

MC3T3E1 细胞分化过程中 Cbfa1 及相关基因的表达

刘敏 周后德 何玉玲 谢辉 廖二元

摘要：目的 研究在小鼠前成骨细胞 MC3T3E1 诱导成骨过程中，总 Cbfa1、Cbfa1 两种亚型 Cbfa1/P56、Cbfa1/P57 及碱性磷酸酶、I 型胶原、骨钙素、骨涎蛋白和骨桥素在前成骨细胞成熟过程中的变化。明确 Cbfa1、Cbfa1 亚型及相关基因表达与成骨细胞分化的关系，探求与成骨细胞成熟更密切相关的 Cbfa1 亚型，为进一步的 Cbfa1 亚型研究提供基础。方法 MC3T3E1 细胞在含 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸的培养基中培养 22 d，在细胞培养的不同时间(0、4、10、14、18、22 d)，用 α -磷酸萘酚法测定碱性磷酸酶(ALP)活性；Van Gieson 苦味酸酸性复红染色法染色细胞 I 型胶原，茜素红染色观察矿化结节形成；半定量 RT-PCR 检测总 Cbfa1 mRNA 及 Cbfa1/P56、Cbfa1/P57 mRNA 和 I 型胶原、骨钙素、骨涎蛋白、骨桥素 mRNA 的表达；用 Western-blot 检测 Cbfa1 蛋白的表达。结果 MC3T3E1 细胞在 β -甘油磷酸钠存在的情况下，培养第 18 d 开始出现矿化，第 22 d I 型胶原染色及茜素红染色均观察到明显矿化结节形成。随 MC3T3E1 细胞的分化，Cbfa1 mRNA 的表达量逐渐增高，Cbfa1/P57 mRNA 在第 18 和 22 d 的表达量明显增高，Cbfa1/P56 mRNA 无变化。Cbfa1 蛋白随 MC3T3E1 细胞的分化，表达量逐渐增高。同样，随 MC3T3E1 细胞分化，I 型胶原、骨钙素、骨桥素和骨涎蛋白 mRNA 的表达量逐渐增高。ALP 活性 0~10 d 逐渐增高，10 d 后逐渐下降。结论 在 MC3T3E1 细胞的分化过程中 I 型胶原、骨钙素、骨涎蛋白、骨桥素 mRNA 随 MC3T3E1 细胞的分化表达逐渐增高。Cbfa1 mRNA 及 Cbfa1 蛋白的表达随细胞的分化逐渐增高，与其他成骨特异性基因的变化趋势一致，并以 Cbfa1/P57 mRNA 亚型为主。Cbfa1/P57 亚型的表达与成骨分化的关系更密切，在进一步的与成骨细胞分化有关的 Cbfa1 亚型研究应以 Cbfa1/P57 亚型为主。

关键词：MC3T3E1；细胞；Cbfa1；细胞分化；成骨细胞特异性基因

Expression of core binding factor alpha 1 (Cbfa1) and related genes in MC3T3E1 cell line differentiation

LIU Min, ZHOU Houde, HE Yulin et al. Institute of Endocrinology & Metabolism, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

Abstract : Objective To understand the gene expression profile of Cbfa1, Cbfa1/P56, Cbfa1/P57, collagen I, osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein, alkaline phosphatase in MC3T3E1 cell differentiation. **Methods** MC3T3E1 cells were cultured for 22 days, the expressions of Cbfa1, Cbfa1/P56, Cbfa1/P57, collagen I, osteocalcin, osteopontin and bone sialoprotein mRNA in MC3T3E1 cells were examined using semiquantitative RT-PCR; alkaline phosphatase (ALP) activity was determined by p-nitro phenyl phosphate assay; the expressions of Cbfa1 protein was tested using Western blot. Morphology and phenotypes of MC3T3E1 cells were stained using Van Gieson and alizarin red method. **Results** By alizarin red staining, small mineralization nodules were formed on the 18th day, and became more prominent on the 22nd day in MC3T3E1 cells. The expression of Cbfa1/P56 mRNA was stable, while the expression of Cbfa1, Cbfa1/P57, collagen I, osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein mRNA were gradually increased. ALP activity reached the maximum level on the 10th day, and then decreased to the minimal level till 22nd day. **Conclusions** During the differentiation of MC3T3E1 cells, the expressions of Cbfa1, Cbfa1/P57, collagen I, osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein mRNA and Cbfa1 protein are gradually increasing, while the expression of Cbfa1/P56 mRNA is stable.

