doi:10.11659/jjssx.02E020011

·基础研究·

持续激活 β-连环蛋白对小鼠成骨细胞增殖和凋亡的影响

鲍全伟[1],宗兆文[2],谭 丹[1] (1.陆军军医大学第二附属医院急诊科,重庆 400037;2.陆军军医大学陆军卫勤训练基地战救技能训练教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 观察持续激活 β-连环蛋白(β-catenin)对小鼠成骨细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 新生 3 d 基因型为 3.2 kb-Cre;β-catentin exon 3 FX+/+小鼠及野生型(WT)小鼠各 20 只分别作为 CA-β-catenin 组和对照组,2 组均腹腔注射他莫昔芬(TM)以持续激活 β-catenin(CA-β-catenin)。持续激活 1 个月后分离培养小鼠原代成骨细胞,并进行形态观察,收集胫骨标本行增殖(Brdu)染色,TUNEL 凋亡染色,细胞周期相关因子(c-myc、cyclin Y)的免疫组化实验。**结果** 与对照组小鼠相比,CA-β-catenin 组小鼠成骨细胞增殖增多,凋亡减少,差异有极显著性统计学意义($P<0.01$);CA-β-catenin 组 G1 期关键调节因子 c-myc、G2 期调节因子 cyclin Y 表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 持续激活 β-catenin 可使小鼠成骨细胞增殖增多、凋亡减少,一直处于高增殖状态。

[关键词] β-catenin;小鼠成骨细胞;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-02-11

Effect of continuous activation of β-catenin on proliferation and apoptosis of osteoblasts in mice

BAO Quan-wei[1], ZONG Zhao-wen[2], TAN Dan[1] (1. Department of Emergency, Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of War Wound Rescue Skills Training, Base of Army Health Service Training, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of continuous activation of β-catenin on proliferation and apoptosis of mouse osteoblasts. **Methods** The genotype at 3 days after birth was 3.2 kb-Cre. Twenty of the β-catentin exon 3 FX+/+ gene mice and 20 of the wild-type mice in the same litter were treated as CA-β-catenin group and control group, respectively. The mice in both two groups received intraperitoneal injection of tamoxifen (TM) to continuously activate CA-β-catenin. After 1 month of continuous activation, primary osteoblasts of mice were isolated and cultured, and the morphology was observed. Tibial specimens were collected for proliferation (Brdu) staining, TUNEL apoptosis staining, and immunohistochemical staining of cell cycle related factors (c-myc and cyclin Y). **Results** Compared with control group, the proliferation of osteoblasts was increased and the apoptosis of osteoblasts was decreased in the CA-β-catenin group, the differences were statistically significant ($P<0.01$). The expressions of key regulatory factors c-myc in G1 phase and cyclin Y in G2 phase were higher in the CA-β-catenin group than those in the control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Continuous activation of β-catenin can increase the proliferation and decrease the apoptosis of mouse osteoblasts and keep them in a state of high proliferation.

Keywords: β-catenin; mouse osteoblast; cell proliferation; cell apoptosis

骨形成与骨吸收二者之间的动态平衡决定了骨量的高低。成骨细胞是体内唯一可以分泌骨基质、介导骨形成的细胞,并且还可以影响破骨细胞的功能,其在骨量的动态平衡中发挥了重要作用[1-4]。研究发现,Wnt/β-catenin 信号通路在成骨细胞发育过程中发挥着重要作用,较高的 Wnt/β-catenin 活性是维持成骨细胞早期增殖和分化的关键,成骨细胞分化晚期需降低 Wnt/β-catenin活性以保证成骨细胞分化成熟[5-7]。为了维持一定的细胞数量,细胞必须不断地进行分裂并程序性死亡,如果平衡被打破,可能出现疾病(如骨质疏松症)或癌症[8-10]。本课题组前期研究也发现,Wnt/β-catenin 信号通路在成骨细胞自我更新、数量维持上发挥重要作用[11];激活成骨细胞内 Wnt/β-catenin 信号通路可促进成骨细胞增殖增多,凋亡减少,但具体机制尚不明确[11-14]。因此,本研究在小鼠成骨细胞中特异性激活 β-catenin(CA-β-catenin),观察其对成骨细胞增殖、凋亡的影响,并通过免疫组化实验观察细胞周期相关因子的变化,继而探讨 Wnt/β-catenin 信号通路对细胞增殖影响的可能机制。

