

· 论 著 ·

sox-9 通过 Wnt3a/ β -catenin 通路促进大鼠骨髓间充质干细胞分化

樊薰勤¹ 张明勇¹ 李雯婷¹ 钱雪丰¹ 徐宁路¹ 王勇¹ 曹平¹ 张杰² 郭奉斌¹ 赵志强¹ 郑金鹏¹
刘盾¹ 刘拴^{1*}

1. 武汉科技大学附属天佑医院骨科, 湖北 武汉 430064

2. 武汉科技大学附属天佑医院放射介入科, 湖北 武汉 430064

中图分类号: R681.3;R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 08-1169-05

摘要: **目的** 探讨 sox-9 对骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖能力和分化能力的影响。**方法** 分离并鉴定 BMSCs, 对细胞进行 sox-9 过表达和敲降处理。将细胞分为对照组、过表达对照组、干扰对照组、sox-9 过表达组、sox-9 干扰组。CCK8 法检测细胞增殖活性;免疫组化观察细胞的Ⅱ型胶原蛋白(Collage II)和聚蛋白聚糖(Aggrekan)表达水平;Western blot 检测细胞 sox-9、Wnt3a、 β -连环蛋白(β -catenin)表达水平。**结果** 各组细胞增殖能力无显著差异($P>0.05$);sox-9 过表达组的 Collage II 和 Aggrekan 表达显著升高,而 Wnt3a 和 β -catenin 的表达显著降低($P<0.05$)。**结论** sox-9 可能是调控间质干细胞向软骨细胞分化能力的关键因子,通过抑制 Wnt3a/ β -catenin 信号途径,促进其向软骨细胞分化。**关键词:** 骨髓间充质干细胞;Wnt3a/ β -catenin;sox-9;软骨分化能力;大鼠

Sox-9 promotes differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells by inhibiting Wnt3a/ β -catenin pathway

FAN Xunqin¹, ZHANG Mingyong¹, LI Wenting¹, QIAN Xuefeng¹, XU Ninglu¹, WANG Yong¹, CAO Ping¹, ZHANG Jie², GUO Fengbin¹, ZHAO Zhiqiang¹, ZHENG Jinpeng¹, LIU Dun¹, LIU Shuan^{1*}

1. Department of Orthopedics, Tianyou Hospital Affiliated to Wuhan University of Science & Technology, Wuhan 430064

2. Department of Interventional Radiography, Tianyou Hospital Affiliated to Wuhan University of Science & Technology, Wuhan 430064, China

* Corresponding author; LIU Shuan, Email: m18963948463@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Sox-9 on the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** BMSCs were isolated and identified. Sox-9 was over-expressed or knocked down in the cells. The cells were divided into blank control group, over-expression control group, interference control group, Sox-9 over-expression group, and Sox-9 interference group. MTT method was used to measure the cell growth. Immunohistochemical method was used to detect the expressions of collagen II and aggrecan. Western blotting was used to detect the expressions of Sox-9, Wnt3a, and β -catenin. **Results** There was no significant difference in cell proliferation among the groups ($P>0.05$). The expression of collagen II and aggrecan was significantly increased in Sox-9 over-expression group, while the expression of Wnt3a and β -catenin was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Sox-9 may be a key factor in regulating the differentiation ability of BMSCs to chondrocytes. It promotes the differentiation of BMSCs to chondrocytes by inhibiting Wnt3a/ β -catenin signaling pathway.

Key words: bone marrow-derived mesenchymal stem cells; Wnt3a/ β -catenin; sox-9; cartilage differentiation ability; rat

sox-9 基因在软骨细胞的发育和肥大软骨细胞的变化中起着重要作用,可调节生长^[1]。关节软骨

受到损伤时,很难完成自身修复,且尚无有效方法能产生具有正常功能的透明软骨组织,其治疗方案一直是骨科领域的难题之一。干细胞是一类处于“不成熟”和未分化状态的细胞,具有很强的自我更新能力和多向分化潜能。研究发现^[2],调节 sox-9 基

基金项目:湖北省卫生计生委面上项目(WJ2017M171)

