

·论著·

电离辐射对原代成骨细胞 M-CSF 表达的影响

韩英 杨冰 唐泉 周慧 樊体强 樊飞跃 张晓东 孙元明

【摘要】目的 研究辐射对于原代成骨细胞巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)表达的影响,进而研究辐射导致骨损伤的分子机理。**方法** 采用原代骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞,经0、2、4 Gy ^{137}Cs γ 射线照射后,采用实时定量PCR以及Western blot方法检测辐射对M-CSF mRNA和蛋白表达水平的影响。**结果** 2 Gy和4 Gy γ 射线照射均能引起成骨细胞M-CSF mRNA ($t=-17.329$, $P<0.01$; $t=-3.841$, $P<0.05$)和蛋白表达水平上调。4 Gy照射后则会导致成骨前体细胞M-CSF mRNA表达水平上调($t=-4.478$, $P<0.05$),但与对照组比较,两者的蛋白表达水平未见显著差异。**结论** 2 Gy和4 Gy γ 射线照射后,成骨细胞M-CSF表达水平上调能增强核因子 κB 受体活化因子配体对破骨细胞分化、成熟的促进作用,有助于增强破骨细胞的骨吸收能力。

【关键词】 辐射, 电离; 成骨细胞; 破骨细胞; 放射疗法; 巨噬细胞集落刺激因子

Effects of radiation on macrophage colony stimulating factor in primary osteoblasts HAN Ying*, YANG Bing, TANG Quan, ZHOU Hui, FAN Ti-qiang, FAN Fei-yue, ZHANG Xiao-dong, SUN Yuan-ming.
*Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: SUN Yuan-ming, Email: yuanmings1962@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the radiation effect on the expression of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) in primary osteoblasts and the molecular mechanism of bone injury induced by radiation. **Methods** Osteoblasts differentiated from bone marrow stromal cells (BMSCs) were analyzed by real-time PCR and Western blot after 2 Gy or 4 Gy ^{137}Cs γ -irradiation. **Results** M-CSF mRNA and protein expression level were up-regulated after 2 Gy and 4 Gy irradiation ($t=-17.329$, $P<0.01$; $t=-3.841$, $P<0.05$) in osteoblasts. 4 Gy irradiation increased M-CSF mRNA in osteoblast precursors ($t=-4.478$, $P<0.05$), but do not affect the protein expression level. **Conclusions** These results indicated that up-regulated M-CSF in osteoblasts could enhance the function of osteoclasts' differentiation and maturation which induced by receptor activator of nuclear factor κB ligand after 2 Gy and 4 Gy irradiation. Further more, up-regulated M-CSF expression could enhance osteoclastic bone resorption of mature osteoclasts.

【Key words】 Radiation, ionizing; Osteoblasts; Osteoclasts; Radiotherapy; Macrophage colony-stimulating factor

放射治疗是肿瘤治疗的重要方法之一。虽然随着放射治疗仪器的不断发展,照射位置的精确程度不断提高,但是肿瘤附近区域还是不可避免地受到照射的影响。患者接受长期的肿瘤放射治疗可能导致骨折、骨脱钙、骨变薄、骨硬化等骨损伤^[1]。辐

射对于成骨细胞的损伤被认为是辐射造成骨损伤的主要原因^[2]。辐射可以影响成骨细胞增殖、分化,进而影响骨重建。

骨重建是一个持续的骨吸收和新骨形成的过程。其中,骨吸收主要是由破骨细胞进行,而新骨形成主要是由成骨细胞进行。成骨细胞和破骨细胞的功能和数量对于维持骨骼稳态极为重要^[3]。研究表明,成骨细胞所表达的核因子 κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor κB ligand, RANKL)与破骨细胞上的RANK相结合促进破骨细胞的增殖、分化并对其功能起到了重要的调节作用,但该作用可以被骨保护素抑制^[4]。Hodge等^[5]的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.01.002

基金项目: 国家自然科学基金(30970867); 中国医学科学院放射医学研究所学科发展基金(SF1105/ST1223)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室(韩英, 杨冰, 唐泉, 樊体强, 樊飞跃, 张晓东, 孙元明); 300070, 天津医科大学药学院(周慧)

通信作者: 孙元明(Email: yuanmings1962@163.com)

研究表明,成骨细胞所表达的巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)对破骨细胞的分化、增强成熟破骨细胞的生存以及功能也起到了重要的调节作用。M-CSF 对于破骨细胞的分化非常重要。

