

# TNFR1/RANK 嵌合体的构建及其在研究破骨细胞分化中的意义

许多荣, 罗绍凯, 童秀珍, 李娟  
(中山大学附属第一医院血液科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】构建肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)膜外部分和核转录因子 NF- $\kappa$ B 受体激动剂 (RANK)跨膜及膜内部分相结合的嵌合体, 探讨其在破骨细胞(OC)分化中的意义。【方法】克隆 TNFR1/RANK 嵌合体的 cDNA, 用 platt E 将其包装成逆转录病毒, 通过感染将这种逆转录病毒转染到敲除 TNFR1/R2 基因的小鼠 (TNFR1- /R2-)骨髓巨噬细胞(BMM)中, 用 TNF $\alpha$  刺激, 分别观察 OC 的分化及骨的重吸收能力;用 Western Blot 方法证实 TNFR1/RANK 是通过 NF- $\kappa$ B、JNK、P38 和 ERK 蛋白的磷酸化来调节 OC 的分化和功能。【结果】在 TNF $\alpha$  刺激下, BMM 能分化成 OC, 而且分化出的 OC 能明显地导致骨质破坏。TNF $\alpha$  刺激 BMM 5 min 后磷酸化的 NF- $\kappa$ B、JNK、P38 和 ERK 蛋白的表达明显增强。【结论】TNFR1/RANK 嵌合体具有完整的分子结构和生物功能, 可作为研究 RANK 结构、功能及其信号途径的一个简便、有效的生物工具。

关键词: TNFR1/RANK; 嵌合体; 破骨细胞; 分化; 克隆

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2007)04-0378-05

## Construction of TNFR1/RANK Chimera and Its Significance in Study of Differentiation in Osteoclast

XU Duo-rong, LUO Shao-kai, TONG Xiu-zhen, LI Juan  
(Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To construct a TNFR1/RANK chimera which consists of TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) extracellular domain linked to transmembrane domain and cytoplasmic domain of RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B) to study its significance in osteoclasts (OC) differentiation. 【Methods】 The authors firstly cloned the cDNA of TNFR1/RANK chimera and produced the retrovirus using packing cell platt E, then infected BMM (bone marrow macrophage) isolated from TNFR1/R2 double knockout mice with the retrovirus. After treated by TNF- $\alpha$ , the authors inspected the differentiation and bone resorption of OC. Finally the authors confirmed chimeric TNFR1/RANK regulated OC differentiation and function through phospholation of NF- $\kappa$ B, JNK, P38, and ERK by Western blot analysis. 【Results】 Stimulated by TNF $\alpha$ , not only BMM can differentiate into OC, but also the differentiated OC can cause bone destruction. Five minutes after stimulated by TNF $\alpha$ , expression of protein phospholation of NF- $\kappa$ B, JNK, P38 and ERK obviously increased. 【Conclusion】 TNFR1/RANK chimera has a complete molecular construction and biological function and can be used as an effective and simple biological tool for the study of construction, function, and signaling pathways of RANK.

Key words: TNFR1/RANK; chimera; osteoclast; differentiation; clone

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(4):378-382]

破骨细胞(osteoclast, OC)的分化受两个重要细胞因子的调节: 单核/巨噬细胞集落刺激因子

(monocyte/macrophage-clone stimulating factor, M-CSF) 和核转录因子 NF- $\kappa$ B 受体激动剂的配体

收稿日期: 2007-01-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30670997); 教育部归国人员启动基金项目(2005546); 广东省自然科学基金项目(5300754, 06021319)

作者简介: 许多荣(1968-), 男, 安徽芜湖人, 博士, 副教授, E-mail: xudr@hotmail.com

(ligand of receptor activator of nuclear factor kappa B, RANKL)。M-CSF 主要维持 OC 的生长, RANKL 则促进 OC 的定向分化<sup>[1-3]</sup>。RANKL 必须与其受体 RANK 结合, 再通过 NF- $\kappa$ B、JNK、P38 和 ERK 蛋白的磷酸化来调节 OC 的分化和功能<sup>[4]</sup>, 所以 RANK 是起作用的关键环节。正常的骨髓巨噬细胞(BMM)中存在内源性 RANK, 但很难直接在机体活细胞内研究其结构和功能。为了克服这一难题, 我们成功地构建了一种新的肿瘤坏死因子受体 1/核转录因子 NF- $\kappa$ B 受体激动剂 (tumor necrosis factor receptor 1/receptor activator of nuclear factor kappa B, TNFR1/RANK) 嵌合体(chimera), 其膜外部分由 TNFR1 膜外部分组成、膜内部分由 RANK 跨膜和膜内部分组成, 它具有完整的分子结构和生物功能, 完全可以替代内源性 RANK 的作用, 现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

