文章编号:1000-5404(2013)16-1667-04

论著

# 唑来膦酸对破骨细胞生成及Syk基因表达的影响

王宏利,李 鹏,刘 强,董 伟,戚孟春,李金源 (063000 河北 唐山,河北联合大学口腔医学院口腔颌面外科教研室)

[摘要] **目的** 探讨唑来膦酸(zoledronate acid,ZOL)在共培养体系中对脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase,Syk)基因表达及破骨细胞(osteoclast,OC)生成的影响。**方法** 体外将小鼠颅骨成骨细胞与单核巨噬细胞RAW264.7共培养,将细胞分为2组:对照组及$5\times10^{-7}$mol/L ZOL处理24 h组(ZOL组)。应用TRAP染色、牙本质吸收陷窝检测OC生成及骨吸收情况;Real-time PCR、Western blot、免疫荧光化学检测Syk基因表达。**结果** 2组细胞均有TRAP染色阳性多核OC生成,并在牙本质磨片上形成吸收陷窝;但OC生成及吸收陷窝的数目和体积ZOL组均显著少于对照组($P<0.01$)。Syk mRNA及蛋白水平在ZOL组也显著下降($P<0.01$)。免疫荧光检测显示,Syk在对照组细胞质内强表达,并在细胞周缘形成肌动蛋白环样结构;而ZOL组Syk表达明显减弱,肌动蛋白环样结构消失。**结论** ZOL可显著抑制共培养体系中OC生成和骨吸收功能,这可能与其对Syk基因表达的抑制有关。

[关键词] 唑来膦酸;破骨细胞生成;脾酪氨酸激酶;抗酒石酸酸性磷酸酶
[中图法分类号] R322.71;R394.3;R916.4 [文献标志码] A

# Effect of zoledronate acid on osteoclastogenesis and expression of spleen tyrosine kinase in a osteoclast-osteoblast co-culture system *in vitro*

Wang Hongli, Li Peng, Liu Qiang, Dong Wei, Qi Mengchun, Li Jinyuan (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Hebei United University, Tangshan, Hebei Province, 063000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of zoledronate acid (ZOL) on the gene expression of spleen tyrosine kinase (Syk) and osteoclastogenesis in an osteoclast-osteoblast co-culture system. **Methods** Mice calvarial osteoblasts at passage 3 and RAW264.7 cells were co-cultured, and the cells were divided into 2 groups, control and ZOL treatment group ($5\times10^{-7}$ mol/L, for 24 h). TRAP staining and dentin resorption lacunae examination were used to detect osteoclast formation and bone resorption. While, real-time PCR, Western blotting and immunofluorescent chemical assay were applied to measure Syk expression at mRNA and protein levels. **Results** TRAP positive cells and dentin resorption lacunae were observed in both groups. However, there were less TRAP positive multi-nucleated osteoclasts and resorption lacunae in the ZOL treatment group than in the control ($P<0.01$). ZOL treatment also resulted in a significant decrease in Syk mRNA and protein levels ($P<0.01$). Immunofluorescent staining showed that Syk was strongly expressed in the cytoplasm of control group and formed actin-like rings around the cell, but, it was only weakly expressed in treatment group but no actin-like ring was found. **Conclusion** In the co-culture system, ZOL significantly inhibits osteoclast formation and bone resorption in our co-culture system, which might be due to its inhibition on Syk expression.

