· 论著 ·

糖皮质激素影响间充质干细胞成骨分化的实验研究

徐莹[1] 田野[2*]
1. 中国医科大学附属盛京医院麻醉科,辽宁 沈阳 110004
2. 中国医科大学附属盛京医院脊柱关节骨科,辽宁 沈阳 110004

中图分类号: R329 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7108(2019) 04-0493-05

摘要:目的 探讨 Notch 信号通路在糖皮质激素影响间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)成骨分化过程中的作用。**方法** 培养 MSCs,给予糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)处理,计算凋亡率,分析细胞凋亡情况;通过 real-time PCR 方法,检测细胞内 Notch 信号通路靶基因 Hes1 和成骨相关基因(ALP,Col1agen1)mRNA 的表达;通过 Western blot 方法检测 Notch 信号通路靶基因 Hes1 和成骨相关基因蛋白的表达;应用茜素红染色,检测细胞内成骨钙化作用。**结果** GCs 处理后,凋亡细胞增加[(80±5.789)vs 对照组(60±7.132),$P<0.05$];MSCs 成骨分化相关基因 ALP、Collagen1mRNA 和蛋白表达明显减低,与对照组相比,$P<0.05$;茜素红染色显示 GCs 组染色强度与对照组相比显著降低($P<0.05$)。同时,Notch 信号通路靶基因 Hes1 表达明显降低(与对照组相比,$P<0.05$),Notch 信号通路表达明显受到抑制。激活 Notch 信号通路,细胞凋亡百分率降低为 72±2.169(与 GCs 组相比,$P<0.05$);成骨分化基因 ALP、Collagen1mRNA 和蛋白表达都较 GCs 组有所提高($P<0.05$);茜素红染色显示 GCs+JAG1 组染色强度与 GCs 组相比明显提高($P<0.05$)。**结论** GCs 通过抑制 Notch 信号通路的表达,进而抑制 MSCs 的成骨分化。

关键词: 糖皮质激素;间充质干细胞;成骨分化;Notch 信号通路

Experimental study of the effect of glucocorticoids on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells

XU Ying,[1], TIAN Ye[2*]
1. Department of Anesthesiology, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004
2. Department of Orthopedic Surgery, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China
* Corresponding author: TIAN Ye, Email: tiany3@sj-hospital.org

Abstract: Objective To investigate the exact role of Notch signaling pathway in the inhibition of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) by glucocorticoids (GCs). **Methods** MSCs were cultured. GCs were added to the medium. Cell apoptosis was determined using multi-mode microplate reader by 530 nm. The mRNA expression of Hes1 and osteoblastic markers (ALP, Collagen 1) was determined by real-time PCR. The protein of Hes1 and osteoblastic markers (ALP, Collagen 1) was determined by Western blot. The mineralization was detected by Alizarin red staining. **Results** After GCs treatment, the number of apoptotic cells was increased [(80±5.789) vs Control (60±7.132), $P<0.05$]. The mRNA and protein of osteogenic markers ALP and Collagen 1 was decreased compared with the control ($P<0.05$). The Alizarin staining density was decreased compared with the control ($P<0.05$). The expression of Notch target gene Hes1 was decreased significantly compared with the control ($P<0.05$) and the expression of Notch signaling pathway was decreased by GCs significantly. After activation of Notch signaling, the number of apoptotic cells was decreased to 72±2.169 (compared with the GCs group, $P<0.05$). The mRNA and protein of osteogenic markers ALP and Collagen 1 was increased compared with the GCs group ($P<0.05$). The Alizarin staining density was increased in GCs+JAG1 group compared with the GCs group ($P<0.05$). **Conclusion** GCs demolish osteogenic differentiation of MSCs via Notch signaling pathway inhibition.

