

内源性甲状旁腺激素对体外诱导培养破骨细胞的影响

孙 鹏,唐鹏宇,凡 进,张建伟,张 宁*

(南京医科大学第一附属医院骨科,江苏 南京 210029)

[摘 要] **目的:**研究内源性甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)对于体外诱导培养破骨细胞的影响。**方法:**取 8 周龄 PTH^{+/+}和 PTH^{-/-}小鼠各 16 只,分离培养小鼠股骨全骨髓细胞,在含有 10 ng/ml 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的培养皿中培养 24 h,收集未贴壁细胞,即得破骨细胞前体,利用 M-CSF 和核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)刺激形成破骨细胞。根据加入不同 RANKL 浓度分为低浓度(50 ng/ml)和高浓度(100 ng/ml)组。于诱导第 6 天、第 9 天进行抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色,观察破骨细胞形态并计数 40 或 100 倍视野内 TRAP 阳性细胞数量。**结果:**M-CSF 和 RANKL 能够在体外诱导小鼠全骨髓细胞形成 TRAP 阳性的破骨细胞。诱导第 9 天进行 TRAP 染色,同一个视野中形成的 TRAP 阳性破骨细胞数量较诱导第 6 天减少,但是破骨细胞体积和细胞核数量增多。相同浓度 RANKL 刺激下,PTH^{+/+}与 PTH^{-/-}组破骨细胞数量未见明显统计学差异。不同浓度 RANKL 刺激下,高浓度组破骨细胞数量明显多于低浓度组细胞数量。**结论:**内源性 PTH 对于体外 M-CSF 和 RANKL 诱导骨髓培养的破骨细胞数量没有影响,与低浓度组相比,高浓度 RANKL 能够进一步促进破骨细胞数量增加。

[关键词] 甲状旁腺激素;破骨细胞;细胞培养;M-CSF;RANKL

[中图分类号] R681

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-467-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140413

Effect of endogenous parathyroid hormone on osteoclast cultured *in vitro*

Sun Peng, Tang Pengyu, Fan Jin, Zhang Jianwei, Zhang Ning*

(Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To study the effect of endogenous parathyroid hormone (PTH) on osteoclasts (OCs) cultured *in vitro*. **Methods:**Sixteen PTH^{+/+} and sixteen PTH^{-/-} mice with 8-week-old were used in this study. Bone marrow stem cells obtained from mouse femurs were isolated and cultured with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, 30 ng/ml) and different concentration of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL, 50 ng/ml as low concentration group or 100 ng/ml as high concentration group) in culture dishes containing 10 ng/ml M-CSF for 24 h. The tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was performed to observe and count cell morphology and TRAP-positive osteoclasts numbers at 40 or 100 magnified visual field after 6-day and 9-day culturing. **Results:**M-CSF and RANKL induced bone marrow stem cells to form TRAP-positive OCs. TRAP-positive OCs numbers in the same visual field decreased after 9-day culturing compared with that after 6-day culturing, but OCs volume after 9-day culturing became more larger and had more nuclei than after 6-day culturing. In the same concentration of RANKL, no changes were observed in the numbers of TRAP-positive OCs between the PTH^{+/+} groups and the PTH^{-/-} groups. In contrast, either in the PTH^{+/+} or the PTH^{-/-} groups, high concentration of RANKL (100 ng/ml) induce more TRAP-positive OCs. **Conclusion:**Endogenous PTH had no effect on the numbers of osteoclasts cultured *in vitro* in the presence of M-CSF and RANKL. High concentration of RANKL (100 ng/ml) increased the TRAP-positive osteoclast numbers compared with low concentration (50 ng/ml).

