

唑来膦酸抑制RAW264.7细胞系分化的最佳浓度体外实验

张禄铭^{1,2} 马剑雄¹ 赵杰¹ 匡明杰¹ 卢斌¹ 王颖¹ 孙磊¹ 马信龙^{1,3}

【摘要】 目的 观察唑来膦酸盐对RAW264.7细胞系毒性作用的浓度范围和抑制RAW264.7分化为破骨细胞的最佳实验浓度。方法 以小鼠前破骨细胞系RAW264.7为研究对象,应用MTT法检测唑来膦酸盐对小鼠前破骨细胞系RAW264.7的毒性作用范围。使用TAR染色法观察不同浓度的唑来膦酸盐作用下破骨细胞的生成数目。结果 体外培养24 h后,酶联免疫反应吸光度结果显示, 10^{-3} mol/L (0.511 ± 0.920), 10^{-4} mol/L (0.615 ± 0.577)唑来膦酸对小鼠前破骨细胞系RAW264.7增殖有毒性作用,与空白对照组(0.789 ± 0.061)相比,差异有统计学意义($F=5.880, P<0.01$)。TRAP染色破骨细胞计数结果显示: 10^{-5} mol/L (8.333 ± 0.817)、 10^{-6} mol/L (10.400 ± 1.817)、 10^{-7} mol/L (11.250 ± 2.750)及 10^{-8} mol/L (11.143 ± 1.864)唑来膦酸盐实验组破骨细胞数与空白对照组破骨细胞数(13.833 ± 2.483)相比,差异具有统计学意义($F=27.972, P<0.05$),且呈浓度依赖性,当唑来膦酸盐浓度为 10^{-5} mol/L时,抑制效果最明显($P<0.01$)。结论 唑来膦酸盐抑制RAW264.7细胞系分化为破骨细胞的最佳体外实验浓度为 10^{-5} mol/L。

【关键词】 唑来膦酸; 破骨细胞; 细胞分化; 细胞毒性; RAW264.7

Effects and optimum concentration of zoledronate on RAW264.7 Zhang Lukai^{1,2}, Ma Jianxiong¹, Zhao Jie¹, Kuang Mingjie¹, Lu Bin¹, Wang Ying¹, Sun Lei¹, Ma Xinlong¹. ¹Orthopedics institute of Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; ²Graduate school of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; ³Tianjin Hospital, Tianjin 300142, China

Corresponding author: Ma Xinlong, Email: ZLMM10@163.com

【Abstract】 Objective To further observe the concentration range of zoledronate on RAW264.7 cell toxic effect and confirm the optimum concentration in inhibition of RAW264.7 differentiation of osteoclast. **Methods** Mouse leukemia macro phage RAW264.7 was cultured as research object. RAW264.7 osteoclast toxic effect of zoledronate was detected by MTT method. Inhibition of osteoclast differentiation by different concentration of zoledronate were detected by tartrate-resistant acid phosphatase staining method. **Results** After 24 h vitro culture, Enzyme-linked immunosorbent assay absorbance indicated that 10^{-3} mol/L (0.511 ± 0.920), 10^{-4} mol/L (0.615 ± 0.577) concentrations of zoledronate had significantly toxic effects on cells compared with the blank control group (0.789 ± 0.061) ($F=5.880, P<0.01$). TRAP staining osteoclast count indicated that 10^{-5} mol/L (8.333 ± 0.817), 10^{-6} mol/L (10.400 ± 1.817), 10^{-7} mol/L (11.250 ± 2.750) and 10^{-8} mol/L (11.143 ± 1.864) concentrations of zoledronate all significantly inhibited RAW264.7 differentiation compared with the blank control group ($F=27.972, P<0.05$), showing concentration dependence, 10^{-5} mol/L zoledronate had the highest inhabitation effect ($P<0.01$). **Conclusion** Zoledronate can effectively inhibit RAW264.7 differentiation, and the optimum concentration in vitro is 10^{-5} mol/L.

