

MMP-9 表达在不同方法获得破骨细胞的比较研究

杜明^{1,2)}, 何波¹⁾, 张小超¹⁾, 杨雪婷^{1,2)}, 陆义芹^{1,2)}, 陈鹏¹⁾, 沈志强¹⁾

(1) 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500; 2) 云南省第一人民医院药剂科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 比较基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 表达在机械法获得破骨细胞 (osteoclasts, OC) 和诱导法获得破骨样细胞 (osteoclast like cells, OLC) 的差异, 为体外培养 OC 提供实验依据。**方法** 采用机械分离方法, 从 1 d 龄 SD 大鼠四肢长骨获得成熟 OC; 利用 RANKL (100 ng/mL) 和 M-CSF (100 ng/mL) 诱导 RAW264.7 细胞形成 OLC。采用免疫细胞化学和原位杂交技术检测不同方法获得的 OC 和 OLC MMP-9 蛋白及其 mRNA 的表达。**结果** 诱导法 12 d 组的积分光密度和平均光密度均明显高于机械法 3 d 组。**结论** 诱导 12 d 的 OLC MMP-9 及其 mRNA 表达的明显高于机械法 3 d, 为 OLC 提供了进一步的实验数据。

[关键词] 破骨细胞; 破骨样细胞; 机械法; 诱导法; 基质金属蛋白酶 9

[中图分类号] R973 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 12 - 0001 - 05

Comparison of MMP-9 Expression in Osteoclasts Obtained by Different Methods

DU Ming^{1,2)}, HE Bo¹⁾, ZHANG Xiao - chao¹⁾, YANG Xue - ting^{1,2)}, LU Yi - qin^{1,2)}, CHEN Peng¹⁾, SHEN Zhi - qiang¹⁾

(1) *Pharmaceutical College & Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products of Yunnan Province, Kunming Medical University, Kunming Ynnnan 650500;* 2) *Pharmacy Department, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Ynnnan 650032, China)*

[Abstract] **Objective** To investigate the differences of protein and mRNA expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in osteoclasts (OC) and osteoclast-like cells (OLC) obtained by mechanical and inducement methods. **Methods** Mechanical separation method was used to separate mature osteoclasts from long bones of SD rats aged one-day; and inducement culture method was applied to induce OLC by using RANKL (100 ng/mL) and M-CSF (100 ng/mL). The protein expression of MMP-9 was measured by immunocytochemistry and mRNA expression of MMP-9 was assayed by in situ hybridization. **Results** The integral optical density (IOD) and average optical density (AOD) of positive cells in the visual field were higher in the 12-d group of inducement method as compared with the 3 d-group of mechanical method. **Conclusions** It is suggested that the protein and mRNA expression of MMP-9 in OLC obtained by 12 d inducement method is much high than in OC obtained by 3 d mechanical method. OLC obtained by inducement method can be applied in the study of osteoporosis.

[Key words] Osteoclast; Osteoclast like cells; Mechanical method; Inducement method; Matrix metalloproteinase 9

正常的骨代谢有赖于破骨细胞 (osteoclasts, OC) 所致的骨吸收与成骨细胞所致的骨形成这两个过程处于相对平衡状态。若这一平衡状态遭到破坏, 出现骨吸收大于骨形成时, 就可导致骨量的丢失。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30660212、81160401、81260493); 云南省社会发展计划重点项目 (2008CC009); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2009CD214、2004C0044M)

[作者简介] 杜明 (1979~), 男, 云南昆明市人, 在读硕士研究生, 主管药师, 主要从事药物学研究工作。

[通讯作者] 陈鹏. E-mail:cp99@yahoo.cn; 沈志强. E-mail:shzhq21cn@qq.com

失。在病理上,若 OC 异常活跃,造成了较深的吸收陷窝,而成骨细胞分泌的类骨质又不能足够地填充这些陷窝,就可导致骨量的丢失^[1]。常规的机械分离法获得的 OC 含量少,严重限制了分子生物学的研究。因此,探索一种永生化的、能方便使用的破骨细胞前体细胞系对骨科相关疾病的研究意义重大。破骨样细胞 (osteoclast like cells, OLC) 是指实验中原代培养或诱导生成的、具有 OC 特性、用于细胞学或分子生物学研究的细胞。