[Key words] parathyroid hormon; osteoclast; cell culture; M-CSF; RANKL

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):467-471]

[基金项目] 国家自然科学基金(30973030)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhangning2003@medmail.com

破骨细胞是由单核/巨噬系来源的单核前体细胞相融合而形成的多核巨细胞,是最主要的起骨吸收作用的细胞^[1-2]。它与介导成骨作用的成骨细胞一起调控着骨的形成和骨量的多少^[3]。早在 1990 年有研究者指出,单核/巨噬细胞形成破骨细胞需要适合

的骨髓来源的基质细胞介导^[4]。后来经证实,正是存在于基质细胞中的核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 与破骨细胞前体细胞表面的 RANK 相结合而刺激了破骨细胞的分化激活^[5]。另外一种因子巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), 也在破骨细胞形成过程中起重要作用, 它主要是结合早期破骨细胞前体细胞上的受体 c-FMS, 促进其生长增殖^[3,5]。甲状旁腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 是调节骨代谢的一个重要激素。很多研究发现, 间断性地注射 PTH 能够促进向成骨细胞分化和骨形成, 而持续性注射 PTH 却抑制骨生成^[6]。对于 PTH 与成骨细胞的研究有很多, 但是对于 PTH 与破骨细胞的关系却并不是非常清楚。

有人提出 PTH 间接地影响破骨细胞^[7]。因为 PTH 及 PTH 相关蛋白的相关受体主要存在于成骨细胞, 而破骨细胞及其前体细胞缺乏高亲和性的 PTH 及 PTH 相关蛋白受体^[8]。PTH 上调成骨细胞的 RANKL 基因与蛋白的表达, 通过 RANKL 刺激破骨细胞前体细胞向成熟破骨细胞分化。近年来有研究显示, 外源性 PTH 间断注射, 能够提高破骨细胞前体细胞形成破骨细胞的能力, 但是有趣的是, 这种成熟破骨细胞数量的增多是短暂性的, 随 PTH 间断注射的时间延长, 破骨细胞形成数量并不受影响^[8]。

尽管大多数人认为 PTH 对于破骨细胞的作用是通过成骨细胞介导的, 但是内源性 PTH 对于破骨细胞的作用还不清楚。本研究通过对 PTH 基因敲除小鼠的体外实验, 探索内源性 PTH 缺乏在 M-CSF 和 RANKL 因子的刺激下对于体外诱导破骨细胞数量影响及不同浓度 RANKL 对于体外诱导破骨细胞数量影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

同窝 8 周龄 PTH 野生型小鼠 ($PTH^{+/+}$) 和 PTH 基因敲除小鼠 ($PTH^{-/-}$) 各 16 只 (从加拿大 McGill 大学引进, 饲养于南京医科大学动物中心), 雌雄不限。

1.1.2 实验试剂

α -MEM 培养基 (HyClone 公司, 美国), 胎牛血清 (FBS, HyClone 公司, 美国), 双抗 (Gibco 公司, 美国), 维生素 C (Sigma 公司, 美国), 磷酸盐缓冲液 (PBS, 南通碧云天生物技术研究所在所)。重组鼠 RANKL、重组鼠 M-CSF (PeproTech 公司, 美国)。Leuko-

cyte Acid Phosphatase Kit (Sigma 公司, 美国)。

1.1.3 培养基配制

完全培养基配制: α -MEM 培养基加入 10% 的胎牛血清, 青、链霉素终浓度为 100 U/ml, 维生素 C 终浓度为 50 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

按照基因型鉴定结果将小鼠分为野生型组 ($PTH^{+/+}$) 和纯合子组 ($PTH^{-/-}$) 各 16 只小鼠, 每组基因型中随机分为高浓度 RANKL 作用组与低浓度 RANKL 作用组。取骨髓细胞行破骨细胞诱导培养, 按照分组加入相应浓度诱导因子 RANKL。

1.2.2 破骨细胞分离与培养

骨髓干细胞诱导形成破骨细胞: 参考 Karen Fuller^[9]的培养方法, 分别取 8 周龄 $PTH^{+/+}$ 和 $PTH^{-/-}$ 小鼠各 16 只, 颈部脱臼处死, 75% 酒精浸泡 5 min, 无菌条件下于冰板上分离小鼠的股骨, 在 PBS 液中将骨髓及表面软组织去除干净, 再用 α -MEM 冲洗骨髓腔直至其内面发白, 冲洗后的细胞悬液用 1 ml 注射器针头反复抽吸, 以获得单细胞悬液。将获得的全骨髓细胞用 α -MEM 完全培养基重悬 2 次, 调整细胞密度为 3×10^6 个/ml, 在含有 10 ng/ml M-CSF 的培养皿中培养 24 h, 收集未贴壁细胞, 即得破骨细胞前体, 按细胞密度 1×10^5 个/ml, 接种于放有盖玻片的 6 孔培养板中培养。按照分组加入相应浓度破骨细胞诱导刺激因子, 低浓度组同时加入 M-CSF 30 ng/ml 及 RANKL 50 ng/ml。高浓度组同时加入 M-CSF 30 ng/ml 及 RANKL 100 ng/ml。每 3 d 半量换液, 培养 6、9 d 后分别将盖玻片进行抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色, 观察细胞形态并计算比较破骨细胞数量。