Key words: glucocorticoids; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; Notch signaling pathway

糖皮质激素(glucocorticoids,GCs)是目前许多慢性疾病和自身免疫性疾病治疗的首选药物,如类

* 通信作者:田野,Email:tiany3@sj-hospital.org

风湿性关节炎、结缔组织病、炎性肠道疾病、慢性阻塞性肺炎和哮喘等。调查表明,全世界约有 1%~2%的不同年龄段患者接受长期的 GCs 治疗[1]。其副作用中,糖皮质激素诱发的骨质疏松(glucocorticoid induced osteoporosis, GIO)是继发性骨质疏松的主要原因[2]。由此带来的低应激性骨折,更是给患者带来了巨大的痛苦和负担。虽然 GIO 目前在临床上已被广泛认知,但目前干预措施主要为发病后钙剂、磷酸盐的补充和骨折后的手术治疗,其发生发展具体机制仍不明确。

正常生理状态下,成骨与骨吸收处于平衡中。骨质疏松是多种原因所导致的成骨受到抑制,骨吸收大于骨形成,进而产生骨代谢失衡所致[3-4]。在成骨过程中,骨祖细胞作为骨组织的干细胞,分化为成骨细胞,参与骨代谢稳态的维持[5]。有研究[6]证实,在间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分化成骨细胞的过程中,不仅对成骨细胞的数量进行补充,而且能通过细胞旁分泌的形式分泌内源性生长因子,进一步促进成骨。其分化过程是一个受到多种信号通路与细胞因子调控的复杂过程[7]。

在对 MSCs 成骨分化的调控中,Notch 信号通路已被证实具有明显的促进成骨分化作用[8],但在 GIO 中,Notch 信号通路的作用仍不明确。本研究通过 GCs 对 MSCs 成骨分化的影响入手,明确在 GIO 发生发展中 MSCs 的功能变化,并进一步验证 Notch 信号通路在这种变化中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人 MSCs 细胞系(Lonza Group 公司,美国);MSCGM 培养基(Mesenchymal Stem Cell Growth Medium, Lonza 公司,瑞士);JAG1 重组蛋白(EnzoLife Sciences 公司,美国),Alizarin Red 染色剂(北京索莱宝科技有限公司,中国);anti-Hes1, anti-ALP, anti-Collagen1,(Santa Cruz 公司,美国);RNeasy 试剂盒(Qiagen 公司,美国);逆转录试剂盒(Invitrogen 公司,美国);Apo-ONE homogeneous Caspase-3/7 分析试剂盒(Promeg Biosciences 公司,美国);SYBR Green(Applied Biosystems 公司,美国)。

1.2 细胞培养和分组

将细胞以 5 000 cell/mm^2 的密度接种于 6 孔培养皿的 MSCGM 培养液中,其内加入 10%胎牛血清、1% 青霉素溶液、5 mmol/L 的 L-Glutamine,置于 37 ℃、5% CO_2,6% O_2 的饱和湿度孵育箱中培养,至细胞 70%~80%融合时,分别以生理盐水(对照组)、地塞米松 10^6mol/L(GCs 处理组)、地塞米松 10^6 mol/L+JAG1(Notch 信号通路配体激活,GCs+JAG1 组)处理细胞。于孵育箱内共同培养 48 h。

1.3 检测指标

1.3.1 细胞凋亡分析:收取细胞,通过 Apo-ONE homogeneous Caspase-3/7 分析试剂盒,应用 multi-mode microplate reader 软件,以 530 nm 来测量吸收率,分析细胞凋亡情况。

1.3.2 RNA 提取和 real-time PCR 检测:应用 RNeasy 试剂盒提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,稀释 3 倍后,取 1 μL 稀释后的 cDNA 进行 Real-timePCR 反应。在 95 ℃预变性 15 min,同温度下变性 20 s,在 58 ℃退火 30 s,在 72 ℃条件下延伸 30 s,共计 45 个循环。于延伸阶段检测荧光产物,生成扩增曲线。在每个同次反应中,各组均设 3 个平行重复实验。以 β-actin 为内参基因,通过 PCR 仪 RotorGene 分析软件进行定量分析。特异性引物序列见表 1。

表 1 特异性引物序列

Table 1 Specific primer sequence

	Sense	Antisense
ALP	TGACCTTCTCTCCTCCATCC	CTTCCTGGGAGTCTCATCCT
Collagen1	CCAGTGCCAAGGACACAATC	GCTCGGTTGCCATCGTCCT
Hes1	TTCCTCCTCCCCGGTGGCTG	TGCCCTTCGCCTCTTCTCCA
β-actin	AGATGTGGATCAGCAAGCAG	GCGCAAGTTAGGTTTTGTCA