[基金项目] 全军医学科技"十二五"后勤科研项目重大专项分题(AWS14L012);重庆市社会事业与民生保障专项(CSTC2016HMSZX13008)

[通信作者] 谭 丹,E-mail:1943863803@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料

新生 3 d 基因型为 3.2 kb-Cre;β-catentin exon 3 FX +/+转基因小鼠及野生型(WT)小鼠各 20 只,分别设为 CA-β-catenin 组和对照组,由陆军军医大学第二附属医院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(渝)20170002。

1.2 动物准备

基因型为3.2 kb-Cre;β-catenin exon 3 FX +/+的小鼠腹腔注射他莫昔芬(tamoxifen,TM),因注射 TM 后可以特异性启动成骨细胞内 3.2 kb-Cre 的启动子继而敲除 β-catenin 基因的第 3 个外显子,使成骨细胞内 β-catenin 无法降解,持续释放并进入细胞核启动下游基因表达,因而获得在成骨细胞中特异性激活 β-catenin 的基因小鼠,记为 β-catenin 持续激活小鼠(CA-β-catenin 小鼠)。药物注射方法:将 CA-β-catenin 组小鼠及对照组小鼠腹腔注射 TM(75 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$),连续注射 4 d,1 个月后取材并固定至多聚甲醛备用,并于取材前 3 d 和取材当日注射溴脱氧尿苷(bromodeoxyuridine,Brdu)50 mg/kg[11-14]。

1.3 原代成骨细胞提取及培养

小鼠处死后,在无菌通风橱内分离出胫骨、股骨并去除周围软组织及骨髓,再用剪刀剪成细小的骨块。转移骨块到 6 孔板内继续培养,每周换液 3 次,待细胞达 90% 融合状态时便可进行离体实验。

1.4 免疫组化实验

将固定好的小鼠胫骨用 15% EDTA 脱钙液脱钙 7 d,经脱水、包埋,制备石蜡切片(厚度为 5 μm)备用。染色流程:①抑制内原过氧化物酶,30% 过氧化氢与甲醇 1∶9混合液 50 mL,37 ℃,20 min,蒸馏水清洗2 次,每次 3 min;②抗原修复,切片滴抗原修复液 50 μL,37 ℃,20 min,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,每次 2 min;③封闭,切片滴加 5% BSA 液,37 ℃,45 min,不洗;④切片甩干,滴加一抗 50 μL,于湿盒内常温放置 2 h;⑤PBS 清洗 3 次,每次 2 min,然后滴加相应的二抗;⑥显微镜下显色;⑦甲基绿复染 5 min;⑧封片观察。免疫组化指标包括细胞周期 G1 期关键调节因子 c-myc、G2 期调节因子 cyclin Y。

1.5 增殖凋亡染色

取 1.3 中制备好的切片,采用 Brdu 增殖试剂盒及罗氏凋亡试剂盒进行染色,具体方法与免疫组化实验方法相同[4],染色后观察并统计处于增殖状态的成骨细胞及凋亡的成骨细胞。

1.6 阳性细胞计数评分方法

阳性结果选择标准:体内实验 Brdu、TUNEL 及免疫组化实验为细胞核呈黄褐色,体外实验 Brdu、TUNEL 荧光染色为细胞核呈绿色。所有染色标本均随机选择 10 个高倍镜视野,计算阳性细胞占视野内细胞数的比例并记分,标准为:阳性细胞数占细胞总数 25% 以下记为 1 分,26% ~50% 记为 2 分,51% ~75% 记为 3 分,76% 以上记为 4 分;染色强度以(+)、(++)、(+++)表示,分别记为 1、2、3 分;计算二者的分数乘积作为染色结果的量化值。

