

· 论著 ·

辛伐他汀对 BMSCs 成骨分化过程中 WNT 信号通路早期 WNT3 的影响

贾忠宝^{1*} 崔纳² 尹丹丹³ 田发明⁴ 张柳⁵

1.北京市丰台区南苑医院骨外科,北京 100076

2.北京市丰台区南苑医院功能科,北京 100076

3.山东省潍坊市人民医院病理科,山东 潍坊 261599

4.华北理工大学附属医院医学实验中心,河北 唐山 063000

5.华北理工大学附属医院骨外科,河北 唐山 063000

中图分类号: R364.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 07-0929-04

摘要: **目的** 进一步研究辛伐他汀(simvastatin, SIM)体外给药对 SD 大鼠骨髓基质干细胞在向成骨细胞分化过程中 WNT 信号通路早期 WNT3 表达的影响,进一步探讨辛伐他汀在 WNT 信号通路的作用及其作用机制。**方法** 10 只 4 周龄雌性 SD 大鼠,颈椎脱位法处死后取股骨骨髓细胞和胫骨骨髓细胞向成骨方向诱导培养。应用培养的第二代细胞随机分为实验组及对照组。实验组加入 10^{-7} mol/L 的 SIM(先应用培养基稀释 SIM 溶于 DMSO 后制成的母液),对照组加入含有相同量的 DMSO 培养基。两组细胞在加入 SIM 12 h 和 36 h 后分别提取 RNA 和蛋白质,采用实时定量-PCR 法检测 WNT3 mRNA 的表达,采用 Western blot 法检测两组细胞 WNT3 蛋白的表达。**结果** (1)实时定量-PCR 结果:SIM 干预 12 h 后 WNT3 mRNA 的表达水平实验组与对照组相比表达增高,两组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。SIM 干预 36 h 后 WNT3 mRNA 的表达水平实验组与对照组相比表达增高,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。(2)Western blot 结果:SIM 干预 12 h 及 36 h 后 WNT3 蛋白表达水平实验组与对照组相比无显著增高,两组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 辛伐他汀在促进骨髓基质干细胞成骨细胞分化的早期发挥了作用,这其中涉及到 Wnt 信号通路的活化,但是在不同的时间点所起作用有所不同。

关键词: 辛伐他汀;骨髓基质干细胞;WNT 信号通路;WNT3;动物实验

Effects of simvastatin on WNT3 of WNT signal pathway in the early process of osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells of rats

JIA Zhongbao^{1*}, CUI Na², YIN Dandan³, TIAN Faming⁴, ZHANG Liu⁵

1. Department of Orthopaedic Surgery, Nanyuan Hospital of Fengtai, Beijing 100076

2. Department of Functional Section, Nanyuan Hospital of Fengtai, Beijing 100076

3. Department of Pathology, People's Hospital of Weifang, Weifang 261599

4. Department of Laboratory, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000

5. Department of Orthopaedic Surgery, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China

* Corresponding author: JIA Zhongbao, Email: beixigaoyuan@163.com

Abstract: Objective To research the effects of simvastatin on WNT3 of WNT signal pathway in the early process of osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) of SD rats in vitro, to further study the role of simvastatin in the signal pathway of WNT and to further clarify the mechanism. **Methods** Ten 4-week-old female Sprague-Dawley rats were killed by cervical dislocation. The bilateral femur and tibia bone marrow cells were obtain under sterile conditions, which were then cultured in vitro. Two groups were established: experimental and control groups. After two passage, all the cells were treated with osteogenic inductive DMEM and experimental group were added 10^{-7} mol/L SIM at the same time. Two groups were respectively extracted

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2006000580)

