论著

文章编号:1000-5404(2013)05-0412-04

Wnt3a 对小鼠破骨细胞分化调控的影响

李红丽[1,2],申利红[1,2],芦永良[1,2],冯 涛[1,2],黄佳祎[1,3] (400016 重庆,重庆医科大学:分子医学与肿瘤研究中心[1],生物化学与分子生物学教研室[2],病理生理学教研室[3])

[摘要] **目的** 探讨 Wnt3a 对小鼠破骨细胞分化调控的影响。**方法** 将细胞分为4组:阴性对照组(即空白组)、实验对照组(感染 Ad-GFP 组)、阳性对照组(50 ng/ml RANKL 诱导组)、实验组(感染 Ad-Wnt3a 组)。分别给予处理因素后常规细胞培养6 d,通过酒石酸抗酸性磷酸酶(TRAP)染色观察破骨细胞的分化成熟情况;Western blot 检测 TRAP、Cathepsin K 蛋白的表达;分别于处理因素后 3、6、9 d 提取细胞总 RNA,荧光定量 Real time(RT-PCR)检测核因子 κB 受体(RANK)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、组织蛋白酶 K(Cathepsin K)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)基因的表达。**结果** TRAP 染色显示 50 ng/mL RANKL 诱导组能成功诱导 RAW 264.7 成多核(核≥10),空白组和 Ad-GFP 组有少量多核细胞(3≤核≤5),Ad-Wnt3a 组为单核有个别双核;Western blot 检测显示 Ad-Wnt3a 组 TRAP、Cathepsin K 蛋白表达降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);RT-PCR 检测 Ad-Wnt3a 组能下调 RANK、TRAP、Cathepsin K、MMP-9 基因的表达。**结论** Wnt3a 能抑制 RAW264.7 分化成成熟的破骨细胞。

[关键词] Wnt3a,RAW264.7,RANKL ,TRAP

[中图法分类号] R322.71; R329.28; R394.2 [文献标志码] A

Effect of Wnt3a on regulation of mouse osteoclast differentiation

Li Hongli[1,2], Shen Lihong[1,2], Lu Yongliang[1,2], Feng Tao[1,2], Huang Jiayi[1,3] ([1]Center Institute of Molecular Medicine and Tumor Research, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, [3]Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the regulatory role of Wnt3a in the differentiation of mouse osteoclasts. **Methods** Cells were divided into a negative control group (blank), an experimental control group (Ad-GFP transfection), a positive control group (50 ng/mL RANKL induction), and an experimental group (Ad-Wnt3a transfection). All the cells were conventionally cultured for 6 d. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was applied to observe osteoclast differentiation and maturation, and Western blot analysis was applied to detect the protein expression of TRAP and cathepsin K. Total cellular RNA was extracted after treatment for 3, 6 and 9 d, and quantitative real-time PCR was applied to determine the expression of receptor activator of nuclear factor κB (RANK), TRAP, cathepsin K and matrix metalloproteinase (MMP)-9. **Results** TRAP staining showed that 50 ng/ml RANKL could successfully induce RAW264.7 cells into multinucleated cells (nuclear≥10). A few multinucleated cells (3≤nuclear≤5) were observed in the control group and the Ad-GFP group, and mononuclear cells and few dual-nuclear cells were observed in the Ad-Wnt3a group. **Conclusion** Wnt3a can inhibit the differentiation of RAW264.7 cells into mature osteoclasts.

[**Key words**] Wnt3a; RAW264.7; RANKL; TRAP

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5100). Corresponding author: Huang Jiayi, E-mail:e738741@126.com

骨的发育处于不断的成骨和破骨的动态平衡之中。破骨细胞分化的激活和功能亢进是导致吸收性骨病的关键环节[1]。研究破骨细胞分化的调节,阻断破骨前体细胞分化为破骨细胞的信号通路可能是一种有效防止骨吸收的治疗策略。Wnt 信号途径在骨的代谢中具有非常重要的作用。在人类和小鼠中,均可观察到 Wnt 途径的增强可最终导致成骨增加[2]。相关研究[3]发现 Wnt 信号途径可通过上调 OPG/RANKL 的比例来抑制破骨细胞的形成。但究竟是哪一种亚型的作用及对破骨细胞分化的调控有无直接影响目前尚不

