

小鼠成骨细胞Wnt信号通路相关因子表达与胰岛素样生长因子1的影响*☆

郭玲¹, 郑立舸¹, 王敏², 郝亮²

Effects of insulin-like growth factor 1 on expression of Wnt signaling pathway-related factors in mouse osteoblasts

Guo Ling¹, Zheng Li-ge¹, Wang Min², Hao Liang²

Abstract

BACKGROUND: Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) plays a crucial role in cell occurrence and development by regulating cell proliferation, differentiation and inhibition of apoptosis. But the underlying mechanism is unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effects of IGF-1 on the proliferation and differentiation of the cultured mouse osteoblasts and the mRNA expression levels of some related factors of Wnt signaling pathway.

METHODS: The medium containing 25 µg/L IGF-1 was added to the mouse osteoblasts cultured *in vitro*. Cell proliferation was determined using CCK-8 method on days 1, 2, 3, 4, and 5 of culture. Alkaline phosphatase activity was determined with enzyme-linked immunosorbent assay on days 3, 6 and 9 days of culture. On day 3 of culture, total RNA was extracted, and the mRNA expression levels of Wnt-3a, low density lipoprotein receptor-related protein 5 and β-catenin were detected by real time polymerase chain reaction.

RESULTS AND CONCLUSION: 25 µg/L IGF-1 can promote the proliferation of mouse osteoblasts, increase the activity of alkaline phosphatase, and significantly increase the mRNA expression levels of Wnt-3a, low density lipoprotein receptor-related protein 5 and β-catenin ($P < 0.05$). These findings suggest that IGF-1 can promote the proliferation and differentiation of osteoblasts and Wnt signaling pathway is involved in this process.

Guo L, Zheng LG, Wang M, Hao L. Effects of insulin-like growth factor 1 on expression of Wnt signaling pathway-related factors in mouse osteoblasts. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(28): 5169-5172.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 胰岛素样生长因子1可促进细胞增殖、分化,但其具体作用机制尚不清楚。

目的: 观察胰岛素样生长因子1对小鼠成骨细胞增殖、分化的影响,及Wnt信号通路相关因子mRNA的表达。

方法: 向体外培养的小鼠成骨细胞中加入25 µg/L的胰岛素样生长因子1,分别于培养的第1, 2, 3, 4, 5天用CCK-8比色法检测细胞增殖率;于培养的第3, 6, 9天应用酶联免疫法检测细胞内碱性磷酸酶活性;细胞培养第3天提取总RNA,采用Real-time RT-PCR检测Wnt-3a,低密度脂蛋白受体相关蛋白5, β-catenin mRNA的表达。

结果与结论: 25 µg/L胰岛素样生长因子1能够促进成骨细胞增殖,提高碱性磷酸酶活性,而且明显增加成骨细胞中Wnt-3a、低密度脂蛋白受体相关蛋白5、β-catenin mRNA的表达($P < 0.05$)。说明胰岛素样生长因子1能够促进成骨细胞的增殖和分化,Wnt信号通路参与了该调控过程。

关键词: 胰岛素样生长因子1; 成骨细胞; 增殖; 分化; Wnt/β-catenin

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.28.010

郭玲, 郑立舸, 王敏, 郝亮. 小鼠成骨细胞Wnt信号通路相关因子表达与胰岛素样生长因子1的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28):5169-5172. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

成骨细胞在骨的形成、发育、改建、修复过程中发挥重要作用。在生物体内,成骨细胞的生物活性受多种因素的影响。Wnt/β-catenin信号通路在骨细胞的分化、增殖及凋亡过程中发挥着重要的作用^[1]。Wnt/β-catenin信号通路与其他途径及蛋白相互协调作用于骨组织。胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)是骨形成的调节因子,具有促进有丝分裂、促进成骨等作用,在骨形成过程中发挥了重要的生理作用^[2]。在IGF-1促进成骨细胞增殖分化的过程中,Wnt信号转导通路是否参与其