Key words: MC3T3E1 cell line; Cbfa1; Collagen I; Osteocalcin; Osteopontin; Bone sialoprotein; Alkaline

phosphatase

核结合因子(core binding factor alpha 1 ,Cbfa1)是成骨细胞分化的最关键作用因子,不仅促进成骨细胞分化,还影响分化后成熟成骨细胞的功能。按 N 末端起始氨基酸不同,Cbfa1 可分为 3 种蛋白异构体:Cbfa1/P57、Cbfa1/P56 和 Cbfa1/osf2^[1]。Cbfa1 有 8 个外显子,3 种亚型形成是因为外显子 1 的起始位点不同引起,外显子 1 分为 1a 和 1b,1a 又分为两部分,分别编码 Cbfa1/P57 和 Cbfa1/osf2,1b 则编码 Cbfa1/P56,余下的 7 个外显子在 3 种亚型中完全一样。目前大部分 Cbfa1 亚型的研究集中于 Cbfa1/P56 和 Cbfa1/P57 上。体外成骨细胞的成骨过程由细胞增殖、细胞外基质形成及成熟,骨基质矿化几个过程组成,每个阶段的成骨细胞均表现出不同的特性,各个阶段与成骨有关的基因表达的时限和量都有所不同。其中,I 型胶原、碱性磷酸酶和骨钙素是常用的观察成骨细胞成熟的指标。小鼠锁骨细胞来源的前成骨细胞 MC3T3E1 细胞系是体外研究成骨过程的经典模型,在抗坏血酸(ascorbic acid)存在的情况下,能在体外形成矿化结节^[2]。本研究通过观察 MC3T3E1 细胞的体外诱导成熟过程中,Cbfa1、Cbfa1 两种亚型 Cbfa1/P56 和 Cbfa1/P57 及成骨相关的其他基因 I 型胶原、骨钙素、骨涎蛋白、骨桥素在成骨过程中表达变化及碱性磷酸酶活性的变化,明确 Cbfa1、Cbfa1 亚型及相关基因表达与成骨细胞分化的关系,探求与成骨细胞成熟更密切相关的 Cbfa1 亚型,为进一步的 Cbfa1 亚型研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 细胞培养与干预实验

小鼠前成骨细胞 MC3T3E1 用无酚红的 DMEM 培养液培养,内含 10% FBS、抗坏血酸 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、青霉素 50 U/mL、庆大霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每 3 d 换液 1 次,细胞达汇片后用 0.25% 胰酶-EDTA 消化,按 5×10^5 个细胞/瓶接种至 25 cm^2 培养瓶及小平皿中。从接种后第 3 d 开始在细胞培养液中加入 10 mM β -甘油磷酸钠。分别于培养的 0,4,10,14,18 和 22 d 抽提细胞总 RNA 和蛋白行逆转录 PCR 及蛋白免疫印迹操作。于培养的 0,4,10,14,18 和 22 d 对培养的细胞行 I 型胶原及矿化结节染色。