基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 亦称 IV 型胶原酶或明胶酶 B, 是 MMPs 家族的成员, 是一种重要的反映骨吸收的关键酶。由于其具有降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的功能, 并且通过降解细胞外基质, 在 OC 的迁移、侵蚀和锚着过程中发挥重要作用^[2]。因而, MMP-9 已成为研究防治骨质疏松症的重要靶标。

本实验在经典的机械分离法和骨髓细胞诱导培养法的基础上加以改进, 在对所获细胞的形态、分化及功能进行鉴别的基础上, 测定 OC 和 OLC 的 MMP-9 蛋白及 mRNA 表达水平量, 旨在进一步探索和比较两种不同方法所获取的破骨细胞的 MMP-9 表达的差异, 为体外培养破骨细胞提供方法学实验依据。

1 材料

1.1 药品和试剂

DMEM 培养基, Medium M199, GIBCO 公司产品; 小鼠重组可溶性 RANKL, 规格:10 μg , PEPROTECH 公司产品; M-CSF, 规格:10 μg , PEPROTECH 公司产品。胎牛血清 (FBS), 杭州四季青生物制品有限公司产品; 金属基质蛋白酶 -9 抗体, MILLIPORE 公司产品; MMP-9 原位杂交检测试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物和细胞

1 d 龄 SD 大鼠, SPF 级, 雌雄均用, 由昆明医科大学实验动物中心提供 (实验动物生产许可证: SCXK (滇 2005-008))。小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7, 购于上海中科院细胞库。

1.3 主要仪器

1 \times 71-12 FL/PH 型倒置相差显微镜 (日本, Olympus); 病理多头显微镜, DM4000B 型徕卡高级显微摄影系统 (德国, LEICA); Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件 (美国 Media Cybernetics)。HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图

文分析系统, 同济大学千屏影像工程公司。

1.4 方法

1.4.1 机械分离培养法制备 OC^[3,4] 1 d 龄 SD 大鼠, 拉颈处死后, 浸泡于 75% 乙醇中 1 min, 分离四肢长骨; 仔细清除附着于骨表面的软组织和骨骺, 骨干部分在冰 PBS 中清洗后放入盛有完全培养液 (15% FBS, 100 U/mL 硫酸链霉素, 100 U/mL 青霉素钠) 的玻璃平皿中, 平皿置于冰上; 用解剖刀片将骨质刮碎入培养液中, 再用旋涡混合器混悬 30 s \times 2 次, 每次静置 10 s 取上层悬液, 将 2 次所得上层细胞悬液 (含有 OC) 混合后均匀接种于 24 孔板, 每孔加完全培养液至 1 mL。常规静置培养 (5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 湿热) 30 min, 用预温的无血清培养液冲洗 2 次以洗去未贴壁细胞, 更换完全培养液 1 mL/孔继续培养, 隔天换液。于培养 3 d 后用倒置相差显微镜观察 OC 形态特征鉴定后用于实验。

1.4.2 诱导法制备 OLC^[5,6] 将 RAW264.7 细胞复苏后, 应用无酚红高糖 DMEM 完全培养液 (含体积分数为 15% FBS、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素和 0.01 mol/L HEPES 缓冲液) 于 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% CO₂ 培养。每隔 1~2 d 细胞换液 1 次, 换液前观察细胞形态、贴壁和生长情况。3~5 d 细胞铺满, 贴壁完好, 即可进行传代。当传代至所需的细胞数量后, 将细胞以 1×10^5 /孔接种在 24 孔板, 1 d 后更换为 OC 培养液, 每孔为 1 mL DMEM 全培养液 (含 100 ng/mL 的 RANKL, 100 ng/mL 的 M-CSF), 隔 2 d 细胞换液 1 次。于培养第 12 d 用倒置相差显微镜观察 OLC 形态特征鉴定后用于实验。

