

白细胞介素 9 缺失抑制小鼠的成骨能力

王 怡, 陈迟迟, 周熙超, 施 勤

<https://doi.org/10.12307/2024.434>

投稿日期: 2023-06-10

采用日期: 2023-08-01

修回日期: 2023-08-23

在线日期: 2023-09-05

中图分类号:

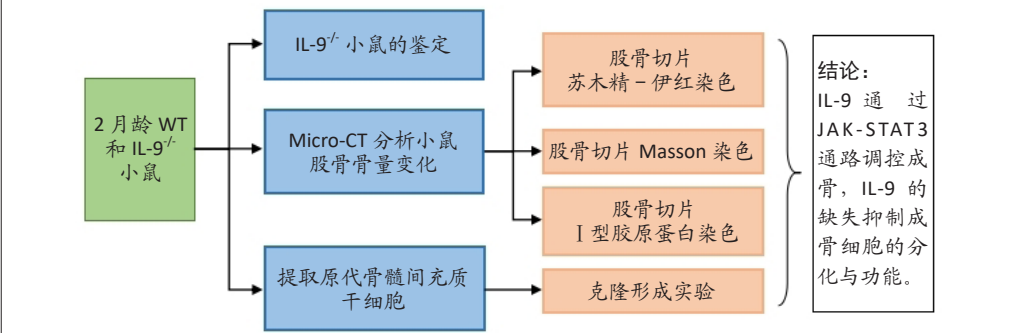
R459.9; R318; Q291

文章编号:

2095-4344(2024)26-04178-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 白细胞介素 9(IL-9) 缺失损害小鼠成骨能力



文题释义:

白细胞介素9: 最初被鉴定为T细胞生长因子, 通过JAK-STAT通路进行信号传递, 能够影响多种类型细胞的生长与功能。研究发现JAK-STAT通路在调节骨代谢中发挥着重要作用。因此, 白细胞介素9作为调节骨代谢的新型细胞因子备受关注。

成骨能力: 机体骨骼是一个高度活跃的器官, 长期保持着成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收之间的动态平衡。一旦成骨能力受到抑制, 新骨形成的数量少于旧骨吸收的数量, 就会导致骨质净丢失, 表现为骨量降低、骨微结构受损, 即骨质疏松。

摘要

背景: 小鼠成骨能力受到JAK/STAT通路的调控, 白细胞介素9能够通过JAK-STAT通路调控多种细胞的功能, 有潜力成为调控成骨能力的新型细胞因子。

目的: 探究体内白细胞介素9的缺失对于小鼠成骨能力的影响。

方法: 将2月龄野生型小鼠(WT)和白细胞介素9基因全敲除小鼠(IL-9^{-/-})股骨进行Micro-CT扫描, 分析其骨量变化; 并分别对小鼠股骨切片行苏木精-伊红染色、Masson染色以及I型胶原蛋白免疫组化染色。提取2月龄WT和IL-9^{-/-}小鼠骨髓细胞进行骨髓间充质干细胞克隆形成实验, 并检测成骨基因的表达。为了进一步验证白细胞介素9是否通过JAK-STAT通路进行信号传导, 采用Western blot检测STAT3蛋白的表达。

结果与结论: ①Micro-CT扫描结果显示, 相较于WT小鼠, IL-9^{-/-}小鼠的骨量显著降低, 骨密度、骨体积分数、骨小梁数目显著降低, 骨小梁分离度显著增大; ②苏木精-伊红染色与Micro-CT结果一致, IL-9^{-/-}小鼠骨小梁密度更低; ③I型胶原蛋白免疫组化染色以及Masson染色结果显示, IL-9^{-/-}小鼠I型胶原蛋白阳性成骨细胞数量显著减少, 同时胶原形成能力更差; ④克隆形成实验结果表明, IL-9^{-/-}小鼠成骨细胞的矿化能力显著低于WT小鼠; ⑤Western blot结果显示, 成骨诱导激活STAT3信号传导, WT成骨诱导组pSTAT3表达明显高于IL-9^{-/-}成骨诱导组, 说明白细胞介素9通过JAK-STAT3通路调控成骨, 白细胞介素9的缺失抑制成骨细胞的分化与功能, 这可能是IL-9^{-/-}小鼠骨量降低的原因之一。

关键词: 白细胞介素9; 骨质疏松; 间充质干细胞; 成骨能力; 成骨诱导; 成骨矿化

Deficiency of interleukin-9 inhibits osteogenic potential in mice

Wang Yi, Chen Chichi, Zhou Xichao, Shi Qin

Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Institute of Orthopedics of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Wang Yi, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Institute of Orthopedics of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Shi Qin, MD, Professor, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Institute of Orthopedics of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Mouse osteogenic potential is regulated by the JAK-STAT signaling pathway, and interleukin-9 can regulate multiple cellular functions through the JAK-STAT pathway, which has the potential to be a novel cytokine that regulates osteogenic potential.

OBJECTIVE: To investigate the effect of interleukin-9 deficiency on osteogenic potential in mice

METHODS: The femurs collected from 2-month-old wild-type and interleukin-9 knockout mice were subjected to Micro-CT scanning to analyze the changes in bone mass. Then, hematoxylin-eosin staining, Masson staining, and immunohistochemical staining of type I collagen were performed on the slices of the

苏州大学附属第一医院骨科, 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215006

第一作者: 王怡, 男, 1997年生, 重庆市人, 汉族, 2020年四川大学临床医学专业毕业, 主要从事骨质疏松研究。

通讯作者: 施勤, 博士, 教授, 苏州大学附属第一医院骨科, 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215006

<https://orcid.org/0000-0002-9403-752X>(施勤)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(81972059), 项目负责人: 施勤

引用本文: 王怡, 陈迟迟, 周熙超, 施勤. 白细胞介素 9 缺失抑制小鼠的成骨能力 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(26):

4178-4183.



