

# 类风湿关节炎中破骨细胞的研究进展

★ 黄艳 王明艳\* 周学平\*\* (南京中医药大学 南京 210029)

关键词:类风湿关节炎;破骨细胞;综述

中图分类号:R 593.22 文献标识码:A

RA 是一种慢性、系统性、自身免疫性疾病,病程进展中体现了炎症、滑膜组织增生、自身免疫三种病理生理过程,异常增生的滑膜组织侵蚀关节周围肌腱、韧带、软骨及骨,造成关节进行性破坏、畸形,最终出现不同程度的功能障碍。破骨细胞(Osteoclast OC)在类风湿关节炎(RA)关节内局部骨侵蚀过程中具有重要作用<sup>[1]</sup>。为了更好的了解类风湿关节炎的发病机制,探讨影响破骨细胞分化和骨吸收活性的分子机制,本文将破骨细胞的研究进展综述如下。

## 1 RA 中的破骨细胞来源及鉴定

### 1.1 破骨细胞的来源

血液来源的炎性单核巨噬细胞以及滑膜本身的组成细胞 A型滑膜细胞(巨噬细胞样细胞)可在一定条件下诱导分化为破骨细胞,是 RA 关节内破骨细胞的来源<sup>[2~4]</sup>。骨髓也是 RA 关节内破骨细胞的来源之一<sup>[4]</sup>。

### 1.2 破骨细胞的鉴定

在研究破骨细胞的分化及骨吸收活性时均需要对破骨细胞进行鉴定,比较常用的鉴定方法有如下三种:(1)倒置相差显微镜下活体细胞形态学观察。典型的 OC 态多种多样,呈圆形、不规则形及葡萄串形,胞体大,胞核为 3~30 个不等,质膜边界不整,周边可见伪足伸展。

(2)TRAP 染色细胞观察。TRAP 染色,破骨细胞酶活性部位呈红色,分布于胞浆内,细胞核呈阴性。TRAP 染色通常作为鉴定破骨细胞的重要指标。同时通过 TRAP 阳性多核细胞数的定量分析,可以了解 ACP 的活性。

(3)噬骨试验。骨吸收陷窝甲苯胺蓝染色细胞观察破骨细胞在象牙骨片上形成的骨吸收陷窝经甲苯胺蓝染色呈蓝色圆形或不规则形,边界清楚,大小不一。

## 2 RA 中影响破骨细胞分化的因素

RA 中受累关节区域中破骨细胞及其前体细胞活性及数量的上调与骨质破坏的严重程度相关。尽管多种细胞因子或激素可以影响破骨细胞及其前体细胞活性及数量,但最后的决定因素是细胞核因子 κB 受体活化因子配基(RANKL)

和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)。进一步研究表明,在典型破骨细胞基因:降钙素受体(CT)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、组织蛋白酶 k(cathepsin K)以及  $\beta_3$  整合素的表达中,RANKL 和 M-CSF 都是必需的。

### 2.1 RANKL

RANKL 是一种 II 型跨膜蛋白,由细胞内区域和细胞外区域组成。其细胞外区域与 TNF 相关蛋白具有高度同源性,属于 TNF 家庭成员。与骨保护素配体(OPGL)、破骨细胞分化因子(ODF)、肿瘤坏死因子(TNF)相关激活诱导细胞因子(TRANCE)为同一分子。2000 年,美国骨矿研究学会(ASBMR)将它们标准化命名为 RANKL。

人 RANKL 由 317 个氨基酸组成,可通过三种截然不同的形式表达,一种是含 317 个氨基酸的缩氨酸的细胞结合形成,一种是细胞结合形式的蛋白在 140 或 145 的位置通过酶切后由外部区域重组的形式,还有一种是原分泌形式。细胞结合形式是最普遍存在的,可通过许多细胞类型表达,原分泌形式仅限于活化的 T 细胞和鳞状癌细胞表达<sup>[5]</sup>。