1.2 I 型胶原及矿化结节染色

1.2.1 I 型胶原染色 细胞用 PBS 冲洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 10 min,Weigert 铁苏木素染液染色 5

min,Van Gieson 苦味酸酸性复红染液染色 5 min,95% 乙醇快速分化、脱水,置镜下观察并摄像。

1.2.2 矿化结节染色 细胞固定后,用 0.1% 茜素红(alizarin red-S)染色 5 min,蒸馏水冲洗 3 次,乙醇脱水,置镜下观察并摄像。

1.3 细胞总 RNA 的提取及测定

Trizol(Gibico 公司)抽提细胞总 RNA。取 2.0 μg 总 RNA,用逆转录试剂盒(Promega 公司)合成 cDNA。再取 1 μL cDNA 行 PCR 扩增 Cbfa1、Cbfa1/P56、Cbfa1/P57、I 型胶原、骨钙素、骨涎蛋白、骨桥素基因,以 B-action 为内对照(引物序列及扩增条件见表 1)。其中,Cbfa1 的引物针对 Cbfa1/P57 和 Cbfa1/P56 亚型共有的外显子 2-8,Cbfa1/P57 和 Cbfa1/P56 的引物分别针对外显子 1a 和 1b。除 B-action 为 28 个循环外,其他产物均为 32 个循环。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后拍照。用 Image mater VDS 成像分析系统行光密度扫描,各基因数值以各基因与 β -actin 吸光度的比值表示。

1.4 细胞总蛋白的提取及测定

用细胞裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCL (pH8.0),150 mmol/L NaCl,1% Triton X-100,0.2% NaNO_3 ,0.5% 去氧胆酸钠,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aprotinin,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF)裂解细胞,Bradford 法测蛋白含量后置 -70℃ 冰箱保存。

参照分子克隆实验指南方法行蛋白免疫印迹操作。取 40 μg 细胞总蛋白于 10% SDS-PAGE 胶中电泳,电转移至 PVDF 膜上。含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 1 h 后,用含羊抗人、鼠多克隆抗体 PEBP 2Aa(c-19)(1:500,sc-8566,Santa Cruz 公司)的 PBS 温育 1 h,PBS 洗膜,含辣根过氧化物酶标记抗羊二抗(1:2000,Santa Cruz 公司)PBS 温育 1 h,洗膜后,ECL(Santa Cruz 公司)发光自显影,洗片显带。同一张膜洗脱后,用羊抗鼠 actin 一抗(1:1000,sc-1616,Santa Cruz 公司)和辣根过氧化物酶标记抗羊二抗(1:2000 稀释,Santa Cruz 公司)重新杂膜,发光自显影,洗片显带作为内对照。所有杂交信号在成像分析系统测定条带密度。Cbfa1 蛋白目的条带水平以 Cbfa1/actin 的比值表示。

1.5 ALP 活性测定

用细胞裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCL (pH8.0),150 mmol/L NaCl,1% Triton X-100,0.2% NaNO_3 ,0.5% 去氧胆酸钠,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aprotinin,1 $\mu\text{g}/$

