

降钙素基因相关肽对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的影响及其与 Wnt/ β -catenin 信号转导通路关系的研究

何鹏 汪志军 王愉思

湖南师范大学第一附属医院创伤骨科 湖南长沙 410006

【摘要】目的 探讨降钙素基因相关肽(CGRP)对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响,并从Wnt/ β -catenin信号通路角度初步探讨其可能的机制。**方法** 实验分为4组,分别为空白对照组、CGRP组、CGRP+CGRP拮抗剂(CGRP8-37组)、CGRP+DKK1组。培养4、7、14 d应用荧光定量核酸扩增(Q-PCR)检测法检测各组碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OC)、I型胶原(COL I)、RUN X2基因、及Wnt/ β -catenin信号通路相关基因(β -catenin、C-myc、TCF/LEF)的表达;4、7、14 d采用Western blot法检测各组 β -catenin蛋白表达情况;培养7 d应用免疫荧光法检测各组 β -catenin的核转移情况。**结果** (1) CGRP能明显提高MC3T3-E1细胞ALP、OC、COL I、RUN X2基因的表达;(2) CGRP作用于MC3T3-E1细胞能明显提高C-myc、TCF/LEF基因及 β -catenin蛋白的表达,同时能提高细胞核内 β -catenin蛋白蛋白的聚集。**结论** CGRP能促进MC3T3-E1细胞成骨分化,Wnt/ β -catenin信号通路可能参与其调控。

【关键词】 降钙素基因相关肽; MC3T3-E1; Wnt/ β -catenin

【中图分类号】 R336 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-9561 (2015) 08-010-04

降钙素基因相关肽(Calcitonin gene-related peptide, CGRP)由感觉神经元分泌的一种含有37个氨基酸的生物活性多肽,是由神经纤维分泌的一种神经递质,广泛分布于中枢及周围神经系统,参与骨代谢、骨生理^[1, 2]。研究者发现,分泌CGRP这些神经纤维广泛分布于骨组织内;这些神经纤维的分布随着骨代谢、骨重建发生变化;感觉神经束的植入能明显促进骨组织周围血管的形成,同时神经植入能促进组织工程骨成骨及骨缺损的修复。这些研究表明CGRP参与骨折愈合的过程,可能发挥重要的调节作用^[3, 4]。已有研究表明CGRP、P物质(SP)能明显促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)增殖、分化,Wnt/ β -catenin信号转导通路参与其调节过程,并且Wnt/ β -catenin信号转导通路参与骨生理、骨代谢的调节^[5-10]。MC3T3-E1细胞作为前成骨细胞,具有易培养、增殖快、成骨分化周期短等优点,是骨组织工程中支架植入的首选种子细胞之一,但是神经肽对其影响的研究尚缺乏,因此有必要进一步研究神经递质CGRP对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响,并从Wnt/ β -catenin信号转导通路角度探讨其作用机制,这可为神经调节骨生理、骨代谢提供理论支持,为骨组织工程中支架植入种子细胞提供思路及理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料、主要试剂及仪器

MC3T3-E1细胞(中科院细胞库,中国),CGRP、CGRP受体拮抗剂(CGRP 8-37)(Sigma公司,美国),DKK1(Peprotech公司,美国), β -catenin一抗(SantaCruz Biotechnology,美国),辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-羊抗鼠IgG(Cell Signaling Technology,美国),4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、染色液(碧云天生物技术公司,上海),光学显微镜照相系统、倒置显微镜、荧光显微镜(Olympus公司,日本),核酸分析仪(Bio-Rad公司,美国),CO₂孵育箱(Heraeus公司,德国)。

1.2 MC3T3-E1细胞培养

解冻MC3T3-E1细胞(购自中科院细胞库),加入 α -MEM、10%FBS培养基,置于37℃ 5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。每隔2天传代、换液,用胰酶消化以后,加入FBS冲洗培养瓶,以离心半径1.5 cm、800r/min离心10min后弃上清,换用新鲜培养基继续培养,细胞培养至第6代用于以下实验。倒置相差显微镜观察细胞形态变化。

1.3 荧光定量核酸扩增(Q-PCR)法检测各组碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OC)、I型胶原(COL I)、RUN X2基因、及Wnt/ β -catenin信号通路相关基因(β -catenin、C-myc、TCF/LEF)的表达情况取