RANKL 在 RA 滑膜成纤维细胞、肥大的软骨细胞、成骨细胞、活化 T 淋巴细胞表面均有表达,并受多种因素调节,一些亲骨因子和激素如 PTH,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,IL-1 $\beta$ ,IL-6,IL-17,TNF- $\alpha$  和 PGE<sub>2</sub> 上调 RANKL 的表达<sup>[6,7]</sup>。在 RA 中炎性因子 IL<sub>6</sub> 可以通过促进 RAFLs(RA 滑膜成纤维细胞)细胞表面 RANKL 的表达,起到间接促进破骨细胞分化的作用<sup>[1]</sup>。有研究提示在 RANKL 存在的情况下 TNF- $\alpha$  可促进破骨细胞的分化,但 TNF- $\alpha$  不能取代 RANKL。TNF- $\alpha$  加速破骨细胞的形成,但并不延长其寿命<sup>[8]</sup>。也有研究认为 TNF- $\alpha$  可以直接诱导破骨细胞分化并刺激其活性从而在骨代谢中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。在 RA 患者体内,T 细胞和成纤维细胞等活化增殖,释放上述一系列的因子,导致 RANKL 的大量释放,进而激活破骨细胞的分化与成熟,促进破骨而导致骨质的丢失。

#### 2.1.1 RANKL 受体 - RANK RANKL 受体有两种,一种

\* 通讯作者:王明艳,Email:wangmy666@sina.com.

\*\* 基金课题:教育部留学回国人员启动基金项目(2006331)

是细胞核因子受体 κB 受体活化因子(RANK),是 TNFR 家族成员,存在于破骨细胞或破骨细胞前体细胞表面。RANKL 与 RANK 结合后,可促进破骨细胞前体细胞的分化,并使破骨细胞内结构发生改变,如肌动蛋白细胞骨架的重排、基底膜与骨表面紧密结合形成一个密闭的腔隙,并向这个小腔隙中分泌 H<sup>+</sup>使之酸化,还分泌 TRAP 和组织蛋白酶前体,溶解酶在酸性环境中被活化,进而产生骨吸收<sup>[10]</sup>。

2.1.2 RANKL 受体 - OPG RANKL 受体的另外一种受体是抑骨素(OPG),OPG 与 RANKL 的结合能力比 RANK 强,可以竞争性的阻碍 RANKL 与 RANK 的结合,达到抑制破骨细胞分化的目的 RANKL 表达于 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 细胞、CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 细胞、滑膜成纤维细胞、肥大的软骨细胞等。

## 2.2 M-CSF

M-CSF 也称为 CSF-1,它结合在破骨细胞前体细胞表面的受体 c-FMS,对破骨细胞前体细胞的存活和增殖提供必要的信号<sup>[2]</sup>。研究证明,M-CSF 存在时几种炎症细胞因子,例如 TNF-α 能不依赖 RANKL 直接促进破骨细胞的分化和激活<sup>[11,12]</sup>,IL-1 能不依赖 RANKL 直接激活破骨细胞的骨质吸收功能<sup>[13]</sup>。

## 3 影响破骨细胞吸收功能的重要因素——细胞内钙离子

破骨细胞的骨吸收功能还与细胞内钙离子浓度密切相关。多种细胞因子、激素、药物可使破骨细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高,降低破骨细胞骨吸收活性<sup>[14]</sup>。

具有骨吸收活性的破骨细胞,必须能移动并附着于骨基质表面,这个过程与细胞的伪足密切相关。破骨细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的升高可使破骨细胞的伪足回缩,使破骨细胞的移动和粘附功能减弱,降低破骨细胞骨吸收活性。伪足是 Ca<sup>2+</sup> 调节性结构,伪足上对 Ca<sup>2+</sup> 敏感的结构是凝胶溶素—一种 Ca<sup>2+</sup> 依赖性肌动蛋白<sup>[15]</sup>。凝胶溶素与 Ca<sup>2+</sup> 结合后,微丝断裂,细胞骨架重组,形成新的排列组合,改变细胞形态,从而抑制破骨细胞的骨吸收。研究表明,破骨细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 过高使破骨细胞易于从骨基质表面脱离,降低破骨细胞的骨吸收活性。结果显示,破骨细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高,伴随细胞的伪足回缩,这可能是影响破骨细胞骨吸收功能的因素之一<sup>[16]</sup>。破骨细胞回缩,细胞伸展面积减小,减低破骨细胞的骨吸收活性。其作用机制是 Ca<sup>2+</sup> 作用于破骨细胞骨架。使细胞内微丝收缩、断裂,细胞的波状缘消失,破骨细胞去极化,细胞伸展功能下降,从而降低破骨细胞骨吸收功能。

