论著

文章编号:1000-5404(2014)07-0636-04

FGF2对破骨细胞体外分化以及骨吸收功能的直接调控作用

李晓刚,苏 楠,唐玉彬,温 轩,唐浚洲,陈思宇,李 灿,杜晓兰,陈 林 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤实验室,骨代谢与修复中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 研究成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2,FGF2)对于破骨细胞(osteoclast,OC)体外分化与功能的直接调控作用。**方法** 分离野生型C3H/HeJ小鼠骨髓单核细胞,利用核因子κB受体活化因子配体(receptor activator of NF-κB ligand,RANKL)以及巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor,M-CSF)诱导向破骨细胞分化,同时在实验组中加入FGF2,观察骨髓单核细胞向破骨细胞分化发育过程,鬼笔环肽(phalloidine)染色观察破骨细胞肌动蛋白环(actin ring)变化,Real-time PCR检测破骨细胞 *Trap*、*Mmp9*、*Ctsk* 以及 *Clcn7* 表达,破骨细胞与骨片共培养检测骨吸收功能变化,并用Western blot检测相关信号通路分子表达情况。**结果** ①TRAP染色显示实验组与对照组破骨细胞数量无明显差异($P>0.05$);②鬼笔环肽染色提示实验组与对照组肌动蛋白环均正常;③实验组 *Trap*、*Mmp9* 及 *Ctsk* mRNA表达量均高于对照组($P<0.05$),而 *Clcn7* mRNA表达2组无明显差异;④体外骨片吸收实验提示实验组骨吸收陷窝面积显著大于对照组($P<0.05$);⑤Western blot检测实验组磷酸化细胞外信号调节激酶(ERK)较对照组表达明显增多。**结论** FGF2不影响破骨细胞前体细胞向破骨细胞的分化以及肌动蛋白环的形成,但可以通过ERK信号通路正向调控成熟破骨细胞的骨吸收功能。

[关键词] 破骨细胞;成纤维细胞生长因子2;细胞外信号调节激酶

[中图法分类号] R322.71; R329.25; R341 [文献标志码] A

Fibroblast growth factor 2 directly regulates osteoclast differentiation and bone resorption function

Li Xiaogang, Su Nan, Tang Yubin, Wen Xuan, Tang Junzhou, Chen Siyu, Li Can, Du Xiaolan, Chen Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Center of Bone Metabolism and Repair, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of fibroblast growth factor 2 (FGF2) on the differentiation of bone marrow monocytes (BMMCs) to osteoclast and bone resorption function. **Methods** After BMMCs were isolated from the bone marrow of femurs and tibiae from C3H mice, the cells were treated with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF). Experimental and control groups were separated by addition of FGF2 or not. The differentiation and maturation of osteoclast precursors were observed by TRAP staining, and the osteoclast actin ring of both group were analyzed by phallodine staining. The expression of *Trap*, *Mmp9*, *Ctsk* and *Clcn7* at mRNA level were detected by real-time PCR. The function of bone resorption was measured by bovine bone slice and osteoclast coculture. The effect of FGF2 on activity of ERK protein in the osteoclasts was analyzed by Western blotting. **Results** There was no significant difference in differentiation and maturation of osteoclast precursors between 2 groups ($P>0.05$), neither in the actin ring of osteoclasts. The mRNA expression level of *Trap*, *Mmp9*, and *Ctsk* were upregulated after FGF2 treatment ($P<0.05$), however, *Clcn7* mRNA expression level was not influenced. Compared with control group, the bone resorption lacuna area of FGF2 treated group was larger ($P<0.05$). Finally, Western blot analysis showed that treatment with FGF2 induced enhanced activity of phosphorylated ERK in cultured osteoclasts. **Conclusion** FGF2 cannot influence the differentiation of osteoclast precursors or formation of actin ring, but can upregulate the function of osteoclastic resorption *via* an

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2014CB942904);国家自然科学基金(81270012,81170809);国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ201017)

[通信作者] 陈 林,E-mail: linchen70@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140314.1736.010.html(2014-03-14)

ERK-related pathway.

