

· 基础研究 ·

# 重组人骨保护素与重组核因子 $\kappa$ b 活化因子受体蛋白对破骨前体细胞分化的影响

熊琦, 张里程, 张立海, 姚琦, 唐佩福  
(中国人民解放军总医院骨科, 北京 100853)

**【摘要】 目的:**对比重组人骨保护素(rhOPG-Fc)与重组核因子  $\kappa$ b 活化因子受体蛋白(rhRANK)对破骨前体细胞分化的影响。**方法:**采用成骨细胞与破骨前体细胞 RAW264.7 混合培养,在地塞米松、1,25(OH)<sub>2</sub>VitD<sub>3</sub> 诱导下生成破骨细胞的方法。研究分 3 组:rhRANK 组:10<sup>-5</sup> g/L;rhOPG-Fc 组:10<sup>-5</sup> g/L;空白对照组。作用 9 d 后观察破骨细胞数目和形态,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色阳性细胞个数,骨磨片吸收陷窝计数。**结果:**在空白对照组,小鼠成骨细胞与破骨前体细胞 RAW264.7 混合培养 6 d 后,开始出现多核细胞,9 d 时可见大量成熟多核细胞,经 TRAP 染色证实为成熟破骨细胞,而 rhRANK 组及 rhOPG-Fc 组 TRAP 染色阳性多核细胞数较对照组均减少,特别是 rhRANK 组减少更明显。骨片吸收陷窝计数显示 rhRANK 组及 rhOPG-Fc 组较对照组也明显减少,而相对来说,rhRANK 组较 rhOPG-Fc 组更少。**结论:**rhOPG-Fc 与 rhRANK 均可以有效抑制破骨前体细胞分化成为成熟破骨细胞,且 rhRANK 较 rhOPG-Fc 抑制效果更明显。

**【关键词】** 骨保护素; 核因子  $\kappa$ b 活化因子受体蛋白; 破骨前体细胞; 细胞分化

**DOI:**10.3969/j.issn.1003-0034.2013.04.015

**Effects of recombinant human osteoprotegerin and recombinant RANK protein on the differentiation of osteoclast precursors** XIONG Qi, ZHANG Li-cheng, ZHANG Li-hai, YAO Qi, and TANG Peifu. Department of Orthopaedics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

**ABSTRACT Objective:**To compare the effect of recombinant OPG-Fc and recombinant RANK protein on the differentiation of osteoclast precursors. **Methods:**Mouse osteoblasts cell lines were incubated with osteoclast precursors cell lines RAW 264.7 for 9 days with 10<sup>-5</sup> g/L rhRANK or rhOPG-Fc or PBS added to the coculture system. TRAP stain positive cells counting and cortical bone pit formation counting were performed in the 9th day. **Results:**Multinucleated TRAP stain positive cells were observed in the coculture systems after 6 days incubation, and plenty of mature osteoclasts could be observed in the 9th day. With the addition of 10<sup>-5</sup> g/L rhOPG-Fc or rhRANK, multinucleated giant cells and cortical bone pit formation counting decreased significantly compared with the control group, and the rhRANK group decreased more significantly than the rhOPG-Fc group. **Conclusions:**Both rhOPG-Fc and rhRANK can inhibit the differentiation of osteoclast precursors and prevent them forming mature osteoclasts, moreover, the rhRANK shows the significant inhibition effect than the rhOPG-Fc.

**KEYWORDS** Osteoprotegerin (OPG); Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ b protein (RANK); Osteoclast precursor; Cell differentiation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(4): 324-327 www.zggszz.com

OPG/RANKL/RANK 是破骨细胞分化成熟过程中非常重要的信号传导通路<sup>[1-2]</sup>。RANKL 由成骨细胞及骨髓基质细胞分泌,通过与破骨前体细胞表面的受体 RANK 结合,刺激破骨前体细胞分化与成熟<sup>[3-4]</sup>。OPG 是 RANKL 的假诱受体,通过竞争性抑制 RANKL 与破骨前体细胞表面 RANK 结合,消除 RANKL 对于破骨细胞的诱导作用<sup>[5]</sup>。研究表明,通

