

风湿清对 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞 向破骨细胞分化的影响

苏晓慧¹, 孔祥英¹, 吴文彬¹, 万红叶¹, 杨悦¹, 吴振宇², 姜泉², 林娜^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的: 通过观察风湿清(Fengshiqing, FSQ)含药血清对 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化及细胞分泌骨免疫相关因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白介素-17 (IL-17)的影响,初步探讨 FSQ 缓解类风湿性关节炎(RA)骨破坏的机制。方法: 5%、10%、15% 3 个不同体积分数的 FSQ 含药血清与核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)诱导的 RAW264.7 共孵育 6 d,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色观察 TRAP 阳性多核细胞的形成;FSQ 含药血清(5%、10%、15%)与白介素-1 β (IL-1 β)诱导的 RAW264.7 细胞共孵育 24 h 后收集细胞上清液,ELISA 方法检测 TNF- α 和 IL-17 的含量。结果:RANKL 诱导 RAW264.7 细胞形成 TRAP 阳性多核细胞,IL-1 β 诱导 TNF- α 和 IL-17 在 RAW264.7 细胞中异常高表达,5%~15% FSQ 含药血清能剂量依赖地降低 TRAP 阳性细胞数;10%和 15%的 FSQ 含药血清能显著抑制 TNF- α ($P < 0.05$)以及 IL-17 ($P < 0.01$)的表达量。结论:FSQ 能抑制破骨前体细胞向破骨细胞分化,降低 TNF- α 和 IL-17 在 RAW264.7 细胞中的异常高表达,这可能是 FSQ 抑制骨破坏治疗 RA 的作用机制之一。

[关键词] 风湿清; 破骨细胞分化; 肿瘤坏死因子 α ; 白介素 17

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0173-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121206.1024.002.html>

[网络出版时间] 2012-12-6 10:24

Effects of Fengshiqing on Osteoclast Differentiation of RAW264.7 Cells Induced by RANKL

SU Xiao-hui¹, KONG Xiang-ying¹, WU Wen-bin¹, WAN Hong-ye¹,
YANG Yue¹, WU Zhen-yu², JIANG Quan², LIN Na^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Guanganmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Fengshiqing (FSQ) on osteoclast differentiation of RAW264.7 cells induced by receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL (RANKL) and the secretion of bone-related immune factor tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-17 (IL-17) in RAW264.7 cells. **Method:** RAW264.7 cells induced by RANKL were cultured with three variable volume fraction (5%, 10%, 15%) of serum containing FSQ *in vitro* 6 days. The influence of FSQ on osteoclast (RAW264.7 induced by RANKL) differentiation was observed by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. RAW264.7 cells induced by IL-1 β were cultured with three variable volume fraction of serum containing FSQ *in vitro* 24 hours, level of TNF- α , IL-17 in cell culture supernatant was examined by ELISA. **Result:** RANKL could induce RAW264.7 cell to form TRAP positive multinucleated cells, IL-1 β could induce abnormally high expression of TNF- α and IL-

[收稿日期] 20120917(524)

[基金项目] 国家科技部重大新药创制项目(2009ZX09301-005-007,2009ZX090502-019);国家自然科学基金项目(30873250);北京市自然科学基金项目(7082069)

[第一作者] 苏晓慧,硕士研究生,从事中药药理,E-mail: sxh66159@163.com

[通讯作者] *林娜,博士,研究员,博导,从事中药药理与中药药性研究, Tel:010-64014411-2869, E-mail: linna888@163.com

17 in RAW264.7 cells. Variable volume fraction (5%, 10%, 15%) of serum containing FSQ could decrease the number of TRAP-positive cells dose-dependently. In addition, FSQ (10%, 15%) also suppressed the expression of IL-17 ($P < 0.01$) and TNF- α ($P < 0.05$). **Conclusion:** FSQ has notable inhibiting effect on osteoclast differentiation of preosteoclast cells and suppressing expression of IL-17 and TNF- α in RAW264.7 cells induced by IL-1 β , which may be a part of the mechanism of FSQ for treating rheumatoid arthritis.