野生型 C3h 小鼠购于美国 Harlan Industriy in Indianapolis, 肿瘤坏死因子受体基因敲除小鼠 (TNFR1-/- R2-/-) 购于美国 the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME); 质粒 pBluescript SK<sup>+</sup>、质粒 PMX-puro、包装细胞 Plat E、M-CSF、GST-RANKL: 由美国阿拉巴马大学伯明翰分校 (University of Alabama at Birmingham) 病理实验室 Xu Feng 教授提供; 抗体 I B-、Phospho-I B-、SAPK/JNK、Phospho-SPAK/JNK、P38 MAP Kinase、Phospho-P38 MAP Kinase、P44/42 MAP kinase、Phospho-P44/42 MAP kinase 及磷酸酶抑制剂和磷酸酶抑制剂 购于美国 Cell Signaling 公司。用于扩增 TNFR1 膜外部分 (TNFR1-Ext) 的 cDNA 引物序列为(美国 Sigma 公司合成): P1:5'-TCTAGAATGGGTCTCCCCACCGTGCTGGCCTGCTG-3'; P2:5'-TCTAGAACCTGAGTCTGGGGTTGTGACATTTGC-3' (两端酶切位点均为 Xba<sup>I</sup>)。用于扩增 RANK 跨膜、膜内部分(RANK-TM/RANK-Cyt) cDNA 引物序列为: P1:5'-TCTAGAATGGGTCTCCCCACCGTGCTGGCCTGCTG-3'; P2:5'-TCTAGAACCTGAGTCTGGGGTTGTGACATTTGC-3' (P1 的 5' 含 Spe<sup>I</sup>; P2 的 5' 含 BamH、stop code 和 mLu-1)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 CH3 小鼠、TNFR1-/- R2-/- 小鼠的 BMM 和包装细胞 Plat E 培养参考<sup>[5]</sup>。

1.2.2 质粒 PMX-TNFR1/RANK 的克隆 TNFR1/RANK 主要由两个部分组成: TNFR1 膜外部分 (TNFR1-Ext)、RANK 跨膜和膜内部分 (RANK-TM/RANK-Cyt)。先培养正常小鼠 BMM, 再从 BMM 中提取总 RNA, 用 RT-PCR 分别获得带有酶切位点的 TNFR1-Ext 片段和 RANK-TM/RANK-Cyt 片段。利用 Xba<sup>I</sup> 酶切位点将 TNFR1-Ext 片段克隆到质粒 pBluescript SK<sup>+</sup> 上, 再用 Spe<sup>I</sup> 和 BamH<sup>I</sup> 酶切位点将 RANK-TM/RANK-Cyt 片段克隆到质粒 pBluescript SK<sup>+</sup> 上。这样, 整个 TNFR1/RANK 的 cDNA 就被克隆到质粒 pBluescript SK<sup>+</sup> 上。然后再利用 Not<sup>I</sup> 和 EcoR<sup>I</sup> 切下含 TNFR1/RANK 的 cDNA 并亚克隆到质粒 PMX 上, 最后完成 PMX-TNFR1/RANK 的构建 (图 1)。重复实验 3 次以上, 直至所有克隆序列最后都经测序证实是正确无误的。

