文章编号:1000-5404(2010)24-2623-04

论著

CD147对体外破骨细胞分化成熟的影响

廖通权,刘玉刚,胡 旭,张 莹,余世明,初同伟,周 跃 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

【摘要】 目的 建立破骨细胞(osteoclasts,OCs)体外分化成熟的模型,研究CD147对OCs分化成熟的影响。**方法** 从外周血分离单个核细胞贴壁培养,使用破骨细胞分化因子(receptor activator of nuclear factor-κβ ligand,RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor,M-CSF)诱导OCs生成。实验分为对照组、诱导组(RANKL+M-CSF)及阻断组(RANKL+ M-CSF +CD147Ab),应用免疫荧光染色和流式细胞术检测CD147在破骨前体细胞(osteoclast precursor cells,OPCs)的表达;抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase,TRAP)染色观察OCs的分化成熟情况及Real-time PCR技术检测CD147及TRAP mRNA在OPCs中的表达变化。**结果** ①CD147分子在OPCs细胞膜上表达。②流式细胞术测得细胞膜表面平均荧光强度对照组(159.55±1.65)、诱导24 h组(171.18±3.46)、诱导48 h组(178.47±4.59)逐渐增强($P<0.05$),而阻断24 h组(117.69±9.01)显著减弱($P<0.01$)。③阻断组TRAP染色阳性细胞(细胞核≥3)数显著少于诱导组($P<0.01$),且OCs体积小。④在24、48 h诱导组CD147 mRNA相对表达量[(1.393±0.248)、(1.772+0.326)]及TRAP mRNA的相对表达量[(1.810±0.398)、(2.608±0.906)]在OPCs诱导分化过程逐渐增高,均高于相应时相点阻断组($P<0.05$);且TRAP mRNA相对表达量与CD147 mRNA相对表达量呈正相关($r=0.833$, $P<0.01$)。**结论** CD147分子在OPCs细胞膜上表达且参与OCs分化成熟;抑制CD147的表达,OCs出现成熟障碍。

【关键词】 破骨细胞;CD147;分化成熟
【中图法分类号】 R322.71;R329.21;R341 **【文献标志码】** A

Effect of CD147 on differentiation and maturation of osteoclasts *in vitro*

Liao Tongquan, Liu Yugang, Hu Xu, Zhang Ying, Yu Shiming, Chu Tongwei, Zhou Yue (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【Abstract】 Objective To establish a model of differentiation and maturation of osteoclasts (OCs) *in vitro* and to explore the effect of CD147 on the differentiation and maturation of OCs. Methods Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the fresh blood samples of 10 healthy volunteers, and then OCs were induced by using medium with macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL). PBMCs were divided into 3 groups, control group, induction group (RANKL+M-CSF) and blocking group (RANKL+M-CSF+CD147Ab). Expression of CD147 was determined by immunofluorescence staining and flow cytometry, and mRNA levels of CD147 and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) were detected by real-time PCR. The differentiation and maturation of OCs were observed by TRAP staining. Results CD147 was expressed on the membrane of osteoclast precursor cells (OPCs) in all groups. The average fluorescence intensity (AFI) of OPCs surface was gradually increased in control group (159.55±1.65), and in induction group in 24 h (171.18±3.46) and 48 h (178.47±4.59) ($P<0.05$), but was significantly reduced in blocking group in 24 h (117.69±9.01, $P<0.01$). The TRAP positive cells (nuclei≥3) in the blocking group was significantly lesser and with smaller cell body compared with those in the induction group ($P<0.01$). The mRNA levels of CD147 [(1.393±0.248), (1.772±0.326)] and TRAP [(1.810±0.398), (2.608±0.906)] of induction group in 24 and 48 h after the induction were gradually increased in OPCs and were higher than those in the blocking group at corresponding time points ($P<0.05$). Moreover, the mRNA levels of CD147 was significantly positively correlated to the mRNA levels of CD147 ($r=0.833$, $P<0.01$). Conclusion CD147 is expressed on the membrane of OPCs and involved in the differentiation and maturation of OCs. Inhibiting CD147 expression may result in dysmaturity of OCs.

