

网络出版时间: 2018-11-5 15:38 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.016.html>

膜铁转运蛋白的缺失对破骨细胞分化的影响

周 剑, 王 磊, 储 彬

摘要 目的 探究在骨髓谱系细胞中特异性敲除膜铁转运蛋白(Fpn)对破骨细胞分化的影响。方法 实验组为Fpn基因敲除小鼠,对照组为含Fpn基因的小鼠,分别对两组小鼠骨髓巨噬细胞进行培养并诱导其分化成破骨细胞,且分为巨噬细胞组、前体细胞组、破骨细胞组。通过TRAcP染色、RT-PCR及Western blot等方法探讨Fpn的缺失对破骨细胞分化的影响。结果 染色显示实验组中成熟破骨细胞的阳性表达强于对照组。实验组NFATc1、PGC-1 β 的mRNA表达量及CTSK、NFATc1、PGC-1 β 的蛋白表达量均高于对照组($P < 0.01$)。结论 在骨髓谱系细胞中膜铁转运蛋白的缺失会促进破骨细胞的形成。

关键词 膜铁转运蛋白; 破骨细胞; 分化

中图分类号 R 681

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)12-1893-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.016

破骨细胞的骨吸收作用和成骨细胞的骨形成作用在骨骼发育、骨量平衡及骨损伤的修复中至关重要^[1]。骨骼通过不断地骨重建来实现自身的代谢更新,使骨的吸收与形成处于动态平衡。在大多数骨代谢疾病中,如骨质疏松症、骨Paget's病、牙周病和肿瘤的溶骨性转移,由于破骨细胞数量的增加或活性的增强导致骨吸收过度表达,进而引起病理性骨流失^[2]。铁是生物体维持稳态的重要元素,哺乳动物的细胞通过摄取转铁蛋白、亚铁血红素、铁蛋白或通过非转铁蛋白获得铁^[3]。在哺乳动物细胞中,由Slc40a1基因编码的膜铁转运蛋白(ferroportin, Fpn)是目前唯一确定的能够排出细胞铁的通道蛋白^[4],未利用的细胞铁既可以储存在铁蛋白中,也可以通过Fpn排出。Slc40a1基因的突变会导致常染色体隐性遗传性疾病——血色病沉着症^[5],这是一种铁超负荷类疾病。近期已有学者研究^[6]证明,下调Fpn的mRNA表达水平对破骨细胞有重要的影响,为了进一步探讨Fpn在骨髓谱系细胞中的缺

失是否影响破骨细胞的分化,该研究建立了基因敲除小鼠模型,在体外观察Fpn在骨髓谱系细胞中的缺失对破骨细胞分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 本实验小鼠购自美国Jackson实验动物中心; α -MEM细胞培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(美国Hyclone公司);鼠重组细胞核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear kappa B ligand, RANKL)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)(美国Peprotech公司);胰酶细胞消化液(美国Life Technologies公司);10 $\times$ 青霉素-链霉素-L-谷氨酰胺、牛血清白蛋白、破骨细胞分化标志物抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色试剂盒(美国Sigma公司);磷酸缓冲盐溶液(美国Diamidex公司);RNeasy mini试剂盒(美国Qiagen公司);High-Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(美国Applied Biosystems/Thermo-Fisher Scientific公司);TaqMan Universal Master Mix(美国Applied Biosystems公司);RIPA缓冲液、小鼠抗组织蛋白酶K单克隆抗体、小鼠抗 α 微管蛋白单克隆抗体(美国MilliporeSigma公司);BCA试剂盒(上海碧云天生物公司);小鼠抗NFATc1单克隆抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司);兔抗PGC-1 β 多克隆抗体(美国Abcam公司)。

1.1.2 仪器 CO₂恒温细胞培养箱(美国Thermo Scientific公司);双目显微镜(美国Olympus公司);光学显微镜(美国Carl Zeiss公司);Step One Plus荧光定量PCR仪(美国Life Technologies公司);微量紫外分光光度计(美国Thermo scientific公司);PCR扩增仪、微孔检测仪、垂直电泳仪、半干转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 骨髓巨噬细胞及破骨细胞的分离培养 2月龄小鼠用CO₂处死后,取双侧股骨及胫骨骨髓,室温下红细胞裂解液裂解5 min,在一个100 mm培

2018-08-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 81501843)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院骨科, 合肥 230022