* 通信作者: 贾忠宝, Email: beixigaoyuan@163.com

protein and RNA after 12 h and 36 h. Real-time RT-PCR was performed for evaluating the expression level of WNT3 mRNA. Western Blot was performed for evaluating the expression level of WNT3 protein. **Results** (1) The result of real time-PCR: After 12 h treatment of SIM; the expression level of mRNA of WNT3 was significantly higher in the experimental group compared to the control group ($P<0.01$). After 36 h treatment of SIM; the expression level of mRNA of WNT3 was significantly higher in the experimental group compared to the control group ($P<0.05$). (2) The result of Western Blot: After 12 h and 36 h treatment of SIM; the expression level of WNT3 protein was not significantly higher in the experimental group compared to the control group ($P>0.05$). **Conclusion** There are some effects of simvastatin on osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) of SD rats in vitro. This involves the activation of the WNT signaling pathway, but the role at different time points was different.

Key words: simvastatin; bone marrow stromal cells; WNT signaling pathway; WNT3; animal experimentation

多项研究证实,骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)在不同诱导条件下具有多向分化潜能比如成骨细胞等分化^[1]。多种因素及因子调控了 BMSCs 的分化潜能,在这其中不同特异性标志物表达水平也有不同的改变,如因子 WNT3、 β -catenin 及 Runx2、ALP、I 型胶原等。经典而又十分保守的 Wnt 信号传导通路的主要有配体(Wnt 家族分子)、跨膜受体(Frizzled 家族分子和 LRP-5/6)、胞浆调节蛋白(Dsh、 β -catenin、APC、Axin、GSK-3 β 等)以及核内转录因子(TCF/LEF1 家族)等组成。

Wnt 信号通路增加骨量是通过不同的机制来实现,研究发现在调控骨形成发育、生长及骨量增加过程中,经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路以时空形式发挥着重要作用^[2-3]。BMSCs 向成骨细胞、软骨细胞及脂肪细胞的不同分化结果主要是因为细胞分化的不同阶段、时期,Wnt/ β -catenin 信号通路在多种调节机制下发挥了不同的作用。

研究发现,具有多条密切相关的信号传导通路参与至 BMSCs 向成骨细胞复杂的分化过程中,既往研究多侧重于转化生长因子信号传导途径^[4],新的研究证实在成骨细胞的分化及骨折的愈合过程中 Wnt 经典信号传导途径至关重要^[5-6]。而 Wnt 蛋白将信号传入细胞内必须要与 frizzled 受体结合。这条 Wnt/ β -catenin 途径称为“经典途径”^[7]。Wnt 信号通路激活时,GSK-3 β 被募集并磷酸化 LRP6,而不能磷酸化 β -catenin 从而避免被其降解;但在 Wnt 信号未激活时,GSK-3 β 则磷酸化 β -catenin,并促使其降解。

辛伐他汀在 SD 大鼠骨髓基质干细胞在 WNT 信号通路调节下向成骨细胞分化过程中早期的作用如何,相关的研究文章国内外较少报道发表。辛伐他汀早期干预可以促进骨髓基质干细胞成骨细胞分化过程中骨钙素水平的增高^[8]。可本研究采用在第二代细胞中给药的方法在早期分别提取 RNA 和蛋白来分析骨髓基质干细胞定向诱导分化为成骨细

胞培养过程中辛伐他汀所发挥的作用及对 Wnt 信号通路的影响,以进一步探讨促进骨形成的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物:4 周龄雌性 SD 大鼠 10 只(北京大学提供 SPF 级,合格证号 SCXK(京)2006-0 008 号)。10 只 SD 大鼠均安实验要求单笼适应环境饲养 1 周。

1.1.2 试剂和仪器:由 Sigma 公司购买 DMEM 培养基、辛伐他汀、维生素 C、 β -甘油磷酸钠、氯化可的松及血清。由大连宝生物公司购买 Realtime PCR 试剂盒及 Trizol (Invitrogen),引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 提取及体外培养骨髓基质干细胞:取 4 周龄 SD 大鼠的股骨和胫骨。收集由培养基冲洗出来的骨髓细胞于离心管中,以 1 000 r/min 的速度离心 10 min,弃上清,应用完全 DMEM 培养液重悬吹打后每只大鼠的细胞接种于一个培养瓶中,拧松瓶口并在 37 °C 恒温箱中以含有 50 mL/L(体积分数)的二氧化碳环境下培养 2 d 后换液,后期视情况每间隔 2~3 d 更换一次培养液。待细胞贴壁并增殖至培养瓶底的 4/5 后加入诱导培养基,待细胞增殖融汇成致密单层后再传代接种于新的培养瓶。

