

ERK5 调节成骨细胞功能的研究

程群 朱汉民 甘洁民 缪应新 施泓

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)12-0845-04

摘要:目的 研究 ERK5 在成骨细胞的表达及 IL-6 对其表达的调控,初步探讨 ERK5 在成骨细胞增殖分化中的作用。方法 应用免疫印迹法检测人、大鼠、小鼠成骨细胞和 MG-63 细胞 ERK5 的表达;用 IL-6 作用于 MG-63 细胞,检测不同时间和剂量干预后 ERK5 和 P-ERK5 表达情况,构建 ERK5 siRNA 和空白对照质粒,转染 MG-63 细胞,IL-6 干预细胞后检测各组细胞增殖率、碱性磷酸酶活性和骨钙素表达的差异。结果 在人、大鼠、小鼠成骨细胞和 MG-63 细胞中均有 ERK5 的表达;IL-6 可呈时间、剂量依赖性的提高 ERK5 的磷酸化;与对照组相比,ERK5 siRNA 的成骨细胞 IL-6 刺激后增殖降低,骨钙素表达量下降且差异有统计学意义,而碱性磷酸酶活性的变化差异无显著性。结论 成骨细胞 ERK5 信号通路的活性受 IL-6 调控,ERK5 信号通路参与了成骨细胞的增殖分化。

关键词: 成骨细胞; ERK5; IL-6; RNA 干扰; 增殖; 分化

Study of ERK5 regulating osteoblast function CHENG Qun, ZHU Hanmin, GAN Jiemin, et al. Shanghai Geriatric Institute, Fudan University Affiliated Huadong Hospital, Shanghai 200040, China

Abstract: **Objective** To study the expression of ERK5 on human, rat, mouse osteoblasts and the regulation of IL-6 on ERK5 expression, preliminarily investigate the effect of ERK5 on proliferation and differentiation of osteoblast. **Methods** The protein expression of ERK5 on osteoblasts was confirmed by western blot. ERK5 and P-ERK5 were detected when different dose of IL-6 treated osteoblast during different time. ERK5 siRNA plasmids were constructed and transfected into MG-63 cells. MTT, ALP activity and osteocalcin expression were detected after treated with 10 nmol/L IL-6. **Results** ERK5 was expressed in human, rat, mouse osteoblasts. The phosphorylation level of ERK5 were increased by IL-6 on time and dose dependent manner. As compared to control cells, ERK5 siRNA cells' MTT reduced, osteocalcin expression reduced ($P < 0.05$) yet the ALP activity was no significant difference. **Conclusion** ERK5 signal pathway is regulated by IL-6 in osteoblast, and ERK5 signal pathway participate in the proliferation and differentiation of osteoblast.

Key words: Osteoblast; ERK5; IL-6; RNA interference; Proliferation; Differentiation

骨质疏松不仅表现为破骨细胞活性增强,而且合并有成骨细胞功能降低,尤其在病理状态下,某些体液因子和药物对成骨细胞功能的抑制已成为这些继发性骨质疏松症的主要发病机制。

丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是将细胞外信号分子传入细胞内并使细胞作出相应反应的细胞内重要信号调节网络,ERK5 是 MAPK 家族中组成成员之一,自从 1995 年被克隆后,成为 MAPK 最新的研究通路之一,在调节细胞增殖分化中起重要作用,并执行了一系列原以

为是由 ERK1/2 来完成的功能。ERK5 受到细胞外理化因子和应激的广泛调控,已知 IL-6 是有效的成骨细胞增殖促进剂,其通过调节成骨细胞和破骨细胞功能对骨代谢产生影响^[1],而且在体外实验中证实可以激活 ERK1/2,但 IL-6 对 ERK5 信号通路的激活作用以及 ERK5 在成骨细胞功能和活性中的地位还不清楚,本次研究的目的是探讨 ERK5 在成骨细胞的表达和调控,并初步探讨该信号通路对成骨细胞增殖分化成熟的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

成年雄性 SD 大鼠和昆明小鼠购于中科院上海分院动物房,人成骨肉瘤 MG-63 细胞购于中科院上

基金项目:上海市科委计划项目(04ZR14044)