作者简介: 周 剑, 男, 医师, 博士, 责任作者, E-mail: zhoujian831207

@163.com

养皿内接种 5×10^6 个骨髓巨噬细胞 (bone marrow macrophages, BMMs), 并加入 α -10 MEM 和 M-CSF, 于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养, 隔天换液 1 次。4~5 d 后获得 M-CSF 依赖性 BMMs。

将两种小鼠的 BMMs 接种于多孔细胞培养板中或培养皿内, 同时加入含有 M-CSF 和 RANKL (100 ng/ml) 的 α -10 MEM 诱导其向破骨细胞分化, 在 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养, 于第 2 天后每天换液 1 次并收集细胞, 即可获得破骨细胞前体细胞 (pre-osteoclasts, pOCs) 和成熟的破骨细胞 (osteoclasts, OCs)。

1.2.2 TRAP 染色及阳性细胞计数 如上述细胞培养法, 将两种小鼠的 BMMs 接种于 48 孔细胞培养板内 (塑料组) 及含有骨片的 48 孔细胞培养板内 (骨片组)。塑料组分为两组 (3 d 和 4 d), 骨片组只有一组 (4 d)。每孔细胞密度为 1.5×10^4 个/ml, 每种细胞设 5 个副孔。同时加入 M-CSF 和 RANKL 诱导分化, 于第 3 天和第 4 天从细胞培养箱中取出, 4% 多聚甲醛固定细胞后, TRAP (一种破骨细胞分化标志物) 染色: 在含有亚硝酸钠、碱性副品红溶液及萘酚 AS-BI 磷酸盐的 NaK 酒石酸盐溶液中 36°C 孵育 10~15 min, 双蒸水洗 3 次后风干, 光镜下观察。

计数标准: 实验组及对照组 2 组细胞分别在 100 倍视野下每孔随机选取 6 个视野进行计数。成熟的破骨细胞呈现大圆片状, 粉红或玫瑰红色, 细胞核 ≥ 3 个。上述实验每种细胞 6 个孔, 即重复 6 次。

1.2.3 荧光实时定量 PCR 如前所述细胞培养法, 将两种小鼠的 BMMs 培养于 6 孔细胞培养板中, 分为 BMMs 组、pOCs 组及 OCs 组, 每组 6 个孔 (实验组 3 个孔, 对照组 3 个孔), BMMs 组中仅加入 M-CSF, 而 pOCs 组及 OCs 组中加入 M-CSF 和 RANKL 诱导其向破骨细胞分化。每孔细胞密度为 15×10^4 个/ml。分别于第 2 天取出 BMMs 组及 pOCs 组和第 4 天取出 OCs 组, 每孔加入 350 μl RLT 溶液, 收集细胞裂解液。使用 RNeasy mini 试剂盒提取全 RNA, 使用 High-Capacity cDNA Reverse Transcription 试剂盒将全 RNA 逆转录为 cDNA。以线粒体基因 Mrps2 作为内参基因, 引物从美国 Life Technologies 公司购买: Acp5 (Mm00475698_m1), NFATc1 (Mm00479445_m1), Ppargc1b (Mm00504720_m1), Mrps2 (Mm03991065_g1)。通过实时荧光定量 PCR 检测其破骨细胞标记基因 Acp5 (编码 TRAcP)、Nfatc1 (编码破骨细胞关键的转录因子 NFATc1) 和 Ppargc1b (编码 PGC-1 β) 中 mRNA 的表达量。PCR

程序参数如下: 50°C 、2 min, 95°C 、10 min, 然后进行 40 个 95°C 、15 s 及 60°C 、18 s 的循环。反应完成后进行扩增曲线和熔解曲线分析, 基因表达量以检测基因的初始模板量以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。

1.2.4 Western blot 如前所述细胞培养法, 将两种小鼠的 BMMs 培养在 100 mm 培养皿中, 分为 BMMs 组、pOCs 组及 OCs 组, 每组 2 个培养皿 (实验组 1 个, 对照组 1 个), BMMs 组中仅加入 M-CSF, 而 pOCs 组及 OCs 组中加入 M-CSF 和 RANKL 诱导其向破骨细胞分化。每个培养皿细胞密度为 1.5×10^6 个/ml。分别于第 2 天取出 BMMs 组及 pOCs 组和第 4 天取出 OCs 组, 经 RIPA 裂解后, 摇床上冰镇 30 min, 14 000 r/min、 4°C 、离心 15 min, 提取上清液。再用 BCA 试剂盒测量蛋白浓度后, 按 1:4 比例加入蛋白上样缓冲液 (SDS-PAGE Sample Loading Buffer), 95°C 煮 5 min。SDS-PAGE 检测破骨细胞分化过程中的相关蛋白 CTSK、NFATc1 和 PGC-1 β 的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析 (ANOVA), Leven 检验方差齐性, $P < 0.05$ 时, 组间比较采用 Dunnett's T3 法; 反之采用 SNK 法。两组之间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