femurs of mice. Bone marrow cells from 2-month-old wild-type and interleukin-9 knockout mice were extracted for colony-forming assay and detection of osteogenic gene expression in bone marrow mesenchymal stem cells. To further verify whether interleukin-9 worked through the JAK-STAT pathway, the expression of STAT3 protein was detected by western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Micro-CT results showed the bone mass of interleukin-9 knockout mice decreased significantly compared with that of wild-type mice. In addition, the bone mineral density, bone volume fraction, trabecular number significantly decreased and trabecular separation markedly escalated in interleukin-9 knockout mice. The findings of hematoxylin-eosin staining were consistent with Micro-CT results. Interleukin-9 knockout mice had lower bone trabecular density. Type I collagen immunohistochemistry staining and Masson staining indicated the number of type I collagen positive osteoblasts was significantly reduced and the capacity of collagen formation was damaged in interleukin-9 knockout mice. The results of colony-forming assay indicated that the mineralization capacity of osteoblast in interleukin-9 knockout mice were significantly lower than that in wild-type mice. Western blot results showed that osteogenesis induction activated STAT3 signaling, and the pSTAT3 level in wild-type mice with osteogenic induction was significantly higher than that in interleukin-9 knockout mice with osteogenic induction. These findings suggest that interleukin-9 regulates osteogenesis through the JAK-STAT3 pathway and interleukin-9 deficiency inhibits osteoblast differentiation and function, which may lead to reduced bone mass in interleukin-9 knockout mice.

Key words: interleukin-9; osteoporosis; mesenchymal stem cell; osteogenic capability; osteogenic induction; osteogenic mineralization

Funding: the National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 81972059 (to SQ)

How to cite this article: WANG Y, CHEN CC, ZHOU XC, SHI Q. Deficiency of interleukin-9 inhibits osteogenic potential in mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(26):4178-4183.

0 引言 Introduction

骨质疏松是一种系统性的骨骼疾病，以骨量低和骨组织微结构退化为主要特征，导致骨脆性和骨折风险的增加^[1-2]。骨折疏松是一种全身性疾病，骨折风险增加几乎影响所有部位，以髋部骨折和椎体骨折最为常见。一旦发生骨折，就需要长期治疗和医疗管理，这会造成了巨大的经济、社会和临床负担^[3-5]。随着人口老龄化的进展，骨质疏松已经成为全球主要的健康卫生问题。目前，骨质疏松的治疗药物主要有地诺单抗^[6]、双膦酸盐、硬化素抑制剂^[7]、选择性雌激素受体调节剂、组织蛋白酶抑制剂以及甲状旁腺素制剂等等^[8-9]。但由于其严重的不良反应、不确切的疗效以及生物安全性等问题无法在临床治疗中进行推广^[10-11]。

骨质疏松主要表现为骨重塑的失衡。一旦骨重塑失衡，骨吸收速度超过骨形成的速度，就会导致骨丢失，骨量降低^[12]。骨重塑是一个动态调节的过程，受到多种因素的调节。

白细胞介素 9(Interleukin-9, IL-9) 最初被鉴定为 T 细胞生长因子，由多种免疫细胞以及成骨细胞分泌，能调节多种细胞的增殖与功能^[13-14]。IL-9 是常见的 γ 链受体细胞因子家族成员，其他成员则包括 IL-2、IL-4、IL-7、IL-15 和 IL-21。IL-9 受体由细胞因子特异性 IL-9 受体 α 链 (IL-9R α) 和公用 γ 链组成^[15]，其中 α 链结合配体， γ 链进行信号传导，传导通路主要为 Janus 激酶 - 信号转导子和转录激活子 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) 通路。有研究发现 IL-9 在股骨头患者骨坏死中的表达升高，并通过体外激活 JAK-STAT 信号促进软骨降解^[16]，另外 IL-9 还能通过 JAK/STAT5 信号传导预防小鼠免疫性血小板减少症^[17]。随着对 JAK-STAT 通路研究的深入，发现 JAK-STAT 通路在骨发育以及骨重塑中发挥着重要的作用^[18-19]。如 ZHOU 等^[20] 发现成骨细胞特异性敲除 STAT3 会导致骨发育不良，出现颅面畸形以及骨质疏松；而在破骨细胞中靶向敲除 STAT5 能抑制破骨细胞的生成和活性，小鼠骨量增加^[21]。除此之外，许多细胞因子能够通过 JAK-STAT 调节骨代谢，如 IL-4 通过 STAT6 的磷酸化来抑制核因子 κ B 的激活，IL-17 通过激活 JAK2/STAT3 信号通路，调节成骨细胞的活性和分化；一些生长因子如表皮生长因子、血小板衍生生长因子也能通过 STAT 通路调节骨形成。

而关于 IL-9 直接参与调控骨代谢相关的研究则很少。

此文展示了 IL-9 基因全敲除 (IL-9^{-/-}) 小鼠出现自发性骨质疏松，骨量明显降低。进一步研究结果显示 IL-9 的缺失抑制了小鼠的成骨分化能力，成骨作用减弱。IL-9 的缺失导致成骨减弱，骨量降低，这为骨质疏松的治疗提供了新的方向与靶点。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物实验和体外细胞学实验，比较 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠之间体内成骨能力以及骨量的差异，分别提取原代骨髓间充质干细胞比较体外成骨分化能力，组间比较采用配对 *t* 检验与 ANOVA 单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 1 月至 2022 年 2 月在苏州大学骨科研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 实验中所用的野生型 (WT) 和 IL-9 基因全敲除 (IL-9^{-/-}) 小鼠 (苏州大学王雪峰教授惠赠)，为 2 月龄雄性小鼠，体质量 22 g 左右，均于 SPF 级实验动物中心进行饲养和繁殖 (SYXK(苏) 2021-0065)。SPF 屏障设施相对温度为 20-26 °C，相对湿度为 40%-70%。昼夜交替时间为 12/12 h。

