

## 唑来膦酸对破骨细胞分化中钙调蛋白、钙调磷酸酶表达的影响

阴露佳<sup>1</sup>, 林珏杉<sup>1</sup>, 温黎明<sup>1</sup>, 董伟<sup>1</sup>, 冯晓洁<sup>1</sup>, 孙红<sup>2</sup>, 戚孟春<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>华北理工大学口腔医学院口腔颌面外科教研室,<sup>2</sup>基础医学院病理教研室,河北唐山 063000)

**[摘要]** 目的:探讨唑来膦酸(zoledronate,ZOL)对破骨细胞分化中钙调蛋白(calmodulin)和钙调磷酸酶(calcineurin)基因表达的影响。方法:小鼠 RAW264.7 细胞分为 A、B 两组,均用 100 ng/mL 核因子  $\kappa$ B 受体激活蛋白配体(RANKL)诱导 4 d;B 组细胞在 RANKL 诱导第 2 天加入  $1 \times 10^{-6}$  mol/L ZOL 处理 48 h。RANKL 诱导 4 d 后收获细胞,检测破骨细胞生成及 calmodulin、calcineurin 基因表达情况。结果:B 组多核破骨细胞数、吸收陷窝数目及面积分别为  $(8.8 \pm 2.3)$  个、 $(6.7 \pm 1.2)$  个和  $(997.1 \pm 14.8) \mu\text{m}^2$ ,均显著低于 A 组的  $(19.7 \pm 2.9)$  个、 $(13.3 \pm 1.5)$  个和  $(1676.9 \pm 24.9) \mu\text{m}^2$  ( $P < 0.01$ )。B 组 calmodulin mRNA 及蛋白水平较 A 组分别降低了 51.0% 和 78.7% ( $P < 0.05$ ),calcineurin 则分别下降了 37.0% 和 69.5% ( $P < 0.01$ )。免疫荧光细胞化学显示,B 组 calmodulin、calcineurin 的荧光强度较 A 组也明显下降。结论:ZOL 可显著抑制破骨细胞生成,并下调破骨细胞分化中 calmodulin 和 calcineurin 的 mRNA 和蛋白水平,而 calmodulin、calcineurin 可能参与了 ZOL 对破骨细胞形成和功能的抑制。

**[关键词]** 唑来膦酸;破骨细胞;钙调蛋白;钙调磷酸酶;基因调控

**[中图分类号]** R329.26

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)02-171-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160209

## The effect of zoledronate on gene expression of calmodulin and calcineurin during osteoclast differentiation

Yin Lujia<sup>1</sup>, Lin Jueshan<sup>1</sup>, Wen Liming<sup>1</sup>, Dong Wei<sup>1</sup>, Feng Xiaojie<sup>1</sup>, Sun Hong<sup>2</sup>, Qi Mengchun<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology;<sup>2</sup>Department of Pathology, College of Basic Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** The study is aimed to examine the effects of zoledronate (ZOL) on gene expression of calmodulin and calcineurin during differentiation of osteoclasts. **Methods:** RAW264.7 cells were divided into 2 groups, group A and group B. The cells in both groups were induced with 100 ng/ml RANKL (ligand of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B) for 4 d for osteoclast differentiation. At the second day of RANKL induction, cells in group B also treated with  $1 \times 10^{-6}$  mol/L ZOL for 48 h. Four days later, the cells were harvested and examined for osteoclastogenesis, as well as gene expression of both calmodulin and calcineurin. **Results:** TRAP positive multinuclear cells, number and size of resorption lacunae in group B were  $8.8 \pm 2.3$ ,  $6.7 \pm 1.2$  and  $997.1 \pm 14.8 \mu\text{m}^2$  respectively, which were significantly lower than those ( $19.7 \pm 2.9$ ,  $13.3 \pm 1.5$  and  $1676.9 \pm 24.9 \mu\text{m}^2$ ) in group A ( $P < 0.01$ ). mRNA and protein level of calmodulin in group B decreased about 51% and 78.7%, respectively when compared with group A ( $P < 0.05$ ), and those of calcineurin also decreased about 37% and 69.5%, respectively ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescent cytochemistry showed obvious decrease of fluorescent intensity of calmodulin and calcineurin protein in group B when compared with group A. **Conclusion:** ZOL significantly inhibits osteoclastogenesis and down-regulates gene expression of calmodulin and calcineurin, which may play a role in ZOL-induced inhibition of osteoclastogenesis.

