

· 论 著 ·

APE1/Ref-1 在外周血单核细胞破骨样分化中的作用研究*

杜 佳, 谢家印[△], 张 亮, 周立为, 杨宇馨, 王 东

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(APE1)在核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)及巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)诱导外周血单个核细胞(PBMCs)破骨样分化过程中的作用。方法 采用密度梯度法分离提取人 PBMCs;将构建的 APE1 siRNA 表达载体导入分离获得的单个核细胞中。抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色检测是否为破骨样细胞(OCL),蛋白免疫印记法(Western blot)检测单个核细胞 APE1 蛋白表达,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 OCL 中组织蛋白酶 K(cathepsin K,CK)及 V-ATPase 基因表达水平。结果 APE1 siRNA 明显降低 PBMCs APE1 蛋白表达,与未感染 APE1 siRNA 细胞相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);在 RANKL/M-CSF 作用下单个核细胞可分化为 TRAP 阳性的 OCL,CK 及 V-ATPase 的表达在基因水平升高;但经 APE1 siRNA 处理后,诱导分化的 OCL 数量减少,CK 和 V-ATPase 的表达在基因水平降低。结论 PBMCs 经 RANKL/M-CSF 诱导培养后可产生大量 OCL,APE1 siRNA 能明显抑制单个核细胞的破骨样分化,APE1 参与调节单个核细胞破骨样分化过程。

关键词:单核细胞;细胞分化;破骨细胞;脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.34.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)34-4112-03

Effect of APE1/Ref-1 on differentiation of peripheral blood mononuclear cells into osteoclast-like cells*

Du Jia, Xie Jiayin[△], Zhang Liang, Zhou Liwei, Yang Yuxin, Wang Dong

(Cancer center, Institute of Surgery, Daping Hospital Affiliated to Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of APE1 on differentiation of peripheral blood mononuclear cells into osteoclast-like cells(OCL) which induced by macrophage colony stimulating factor (RANKL) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF). **Methods** Human peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) were collected by density gradient separation; Constructed APE1 siRNA expression vector Ad5v-APE1 siRNA was used to transfect PBMCs. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) method was conducted to identify the cells, the expression level of APE1 was detected by Western blot, the mRNA expression levels of Cathepsin K(CK) and V-ATPase were detected by RT-PCR. **Results** PBMCs transfected with APE1 siRNA had significantly lower protein expression of APE1 than untransfected cells ($P < 0.05$); PBMCs could differentiate into OCL under the stimulation of RANKL and M-CSF, the mRNA expression levels of CK and V-ATPase increased; After APE1 siRNA treatment, the number of OCL was reduced and the levels of CK and V-ATPase mRNA decreased. **Conclusion** PBMCs can differentiate into a large number of OCL induced by RANKL and M-CSF, APE1 siRNA significantly inhibited differentiation of PBMCs into osteoclast-like cells, APE1 may be involved in the regulation of osteoclast-like differentiation process.

Key words: mononuclear cells; osteoclast cells; cell differentiation; apurinic/aprimidinic endonuclease/redox-factor1

骨髓瘤骨病是多发性骨髓瘤的重要病理改变,其溶骨性骨质破坏严重影响患者的生活质量及预后。破骨细胞(osteoclast, OC)是参与骨吸收功能的唯一效应细胞,其分化及功能异常会导致多种骨代谢疾病^[1-2]。已有研究表明,体外联合应用核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)可诱导混合/富集的造血细胞系向 OC 分化^[3-4]。脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子(apurinic/aprimidinic endonuclease/redox-factor1, APE1/Ref-1)是一种独特的氧化还原、DNA 损伤修复双功能蛋白,通过氧化还原调控多种转录因子的表达和激活,从而调控细胞因子分泌及细胞分化、增殖、凋亡等^[4-6]。APE1 是否参与单个核细胞的破骨样分化过程,目前国内外少见报道。本实验应用 APE1 siRNA 抑制多发性骨髓瘤患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中 APE1

蛋白表达,利用外源性 OC 活化因子 RANKL 及 M-CSF 诱导单个核细胞破骨样分化,观察破骨样细胞(osteoclast-like cell, OCL)生成,为以 APE1 为分子靶点治疗骨髓瘤骨病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 α -MEM 培养基购自 HyClone, RANKL 购自 Peprotech 公司, M-CSF 购自 eBioscience 公司, 单个核细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司, pSilencerU6-control、APE1 siRNA 由本室自行构建^[5]; 鼠抗人 APE1 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自 Promega 公司(PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成)。抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)试剂盒购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 外周血来源 采集初诊多发性骨髓瘤患者外周血 13

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172258)。 作者简介:杜佳(1984~), 硕士, 职称医师, 主要从事骨髓瘤骨病方面的研究。