实验方案经过苏州大学大学动物实验伦理委员会批准，批准号：SUDA20230801A01。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 实验试剂与耗材 胎牛血清 (东岭，中国)，抗坏血酸 Vc、 β -甘油磷酸钠、地塞米松 (Sigma，美国)， α -MEM 培养基 (Hyclone，美国)，结晶紫染色液 (碧云天，中国)，茜素红染色试剂盒 (Cyagen，美国)，伊红染液、苏木精染液 (武汉塞维尔生物科技有限公司，中国)，Masson 染色试剂盒 (索莱宝，中国)，40 g/L 多聚甲醛 (Biosharp，中国)，I 型胶原蛋白抗体 (Abcam，美国)，荧光定量 PCR 试剂盒 (伯乐，美国)，TRIzol RNA 分离试剂 (Invitrogen，美国)

1.3.3 实验仪器 Micro-CT(SkyScan，比利时)，石蜡切片包埋机、切片 (Leica，德国)，正置显微镜 (Carl Zeiss，德国)，超纯水过滤机 (Millipore，美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 IL-9^{-/-}小鼠的鉴定 用生理盐水配制 1% 的戊巴比妥钠溶液，以 20 mg/kg 用量腹腔注射进行小鼠麻醉。剪取小鼠部分鼠尾组织放置于 1.5 mL EP 管中，加入 300 μ L 裂解液和 3 μ L 蛋白酶 K，使鼠尾组织完全浸没，置于 58 $^{\circ}$ C 烘箱过夜。次日消化完成，可见絮状物沉淀，振荡，加入 42 μ L 乙酸钾，插入冰中孵育 1 h。12 000 r/min，离心 10 min；吸取上清，并转移到新的 1.5 mL EP 管中。每管加入约 300 μ L 的异丙醇，上下颠倒混匀，可见丝状物的产生，12 000 r/min 离心 10 min，弃去上清，得到 DNA 沉淀。通风橱中晾干，适量加入 DDH₂O 70–100 μ L，置于 55 $^{\circ}$ C 烘箱，促进 DNA 的溶解，作为 PCR 扩增模板备用。再行琼脂糖电泳进行鉴定。

1.4.2 Micro-CT 分析 用生理盐水配制 1% 的戊巴比妥钠溶液，以 20 mg/kg 用量腹腔注射进行小鼠麻醉。将麻醉后的 2 月龄大小的 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠安乐死，收获股骨，剔除周围的软组织 ($n=3$)。使用 SkyScan1176 型扫描器 (Bruker, Belgium) 对小鼠股骨进行扫描，扫描参数为射线管电压为 50 kV，电流为 200 μ A，Al 为 0.5 mm，分辨率为 High，扫描旋转角度为 180 $^{\circ}$ ，空间分辨率尺寸为 9 μ m。扫描得到的原始图像通过计算机软件 NRecon/NReconServe 进行重建，使用软件 Data Viewer 确定生长板的位置，使用软件 CTAn 选取股骨远端生长板上 60–210 层作为骨密度、骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数目以及骨小梁分离度等参数的定量分析区域，并使用 Mimics 对这一区域进行三维重建。

1.4.3 苏木精-伊红染色 将 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠股骨置于 40 g/L 多聚甲醛中进行固定，时间不超过 48 h。固定完成后，用 PBS 清洗 3 遍，置于 14%EDTA 中进行脱钙，时间约为 2 周。脱钙完成后，用 PBS 清洗 3 遍，按照顺序进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片等操作。将小鼠股骨石蜡切片置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中 1 h，使用二甲苯脱蜡 2 次，梯度乙醇复水，DDH₂O 清洗 5 min，苏木精染色 2 min，流水冲洗 5 min，盐酸乙醇分化液清洗 30 s，氨水清洗 1 min，伊红染色 2 min，梯度乙醇脱水，二甲苯透明 2 次，中性树脂封固。于通风橱内风干 3 d 后，用正置荧光显微镜拍照。

1.4.4 Masson 三色染色 将 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠股骨石蜡切片置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中 1 h，使用二甲苯脱蜡 2 次，梯度乙醇复水，DDH₂O 清洗 5 min，Weigert 铁苏木精染色液染色 5 min，盐酸乙醇分化液分化 5 min，流水冲洗，Masson 蓝化液 3 min，流水冲洗，丽春红品红染色液染色 5 min，弱酸工作液洗 1 min，磷钼酸溶液洗 1 min，弱酸工作液洗 1 min 后置于苯胺蓝染色液 2 min，弱酸工作液洗 1 min，梯度乙醇脱水，二甲苯透明 2 次，中性树脂封固。于通风橱内风干 3 d 后，用正置荧光显微镜拍照。

1.4.5 免疫组化 将 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠股骨切片置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中 1 h，二甲苯脱蜡 2 次，梯度乙醇复水，用 DDH₂O 清洗 5 min，使用柠檬酸钠缓冲液修复抗原，滴加内源性过氧化物酶阻断剂孵育 15 min。PBST 洗涤 3 次，滴加 I 型胶原蛋白一

抗，稀释比例为 1 : 100，4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。次日，回收一抗，PBST 清洗，滴加二抗，稀释比例为 1 : 1 000，室温下孵育 30 min；PBST 清洗；滴加三抗，稀释比例为 1 : 200，同样在室温下孵育 30 min，PBST 清洗，滴加 DAB 显色液，DDH₂O 清洗 5 min，苏木精染色 2 min，流水冲洗 5 min。梯度乙醇脱水，二甲苯透明 2 次，中性树脂封固。于通风橱内风干后，用正置荧光显微镜拍照。

1.4.6 骨髓细胞成纤维集落形成单位 (colony-forming unit-fibroblast, CFU-F) 实验 通过提取骨髓原代细胞培养，观察间充质干细胞集落形成情况，探究小鼠骨髓细胞中间充质干细胞占比的多少。