**[Key words]** zoledronate; osteoclast; calmodulin; calcineurin; gene regulation

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(02): 171-175, 217]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81270965)

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

破骨细胞导致的骨过度吸收可以造成多种骨病理性疾病,如骨质疏松症、牙周炎、类风湿性关节炎等<sup>[1]</sup>。Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-NFATc1(nuclear factor of activated T-cells plasmic 1)信号通路对破骨细胞分

化至关重要;在该信号通路中,钙调蛋白(calmodulin)和钙调磷酸酶(calcineurin)是传递钙信号、活化 NFATc1 的两个关键信号分子<sup>[2]</sup>。唑来膦酸(zoledronate,ZOL)广泛用于骨过度吸收性疾病的治疗,主要通过诱导破骨细胞凋亡,抑制其骨吸收来发挥作用<sup>[3]</sup>。钙信号是否参与 ZOL 对破骨细胞的抑制,目前尚不清楚。在前期研究基础上,本文主要探讨破骨细胞分化中 ZOL 对钙信号分子 calmodulin、calcineurin 基因表达的影响,以评价他们在 ZOL 诱发的破骨细胞生成抑制中的作用,从新角度阐明 ZOL 作用的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠白血病单核巨噬细胞株 RAW264.7 细胞,由中国医学科学院基础研究所提供。

核因子  $\kappa$ B 受体激活蛋白配体 (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand,RANKL)、胎牛血清、兔抗鼠 calmodulin、calcineurin 抗体(Biovision 公司,美国);DMEM 培养基(Hyclone 公司,美国),抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色试剂盒,ZOL(Sigma 公司,美国),PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分组及处理

RAW264.7 细胞分为 A、B 两组,均用 100 ng/mL

RANKL<sup>[4]</sup>诱导 4 d,使之向破骨细胞分化。A 组为对照组,只加入 RANKL 进行诱导;B 组为 ZOL 处理组,在用 RANKL 诱导的同时,于第 2、3 天加入  $1 \times 10^{-6}$  mol/L ZOL<sup>[5-6]</sup>,共处理 2 d,然后用 RANKL 继续诱导。

#### 1.2.2 TRAP 染色

RAW264.7 细胞按  $1 \times 10^3$  个/cm<sup>2</sup> 接种于培养皿中;待细胞贴壁 24 h 后分别用 RANKL 和 ZOL 处理 A、B 两组细胞,共培养 4 d。然后 4%多聚甲醛固定细胞,按 TRAP 染色试剂盒说明进行染色。在 200 倍镜下随机选取 6 个视野,计算 TRAP 染色阳性多核破骨细胞数目(细胞核  $\geq 3$  个),取其平均值代表该细胞爬片的破骨细胞数目<sup>[5-6]</sup>,每组检测 3 个细胞爬片。

#### 1.2.3 骨吸收陷窝检测

将新拔除的下颌智齿制备成直径 0.5 cm、厚度 0.4 mm 的牙本质磨片,高温高压灭菌。牙本质磨片上细胞接种密度为  $1 \times 10^3$  个/cm<sup>2</sup>,并于实验处理 7 d 后收获牙本质磨片,进行扫描电镜观察。在 500 倍镜下每个磨片上随机选择 6 个视野,检测骨吸收陷窝的数目和面积,取其平均值代表该磨片的骨吸收陷窝数目和面积,每组检测 3 个磨片<sup>[5-6]</sup>。

#### 1.2.4 real-time PCR 检测

TRIzol 提取细胞总 RNA,RT-PCR 反转录合成 cDNA,然后在荧光定量 PCR 仪上进行检测;引物见表 1。PCR 反应条件为:95℃预热 30 s;然后 95℃ 5 s,56℃ 30 s,共扩增 40 个循环。每组实验重复 3 次,取平均值作为目的基因的 mRNA 相对表达水平。