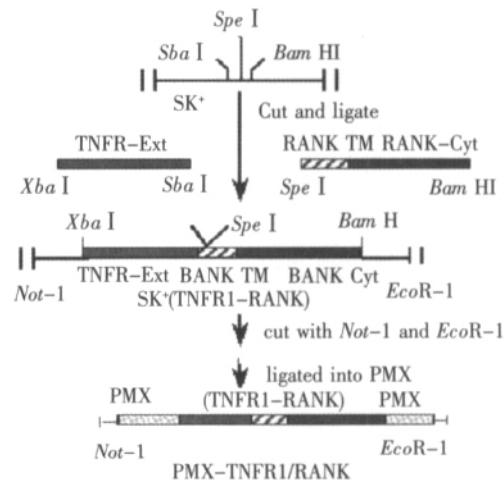


图 1 PMX-TNFR1/RANK 嵌合体的构建

Fig.1 Construction of TNFR1/RANK chimera

1.2.3 表达 PMX-TNFR1/RANK 的逆转录病毒的包装 在上述准备好的 Plat E 细胞培养盘中加入 4  $\mu$ g 构建好的质粒 PMX-TNFR1/RANK, 利用脂质体 Plus<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen Cat No:10964021)、Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen Cat No:50470) 将质粒 PMX-TNFR1/RANK 转入包装细胞 Plat E 中, 连续 3 d 收集含逆转录病毒的细胞培养液, 并用直径 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤备用<sup>[5]</sup>。

1.2.4 逆转录病毒感染 BMM 及其感染效率的鉴

定向培养好的 BMM 培养盘(60 mm × 60 mm)中加入 3 mL 含病毒悬液、2.4 mL 10 培养液、6 μL polybrene (Sigma H-9268, 终浓度为 4 μg/mL)和 M-CSF(终浓度为 10 ng/mL)。第 2 天用 puromycin (Sigma P-7255, 终浓度为 24 μg/mL)筛选出病毒感染的阳性细胞。分别收集  $1 \times 10^6$  个未感染(uninfected) BMM 和感染后的(infected) BMM,作直接免疫荧光标记(Direct Immunofluorescence Labeling)实验<sup>[5]</sup>以鉴定 TNFR1/RANK 的逆转录病毒能否感染 BMM,以及感染后 TNFR1/RANK 蛋白能否表达在 BMM 的细胞膜上。

**1.2.5 破骨细胞形成实验** 将感染和未感染的 BMM ( $5 \times 10^4$ )分别加入 24 孔培养孔中,加入 1 mL 10 培养液,再分别加入 10 ng M-CSF、10 ng M-CSF+100 ng RANKL、10 ng M-CSF+10 ng TNF- 不同组合的细胞因子。每隔 2 d 更换培养液及各细胞因子 1 次,观察 OC 形成并进行 TRAP 染色<sup>[5]</sup>。

**1.2.6 骨重吸收实验** 用切片机将鲸鱼牙片制成约 0.6 cm × 0.6 cm 大小的薄片,放入 PBS 溶液中高压灭菌后备用。在选择 24 孔培养板中的培养孔中,每孔加入一块牙片,磷酸缓冲液浸泡 2 h 后除去缓冲液,然后再向孔中  $5 \times 10^4$  个感染后的 BMM,并加入 10 ng M-CSF、10 ng M-CSF+100 ng RANKL、10 ng M-CSF+10 ng TNF- 不同组合的细胞因子,放入 37 °C、7%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中,进行培养。每两天更换培养液及细胞因子一次。当 OC 出现高峰后 2~3 d 取出骨片,用 0.25 mol/L 氢氧化氨清除骨片上残留细胞,晾干。液氮下镀金 2 h。

最后,在电镜下观察骨吸收情况,并摄片<sup>[5]</sup>。

**1.2.7 Western 免疫印迹 检测 NF-κB、JNK、P38 和 ERK 蛋白的磷酸化。**

## 2 结果

### 2.1 逆转录病毒感染 TNFR1-/- R2-/- 小鼠的 BMM 及其效率的鉴定

直接免疫荧光标记实验结果发现:感染后的阳性细胞所携带的荧光明显增强,其峰值明显右移(图 2)。这表明嵌合体 TNFR1/RANK 蛋白不仅能成功地表达,而且表达在 BMM 的细胞膜上。