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5100)

[通信作者] 黄佳祎,E-mail:e738741@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121225.1249.004.html(2012-12-25)

明确。因此,本研究结合前期实验中的筛选结果,以腺病毒为载体,探讨了 Wnt3a 在体外对破骨前体细胞 RAW246.7 分化调控的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

小鼠单核巨噬细胞/RAW264.7 细胞株(ATCC);鼠重组细胞核因子 κB 配体(RANKL)可诱导 RAW264.7 分化成熟为多核破骨细胞 (Pepro Tech);破骨细胞分化标记物抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(Sigma);Ad-GFP, Ad-Wnt3a(美国芝加哥大学肿瘤研究中心何通川教授实验室赠送保存);RT-PCR 试剂盒及 Real-time PCR 试剂(TaKaRa);DMEM 培养基及胎牛血清(Gibco)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养,病毒扩增及滴度测定 HEK293 细胞和小鼠单核/巨噬细胞 RAW264.7 复苏后,用含 10% FBS 无酚红 DMEM 培养基于 37 ℃,5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养。每 2~3 天用 0.25% 的胰酶消化传代,病毒扩增时将 HEK293 以 60% 的融合度接种于直径为 10 cm 的培养皿中,待细胞贴壁后分别加入 3 μL 的 Ad-GFP、Ad-Wnt3a 分别在 24、48、72 h 观察其绿色荧光的表达。72 h 后待绿色荧光表达到 90% 以上,细胞呈逐渐漂浮浓缩状态时收集细胞于离心管中 1 200 r/min 离心 10 min 弃上清,根据细胞数及荧光量 PBS 重悬细胞, -80 ℃冻存,37 ℃水浴反复冻融 4 次,12 000 r/min 低温离心 10 min 收集病毒液, -80 ℃保存。将 RAW264.7 按 60% 的融合度接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后分别加入 2、4、8、16 μL 的 Ad-GFP、Ad-Wnt3a 病毒液,观察 24、48、72 h 后感染效率及病毒表达状况,确定最适滴度。

1.2.2 TRAP 染色 RAW264.7 细胞用 0.25% 胰酶消化收集到离心管中,800 r/min 离心 5 min 后加血清的培养基重悬。将细胞分为 4 组:阴性对照组(即空白组)、实验对照组(感染 Ad-GFP 组)、阳性对照组(50 ng/ml RANKL 诱导组)、实验组(感染 Ad-Wnt3a 组)。以 30% 的融合度将 4 组细胞各 3 个复孔接种到 24 孔板中,6 d 后,弃去培养基,PBS 润洗,25 mL 柠檬酸、65 mL 丙酮和 8 mL 37% 的甲醛配成的固定液固定 30 s,去离子水冲洗,再加入染液避光。37 ℃水浴 1 h 后预热的去离子水冲洗,苏木精复染 2 min 弱碱性水冲洗,观察是否有 TRAP 阳性多核细胞(细胞核≥3)为阳性,每个组各取 3 个视野计算阳性细胞数比较分化率。

1.2.3 Western blot 检测 细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次,按 Westen 裂解液:PMSF 溶液(100∶1)混合液裂解细胞 4 ℃ 20 min,低温离心 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白量调整一致后,加入 SDS 缓冲液,100 ℃ 变性 6 min。根据待测目的蛋白分子量大小配制相应浓度的 SDS 胶,蛋白样品经电泳分离后,电转移至硝酸纤维素膜上。将膜置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 1 h,随后加入相应一抗 4 ℃ 过夜,TBST 洗 8 min×5 次,与 IgG 标记的二抗在室温下反应 1 h,TBST 洗 8 min×5 次后 ECL 法显影。

