

Wnt3a 信号分子对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程中端粒酶活性的影响

胡江伟 王亮* 马远征 张妍 杨帆 杨国花 王文娇 付雪梅
解放军第 309 医院全军骨科中心骨内科,北京 100091

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 01-0033-05

摘要: **目的** 探索 Wnt3a 信号分子对体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程中端粒酶活性的影响。**方法** 采用密度梯度离心联合贴壁筛选法分离培养 SD 大鼠股骨骨髓间充质干细胞。传代后通过形态学和流式细胞学检测细胞表面标志物 CD29、CD44、CD45,筛选并鉴定细胞。采用成骨诱导培养基联合不同浓度的 wnt3a(5 ng/mL、25 ng/mL、100 ng/mL)诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化,以碱性磷酸酶活性检测评价其成骨分化能力。通过 TRAP-ELISA 端粒酶活性检测法检测在不同浓度的 wnt3a 干预下诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化过程中端粒酶活性的表达。**结果** 骨髓间充质干细胞传至第 3 代后可获得均一性较高的细胞,流式细胞学检测细胞表面标志物 CD29、CD44 高表达,CD45 低表达。成骨诱导培养基联合不同浓度的 wnt3a 诱导大鼠 BMSCs 7 d 后,碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)活性检测结果:与普通成骨诱导培养基相比,含有 5 ng/mL 及 25 ng/mL wnt3a 的成骨诱导培养基可显著增加其碱性磷酸酶(ALP)活性($P < 0.05$),而含有 100 ng/mL wnt3a 的成骨诱导培养基则明显抑制其碱性磷酸酶(ALP)活性($P < 0.05$)。与普通成骨诱导培养基相比,联合诱导培养基诱导骨髓间充质干细胞成骨分化过程中,端粒酶活性的改变无明显的统计学差异。**结论** 小剂量(5 ng/mL、25 ng/mL)的 wnt3a 分子能够促进体外培养的骨髓间充质干细胞成骨分化,而大剂量(100 ng/mL)的 wnt3a 分子则抑制其成骨分化。骨髓间充质干细胞具有较弱的端粒酶活性,成骨分化过程中其活性逐渐减弱,直至消失;wnt3a 信号分子刺激并不能有效激活其端粒酶活性。

关键词: wnt3a;骨髓间充质干细胞;成骨分化;端粒酶

Effect of Wnt3a signaling molecules on the activity of telomerase during the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats

HU Jiangwei, WANG Liang, MA Yuanzheng, ZHANF Yan, YANG Fan, YANG Guohua, WANG Wenjiao, FU Xuemei
Department of Orthopedics, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China
Corresponding author: WANG Liang, Email: wangl309@sina.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of Wnt3a signaling molecules on the activity of telomerase during the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*. **Methods** BMSCs of the femur of Sprague Dawley rats were isolated using the density gradient centrifugation combined with adherence screening method, and then cultured *in vitro*. After passaging, cell surface markers CD29, CD44, and CD45 were detected using morphology and flow cytometry. The cells were screened and identified. Cells were cultured with osteogenic inducing medium combined with different concentrations of Wnt3a (5 ng/mL, 25 ng/mL, and 100 ng/mL), in order to induce the differentiation of BMSCs. the activity of ALP was detected to evaluate the capability of osteogenic differentiation of BMSCs. The activity of telomerase during the differentiation of BMSCs into osteoblasts with the intervention of different concentrations of Wnt3a was detected using telomeric repeat amplification protocol-enzyme-linked immunosorbent assay (TRAP-ELISA). **Results** At the 3rd passage of BMSCs, cells with high uniformity were obtained. The results of flow cytometry showed that the expression of cell surface markers CD29 and CD44 was high, while CD45 had low expression. After 7-day culture of BMSCs with osteogenic inducing medium combined with different concentrations of Wnt3a, the results of ALP activity detection revealed that, compared with the ordinary osteogenic inducing medium, the osteogenic inducing medium containing 5 ng/mL and 25 ng/mL Wnt3a could significantly increase ALP activity ($P < 0.05$). On the contrary, the medium