[**Key words**] zoledronate; osteoclastogenesis; spleen tyrosine kinase, tartrate-resistant acid phosphatase

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81270965) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2011401044). Corresponding author: Qi Mengchun, E-mail: qimengchun@163.com

破骨细胞(osteoclast, OC)活性异常在骨质疏松、风湿性关节炎、Paget's病等疾病中发挥着重要作用[1]。在骨吸收部位,OC表面αvβ3整合素分子与骨基质结合,诱发细胞内一系列信号分子的活化,使细胞骨架重排形成肌动蛋白环,从而形成封闭区,为骨吸收提供特殊的微环境[2]。在上述信号通路中,脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase,Syk)作为重要的信号分子,对OC细胞骨架构建发挥着极其重要的作用[2-4]。

[基金项目] 国家自然科学基金(81270965);河北省自然科学基金(C2011401044)
[通信作者] 戚孟春, E-mail: qimengchun@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130425.0902.003.html(2013-04-25)

唑来膦酸(zoledronate acid, ZOL)是临床上治疗骨吸收性疾病的首选双膦酸盐类药物,主要通过对OC的抑制发挥作用[5],但确切的分子机制还知之甚少。本研究通过建立共培养体系,应用ZOL处理OC前体RAW264.7细胞,观察其对Syk基因表达及OC生成的影响,探索Syk在ZOL诱发的OC生成及骨吸收障碍中的作用,进一步揭示ZOL对OC抑制的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

RAW264.7细胞购自北京军事医学科学院,$PGE_2$、1,25-$(OH)_2VitD_3$、TRAP染色试剂盒购自美国Sigma公司,α-MEM培养基、胎牛血清购自美国HyClone公司,RANKL购自美国Biovision公司,兔抗鼠Syk多克隆抗体购自美国SANTA CRUZ公司,新生SPF级BALB/c小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)。

### 1.2 成骨细胞-破骨细胞共培养及实验分组

胰酶消化法培养小鼠颅骨成骨细胞(OB)[6]。所培养细胞经地塞米松、β-甘油磷酸钠和抗坏血酸诱导,1周后表现为碱性磷酸酶染色阳性,2周后可形成矿化结节,茜素红染色为鲜红色,证实细胞具有体外成骨功能;第3代成骨细胞用于本实验。将小鼠单核巨噬细胞前体RAW264.7细胞用RANKL(50 ng/mL)预诱导48 h,使之向前破骨细胞分化。将预诱导的RAW264.7细胞($1\times10^3$/孔)与成骨细胞($4\times10^3$/孔)混合接种于48孔板;加入$10^{-6}$ mol/L $PGE_2$和$10^{-8}$ mol/L 25-$(OH)_2VitD_3$;用含有10% 胎牛血清的α-MEM完全培养基在37 ℃、5% $CO_2$条件下培养;每2天换液1次。将共培养的细胞分为2组:对照组及ZOL组(于共培养第3天加入$5\times10^{-7}$ mol/L ZOL处理24 h,然后继续培养)。

### 1.3 破骨细胞生成及骨吸收检测

抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色:于共培养第7天收获细胞爬片,按试剂盒操作步骤进行染色。相差显微镜下观察:400倍下任选取5个视野,计数每视野中TRAP染色阳性细胞(细胞核≥3个,细胞质内出现棕褐色颗粒)数目,数目的总和/5为该细胞爬片的OC数目。牙本质磨片吸收陷窝检测:于共培养第7天收获牙本质磨片,扫描电镜(SEM)下观察。500倍下每牙本质磨片上任选取5个视野拍照,用医学数码图像分析系统Med6.0测量5个视野吸收陷窝数目及陷窝面积,数值总和/5代表该磨片的陷窝数目及面积。