1.3.3 Western blot 蛋白表达检测:应用 Goldenlysis buffer 液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,每泳道上样 40 μg。应用 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。转膜后应用 5%的脱脂牛奶封闭,并与一抗 4 ℃孵化过夜。一抗分别为 anti-Hes1, anti-ALP, anti-Collagen1(1∶1 000, Santa Cruz. Cambridge, MA, USA)。次日 PVDF 膜在室温下与二抗(中杉金桥,中国)孵化 2 h。应用显影液(赛默飞世尔科技,美国)使蛋白条带显影。使用 Image Quant 5.0 软件对

蛋白条带进行密度分析。通过应用 β-actin 作为内参来控制实验误差。

1.3.4 茜素红染色:培养 48 h 后除去细胞培养液,蒸馏水清洗 3 次;10%中性甲醛 4 ℃条件下固定细胞 20 min;吸除甲醛,蒸馏水清洗 3 次;加入 Alizarin Red 染色剂,于室温下染色 30 min;吸除染色剂,蒸馏水清洗 3 次;加入乙醇脱水,室温下自然干燥过夜。显微镜下观察,照相。

1.4 统计学分析

全部计量数据以均数±标准差表示,并按照 SNK 法进行单因素方差分析(ANOVA),各组间比较采用 t 检验;当 $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。所有数据应用 SPSS 17.0 软件进行分析。

2 结果

2.1 GCs 处理对 MSCs 凋亡的影响。

在 GCs 处理后 48 h,通过应用 multi-mode microplate reader 软件,以 530 nm 波长吸收率计数 Caspase-3/7 阳性的细胞,计算凋亡细胞百分率。笔者发现,与对照组相比,GCs 处理组凋亡细胞百分率明显增加[(80±5.789)vs 对照组(60±7.132),$P<0.05$];而 GCs+JAG1 组则部分减少了凋亡细胞百分率(72±2.169),与 GCs 组相比,$P<0.05$;与对照组相比,$P<0.05$,见图 1。

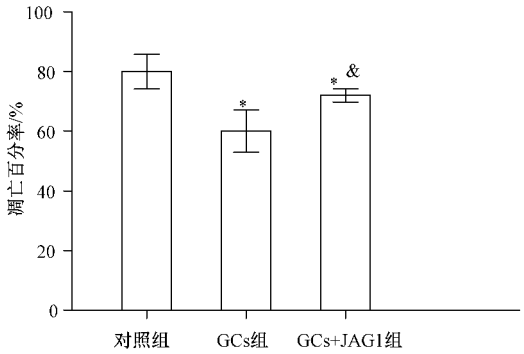

图 1 GCs 处理对 MSCs 凋亡的影响(与对照组比较,* $P<0.05$;与 GCs 组比较,& $P<0.05$)

Fig.1 Effects of GCs on MSCs apoptosis (vs control group, * $P<0.05$; vs GCs group, & $P<0.05$)

2.2 GCs 处理对 MSCs 中 Notch 信号通路表达的影响

通过对各组 MSCs 的 Hes1mRNA 的 RT-PCR 检测,与对照组相比,GCs 处理组 Hes1mRNA 明显降低($P<0.05$),JAG1 的给予逆转了 Hes1mRNA 的下降(与 GCs 组相比,$P<0.05$;与对照组相比,$P>0.05$);通过 Western blot 检测 Hes1 蛋白表达,与 RT-PCR 结果一致(见图 2a,图 2b)。

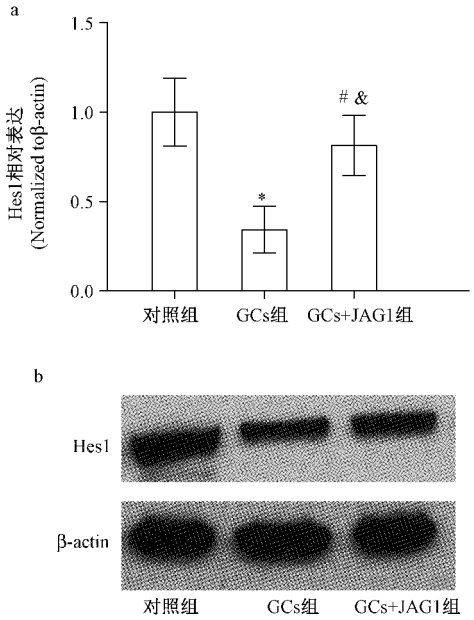

图 2 GCs 处理对 MSCs 中 Notch 信号通路的影响(与对照组相比,* $P<0.05$;与 GCs 组相比,& $P<0.05$;与对照组相比,# $P>0.05$)