【Key words】 osteoclasts, CD147, differentiation and maturation

Corresponding author: Chu Tongwei, Tel: 86-23-68774080, E-mail: chtw@sina.com

【通信作者】 初同伟,电话:(023)68774080,E-mail:chtw@sina.com

骨转移是恶性肿瘤的常见并发症，晚期肿瘤骨转移仅次于肝、肺转移[1]。肿瘤发生骨转移将带来严重的并发症，包括顽固性骨痛、病理性骨折、高钙血症、椎体压缩等，严重影响患者的生活质量和生存期[2]。肿瘤转移骨破坏主要表现为溶骨性骨破坏，溶骨性骨破坏主要是宿主自身的破骨细胞（osteoclasts，OCs）超活化所介导的，而OCs的成熟、活化及其功能的发挥是一系列的生物分子调节及相互作用的结果[3]。CD147发现表达于多种侵蚀性肿瘤的外周，参与肿瘤的浸润转移，刺激肿瘤间质细胞主要为成纤维细胞分泌金属基质蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP），作为MMPs的上游调节子而发挥作用，且与肿瘤的预后相关[4-5]。抑制CD147的表达或者阻断其作用能明显减低肿瘤的浸润、转移[6-7]。在风湿性关节炎的研究中发现CD147参与关节软骨及骨破坏[8]，且CD147也参与单核-巨噬细胞活性的调节[9]；因此推断CD147可能参与OCs活性的调节。本实验通过RANKL + M-CSF体外诱导OCs生成，研究CD147在OCs分化成熟中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

外周血采自10例健康志愿者，男女各5例，18～30岁，平均24岁，白细胞计数均在正常范围。人重组RANKL（Biovision）、人重组M-CSF（Peprotech）、CD147小鼠抗人单克隆抗体（CD147Ab，Santa Cruz）、α-最低必需培养基（α-MEM）及D-Hanks液（HyClone）、胎牛血清（FBS，Gibco）、淋巴细胞分离液（中国医学科学院生物工程所）、青链霉素双抗（碧云天产品）、山羊抗小鼠FITC荧光抗体和山羊工作血清（北京中杉金桥）、胰蛋白酶/EDTA（Sigma）、TRAP染色试剂盒（南京建成）。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞的分离纯化 抽取新鲜外周血10 ml按淋巴细胞分离液说明书操作，分离单个核细胞。所得细胞加入含10% FBS的α-MEM吹打均匀后细胞计数，接种5×10^6个单核细胞于50 ml培养瓶中，置于37 ℃，5% CO_2培养箱孵育48 h[10]。倒去培养瓶中的上清液，PBS反复冲洗，去除非黏附细胞。0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA消化培养瓶内的细胞，收集细胞后，1 500 r/min离心10 min，再用α-MEM培养基分管洗涤细胞1次。

1.2.2 实验分组及细胞培养 实验分为对照组（10% FBS + α-MEM + 青链霉素100 U/ml）、诱导组（10% FBS + α-MEM + 青链霉素100 U/ml +30 ng/ml RANKL、25 ng/ml M-CSF）及阻断组（10% FBS + α-MEM + 青链霉素100 U/ml +30 ng/ml RANKL、25 ng/ml M-CSF +10 μg/ml CD147Ab[11]）。将洗涤后收集的细胞按分组情况调整细胞数为10^6/ml的细胞悬液，按实验要求将不同体积的细胞悬液接种于细胞孔板或培养皿中，细胞培养在37 ℃，5% CO_2的恒温细胞培养箱中。

1.2.3 免疫荧光染色测定CD147在破骨前体细胞膜上的表达 0.8 ml细胞悬液接种于35 mm × 12 mm细胞培养皿（NEST）中培养48 h后，吸取培养液上清，PBS洗涤2次，加入4%多聚甲醛室温固定20 min；PBS洗涤2次，山羊工作血清室温孵育30 min；PBS洗涤2次，加入0.4 ml按1∶100稀释的CD147Ab，4 ℃下过夜；洗涤后加入1∶50的山羊抗小鼠FITC荧光抗体，室温避光孵育1 h；洗涤后封片，激光共聚焦显微镜（Leica AF6000，Germany）下观察。

