

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.10.004

唑来膦酸对破骨细胞分化中 CaMK II δ 及下游基因表达的影响*王 会¹, 刘娟娟¹, 戚孟春^{1 Δ} , 董 伟¹, 李 任¹, 孙 红²

(华北理工大学:1. 口腔医学院口腔颌面外科教研室;2. 基础医学院病理学教研室, 河北唐山 063000)

[摘要] **目的** 研究唑来膦酸(ZOL)对破骨细胞分化中钙调蛋白依赖性激酶 II δ (CaMK II δ)以及下游信号基因表达的影响。**方法** 将小鼠破骨前体细胞 RAW264.7 细胞分为对照组和 ZOL 组;两组细胞均用 50 $\mu\text{g/L}$ 核因子 κB 受体激活蛋白配体(RANKL)诱导与第 5 天收获,ZOL 组同时加用 1×10^{-6} mol/L ZOL 处理 2 d。5 d 后收获细胞,检测破骨细胞生成及 CaMK II δ 、活化 T 细胞核因子蛋白 c1(NFATc1)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)及 c-Src 基因表达情况。**结果** ZOL 组 TRAP+多核破骨细胞数目、牙本质吸收陷窝数目和面积分别是 (20.0 ± 3.2) 、 (18.0 ± 4.2) 和 $(6\ 335.3 \pm 1\ 043.2) \mu\text{m}^2$,显著低于对照组的 (36.0 ± 8.4) 、 (37.2 ± 5.0) 和 $(11\ 636.2 \pm 3\ 661.1) \mu\text{m}^2$ ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),分别下降了 44.4%、51.6% 和 45.6%。ZOL 处理还使破骨细胞分化中 CaMK II δ 及下游因子 NFATc1、TRAP 和 c-Src 基因表达产生显著抑制,mRNA 水平分别下降了 44.1%、49.0%、53.8% 和 49.6% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),蛋白水平分别下降了 43.5%、32.2%、45.5% 和 48.0% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。免疫荧光化学检测显示 ZOL 组 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP 和 c-Src 的荧光强度较对照组也明显减弱。**结论** ZOL 可显著抑制破骨细胞生成和骨吸收功能,并下调破骨细胞分化中 CaMK II δ 及下游 NFATc1、TRAP 和 c-Src 基因表达。

[关键词] 破骨细胞;唑来膦酸;钙调蛋白依赖性激酶 II δ ;活化 T 细胞核因子 c1;抗酒石酸酸性磷酸酶;c-Src

[中图分类号] R782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)10-1308-04

Effects of zoledronate on CaMK II δ and down-stream gene expressions during osteoclast differentiation*Wang Hui¹, Liu Juanjuan¹, Qi Mengchun^{1 Δ} , Dong Wei¹, Li Ren¹, Sun Hong²

(1. Teaching and Researching Section of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology;
2. Teaching and Researching Section of Pathology, College of Basic Medicine, North-China University
of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of zoledronate (ZOL) on Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II δ (CaMK II δ) and down-stream gene expressions during osteoclast differentiation. **Methods** Mouse osteoclast precursors RAW264.7 cells were divided into the control group and ZOL group. The cells in both groups were induced with 50 $\mu\text{g/L}$ receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and were harvested on 5 d, while the cells in ZOL group were also simultaneously treated with 1×10^{-6} mol/L ZOL for 2 d. Five days later, the cells were harvested and examined osteoclastogenesis, as well as gene expressions of CaMK II δ , nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and cell-sarcoma receptor coactivator (c-Src). **Results** The number of TRAP positive multinuclear osteoclasts, number and size of dentin absorption lacunae and area in the ZOL group were (20.0 ± 3.2) , (18.0 ± 4.2) and $(6\ 335.3 \pm 1\ 043.2) \mu\text{m}^2$ respectively, which were significantly lower than (36.0 ± 8.4) , (37.2 ± 5.0) and $(11\ 636.2 \pm 3\ 661.1) \mu\text{m}^2$ in the control group and decreased by 44.4%, 51.6% and 45.6% respectively ($P < 0.01$). ZOL also significantly inhibited the gene expressions of CaMK II δ , NFATc1, TRAP and c-Src, and the mRNA levels of these genes were decreased by 44.1%, 49.0%, 53.8% and 49.6% respectively, the protein level were decreased by 43.5%, 32.2%, 45.5% and 48.0% respectively. The immunofluorescent cytochemistry detection results showed the fluorescence intensity of CaMK II δ , NFATc1, TRAP and c-Src in the ZOL group was significantly weakened when compared with the control group. **Conclusion** ZOL could significantly inhibit the osteoclast formation and bone absorption function, and down-regulates gene expressions of CaMK II δ , NFATc1, TRAP and c-Src in osteoclast differentiation.