作用尚不清楚。为进一步明确IGF-1对小鼠成骨细胞增殖分化的影响及Wnt信号转导通路在该过程中的作用,实验以IGF-1作用于小鼠成骨细胞,探讨IGF-1对成骨细胞增殖、分化的影响及在此过程中Wnt/β-catenin信号通路相关因子Wnt-3a,低密度脂蛋白受体相关蛋白5(low density lipoprotein receptor related protein, LRP-5), β-catenin的表达。

1 材料和方法

设计: 细胞水平的对比观察实验。

时间及地点: 于2009-12/2010-03在口腔疾病研究国家重点实验室完成。

¹Department of Prosthodontics, Stomatology Hospital Affiliated to Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ²Department of Prosthodontics, West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Guo Ling☆, Doctor, Lecturer, Department of Prosthodontics, Stomatology Hospital Affiliated to Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
glsmling@yahoo.cn

Correspondence to: Zheng Li-ge, Professor, Department of Prosthodontics, Stomatology Hospital Affiliated to Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Lzyxy-zlg@163.com

Supported by: Foundation of Ministry of Health of Sichuan Province, No. 20090201*

Received: 2011-01-19
Accepted: 2011-03-25

¹ 泸州医学院附属口腔医院修复科, 四川省泸州市 646000; ² 四川大学华西口腔医学院修复科, 四川省成都市 610041

郭玲☆, 女, 1977 年生, 重庆市綦江县人, 汉族, 四川大学口腔医学院毕业, 博士, 讲师, 主要从事口腔修复方面的研究。
glsmling@yahoo.cn

通讯作者: 郑立舫, 教授, 泸州医学院附属口腔医院修复科, 四川省泸州市 646000
Lzyxy-zlg@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)28-05169-04

收稿日期: 2011-01-19
修回日期: 2011-03-25
(20101105005/WLM - S)

材料: 清洁级新生昆明小鼠 20 只, 由四川大学华西动物实验中心提供, 动物合格证号: 川医实验动物准字: 010。

主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
F12 培养基、胰蛋白酶	Gibco, USA
IGF-1、考马斯亮蓝	Sigma, USA
Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒	Dojindo Laboratories, Japan
碱性磷酸酶检测试剂盒	北京柏定生物工程有限公司, 中国
引物	大连宝生物技术有限公司合成
RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒	TAKARA, Japan
全波长扫描式多功能读数仪	Thermo VARIOSKAN FLASH, Finland
FTC2000 实时荧光定量基因扩增仪	加拿大枫岭(FUNGLYN)公司

实验方法:

小鼠成骨细胞的体外培养及鉴定: 在无菌条件下取新生 24 h 内的昆明小鼠颅盖骨, 用镊子去除表面膜层, Hank's 液清洗 3 次, 剪碎, 将组织碎块均匀地铺散在 75 mL 培养瓶底壁上。翻转培养瓶, 将有组织块的瓶底向上, 加入 5 mL 含体积分数 20% 小牛血清的 F12 培养基, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。4 h 后翻转培养瓶, 置培养箱中继续培养。待细胞生长融合长满瓶底时, 进行消化传代。取第 3 代细胞爬片, 进行碱性磷酸酶染色。取培养至第 28 天的细胞行茜素红矿化结节染色。

实验分组: 取生长良好的第 3 代小鼠成骨细胞, 分为实验组和对照组, 实验组成骨细胞给予 25 μg/L 的 IGF-1 进行干预, 对照组正常培养。

小鼠成骨细胞增殖率: 取生长良好的成骨细胞, 按每孔 1×10⁸ L⁻¹ 细胞浓度接种于 96 孔细胞培养板中, 每组设 6 个复孔, 共接种 5 块 96 孔培养板。12 h 细胞贴壁后, 在各孔内换入相应的培养液, 继续培养。在培养的第 1, 2, 3, 4, 5 天, 分别在所需检测的培养孔内每孔加入 10 μL CCK-8, 37 °C 继续孵育 1 h, 测定 450 nm 处各孔吸光度值。

小鼠成骨细胞碱性磷酸酶活性: 取第 3 代小鼠成骨细胞, 按 2×10⁴ 个/孔细胞浓度接种于 6 孔细胞培养板中, 每组设 3 个复孔。12 h 细胞贴壁后, 在各孔内换入相应的培养液, 继续培养。在培养的第 3, 6, 9 天, 胰酶消化, 每孔加入 3 mL 培养基终止消化, 混匀离心, 弃上清, 加入 5 mL