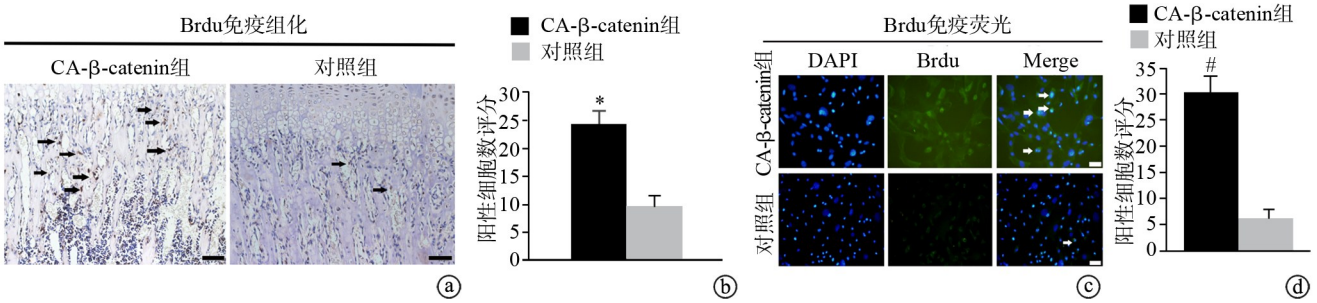
1.7 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,将阳性细胞进行量化处理后,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数进行独立样本 t 检验。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,$P < 0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 CA-β-catenin 小鼠成骨细胞增殖情况

免疫组化实验结果显示,CA-β-catenin 组小鼠成骨细胞 Brdu 阳性细胞评分为(24.5 ±3.9)分,高于对照组的(9.1 ±1.4)分,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1a、b;免疫荧光染色结果显示,CA-β-catenin 组小鼠成骨细胞 Brdu 阳性细胞评分为(30.2 ±4.2)分,高于对照组的(4.9 ±1.2)分,差异有极显著性统计学意义($P < 0.01$),见图 1c、d。

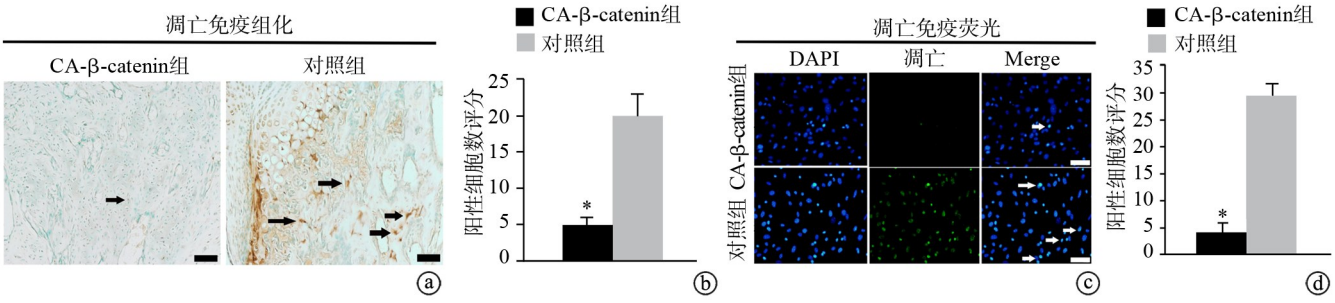


a:Brdu 免疫组化实验结果,箭头所指均为染色阳性细胞(×200);b:Brdu 免疫组化实验阳性细胞数评分统计图;c:Brdu 免疫荧光染色结果,箭头所指均为染色阳性细胞(×400);d:Brdu 免疫荧光阳性细胞数评分统计图 *:与对照组比较,$P < 0.05$;#:与对照组比较,$P < 0.01$