1.2.3 细胞 TRAP 染色和破骨细胞计数

取盖玻片, 无菌 PBS 冲洗 3 次, 用 2.5% 戊二醛固定细胞 30 min, PBS 冲洗 3 次。按照说明书配制 TRAP 染色液。将盖玻片放入染色液中, 37℃ 孵育 1 h。PBS 冲洗 3 遍。将染色好的盖玻片置于倒置显微镜下观察拍照。TRAP 阳性细胞计数为破骨细胞。随机取 10 个低倍及高倍视野进行破骨细胞计数。

1.3 统计学方法

使用 SPSS11.0 统计软件进行统计学检验, 计数资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间采用 t 检验, 多组间采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK- q 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 RANKL 与 M-CSF 能够诱导骨髓细胞形成破骨细胞

分离骨髓细胞得到破骨细胞前体细胞,在 M-CSF(30 ng/ml)和 RANKL(50 ng/ml)刺激下能生长成破骨细胞。诱导刺激第 6 天时,可见细胞体积明显增大的单核 TRAP 阳性细胞。刺激 9 d 后,TRAP 阳性细胞数量较第 6 天时减少,但是体积增大明显,细胞核数量明显增多(图 1)。在 100 倍视野中,统计学分析第 6 天时单核 TRAP 阳性细胞数量多于第

9 天时的多核 TRAP 阳性巨细胞数量(14.90 ± 3.25 vs 4.50 ± 1.43 , $P < 0.05$)。培养时间越长,细胞数量越少,细胞核越多,体积越大,这可能由于在诱导过程中,单核破骨细胞不断融合,形成多核的巨型破骨细胞。

2.2 PTH^{+/+}和 PTH^{-/-}小鼠骨髓诱导形成的破骨细胞数量未见明显差异

经 M-CSF 和 RANKL 诱导 9 d,PTH^{+/+}和 PTH^{-/-}小鼠骨髓细胞在 30 ng/ml 的 M-CSF 和 50 ng/ml 的 RANKL 刺激下均能形成巨大的多核破骨细胞(图 2),两组间破骨细胞数量未见统计学差异(表 1)。