过基因工程得到的重组人源性 OPG-Fc 及 RANK 蛋白均可竞争性结合 RANKL<sup>[6-7]</sup>,从而抑制破骨细胞的分化及骨吸收功能,但未见二者在破骨细胞分化、吸收功能方面抑制作用的对比研究。因此本研究旨在对比同等浓度重组人源性 OPG-Fc 及 RANK 蛋白对破骨细胞分化及骨吸收活性的抑制作用。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂和药品** DMEM 培养液 (Gibco 公司)。胎牛血清 (Gibco 公司)。胰蛋白酶 (Sigma 公司)。地塞米松 (Sigma 公司)。TRAP 染色试剂盒 (南京建成生物工程所)。1,25-dihydroxy-vitamin D3

基金项目:国家自然科学基金(编号:81000796;30973068)  
Fund program:the National Natural Science Foundation of China (NO. 81000796;30973068)  
通讯作者:唐佩福 E-mail:pftang301@126.com

(1,25 (OH)<sub>2</sub>VitD<sub>3</sub>) (日本和光纯药株式会社)。rhOPG-Fc (上海生工生物公司)。rhRANK 蛋白 (Met26-Pro210) (中国科学院微生物研究所惠赠)。小鼠成骨细胞株 (解放军总医院骨科研究所)。RAW264.7 细胞株 (解放军总医院骨科研究所)。

**1.2 盖玻片及骨磨片的制备** 取 10 mm×10 mm 盖玻片若干,清洗干净后,5%的稀盐酸浸泡过夜,双蒸水漂洗 10 min 后烘干,高压蒸汽灭菌备用。将新鲜牛股骨皮质骨用钢锯及粗细金刚砂石制成 6 mm×6 mm 大小,100 μm 厚的骨磨片,蒸馏水中在超声波清洗仪内清洗 3 次,每次 10 min,<sup>60</sup>Co 照射消毒后放置 6 孔板中备用。

### 1.3 细胞培养

**1.3.1 成骨细胞培养** 将小鼠成骨细胞复苏后接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,24 h 换液 1 次。待细胞增殖到培养瓶面积的 80%时进行传代。

**1.3.2 RAW264.7 细胞的复苏、培养** RAW264.7 细胞为小鼠单核巨噬细胞瘤细胞。将冻存的 RAW264.7 细胞自液氮中取出,室温下静置 1 min 左右,置于 37 ℃的水浴中待冻存液完全溶解。室温 1 000 r/min,离心 3 min,收集细胞。加入适量的 DMEM 完全培养基悬浮细胞,根据数量移至 1~3 个 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,每瓶中加入 DMEM 完全培养基 5 ml,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养。根据培养基中酚红指示剂的颜色改变和细胞数量,决定换液和传代时间。

**1.3.3 破骨细胞培养体系建立** 选择生长较好的成骨细胞以及 RAW264.7 细胞,使用 0.25%胰蛋白酶将其消化下来,分别以每孔 4×10<sup>4</sup> 与 1×10<sup>4</sup> 的密度均匀种植于 6 孔板骨磨片和盖玻片培养体系中,每孔加入 3 ml 破骨细胞诱导分化液,即含 10%胎牛血清 DMEM 培养基中加入 Dex 和 1,25 (OH)<sub>2</sub>VitD<sub>3</sub>,使两者浓度分别为 10<sup>-7</sup>mol/L 和 10<sup>-8</sup>mol/L。

### 1.4 观察项目与方法

**1.4.1 破骨细胞观察、鉴定** 将破骨细胞培养体系于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,隔日换液,倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。使用抗酒石酸盐酸性磷酸酶染色 (TRAP 染色) 来鉴定成熟破骨细胞。共培养体系 6 孔板盖玻片分成 3 组:空白对照组仅加 PBS,两个实验组分别加 10<sup>-5</sup> g/L 的 rhRANK 和 rhOPG-Fc,其他培养条件相同,隔日换液。培养 9 d 后使用倒置相差显微镜观察 6 孔板中玻片破骨细胞生长情况及形态。然后进行 TRAP 染色,每组取 10 个视野,倒置相差显微镜 100 倍下计算 TRAP 染色阳性多核 (2 个核以上) 细胞总数。