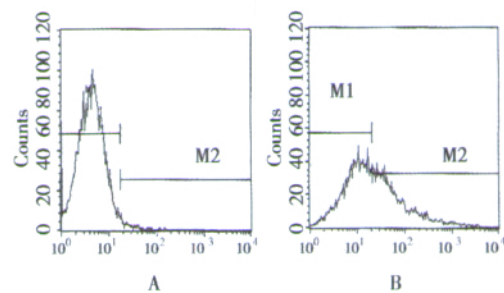


图 2 TNFR1/RANK 蛋白在 BMM 膜上的表达

Fig.2 Expression of TNFR1/RANK protein on the membrane of BMM

A: uninfected BMM ; B: infected BMM

### 2.2 OC 形成实验证实 TNFR1/RANK 具有诱导 OC 分化的功能

OC 形成实验结果表明:未感染组和感染组 BMM 单独在 M-CSF 刺激下不能形成 OC;但在

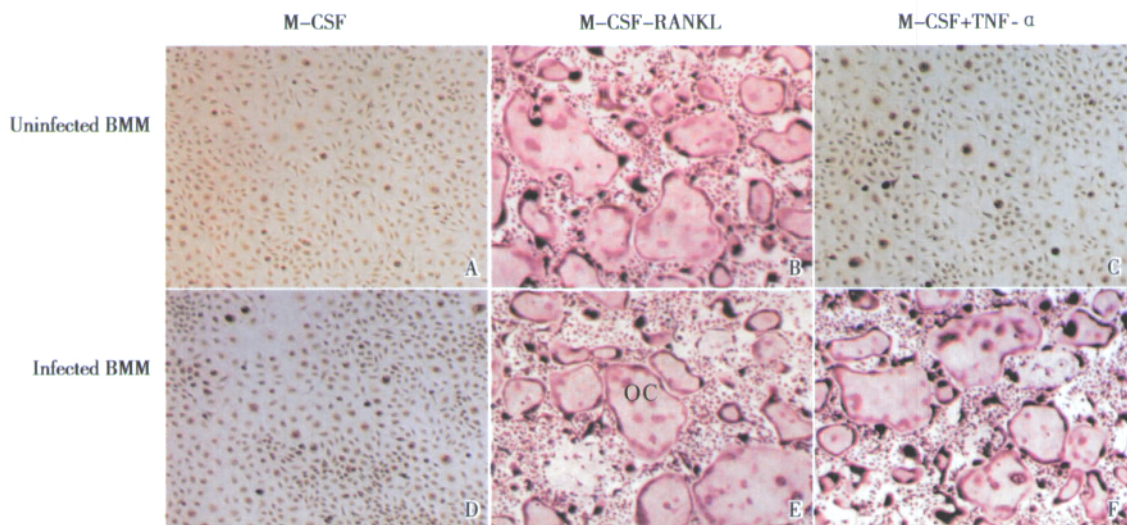


图 3 不同细胞因子刺激下破骨细胞的分化情况

Fig.3 Differentiation of OC treated by different cytokines

A, B and C express uninfected BMM treated by M-CSF, M-CSF+RANKL, and M-CSF+TNF- $\alpha$  respectively; D, E, and F express infected BMM treated by M-CSF, M-CSF+RANKL, and M-CSF+TNF- $\alpha$  respectively.

M-CSF+RANKL 刺激下两组均出现了 OC, 这正说明了内源性 RANK 能诱导 OC 形成, 重要的是: 在 M-CSF+TNF- $\alpha$  刺激条件下, 感染的 BMM 出现大量的 OC, 而阴性对照未发现 OC, 表明这个外源性的 TNFR1/RANK 嵌合体能诱导 BMM 分化成 OC。