### 1.4 Syk基因表达检测

参见文献[7]方法于共培养4 d后进行免疫荧光化学检测。兔抗鼠Syk多克隆抗体为一抗,FITC荧光标记(绿色)的羊抗兔IgG为二抗,Hoechst复染细胞核(蓝色),封片后激光共聚焦显微镜(LSCM)下观察。Real-time PCR检测mRNA:共培养4 d后收获细胞,提取总RNA,PCR仪上逆转录合成cDNA。Syk引物上游5′-AGGAAACCTCCACTTGCTCTC-3′,下游5′-GTCTGCACCCCTTCAGAGTT-3′,片段长度为183 bp。GAPDH引物上游5′-AATGTGTCCGTCGTGGATCT-3′,下游5′-TCCAC-CACCCTGTTGCTGTA-3′,片段长度为262 bp。cDNA扩增后在Rotor-Gene 3000荧光定量PCR仪上进行实时检测。反应条件:95 ℃ 15 s;60 ℃ 40 s;72 ℃ 15 s;共50个循环。系统自动计算出样品荧光强度增加到阈值时的平均Ct值、待测基因与管家基因GAPDH比较的ΔCt值,以及与对照组ΔCt值比较的ΔΔCt,进而计算出样品的相对浓度。每组细胞取3孔标本进行检测。Western blot检测:细胞共培养4 d后,RIPA裂解液与蛋白酶抑制剂混合液(100:1)提取蛋白质,测定蛋白质浓度,煮沸变性5 min,凝胶电泳并转膜,经5% BSA室温封闭2 h,Syk多克隆和GADPH多克隆一抗孵育过夜。二抗室温1 h,DAB显色1 min。以GAPDH为对照。用ImageJ分析软件检测膜上每个条带的灰度值;实验重复3次。

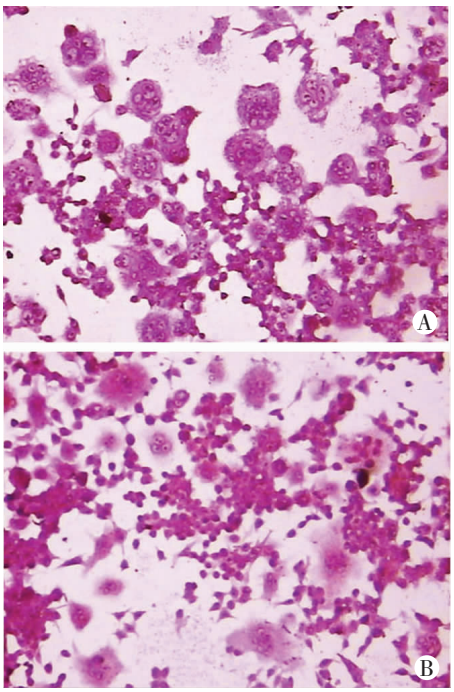
### 1.5 统计学分析

原始数据用Excel 2003建立数据库,数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 13.0统计软件对数据进行两独立样本的$t$检验。

## 2 结果

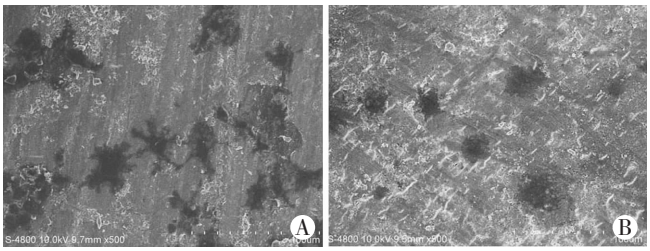
### 2.1 ZOL对OC生成及骨吸收功能的影响

细胞共培养至第7天,2组均形成TRAP染色阳性多核破骨细胞(图1),但ZOL组OC数量显著少于对照组($P<0.01$,表1),ZOL组OC的体积也较小,提示ZOL可显著抑制共培养体系中OC的生成。牙本质磨片SEM检测见图2,吸收陷窝计数及陷窝面积见表1。可见2组牙本质磨片上均有不同程度的吸收陷窝,但对照组吸收陷窝数目较多,陷窝面积较大,而ZOL组吸收陷窝数目较少,面积较小($P<0.01$)。说明ZOL在共培养体系中可显著抑制OC骨吸收功能。