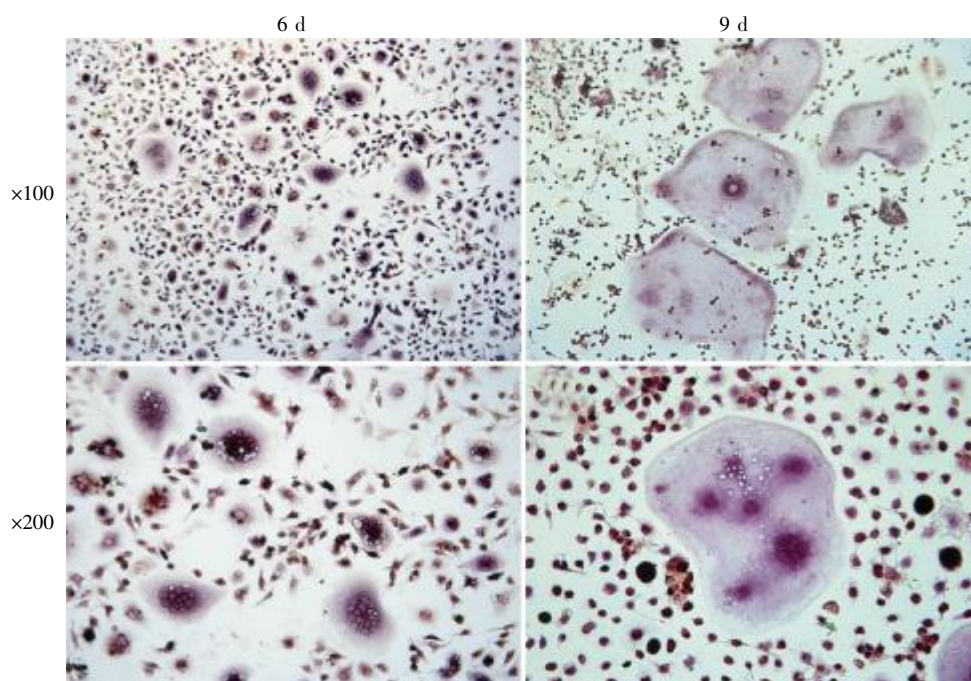


图 1 TRAP 染色结果

Figure 1 TRAP staining

2.3 高浓度 RANKL 刺激骨髓细胞引起破骨细胞数量增多

在相同 M-CSF (30 ng/ml) 浓度下,不同浓度 RANKL 作用能够引起诱导形成的破骨细胞数量发生变化。高浓度组的 RANKL(100 ng/ml)较低浓度组 RANKL(50 ng/ml),诱导形成的破骨细胞数量明显上升(图 2,表 1)。但是不同基因型组在高浓度 RANKL(100 ng/ml)作用下,诱导形成的破骨细胞数量依然没有差异($P < 0.05$)。

3 讨 论

骨在人的一生中都在不断地重塑过程中,这一过程包括了骨吸收和骨合成两个过程。人的整个骨

骼都在发生着这样的微小规模的重建。骨重建是成年人调节骨结构和功能的主要代谢过程,而这一过程中一个关键的参与者就是破骨细胞。任何影响破骨细胞的因素都可能影响骨的结构和功能,并造成骨质疏松、骨硬化症等骨骼方面的疾病甚至影响人的寿命^[2]。

影响破骨细胞的因素有很多,包括 PTH、1,25-二羟维生素 D₃ [1,25-(OH)₂D₃]、前列腺素 E₂ (PGE₂)和白细胞介素 1(IL-1)等,在一定条件下它们都能引起破骨细胞的变化。但是对于破骨细胞起直接作用的因素主要有 M-CSF 和 RANKL,这两个因子在破骨细胞的分化成熟中起着重要作用。M-CSF 是破骨细胞前体细胞分化增殖所必要的的一个因

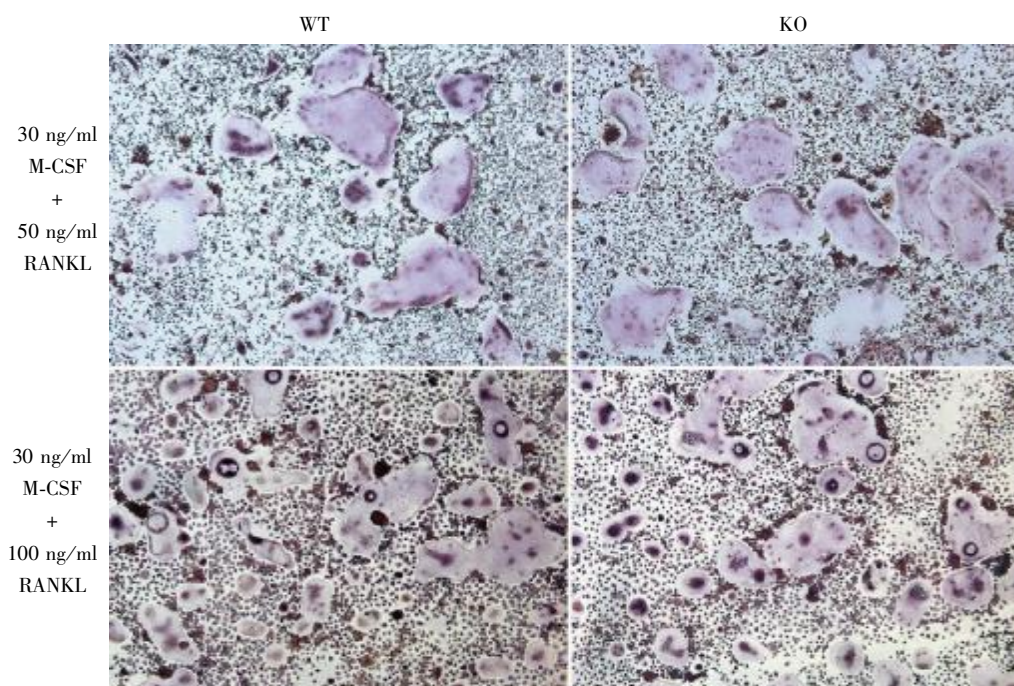
图2 不同浓度 RANKL 作用下第 9 天骨髓细胞的 TRAR 染色($\times 40$)Figure 2 TRAR staining ($\times 40$)