**1.4.2 骨磨片吸收陷窝观察** 骨片按上述方法同

样分为 3 组:实验组加入 10<sup>-5</sup> g/L 的 rhRANK 或 rhOPG-Fc,空白对照组仅加 PBS。同等条件培养,隔日换液。第 9 天将各组骨片取出,2.5%戊二醛固定后,甲苯胺蓝染色,光镜 100 倍下对每组整张骨磨片染色阳性陷窝计数。上述染色后的骨磨片经蒸馏水超声清洗 3 次,扫描电镜下观察骨吸收陷窝并照相。

**1.5 统计学分析** 统计学分析采用 SPSS13.0 软件完成,数据采用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较采用参数统计方法独立样本 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 破骨细胞观察结果** 破骨前体细胞 (RAW264.7) 与成骨细胞共同培养后,成骨细胞比例逐渐减少,形态均不完整,而 RAW264.7 增长迅速。培养第 4 天,部分 RAW264.7 进入分化前期,胞体变厚。第 5 天,倒置相差显微镜观察发现混合体系中 RAW264.7 出现多个分裂相,部分细胞呈现双核。第 6 天,开始出现多核巨细胞,胞体较大,中部隆起,边缘较扁平,核数目尚少,以 3~4 个核为主。第 7 天,成熟破骨细胞核增至 5~6 个。第 8 天,破骨细胞核数增多达到 8~14 个,呈现清晰的典型破骨细胞外观。第 9 天,破骨细胞核数继续增多达到 16~20 个,直径达 30~40 μm。TRAP 染色显示多核细胞胞浆呈现玫瑰红色,证实为成熟破骨细胞,成骨细胞在混合体内的比例明显减少,而 RAW264.7 细胞 TRAP 染色则为棕黄色。混合培养 9 d 后,TRAP 染色阳性多核细胞计数,结果显示:rhOPG-Fc 组与对照组相比,TRAP 阳性细胞计数明显减少 (*t*=4.62, *P*<0.05),差异具有统计学意义;rhRANK 组较对照组 TRAP 染色阳性细胞个数也明显减少 (*t*=8.97, *P*<0.05);且 rhRANK 组较 rhOPG-Fc 组细胞个数减少更明显,差异均具有统计学意义 (*t*=8.07, *P*<0.05) (表 1,图 1)。

**2.2 骨片吸收陷窝观察结果** 成骨细胞与 RAW264.7 混合接种 4 h 后,大部分细胞开始在骨片上贴附。混合 2 d 后,RAW264.7 细胞在骨片上生长旺盛,成骨细胞比例逐渐减少。第 6 天,骨片上开始出现 4~5 核的破骨细胞。第 9 天将各组骨片取出,2.5%戊二醛固定后,甲苯胺蓝染色。镜下观察,可见对照组骨片上有较多吸收陷窝,呈圆型、椭圆型及不规则的多种形态,经甲苯胺蓝染色呈蓝紫色。100 倍镜下对整张骨片染色阳性陷窝计数,结果显示:与对照组相比, rhOPG-Fc 组骨磨片吸收陷窝计数明显减少 (*t*=12.86, *P*<0.05);而 rhRANK 组较对照组也明显减少 (*t*=21.05, *P*<0.05);并且 rhRANK 组较 rhOPG-Fc 组减少更为明显,差异均有统计学意义 (*t*=6.72, *P*<0.05) (表 1)。扫描电镜观察:骨片吸收陷窝形态与甲

