

· 基础研究 ·

Trio对破骨细胞的调控作用

杨芷雯, 顾嘉雯, 袁礼婵, 孟 丽, 马俊青, 陈文静*

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 南京医科大学附属口腔医院口腔正畸科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 构建破骨细胞特异性 Trio 基因敲除小鼠模型, 探究 Trio 在骨改建过程中对破骨细胞的影响。方法: 应用 cre-loxp 系统培育破骨细胞特异性 Trio 基因敲除小鼠, Micro-CT 扫描小鼠股骨, 股骨组织切片采用 HE 染色、抗酒石酸酸性磷酸酶染色观察成骨细胞及破骨细胞数量。使用核因子(nuclear factor, NF)- κ B 受体活化因子配体及巨噬细胞集落刺激因子诱导小鼠骨髓细胞分化为破骨细胞, 观测 Trio 对破骨细胞形成的影响。结果: Trio 基因敲除小鼠的体型小, Micro-CT 显示骨密度及相关参数升高。组织学染色表明基因敲除小鼠股骨的骨量增加, 破骨细胞变少。体外实验中, Trio 基因敲除小鼠骨髓细胞诱导分化的破骨细胞数量减少。结论: 成功构建破骨细胞特异性 Trio 基因敲除小鼠模型, Trio 敲除后, 小鼠骨量增加, 破骨细胞的分化受到抑制。

[关键词] Trio; 破骨细胞; 细胞特异性敲除

[中图分类号] R336

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)09-1297-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20200909

Regulatory effects of Trio on osteoclasts

YANG Zhiwen, GU Jiawen, YUAN Lichan, MENG Li, MA Junqing, CHEN Wenjing*

Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, Department of Orthodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to construct osteoclast-special Trio gene knockout mouse model and explore the effects of Trio on osteoclasts. **Methods:** Osteoclast-special Trio gene knockout mice were cultivated by cre-loxp recombination system. Micro-CT was used to scan femurs. The histologic sections of femurs were stained with HE staining, and tartrate resistant acid phosphatase staining to observe number of osteoblasts and osteoclasts. Mouse bone marrow cells were treated with macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) for differentiation to discover the effects of Trio on osteoclasts. **Results:** The mice of Trio knockout group showed small body size. The result of Micro-CT revealed bone mass and related indexes increased. Histologic sections staining displayed that the bone mass of femur increased and osteoclasts decreased in gene knockout mice. *In vitro*, the number of osteoclasts differentiated from bone marrow cells decreased in mice of Trio knockout group. **Conclusion:** osteoclast-specific Trio gene knockout mouse model was successfully established. The bone mass of Trio gene knockout mice increased, and osteoclast differentiation was inhibited.

[Key words] Trio; osteoclast; cell-special knockout

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(09): 1297-1301, 1343]

成骨细胞介导的骨形成和破骨细胞介导的骨吸收共同维持着骨平衡的动态稳定^[1]。破骨细胞是多核的骨吸收细胞, 来源于造血前体的单核/巨噬细

[基金项目] 国家自然科学基金(81771029); 江苏省高校优势学科建设工程(JX10531803)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chenwenjing_orth@163.com

胞谱系。巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)和核因子 NF- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)是破骨细胞生成过程中两种关键的细胞因子^[2]。破骨细胞的分化过程和骨吸收功能与细胞骨架密切相关。在破骨细胞骨吸收阶段, 首先形成封闭带, 随后形成皱褶缘。封闭带是致密伪足小体