[△] 通讯作者, Tel: (023)68757157; E-mail: xiejia505@sina.com。

mL,其中 3 mL 标本用于血常规检查,白细胞计数均在正常范围。

1.2.2 人 PBMCs 的分离及培养 抽取外周血 10 mL 置于无菌肝素抗凝管,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)等量稀释,将稀释外周血与单个核细胞分离液按等比体积加入离心管后离心,洗涤 2 次, α -MEM 培养液重悬细胞,以 1×10^6 /L 细胞密度接种于培养瓶中,加入 M-CSF(终浓度为 10 ng/mL),置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度孵箱内培养 48 h 后,弃除上清液,0.1%胰酶消化,收集单个核细胞。

1.2.3 APE1 siRNA 感染 PBMCs 实验分为 APE1 siRNA 感染组和 APE1 siRNA 未感染组。APE1 siRNA 感染组:将分离获得的单个核细胞接种于 60 mm² 培养皿中,待细胞融合 50% 后,加入 Ad5v-APE1 siRNA 感染 PBMCs。本研究前期研究中已筛选出抑制率 APE1 表达超过 90% 的 APE1 特异 siRNA^[7],腺病毒表达载体 Ad5v-APE1 siRNA 由本室向德兵博士构建,其滴度为 1.6×10^{10} IU/mL。通过预实验后确定以 50 复感染指数(multiplicity of infection,MOI)有效工作浓度感染 PBMCs 48 h。

1.2.4 Western Blot 检测 APE1 siRNA 对单个核细胞 APE1 蛋白水平的影响 分组同 1.2.3,收集经 APE1 siRNA 感染 48 h 的 PBMCs,Bradford 法测定蛋白水平,15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)电泳,转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride,PVDF)膜,5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h 后以特异性抗体(用 TBST 以 1 : 8 000 比例稀释鼠抗人 APE1 单克隆抗体)4 °C 孵育过夜后加入 1 : 10 000 辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠抗体。洗膜后加入显色液,常规方法显色、定影。Quantity One 4.4.0 软件分析,以目的蛋白条带灰度值/ β -actin 蛋白条带灰度值表示相对蛋白水平,实验重复 3 次。

1.2.5 单个核细胞诱导培养 实验分组:PBMCs 未处理(A 组)、PBMCs + 50 ng/mL RANKL + 30 ng/mL M-CSF(B 组)、PBMCs APE1 siRNA + 50 ng/mL RANKL + 30 ng/mL M-CSF(C 组)。收集 PBMCs 及转染 48 h 的 PBMCs APE1 siRNA,用含 50 ng/mL RANKL 及 30 ng/mL M-CSF 的 α -MEM 培养液重悬细胞,以 7×10^5 /孔接种于 6 孔板内,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度孵箱内培养,隔 2 d 换 1 次液。

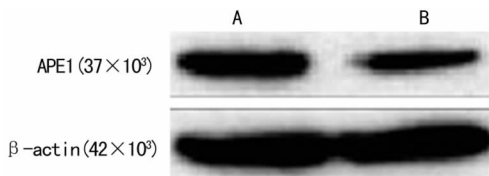
1.2.6 TRAP 染色法 分组同 1.2.5,细胞培养至 12 d 时,按照 TRAP 染色试剂盒说明书进行染色,光学显微镜下观察,对每张玻片 6 个随机视野中的 TRAP 染色阳性细胞的 OCL(细胞核大于或等于 3 个,细胞质内出现棕褐色颗粒)进行计数。

1.2.7 RT-PCR 检测 OCL 中 CK、V-ATPase mRNA 水平 实验分为 PBMCs + 50 ng/mL RANKL + 30 ng/mL M-CSF 组和 PBMCs APE1 siRNA + 50 ng/mL RANKL + 30 ng/mL M-CSF 组。细胞培养 12 d,采用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA。按照反转录试剂盒说明书取 1 μ g 总 RNA 行反转录反应及 PCR。CK 上游引物 5'-CTC AAG GTT CTG CTG CTA-3',下游引物 5'-GAC AGG AGT AAC ATA TCC-3',扩增产物 381 bp;V-ATPase 上游引物 5'-AAG GGA TGA CCA GGA AGG AT-3',下游引物 5'-AAC ATA GCA CTG AGG ACC CA-3',扩增产物 410 bp; β -actin 上游引物 5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC-3',下游引物 5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC-3',扩增产物 520 bp。PCR 反应条件:95 °C 预变性 3 min,95 °C 30 s,退火温度(β -actin:54.4 °C,CK:50.5 °C,V-ATPase:60.3 °C)30 s,72 °C 60 s,共 34 个循环,72 °C 充分延伸 10 min。取扩增产物行琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad 图像分析系统照相,Quantity One 4.4.0 软件分析各扩增条带产物含量,以目的条带灰度值/ β -actin 条带灰度值表示产物相对含量,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本均数的 *t* 检验进行比较,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