图 1 CA-β-catenin 小鼠成骨细胞增殖情况

2.2 CA-β-catenin 小鼠成骨细胞凋亡情况

TUNEL 染色结果显示,CA-β-catenin 组小鼠成骨细胞凋亡阳性细胞评分为(5.5±1.2)分,低于对照组的(20.1±1.4)分,差异有极显著性统计学意义($P<0.01$),见图 2a、b;免疫荧光染色结果显示,CA-β-catenin组小鼠成骨细胞凋亡阳性细胞评分为(4.8±0.9)分,低于对照组的(30.5±1.2)分,差异有极显著性统计学意义($P<0.01$),见图 2c、d。

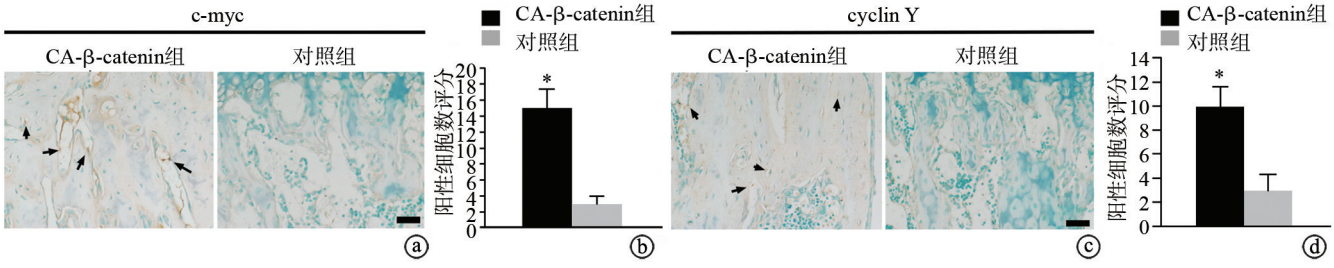


a:凋亡免疫组化实验结果,箭头所指均为染色阳性细胞(×200);b:凋亡免疫组化实验阳性细胞数评分统计图;c:凋亡免疫荧光染色结果,箭头所指均为染色阳性细胞(×400);d:凋亡免疫荧光阳性细胞数评分统计图 *:与对照组比较,$P<0.01$

图 2 CA-β-catenin 小鼠成骨细胞凋亡情况

2.3 CA-β-catenin 小鼠成骨细胞细胞周期相关蛋白表达情况

免疫组化实验实验结果提示,CA-β-catenin 组小鼠成骨细胞 c-myc 阳性细胞数评分为(15.3±2.9)分,高于对照组的(3.1±0.6)分,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3a、b;cyclin Y 阳性细胞数评分为(10.5±1.9)分,高于对照组的(2.6±0.9)分,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3c、d。



a:胫骨 c-myc 免疫组化实验结果,箭头所指均为染色阳性细胞(×200);b:c-myc 阳性细胞数评分统计图;c:胫骨 cyclin Y 免疫组化实验结果,箭头所指均为染色阳性细胞(×200);d:cyclin Y 阳性细胞数评分统计图 *:与对照组比较,$P<0.05$