[**Key words**] Fengshiqing; osteoclast differentiation; tumor necrosis factor alpha; interleukin-17

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是表现为对称性外周关节炎的一种慢性系统性自身免疫疾病,患病后 5~10 年的致残率高达 60%,而关节局部持续的炎症过程是导致患者骨破坏的重要原因之一^[1-3]。风湿清(Fengshiqing, FSQ)是中国中医科学院广安门医院风湿科治疗 RA 的经验方,临床发现其单独和早期联合甲氨蝶呤均可以有效控制疾病活动度,改善风湿病情,延缓骨破坏进程^[4-6]。为探讨相关作用机制,本研究利用核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)诱导 RAW264.7 细胞向成熟破骨细胞分化的方法,探讨 FSQ 含药血清对破骨细胞分化的调节作用,同时通过观察对破骨细胞形成期细胞分泌骨免疫相关因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-17(IL-17)的影响,初步阐述 FSQ 缓解 RA 骨破坏的免疫调控机制。

1 材料

1.1 细胞 RAW264.7 细胞购自协和细胞中心。

1.2 药品与试剂 RPMI 1640 培养基(Gibico 公司);胰蛋白酶(Gibico 公司),FBS(Hyclone,公司),双抗(Gibico 公司),TNF- α , IL-17 ELISA 试剂盒(R&D 公司),抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(Sigma 公司),多聚赖氨酸(PLL)(ScienCell 公司),sRANKL(Peprotech 公司),白介素-1 β (Peprotech 公司),TNF- α (Peprotech 公司)。

1.3 仪器 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司),CO₂ 培养箱(上海力申科学仪器有限公司),倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司)。

2 方法

2.1 FSQ 含药血清的制备 大鼠随机分为正常对照组和 FSQ 组,各 20 只,FSQ 水煎液给药,24 mL·kg⁻¹·d⁻¹(给药组按成人临床等效剂量的 10 倍,对照组给予等量蒸馏水),2 次/d,连续 5 次。末次给药前禁食 12 h,不禁水。末次给药 1 h 后,乌拉坦麻醉,腹主动脉采血。4℃ 冰箱静置 1 h 后 3 000 r·min⁻¹ × 15 min 离心,分离血清,56℃ 水浴灭活 30 min,0.22 μ m 滤膜过滤分装,-20℃ 保存备用。

2.2 细胞培养 RAW264.7 细胞常规培养于含

2 mmol·L⁻¹ L-谷氨酰胺、100 U·mL⁻¹青霉素和 80 U·mL⁻¹链霉素的 RPMI 1640 培养基,置 37℃,5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。

2.3 TRAP 染色观察破骨细胞 将对数生长期 RAW264.7 细胞消化,制备单细胞悬液,以 2 × 10⁴ 个/mL 密度接种到 24 孔板中,未诱导组和 RANKL 诱导组接种 24 h 待细胞完全贴壁后,除正常对照外,均加入含 50 μ g·L⁻¹ RANKL 诱导,同时加 FSQ 含药血清使体积分数分别为 5%,10%,15%。未诱导组和 RANKL 诱导组仅添加相同体积分数的正常鼠血清,每 2 天换液 1 次,于第 6 天弃去培养基,PBS 缓冲液洗 1 次,用 2.5% 的戊二醛固定 6 min,再用 TRAP 液(按试剂盒说明配制)37℃ 避光孵育 1 h,PBS 洗 1 min,然后用苏木素复染 3~5 min,PBS 洗 3 min,倒置显微镜下观察。以 TRAP 染色阳性,细胞核 ≥ 3 个为破骨细胞。

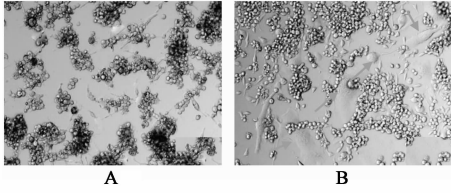
2.4 ELISA 法检测 FSQ 对细胞因子的影响 将对数生长期 RAW264.7 细胞消化,制备单细胞悬液,2 × 10⁴ 个/mL 密度接种到 24 孔板中,接种 24 h 待细胞完全贴壁后,除正常对照外,均加入含 IL-1 β (10 μ g·L⁻¹)诱导,同时分别加入不同体积分数的含药血清 FSQ,使其含药血清最终体积分数分别为 5%,10%,15%,未诱导组和 RANKL 诱导组仅添加相同体积分数的正常鼠血清,24 h 收集细胞上清液。ELISA 法检测 TNF- α ,IL-17 的含量,具体操作参照试剂盒说明。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 数据分析软件对实验数据进行统计分析处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析做组间数据分析, $P < 0.05$ 为组间具有显著性差异。

3 结果

3.1 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞 相差显微镜观察刚接种至板中的细胞呈圆形,培养 2 h 后开始贴壁。24 h 后加入含 50 μ g·L⁻¹ RANKL 的培养液培养,第 2 天出现少数多核细胞,第 4 天开始,多核细胞明显增多,形状不规则,体积较大,胞内可见大小不等的空泡,有的细胞有突出的伪足,培养第 6