【Key word】 Zoledronic acid; Osteoclast; Cell differentiation; Cytotoxicity; RAW264.7

近年随着世界人口的老龄化,骨质疏松的患病率逐年升高并影响着众多人群的健康,目前已经成为全世界最关注的公共疾病之一^[1]。根据国内最新

的研究报告显示我国目前大约共有1.4亿名骨质疏松患者,其中男性和女性骨质疏松患者每十年增长率分别为15%和20%,如何预防骨质疏松的发生,提

高骨质疏松患者的骨骼强度是一个重要的急需解决的问题^[2]。

骨质疏松的发生大多和破骨细胞的骨吸收功能过强有关,正常情况下破骨细胞骨吸收功能与成骨细胞骨重建功能保持在一定的动态平衡之中,当破骨细胞的骨吸收功能亢进时将会导致骨基质吸收过度,全身骨量降低,甚至引发疼痛,进而引发骨质疏松^[3-4]。目前市面上的抗骨质疏松药物多分为基本补充剂、抗骨吸收抑制、促进骨形成药物和新型单克隆抗体抗骨质疏松药物(狄诺塞麦)。唑来膦酸作为一线的抗骨质疏松药属于抗骨吸收抑制剂类药物,目前有大量实验研究唑来膦酸盐对破骨细胞分化和骨吸收功能的抑制作用^[5-7],旨在探究治疗骨质疏松的新目的和方法,然而目前对于唑来膦酸盐的实验浓度没有统一的标准。本实验以小鼠前破骨细胞系(RAW264.7细胞株)为实验对象,通过四甲基偶氮唑盐检测法(menthyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测唑来膦酸盐对前破骨细胞的毒性范围,抗酒石酸性磷酸酶(tyrosine rich amelogenin peptidetartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色法观察不同唑来膦酸盐浓度对前破骨细胞的分化效果,最终得出唑来膦酸盐抑制前破骨细胞分化的最佳浓度,为今后研究提供实验依据。

材料与方法

一、实验设计

分组对照细胞学实验,2016年9至12月于天津市骨科研究所实验室完成。

二、材料

小鼠前破骨细胞系(RAW264.7细胞株)由北京协和和科学研究院提供,见表1。

三、实验方法

(一)小鼠前破骨细胞系RAW264.7培养

将小鼠巨噬细胞系RAW264.7接种在含有10% F-GBS的双抗高糖DMEM培养液(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养,隔天更换一次培养液,当细胞铺满细胞培养瓶底面80%~90%时,采用0.25%的胰酶和0.04%的EDTA消化传代。

(二)药品的配制

将纯度≥99%唑来膦酸盐粉末用D-Hanks溶解(dulbecco's hanks balanced salt solution, Hanks)后

表1 唑来膦酸干扰前破骨细胞活性及抑制前破骨细胞分化实验所用试剂和仪器

试剂及仪器	来源
DMEM培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、	Sigma公司,美国
磷酸缓冲液D-Hank's	自制
二甲基亚砷	美国sigma公司
青链霉素溶液	美国Invitrogen公司
MTT试剂	美国sigma公司
碱性磷酸酶试剂盒	南京建成生物工程研究所
细胞培养皿	美国Corning公司
倒置显微镜	德国Leica公司
细胞培养箱	德国Heraeus公司
唑来膦酸	美国sigma公司

滤膜过滤,配置10⁻² mol/L的唑来膦酸溶液祖液,然后用无血清的高糖DMEM培养液稀释唑来膦酸盐祖液,分别配置成10⁻³ mol/L、10⁻⁴ mol/L、10⁻⁵ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10⁻⁷ mol/L、10⁻⁸ mol/L六种不同浓度备用。

(三)RAW264.7细胞株增殖测定

实验组分别添加10⁻³ mol/L、10⁻⁴ mol/L、10⁻⁵ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10⁻⁷ mol/L、10⁻⁸ mol/L的唑来膦酸盐溶液,加入高糖DMEM培养液的作为空白对照组,设6个复孔。调整细胞悬液浓度为10⁵个/ml,每孔加入100 ul细胞悬液接种于96孔板中,细胞培养箱培养24 h当细胞贴壁后,换为加入药物的培养液,作用36 h后按照MTT试剂盒方法检测实验组与对照组的增殖率,具体的实验步骤按照说明书要求,多功能酶标仪读取波长450 nm处吸光度值。