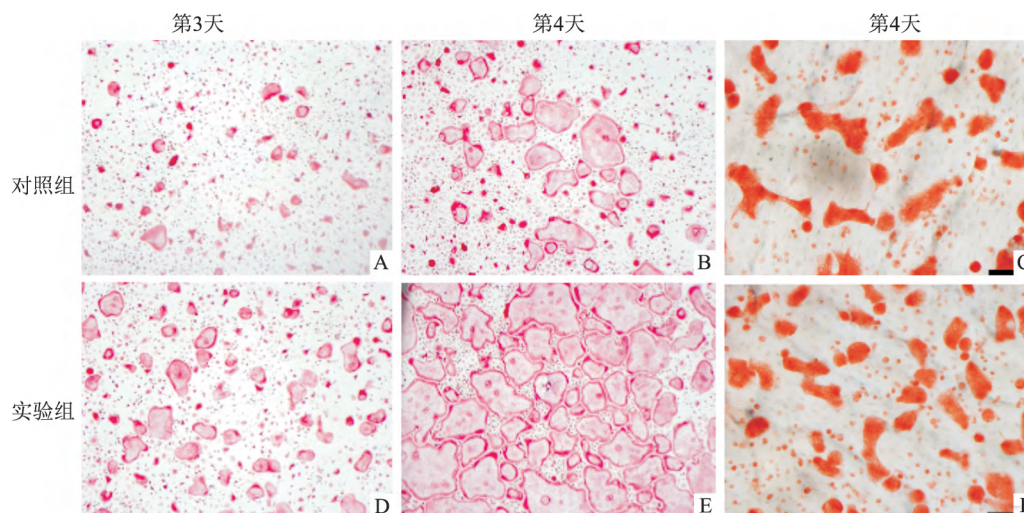
2 结果

2.1 TRAcP 染色

2.1.1 在细胞培养板上观察 对 48 孔培养板中的细胞分别于第 3 天和第 4 天进行细胞固定, 然后行 TRAcP 染色, 通过 t 检验结果如下: ① 在第 3 天时, 对照组中可见大量 TRAP 染色阳性的小圆细胞, 而成熟的破骨细胞 TRAP 阳性率为 8.76% (73/817), 实验组已有部分形成大的多核的 TRAP 染色阳性的成熟破骨细胞, 阳性率为 43.17% (376/853), 见图 1、表 1; ② 在第 4 天时, 实验组已有大量 TRAcP 染色阳性的多核的成熟破骨细胞形成, 阳性率为 84.75% (700/830), 而对照组仅有部分破骨细胞形成, 阳性率为 31.32% (249/783), 见图 1、表 1。

2.1.2 在骨片上观察 养在骨片上的细胞在第 4 天行细胞固定, TRAcP 染色后可见实验组已有大量 TRAcP 染色阳性的多核的成熟破骨细胞形成, 而对照组仅有部分破骨细胞形成, 见图 1。

2.1.3 细胞计数 显微镜下对 2.1.1 实验中细胞培养板中的成熟破骨细胞进行计数, 如表 1 及图 2

图1 两组 BMMs 分别培养在 48 孔细胞培养板与骨片上并行 TRAP 染色 $\times 1\,000$

A、B: 对照组分别于第 3 天和第 4 天在培养板上行 TRAcP 染色; D、E: 实验组分别于第 3 天及第 4 天在培养板上行 TRAcP 染色; C、F: 对照组与实验组分别于第 4 天在骨片上行 TRAcP 染色

表1 TRAP 染色的计数结果

时间	对照组			实验组			F 值	P 值
	阳性细胞数	总多核细胞数	阳性率	阳性细胞数	总多核细胞数	阳性率		
第 3 天	73	817	8.91%	376	853	44.07%	3.285	0.000 000 009
第 4 天	249	783	31.80%	700	830	84.30%	6.569	0.000 002

所示,结果如下:①第 3 天,实验组中成熟的破骨细胞数为(376 $\pm$ 75)个,对照组为(73 $\pm$ 32)个,实验组明显高于对照组,差异具有统计学意义($P=0.000\,047\,51$);②在第 4 天,实验组中成熟的破骨细胞数为(700 $\pm$ 58)个,对照组为(249 $\pm$ 22)个,实验组明显高于对照组,差异具有统计学意义($P=0.000\,000\,96$)。