*通讯作者: 王亮, Email: wangl309@sina.com

containing 100 ng/mL Wnt3a could significantly inhibit ALP activity ($P < 0.05$). Compared with that in ordinary osteogenic inducing medium, no significant difference of telomerase activity in the osteogenic inducing medium containing Wnt3a was observed. **Conclusion** Lower dose (5ng/mL and 25ng/mL) of Wnt3a molecules can promote the osteogenic differentiation of BMSCs, while higher dose (100 ng/mL) of Wnt3a molecules can inhibit the osteogenic differentiation. The activity of telomerase in BMSCs is weak, and it gradually weakens during the osteogenic differentiation till disappearing. Wnt3a signaling molecules cannot effectively stimulate the activity of telomerase in BMSCs.

Key words: Wnt3a; Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation; Telomerase

骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种易于扩增、具有多种分化潜能的细胞。在成年人的骨骼中,骨髓间充质干细胞主要向成骨细胞和脂肪细胞分化,二者间正常的比例关系对维持骨组织重建与代谢发挥着重要的调控作用。越来越多的研究发现随着年龄的增长骨髓间充质干细胞增殖能力逐渐下降,且其成骨能力降低,而成脂能力升高^[1]。这可能是骨质疏松症的发病机制之一。端粒酶是一种核糖核蛋白酶,能以自身 RNA 为模板,将随机重复序列添加到染色体末端而维持端粒长度,在细胞增殖和分化过程起重要作用^[2]。最近的一项研究证实^[3]: Wnt/ β -catenin 信号通路可调控人胚胎干细胞、一些成体干细胞及癌细胞内端粒酶逆转录酶基因的表达,从而增强这些细胞的端粒酶活性。然而,在骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞的过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路对端粒酶活性的影响,目前还未见相关报道。本文采用方便快捷、准确率高、重复性好的 TRAP-ELISA 端粒酶检测法检测在不同浓度的 wnt3a 干预下诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化过程中端粒酶活性的表达,以期探讨在这一过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路对端粒酶活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级雄 SD 大鼠 6 只,体质量 180 ~ 220 g(北京维通利华实验动物技术有限公司 SCXK 京 2007 - 0001)。低糖培养基(L-DMEM)、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司。重组 wnt3a 蛋白购自 R&D 公司。抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、地塞米松均购自 Sigma 公司。荧光标记兔抗大鼠 CD29-APC、CD44-PE 和 CD45-FITC 单克隆抗体和大鼠同型阴性对照购自美国 BD 公司。TRAP-ELISA 端粒酶活性检测试剂盒购自 R&D 公司。

2 方法

2.1 大鼠 BMSCs 的分离培养

引颈处死 SD 大鼠,用体积分数 75% 乙醇全身浸泡 20 min。无菌条件下取股骨及胫骨,剔除表面附着的肌肉及其他组织,PBS 清洗 5 次,剪去股骨和胫骨的骨骺端,暴露骨髓腔,用 10 mL 注射器抽取 L-DMEM 培养液冲洗骨髓腔至液体变澄清,用微量移液器吹打细胞悬液 5 次,静置 5 min 后吸取上清液,1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用含体积分数 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养液重悬,吹打均匀后以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种到 25 mL 培养瓶中,置 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱中常规培养。3 d 后首次更换培养液。每日观察细胞生长情况,隔 3 d 换液 1 次。待贴壁细胞 80% 融合后用 0.125% 胰酶消化传代。

2.2 大鼠 BMSCs 表型鉴定

取传代培养的第 3 代大鼠 BMSCs 进行流式细胞表型鉴定。吸去培养液,按常规方法消化,洗涤,分成每个 Eppendoff 管 1×10^8 个/L 细胞,重悬于 50 μL PBS 溶液中,并分别加入荧光标记的兔抗大鼠 CD29-APC、CD44-PE 和 CD45-FITC 单克隆抗体各 10 μL ,阴性对照管加同型荧光标记的兔抗大鼠 IgG 各 10 μL ,4 °C 孵育 30 min,PBS 洗涤后用流式细胞仪分析。