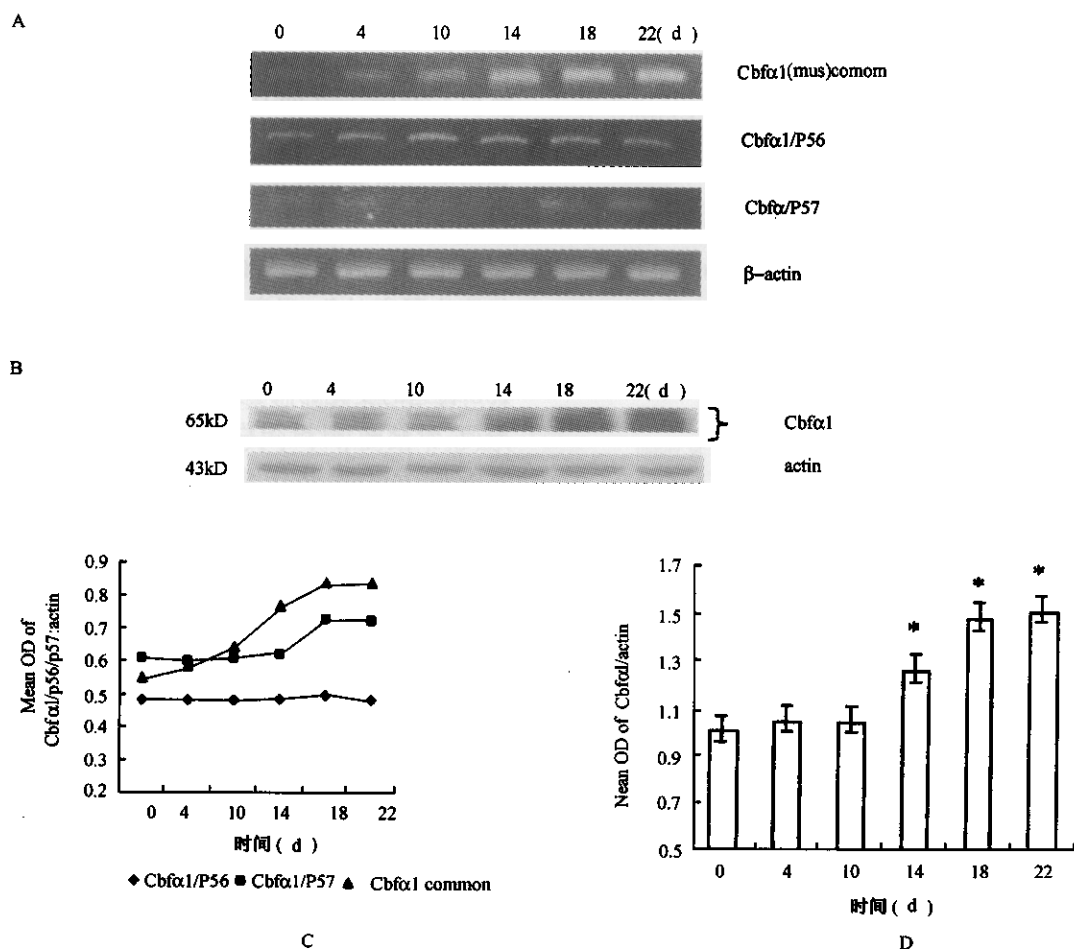


图 2 Cbfa1、Cbfa1/P56、Cbfa1/P57 mRNA 及 Cbfa1 蛋白在 MC3T3E1 分化过程中的表达

(A) Cbfa1、Cbfa1/P56、Cbfa1/P57 mRNA 在 MC3T3E1 分化过程中的表达。(B) Cbfa1 蛋白在 MC3T3E1 分化过程中的表达。(C) 为图 A 的示意图。(D) 为图 B 的示意图

Cbfa1 蛋白的表达逐渐增加(见图 1)。

2.4 I 型胶原、骨钙素、骨涎蛋白、骨桥素表达

半定量 RT-PCR 结果显示:从 MC3T3E1 细胞接种培养的第 1 d 开始即有 I 型胶原、骨钙素和骨桥素的表达,I 型胶原和骨钙素 mRNA 在 MC3T3E1 细胞成骨过程中表达逐渐增加,在第 22 d 达到高峰。骨桥素 mRNA 也随时间推移表达量逐渐增加,第 18 d 达到高峰,第 22 d 表达反而有所下降。在 MC3T3E1 细胞接种培养第 1~4 d 未检测到骨涎蛋白 mRNA 表达,从第 10 d 起,骨涎蛋白 mRNA 开始表达,并随培养时间的延长,表达量逐渐增加,在第 22 d 达到高峰(见图 3)。

3 讨论

Cbfa1(core binding factor alpha 1)是公认的促进成骨细胞分化的转录因子。Cbfa1 基因敲除纯合子小鼠完全缺乏骨组织,骨内无矿化中心出现,如果在

非成骨细胞如 C3H10T1/2 细胞或皮肤成纤维细胞中过表达 Cbfa1,可诱导出成骨细胞特异性标志物如 I 型胶原 $\alpha 1$ 、骨涎素和骨钙素的表达;相反,若在成熟成骨细胞用反义寡核苷酸或用小干扰 RNA 阻断 Cbfa1 的表达,可使成骨细胞标志物 I 型胶原、碱性磷酸酶、骨钙素、骨桥蛋白等的表达下降,并可阻断成骨细胞的成骨过程^[14,5]。

