

白细胞介素 29 抑制破骨细胞分化的研究

彭秋月¹, 宣文华², 石雨濛², 谈文峰², 王芳³, 张前德^{1*}

(¹南京医科大学中西医结合研究所, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第一附属医院风湿免疫科, ³心血管内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 新型细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-29 具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等作用, 但其在破骨细胞分化中的作用尚未见报道。本研究探讨 IL-29 对核因子 κ B 受体活化因子配基(receptor activation of nuclear- κ B ligand, RANKL)诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7(破骨前体细胞)向破骨细胞分化的作用。方法: 流式检测 IL-29 特异性受体 IL-28R α 在 RAW264.7 细胞表面的表达, CCK8 法检测 IL-29 对 RAW264.7 细胞增殖的影响。不同浓度 IL-29 重组因子加入到 RANKL 诱导的 RAW264.7 向破骨细胞分化的体系中, 5 d 后通过抗酒石酸酸性磷酸酶染色检测 IL-29 对破骨细胞数目的影响。实时荧光定量 PCR 检测 IL-29 对破骨细胞标志性基因 TRAP、CTR、CTSK 及相关基因 TRAF6、RANK 表达的影响。结果: IL-29 呈剂量依赖性抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 中破骨细胞的形成, 100 ng/mL IL-29 可显著抑制破骨细胞的形成以及破骨细胞形成相关基因 TRAP、CTR、CTSK、TRAF6、RANK 的表达。结论: 本研究首次证实 IL-29 可以抑制破骨细胞形成及其功能。

[关键词] 白细胞介素 29; 破骨细胞; 类风湿关节炎

[中图分类号] R336

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)03-313-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160312

Inhibitory effect of interleukin 29 on osteoclast differentiation

Peng Qiuyue¹, Xuan Wenhua², Shi Yumeng², Tan Wenfeng², Wang Fang³, Zhang Qiande^{1*}

(¹Integrative Medicine Institute, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Rheumatology, ³Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** The novel cytokine interleukin(IL)-29 has been reported to induce antiviral, antitumor, and immune responses. However, the effect of IL-29 on osteoclast differentiation remains unclear. This study aimed to explore the effect of IL-29 on osteoclast differentiation and function in RANKL-induced in RAW264.7 cells (osteoclast precursors). **Methods:** The expression of IL-28R α (specific receptor of IL-29) on RAW264.7 cells was evaluated by flow cytometry. RAW264.7 cells were stimulated with RANKL and different doses of recombinant IL-29 for 5 d, then the osteoclast formation was evaluated by counting multinucleated cells for tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) staining. Furthermore, the effect of IL-29 on the RANKL-induced expression of osteoclastic genes(TRAP, CTR and CTSK) and relevant genes(TRAF6 and RANK) was detected by real time PCR. **Results:** IL-29 inhibited the osteoclast formation in a dose-dependent manner in RANKL-induced RAW264.7 cells, and the dose of 100 ng/ml IL-29 significantly reduced the number of TRAP positive multinucleated cells and mRNA expression of osteoclastic genes(TRAP, CTR and CTSK) and relevant genes(TRAF6 and RANK). **Conclusion:** The findings in the present study indicate, for the first time, that IL-29 could inhibit osteoclast formation and function.

[Key words] interleukin 29; osteoclast; rheumatoid arthritis

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(03):313-317]

白细胞介素(interleukin, IL)-29, 又称为干扰素(interferon, IFN)- λ 1, 是 2003 年首次被报道的干扰

素超家族中的新成员, 是一种新型细胞因子, 被称为 III 类 IFN, 包括 IL-29 (IFN- λ 1)、IL-28A (IFN- λ 2)、IL-28B (IFN- λ 3), 三者中以 IL-29 活性最强^[1]。IL-29 的受体位于细胞表面, 由 IL-10R2(与 IL-10、IL-19、IL-26 共享) 和对 IL-29 特异性的 IL-28Ra (IFN- λ R1) 两部分组成。因此 IL-29 又与 IL-10、

[基金项目] 国家自然科学基金(81471610, 81471611)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhangqiande@njmu.edu.cn

