

· 论 著 ·

Wnt 信号通路对 vaspin 诱导大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

陈坤¹, 高飞²

1. 山西医科大学第一临床医学院, 山西 太原 030001;

2. 山西医科大学第一临床医学院内分泌科, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 研究 Wnt/ 胞内 β -连锁蛋白(β -catenin) 信号通路对脂肪组织特异性丝氨酸蛋白酶抑制剂(vaspin) 介导大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化的影响。**方法** 体外培养 4 周龄雄性 SD 大鼠的 BMSCs, 分为 4 组: 对照组, 实验 1、2、3 组, 分别加入成骨诱导液、含 50 ng/ml、100 ng/ml vaspin 的成骨诱导液及含 100 ng/ml vaspin 成骨诱导液 + Dickkopf1 (DKK1, Wnt/ β -catenin 信号通路特异性阻断剂), 于成骨诱导第 7 天酶标仪检测碱性磷酸酶(ALP)活性, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 检测成骨分化相关基因: ALP、核心蛋白结合因子 2 (RUNX2)、成骨细胞特异性转录因子 Osterix (OSX) mRNA 及 β -catenin 的表达水平。**结果** 体外培养 BMSCs, 并加入不同浓度 vaspin 诱导后, 实验 1、2 组 ALP 活性较对照组增加, 并呈 vaspin 浓度依赖性(P 均 < 0.05); 成骨分化基因 ALP、RUNX2、OSX mRNA 表达水平增加, 亦呈 vaspin 浓度依赖性(P 均 < 0.05); β -catenin 表达水平仅在加入 100 ng/ml vaspin 时升高($P < 0.05$); 加入 DKK1 后(实验 3 组), ALP 活性及成骨分化各基因表达水平较实验 2 组(100 ng/ml vaspin)显著下降(P 均 < 0.05), β -catenin 表达水平也显著下降($P < 0.05$)。**结论** Vaspin 可通过 Wnt/ β -catenin 通路促进大鼠 BMSCs 成骨分化。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 脂肪组织特异性丝氨酸蛋白酶抑制剂; Wnt/胞内 β -连锁蛋白通路; 核心蛋白结合因子 2; 成骨细胞特异性转录因子 Osterix

中图分类号: R 329.2 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2015)11-1415-04

Effect of Wnt signaling pathway on vaspin-induced osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of rats in vitro

CHEN Kun*, GAO Fei

*The First Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Corresponding author: GAO Fei, E-mail: gaofixi@126.com

Abstract: Objective To observe the effect of Wnt/ intracellular beta chain protein (β -catenin) signaling pathway on vaspin (a visceral adipose-specific serine protease inhibitor)-induced osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in rats. **Methods** BMSCs from 4 weeks SD rats were randomly divided into control group, experimental group 1, experimental group 2 and experimental group 3 after being isolated and cultured in vitro. Four type of osteogenic induction fluid were respectively added in the BMSCs of 4 groups as follow: the osteogenic induction fluid, the osteogenic induction fluid with 50 ng/ml of vaspin, the osteogenic induction fluid with 100 ng/ml of vaspin and the osteogenic induction fluid with 100 ng/ml of vaspin plus Dickkopf1 (DKK1, a Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitor). After 7 days, alkaline phosphatase (ALP) activity was detected by microplate reader. The expression levels of osteogenic differentiation-related genes including ALP, core protein binding factor 2 (RUNX2), osteoblast specific transcription factor Osterix (OSX) mRNA and β -catenin were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** After BMSCs were cultured and induced by different concentration of vaspin, ALP activity in experimental group 1, group 2 increased significantly compared with control group and in a vaspin concentration-dependent manner ($P < 0.05$). The mRNA expression levels of ALP, RUNX2, OSX in experiment group 1, group 2 rose in a vaspin concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). β -catenin expression increased only in the 100 ng/ml of vaspin. In experimental group 3 (with DKK1),

ALP activity and expression levels of each osteogenic differentiation-related gene and β -catenin decreased significantly compared with experiment group 2 (all $P < 0.05$). **Conclusion** Vaspin can promote the osteogenic differentiation of BMSCs in rats through Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation; Visceral adipose-specific serine protease inhibitor; Wnt/ intracellular beta chain protein pathway; Core protein combination factor 2; Specific transcription factor of osteoblast cells Osterix

骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 的生物学行为与骨质疏松的发生发展密切相关, 可表现为成骨分化能力减弱, 凋亡增加或成脂分化能力增强。大量体内外研究证实, 经典 Wnt/胞内 β -连锁蛋白 (β -catenin) 信号通路是参与成骨分化的主要通路之一^[1]。Dickkopf1 (DKK1) 特异性结合受体 LRP5/6, 可阻断 Wnt 信号向细胞内传递。过表达 DKK1 的转基因老鼠呈骨质疏松表型, 表现为骨量及成骨细胞数量减少伴随血清骨钙素 (OCN) 水平下降。在体外试验中, MC3T3E-1 成骨细胞中加入 $1\mu\text{g/ml}$ DKK1, 碱性磷酸酶 (ALP) 活性及矿化水平较对照组明显降低^[2]。

大量国内外学者研究表明脂肪组织分泌的脂肪因子是参与骨代谢机制之一, 可为骨疾病治疗提供新的靶点^[3]。多项研究揭示脂联素在成骨细胞分化增殖方面的积极作用^[4-5], 体外实验证实脂联素与间充质干细胞 (MSCs) 脂联素受体结合可促进成骨分化^[4]; 瘦素是中枢骨形成抑制剂, 在外周可促进 BMSCs 成骨分化^[6]。脂肪组织特异性丝氨酸蛋白酶抑制剂 (vaspin) 是一种新型脂肪因子, 由 Hida 等^[7]在 2 型糖尿病肥胖大鼠的内脏脂肪组织中发现, 具有改善胰岛素抵抗的作用。关于 vaspin 与骨代谢的报道较少, 因此本研究采用 DKK1 特异性阻断 Wnt 通路, 探讨该信号通路对 vaspin 促进大鼠 BMSC 成骨分化的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂 重组人 vaspin、重组人 DKK1 (美国 ProSpec 公司); DMEM/F12 培养基、无菌 PBS、胰蛋白酶、青霉素、链霉素 (武汉博世德生物工程公司); 成骨诱导液 (赛业生物科技公司); 胎牛血清 (Scien Cell 公司); ALP 测试盒 (南京建成生物工程研究所); RevertAid 逆转录试剂盒 (加拿大 Fermentas 公司); PCR 试剂盒 (罗氏公司); 寡核苷酸引物、TrizolRNA 提取试剂、ALP、OCN、核心蛋白结合因子 2 (RUNX2) 及 β -actin 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。

1.2 大鼠 BMSCs 分离和培养 取 4 周龄雄性 SD 大鼠 (山西医科大学动物实验中心), 颈椎脱臼法处死, 75% 酒精浸泡 5 min, 分离双侧股骨及胫骨, 去除周围

软组织及股骨胫骨两端, 注射器抽取完全培养基 (90% DMEM/F12, 10% 胎牛血清, 1% 青链霉素混合液) 冲洗骨髓腔入离心管, 接种到 25 cm^2 培养瓶, 置于 37°C , 5% CO_2 孵育箱内。48 h 首次换液, 每 3 天换液, 细胞长满瓶底 80% ~ 90%, 用胰酶消化, 每 2 ~ 3 天传代至第 3 代。倒置显微镜下观察细胞形态。

1.3 ALP 活性测定 第 3 代 BMSCs 以 1×10^6 接种于 6 孔板中, 置于 37°C , 5% CO_2 孵育箱培养 24 h 后, 随机分为 4 组: 对照组和实验 1 组、2 组、3 组。对照组加成骨诱导液, 实验 1 组、2 组分别加含 50 ng/ml、100 ng/ml vaspin 的成骨诱导液, 实验 3 组加含 100 ng/ml vaspin 的成骨诱导液及 DKK1 ($1\mu\text{g/ml}$ DKK1 预处理 BMSCs 2 h 后再加入含 100 ng/ml vaspin 成骨诱导液); 每 2 ~ 3 天换液, 7 d 后胰酶消化, 置于冻存管中, 1 000 rpm, 离心 5 min, 弃上清, 加入 1ml 蒸馏水, 反复冻融条件: 液氮 3 ~ 5 s, 立即提出放入 -20°C 冰箱 20 ~ 30 s, 取出放置室温。按照说明书进行操作, 每个组取 5 个复孔, 测定各孔吸光度值 (OD)。