A:对照组; B:ZOL组

**图1 TRAP染色观察2组破骨细胞生成** (×200)



A：对照组；B：ZOL 组

**图 2　扫描电镜观察 2 组牙本质磨片吸收陷窝**　（×500）

**表 1　2 组破骨细胞计数及牙本质磨片吸收陷窝比较**（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

| 组别 | TRAP 阳性细胞计数(个) | 吸收陷窝计数(个) | 吸收陷窝面积($\mu m^2$) |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 29.4 ±4.5 | 15.2 ±3.8 | 10 605.81 ±251.34 |
| ZOL 组 | 16.3 ±3.7[a] | 7.3 ±3.1[a] | 4 103.17 ±88.44[a] |

a：$P<0.01$，与对照组比较

## 2.2　免疫荧光化学检测 Syk 表达

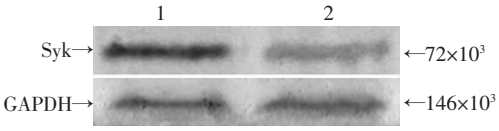
LSCM 检测(图 3)显示，Syk 在对照组 OC(多核)及其前体(单核)细胞质内均呈阳性表达(绿色荧光)；在部分 OC 细胞周缘，Syk 表达较强，呈环形分布，类似于肌动蛋白(actin)环。而 ZOL 组细胞，Syk 在前体细胞表达与对照组比较变化不明显；但在多核 OC，Syk 表达明显减弱，也无肌动蛋白环样环形分布。

## 2.3　Real-time PCR 检测 Syk mRNA 水平

Real-time PCR 检测显示，对照组及 ZOL 组 Syk 相对浓度分别为(1.010 ±0.170)和(0.519 ±0.040)；ZOL 组显著低于对照组($P<0.01$)；提示 ZOL 可显著抑制 Syk 基因 mRNA 水平。