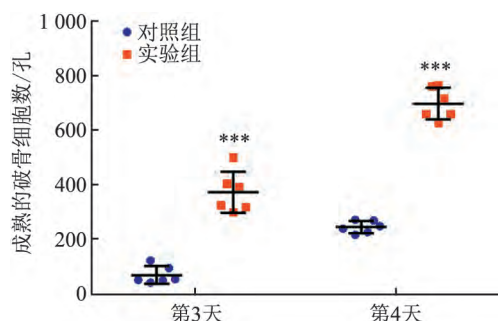


图2 对 TRAP 染色阳性的成熟破骨细胞的计数
与对照组比较: *** $P < 0.001$

2.2 实时荧光定量 PCR RT-PCR 检测实验组与对照组中 BMMs、pOCs 及 OCs 三组细胞中的破骨细胞标记基因 Acp5(编码 TRAP)、Ctsk、NFATc1(编码破骨细胞关键的转录因子 NFATc1)和 Ppargc1b(编

码 PGC-1 β)的 mRNA 相对表达量,RT-PCR 结果显示:①在实验组及对照组中,随着破骨细胞分化的逐渐成熟,其相关基因的 mRNA 表达量逐渐增加;②在 pOCs 组及 OCs 组,实验组 Acp5、Ctsk、NFATc1 的 mRNA 的表达量均高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);③在 OCs 组,实验组 Ppargc1b 的 mRNA 表达水平高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$);④虽然在 pOCs 组中,实验组与对照组之间 Ppargc1b 的 mRNA 表达量差异无统计学意义,但实验组 Ppargc1b 的 mRNA 表达水平仍高于对照组,见图 3、表 2。

表2 RT-PCR 检测破骨细胞分化过程中
标记基因 mRNA 表达量的 P 值

破骨细胞	破骨细胞前体细胞组(pOCs)		成熟的破骨细胞组(OCs)	
标记基因	F 值	P 值	F 值	P 值
Acp5	0.024	0.015 4	0.026	0.001 1
Ctsk	1.483	0.035 9	0.683	0.045 6
Nfatc1	4.868	0.046 0	0.002	0.009 3
Ppargc1b	3.416	0.120 4	0.625	0.008 8

2.3 Western blot 检测 实验组与对照组中 BMMs 组、pOCs 组及 OCs 组三组细胞的 CTSK、NFATc1 和 PGC-1 β 蛋白表达量,结果如下:①在 BMMs 组中,

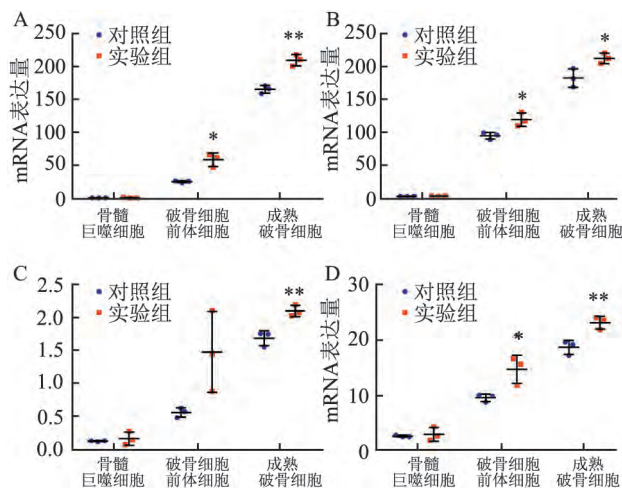


图3 RT-PCR 检测破骨细胞标记基因的 mRNA 的表达水平

A: Acp5(编码 TRAcP) 中 mRNA 的表达水平; B: Ctsk 中 mRNA 的表达水平; C: Pparg1b(编码 PGC-1 β) 中 mRNA 的表达水平; D: Nfatc1 (编码破骨细胞关键的转录因子 NFATc1) 中 mRNA 的表达水平

实验组与对照组的CTSK、NFATc1、PGC-1 β 蛋白表达量均极低,说明基本上不表达 CTSK、NFATc1、PGC-1 β 蛋白;②在 pOCs 组,实验组三种蛋白的表达量已开始高于对照组;③但在 OCs 组,实验组中仅 NFATc1 及 PGC-1 β 的蛋白表达量明显高于对照组,见图 4。