1.4 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 ALP、RUNX2、成骨细胞特异性转录因子 Osterix (OSX)、 β -catenin mRNA 表达水平 实验分组如 1.3 所述, 干预 7 d 后, 使用 Trizol 法提取细胞内总 RNA, 逆转录使用 First Strand cDNA 合成试剂盒, 按照说明书操作, PCR 反应体系 FastStart Universal SYBR Green Master 25 μl 、上下游引物各 0.5 μl 、cDNA 5.0 μl 、加无酶水至 45 μl , 每组设置 3 个反应孔。引物序列: ALP: 上游 GACAAGAAGCCCTTCACAGC 下游 ACTGGGCCTGGTAGTTGTTG; RUNX2: 上游 GAGCACAAACATGGCTGAGA 下游 TGGAGATGTTGCTCTGTTTCG; OSX: 上游 GCTGCCTACTTACCCGTCTG 下游 GTTGCCAC-TATTGCCAACT; β -catenin: 上游 GCCAGTGGATTC-CGTACTGT 下游 GAGCTTGCTTTCCTGATTGC; β -actin 为内参。反应条件 95°C 预变性 10 min, 1 个循环; 95°C 变性 15 s, 退火 - 延伸 60 s, 40 个循环。反应结束后记录每个组循环阈值 (cycle threshold, Ct) 值, 计算各组 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 作为结果。

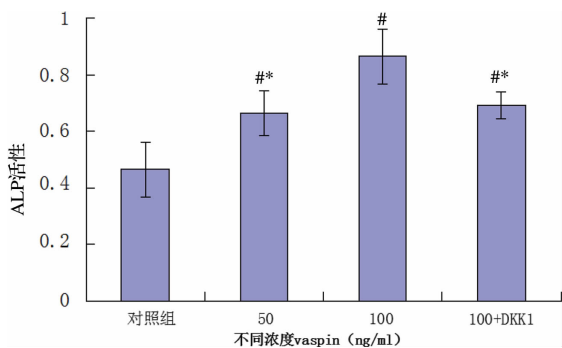
1.5 统计学分析 所有数据均采用软件 SPSS 16.0

进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

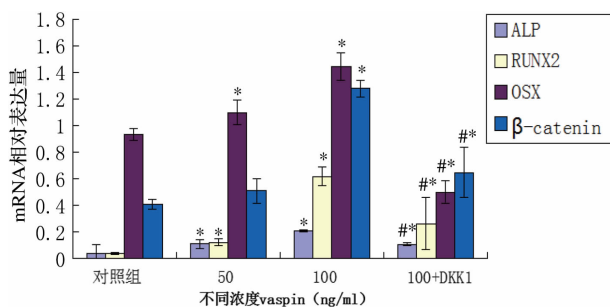
2.1 ALP 活性 不同浓度 vaspin 及 $1 \mu\text{g/ml}$ DKK1 诱导培养 7 d 后结果显示, 实验 1、2、3 组 ALP 活性分别高于对照组 (P 均 < 0.05)。与实验 2 组加入 100 ng/ml vaspin 相比, 实验 3 组增加阻断剂 DKK1 后 ALP 活性下降 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 Vaspin 对成骨分化相关基因及 β -catenin 相对表达量的影响 不同浓度 vaspin 诱导培养 BMSCs 7 d 后, 与对照组相比, 实验 1、2 组加入 50 ng/ml 及 100 ng/ml vaspin 后, ALP、RUNX2、OSX mRNA 表达量显著增加 (P 均 < 0.05), 且呈浓度依赖性; β -catenin 也随 vaspin 浓度升高渐升高, 但只在 100 ng/ml 组有统计学差异 ($P < 0.05$)。实验 3 组加入 DKK1 后, 与实验 2 组 (100 ng/ml vaspin) 相比, 成骨分化基因 ALP、RUNX2、OSX mRNA 表达量显著下降 (P 均 < 0.05), β -catenin mRNA 表达量也显著下降 ($P < 0.05$)。见图 2。



