文章编号:1000-5404(2013)11-1067-04

论著

血小板衍生生长因子D对体外破骨细胞分化过程的影响

刘栓得,初同伟,张 超,黄 晨,余世明,周 跃 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[摘要] **目的** 用外源性血小板衍生生长因子D(platelet-derived growth factor D,PDGF-D)体外刺激外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs),观察其对破骨细胞(osteoclasts,OCs)分化过程的影响。**方法** 采集外周血并分离单个核细胞,实验分为3组:阳性对照组为NF-κB配体激活因子(receptor or activator of NF-κB Ligand,RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor,M-CSF)联合诱导,阴性对照组(细胞培养基)和实验组(PDGF-D)。应用抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase,TRAP)染色观察各组破骨细胞前体细胞向破骨样细胞(osteoclast like cells,OLCs)的分化情况,Real-time PCR检测破骨细胞标志基因TRAP、Cathepsin K、MMP-9 mRNA的表达情况,Western blot检测各组细胞中Cathepsin K蛋白的表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组细胞上清液中MMP-9的表达。**结果** ①TRAP染色可见阳性对照组和实验组的OLCs显著多于阴性对照组。②阳性对照组和实验组TRAP、Cathepsin K、MMP-9 mRNA的相对表达量均显著高于阴性对照组($P<0.05$),但阳性对照组和实验组间无统计学差异($P>0.05$)。③阳性对照组和实验组MMP-9(ELISA检测)、Cathepsin K蛋白(Western blot检测)表达均显著高于阴性对照组($P<0.05$),但阳性对照组和实验组间无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 外源性PDGF-D可在无RANKL/M-CSF的条件下于体外独立诱导破骨前体细胞向OLCs分化。

[关键词] 破骨细胞;NF-κB配体激活因子;血小板衍生生长因子D
[中图法分类号] R322.71; R329.21; R349.21 [文献标志码] A

Platelet-derived growth factor-D induces differentiation and maturation in osteoclasts *in vitro*

Liu Shuande, Chu Tongwei, Zhang Chao, Huang Chen, Yu Shiming, Zhou yue (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of platelet-derived growth factor-D (PDGF-D) on the differentiation and maturation of osteoclasts (OCs) from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) *in vitro*. **Methods** After PBMCs were gathered and isolated from the fresh blood, and then were treated with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) as positive control cells, and with PDGF-D as experimental cells. The cells cultured in normal culture medium served as negative control. After treatment for 15 d, the mRNA levels of tartate-resistant acid phosphatase (TRAP), matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) and Cathepsin K were detected by real-time PCR. The differentiation and maturation of OCs were observed by TRAP staining. The expression of Cathepsin K were detected by Western blotting, and the protein level of MMP-9 in the supernatant was detected by ELISA. **Results** The OC-like cells positive to TRAP were observed in both positive control and experimental cells, but there was no such cell in negative control ($P<0.05$). The mRNA levels of TRAP, MMP-9 and Cathepsin K at day 15 were significantly higher in positive control and experimental cells than those in the negative control ($P<0.05$), but there was no difference between the former 2 groups of cells ($P>0.05$). As the same as the mRNA results, the protein levels of MMP-9 (ELISA) and Cathepsin K (Western blotting) were significantly higher in positive control and experimental cells than those in the negative control ($P<0.05$). **Conclusion** PDGF-D, not combination of RANKL and M-CSF, induces PBMCs to differentiate into OC-like cells *in vitro*.