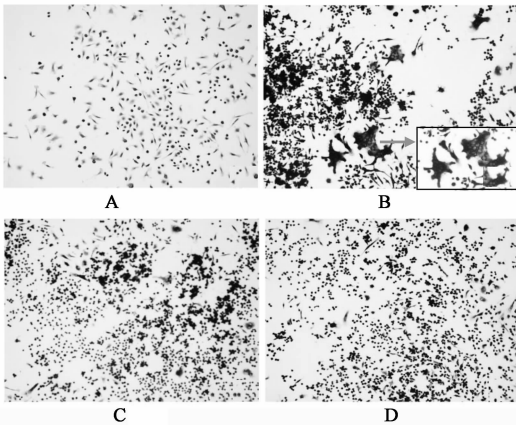
天,可见大量的多核细胞形成,见图 1。



A. 未诱导组;B. RANKL 诱导组(箭头示多核细胞)

图 1 RANKL 诱导对 RAW264.7 细胞的影响(相差显微镜,×200)

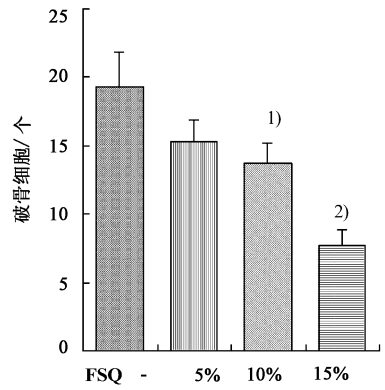
3.2 FSQ 对 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞形成破骨细胞的影响 诱导培养 6 d 后进行 TRAP 染色,可见空白对照组都是苏木素紫染的单核细胞,而 RANKL 诱导组出现很多多核细胞(核≥3 个),核紫染,细胞大,胞浆呈空泡状淡红色,胞膜边界不整,周边可见伪足伸展。与 RANKL 诱导组相比,在 FSQ 含药血清的作用下,破骨细胞的成熟度(细胞核数目、直径)及数量明显降低($P < 0.05$),说明 FSQ 含药血清具有明显的抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞形成破骨细胞的能力,见图 2~3。



A. 未诱导组;B. RANKL 诱导组;C. RANKL 诱导 + 5% FSQ 含药血清组;D. RANKL 诱导 + 10% FSQ 含药血清组

图 2 FSQ 对 RANKL 诱导的 RAW264.7 分化为破骨细胞的影响(TRAP 染色,×200)

3.3 FSQ 对 IL-1 β 诱导的 RAW264.7 细胞分泌骨免疫相关因子 TNF- α , IL-17 的影响 模型组 TNF- α , IL-17 水平较正常鼠血清组显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明 IL-1 β 诱导可显著提高 TNF- α 和 IL-17 在 RAW264.7 中的分泌水平;随着 FSQ 含药血清体积分数增大 TNF- α , IL-17 水平呈降低趋势,其中 10%,15% FSQ 含药血清可显著降低由 IL-1 诱导的 TNF- α 在 RAW264.7 培养上清中的异常高表达($P < 0.05$),说明 FSQ 含药血清可显著抑制 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α , IL-17。见表 1。



与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 3 不同体积分数 FSQ 含药血清对 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 1 FSQ 对 IL-1 β 诱导的 RAW264.7 细胞分泌

TNF- α , IL-17 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) ng·L⁻¹

分组	含药血清 /%	TNF- α	IL-17
对照	-	26.6 ± 2.5 ¹⁾	62.3 ± 1.5 ²⁾
IL-1 β 诱导	-	34.0 ± 4.7	100.9 ± 1.8
IL-1 β 诱导 + FSQ	5	25.7 ± 2.2	96.4 ± 1.4
	10	21.7 ± 1.3 ¹⁾	88.4 ± 2.3 ¹⁾
	15	18.8 ± 1.2 ¹⁾	77.0 ± 2.2 ¹⁾

注:与诱导组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

RA 是一种病因尚不清楚的以关节破坏为主要特点的慢性、全身性系统免疫疾病,其主要的病理特征是免疫异常、滑膜慢性炎症、软骨破坏和骨侵蚀。受累关节边缘的骨质侵蚀是 RA 的放射学特点之一,一旦骨质遭到破坏,则意味着其病理改变进入不可逆期。因此,延缓和阻止骨质破坏成为 RA 治疗的重要目标之一,探索逆转 RA 骨质破坏的方法也引起了广大研究者的关注。

