

· 论 著 ·

Raji-MG63 细胞共培养体系中心肌营养蛋白样细胞因子 1 (CLCF1) 对 RANKL/OPG 比值及成骨细胞分化的影响

陈娟 叶云金 谢丽华 陈赛楠 葛继荣 许惠娟*

福建省中医药科学院骨质疏松证候基因组学重点实验室, 福建 福州 350003

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 02-0157-05

摘要: 目的 探讨 Raji-MG63 细胞共培养体系中, 心肌营养蛋白样细胞因子 1 (cardiotrophin-like cytokine factor 1, CLCF1) 基因对骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)、核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 和成骨细胞分化的影响。方法 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 CLCF1 基因敲除 Raji 细胞系, 实验分 2 组: 对照组 (Control 组) 和 CLCF1 敲除组 (CLCF1-KO 组)。应用 Transwell 技术建立 Raji-MG63 细胞共培养体系, 通过蛋白质印迹法 (western blot, WB) 检测 CLCF1、OPG、RANKL 及 JAK2/STAT3 蛋白的变化。运用碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测和茜素红染色观察成骨细胞分化能力。结果 WB 结果显示, 与对照组比较, CLCF1 敲除组 OPG ($P < 0.01$) 蛋白明显下调, RANKL/OPG 比值升高 ($P < 0.001$), 磷酸化 JAK2 ($P < 0.001$) 和 STAT3 ($P < 0.01$) 蛋白明显下调, 差异具有统计学意义; ALP 活性检测和茜素红染色结果显示, Raji-MG63 细胞共培养体系中, CLCF1 敲除组 MG63 细胞 ALP 活性和矿化形成能力降低, 与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。结论 CLCF1 基因能通过调控 RANKL/OPG 比值和 JAK2/STAT3 通路影响成骨细胞分化。

关键词: CLCF1; RANKL/OPG; JAK2/STAT3 通路; 成骨分化; 骨免疫

The effect of cardiotrophin-like cytokine 1 (CLCF1) on the RANKL/OPG ratio and osteoblast differentiation in Raji-MG63 cell co-culture system

CHEN Juan, YE Yujin, XIE Lihua, CHEN Sainan, GE Jirong, XU Huijuan*

Key Research Laboratory of Osteoporosis Syndrome Genomics, Fujian Academy of Chinese Medical sciences, Fuzhou 350003

* Corresponding author; XU Huijuan, Email: 24526781@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of inhibiting the expression of Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1 (CLCF1) gene in Raji-MG63 cell co-culture system on osteoprotegerin (OPG) and nuclear factor- κ B receptor activator factor ligand (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) and osteoblast differentiation. **Methods** The CLCF1 knockout Raji cell line was constructed by CRISPR/Cas9 gene editing technology. The experiment was divided into 2 groups: control group (Ctrl group) and CLCF1 knockout group (CLCF1-KO group). Transwell technology was used to establish a Raji-MG63 cell co-culture system, and Western blot (WB) was used to detect the changes of CLCF1, OPG, RANKL and JAK2/STAT3 proteins. Alkaline phosphatase (ALP) activity detection and alizarin red staining were used to observe the differentiation ability of osteoblasts. **Results** Western blot result showed that compared with the control group, the OPG ($P < 0.01$) protein in the CLCF1 knockout group was significantly down-regulated, the RANKL/OPG ratio increased ($P < 0.001$), and JAK2 ($P < 0.001$) and STAT3 ($P < 0.01$) phosphorylated. The protein was significantly down-regulated, and the difference was statistically significant; the result of ALP activity detection and Alizarin Red staining showed that the Raji-MG63 cell co-culture system, the ALP activity and mineralization ability of MG63 cells in the CLCF1 knockout group were reduced, which was different from the control. Statistically significant ($P < 0.001$). **Conclusion** CLCF1 gene can affect osteoblast differentiation by regulating RANKL/OPG ratio and JAK2/STAT3 pathway.