[Key words] osteoclasts; zoledronic acid; Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II δ ; nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1; tartrate-resistant acid phosphatase; c-Src

唑来膦酸(zoledronate, ZOL)能够显著抑制破骨细胞的生成及骨吸收功能,因而广泛应用于骨过度吸收性疾病^[1];但其作用机制尚未弄清。钙调蛋白(calmodulin)-活化 T 细胞核因子 c1(nuclear factor of activated T cells type c1, NFATc1)信号通路对破骨细胞的分化至关重要;而钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)是其中的关键信号分子^[2-4]。CaMK II 有 α 、 β 、 γ 、 δ 4 个异构体^[5];

国外学者研究显示,异构体 δ 对破骨细胞分化的调控作用可能最为关键^[6-7],但其是否参与 ZOL 诱发的破骨细胞抑制目前尚不清楚。本实验通过检测 ZOL 对 CaMK II δ 及其下游基因表达的影响,探讨 CaMK II δ 在 ZOL 诱发的破骨细胞抑制中的作用,为唑来膦酸治疗骨过度吸收性疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞株来自北京

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270965);河北省教育厅重点项目(ZD2015005)。 作者简介:王会(1983-),硕士,主要从事唑来膦酸对破骨细胞分化中作用机制的研究。 Δ 通信作者, E-mail: qimengchun@163.com。

表 1 Real-time PCR 使用基因引物

GeneBank	基因	序列	产物长度
NM_001025438	CaMK II δ	上游:5'-CAG TGG AGC TGT CTG TCG TT-3' 下游:5'-GCA GAC TAC CAC GCA ACT CA-3'	409 kb
NM_001164112.1	NFATc1	上游:5'-CTC ACC ACA GGG CTC ACT ATG-3' 下游:5'-TTC TTC CTC CCG ATG TCC GT -3'	364 kb
NM_006509946.1	TRAP	上游:5'- AGA TTT GTG GCT GTG GGC GA-3' 下游:5'-AAG TCA GCG CCC ATC GTC TG-3'	116 bp
NM_006499067.2	c-Src	上游:5'-ACT GTC ACC TCC CCA CAA AG-3' 下游:5'-GAC ATT CCA CCT TCC TCG TGT -3'	154 bp
NM_007393.3	β -actin	上游:5'-GTT GGA GCA AAC ATC CCC CA-3' 下游:5'-CGC GAC CAT CCT CCT CTT AG-3'	186 bp

军事医学科学院;核因子- κ B 受体激活因子配体(RANKL)购自美国 Biovision 公司;DMEM 培养基、唑来膦酸、胎牛血清购自中国四季青公司;兔抗鼠 CaMK II δ 多克隆抗体、 β -actin 单克隆抗、抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)单克隆抗体、NFATc1 单克隆抗体、c-Src 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;TRAP 染色试剂盒、异硫氰酸荧光素(FITC)、碘化丙啶(PI)购自美国 Sigma 公司;PCR 引物购自上海生工;激光聚焦显微镜(LSCM)购自日本 Olympus 公司);Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪购自美国 gene company limited。

1.2 方法 RAW264.7 细胞分为对照组和 ZOL 组。两组细胞均用含 50 μ g/L RANKL 的 DMEM 培养基培养 5 d,使细胞向破骨细胞分化;ZOL 组在 RANKL 诱导 1 d 后,加用 1×10^{-6} mol/L ZOL 处理 2 d^[8],继续培养。

