

通过体外细胞培养观察补体 C3 对骨形成影响的实验研究

刘康¹, 童铭豪², 唐彬彬¹, 曹延广¹, 史晓林¹, 余阳²

(1. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053)

【摘要】 目的: 探讨慢病毒介导补体 C3 沉默载体转染人 B 淋巴细胞 Raji-成骨细胞系 MG63 共培养体系对共培养体系成骨能力的影响及其作用机制。方法: 构建慢病毒补体 C3 沉默载体, 转染人 B 淋巴细胞 Raji 后建立体外 Raji-成骨细胞系 MG63 共培养体系, 分为空白对照组(不做特殊处理)、补体 C3 沉默组(慢病毒补体 C3 沉默载体转染共培养体系)与模型组(慢病毒空载体转染共培养体系)。培养 24 h 后, 采用反转录酶-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法及 Western-Blot 法检测各组补体 C3 表达水平; 各组分别培养 0、3、6、12、24、48、72 h 后采用 CCK-8 检测各组成骨细胞系 MG63 增殖能力; 培养 24 h 后分别采用流式细胞术检测各组成骨细胞系 MG63 的细胞凋亡情况, 采用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)检测盒检测各组 MG63 细胞 AKP 活力, 采用 Western-Blot 法检测各组成骨细胞系 MG63 的骨保护素(osteoprotegerin, OPG)蛋白表达水平。结果: RT-PCR 法检测结果显示补体 C3 沉默组 C3 表达水平低于空白对照组和模型组; Western-Blot 法检测结果显示补体 C3 沉默组 C3 表达水平低于空白对照组和模型组; CCK-8 检测结果提示培养 3、6 h 后补体 C3 沉默组 MG63 增殖能力与空白对照组、模型组比较差异无统计学意义; 培养 12 h 后补体 C3 沉默组成骨细胞系 MG63 增殖能力高于空白对照组和模型组; 培养 24、48、72 h 后补体 C3 沉默组成骨细胞系 MG63 增殖能力高于空白对照组和模型组; 流式细胞术检测结果提示补体 C3 沉默组成骨细胞系 MG63 的细胞凋亡水平低于空白对照组和模型组; AKP 检测盒检测结果提示补体 C3 沉默组 AKP 活力高于空白对照组和模型组; Western-Blot 法检测结果提示补体 C3 沉默组 OPG 蛋白表达水平高于空白对照组和模型组。结论: 补体 C3 的沉默能够增强成骨细胞系 MG63 的骨形成能力, 并且发挥这种能力需要时间的累积。补体 C3 可能通过改变 OPG/RANKL/RANK 轴来影响成骨能力。

【关键词】 补体 C3; 骨生成; 细胞培养技术; 碱性磷酸酶

中图分类号: R336

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2022.06.009

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Experimental study on effect of complement C3 on bone formation observed by cell culture in vitro LIU Kang, TONG Ming-hao, TANG Bin-bin, CAO Yan-guang, SHI Xiao-lin, and YU Yang*. *The Second Clinical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore effect of lentivirus-mediated complement C3 silencing vector on the osteogenic ability of human B lymphocyte Raji-osteoblast cell line MG63 co-culture system and its mechanism. **Methods:** The lentiviral complement C3 silencing vector was constructed and transfected into human B lymphocyte Raji to establish in vitro Raji-osteoblast cell line MG63 co-culture system. The cells were divided into blank control group (without special treatment), complement C3 silencing group (lentiviral complement C3 silencing vector transfection co-culture system) and model group (lentiviral vector transfection co-culture system). The expression of complement C3 in each group was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western-Blot at 24 h after culture, proliferation of MG63 cells was detected by CCK-8 at 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h, apoptosis of MG63 cells in each group was detected by flow cytometry at 24 h after culture, and alkaline phosphatase (AKP) activity of MG63 cells in each group was detected by AKP detection kit, and osteoprotegerin (OPG) protein expression of MG63 cells in each group was detected by Western-Blot method. **Results:** RT-PCR results showed that the expression level of C3 in complement C3 silencing group was lower than that in blank control group and model group, Western-Blot results showed that expression of C3 in complement C3 silencing group was lower than that in blank control

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81973884); 浙江省自然科学基金(编号: LY19H290004); 浙江省中医药重点研究项目(编号: 2022zz020); 浙江省自然科学基金(编号: 91873884)

Fund program: General Project of National Natural Science Foundation of China (No. 81973884)

通讯作者: 余阳 E-mail: 869205054@qq.com

Corresponding author: YU Yang E-mail: 869205054@qq.com

group and model group, CCK-8 results showed that there was no difference in proliferation ability of MG63 among complement C3 silencing group and blank control group and model group at 3 and 6 h after culture; at 12 h after culture, proliferation ability of MG63 cells with C3 silencing was higher than that of blank control group and model group; at 24, 48 and 72 h after culture, proliferation ability of MG63 cell line with complement C3 silencing group were higher than that of blank control group and model group. Flow cytometry results showed that apoptosis of proliferation ability of MG63 cell line with complement C3 silencing group was lower than that of blank control group and model group; AKP detection kit suggested that AKP activity in complement C3 silencing group was higher than that in blank control group and model group. Western-Blot results showed that expression level of OPG protein in complement C3 silencing group was higher than that in blank control group and model group.