第6代MC3T3-E1细胞,加入成骨诱导液(包括 α -MEM、10% FBS、10⁻⁸ mol/L地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/mL维生素C)后,细胞分成4组(n=3):CGRP组,CGRP + CGRP拮抗剂(CGRP 8-37),CGRP +DKK1组及对照组(等量PBS)。培养4、7、14 d检测并比较各组ALP、OC、COL I、RUN X2、 β -catenin、C-myc及TCF/LEF的表达差异。各基因引物见表1。Trizol法进行总RNA抽提,反转录为cDNA,PCR反应条件优化,随后采用SYBR GreenI染料法进行实时PCR检测。ABI 7500系统进行分析,GAPDH作为内参,实验重复3次。

表1 基因序列

基因	序列	长度(bp)
ALP	5' -AACCAGACACAAGCATTCC-3'	200
	5' -GCCTTTGAGGTTTTTGGTCA-3'	
COL1	5' -GCCAAGAAGACATCCCTGAA-3'	107
	5' -GCCATTGTGGCAGATACAGA-3'	
OCN	5' -TGACAAAGCCTTCATGTCCA-3'	175
	5' -TTTGTAGGCGGTCTTCAAGC-3'	
RUNX2	5' -AAGTGCCTGCAAACTTTCT-3'	175
	5' -ACGCCATAGTCCCTCCTTTT-3'	
C-MYC	5' -TCCTGTACCTCGTCCGATTC-3'	195
	5' -GGTTTGCCTCTTCTCCACAG-3'	
LEF1	5' -TATGAACAGCGACCCGTACA-3'	132
	5' -TCGTCGCTGTAGGTGATGAG-3'	
TCF7	5' -ATCCTTGATGCTGGGATCTG-3'	139
	5' -CTTCTCTGCCTTGGGTTCTG-3'	
β -CATENIN	5' -ATGGCTTGAATGAGACTGC-3'	150
	5' -ATGCTCCATCATAGGGTCCA-3'	
GAPDH	5' -ATTGTCAGCAATGCATCTG-3'	102
	5' -ATGGACTGTGGTCATGAGCC-3'	

1.4 免疫荧光法检测 β -catenin蛋白在细胞核中的聚集

取第6代MC3T3-E1细胞,加入成骨诱导液,细胞分成4组(n=3):CGRP组,CGRP + CGRP 8-37,CGRP +DKK1组及对照组(等量PBS)。培养7 d检测各组 β -catenin蛋白在细胞核中的表达情况。按1 $\times$ 10⁴/孔的密度接种细胞于96孔板中,于刺激的第7 d弃培养基,PBS冲洗后用体积百分比为4%的多聚甲醛固定10 min,体积百分比为0.5%的Triton穿孔15 min,质量百分比为1%的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭30 min,PBS清洗3次,5 min/次。加入 β -catenin一抗(1:100),4℃过夜,PBS清洗1次,加入二抗IgG(1:200)孵育30 min,PBS清洗1次,加入5 μ g/mL DAPI染色2 min,PBS清洗1次,荧光显微镜下观察、拍照,对比

作者简介:何鹏(1988-),男,籍贯:湖南永州,职称:主治医师,学历:研究生,工作单位:湖南师范大学第一附属医院创伤骨科。通讯作者:王愉思,主任医师,硕士研究生导师