[**Key words**] osteoclasts; receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand; platelet-derived growth factor-D

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271979). Corresponding author: Chu Tongwei, E-mail: chtw@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271979)
[通信作者] 初同伟,E-mail:chtw@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130107.1727.004.html(2013-01-07)

骨是恶性肿瘤转移的常见部位,仅次于肝转移和肺转移[1]。转移性骨肿瘤患者常常经历多种并发症,包括病理性骨折、高钙血症、椎体破坏与压缩、顽固性骨痛等,严重影响了患者的生活质量和生存期[2]。多数转移性骨肿瘤主要表现为溶骨性骨破坏。“种子-土壤”学说提示[3]:转移至骨的肿瘤细胞破坏了成骨细胞(osteoblasts,OBs)与破骨细胞(osteoclasts,OCs)间的生理平衡,使得宿主自身的正常 OCs 过度活化、成熟,进而过度溶骨,在此过程中众多肿瘤相关细胞因子发挥了重要作用[4]。外源性血小板衍生生长因子 D(platelet-derived growth factor D,PDGF-D)是 PDGF 家族中的新成员,是在进行 EST 数据库比对寻找新的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)同源体的过程中发现的[5]。PDGF-D 通过旁分泌的方式作用于细胞表面 PDGF 受体 β(PDGFR-β),从而发挥促进细胞分裂、分化,调节细胞周期等作用[6]。前期实验在不同转移潜能的乳腺癌细胞中检测到不同表达水平的 PDGF-D,同时在外周血分离的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)(即破骨细胞前体细胞)中检测到其特异性受体PDGFR-β 的表达。本实验引入外源性人重组 PDGF-D 体外刺激 PBMCs,观察其对 OCs 分化过程的影响。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

采集 12 例健康志愿者(健康志愿者为本院医护人员、学生或患者家属等,每次采集的志愿者新鲜外周血均需做血常规检测,各项指标在正常范围内时方可用于实验,志愿者均知情同意)外周血,男女性各6 例,18 ~32 岁,平均 25 岁,白细胞计数均在正常范围内。重组人 NF-κB 配体激活因子(receptor or activator of NF-κB Ligand, RANKL)、重组人巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)(PeproTech),重组人 PDGF-D(R&D systems),α-MEM 培养基和 D-Hanks 液(HyClone),胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)及胰蛋白酶(Gibco),人外周血淋巴细胞分离液及 TRIczol(TBD),抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase,TRAP)染色试剂盒(Sigma),人基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)酶联免疫吸附试验试剂盒(上海奥迪生物制品),PrimeScript® 逆转录试剂盒及荧光染料 SYBR® Premix *Ex Taq*™Ⅱ(TaKaRa),兔抗人 Cathepsin K 单克隆抗体(Bioss),羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗、彩色预染蛋白质分子量标准、SDS 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒、青链霉素双抗(碧云天)。

1.2 方法

1.2.1 外周血单核细胞的分离纯化 采集健康志愿者新鲜外周血 20 mL[7],严格按照人外周血淋巴细胞分离液说明书操作,分离出的外周血单核细胞于 α-MEM 培养基(含 10% FBS,1% 青链霉素双抗)吹打均匀,细胞计数后按照 1×10^6/mL 细胞数接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中,置于 37 ℃,5% CO_2 细胞培养箱中孵育 48 h。弃上清,D-Hanks 液反复漂洗,1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞,收集细胞后离心 8 min,1 000 r/min,α-MEM 培养基重悬细胞,将获得的 PBMCs 调整为 1×10^7/mL。

1.2.2 实验分组 分为阳性对照组(α-MEM 培养基 + 10% FBS + 1% 青链霉素双抗 + 50 ng/mL M-CSF + 50 ng/mL RANKL)、阴性对照组(α-MEM 培养基 + 10% FBS + 1% 青链霉素双抗)及实验组(α-MEM 培养基 + 10% FBS + 1% 青链霉素双抗 + 100 ng/mL PDGF-D),将各组 100 μL 细胞悬液均匀接种于 96 孔培养板中,每组至少 3 个复孔,置于 37 ℃,5% CO_2 的细胞培养箱中孵育,每隔 2 天换液 1 次,连续培养 15 d。

1.2.3 细胞观察及鉴定 倒置相差显微镜观察各组细胞的形态及分化情况。于诱导的第 15 天对各组细胞进行 TRAP 染色观察,严格按照 TRAP 染色试剂盒说明进行,PBS 液漂洗后苏木精复染细胞核。于倒置相差显微镜下观察,对每孔随机 6 个视野中 TRAP 染色阳性的破骨样细胞(osteoclast like cells, OLCs)(细胞核≥3 个)计数并摄片。

