

## 去势大鼠股骨组织中 Wnt10b 的表达

李战宁 王坤正

中图分类号: R36 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)06-0471-04

**摘要:** 目的 观测去势大鼠骨质疏松模型中股骨组织 Wnt10b 的表达。方法 20 只 SD 雌性大鼠随机分为去势组和对照组两组。大鼠切除双侧卵巢去势诱发骨质疏松症。术后 3 个月腹主动脉取血,用放射免疫法测定各组大鼠血清  $E_2$  水平。从股骨中提取总 RNA 和蛋白,分别采用 RT-PCR 和免疫印迹的方法检测 Wnt10b 在 mRNA 和蛋白表达水平上的变化。结果 去势组大鼠血清  $E_2$  含量为  $10.228 \pm 4.094$  pmol/L;对照组血清  $E_2$  含量为  $21.975 \pm 3.021$  pmol/L。经 RT-PCR 和免疫印迹检测发现,与对照组相比,去势大鼠 Wnt10b 的 mRNA 和蛋白水平表达量均降低。结论 去势大鼠骨质疏松模型体内股骨组织中 Wnt10b 的 mRNA 和蛋白表达水平均下降,以上结果提示 Wnt10b 可能在大鼠去势诱发骨质疏松模型中通过调节成骨等过程参与了骨质疏松的发展过程。

**关键词:** 大鼠; 去势; 骨质疏松; Wnt10b

**Wnt10b expression in the femur of castrated rats** Li Zhanning, WANG Kunzheng. Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Corresponding author: WANG Kunzheng, Email: wangkunzheng2008@163.com

**Abstract: Objective** To observe and measure the expression level of Wnt10b in the femur of ovariectomized osteoporosis rat model. **Methods** Twenty female SD rats were randomly divided into 2 groups: the ovariectomized group and the model control group. The rats were ovariectomized to induce osteoporosis. After 3 months, blood was withdrawn from the cardinal vein and serum  $E_2$  was using immunoradiological method. Total RNA and protein were collected from the femur. Expression of Wnt10b mRNA and protein was detected using RT-PCR or Western blotting. **Results** The concentration of serum  $E_2$  was  $10.228 \pm 4.094$  pmol/L in ovariectomized group, and  $21.975 \pm 3.021$  pmol/L in the model control group, respectively. The mRNA and protein expression of Wnt10b in rats of ovariectomized group was lower than those of model control group. **Conclusion** Both mRNA and protein expression of Wnt10b were lower in rats of ovariectomized group, indicating that Wnt10b might play an important role in ovariectomized rats to induce the development of osteoporosis through regulating bone formation.

**Key words:** Rats; Castrating; Osteoporosis; Wnt10b

骨质疏松症是导致老年人伤残和影响老年人生活质量最常见的因素之一。随着社会的进步,我国人口老龄化已经日趋明显。而绝经后骨质疏松是目前导致全世界老年妇女发生骨折的重要因素。临床上用于预防和治疗骨量丢失的传统方法是抑制骨吸收;这种治疗能够减缓骨量的继续丢失,但是不能改善骨的质量也不能恢复已经丢失的骨量<sup>[1]</sup>。骨质

疏松症发生的根本性原因是骨重建平衡被打破并向骨吸收方向倾斜,但有关作用机理仍有待深入研究。因此,进一步探讨骨质疏松相关细胞内的信号转导过程,发现其中的关键环节和关键信号转导分子,对于深入理解骨质疏松的发生发展具有重要的理论意义和临床指导作用。Wnt 信号系统在成骨以及骨细胞的发育及分化过程中扮演重要角色<sup>[2,3]</sup>,我们通过建立去势大鼠骨质疏松模型,研究动物模型股骨中 Wnt10b 在基因和蛋白水平上的表达,从而为绝经后骨质疏松的信号传导通路研究增加新的内容,同时指导临床药物治疗。

作者单位: 710004 西安,西安交通大学医学院第二附属医院骨科

通讯作者: 王坤正, Email: wangkunzheng2008@163.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

3 周龄 SD 雌性大鼠(西安交通大学医学院动物中心提供),体重(270 + 15)g;蛋白电泳仪(Bio-Rad)公司;PTC-100TM PCR(MJ Research 公司);凝胶成像系统;小鼠抗人 Wnt10b 单克隆抗体(Abcam 公司);HRP 标记兔抗小鼠二抗(北京中杉);蛋白定量试剂盒;DNA maker (DL2000)(TAKARA 公司)。RNA 提取试剂盒、反转录以及 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。凝胶回收试剂盒购自上海博亚生物技术有限公司。引物合成及序列测定由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 血清 E<sub>2</sub> 检测:** 将健康雌性 SD 大鼠 20 只随机平均分为两组,每组 10 只:去势组和对照组。去势组在无菌条件下行卵巢切除术,对照组进入腹腔仅切除少量脂肪后缝合皮肤。实验动物术后观察均可正常饮食与活动,生长状况良好。术后 3 个月分别检测两组大鼠体重,用 0.1% 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,分别从腹主动脉取血和获取双侧股骨,室温 1 h,4℃ 过夜,3000 r/min 离心 15 min,吸取上清,用放射免疫法检测 E<sub>2</sub> 水平(西安交通大学第一附属医院检验科)。