Conclusion: Silencing of complement C3 could enhance bone formation ability of osteoblast MG63, and it takes time to accumulate this ability. Complement C3 may affect osteogenesis by altering OPG / RANKL / RANK axis.

KEYWORDS Complement C3; Osteogenesis; Cell culture techniques; Alkaline phosphatase

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是由多种原因导致的骨密度和骨质量下降,骨微结构破坏,造成骨质疏松性增加,易发骨折的全身性骨病^[1]。随着社会老龄化的进展,骨质疏松症现已成为困扰我国中老年人的一大难题,给家庭与社会带来极大的负担^[2]。近年来大量研究显示骨免疫学与骨质疏松症存在联系^[3],而补体 C3 在免疫应答的提呈、增殖效应等多个环节中发挥核心作用^[4]。在含量上,C3 在补体各成分中最高;在功能上,C3 亦居于中心地位^[5];同时,C3 裂解片段及其结合蛋白复杂而多样,在免疫防御、免疫调控以及免疫病理中发挥着重要作用^[6]。有研究^[7]称 C3 在骨的发育过程中参与软骨内骨化中心软骨模型的细胞溶解,C3a 驱动对骨形成至关重要的血管生成细胞的趋化性。因此,研究补体 C3 与骨质疏松症的病理改变之间的联系尤为关键。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)常被作为骨形成标志物,其含量的高低能体现成骨能力的强弱^[8]。而骨保护素(osteoprotegerin, OPG)是一种由骨髓基质细胞及成骨细胞(osteoblast, OB)分泌的细胞因子,能作为诱饵受体竞争性地与核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)结合,从而阻断具有促破骨前体细胞分化功能的核因子- κ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)与 RANKL 结合的过程,抑制骨吸收的发展^[9],亦被作为骨形成的指标。目前补体 C3 对骨代谢的影响及其作用机制尚不明确,因此,本研究自 2019 年 3 月至 2019 年 8 月通过构建慢病毒补体 C3 沉默载体,转染人 B 淋巴细胞 Raji 后建立体外 Raji-成骨细胞系 MG63 共培养体系,分为空白对照组(未进行慢病毒转染)、补体 C3 沉默组(慢病毒补体 C3 沉默载体转染共培养体系)与模型组(慢病毒空载体转染共培养体系),检测补体 C3 沉默后共培养体系中成骨细胞系 MG63 增殖能力与凋亡情况以及 AKP、OPG 的表达情况,得出补体 C3 对成骨细胞系 MG63 骨形成的影响,探究补体 C3 与骨质疏松症之间的联系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胎牛血清(GIBCO 公司);DMEM(Hyclone 公司);青链霉素混合液(100X),琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%)(Solarbio 公司);CCK-8(SAB 公司);羊抗兔 HRP 标记二抗,驴抗山羊 HRP 标记二抗,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);SYBR Green PCR 试剂盒,BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo 公司);逆转录试剂盒(Fermentas 公司),OPG、C3(Abcam 公司);碱性磷酸酶 AKP 测试盒(南京建成公司);质粒抽提试剂盒(OMEGA 公司);二甲基亚砷(Sigma 公司);PLKO.1(慢病毒核心质粒),psPAX2, pMD2G(慢病毒包装质粒)(Addgen 公司);感受态细胞 DH5a (Transgen 公司);293T 细胞(用于包装病毒)(ATCC)。

1.2 溶液配制

细胞培养基:10%胎牛血清、1%双抗,过滤后保存。细胞冻存液:10%二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO),20%胎牛血清,70%DMEM 培养;LB 液体培养基:将蛋白胨,NaCl,酵母提取物溶于二次蒸馏水(distillation-distillation H₂O, ddH₂O)中,定容,灭菌。LB 固体培养基:液体培养基中加入琼脂粉,灭菌;溶液 I:加入 Tris·Cl、葡萄糖、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetracetic acid, EDTA)灭菌后保存;溶液 II: NaOH、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS);溶液 III:乙酸钾、冰乙酸、水,保存;0.5 mol/L EDTA:双蒸水加入二水乙二胺四乙酸二钠,调 pH,定容,灭菌备用。1 mol/L Tris·Cl:蒸馏水中溶解 Tris,调 pH,定容,灭菌后备用。50×TAE 缓冲液:双蒸水中溶解 Tris,加入 EDTA、冰乙酸,定容,备用。PBS 溶液:600 ml 的 ddH₂O 中溶解 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄,用 HCl 调节溶液 pH 至 7.4,定容至 1 L,滤器过滤后高压灭菌,室温保存。

1.3 实验仪器与耗材

离心机(3K15,上海卢湘仪离心机仪器有限公司)