## 2.4　Western blot 检测

ZOL 组蛋白灰度值为 63.60 ±4.69，较对照组(灰度值 98.84 ±3.64)下降了 35.65%($P<0.01$)。见图 4。

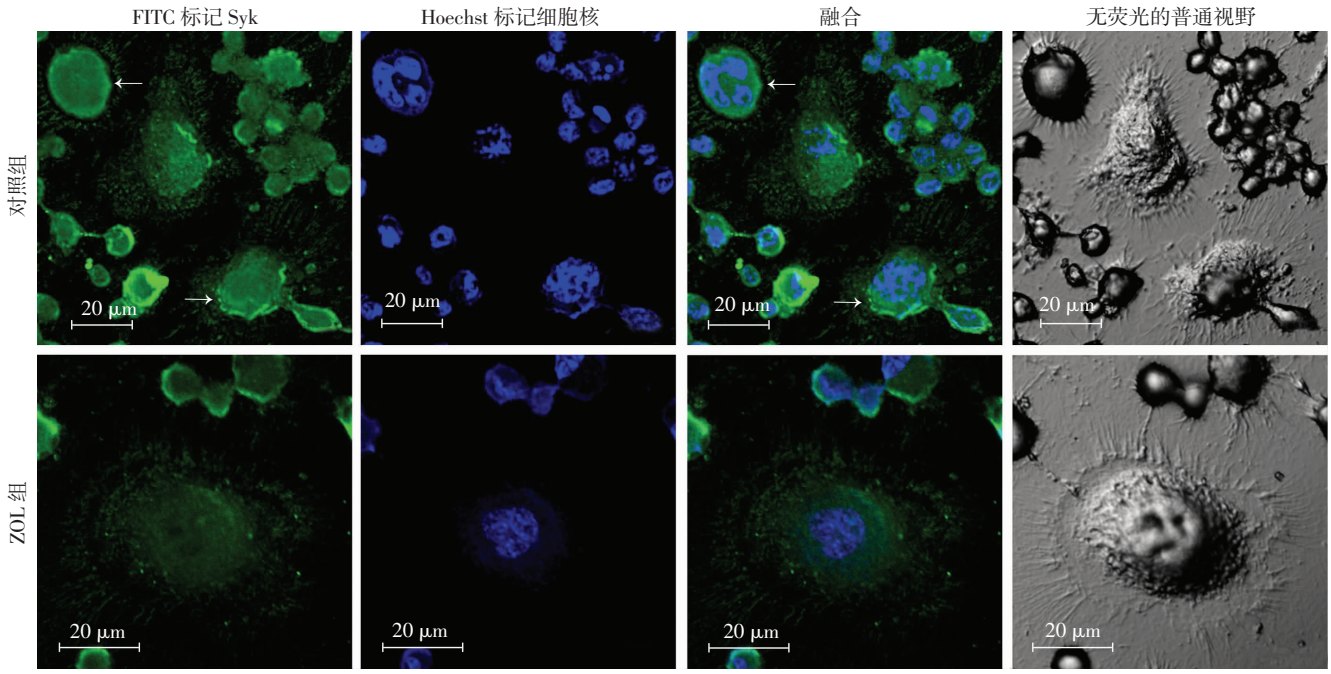



1：对照组；2：ZOL 组

**图 4　Western blot 检测 2 组 Syk 在 OC 中的表达**

## 3　讨论

破骨细胞是体内唯一具有骨吸收功能的多核巨细胞，其活性异常在许多骨吸收性疾病中发挥着极其重要的作用[1]。OC 在骨吸收部位形成封闭区(sealing zone)，并向其内运输 $H^+$ 和蛋白质水解酶，降解吸收陷窝内骨基质。封闭区的形成需要细胞骨架重排，形成肌动蛋白环；而在上述过程中，αvβ3 整合素介导的胞内信号通路发挥着至关重要的作用[2-4]。在 αvβ3 诱发的细胞骨架蛋白重排中，脾酪氨酸激酶 Syk 是关键的信号分子[2-4]。Syk 和 c-Src、Dap12、Vav3、Rac 等信号分子一起参与了肌动蛋白环的形成。αvβ3 与骨吸收部位骨基质蛋白(RGD 序列)结合后，使与其结合的 c-Src 磷酸化，并募集胞内 Syk 形成三元复合体。Syk 作




↑：示肌动蛋白环样结构

**图 3　免疫荧光化学检测 2 组 Syk 在 OC 中的表达**　(LSCM)

为适配蛋白通过SH2功能域与OC表面含有ITAM功能域(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)的Dap12结合。活化的c-Src使Syk磷酸化,并募集SLP-76蛋白,随之与鸟嘌呤转换因子Vav3结合。Syk使Vav3磷酸化,后者则将无活性的Rac(与GDP结合)转变成活性Rac(与GTP结合)。GTP-Rac复合体进而使OC细胞骨架重排形成肌动蛋白环。

本研究发现,应用$5\times10^{-7}$ mol/L ZOL处理OB-OC共培育体系,发现Syk基因mRNA水平下降了48.1%,而蛋白水平下降了35.65%;免疫荧光检测则表明,对照组OC及其前体细胞细胞质内Syk均呈阳性表达,特别是在细胞周缘荧光较强,呈环形分布,类似于肌动蛋白环;而ZOL处理组,Syk在OC中表达明显减弱,也无肌动蛋白环样分布。表明ZOL不仅显著抑制了Syk基因表达,而且降低了Syk活性,干扰了其与肌动蛋白的结合,不能形成肌动蛋白环,从而丧失了骨吸收功能;提示Syk基因表达及活性的抑制在ZOL诱发的破骨细胞骨吸收障碍中发挥着重要作用。国外学者研究也表明,Syk对OC功能至关重要;Syk-/-小鼠虽然不会出现严重的骨硬化症(osteopetrosis),但会出现骨骼量显著增加,Syk-/- OC在体外也因细胞骨架不能形成肌动蛋白环而发生骨吸收障碍[3],而这些细胞即使补充没有活性的Syk,也不能挽救OC的功能缺陷,提示Syk活性对OC细胞骨架重排至关重要。鉴于αvβ3/c-Src/Syk三元复合体在OC细胞骨架构建中的重要作用,Mocsai[8]应用免疫荧光法检测Syk与肌动蛋白在OC内分布的关系,发现Syk的分布与肌动蛋白环高度吻合,提示Syk与肌动蛋白间存在直接的结合。本研究结果也进一步印证了Mocsai的研究结论。体内研究[9]发现,应用双膦酸盐(如ZOL)的患者骨髓腔内出现游离的多核巨细胞,这也可能与对Syk的抑制及细胞骨架肌动蛋白环形成障碍,细胞不能贴附于骨表面有关。