1.4.3 对破骨细胞基质金属蛋白酶 -9 蛋白表达的影响 实验分组: 机械法培养 3 d 组和诱导法 12 d 组, 每组 4 个复孔。

先用 0.1% 多聚赖氨酸处理盖玻片, 在 24 孔培养板中用盖玻片上常规培养 OC。孵育 24 h 后, 用 0.01 mol/L 的 PBS (pH = 7.4) 冲洗细胞 3 次, 然后用 4% 多聚甲醛固定 20~30 min, PBS 漂洗; 3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶; 滴加一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 滴加试剂 1, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次; 滴加试剂 2, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20~30 min; DAB 溶液显色后冲洗、封片。用图文分析系统检测视野中阳性细胞的积分光密度、平均光密度。

1.4.4 对破骨细胞 MMP-9 mRNA 表达的影响 实验分组同上。按原位杂交试剂盒说明, 针对大鼠 MMP-9 的 mRNA 序列为: (1) 5'-TCCCT

GCCCC A GACT GGTGA GCTGG ACAGC-3'; (2) 5'-CAACT CGGCA GGAGA GATGT GCGTC TTCCC-3'; (3) 5'-CCAGG TGGAC CACGT GGCCT ACGTG ACCTA-3'.

按试剂盒说明常规处理后, 滴加生物素化鼠抗地高辛, 37 °C 60 min. 原位杂交用 PBS 洗 5 min × 4 次. 滴加 SABC: 37 °C 20 min 或室温 30 min. 原位杂交用 PBS 洗 5 min × 3 次. 滴加生物素化过氧化物酶: 37 °C 20 min 或室温 30 min. 原位杂交用 PBS 洗 5 min × 4 次. DAB 显色, 充分水洗, 封片. 用图文分析系统检测视野中阳性细胞的积分光密度、平均光密度.

机械法培养 3 d OC; 诱导获得的第 12 天 OLC 每组固定 4 个孔的细胞爬片用 PBS 冲洗 3 遍. 按上述原位杂交步骤进行操作. 实验重复 3 次. MMP-9 的 mRNA 主要表达于破骨细胞胞浆中, 阳性细胞胞浆染色为棕黄色. 本实验用 Image-Pro Plus 图像分析系统检测视野中阳性细胞的积分光密度、平均光密度.

1.5 统计学处理

采用 SPSS 统计软件进行分析, 所有数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

3 结果

3.1 MMP-9 蛋白的表达

积分光密度: 诱导法 12 d 组积分光密度明显高于机械法 3 d 组积分光密度 ($P < 0.01$); 平均光密度: 诱导法 12 d 组平均光密度明显高于机械法 3 d 组平均光密度 ($P < 0.01$), 见图 1、表 1.

3.2 MMP-9 mRNA 的表达

积分光密度: 诱导法 12 d 组的积分光密度明显高于机械法 3 d 组的积分光密度 ($P < 0.01$).

平均光密度: 诱导法 12 d 组的平均光密度明显高于机械法 3 d 组的积分光密度 ($P < 0.01$), 见图 2、表 2.

表 1 机械法和诱导法获得的 OC 及 OLC MMP-9 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Expression of MMP-9 protein in OC and OLC obtained by mechanical and inducement methods ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	积分光密度	平均光密度
机械法 3 d	4	118.53 ± 3.42	0.34 ± 0.03
诱导法 12 d	4	212.22 ± 6.60**	0.45 ± 0.02**

与机械法组比较, ** $P < 0.01$.

表 2 机械法和诱导法获得的 OC 及 OLC MMP-9 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Expression of MMP-9 protein in OC and OLC obtained by mechanical and inducement methods ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	积分光密度	平均光密度
机械法 3 d	4	128.41 ± 4.97	0.31 ± 0.02
诱导法 12 d	4	251.56 ± 15.75**	0.52 ± 0.04**

与机械法组比较, ** $P < 0.01$.



