

R-spondin1 在促进人骨髓间充质干细胞成骨分化中的作用*

孙博^{1**}, 张弢², 杨龙¹, 李靖¹, 任厚相¹, 孙琦¹, 王建吉¹, 叶川^{1***}

(1. 贵阳医学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 中国人民解放军第117医院 骨科, 浙江 杭州 311201)

[摘要] 目的: 研究 Wnt 信号通路激活剂 R-spondin1 在人骨髓间充质干细胞(hBMSC)成骨分化中的作用。方法: 用 0、5、10、20 $\mu\text{g/L}$ R-spondin1 处理 hBMSC, 利用荧光素酶实验检测 R-spondin1 对 hBMSC 中 Wnt 信号通路的作用, Western blot 检测 R-spondin1 对 Wnt 信号通路下游靶基因 β -catenin 蛋白表达的影响; 在成骨分化培养基中添加 20 $\mu\text{g/L}$ R-spondin1 诱导 hBMSC 成骨分化, 检测 R-spondin1 对早期成骨分化指标 ALP 活性及成骨分化晚期钙沉积、成骨分化标志物 OSX、OCN 和成骨分化关键转录因子 RUNX2 表达的影响。结果: R-spondin1 增强 hBMSC 中 Wnt 信号通路, R-spondin1 增强 ALP 活性和钙沉积, 促进 OSX、OCN 及 RUNX2 的表达。结论: R-spondin1 增强 hBMSC 中 Wnt 信号通路的作用, 促进 hBMSC 成骨分化。

[关键词] R-spondin1; Wnt 信号通路; 人骨髓间充质干细胞; 成骨分化; RUNX2

[中图分类号] R318.17 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)05-0438-04

R-spondin1 Promotes Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

SUN Bo¹, ZHANG Tao², YANG Long¹, LI Jing¹, REN Houxiang¹, SUN Qi¹, WANG Jianji¹, YE Chuan¹

(1. Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Orthopedics, the 117th Hospital of PLA, Hangzhou 311201, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of R-spondin1, a Wnt signal pathway activator, on osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSC). **Methods:** hBMSC were treated with 0, 5, 10, 20 $\mu\text{g/L}$ R-spondin1. Luciferase assay was employed to detect the effect of R-spondin1 on Wnt signal pathway, and Western blot was used to detect the expression of β -catenin which was the downstream target gene of Wnt signal pathway. Alkaline phosphatase (ALP) activity, calcium deposition, and the levels of OSX, OCN, RUNX2 were detected to observe the effect of R-spondin1 on hBMSC osteogenic differentiation. **Results:** R-spondin1 enhanced Wnt signal pathway, ALP activity, calcium deposition and the expression of OSX, OCN and RUNX2 in hBMSC osteogenic differentiation. **Conclusion:** R-spondin1 can enhance Wnt signal pathway of hBMSC and promote osteogenic differentiation.

[Key words] R-spondin1; Wnt signal pathway; Human bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation; RUNX2

骨缺损是临床上常见的骨骼系统疾病, 严重危害患者的生活质量。人骨髓间充质干细胞(human

bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSC) 是成骨细胞的前体细胞, 具有自我更新能力和多向分化

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目[81360232]; 贵州省卫生厅资助项目[gzkwj2010-1-042]; 贵州省国际科技合作项目[黔科合外 G 字 2010-7]; 贵州省科技厅社发联合基金项目[黔科合 20103166]

** 贵阳医学院 2012 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: yechuanchina@hotmail.com

网络出版时间: 2015-05-21 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150521.1226.004.html>