司);Pipetman 移液枪 (吉尔森 P 型移液器公司);PCR 仪 (ABI-2720, ABI 公司);细胞培养耗材 (TRU-ELINE 公司);CO₂ 恒温培养箱 (Thermo 公司);流式细胞仪购 (BD 公司);电转仪 (自大连竞迈科技有限公司);酶标仪 (芬兰雷勃酶标仪公司);稳压电泳仪 (EPS300, 上海天能科技有限公司), 凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 慢病毒补体 C3 沉默载体的构建 慢病毒补体 C3 沉默载体的构建由上海基尔顿公司合成, 选择 PLKO.1 为慢病毒核心载粒, psPAX2, pMD2G 为慢病毒包装质粒, 经过基因测序, 证明序列正确性。

1.4.2 共培养系模型建立与分组 将含 10% 胎牛血清, 1% 双抗 (青链霉素混合液) 的 DMEM 高糖培养基置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养 MG63 细胞。观察细胞呈不规则形, 为贴壁细胞, 台盼蓝染色活细胞率达 95% 以上。采用含 10% 胎牛血清, 1% 双抗的 1640 培养基, 培养 Raji 细胞。观察细胞为悬浮细胞, 台盼蓝染色活细胞率达 95% 以上。将 Raji 细胞铺入培养板中培养, 分为: (1) 补体 C3 沉默组 (慢病毒补体 C3 沉默载体转染共培养体系)。(2) 空白对照组 (未进行慢病毒转染)。(3) 模型组 (慢病毒空载体转染共培养体系), 每组 3 孔。2 h 后补体 C3 沉默组 3 孔加入 15 μl 补体 C3 沉默慢病毒+1 μl 5 μg/μl polybrene, 混匀后加入细胞中继续培养, 转染后换新鲜培养基, 筛选稳定株; 对照组 (未进行慢病毒转染) 3 孔加入 PBS 溶液 15 μl+1 μl 5 μg/μl polybrene 混匀后加入细胞中继续培养, 转染后换新鲜培养基, 筛选稳定株; 模型组 (慢病毒空载体转染共培养体系) 3 孔加入 15 μl 空载体慢病毒+1 μl 5 μg/μl polybrene 混匀后加入细胞中继续培养, 转染后换新鲜培养基, 筛选稳定株。应用 transwell 实验建立共培养体系, 将转染后的各组 Raji 细胞种植于 24 孔板 transwell 小室上层, 下层为成骨细胞系 MG63, 常规培养。

1.5 检测项目与方法

1.5.1 补体 C3 沉默效果检测 采用反转录酶-聚合酶链锁反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法及 Western-Blot 法检测补体 C3 沉默组补体 C3 沉默效果, 并与补体 C3 沉默组及模型组对比, PCR 实验引物设计见表 1。

1.5.2 各组成骨细胞系 MG63 细胞增殖能力检测 使用 CCK-8 检测成骨细胞系 MG63 增殖能力: 分别在共培养体系培养 0、3、6、12、24、48、72 h 后, 按 1:10 体积比混合 Cell Counting Kit -8 (CCK-8) 和无血清必需基本培养基, 每孔 300 μl 加入待测孔中, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h, 采用酶标仪测定

表 1 PCR 实验引物设计选择

Tab.1 Selection of primers for PCR experiment

基因名称	基因序列 (5'-3')	扩增长度 (bp)
C3	Forward: CACCAGCAGACCGTAACCATC	101
	Reverse: GCAGCCTTGACTTCCACTTCC	
Gapdh	Forward: GGAGTCTACTGGCGTCTTTCAC	237
	Reverse: ATGAGCCCTTCCACGATGC	

450 nm 波长吸光度。记录每块板的数值并进行分析。

1.5.3 各组成骨细胞系 MG63 的细胞凋亡检测 培养 72 h 后利用流式细胞术检测成骨细胞系 MG63 的细胞凋亡: (1) 收集细胞, 用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。(2) 取 5~10 万重悬的细胞, 1 000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。(3) 加入 5 μl Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 4 °C 避光孵育 15 min。(4) 加入 5 μl 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 4 °C 避光孵育 5 min。同时以不加 Annexin V-FITC 及碘化丙啶的 1 管作为阴性对照 (注: 孵育过程中重悬细胞 2~3 次以改善染色效果)。(5) 流式细胞仪检测, Annexin V-FITC 为绿色荧光, 对应 BD 流式细胞仪 FL1 检测通道; 碘化丙啶为红色荧光, 对应 BD 流式细胞仪 FL2 检测通道; 涂片后, 荧光显微镜下观察。对比流式检测的效果说明图分析数据。

1.5.4 各组成骨细胞系 MG63 的 AKP 活力检测 培养 24 h 后采用 AKP 试剂盒 (货号 A059-1 50T/48 样) 对共培养体系中补体 C3 沉默组、空白对照组及模型组 AKP 灰度值 (OD 值) 进行检测, 并按说明书公式计算 AKP 活性。