1.2.4 RT-PCR 检测 RAW264.7mRNA 的表达 分别提取 4 组细胞 3、6、9 d 的总 RNA 逆转录,稀释 10 倍。取 2.5 μL 为模板做 Real-time(RT-PCR)检测 RANK、TRAP、组织蛋白酶 K(Cathepsin K)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)基因的表达。扩增条件为:95 ℃预变性 10 s, 95 ℃ 5 s、58 ℃ 15 s、72 ℃ 15 s,共 35 个循环。

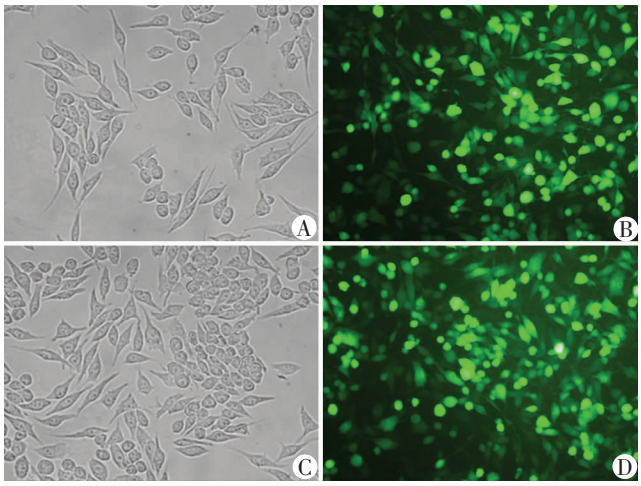
1.3 统计学分析

采用 SPSS 10.1 统计软件进行组间配对 t 检验。

2 结果

2.1 病毒感染效率及细胞形态

Ad-GFP、Ad-Wnt3a 感染 RAW264.7 荧光表达约 90%;空阳性对照组 RAW264.7、50 ng/mL RANKL 阴性对照组细胞形态呈圆形、梭形、椭圆形为正常生长形态,生长状况良好(图 1)。

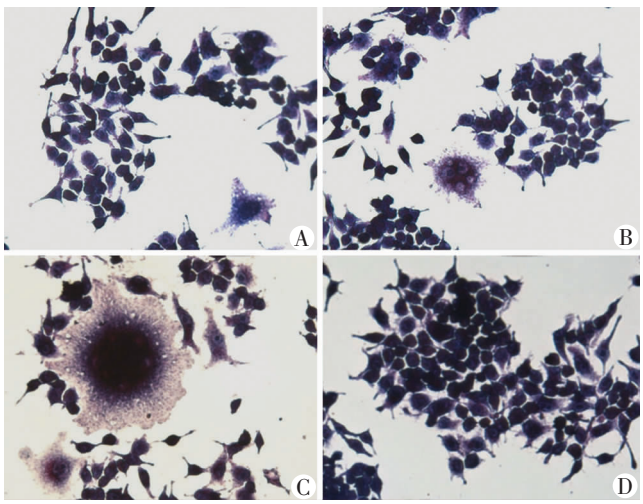


A:阴性对照组;B:实验对照组;C:阳性对照组;D:实验组

图 1 各组细胞形态变化 (荧光显微镜 ×200)

2.2 TRAP 染色

阳性对照组 TRAP 染色多核细胞增多(核≥10)分化率为 12.2%,阴性对照组和实验对照组有少许 TRAP 多核细胞(3≤核≤5)分化率分别为 2.9%、4.6%,实验组呈单核,有少见双核细胞其分化率为 0.15%,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见图 2。

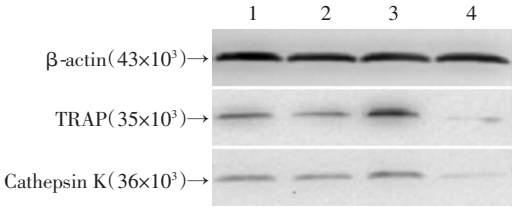


A:阴性对照组;B:实验对照组;C:阳性对照组;D:实验组

图 2 TRAP 染色观察各组细胞形态变化 (倒置荧光显微镜 ×200)