排布而成的肌动蛋白环,它紧密地将破骨细胞附着在骨骼上,为骨骼降解创造了有利的酸性微环境^[3-4]。

Trio基因属于Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide-exchange factor, GEF)家族成员,该家族可在细胞中促进Rho GTPases与二磷酸鸟苷(guanosine diphosphate, GDP)的解离和三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)的结合进而激活一系列生物反应^[5],其中最主要的功能是调节肌动蛋白、细胞骨架的重组和促进细胞的迁移^[6],且可能参与破骨细胞封闭区的形成^[7]。Trio全身敲除小鼠因胚胎大脑和肌肉发育出现明显缺陷而具有胚胎致死性^[8],因此Trio在破骨细胞中的作用有待进一步研究。本课题组构建了LysM-cre/Trio^{fl/fl}纯合子小鼠(CKO),以观测破骨细胞特异性敲除Trio后的相关表型变化。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究选择小鼠品系均为C57BL/6J,对照组和实验组小鼠均于南京医科大学动物房恒温下饲养。其中Trio^{fl/fl}小鼠购于南京大学模式生物研究院,LysM-cre小鼠由南京医科大学江苏省心血管病分子干预重点实验室赠予。本课题所开展的动物实验均符合南京医科大学实验动物福利伦理委员会的要求。

α -MEM培养基(Gibco公司,美国),胎牛血清(Invitrogen公司,美国),Trio抗体(Santa Cruz公司,美国),GADPH抗体(Bioworld公司,美国),高纯度总RNA快速提取试剂盒(无锡百泰克),动物基因组DNA快速抽提试剂盒(上海生工公司),山羊血清、DAPI染色试剂盒(上海碧云天公司),SDS-PAGE凝胶试剂盒(南京凯基公司),苏木素-伊红染色液(南京建成公司),RIPA蛋白裂解液(上海碧云天公司)。

全自动半薄轮转切片机、自动组织脱水机、石蜡包埋机(Leica公司,德国),Micro-CT扫描仪(SkyScan公司,德国),荧光显微镜(Leica Microsystems公司,加拿大)。

1.2 方法

1.2.1 CKO小鼠的繁育

Cre重组酶可辨别并结合loxP位点,将2个位点中间的基因片段剪除,得到特异性敲除基因小鼠。本课题组先将Trio^{fl/fl}小鼠与LysM-cre小鼠交配后得到LysM-cre/Trio^{fl/fl}杂合子小鼠,再将LysM-cre/Trio^{fl/fl}杂合子小鼠与Trio^{fl/fl}小鼠交配即可得到LysM-cre/Trio^{fl/fl}杂合子小鼠、Trio^{fl/fl}杂合子小鼠、Trio^{fl/fl}纯合子小鼠及

LysM-cre/Trio^{fl/fl}纯合子小鼠。其中LysM-cre/Trio^{fl/fl}纯合子小鼠为CKO组小鼠,Trio^{fl/fl}小鼠作为对照组小鼠。

1.2.2 基因型鉴定

剪取待测小鼠鼠尾放入EP管中,捣碎,根据动物基因组DNA快速抽提试剂盒说明书进行DNA提取。配制PCR反应体系进行DNA扩增,凝胶电泳分离,曝光成像。

1.2.3 样本收集

选取CKO组以及同窝对照组小鼠各3只,8周龄,予安乐死后分离股骨。将新鲜的股骨置于4%多聚甲醛中固定12h,随后进行Micro-CT扫描。拍摄Micro-CT后将股骨置于流水下冲洗过夜,随后放入10%的EDTA脱钙液中进行组织脱钙,待脱钙完成后进行石蜡包埋。对包埋后小鼠股骨进行组织切片,切片厚度为6 μ m。

1.2.4 Micro-CT

对小鼠离体股骨进行Micro-CT扫描。扫描参数:像素15.6 μ m,分辨率高,55 kVp,145 μ A,整合时间200 ms。使用CTAn v1.31.8.1软件及NRecon v1.6软件对数据进行三维影像重建和数据分析。选择股骨远端生长板下区域作为目标区域,在相同模式下观察及进行数据分析。所有实验均重复3次。

1.2.5 破骨细胞的提取及培养

分离CKO组及对照组各3只4周龄小鼠的骨髓细胞,以5000个/孔种于96孔板中,每孔200 μ L完全培养液,并加入RANKL和M-CSF诱导,每2d半量换液,第6天可见大量破骨细胞形成。所有实验均重复3次。

1.2.6 免疫荧光染色

破骨细胞形成后用4%多聚甲醛固定,山羊血清封闭,一抗4 $^{\circ}$ C过夜,PBS漂洗,荧光二抗室温孵育30 min,PBS漂洗,DAPI室温孵育5 min,封片,荧光显微镜拍摄。所有实验均重复3次。