1.5.5 各组 OPG 蛋白质表达水平检测 培养 24 h 后采用 Western-Blot 方法检测共培养体系中的补体 C3 沉默组、空白对照组及模型组各组中成骨细胞系 MG63 的 OPG 蛋白表达水平。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。PCR、Western-Blot 检测的补体 C3、OPG 基因表达、AKP 活力值等定量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 先进行正态性检验、方差齐性检验, 不同组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-t 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补体 C3 沉默效果检测结果

RT-PCR 检测显示补体 C3 沉默组补体 C3 mRNA 水平 (0.005 491 698 8±0.000 306 028 4), 较空白对照组 C3 mRNA 水平 (0.015 451 589 1±0.000 533 194 5) 及模型组 C3 mRNA 水平 (0.016 974 746 7±

0.003 110 412 6) 显著下降, 3 组比较差异有统计学意义 ($F=34.824, P=0.00$); 空白对照组与模型组相比差异无统计学意义 ($t=-0.56, P=0.573>0.05$); 补体 C3 沉默组与模型组比较 ($t=-8.36, P=0.00<0.05$), 补体 C3 沉默组与空白对照组相比 ($t=-8.96, P=0.00<0.05$) 差异均有统计学意义; 提示建模成功。C3 mRNA 扩增动力学曲线见图 1。

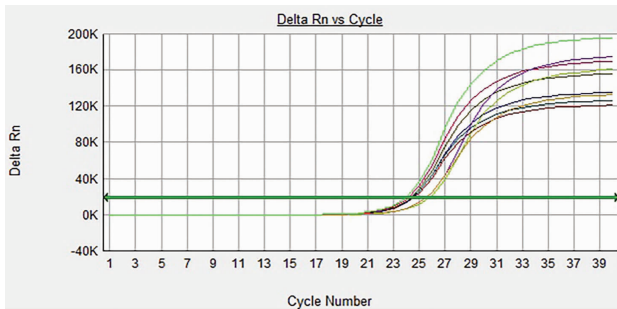


图 1 C3 mRNA 扩增动力学曲线
Fig.1 C3 mRNA amplification kinetics curve

Western-Blot 法检测显示补体 C3 沉默组补体 C3 水平 (7241.024 ± 36.052), 较空白对照组的 ($17 545.409 \pm 54.398$) 与模型组的 ($17 425.924 \pm 61.726$) 显著降低 ($F=55 865.612, P<0.01$); 空白对照组与模型组相比差异无统计学意义 ($t=0.36, P=0.732>0.05$); 补体 C3 沉默组与模型组比较 ($t=-15.60, P=0.00<0.05$), 补体 C3 沉默组与空白对照组相比 ($t=-15.63, P=0.00<0.05$) 差异均有统计学意义; 再次提示造模成功。C3 灰度值见图 2。

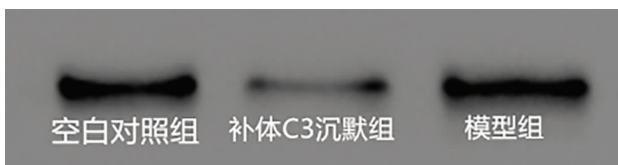


图 2 Western-Blot 检测补体 C3 沉默后共培养体系下各组 C3 灰度值, 可见补体 C3 沉默组灰度值显著小于空白对照组及模型组
Fig.2 Detection of C3 gray value in co-culture system after complement C3 silencing, gray value of complement C3 silence group was significantly lower than that of the blank control group and the model group, detected by Western-Blot

2.2 各组成骨细胞系 MG63 细胞增殖检测结果

0 h 时 CCK-8 检测结果, 显示补体 C3 沉默组吸光度与空白对照组、模型组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 3 h 后 CCK-8 检测结果显示空白对照组吸光度为 0.521 ± 0.002 , 模型组吸光度为 0.520 ± 0.004 , 补体 C3 沉默组吸光度为 0.518 ± 0.006 , 补体 C3 沉默组吸光度与空白对照组及模型组比较差异

无统计学意义 ($P>0.05$); 6 h 后 CCK-8 检测结果显示空白对照组吸光度为 0.521 ± 0.007 , 模型组吸光度为 0.517 ± 0.007 , 补体 C3 沉默组吸光度为 0.518 ± 0.002 , 补体 C3 沉默组吸光度与空白对照组及模型组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 12 h 后 CCK-8 检测结果显示空白对照组吸光度为 0.879 ± 0.003 , 模型组吸光度为 0.878 ± 0.005 , 补体 C3 沉默组吸光度为 0.900 ± 0.002 , 补体 C3 沉默组吸光度显著高于空白对照组及模型组 ($P<0.05$); 24 h 后 CCK-8 检测结果显示空白对照组吸光度为 1.364 ± 0.006 ; 模型组吸光度为 1.364 ± 0.008 , 补体 C3 沉默组吸光度为 1.449 ± 0.008 , 补体 C3 沉默组吸光度显著高于空白对照组及模型组 ($P<0.05$); 48 h 后 CCK-8 检测结果显示空白对照组其吸光度为 1.628 ± 0.006 , 模型组吸光度为 1.626 ± 0.005 , 补体 C3 沉默组吸光度为 1.882 ± 0.006 , 较空白对照组其增殖率为 $+15.62\%$, 补体 C3 沉默组吸光度显著高于空白对照组及模型组 ($P<0.05$); 72 h 后 CCK-8 检测结果显示空白对照组吸光度为 2.252 ± 0.005 ; 模型组吸光度为 2.250 ± 0.002 , 补体 C3 沉默组吸光度为 2.971 ± 0.010 , 补体 C3 沉默组吸光度显著大于空白对照组及模型组 ($P<0.05$)。见表 4。