### 2.3 骨吸收实验证实 TNFR1/RANK 具有调节骨的重吸收功能

骨吸收实验结果表明: 感染后的 BMM 不仅能分化成 OC, 而且分化出的 OC 具有骨的重吸收能力 (图 4)。

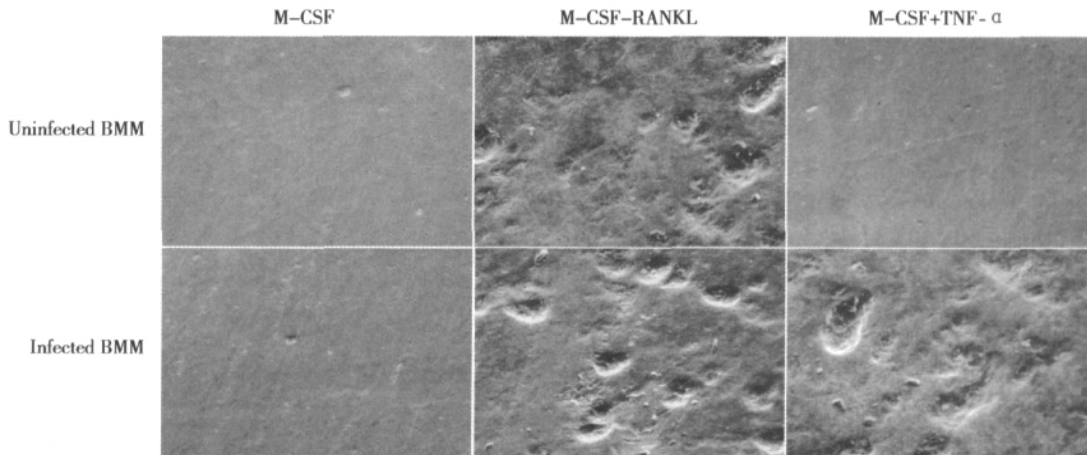


图 4 TNFR1/RANK 诱导出的 OC 对骨的重吸收

Fig.4 Bone resorption of OC induced by TNFR1/RANK

### 2.4 TNFR1/RANK 通过 NF- $\kappa$ B、JNK、P38 和 ERK 蛋白的磷酸化调节 OC 的分化和功能

在本实验中, 我们用 RANKL 刺激感染后细胞 (Uninfected BMM) 作为阳性对照组、TNF- $\alpha$  刺激未感染细胞 (Uninfected BMM) 作为阴性对照组, 然后用 TNF- $\alpha$  刺激感染后细胞作为观察组进行 western blot 实验, 观察 I $\kappa$ B、JNK、ERK、P38 蛋白磷酸化的情况 (图 5)。结果证实: 在阴性对照组中, p-I $\kappa$ B、p-JNK、p-ERK、p-P38 在 0、5、10 min 无变化趋势。重要的是观察组和阳性对照组一样, 在受刺激 5 min 后, 磷酸化的蛋白明显升高。这表明: TNFR1/RANK 嵌合体中的外源性 RANK 和内

源性 RANK 一样, 也能激活 I $\kappa$ B、JNK、ERK、P38 蛋白的磷酸化。

## 3 讨论

### 3.1 在 BMM 中构建 TNFR1/RANK 嵌合体的重要性

RANK 主要分布在骨髓巨噬细胞、激活的 T 淋巴细胞表面, 在肾性骨病<sup>[9]</sup>、风湿性关节炎和多种恶性肿瘤的骨损害<sup>[7-8]</sup>方面起着重要的作用。要想知道 RANK 在 OC 生成、激活和分化中的作用, 首先必须清楚 RANK 具有功能的结构部分。由于 BMM 存在内源性 RANK 的干扰, 往往给我们研究其结构和功能带来很大困难。为了排除这种干扰, 我们设计了 TNFR1/RANK 这个嵌合体, 当它被转染到 TNFR1/TNFR2 基因敲除小鼠的 BMM 中后, 再用 TNF- $\alpha$  刺激, 其本身内源性的 RANK 就不再起作用, 起作用的是 TNFR1/RANK chimera 这个外源性 RANK。在分子生物学的研究中, 改变一个外源性基因的结构通常比改变其内源性基因结构更为容易、简便。因此, 我们根据实验的需要, 通过改变这个外源性 RANK 的结构, 然后将其感染到 BMM 中, 再观察其功能, 就可很容易找出 RANK 具有功能的结构部分及其在 OC 分化中的传导途径。另外, 近年来多位学者<sup>[9-10]</sup>对 RANK 和 TRAF

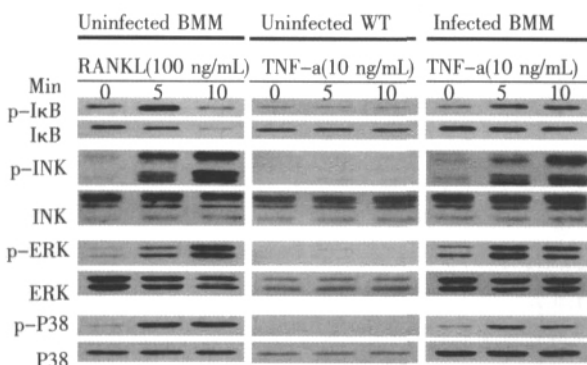


图 5 TNFR1/RANK 激活 I $\kappa$ B、JNK、ERK、P38 的磷酸化  
Fig.5 TNFR1/RANK activated phosphorylation of NF- $\kappa$ B, JNK, P38, and ERK

之间的关系作了很多研究,但他们之间的结果存在很大的争议,究其原因发现他们的研究大多在 293、Hela 等细胞系或酵母菌中进行,这些细胞或细菌本身不能分化成 OC,和生理条件相差很远。我们在能分化成 OC 的 BMM 中研究 RANK 信号传导,模拟更接近生理环境,得出更准确结论。