1.2.1 破骨细胞生成及功能检测 (1)TRAP 染色:细胞以 5×10^3 /cm² 密度种在载玻片上制备细胞爬片。收获细胞后,按 TRAP 试剂盒说明进行染色,光镜 200 倍下选取 6 个视野,计数 TRAP+多核细胞数目(细胞核大于或等于 3 个),取平均值;每组检测 3 个细胞爬片^[8]。(2)牙本质吸收陷窝检测:用新鲜拔除的下颌阻生智齿制备厚约 0.2 mm 的牙本质磨片,超声震荡,高温高压灭菌;细胞接种密度为 5×10^3 个/cm²。细胞收获后扫描电镜(Scanning Electron Microscope,SEM)观察,500 倍下每个磨片上选取 6 个视野,测量吸收陷窝总数目及总面积,取平均值,作为该磨片的吸收陷窝数目及面积;每组检测 3 个牙本质磨片^[8]。

1.2.2 CaMK II δ 及其下游因子 NFATc1、TRAP、c-Src 基因表达检测

1.2.2.1 免疫荧光细胞化学检测 以 5×10^3 个/cm² 密度接种在激光共聚焦皿里。5 d 后收获细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,4%多聚甲醛固定 30 min,0.4%的 TritonX-100 PBS 室温孵育 25 min,单克隆抗体一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,FITC 标记为二抗,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 90 min,PI 复染胞核,甘油封片,激光共聚焦显微镜(LSCM)观察,每个共聚焦小皿随机检测 6 个视野,实验重复 3 次。

1.2.2.2 Real-time PCR 检测 Trizol 法提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA;在 Rotor-Gene3000 荧光定量 PCR 仪上检测;引物见表 1。反应条件为:95 $^{\circ}$ C,30 s;95 $^{\circ}$ C 15 s,56 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,45 个循环。计算目的基因 mRNA 相对表达量;每个因子设 3 个复孔。

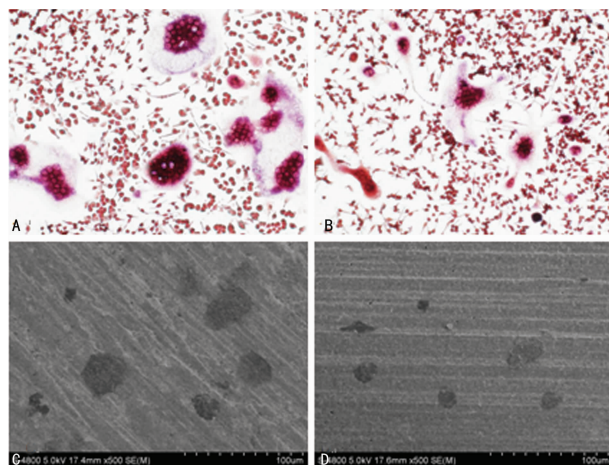
1.2.2.3 Western blot 检测 加蛋白酶抑制剂(RIPA)提取细

胞总蛋白,Bradford 法测蛋白浓度;加入 $1 \times$ buffer 后,煮沸 5 min 变性;蛋白上样,凝胶电泳,转膜;室温封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 35 min,ECL 显色仪上显色。用 ImageLab 分析软件检测膜上条带光密度值;实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 软件对数据进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ZOL 对破骨细胞的生成和骨吸收功能影响 RANKL 诱导 5 d 后,两组均出现 TRAP+多核破骨细胞(细胞质红染),见图 1;与对照组比较,ZOL 组多核破骨细胞显著减少,破骨细胞下降了 44.4% ($P < 0.05$),见表 2。扫描电镜(SEM)观察,两组牙本质磨片上均出现不同程度的吸收陷窝;ZOL 组吸收陷窝的数目和面积均显著少于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 2,分别下降了 51.6% 和 45.6%。ZOL 可显著抑制破骨细胞的骨吸收功能。



A: 对照组 TRAP 染色; B: ZOL 组 TRAP 染色; C: 对照组牙本质吸收陷窝检测; D: ZOL 组牙本质吸收陷窝检测。

图 1 破骨细胞生成与功能

2.2 免疫荧光细胞化学检测 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src 表达 经检测,CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src 在两组细胞中均有表达;但在对照组中荧光较强;而在 ZOL 组中则表达明显较弱(图 2, FITC 标记靶蛋白,PI 标记细胞核)。ZOL 对破骨细胞分化中 CaMK II δ 以及下游因子 NFATc1、TRAP、c-Src 蛋白表达均产生了显著的抑制作用。