1.2.4 Real-time PCR 检测 TRAP、Cathepsin K、MMP-9 mRNA 的表达 于第 15 天收集各组细胞各 1.0×10^6 个,加入 1 mL TRIczol 并依照使用说明提取 2 种细胞总 RNA,取 2 μL RNA 待测样本于微量核酸仪测定其浓度,选取 $D(260)/D(280)$ 为 1.8 ~2.0 的 RNA 样本,依照 PrimeScript® 逆转录试剂盒操作说明进行逆转录。使用 Primer Premier 6.6 软件设计引物并由上海生工生物技术有限公司合成。GAPDH 引物序列:正义链 5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′,反义链 5′-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3′,片段长度 258 bp;TRAP 引物序列:正义链 5′-GCAAGGTCCCCAACGGCTATC-3′,反义链 5′- GCCTCGGCAGCCTGGTCT-3′,片段长度 112 bp;Cathepsin K 引物序列:正义链 5′-AAGAGGTGGTTCAGAAGATG-3′,反义链 5′-TATTGGAAGGCATTGGTCAT-3′,片段长度 113 bp;MMP-9 引物序列:正义链 5′-CGACCAAGGATACAGTTTGTT-3′,反义链 5′-GCGGTACATAGGGTACATGAGC-3′,片段长度 107 bp。PCR 反应体系均为 20 μL,反应液各成分分别为 SYBR Premix *Ex Taq* Ⅱ 10 μL,上游引物 0.8 μL,下游引物 0.8 μL,DNA 模板 2.0 μL,dH_2O 6.0 μL,ROX Reference Dye Ⅱ 0.4 μL。每组设阴性对照,每组 3 个复孔。反应条件:95 ℃,30 s,1 个循环;95 ℃,5 s,58 ℃,34 s,40 个循环。反应体系于 ABI 7500 Real-time PCR 仪上进行检测,自动扫描并记录荧光强度。通过调整模板浓度使内参 GAPDH 扩增 Ct 值为 18 ~30。应用 ABI 7500 System SDS Software1.3.1 软件进行数据处理,其相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

1.2.5 ELISA 法检测 MMP-9 在各组细胞上清中的表达 收集各组第 15 天细胞培养上清液,于 3 000 r/min 离心 10 min,去除颗粒和聚合物,依照 ELISA 试剂盒说明设置标准品和细胞上清液样本孔,调整体系为 50 μL,均采用复孔检测,具体操作严格按照 MMP-9 ELISA 试剂盒说明进行,最终反应板于TECAN F039300 酶标仪(奥地利)上测定蛋白的浓度(pg/mL)[8]。根据标准品 MMP-9 的抗原浓度值设为 X 轴,其对应的 $D(450)$ 值设为 Y 轴,建立标准曲线的直线回归方程($y=0.89x+0.133$,$r^2=0.999\,9$),各样品的浓度可由标准曲线获得。独立重复实验 3 次。

1.2.6 Western blot 检测各组细胞 Cathepsin K 蛋白的表达

SDS 裂解液分别裂解各组第 15 天细胞并提取细胞内总蛋白，BCA 蛋白浓度测定法进行蛋白定量，SDS-PAGE 电泳分离后湿转法电转至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，兔抗人 Cathepsin K 多克隆抗体（1∶100）4 ℃孵育过夜，TBST 漂洗 3 次，羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶500），37 ℃孵育 1 h，TBST 漂洗 3 次，ECL 法显色、曝光 2 min 并拍照。内参为 GAPDH。用 Image J 分析软件分析图片各条带灰度值。

1.3 统计学分析

独立重复各实验 3 次，计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 18.0 统计软件，均数间多重比较行单因素方差分析，2 组间比较行 t 检验。