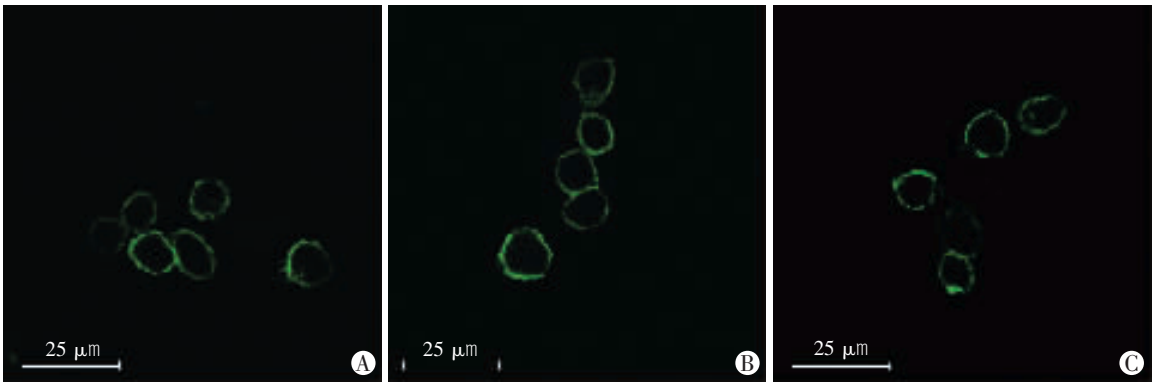
1.2.4 流式细胞仪测定CD147在破骨前体细胞膜上的表达量 2 ml细胞悬液接种于6孔细胞培养板中，培养24、48 h后，细胞刮刀收集贴壁细胞；预冷的PBS 2 000 r/min离心5 min洗涤细胞，加入0.1 ml 10 μg/ml的CD147Ab，分散细胞，4 ℃下孵育1 h；预冷的PBS 2 000 r/min离心5 min洗涤细胞2次，加入1∶50的山羊抗小鼠FITC荧光抗体0.1 ml，室温避光孵育30 min，洗涤后加入0.3 ml的PBS用流式细胞仪（FACSC Alibur，BD）进行细胞膜表面荧光强度测定。

1.2.5 细胞形态学观察及TRAP染色 0.4 ml的细胞悬液接种于预置玻片的24孔细胞培养板中，培养15 d，隔2天换液1次。倒置相差显微镜下观察OCs分化及形态变化，并于诱导第3、6、9、12、15天TRAP染色观察，TRAP染色按Sigma TRAP染色试剂盒说明进行，后甲基绿或者苏木精复染。镜下观察，对每张片随机6个视野中TRAP阳性（细胞核≥3）OCs进行计数。

1.2.6 Real-time PCR检测CD147 mRNA及TRAP mRNA的表达 4 ml的细胞悬液接种于25 ml培养瓶中，培养24、48 h，贴壁细胞PBS洗涤2次后，RNA提取按RNAout试剂盒（天净沙）说明进行，取2 μl的RNA样品在微量核酸仪进行RNA浓度测定，取$D(260)/D(280)$为1.8～2.0的RNA样品进行逆转录，逆转录参照PrimeScript® RT reagent Kit（TaKaRa）说明书进行。引物设计使用Primer Premier 5.0软件，由上海生工生物技术有限公司合成，β-actin引物序列：正义链5′-CGGGAAATCGTGCGTGAC-3′，反义链5′-GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3′，片段长度180 bp；CD147引物序列：正义链5′-AAGACCTTGGCTCCAAGATAC-3′，反义链5′-CTTGAACTCCGTTTTCTGGCC-3′，片段长度134 bp；TRAP引物序列：正义链5′-TTCACTGGTGTGCAAGACATC-3′，反义链5′-CTTGGAGATCTTAGAGTATGC-3′，片段长度162 bp。按60 μl的PCR反应体系，其各反应成分为Real MasterMix + CYBR Green（TIANGEN公司）27 μl，dH_20 28.2 μl，上游引物1.2 μl，下游引物1.2 μl，cDNA 2.4 μl。每个反应孔为20 μl体系，每个基因设3个复孔，每组均设阴性对照。反应条件：94 ℃ 2 min 1个循环；94 ℃ 20 s，60 ℃ 30 s，68 ℃ 45 s，40个循环。反应在ABI 7500 Real-time PCR仪上进行，每个循环末自动记录荧光强度。应用ABI 7500 System SDS Software1.3.1软件进行数据处理，相对表达量采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算。