ZOL除显著下调Syk基因表达,影响OC细胞骨架重排,进而影响OC骨吸收功能外,本研究还发现,ZOL使OC数量显著降低,抑制了OC生成,这可能与ZOL对Syk介导的其他信号通路的抑制有关。Syk除作用于下游分子SLP-76及Vav3,参与OC细胞骨架重排外,还可以通过活化PLCγ(phospholipase Cγ1),参与$Ca^{2+}$-NFATc1(nuclear factor activated T cell type c1)信号通路,在OC分化、融合、成熟中发挥作用[7,10]。Dap12与Syk SH2功能域结合,Syk磷酸化获得活力,促使PLCγ活化,诱发细胞内$Ca^{2+}$水平上升及$Ca^{2+}$波动[7,10];$Ca^{2+}$波动进而激活下游一系列分子并最终活化NFATc1,使其易位进入细胞核内,调控TRAP、cathepsin K、c-Src、β3 integrin、Atp6v0d2、DC-STAMP(dendritic cell-specific transmembrane protein)等许多OC分化、细胞融合、骨吸收功能相关基因的表达[10-11]。我们前期研究也证实,双膦酸盐可以显著抑制NFATc1及下游基因Atp6v0d2的表达,这也可能与其对上游分子Syk的抑制有关。

本研究表明,在体外OB-OC共培养体系中,唑来膦酸可显著抑制破骨细胞生成及骨吸收功能,这可能与其对Syk基因表达的抑制有关。

**参考文献:**


[1] Edwards J R, Weivoda M M. Osteoclasts: malefactors of disease and targets for treatment[J]. Discov Med, 2012, 13(70): 201-210.

[2] Teitelbaum S L. The osteoclast and its unique cytoskeleton[J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1240: 14-17.

[3] Zou W, Kitaura H, Reeve J, *et al*. Syk, c-Src, the alphavbeta3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption[J]. J Cell Biol, 2007, 176(6): 877-888.

[4] Reeve J L, Zou W, Liu Y, *et al*. SLP-76 couples Syk to the osteoclast cytoskeleton[J]. J Immunol, 2009, 183(3): 1804-1812.

[5] Piper P K, Gruntmanis U. Management of osteoporosis in the aging male: focus on zoledronic acid[J]. Clin Interv Aging, 2009, 4: 289-303.

[6] 戚孟春, 胡静, 邹淑娟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞和颅骨成骨细胞在张应力下细胞骨架的改变[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(2): 110-112.

[7] Hasegawa H, Kido S, Tomomura M, *et al*. Serum calcium-decreasing factor, caldecrin, inhibits osteoclast differentiation by suppression of NFATc1 activity[J]. J Biol Chem, 2010, 285(33): 25448-25457.

[8] Mocsai A, Humphrey M B, Van-Ziffle J A, *et al*. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(16): 6158-6163.

[9] Weinstein R S, Roberson P K, Manolagas S C. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy[J]. N Engl J Med, 2009, 360(1): 53-62.

[10] Negishi-Koga T, Takayanagi H. $Ca^{2+}$-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation[J]. Immunol Rev, 2009, 231(1): 241-256.

[11] Kim K, Lee S H, Ha-Kim J, *et al*. NFATc1 induces osteoclast fusion *via* up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)[J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(1): 176-185.


(**收稿**:2013-01-18;**修回**:2013-03-27)

(编辑 龙 亮)