2.3 Real-time PCR 检测 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src mRNA 水平 经 Real-time PCR 分析, CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src 在两组中都有表达, 但 ZOL 组 mRNA 水平明显下降。ZOL 组 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src mRNA 水平分别为 0.595 ± 0.007 、 0.503 ± 0.014 、 0.474 ± 0.006 和 0.494 ± 0.016 , 显著低于对照组的 1.065 ± 0.066 、 0.986 ± 0.013 、 1.026 ± 0.070 和 0.981 ± 0.016 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 较对照组分别下降了 44.1%、49.0%、53.8% 和 49.6%。唑来膦酸显著下调了破骨细胞分化中 CaMK II δ 及下游 NFATc1、TRAP、c-Src mRNA 水平。

表 2 破骨细胞计数及牙本质磨片吸收陷窝定量分析 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	破骨细胞数 (个)	吸收陷窝计数 (个)	吸收陷窝面积 (μm^2)
对照组	36.0 ± 8.4	37.2 ± 5.0	$11\ 636.2 \pm 3\ 661.1$
ZOL 组	20.0 ± 3.2^a	18.0 ± 4.2^a	$6\ 335.3 \pm 1\ 043.2^b$
<i>t</i>	6.0	5.8	40.0

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

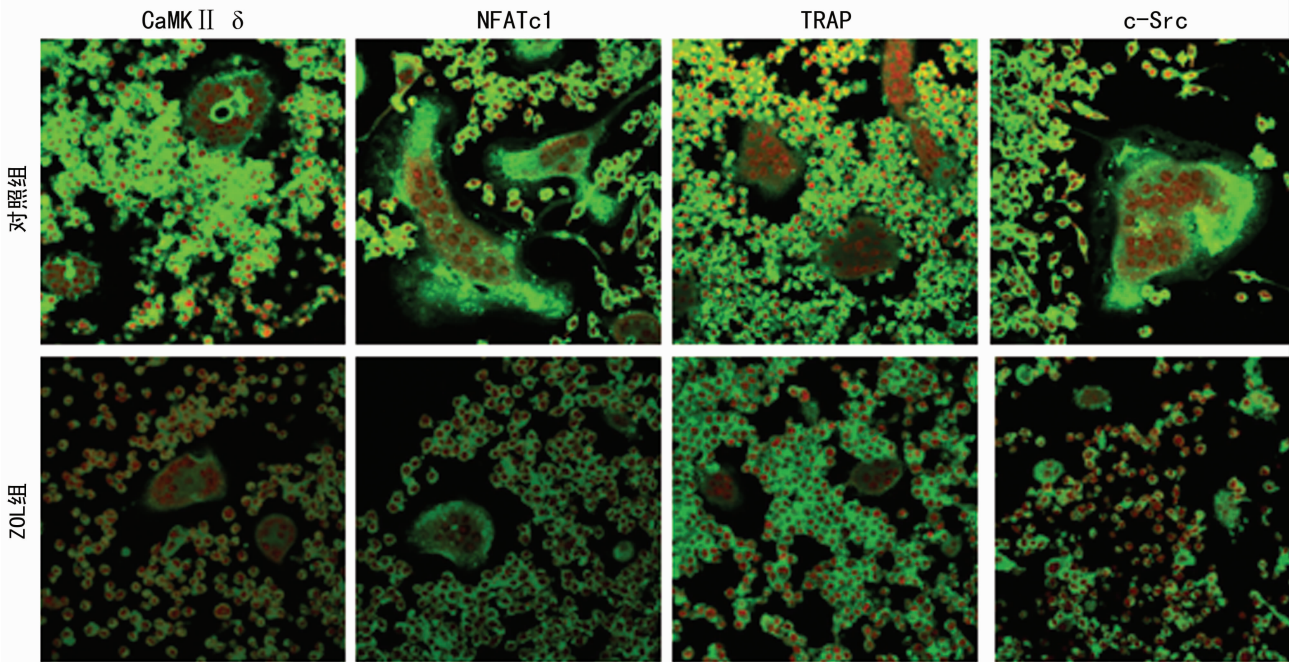


图 2 免疫荧光细胞化学检测 CaMK II δ 及其下游基因在两组破骨细胞中表达 (LSCM $\times 400$)