表1 诱导第9天破骨细胞数量

Table 1 Number of osteoclasts after 9-day culturing

分组	RANKL(ng/ml)		P 值
	50	100	
WT 组	9.90 ± 2.02	21.90 ± 3.87	<0.05
KO 组	9.50 ± 1.78	23.3 ± 5.12	<0.05
P 值	0.799	0.375	

子^[9]。而 RANKL 也被认为是刺激破骨细胞分化的重要因子^[10-11]。体外破骨细胞诱导研究显示, M-CSF 和 RANKL 可有效诱导骨髓细胞向破骨细胞分化而不需要其他因子的参与^[2]。

近年来, 对于破骨细胞与 PTH 的研究增多。PTH 也被美国食物与药物管理局 (Food and Drug Administration) 认可为治疗骨质疏松症的药物。但有趣的是, 体内 PTH 的作用取决于注射的量和频率。对于 PTH 的具体作用机制还并不是很清楚。对于 PTH 与破骨细胞的研究也比较少。大多学者认为, 破骨细胞缺乏 PTH 相关受体, 因此 PTH 对于破骨细胞的作用是间接的, 需要通过其他一些基质细胞的介导才能发挥作用^[11]。许多利用成骨细胞与造血干细胞共培养的实验也形成共识, 认为成骨及骨髓来源的基质细胞对于破骨细胞分化起着重要调节作用^[1]。但是间断性注射 PTH 能够短暂性增加破骨细胞祖细胞的数量, 从而一过性引起破骨细胞数量增

加^[8]。这些对于 PTH 与破骨细胞的研究都是使用体外注射 PTH 片段的方法, 对于内源性 PTH 缺失后对于体外破骨细胞的影响如何目前尚无结论。本研究利用 PTH 基因敲除小鼠, 通过体外骨髓细胞诱导培养破骨细胞, 观察破骨细胞数量以及不同浓度因子刺激对其影响。

本研究发现, 相同浓度的 M-CSF 和 RANKL 刺激下, PTH 野生型 (+/+) 和 PTH 纯合子 (-/-) 两组细胞形成的破骨细胞数量并无差异。这表明, 内源性的 PTH 缺乏对于体外 M-CSF 和 RANKL 刺激骨髓诱导破骨细胞形成的破骨细胞数量没有影响。这一结论也与大多数人所认可的 PTH 需要通过成骨及其他骨髓基质细胞影响破骨细胞的观点相一致。

另外, 本研究还利用不同浓度细胞因子诱导形成破骨细胞。M-CSF 和 RANKL 两种重要的刺激因子对于破骨细胞的作用目前尚存在争议。M-CSF 对于破骨细胞作用的相关研究, Fujikawa 等^[12]培养人的破骨细胞发现, M-CSF 为 10~100 ng/ml 浓度时, 能诱导破骨细胞生成, 且呈浓度依赖性。Matsuzaki 等^[13]也认为高浓度 M-CSF 不会抑制破骨细胞。但是 Hodge 等^[14]同样研究人破骨细胞体外培养, 结果只有在低浓度 M-CSF 刺激下, 破骨细胞形成和增殖呈浓度依赖性, 而 > 25 ng/ml 时即没有明显差别。并且当 M-CSF 浓度为 100 ng/ml 时会显著抑制破骨细