2.3 大鼠 BMSCs 成骨诱导分化

取大鼠生长良好的第 3 代 BMSCs 以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种到的 6 孔培养板中。成骨诱导基础培养液组成:L-DMEM 培养液 + 10 mmol/L β -甘油磷酸钠 + 1.0×10^{-7} mol/L 地塞米松 + 50 mg/L 抗坏血酸,共诱导 7 d。实验分组及诱导液组成见表 1。首先加入预诱导剂进行预诱导,过夜,倒掉预诱导液,更换为诱导液进行诱导。诱导 7 d 后终止诱导,检测碱性磷酸酶活性,并于 0、2、4、7 d 检测端粒酶活性。

2.4 碱性磷酸酶活性测定

取第 3 代生长良好的大鼠 BMSCs 以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种到的 6 孔培养板中,置 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,弃原液并将细胞

随机分为 4 组(对照组和 Wnt3a A 组、Wnt3a B 组、Wnt3a C 组),加入对应的成骨诱导培养基(具体成分见表 1),每 2 天换液 1 次。诱导培养 7 d 后,取各组细胞, PBS 漂洗 2 次, 95% 乙醇室温下固定 30 min,按 ALP 检测试剂盒说明书进行染色,光学显微镜观察并照像,用 ipp 图像分析软件进行图像分析,计算各组细胞 ALP 活性。

表 1 实验分组及诱导液组成

Table 1 Grouping in the experiment and the composition of inducing medium

组别 (groups)	预诱导液 (Pre-inducing medium)	诱导液 (inducing medium)
对照组	成骨诱导基础培养液 + 体积分数为 10% FBS	成骨诱导基础培养液
Wnt3a A	成骨诱导基础培养液 + 体积分数为 10% FBS + 5 ng/mL wnt3a	成骨诱导基础培养液 + 5 ng/mL wnt3a
Wnt3a B	成骨诱导基础培养液 + 体积分数为 10% FBS + 25 ng/mL wnt3a	成骨诱导基础培养液 + 25 ng/mL wnt3a
Wnt3a C	成骨诱导基础培养液 + 体积分数为 10% FBS + 100 ng/mL wnt3a	成骨诱导基础培养液 + 100 ng/mL wnt3a

2.5 端粒酶活性检测

分别检测 4 组大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导前及成骨诱导后 2、4、7 d 端粒酶活性。细胞提取物的制备、端粒酶重复序列扩增、杂交及 ELISA 反应均按 TRAP-ELISA 端粒酶检测试剂盒说明书内的方法进行操作。根据试剂盒说明,样品 A 值以 A450 nm ~ A690 nm 值小于 0.1 为端粒酶阴性,大于 0.2 为阳性。以人胚肾细胞系 293 细胞的蛋白提取物作为阳性对照,其 A450 减 A690 的差值应大于 1.5U。阴性对照:将培养的细胞灭活后提取蛋白物于 65 ℃ 培养 10 min 或用 RNA 酶处理,其 A450 与 A690 的差值应小于 0.1。标本的 A450 与 A690 的差值跟阴性对照相比较,其差值大于 0.2 U 则认为是阳性,反之则认为是阴性。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

3 结果

3.1 骨髓间充质干细胞的分离培养

分离培养的骨髓间充质干细胞 24 h 后逐渐贴

壁,多次换液除去其他细胞,48 h 后贴壁细胞明显增多,并开始分裂增殖,细胞呈梭形。

3.2 大鼠 BMSCs 表型鉴定

流式细胞仪检测结果显示:CD29 和 CD44 为阳性表达(其表达量分别为 97.44%、94.94%),CD45 为阴性表达,证明培养的细胞为骨髓间充质干细胞。