2.3 各组成骨细胞系 MG63 的细胞凋亡检测结果

利用流式细胞术检测各组成骨细胞系 MG63 的细胞凋亡, 测得补体 C3 沉默组凋亡细胞百分比 (2.63 ± 0.25)%, 小于空白对照组凋亡细胞百分比 (7.40 ± 0.20)% 及模型组凋亡细胞百分比 (8.97 ± 0.25)% ($F=687.580, P<0.05$); 空白对照组与模型组相比 ($t=9.44, P<0.05$), 补体 C3 沉默组与模型组相比 ($t=-34.77, P<0.05$), 补体 C3 沉默组与空白对照组相比 ($t=-15.36, P<0.05$), 差异均有统计学意义。流式细胞仪检测图见图 3-5。

2.4 AKP 检测盒检测各组 MG63 细胞 AKP 活力

培养 24 h 后测得补体 C3 沉默组 AKP 活力 26.723 ± 4.350 , 显著高于空白对照组的 17.281 ± 2.188 及模型组的 16.462 ± 1.795 , ($P<0.05$)。而空白对照组 AKP 活力 17.281 ± 2.188 与模型组的 16.462 ± 1.795 比较差异无统计学意义 ($F=10.866, P>0.05$); 空白对照组与模型组相比, 差异无统计学意义 ($t=0.13, P>0.05$); 补体 C3 沉默组与模型组相比 ($t=4.19, P<0.05$), 补体 C3 沉默组与空白对照组相比 ($t=3.85, P<0.05$), 差异均有统计学意义。

2.5 Western-Blot 法检测各组 OPG 表达水平

培养 24 h 后测得干补体 C3 沉默组 OPG 灰度值 $15 710.794 \pm 34.592$, 较空白对照组的 $8 249.158 \pm 53.671$ 及模型组 $8 249.158 \pm 53.671$ 显著升高 ($P<$

表 4 培养各时间段后 CCK-8 检测各组吸光度比较

Tab.4 Comparison of absorbance among each group detected by CCK-8 after culture at different times

时间	模型组	空白对照组	补体 C3 沉默组	F 值	P 值
0 h	0.517±0.003	0.518±0.002 ^{a3}	0.519±0.001 ^{b3c3}	0.903	0.454
3 h	0.520±0.004	0.521±0.002 ^{a4}	0.518±0.006 ^{b4c4}	0.412	0.680
6 h	0.517±0.007	0.521±0.007 ^{a5}	0.518±0.002 ^{b5c5}	0.497	0.631
12 h	0.878±0.005	0.879±0.003 ^{a6}	0.900±0.002 ^{b6c6}	39.514	0.000
24 h	1.364±0.008	1.364±0.006 ^{a7}	1.449±0.008 ^{b7c7}	136.116	0.000
48 h	1.626±0.005	1.628±0.006 ^{a8}	1.882±0.006 ^{b8c8}	2047.244	0.000
72 h	2.250±0.002	2.252±0.005 ^{a9}	2.971±0.010 ^{b9c9}	13231.368	0.000

注：与模型组相比，^{a3} $t=0.44, P=0.675>0.05$ ；^{a4} $t=0.45, P=0.666>0.05$ ；^{a5} $t=0.97, P=0.371>0.05$ ；^{a6} $t=0.23, P=0.821>0.05$ ；^{a7} $t=0.11, P=0.914>0.05$ ；^{a8} $t=0.51, P=0.631>0.05$ ；^{a9} $t=0.49, P=0.643>0.05$ ；^{b3} $t=1.32, P=0.235>0.05$ ；^{b4} $t=-0.45, P=0.666>0.05$ ；^{b5} $t=0.28, P=0.791>0.05$ ；^{b6} $t=7.81, P=0.00<0.05$ ；^{b7} $t=14.35, P=0.00<0.05$ ；^{b8} $t=5.56, P=0.00<0.05$ ；^{b9} $t=13.18, P=0.00<0.05$ 。与空白对照组相比，^{c3} $t=0.88, P=0.413>0.05$ ；^{c4} $t=0.91, P=0.399>0.05$ ；^{c5} $t=0.69, P=0.515>0.05$ ；^{c6} $t=7.58, P=0.00<0.05$ ；^{c7} $t=14.24, P=0.00<0.05$ ；^{c8} $t=5.51, P=0.00<0.05$ ；^{c9} $t=13.13, P=0.00<0.05$