各组 β -catenin 的核转移差异。

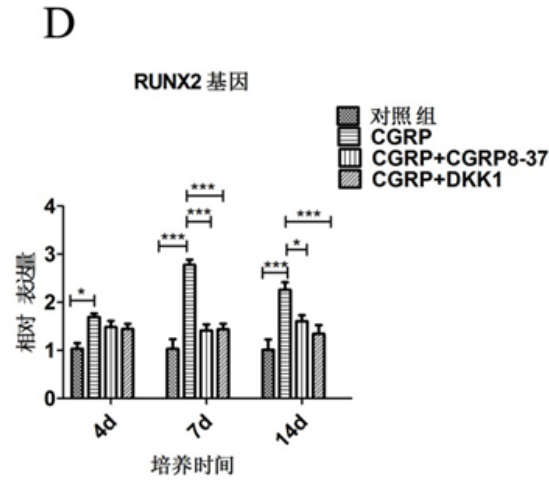
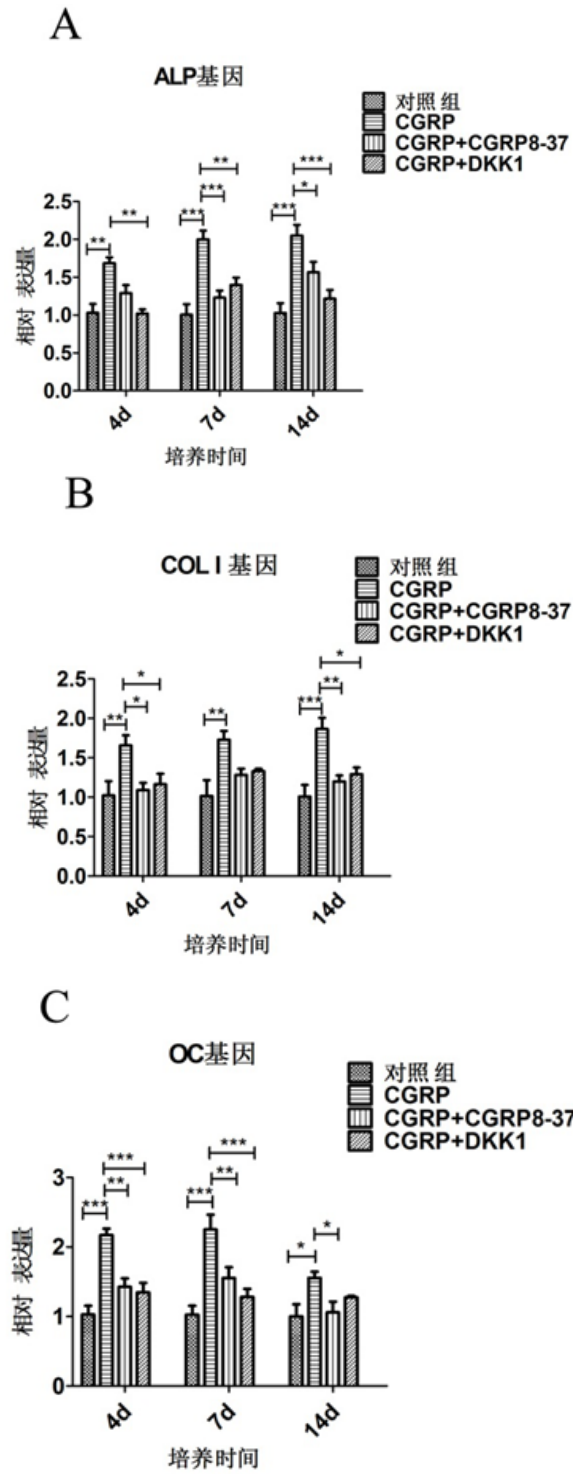
1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计学软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本均数的比较采用 One-way ANOVA 进行检验, 两两比较采用 Dunnett's t 和 SNK 进行检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

