文章编号:1000-5404(2013)16-1663-04

论著

骨髓瘤细胞表达 APE1 促进 THP-1 细胞破骨样分化

周立为,杜 佳,张 亮,程 燚,王 东,谢家印 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

[摘要] **目的** 研究在非接触式共培养体系下,RNA 干扰多发性骨髓瘤细胞株 U266 APE1 表达对与其共培养的 THP-1 细胞破骨样分化的影响。**方法** ①将构建的 APE1 siRNA 表达载体导入 U266 细胞中。②Western blot 法检测 U266 细胞中 APE1 及破骨细胞分化因子(RANKL)蛋白表达。③建立非接触式共培养体系:THP-1 + U266 共培养组、THP-1 + $U266^{APE1\ siRNA}$ 共培养组和 THP-1 细胞单培养组。④抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色鉴定破骨样细胞,RT-PCR 法检测 THP-1 细胞 Cathepsin K 和 V-ATPase mRNA 表达水平。⑤光镜下观察骨切片陷窝形成。**结果** APE1 siRNA 能明显抑制 U266 细胞中 APE1 及 RANKL 蛋白表达($P<0.01$)。THP-1 细胞与 U266 细胞共培养后,THP-1 细胞可分化为 TRAP 阳性的破骨样细胞,Cathepsin K 和 V-ATPase 基因表达显著升高($P<0.05$);U266 细胞经 APE1 siRNA 处理后,共培养体系中 THP-1 细胞诱导分化的 OCLs 数量减少,Cathepsin K 和 V-ATPase 基因水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** APE1 siRNA 能明显抑制 U266 细胞诱导的 THP-1 细胞的破骨样分化,其机制可能与 APE1 下调 U266 细胞 RANKL 有关。

[关键词] APE1;骨髓瘤骨病;共培养;THP-1;RNA 干扰
[中图法分类号] R394-33;R730.23;R733.3 [文献标志码] A

APE1 expression in multiple myeloma cells promotes differentiation of THP-1 cells into osteoclast-like cells

Zhou Liwei, Du Jia, Zhang Liang, Cheng Yi, Wang Dong, Xie Jiayin (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of RNA interference (RNAi) of apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) in multiple myeloma cell line U266 on the differentiation of a human monocytic cell line THP-1 into osteoclast-like cells in a contactless co-culture system. **Methods** Constructed APE1 siRNA expression vector Ad5v2 APE1 siRNA was used to transfect the U266 cells. The protein levels of APE1 and RANKL were detected by Western blotting. A co-culture system of THP-1 cells and U266 cells was established with Transwell insert culture dish. The co-culture system were divided into 3 groups: THP-1 + U266 group, THP-1 + $U266^{APE1\ siRNA}$ group and the control group (THP-1 cells). Osteoclast-like cells were identified through tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. The mRNA levels of Cathepsin K and V-ATPase were examined by RT-PCR. Osteoclast bone resorption was measured by pit assay. **Results** U266 cells transfected with Ad5v2 APE1 siRNA had significantly lower protein expression of APE1 and RANKL than the untransfected cells. THP-1 cells differentiated into the osteoclast-like cells with the elevated mRNA expression of Cathepsin K and V-ATPase($P<0.05$). The number of osteoclast-like cells was decreased significantly in the THP-1 + $U266^{APE1\ siRNA}$ group, as well as the mRNA levels of Cathepsin K and V-ATPase ($P<0.05$). **Conclusion** Inhibiting APE1 expression in U266 cells in a co-culture system suppresses the differentiation of THP-1 cells into osteoclast-like cells, which may be related to APE1 down-regulating RANKL in U266 cells.