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华东医院老年医学研究所

通讯作者:朱汉民,Email:zhuhanmin@yeah.net

海细胞库。细胞培养基 DMED 和胎牛血清(GIBICO BRL USA),重组人 IL-6(peprotech ,USA),ERK5、P-ERK5、osteocalcin 抗体、 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶小鼠二抗(Santa Cruz ,USA),MTT、DMSO、Triton X-100(Sigma BRL USA)碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成生物研究所),转染试剂: Lipfectamine2000 (Invitrogen ,USA)。

1.2 不同来源成骨细胞培养

手术取正常成人松质骨、新生大鼠或小鼠头颅骨,剪成 1 mm^3 大小碎片,经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗、振荡 3 次,加入 IV 型胶原酶于 37°C 水浴手动振荡消化 15 min,离心弃上清,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基接种至培养瓶,隔日换液。人 MG-63 细胞接种于含 10% 胎牛血清、10 mmol/L HEPES、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 IU/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养液中,每 3 日换液 1 次,5~7 天传代。以上细胞生长至 60%~80% 汇合后,分别给予不同浓度的 IL-6 干预。

1.3 siRNA 的合成筛选及 siRNA 干扰

GeneBank 中检索人全长的 ERK5 基因序列,根据 http://www.ambion.com/echlib/misc/siRNA_finder.html 设计 3 对针对 ERK5 的 siRNA,同时设计 1 条阴性对照序列: siRNA1: CACGACAACATCATCGCCA; siRNA2: CTATGTACACCAGCTACAG; siRNA3: GAAAGATGGTGCCATCTCA; negative: TTCTCCGAACGTGTCACGT。siRNA 及阴性对照质粒由上海吉玛基因化学技术有限公司构建。转染前 1 天将 MG-63 细胞按每孔 1×10^6 接种于 6 孔培养板中,细胞汇合至 70%~80% 时用 Lipofectin 2000™ 将 siRNA 转染入细胞,siRNA 的转染浓度为 200 nmol/L,转染方法按照 Lipofectin2000™ 说明书操作,每组设 3 个复孔,实验重复 3 次,转染后 48 h 提取细胞总 RNA,用实时定量 PCR 方法筛选 1 个最有效的 siRNA(干扰效率 $\geq 75\%$,具体数据未提供),命名为 pRNA TU6.2-ERK5i,阴性对照质粒命名为 pRNA TU6.2-GFP。

将 MG-63 细胞分为 4 组: ① pRNA TU6.2-GFP 质粒转染细胞未加入 IL-6 干预; ② pRNA TU6.2-GFP 质粒转染细胞加入 IL-6 干预; ③ pRNA TU6.2-ERK5i 质粒转染细胞未加入 IL-6 干预; ④ pRNA TU6.2-ERK5i 质粒转染细胞加入 IL-6 干预。转染 24 h 后用 10 nmol/L 的 IL-6 干预细胞,24~48 h 后用于细胞增殖率、碱性磷酸酶活性和蛋白表达的检测。

1.4 Western 印迹检测

培养于 6 孔板中的 MG-63 细胞弃去培养液,用

预冷 PBS 洗 2 次,加入细胞裂解液,超声波破碎细胞数次,Bradford 法检测蛋白含量。60 μg 细胞总蛋白加 $4 \times$ 上样缓冲液煮沸变性 10 min,10% 的 SDS 聚丙烯酰胺电泳后转膜,0.5% 脱脂奶粉封闭,与 1:1000 的单克隆抗体 4°C 杂交过夜,杂交膜用 TBST 缓冲液洗 3 次,再与辣根过氧化物酶标记的二抗室温杂交 1 h 后显影。电泳条带用 BandScan V 软件分析灰度值,结果以目的基因灰度值与 β -actin 灰度值的比值表示,取 4 次相同实验的结果进行统计学分析。