潜能,在体外可定向分化为骨细胞,是骨再生工程理想的种子细胞,具有重要的临床应用前景^[1]。R-spondins 是一个在多种生物中广泛表达的分泌蛋白家族,人类 RSPO 家族包括四个家族成员,即 R-spondin1、R-spondin2、R-spondin3 和 R-spondin4^[2]。研究发现,R-spondins 主要是通过激活 Wnt 信号通路发挥其生物学功能^[3]。由于 Wnt 信号在骨发生中发挥着重要作用,经典 Wnt 信号通路的激活能够促进 BMSC 成骨分化,抑制成脂分化^[4]。因此推测 R-spondins 在体外能够通过调控 Wnt 信号通路促进人 BMSC 成骨分化。为了验证这一推测,本研究选取了 R-spondins 家族成员 R-spondin1,检测了其对人 BMSC Wnt 信号通路和成骨分化的作用。

1 材料方法

1.1 材料

TOPflash 质粒和 pRL-SV40 质粒由本实验室保存,Lipofectamine 2000 转染试剂和 RNA 提取试剂 TRIzol 为 Invitrogen 公司产品,双荧光素酶活性检测试剂盒和反转录试剂盒购自 Promega 公司,SYBR Premix ExTaq M 定量 PCR 试剂为大连宝生物公司产品, β -catenin、RUNX2、OSX 和 OCN 抗体购自 CST 公司,Tubulin 抗体购自 Santa Cruz 公司,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)检测试剂盒购自南京建成生物研究所,茜素红 S(Alizarin Red S)为 Sigma 公司产品, α -MEM 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清为杭州四季青公司产品。

1.2 BMSC 的分离、培养和成骨诱导

经伦理委员会批准和本人签署知情同意书,hBMSC 取自一位 32 岁健康男性志愿者,采用密度梯度离心法获取 hBMSC,并在加有双抗的含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基中培养。实验使用第 4 代 hBMSC。将 hBMSC 接种至孔板中,待细胞密度约 60% 时加入成骨诱导分化液(10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基中加入 10 mmol/L β -磷酸甘油钠、50 mg/L 维生素 C 和 0.1 μ mol/L 地塞米松),每 3 d 换液一次。使用 0、5、10、20 μ g/L R-spondin1 处理细胞,观察其对 Wnt 信号通路的作用是否具有剂量依赖效应。其余实验所用的 R-spondin1 浓度均为 20 μ g/L。

1.3 荧光素酶活性检测

将 hBMSC 接种至 12 孔培养板中,细胞密度长

至 70% 左右时使用 Lipofectamine 2000 转染试剂转染 TOPflash 质粒和 pRL-SV40 质粒,转染 24 h 后使用 20 μ g/L 的 R-spondin1 处理细胞 24 h,收集细胞后按照双荧光素酶活性检测试剂盒说明书检测细胞荧光素酶活性,每组样品含有 3 个重复,相对荧光素酶活性为萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。

1.4 Western blot 分析

收集细胞,提取蛋白,蛋白定量后加入 5 \times SDS 沸水浴 5 min,SDS-PAGE 电泳、转膜,使用 5% 的脱脂奶粉封闭,1 h 后加入相应一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次后加入辣根过氧化物酶偶联的二抗,孵育 2 h 后用 TBST 洗膜 3 次,加入 ECL 发光剂显色 3 min 后压片显影。

1.5 ALP 活性检测

BMSC 成骨分化 4 d,吸除培养板中的培养液,PBS 洗 2 遍后,按试剂盒说明书进行 ALP 活性检测,用酶标仪测出各孔吸光度值,同时采用 BCA 法检测细胞内总的蛋白量,用以校正 ALP 活性。重复 3 次。

1.6 钙盐沉积实验

hBMSC 成骨分化 14 d,弃去培养基后使用 PBS 洗 2 遍,戊二醛固定,使用 ddH₂O 清洗 3 次后加入 0.4% 茜素红 S,光镜下观察监测,待出现红色物质堆积时弃去染液,使用 ddH₂O 终止反应和洗涤,显微镜下拍照。为了定量检测钙盐沉积,染色后加入冰乙酸在摇床上孵育 30 min,刮下后于 85 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,冰上 5 min,高速离心后 15 min,取 400 μ L 加入 10% NH₄OH,将 pH 调到 4.5 后,用酶标仪于 405 nm 处测吸光度值。