2.3 Western blot 检测 TRAP、Cathepsin K 蛋白的表达

从图3可见，在相应蛋白分子大小处各组细胞均有显色。阴性对照组和实验对照组相比，表达无明显差异，提示腺病毒的感染对破骨细胞的分化没有明显影响；阳性对照组和阴性对照组相比，TRAP 和 Cathepsin K 的表达均明显上升，提示 TRAP 和 Cathepsin K 的表达反映了破骨细胞的分化成熟；而实验组 TRAP 和 Cathepsin K 的条带明显变浅，差异具有统计学意义（$P<0.05$），提示 Wnt3a 的处理可能导致了破骨细胞分化的抑制。



1：阴性对照组；2：实验对照组；3：阳性对照组；4：实验组

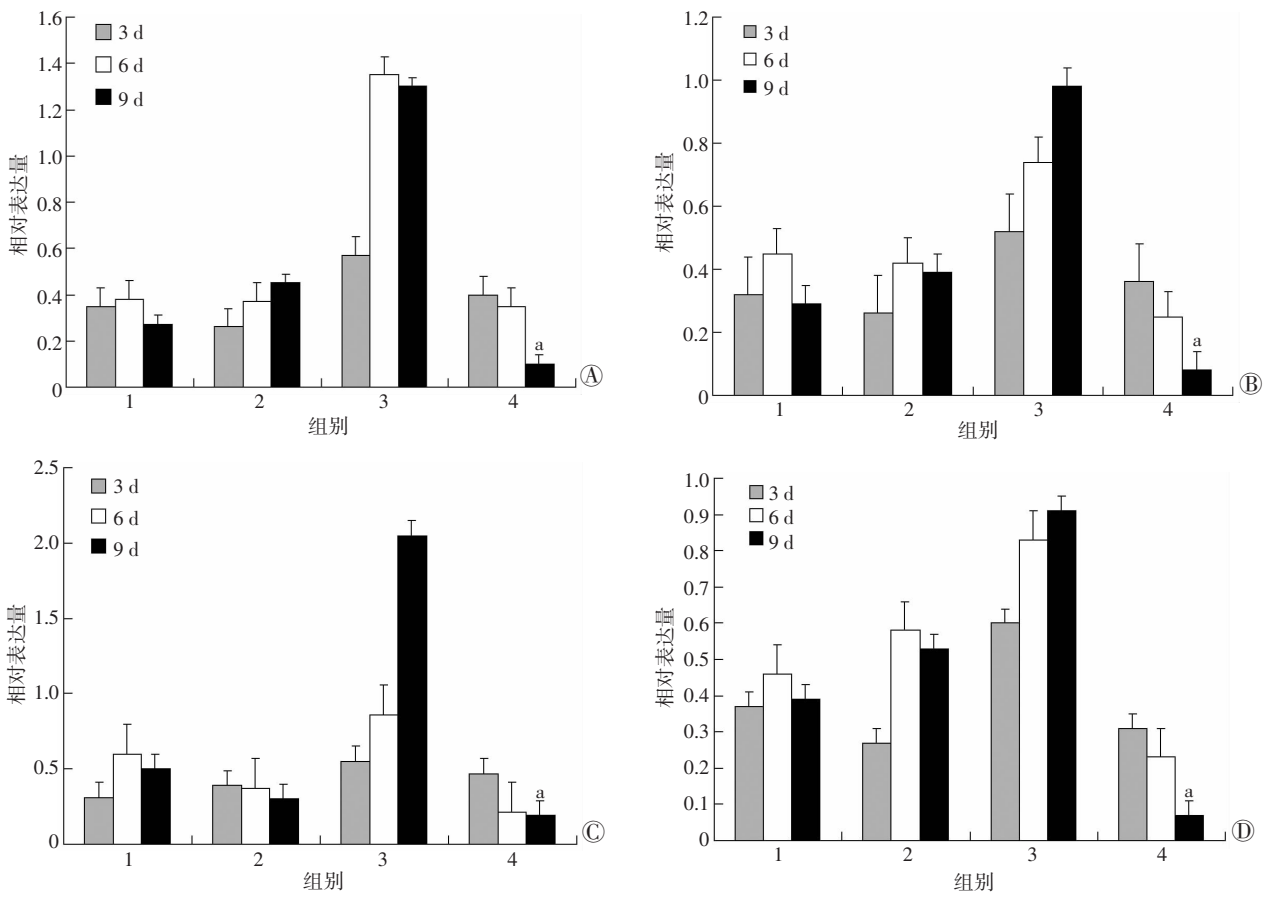
图3 Western blot 检测各组蛋白 TRAP、Cathepsin K 的表达