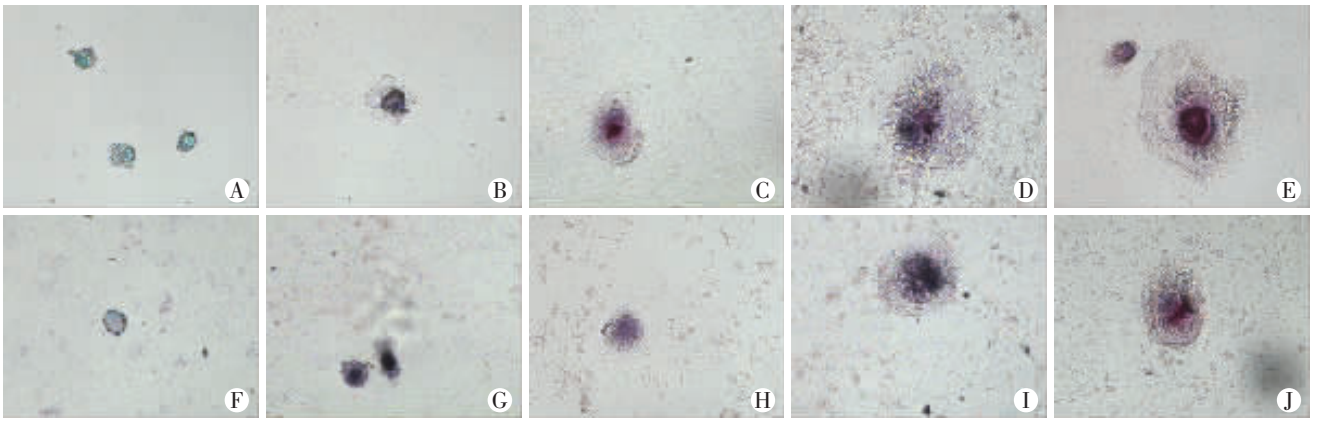
1.3 统计学分析

独立重复实验3次。数据用$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 16.0统计软件行组间比较单因素方差分析及相关性检验Pearson分析。



A：对照组；B：诱导组；C：阻断组

图 1　免疫荧光染色观察 CD147 在各组破骨前体细胞膜上的表达（FITC 标记）



A－E：诱导组；F－J：阻断组；A、F 3 d；B、G 6 d；C、H 9 d；D、I 12 d；E、J 15 d

图 2　培养的破骨细胞不同时间段染色观察（TRAP ×400）

2　结果

2.1　CD147 在外周血破骨前体细胞膜表面的表达

外周血 OPCs 培养 48 h 后，间接法免疫荧光染色显示对照组、诱导组、阻断组的细胞膜上均有 FITC 绿色荧光（图 1），表明 CD147 在外周血破骨前体细胞膜上存在表达。

2.2　流式细胞仪测定 CD147 在细胞膜上的表达量

外周血 OPCs 培养 24、48 h 后，间接荧光标记，流式细胞仪上测定荧光强度。对照组（159.55 ± 1.65）、诱导 24 h 组（171.18 ± 3.46）、诱导 48 h 组（178.47 ± 4.59）的荧光强度逐渐增强（$P<0.05$）；而阻断 24 h 组（117.69 ± 9.01）荧光强度明显减弱（$P<0.01$），阻断 48 h 组（166.15 ± 4.89）荧光强度反而增高但低于诱导 48 h 组（$P<0.05$）。在 OPCs 细胞分化过程中，CD147 在其细胞膜上表达逐渐增强，而 CD147Ab 能显著减弱 CD147 在细胞膜上的表达，但随着诱导时间的增加，CD147 的表达又增强。