图 1 机械法和诱导法分别获得的 OC 及 OLC MMP-9 蛋白的表达 (ICC)

Fig. 1 Expression of MMP-9 protein in OC and OLC obtained by mechanical and inducement methods



图 2 机械法和诱导法分别获得的 OC 及 OLC 内 MMP-9 mRNA 的表达 (ISH)

Fig. 2 Expression of MMP-9 mRNA in OC and OLC obtained by mechanical and induction methods

3 讨论

MMPs 是一组锌依赖的蛋白水解酶, 主要参与细胞外基质的代谢. MMP-9 是 MMPs 家族中的一员, 可特异性地降解 IV 型胶原, 在破骨细胞中呈高表达^[7]. MMP-9 在一些衬细胞中的表达, 可能与去除骨表面类骨质, 便于 OC 与矿化基质黏附有关. 而骨髓单核细胞 (包括单核破骨前体细胞) 中 MMP-9 的表达, 可能反映该酶参与 OC 的发育和募集过程^[8]. MMP-9 通过降解 ECM, 在 OC 的迁移、侵蚀和锚着过程中发挥作用^[9]. MMP-9 的缺失, 会阻碍破骨细胞的移动, 使破骨细胞聚集在类骨质和软骨界面处^[10]. 有学者报道: MMP-9 表达水平可随骨吸收活性的不同而改变^[11]. 抑制破骨细胞分化能够下调 MMP-9 表达^[12,13]. MMP-9 是一种重要的反映骨吸收和骨重建的关键酶, 且在破骨细胞性骨吸收中发挥重要作用^[14,15]. 是用于观察各种细胞因子、激素及药物对破骨细胞影响的常用指标之一.

积分光密度定义为测量标本结构范围内各个像素点光密度之和, 它可反映所测结构的光密度与面积的综合变化, 其与物质的质量成正比, 其数值反映物质的相对含量^[6]. 平均光密度定义为整个视野中每一点的光密度的叠加除以点数的总和. 在本实验中, 积分光密度和平均光密度的数值越大, 说明阳性细胞中所要检测的物质含量越多. 积分光密度和平均光密度可反映破骨细胞 MMP-9 及其 mRNA 表达的强弱. 结果表明, 诱导法 12 d 组的积分光密度和平均光密度均明显高于机械法 3 d 组, 提示诱导 12 d 的 OLC MMP-9 及其 mRNA 表达的明显高于机械法 3 d, 诱导获得的 OLC 可应用于骨质疏松的研究.

[参考文献]

- [1] CANALIS E. New treatment modalities in osteoporosis[J]. *Endocr Pract*, 2010, 16(5):855 - 863.
- [2] 王丽娜, 肖国强, 郭旭昌. 破骨细胞及其功能的调控[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(33):130 - 132.
- [3] 史凤芹, 于世凤. 体外破骨细胞分离培养方法的建立[J]. *中华骨科杂志*, 1994, 14(1):43 - 46.
- [4] 于明香. 破骨细胞的体外培养技术[J]. *国外医学内分泌分册*, 1995, 15(4):119 - 120.
- [5] CUETARA B L, CROTTI TN, ODOGNOGUE A J, et al. Cloning and characterization of osteoclast precursors from the RAW264.7 cell line [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*, 2006, 42(7):182 - 188.
- [6] MOCHIZUKI A, TAKAMI M, KAWAWA T, et al. Identification and characterization of the precursors committed to osteoclasts induced by TNF-related activation-induced cytokine/receptor activator of NF- κ B ligand [J]. *J Immunol*, 2006, 177(7):4 360 - 4 368.
- [7] WUCHERPFENNIG A L, LI Y P, STETLE-STEVENSON W G, et al. Expression of 92 kD type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclasts [J]. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(4):549 - 556.
- [8] 赵海波, 夏志道, 蔡国平, 等. 雌激素对实验性骨质疏松骨组织 I 型胶原和基质金属蛋白酶-9 表达的影响[J]. *中华老年医学杂志*, 1999, 18(1):42 - 44.
- [9] 高建军, 王洪复. 破骨细胞成熟和活化以及骨吸收机制[J]. *国外医学内分泌学分册*, 1998, 18(2):57 - 61.
- [10] LEE E R, MURPHY G, EI-ALFY M, et al. Active gelatinase B is identified by histozy m ography in the cartilage resorption sites of developing lone bones [J]. *Dev Dyn*, 1999, 215 (3):190 - 205.
- [11] REYNOLDS J J. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation[J]. *Oral Dis*, 1996, 2(1):70 - 76.
- [12] OKADA Y, NAKA K, KAWAMURA K, et al. Localiza-