按 N 末端起始氨基酸不同,Cbfa1 可分为 3 种蛋白亚型:Cbfa1/P57、Cbfa1/P56 和 Cbfa1/osl2。目前关于 Cbfa1 亚型的研究均集中于 Cbfa1/P57 和 Cbfa1/P56 两种亚型。Cbfa1/P57 和 Cbfa1/P56 的表达各有组织和细胞特异性。Cbfa1/P56 和 Cbfa1/P57 均在成年鼠的长骨和肺中有表达,Cbfa1/P56 还在胸腺、脾脏、T 淋巴细胞中有表达,Cbfa1/P57 还在睾丸及骨骼肌中有表达。在成骨细胞系(如小鼠前成骨细胞株 MC3T3-E1,大鼠成骨样细胞系 UMR106 等)中,Cbfa1/P57 和 Cbfa1/P56 均有表达。而 Cbfa1/P56 在几乎所

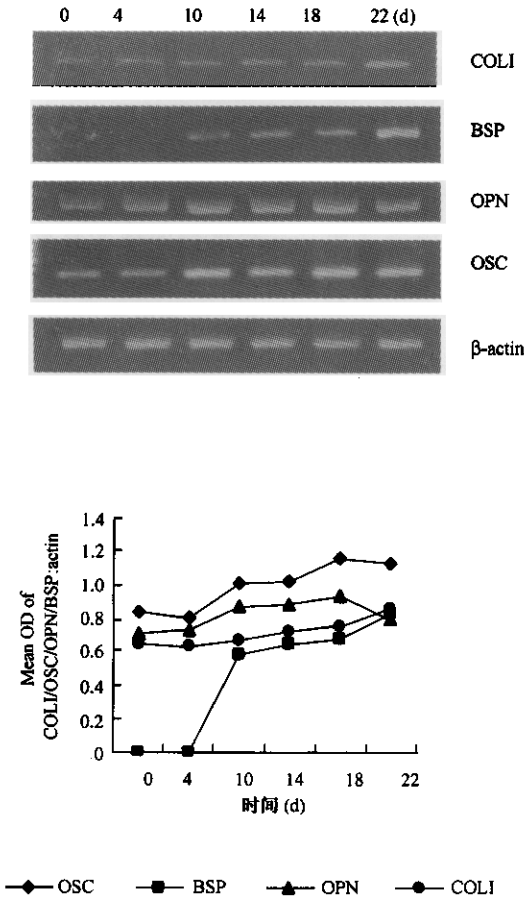


图3 I型胶原、骨涎蛋白、骨桥素、骨钙素 mRNA 在 MC3T3E1 分化过程中的表达

有的非成骨细胞系中有表达(如小鼠肝癌细胞株 Hepal-6,小鼠成纤维细胞株 NIH3T3 等);而 Cbfa1/P57 在某些非成骨细胞系(如 C2C12 ,C3H10T1/2)中有表达,而在另一些非成骨细胞系(如 Hepal-6 ,NIH3T3)中无表达。那么,Cbfa1 及 Cbfa1 的两种 N 末端亚型 Cbfa1/P57、Cbfa1/P56 在成骨细胞分化过程中的表达又是怎样?他们的表达与其他经典的、代表成骨细胞分化的基因表达变化间有无关系?

目前,国内还没有关于 Cbfa1 在成骨细胞分化阶段中表达变化的研究,国外已有了些初步的研究,结果因为研究选择的细胞系不同而有差别。Shui 等人以人髂骨来源的骨髓间质细胞为研究对象,发现 Cbfa1/P57 在成骨细胞分化的全过程都有表达,而且不随成骨细胞分化成熟而变化,而 Cbfa1/P56 在整个成骨过程中都没有表达^[6]。Bangerjee 等采用大鼠锁骨来源的成骨细胞和 MC3T3E1 细胞为研究对象,发现 Cbfa1/P56 不随成骨细胞分化成熟而变化,Cbfa1/P57 随原始细胞的分化而表达量逐渐增加^[7]。但他

们均没有观察总 Cbfa1 的表达随成骨细胞分化成熟的变化,也没有对比观察总 Cbfa1 表达变化与两种亚型 Cbfa1/P57、Cbfa1/P56 表达变化的关系,亦没有观察总 Cbfa1、Cbfa1/P57 亚型、Cbfa1/P56 亚型随成骨细胞分化成熟表达的变化与成骨表型的标志基因如骨钙素、骨涎素等表达变化的关系。