2.3　TRAP 染色观察破骨前体细胞的分化成熟

初始培养时细胞数量较多，于第 3 天换液时去除未贴壁细胞，阻断组贴壁细胞明显少于诱导分化组（$P<0.01$）。细胞伪足伸出延后、融合细胞数少，显示明显的成熟延迟（图 2）。诱导组细胞在第 9 天即可见成熟的破骨样细胞，而第 12、15 天可见完全成熟的破骨样细胞；而阻断组 OCs 出现明显的成熟延迟且细胞个头小，成熟不完全。于第 9、12、15 天计算两组的 TRAP 阳性的 OCs 数，诱导组细胞数显著多于阻断组（$P<0.01$）。

2.4　Real-time PCR 检测 CD147、TRAP mRNA 的表达及两者相关性分析

CD147 mRNA 的表达在 OPCs 诱导分化过程逐渐增高，CD147Ab 能抑制 CD147 mRNA 的表达；TRAP mRNA 的表达也随 OPCs 诱导分化逐渐增高，阻断组 TRAP mRNA 相对表达量显著低于诱导分化组（$P<0.05$）（表 1）。经 Pearson 相关分析，TRAP mRNA 的相对表达量与 CD147 mRNA 的表达量呈显著正相关（$r<0.833$，$P<0.01$）。

表 1　各组 CD147、TRAP mRNA 的相对表达量（$\bar{x}\pm s$）

组别	CD147	TRAP
对照组	1.000	
诱导 24 h 组	1.393 ± 0.248[a]	1.810 ± 0.398
阻断 24 h 组	0.673 ± 0.175[b]	0.784 ± 0.265[b]
诱导 48 h 组	1.772 ± 0.326[abc]	2.608 ± 0.906[bc]
阻断 48 h 组	1.242 ± 0.355	0.900 ± 0.128

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与诱导 24 h 组比较；c：$P<0.05$，与阻断 48 h 组比较

3　讨论

肿瘤骨转移在病理上分为成骨型、破骨型破坏及两者混合型，但不管哪一种类型，OCs 在肿瘤转移骨吸收破坏中都发挥了关键的作用。肿瘤骨破坏是一个恶性循环的过程，肿瘤组织并不能直接的破坏骨组织，但

其分泌的细胞因子(如 RANK、PTHrP、IL-6)直接或间接的促进 OCs 的分化和活化,反过来骨吸收时 OCs 和骨基质释放的细胞因子又可以刺激肿瘤细胞的生长[13]。因此遏制肿瘤骨转移不仅要从肿瘤细胞入手,破细胞的干预也是一个研究的方向,减少骨吸收也可以减轻骨肿瘤负荷[3]。CD147 被发现表达于多种肿瘤的外周并参与肿瘤的浸润转移,在肿瘤的转移过程中发挥重要的作用。本实验使用 RANKL 和 M-CSF 诱导 OCs 的生成,在 OPCs 向 OCs 的分化成熟过程中,CD147 在 OPCs 膜上的表达增强,且其基因表达水平也显著增高,说明其参与 OCs 分化成熟的过程。研究表明 CD147 不仅表达于多种细胞膜表面,特别是肿瘤的外周,也有多种可溶性的活性形式作用于远处的细胞发挥生物学效应,其本身既是受体也是配体,膜型和可溶性的 CD147 与膜型 CD147 作用启动细胞内信号途径而发挥生物学作用[13]。因此 CD147 可能在肿瘤和 OCs 都起重要的作用,参与肿瘤骨破坏的恶性循环的过程,但需要实验的进一步证实。

本实验使用 CD147Ab 抑制 CD147 在 OPCs 中的表达,TRAP 染色发现成熟的 OCs 数量明显减少、OCs 体积减小,且 TRAP mRNA 的表达与 CD147 mRNA 呈正相关关系,进一步的说明 CD147 参与 OCs 分化成熟的过程,抑制 CD147 的表达能导致 OCs 成熟障碍。既往研究表明 CD147 参与细胞的黏附,可作为肿瘤细胞表面间质胶原酶的锚定蛋白,可以与 Integrin 家族 $\alpha3\beta1$ 和 $\alpha6\beta1$ 形成蛋白复合物[4]。因此成熟 OCs 数量的减少也可能和 CD147 影响 OPCs 的贴壁减少有关,但需要进一步的实验证实。研究表明抑制 CD147 的表达或者阻断其作用能明显减低肿瘤的浸润、转移,CD147 被越来越多的学者认为是肿瘤治疗中新的靶点[14];本实验证实 CD147Ab 亦能抑制 OCs 的成熟,因此在肿瘤骨转移的治疗中,CD147 可能是一个选择。