IL-19、IL-26、I类IFN和II类IFN等一样,同属于II类细胞因子受体家族。IL-10R2受体在体内各种组织中均有表达,而IL-28Ra受体的表达具有组织和细胞选择性,IL-28Ra受体选择性的表达使得IFN- λ 比IFN- α 、 β 和 γ 具有更好的特异性和独特的生物学功能,其在不同类型疾病和细胞中发挥不同的生物学作用^[2-4]。过去对IL-29功能的研究主要集中在其抗病毒活性和抗肿瘤作用^[5-6],但近几年发现IL-29在免疫调节和炎症反应中也具有重要作用^[7-8]。

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是临床上常见的自身免疫性疾病,慢性滑膜炎和骨侵蚀是RA的两个主要病理特点,也是关节毁损的最根本原因。破骨细胞作为影响骨吸收的主要细胞在RA骨侵蚀中发挥了重要作用^[9]。破骨细胞主要来源于骨髓系造血干细胞、滑膜成纤维细胞、活化的T淋巴细胞等多种单核细胞,其激活和分化受到多种细胞因子(如IL-1、IL-6、IL-17和IL-23)的调控,其中巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)和核因子 κ B受体活化因子配基(receptor activation of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)是最重要的两个细胞因子^[10-11]。新型细胞因子IL-29在破骨细胞形成中的作用尚未见任何报道。本研究初步探讨了IL-29在RANKL诱导RAW264.7(破骨前体细胞)向破骨细胞形成过程中的作用及机制,为RA的治疗提供新依据。

1 材料和方法

1.1 材料

RAW264.7细胞由本室保存。8周龄ICR小鼠8只,体重(20±5)g,购自南京大学模式动物研究所。 α -MEM培养液和胎牛血清(Gibco公司,美国);IL-28Ra抗体及驴抗山羊IgG(Abcam公司,美国),重组细胞因子IL-29和重组RANKL(Peprotech公司,美国);抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色试剂盒(Sigma-Aldrich公司,美国),RNA逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本),CCK-8检测试剂盒(Dojindo公司,日本),高纯总RNA快速提取试剂盒(南京赛研公司),荧光定量PCR试剂(Applied Biosystems公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7细胞培养和破骨细胞诱导

小鼠巨噬细胞RAW264.7培养于含10%胎牛血清、1%青链霉素的高糖DMEM培养液中,置37℃

5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养。破骨细胞诱导条件:含50 ng/mL RANKL的 α -MEM培养基培养5 d,隔天换液。

1.2.2 流式细胞术检测RAW264.7细胞表面IL-28Ra受体的表达

收集对数生长期RAW264.7细胞,PBS洗涤2次,300 g离心5 min,每管取1×10⁶个细胞,3%BSA室温避光封闭30 min后,300 g离心5 min弃上清。PBS重悬细胞,加入一抗(IL-28Ra抗体)室温避光孵育30 min后,PBS洗涤3次,300 g离心5 min后以冷PBS重悬细胞。加入二抗(驴抗山羊IgG H & L, 1:2 000稀释),室温避光孵育30 min,PBS洗涤3次,300 g离心5 min后,以400 μ L PBS重悬细胞,FACS cslibur流式细胞仪检测。

1.2.3 CCK8法测定IL-29对RAW264.7细胞活性影响

取对数生长期RAW264.7细胞接种到96孔板中,接种数目为2 000个/孔,每孔含100 μ L α -MEM完全培养基(含10%胎牛血清、1%青链霉素),于37℃ 5%CO₂培养箱中培养24 h。分为空白对照组,不同浓度IL-29(1、10、100 ng/mL)处理组,每组设6个复孔。细胞培养72 h后,每孔加入10 μ L CCK8试剂,放入培养箱中继续孵育2 h,用酶标仪测定450 nm处的吸光度值。

1.2.4 TRAP染色

取对数生长期RAW264.7细胞接种于24孔板,实验分为5组:①正常对照组;完全 α -MEM培养基培养;②诱导对照组;50 ng/mL RANKL的 α -MEM培养基处理组;③1 ng/mL IL-29和50 ng/mL RANKL的 α -MEM培养基处理组;④10 ng/mL IL-29和50 ng/mL RANKL的 α -MEM培养基处理组;⑤100 ng/mL IL-29和50 ng/mL RANKL的 α -MEM培养基处理组。细胞于37℃ 5% CO₂培养箱中孵育,隔天换液。在诱导第5天用4%多聚甲醛固定细胞40 min,PBS洗涤3次后,按照TRAP染色试剂盒说明书进行染色并拍照。光镜下观察细胞形状不规则且体积大,酶活性部分(胞质)呈砖红色,细胞核呈蓝紫色,细胞核 \geq 3个的巨噬细胞为TRAP阳性,即为破骨细胞。随机计数5个视野内破骨细胞数量并统计。