2.4 RT-PCR 检测相关基因的表达

阳性对照组中随着时间的增加，基因 RANK、TRAP、Cathepsin K、MMP-9 的相对表达量逐渐增加，第9天表达最高。与阴性对照组、实验对照组、阳性对照组比较，实验组的表达量随着时间的增加明显而降低，9 d 表达最低，差异具有统计学意义（$P<0.05$，图4）。

3 讨论

Wnt3a 是 Wnt 蛋白中一种重要的亚型，主要通过经典 Wnt 信号途径发挥作用[4]。在骨相关性疾病中，通过对骨质疏松患者的候选基因筛选后发现，Wnt3a 的突变和骨质疏松的发生密切相关，体外实验证实 Wnt3a 的突变可下调 Wnt 信号通路的激活，从而影响骨的形成[5]。一方面 Wnt3a 可直接诱导成骨细胞的分化，Wnt3a 对神经调节蛋白1受体 ErbB3 表达的下调，可促进经典途径的激活，进一步有利于 Wnt3a 诱导的成骨细胞的分化[6]。另一方面，Wnt3a 还可通过经典途径直接促进成骨细胞的矿化，及通过促进 BMP2 的表达间接促进成骨细胞的矿化[7]。除骨质疏松外其他骨类疾病中也有报道指出 Wnt3a 能抑制多发性骨髓瘤的发生和肿瘤的生长[8]。此外，Wnt3a 对牙质成形[9-10]、软骨发育[11]、骨量调节[12]等方面均有调节作用。因此，全面了解 Wnt3a 在骨微环境调节的生物学特性具有重要意义。健康的骨环境处于不断地骨吸收和新骨形成的动态平衡中。目前，Wnt3a 对骨微环境影响的研究多集中在骨形成方面而在骨吸收方面的报道却较少。



1：阴性对照组；2：实验对照组；3：阳性对照组；4：实验组

图4 Real-time PCR 检测各组基因 TRAP（A）、Cathepsin K（B）、RANK（C）、MMP-9（D）的表达

本实验以腺病毒感染RAW264.7细胞的方式来探讨Wnt3a对破骨细胞的分化调控,并以检测破骨细胞分化指标:RANK、TRAP、Cathepsin K和MMP-9表达的方式来综合判断破骨细胞分化的情况。经前期实验筛选获得RANKL诱导RAW264.7分化成熟的最佳浓度为50 ng/mL,因此,我们就以50 ng/mL RANKL诱导RAW264.7作为阳性对照组、空RAW264.7组为阴性对照组、感染Ad-GFP组为实验对照组、感染Ad-Wnt3a组为实验组。与阴性对照组、实验对照组和阳性对照组相比,实验组反映了Wnt3a对破骨前体细胞RAW264.7的分化情况。结果显示:与各对照组相比Wnt3a能抑制破骨细胞的分化成熟。骨吸收作用的异常是多种溶骨性骨病发生的关键。明确Wnt3a抑制破骨细胞的分化这一作用将进一步完善Wnt途径在骨微环境中的调控机制,同时也为骨态平衡中Wnt途径作用失常而引起的骨病,如原发性骨质疏松、骨硬化症、骨巨细胞瘤、关节炎等系列疾病的治疗提供了可靠、全面的参考依据。但Wnt3a是通过哪个信号通路及具体调节过程还不清楚,这将在下一步实验中进一步明确。

参考文献:

[1] Charles J F, Hsu L Y, Niemi E C, *et al*. Inflammatory arthritis increase mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function [J]. J Clin Invest, 2012, 122(12): 4592-4605.