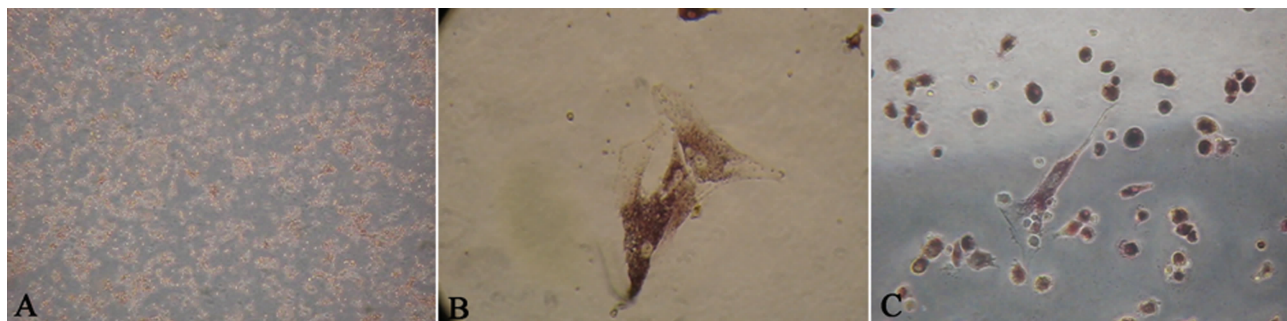
2.1 人 PBMCs 中 APE1 蛋白表达 Western blot 结果显示,APE1 siRNA 感染 PBMCs 48 h 后,感染组细胞中 APE1 蛋白相对表达量(0.25 \pm 0.05)明显降低,与 APE1 siRNA 未感染组(0.38 \pm 0.03)比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 1。



A: APE1 siRNA 未感染组; B: APE1 siRNA 感染组。

图 1 Western blot 检测单个核细胞 APE1 蛋白水平

2.2 TRAP 染色鉴定 OCL 多发性骨髓瘤患者外周血 PBMCs 呈类圆形或不规则形状,在 RANKL 及 M-CSF 联合诱导下,12 d 时会出现较多 TRAP 染色阳性的 OCL。OCL 形态呈圆形、梭形或不规则性,细胞体积较大,周边可见伪足伸展,细胞质中可见许多红色阳性颗粒,表明人外周血单个核细胞经外源性 RANKL 及 M-CSF 联合诱导下可分化为破骨样细胞,此培养体系建立成功,见图 2。



A: A 组($\times 40$); B: B 组($\times 200$); C: C 组($\times 100$)。

图 2 OCL TRAP 染色鉴定图

2.3 APE1 siRNA 对 OCL 生存数量的影响 在患者 PBMCs 向 OCL 分化的过程中,经 APE1 siRNA 处理后在光学显微镜

($\times 200$)下每个视野中 OCL 数量为(104 ± 16),是 APE1 siRNA 未处理组(277 ± 21)的 38%,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 RT-PCR 检测 OCL 中 CK、V-ATPase 基因水平变化
外周血 PBMCs 经 RANKL 及 M-CSF 联合诱导后,OCL 标志酶 CK 和 V-ATPase mRNA 表达水平增高,分别为(0.31 ± 0.02)、(0.52 ± 0.03)。但在经 APE1 siRNA 处理后分化的 OCL 中,CK 和 V-ATPase mRNA 表达水平降低,分别为(0.20 ± 0.01)、(0.30 ± 0.03),与未处理 PBMCs 细胞相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

多发性骨髓瘤是血液系统常见的恶性肿瘤,其病程中约 80% 患者并发骨髓瘤骨病,而溶骨性骨质破坏是骨髓瘤性骨病最严重的临床表现^[8]。OC 来源于单核/巨噬细胞系的造血前体细胞,由这些单核细胞经分化融合而成^[9],其前体细胞位于骨髓、脾及外周血内。OCL 指在实验中原代培养或诱导生成的具有 OC 性质的细胞,二者在生物学上仍属于同一种细胞。OC/OCL 的分化和活化受多种细胞因子的调节,其中 RANKL 和 M-CSF 是对 OC 分化起关键调控作用的两种细胞因子^[10]。Matsuzaki 等^[11]报道 RANKL 可诱导人 PBMCs 生成 OCL,为培养人 OCL 提供了新思路。霍晓聪等^[12]发现:RANKL 和 M-CSF 可协同诱导类风湿关节炎患者 PBMCs 转分化为 OCL。TRAP 活性已作为 OC 鉴定的可靠指标而被广泛应用^[13]。本实验以多发性骨髓瘤患者 PBMCs 为实验对象,采用 RANKL 和 M-CSF 诱导培养 12 d 时会出现较多 TRAP 染色阳性的 OCL。由此表明,本实验采用外源性 RANKL 及 M-CSF 联合诱导人 PBMCs 向 OCL 分化培养体系建立成功。