2 结果

2.1 TRAP 染色观察 OLCs

倒置显微镜下观察各组细胞：经诱导培养 15 d 后，阳性对照组和实验组均可见细胞体积巨大的 OLCs，其形态多为不规则形、油煎蛋形或漏斗形，可见裙状、放射状或丝状伪足形成，细胞质内可见酒红色颗粒沉淀，细胞内可见多核（细胞核≥3 个），细胞核为蓝染，可见深色核仁；而阴性对照组细胞较小，多为单核，部分细胞细胞质皱缩，细胞核固缩，呈凋亡状态。对每孔随机 6 个视野中 TRAP 染色阳性 OLCs 计数，阳性对照组和实验组组间无统计学差异，但均显著多于阴性对照组（图 1）。

2.2 Real-time PCR 检测 TRAP、Cathepsin K、MMP-9 mRNA 的表达

阳性对照组、阴性对照组和实验组细胞经诱导培养 15 d 后，Real-time PCR 检测结果显示：实验组和阳性对照组 TRAP、Cathepsin K、MMP-9 mRNA 的表达均显著高于阴性对照组（$P<0.05$），其中以 TRAP mRNA 表达的差异最为显著，而实验组与阳性对照组间无统计学差异（$P>0.05$，表 1），提示 PDGF-D 同 RANKL/M-CSF 一样可以诱导外周血单核细胞向 OLCs 分化。

表 1 Real-time PCR 检测第 15 天各组细胞 TRAP、Cathepsin K、MMP-9 mRNA 的相对表达量（$n=3, \bar{x} \pm s$）

组别	TRAP	Cathepsin K	MMP-9
阳性对照组	9.984 ± 0.924[a]	1.742 ± 0.483[a]	2.316 ± 0.402[a]
实验组	9.875 ± 0.911[a]	1.683 ± 0.547[a]	2.287 ± 0.471[a]

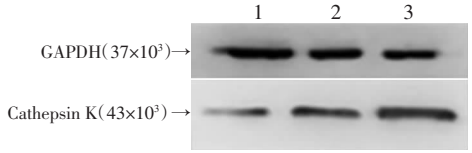
阴性对照组均为 1 a：$P<0.05$，与阴性对照组比较

2.3 ELISA 检测 MMP-9 在各组细胞上清中的表达

第 15 天阳性对照组［（273.97 ± 10.45）pg/mL］及实验组［（272.48 ± 6.67）pg/mL］显著高于阴性对照组［（196.51 ± 6.67）pg/mL，$P<0.05$］，而实验组与阳性对照组间差异无统计学意义（$P>0.05$），提示 2 组不同刺激条件下诱导出的 OLCs 具有相同的功能。

2.4 Western blot 检测各组细胞 Cathepsin K 蛋白的表达

第 15 天实验组（1.473 ± 0.285）和阳性对照组（1.376 ± 0.314）Cathepsin K 蛋白的表达量无显著差异（$P>0.05$），而 2 组均显著高于阴性对照组（0.764 ± 0.042，$P<0.05$，图 2）。