[**Key words**] APE1; myeloma bone disease; co-culture; THP-1; RNA interference

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81172258). Corresponding author: Xie Jiayin, Tel: 86-23-68757157, E-mail: xiejia505@sina.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)是浆细胞的恶性肿瘤,在病程中约有 80% 的患者并发骨髓瘤骨病(myeloma bone disease,MBD),其进行性和破坏性的溶骨性病变严重影响 MM 患者的生存质量。MBD 的分子机制虽未明确,但已有研究发现,与其他肿瘤形成

[基金项目] 国家自然科学基金(81172258)
[通信作者] 谢家印,电话:(023)68757157,E-mail:xiejia505@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130516.1138.018.html(2013-05-16)

的骨转移瘤不同,MBD在发生溶骨性骨破坏过程中并不伴有新骨生成[1],MBD的形成是破骨细胞过度增殖活化及成骨细胞成熟受抑制所导致的骨代谢失衡的结果[2]。在骨髓微环境中,MM细胞与破骨细胞(osteoclasts,OCs)、成骨细胞(osteoblasts,OBs)形成复杂的交互作用,引起OCs或破骨样细胞(osteoclast-like cells,OCLs)生成增加和激活,MM细胞分泌破骨细胞活化因子以及成骨细胞抑制,从而造成溶骨性损害。人类脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子-1(apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox factor-1,APE1/Ref-1)是一个具有DNA损伤修复和氧化还原功能的双功能蛋白,在多个生物过程中发挥重要作用。APE1可通过氧化还原途径激活包括AP-1、NF-κB、P53、HIF在内的多种转录因子,从而调控细胞凋亡、增殖及分化等生物学过程[3]。我们从骨髓微环境着手,siRNA抑制U266细胞APE1表达,采用对人单核细胞功能有较好代表性的THP-1细胞株,与U266细胞构建共培养模型,观察共培养体系中THP-1细胞向OCLs的分化、破骨细胞特征性基因表达及破骨细胞功能,以期为靶向治疗骨髓瘤骨病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640培养基购于HyClone,胎牛血清购于GIBCO。Transwell小室(孔径0.4 μm)购于Millipore,APE1 siRNA由我室自行构建[4],DOTAP脂质体转染试剂盒购于Roche,兔抗人APE1多克隆抗体购于Santa Cruz,兔抗人RANKL多克隆抗体购于GeneTex。TRAP(抗酒石酸酸性磷酸酶)染色试剂盒及PMA(佛波醇)购于Sigma。PCR引物由上海捷瑞生物工程公司合成,RT-PCR试剂盒购于Promega。骨切片(厚度为200 μm)购于英国IDS公司。

1.2 细胞培养

人单核/巨噬细胞细胞株THP-1细胞及人多发性骨髓瘤细胞株U266细胞用10%胎牛血清的RPMI1640培养基培养,培养条件为37 ℃、5% CO_2,2~4 d换液。

1.3 APE1 siRNA载体转染U266细胞

前期实验中,我们已经筛选出抑制APE1表达超过90%特异siRNA[4],腺病毒表达载体Ad5v-APE1 siRNA由本实验室向德兵博士构建,滴度为1.6×10^{10}IU/mL,经预实验将50 MOI确定为有效工作浓度,感染U266细胞48 h。APE1 siRNA质粒转染U266细胞和阳性克隆的筛选依照文献[5]进行。

1.4 Western blot检测U266细胞中APE1及RANKL蛋白水平

收集APE1 siRNA处理的U266细胞提取总蛋白,Bradford法测定蛋白含量,经12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳进行分离后,转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉37 ℃封闭1 h,加入RANKL(1∶500)或APE1(1∶8 000)兔抗人多克隆抗体,4 ℃过夜后加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔抗体(1∶8 000)。洗膜后加入显色液,常规方法显色、定影。用QuantityOne 4.4.0软件分析各条带的灰度值,以目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带的灰度值表示相对蛋白含量,重复实验3次。

1.5 建立非接触式共培养体系

在含10%胎牛血清及200 ng/mL PMA的RPMI1640培养基中常规培养THP-1细胞,调整细胞密度以1×10^5/mL接种于已预置骨片的24孔板中,4 d后换液并除去非贴壁细胞。将接种有1×10^5/mL U266细胞的Transwell小室套入接种有贴壁THP-1细胞的24孔板中形成Transwell上、下室。实验分组:THP-1+U266组,THP-1+$U266^{APE1\ siRNA}$组,单独培养的贴壁THP-1细胞为对照组。置于37 ℃、5% CO_2饱和湿度孵育箱中,每3天换液。