[**Key words**] osteoclast; fibroblast growth factor 2; extracellular signal-regulated kinases

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2014CB942904), the National Natural Science Foundation of China (81270012,81170809) and the Spontaneous Research Project of State Key Laboratory (SKLZZ201017). Corresponding author: Chen Lin, E-mail: linchen70@163.com

破骨细胞是体内行使骨吸收功能的最主要细胞,对于骨骼稳态的维持发挥重要作用[1]。破骨细胞源于造血干细胞的单核/巨噬系,成熟破骨细胞通过附着于骨表面形成骨吸收陷窝,之后分泌 H^+ 以及各种溶解性酶类降解骨质[2]。破骨细胞在分化发育过程中受到多种细胞因子的调控,其中最主要的为核因子 κB 受体活化因子配体(receptor activator of NF-κB ligand, RANKL)以及巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF),除此之外还包括转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)以及甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)等。

成纤维细胞生长因子家族是由22个成员组成,其中FGF2被认为是作用最广泛的细胞因子,在骨组织中,FGF2由成骨细胞及其前体细胞分泌,以自分泌或者旁分泌的形式作用于骨骼相关细胞。以往的研究发现,FGF2对于破骨细胞有很重要的调控作用,但是没能明确FGF2对破骨细胞早期分化的直接作用以及调节破骨细胞功能的信号机制[3-9]。本实验通过FGF2体外刺激骨髓单核/巨噬造血干细胞,观察其对破骨细胞的分化发育与功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验动物为SPF级C3H/HeJ小鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供);小鼠重组sRANKL(Santa Cruz);小鼠重组M-CSF(PeproTech);FGF2(Sigma);α-MEM培养基(Gibco);优质胎牛血清(Gibco);TRAP染色试剂盒(Sigma);ficoll-paque PREMIUM(GE healthcare);phalloidine(FITC labeled, Sigma),总RNA抽提试剂盒(Invitrogen);SYBR ExScript™ RT-PCR试剂盒(TaKaRa);ERK、p-ERK以及β-actin抗体(Santa Cruz);抗兔、抗鼠辣根过氧化物酶抗体(北京中杉);化学发光试剂盒(Thermo);胶片购自Kodak公司。

1.2 方法

1.2.1 牛皮质骨片的制备及处理 新鲜牛皮质骨纵切成厚约200 μm的骨片,用水洗砂纸磨薄至50 μm,眼科剪修剪为5 mm×5 mm的骨片,超声波清洗3次,每次10 min。无菌去离子水冲洗后浸泡在含青霉素1 000 U/mL、链霉素1 000 U/mL的D-Hanks液中,换液3次,每次30 min,最后置含抗生素(同前)的α-MEM培养液中备用。

1.2.2 破骨细胞的诱导以及FGF2处理 参考McHugh等[10-11]方法,将4~8周龄雄性小鼠断颈处死,在无菌条件下分离股骨及胫骨;剪断两侧骨骺端,使用1 mL注射器注满α-MEM(含1 000 U/mL青霉素、1 000 U/mL链霉素,10%胎牛血清)轻轻冲洗骨髓腔;收集骨髓细胞混合液,于200目筛网过滤并接种至直径100 mm的培养皿中,收集细胞,使用分离液分离骨髓单核细胞,之后PBS重悬,1 000 r/min,离心5 min,沉淀用α-MEM(含1 000 U/mL青霉素,1 000 U/mL链霉素,10%胎牛血清,50 ng/mL RANKL,30 ng/mL M-CSF)培养液重悬,实验组加入终浓度为20 ng/mL的FGF2,计数并调整细胞浓度为1×10^7/mL后接种于预先放或者不放置牛骨片的6孔培养板中,每孔接种2 mL,37 ℃,5% CO_2培养,细胞每2天换液1次,诱导过程中不断观察破骨细胞形成和凋亡情况。