Key words: CLCF1; RANKL/OPG; JAK2/STAT3; osteogenic differentiation; bone immunity

2000 年 Arron^[1]首次提出“骨免疫学”概念,讲述了骨骼系统与免疫系统之间的相互关系,在维持骨代谢平衡过程中,免疫因素发挥着重要作用。B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、细胞因子和趋化因子等均能与成骨细胞、破骨细胞相互作用,调节骨形成和骨吸收^[2-3]。其中,骨保护素(osteoprotegerin, OPG)/核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)系统是骨代谢与免疫系统之间的桥梁^[4]。OPG 主要来源于骨微环境内 B 细胞及浆细胞,对骨有保护作用。成骨细胞分泌 RANKL,可激活破骨细胞和单核巨噬细胞(破骨细胞前体细胞)膜表面的 RANK 受体,引起破骨细胞活化。

心肌营养蛋白样细胞因子 1(cardiotrophin-like cytokine factor 1, CLCF1)基因属于白细胞介素 6(IL-6)细胞因子家族成员,是一种 B 细胞刺激剂,与神经内分泌免疫调节密切相关^[5-6]。课题组前期研究发现,CLCF1 是绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)肾阴虚证关联基因^[7]。但 CLCF1 基因参与 PMOP 的具体机制尚不清楚。本研究通过构建 Raji-MG63 细胞共培养体系,研究 CLCF1 基因对 RANKL/OPG 比值和成骨细胞分化的影响。旨在从骨免疫角度,探讨 CLCF1 对 OPG/RANKL/RANK 信号系统的调控机制,阐明 PMOP 的骨免疫机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人 B 淋巴瘤细胞 Raji 细胞、人骨肉瘤细胞 MG63 均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;MEM 培养基(GIBCO 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, GIBCO 公司);青链霉素(Invitrogen 公司);CRISPR/Cas9 慢病毒系统(上海吉凯基因化学技术有限公司);CLCF1、OPG、RANKL、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、GAPDH 抗体(Abcam 公司);碱性磷酸酶检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);茜素红(南京凯基)。

1.2 方法

1.2.1 CLCF1 基因敲除 Raji 细胞株的构建:Raji 细胞用含 10% FBS、1% 双抗的 RPMI-1640 培养基,置于含 5% CO₂ 孵箱中以 37℃ 恒温培养。CRISPR/Cas9 基因编辑技术介导的 CLCF1 基因敲除 Raji 细胞株的构建,参考文献[8]。CLCF1 sgRNA 序列 5'-TTGAAGTCTGGCTCGTTGAA-3'。实验分 2 组:对照组(Control 组)和 CLCF1 敲除组

(CLCF1-KO 组)。转染前先将 Raji 细胞接种于 6 孔板中,Control 组和 CLCF1-KO 组按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)100,分别感染 CRISPR/Cas9-CLCF1 慢病毒及相应阴性对照慢病毒。24 h 后换正常培养液,转染 72 h 后通过荧光显微镜及 FCM 观察感染效率,并收取细胞进行相关检测。

1.2.2 Raji-MG63 细胞共培养体系的构建:应用 Transwell 实验建立共培养体系,将 Raji 细胞种植于 24 孔板 Transwell 小室上层,下层为成骨细胞系 MG63,细胞以完全培养基(RPMI1640 培养基+10% 胎牛血清+1% 双抗)常规培养。

1.2.3 Western blot 检测蛋白水平:运用 RIPA 裂解法提取转染后各组细胞总蛋白,定量蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白样品,110 V、120 g/L SDS-PAGE 分离蛋白 70 min。采用湿转系统,100 V 恒压转膜 60 min,50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h;分别加入 CLCF1 抗体(1:1 000)、OPG 抗体(1:1 000)、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 抗体(均 1:1 000)、RANKL 抗体(1:500)和 GAPDH 抗体(1:2 000)。4℃ 孵育过夜;1×TBST 漂洗 3 次,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(1:4 000),常温孵育 1 h;1×TBST 漂洗 4 次,避光条件下化学发光检测,并进行灰度值分析。以 GAPDH 作为内参计算目的蛋白相对灰度比值^[9]。