1.5 细胞增殖率的检测

MG-63 细胞以每孔 2×10^4 密度接种于 96 孔板,每孔 200 μL ,每组分别重复 4 孔,并设 4 个不含细胞的完全培养基做空白对照,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 24 h 后,换为无血清培养基,干预组加入浓度为 10 nmol/L 的 IL-6,继续培养,于 48 h 收集细胞,测定前 4 h,用 PBS 冲洗后更换无血清培养液 100 μL ,同时加入 10 μL 0.5% MTT,培养箱孵育 4 h,加 100 μL DMSO 室温下静置 10 min 后振荡 5 min,酶标仪 490 nm 波长下测定各孔的吸光度(A)值,取 4 组平均值。

1.6 碱性磷酸酶(ALP)活性检测

MG-63 细胞以每孔 2×10^4 密度接种于 96 孔板,每孔 200 μL ,每组分别重复 4 孔,并设 4 个不含细胞的完全培养基做空白对照,含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 24 h 后,换为无血清培养基,干预组加入浓度为 10 nmol/L 的 IL-6 培养 24 h 后,吸除孔内培养液, PBS 洗涤 2 次,每孔加入 1 mL 0.1% Triton-100 作用 30 min 后,加入基质液及缓冲液各 50 μL ,充分混匀后 37°C 孵育 15 min,酶标仪 520 nm 波长下测定各孔的吸光度值(A)值,取 4 组平均值。

1.7 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理,组间差异统计学意义比较采用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ERK5 在不同来源成骨细胞中的表达

westernblot 结果显示 116 kd 处可见一条带,大鼠和人的成骨细胞表达量较小鼠高。ERK5 磷酸化抗体检测结果显示,在基础状态下,成骨细胞中 ERK5 磷酸化的水平较低,见图 1。

2.2 IL-6 时间依赖性的激活 ERK5

IL-6 是成骨细胞成熟和分化的调节因子之一,

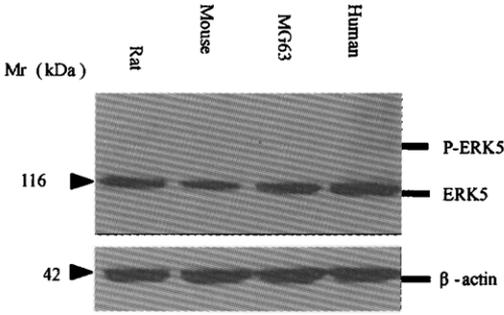


图1 ERK5在不同来源成骨细胞中的表达

有研究证实 IL-6 可以使成骨细胞中 ERK1/2 磷酸化而激活,而且 IL-6 可以体外激活多种细胞内的 ERK5,所以我们观察 IL-6 对成骨细胞 ERK5 的作用。

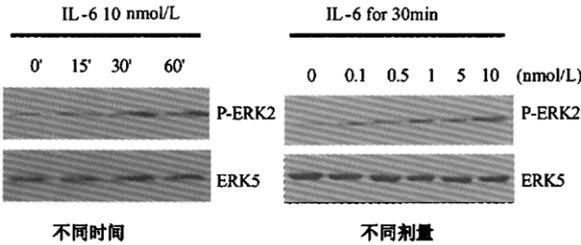


图2 IL-6对MG-63细胞ERK5磷酸化水平的剂量效应

如图2所示,IL-6呈时间、剂量依赖性的增加 ERK5 的磷酸化水平。10 nmol/L 的 IL-6 在 15 min 时起效,在 30 min 时达到高峰,60 min 开始下降,选择 30 min 作为观察终点,不同剂量的 IL-6 刺激细胞,随着剂量的增加,ERK5 磷酸化逐渐增加,在 10 nmol/L 时作用最强。

2.3 ERK5 iRNA 的成骨细胞增殖率降低,成熟分化障碍

表1 不同处理组细胞增殖率的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	MTT (A_{490})	
	未干预	IL-6 干预
pRNA TU6.2-GFP	0.320 ± 0.044	0.538 ± 0.065*
pRNA TU6.2-ERK5i	0.295 ± 0.030	0.278 ± 0.024*

注:与 pRNA TU6.2-GFP IL-6 未干预组相比,* $P < 0.05$;与 pRNA TU6.2-GFP IL-6 干预组相比,* $P < 0.05$