1.2.7 RNA提取及实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)

按照高纯度总RNA快速提取试剂盒说明书提取RNA,PCR仪中逆转录后存于-80 $^{\circ}$ C组织样本库。配制实时荧光定量反应体系,加入荧光定量专用96孔板中。放入PCR仪中进行反应,反应条件保持一致。Trio:上游引物5'-CATCATTCACGACT-CAAGGT-3',下游引物5'-TAACAAAACCTCCGCA-CAACAG-3'; β -actin:上游引物5'-TTCCTTCCTGGG-TATGGAATC-3',下游引物5'-GCACTGTGTTG-GCATACAGG-3'。所有实验均重复3次。

1.2.8 蛋白提取及 Western blot

破细胞诱导6 d后加入提前配制的裂解液,于冰上裂解15 min,超声裂解后离心,-80℃组织样本库中保存。制作分离胶,上样,电泳分离蛋白,转膜,脱脂牛奶封闭,一抗孵育过夜,漂洗后二抗孵育1 h,曝光液显影,凝胶成像系统曝光并采集图像。所有实验均重复3次。

1.2.9 HE染色

脱蜡水化,苏木精染色5 min,流水冲5 min,1%盐酸乙醇30 s,水洗30 s,伊红染色1 min,水洗30 s,去水,中性树胶封片。所有实验均重复3次。

1.2.10 抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色

脱蜡水化,根据试剂盒说明按照比例配制染液,37℃孵箱中避光染1 h,甲基绿复染1 min,流水冲洗。甘油明胶封片。正置荧光显微镜拍照。所

有实验均重复3次。

1.3 统计学方法

荧光定量RT-qPCR所得数据CT值根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算,Western blot结果通过Image J软件进行半定量分析,数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS 19.0软件对数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Trio在破骨细胞中表达且集中于细胞边缘

使用免疫荧光染色定位Trio在破骨细胞中的表达,发现Trio在细胞核及细胞质中均有表达,而且主要表达于细胞边缘区域,即肌动蛋白环处(图1)。

2.2 Trio基因特异性敲除小鼠模型的鉴定

取鼠尾鉴定基因型,证实已成功构建LysM-cre/Trio^{fl/fl}纯合子小鼠。培养CKO组及对照组小鼠骨髓



A:红色为Trio免疫荧光染色;B:蓝色为DAPI染色;C:A图与B图合并图。

图1 免疫荧光法观察Trio在破骨细胞中的分布(×400)

Figure 1 Distribution of Trio in osteoclasts detected by immunocytochemical fluorescence (×400)

细胞,诱导形成破骨细胞,提取RNA及蛋白。RT-qPCR与Western blot显示CKO组小鼠Trio的RNA和蛋白表达量均显著下降(表1)。

表1 RT-qPCR及Western blot验证敲除效率

Table 1 Knockout efficiency verified by RT-qPCR and Western blot

指标	对照组(n=3)	CKO组(n=3)	P值
Trio mRNA相对表达水平	1.012 ± 0.077	0.012 ± 0.020	< 0.001
Trio蛋白相对表达水平	0.275 8 ± 0.027 6	0.119 8 ± 0.012 8	< 0.05

2.3 CKO小鼠体型减小并表现出骨量增加

CKO组与对照组小鼠比较,CKO组小鼠体型较小(图2A、B)。通过Micro-CT拍摄8周龄小鼠离体股骨显示CKO组小鼠股骨的骨量提高(图2C、D)。对股骨干骺端生长板下局部区域进行3D重建及数据分析显示骨量/总量、骨小梁数量、骨小梁厚度均增加,骨小梁间隙无差异(图2E~L)。对两组8周龄