* 通信作者:刘拴,Email:m18963948463@163.com

因表达,可将脂肪源性干细胞诱导分化为功能性软骨细胞。骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)的成骨分化能力在骨相关疾病的治疗中具有潜在的临床应用价值^[3]。但由于病理性骨组织可影响 MSCs 的成骨分化和迁移能力,从而限制了 MSCs 移植治疗的效果^[4]。在 MSCs 成骨分化过程中,sox-9 和聚集蛋白聚糖等软骨生成标志物的含量升高^[5]。sox-9 在 MSCs 分化成软骨细胞的过程中起着关键性作用,sox-9 可与 collagen II、aggrecan 等基因的增强子元件相结合,促进 collagen II 和 aggrecan 等基因的表达,从而促使 MSCs 向软骨方向分化^[6-7]。因此,本研究以 BMSCs 为研究对象,以 sox-9 为靶基因,探索 sox-9 表达对 BMSCs 分化的影响,以期对软骨损伤修复的基因强化组织工程治疗手段奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物

4 周龄的 SD 大鼠,购自湖北省疾病控制中心。

1.2 试剂及仪器

主要试剂:DMEM 培养基(Hyclone 公司,美国);胎牛血清(Gibco 公司,美国);0.25%胰蛋白酶、CCK8 溶液、正常兔血清(Solarbio,中国);CD90-FITC、CD34-FITC 荧光标记抗体(eBioscience,美国);慢病毒 sox-9 shRNA(上海吉凯基因科技有限公司,中国);腺病毒 Ad-GFP 和 Ad-sox-9-PLCG2(汉恒生物科技有限公司,中国);甲醛、30% H₂O₂(国药集团化学试剂有限公司,中国);Collagen II、Aggrecan、sox-9、Wnt3a、 β -catenin 抗体(Abcam,英国);HRP 免疫组化试剂盒、生物素标记的抗山羊 IgG、DAB 浓缩型试剂盒、苏木精、RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、PBS 磷酸盐缓冲液(Bioswamp,中国);GAPDH(CST,美国)。主要仪器:流式细胞仪(BECKMAN 公司,美国);倒置显微镜(Leica 公司,德国);全自动化学发光分析仪(天能源科技有限公司,中国)。

1.3 BMSCs 的分离和鉴定

1.3.1 BMSCs 的分离:4 周龄的 SD 大鼠颈椎脱臼处死后,于 75%的乙醇溶液中浸泡消毒 10 min。超净工作台内,取下双侧股骨及胫骨并剔除附着肌肉,两端剪除少许骨髓端,暴露骨髓腔,无菌 PBS 反复冲洗,将骨髓细胞过筛网制成单细胞悬液,离心后,弃上清,加入少量含 10%胎牛血清的 DMEM 重悬并接种于培养皿。于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

接种 24 h 后全量换液,2 d 后去除非贴壁细胞,以后每 3 d 换液 1 次,待细胞达 80%~90% 融合时,0.25%胰酶消化并进行传代,利用差速贴壁特性逐步纯化 BMSCs。显微镜下观察细胞形态变化;流式细胞术鉴定表面抗原 CD90 和 CD45 的表达。

1.3.2 BMSCs 的鉴定:倒置显微镜下观察细胞形态及贴壁状况,并拍照记录。表面标志物检测第 3 代 BMSCs,胰蛋白酶室温消化,离心收集细胞,PBS 清洗细胞并制成单细胞悬液。各样本分别加入抗 CD90 和 CD45 的荧光标记抗体,同时设立同型阴性对照,4 ℃避光孵育,用流式细胞仪进行检测。

1.4 细胞分组和处理

将细胞分为空白对照组(con)、过表达对照组(ov-NC 组)、干扰对照组(sh-NC 组)、sox-9 过表达组(ov-sox-9 组)、sox-9 干扰组(sh-sox-9 组)5 组。慢病毒 sox-9 shRNA 由上海吉凯基因科技有限公司合成鉴定,腺病毒 Ad-GFP 和 Ad-sox-9-PLCG2 由汉恒生物科技有限公司合成鉴定,sox-9 过表达组(ov-sox-9 组)和 sox-9 干扰组(sh-sox-9 组)BMSCs 分别感染 Ad-sox-9-PLCG2 腺病毒和 sox-9 shRNA 慢病毒。