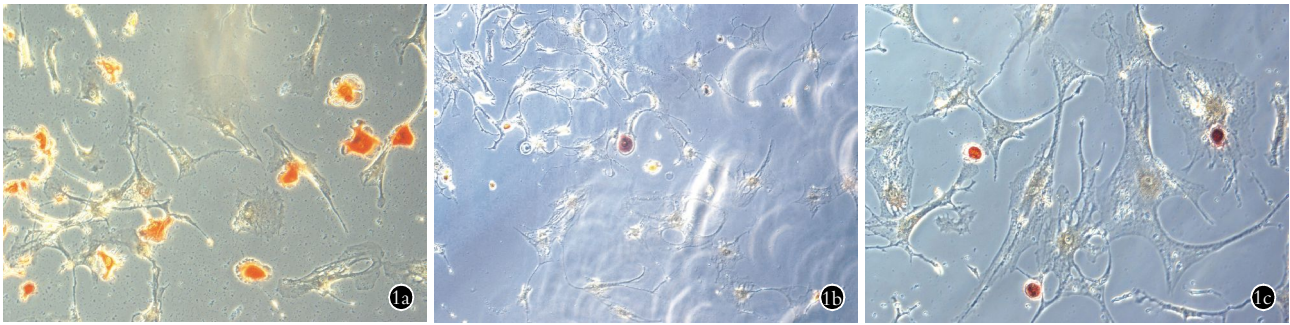


图 1 TRAP 染色阳性多核细胞 1a. 对照组 10<sup>-5</sup> g/L PBS(×100) 1b. rhOPG-Fc 组 10<sup>-5</sup> g/L rhOPG-Fc(×100) 1c. rhRANK 组 10<sup>-5</sup> g/L rhRANK (×100)

Fig.1 Multinucleated TRAP stain positive cells 1a. The coculture system with 10<sup>-5</sup> g/L PBS(×100) 1b. The coculture system with 10<sup>-5</sup> g/L rhOPG-Fc (×100) 1c. The coculture system with 10<sup>-5</sup> g/L rhRANK(×100)

表 1 各组间 TRAP 阳性多核细胞计数及骨磨片吸收陷窝计数(̄x±s, 个)

Tab.1 Multinucleated TRAP stain positive cells and cortical bone pit formation counting(̄x±s, piece)

组别	视野数	TRAP 计数	吸收陷窝计数
对照组	10	23.44±5.94	90.40±8.27
rhOPG-Fc 组	10	14.00±2.56	40.87±8.94
rhRANK 组	10	5.60±2.07	16.07±7.50

注:TRAP 细胞计数:rhOPG-Fc 组与对照组比较,  $t=4.62, P<0.05$ ; rhRANK 组与对照组比较,  $t=8.97, P<0.05$ ; rhRANK 组与 rhOPG-Fc 组比较,  $t=8.07, P<0.05$ 。吸收陷窝计数:rhOPG-Fc 组与对照组比较,  $t=12.86, P<0.05$ ; rhRANK 组与对照组比较,  $t=21.05, P<0.05$ ; rhRANK 组与 rhOPG-Fc 组比较,  $t=6.72, P<0.05$

Note:TRAP:rhOPG-Fc group vs control group,  $t=4.62, P<0.05$ ; rhRANK group vs control group,  $t=8.97, P<0.05$ ; rhRANK group vs rhOPG-Fc group,  $t=8.07, P<0.05$ 。Cortical bone pit:rhOPG-Fc group vs control group,  $t=12.86, P<0.05$ ; rhRANK group vs control group,  $t=21.05, P<0.05$ ; rhRANK group vs rhOPG-Fc group,  $t=6.72, P<0.05$

苯胺蓝染色的陷窝形态一致,陷窝边缘清晰,深浅不等,深者底面粗糙,所有骨片吸收陷窝明显不同于哈佛管等其他结构(图 2)。

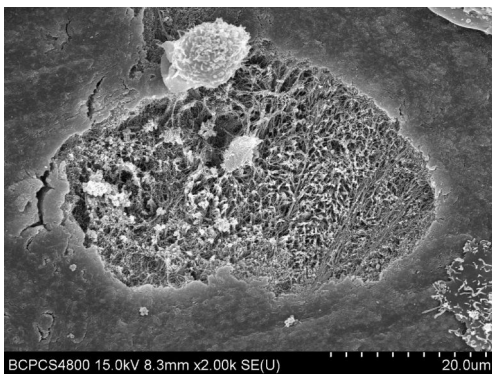


图 2 电镜下骨吸收陷窝

Fig.2 Cortical bone pit imaging with SEM

### 3 讨论

由于基因工程的进步与发展,在体外已可以合成重组人 OPG 和重组 RANK<sup>[6,8-9]</sup>,这些体外合成的

OPG 和 RANK 具有与生物体内的 OPG 和 RANK 相同的生物功能,均能与 RANKL 结合竞争性抑制 RANKL 与破骨细胞上 RANK 结合,从而消除 RANKL 对于破骨细胞的生理作用,达到抑制骨吸收、增加骨量的作用。