1.2.4 ALP 活性检测:参考碧云天碱性磷酸酶检测试剂盒说明书,收集各组细胞,计数后,添加 150 μ L 0.2% Triton X-100 裂解细胞,4℃,15 000 r/min 离心 15 min,收集上清液作为样品;向 96 孔板内添加 50 μ L 底物、30 μ L 缓冲液和 20 μ L 样品,在微孔板震荡器上充分振荡 1 min 后,37℃ 孵育 15 min;添加 100 μ L 反应终止液,在微孔板震荡器上充分振荡 1 min 后,酶标仪测量 405 nm 处的吸光值;同样方法进行空白(蒸馏水)对照和标准品的检测,实验数据取 ALP 活性与细胞蛋白总量的比值进行统计分析。

1.2.5 茜素红染色:细胞用 PBS 洗 2 次;每孔加入 2 mL 4% 中性甲醛溶液,固定 30 min;吸走中性甲醛溶液,用 PBS 洗 2 次;每孔加入 1 mL 茜素红染液染 3~5 min;吸走茜素红染液,用 PBS 洗 2 次;每孔加入 1 mL 10% 十六烷基吡啶,轻微摇晃 10 min 洗脱染料,吸取 200 μ L 加入 96 孔板中,分光光度计检测 540 nm 处吸光值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量资料

采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 两组比较采用 t 检验, 双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 CLCF1 基因表达对 RANKL/OPG 比值和 JAK2/STAT3 通路的影响

CRISPR/Cas9-CLCF1 慢病毒感染 Raji 细胞 72 h 后, Western blot 结果显示, 与对照组相比, CLCF1 基因敲除组 CLCF1 蛋白表达水平显著降低, 差异有统计学意义(图 1A), 提示成功建立 CLCF1 基因敲除的 Raji 细胞株。

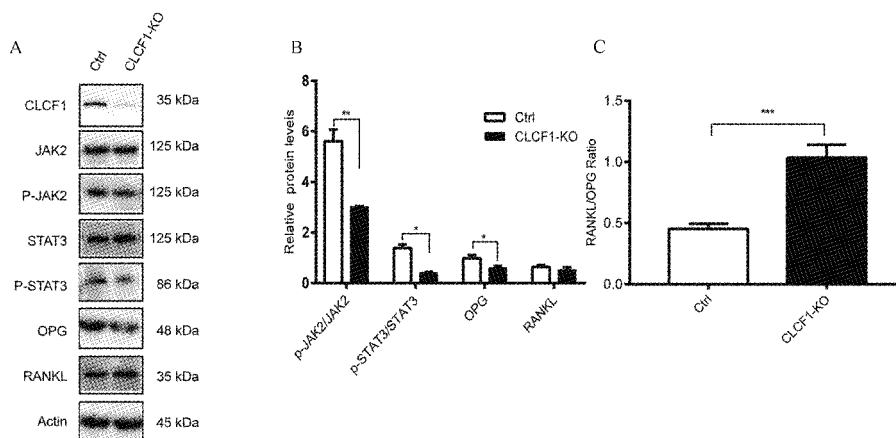


图 1 CLCF1 对 JAK2/STAT3 通路和 RANKL/OPG 比值的影响

A: Western blot 分析 CLCF1 基因敲除对 JAK2/STAT3 通路及 RANKL 和 OPG 影响; B: 相对蛋白质水平的定量分析; C: Western blot 分析显示 CLCF1 基因敲除对 RANKL/OPG 比值的影响。注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Fig.1 Effects of CLCF1 on the JAK2/STAT3 pathway and RANKL/OPG ratio

2.2 抑制 CLCF1 基因表达对成骨细胞分化的影响

为了探讨 CLCF1 基因能否通过 RANKL/OPG 系统影响成骨细胞分化, 笔者通过 Transwell 小室建立了 Raji-MG63 细胞共培养系统。通过碱性磷酸酶 (ALP) 活性和茜素红 S 染色水平分析 MG63 细胞成骨分化能力。结果表明, 与对照组相比, CLCF1 基因敲除组 MG-63 细胞 ALP 活性降低(图 2A)。钙结节的数量和体积明显低于对照组, 茜素红半定量结果显示 CLCF1 基因敲除组成骨能力弱于对照组, 差异有统计学意义(图 2B)。提示抑制 CLCF1 基因表达能抑制成骨细胞分化。WB 结果显示, CLCF1 基因敲除组 MG63 细胞 OPG 蛋白表达水平明显降低, RANKL 蛋白上调, RANKL/OPG 比值升高; 同时, p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 比值降低。与对照组比较, 差异具有统计学意义(图 2C)。