3.3 碱性磷酸酶活性检测

成骨诱导培养基联合不同浓度的 wnt3a 诱导大鼠 BMSCs 7 d 后,碱性磷酸酶(ALP)活性检测结果:与普通成骨诱导培养基相比,含有 5 ng/mL 及 25 ng/mL wnt3a 的成骨诱导培养基可显著增加其碱性磷酸酶(ALP)活性($P < 0.05$),而含有 100 ng/mL wnt3a 的成骨诱导培养基则明显抑制其碱性磷酸酶(ALP)活性($P < 0.05$)。见图 1,2。

3.4 骨髓间充质干细胞诱导前后端粒酶的检测结果

骨髓间充质干细胞成骨分化过程中端粒酶检测:分别取 4 组成骨诱导前及成骨诱导后第 2、4、7 d 的骨髓间充质干细胞进行端粒酶活性检测,结果显示,骨髓间充质干细胞未分化前表达低水平端粒酶活性,为阳性对照组的 33.9% ~ 35.1%;诱导分化后的第 2、4d 端粒酶表达呈阳性(A 值为 0.321 ~ 0.912),为阳性对照组的 8.4% ~ 24.7%,第 7 天呈阴性(A 值为 0.068 ~ 0.081),见表 2、图 3。与普通成骨诱导培养基相比,联合诱导培养基诱导骨髓间充质干细胞成骨分化过程中,端粒酶活性的改变无明显的统计学差异。

表 2 骨髓间充质干细胞成骨诱导分化过程中端粒酶检测的 A 值

Table 2 Absorbance (A) value of telomerase during the osteogenic differentiation of BMSCs

组别 (group)	A 值(A value)			
	0 d	2 d	4 d	7 d
对照组	1.324	0.813	0.321	0.068
wnt3a A 组	1.297	0.821	0.386	0.072
wnt3a B 组	1.312	0.894	0.417	0.081
wnt3a C 组	1.278	0.912	0.432	0.075
阳性对照组	3.765	3.678	3.821	3.816
阴性对照组	0.0	0.0	0.0	0.0

4 讨论

骨髓间充质干细胞是一种易于扩增、具有多种分化潜能的干细胞。在正常成年人的骨骼中,骨髓间充质干细胞主要向成骨细胞和脂肪细胞分化,二者间正常的比例关系,对维持骨组织重建与代谢发