1.2.3 破骨细胞TRAP染色及计数 破骨细胞诱导培养4、5、6、7、8、9、10 d后,将贴有细胞的玻片取出,PBS冲洗1次;5%的戊二醛4 ℃固定10 min;蒸馏水冲洗3次;玻片浸入预热到37 ℃的TRAP染色液,避光温育1 h;去离子水漂洗,1 min×3次;自然干燥,中性树胶封片;光镜下观察,以TRAP(+)多核细胞(3个或3个以上)为破骨细胞。破骨细胞计数参照刘栓得等[12]方法,每个处理取3张玻片进行破骨细胞计数,每张玻片随机取6个位置视野,取均值,结果以细胞个数/视野表示。

1.2.4 破骨细胞鬼笔环肽染色 破骨细胞诱导培养10 d后,将贴有细胞的玻片取出,用37 ℃预热的PBS清洗细胞2次,之后使用4% PFA固定10 min,PBS清洗3次,1% BSA阻断30 min,5 mg/mL鬼笔环肽染液密闭湿盒室温染色60 min,细胞核使用DAPI染液染10 min,中性树胶封片后激光共聚焦观察。

1.2.5 破骨细胞标志酶基因表达检测诱导培养 采用TRIZOL法提取经过10 d诱导分化的破骨细胞总RNA,按照TaKaRa反转录试剂盒说明进行反转录及定量反应,内参 *Cyclophilin* 以及 *Trap*(*tartrate resistant acid phosphatase*)、*Mmp9*(*matrix metalloproteinase-9*)、*Ctsk*(*cathepsin K*)以及 *Clcn7*(*chloride channel 7*)基因引物序列参照Su等[13]方法,扩增条件为:95 ℃ 30 s、(95 ℃ 5 s、57 ℃ 20 s、72 ℃ 20 s)×40个循环、95 ℃ 30 s、57 ℃ 30 s、95 ℃ 30 s。MX3000P定量RCR仪自动计算样本Ct值以及样本含量。

1.2.6 破骨细胞骨吸收功能检测 将接种于骨片上的破骨细胞诱导培养10 d后,将贴有细胞的骨片去除,PBS清洗3次后,2.5%戊二醛4 ℃固定10 min后,0.25%氢氧化氨50 kHz超声清洗3次,每次3 min,系列乙醇脱水,自然晾干。1%甲苯胺蓝染液室温下染色1 min,蒸馏水洗后自然晾干。于解剖显微镜下观察采像,利用Spot RT Camera软件对吸收陷窝进行面积统计。

1.2.7 Western blot检测ERK蛋白表达 细胞接种于6孔板,实验组加20 ng/mL FGF2以及RANKL和M-CSF,对照组不加FGF2,RANKL和M-CSF同前。诱导10 d后,含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液收集总蛋白并用BCA法测定蛋白浓度,Western blot检测总ERK、p-ERK及内参β-actin蛋白水平的变化。

1.3 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 FGF2对骨髓单核细胞向破骨细胞分化无明显影响

实验组与对照组均于第5天开始出现破骨细胞，第6、7天左右数量达到顶峰，之后数量开始减少（图1），通过计数发现FGF2实验组与对照组相比，二者在诱导后第5～10天破骨细胞数量无明显差异。