研究表明重组 OPG 和重组 RANK 均具有抑制破骨细胞的作用。通过基因工程使酵母菌成功表达合成 OPG,将合成的 OPG 加入破骨细胞培养基中,破骨细胞的骨吸收作用减弱,且成熟的 TRAP 阳性多核破骨细胞细胞的数量也明显减少<sup>[8,10-15]</sup>。此外,将合成的重组 OPG 用于去势小鼠和去势大鼠骨质疏松治疗研究发现,重组 OPG 能有效抑制骨质疏松,使骨量明显增加<sup>[11]</sup>。而经体外实验证实发现,重组 RANK 蛋白能有效抑制 RANKL 调节的破骨细胞分化<sup>[12]</sup>,且有研究认为重组可溶性 RANK(重组 sRANK)以剂量依赖方式抑制破骨细胞生成和骨吸收陷窝形成,并且 sRANK 可显著抑制 PTH 刺激的小鼠骨髓细胞碳酸酐酶 II 和抗酒石酸酸性磷酸酶 mRNA 的表达<sup>[7]</sup>。将 rhRANK 加入破骨细胞培养基中发现, rhRANK 能有效抑制破骨细胞数量及其骨吸收能力,且 rhRANK 能有效阻止去势小鼠的骨量丢失<sup>[9]</sup>。

以上说明 rhOPG-Fc 与 rhRANK 均能显著性抑制破骨细胞分化过程及其骨吸收功能,从而抑制骨质疏松,但是两者抑制破骨细胞能力强弱则尚未有报道,研究发现浓度为 10<sup>-5</sup> g/L 的 rhRANK 或 rhOPG-Fc 均能显著性抑制破骨细胞数量及其功能<sup>[6,9]</sup>,因此为对比这两者的抑制能力,本实验选择 10<sup>-5</sup> g/L 浓度作为比较标准,因为破骨细胞来源于单核巨噬细胞系<sup>[13]</sup>,因此本实验研究利用 RAW264.7 细胞系作为破骨前体细胞系。

本实验发现,在破骨细胞混合培养体系中加入 10<sup>-5</sup> g/L 的 rhRANK 或 rhOPG-Fc 后,TRAP 染色阳性多核细胞计数显示与对照组相比,实验组 TARP

染色阳性细胞个数明显减少,且 rhRANK 组较 rhOPG-Fc 组细胞个数减少更明显。据此认为 rhRANK 和 rhOPG-Fc 均能抑制破骨前体细胞分化融合为破骨细胞,且 rhRANK 的抑制效应较 rhOPG-Fc 更为明显。有研究表明 RANK 与 RANKL 的结合力约为 OPG 与 RANKL 结合力的 200 倍左右<sup>[10,14]</sup>,本实验结果与此相符。

此外,为对比 rhRANK 和 rhOPG-Fc 对破骨细胞骨吸收的抑制能力,本实验还将破骨细胞混合培养体系置于预先准备好的 6 孔骨磨片上,实验组加入  $10^{-5}$  g/L 的 rhRANK 或 rhOPG-Fc,培养 9 d 后统计骨磨片吸收陷窝计数,与对照组相比,各实验组骨磨片吸收陷窝计数明显减少,且 rhRANK 组较 rhOPG-Fc 组减少更为明显。因此认为 rhRANK 和 rhOPG-Fc 不但能有效抑制破骨前体细胞分化,而且能有效抑制破骨细胞的骨吸收能力,并且 rhRANK 较 rhOPG-Fc 的抑制能力更强。