表 3 两组细胞 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src 蛋白水平定量分析 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	CaMK II δ	NFATc1	TRAP	c-Src
对照组	205.104 ± 13.006	243.283 ± 10.200	169.350 ± 12.089	223.276 ± 11.830
ZOL 组	115.921 ± 5.891	164.849 ± 11.825	92.322 ± 8.307	116.040 ± 11.655
<i>t</i>	10.818	8.699	9.096	11.183
<i>P</i>	< 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01

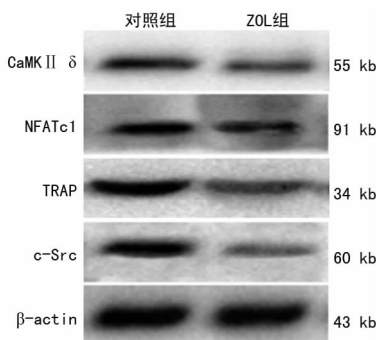


图 3 Western blot 检测两组中 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src 蛋白表达

2.4 Western blot 检测 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src 蛋

白表达 经 Western-blot 检测, ZOL 组中 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src 的蛋白表达量较对照组明显减弱(图 3); 定量数据分析显示(表 3), ZOL 组中 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP 和 c-Src 蛋白条带光密度值较对照组分别下降了 43.5%、32.2%、45.5% 和 48.0% ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。上述结果说明, ZOL 能够显著降低 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src 蛋白表达, 从而对破骨细胞的生成产生抑制作用。

3 讨 论

临床上牙周炎、骨肿瘤、种植体周围炎等疾病造成的骨过度吸收均与破骨细胞数目及活性异常有关^[9]; ZOL 作为临床上治疗骨过度吸收性疾病的常用药物, 主要通过抑制破骨细胞分化及骨吸收功能发挥作用^[1]。在本研究中, 应用 1×10^{-6} mol/L ZOL 处理 RANKL 诱导下的 RAW264.7 细胞 48 h, 发现 TRAP+ 多核破骨细胞生成及骨吸收功能受到显著抑制, 破

骨细胞数及牙本质吸收陷窝显著少于未经处理的对照组;从而进一步证实了 ZOL 对破骨细胞的抑制功能。需要指出的是, ZOL 加入的时间为 RANKL 诱导第 2~3 天, 此时正是单核破骨细胞向多核破骨细胞融合, 即细胞多核化阶段; 因而上述结果证实, ZOL 可在破骨细胞分化中期, 即破骨细胞多核化阶段发挥对破骨细胞的抑制作用, 从而影响破骨细胞的生成及后期的骨吸收功能。破骨细胞分化相关信号通路研究近年来取得了许多进展, 其中 NFATc1 信号通路的发现被认为是一个重要突破^[2-4]。在该信号通路中, CaMKs 是 Calmodulin 下游 Ca^{2+} 信号传递的重要分子; 在 CaMKs 中, CaMK II 和 CaMK IV 在破骨细胞分化中的作用尤为重要。CaMK IV 对破骨细胞分化的作用已证实^[4], 而 CaMK II 相关研究尚无明确定论。Park-Min 等^[10]发现, RANKL 刺激可使破骨细胞分化中 CaMK II 磷酸化; William 等^[11]研究显示, RANKL 显著提高了破骨细胞中 CaMK II 的活性, 提示 CaMK II 在破骨细胞分化中可能发挥着重要作用。本课题组前期研究发现, 唑来膦酸可显著抑制破骨细胞分化中 CaMK II 和 CaMK IV 基因表达^[8,12], 进一步说明了 CaMK II 可能发挥的作用。

CaMK II 有 α 、 β 、 γ 、 δ 四种异构体^[5]; 在破骨细胞分化过程中异构体 α 、 β 表达较弱或几乎不表达, 而异构体 δ 表达则较强^[4,6-7]; 提示 CaMK II δ 与破骨细胞分化密切相关; 而 CaMK II δ 是否参与了 ZOL 对破骨细胞生成的抑制, 目前尚不清楚。本研究发现, 唑来膦酸处理可使破骨细胞分化中 CaMK II δ 基因表达在 mRNA 及蛋白水平均显著下降, 提示该因子可能参与了 ZOL 对破骨细胞分化的抑制。