1.7 Real-time PCR

按 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞 RNA,反转录后进行 Real-time PCR。Real-time PCR 按照 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒说明书进行,反应体系如下:SYBR Premix Ex Taq 10 μ L、cDNA 1 μ L、上游引物 1 μ L、下游引物 1 μ L,加 H₂O 7 μ L 补至 20 μ L,反应在 Applied Biosystems 公司的 7900HT Fast Real-time PCR system 上进行,每一样品均设 3 个重复孔,以 GAPDH 作为内参。RUNX2 引物序列:Forward TCTTAGAACAAATTCGCCCTTT、Reverse TGCTTTGGTCTTGAAATCACA。OSX 引物序列:Forward CCTCCTCAGCTCACCTTCTC、Reverse GTTGGGAGCCCCAAATAGAAA。OCN 引物序列:Forward AGCAAAGGTGCAGCCTTTGT、Reverse GCGC-

CTGGGTCTCTTCACT。GAPDH 引物序列: Forward GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, Reverse GAGATGGT-GATGGGATTTTC。

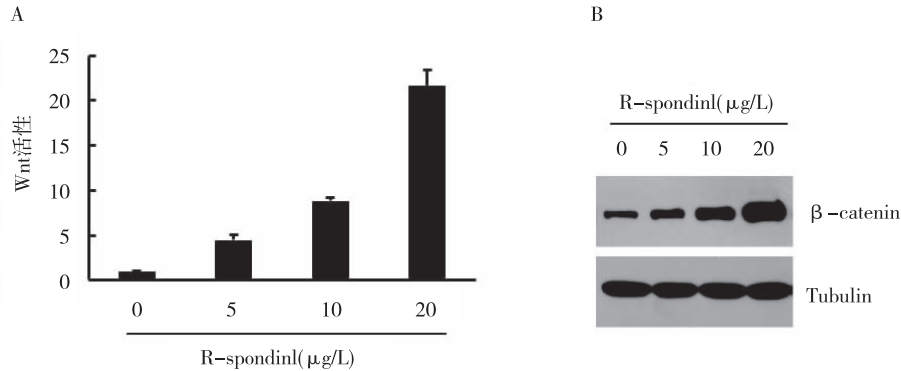
1.8 统计学分析

所有数据均使用 SPSS 统计软件进行统计学分析,数据以均值 \pm 标准差表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 R-spondin1 对 hBMSC Wnt 信号通路的影响

双荧光素酶报告基因检测系统结果显示 R-spondin1 能够以剂量依赖的方式激活 Wnt 信号通路,见图 1A。Western blot 检测结果显示 R-spondin1 能够以剂量依赖的方式增强 Wnt 信号通路下游靶基因 β -catenin 蛋白表达,见图 1B。