综上,本研究表明,同等浓度的 rhRANK 和 rhOPG-Fc 均有效抑制了破骨前体细胞的分化以及骨吸收作用,而且在  $10^{-5}$  g/L 水平, rhRANK 的抑制能力较 rhOPG-Fc 更强。然而,本研究结果是基于同等质量浓度下,二者破骨细胞抑制性能的比较;鉴于二者分子量的不同,因此在进一步研究中,需要对二者同等分子数量等级下破骨细胞抑制活性的观察;而且,尚缺乏两种重组蛋白在动物体内实验的对比观察。

#### 参考文献

- [1] Nakashima T, Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1240: 13-18.
- [2] 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.
- [3] Li J, Sarosi I, Yan XQ, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, 97(4): 1566-1571
- [4] 杨治,朱养均,程延,等. 体外负压培养对骨髓间充质干细胞成骨活性的影响[J]. *中国骨伤*, 2011, 24(12): 1024-1027.  
Yang Z, Zhu YJ, Cheng Y, et al. Effects of negative pressure on osteogenesis in human bone marrow-derived stroma cells cultured in vitro[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2011, 24(12): 1024-1027. Chinese with abstract in English.
- [5] Cheng X, Kinoshita M, Takami M, et al. Disabling of receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) receptor complex by novel osteoprotegerin-like peptidomimetics restores bone loss in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 8269-8277.
- [6] Huang P, Wang Y, Chi Z, et al. In vitro study of combination rhOPG-Fc and alendronate on inhibiting osteoclast[J]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2005, 43(12): 812-816.
- [7] Wang BL, Liang H, Zheng F, et al. Recombinant soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB inhibits parathyroid hormone-induced osteoclastogenesis in vitro[J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2007, 59(2): 169-174.
- [8] 刘继中,陈苏民,李毅,等. 人骨保护素在毕赤酵母中的分泌表达及表达产物的生物活性分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19: 566-571.  
Liu JZ, Chen SM, Li Yi, et al. Secretory expression of human osteoprotegerin in pichia pastoris and bioactivity analysis of the recombinant protein[J]. *Zhongguo Sheng Wu Hua Xue Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Bao*, 2003, 19(5): 566-571. Chinese.
- [9] Tang P, Zhang L, Xu M, et al. Inhibition of the osteoclast activity with the application of recombinant murine RANK protein[J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2010, 38(4): 169-177.
- [10] Vitovski S, Phillips JS, Sayers J, et al. Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-kB or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways[J]. *J Biological Chem*, 2007, 282, 31601-31609.
- [11] 张忠荣,王爱民,王晓军,等. 人骨保护素重组腺病毒抑制去势骨质疏松大鼠骨吸收作用的研究[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(36): 8267-8269.  
Zhang ZR, Wang AM, Wang XJ, et al. Effect of recombinant adenovirus vector carrying human osteoprotegerin gene in inhibiting bone resorption in ovariectomized rat model of osteoporosis[J]. *Zhongguo Lin Chuang Kang Fu*, 2004, 8(36): 8267-8269. Chinese.
- [12] Kim H, Choi HK, Shin JH, et al. Selective inhibition of RANK blocks osteoclast maturation and function and prevents bone loss in mice[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(4): 813-825.
- [13] 俞索静,肖鲁伟,吴承亮,等. 破骨细胞血系起源的活细胞成像观察[J]. *中国骨伤*, 2012, 25(4): 317-323.  
Yu SJ, Xiao LW, Wu CL, et al. Imaging observation of live cells originating from osteoclasts of the blood system[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2012, 25(4): 317-323. Chinese with abstract in English.
- [14] Zhang S, Liu C, Huang P, et al. The affinity of human RANK binding to its ligand RANKL[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 487: 49-53.
- [15] 杨旭,杨庆铭,邓廉夫. 重组人骨保护素对体外培养兔破骨细胞的影响[J]. *中华骨科杂志*, 2003, 23(6): 365-368.  
Yang X, Yang QM, Deng LF, et al. Effects of recombinant human osteoprotegerin on rabbit osteoclasts in vitro[J]. *Zhonghua Gu Ke Za Zhi*, 2003, 23(6): 365-368. Chinese.

(收稿日期:2012-06-20 本文编辑:王玉蔓)