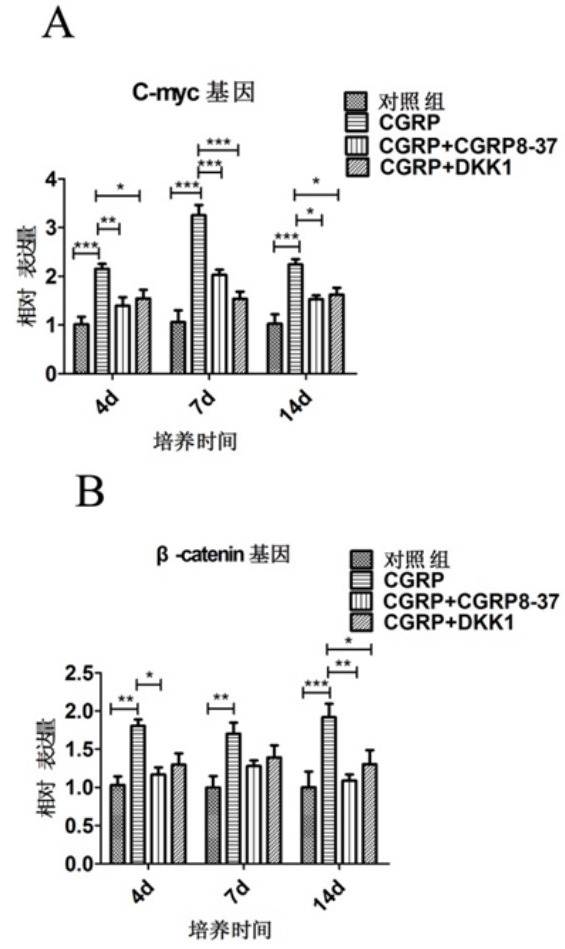
2.1 各组对 MC3T3-E1 细胞成骨基因的影响

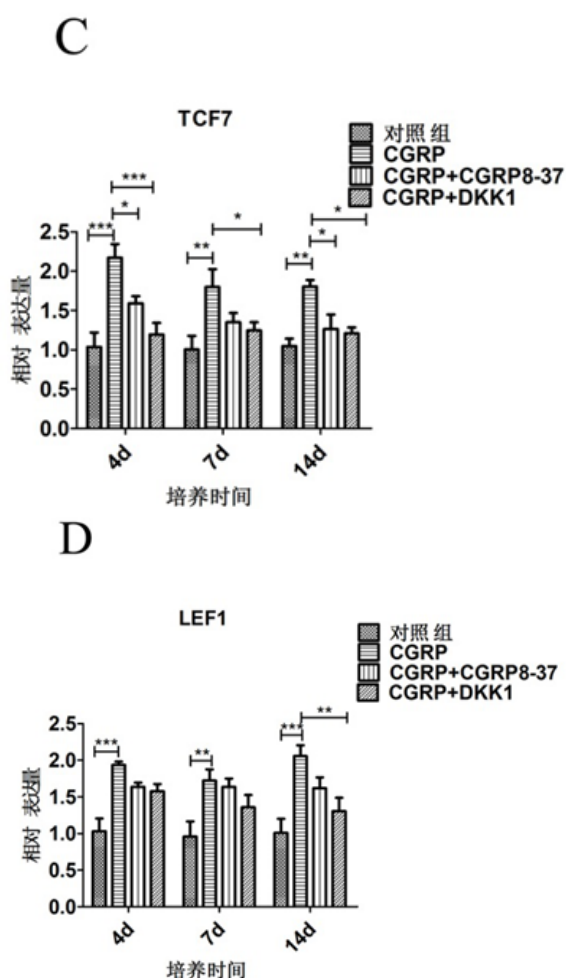
四组加入刺激物刺激培养 4、7、14d, CGRP 能显著提高 ALP、OC、COL I、RUN X2 基因的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而加入 CGRP8-37、DKK1 预处理后, CGRP 对成骨基因的促进作用明显减弱, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



2.2 各组作用于 MC3T3-E1 细胞对 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因的影响

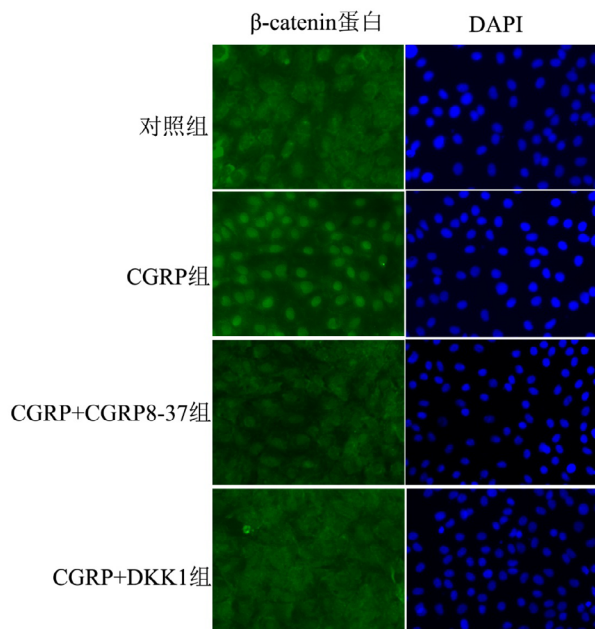
CGRP 作用于 MC3T3-E1 细胞 4、7、14d, 能明显提高 C-myc、TCF7 基因的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而加入 CGRP8-37、DKK1 预处理后明显抑制 CGRP 对 C-myc、TCF7 基因的促进作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CGRP 对 β -catenin、LEF1 的作用并不明显。