1.6 TRAP染色及细胞计数

对共培养12 d的THP-1细胞进行TRAP染色,按照试剂盒说明书步骤进行操作。细胞用4%多聚甲醛固定后,加入染色液,37 ℃避光水浴60 min,光镜下观察。对任意6个视野中的TRAP阳性的多核破骨样细胞(≥3个核)计数。

1.7 骨吸收陷窝观察

于共培养后15 d取出骨片,用PBS冲洗,2.5%戊二醛固定液固定8 min,0.25 mol/L氢氧化铵中超声清洗1 min×3次,梯度乙醇脱水。1%甲苯胺蓝染液室温染色3 min后用蒸馏水清洗,光镜下观察。

1.8 RT-PCR检测THP-1细胞破骨细胞特征性基因

实验分组同1.5,共培养12 d后收集THP-1细胞,Trizol提取总RNA,RNA浓度和纯度的检测采用紫外分光光度法,$D(260)/D(280)$值均大于1.8。参照说明书进行RT-PCR。反应条件为95 ℃预变性3 min,95 ℃ 30 s、退火温度30 s、72 ℃ 60 s,共34个循环,72 ℃充分延伸10 min。以β-actin为内参,PCR引物经2%琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad图像分析系统扫描条带,Quantity One 4.4.0软件分析,以目的条带灰度值/内参照条带灰度值表示目的基因mRNA相对含量,重复实验3次。各引物和退火温度见表1。

表1 RT-PCR引物及退火温度

基因	引物序列	产物大小	退火温度(℃)
β-actin	5′-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3′ 5′-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3′	520 bp	54.5
Cathepsin K	5′-CTCAAGGTTCTGCTGCTA-3′ 5′-GACAGGAGTAACATATCC-3′	381 bp	50.8
V-ATPase	5′-AAGGGATGACCAGGAAGGAT-3′ 5′-AACATAGCACTGAGGACCCA-3′	410 bp	60.4

1.9 统计学处理

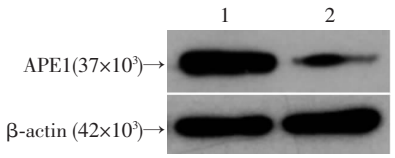
数据以$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS 19.0软件分析,2组间比较采用t检验分析,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 APE1 siRNA对U266细胞APE1蛋白表达的影响

APE1 siRNA转染U266细胞48 h后,Western blot检测结果显示U266细胞APE1蛋白表达水平(1.64±0.13)明显降低,与对照组(0.33±0.06)比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。由此表明,本研究合成的APE1 siRNA可有效地抑制

U266 细胞 APE1 蛋白表达水平。见图 1。

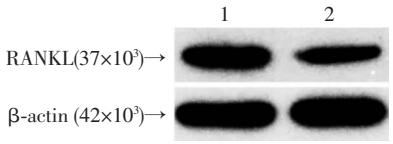


1:对照组;2:APE1 siRNA 组

图 1 Western blot 检测 U266 细胞 APE1 蛋白表达

2.2 APE1 siRNA 对 U266 细胞 RANKL 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示:经 APE1 siRNA 处理的 U266 细胞 RANKL 的蛋白表达水平(0.79 ± 0.08)明显降低,与对照组(0.31 ± 0.04)比较,差异有统计学意义(P < 0.01)。见图 2。