1.2.2 分组与加药:在第二代细胞第一次换液时取生长良好的细胞更换诱导培养基并随机分组,分为对照组(G1)和实验组(G2)。G2 加入诱导培养基(含有 1×10^{-7} mol/L SIM),对照组加入含有等量 DMSO 的培养基。以后视细胞生长情况间隔 2~3 d 全量换液,每次换液均要求实验组加入含有辛伐他汀的诱导培养基,G1 加空白完全培养,分别在 12 h 和 36 h,提取总 RNA 和蛋白质。

1.2.3 Real-time RT-PCR:选取第二代细胞在经诱导分化 12 h 和 36 h 后两组分别提取细胞总 RNA,定量后经过反转录合成第一链 cDNA 进行 PCR 反

应,同批扩增待测基因与内参基因(β -actin),采用溶解曲线法进而来鉴定扩增产物的特异性和片段大小,应用梯度稀释内参基因法制定相对标准曲线。PCR 反应体系的总体积为 25 μ L,其中上下游引物各 0.5 μ L、12.5 μ L 的 STBR® Premix Ex Tap™,2

μ L 的 DNA 模板及 dH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件:在经过 95 $^{\circ}$ C 30 s、95 $^{\circ}$ C 5 s、60 $^{\circ}$ C 30 s,共计 40 个循环。对 RT-PCR 结果进行半定量分析。查出 WNT3 的 cDNA 全长序列后应用软件 Primer 5.0 设计因子的引物并由 Invitrogen 公司合成。详见表 1。

表 1 WNT3 及 β -actin 引物序列

Table 1 List of PCR primers

基因	引物序列	产物长度
WNT3	上游(fwd):5'-TGGATACAGCAGGTTGGCAGGAA-3'	205 bp
	下游(rvs):5'-TTGTGAGGACTTGAGCAGAACGGAT-3'	
β -actin	上游(fwd):5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'	201 bp
	下游(rvs):5'-TTCACCACCATGGAGAAGGG-3'	

1.2.4 Weten blot:选取第二代骨髓基质干细胞在经诱导培养后用辛伐他汀干扰 12 h 和 36 h,两组细胞分别提取总蛋白,以 50 μ g/孔的标准上样行凝胶电泳进行蛋白分离;分离后将蛋白转移至 PVDF 膜于 BSA 中在室温环境下封闭 2 h,将膜与一抗 WNT3 (1:200)及内参 β -actin (1:1500) 在 4 $^{\circ}$ C 环境中孵育过夜。第 2 天加入经过碱性磷酸酶标记的二抗 (1:1000 稀释),改为在 37 $^{\circ}$ C 环境下孵育 2 h, TBST 缓冲液冲洗 3 次后用 BCIP/NBT 进行显色。结果通过 Image J 图像分析软件进行扫描测定图像灰度,得出目的及内参蛋白的光密度比值,即为目的蛋白表达水平的半定量指标。

1.3 统计学处理

实验结果通过均值 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析, $P<0.05$ 表示

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长状态观察

SD 大鼠骨髓细胞中有大量悬浮细胞在第 1 次换液时会被丢弃,而在沉淀细胞中可见到单核细胞,呈现典型成纤维细胞样生长以梭型或多边型为主。细胞融汇瓶底至 9/10 大概需要 10 d 左右。