表 1 Real-Time PCR 基因引物

Table 1 Primers of genes used in real-time PCR

GenBank 号	基因	序列(5'→3')	产物长度(bp)
NM_007393.3	$\beta$ -actin	上游 GTGACGTTGACATCCGTAAGA	245
		下游 GCCGGACTCATCGTACTCC	
NM_007589.5	calmodulin	上游 AGGGAAGCAGACATTGACGG	326
		下游 GATGTGCAGACGGGCTTAGA	
NM_008913.5	calcineurin	上游 AGTGTCTCAGTTCTCAG	145
		下游 TTCATCAGCCTCAATAGC	

#### 1.2.5 Western blot 检测蛋白水平

提取细胞总蛋白,测蛋白浓度,加入 5 $\times$ 上样缓冲液稀释蛋白样品,煮沸变性,凝胶电泳后转膜。脱脂牛奶室温封闭 1 h,兔抗鼠一抗 4℃孵育过夜。羊抗兔二抗 37℃孵育 2 h,ECL 显色 1 min。用 Image J 分析软件将条带图片上每个条带灰度值数字化。实验重复做 3 次,取平均值作为目的蛋白的相对表达水平。

#### 1.2.6 免疫荧光细胞化学检测

细胞以  $1 \times 10^3$  个/cm<sup>2</sup> 接种于激光共聚焦小皿

中,实验处理 4 d 后收获细胞。兔抗鼠一抗 4℃孵育过夜,异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,37℃避光杂交 90 min;碘化丙啶(propidium iodide,PI)复染胞核,封片;激光共聚焦显微镜(LSCM)下观察。

#### 1.3 统计学方法

数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 来表示。应用 SPSS17.0 统计学软件对 A、B 组两组数据进行两独立样本的 *t* 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

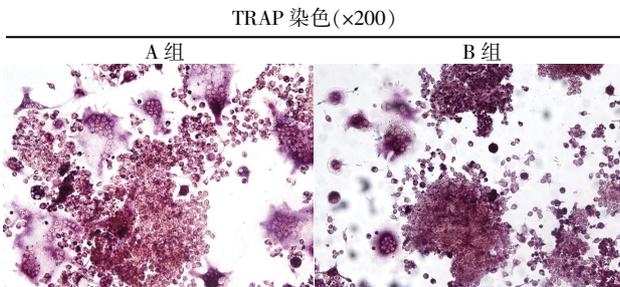
## 2 结果

### 2.1 TRAP 染色

两组细胞经 RANKL 及 ZOL 处理后,均出现 TRAP 阳性多核破骨细胞(图 1)。A 组破骨细胞数目较多,体积较大,胞核可达 10~20 个;而 B 组破骨细胞体积较小,数目较 A 组减少了 55.3%( $P < 0.01$ ,表 2)。

### 2.2 骨吸收陷窝检测

扫描电镜显示,两组磨片上均出现不同程度的吸收陷窝(图 1);但 B 组牙本质吸收陷窝数目和面积分别较 A 组下降了 49.6%和 40.5%( $P < 0.01$ ,表 2)。



### 2.3 Real-time PCR 检测

Real-time PCR 检测结果显示,B 组 calmodulin、calcineurin 基因 mRNA 相对浓度分别为 A 组的  $0.49 \pm 0.16$  和  $0.63 \pm 0.02$ ,较 A 组分别下降了约 51%( $P=0.005$ )和 37%( $P=0.001$ )。

### 2.4 Western blot 检测基因蛋白表达水平

A、B 两组的蛋白条带见图 2。定量分析表明,B 组中 calmodulin、calcineurin 蛋白条带灰度值为  $38.7 \pm 8.1$  和  $129.6 \pm 47.4$ ,显著低于 A 组的  $181.5 \pm 5.3$  和  $425.2 \pm 40.3$ ;ZOL 处理使 B 组 calmodulin 和 calcineurin 蛋白条带灰度值较 A 组分别下降了 78.7%( $P=0.044$ )和 69.5%( $P=0.001$ )。