1.4.7 原代骨髓间充质干细胞的提取 收获 2 月龄 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠两侧股骨与胫骨，用含 α -MEM 基础培养基的 5 mL 无菌注射器反复冲洗骨髓腔，直到骨髓被全部冲出，骨头发白；并用 100 μ m 的滤筛过滤掉多余的肌肉、碎骨片，获得骨髓细胞悬液。进行细胞计数，以 1×10^6 个 / 孔的密度种于 6 孔板中，将细胞摇匀，用 α -MEM 成骨诱导培养基培养。3 d 后行半换液，之后每 2 d 换液。7 d 后行结晶紫染色和碱性磷酸酶染色，21 d 后进行茜素红染色。

小鼠间充质干细胞细胞的培养及鉴定：

细胞来源	小鼠胫骨及股骨骨髓
原代培养方法	全骨髓贴壁培养
基础培养基	α -MEM 完全培养基
添加材料	体积分数 10% 的无菌胎牛血清以及体积分数 1% 的青霉素、链霉素
原代培养时间	原代细胞培养 3 d 开始进行第一次换液，之后每 3 d 换液 1 次，培养 7 d 开始传代
细胞传代	细胞融合至 80%–90% 用胰酶消化传至下 1 代，按照 1 : 2 的比例传代，约 3 d 传 1 代，共传 3 代
细胞鉴定	采用流式鉴定骨髓间充质干细胞上 CD29、CD34、CD45 和 CD90 的表达
伦理学批准	该实验经过苏州大学伦理学委员会批准

1.4.8 结晶紫染色 取出 6 孔板细胞，弃去培养基，并用 PBS 清洗残余的培养基，洗涤 2 遍。用 40 g/L 多聚甲醛室温下固定 30 min，弃去多聚甲醛，用 PBS 清洗残余的多聚甲醛，洗涤 2 遍。每孔加入 1 mL 结晶紫染色，染色 10 min，弃去染色液，加入 PBS 终止染色反应并洗去多余底色。显微镜下拍照。

1.4.9 碱性磷酸酶染色 取出 6 孔板细胞，弃去培养基，并用 PBS 清洗残余的培养基，洗涤 2 遍。用 40 g/L 多聚甲醛室温下固定 30 min，弃去多聚甲醛，用 PBS 清洗残余的多聚甲醛，洗涤 2 遍。每孔加入 1 mL 碱性磷酸酶染液，室温避光孵育 30 min，弃去染色液，加入 PBS 终止染色反应并洗去多余底色。显微镜下拍照。

1.4.10 茜素红染色 取出 6 孔板细胞，弃去培养基，并用 PBS 清洗残余的培养基，洗涤 2 遍。用 40 g/L 多聚甲醛室温下固定 30 min，弃去多聚甲醛，用 PBS 清洗残余的多聚甲醛，洗涤 2 遍。每孔加入 1 mL 茜素红染液，室温避光孵育 30 min，弃去染色液，加入 PBS 终止染色反应并洗去多余底色，显微镜下拍照。

1.4.11 荧光定量 PCR 检测成骨基因表达水平 将从 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠提取的原代骨髓间充质干细胞分别用 α 培养基和成骨培养基诱导 3 d, 分别命名为 WT-C、WT-OB、IL-9^{-/-}-C 和 IL-9^{-/-}-OB(其中 C 代表对照, OB 代表成骨诱导), 弃去培养基, 用 PBS 清洗细胞 2 遍, 用胰酶将细胞消化下来, 转移至 1.5 mL EP 管中。加入适量 TRIzol 裂解细胞, 加入 1/5 体积氯仿混匀后高速离心。将上清转移至新的 EP 管中, 加入适量异丙醇, 混匀, 高速离心。弃去上清, 用 1 mL 体积分数 75% 乙醇清洗底部 RNA 沉淀 2 次, 去除杂质。于通风橱晾干后加入适量 DEPC 水溶解。用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 检测成骨相关基因碱性磷酸酶、runt 相关转录因子 2(runt related transcription factor 2, Runx2)、骨钙素和 I 型胶原蛋白的表达。引物序列见表 1。

表 1 | 成骨相关基因引物序列
Table 1 | Primer sequences

基因名称	上游序列 (5'-3')	下游序列 (3'-5')
碱性磷酸酶	CTT GCT GGT GGA AGG AGG CA	CAC GTC TTC TCC ACC GTG GGT
骨钙素	CTG ACC TCA CAG ATC CCA AGC	TGG TCT GAT AGC TCG TCA CAA G
I 型胶原蛋白	GCT CCT CTT AGG GGC CAC T	CCA CGT CTC ACC ATT GGG G
Runx2	CAA GAA GGC TCT GGC GTT TA	TGC AGC CTT AAA TGA CTC GG
GAPDH	GGT CGG TGT GAA CGG ATT TG	ATG AGC CCT TCC ACA ATG

表注: Runx2 为 runt 相关转录因子 2。

1.4.12 Western blot 检测 JAK-STAT 信号通路相关蛋白表达水平 将从 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠提取的原代骨髓间充质干细胞分别用 α 培养基和成骨培养基诱导 3 d, 分别命名为 WT-C、WT-OB、IL-9^{-/-}-C 和 IL-9^{-/-}-OB, 弃去培养基, 用 PBS 清洗细胞 2 遍, 使用 RIPA 提取细胞蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度; 经过电泳、转膜、封闭后, 使用 β -actin、STAT3 和 pSTAT3 一抗 (1 : 1 000) 孵育过夜, 使用相应二抗 (1 : 1 000) 孵育 1 h 后洗涤曝光。

1.5 主要观察指标 ①两组小鼠股骨 Micro-CT 分析、苏木精-伊红染色结果; ②两组小鼠 I 型胶原蛋白阳性细胞数量以及骨胶原纤维形成能力的差异; ③两组小鼠成骨能力的差异。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计学分析。所有数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对 t 检验检测两组间的变量来确定统计学意义, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。统计学方法已经通过苏州大学附属第一医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 IL-9^{-/-} 小鼠的鉴定 剪取鼠尾组织提取小鼠基因组 DNA, 使用 DNA 扩增技术对目的基因 (IL-9) 进行扩增, 根据 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠的 IL-9 基因编码长度不同, 最后通过琼脂糖凝胶核酸电泳区分出 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠。WT 小鼠中 IL-9 基因的 DNA 大小为 804 bp, IL-9^{-/-} 小鼠中 IL-9 基因的 DNA 大小为 1 118 bp。基因型鉴定结果见图 1。