### 3.2 构建的 TNFR1/RANK chimera 结构和功能的正确性

在 TNFR1/RANK chimera 构建的过程中,所有的克隆都经测序证实其 cDNA 序列是完全正确的。直接免疫荧光标记法也证实了 TNFR1/RANK 蛋白能成功表达在 BMM 细胞膜上,用 TNF- $\alpha$  和 M-CSF 刺激表达 TNFR1/RANK 的 BMM,不仅诱导出了 OC,而且证实这些 OC 和内源性的 OC 具有相同的吸收骨的能力。同时,我们还证实:TNFR1/RANK 嵌合体中的外源性 RANK 也和内源性 RANK 一样,通过 I $\kappa$ B、JNK、ERK、P38 蛋白的磷酸化调节 OC 的分化和功能。所以,我们构建的 TNFR1/RANK chimera 具有完整的结构和功能,可为研究 RANK 在 OC 形成、分化及其信号传导中的作用提供一个有效的生物工具。

#### 参考文献:

- [1] YASUDA H, SHIMA N, NAKAGAWA N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(7): 3597-3602.
- [2] KONG Y Y, YOSHIDA H, SAROSI I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis [J]. Nature, 1999, 397(6717):315-323.
- [3] KODAMA H, YAMASAKI A, NOSE M, et al. Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (op/op) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor [J]. J Exp Med, 1991, 173(1): 269-272.
- [4] INOUE J, ISHIDA T, TSUKAMOTO N, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling [J]. Exp Cell Res, 2000, 254(1):14-24.
- [5] XU D, SHI Z, MCDONALD J, et al. Development of a chimeric receptor approach to study signaling by tumour necrosis factor family members [J]. Biochem J, 2004, 383(4):219-225.
- [6] 许多荣,余学清,方葶蓂. PTH 在体外对破骨细胞分化及骨重吸收能力的影响 [J]. 中华肾脏病杂志,2005,21(4):186-190.
- [7] ROATO I, GRANO M, BRUNETTI G, et al. Mechanisms of spontaneous osteoclastogenesis in cancer with bone involvement [J]. FASEB J, 2005, 19(2): 228-230.
- [8] ICHIKAWA H, MURAKAMI A, AGGARWAL B B. 1-acetoxychavicol acetate inhibits RANKL-induced osteoclastic differentiation of RAW 264.7 monocytic cells by suppressing nuclear factor-kappa B activation [J]. Mol Cancer Res, 2006, 4(4): 275-281.
- [9] WONG B R, JOSIEN R, LEE S Y, et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF-Kappa-B activation by the TRANCE receptor [J]. J Bio Chem, 1998, 273(43): 28355-28359.
- [10] DARNAY B G, NI J, MOORE P A, et al. Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif [J]. J Biol Chem, 1999, 274(12):7724-7731.

(编辑 孙慧兰)

## 口腔颌面肿瘤综合治疗高级研修班招生通知

本研修班是国家卫生部和中华医学会批准的 2007 年国家级继续医学教育项目(项目编号 2007-0802-021),由中山大学颌面外科中心和附属第二医院口腔颌面外科主办,将于 2007 年 11 月 16-18 日在广州举行。本班采用多媒体系统教学,由国际著名大学相关专业学科知名专家讲授口腔颌面肿瘤治疗的最新理念、最新理论和最新有效医疗技术和方法,旨在培训口腔颌面肿瘤临床医疗与科学研究复合型高级人才。学员可获得 I 类学分 6 分。招生对象:口腔颌面-头颈外科医师、耳鼻喉-头颈外科医师、肿瘤科医师、专科护理师。收费标准:学费 800 元(免收讲义费),食宿自理,期间安排免费自助餐和珠江夜景游一次。报名:2007 年 11 月 14 日前登录 <http://omfsurg.net>,下载报名表,电邮 [omfsurg@yahoo.com.cn](mailto:omfsurg@yahoo.com.cn) 或邮递报名。办班地点:中山大学附属第二医院内(广州市沿江西路 107 号,邮编 510120)。项目负责人:中山大学颌面外科中心副主任、中山大学附属第二医院口腔颌面外科主任陈伟良教授/主任医师。联系人:赵婉文老师、何璇凌老师。咨询电话:(020)81332689。

中山大学颌面外科中心