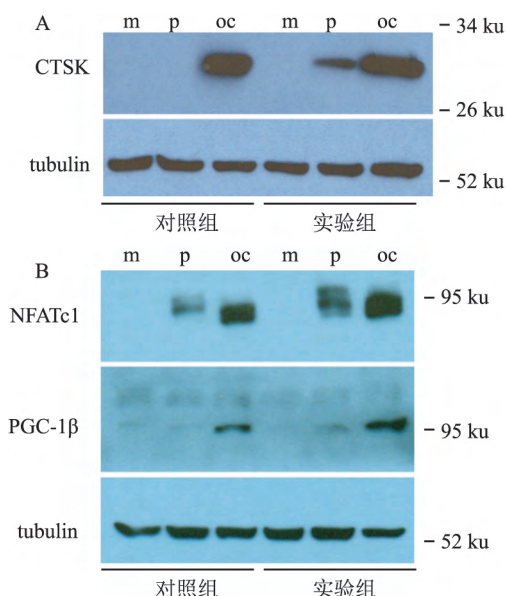


图4 通过 Western blot 检测破骨细胞分化过程中相关蛋白的表达水平

A: 用 tubulin 作为内参,检测 CTSK(1 μ g/ μ l) 蛋白的表达水平; B: 用 tubulin 作为内参,检测 NFATc1(1 μ g/ μ l) 和 PGC-1 β (1 μ g/ μ l) 蛋白的表达水平; m: 巨噬细胞; p: 破骨细胞前体细胞; oc: 成熟的破骨细胞

3 讨论

Fpn 也被称为 Slc40a1,在 2000 年由 Donovan et al^[7] 首先发现,并发表于 Nature 杂志。目前已经证明 Fpn 是哺乳动物细胞内排出铁的唯一通道蛋白^[8],并有大量的研究^[9] 证明其在铁代谢平衡中具有重要作用。人的 Fpn 基因定位在 2 号染色体上,长度 20 bp,并有 8 个外显子,其 mRNA 的 5 末端非翻译区含有一个典型的铁反应元件 IRE^[10]。Fpn mRNA 编码的蛋白有 570 个氨基酸,分子量约 62 ku,至少有 10 个跨膜结构域,是一种膜蛋白。Fpn 蛋白在哺乳动物里是一种高度保守的蛋白,人、小鼠、大鼠的序列同源性有 90% ~ 95%^[11]。因此,本研究的动物模型选择小鼠。Fpn 蛋白广泛分布在哺乳动物的十二指肠、胎盘、肝、肾、肌肉、肺、脑等,参与这些器官的铁代谢^[12]。

研究^[13] 证明,下调 Fpn 的 mRNA 表达水平对破骨细胞有重要的影响。但本课题组通过下调多种基因表达并研究显示,基本都对破骨细胞的分化存在影响^[11-12],故认为这种阳性结果不一定准确。另外,有研究^[13] 证明,Fpn 的种系缺失会导致小鼠胚胎致死。因此,本研究通过在骨髓谱系细胞中特异性敲除 Fpn 基因,建立了一种全新的基因敲除小鼠模型。取其骨髓巨噬细胞进行细胞培养,并加入 RANKL 及 M-CSF(破骨细胞分化过程中两种极其重要的细胞因子) 诱导其向破骨细胞分化,在显微镜下可观察到 Fpn 基因敲除的小鼠骨髓巨噬细胞加速形成成熟的破骨细胞,并通过细胞固定,TRAP 染色,计数等方法进一步证实了 Fpn 的缺失对破骨细胞的形成分化有着显著的促进作用。

为了明确 Fpn 的缺失在分子水平上如何影响破骨细胞的形成分化,本研究通过荧光实时定量 PCR 检测了几种破骨细胞标志物,结果显示随着破骨细胞的形成分化,其标志物显著增加,其中 Acp5、Ctsk、NFATc1 这几种标志物明显高于阴性对照组, Pparg1b mRNA 的表达量虽然在破骨细胞前体细胞阶段升高不具有显著性,但在成熟破骨细胞阶段其表达量显著增加。这些结果表明 Fpn 的缺失可能诱导破骨细胞分化形成过程中的多种细胞因子的活化,进而促进骨髓巨噬细胞分化形成成熟的破骨细胞。

本研究又通过 Western blot 检测 CTSK、NFATc1 及 PGC-1 β 的蛋白含量,进一步证实了 RT-PCR 结果的可靠性。NFATc1 和 PGC-1 β 两种对破骨细胞