[2] Zhong Z, Zylstra-Diegel C R, Schumacher C A, *et al*. Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(33): E2197-E2204.

[3] Glass D A 2nd, Bialek P, Ahn J D, *et al*. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation[J]. Dev Cell, 2005, 8(5): 751-764.

[4] Cho Y D, Kim W J, Yoon W J, *et al*. Wnt3a stimulates Mepe, matrix extracellular phosphoglycoprotein, expression directly by the activation of the canonical Wnt signaling pathway and indirectly through the stimulation of autocrine Bmp-2 expression[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(6): 2287-2296.

[5] Korvala J, Loija M, Makitie O, *et al*. Rare variations in WNT3A and DKK1 may predispose carriers to primary osteoporosis[J]. Eur J Med Genet, 2012, 55(10): 515-519.

[6] Jullien N, Maudinet A, Leloutre B, *et al*. Downregulation of ErbB3 by Wnt3a contributes to wnt-induced osteoblast differentiation in mesenchymal cells[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(6): 2047-2056.

[7] Silverio K G, Davidson K C, James R G, *et al*. Wnt/β-catenin pathway regulates bone morphogenetic protein (BMP2)-mediated differentiation of dental follicle cells[J]. J Periodontal Res, 2012, 47(3): 309-319.

[8] Qiang Y W, Shaughnessy J D Jr, Yaccoby S. Wnt3a signaling within bone inhibits multiple myeloma bone disease and tumor growth[J]. Blood, 2008, 112(2): 374-382.

[9] Morimoto M, Kerouredan O, Gendronneau M, *et al*. Dental abnormalities in Schimke immuno-osseous dysplasia[J]. J Dent Res, 2012, 91(7 Suppl): 29S-37S.

[10] Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, *et al*. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation[J]. Bone, 2009, 44(5): 805-812.

[11] Minear S, Leucht P, Jiang J, *et al*. Wnt proteins promote bone regeneration[J]. Sci Transl Med, 2010, 2(29): 29-30.

[12] Winkler D G, Sutherland M S, Ojala E, *et al*. Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins[J]. J Biol Chem, 2005, 280(4): 2498-2501.

(**收稿**:2012-09-28;**修回**:2012-12-12)

(编辑 汪勤俭)

医学论文中被误用为单位符号的“ppm、ppb、ppt”英文缩写的换算

在医学论文中,“ppm、ppb、ppt”这类英文缩写常常被作者作为单位符号使用,而“ppm、ppb、ppt”不是量纲一的量的单位的专门名称,也不是数学符号,更不是单位符号,只是表示数量份额的英文名词缩写(英文全称分别为parts per million、parts per billion、parts per trillion)。在实际研究中,仪器测量的数值可能会以“ppm、ppb、ppt”形式给出结果,作者在撰写文章进行数据描述时则需对“ppm、ppb、ppt”进行换算。

对溶液而言,换算前需了解是体积比还是质量比。1 μg/mL是质量-体积比,如果溶液的密度是1 g/mL,则1 μg/mL相当于1 ppm;如果溶液密度不是1 g/mL,则需要进行换算。

对大气中的污染物而言,常用体积浓度和质量-体积浓度来表示其在大气中的含量。体积浓度是用每立方米大气中含有污染物的体积数来表示(如cm^3/m^3、mL/m^3),换算关系是:1 ppm = 1 cm^3/m^3 = 10^{-6},1 ppb = 10^{-9},1 ppt = 10^{-12};质量-体积浓度是用每立方米大气中污染物的质量数来表示(如mg/m^3、g/m^3),换算关系是:C = 22.4X/M,式中:X为污染物以mg/m^3表示的浓度值;C为污染物以ppm表示的浓度值;M为污染物的分子质量。

在土壤、动植物、固体废弃物中“ppm、ppb、ppt”与质量含量的换算关系为:1 ppm = 1 mg/kg = 1 000 μg/kg;1 ppb = 1 μg/kg = 10^{-3} mg/kg;1 ppt = 1 ng/kg = 10^{-6} mg/kg。

本刊编辑部