如表1所示,4组细胞的 MTT 增殖率结果测定分别为 0.320 ± 0.044、0.538 ± 0.065、0.295 ± 0.030、

0.278 ± 0.024,在正常对照 MG-63 细胞,IL-6 干预后增殖率明显升高 ($P < 0.05$),但 ERK5 iRNA 的细胞基础状态下增殖率处于低水平,IL-6 干预后也未提高,且与正常 IL-6 干预相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。

如表2所示,4组细胞的碱性磷酸酶活性分别为 3.116 ± 0.1334、5.367 ± 0.217、3.149 ± 0.068、5.038 ± 0.221,在正常对照组和 ERK5 iRNA 组的 MG-63 细胞,IL-6 干预后碱性磷酸酶活性均明显升高 ($P < 0.05$),正常组和 ERK5 iRNA 组之间差异无统计学意义。

表2 不同处理组碱性磷酸酶活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	ALP (A_{520})	
	未干预	IL-6 干预
pRNA TU6.2-GFP	3.116 ± 0.133	5.367 ± 0.217*
pRNA TU6.2-ERK5i	3.149 ± 0.068	5.038 ± 0.221*

注:与同质粒转染未干预组比较;* $P < 0.05$

如图3所示,不同条件干预后4组细胞的骨钙素表达情况,在正常对照 MG-63 细胞,IL-6 干预后骨钙素表达明显升高 ($P < 0.05$),但 ERK5 iRNA 的细胞 IL-6 干预后骨钙素无明显提高,且与正常对照相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。

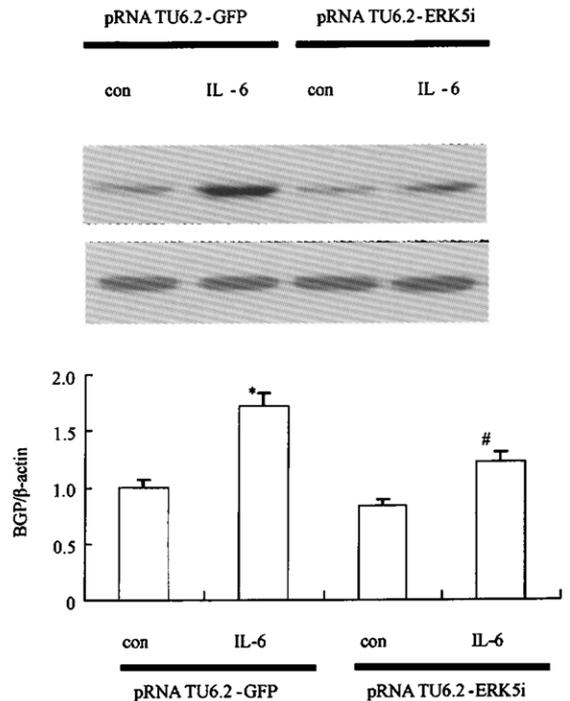


图3 不同处理组骨钙素蛋白表达 ($n = 4$)

注:与 pRNA TU6.2-GFP IL-6 未干预组相比,* $P < 0.05$,与 pRNA TU6.2-GFP IL-6 干预组相比,* $P < 0.05$

3 讨论

丝裂原激活蛋白激酶是一个双磷酸化激活的丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶,由4个成员组成:细胞外信号调节激酶1/2(extracellular-signal regulated kinase 1/2, ERK1/2),c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK),应激激活蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)和大丝裂原活化蛋白激酶1(big MAP kinase 1, BMK1 又称为 ERK5)。每个成员分别由不同的上游激酶活化并发挥不同的调节功能,ERK5 是 MAPK 家族中的新成员,目前对其知之甚少,其分子量为 115000,相当于 ERK1/2 双分子量,与 ERK1/2 有 53% 的同源性,其 N-末端的高度保守双磷酸化位点(Thr219, Tyr221)是激酶活化域。ERK5 主要定位于胞质,接受细胞外传来的信号并由其上游激酶 MEK5 激活,然后可转位于细胞核内对转录因子心肌细胞增强子(myocyte enhancer factor, MEF2)磷酸化而调节其转录活性。最初的研究发现细胞因子如表皮生长因子、神经生长因子等能诱导激活 ERK5,而 ERK5 可促进转录因子 MEF2 家族核 cAMP 应答元件结合蛋白(Camp responds element binding protein, CREB)的磷酸化,这些转录因子与细胞生存密切相关,ERK5 还可以入核直接调节其他转录因子的表达,如 c-Jun 参与细胞周期的调控,而 c-fos 可介导 ERK5 的抗凋亡作用^[2]。