分化至关重要的转录因子) 的蛋白含量随着破骨细胞的分化逐渐增加, 并明显高于阴性对照组。然而, CTSK 似乎在破骨细胞分化成熟阶段并没有显著升高, 这与之之前 RT-PCR 定量 Ctsk 分析 $P = 0.046$ 相比较, 其实并没有多大矛盾。首先 RT-PCR 表明 Ctsk 确实升高, 但是相比较其他几种标志物来说增高并不明显。其次, 破骨细胞在分化形成的过程中, 调控的通路并不只有一条, 也就是说并不一定每一种标记物都显著增高, 因此本实验 Western blot 结果具有可靠性。

综上所述, 本研究揭示了在骨髓谱系细胞中敲除 Fpn 会促进破骨细胞分化形成。至于其是否会进一步对骨量造成影响, 以及对成骨细胞是否有正反馈或负反馈作用, 对铁量的聚集是否有刺激作用, 而引起铁代谢性疾病, 还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 宋才渊, 彭冰, 沈佳怡, 等. 破骨细胞分化调节机制的研究进展 [J]. 中国骨伤, 2015, 28(6): 580-4.
- [2] 肖超, 常春康. 骨髓瘤骨病的病理机制进展与治疗 [J]. 诊断学理论与实践, 2015, 14(4): 375-80.
- [3] Pantopoulos K, Porwal S K, Tartakoff A, et al. Mechanisms of Mammalian Iron Homeostasis [J]. Biochemistry, 2012, 51(29): 5705.
- [4] 刘玉洁, 耿惠. 铁调素受体-膜铁转运蛋白的研究进展 [J]. 重庆医学, 2016, 45(8): 1110-3.
- [5] 冯燕, 程思根. 原发性血色病在中国的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(7): 1190-3.
- [6] Gu Z, Wang H, Xia J, et al. Decreased ferroportin promotes myeloma cell growth and osteoclast differentiation [J]. Cancer Res, 2015, 75(11): 2211-21.
- [7] Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter [J]. Nature, 2000, 403(6771): 776.
- [8] 李妍, Konstantinos Gkouvatso. 铁转运的调控和转铁蛋白的作用 [J]. 饲料与畜牧: 新饲料, 2014(11): 60-3.
- [9] Montalbetti N, Simonin A, Kovacs G, et al. Mammalian iron transporters: families SLC11 and SLC40 [J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2-3): 270-87.
- [10] Tandara L, Salamunic I. Iron metabolism: current facts and future directions [J]. Biochem Med, 2012, 22(3): 311-28.
- [11] Zhou J, Fujiwara T, Ye S, et al. Downregulation of Notch modulators, tetraspanin 5 and 10, inhibits osteoclastogenesis in vitro [J]. Calcif Tissue Int, 2014, 95(3): 209-17.
- [12] Zhou J, Ye S, Fujiwara T, et al. Steap 4 plays a critical role in osteoclastogenesis *in vitro* by regulating cellular iron/reactive oxygen species (ROS) levels and cAMP response element-binding protein (CREB) activation [J]. J Biol Chem, 2013, 288(42): 30064-74.
- [13] Donovan A, Lima C A, Pinkus J L, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis [J]. Cell Metabolism, 2005, 1(3): 191-200.

Effect of ferroportin deficiency in myeloid lineage cells on osteoclast differentiation

Zhou Jian, Wang Lei, Chu Bin

(Dept of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To elucidate the effect of deletion of ferroportin in osteoclast lineage cells on osteoclast differentiation. **Methods** The Fpn-flox/flox; Cre/+ mice were designated as myeloid (Fpn Δ LysM) Fpn knockout mice. The Fpn-+/+; Cre/+ littermates were used as controls. The macrophages from both knockout mice and controls were culture with RANKL and M-CSF, then TRAP staining, RT-PCR and Western blot were used to detect the difference between two strains. **Results** There was a significant increase in osteoclast formation in Fpn-depleting BMM cultures compared to controls from TRAP staining. The accelerated osteoclastogenesis in Fpn-null BMMs was further confirmed by a higher mRNA expression of osteoclast marker genes, NFATc1 and PGC-1 β , in Fpn-null osteoclast lineage cells than in control ones ($P < 0.01$). Similarly, loss of FPN resulted in elevation of protein levels of CTSK, NFATc1, and PGC-1 β in the course of osteoclast differentiation. **Conclusion** FPN deficiency in myeloid lineage cells stimulates osteoclastogenesis *in vitro*.

Key words ferroportin; osteoclast; differentiation