1:对照组;2:APE1 siRNA 组

图 2 Western blot 检测 U266 细胞 RANKL 蛋白表达

2.3 APE1 siRNA 对破骨样细胞生成的影响

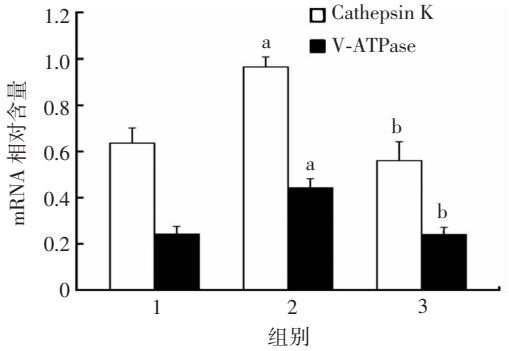
光镜下观察,单培养组中 THP-1 细胞胞体较小,TRAP 染色呈阴性;THP-1 + U266 组中可见 TRAP 染色阳性破骨样细胞,胞体较大,细胞边缘可见伪足样突起,胞质内有红色颗粒沉积,光学显微镜下计数为(324 ± 23)个,提示:在共培养体系中,U266 细胞可诱导破骨前体细胞 THP-1 细胞向 OCLs 分化。但经 APE1 siRNA 处理的共培养体系中,OCLs 生成减少,光学显微镜下计数为(82 ± 11)个,与 THP-1 + U266 组相比,差异有统计学意义(P < 0.05)。见图 3。

2.4 骨片观察

光镜下观察,THP-1 + U266 组的骨片表面可见明显的骨吸收陷窝(图 4),说明破骨样细胞具有溶骨活性。骨吸收陷窝被染为紫色,呈腊肠形或椭圆形,且边界清晰。而 THP-1 + U266$^{\text{APE1 siRNA}}$组及 THP-1 细胞单培养组骨片上未见骨吸收陷窝。

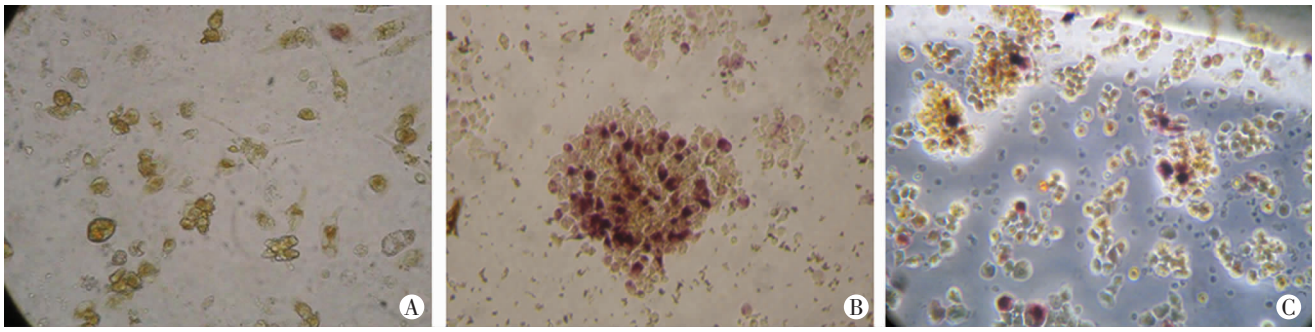
2.5 共培养体系中 THP-1 细胞 Cathepsin K 和 V-ATPase mRNA 表达

RT-PCR 结果显示(图 5),THP-1 + U266 组中 THP-1 细胞的 Cathepsin K 和 V-ATPase 基因表达水平均升高,与 THP-1 细胞单培养组相比,差异有统计学意义(P < 0.05);THP-1 + U266$^{\text{APE1 siRNA}}$组中 THP-1 细胞的 Cathepsin K 和 V-ATPase 基因表达水平均降低,与 THP-1 + U266 组相比差异有统计学意义(P < 0.05)。THP-1 + U266$^{\text{APE1 siRNA}}$组中 THP-1 细胞的 Cathepsin K 和 V-ATPase 基因表达水平与 THP-1 细胞单培养组相比无统计学差异。