胞形成。而且当进行鼠的破骨细胞体外培养发现,当 M-CSF 浓度 $> 40 \text{ ng/ml}$ 时即会抑制破骨细胞形成^[10]。目前国内外大多数学者进行破骨细胞诱导时,多选择较低浓度 M-CSF。因此本研究参考大量文献,使用 M-CSF 浓度为 30 ng/ml 。对于 RANKL 浓度对于破骨细胞目前的影响也存在争议。国内有学者认为在 M-CSF 浓度不变条件下,增加 RANKL 浓度并不能引起破骨细胞数量上的差异,体外 C-CSF 和 RANKL 诱导大鼠破骨细胞形成的最佳浓度分别为 30 与 50 ng/ml ^[15]。然而亦有学者研究得出使用 100 ng/ml 浓度 RANKL 较 50 ng/ml 更有利于破骨细胞的分化和生成^[16]。考虑到 RANKL 能够直接作用于破骨细胞并对其产生影响,并且对于 RANKL 浓度对于破骨细胞影响的研究尚少,因此本研究体外使用不同浓度的 RANKL 诱导破骨细胞。结果在本研究中发现高浓度 RANKL(100 ng/ml)较低浓度(50 ng/ml)更有利于破骨细胞的形成。

综上所述,内源性 PTH 缺乏对于体外利用 M-CSF 和 RANKL 因子刺激骨髓诱导破骨细胞没有影响,但是不同浓度的 RANKL 能够引起破骨细胞数量改变,高浓度的 RANKL 能明显增加破骨细胞数量。

但是本研究有局限之处。此次研究都是在体外培养破骨细胞的结果。而在体内,由于成骨以及其他细胞的影响,PTH 对于破骨细胞的影响过程较为复杂。关于内源性 PTH 对于体内破骨细胞的影响及其机制还有待进一步研究。并且,RANKL 浓度的变化对于破骨细胞的影响及其机制尚无定论,本研究缺乏完整的浓度梯度以证实 RANKL 对于破骨细胞的影响。

[参考文献]

- [1] Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation[J]. *Endocr Rev*, 1992, 13(1): 66-80
- [2] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation [J]. *Nature*, 2003, 423 (6937): 337-342
- [3] Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts [J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1504-1508
- [4] Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. Origin of osteoclasts; mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(18): 7260-7264
- [5] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation[J]. *Cell*, 1998, 93(2): 165-176
- [6] Frolik CA, Black EC, Cain RL, et al. Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure [J]. *Bone*, 2003, 33(3): 372-379
- [7] Zhao W, Byrne MH, Boyce BF, et al. Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(4): 517-524
- [8] Jacome-Galarza CE, Lee SK, Lorenzo JA, et al. Parathyroid hormone regulates the distribution and osteoclastogenic potential of hematopoietic progenitors in the bone marrow[J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(6): 1207-1216
- [9] Fuller K, Kirstein B, Chambers TJ. Murine osteoclast formation and function; differential regulation by humoral agents[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(4): 1979-1985
- [10] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation[J]. *Cell*, 1998, 93(2): 165-176
- [11] Fuller K, Owens JM, Chambers TJ. Induction of osteoclast formation by parathyroid hormone depends on an action on stromal cells[J]. *J Endocrinol*, 1998, 158(3): 341-350
- [12] Fujikawa Y, Sabokbar A, Neale SD, et al. The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor- α , and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells[J]. *Bone*, 2001, 28(3): 261-267
- [13] Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, et al. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 246(1): 199-204
- [14] Hodge JM, Kirkland MA, Nicholson GC. Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 102(3): 759-768
- [15] 王晓庚, 刘文佳, 周 洪, 等. 不同浓度破骨细胞分化因子和巨噬细胞集落刺激因子体外诱导大鼠破骨样细胞形成的研究[J]. *口腔医学*, 2008, 28(4): 169-172
- [16] 董 伟, 于 静, 戚孟春, 等. M-CSF、RANKL 浓度及 M-CSF 预诱导对破骨细胞生成影响的研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2010, 27(6): 1336-1340

[收稿日期] 2013-12-08