图 3 CA-β-catenin 小鼠成骨细胞细胞周期相关蛋白表达情况

3 讨论

骨质疏松症主要表现为骨量丢失,是影响老年人群健康的重要疾病,目前治疗骨质疏松的主要手段有促进骨形成和抑制骨吸收。骨量主要取决于骨形成与骨吸收二者之间的平衡。在骨量调控过程中成骨细胞发挥着重要作用,作为体内唯一可诱导骨形成的细胞,其数量越多,骨形成能力越旺盛,不仅是骨形成的关键细胞,而且还会调节破骨的形成和功能。成骨细胞受到多种激素及信号通路的调控,其中 Wnt/β-catenin 信号通路发挥着重要作用。越来越多的证据都证实在成骨细胞内以不同方式激活 Wnt/β-catenin 信号通路可使成骨细胞数量增多而破骨细胞数量减少,从而使骨量显著增加;而降低该信号通路则会引起成骨细胞数量减少,破骨细胞数量活性增多,进而导致骨量减少[11-14],这给骨质疏松的治疗带来了新的靶点及希望。但目前对于 Wnt/β-catenin 信号通路活性增强后如何影响成骨细胞活性尚无统一定论,故本研究深入探讨持续激活 β-catentin 信号通路对成骨细胞活性的影响。

细胞增殖和凋亡是评价细胞活性的关键指标,本研究体内及体外实验均发现,持续激活 β-catentin 信号通路后,CA-β-catenin 组小鼠 Brdu 活性明显强于对照组小鼠,证明 CA-β-catenin 组小鼠成骨细胞增殖能力增强;而凋亡染色结果显示,CA-β-catenin 组小鼠凋亡细胞数量较对照组明显减少,说明激活 β-catenin 后成骨细胞凋亡受到抑制。以上结果表明持续激活 β-catenin 后会促进成骨细胞的增殖活性,从而抑制成骨细胞的凋亡,二者共同作用导致成骨细胞数量增加。

影响细胞增殖即是影响细胞周期,细胞周期包括细胞在有丝分裂原作用下复制 DNA 和细胞分裂的调节机制。抑制与细胞周期调节相关的基因会导致增殖

停止[8,15-16]。细胞周期的调控主要是对各期关键因子的调控,本研究中免疫组化实验提示,G1 期关键调节因子 c-myc、G2 期调节因子 cyclin Y 表达均上升,这使细胞周期得以顺利进行,有利于成骨细胞的增殖。有研究显示,当 β-catenin 入核后与 Tcf-Lef 形成 β-catenin/Tcf-Lef 复合体可上调 G1 期关健调节因子 c-myc 和 G2 期调节因子 cyclin Y 的表达,从而加快细胞周期进程和细胞增殖[8-9]。还有研究显示,cyclin Y 表达上调一方面可加快细胞周期的进程,另一方面还可使 Wnt/β-catenin 信号通路上游因子 LRP6 表达上调,进一步激活 Wnt/β-catenin 信号通路;由此在 Wnt/β-catenin 信号通路和细胞周期调控之间形成了正反馈循环,即当 β-catenin 持续激活后可上调 cyclin Y 的表达水平,而表达上调的 cyclin Y 又可增强 β-catenin 的表达[17-19]。这个正反馈循环的存在可加快细胞周期进程,使细胞处于高增殖状态。此外,c-myc、cyclin Y 的表达上升可抑制细胞程序性死亡,减少凋亡。

综上所述,本研究表明成骨细胞中持续激活 β-catenin可使细胞周期 G1 期关键调节因子 c-myc、G2 期调节因子 cyclin Y 的表达上调,而表达上调的 cyclin Y 又正反馈调节 Wnt/β-catenin 信号通路,使成骨细胞无法脱离细胞周期而处于高增殖状态。

[参考文献]

[1] Kumar R, Bhargasla P, Dyivedi A. Synthesis and characterization of a new cadmium complex, cadmium [(1, 10-phenanthroline)(8-hydroxyquinoline)] Cd(Phen) q [J]. Procedia Materials Science, 2015,10(2):37-43. doi:10.1016/j.mspro.2015.06.023.

[2] Karsenty G. Transcriptional control of osteoblast differentiation and function[J]. Principles of Bone Biology (Fourth Edition), 2020: 163-176. doi:10.1016/B978-0-12-814841-9.00007-5.

[3] Yang S, Hu L, Wang C, et al. PERK-eIF2α-ATF4 signaling contributes to osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells[J]. J Mol Histol, 2020, 51(2): 125-135. doi:10.1007/s10735-020-09863-y.