本研究选用经典的前成骨细胞模型 MC3T3E1 细胞为研究对象,观察在 MC3T3E1 细胞的诱导成骨过程中,总 Cbfa1 及 Cbfa1 两种亚型 Cbfa1/P57、Cbfa1/P56 表达的变化,并同步检测其他成骨相关基因 I 型胶原、骨钙素、骨涎蛋白、骨桥素和碱性磷酸酶在成骨细胞分化成熟中表达变化。结果发现,Cbfa1 mRNA 和蛋白随 MC3T3E1 细胞的分化成熟,表达量逐渐增高。Cbfa1/P57 mRNA 的表达培养时间的延长表达量逐渐增加,而 Cbfa1/P56 mRNA 随 MC3T3E1 细胞的分化成熟表达的变化不明显。与 Bangerjee 等的研究一致。

Hideyuki 和 Xiao 等的研究都发现,Cbfa1/P57 促进骨钙素表达或骨钙素启动子活性的作用较 Cbfa1/P56 强^[4,8]。Cbfa1/P57(Runx 2-Ⅱ)基因选择性敲除的转基因动物模型也显示 Cbfa1/P57 亚型对于软骨内成骨和成骨细胞成熟的作用更强。在 Runx 2-Ⅱ-/-转基因小鼠中,成熟成骨细胞标志物(如碱性磷酸酶、骨钙素、骨桥素)和破骨细胞标志物(如 TRAP ,tartrate-resistant acid phosphatase)的表达下降。Runx 2-Ⅱ-/-基因剔除小鼠锁骨来源的成骨细胞体外成骨能力明显下降,碱性磷酸酶分泌减少,矿化结节的形成障碍^[9]。本研究发现,Cbfa1 mRNA 和蛋白随 MC3T3E1 细胞的分化成熟,表达量逐渐增高。而 Cbfa1/P56 mRNA 表达变化不明显,Cbfa1/P57 mRNA 的表达在培养的 18 d 和 22 d 明显增高,提示在 Cbfa1 的两个 N 末端亚型中,Cbfa1/P57 亚型表达与成骨细胞的分化成熟的关系更密切,随成骨细胞的分化成熟而表达量逐渐增高。

成骨细胞的体外矿化过程可分为细胞增殖、骨基质形成并成熟及骨基质矿化 3 个阶段,各阶段的成骨细胞相关基因表达有特定的次序性。碱性磷酸酶是成骨细胞分化的早期指标之一,可促进无机磷的释放和羟磷灰石的形成。I 型胶原占细胞外基质的主要成分,是羟基磷灰石沉积反应的依托和骨架。骨涎蛋白和骨桥素都是非胶原细胞外基质的成员,能与整和素结合,促进骨细胞对矿化基质的黏附。骨钙素与羟磷灰石结合并沉积于胶原纤维上,是成骨细胞分化的中期指标。本研究发现,在 MC3T3E1

细胞培养的 0~10 d ALP 活性逐渐增高,到第 10 d 达到最高值,其后表达逐渐下降;Ⅰ型胶原、骨钙素和骨桥蛋白 mRNA 在 MC3T3E1 细胞的整个分化过程都有表达,随 MC3T3E1 细胞的分化,表达量逐渐增加,Ⅰ型胶原、骨钙素 mRNA 在第 22 d 达到高峰,骨桥素 mRNA 在培养的 14~18 d 达到高峰。骨涎蛋白从 MC3T3E1 细胞培养的第 10 d 才开始有表达,随培养时间的延长而表达量逐渐增加,到第 22 d 达到高峰。培养 10 d 开始,MC3T3E1 细胞Ⅰ型胶原染色转为深红色,培养 18 d,可见细胞致密,有染色深红的小结节形成;第 22 d,有大小不等的结节形成,结节处染色深红。茜素红染色,自培养第 18 d 起有着色小点形成,培养第 22 d 可见典型矿化结节形成。结合Ⅰ型胶原、骨钙素、骨涎蛋白、骨桥素、碱性磷酸酶表达变化及Ⅰ型胶原及茜素红染色结果,可认为,MC3T3E1 细胞培养的第 10 d 以前为细胞增殖期,培养的第 10 d 到第 22 d 为骨基质形成并成熟矿化期。MC3T3E1 细胞在接种培养时就有Ⅰ型胶原、骨桥素、骨钙素 mRNA 的表达,但表达量较低,说明 MC3T3E1 细胞代表的是前成骨细胞模型。骨桥素与骨涎蛋白虽然同为非胶原细胞外基质,反映成骨细胞成熟程度,但骨涎蛋白的表达落后于骨桥素,提示骨涎蛋白是反映更成熟阶段成骨细胞标志。