2.3 各组作用于MC3T3-E1细胞对 β -catenin蛋白在细胞核中聚集的影响

从图3可以看出,细胞培养7d,对照组细胞中未见明显 β -catenin表达,CGRP组可见明显 β -catenin蛋白在细胞核中的分布,CGRP+CGRP8-37,CGRP+DKK1组细胞核未见 β -catenin表达。



3 讨论

在本研究内容中,我们加入了MC3T3-E1细胞这个新的元素,小鼠颅盖骨细胞来源的成骨前细胞MC3T3-E1细胞系是体外进行成骨过

程相关研究的经典模型,经常被用作骨组织工程支架的种子细胞,用于骨折或者骨缺损等相关研究,已有研究表明MC3T3E1细胞在 β -磷酸甘油和抗坏血酸存在的情况下,能在体外向成骨细胞方向分化,并形成矿化结节。我们知道,Runx2基因表达伴随着成骨细胞形成的整个过程,ALP、Col I基因被认为是成骨分化早期标志物,OC基因被认为是晚期成骨标志物,因此,在本研究中检测四个成骨标志物基因表达的变化,研究结果表明:神经肽CGRP能明显促进MC3T3-E1细胞向成骨细胞方向分化。

目前已有研究表明Wnt/ β -catenin信号转导通路参与骨生理、骨代谢,为了进一步探讨CGRP对MC3T3-E1细胞的作用机制,本实验从Wnt/ β -catenin信号转导通路角度探讨其可能的作用机制。Wnt/ β -catenin信号转导通路是目前骨骼系统相关疾病发病机制和骨代谢研究的热点。Wnts蛋白与低密度脂蛋白受体相关蛋白(Lrp)Frizzleds受体(Fzd)受体复合体结合后,通过一系列胞质蛋白(Dsh、Gsk3 β 、APC、Axin等)的相互作用,使得 β -连环蛋白(β -catenin)在胞质稳定并累积, β -catenin入核后与转录因子:T细胞因子(Tcf)/淋巴增强因子-1(Lef)作用,通过作用于靶基因而发挥调节作用。这条通路被称为Wnt/ β -catenin经典途径[6, 8, 11-13]。本实验中检测了CGRP作用于MC3T3-E1细胞后Wnt/ β -catenin信号转导通路相关基因的表达及 β -catenin蛋白在细胞核中的分布,结果表明Wnt/ β -catenin信号转导通路可能参与CGRP对MC3T3E1细胞向成骨细胞方向分化的调控。

β -catenin是Wnt/ β -catenin信号转导通路核心蛋白, β -catenin蛋白的稳定及入核在Wnt/ β -catenin信号转导通路激活过程中起到关键作用,对此本实验检测了 β -catenin蛋白在不同组、不同时间点细胞核中的分布,结果表明CGRP能提高 β -catenin蛋白在MC3T3-E1细胞核中的分布,而CGRP8-37、DKK1能减弱CGRP的作用,结果进一步证实了CGRP能激活Wnt/ β -catenin信号转导通路。同时我们检测了不同组、不同时间点 β -catenin基因的表达,我们发现各组 β -catenin基因表达差异不大,我们推测Wnt/ β -catenin信号转导通路的状态主要由细胞核中 β -catenin蛋白量控制的,而不是主要由细胞质中 β -catenin蛋白的表达量决定的。C-myc作为Wnt/ β -catenin信号转导通路靶基因,在CGRP作用于MC3T3-E1细胞后,其表达量明显提高。

通过Q-PCR及免疫荧光结果可以推测,CGRP作用于CGRP受体后,使 β -catenin在细胞浆不被降解,此时稳定的 β -catenin进入细胞核,与起始转录因子Tcf7/Lef1结合,最后激活靶基因C-myc,Wnt/ β -catenin信号转导通路被激活,进而促进MC3T3-E1细胞向成骨细胞分化。

阐明神经肽CGRP对MC3T3E1细胞向成骨细胞方向分化的具体作用有助于我们更好的了解神经肽在骨生理过程中发挥的作用,进一步揭示骨再生过程中的神经因素所起到的作用及相关生物学作用机制。本实验通过MC3T3E1细胞的体外培养,采用PCR和免疫荧光等实验方法,对神经肽CGRP、CGRP8-37及DKK1对MC3T3E1细胞生物学效应进行研究,为进一步深入研究骨缺损愈合、骨生理过程中的神经生物学调节分子转导机制奠定坚实基础,同时也可为其在骨折以及骨代谢疾病中的临床应用提供新的思路和实验依据。