本研究旨在探讨辐射对成骨细胞不同分化阶段中 M-CSF 表达的影响,进而揭示在辐射影响下成骨细胞对破骨细胞调节功能的影响,进一步解释由辐射所导致的骨损伤的机理。

1 材料和方法

1.1 动物与分组

C57BL/6J 正常小鼠 9 只,雌性,7~8 周龄,体质量为 20~25 g,购自北京维同利华实验动物技术有限公司[许可证号:Sexk(京)2007-001]。随机分成 3 组,每组 3 只。

1.2 仪器

^{137}Cs γ 放射源为加拿大 GammaII40(吸收剂量率为 63.42 mGy/min);实时定量 PCR 仪为德国 Eppendorf Mastercycler ep realplex⁴;微量分光光度计为美国 Thermo 公司的 Nanodrop 2000;凝胶成像系统为美国 Biorad 公司的 ChemiDoc™ XRS+ System。

1.3 试剂

α -minimum essential medium 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;TRIzol[®] 试剂、莫洛尼氏鼠白血病毒逆转录酶试剂盒和实时定量 Platinum[®] SYBR-Green qPCR SuperMix-UDG 聚合酶试剂盒购自美国 invitrogen 公司;mammalian protein extraction reagent 蛋白裂解液购自美国 Thermo 公司;蛋白酶抑制剂购自德国 Roche 公司;聚偏二氟乙烯膜购自美国 Biorad 公司;脱脂奶粉购自美国 BD 公司;抗 β -肌动蛋白、M-CSF 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; β -甘油磷酸钠和维生素 C 购自美国 Sigma 公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒购自南京建成生物工程研究所;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

1.4 骨髓细胞悬液培养

全部小鼠皆颈椎脱臼处死。无菌取出小鼠双侧股骨,用注射器冲出骨髓细胞。在 20 ml 含 10% 胎牛血清的 α -minimum essential medium 培养基中制成单细胞悬液,分别装入 6 个 25 ml 培养瓶中,每

瓶 5 ml。在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度的细胞培养箱中培养 24 h。去除悬浮细胞、贴壁细胞,每 3 天换液 1 次,至贴壁细胞 80% 融合。

1.5 成骨细胞的诱导分化

根据文献[6],将 80% 融合的骨髓贴壁细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)换用成骨细胞分化培养液(osteoblast differentiation medium, OBDM)培养,每 3 天换液 1 次,培养 8 d 作为成骨前体细胞,培养 18 d 作为成熟的成骨细胞。OBDM 中含有 10% 的胎牛血清、10 mmol/L 的 β -甘油磷酸钠、50 $\mu\text{g/ml}$ 的维生素 C。

1.6 细胞照射

每组小鼠所取出的 6 瓶 BMSCs,其中 3 瓶在 OBDM 中培养 5 d,另外 3 瓶在 OBDM 中培养 15 d 后,用 ^{137}Cs γ 射线放射源按组别分别进行 0、2 和 4 Gy 照射。

1.7 ALP 组织化学染色

根据 ALP 染色试剂盒说明书,对经 OBDM 处理 8 d 和 18 d 后的骨髓贴壁细胞进行染色。

1.8 逆转录及实时定量 PCR

照射后 3 d,用 TRIzol 法提取总 RNA。RNA 样品用微量紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处的比值,进行 RNA 电泳,确定 RNA 的完整性和浓度。根据莫洛尼氏鼠白血病毒逆转录酶试剂盒和 Platinum[®] SYBR-Green qPCR SuperMix-UDG 聚合酶试剂盒说明书进行操作。PCR 反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,共 1 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,共 40 个循环。使用 β -肌动蛋白作为内参,各基因引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法^[7]来评价目的基因 mRNA 的表达水平。每个样品 3 个复孔,重复 3 次。

表 1 M-CSF 和 β -肌动蛋白的 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3'方向)
M-CSF	上游引物 CATCGAGACCCTCAGACATT
	下游引物 GCTGCTCTTTTCATCCAGTC
β -肌动蛋白	上游引物 GAGACCTCAACACCCAGCC
	下游引物 AATGTCACGCACGATTTC

注:表中, M-CSF 为巨噬细胞集落刺激因子。

1.9 蛋白提取及 Western blot

消化并收集细胞,使用添加蛋白酶抑制剂的 mammalian protein extraction reagent 蛋白裂解液裂解

细胞, 12 000 r/min, 离心半径为 7 cm, 离心 20 min, 取上清液即为细胞总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 取 50 μ g 上样, 进行 12%聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 电泳结束后, 将蛋白电转移至聚偏二氟乙烯膜上, 分别用抗 M-CSF 多抗 (工作浓度 1:500) 以及抗 β -肌动蛋白单抗 (工作浓度 1:1000) 检测 M-CSF 和 β -肌动蛋白的表达。