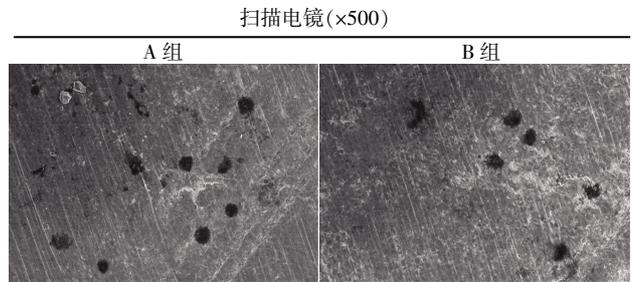


图 1 两组破骨细胞生成情况(x200)和牙本质磨片吸收陷窝情况(x500)

Figure 1 Detection of osteoclastogenesis by TRAP staining(x200) and dentin resorption lacunae by scanning electronic microscope (x500) in group A and group B

表 2 破骨细胞计数及牙本质磨片吸收陷窝定量检测

Table 2 The quantitative analysis of osteoclasts and dentin resorption lacunae ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	破骨细胞数(个)	吸收陷窝数(个)	吸收陷窝面积( $\mu\text{m}^2$ )
A 组( $n=3$ )	$19.7 \pm 2.9$	$13.3 \pm 1.5$	$1\ 676.9 \pm 24.9$
B 组( $n=3$ )	$8.8 \pm 2.3$	$6.7 \pm 1.2$	$997.1 \pm 14.8$
<i>t</i> 值	7.084	6.030	40.632
<i>P</i> 值	<0.001	0.005	<0.001

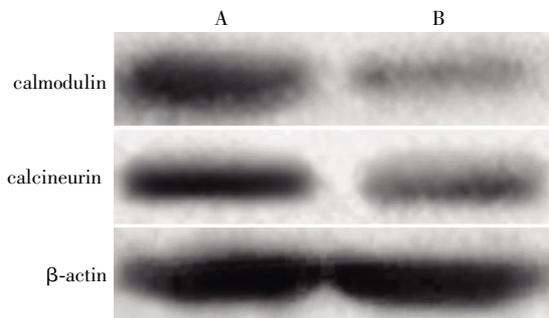


图 2 Western blot 检测 A、B 组中 calmodulin、calcineurin 蛋白表达水平

Figure 2 Detection of protein level of calmodulin and calcineurin in group A and B by Western blot

### 2.5 免疫荧光细胞化学检测

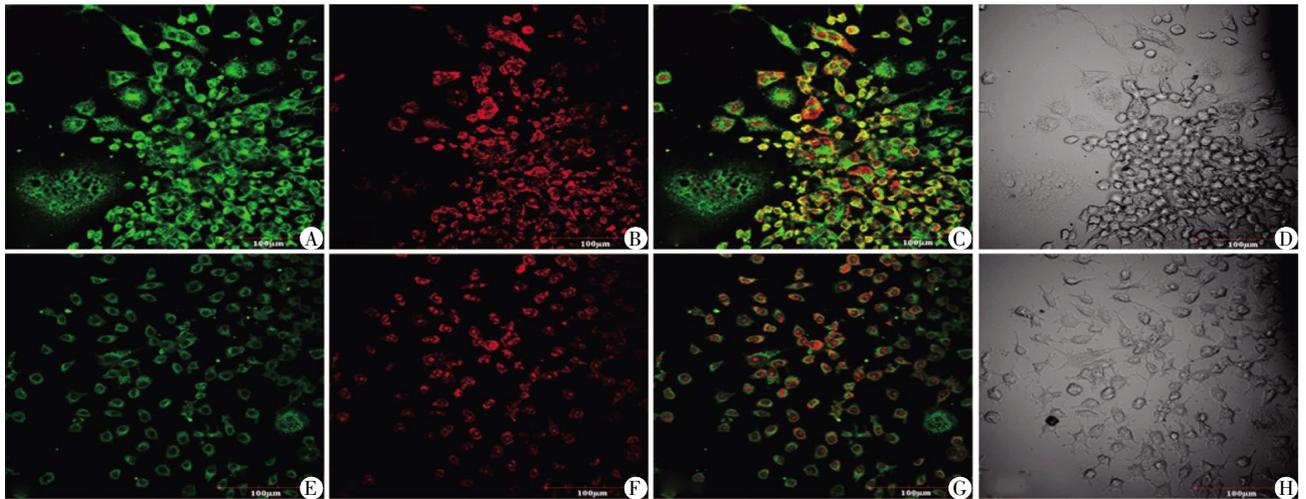
免疫荧光细胞化学分析表明,calmodulin 在两组破骨细胞及其前体细胞(胞内含有单核或两个