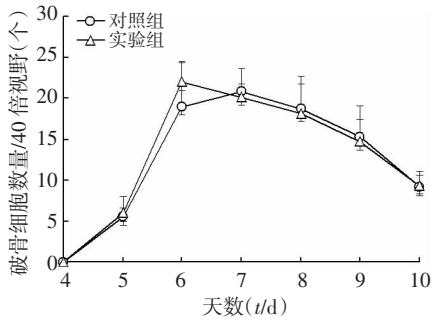
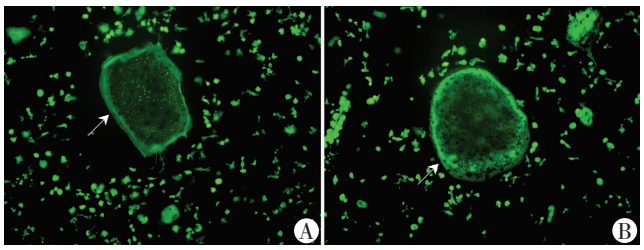


图1 破骨细胞体外诱导分化计数

2.2 FGF2不影响破骨细胞肌动蛋白环的形态

体外培养诱导骨髓单核细胞分化为破骨细胞后，通过phalloidine染色观察破骨细胞足体，结果显示（图2）FGF2实验组与对照组相比，破骨细胞肌动蛋白环均正常，二者形态无明显差异。

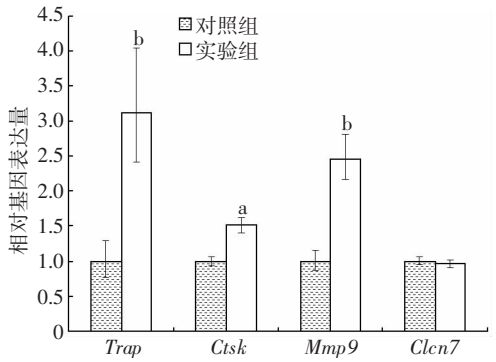


A：对照组；B：实验组；箭头示破骨细胞肌动蛋白环

图2 破骨细胞鬼笔环肽染色观察 （×100）

2.3 FGF2上调破骨细胞骨吸收相关酶的表达

FGF2刺激后的破骨细胞*Trap*（$P<0.01$）、*Ctsk*（$P<0.05$）以及*Mmp9*（$P<0.01$）的mRNA水平表达均增高，而*Clcn7*的mRNA表达实验组与对照组无明显差异。

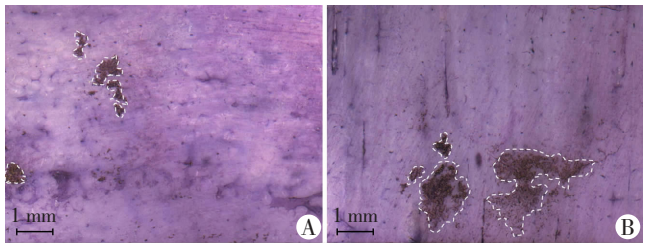


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

图3 RT-PCR检测破骨细胞相关功能酶表达

2.4 FGF2促进破骨细胞骨吸收功能

利用破骨细胞与骨片共培养的方法，在培养10 d后，对骨片进行甲苯胺蓝染色，发现骨片上深蓝色的吸收陷窝（图4白色虚线内），对实验组与对照组吸收陷窝面积进行统计，发现FGF2刺激后破骨细胞吸收陷窝面积为（3.20±0.33）mm^2，明显大于对照组（2.32±0.51）mm^2（$P<0.05$）。



A：对照组；B：实验组

图4 体外骨片吸收实验检测破骨细胞骨吸收功能

2.5 FGF2能够上调破骨细胞ERK磷酸化水平

提取诱导的破骨细胞总蛋白，利用Western blot技术进行检测，发现在总ERK蛋白水平无明显差异的前提下，FGF2刺激后的破骨细胞ERK磷酸化水平明显增高（图5）。