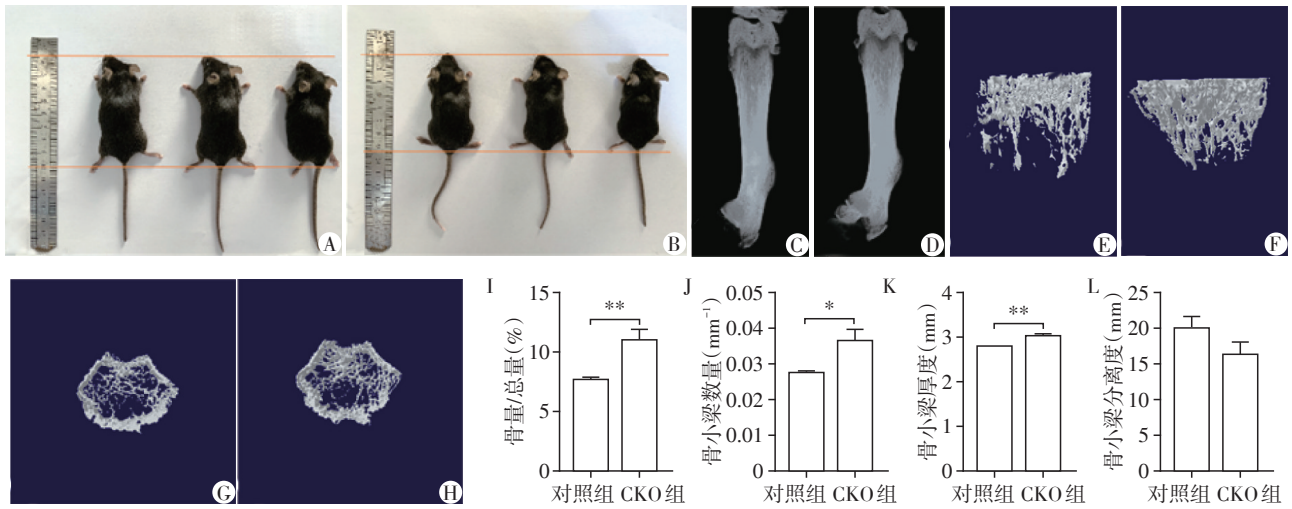
小鼠股骨组织切片进行HE染色,显示成骨细胞数量无差异(图3A、B),TRAP染色显示CKO组小鼠骨表面破骨细胞的数量明显减少(图3A、C)。

2.4 体外培养的CKO小鼠破骨细胞数量减少

破骨诱导6 d后,固定细胞后进行TRAP染色,发现CKO组破骨细胞数量较对照组显著减少(图4)。

3 讨论

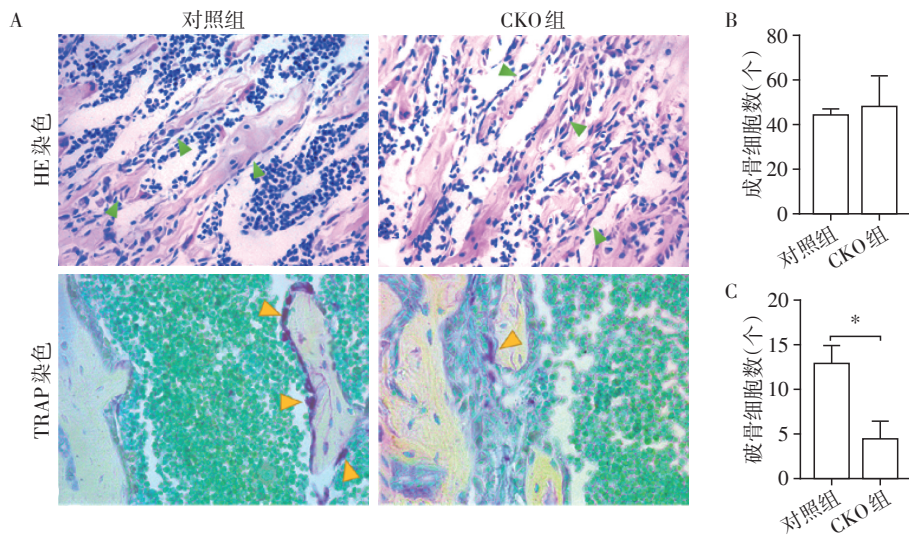
破骨细胞负责骨吸收,在维持正常骨结构方面起着至关重要的作用。破骨细胞的过度分化与激活可导致多种溶骨性疾病,如骨质疏松症、假体无菌性松动和侵蚀性关节炎等^[9],因此,破骨细胞已成为治疗和预防骨病的重要靶点。破骨细胞是由单核巨噬细胞系前体细胞分化融合而成的巨型多核细胞,它们的生理功能是降解骨基质。这种骨吸收活动对于控制骨骼发育和转换,维持骨稳态必不可少^[10-11]。骨吸收的一个重要步骤是通过分泌大量H⁺和Cl⁻进行矿化物的溶解,保持这种酸性的微环