2.2 Real time RT-PCR 结果

实验组与对照组两组细胞分别经诱导培养及诱导培养加用辛伐他汀干预 12 h 后,Real Time-PCR 分析,实验组因子 WNT3 mRNA 比对照组的表达水平增高,两组差异有统计学意义($P<0.01$)。经过 36 h 后,两组间因子 WNT3 mRNA 的表达水平差异有统计学意义($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 Real Time-PCR 测定 WNT3 Mrna

Table 2 Real Time-PCR evaluation of WNT3 mRNA

时间	Ct(WNT3)	Ct(β -actin)	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
12 h					
	对照组	29.67 $\pm$ 0.32	20.69 $\pm$ 0.45	8.99 $\pm$ 0.32	0.00 $\pm$ 0.32
	实验组	30.10 $\pm$ 0.33	19.50 $\pm$ 0.48	10.59 $\pm$ 0.34	1.61 $\pm$ 0.18 $^{\Delta\Delta}$
36 h					
	对照组	30.13 $\pm$ 0.49	20.30 $\pm$ 0.46	9.83 $\pm$ 0.49	0.00 $\pm$ 0.49
	实验组	30.59 $\pm$ 0.51	20.44 $\pm$ 0.42	10.15 $\pm$ 0.51	0.32 $\pm$ 0.48 $^{\Delta}$

注:实验组与对照组相比, $^{\Delta\Delta}P<0.01$; $^{\Delta}P<0.05$ 。

2.3 Western blot

两组细胞在经诱导培养及加用辛伐他汀干预 12 h 后,因子 WNT3 的蛋白表达水平变化不大。36 h 后 WNT3 蛋白表达水平实验组高于对照组,但是两组间的差异无统计学意义($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 WNT3 蛋白的表达

Table 3 The expression level of WNT3 protein

时间	OD(β -catenin/ β -actin)
12 h	
	对照组 8.0836 $\pm$ 0.2364
	实验组 7.3270 $\pm$ 0.8467 $^{\Delta}$
36 h	
	对照组 4.5719 $\pm$ 0.2816
	实验组 4.8648 $\pm$ 0.1952 $^{\Delta}$

注:实验组与对照组相比, $^{\Delta}P>0.05$ 。

3 讨论

通过本实验发现,体外短期应用辛伐他汀干预 BMSCs 12 h 及 36 h 后对其 WNT 信号通路主要相关因子在骨髓基质干细胞成骨分化早期有一定作用。

骨髓基质干细胞的多向分化潜能有多项研究中已有所发现,比如在诱导剂诱导下能够使 BMSCs 向成骨细胞分化。同时, BMSCs 也可向软骨细胞分化^[9]。不过在 BMSCs 向成骨细胞定向分化过程中参与的信号通路较多,其中主要的 WNT 信号通路相关因子参与调控并发挥重要作用^[10-11]。

不论在骨组织工程学还是在骨折愈合及骨质疏松治疗学方面都具有重要价值的成骨细胞,如何使骨髓基质干细胞定向分化有着重要的研究价值。Wnt 信号通路在 MSCs 体外分化所起的作用随仍存在争议,但大部分研究证实了其积极作用。而早期阶段的作用及其机制鲜有报道。有研究表明,在 BMSCs 向成骨细胞分化过程中经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥积极作用^[12-13],而有的研究结果与之不一致而相冲突^[14]。有的研究发现通过别的通路也能达到促进成骨细胞分化的作用^[15]。尽管目前存有争议,但是都能一致认可 BMSCs 强大的成骨潜能,研究者认为 BMSCs 也参与了骨修复愈合过程,成为增加骨量、修复骨损伤最有前途的干细胞之一。

有关辛伐他汀在成骨分化早期所发挥作用的报道较少,涉及 WNT 信号通路早期的也鲜有报道。辛伐他汀在早期干预能促进骨髓基质干细胞向成骨细胞分化^[16-17]。刘昊等^[18]的研究也证实了这种分化潜能。通过本实验,两组间在辛伐他汀干预 12 h 及 36 h 后, WNT 信号通路主要因子 WNT3 mRNA 表达水平实验组与对照组相比明显升高,而蛋白表达水平两组间未见明显差异。