注:A 为荧光素酶实验结果,B 为 Western blot 检测结果

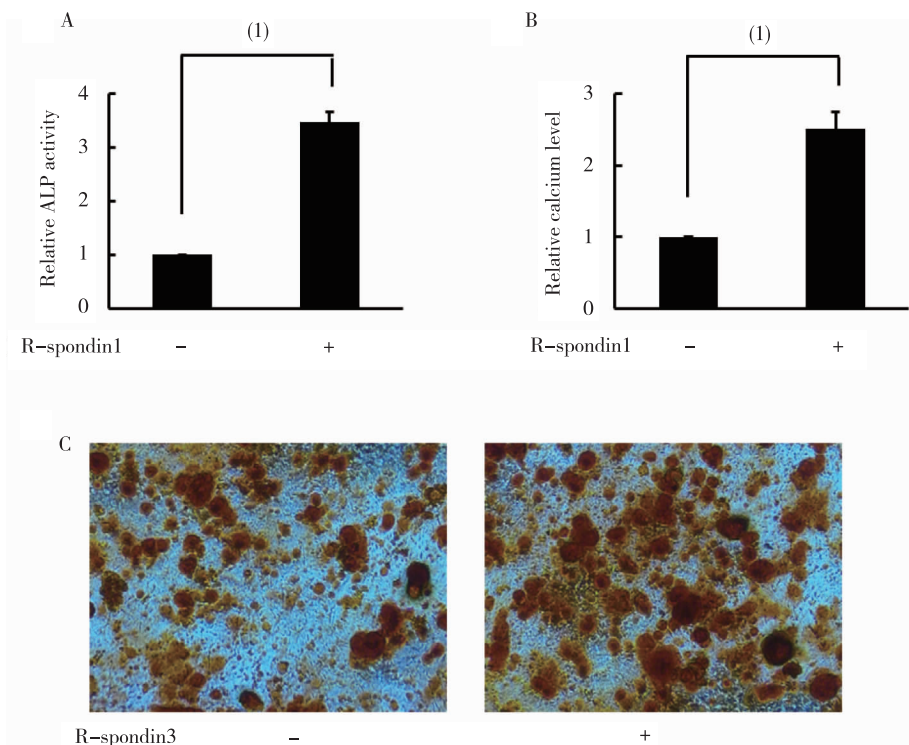
图 1 R-spondin1 对 hBMSC 中 Wnt 信号通路的影响

Fig. 1 The effect of R-spondin1 on Wnt signal pathway of hBMSC

2.2 R-spondin1 对 hBMSC 成骨分化的影响

R-spondin1 显著促进了 ALP 活性,钙沉积,见

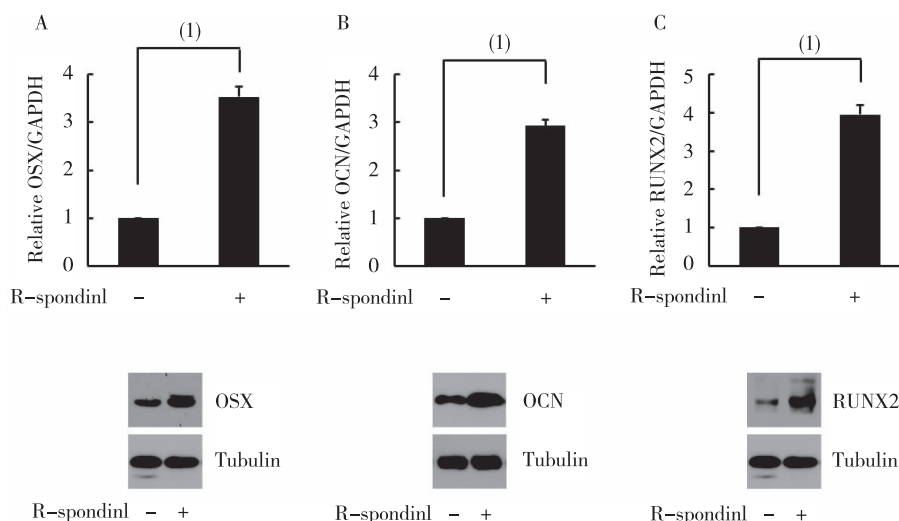
图 2。R-spondin1 显著促进了 OSX、OCN 和 RUNX2 mRNA 和蛋白的表达,见图 3。



注:A 为 ALP 活性,B 为钙盐沉积的定量,C 为显微镜下钙盐沉积;⁽¹⁾两组比较, $P < 0.05$

图 2 R-spondin1 对 hBMSC 成骨分化的影响

Fig. 2 The effect of R-spondin1 on hBMSC osteogenic differentiation



(¹) 两组比较, $P < 0.05$

图3 R-spondin1 对 hBMSC 中 OSX、OCN 和 RUNX2 表达的影响

Fig.3 The effect of R-spondin1 on the expression of OSX, OCN and RUNX2 in hBMSC

3 讨论

hBMSC 是一种具有自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞,因其具有分离培养容易、增殖能力强和多向分化能力的优点成为再生医学和组织工程领域研究最为深入的种子细胞之一。hBMSC 是成骨细胞的前体细胞,在体外可以定向分化为骨细胞,其过程受到多种信号通路的调控,包括 BMPs/Smad、MAPK 和 Wnt 信号通路等^[5]。