1.10 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件处理实验数据, 两两比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALP 染色结果

ALP 染色结果表明, 通过 18 d 的 OBDM 培养, 可成功将 BMSCs 诱导成为成骨细胞, ALP 染色可见 ALP 阳性 (棕红色) (图 1)。

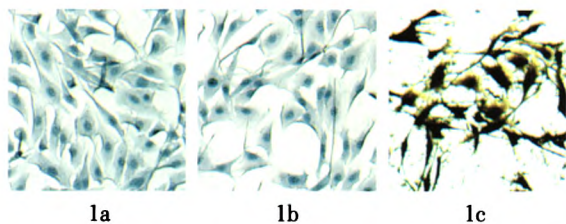


图 1 小鼠骨髓贴壁细胞碱性磷酸酶染色结果($\times 10$) 图中, 1a 为骨髓贴壁细胞; 1b 为经成骨细胞分化培养液处理 8 d 后的骨髓贴壁细胞; 1c 为经成骨细胞分化培养液处理 18 d 后的骨髓贴壁细胞。

2.2 实时定量 PCR 检测 M-CSF mRNA 表达水平

以 0、2 和 4 Gy γ 射线照射的细胞 cDNA 为模板, 通过实时定量 PCR 分别检测各受照射剂量细胞的 β -肌动蛋白、M-CSF 的 mRNA 表达量。相应的融解曲线见图 2、图 3。融解曲线中只有一个主峰, PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳证明为单条带, 表明 β -肌动蛋白、M-CSF 在扩增中没有出现非特异性产物和污染。本研究结果表明, 经过 2 Gy 和 4 Gy γ 射线照射后, 成骨细胞 M-CSF mRNA 表达水平明显升高 ($t = -17.329, P < 0.01$; $t = -3.841, P < 0.05$), 而 4 Gy γ 射线照射后则会导致成骨前体细胞 M-CSF mRNA 表达水平上调 ($t = -4.478, P < 0.05$) (表 2)。

2.3 Western blot 检测 M-CSF 蛋白表达水平

通过 Western blot 方法对经过 2 Gy 与 4 Gy γ 射线照射后的成骨前体细胞和成骨细胞总蛋白进行

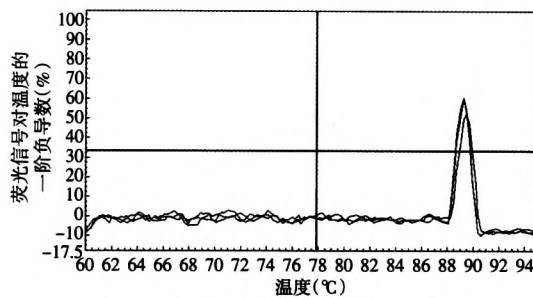


图 2 β -肌动蛋白基因的融解曲线

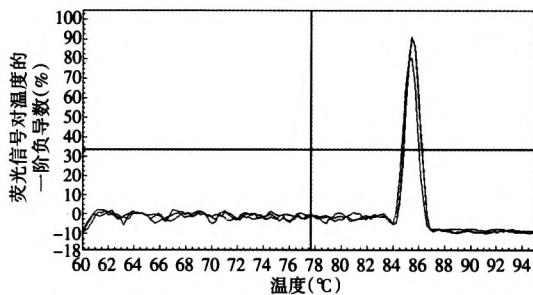


图 3 巨噬细胞集落刺激因子基因的融解曲线

表 2 不同照射剂量下成骨前体细胞和成骨细胞中巨噬细胞集落刺激因子 mRNA 表达水平 (与 0 Gy 剂量组相比)

组别	2 Gy	4 Gy
成骨前体细胞	0.93 \pm 0.08	1.12 \pm 0.05 ^a
成骨细胞	1.45 \pm 0.05 ^b	1.50 \pm 0.24 ^c

注: 表中, 与 0 Gy 剂量组相比, a: $t = -4.478, P < 0.05$; b: $t = -17.329, P < 0.01$; c: $t = -3.841, P < 0.05$ 。

M-CSF 蛋白表达水平分析。研究结果表明: 经 2 Gy 和 4 Gy γ 射线照射均可以导致成骨细胞 M-CSF 蛋白表达水平明显升高; 同时, 本研究结果发现, 经 4 Gy γ 射线照射后, 成骨前体细胞中 M-CSF 蛋白水平表达与对照组比较, 两者之间无显著差异 (图 4)。