PBS, 混匀离心, 弃上清控干, 加入 80 μL PBS 液混匀后存于 -20 °C 冰箱待检。检测之前反复冻融细胞 3 次, 超声裂解, 在酶联免疫检测仪上选择 405 nm 波长测定吸光度值, 做标准曲线, 计算样本总蛋白浓度, 换算求出样本中碱性磷酸酶活性 (nkat/L)^[3]。最后计算出各组中的每毫克蛋白中相对的碱性磷酸酶活性值。

小鼠成骨细胞 Wnt 信号通路相关因子的表达: 将第 3 代小鼠成骨细胞按 2×10⁴ 个/孔细胞浓度接种于 6 孔细胞培养板中, 每组设 3 个复孔。体外培养 3 d 后, 采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA, RNA 定量后反转录合成第一链 cDNA, 用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 荧光定量 PCR 系统进行 PCR 反应, 内参基因 β-actin 与待测基因同批扩增, 梯度稀释内参基因法制定相对标准曲线, 根据扩增产物的 Ct 值 (扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数) 及相对标准曲线求出各标本所含该基因的模板量, mRNA 的相对表达量以公式 2^(-ΔΔCt) 表示^[4]。采用溶解曲线法和凝胶电泳法鉴定产物特异性和片段大小。PCR 反应体系: 总体积 20 μL, 包括: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 10 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 0.8 μL, cDNA 模板 2 μL。PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。

引物序列:

Gene	Primer	Product length (bp)
β-actin	Sense 5'- GAA GAT CAA GAT CAT TGC TCC T -3'	111
	Antisense 3'- TAC TCC TGC TTG CTG ATC CA -5'	
Wnt-3a	Sense 5'-AGC TGA AGT GAA GAC CTG CT-3'	116
	Antisense 3'- GAC TCT CGG TGT TTC TCT ACC AC -5'	
LRP-5	Sense 5'- GAC TGT GCT GAT GGG TCT GAT -3'	120
	Antisense 3'- GAC GAA GAG GGA GAG GAT GAT AC -5'	
β-catenin	Sense 5'- GGG TCC TCT GTG AAC TTG CTC -3'	167
	Antisense 3'- CTT GTA ATC CTG TGG CTT GTC C -5'	

主要观察指标: 小鼠成骨细胞增殖率、碱性磷酸酶活性以及 Wnt 信号通路相关因子的表达。

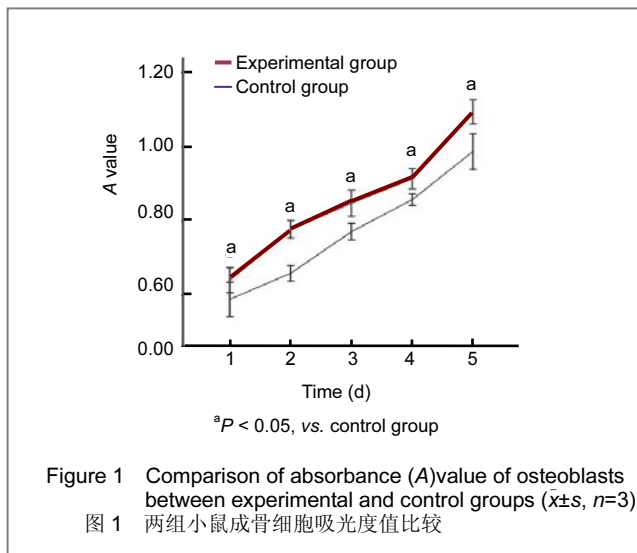
统计学分析: 由第一作者采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行处理, 实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析处理组间差异,