A: 8周龄对照组小鼠体长约8.4 cm; B: 8周龄CKO组小鼠体长约7.4 cm; C: 8周龄对照组小鼠股骨密度; D: 8周龄CKO组小鼠股骨密度; E: 8周龄对照组小鼠股骨远端生长板下方区域骨松质3D重建模型纵向观; F: 8周龄CKO组小鼠股骨远端生长板下方区域骨松质3D重建模型纵向观; G: 8周龄对照组小鼠股骨远端生长板下方区域横截面3D重建模型; H: 8周龄CKO组小鼠股骨远端生长板下方区域横截面3D重建模型; I: 对照组与CKO组小鼠股骨远端生长板下方区域骨量/总量比较; J: 对照组与CKO组小鼠股骨远端生长板下方区域骨小梁数量; K: 对照组与CKO组小鼠股骨远端生长板下方区域骨小梁厚度比较; L: 对照组与CKO组小鼠股骨远端生长板下方区域骨小梁分离度比较。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图2 8周龄小鼠体型测量及Micro-CT数据分析

Figure 2 Somatotype measurement and Micro-CT data analysis of 8-week-old mice



A: 两组HE染色及TRAP染色结果(绿色箭头为成骨细胞,黄色箭头为破骨细胞); B: 视野中成骨细胞数量; C: 视野中破骨细胞数量。两组比较, * $P < 0.01$ ($n=3$)。

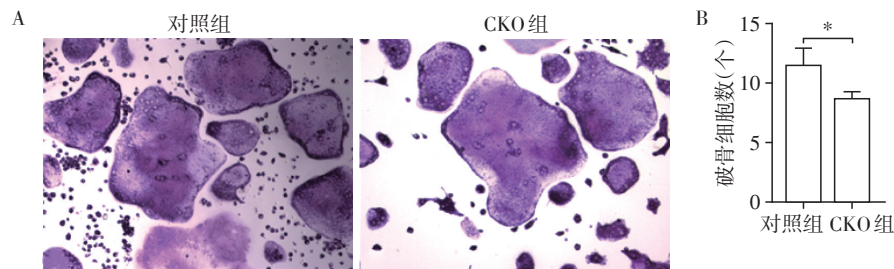
图3 8周龄小鼠股骨切片HE及TRAP染色(×400)

Figure 3 HE and TRAP staining of femur sections of 8-week-old mice (×400)

境是进行有效骨吸收的关键^[3]。成熟的破骨细胞形成一个环形的富含F-肌动蛋白的结构,称为封闭区^[12]。这种结构将破骨细胞吸附在矿物底物上,并产生与吸收部位相对应的空腔,为骨骼降解创造了有利的酸性微环境^[3,13]。

GEF Trio在1966年首次被发现,是350 kDa的

大分子蛋白^[14],其蛋白结构在进化方面十分保守,分子结构在哺乳动物中高度一致。有2处GEF功能域、1处丝氨酸激酶功能域。此外,Trio还具备2个SH3结构,1个CRAL-Trio/Sec14结构。Trio蛋白的催化单元分为两类:N-端的DH-PH单位被称为Trio D1,TrioD1能够激活Rac1和RhoG;C-端的DH-PH单位被



A: 两组小鼠骨髓细胞诱导破骨细胞分化后的TRAP染色($\times 100$); B: 两组每个视野中破骨细胞数量比较, 两组比较, $^*P < 0.05 (n=3)$ 。

图4 破骨细胞TRAP染色($\times 100$)