核)中均有不同程度的表达,且主要表达在胞浆(绿色荧光)(图 3)。但两组比较,A 组 calmodulin 蛋白表达水平较高,绿色荧光较强,而 B 组蛋白表达水平较低,绿色荧光较弱;A 组破骨细胞数也明显多于 B 组,细胞体积也较大。

calcineurin 在两组细胞中也均有不同程度的表达(图 4)。在成熟多核破骨细胞中,calcineurin 主要表达在胞浆(绿色荧光),胞核中无表达;而在前体细胞,calcineurin 在胞浆和胞核中均有表达。两组比较,B 组 calcineurin 表达水平较低,绿色荧光强度明显弱于 A 组;破骨细胞数目及体积也明显小于 A 组。

## 3 讨论

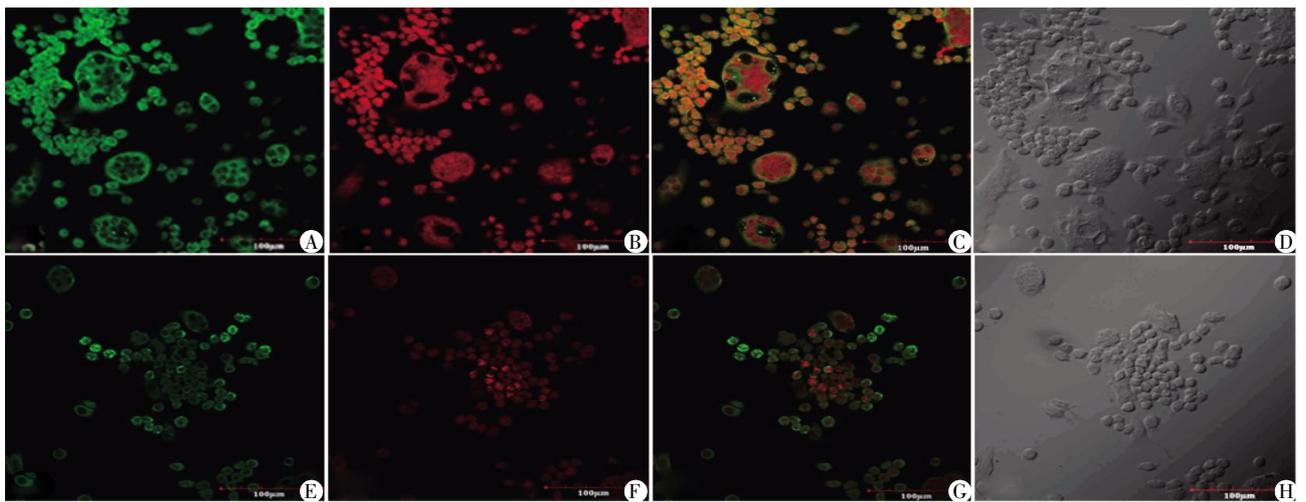
破骨细胞是体内唯一具有骨吸收功能的细胞,



A, E: FITC 标记 calmodulin 蛋白(绿色); B, F: PI 标记细胞核(红色); C, G: 融合图像; D, H: 无荧光视野。

图 3 免疫荧光细胞化学检测 A 组(A~D)、B 组(E~H)破骨细胞中 calmodulin 的表达(LSCM, ×400)

Figure 3 Detection of calmodulin expression within osteoclasts in group A (A~D) and group B (E~H) by immunofluorescent cytochemistry (LSCM, ×400)