Note: Compared with model group, ^{a3} $t=0.44, P=0.675>0.05$ ；^{a4} $t=0.45, P=0.666>0.05$ ；^{a5} $t=0.97, P=0.371>0.05$ ；^{a6} $t=0.23, P=0.821>0.05$ ；^{a7} $t=0.11, P=0.914>0.05$ ；^{a8} $t=0.51, P=0.631>0.05$ ；^{a9} $t=0.49, P=0.643>0.05$ ；^{b3} $t=1.32, P=0.235>0.05$ ；^{b4} $t=-0.45, P=0.666>0.05$ ；^{b5} $t=0.28, P=0.791>0.05$ ；^{b6} $t=7.81, P=0.00<0.05$ ；^{b7} $t=14.35, P=0.00<0.05$ ；^{b8} $t=5.56, P=0.00<0.05$ ；^{b9} $t=13.18, P=0.00<0.05$ 。Compared with the blank control group, ^{c3} $t=0.88, P=0.413>0.05$ ；^{c4} $t=0.91, P=0.399>0.05$ ；^{c5} $t=0.69, P=0.515>0.05$ ；^{c6} $t=7.58, P=0.00<0.05$ ；^{c7} $t=14.24, P=0.00<0.05$ ；^{c8} $t=5.51, P=0.00<0.05$ ；^{c9} $t=13.13, P=0.00<0.05$

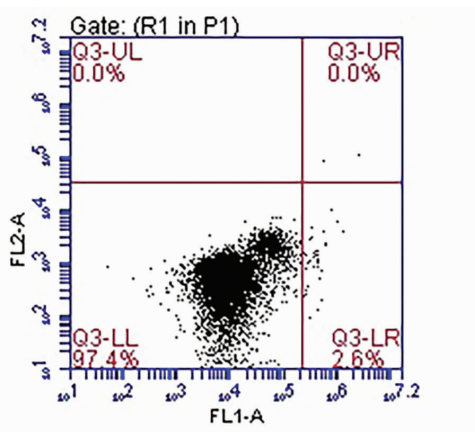


图 3 补体 C3 沉默组 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色后的流式细胞仪检测图,提示凋亡早期的细胞为 2.6%(图中右下部分)

Fig.3 Flow cytometry detection diagram of Annexin V-FITC and propidium iodide staining in Complement C3 silence group, early apoptotic cells was 2.6 % (lower right)

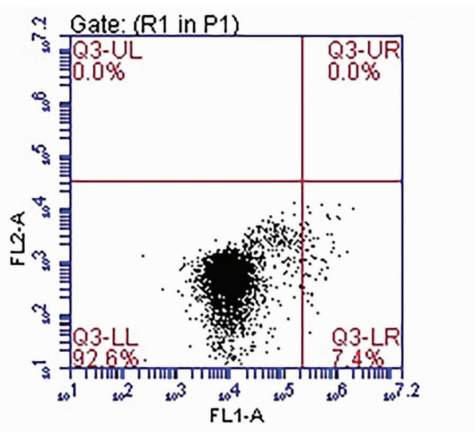


图 4 空白对照组 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色后的流式细胞仪检测图,提示空白对照组中凋亡早期的细胞为 7.4%(图中右下部分)

Fig.4 Flow cytometry detection diagram of Annexin V-FITC and propidium iodide staining in blank control group, early apoptotic cells was 7.4 % (lower right)

0.05), 而空白对照组 $8\ 249.158 \pm 53.671$ 与模型组 $8\ 278.309 \pm 27.884$ 比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 空白对照组与模型组相比, 差异无统计学意义 ($t=-0.88, P>0.05$); 补体 C3 沉默组与模型组相比 ($t=22.62, P<0.05$), 补体 C3 沉默组与空白对照组相比 ($t=22.71, P<0.05$), 差异均有统计学意义。OPG 灰度值见图 6。

3 讨论

近年来, 骨免疫学与骨质疏松症的关系成为研究的热点^[10]。正常人体内由成骨细胞引导的骨形成与破骨细胞(osteoclast, OC)引导的骨吸收处于一种平衡状态^[11], 而骨质疏松症患者通常表现为骨吸收

和骨形成的平衡被打破, 其本质是 OC 过度激活或破骨前体细胞向 OC 过度分化, 导致骨吸收过程加速, 并以骨组织显微结构变化、骨量降低等为主要病理改变^[12]。有关免疫系统细胞调节骨形成及骨吸收的假说认为, RANK 与 RANKL 结合能够促进破骨前体的细胞的分化, 引起 OC 的成熟^[13]。而由骨髓基质细胞及 OB 分泌的 OPG, 因其 N 末端与 RANK 结构具有较高相似性, 故能够竞争性结合 RANKL, 阻断 RANK 与 RANKL 的结合, 从而抑制骨吸收的发展^[8]。