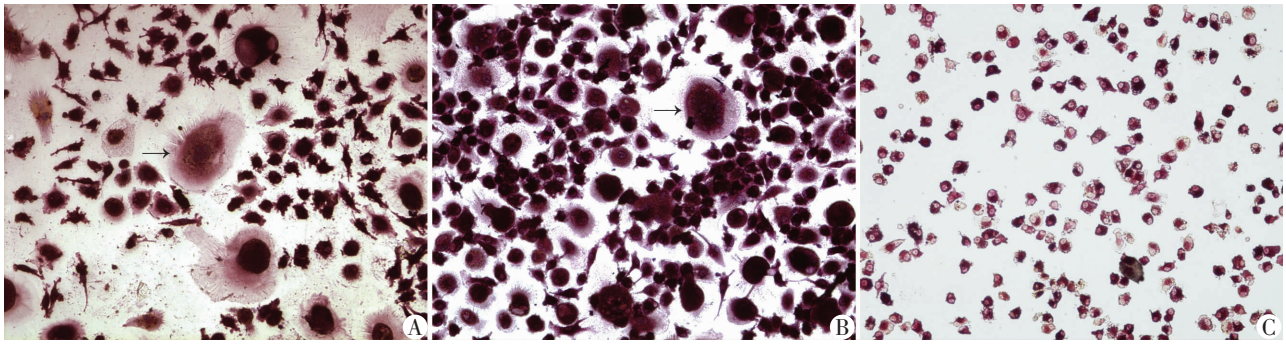


1：阴性对照组；2：实验组；3：阳性对照组

图 2 Western blot 检测第 15 天各组细胞 Cathepsin K 蛋白的表达

3 讨论

PDGF-D 是 PDGF 家族成员之一，由 370 个氨基酸组成，信号肽剪接位点位于第 23 个氨基酸残基之间，相对分子质量约为 40.2×10^3，是原癌基因 C-sis 的表达产物，起着促进增殖、增强侵袭力和促血管生成等作用[9]。肿瘤细胞分泌的 PDGF-D 蛋白最初为无活性状态，在纤溶酶蛋白在内的几种蛋白酶的水解作用下，在铰链区将 N 末端 CUB 结构和 C 末端生长因子结构分离开来，形成同源二聚体 PDGF-DD 后作用于其特异性受体 PDGFR-β，从而发挥生物学功能[10]。Kong 等[11]证实 PDGF-D 过表达可提高前列腺癌细胞上皮-间质转化（epithelial-mesenchynal transition，EMT）能力，从而提高其侵袭转移能力。Wang 等[12]通过 siRNA 使得胰腺癌 PDGF-D 的表达下调，从而使 Notch-1 和 NF-κB 信号通路失活进而抑制了细胞生长和血管生成，降低



↑：OLCs A：实验组；B：阳性对照组；C：阴性对照组

图 1 TRAP 染色观察第 15 天各组 OLCs 形态变化（倒置显微镜 ×200）

了肿瘤细胞的侵袭能力。前期实验证实 PDGF-D 在乳腺癌高转移细胞株 MD-MBA-231 中的表达高于低转移细胞株 MCF-7,而破骨细胞前体细胞中不表达 PDGF-D,同时其仅表达 PDGFR-β 而不表达其同源受体 PDGFR-α。因此,PDGF-D 对肿瘤的转移、定植以及 OCs 的分化都有着重要的作用,其可能参与的骨破坏的恶性循环过程需要实验进一步证实。

本实验通过引入外源性 PDGF-D 体外刺激外周血分离的单核细胞(即破骨细胞前体细胞),以诱导 OLCs 的经典模型(RANKL/M-CSF)为阳性对照组,实验组仅加入 PDGF-D。结果显示:PDGF-D 可诱导破骨细胞前体细胞分化为 OLCs,TRAP 染色观察到实验组的 OLCs 数量、细胞形态与阳性对照组比较无显著差异,实验组和阳性对照组 OCs 标志性基因 TRAP、Cathepsin K、MMP-9 mRNA 及相应蛋白的表达亦无显著差异,同时 2 组结果均明显高于阴性对照组。因此,我们认为 PDGF-D 同样具有诱导破骨细胞前体细胞分化为 OLCs 的作用,并且其与经典的 RANKL/M-CSF 诱导模型并无显著差异。

Huang 等[13]用 PDGF-D 体外刺激鼠单核细胞系 RAW264.7,将其诱导分化为 OLCs,与 RANKL 诱导的 OLCs 比较,认为该途径独立于 RANKL/RANK/OPG 信号通路。但是,Stiles 等[10]发现,在过表达 PDGF-D 的前列腺癌细胞中,NF-κB 与 DNA 特异性位点的绑定增加,从而增强了肿瘤细胞分泌生长因子、趋化因子和抗凋亡因子的能力。同时,亦有文献报道,PDGF-D 可通过与 PDGFR-β 的相互作用调节多条下游通路,如 PI3K/Akt、MAPK、Noth[14-16]等,而这些通路与 OCs、OBs 的分化、成熟密切相关。本研究结果显示,2 条诱导破骨前体细胞向 OLCs 分化的途径 RANKL/RANK 和 PDGF-D/PDGFR-β 对于诱导 OLCs 具有类似的效应,这样便产生了以下问题:若两者为各自独立的途径,那么对于转移至骨的肿瘤而言,抑制或阻断其分泌 PDGF-D 便可显著减少溶骨性骨病的发生;若两者有着共同的途径,那么对于交叉点上的关键因子的抑制或阻断即可起到显著作用。另外,Najy 等[17]报道过表达 PDGF-D 的前列腺癌细胞可同时促进溶骨性和成骨性反应,但 PDGF-D 是否对 OCs 和 OBs 同时具有调节作用仍需进一步观察。对以上问题将成为了我们今后研究的重要方向。