**1.2.2 细胞总 RNA 提取(Trizol 法):** 取术后 3 个月大鼠,用 0.1% 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,取股骨组织 100 ~ 200 mg,放进经 DEPC 处理过的研磨器中在液氮下研磨,加入 1 mL Trizol 液,静置 5 min。加入 0.2 mL 氯仿后剧烈震荡,使其充分混合,室温放置 5 min;12000 r/min 4℃ 离心 15 min 使之分为水相和有机相两层,小心取出 RNA 所在的水相(上层),加入 0.5 mL 异丙醇,轻轻混匀,室温放置 10 min;12000 r/min 4℃ 离心 10 min,弃上清;加入用不含 RNA 酶的水配制的 75% 乙醇 1 mL,洗涤沉淀 1 次;7500 r/min 4℃ 离心 5 min,弃上清;室温干燥 RNA 5 ~ 10 min;取 10 μL 不含 RNA 酶的水加入离心管中溶解 RNA;核酸定量分析仪检测 A260/A280 及 RNA 含量。

**1.2.3 逆转录合成 cDNA 反应(RT):** 在 12 μL 的反应体系中加入提取的总 RNA (0.5 ~ 1 μg)、Oligo (dT) 1 μL、dNTP 2 μL 和 DEPC 水,放置于 65℃ 水浴中 5 min,然后置于冰上。将 4 μL cDNA 合成缓冲液、1 μL DTT、1 μL RNaseOUT (40 U/mL)、1 μL DEPC 水和 1 μL 反转录酶混合(共 8 μL),再加入上

述 12 μL 反应体系中,并充分混合,50℃ 孵育 30 ~ 60 min;85℃ 孵育 5 min;加入 1 μL 的 RNaseH 并于 37℃ 孵育 20 min 即可得到 cDNA。cDNA 产物可以于 -20℃ 保存或立即进行 PCR 反应。

**1.2.4 PCR 反应检测 Wnt10b 的 mRNA 表达:** 建立 25 μL 的反应体系,分别加入 TaqDNA 聚合酶 1 μL,10 × PCR 反应缓冲液 2.5 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL,dNTP 2 μL,上下游引物各 0.5 μL,cDNA 产物 5 μL 和水 12.5 μL,进行 PCR 反应。反应条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s。共进行 30 个循环。最后一个循环 72℃ 保温 15 min。正向引物:5'-AGACAGTGGTAGAGAGGTTT-3'。反向引物:5'-AGTATGATAAATTATCCCTT-3',共 220 bp。取 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

**1.2.5 蛋白提取:** 取术后 3 个月大鼠,用 0.1% 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,获取股骨组织,用手术刀轻轻刮掉骨膜,把骨膜放入离心管中加入 2 × 载样缓冲液,水煮 3 min,12000 r/min 离心 15 min,小心吸取蛋白(最上层)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

**1.2.6 免疫印迹:** SDS-PAGE 结束后,按 Bio-Rad 产品说明,凝胶靠近阴极一侧,硝酸纤维素膜(NC 膜)靠近阳极一侧,置转移缓冲液中(25 mmol/L Tris,192 mmol/L Glycine,20% 甲醇),100 V 恒压 1 h,将蛋白从凝胶电转移至 NC 膜上,电转移结束后,取出 NC 膜,用洗涤液 TBST(含 0.02 mol/L pH 7.4 TBS,0.4% Tween20)室温洗 3 次,浸入封闭液(含 2% BSA 的 TBST)中 37℃,1 h,洗涤液(TBST)室温洗 3 次,加小鼠抗人 Wnt10b 单克隆抗体,37℃ 孵育 1 h,TBST 室温洗膜 3 次,加入兔抗小鼠 HRP 标记二抗,37℃ 孵育 1 h,TBST 室温洗膜 3 次,再用 TBS 洗 3 次,NC 膜浸入 ECL 荧光显色液中,室温避光显色 1 min,置暗盒内,压片曝光。

## 2 结果

### 2.1 血清 E<sub>2</sub> 水平的检测

用放免方法分别检测去势组和对照组大鼠血清中 E<sub>2</sub> 的含量,经统计学分析,去势组血清中 E<sub>2</sub> 的含量显著低于对照组的含量, $P < 0.05$ (结果见表 1)。