为探讨 CLCF1 基因对 RANKL/OPG 和 JAK2/STAT3 通路的调控作用, 笔者检测了相关蛋白的表达变化。结果显示, 与对照组相比, CLCF1 基因的敲除显著降低 OPG 的表达, 但对 RANKL 的表达影响轻微(图 1A, 图 1B)。与对照组相比, CLCF1 基因敲除增加了 RANKL/OPG 比率(图 1C)。此外, CLCF1 基因敲除组, p-JAK2 和 p-STAT3 水平均减少(图 1A), p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 比值降低(图 1B)。说明抑制 CLCF1 表达, 会抑制 JAK2/STAT3 通路的激活, 并影响 RANKL/OPG 的比值。

3 讨论

CLCF1 作为 IL-6 家族的细胞因子, 参与调节 B 细胞的增殖和运动神经元的发育。然而, CLCF1 在骨代谢的生理和病理学中的作用尚待明确。本研究结果表明, 抑制 CLCF1 的表达能使 JAK2/STAT3 通路失活、RANKL/OPG 比值升高。此外, CLCF1 基因敲除能抑制成骨细胞分化。提示 CLCF1 可能通过调节 RANKL/OPG 平衡在免疫介导的骨代谢中发挥作用。

骨免疫学的概念指出, 骨质疏松症、类风湿关节炎和牙周炎等慢性炎症性疾病通过激活免疫细胞合成的细胞因子来诱导骨丢失^[10-11]。在这方面, 许多被认为与骨免疫相关的细胞因子, 如白细胞介素 6 (IL-6)^[12]、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)^[13]、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)^[14]、核因子- κ B 受体激活剂 (RANK) 及其配体 (RANKL)^[15] 都被发现参与了这

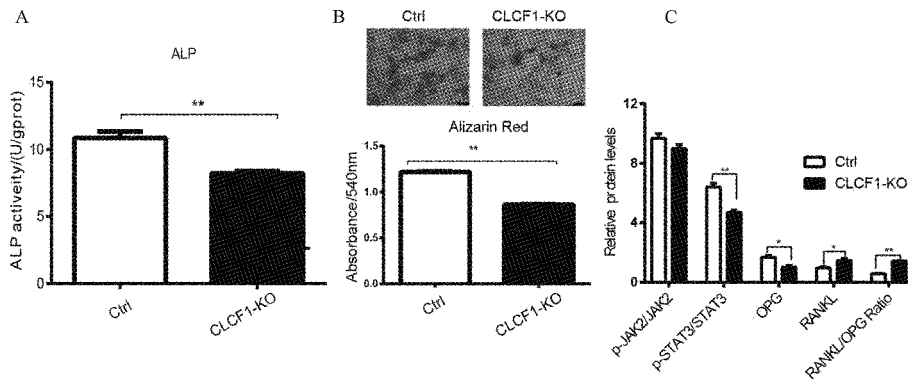


图2 CLCF1 基因敲除对 Raji-MG-63 共培养体系中 MG-63 细胞成骨分化的影响

A: MG63 细胞 JAK2/STAT3 通路和 RANKL/OPG 的相对蛋白水平的定量分析; B: MG-63 细胞 ALP 活性评价成骨能力的分析; C: 茜素红染色分析 MG63 细胞成骨能力。注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Fig.2 Effect of CLCF1 gene knockout on osteogenic differentiation of the MG-63 cells in the Raji-MG-63 co-culture system