注: 与对照组比较, $\# P < 0.05$; 与 100 ng/ml vaspin 组比较, $* P < 0.05$ 。

图 1 ALP 活性测定



注: 与同基因对照组相比, $* P < 0.05$; 与同基因 100 ng/ml 组相比, $\# P < 0.05$ 。

图 2 Vaspin 对 ALP、RUNX2、OSX 及 β -catenin mRNA 表达量的影响

3 讨论

BMSCs 具有多向分化潜能及自我更新能力, 与骨质疏松症的形成有密切关系。在一项临床研究中, 分别取骨质疏松患者及健康者外周血 MSCs, 体外成骨诱导培养 15 d, 发现骨质疏松患者外周血 MSCs 较健康者增多, 伴随成骨分化基因 RUNX2、OPN 表达量及调节骨保护素 (OPG)/核因子- JB 受体活化因子配体 (RANKL) 比率下降^[8]。老年性骨质疏松症患者 BMSC 自我更新能力差, 凋亡数量增加伴随成骨分化能力减退^[9]。另一项研究报道沉默 Wnt 通路特异性抗体 DKK1 表达, 地塞米松诱导的成骨细胞分化抑制作用减弱, 提示 Wnt 信号通路在糖皮质激素导致的骨质疏松中发挥重要作用^[10]。因此提高 BMSCs 成骨分化能力有助于延缓骨质疏松症的发展。

Kamio 等^[11] 研究报道 vaspin 通过下调活化 T 细胞核因子 1 (NFATc1) 抑制破骨细胞生成, 说明 vaspin 可间接促进骨形成, 本研究体外诱导培养 BMSCs, 加入不同浓度 vaspin, 发现其呈浓度依赖性促进 ALP 活性及成骨分化基因 ALP、RUNX2、OSX mRNA 的表达, 提示 vaspin 可促进 BMSCs 成骨分化, 结果与上述研究存在一致性。另一项研究表明 vaspin 可通过 ERK 通路减弱人成骨细胞凋亡^[12]。总之上述研究结果提示 vaspin 在成骨细胞增殖分化方面的积极作用。

Wnt/ β -catenin 信号通路在成骨分化过程中发挥重要作用, Wnt 蛋白与跨膜受体 FZD 及 LRP5/6 结合, 引起细胞内 β -catenin 蛋白堆积, 并进入细胞核内与 T 细胞转录因子/淋巴增强因子 (TCF/LEF) 相互作用, 启动靶基因的表达。本研究发现其可呈 vaspin 浓度依赖性促进 β -catenin 表达, 提示 Wnt/ β -catenin 信号通路可能参与 vaspin 介导的 BMSCs 成骨分化。加入 Wnt 通路特异性阻断剂 DKK1 后, ALP 活性及成骨分化基因表达水平显著下降, β -catenin 表达水平也显著下降, 进一步证实 vaspin 可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 BMSCs 成骨分化。刘源等^[13] 研究发现 vaspin 通过磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI-3K) 通路抑制 MC3T3-E1 细胞成骨分化。Wnt 信号通路可能参与骨质疏松的发展, 与其他通路有协同或相反的作用, 进一步研究 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 MSCs、成骨细胞等细胞行为的具体机制, 将为基因靶向治疗和干细胞治疗骨质疏松症提供实验依据。

综上所述, 脂肪因子 vaspin 可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 BMSCs 成骨分化, 这一结论仅在基因水平检测中得到证实, 在蛋白质水平及其他通路是

家族成员,和细胞质中的热休克蛋白质 70 和 90 同源,并且一般被认为是内质网应激的分子标志^[12]。在内质网应激发生时,GRP78 表达水平明显上调。本研究也显示,在肺癌 A549 细胞中,TM 能以浓度依赖的方式上调 GRP78 的表达,并且当 TM 和 DDP 联用时,能够有效抑制肺癌 A549 细胞的生存率,明显增加肺癌 A549 细胞的凋亡率及凋亡相关蛋白 Caspase-7 的表达。