表 1 去势大鼠血清 E<sub>2</sub> 检测结果

分组	对照组	去势组
E <sub>2</sub> (pmol/L)	21.975 ± 3.021	10.228 ± 4.094

## 2.2 PCR 检测

分别检测去势组和对照组左侧股骨中 Wnt10b 的 mRNA 表达水平。经半定量 RT-PCR 检测,去势组 Wnt10b 的 mRNA 表达低于对照组。结果见图 1 和 2。RT-PCR 结果经三博远志公司测序,与预期结果一致。

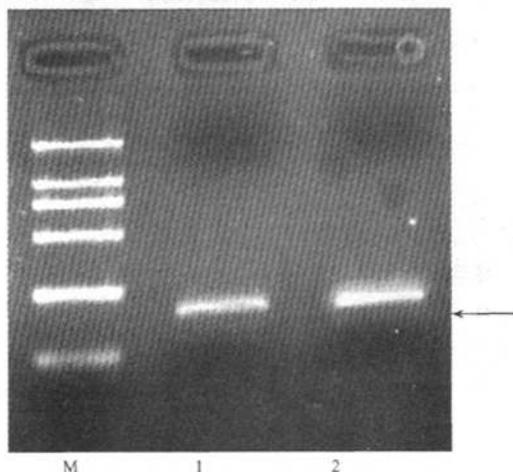


图 1 Wnt10b 片段的琼脂糖凝胶电泳图  
1 为去势组,2 为对照组

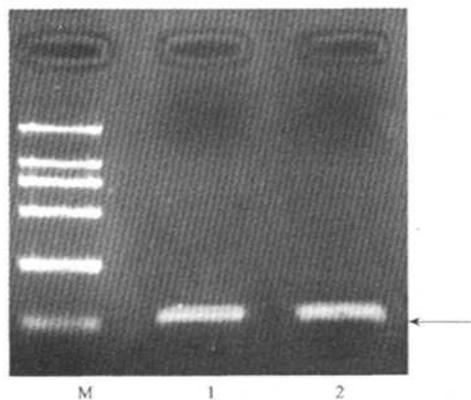


图 2  $\beta$ -actin 琼脂糖凝胶电泳图  
1 为去势组,2 为对照组

## 2.3 免疫印迹

分别检测去势组和对照组右侧股骨中 Wnt10b 蛋白表达水平。经免疫印迹检测,去势组中 Wnt10b 蛋白表达水平低于对照组。结果见图 3 所示。

## 3 讨论

人类遗传学和动物研究表明:Wnt/LRP5/6 是骨量形成的重要调节因子。经临床研究证实 Wnt 受体复合物的突变与骨密度的改变和骨质疏松的发生

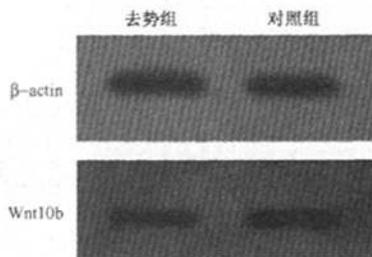


图 3 免疫印迹结果  
1 为对照组,2 为去势组

密切相关,LRP5 失去功能的突变将导致骨质疏松-假性神经胶质瘤综合征 (osteoporosis-pseudoglioma syndrome, OPPG)<sup>[4]</sup>,而获得功能的突变将导致高骨量 (high bone mass, HBM) 的表型<sup>[5,6]</sup>;有关 Wnt 通路组分基因敲除和转基因鼠模型也表明经典 Wnt 通路调节成骨细胞的分化、骨基质的形成及矿化等环节并影响破骨细胞的发生和骨吸收等<sup>[7]</sup>。

Wnt 信号通路通过调节成骨细胞的增殖、分化和功能等影响出生后个体骨组织的生长和发育。上调或下调这条途径中相关因子的表达或改变它们的功能将导致成骨细胞功能的改变及骨量的变化;并通过调节 OPG/PRANKL 的表达,间接调节破骨细胞的功能。因此,Wnt 通路中的组分已成为抗骨质疏松治疗的靶点,受到科学家们的关注。然而,骨质疏松这类慢性疾病的治疗需要严格的安全措施,而 Wnt 通路的激活与癌症的发生密切相关。所以,靶向活化骨组织特异 Wnt 通路的作用机理仍待进一步证实和研究。

Christina 等<sup>[8]</sup>发现 Wnt10b 信号传导通路能够促进成骨细胞生成而抑制脂肪细胞的生成,而且 Wnt10b 能够抑制 PPAR $\gamma$  的表达使骨生成增加,反之,罗格列酮、15dPGJ2 和 GW0072 又能几乎完全抵消 Wnt10b 的表达且抑制其合成从而阻止骨生成<sup>[9]</sup>。