1.5 BMSCs 生长曲线分析

取生长状态良好的第 3 代 BMSCs,以 4×10^3 /mL 接种于 96 孔板,每组 6 复孔,每 3 d 换液 1 次,采用 CCK8 法检测其生长增殖能力。培养 3、7、14 d 时,在相应复孔加入 10 μ L CCK8 溶液,37 ℃孵育 4 h,酶标仪检测 490 nm 波长处各孔光密度值(OD 值),以时间为横坐标,OD 值为纵坐标绘制生长曲线。

1.6 免疫组化

取细胞玻片经 4%多聚甲醛固定。细胞玻片依次经 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化氢酶 15 min,PBS 冲洗,10%正常兔血清封闭非特异性结合 30 min,滴加 1:100 的抗 Collagen II、Aggrecan 多克隆山羊抗体于湿盒内 4 ℃过夜,PBS 冲洗,滴加 1:100 生物素标记的抗山羊 IgG 孵育 15 min,PBS 冲洗,辣根酶标记链霉卵白素孵育 15 min,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

1.7 Western blot 检测

诱导分化后,Western blot 检测 BMSCs 中 sox-9、Wnt3a、 β -catenin 等指标的表达变化。冰面上 RIPA 蛋白裂解液裂解细胞,每 5 min 振荡 1 次,裂解 20 min,4 ℃下 15 000 r/min 离心 30 min,吸取上清液获取总蛋白。根据 BCA 蛋白定量结果上样,10% SDS-PAGE 凝胶电泳 2.5 h,转膜后 NC 膜 TBS 稍荡洗,

5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 4 ℃ 下分别孵育 sox-9、Wnt3a、 β -catenin 一抗过夜, TBST 洗 10 min, 重复 3 次, 室温孵育二抗 1 h, TBST 洗 10 min, 重复 3 次, 曝光显影; 采用 BIO-RAD Image Lab 软件进行灰度值分析。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析法比

较组间的差异性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞鉴定

细胞鉴定结果见图 1。细胞形态见图 1 A, 细胞呈纤维状。表面抗原鉴定见图 1 B, 其结果表明细胞表面抗原 CD90 呈阳性, CD45 呈阴性。

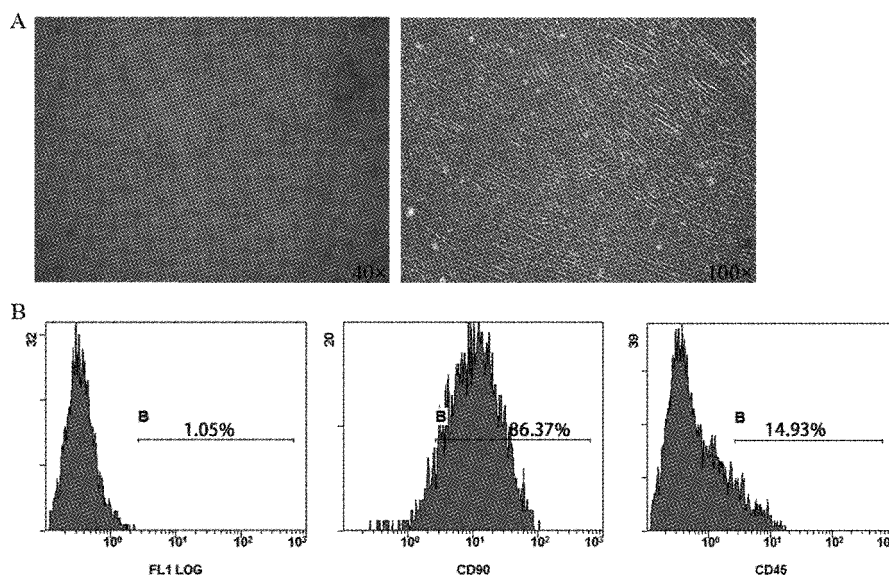


图 1 细胞形态观察 (A) 和表面抗原表达检测 (B)

Fig.1 Cell morphology (A) and surface antigen expression (B)