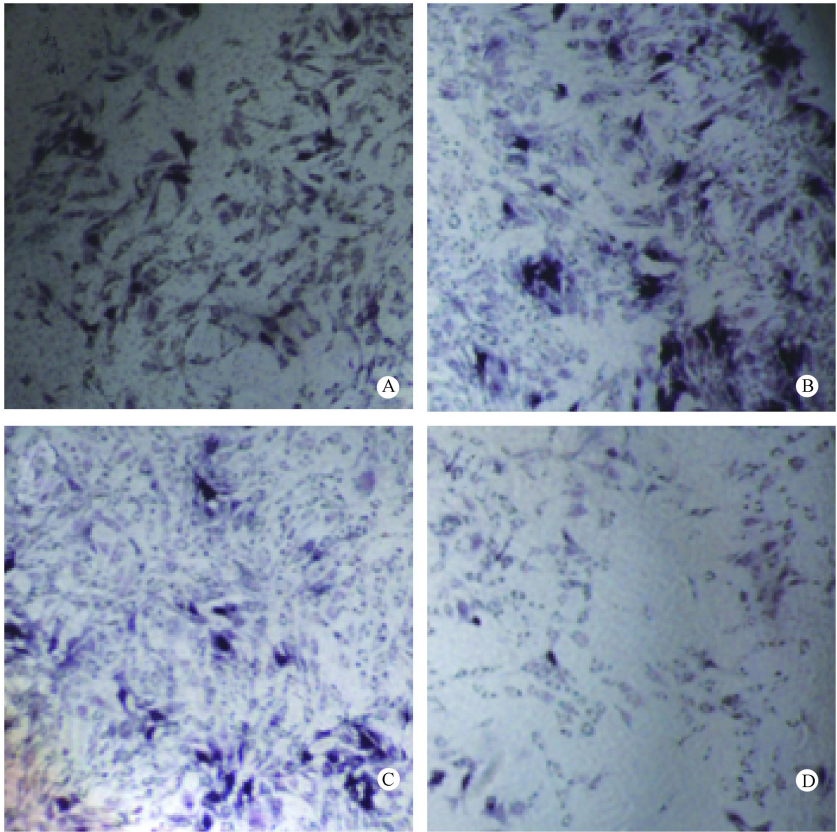


图1 大鼠 BMSCs 成骨诱导 7 d 后 ALP 染色结果:A(对照组)、B(Wnt3a A 组)、C(Wnt3a B 组)、D(Wnt3a C 组)(×100)

Fig.1 The results of ALP staining of rat BMSCs after 7-day osteogenic induction : A (control group) , B (Wnt3a A group) , C (Wnt3a B group) , and D (Wnt3a C group) (×100)

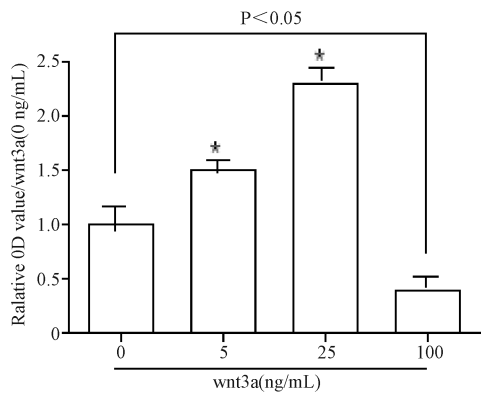


图2 A-D 组间 ALP 活性比较

注:与对照组(wnt3a 0 ng/ml)比较, * $p < 0.05$

Fig.2 Comparison of ALP activity among group A-D

Note: compared with control group, * $P < 0.05$

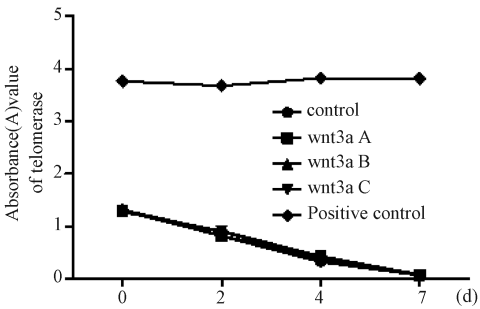


图3 骨髓间充质干细胞成骨诱导分化过程中端粒酶的变化趋势

Fig.3 The changing trend of telomerase activity during the osteogenic differentiation of BMSCs

挥着重要的调控作用。骨髓间充质干细胞的分化方向受多种因素及多个信号途径的调节,这在骨质疏松症的发生机制中具有重要意义。

Wnt 信号在 BMSCs 的分化过程中发挥着重要的调节作用。本实验通过联合成骨诱导培养基与不同浓度的 Wnt3a 诱导方案,研究在 BMSCs 成骨分化的初级阶段(BMSCs 分化至前成骨细胞阶段)不同量的经典 wnt 信号分子对其成骨分化的影响,结果

发现在诱导 7 d 后,含有较小剂量(5 ng/ml 及 25 ng/ml)wnt3a 的成骨诱导培养基可显著增加 BMSCs 碱性磷酸酶(ALP)的表达,且存在剂量相关性,而含有较大剂量(100 ng/ml)wnt3a 的成骨诱导培养基则明显抑制其碱性磷酸酶(ALP)的表达,表明 Wnt3a 对 BMSCs 成骨分化的影响与其剂量有关。