在体实验表明 ERK5 可提高血管内皮细胞活性,在胚胎发育中起关键作用,提示了 ERK5 在增殖和器官发生中的作用^[3];ERK5 缺陷小鼠模型出现胚胎期神经分化障碍,表明 ERK5 信号通路是神经分化所必需的^[4];ERK5 还与肾小球系膜细胞增殖相关,可能是糖尿病肾病综合征的致病因素之一^[5];Sohn S 等^[6]报道对胸腺细胞发育成熟起关键作用的是 ERK5,而不是 ERK1/2,揭示了 ERK5 对 T 淋巴细胞分化的作用;另外在脊神经节激活 ERK5 信号通路可导致持久的痛觉过敏^[7],而在肿瘤方面的研究发现 ERK5 的激活与淋巴结转移有关^[8]。

正因为 ERK5 信号通路在多种组织调控细胞增殖分化和凋亡中的作用,我们初步探讨了 ERK5 在成骨细胞的表达和功能,发现成骨细胞可表达 ERK5,并能被 IL-6 特异性的磷酸化而激活,ERK5 siRNA 的成骨细胞表现为 IL-6 干预后增殖率降低、骨

钙素表达降低,但碱性磷酸酶活性无明显变化。碱性磷酸酶出现在成骨细胞分化早期,与细胞增殖关系密切,细胞增殖上调后可使碱性磷酸酶表达延迟,笔者选择干预 24 h 作为观察点,未能发现碱性磷酸酶的有差异变化。骨钙素是成骨细胞分化后期矿化期表达升高的蛋白,主要反映成骨细胞的分化和成熟,骨钙素的降低提示成骨细胞成熟分化障碍。所以,笔者的数据表明在成骨细胞 ERK5 是一个新的信号分子,对成骨细胞的增殖分化成熟起着重要的作用,而细胞因子 IL-6 的部分活性是由 ERK5 来介导的。

总之,ERK5 在成骨细胞内作为信号分子介导了细胞内外信息的交流,是成骨细胞保持其活性和完成其功能不可缺少的信号蛋白,目前对其作用还不是很清楚,需要通过更多的体内、体外实验进行深入研究。

【参 考 文 献】

- [1] Chipoy C, Berreur M, Couillaud S, et al. Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKC delta and STAT3. *J Bone Miner Res* 2004, 19(11):1850-1861.
- [2] Nishimoto S, Nishida E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* 2006, 7(8):782-786.
- [3] Yan C, Ding B, Shishido T, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase 5 reduces cardiac apoptosis and dysfunction via inhibition of a phosphodiesterase 3A/inducible cAMP early repressor feedback loop. *Circ Res* 2007, 100(4):510-519.
- [4] Nishimoto S, Kusakabe M, Nishida E. Requirement of the MEK5-ERK5 pathway for neural differentiation in *Xenopus* embryonic development. *EMBO Rep*, 2005, 6(11):1064-1069.
- [5] Dorado F, Velasco S, Esparis A, et al. The mitogen-activated protein kinase Erk5 mediates human mesangial cell activation. *Nephrol Dial Transplant* 2008, 23(11):3403-3411.
- [6] Sohn S, Lewis G, Winoto A. Non-redundant function of the MEK5-ERK5 pathway in thymocyte apoptosis. *EMBO J*, 2008, 27(13):1896-1906.
- [7] Xiao C, Zhang L, Cheng Q, et al. The activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 in spinal cord and dorsal root ganglia contributes to inflammatory pain. *Brain Res* 2008, 1186(1):76-86.
- [8] Sticht C, Freier K, Knopfle K, et al. Activation of MAP kinase signaling through ERK5 but not ERK1 expression is associated with lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Neoplasia* 2008, 10(5):462-470.

(收稿日期:2008-08-12)