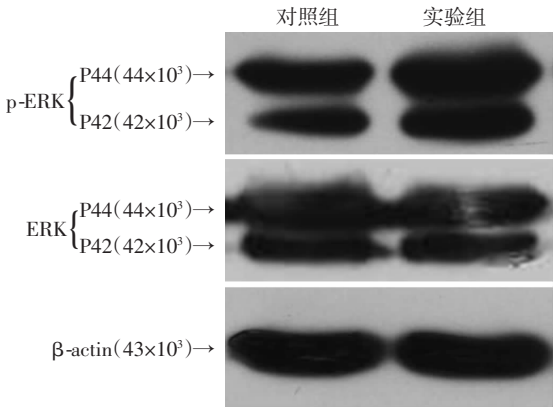


图5 Western blot检测破骨细胞p-ERK的表达

3 讨论

FGF2是多功能的生长因子，对多种组织和细胞都具有生物学效应，参与细胞的增殖、分化、迁移等过程。FGF2在体内主要通过自分泌及旁分泌的方式与位于细胞膜上的高亲和力受体FGFRs结合发挥作用，目前研究认为FGF/FGFRs信号主要是通过MAPK、PKC、PI3K等通路介导[14]，其中MAPK通路包括ERK1/2、P38以及JNK。

FGF2在骨骼发育以及损伤修复中发挥重要的作用，FGF2能够促进人胚胎干细胞向骨与软骨分化[15]。人体血清中的FGF2水平可预测骨折愈合情况，提示FGF2为骨折愈合的正向调节因子[16]。另外，FGF2有助于维持骨稳态，具有协调成骨细胞与破骨细胞的分化发育及活性的功能[17-19]。有研究发现FGF2能缓解卵巢摘除小鼠的骨质疏松[20]，促进骨折的损伤修复等。综上所述，FGF2有望成为临床骨质疏松和骨折的治疗药物。

目前研究认为,FGF2 可通过促进成骨细胞分泌 RANKL 来间接促进体外培养的骨髓细胞向破骨细胞的分化[5,21],但 FGF2 是否直接作用于破骨细胞尚不清楚。尽管 Kawaguchi[5] 以及 Chikazu[6] 等在研究中均提及 FGF2 对于破骨细胞的影响,但是都没能明确 FGF2 对破骨细胞的早期分化的直接作用以及调控其功能的机制。本研究利用小鼠骨髓造血干细胞单核细胞系体外诱导的方式,探讨了 FGF2 对于破骨细胞分化、形态、功能以及信号通路的直接调控作用。我们发现 FGF2 不影响破骨前体细胞向多核破骨细胞分化,也不改变破骨细胞肌动蛋白环的形态,因此 FGF2 刺激后破骨细胞的数量和粘附功能并没有发生变化。在破骨细胞的骨吸收功能方面,FGF2 能够明显上调破骨细胞相关功能酶的表达,进而促进了破骨细胞的骨吸收功能。但是 FGF2 对 *Clcn7* 的表达并无影响,提示 FGF2 促进体外破骨细胞的骨吸收功能与吸收陷窝中的酸化情况无关。另外,破骨细胞的分化发育以及功能的维持主要依赖于 MAPK、NF-κB 以及 PI3K 3 条信号通路[22],而 MAPK 也是 FGF 信号重要的下游通路,因此我们检测 FGF2 对于破骨细胞 MAPK 信号通路的影响,发现 FGF2 可以上调磷酸化 ERK 的活化程度,提示 FGF2 对于破骨细胞功能的上调作用可能是通过增强 ERK 信号通路实现的。

综上所述,我们的研究明确了 FGF2 对于破骨细胞体外分化的直接调控作用,为从调节 FGF 信号方面治疗临床骨质疏松与其他骨骼疾病提供了新的实验证据,但 FGF2 在体内对破骨细胞的具体作用机制还不完全清楚,尚需进一步的研究和探索。

参考文献:

[1] Teitelbaum S L, Ross F P. Genetic regulation of osteoclast development and function[J]. Nat Rev Genet, 2003, 4(8): 638 - 649.

[2] Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. Osteoclast differentiation and activation[J]. Nature, 2003, 423(6937): 337 - 342.