Figure 4 Osteoclasts detected by TRAP staining($\times 100$)

称为TrioD2,该结构能够特异性地作用于RhoA^[15]。TrioD1催化单位中的PH1结构域可直接与肌动蛋白交联剂Filamin A结合,参与调控细胞骨架的形成^[16]。Trio蛋白D1结构域还可直接结合到细胞骨架。Trio复杂的分子结构能够与多种蛋白产生相互作用。在神经特异性敲除Trio的小鼠模型中,Trio的缺失导致Rac1、RhoA和Cdc42的激活下调^[17-18]。

在Cdc42缺失的小鼠模型中,破骨细胞的分化受到严重破坏,而在Rac1及Rac2双敲的小鼠模型中,破骨细胞虽然可以正常表达分化成熟的标志物,但小鼠表现出严重的骨硬化病^[19]。以上研究提示Cdc42主要通过刺激破骨细胞生成来介导骨吸收,而Rac1通过调节破骨细胞的细胞骨架影响破骨细胞的吸收功能。Dock5属于Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子家族成员之一,在敲除Dock5的小鼠模型中,小鼠表现出骨硬化的体征,诱导其破骨细胞,发现其破骨细胞无法形成大的封闭环,吸收功能明显下降^[3]。

本研究构建了破骨细胞特异性敲除Trio基因小鼠模型,通过RT-qPCR及Western blot验证该模型Trio敲除效率明显,为探究Trio对破骨细胞的作用及调控机制提供了动物模型。初步分析了该模型表型的差异,显示破骨细胞Trio特异性敲除小鼠的骨量增加。结合以往研究结果,推测在破骨细胞中特异性敲除Trio可能通过下调Rac1及Cdc42的活性影响破骨细胞的分化、成熟及吸收功能。本研究仅观测了Trio对破骨细胞的影响以及对骨量的调控,其是否通过下游Rac1或Cdc42进一步影响细胞骨架等具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] WANG L, LIU S, ZHAO Y, et al. Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/FAS pathway is required for maintenance of bone mass [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(10): 1654-1664

[2] WU L, LUO Z, LIU Y, et al. Aspirin inhibits RANKL-

induced osteoclast differentiation in dendritic cells by suppressing NF-kappaB and NFATc1 activation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 375

[3] GUIMBAL S, MOREL A, GUERIT D, et al. Dock5 is a new regulator of microtubule dynamic instability in osteoclasts [J]. *Biol Cell*, 2019, 111(11): 271-283

[4] MOREL A, BLANGY A, VIVES V. Methods to investigate the role of Rho GTPases in osteoclast function [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1821: 219-233

[5] PASKUS J D, TIAN C, FINGLETON E, et al. Synaptic Kalirin-7 and Trio interactomes reveal a GEF protein-dependent neuroligin-1 mechanism of action [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(10): 2944-2952

[6] IWATAKE M, NISHISHITA K, OKAMOTO K, et al. The Rho-specific guanine nucleotide exchange factor Plekhg5 modulates cell polarity, adhesion, migration, and podosome organization in macrophages and osteoclasts [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359(2): 415-430

[7] ORY S, BRAZIER H, PAWLAK G, et al. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement [J]. *Eur J Cell Biol*, 2008, 87(8-9): 469-477

[8] CHEN H, GUO S, XIA Y, et al. The role of Rho-GEF Trio in regulating tooth root development through the p38 MAPK pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 372(2): 158-167

[9] WANG J, CHEN G, ZHANG Q, et al. Phyllirin attenuates osteoclast formation and function and prevents LPS-induced osteolysis in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1188

[10] 米雁翎,刘婷,蒋自然,等. 正畸牙齿移动中破骨细胞活动的影响因素[J]. *口腔医学*, 2017, 37(1): 89-92

[11] 王燕,朱琳琳,王思雨,等. 正畸驱动的骨皮质切开术对巨噬细胞的作用及机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(5): 582-589

[12] LOCK J G, BASCHIERI F, JONES M C, et al. Clathrin-containing adhesion complexes [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(7): 2086-2095

(下转第1343页)