[4] Sun LJ, Li C, Wen XH, et al. Icariin stimulates hFOB 1.19 osteoblast proliferation and differentiation via OPG/RANKL mediated by the estrogen receptor [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2020, 10: 2174. doi: 10.2174/1389201021666200123102550.

[5] Liu J, Zhang B, Song SJ, et al. Bovine collagen peptides compounds promote the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99920. doi: 10.1371/journal.pone.0099920.

[6] Harmon B, Bird SW, Schudel BR, et al. A genome-wide RNAi screen identifies a role for wnt/beta-catenin signaling during rift valley fever virus infection[J]. J Virol, 2016, 90(16): 7084-7097. doi:10.1128/JVI.00543-16.

[7] Duan P, Bonewald LF. The role of the Wnt/β-catenin Signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 77(Pt A): 23-29. doi: 10.1016/j.biocel.2016.05.015.

[8] Yang JM, Wang Q, Wang CX. Pseudomonas aeruginosa synthesized silver nanoparticles inhibit cell proliferation and induce ROS mediated apoptosis in thyroid cancer cell line (TPC1) [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48(1): 800-809. doi:10.1080/21691401.2019.1687495.

[9] Li J, Wang M, Chen X. Long non-coding RNA UCA1 modulates cell proliferation and apoptosis by regulating miR-296-3p/Myc axis in acute myeloid leukemia [J]. Cell Cycle, 2020(2): 1-12. doi:10.1080/15384101.2020.1750814.

[10] Yin R, Jiang J, Deng H, et al. miR-140-3p aggregates osteoporosis by targeting PTEN and activating PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Human Cell, 2020:1-13. doi:10.1007/s13577-020-00352-8.

[11] 鲍全伟,李 昂,刘华渝,等. 持续激活 β-连环蛋白对骨量及骨生长的影响[J]. 中华实验外科杂志,2016,33(11):2455-2459. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2016.11.006.

[12] Chen S, Feng J, Bao Q, et al. Adverse effects of osteocytic constitutive activation of β-catenin on bone strength and bone growth[J]. J Bone Miner Res, 2015, 30(7): 1184-1194. doi:10.1002/jbmr.2453.

[13] Bao Q, Chen S, Qin H, et al. Constitutive β-catenin activation in osteoblasts impairs terminal osteoblast differentiation and bone quality[J]. Exp Cell Res, 2017, 350(1): 123-131. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.11.013.

[14] Bao Q, Chen S, Qin H, et al. An appropriate Wnt/β-catenin expression level during the remodeling phase is required for improved bone fracture healing in mice[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2695-2706. doi:10.1038/s41598-017-02705-0.

[15] Jin KH, Jin MS, Seok-Hyung K, et al. DBC1 regulates Wnt/β-catenin-mediated expression of MACC1, a key regulator of cancer progression, in colon cancer[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(8): 831-842. doi:10.1038/s41419-018-0899-9.

[16] Chen S, Zong ZH, Wu DD, et al. The role of metastasis-associated in colon cancer 1 (MACC1) in endometrial carcinoma tumorigenesis and progression[J]. Mol Carcinog, 2017, 56(4): 1361-1371. doi: 10.1002/mc.22599.

[17] Zhang B, Zhang C, Yang X, et al. Cytoplasmic collagen XIαI as a prognostic biomarker in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(5): 364-372. doi: 10.1080/15384047.2018.1423915.

[18] Kornblith LZ, Cohen MJ. Response: the whole is greater than the sum of its parts: hemostatic profiles of whole-blood variants[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2014, 77(6): 1003-1004. doi: 10.1097/TA.0000000000000475.

[19] Hao HH, Jiang XM, Feng C. Control of Wnt receptor turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 signaling module and its dysregulation in cancer [J]. Cancers, 2016, 8(6): 54-66. doi: 10.3390/cancers8060054.

(编辑:刘 艺)