1.2.5 实时荧光定量PCR(real-time PCR)检测破骨细胞表面相关基因表达

取对数生长期RAW264.7细胞接种于24孔板,实验分组同1.2.4。每组设4个复孔,于37℃ 5%CO₂培养箱中孵育,隔天换液。诱导5 d后分别收集各组

细胞提取 RNA,采用 TaKaRa 试剂盒逆转录,荧光定量 PCR 检测各组破骨细胞表面相关基因的表达。荧光定量 PCR 反应体系为:Power SYBR Green PCR Maste Mix (2×) 2.5 μL,cDNA 1 μL,上下游引物各 0.125 μL

和双蒸水 1.25 μL,每个样本设 3 个复孔。PCR 反应条件为 95℃ 10 min,40 个循环 (95℃ 15 s,60℃ 1 min)。以小鼠 18s 作为内参基因,2^{-ΔΔCt} 法分析基因的相对表达。基因引物由美国 Invitrogen 公司合成(表 1)。

表 1 PCR 引物碱基序列

Table 1 Sequences of PCR primers

基因	上游(5'→3')	下游(5'→3')
TRAP	CCAATGCCAAAGAGATCGCC	TCTGTGCAGAGACGTTGCCAAG
CTR	TCAGGAACCACGGA ATCCTC	ACATTC-AAGCGGATGCGTCT
CTSK	GACGCAGCGATGCTAACTAA	CCAGCACAGAGT-CCACAACCT
18s	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	GGACATCTAAGGGCATCAC
RANK	ACCTTCCAGTCAGCAAGAAGT	TCCTCCAGTCAGCAAGAAGT
TRAF6	AAGATTGGCAACTTTGGGATG	GTGGGATTGTGGGTCGCTG

2 结果

2.1 RAW264.7 细胞表面 IL-28Rα 的表达

IL-28Rα 是 IL-29 的特异性受体,IL-29 与其结合后通过 STAT 等信号通路发挥独特的生物学功能。流式检测结果显示 IL-28Rα 在 RAW264.7 细胞表面有阳性表达(图 1),表明 RAW264.7 可以接受外界 IL-29 刺激并发挥生物学作用。

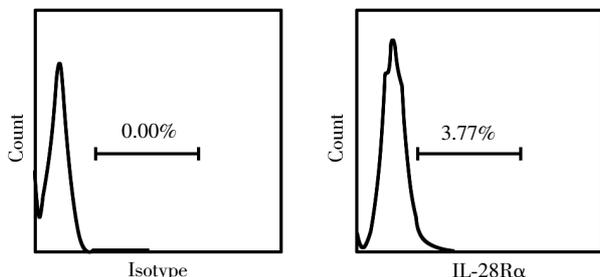


图 1 流式检测 RAW264.7 细胞表面 IL-28Rα 的表达

Figure 1 The expression of IL-28Rα on RAW264.7 cells

2.2 IL-29 对 RAW264.7 细胞活性的影响

CCK8 法检测不同浓度 IL-29(1、10、100 ng/mL)对 RAW264.7 细胞活性的影响。结果表明 IL-29 刺激 RAW264.7 细胞 72 h 后,与正常对照组相比,细胞活性未见明显差异(图 2)。提示以上浓度可以作为 RAW264.7 破骨细胞诱导分化体系中的作用浓度。

2.3 IL-29 对 RAW264.7 细胞诱导破骨细胞分化功能的影响

RANKL(50 ng/mL)诱导 RAW264.7 细胞分化,同时分别加入 1、10、100 ng/mL IL-29 共培养。5 d 后,通过 TRAP 染色观察不同浓度 IL-29 对破骨细胞分化的影响,并且相同倍数(10 倍)光镜下随机选取 5 个视野计数破骨细胞数目(图 3)。结果表明,加入 IL-29 处理组,诱导出的破骨细胞与 RANKL 对照组相比,破骨细胞体积小,破骨细胞数目明显减少,