综上所述,本实验证实 PDGF-D 可作为独立的诱导因子使得破骨前体细胞分化为 OLCs,其效应与经典模型 RANKL/M-CSF 所诱导出的 OLCs 无统计学差异,但 PDGF-D 对下游通路的影响机制、对 OBs 和 OCs 的调节作用以及 2 种途径是否有共同通路等需要进一步研究。

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] Berenson J R, Rajdev L, Broder M. Pathophysiology of bone metastases[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(9): 1078 - 1081.

[3] Buijs J T, van-der-Pluijm G. Osteotropic cancers: from primary tumor to bone[J]. Cancer Lett, 2009, 273(2): 177 - 193.

[4] Sterling J A, Edwards J R, Martin T J, *et al*. Advances in the biology of bone metastasis: how the skeleton affects tumor behavior[J]. Bone, 2011, 48(1): 6 - 15.

[5] Bergsten E, Uutela M, Li X, *et al*. PDGF-D is a specific, protease activated ligand for PDGF beta-receptor[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(5): 512 - 516.

[6] Erlandsson A, Brannvall K, Gustafsdottir S, *et al*. Autocrine/paracrine platelet-derived growth factor regulates proliferation of neural progenitor cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(16): 8042 - 8048.

[7] 廖通权, 刘玉刚, 胡旭, 等. CD147 对体外破骨细胞分化成熟的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(24): 2623 - 2626.

[8] 余世明, 初同伟, 廖通权, 等. CD147 对体外破骨细胞分化过程中基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-9 分泌的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(14): 1492 - 1496.

[9] Li M, Jendrossek V, Belka C. The role of PDGF in radiation oncology [J]. Radiat Oncol, 2007, 2: 5.

[10] Stiles C D. The molecular biology of platelet-derived growth factor [J]. Cell, 1983, 33(3): 653 - 655.

[11] Kong D, Wang Z, Sarkar S H, *et al*. Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cancer cells[J]. Stem Cells, 2008, 26(6): 1425 - 1435.

[12] Wang Z, Kong D, Banerjee S, *et al*. Down-regulation of platelet-derived growth factor-D inhibits cell growth and angiogenesis through inactivation of Notch-1 and nuclear factor-kappaB signaling[J]. Cancer Res, 2007, 67(23): 11377 - 11385.

[13] Huang W, Fridman Y, Bonfil R D, *et al*. A novel function for platelet-derived growth factor D: induction of osteoclastic differentiation for intraosseous tumor growth[J]. Oncogene, 2012, 31(42): 4527 - 4535.

[14] Liu P, Cheng H, Roberts T M, *et al*. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(8): 627 - 644.

[15] Borkham-Kamphorst E, van-Roeyen C R, Ostendorf T, *et al*. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis[J]. J Hepatol, 2007, 46(6): 1064 - 1074.

[16] Wang Z, Li Y, Banerjee S, *et al*. Exploitation of the Notch signaling pathway as a novel target for cancer therapy[J]. Anticancer Res, 2008, 28(6A): 3621 - 3630.

[17] Najy A J, Jung Y S, Won J J, *et al*. Cediranib inhibits both the intraosseous growth of PDGF-D-positive prostate cancer cells and the associated bone reaction[J]. Prostate, 2012, 72(12): 1328 - 1338.

(**收稿**:2012-11-16;**修回**:2013-01-05)

(编辑 龙 亮)