$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

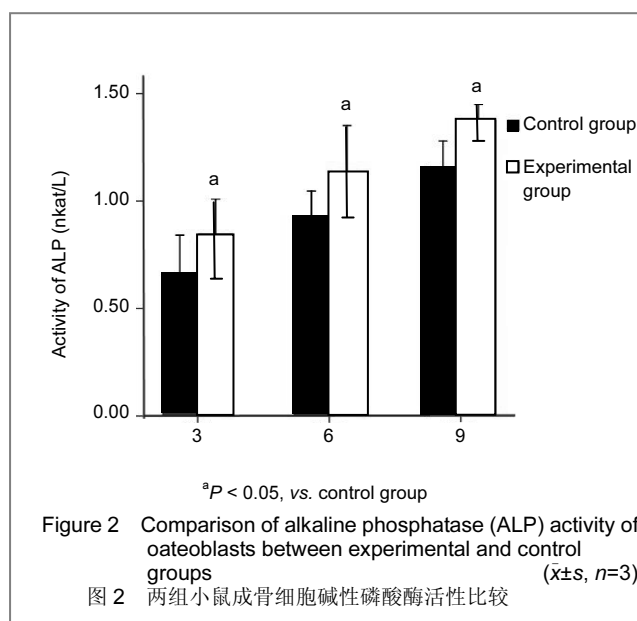
2 结果

2.1 小鼠成骨细胞培养结果 倒置显微镜下观察, 可见原代培养细胞呈长梭形或星形, 胞体丰满, 胞突细长, 胞质均匀, 中央胞核呈椭圆形或圆形, 核仁清晰。培养14 d左右细胞长满培养瓶底, 呈放射状、漩涡状排列, 碱性磷酸酶染色阳性。培养28 d, 细胞形成明显的矿化结节, 茜素红染色阳性, 以上结果证实所获得的细胞为成骨细胞。

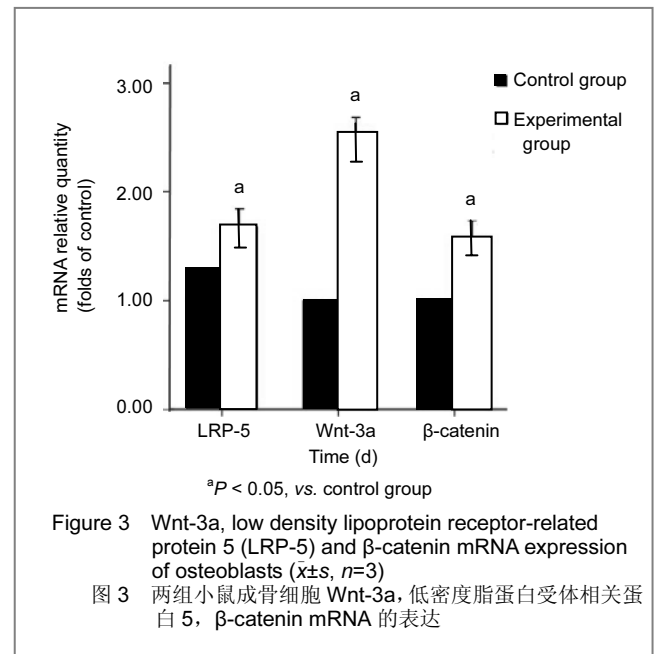
2.2 IGF-1对小鼠成骨细胞增殖率的影响 与对照组比较, 实验组细胞的吸光度值显著增高($P < 0.05$), 说明25 $\mu\text{g/L}$ IGF-1能明显促进细胞增殖, 见图1。



2.3 IGF-1对小鼠成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响 实验组细胞的碱性磷酸酶活性显著高于对照组($P < 0.05$), 见图2。



2.4 Real time RT-PCR检测结果 实验组Wnt-3a, LRP-5, β -catenin mRNA表达水平均较对照组明显升高($P < 0.05$), 见图3。



3 讨论

骨重塑过程在系统或局部骨生长调节因子的作用下处于动态平衡之中。成骨细胞含有丰富的IGF-1, 参与骨代谢的调节。最近的研究充分肯定了IGF-1在调节成骨细胞和破骨细胞中起重要作用^[5-6]。有学者发现, IGF-1可明显促进正常大鼠骨祖细胞的增殖和分化, 增强碱性磷酸酶活性和骨的矿化^[7]。课题组的前期研究也证实不同质量浓度的IGF-1能促进小鼠成骨细胞增殖和碱性磷酸酶表达^[8]。实验中观察到25 $\mu\text{g/L}$ 的IGF-1对小鼠成骨细胞的增殖和碱性磷酸酶表达有显著的促进作用。提示IGF-1可通过诱导小鼠成骨细胞增殖以保证参与骨改建的成骨细胞数量而促进骨组织再生^[9], 同时促进其进一步分化成熟^[9-10]。