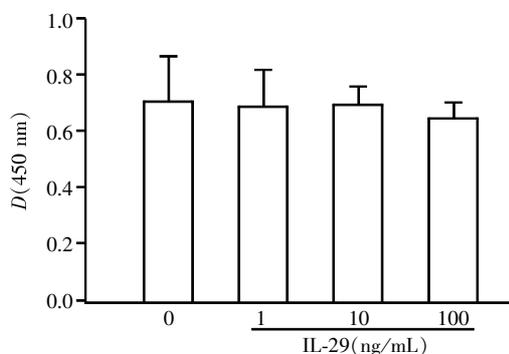


图 2 CCK8 检测 IL-29 对 Raw264.7 细胞活力的影响

Figure 2 The effect of IL-29 on viability of the RAW264.7 cells

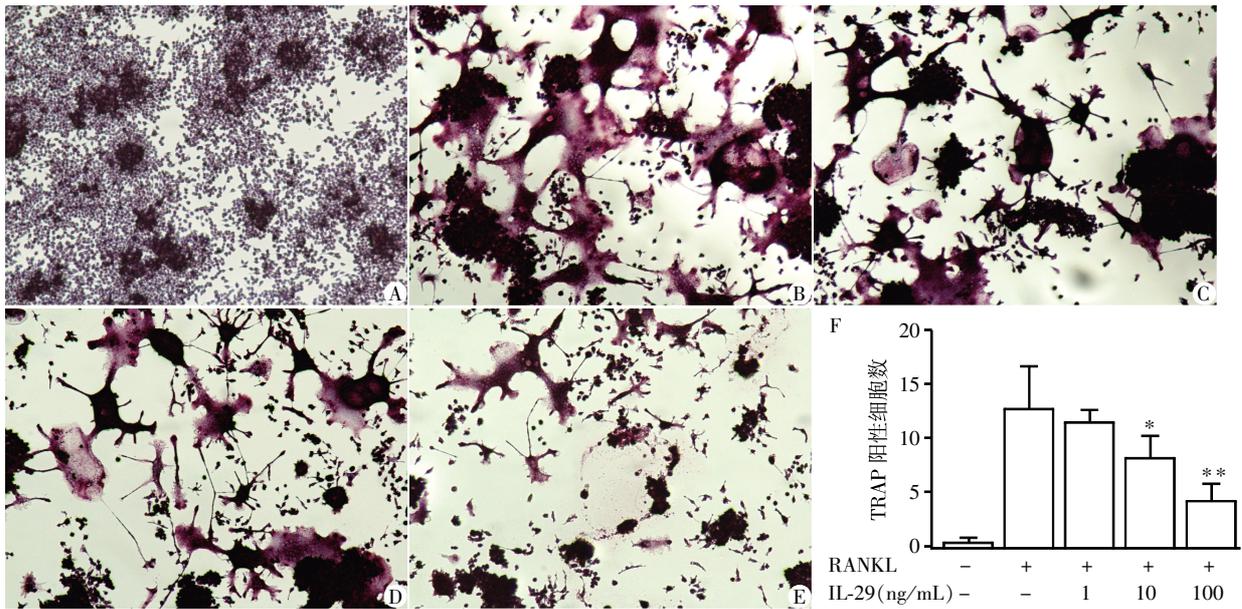
其中 100 ng/mL 组减少最为明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 IL-29 对 RAW264.7 细胞诱导破骨分化相关基因表达的影响

RANKL(50 ng/mL)分别与 1、10 和 100 ng/mL IL-29 诱导 RAW264.7 细胞分化 5 d 后,荧光定量 PCR 检测不同浓度 IL-29 对 RAW264.7 细胞诱导出的破骨细胞相关基因的表达。结果显示:RANKL 诱导组与正常对照组(培养基组)相比,相关基因 TRAP、CTR、CTSK、RANK、TRAF6 基因表达均显著升高($P < 0.05$)。与 RANKL 诱导组相比,IL-29 (1、10、100 ng/mL) 处理均可降低 TRAP、CTR、CTSK 及相关基因 TRAF6、RANK 表达,且呈剂量依赖性,其中,IL-29 100 ng/mL 对以上 5 个基因的抑制作用具有显著统计学意义($P < 0.01$,图 4)。