Wnt 信号通路包括经典和非经典 2 种。经典的 Wnt 信号通路:即 Wnt/ β -catenin 信号通路,Wnt 配体(如 Wnt3a)与受体 FZD 和辅助受体 LRP 结合后抑制 APC 复合物对 β -catenin 的降解,使 β -catenin 在细胞内富集并入核与 Tcf/Lef 形成转录激活复合物,促进下游基因的转录^[6]。非经典的 Wnt 信号通路:Wnt 配体(如 Wnt11)与受体 FZD 和辅助受体 ROR2/Ryk 结合后,激活下游 JNK、CaMKII、PKC 信号通路。研究发现经典的 Wnt 信号通路和非经典的 Wnt 信号通路在 hBMSC 成骨分化过程中均发挥着重要的作用^[7]。Qin 等^[4]发现使用 Wnt3a 激活经典的 Wnt 信号通路,能够显著增强 hBMSC 中 ALP 活性,同时抑制脂滴形成,进一步研究证实了经典的 Wnt 信号通路能够通过促进 RUNX2 的表达从而促进 hBMSC 的成骨分化。研究发现在间充质干细胞敲除 β -catenin 基因,能够抑制成骨分化,进一步说明了经典的 Wnt 信号

通路在 hBMSC 成骨分化过程中发挥着重要的作用^[8]。Fu 等^[9]发现非经典 Wnt/JNK 通路也能促进 hBMSC 的成骨分化能力。

R-spondin1 是 Wnt 信号通路的激活剂,既能激活经典的 Wnt 信号通路,也可以激活非经典的 Wnt 信号通路^[10]。由于经典的 Wnt 信号通路和非经典的 Wnt 信号通路在 hBMSC 成骨分化过程中均发挥着重要的作用,因此 R-spondin1 能够促进 hBMSC 的成骨分化能力。本研究结果证实了该推测,R-spondin1 对早期成骨分化指标 ALP 活性和成骨分化晚期钙沉积都有显著的增强作用,进一步在分子水平上证明 R-spondin1 能够促进成骨分化标志物 OSX 和 OCN 的表达,并初步证明对 RUNX2 表达的促进作用可能是 R-spondin1 促进 hBMSC 成骨分化的原因。

4 参考文献

- [1] Guoping W, Xiaochuan H, Zhihui Y, et al. Influence on the osteogenic activity of the human bone marrow mesenchymal stem cells transfected by liposome-mediated recombinant plasmid pIRES-hBMP2-hVEGF165 in vitro [J]. *Annals of plastic surgery*, 2010(1):80-84.
- [2] De Lau WB, Snel B, Clevers HC. The R-spondin protein family[J]. *Genome Biol*, 2012(3):242.
- [3] de Lau W, Peng W C, Gros P, et al. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength [J]. *Genes & development*, 2014(4):305-316.

(下转第 446 页)