2.2 sox-9 对 BMSCs 增殖的影响

BMSCs 在 sox-9 修饰后培养 3~14 d 的增殖变化见图 2。在各个时间点, 各组之间的增殖能力无显著差异 ($P > 0.05$)。

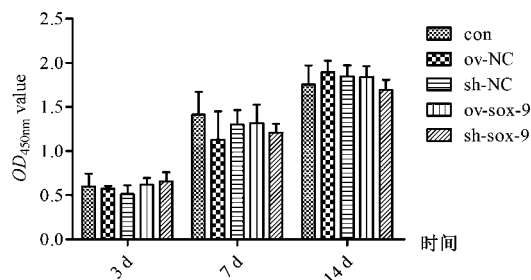


图 2 CCK8 检测 BMSCs 的增殖活性

Fig.2 Proliferation activity of BMSCs was detected with CCK8 assay

2.3 sox-9 促进 BMSCs 的分化

免疫组化检测 Collagen II、Aggrecan 表达见图 3。与对照组或 NC 组比较, ov-sox-9 组的 Collagen II 和 Aggrecan 阳性表达水平升高, sh-sox-9 组的 Collagen

II 和 Aggrecan 表达水平降低。

2.4 sox-9 抑制 Wnt3a 和 β -catenin 的表达

Western blot 检测结果见图 4, 和对照组比较, sh-NC 组和 ov-NC 组均无显著性差异 ($P > 0.05$)。和对照组或 NC 组比较, ov-sox-9 组的 sox-9 表达显著升高, Wnt3a 和 β -catenin 的表达显著降低 ($P < 0.05$), sh-sox-9 组 sox-9 表达显著降低, Wnt3a 和 β -catenin 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

软骨组织在骨骼的构建、保护和补充中起着关键作用, 然而, 由于缺少血液供应, 软骨受到损伤后一般难以自我修复, 通常会引起后续的一系列病变, 成为骨科疾病治疗的难点^[8-9]。软骨由软骨细胞精心构建和维护, 因此研究可促进 BMSCs 分化为软骨细胞的调节因子将有利于研发软骨损伤的治疗方案。研究表明位于人 17 号染色体上的 sox-9 基因是软骨发育的关键基因, 在软骨的分化过程中有着重要影响, 其突变可导致骨骼畸形综合征^[10-11]。本研

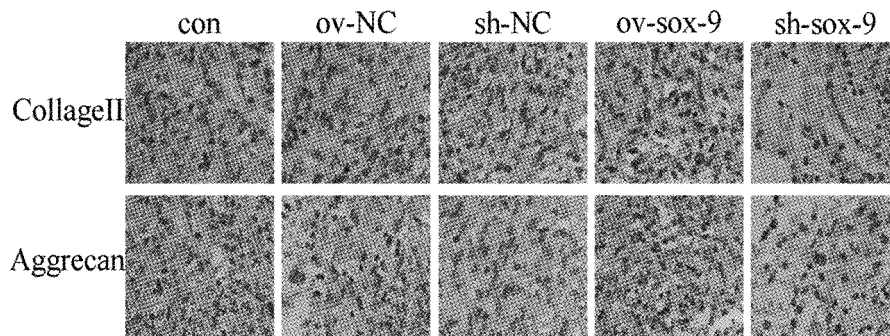


图 3 免疫组化检测 Collagen II 和 Aggrecan 表达

Fig.3 The expressions of collagen II and aggrecan were detected with immunohistochemistry

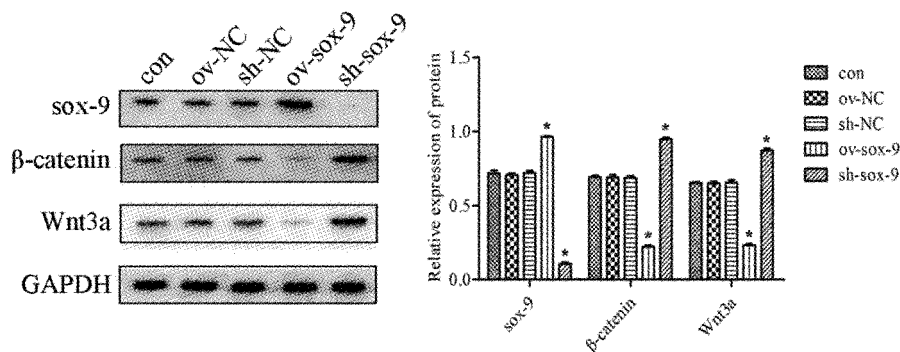


图 4 Western blot 检测 sox-9、Wnt3a 和 β-catenin 蛋白表达水平

Fig.4 The expression levels of Sox-9, Wnt3a, and β-Catenin were detected with Western blotting