正常 OC 的分化发育主要通过 RANKL 及 M-CSF 经典分化途径和其他非经典分化途径,其中转录因子核因子- κ B(NF- κ B)和转录激活蛋白(AP-1)是正常 OC 分化成熟过程中 RANKL/RANK 和 M-CSF/c-Fms 信号途径的共同效应分子^[14]。APE1 是一种体内广泛分布的多功能蛋白,在氧化应激、细胞凋亡等多个生物过程中发挥重要作用。Flaherty 等^[15]研究发现人 PBMCs 表达 APE1,并证实了 APE1 是通过与细胞 AP-1 结合改变了 Fos 和 Jun 蛋白的氧化还原状态,从而调节了单个核细胞向肺泡巨噬细胞的分化。本研究采用 RNA 干扰技术发现,APE1 siRNA 感染 PBMCs 48 h 后,细胞中 APE1 蛋白表达明显降低。此外,与 APE1 siRNA 未处理组相比,APE1 siRNA 处理组中 OCL 的生成数量明显减少,OCL 标志酶 CK 和 V-ATPase mRNA 表达水平均下降。由此提示:APE1 siRNA 能明显抑制单个核细胞的破骨样分化,APE1 参与调节单个核细胞破骨样分化过程。本研究不仅成功建立了体外 OCL 培养体系,而且进一步揭示了双功能蛋白 APE1 参与调节 PBMCs 破骨样分化过程。基于目前实验结果,本研究将进一步以 APE1 为研究对象,揭示 APE1 在调控 OCL 分化过程中的下游分子机制,为以 APE1 为分子靶点治疗骨髓瘤骨病提供实验依据。

参考文献:

[1] Giuliani N, Ferretti M, Bolzoni M, et al. Increased osteocyte death in multiple myeloma patients; role in myeloma-induced osteoclast formation[J]. *Leukemia*, 2012, 26(6): 1391-1401.

[2] Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current

knowledge and future perspectives[J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2008, 8(3): 204-216.

- [3] Yu SJ, Xiao LW, Wu CL, et al. Imaging observation of live cells originating from osteoclasts of the blood system[J]. *Zhongguo Gu Shang*, 2012, 25(4): 317-323.
- [4] Atkins GJ, Kostakis P, Vincent C, et al. RANK Expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone[J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(9): 1339-1349.
- [5] Kim WC, Berquist BR, Chohan M, et al. Characterization of the endoribonuclease active of human apurinic/aprimidic endonuclease[J]. *J Mol Biol*, 2011, 411(5): 960-971.
- [6] Tell G, Quadrioglio F, Tiribelli C, et al. The many functions of APE1/Ref-1; not only a DNA repair enzyme[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(3): 601-620.
- [7] Yang ZZ, Chen XH, Wang D. Experimental study enhancing the chemosensitivity of multiple myeloma to melphalan by using a tissue-specific APE1-silencing RNA expression vector[J]. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2007, 7(4): 296-304.
- [8] Oranger A, Carbone C, Izzo M, et al. Cellular mechanisms of multiple myeloma bone disease[J]. *Clin Dev Immunol*, 2013(2013): 289458.
- [9] Hemingway F, Cheng X, Knowles H J, et al. In vitro generation of mature human osteoclasts[J]. *Calcif Tissue Int*, 2011, 89(5): 389-395.
- [10] Zhou P, Hu J, Meng X. Protein-protein interaction network of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and macrophage colony-stimulating factor induced differentiation of osteoclasts[J]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2012, 30(5): 518-521.
- [11] Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, et al. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 246(1): 199-204.
- [12] 霍晓聪, 张浩, 季迎, 等. 类风湿关节炎患者外周血单核细胞诱导转分化为破骨样细胞[J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(7): 1063-1066, 1072.
- [13] Li H, Zhai Z, Liu G, et al. Sanguinarine inhibits osteoclast formation and bone resorption via suppressing RANKL-induced activation of NF-kappaB and ERK signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(3): 951-956.
- [14] Li C, Yang Z, Li Z, et al. Maslinic acid suppresses osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss by regulating RANKL-mediated NF-kappaB and MAPK signaling pathways[J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(3): 644-656.
- [15] Flaherty DM, Monick MM, Carter AB, et al. GM-CSF increases AP-1 DNA binding and Ref-1 amounts in human alveolar macrophages[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25(2): 254-259.