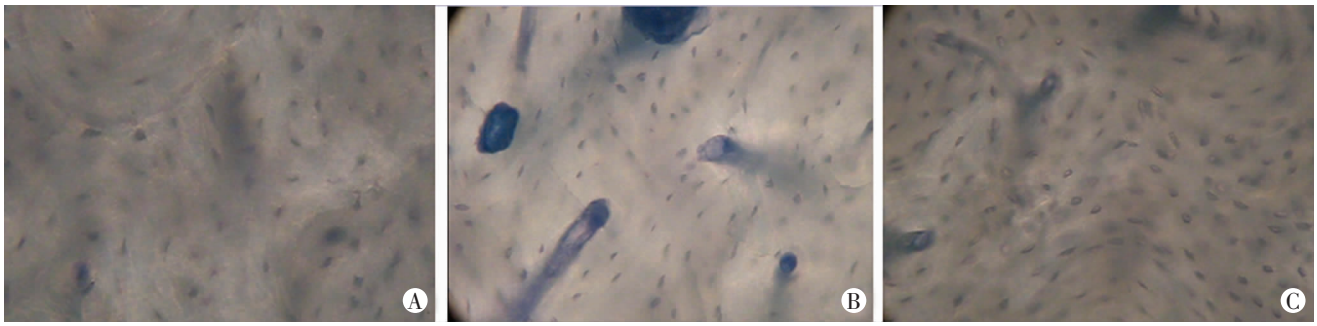
1:THP-1 组;2:THP-1 + U266 组;3:THP-1 + U266$^{\text{APE1 siRNA}}$组
a:P < 0.05,与 THP-1 组比较;b:P < 0.05,与 THP-1 + U266 组比较

图 5 Cathepsin K 及 V-ATPase mRNA 表达



A:THP-1 细胞单培养组;B:THP-1 + U266 组;C:THP-1 + U266$^{\text{APE1 siRNA}}$组

图 3 破骨样细胞 TRAP 染色观察 APE1 siRNA 对破骨样细胞生成的影响 (×200)



A:THP-1 细胞单培养组;B:THP-1 + U266 组;C:THP-1 + U266$^{\text{APE1 siRNA}}$组

图 4 THP-1 细胞共培养后形成骨吸收陷窝甲苯胺蓝染色观察 (×200)

3 讨论

MBD是MM患者的常见并发症,临床表现主要为溶骨性损害、骨质疏松、病理性骨折、高钙血症和严重骨痛,骨重塑的失衡是其发生的主要原因[6]。MM患者骨髓内的OCs主要受到来自于骨髓微环境中的骨髓瘤细胞、基质细胞及T淋巴细胞分泌的破骨细胞活化因子作用,引起OCs生成增多、功能活跃,从而导致溶骨性破坏增加。目前OCs的来源尚不明确,多倾向于外周血或者骨髓单核/巨噬细胞来源的破骨祖细胞,而后者转化为OCs或OCLs的前提条件可能是骨髓瘤细胞分泌某些破骨细胞活化因子如RANKL、M-CSF等起诱导作用[7],或刺激其他细胞分泌破骨细胞活化因子对破骨祖细胞进行招募,促进其分化和活化。目前已有报道,用PMA刺激可代表单核细胞功能的THP-1细胞后,使其由悬浮细胞分化为贴壁的巨噬细胞,并停止增殖[8-9]。再经RANKL和M-CSF联合诱导,可得到TRAP染色阳性的OCLs。本研究从骨髓微环境着手,采用Transwell构建THP-1细胞与骨髓瘤细胞U266非接触式共培养模型,以模拟含有由某些破骨活化因子的骨髓微环境,观察破骨祖细胞向OCLs分化的过程。研究发现:在共培养体系中,可观察到TRAP染色阳性的多核破骨样细胞,胞体较大,细胞边缘可见伪足样突起,胞质内有红色颗粒沉积。同时发现破骨细胞标志酶Cathepsin K和V-ATPase的mRNA表达增高,且破骨样细胞具有骨吸收功能,由此提示:骨髓瘤细胞U266可诱导THP-1细胞破骨样分化。