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

究以 BMSCs 为研究对象,探讨 sox-9 对 BMSCs 向软骨细胞分化能力的影响。

本研究首先探究了 sox-9 基因对 CD45 阴性 CD90 阳性 BMSCs 增殖能力的影响。其结果显示, sox-9 基因的过表达和抑制未对 BMSCs 增殖能力产生显著性影响。随后通过研究 Collagen II、Aggrecan 蛋白的表达情况判断 sox-9 基因的修饰对 BMSCs 分化能力的影响。作为软骨细胞大量产生的软骨细胞外基质, Collagen II 和 Aggrecan 蛋白可用于指示软骨细胞的分化水平^[8,12],其结果显示上调 sox-9 基因的表达可显著促进软骨细胞的形成。sox-9 基因修饰对软骨形成的影响与之前的研究结论相似^[13],其作用方式不是通过增强细胞增殖能力而提供更多可供分化为软骨细胞的 BMSCs。

根据 sox-9 基因的上调促进 BMSCs 软骨分化的研究成果,继续深入研究其调控的途径。Wnt/β-catenin 信号通路的抑制已被证明可促进 BMSCs 成软骨分化^[14-15],且有研究表明 Wnt/β-catenin 信号通路可通过抑制 sox-9 基因的表达来抑制软骨形成并

促进成骨分化^[16]。Chen 等^[17]证明了可通过 sox-9 基因的上调表达抑制 GSK-3β 的磷酸化作用,进而抑制 Wnt/β-catenin 信号通路。相关研究^[13]表明, Wnt3a/β-catenin 信号通路可影响间质细胞向成骨细胞和软骨细胞分化的平衡。在本研究结果中,上调 sox-9 基因可抑制 BMSCs 中 Wnt3a 和 β-catenin 的表达,而下调 sox-9 基因可促进 BMSCs 中 Wnt3a 和 β-catenin 的表达,提示 sox-9 基因可负调节 Wnt/β-catenin 信号通路。

综上所述,上调 sox-9 基因的表达,对 BMSCs 增殖无明显作用,但可促进 Collagen II 和 Aggrecan 的表达,说明 sox-9 基因对 BMSCs 向软骨细胞分化过程具有调控作用,其作用机制可能与抑制 Wnt3a/β-catenin 信号通路有关。

【参 考 文 献】

- [1] He LB, Bi Y, Wang RL, et al. Detection of a 4 bp mutation in the 3'UTR region of goat Sox9 gene and its effect on the growth traits[J]. Animals, 2020, 10(4):672.
- [2] Lee J, Lee CY, Park JH, et al. Differentiation of adipose-derived