细胞比率和表达强度均没有明显增高。以上结果显示,通过导入 NF- κ B ODN Decoy 构建的耐受性 DC 具有稳定的耐受表型。

II 型胶原常被用来建立类风湿性关节炎的动物模型,建立的动物模型与人类风湿性关节炎表现最为相似^[9]。获得抗原特异性的耐受性 DC 疫苗,在 DC 培养体系中加入 NF- κ B ODN Decoy 后第 6 天时,又加入 B II C 共孵至第 8 天,使其对 B II C 完成摄取和表达,制备负载了 B II C 的耐受性 DC,称为 B II C-Decoy-DC。结果显示,B II C-Decoy-DC 形态与单纯 Decoy-DC 无明显区别,且负载 B II C 后细胞表面 CD80 和 CD86 的表达仍然保持与 Decoy-DC 相似的水平,负载抗原之后并未影响 Decoy-DC 表面 CD80 和 CD86 的相对低表达状态,此结果有望将 NF- κ B ODN Decoy 构建的耐受性 DC 负载 B II C 抗原后应用于 B II C 所致的大鼠 RA 模型研究,进一步在体内实验中探讨该疫苗的治疗效果及机制。

4 参考文献

- [1] Orange DE, Blachere NE, Fak J, et al. Dendritic cells loaded with FK506 kill T cells in an antigen-specific manner and prevent autoimmunity in vivo [J]. *Elife*, 2013(2):e00105.
- [2] Natarajan S, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells: potential for regulation and therapy of liver auto- and alloimmunity [J]. *Immunobiology*, 2010(9-10):698-703.
- [3] Xu DL, Liu Y, Tan JM, et al. Marked prolongation of murine cardiac allografts al. Marked prologation urvival using recipient immature dendritic cells loaded with donor derived apoptotic cells [J]. *Scand J Immunol*, 2004(6):536-544.
- [4] Bonham CA, Peng L, Liang X, et al. Marked prolongation of cardiac allograft survival by dendritic cells genetically engineered with NF-kappa B oligodeoxyribonucleotide decoys and adenoviral vectors encoding CTLA4-Ig [J]. *J Immunol*, 2002(6):3382-3391.
- [5] 胡祖权, 夏雪, 杨晓芳, 等. 基于树突状细胞的抗肿瘤免疫治疗 [J]. *贵阳医学院学报*, 2014(6):783-787.
- [6] Kornete M, Piccirillo C A. Functional crosstalk between dendritic cells and Foxp3(+) regulatory T cells in the maintenance of immune tolerance [J]. *Front Immunol*, 2012(3):165.
- [7] Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells: all present and correct [J]. *Am J Transplant*, 2010(2):214-219.
- [8] 徐东亮, 唐孝达, 李博, 等. 核因子- κ B 对小鼠树突状细胞分化成熟及其体外刺激 T 细胞免疫反应的影响 [J]. *中华器官移植杂志*, 2004(25):89-92.
- [9] Sylvie S, Peggy J. Jens VP, et al. A multiparameter approach to monitor disease activity in collagen-induced arthritis. [J], *Arthritis Research & Therapy*, 2010(4):1-10.
- [4] Shen YL, Luo Q, Guo YX, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived Wnt5a inhibits leukemia cell progression in vitro via activation of the non-canonical Wnt signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2014(1):85-90.
- [5] 张新昌, 张西正. 骨髓间充质干细胞成骨分化相关通路的研究进展 [J]. *医学综述*, 2013(21):3853-3856.
- [6] 尹定子, 宋海云. Wnt 信号通路: 调控机理和生物学意义 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2011(2):103-111.
- [7] 陈小静, 高艳虹. Wnt 信号通路调控间充质干细胞成骨分化的研究进展 [J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2013(1):99-103.
- [8] Cai SX, Liu AR, Chen S, et al. Activation of Wnt/ β -catenin signalling promotes MSCs to repair injured alveolar epithelium induced by LPS in mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015(1):65.
- [9] Fu L, Tang T, Miao Y, et al. Activation of non-canonical Wnt/JNK pathway by Wnt3a is associated with differentiation fate determination of human bone marrow stromal (mesenchymal) stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011(1):98-104.
- [10] Hao HX, Xie Y, Zhang Y, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner [J]. *Nature*, 2012(7397):195-200.

(2015-03-05 收稿, 2015-04-21 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 刘 华

(上接第 441 页)

(2015-03-23 收稿, 2015-04-19 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 周 凌