DDP 作为治疗癌症经典的化疗药物,通过诱导肺癌 A549 细胞中 DNA 损伤而引起细胞凋亡。但 DDP 对肺癌的治疗效果并不理想。然而,加入内质网诱导剂 TM 能够有效增强 DDP 对肺癌 A549 细胞的杀伤作用,提高肺癌 A549 细胞对 DDP 的敏感性。因此,内质网诱导剂 TM 和 DDP 联合应用可能成为治疗肺癌的潜在新策略,值得进行进一步研究。

参考文献

- [1] Zhao J, Kim JE, Reed E, et al. Molecular mechanism of antitumor activity of taxanes in lung cancer (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2005, 27 (1): 247 - 256.
- [2] Holford J, Beale PJ, Boxall FE, et al. Mechanisms of drug resistance to the platinum complex ZD0473 in ovarian cancer cell lines [J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36 (15): 1984 - 1990.
- [3] Perego P, Gatti L, Righetti SC, et al. Development of resistance to a

trinuclear platinum complex in ovarian carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2003, 105 (5): 617 - 624.

- [4] Di Sano F, Ferraro E, Tufi R, et al. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (5): 2693 - 2700.
- [5] Mandic A, Hansson J, Linder S, et al. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (11): 9100 - 9106.
- [6] Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response [J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 739 - 789.
- [7] Ahmad M, Hahn IF, Chatterjee S. GRP78 up-regulation leads to hypersensitization to cisplatin in A549 lung cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34 (7): 3493 - 3500.
- [8] Zhao Y, Zhu C, Li X, et al. Asterosaponin 1 induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in A549 human lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26 (4): 919 - 924.
- [9] Madeo F, Kroemer G. Intricate links between ER stress and apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2009, 33 (6): 669 - 670.
- [10] Tan Y, Dourdin N, Wu C, et al. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (23): 16016 - 16024.
- [11] Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell [J]. *Nature*, 1992, 355 (6355): 33 - 45.
- [12] Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26 (8): 504 - 510.

收稿日期: 2015-07-20 修回日期: 2015-08-11 编辑: 王国品

(上接第 1417 页)

否参与, 还需进一步证实。

参考文献

- [1] Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and Notch signaling pathways in osteoblast differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112 (12): 3491 - 3501.
- [2] Li J, Sarosi I, Cattley RC, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia [J]. *Bone*, 2006, 39 (4): 754 - 766.
- [3] Scotece M, Conde J, Abella V, et al. Bone metabolism and adipokines: are there perspectives for bone diseases drug discovery? [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, 9 (8): 945 - 957.
- [4] Lee HW, Kim SY, Kim AY, et al. Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (9): 2254 - 2262.
- [5] Luo E, Hu J, Bao CY, et al. Sustained release of adiponectin improves osteogenesis around hydroxyapatite implants by suppressing osteoclast activity in ovariectomized rabbits [J]. *Acta Biomater*, 2012, 8 (2): 734 - 743.
- [6] Zhang J, Li T, Xu L, et al. Leptin promotes ossification through multiple ways of bone metabolism in osteoblast: a pilot study [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2013, 29 (8): 758 - 762.
- [7] Hida K, Wada J, Eguchi J, et al. Visceral adipose tissue-derived ser-

ine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2005, 102 (30): 10610 - 10615.

- [8] Dalle Carbonare L, Valenti MT, Zanatta M, et al. Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60 (11): 3356 - 3365.
- [9] Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts [J]. *Aging Cell*, 2008, 7 (3): 335 - 343.
- [10] Butler JS, Queally JM, Devitt BM, et al. Silencing Dkk1 expression rescues dexamethasone-induced suppression of primary human osteoblast differentiation [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11: 210.
- [11] Kamio N, Kawato T, Tanabe N, et al. Vaspin attenuates RANKL-induced osteoclast formation in RAW264.7 cells [J]. *Connect Tissue Res*, 2013, 54 (2): 147 - 152.
- [12] Zhu X, Jiang Y, Shan P, et al. Vaspin attenuates apoptosis of human osteoblasts through ERK signaling pathways [J]. *Amino Acids*, 2013, 44 (3): 961 - 968.
- [13] 刘源. microRNA-34c 在调控成骨细胞及间充质干细胞成骨分化中的作用及机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2013.

收稿日期: 2015-07-04 修回日期: 2015-07-20 编辑: 周永彬