NFATc1 是破骨细胞分化的主要调节基因, 参与 Cathepsin K、TRAP、integrin β 3、c-Src、DC-STAMP、Atp6v0d2 等许多破骨细胞特异性基因表达的调控, 对破骨细胞分化及骨吸收功能至关重要^[2,13-14]。NFATc1 基因敲除的胚胎干细胞不能向破骨细胞分化; 而 NFATc1 过表达则在没有 RANKL 的条件下骨髓基质细胞依然能分化成破骨细胞^[15]。本研究中, ZOL 处理使破骨细胞分化中 NFATc1、TRAP、c-Src 蛋白及 mRNA 水平均较对照组显著降低; 提示上述因子参与了 ZOL 对破骨细胞生成的抑制; 鉴于 NFATc1 在破骨细胞分化中的作用, 其表达下调可能是 ZOL 诱发的破骨细胞生成抑制的主要原因。

有关 CaMK II δ 调控 NFATc1 基因表达及破骨细胞分化的机制, 目前尚不清楚。Chang 等^[6]研究认为, CaMK II 与 CaMK IV 一样^[4], 通过 cAMP response element (CRE)-binding protein (CREB) 及 c-fos 信号通路来发挥作用; 而 Yao 等^[7]则认为, CaMK II δ 具有拮抗 CREB 信号通路的作用, 因而支持 Park-Min 等^[10]的研究结论, 即 CaMK II δ 通过 MEK-ERK 信号通路来发挥对破骨细胞的调控作用。然而, CaMK II δ 是怎样调控 NFATc1 基因表达及破骨细胞分化的? 有哪些信号参与其中, 尚待进一步研究。

本研究表明, 唑来膦酸可显著抑制破骨细胞生成及 CaMK II δ 、NFATc1、TRAP、c-Src 基因表达; 唑来膦酸对破骨细胞生成的抑制与上述因子表达下调有关。

参考文献

[1] Roelofs AJ, Thompson K, Ebetino FH, et al. Bisphosphonates: molecular mechanisms of action and effects on bone

cells, monocytes and macrophages[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(27): 2950-2960.

- [2] Negishi-Koga T, Takayanagi H. Ca^{2+} -NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation[J]. *Immunol Rev*, 2009, 231(1): 241-256.
- [3] Zhang L, McKenna M, Said-Al-Naief N, et al. Osteoclastogenesis; the role of Calcium and calmodulin[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2005, 15(1): 1-13.
- [4] Sato K, Suematsu A, Nakashima T, et al. Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway[J]. *Nat Med*, 2006, 12(12): 1410-1416.
- [5] Colbran RJ. Targeting of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II [J]. *Biochemical Journal*, 2004, 378(1): 1-16.
- [6] Chang EJ, Ha J, Huang H, et al. The JNK-dependent CaMK pathway restrains the reversion of committed cells during osteoclast differentiation[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 15): 2555-2564.
- [7] Yao CH, Zhang P, Zhang L. Differential protein and mRNA expression of CaMKs during osteoclastogenesis and its functional implications[J]. *Biochem Cell Biol*, 2012, 90(4): 532-539.
- [8] 李鹏, 林珏彬, 张鹏, 等. 唑来膦酸对破骨细胞分化中钙调蛋白和钙调蛋白依赖性激酶 II 基因表达的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2013, 48(11): 694-698.
- [9] Edwards JR, Weivoda MM. Osteoclasts: malefactors of disease and targets for treatment[J]. *Discov Med*, 2012, 70(3): 201-210.
- [10] Park-Min KH, Ji JD, Antoniv T, et al. IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression[J]. *J Immunol*, 2009, 183(4): 2444-2455.
- [11] Williams JP, Micoli K, McDonald JM. Calmodulin-an often ignored signal in osteoclasts[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010(1192): 358-364.
- [12] 刘娟娟, 李鹏, 董伟, 等. 唑来膦酸对破骨细胞分化中钙调蛋白依赖性激酶 II 和 IV 基因表达的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2016, 42(1): 19-23.
- [13] Zhao Q, Wang X, Liu Y, et al. NFATc1: functions in osteoclasts[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(5): 576-579.
- [14] Seales EC, Micoli KJ, McDonald JM. Calmodulin is a critical regulator of osteoclastic differentiation, function, and survival[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(1): 45-55.
- [15] Takayanagi H, Kim S, Koga T, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts[J]. *Dev Cell*, 2002, 3(6): 889-901.