2.2 2 月龄 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠股骨 Micro-CT 分析结果 为了探究 IL-9 缺失对于小鼠骨量的影响, 对 2 月龄 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠股骨进行 Micro-CT 扫描分析。通过小鼠股骨 Micro-CT

的三维重建图, 发现 IL-9^{-/-} 小鼠骨量明显低于 WT 小鼠, 骨小梁间隙明显增大 (图 2A), 骨密度明显降低 (图 2B), 骨小梁相关参数分析显示, IL-9^{-/-} 小鼠骨体积分数、骨小梁数目明显下降, 骨小梁分离度明显增大 (图 2C-F), 差异有显著性意义。综上所述, IL-9 的缺失导致小鼠出现自发性骨质疏松, 骨量显著降低。

2.3 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠股骨苏木精-伊红染色结果 为了进一步验证 IL-9 缺失对于小鼠骨量的影响, 对 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠股骨切片进行苏木精-伊红染色。结果显示, IL-9^{-/-} 小鼠骨小梁密度明显降低 (图 3), 这与前面 Micro-CT 数据得出的结论一致。

2.4 IL-9^{-/-} 小鼠股骨成骨能力减弱 骨重塑是一个骨吸收和骨形成动态平衡的过程。一旦骨重塑失衡, 骨吸收速度大于骨形成, 就会出现骨质疏松。为了进一步探究 IL-9^{-/-} 小鼠骨量降低的原因, 对 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠股骨切片分别进行 I 型胶原蛋白和 Masson 染色, 观察其成骨细胞数量是否存在差异。

I 型胶原蛋白免疫组化染色结果显示, IL-9^{-/-} 小鼠股骨远端生长板下方区域 I 型胶原蛋白阳性细胞数目低于 WT 小鼠; 而 Masson 染色结果说明 WT 小鼠胶原形成能力较 IL-9^{-/-} 小鼠更强, 差异均有显著性意义 (图 4)。说明 IL-9 的缺失抑制了小鼠的成骨分化。

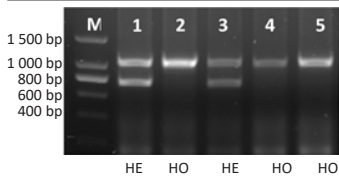
2.5 IL-9 的缺失抑制了骨髓间充质干细胞的矿化能力 为了进一步探究 IL-9^{-/-} 小鼠成骨能力减弱的原因, 分别提取了 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠原代骨髓细胞进行 CFU-F 实验。通过结晶紫染色, 发现 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠骨髓细胞形成的间充质干细胞集落数未见明显差异 (图 5A)。于是对骨髓细胞进行成骨诱导, 检测其成骨分化能力。7 d 后, 通过碱性磷酸酶染色, 发现两者碱性磷酸酶活性未见明显差异 (图 5B)。21 d 后, 通过茜素红染色, 发现 IL-9^{-/-} 小鼠来源的原代骨髓间充质干细胞矿化能力明显减弱 (图 5C)。说明 IL-9 的缺失显著抑制了骨髓间充质干细胞的矿化能力。

2.6 IL-9 的缺失抑制了成骨相关基因的表达 为了进一步探究 IL-9 对于成骨能力的影响, 定量 PCR 的结果显示, 两组小鼠骨髓间充质干细胞经过成骨诱导后, 成骨相关基因的表达升高; 而野生型小鼠骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶、Runx2、骨钙素和 I 型胶原蛋白表达明显高于 IL-9 敲基因小鼠, 说明 IL-9 的缺失抑制了小鼠的成骨作用 (图 6)。

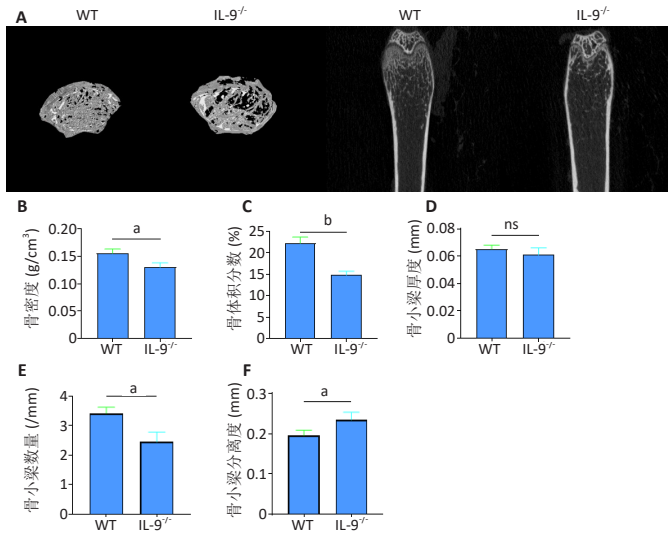
2.7 IL-9 的缺失抑制 JAK-STAT 通路信号传导 为了进一步验证 IL-9 是否通过 JAK-STAT 通路进行信号传导, 采用 Western blot 检测 STAT3 蛋白的表达, 结果显示, 成骨诱导激活 STAT3 信号传导, pSTAT3 表达明显增多; 而 IL-9 的缺失则抑制此信号通路的传导。说明 IL-9 通过 JAK-STAT3 通路调控成骨, 与 ZHOU 等^[20]的发现一致 (图 7)。

3 讨论 Discussion

骨骼系统由坚硬的骨骼框架和高度血管化的骨髓腔组成^[22]。与普遍认为的错误观念相反, 骨骼并不是处于“静止不动”