本研究发现,骨髓瘤细胞株可表达RANKL,后者对破骨细胞分化起重要调控作用。已有报道RANKL可诱导单核巨噬细胞系的破骨前体细胞分化为破骨细胞[10]。因此,我们推测骨髓瘤细胞株U266诱导THP-1细胞破骨样分化的机制可能与U266表达RANKL有关。脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子-1(APE1/Ref-1)是一种独特的DNA损伤修复、氧化还原双功能蛋白,除具有碱基切除修复功能外,还可通过氧化还原激活多种转录因子调控氧化应激、细胞凋亡等重要功能[11]。Xie等[12]研究发现,APE1促进骨髓基质细胞分泌细胞因子IL-6及IL-8,敲低APE1表达可显著下调其下游分子AP-1和NF-κB的DNA结合活性,而APE1上调AP-1、NF-κB的DNA结合活性对胃上皮细胞的IL-8及MIP-3α分泌亦有促进作用[13]。OCs/OCLs的分化和活化受多种细胞因子的调节,APE1是否通过调节破骨细胞活化因子参与破骨样分化,目前国内外尚少见报道。本研究采用RNA干扰技术,沉默APE1蛋白表达,发现APE1 siRNA可明显抑制骨髓瘤细胞株U266细胞APE1及RANKL蛋白表达,与对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.01$)。在共培养体系中,RT-PCR检测发现:THP-1 + U266$^{\text{APE1 siRNA}}$组破骨细胞标志酶Cathepsin K和V-ATPase的mRNA表达降低,这与TRAP染色实验中该组TRAP阳性破骨样细胞数量减少及骨陷窝实验中的阴性结果一致,提示APE1可能通过影响U266细胞RANKL的表达,从而参与调节THP-1细胞向OCLs分化的过程。

本研究采用共培养体系,发现骨髓瘤细胞株U266可诱导破骨组细胞向破骨样细胞分化,并进一步揭示多功能蛋白APE1可能通过调控骨髓瘤细胞RANKL的表达,参与破骨样细胞的分化过程,这为阐明骨髓瘤骨病的发病机制以及寻找治疗新靶点提供了实验依据。

参考文献:

[1] Roodman G D. Pathogenesis of myeloma bone disease[J]. Blood Cells Mol Dis, 2004, 32(2): 290-292.

[2] Boyce B F, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling[J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473(2): 139-146.

[3] Tell G, Quadrifoglio F, Tiribelli C, *et al*. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(3): 601-620.

[4] Yang Z Z, Chen X H, Wang D. Experimental study enhancing the chemosensitivity of multiple myeloma to melphalan by using a tissue-specific APE1-silencing RNA expression vector[J]. Clin Lymphoma Myeloma, 2007, 7(4): 296-304.

[5] 谢家印, 王东, 杨镇洲, 等. RNA干扰抑制KM3细胞APE1蛋白表达对其增殖与凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 700-703.

[6] Longo V, Brunetti O, D'Oronzo S, *et al*. Therapeutic approaches to myeloma bone disease: an evolving story[J]. Cancer Treat Rev, 2012, 38(6): 787-797.

[7] Lai F P, Cole-Sinclair M, Cheng W J, *et al*. Myeloma cells can directly contribute to the pool of RANKL in bone bypassing the classic stromal and osteoblast pathway of osteoclast stimulation[J]. Br J Haematol, 2004, 126(2): 192-201.

[8] 刘天云. RANKL和M-CSF诱导THP-1细胞向破骨细胞样细胞分化的研究[J]. 山东医药, 2011, 51(33): 19-21.

[9] Munoz-Pacheco P, Ortega-Hernandez A, Miana M, *et al*. Ezetimibe inhibits PMA-induced monocyte/macrophage differentiation by altering microRNA expression: a novel anti-atherosclerotic mechanism[J]. Pharmacol Res, 2012, 66(6): 536-543.

[10] Buckley K A, Chan B Y, Fraser W D, *et al*. Human osteoclast culture from peripheral blood monocytes: phenotypic characterization and quantitation of resorption[J]. Methods Mol Med, 2005, 107: 55-68.

[11] Al-Safi R I, Odde S, Shabaik Y, *et al*. Small-molecule inhibitors of APE1 DNA repair function: an overview[J]. Curr Mol Pharmacol, 2012, 5(1): 14-35.

[12] Xie J Y, Li M X, Xiang D B, *et al*. Elevated expression of APE1/Ref-1 and its regulation on IL-6 and IL-8 in bone marrow stromal cells of multiple myeloma[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2010, 10(5): 385-393.

[13] O'Hara A M, Bhattacharyya A, Bai J, *et al*. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha-induced IL-8 expression in gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and AP endonuclease-1/redox factor (Ref)-1[J]. Cytokine, 2009, 46(3): 359-369.

(收稿:2013-02-05;修回:2013-04-22)

(编辑 汪勤俭)