A, E: FITC 标记 calcineurin 蛋白(绿色); B, F: PI 标记细胞核(红色); C, G: 融合图像; D, H: 无荧光视野。

图 4 免疫荧光检测 A 组(A~D)、B 组(E~H)破骨细胞中 calcineurin 的表达(LSCM, ×400)

Figure 4 Detection of calcineurin expression within osteoclasts in group A(A~D) and group B(E~H) by immunofluorescent cytochemistry (LSCM, ×400)

临床上许多骨过度吸收性疾病,如骨质疏松、原发或转移性骨肿瘤、牙周炎、种植体周围炎、多发性骨髓瘤等,与破骨细胞数目及活性异常增高有关<sup>[1]</sup>。因而,这些疾病治疗的一个重要策略是抑制破骨细胞生成及其骨吸收功能。双膦酸盐是目前临床上应用的强效骨吸收抑制剂,通过直接或间接作用于破骨细胞,抑制其细胞分化,降低其骨吸收功能,并诱发细胞凋亡<sup>[3,7]</sup>,发挥对上述骨过度吸收性疾病的治疗作用。既往研究表明,含氮双膦酸盐主要通过抑制甲羟戊酸信号途径中法尼基焦磷酸合成酶(farnesyl pyrophosphate synthase),阻碍小 GTPase 等蛋白的异戊二烯化来发挥对破骨细胞分化、生成和骨吸收的

抑制作用<sup>[3,8]</sup>。然而,除上述机制外,双膦酸盐是否通过其他信号通路或分子来发挥对破骨细胞的调节作用,目前尚不清楚。

研究表明,  $Ca^{2+}$ /Calmodulin/NFATc1 信号轴是 RANKL 诱发的破骨细胞生成的重要信号通路<sup>[2,9]</sup>,该信号通路的异常会造成破骨细胞的生成及功能障碍。 $Ca^{2+}$ 作为胞内重要第二信使,参与细胞生长、分化等多种生理功能<sup>[2,9-12]</sup>。RANKL 刺激下,  $Ca^{2+}$ 从破骨细胞内钙池释放,诱发低水平  $Ca^{2+}$ 低水平震荡<sup>[2,9-10]</sup>,  $Ca^{2+}$ 进而与 calmodulin 结合,通过激活下游 calcineurin 和 CaMKs<sup>[2,9,13]</sup>来传递  $Ca^{2+}$ 信号,并最终活化 NFATc1,使之异位进入细胞核内,调控许多破骨细胞特异性

基因的表达,参与破骨细胞分化、细胞融合、黏附、迁移及骨吸收等许多过程<sup>[2,9,14]</sup>。calmodulin 是钙信号传递的重要信号分子,Ca<sup>2+</sup>只有与 calmodulin 结合,才能发挥信号分子的效应;因而许多信号蛋白均利用 calmodulin 来作为钙感应器和信号转导分子<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究发现,ZOL 在破骨细胞分化中可显著下调 Ca<sup>2+</sup>信号上游分子 Syk、下游分子 NFATc1 及破骨细胞特异基因 TRAP、Atp6v0d2、Cathepsin K、integrin $\alpha$ v $\beta$ 3 等分子的表达<sup>[5,15-16]</sup>,提示 Ca<sup>2+</sup>—Calmodulin—NFATc1 信号通路参与了 ZOL 对破骨细胞的抑制。

本研究中,应用 RANKL 处理小鼠白血病单核巨噬细胞株 RAW264.7 细胞,使之向破骨细胞分化;诱导 4 d 后 A 组出现了许多 TRAP 阳性多核巨细胞,体积可达 100  $\mu$ m,胞核达 10~20 个,并且在牙本质磨片上形成了骨吸收陷窝,证实破骨细胞培养是成功的。而 ZOL 处理的 B 组虽然也有 TRAP 阳性多核破骨细胞出现,但数目较少,体积较小,牙本质吸收陷窝的数目和面积也显著少于 A 组,从而证实了 ZOL 对破骨细胞生成及骨吸收的抑制效应。本实验中,通过 real-time PCR 和 Western blot 技术对破骨细胞分化中 calmodulin、calcineurin 基因表达进行了检测,以评价双膦酸盐对钙信号通路的影响。结果表明,ZOL 处理使 B 组 calmodulin、calcineurin 的 mRNA、蛋白水平均显著降低,提示双膦酸盐对破骨细胞分化中钙信号通路产生了影响。免疫荧光细胞化学检测进一步显示,calmodulin、calcineurin 蛋白荧光强度显著减弱,也进一步说明上述信号分子可能参与了 ZOL 对破骨细胞的抑制。