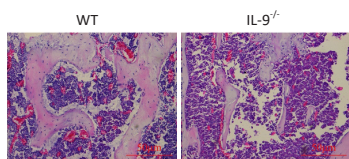


图注: HO为纯合子, HE为杂合子, IL-9为白细胞介素9。
图1 | IL-9^{-/-}小鼠基因鉴定结果
Figure 1 | Genetic identification of interleukin-9 knockout mice

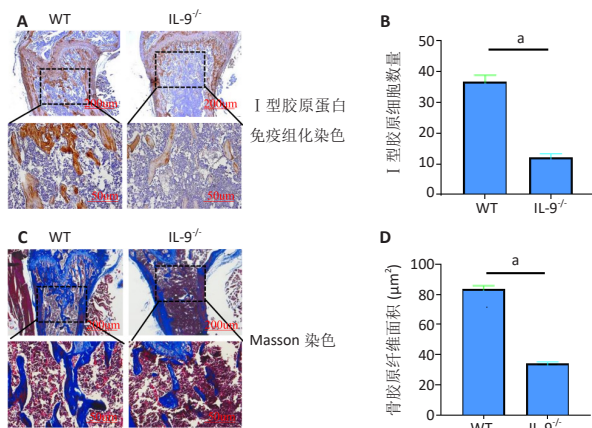


图注: WT为野生型, IL-9^{-/-}为IL-9基因全敲除。图A为2月龄WT和IL-9^{-/-}小鼠股骨三维重建图,前两幅为Micro-CT代表图像的三维重建图,后两幅为二维重建图的骨密度分析。B为2月龄WT和IL-9^{-/-}小鼠股骨骨密度分析。C-F为2月龄WT和IL-9^{-/-}小鼠股骨骨小梁参数定量分析, ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^{ns}P > 0.05。
图2 | 白细胞介素9(IL-9)缺失对小鼠骨量的影响
Figure 2 | Effect of interleukin-9 deficiency on mouse bone mass

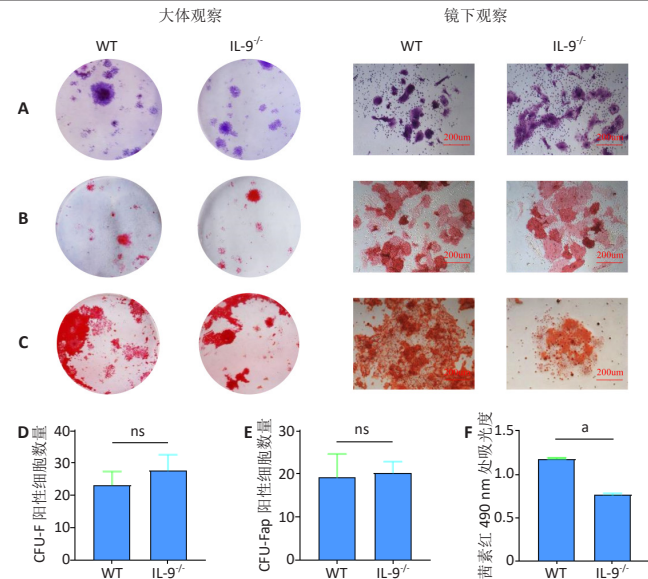
图注: WT为野生型, IL-9^{-/-}为IL-9基因全敲除。图A为2月龄WT和IL-9^{-/-}小鼠股骨三轴切片苏木精-伊红染色,标尺=50 μm。
图3 | 白细胞介素9(IL-9)缺失对小鼠骨小梁密度的影响 (苏木精-伊红染色, 标尺=50 μm)
Figure 3 | Effect of interleukin-9 deficiency on trabecular bone density in mice (hematoxylin-eosin staining, scale bar=50 μm)



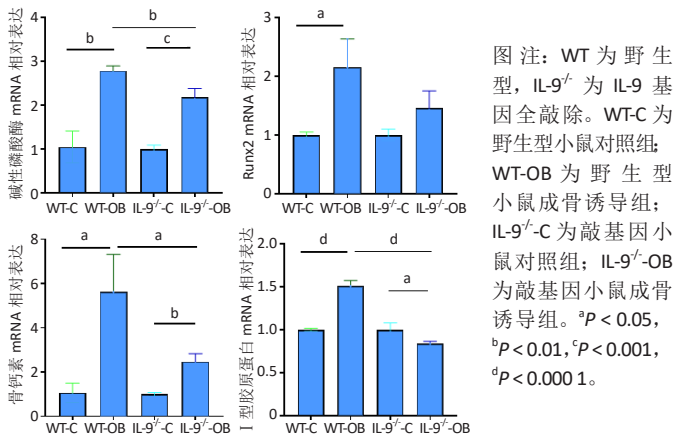
图注: WT为野生型, IL-9^{-/-}为IL-9基因全敲除。图A为2月龄WT和IL-9^{-/-}小鼠I型胶原蛋白免疫组化染色; B为免疫组化量化图; C为WT小鼠和IL-9^{-/-}小鼠Masson染色; D为Masson染色量化图。 ^aP < 0.000 1。
图4 | 白细胞介素9(IL-9)缺失对小鼠体内成骨能力的影响
Figure 4 | The deficiency of interleukin-9 affects osteogenic potential in mice



图注: WT为野生型, IL-9^{-/-}为IL-9基因全敲除。图A为2月龄WT和IL-9^{-/-}小鼠I型胶原蛋白免疫组化染色; B为免疫组化量化图; C为WT小鼠和IL-9^{-/-}小鼠Masson染色; D为Masson染色量化图。 ^aP < 0.000 1。
图4 | 白细胞介素9(IL-9)缺失对小鼠体内成骨能力的影响
Figure 4 | The deficiency of interleukin-9 affects osteogenic potential in mice



图注: WT为野生型, IL-9^{-/-}为IL-9基因全敲除。图A-C为2月龄WT小鼠和IL-9^{-/-}小鼠骨髓间充质干细胞结晶紫染色、碱性磷酸酶染色、茜素红染色; 图D-F为2月龄WT小鼠和IL-9^{-/-}小鼠骨髓间充质干细胞结晶紫染色、碱性磷酸酶染色、茜素红染色的定量分析, ^aP < 0.000 1, ^{ns}P > 0.05。
图5 | 白细胞介素9(IL-9)的缺失抑制了骨髓间充质干细胞的矿化能力
Figure 5 | The deficiency of interleukin-9 inhibits the mineralization capacity of bone marrow mesenchymal stem cells