Fig.2 Effects of GCs on Notch signaling in MSCs (vs control group, * $P<0.05$; vs GCs group, & $P<0.05$; vs control group, # $P>0.05$)

2.3 GCs 处理对 MSCs 成骨分化的影响

在对各组 MSCs 成骨相关的指标 ALP、Collagen1 的 RT-PCR 和 Western blot 检测中,发现 GCs 处理组 ALP、Collagen1 的 mRNA 明显降低,蛋白表达也同步下降,与对照组相比,$P<0.05$;在 GCs+JAG1 组,逆转了上述下降(与 GCs 组相比,$P<0.05$;与对照组相比,$P>0.05$),见图 3a~图 3c。在茜素红染色的实验中,与对照组相比,GCs 处理组染色明显减弱($P<0.05$),GCs+JAG1 组染色强度得到明显改善(与 GCs 组相比,$P<0.05$;与对照组相比,$P>0.05$),见图 4。

3 讨论

糖皮质激素诱导的骨质疏松(GIO)是长期或大剂量应用 GCs 而产生的骨骼系统并发症,是继发性骨质疏松的主要原因[2,9]。已有研究[10]证实,骨质疏松发生的主要机制为骨代谢障碍,而 GIO 的具体发生发展机制目前仍不明确。本研究从 GCs 对成骨方面的影响入手,探讨由此而产生的骨代谢失衡,及 GIO 的发病机制。

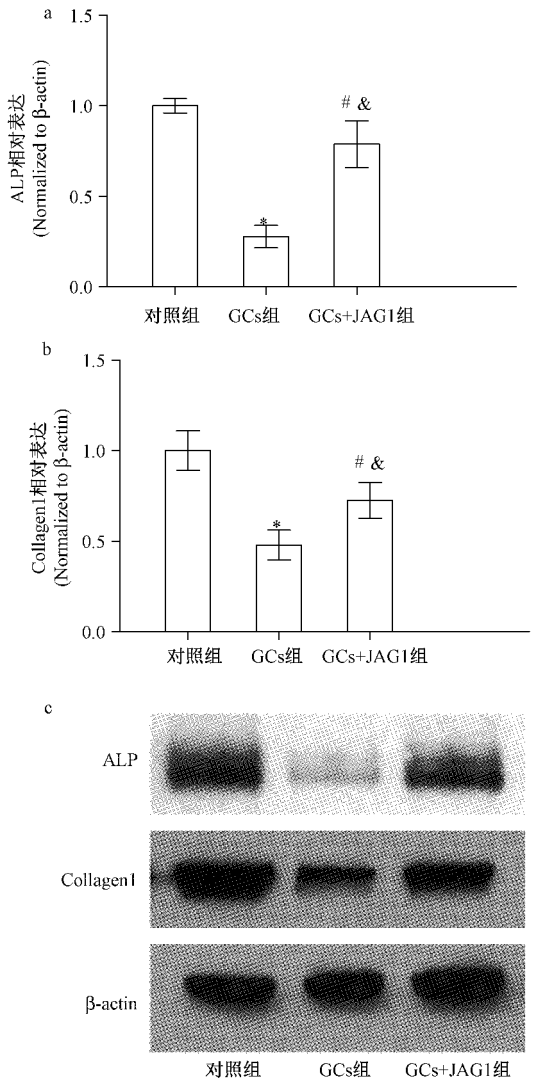

图 3 GCs 处理对 MSCs 成骨分化的影响(与对照组相比,$^{*}P<0.05$;与 GCs 组相比,$^{\&}P<0.05$;与对照组相比,$^{\#}P>0.05$)

Fig. 3 Effects of GCs on MSCs osteogenic differentiation (vs control group, $^{*}P<0.05$; vs GCs group, $^{\&}P<0.05$; vs control group, $^{\#}P>0.05$)