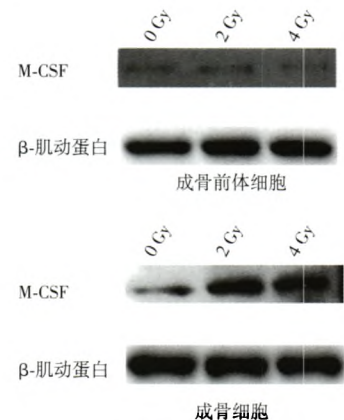


图 4 Western blot 分析巨噬细胞集落刺激因子蛋白表达水平 图中, M-CSF 为巨噬细胞集落刺激因子。

3 讨论

作为肿瘤治疗的重要手段之一,放射治疗广泛应用于临床治疗中。长期接受放射治疗会导致患者照射位点附近的骨损伤,进而导致骨质疏松、骨折等不良反应。在骨骼重建中,负责新骨形成的成骨细胞与破骨细胞的破骨细胞起到了至关重要的作用。成骨细胞与破骨细胞在数量和功能上的平衡以及两者之间的相互调节对于维持骨骼的稳态非常重要。

本研究中,采用成熟的方法将小鼠 BMSCs 通过 OBDM 诱导分化为成骨细胞,并对成骨前体细胞与成骨细胞进行 ALP 染色。ALP 是成骨细胞的重要标志基因。经 OBDM 处理 18 d 后, BMSCs 的 ALP 染色证实,本研究成功地将 BMSCs 诱导分化成为了成骨细胞。

在肿瘤的放射治疗中,照射对于肿瘤周围组织、骨骼会产生很大的影响。在治疗过程中,患者将会接受每次 1.8~2.0 Gy 的照射,照射的总剂量会达到 50~80 Gy,甚至更高。对宇航员来说,在持续 8~24 h 的较大太阳粒子事件中,宇航员将会接受 1~2 Gy 的照射^[1]。本研究选取了临床治疗与宇宙射线中宇航员会接触到的辐射剂量,以 2 Gy 和 4 Gy 的剂量对成骨细胞进行照射研究。

Tamma 和 Zallone^[8]的研究认为,成骨细胞可以通过 RANK/RANKL/骨保护素通路对破骨细胞的分化、功能、存活等进行调控。Hodge 等^[5]的研究表明,成骨细胞中表达的 M-CSF 同样对破骨细胞起到了重要的调控作用。M-CSF 可以增强 RANKL 诱导的破骨细胞的骨吸收能力。本研究旨在探讨在辐射影响下成骨细胞中 M-CSF mRNA 以及蛋白水平的变化情况,结果发现,2 Gy 和 4 Gy γ 射线照射后成骨细胞中 M-CSF mRNA 和蛋白表达水平明显升高。此结果表明,经 2 Gy 和 4 Gy γ 射线照射后, M-CSF 将会提高 RANKL 对破骨细胞的分化作

用以及破骨细胞的骨吸收能力。

放射治疗所导致的骨质疏松、骨折等不良反应已经引起越来越多的关注。越来越多的研究旨在提高放射治疗的疗效,降低其给患者带来的不良反应,提高患者的生存质量。本研究旨在探讨辐射导致骨损伤的分子生物学机理,结果发现,2 Gy 和 4 Gy γ 射线照射后成骨细胞中 M-CSF 表达上调,进而增强破骨细胞的分化、成熟以及功能。但是,辐射对于成骨细胞的影响涉及多种信号通路,如 Wnt/ β -catenin、Notch 等,也可能涉及多种信号通路的相互作用。因而还需要大量深入的研究来阐明其作用机理。

参 考 文 献

- [1] Willey JS, Lloyd SA, Nelson GA, et al. Space radiation and bone loss. *Gravit Space Biol Bull*, 2011, 25(1): 14-21.
- [2] Willey JS, Lloyd SA, Nelson GA, et al. Ionizing radiation and bone loss: space exploration and clinical therapy applications. *Clin Rev Bone Miner Metab*, 2011, 9(1): 54-62.
- [3] Sims SM, Panupinthu N, Lapierre DM, et al. Lysophosphatidic acid: a potential mediator of osteoblast-osteoclast signaling in bone. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(1): 109-116.
- [4] Tanaka H, Mine T, Ogasa H, et al. Expression of RANKL/OPG during bone remodeling in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(4): 690-694.
- [5] Hodge JM, Collier FM, Pavlos NJ, et al. M-CSF potently augments RANKL-induced resorption activation in mature human osteoclasts. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21462.
- [6] Hicok KC, Thomas T, Gori F, et al. Development and characterization of conditionally immortalized osteoblast precursor cell lines from human bone marrow stroma. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(2): 205-217.
- [7] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [8] Tamma R, Zallone A. Osteoblast and osteoclast crosstalks: from OAF to Ephrin. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012, 11(3): 196-200.

(收稿日期: 2012-09-09)