近年来, 很多研究表明Wnt家族与其相关作用成分在骨发育过程中发挥了重要作用。在Wnt信号转导通路中, Wnt相关受体, 尤其是LRP-5, Frizzled蛋白和 β -catenin等发挥着重要作用^[11]。Wnt信号通路包括3条细胞内信号转导通路, 即Wnt/ β -catenin信号转导通路、Wnt/ Ca^{2+} 信号转导通路和Wnt/平面细胞极性信号转导通路^[12]。近年来的研究表明, 经典Wnt信号在控制骨形成方面具有重要作用^[13]。经典的Wnt/LRP-5信号转导通路通过一些机制来增加骨量, 包括更新干细胞, 刺激前成骨细胞复制, 诱导成骨细胞形成^[14]。

在Wnt家族及其作用途径的相关信号分子中, 无论何种亚型或分子的异常表达都可能破坏Wnt系统的正负

平衡机制, 导致骨骼系统畸形^[15]。Shi等^[16]在MC3T3-E1骨祖细胞系增殖分化的不同阶段用固化三醇、锂氯化物及两者联合进行干预, 发现抑制Wnt信号通路转导可使成骨细胞分化受阻, 而诱导Wnt信号通路组分表达可加快成骨细胞分化。骨形态发生蛋白诱导多潜能干细胞向成骨细胞分化过程中LRP-5表达上调^[17]。LRP-5的功能丧失突变会导致骨质疏松-假性神经胶质瘤综合征, 其特征之一是骨密度降低, 而LRP-5的功能获得性突变则会引起高骨密度症^[18]。说明LRP-5基因能够影响骨量和骨密度的变化。LRP-5基因缺失的小鼠, 成骨细胞增殖率下降, 出现明显骨质疏松^[19]。C3H10T1/2是一种可以分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等的多潜能干细胞系, 在骨形态发生蛋白2的作用下可以分化为成骨细胞。Bain等^[20]发现, 在此过程中, 骨形态发生蛋白2可以上调 β -catenin。C3H10T1/2细胞过度表达 β -catenin或加入氯化锂使内源性 β -catenin表达上调, 均能使成骨细胞早期分化标志碱性磷酸酶表达及活性增加。这表明 β -catenin在成骨前体细胞及成骨细胞增殖分化过程中发挥作用。

在IGF-1的作用下骨髓间充质干细胞可以分化为成骨细胞, 在此过程中, IGF-1可以上调 β -catenin, 这表明 β -catenin在成骨前体细胞及成骨细胞增殖分化过程中发挥作用, 并受IGF-1的调节。实验中, 为进一步探讨IGF-1促进小鼠成骨细胞增殖和碱性磷酸酶表达的可能作用机制, 应用Real-time RT-PCR检测Wnt-3a、LRP-5、 β -catenin mRNA的表达。Zhou等^[17]体外实验显示, Wnt-3a通过 β -catenin途径起作用, 对成骨细胞早期分化的标志分子碱性磷酸酶起作用, 能够提高碱性磷酸酶的活性。实验结果也表明IGF-1明显促进成骨细胞增殖和碱性磷酸酶活性, 同时增加成骨细胞中Wnt-3a、LRP-5和 β -catenin mRNA的表达。提示Wnt/ β -catenin信号途径参与了IGF-1促进成骨细胞的增殖和分化的过程, 可以看出Wnt-3a、LRP-5和 β -catenin对成骨细胞增殖、分化有促进作用。

IGF-1在成骨过程中有显著的促进成骨效应, 近年来不断有研究实验证实, Wnt/ β -catenin信号途径在骨改建过程中起着重要的作用, 但其具体的机制尚未明确。因此, 对于Wnt/ β -catenin信号途径在成骨细胞分化、成熟、以及功能作用及调节关系上有待深入研究。

4 参考文献

[1] Olkku A, Mahonen A. Calcitriculin mediated glucocorticoid receptor export is involved in beta-catenin translocation and Wnt signalling inhibition in human osteoblastic cells. *Bone*. 2009;44(4):555-565.