已有研究[6]证实,在骨代谢和骨重建的过程中,MSCs 作为成骨细胞的重要来源,同时在骨组织局部通过细胞旁分泌方式释放生长因子,促进成骨。在本实验中,GCs 对 MSCs 的成骨分化标志基因 ALP 和 Collagen1 的 mRNA 与蛋白水平表达,都具有明显的抑制作用,而且增加了 MSCs 的凋亡,表明 GCs 对细胞成骨分化具有明显的抑制作用。对于 GCs 体外应用浓度的选择上,笔者选择了 10^{6} mmol/L 的地塞米松,这是基于对前期研究和文献的查阅[11],相当于摄入 5 mg/kg GCs(临床常用的治疗量)后的体内血药浓度。

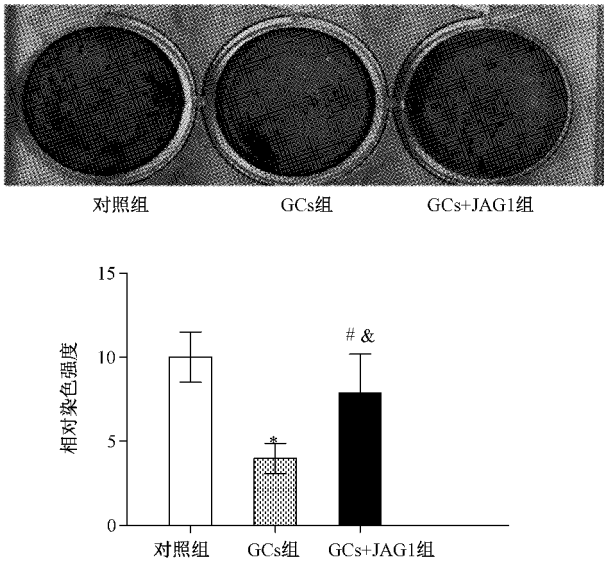

图 4 GCs 处理对 MSCs 茜素红染色的影响(与对照组相比,$^{*}P<0.05$;与 GCs 组相比,$^{\&}P<0.05$;与对照组相比,$^{\#}P>0.05$)

Fig.4 Effects of GCs on Alizarin staining in MSCs (vs control group, $^{*}P<0.05$; vs GCs group, $^{\&}P<0.05$; vs control group, $^{\#}P>0.05$)

体内 MSCs 的成骨分化是一个由多种机制共同调节的复杂过程。Notch 信号通路近年来被证实广泛参与体内骨骼系统的成骨和血管生发过程,是 MSCs 成骨分化调控的重要机制。有研究[12]发现在 Notch 受体和配体突变的小鼠模型中,骨内发生异常的血管构建,骨生发减少,软骨细胞异常,骨小梁减少和骨量缺失,已经发现,在 JAG1 涂层的培养皿中培养的 MSCs 中,细胞内 ALP 等成骨标志性基因表达显著增强;当沉默 Notch 信号通路时,细胞内成骨相关基因表达减弱[13]。在本次实验中,就 GCs 对 MSCs 中 Notch 信号通路的表达的影响进行了验证,发现 GCs 对其具有明显的抑制作用,这种抑制作用通过补充 Notch 信号通路配体 JAG1 而得到逆转。并且,MSCs 的成骨分化也因 Notch 信号系统的激活,得到一定程度的增强,提示 Notch 信号通路是 GIO 发生发展的潜在机制之一。

综上所述,本研究证实 GCs 能够增加 MSCs 的凋亡,并抑制其成骨分化,其机制与 GCs 抑制 MSCs 中的 Notch 信号通路表达有关。对 MSCs 中 Notch 信号通路的进一步研究将为 GIO 的干预治疗提供新的靶点和思路。

(下转第 505 页)

质疏松压缩性骨折治疗中的临床应用研究[J].中国骨质疏松杂志, 2013, 19(7).718-720.

[5] 万成福,于雪,宋涛. 胸脊神经射频热凝治疗胸椎压缩骨折后肋间神经痛的临床观察[J]. 中国医师杂志, 2016, 18(6): 888-889.

[6] 刘明莹,孙忠人,张秦宏.浮针治疗痛证研究进展[J].辽宁中医杂志, 2014, 41(1): 182-183.

[7] 中华医学会骨科学分会骨质疏松学组,骨质疏松性骨折诊疗指南[J].中华骨科杂志, 2017,37(1): 1-10.

[8] Roland M, Fairbank J, The Roland-Morris Disability Questionnaire and the Oswestry Disability Questionnaire [J]. Spine, 2000, 25(24): 3115-3124.