CD147 参与肿瘤的浸润、转移,其主要是刺激肿瘤间质细胞主要为成纤维细胞分泌 MMPs,作为 MMPs 的上游调节子而发挥作用。但在本实验中对 CD147Ab 抑制 OCs 的成熟具体的机制没有进一步的阐明,猜测可能与 MMPs 的分泌有关,是下一步实验的方向。MMPs 与 OCs 的关系已有较多的报道[15],其主要是参与 OCs 的聚集,而 OCs 本身也分泌一些 MMPs,参与骨组织表面基质的降解。而且在风湿性关节炎(RA)的研究中发现 RA 患者滑膜组织中 CD147 高表达,CD147 活化单核-巨噬细胞,介导 MMPs 和炎性因子分泌而参与关节软骨、骨组织的降解、破坏;且抗 CD147 治疗通过降低 MMPs 和炎性因子的分泌,减轻软骨破坏和滑膜炎[8]。因此 CD147Ab 抑制 OCs 的成熟可能与 MMPs 的分泌减少有关。

综上所述 CD147 可能作为我们治疗肿瘤转移骨破坏的一个新的靶点。但其具体的机制需要进一步的研究。此外,骨质疏松的发生也与 OCs 的活化有关[16],抑制 CD147 的表达,亦可能是治疗骨质疏松的一个新的途径。

参考文献:

[1] Mundy G R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(8): 584-593.

[2] Coleman R E. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies[J]. Cancer Treat Rev, 2001, 27(3): 165-176.

[3] Kawatani M, Osada H. Osteoclast-targeting small molecules for the treatment of neoplastic bone metastases[J]. Cancer Sci, 2009, 100(11): 1999-2005.

[4] Iacono K T, Brown A L, Greene M I, *et al*. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology[J]. Exp Mol Pathol, 2007, 83(3): 283-295.

[5] 王晓澍,游潮,孙晓川. MCT1、CD147 在人胶质瘤中的表达、相关性及其与预后的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(9): 985-988.

[6] Dean N R, Newman J R, Helman E E, *et al*. Anti-EMMPRIN monoclonal antibody as a novel agent for therapy of head and neck cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(12): 4058-4065.

[7] Jia L, Wei W, Cao J, *et al*. Silencing CD147 inhibits tumor progression and increases chemosensitivity in murine lymphoid neoplasm P388D1 cells[J]. Ann Hematol, 2009, 88(8): 753-760.

[8] Jia J, Wang C, Shi Z, *et al*. Inhibitory effect of CD147/HAb18 monoclonal antibody on cartilage erosion and synovitis in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2009, 48(7): 721-726.

[9] Schmidt R, Bultmann A, Fischel S, *et al*. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes[J]. Circ Res, 2008, 102(3): 302-309.

[10] 黄红铭,姜华,张慧,等. 外周血单个核细胞诱导培养破骨细胞[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(1): 10-13.

[11] Sato T, Ota T, Watanabe M, *et al*. Identification of an active site of EMMPRIN for the augmentation of matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in a co-culture of human uterine cervical carcinoma cells and fibroblasts[J]. Gynecol Oncol, 2009, 114(2): 337-342.

[12] Roodman G D. Mechanisms of bone metastasis[J]. N Engl J Med, 2004, 350(16): 1655-1664.

[13] Schlegel J, Redzic J S, Porter C C, *et al*. Solution characterization of the extracellular region of CD147 and its interaction with its enzyme ligand cyclophilin A[J]. J Mol Biol, 2009, 391(3): 518-535.

[14] Li Y, Xu J, Chen L, *et al*. HAb18G (CD147), a cancer-associated biomarker and its role in cancer detection[J]. Histopathology, 2009, 54(6): 677-687.

[15] Krane S M, Inada M. Matrix metalloproteinases and bone[J]. Bone, 2008, 43(1): 7-18.

[16] Ng K W. Future developments in osteoporosis therapy[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2009, 9(4): 371-384.

(收稿:2010-07-01 修回:2010-07-25)

(编辑 龙 亮)