[2] Hock JM, Centrells M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*. 1998;122(1):254-260.

[3] Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol(Paris)*. 2009;57(4):318-323.

[4] Lu SD. Beijing: Zhongguo Xiehe Yike Daxue Chubanshe. 1999. 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.

[5] Inaba M, Nishizawa Y, Mita K, et al. Poor glycemic control impairs the response of biochemical parameters of bone formation and resorption to exogenous 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in patients with Type 2 diabetes. *Osteoporos Int*. 1999;9(6):525-531.

[6] Balint E, Szabo P, Marshall CF, et al. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone*. 2001;28(1):21-28.

[7] Sakata T, Halloran BP, Elalieh HZ, et al. Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor I on bone formation. *Bone*. 2003;32:669-680.

[8] Guo L, Wang M, Hao L. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(33):6095-6098. 郭玲, 王敏, 郝亮. 胰岛素样生长因子1对小鼠成骨细胞增殖和碱性磷酸酶活性的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(33): 6095-6098.

[9] Guan S, Ge D, Liu TQ, et al. Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells. *Toxicology in Vitro*. 2009;23(2):201-208.

[10] Fini M, Carpi A, Borsari V. Bone remodeling, humoral networks and smart biomaterial technology for osteoporosis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010;2:468-482.

[11] Li BX, Li YK, Guoji Guke Zazhi. 2008;29(3):179-181. 李宝新, 李玉坤. Wnt信号通路对骨调节研究新进展[J]. 国际骨科学志, 2008, 29(3):179-181.

[12] Issack PS, Helfet DL, Lane JM. Role of wnt signaling in bone remodeling and repair. *HSS J*. 2008;4(1):66-70.

[13] Yue EL, Yang XY, Zhao HY. Zhongguo Kouqiang Zhongzhi Xue Zazhi. 2008;13(4):195-199. 岳二丽, 杨晓喻, 赵红宇. Wnt 信号通道组成及其在成骨细胞增殖分化增殖中的效应[J]. 中国口腔种植学杂志, 2008, 13(4):195-199.

[14] Peter VN, Barry S. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 2006;7(122):33-39.

[15] Rauner M, Sipes W, Pietschmann P. Age-dependent Wnt gene expression in bone and during the course of osteoblast differentiation. *Age(Dordr)*. 2008;30(4):273-282.

[16] Shi YC, Worton L. Effects of continuous activation of vitamin D and Wnt response pathways on osteoblastic proliferation and differentiation. *Bone*. 2007;41(1):87-96.

[17] Zhou H, Mak W, Zheng Y, et al. Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2008;283(4):1936-1945.

[18] Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol*. 2006;16(3):151-158.

[19] Pinson KI, Brennan J, Monkley S, et al. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*. 2000;407(6803):535-538.

[20] Bain G, Müller T, Wang X, et al. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301(1):84-91.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 四川省卫生厅基金资助项目(20090201), 课题名称: IGF-1 与 Wnt/ β -catenin 信号通路在糖尿病颌骨骨质疏松的作用研究。

作者贡献: 实验设计者为郭玲、郑立舫、王敏, 实施者为郭玲、郝亮, 评估为郭玲、郝亮、郑立舫、王敏, 郭玲、郑立舫对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求。

本文创新性: 检索 Pubmed 数据库及中国期刊全文数据库 2001/2010 的相关文献, 关键词为“胰岛素样生长因子 1、Wnt/ β -catenin 信号、成骨细胞”, 未见将胰岛素样生长因子 1、Wnt/ β -catenin 信号通路同时用于成骨细胞增殖分化的研究。实验研究胰岛素样生长因子 1 对 Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子表达的影响并阐明其作用机制。结果显示, 胰岛素样生长因子 1 能够促进成骨细胞增殖, 提高碱性磷酸酶活性, 并且明显增加成骨细胞中 Wnt-3a、LRP-5、 β -catenin mRNA 的表达。说明胰岛素样生长因子 1 能够促进成骨细胞的增殖和分化, Wnt 信号通路参与了该调控过程。