(四)破骨细胞TRAP阳性细胞计数

实验组分别添加10⁻⁵ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10⁻⁷ mol/L、10⁻⁸ mol/L的唑来膦酸盐溶液,加入DMEM高糖培养液作为对照组,调节细胞悬液为5×10⁴个/ml,每孔2 ml溶液接种于12孔板,调整每孔核因子kB受体活化因子(receptor activator for nuclear factor-kB Ligand, RANKL)浓度为100 ng/ml,诱导RAW264.7向破骨细胞分化,诱导7 d后,进行TARP染色,具体的方法参照说明书进行操作。计数方法:五组分别在200倍的视野下随机选取10个视野进行破骨细胞计数,随后取平均值。破骨细胞判断标准:细胞呈玫瑰红色或粉红色,细胞核≥3个,上述实验重复5次。

四、主要观察指标

唑来膦酸对RAW264.7巨噬细胞系的增殖影响:在96孔板中接种细胞36 h后,向每孔加入10 μl

浓度为5 mg/ml的MTT溶液,避光条件下共培养4 h后,去掉培养液并加入100 μ l二甲基亚砷摇床低速震荡10分钟并弃液,最后在酶联免疫检测仪吸光值(optical density, OD)为490 nm处测得各孔的吸光值。唑来膦酸对RAW264.7巨噬细胞系向破骨细胞分化的影响:在100 ng/ml的RANKL诱导七天后,对孔板内细胞进行TRAP染色(具体操作按照说明书要求),染色完成后在200倍视野的显微镜下进行观察,细胞呈玫瑰色或酒红色且胞内细胞核 ≥ 3 个即被认定为破骨细胞,同时每孔随机选取10个视野对破骨细胞进行计数。

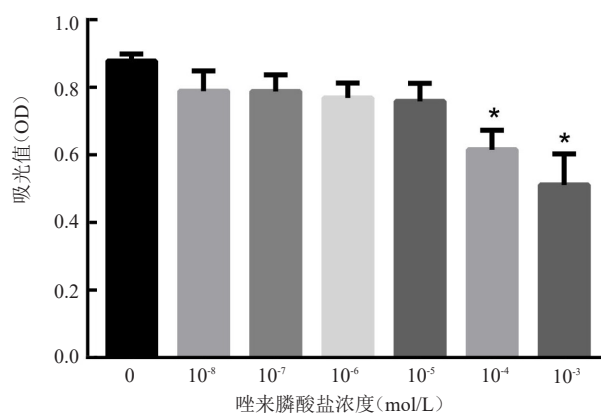
五、统计学分析

采用SPSS 19.0(IBM,美国)对数据进行录入及统计学分析。计量资料采用Kolmogorov-Smirnov检验是否符合正态分布,符合正态分布的组间吸光度值、破骨细胞数的比较方差分析,两两比较采用Dunnett-*t*检验,检验水准 α 值取双侧0.05。

结 果

一、唑来膦酸对小鼠前破骨细胞系RAW264.7增殖的影响

MTT法检测后结果显示RAW264.7在唑来膦酸盐 10^{-3} mol/L, 10^{-4} mol/L浓度作用36 h后,与空白对照组相比,巨噬细胞系的增殖均受到抑制($F=5.880$, $P<0.01$),其余四组对小鼠前破骨细胞系RAW264.7的增殖无显著抑制作用(见图1)。因此得出结论,当唑来膦酸盐的浓度小于 10^{-5} mol/L时对小鼠前破骨细胞系RAW264.7不具有生长抑制的作用。