3.1 补体 C3 在骨免疫的地位

补体 C3 是补体系统的核心, 它是补体激活途径中经典途径、凝集素途径及旁路途径汇聚的枢纽^[14]。

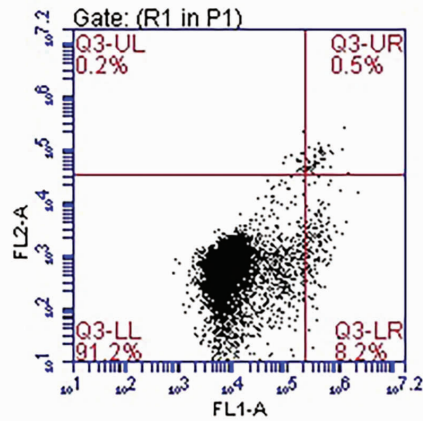


图 5 模型组 Annexin V-FITC 和碘化丙啉染色后的流式细胞仪检测,提示模型组凋亡早期的细胞为 8.2%(图中右下部分),凋亡晚期的细胞为 0.5%(图中右上部分),坏死细胞为 0.2%(图中左上部分)

Fig.5 Flow cytometry detection after Annexin V-FITC and propidium iodide staining in model group, early apoptotic cells in model group was 8.2% (lower right part in the figure), late apoptotic cells was 0.5% (upper right), necrotic cells was 0.2% (upper left)

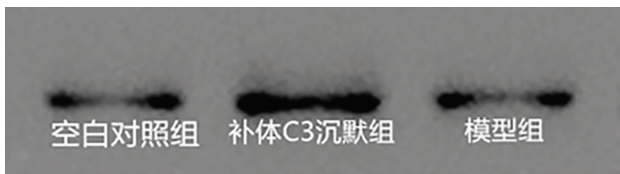


图 6 Western-Blot 检测补体 C3 沉默后共培养体系下各组 OPG 灰度值,可见补体 C3 沉默组灰度值显著大于空白对照组及模型组

Fig.6 Western-Blot detect gray value of OPG among each group after C3 silencing. Gray value of OPG in C3 silencing group was significantly higher than that in blank control and model group

补体 C3 的激活进一步产生补体成分并发挥其免疫作用^[15]。补体 C3 与骨免疫学也有密切的联系^[16], Sato 等^[17]的研究证明初级成骨细胞能够产生 C3,并且阻断骨髓细胞培养中的 C3 会减弱破骨细胞的分化。另有研究^[18]发现补体 C3 可能通过促进破骨细胞的分化影响牙槽骨的吸收;有研究^[17]显示在骨髓细胞培养时,使用单克隆抗体阻断 C3 或 C3 受体能够明显抑制 1,25-(OH)₂-VitD₃ 刺激的骨髓单核细胞的破骨向分化。以上实验均提示 C3 能够通过影响骨吸收来改变骨稳态,但补体 C3 对骨形成的影响及作用机制探究甚少。MacKay 等^[19]研究发现 C3 参与小鼠卵巢切除术后的骨稳态。C3 的缺失减少了骨丢失,改善了骨小梁微结构,使骨的力学性能得到潜在的改善。但该实验未直接体现 C3 对骨形成的影响。

3.2 补体 C3 沉默对骨形成的影响

本研究首先构建了能够较好地模拟体内多种细胞共存培养的条件 Transwell 小室,建立体外人 B 淋巴细胞 Raji-MG63 共培养体系,然后通过 RT-

PCR 及 Western-Blot 检测等方法比较补体 C3 沉默组与空白对照组的补体 C3 水平,分析数据认为补体 C3 沉默组 C3 水平较空白对照组显著降低,而模型组与空白对照组 C3 水平无明显差异。结果表明慢病毒干扰的方法对 C3 水平无影响,提示造模成功。

造模成功后,通过检测 CCK-8 发现补体 C3 沉默组成骨细胞系 MG63 增殖能力在培育 12 h 之前与空白对照组比较差异无统计学意义,在培育 12 h 后补体 C3 沉默组增殖能力显著高于空白对照组,提示补体 C3 的沉默能够显著提升成骨细胞的增殖能力,且增殖能力的提升需要时间的累积;然后利用流式细胞术检测成骨细胞系 MG63 的细胞凋亡,分析得出补体 C3 沉默组成骨细胞凋亡率显著低于空白对照组及模型组,提示补体 C3 的沉默能够抑制成骨细胞系 MG63 的凋亡。因此,本研究发现补体 C3 的沉默对成骨细胞系 MG63 的增殖与凋亡存在影响。

AKP 作为骨形成的早期标志物,其活力能够体现骨形成能力的强弱。通过检测 AKP 活力发现培养 24 h 后补体 C3 沉默组 AKP 活力显著高于空白对照组,再次提示补体 C3 的沉默能够显著提升成骨细胞的骨形成能力。采用 Western-Blot 法检测各组 OPG 结果发现补体 C3 沉默组的 OPG 表达水平显著高于空白对照组,提示补体 C3 对成骨能力的影响可能通过调控 OPG 水平进而影响 OPG/RANKL/RANK 信号通路来实现。