我们通过建立去势大鼠骨质疏松模型,研究动物模型股骨中 Wnt10b 在基因和蛋白水平上的表达。结果证实去势大鼠骨质疏松模型体内股骨组织中 Wnt10b 的 mRNA 和蛋白表达水平均下降,以上结果提示 Wnt10b 可能在大鼠去势诱发骨质疏松模型中通过调节成骨等过程参与了骨质疏松的发展过程。通过这一研究,为绝经后骨质疏松的信号传导通路增添了新的内容,同时指导临床药物治疗。

激可抑制 TGF- $\beta$  基因转录。这充分说明, TGF- $\beta$  可能参与了介导 PTH1-34 的促成骨作用。而 BMP-7 作为 TGF- $\beta$  家族成员之一也具有相同功能, 且可能也是通过 PTH1-34 上调 BMP-7 基因转录而促成骨细胞增殖及分化。

BMP-9 也是 BMPs 家族中发挥重要作用的一员, 其在成骨细胞分化中是最具潜能的诱导因子之一。在近期研究中, Ifelm 等<sup>[6,8]</sup> 发现应用重组的腺病毒载体表达嵌合的 BMP-9 基因显示有明显的诱导成骨效应。Dumont 等<sup>[9]</sup> 最近也研究表明人骨髓间充质干细胞体外复合 BMP-9 能有效地在啮齿类诱导脊柱融合。以上实验充分说明 BMP-9 在成骨作用方面发挥着重要作用, 然而 BMP-9 介导的成骨信号转导机制尚不明确, 而且 rhPTH(1-34) 是如何通过增强 BMP-9 的表达来促进骨形成的机制也需要进一步的深入研究。但目前 BMP-9 仍可以做为一种有效的骨形成物质。

综上所述, rhPTH1-34 可以通过多种因子的协同作用, 促进成骨细胞的增殖及分化。而其作用机理需要更过深入的研究。

#### 【参 考 文 献】

[1] Feng Jiao, Liu Yan-hua, Xiao Yun, et al. A novel human parathyroid hormone (1-34) analog for the treatment of

osteoporosis. *Peptides*, 2009, 30 (6):1173.

- [2] Whitfield J, Fmorley P, Willick GE, et al. Comparison of the ability of recombinant human parathyroid hormone rhPTH(1-84) and rhPTH(1-34) to stimulate femoral trabecular bone growth in ovariectomized rats. *Calcified tissue int*, 1997, 60: 26-29.
- [3] Oconnor MB, Umulis D, Othmer HC, et al. Shaping BMP morphogen gradient in the drosophila embryo and pupalwing development, 2006, 133(2):183-193.
- [4] Hai jman A, Dsouza RN, Bronckers AL, et al. BMP-7 (BMP-7) affects mRNA expression of type I, II, X collagen, and matrixglu protein in ossifying long bones *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 1997, 12 (11):18215-18231.
- [5] 陈雅娟, 张彦定. 骨形态发生蛋白的骨诱导活性及其应用研究现状. *中国药物与临床*, 2003, 3(4):277.
- [6] Morgan EF, Mason ZD, Bishop G, et al. Combined effects of recombinant human BMP-7 (rhBMP-7) and parathyroid hormone (1-34) in metaphyseal bone healing. *Cell Physiol*, 2008, 43(6): 1031-1038.
- [7] Varady P, Li JZ, Cunningham M, et al. Morphologic analysis of BMP-9 gene therapy induced osteogenesis. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(9):697-710.
- [8] Helm GA, Alden TD, Beres EJ, et al. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent. *J Neuro Surg*, 2000, 92(suppl):191-196.
- [9] Vonbunob A, Cho KW. Intracellular bmps signaling at ioninvertebrates: pathway or net work. *Devboil*, 2001, 269(7):1-14.

(收稿日期:2010-12-06)

(上接第 473 页)

#### 【参 考 文 献】

- [1] Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 2002, 359:2018-2026.
- [2] Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S. Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res*, 2007, 22:1-6.
- [3] Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*, 2005, 11: 76-81.
- [4] Chambers TJ. *J Pathol*, 2000, 192: 4-13.
- [5] Martin TJ, Rodan GA. Coupling of bone resorption and formation during bone remodeling. In *Osteoporosis* (Marcus, R. et al., eds), Academic Press, 2001, pp. 361-372.
- [6] Mundy GR. Hormonal factors which regulate bone resorption. In

*Handbook of Experimental Pharmacology: Physiology and Pharmacology of Bone* (Vol. 107) (Mundy, G. R. and Martin, T. J., eds), Springer-Verlag, 2003, pp. 215-238.

- [7] Howard GA, et al. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad. Sci U S A*, 1981, 78:3204-3208.
- [8] Bennett CN, Longo KA, Wrig WS, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3324-3329.
- [9] Lecka Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, et al. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 2002, 143: 2376-2384.

(收稿日期:2011-02-09)