本研究发现,经过辛伐他汀干预对 SD 大鼠骨髓基质干细胞的成骨分化有一定促进作用,涉及其中的重要信号通路主要因子的表达 mRNA 及蛋白并不一致,可能与观察时限有关,也可能有其他因素参与其中,其具体调节机制及其与其他不同因子或不同通路之间相互间作用有待进一步证实。

【参 考 文 献】

[1] Novitsky VA, Khlusov IA, Ryazantseva NV, et al. Structural and functional state of the bone marrow during its in vitro interaction with ferromagnetic nanoparticles[J]. Bull Exp Biol Med, 2011, 151(4): 473-476.

- [2] Case N, Rubin J. Beta-catenin-a supporting role in the skeleton[J]. Cell Biochem, 2010, 110(3): 545-553.
- [3] Shahnazari M, Yao W, Corr M, et al. Targeting the Wnt signaling pathway to augment bone formation[J]. Curr Osteoporos Rep, 2008, 6(41): 142-148.
- [4] Wong RW, Rabie AB. Statin-induced osteogenesis uses in orthodontics: a scientific review[J]. World J Orthod, 2006, 7(1): 35-40.
- [5] 张磊, 张柳, 田发明, 等. 辛伐他汀对人鼠 BMSCs 成骨诱导 Wnt 信号传导通路相关因子 mRNA 表达的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(11): 1371-1375.
- [6] Id Boufker H, Lagneaux L, Fayyad-Kazan H, et al. Role of farnesoid X receptor (FXR) in the process of differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts[J]. Bone, 2011, 49(6): 1219-1231.
- [7] 王月, 吕志伟, 张天宇, 等. 辛伐他汀对骨髓基质干细胞成骨分化晚期骨钙素表达的影响[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2014, 17(7): 1135-1137.
- [8] Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation[J]. Bone, 2004, 34: 609-618.
- [9] Zheng J, Zhang L, Yao SS. Simvastatin on osteoblastic differentiation in bone marrow stromal cells of rats by simvastatin administration[J]. Chin J Osteoporos, 2006, 12(3): 278-282.
- [10] Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells [J]. Hum Gene Ther, 2010, 21: 1226-1238.
- [11] O'Shea PJ, Kim DW, Logan JG, et al. Advanced bone formation in mice with a dominant-negative mutation in the thyroid hormone receptor β gene due to activation of Wnt/ β -catenin protein signaling[J]. J Biol Chem, 2012, 287(21): 17812-17822.
- [12] Yao SS, Zhang L, Zheng J. Effect of simvastatin on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells in rats [J]. J Fourth MilMed Univ, 2006, 27(17): 1609-1612.
- [13] Boland GM, Perkins G, Hall DJ, et al. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells [J]. Cell Biochem, 2004, 93: 1210-1230.
- [14] Secreto FJ, Hoepfner LH, Westendorf JJ. Wnt signaling during fracture repair [J]. Curr Osteoporos Rep, 2009, 7: 64-69.
- [15] 刘佳寅, 刘光源, 田发明, 等. 辛伐他汀通过 p38MAPK 信号通路诱导 BMSCs 成骨分化的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(2): 125-130.
- [16] 贾忠宝, 田发明, 崔纳, 等. 辛伐他汀对 BMSCs 成骨分化早期 β -catenin 及 Runx2 表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(12): 1237-1240.
- [17] 张克忠, 刘光源, 田发明. 辛伐他汀经 p38 MAPK 信号通路调控 BMSCs 中晚期成骨分化的研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2016, 30(8): 1038-1043.
- [18] 刘昊, 张岩, 刘家寅, 等. 辛伐他汀对骨髓基质干细胞特异性成骨分化基因表达的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(19): 2777-2782.

(收稿日期: 2018-07-03; 修回日期: 2018-07-31)