综上所述,本研究证明补体 C3 的沉默能增强成骨 MG63 细胞的骨形成能力。MacKay 等^[19]的研究也发现 C3 参与了小鼠卵巢切除术后的骨稳态,C3 的缺失减少了骨丢失,改善了骨小梁微结构,使骨的力学性能得到潜在的改善。然而 Matsuoka 等^[20]的实验却发现 C3a 在成熟破骨细胞培养基中具有成骨细胞刺激活性,破骨细胞条件培养基通过 C3aR 信号促进成骨细胞分化,使用 C3aR 拮抗剂治疗的 ddy 小鼠胫骨干骺端骨损失比未治疗的小鼠更大。另有学者^[19]认为,在 Matsuoka 等的研究中,体内部分实验的分析局限在了单个解剖部位,未进行力学测试,随着时间推移,补体 C3 是作用于破骨细胞或成骨细胞亦有不不确定性。

本实验通过建立 Raji-MG63 共培养体系后,通过检测成骨细胞系 MG63 的增殖与凋亡情况、ALP 活力以及 OPG 的表达发现了补体 C3 的沉默能增强成骨 MG63 细胞的骨形成能力,并且其增强骨形成能力可能通过影响 OPG/RANKL/RANK 信号通路实现,但其具体机制还需要进一步研究。

参考文献

[1] 马锦锦,应俊,段小红,等. ATP6V1H 基因在骨代谢中的作用[J]. 中国骨伤,2021,34(3):265-268.

- MA JJ, YING J, DUAN XH, et al. Role of ATP6V1H gene in bone metabolism[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2021, 34(3):265-268. Chinese with abstract in English.
- [2] 吕遐, 扶琼. 原发性骨质疏松症的研究进展与最新指南解读[J]. *临床内科杂志*, 2020, 37(5):319-322.
- LYU X, FU Q. Research progress and Interpretation of the latest guidelines of primary osteoporosis[J]. *Lin Chuang Nei Ke Za Zhi*, 2020, 37(5):319-322. Chinese.
- [3] Weitzmann MN. Bone and the immune system[J]. *Toxicol Pathol*, 2017, 45(7):911-924.
- [4] Stephan AH, Barres BA, Stevens B. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2012, 35:369-35389.
- [5] Schoengraf P, Lambris JD, Recknagel S, et al. Does complement play a role in bone development and regeneration[J]. *Immunobiology*, 2013, 218(1):1-9.
- [6] Ling M, Murali M. Analysis of the complement system in the clinical immunology laboratory[J]. *Clin Lab Med*, 2019, 39(4):579-590.
- [7] Andrades JA, Nimni ME, Becerra J, et al. Complement proteins are present in developing endochondral bone and may mediate cartilage cell death and vascularization[J]. *Exp Cell Res*, 1996, 227(2):208-213.
- [8] Jo S, Han J, Lee YL, et al. Regulation of osteoblasts by alkaline phosphatase in ankylosing spondylitis[J]. *Int J Rheum Dis*, 2019, 22(2):252-261.
- [9] Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(5):401-419.
- [10] Bar-Shavit Z. Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators[J]. *Autoimmunity*, 2008, 41(3):195-203.
- [11] 郭铁峰, 周明旺, 李盛华, 等. 长链非编码 RNA 对骨组织代谢影响的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2018, 31(3):286-291.
- GUO TF, ZHOU MW, LI SH, et al. Long non-coding RNA for metabolism of bone tissue[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2018, 31(3):286-291. Chinese with abstract in English.
- [12] Chen X, Wang Z, Duan N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions[J]. *Connect Tissue Res*, 2018, 59(2):99-107.
- [13] Tanaka Y. Clinical immunity in bone and joints[J]. *J Bone Miner Metab*, 2019, 37(1):2-8.
- [14] Vignesh P, Rawat A, Sharma M, et al. Complement in autoimmune diseases[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 465:123-465130.
- [15] Janssen BJ, Huizinga EG, Raaijmakers HC, et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity[J]. *Nature*, 2005, 437(7058):505-511.
- [16] Ehrnthaller C, Huber-Lang M, Nilsson P, et al. Complement C3 and C5 deficiency affects fracture healing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e81341.
- [17] Sato T, Abe E, Jin CH, et al. The biological roles of the third component of complement in osteoclast formation[J]. *Endocrinology*, 1993, 133(1):397-404.
- [18] 尹圆圆, 马华钰, 李昕怡, 等. 小鼠正畸牙移动中牙周组织自噬相关基因表达的初步研究[J]. *国际口腔医学杂志*, 2020, 47(6):627-634.
- YIN YY, MA HY, LI XY, et al. Expression of autophagy related genes in mice periodontal tissue during orthodontic tooth movement[J]. *Guo Ji Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2020, 47(6):627-634. Chinese.
- [19] MacKay DL, Kean TJ, Bernardi KG, et al. Reduced bone loss in a murine model of postmenopausal osteoporosis lacking complement component 3[J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(1):118-128.
- [20] Matsuoka K, Park KA, Ito M, et al. Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation[J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(7):1522-1530.

(收稿日期:2020-06-20 本文编辑:王玉蔓)