3 讨论

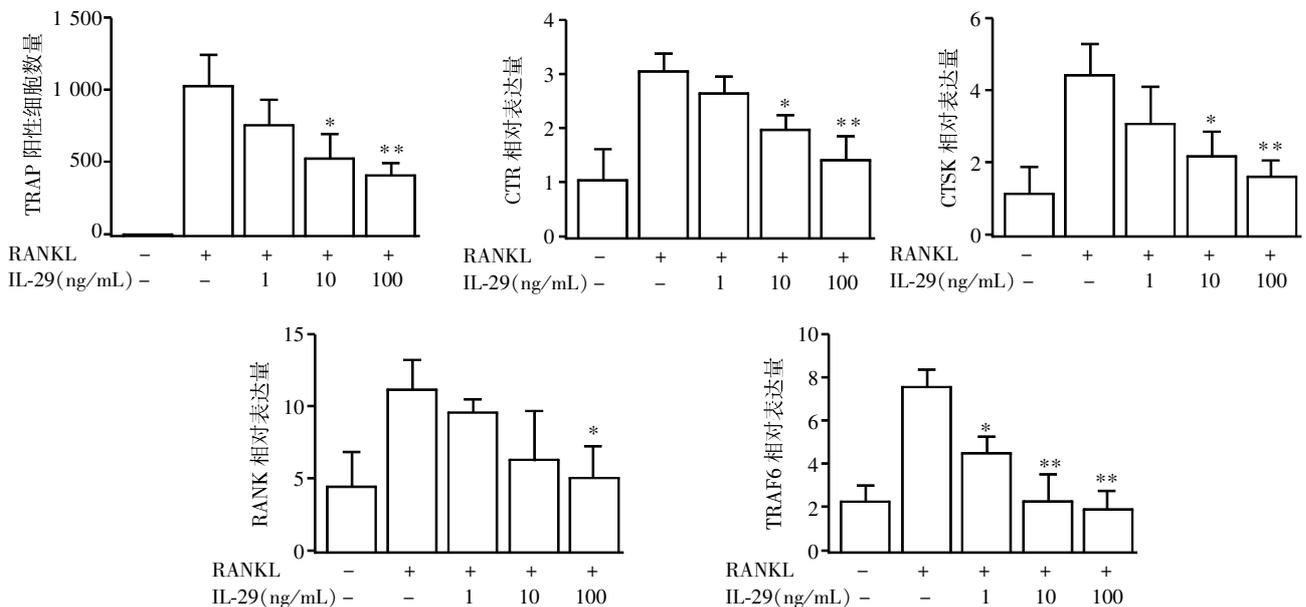
本研究采用流式细胞计数、CCK8、TRAP 染色以及荧光定量 PCR 方法分析外源性 IL-29 对破骨前体细胞 RAW264.7 诱导分化破骨细胞的影响,初



A: 空白组; B: RANKL 诱导组; C: RANKL+IL-29 (1 ng/mL); D: RANKL+IL-29 (10 ng/mL); E: RANKL+IL-29 (100 ng/mL); F: TRAP 阳性细胞统计图(相同倍数光镜下随机选取 5 个视野, 计数破骨细胞数目, $n=5$)。与 RANKL 诱导组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 IL-29 对 RAW264.7 破骨细胞分化的影响($\times 10$)

Figure 3 The effect of IL-29 on osteoclast differentiation of RAW264.7 cells($\times 10$)



与 RANKL 诱导组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=4$)。

图 4 IL-29 对破骨细胞分化标志性基因及相关基因的影响

Figure 4 The effect of IL-29 on the RANKL-induced expression of osteoclastic genes and relevant genes

步论证了 IL-29 对破骨细胞分化和形成的抑制作用。结果显示,与 RANKL 诱导组相比,IL-29(1、10、100 ng/mL) 呈剂量依赖性降低破骨细胞形成的数量, 以及破骨细胞形成相关标记性基因 TRAP、CTR、CTSK 及相关基因 TRAF6、RANK 的表达水平, 并且以 IL-29 100 ng/mL 的抑制作用最明显。