图注: WT为野生型, IL-9^{-/-}为IL-9基因全敲除。WT-C为野生型小鼠对照组; WT-OB为野生型小鼠成骨诱导组; IL-9^{-/-}-C为敲基因小鼠对照组; IL-9^{-/-}-OB为敲基因小鼠成骨诱导组。 ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP < 0.001, ^dP < 0.000 1。
图6 | 白细胞介素9(IL-9)的缺失抑制了成骨相关基因的表达
Figure 6 | The deficiency of interleukin-9 inhibits the expression of osteogenesis-related genes



图注: WT为野生型, IL-9^{-/-}为IL-9基因全敲除。WT-C为野生型小鼠对照组; WT-OB为野生型小鼠成骨诱导组; IL-9^{-/-}-C为敲基因小鼠对照组; IL-9^{-/-}-OB为敲基因小鼠成骨诱导组。
图7 | 白细胞介素9(IL-9)的缺失抑制了STAT3信号通路的传导
Figure 7 | The deficiency of interleukin-9 inhibits the transduction of the STAT3 signaling pathway

的状态, 而是一个相对动态的器官, 是经过不断骨重塑的高度动态的结构^[23]。在儿童时期, 骨转换率很高, 骨形成超过了骨吸收, 骨骼会经历长度以及半径的增大; 在成年时期, 骨形成与骨吸收基本平衡, 但在机械应力的刺激下, 骨骼的微结构会不断进行重塑以适应力的传导, 避免骨损伤的累积。而随着年龄的增长, 骨吸收会逐渐超过骨形成, 导致骨质丢失。

骨重塑是一个长期的过程，是成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收之间的动态平衡。骨重塑过程始于破骨细胞的募集、活化，骨吸收后破骨细胞凋亡，随后成骨细胞被募集，介导新骨形成^[24-25]。也就是说，骨重塑是一个骨吸收偶联骨形成的过程，而骨吸收和骨形成在时间和空间上是高度耦合的。在正常生理状态下，骨形成过程产生的新骨与骨吸收过程吸收的旧骨数量是相同的，保持着动态平衡^[26]。而一旦骨吸收增强或者骨形成减弱，就会导致骨重塑失衡，表现为骨质丢失，骨量降低。机体中许多因素都能对骨重塑过程产生影响。如绝经后骨质疏松症就是女性绝经后雌激素水平下降，导致骨吸收增强，净骨丢失^[27-28]；而年龄相关性骨质疏松则是与骨骼衰老联系更为紧密^[29]，多是骨形成减弱导致骨量降低。除此之外，炎症也能影响骨重塑过程。一些促进炎症的细胞因子 IL-1、IL-6 和肿瘤坏死因子 α 也能刺激破骨细胞的分化，而一些抗炎因子 IL-4、IL-10 则能抑制破骨细胞的形成^[30-31]。而 RAUBER 等^[32] 发现在 WT 和 IL-9 基因敲除小鼠中建立血清转移性关节炎，IL-9 基因敲除小鼠中 2 型固有淋巴细胞的增殖和调节性 T 细胞的激活受到明显抑制，导致关节软骨的破坏和骨质丢失；而当过表达 IL-9 时，可明显促进 2 型固有淋巴细胞的增殖以及调节性 T 细胞的免疫抑制功能，更多地发挥抗炎作用，促进炎症消退有效保护了关节软骨，减少了骨丢失。

在此文中发现 IL-9^{-/-} 小鼠出现自发性骨质疏松、骨量降低。在 IL-9 缺失情况下，骨体积分数、骨小梁数目显著降低，骨小梁分离度明显升高；通过苏木精-伊红染色，从形态学上验证了 Micro-CT 的结果；通过 I 型胶原蛋白免疫组化染色证明了 IL-9^{-/-} 小鼠股骨远端生长板下方区域成骨细胞数量减少，而 Masson 染色结果也说明了 IL-9^{-/-} 小鼠股骨胶原纤维形成减弱，说明 IL-9^{-/-} 小鼠骨量降低可能是由成骨能力减弱导致的。为了进一步从细胞层面进行验证，分别提取 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠的原代骨髓间充质干细胞进行 CFU-F 实验，结果显示 WT 和 IL-9^{-/-} 小鼠骨髓间充质干细胞形成的集落数未见明显差异，但 WT 小鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导后矿化能力明显强于 IL-9^{-/-} 小鼠，与体内结果一致。

此次研究发现了 IL-9 的缺失能够抑制成骨细胞的分化以及矿化能力，导致骨形成减弱，骨量降低。根据文献报道，IL-9 诱导的受体激活通常通过 JAK-STAT3/5 进行传导，通过 Western blot 检测相关信号蛋白的表达，发现成骨诱导激活 STAT3 信号传导，pSTAT3 含量明显增多；而 IL-9 的缺失则抑制此信号通路的传导。这与 ZHOU 等^[20] 发现成骨细胞特异性敲除 STAT3 会导致骨发育不良的现象一致。但关于 IL-9 的缺失对破骨细胞影响未进行全面探究，有文献报道 IL-9 能够促进体外破骨细胞的形成^[33-34]。作者在后续研究中将会关注其对破骨细胞的影响。

综上所述，此次研究结果显示 IL-9^{-/-} 小鼠出现自发性骨质疏松的现象，初步探究发现，IL-9 的缺失抑制成骨细胞的分化与功能，这可能是 IL-9^{-/-} 小鼠骨量降低的原因之一，但具体机制仍不明确，需要进一步深入研究。