- stem cells into functional chondrocytes by a small molecule that induces Sox9[J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(4):672-681.
- [3] Bi HU, Wang D, Liu X, et al. Long non-coding RNA H19 promotes osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating microRNA-140-5p/SATB2 axis[J]. *J Biosci*, 2020, 45:56.
- [4] Zhu WW, Guo MK, Wu Y, et al. CD41-deficient exosomes from non-traumatic femoral head necrosis tissues impair osteogenic differentiation and migration of mesenchymal stem cells[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4):293.
- [5] Vaca-González JJ, Clara-Trujillo S, Guillot-Ferriols M, et al. Effect of electrical stimulation on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured in hyaluronic acid - Gelatin injectable hydrogels[J]. *Bioelectrochemistry*, 2020, 134:107536.
- [6] Zwickl H, Niculescu-Morzea E, Halbwirth F, et al. Correlation analysis of SOX9, -5, and -6 as well as COL2A1 and aggrecan gene expression of Collagen I implant-derived and osteoarthritic chondrocytes[J]. *Cartilage*, 2016, 7(2):185-192.
- [7] Ghiasi M, Qomi RT, Nikbakht M, et al. Expression of collagen type I and II, aggrecan and SOX9 genes in mesenchymal stem cells on different bioscaffolds[J]. *Tehran Univers Med J*, 2015, 73(3):158-167.
- [8] Liu CF, Samsa WE, Zhou G, et al. Transcriptional control of chondrocyte specification and differentiation[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 62:34-49.
- [9] 于斐, 张培训, 寇玉辉. 人工软骨支架材料研究进展[J]. *中华*
- 肩肘外科电子杂志, 2018, 6(3):233-238.
- [10] Lefebvre V, Angelozzi M, Haseeb A. SOX9 in cartilage development and disease[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 61:39-47.
- [11] Song H, Park KH. Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67(1):12-23.
- [12] Symon A, Harley V. SOX9: A genomic view of tissue specific expression and action[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 87:18-22.
- [13] Deshmukh V, Hu H, Barroga C, et al. A small-molecule inhibitor of the Wnt pathway (SM04690) as a potential disease modifying agent for the treatment of osteoarthritis of the knee[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(1):18-27.
- [14] 汪建祥, 殷娉娉, 邹亚华, 等. GDF-5 和 Dex 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 rBMSCs 体外成软骨分化[J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(12):1624-1629.
- [15] 汪建祥, 殷娉娉, 武翠翠, 等. 淫羊藿素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 BMSCs 成软骨分化[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(4):694-699.
- [16] Fang M, Alfieri CM, Hulin A, et al. Loss of β -catenin promotes chondrogenic differentiation of aortic valve interstitial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(12):2601-2608.
- [17] Chen K, Cheng P, Zhou M, et al. Sox9 suppresses the hypertrophy of chondrocytes by inhibiting wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *J Orthop Translat*, 2016, 7:134.
- (收稿日期: 2020-09-01; 修回日期: 2020-09-16)

(上接第 1158 页)

- [26] Wei Y, Sun X, Hua M, et al. Inhibitory effect of a novel antirheumatic drug T-614 on the IL-6-Induced RANKL/OPG, IL-17, and MMP-3 expression in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015:214683.
- [27] 严正杰, 戴有金, 侯道荣. 白介素-10 对去卵巢小鼠骨质疏松的作用[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(10):39-42, 63.
- [28] Fatima LA, Campello RS, Santos R de Souza, et al. Estrogen receptor 1 (ESR1) regulates VEGFA in adipose tissue[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):16716.
- [29] 张萌萌. 雌激素与雌激素受体骨代谢调节作用[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(5):704-708.
- [30] 陈亚辉, 龚忠勤, 崔燎. PI3K/Akt 信号通路在骨质疏松病理过程中的作用[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(3):356-360.
- [31] 强胜利, 刘涛, 贾永龙, 等. 补肾固本方对大鼠骨质疏松模型中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路表达的调控研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(7):983-987.
- [32] 杨嘉豪, 崔瑞琴, 周波, 等. 温阳消饮方对慢性心力衰竭大鼠 PI3K-Akt 信号通路表达及相关凋亡蛋白的影响[J]. *中华中*
- 医药杂志, 2020, 35(1):145-149.
- [33] 孙振双. 温肾固疏方调控 FoxO/Wnt 信号通路抗氧化应激防治绝经后骨质疏松的机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [34] 易登良, 曾奇虎, 刘星, 等. 硫氢化钠对糖尿病心肌病大鼠心脏保护作用及对 JNK/FoxO1/Bcl-2 信号通路的影响[J]. *天津医药*, 2019, 47(6):619-623, 674.
- [35] 钟航, 曹参, 杨静, 等. HIF-1 信号通路对绝经后骨质疏松的关系研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2017, 48(6):862-868.
- [36] Victor Nizet, Randall S Johnson. Interdependence of hypoxic and innate immune responses[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(9):609-617.
- [37] Reyes David RA, Gomes Mariana J, Rosa Camila M, et al. N-Acetylcysteine influence on oxidative stress and cardiac remodeling in rats during transition from compensated left ventricular hypertrophy to heart failure[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 44(6):2310-2321.
- [38] 何琳琳. 胶原蛋白肽防治骨质疏松症研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(7):1078-1082.
- (收稿日期: 2020-09-17; 修回日期: 2020-10-08)