注:“*”表示与0 mol/L相比, $P<0.05$

图1 不同浓度唑来膦酸盐作用36 h后各孔的吸光度值

二、唑来膦酸对RAW264.7巨噬细胞系分化为破骨细胞的影响

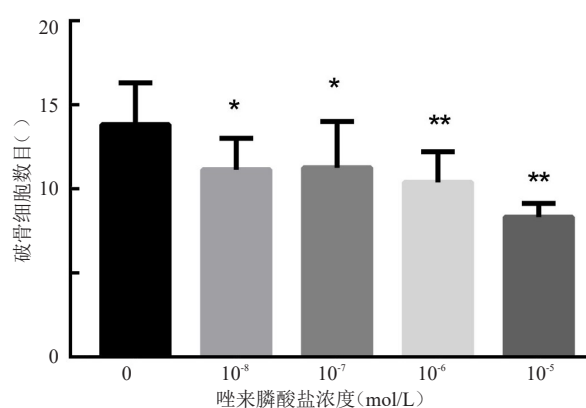
在RANKL诱导剂诱导7 d及TRAP染色后显示唑来膦酸盐的浓度为 10^{-8} mol/L到 10^{-5} mol/L之间,对破骨细胞的分化均有抑制作用,呈浓度依赖性($F=27.972$, $P<0.05$)(见图2~7)。因此我们得出结论,当唑来膦酸盐的浓度为 10^{-5} mol/L(8.333 ± 0.817)时,与对照组(13.833 ± 2.483)相比对破骨细胞分化的抑制作用最明显($P<0.01$)。

讨 论

一、双膦酸盐与破骨细胞

当破骨细胞的骨吸收功能过度、骨吸收和骨形成的动态平衡被破坏时将会造成骨质疏松,然而骨质疏松是一种慢性进行性疾病,患者多在伴有骨折的发生时才得知有骨质疏松症,因此预防骨质疏松的发生和及时治疗是目前的首要方向^[8-10]。近些年来,有关于骨质疏松的治疗药物和靶向治疗方法成为实验研究的热点,其中抗骨吸收抑制剂双膦酸盐类药物在临床实验和细胞组织工程实验上都进行了大量的研究^[11-12]。

近年来的研究表明,双膦酸盐类的药物用于临床治疗骨质疏松性疾病有明显的防治和治疗效果,双膦酸盐可抑制骨过度吸收,恢复骨小梁的微结构,增强骨骼的强度,同时治疗一些特殊性骨病,降低骨性关节炎的发生^[13-14]。唑来膦酸盐为第三代双膦酸盐类药物,抗骨质疏松能力约为一代双膦酸盐类药物的10 000倍,其侧链为含有双氮的环状结构,加强了唑来膦酸与羟基磷灰石的结合力^[15-17]。双膦酸盐