一生物学过程。OPG/RANK/RANKL 通路在骨免疫中的作用已被广泛报道。RANKL 负责刺激破骨细胞分化和骨吸收,而 OPG 通过阻断 RANKL 抑制骨吸收。OPG、RANKL 和其唯一受体 RANK 是调节破骨细胞分化成熟的重要信号系统,在骨质疏松中起重要作用^[16]。RANKL 能激活单核巨噬细胞(破骨细胞前体细胞)膜表面的 RANK 受体,促进破骨细胞的活化^[17]。RANKL 作为一种重要的细胞因子,能调节 T 细胞和早期阶段 B 细胞的发育和功能,对免疫系统发育也起着重要作用。OPG 与 RANK 竞争性地结合 RANKL,阻断 RANKL 与 RANK 结合,从而抑制破骨细胞前体细胞的分化,起到抑制骨吸收的作用^[18]。因此 OPG/RANKL/RANK 信号系统被认为是骨免疫研究的介入点。

作为 IL-6 细胞因子家族的一员,CLCF1 在免疫细胞中高表达。CLCF1 的作用主要在于支持运动神经元的生存和发育。同时,CLCF1 在免疫调节功能和 B 细胞扩张中也发挥重要作用,影响 B 细胞群的存活和分化^[19]。研究^[20]表明,由 B 细胞所表达的 RANKL 促进破骨前体细胞分化,并引发骨吸收。在骨骼生物学中起着至关重要的作用。IL-6 家族的成员,包括睫状神经营养因子(CNTF)、白血病抑制因子(LIF)、心肌营养因子-1(CT-1)和肿瘤抑制素 M(OSM)等已被证明能在病理条件下刺激成骨细胞分化并促进骨吸收^[21-22]。和其他 IL-6 家族细胞因子不同的是,关于 CLCF1 在骨代谢中作用的数据甚少报道。本研究结果表明,抑制 CLCF1 基因表达,会引起 RANKL/OPG 比值失调。因此,笔者推测,CLCF1 基因可能通过调节 B 细胞 RANKL/OPG 的平

衡,从而在骨免疫和骨代谢中发挥重要作用。

CLCF1 也参与 JAK/STAT 级联反应的调节。Mukut Sharma 等^[23]的研究表明,CLCF1 诱导的 STAT3 磷酸化。CLCF1 作为潜在循环因子,促进肾小球足细胞中的 JAK/STAT 信号通路,在人类肾脏疾病局灶节段性肾小球硬化(FSGS)发生发展过程中发挥作用^[24]。JAK2/STAT3 通路在骨质疏松症的发生和发展中起着重要作用。最近的研究^[25-26]表明 JAK2/STAT3 通路能调节 RANKL 水平并增强破骨细胞的分化。此外,本研究结果表明,CLCF1 基因敲除后,抑制了 JAK2/STAT3 通路的激活。提示 CLCF1 可能通过 JAK2/STAT3 调控 RANKL/OPG 的表达,进而影响骨代谢,这一点有待于后续深入的研究。

综上所述,本研究结果显示 CLCF1 可能是骨免疫调控基因,通过调控 B 淋巴细胞,影响 OPG 的生成,继而影响 RANKL/OPG 的平衡和成骨分化,参与骨代谢过程。这些结果为免疫-骨骼相互作用的机制提供了新的理解,并为 CLCF1 作为病理性骨丢失的创新治疗靶点提供了前景。

【参 考 文 献】

- [1] Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system[J]. Nature, 2000, 408(6812): 535-536.
- [2] Ponzetti M, Rucci N. Updates on osteoimmunology: what's new on the cross-talk between bone and immune system[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 236.
- [3] de Vries TJ, El BI, Kamradt T, et al. What are the peripheral blood determinants for increased osteoclast formation in the various inflammatory diseases associated with bone loss? [J].