calmodulin 是结构上高度保守的蛋白,通过 N、C 末端各 2 个“EF-hand”与 Ca<sup>2+</sup>结合,使其构象发生改变而活化,进而激活下游一系列分子<sup>[9]</sup>。研究表明,calmodulin 对 RANKL 诱发的破骨细胞分化至关重要;其拮抗剂三氟拉嗪(trifluoroperazine,TFP)和他莫西芬(tamoxifen,TMX)均可剂量依赖性下调 TRAP 活性,抑制破骨细胞生成<sup>[9]</sup>。进一步研究发现,calmodulin 可能参与了破骨细胞的融合;其抑制剂主要在 RANKL 诱导的第 3、4 天起作用,而该阶段正处于前破骨细胞的融合阶段<sup>[9,17-18]</sup>。calcineurin 是 calmodulin 下游最重要的信号蛋白,通过与 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin 结合而活化,进而使胞浆内 NFATc1 去磷酸化,并异位进入胞核,调控许多破骨细胞基因的转录。研究表明,calcineurin 拮抗剂在体外及体内均可抑制破骨细胞生成、骨吸收;然而在体内,小鼠

的表型并非因破骨细胞抑制而骨量增加,而是表现为骨质减少,这与 calcineurin 对成骨细胞的重要调节剂作用有关<sup>[2,19]</sup>。

综上所述,ZOL 可显著抑制破骨细胞生成及骨吸收功能,并下调 calmodulin 和 calcineurin 基因表达;钙信号中两个关键信号分子 calmodulin 和 calcineurin,可能参与了 ZOL 对破骨细胞形成和功能的抑制。

#### [参考文献]

- [1] Edwards JR, Weivoda MM. Osteoclasts: malefactors of disease and targets for treatment [J]. *Discov Med*, 2012, 13(70): 201-210
- [2] Negishi-Koga T, Takayanagi H. Ca<sup>2+</sup>(2+)-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation[J]. *Immunol Rev*, 2009, 231(1): 241-256
- [3] Roelofs A J, Thompson K, Ebetino FH, et al. Bisphosphonates: molecular mechanisms of action and effects on bone cells, monocytes and macrophages [J]. *Cur Pharm Des*, 2010, 16(27): 2950-2960
- [4] Komarova SV, Alexey P, Shum JW, et al. Convergent signaling by acidosis and receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) on the calcium/calcineurin/NFAT pathway in osteoclasts [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, 102(7): 2643-2648
- [5] 林珏杉,董伟,张鹏,等. 唑来膦酸抑制破骨细胞分化中 TRPV5、NFATc1 的表达[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(9): 1254-1258
- [6] 李鹏,林珏杉,张鹏,等. 唑来膦酸对破骨细胞分化中钙调蛋白和钙调蛋白依赖性激酶 II 基因表达的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2013, 48(11): 694-698
- [7] Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ, et al. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of Mst1 kinase during apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 34967-34973
- [8] Dunford JE, Rogers MJ, Ebetino FH, et al. Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(5): 684-694
- [9] Seales EC, Micoli KJ, McDonald JM. Calmodulin is a critical regulator of osteoclastic differentiation, function, and survival [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(1): 45-55
- [10] Zhang L, McKenna MA, Said-Al-Naief N, et al. Osteoclastogenesis: the role of calcium and calmodulin [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2005, 15(1): 1-13
- [11] Yao CH, Zhang P, Zhang L. Differential protein and mRNA expression of CaMKs during osteoclastogenesis and