注:“*”表示与0 mol/L相比, $P<0.05$, “**”表示与0 mol/L相比, $P<0.01$

图2 不同浓度唑来膦酸盐组破骨细胞生成数目

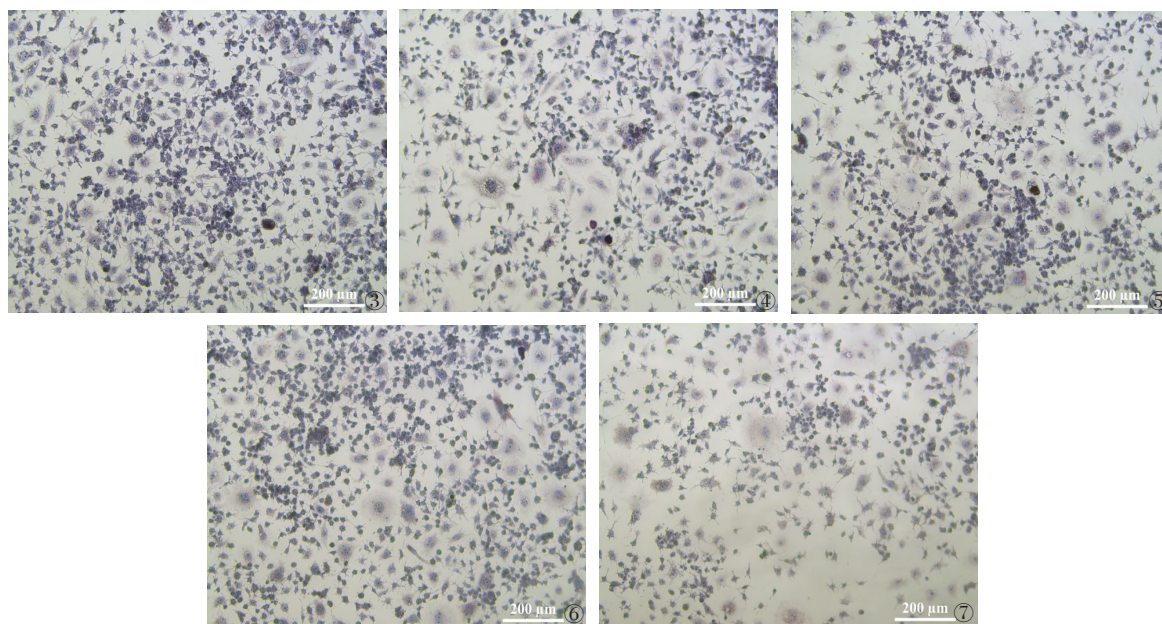


图3~7 不同浓度唑来膦酸盐作用下各组TRAP染色结果。图3、4、5、6、7唑来膦酸盐浓度分别为 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L、 10^{-5} mol/L

抑制破骨细胞的分化主要通过三个方面:(1)直接作用于破骨细胞,抑制破骨细胞的增殖和凋亡,减少细胞的数量,改变破骨细胞的数量和活性并阻止破骨对骨组织的粘附性,抑制了骨基质的重吸收^[18-19];(2)直接与骨基质相结合,抑制骨骼的重吸收,研究发现双膦酸盐可在骨基质的表面聚集并在一定的时间内保持相对稳定浓度,保持抑制骨吸收作用^[20];(3)干扰破骨细胞介导因子的生成,如(L-1, L-6, TNF),间接的抑制破骨细胞的活性和破骨前体细胞的分化^[21]。

二、破骨细胞的来源与形成

破骨细胞来源于骨髓造血系统,属于单核/巨噬细胞系,目前破骨细胞的分化分为四个阶段:(1)骨髓来源的单核细胞分化为特定的造血祖细胞;(2)造血祖细胞分化为前破骨细胞(osteoclast precursor, OCP);(3)前破骨细胞进一步分化为抗酒石酸酸性磷酸酶阳性前破骨细胞;(4)OCP聚集,集合成为成熟的破骨细胞,目前发现破骨细胞的形成通路有RANKL-RANK-OPG信号通路、ITAM信号通路、M-CSF信号通路^[22-24]。破骨细胞是唯一具有骨吸收功能的细胞,破骨细胞的作用为清除旧的骨基质,促进骨基质的新陈代谢,然而当破骨细胞的骨吸收功能亢进,旧骨基质的吸收速度小于新骨基质的形成即会造成骨质疏松^[4, 24]。

三、实验讨论与展望

本实验选用小鼠前破骨细胞系RAW264.7为研究对象,通过设定不同浓度的唑来膦酸盐实验组,最

终得出在唑来膦酸盐浓度为 10^{-5} mol/L时为抑制小鼠前破骨细胞系RAW264.7分化的最佳浓度。跟成骨细胞与破骨细胞建立共培养体系相比,目前多为对破骨细胞的直接研究,然而共培养体系具有更加接近人体内环境的优点。本实验选择了研究唑来膦酸盐在体外对前破骨细胞的直接作用,采用MTT法检测唑来膦酸盐对前破骨细胞的毒性作用和TRAP染色法检测破骨细胞的生成数目。本实验设计一方面可以观察唑来膦酸盐对前破骨细胞分化的直接作用,另一方面与建立成骨细胞与破骨细胞共培养体系相比,本实验所得出的浓度更具有实验指导意义。本实验的不足之处有:(1)仅从破骨细胞的生成角度考虑唑来膦酸盐对小鼠前破骨细胞RAW264.7的作用,而未进一步地从细胞凋亡的角度观察唑来膦酸盐的作用。(2)本实验未设立成骨细胞与小鼠前破骨细胞系RAW264.7共培养体系组,进而观察唑来膦酸盐对共培养体系中小鼠前破骨细胞系RAW264.7分化的抑制作用。(3)本实验仅从体外研究唑来膦酸盐对前破骨细胞分化的抑制作用,然而体外实验环境不能很好的模拟唑来膦酸盐在体内的作用过程。这些不足将是我们的下一步的研究重点。

四、小结

此次实验从细胞增殖和分化的角度探讨了唑来膦酸盐对小鼠前破骨细胞的抑制作用,为今后的细胞实验和动物实验提供了可靠实验浓度依据,同时为更加深入的细胞通路研究提供了基础支持。