## 4 中药对 RA 骨侵蚀的保护作用的研究进展

罗氏<sup>[17]</sup>等认为雷公藤甲素(TP)能够抑制佐剂性关节炎(AA)大鼠外周血单核细胞(PBMC)RANKL mRNA 表达,其机制可能与下调 AA 大鼠外周血 TNF-α、IL-1β 水平有关。魏氏<sup>[18]</sup>等认为补肾通络中药防治 RA 骨侵蚀的可能效应应是通过 RANKL /OPG 系统发挥作用,可能通过上调 OPG,下调 RANKL,增高 OPG/RANKL 比值对 RA 骨侵蚀起保护作用。现中药对 RA 骨侵蚀的保护作用的研究还较少,中药阻止 RA 骨侵蚀的作用方式、途径、环节和靶点尚待进一步深入研究。

总之,在 RA 中影响破骨细胞分化及骨吸收活性的因素很多,如果我们能更好的了解 RA 中破骨细胞分化及骨吸收活性的分子机制,将有利于治疗 RA 的新药的发展以及中药治疗 RA 的作用机理的研究和探讨。

## 参考文献

- [1] 姜军,吕厚山,林剑浩,等.类风湿关节炎中白三烯 B4 间接分化破骨细胞的实验研究[J].中华风湿病学杂志,2005,9(11):660-663.
- [2] Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, et al. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro[J]. Endocrinology, 1998,139(10):4 424-4 427.
- [3] Itonaga I, Fujikawa Y, Sabokbar A, et al. Rheumatoid arthritis synovial macrophage-osteoclast differentiation is osteoprotegerin ligand-dependent [J]. J Pathol, 2000,192(1):97-104.
- [4] Quinn JM, Neale S, Fujikawa Y, et al. Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells [J]. Calcif Tissue Int, 1998,62(6):527-531.
- [5] 王燕,支忠继,李玉坤. RANKL, M-CSF 和破骨细胞体外培养[J].中国骨肿瘤骨病,2004,3(2):122-124.
- [6] Jones DH, Kong YY, Penninger JM. Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2002,61(2):32-39.
- [7] Wu Y, Liu J, Feng X, et al. Synovial Fibroblasts Promote Osteoclast Formation by RANKL in a Novel Model of Spontaneous Erosive Arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2005,52(10):3 257-3 268.
- [8] 赵玉鸣,葛立宏,Aggi E Grigoriadis. 肿瘤坏死因子-α 对小鼠破骨细胞分化的影响[J].北京大学学报,2005,37(4):433-435.
- [9] 孙嗣国,马保安,周勇,等.肿瘤坏死因子-α 诱导外周血单核细胞分化为破骨细胞[J].第四军医大学学报,2005,26(5):1 988-1 991.
- [10] Saldenberg Kermanac'h N, Cohen Solal M, Bessis N, et al. Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation [J]. Joint Bone Spine, 2004,71(1):9-13.
- [11] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction [J]. J Exp Med, 2000,191(2):275-286.
- [12] Fuller K, Murphy C, Kirstein B, et al. TNFalpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL [J]. Endocrinology, 2002,143(3):1 108-1 118.
- [13] Jimi E, Nakamura I, Duong LT, et al. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblast/stromal cells [J]. Exp Cell Res, 1999,247(1):84-93.
- [14] Zheng MH, Wood DJ, Papadimitriou JM, et al. Evidence that protein kinase-A, calcium-calmodulin kinase and cytoskeletal proteins are involved in osteoclast retraction induced by calcitonin [J]. Exp Mol Pathol, 1992,57(2):105-115.
- [15] Marchisio PC, Cirillo D. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interaction [J]. Exp Cell Res, 1987,169:202-224.
- [16] 孟增东,裴福兴,向明,等.17β-雌二醇对体外培养破骨细胞钙离子浓度的影响[J].中国矫形外科杂志,2003,11(23):1 625-1 627.
- [17] 罗波,胡永红,涂胜豪,等.雷公藤甲素对佐剂性关节炎大鼠外周血单核细胞核因子 κB 受体激活剂配基表达的影响[J].华中科技大学学报(医学版),2006,35(2):265-267.
- [18] 魏国强,李钊,吴卓,等.补肾通络中药在类风湿性关节炎骨侵蚀中的保护效应[J].中药材,2007,30(7):894-896.

(收稿日期:2008-03-13)