[3] Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, *et al*. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis *in vivo* on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(10): 1859 - 1871.

[4] Chikazu D, Katagiri M, Ogasawara T, *et al*. Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: stimulation of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoblasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(11): 2074 - 2081.

[5] Kawaguchi H, Chikazu D, Nakamura K, *et al*. Direct and indirect actions of fibroblast growth factor 2 on osteoclastic bone resorption in cultures[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(3): 466 - 473.

[6] Chikazu D, Hakeda Y, Ogata N, *et al*. Fibroblast growth factor (FGF)-2 directly stimulates mature osteoclast function through activation of FGF receptor 1 and p42/p44 MAP kinase[J]. J Biol Chem, 2000, 275(40): 31444 - 31450.

[7] Nakagawa N, Yasuda H, Yano K, *et al*. Basic fibroblast growth factor inhibits osteoclast formation induced by 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D (3) through suppressing the production of osteoclast differentiation factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265(1): 45 - 50.

[8] Nakagawa N, Yasuda H, Yano K, *et al*. Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation by reciprocally regulating the production of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in mouse osteoblastic cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265(1): 158 - 163.

[9] Jimi E, Shuto T, Ikebe T, *et al*. Basic fibroblast growth factor inhibits osteoclast-like cell formation[J]. J Cell Physiol, 1996, 168(2): 395 - 402.

[10] McHugh K P, Hodivala-Dilke K, Zheng M H, *et al*. Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts [J]. J Clin Invest, 2000, 105(4): 433 - 440.

[11] Abu-Amer Y, Ross F P, Schlesinger P, *et al*. Substrate recognition by osteoclast precursors induces C-src/microtubule association[J]. J Cell Biol, 1997, 137(1): 247 - 258.

[12] 刘栓得, 初同伟, 张超, 等. 血小板衍生生长因子 D 对体外破骨细胞分化过程的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(11): 1067 - 1070.

[13] Su N, Sun Q, Li C, *et al*. Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(7): 1199 - 1210.

[14] Su N, Du X, Chen L. FGF signaling: its role in bone development and human skeleton diseases[J]. Front Biosci, 2008, 13: 2842 - 2865.

[15] Lee T J, Jang J, Kang S, *et al*. Enhancement of osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells by mesodermal lineage induction with BMP-4 and FGF2 treatment[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(2): 793 - 797.

[16] Granchi D, Devescovi V, Pratelli L, *et al*. Serum levels of fibroblast growth factor 2 in children with orthopedic diseases: potential role in predicting bone healing[J]. J Orthop Res, 2013, 31(2): 249 - 456.

[17] Byun M R, Kim A R, Hwang J H, *et al*. FGF2 stimulates osteogenic differentiation through ERK induced TAZ expression [J]. Bone, 2013, 58: 72 - 80.

[18] Okada Y, Montero A, Zhang X, *et al*. Impaired osteoclast formation in bone marrow cultures of Fgf2 null mice in response to parathyroid hormone[J]. J Biol Chem, 2003, 278(23): 21258 - 21266.

[19] Yao W, Hadi T, Jiang Y, *et al*. Basic fibroblast growth factor improves trabecular bone connectivity and bone strength in the lumbar vertebral body of osteopenic rats[J]. Osteoporos Int, 2005, 16(12): 1939 - 1947.

[20] Liang H, Pun S, Wronski T J. Bone anabolic effects of basic fibroblast growth factor in ovariectomized rats[J]. Endocrinology, 1999, 140(12): 5780 - 5788.

[21] Hurley M M, Lee S K, Raisz L G, *et al*. Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation in murine bone marrow cultures[J]. Bone, 1998, 22(4): 309 - 316.

[22] Blair H C, Robinson L J, Zaidi M. Osteoclast signalling pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(3): 728 - 738.

(**收稿**:2013-11-20;**修回**:2014-01-30)

(编辑 郭建秀)