端粒及端粒酶在 BMSCs 分化中的作用越来越引起研究者注意。端粒是真核生物线性染色体的末端,被证实有稳定染色体,保护染色体结构基因,调节细胞分化、活化等多种生物学功能^[4]。这些功能得以发挥是因为端粒酶可以合成端粒 DNA,以维持染色体末端的端粒序列。因此端粒酶在细胞分化中起重要作用。Jae-Il Park^[5]等研究证实,在细胞及活体内端粒酶可作为 β -catenin 转录复合体的协同因子直接调节 Wnt/ β -catenin 信号通路,端粒酶逆转录酶可与 BRG-1 相互作用激活 Wnt 依赖性受体。Katrin Hoffmeyer 等研究显示^[3]:Wnt/ β -catenin 信号通路可通过调控人胚胎干细胞、一些成体干细胞及癌细胞内端粒酶逆转录酶的表达来调控端粒酶活性及端粒长度。由此可见 Wnt/ β -catenin 信号通路与端粒酶活性之间存在相互的作用关系,但这一关系尚未在骨髓间充质细胞内证实。

本实验通过 wnt3a 激活大鼠 BMSCs 经典 wnt 信号通路并将其向成骨相诱导分化,采用 TRAP-ELISA 端粒酶检测法精确定量端粒酶在 BMSCs 成骨分化过程中的动态变化。实验中发现端粒酶在骨髓间充质干细胞成骨分化过程中活性逐渐降低,诱导分化后的第 2、4 d 端粒酶表达呈阳性表达,第 7 d 呈阴性表达,对照组与联合诱导组之间无明显的统计学差异。结果证实 wnt3a 信号分子在大鼠 BMSCs 内并不能通过激活经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路的途径来激活端粒酶活性。这可能与 wnt3a 信号分子的使用剂量有关,Katrin Hoffmeyer 等^[3]使用的

wnt3a 剂量为 150 ng/mL,但是这个剂量则可能完全抑制大鼠 BMSCs 的成骨分化,与本研究的目的相悖。

骨髓间充质干细胞在骨组织疏松的细胞及基因治疗方面有重要的应用前景。如何恢复或促进它的增殖分化活力是目前骨组织工程面临的一大难题,通过一定途径激活 BMSCs 端粒酶活性无疑是一条捷径,但目前这一方法尚不能在体内实现。骨髓间充质干细胞在体内的分化调节受多种因素及信号途径的影响,明确这些因素及信号通路之间相互关系,可为筛选药物及抗骨质疏松机制研究提供有价值的参考方向。本研究即致力于寻找同时影响 BMSCs 增殖分化的经典 wnt 信号通路及端粒酶之间可能存在的相互作用,以探索可在体内实现的促进 BMSCs 定向分化的方法,但是,并没有取得理想的成果。要想系统性地阐释干细胞多向分化的分子机制还有待投入更多的工作。

【 参 考 文 献 】

- [1] Chen Beiyu, Wang Xi, Chen Liang-wei, et al. Molecular targeting regulation of proliferation and differentiation of the bone marrow-derived mesenchymal stem cells or mesenchymal stromal cells. *Current Drug Targets*, 2012, 13(7):561-571.
- [2] Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azham M, et al. Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*, 1995, 220(1):194-200.
- [3] Katrin Hoffmeyer. Wnt/ β -Catenin Signaling Regulates Telomerase in Stem Cells and Cancer Cells. *Science*, 2012, 336(13): 1549-1554.
- [4] Hahn WC. Telomere and telomerase dynamics in human cells. *Curr Med*. 2005, 5(2):227-231.
- [5] Jae-Il Park, Andrew S. Venteicher, Ji Yeon Hong, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*, 2009, 460(12):66-72.

(收稿日期:2013-07-26)

Wnt3a信号分子对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程中端粒酶活性的影响

万方数据
WANFANG DATA 文献链接

作者：

胡江伟

王亮

马远征

张妍

杨帆

杨国花

王文娇

付雪梅

HU Jiangwei

WANG Liang

MA Yuanzheng

ZHANF Yan

YANG Fan

YANG Guohua

WANG Wenjiao

FU Xuemei

作者单位：

解放军第309医院全军骨科中心骨内科, 北京, 100091

刊名：

中国骨质疏松杂志

ISTIC

英文刊名：

Chinese Journal of Osteoporosis

年, 卷(期):

2014(1)

本文链接：

http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201401008.aspx