至动作粗鲁或轻佻等^⑥。另外还给医学生开设相关的遗体捐献课程, 这样一方面可以作为独特的医学教育^⑦, 另一方面可以吸引更多的医学生成为未来的遗体捐献者^⑧。有条件的话医学院校还应该经常组织学生到遗体捐献纪念碑扫墓, 以示医学生对捐献者的尊重和纪念, 也体现了遗体捐献的社会价值, 同时也起到了宣传的作用。

云南省的遗体捐献工作还处于起步阶段, 要搞好云南省遗体捐献工作仍然是一条很漫长很艰辛的路, 尤其对于少数民族更加困难, 但笔者相信在政府和社会各界的共同努力下, 一定会有更多人加入到遗体捐献的队伍, 一定会有更多的人实现遗体捐献的崇高愿望。

[参考文献]

- [1] 柏宁, 孙福川, 岳长红. 我国遗体捐献现状及其制约因素的研究[J]. 中国医学伦理学, 2005, 18(4):59 - 60.
[2] 周君华, 李明月, 李慧瑜, 等. 广州市民遗体捐献意愿

及影响因素的调查与分析 [J]. 中国医学伦理学 2004, 17(3):40 - 41, 48.

- [3] 沈孝坤, 戴冀斌, 宋华妮, 等. 武汉市民对遗体捐献知识、态度和行为调查 [J]. 卫生软科学, 2004, 18(4): 194 - 197.
[4] 金新政, 邹庆波. 造血干细胞捐献者招募机制的影响因素与分析[J]. 卫生软科学, 2003, 17(3): 15 - 18.
[5] 陈海英. 我国遗体捐献的局限性问题分析[J]. 医学与哲学, 2000, 21(7):38 - 39.
[6] 张露青, 丁炯, 韩群颖. 人体解剖学教学中的医学伦理教育 [J]. 中华医学教育杂志, 2007, 27(3):24 - 25, 67.
[7] LOZANOFFS. The JABSOMWilled body donation program, a unique medicaleducational experience [J]. Hawaii Medical Journal, 2004, 63(8):243 - 244.
[8] ESSMA C C, LEBOVITZDJ. Donation education for medical students: enhancing the link between physicians and procurement professionals[J]. Prog Transplant, 2005, 15(2):124 - 128.

(2013 - 11 - 14 收稿)

(上接第 4 页)

tion of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption [J]. Lab Invest, 1995, 72(3):311-322.

- [13] GRIGORIADIS A E, WANG Z Q, CECCHIN M G, et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling [J]. Science, 1994, 266(5 184):443 - 448.
[14] SUNDARAM K, NISHIMURA R, SENN J, et al. RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9

gene expression during osteoclast differentiation [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(1):168 - 178.

- [15] HAN K Y, YANG D, CHANG E J, et al. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 74(6):911 - 923
[16] 李枫. 图像分析中光密度参数物理意义的正确理解和使用[J]. 解剖学杂志, 2009, 32(2):271 - 274.
(2013 - 10 - 12 收稿)