作者贡献：施勤负责实验设计，王怡负责实验实施，周熙超负责实验评估，陈迟迟负责资料收集，所有作者均参与文章修改与撰写。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- COMPSTON JE, MCCLUNG MR, LESLIE WD. Osteoporosis. Lancet. 2019;393(10169):364-376.
- EASTELL R, O'NEILL TW, HOFBAUER LC, et al. Postmenopausal osteoporosis. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16069.
- Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women: The 2021 Position Statement of The North American Menopause Society. Management of osteoporosis in postmenopausal women: the 2021 position statement of The North American Menopause Society. Menopause. 2021;28(9):973-997.
- YU F, XIA W. The epidemiology of osteoporosis, associated fragility fractures, and management gap in China. Arch Osteoporos. 2019;14(1):32.
- ZHU X, BAI W, ZHENG H. Twelve years of GWAS discoveries for osteoporosis and related traits: advances, challenges and applications. Bone Res. 2021;9(1):23.
- ZEBAZE R, LIBANATI C, MCCLUNG MR, et al. Denosumab Reduces Cortical Porosity of the Proximal Femoral Shaft in Postmenopausal Women With Osteoporosis. J Bone Miner Res. 2016;31(10):1827-1834.
- CHAVASSIEUX P, CHAPURLAT R, PORTERO-MUZY N, et al. Bone-Forming and Antiresorptive Effects of Romosozumab in Postmenopausal Women With Osteoporosis: Bone Histomorphometry and Microcomputed Tomography Analysis After 2 and 12 Months of Treatment. J Bone Miner Res. 2019;34(9):1597-1608.
- LOTINUN S, KIVIRANTA R, MATSUBARA T, et al. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. J Clin Invest. 2013;123(2):666-681.
- KRAENZLIN ME, MEIER C. Parathyroid hormone analogues in the treatment of osteoporosis. Nat Rev Endocrinol. 2011;7(11):647-656.
- REID IR. Short-term and long-term effects of osteoporosis therapies. Nat Rev Endocrinol. 2015;11(7):418-428.
- WHITAKER M, GUO J, KEHOE T, et al. Bisphosphonates for osteoporosis--where do we go from here? N Engl J Med. 2012;366(22):2048-2051.
- FENG X, MCDONALD JM. Disorders of bone remodeling. Annu Rev Pathol. 2011;6:121-145.
- CHAKRABORTY S, KUBATZKY KF, MITRA DK. An Update on Interleukin-9: From Its Cellular Source and Signal Transduction to Its Role in Immunopathogenesis. Int J Mol Sci. 2019;20(9):2113.
- GOSWAMI R, KAPLAN MH. A brief history of IL-9. J Immunol. 2011;186(6):3283-3288.
- NOELLE RJ, NOWAK EC. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. Nat Rev Immunol. 2010;10(10):683-687.
- GENG W, ZHANG W, MA J. IL-9 exhibits elevated expression in osteonecrosis of femoral head patients and promotes cartilage degradation through activation of JAK-STAT signaling in vitro. Int Immunopharmacol. 2018;60:228-234.
- ZHENG Y, HE Y, XIAO M, et al. Interleukin 9 prevents immune thrombocytopenia in mice via JAK/STAT5 signaling. Exp Cell Res. 2020; 88(1):111801.
- 邹旺辉, 钱楠楠, 张萌, 等. 间充质干细胞临床前研究启示: 间充质干细胞的细胞功能与 JAK/STAT 信号通路的关系 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(19):3048-3055.
- SANPAOLO ER, ROTONDO C, CICI D, et al. JAK/STAT pathway and molecular mechanism in bone remodeling. Mol Biol Rep. 2020;47(11):9087-9096.
- ZHOU S, DAI Q, HUANG X, et al. STAT3 is critical for skeletal development and bone homeostasis by regulating osteogenesis. Nat Commun. 2021;12(1):6891.
- LEE J, SEONG S, KIM JH, et al. STAT5 is a key transcription factor for IL-3-mediated inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis. Sci Rep. 2016;6:30977.
- ZHAO Y, XIE L. Unique bone marrow vessels couple angiogenesis and osteogenesis in bone homeostasis and diseases. Ann N Y Acad Sci. 2020;1474(1):5-14.
- DATTA HK, NG WF, WALKER JA, et al. The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol. 2008; 61(5):577-587.
- KATSIMBRI P. The biology of normal bone remodelling. Eur J Cancer Care (Engl). 2017;26(6). doi: 10.1111/ecc.12740.
- RAGGATT LJ, PARTRIDGE NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. J Biol Chem. 2010;285(33):25103-25108.
- SIDDQUI JA, PARTRIDGE NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. Physiology (Bethesda). 2016;31(3):233-245.
- BATOON L, MILLARD SM, RAGGATT LJ, et al. Osteal macrophages support osteoclast-mediated resorption and contribute to bone pathology in a postmenopausal osteoporosis mouse model. J Bone Miner Res. 2021; 36(11):2214-2228.
- MCNAMARA LM. Osteocytes and Estrogen Deficiency. Curr Osteoporos Rep. 2021;19(6):592-603.
- FÖGER-SAMWALD U, KERSCHAN-SCHINDL K, BUTYLINA M, et al. Age Related Osteoporosis: Targeting Cellular Senescence. Int J Mol Sci. 2022;23(5):2701.
- SCHETT G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. Eur J Clin Invest. 2011;41(12):1361-1366.
- ZUPAN J, JERAS M, MARC J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. Biochem Med (Zagreb). 2013;23(1):43-63.
- RAUBER S, LUBER M, WEBER S, et al. Resolution of inflammation by interleukin-9-producing type 2 innate lymphoid cells. Nat Med. 2017;23(8):938-944.
- KAR S, GUPTA R, MALHOTRA R, et al. Interleukin-9 Facilitates Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis. Int J Mol Sci. 2021;22(19):10397.
- CHAKRABORTY S, SCHNEIDER J, MITRA DK, et al. Mechanistic insight of interleukin-9 induced osteoclastogenesis. Immunology. 2023;169(3):309-322.

(责任编辑: YJ, GD, ZN, WL)