参 考 文 献

- Wallace JJ, Rubin CT, Lieberman DE. Osteoporosis [J]. *Evol Med Public Health*, 2015, (1): 343.
- 张智海, 张智若, 刘忠厚, 等. 中国大陆地区以-2.0SD为诊断标准的骨质疏松症发病率回顾性研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(1): 1-8.
- Iba K, Yamashita T. Osteoclast-Mediated Pain in Osteoporosis [M]. Springer Japan, 2016: 23-34.
- 王想福, 孙凤岐, 叶丙霖, 等. 破骨细胞与骨质疏松症的关系研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(11): 1420-1424.
- Weinerman S, Ussera GL. Antiresorptive therapies for osteoporosis [J]. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 2015, 27(4): 555-560.
- 王会, 刘娟娟, 戚孟春, 等. 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 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(10): 1308-1311.
- Lagari VS, Mcaninch E, Baim S. Considerations regarding adherence of anti-osteoporosis therapy [J]. *Postgrad Med*, 2015, 127(1): 92-98.
- Lange U, Schett G. Osteoporosis [J]. *Z Rheumatol*, 2016, 75(5): 442-443.
- Hintze G, Graf D. [Osteoporosis] [J]. *Med Monatsschr Pharm*, 2016, 39(6): 228-234.
- 邱贵兴. 老年骨质疏松性骨折的治疗策略 [J/CD]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2015, 1(1): 1-5.
- Ishtiaq S, Fogelman I, Hampson G. Treatment of post-menopausal osteoporosis: beyond bisphosphonates [J]. *J Endocrinol Invest*, 2015, 38(1): 13-29.
- Maraka S, Kennel KA. Bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis [J]. *BMJ*, 2015, 351(4): h3783.
- Allen CS, Yeung JH, Vandermeer B, et al. Bisphosphonates for steroid-induced osteoporosis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 10: 1347.
- 邢帅, 高延征, 高坤, 等. 双膦酸盐类药物原发骨质疏松症研究进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2016, 5(3): 70-73.
- Miller PD, Pannaciuoli N, Brown JP, et al. Denosumab or zoledronic acid in postmenopausal women with osteoporosis previously treated with oral bisphosphonates [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(8): 3163.
- Liu M, Guo L, Pei Y, et al. Efficacy of zoledronic acid in treatment of osteoporosis in men and women-a meta-analysis [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(3): 3855-3861.
- Wang H, Hu ZH, Chen L, et al. [Influence of history of oral bisphosphonates on the incidence rate of fever after intravenous injection of zoledronic acid in patients with osteoporosis] [J]. *Beijing da xue xue bao*, 2016, 48(1): 680-682.
- Yu T, Witten PE, Huysseune A, et al. Live imaging of osteoclast inhibition by bisphosphonates in a medaka osteoporosis model [J]. *Dis Model Mech*, 2016, 9(2): 155-163.
- Hughes, DE, Wright KR, Uy HL, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo [J]. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(10): 1478-1487.
- Black DM, Reid IR, Boonen S, et al. The effect of 3 versus 6 years of zoledronic acid treatment of osteoporosis: a randomized extension to the HORIZON-Pivotal Fracture Trial (PFT) [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(2): 243-254.
- Schilcher J, Koeppen V, Aspenberg P, et al. Risk of atypical femoral fracture during and after bisphosphonate use [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(10): 974-976.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 337-342.
- Kim JH, Kim N. Signaling pathways in osteoclast differentiation [J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52(1): 12-17.
- 李子怡, 李玉坤. OPG/RANK/RANKL 信号通路在骨质疏松症中的研究进展和应用 [J/CD]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2017, 3(2): 124-128.
- Albert JS, Bhattacharyya N, Wolfe LA, et al. Impaired osteoblast and osteoclast function characterize the osteoporosis of Snyder-Robinson syndrome [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2015, 10(1): 27.

(收稿日期:2017-04-01)

(本文编辑:吕红芝)

张禄锴, 马剑雄, 赵杰, 等. 唑来膦酸抑制 RAW264.7 细胞系分化的最佳浓度体外实验 [J/CD]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2018, 4(1): 4-8.