综上所述,我们在小鼠前成骨细胞 MC3T3E1 诱导成骨过程中观察了 Cbfa1 基因及 Cbfa1 两种亚型 Cbfa1/P56、Cbfa1/P57 mRNA 及其他成骨相关因子Ⅰ型胶原、骨钙素、骨涎蛋白、骨桥素 mRNA 在成骨过程中的变化,发现 MC3T3E1 细胞培养的第 10 d 以前为细胞增殖期,培养的第 10 d 到第 22 d 为骨基质形成并成熟矿化期。Ⅰ型胶原、骨钙素、骨桥素、骨涎蛋白随成骨进程表达量逐渐增高,而骨涎蛋白是反映更成熟阶段成骨细胞标志。总 Cbfa1 mRNA 随 MC3T3E1 细胞矿化进程表达量逐渐增高,Cbfa1/P57mRNA 在第 18 d 和 22 d 表达量明显增高,与其他成骨特异性基因的变化趋势一致,而 Cbfa1/P56 mRNA 在 MC3T3E1 细胞矿化进程中表达量的变化

不大,提示在 Cbfa1 的两个 N 末端亚型中,Cbfa1/P57 亚型的表达与成骨分化的关系更密切,进一步与成骨细胞分化有关的 Cbfa1 亚型研究应以 Cbfa1/P57 为主。

【参考文献】

- [1] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997, 89(5): 755-764.
- [2] Quarles LD, Yohay DA, Wenstrup RJ, et al. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an *in vitro* model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*, 1992, 7(6): 683-692.
- [3] Francesc Vinals, Teresa Lopez-Rovira, Francesc Ventura, et al. Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2. *FEBS Letters*, 2002, 510: 99-104.
- [4] Xiao ZS, Hinson TK, Quarles LD. Cbfa1 isoform overexpression upregulates osteocalcin gene expression in non-osteoblastic and pre-osteoblastic cells. *J Cell Biochem*, 1999, 74(4): 596-605.
- [5] Gordeladze JO, Noël D, Bony C, et al. Suppression of Cbfa1 expression in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells by anti-Cbfa1 siRNA blocks osteoblastic development, but does not affect chondrogenesis. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(Suppl 3): 86.
- [6] Chaoliang Shui, Thomas C Spelsberg, Sundeeep Khosla, et al. Changes in Runx2/Cbfa1 Expression and activity During Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. *J Bone Miner Res*, 2003, 18: 213-221.
- [7] Chaitali Banerjee, Amjad Javed, Je-Yong Choi. Differential regulation of the Two Principal Runx2/Cbfa1 N-Terminal Isoforms in Response to Bone Morphogenetic Protein-2 during Development of the Osteoblast Phenotype. *Endocrinology*, 142(9): 4026-4039.
- [8] Hideyuki Harada, Shuzo Tagashira, Masanori Fujiwara. Cbfa1 Isoforms Exert Functional Differences in Osteoblast Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(11): 6972-6978.
- [9] Xiao ZS, Anita B, Hjelmeland, et al. Selective Deficiency of the "Bone-related" Runx2-II Unexpectedly Preserves Osteoblast-mediated Skeletogenesis. *J Biol Chem*, 2004, 279: 20307-20313.

(收稿日期:2005-06-12)