IFN 是第 1 个应用于临床的基因工程产品,

IFN α/β 在治疗病毒性疾病、肿瘤、自身免疫性疾病中已取得了显著疗效。但干扰素治疗也有明显的不良反应,如疲劳、发热、食欲缺乏、情绪低落、骨髓抑制和神经毒副作用等^[12]。干扰素治疗面临的巨大挑战是降低不良反应。IL-29 也被证明在体内外对多种病毒具有直接的抗病毒效应,并具有明显的种属特异和不良反应小等特点^[13]。在正常状态下,IL-29 的

mRNA 在血、脑、肺、心脏和扁桃体等多种组织中有微量表达,在 poly (I:C)、PGN 或 LPS 的刺激下,或者在病毒感染的情况下,IL-29 mRNA 含量在多种细胞中均明显升高^[4]。IL-29 的信号转导机制类似干扰素 α/β ,都是通过诱导受体异二聚体化,活化 Jak-STAT、MAPK 等信号通路,进而发挥抗病毒、抗细胞增殖等生物学作用。不同的是 IL-29 通过诱导其独特受体 IL-28R α 和 IL-10R2 异二聚化从而发挥生物学功能。因而 IL-29 有望替代或辅助干扰素治疗^[15]。

骨侵蚀可以发生在多种疾病的病理过程中,如恶性肿瘤、代谢性疾病和慢性炎性疾病,其中最为常见的是 RA。大量研究表明,活化的破骨细胞是 RA 骨侵蚀中唯一具有吸收功能的细胞,具有极其重要的作用。RANKL 是 TNF- α 超家族的主要成员,表达于成骨细胞和基质细胞,是破骨细胞分化、成熟的启动因子。RANKL 与其破骨细胞前体表面的受体 RANK 结合后,可以促进破骨细胞前体分化为破骨细胞,刺激破骨细胞活化及延长破骨细胞存活时间,并且抑制破骨细胞凋亡^[9]。2000 年《Nature》报道,IFN- γ 可以通过降解 TRAF6 蛋白抑制 RANKL 诱导的破骨细胞的形成^[15]。因 IL-29 与 IFN- γ 具有类似的生物学功能,我们推测 IL-29 可能在 RANKL 诱导的破骨细胞分化中具有重要作用。本研究利用 RANKL 诱导 RAW264.7 破骨细胞分化,初步研究了 IL-29 在该体系中的抑制作用。本研究结果不仅发现了 IL-29 新的生物学功能,而且为进一步了解骨侵蚀发病机制和寻找治疗 RA 的新靶点提供了研究基础。但 IL-29 抑制破骨细胞分化抑制作用需要进一步动物实验验证,作用机制也有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, et al. IFN-lambda s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 69-77

[2] Megjugorac NJ, Gallagher GE, Gallagher G. Modulation of human plasmacytoid DC function by IFN-lambda1 (IL-29)[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(6): 1359-1363

[3] Xu LX, Feng XK, Tan WF, et al. IL-29 enhances Toll-like receptor-mediated IL-6 and IL-8 production by the synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients [J].

Arthritis Res Ther, 2013, 15(5): R170

[4] Liu BS, Janssen HL, Boonstra A. IL-29 and IFN alpha differ in their ability to modulate IL-12 production by TLR-activated human macrophages and exhibit differential regulation of the IFN gamma receptor expression[J]. *Blood*, 2011, 117(8): 2385-2395

[5] Muir AJ, Shiffman ML, Zaman A, et al. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection[J]. *Hepatology*, 2010, 52(3): 822-832

[6] Lasfar A, Abushahba W, Balan M, et al. Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy[J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2011: 349575

[7] Groen RA, Boltjes A, Hou J, et al. IFN- λ -mediated IL-12 production in macrophages induces IFN- γ production in human NK cells[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(1): 250-259

[8] Wolk K, Witte K, Witte E, et al. IL-29 is produced by TH17 cells and mediates the cutaneous antiviral competence in psoriasis[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(204): 204ra129

[9] Schett G, Gravallesse E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(11): 656-664

[10] Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions[J]. *J Dent Res*, 2013, 92(10): 860-867

[11] Danks L, Takayanagi H. Immunology and bone [J]. *J Biochem*, 2013, 154(1): 29-39

[12] 聂钰君, 黄星原, 王世红. 干扰素 $\lambda 2$ 对急性病毒性心肌炎小鼠凋亡相关蛋白的研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(4): 296-300

[13] Li M, Liu X, Zhou Y, et al. Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(1): 23-32

[14] Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-Lambda: A new addition to an old family [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2010, 30(8): 555-564

[15] Kotenko SV. IFN- λ s [J]. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23(5): 583-590

[16] Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ [J]. *Nature*, 2000, 408(6812): 600-605

[收稿日期] 2015-10-19