- Frontiers in Immunology, 2019, 10:505.
- [4] Sobacchi C, Menale C, Villa A. The RANKL-RANK axis: A bone to thymus round trip [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10:629.
- [5] Lelievre E, Plun-Favreau H, Chevalier S, et al. Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: Specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(25) : 22476-22484.
- [6] Larsen JV, Kristensen AM, Pallesen LT, et al. Cytokine-like factor 1, an essential facilitator of cardiotrophin-like cytokine: ciliary neurotrophic factor receptor alpha signaling and sorla-mediated turnover [J]. Molecular and Cellular, 2016, 36 (8) : 1272-1286.
- [7] Ge JR, Xie LH, Chen J, et al. Liuwei Dihuang Pill treats postmenopausal osteoporosis with Shen (kidney) Yin deficiency via janus kinase/signal transducer and activator of transcription signal pathway by up-regulating cardiotrophin-like cytokine factor 1 expression [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2018, 24(6) : 415-422.
- [8] Hochheiser K, Kueh AJ, Gebhardt T, et al. CRISPR/Cas9: A tool for immunological research [J]. European Journal of Immunology, 2018, 48(4) : 576-583.
- [9] 陈娟, 谢丽华, 李生强, 等. hsa-miR-655 靶向 CLCF1 基因对成人成骨样肉瘤细胞 MG63 细胞 OPG/RANKL 系统表达的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(11) : 1409-1414.
- [10] Nakamura MC. Osteoimmunology: Entwined regulation of integrated systems [J]. Seminars in Immunopathology, 2019, 41 (5) : 547-549.
- [11] Srivastava RK, Dar HY, Mishra PK. Immunoporosis: immunology of osteoporosis role of T cells [J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9:657.
- [12] Wang T, He C. TNF-alpha and IL-6: The link between immune and bone system [J]. Current Drug Targets, 2020, 21 (3) : 213-227.
- [13] Ilesanmi-Oyelere BL, Schollum L, Kuhn-Sherlock B, et al. Inflammatory markers and bone health in postmenopausal women: A cross-sectional overview [J]. Immunity & Ageing, 2019, 16:15.
- [14] Zur Y, Rosenfeld L, Bakhman A, et al. Engineering a monomeric variant of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) that antagonizes the c-FMS receptor [J]. Biochemical Journal, 2017, 474(15) : 2601-2617.
- [15] Liu Y, Wang C, Wang G, et al. Loureirin B suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and ovariectomized osteoporosis via attenuating NFATc1 and ROS activities [J]. Theranostics, 2019, 9 (16) : 4648-4662.
- [16] Stuss M, Rieske P, Ceglowska A, et al. Assessment of OPG/RANK/RANKL gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after treatment with strontium ranelate and ibandronate in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013, 98(5) : E1007-E1011.
- [17] Zhao J, Huang M, Zhang X, et al. MiR-146a deletion protects from bone loss in OVX mice by suppressing RANKL/OPG and M-CSF in bone microenvironment [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2019, 34(11) : 2149-2161.
- [18] Xu S, Zhang Y, Liu B, et al. Activation of mTORC1 in B lymphocytes promotes osteoclast formation via regulation of beta-Catenin and RANKL/OPG [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2016, 31(7) : 1320-1333.
- [19] Rose-John S. Interleukin-6 family cytokines [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2018, 10(2) : 1-17.
- [20] Stefan A Hienz, Sweta Paliwal, Saso Ivanovski. Mechanisms of bone resorption in periodontitis [J]. Journal of Immunology Research, 2015, 2015: 615486.
- [21] Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer [J]. Nature Reviews Immunology, 2018, 18(12) : 773-789.
- [22] Sims NA. Cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) and neuropeptide (NP) signalling and their roles in development, adulthood, cancer and degenerative disorders [J]. Cytokine and Growth Factor Reviews, 2015, 26(5) : 517-522.
- [23] Sharma M, Zhou J, Gauchat JF, et al. Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors attenuate the effect of cardiotrophin-like cytokine factor 1 and human focal segmental glomerulosclerosis serum on glomerular filtration barrier [J]. Translational Research, 2015, 166(4) : 384-398.
- [24] Savin VJ, Sharma M, Zhou J, et al. Renal and hematological effects of CLCF-1, a B-Cell-Stimulating cytokine of the IL-6 family [J]. Journal of Immunology Research, 2015, 2015: 714964.
- [25] Li C, Zhao J, Sun L, et al. RANKL downregulates cell surface CXCR6 expression through JAK2/STAT3 signaling pathway during osteoclastogenesis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 429(3-4) : 156-162.
- [26] Li CH, Xu LL, Jian LL, et al. Stattic inhibits RANKL-mediated osteoclastogenesis by suppressing activation of STAT3 and NF-kappaB pathways [J]. International Immunopharmacology, 2018, 58: 136-144.

(收稿日期: 2020-10-10; 修回日期: 2020-11-02)