[9] Huskisson EC. Measurement of pain [J]. Lancet, 1974, 2 (7889): 1127-1131.

[10] Cauley JA. Osteoporosis: fracture epidemiology update 2016[J]. Curr Opin Rheumatol, 2017. 29(2): 150-156.

[11] 陈世忠, 刘永皑,王耿.经皮穿刺椎体成形术治疗胸椎压缩骨折并胁肋疼痛[J]. 中医正骨, 2010, 22(8): 43-44.

[12] 任广军,仇发美,苏晋,等. 经皮单侧椎体成形术治疗骨质疏松性椎体严重骨折并肋间神经痛[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(15): 4369-4370.

[13] O´Connor RC, Andary MT, Russo RB, et al., Thoracic radiculopathy[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2002, 13(3): 623-644.

[14] Kraan GA, Hoogland PV, Wuisman PI. Extra foraminal ligament attachments of the thoracic spinal nerves in humans[J]. Eur Spine J, 2009, 18(4): 490-498.

[15] Jinkins JR, Whittemore AR, Bradley WG. The anatomic basis of vertebrogenic pain and the autonomic syndrome associated with lumbar disk extrusion[J]. AJR Am J Roentgenol, 1989, 152 (6): 1277-1289.

[16] 李卓洲, 李其虎,卢文.小针刀联合整脊治疗胸腰椎压缩性骨折术后疼痛[J]. 颈腰痛杂志, 2018,39(1): 119-120.

[17] 杨江霞,符仲华.浅析浮针的理论与临床研究[J].西部中医药, 2015,28(6): 156-158.

[18] 范刚启,符仲华,曹树平,等. 浮针疗法及其对针灸学发展的启示[J].中国针灸, 2005,25(10): 733-736.

[19] 邓亚典, 杨勇,陈曦. 补阳还五汤口服联合浮针疗法治疗腰椎间盘突出症椎间孔镜术后残余神经症状[J]. 中医正骨, 2017,29(10): 64-65,68.

(收稿日期: 2018-09-16;修回日期: 2018-10-25)

(上接第 496 页)

【参 考 文 献】

[1] Overman RA, Yeh JY, Deal CL. Prevalence of oral glucocorticoid usage in the United States: a general population perspective[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2013, 65(2): 294-298.

[2] Compston J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update[J]. Endocrine, 2018, 61(1): 7-16.

[3] Anic B, Mayer M. Glucocorticoid induced osteoporosis [J]. Reumatizam, 2014, 61(2): 105-112.

[4] 田野,徐莹,付勤. 不同剂量的甲状旁腺素对成骨细胞分化的不同作用的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20 (6): 614-617.

[5] Salehi-Nik N, Rezai Rad M. Buccal fat pad as a potential source of stem cells for bone regeneration: a literature review[J]. Stem Cell Int, 2017, 2017: 8354640.

[6] Lassaletta AD, Elmadhun NY, Burgess TA, et al. Microvascular notch signaling is up-regulated in response to vascular endothelial growth factor and chronic myocardial ischemia[J]. Circ J, 2014, 78(3): 743-751.

[7] Stegen S, Carmeliet G. The skeletal vascular system - Breathing life into bone tissue[J]. Bone, 2017, 115: 50-58.

[8] Liu P, Ping Y, Ma M, et al. Anabolic actions of Notch on mature bone[J]. Pro Natl Acad Sci USA, 2016, 113(15): 2152-2161.

[9] Amiche MA, Albaum JM, Tadrous M, et al. Fracture risk in oral glucocorticoid users: a Bayesian meta-regression leveraging control arms of osteoporosis clinical trials[J]. Osteoporos Int, 2016, 27(5): 1709-1718.

[10] Shen G, Ren H, Shang Q, et al. Autophagy as a target for glucocorticoid-induced osteoporosis therapy[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(15): 2683-2693.

[11] Wang L, Fan J, Lin YS, et al. Glucocorticoids induce autophagy in rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(4): 2711-2716.

[12] Wahi K, Bochter MS, Cole SE. The many roles of Notch signaling during vertebrate somitogenesis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2016, 49: 68-75.

[13] Tian Y, Xu Y, Xue TY, et al. Notch activation enhances mesenchymal stem cell sheet osteogenic potential by inhibition of cellular senescence[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(2): e2595.

(收稿日期: 2018-06-09;修回日期: 2018-07-08)