中医认为 RA 的病机关键为湿热痹阻、瘀血阻络,临床治疗以清热活血通络为主。FSQ 由土茯苓、金银花、黄柏、赤芍、莪术等中药组成,具清热祛湿、活血止痛等功效,治疗 RA 疗效显著。临床研究发现 RA 患者服用 FSQ 治疗 1 年以上,关节骨破坏未见有显著进展,提示了 FSQ 在 RA 中的“护骨”作用^[6]。然而,FSQ 对延缓和阻止 RA 骨质破坏的机制如何,至今尚不清楚。

破骨细胞在 RA 骨质侵蚀中所起的关键作用已被研究证实^[7]。作为体内唯一具有骨破坏能力的细胞,破骨细胞来源于单核巨噬细胞系的多核终末分化细胞。利用 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞向成

熟破骨细胞分化的方法, 研究表明, 用 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞可以形成大量的破骨细胞 (TRAP 染色阳性), 而给予 FSQ 含药血清干预后能够明显抑制破骨细胞的分化。

新近的研究发现, IL-17 家族因子在关节损伤中发挥重要作用^[8]。IL-17 可以通过稳定靶基因的 mRNA 和上调受体的表达来增强滑膜细胞的炎症应答反应, 尚可以通过促进滑膜细胞的迁移和趋化因子表达来抑制滑膜细胞凋亡, 分泌金属蛋白酶导致关节损伤。而对免疫细胞有活化、促增殖和分化等作用的 TNF- α 在 RA 关节的损害中也起着十分重要的作用^[9-10], 能通过募集前体细胞、增强破骨细胞吸收骨质能力和诱导成骨细胞凋亡等几个环节, 最终对破骨细胞分化和活性进行调节而参与 RA 的骨质破坏^[11-13]。本研究发现, IL-17 和 TNF- α 经 IL-1 β 诱导下在 RAW264.7 细胞中异常高表达, 而一定体积分数的 FSQ 含药血清能显著抑制 IL-17 和 TNF- α 的水平。结合上面结果, 提示 FSQ 对 RANKL 诱导的破骨细胞分化的调控作用可能部分来自于对这些细胞因子的有效抑制。

综上, 本研究通过体外实验证明了 FSQ 显著抑制细胞因子 IL-17 及 TNF- α 在体外培养的 RAW264.7 中的分泌, 同时有效调节了 RANKL 诱导的破骨细胞分化, 这可能是 FSQ 延缓骨破坏治疗 RA 的分子机制之一。相关研究结果为 FSQ 治疗 RA 机制的进一步阐明提供初步的科学依据。

[参考文献]

[1] Firestein G, Panayi G, Wollheim F A. Rheumatoid arthritis [M]. 2nd Edit. Oxford: Oxford University Press, 2006:314.
[2] 黄旭光, 孙明霞, 孙永显, 等. 用胶原性关节炎模型探讨中药治疗类风湿性关节炎作用机制的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(12):62.
[3] 周新尧, 王雷, 余卫, 等. 清热活血方药治疗类风湿关

节炎 1 年后双手 X 线变化临床观察 [J]. 中国骨伤, 2011, 24(12):992.
[4] 姜泉, 殷海波, 罗成贵, 等. 清热活血方药治疗类风湿关节炎破坏 2 年期放射学研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(4):334.
[5] 姜泉, 冯兴华, 王承德, 等. 清热活血方药治疗类风湿关节炎患者 71 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2012, 53(6):488.
[6] 姜泉, 曹炜, 唐晓颇, 等. 清热活血方药治疗活动期类风湿关节炎的临床疗效观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(7):588.
[7] Lipsky P E. Osteoimmunology: a new area of rheumatology research [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008, 4(3):111.
[8] 黄明进, 罗春丽, 郭刚, 等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):174.
[9] 卢月, 曹雅晶, 钱瑞琴. IL-17 在类风湿性关节炎发病机制中的作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(22):855.
[10] O'Gradaigh D, Ireland D, Bord S, et al. Joint erosion in rheumatoid arthritis: interactions between tumour necrosis factor alpha, interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclasts [J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63(4):354.
[11] 李沛, 王大为, 刘晓东. 肿瘤坏死因子- α 及其受体与类风湿性关节炎 [J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(3):76.
[12] Goldring M B, Marcu K B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases [J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(3):224.
[13] Schett G, Middleton S, Bolon B, et al. Additive bone-protective effects of anabolic treatment when used in conjunction with RANKL and tumor necrosis factor inhibition in two rat arthritis models [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(5):1604.

[责任编辑 何伟]