参考文献:

- [1] Bjurholm A, Kreicbergs A, Brodin E, Schultzberg M. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. Peptides 1988;9: 165-71.
- [2] Chen K, Zhang ZF, Liao MF, Yao WL, Wang J, Wang XR. Blocking PAR2 attenuates oxaliplatin-induced neuropathic pain via TRPV1 and releases of substance P and CGRP in superficial dorsal horn of spinal cord. J Neurol Sci 2015.
- [3] Chen SY, Qin JJ, Wang L, Mu TW, Jin D, Jiang S, Zhao PR, Pei GX. Different effects of implanting vascular bundles and sensory nerve tracts on the expression of neuropeptide receptors in tissue-engineered bone in vivo. Biomed Mater 2010;5: 055002.

[4] Huebner AK, Schinke T, Priemel M, Schilling S, Schilling AF, Emeson RB, Rueger JM, Amling M. Calcitonin deficiency in mice progressively results in high bone turnover. *J Bone Miner Res* 2006;21: 1924-34.

[5] Mei G, Xia L, Zhou J, Zhang Y, Tuo Y, Fu S, Zou Z, Wang Z, Jin D. Neuropeptide SP activates the WNT signal transduction pathway and enhances the proliferation of bone marrow stromal stem cells. *Cell Biol Int* 2013;37: 1225-32.

[6] Georgiou KR, King TJ, Scherer MA, Zhou H, Foster BK, Xian CJ. Attenuated Wnt/beta-catenin signalling mediates methotrexate chemotherapy-induced bone loss and marrow adiposity in rats. *Bone* 2012;50: 1223-33.

[7] Liu Y, Liu Y, Zhang R, Wang X, Huang F, Yan Z, Nie M, Huang J, Wang Y, Wang Y, Chen L, Yin L, He B, Deng Z. All-trans retinoic acid modulates bone morphogenic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/beta-catenin signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;47: 47-56.

[8] Zheng Q, Chen P, Xu Z, Li F, Yi XP. Expression and redistribution of beta-catenin in the cardiac myocytes of left ventricle of spontaneously hypertensive rat. *J Mol Histol* 2013;44: 565-73.

[9] Guo J, Liu M, Yang D, Boussein ML, Saito H, Galvin RJ, Kuhstoss SA, Thomas CC, Schipani E, Baron R, Bringham FR, Kronenberg HM. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation. *Cell Metab* 2010;11: 161-71.

[10] 刘艳玲, 李方兵, 赵曦. Wnt 信号通路在成骨细胞中的作用: 成骨还是破骨? [J]. *中国组织工程研究*, 2014; 5366-5371.

[11] Li J, Li J, Chen B. Oct4 was a novel target of Wnt signaling pathway. *Mol Cell Biochem* 2012;362: 233-40.

[12] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009;17: 9-26.

[13] Shimizu N, Kawakami K, Ishitani T. Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/beta-catenin signaling-reporter transgenic zebrafish. *Dev Biol* 2012;370: 71-85.

(上接第 8 页)

1 例 (0.7%), 肠系膜血管栓塞患者 1 例 (0.7%), 腹腔肿瘤广泛转移 1 例 (0.7%), 胆结石肠梗阻患者 1 例 (0.7%), 动力性肠梗阻患者 1 例 (0.7%), 病因不明 1 例 (0.7%)。

在对肠梗阻患者的治疗中, 术前治疗有, ①胃肠减压: 患者一旦确诊就需立即采取胃肠减压, 来减轻患者的腹胀压力, 可以防止老年患者发生误吸的现象。胃管可以将肠道逆流到胃内的液体的气体吸出, 减少胃肠的膨胀, 有利于进行手术探查。②水与电解质的补充: 肠梗阻患者都会有水喝电解质失衡的现象出现, 对患者进行治疗时, 先判断患者的梗阻部位、梗阻时间, 在根据患者的化验和检查结果, 对患者的水和电解质进行纠正。③抗生素的运用: 主要是针对绞窄性肠梗阻患者, 使用抗生素, 可以减少患者患部细菌的繁殖, 减缓病情的发展。手术治疗主要有: 粘连松解术、复位术, 肠襻间短路吻合术, 肠造瘘术, 肠切除、肠吻合术。非手术治疗方法主要有: 药物治疗 (奥曲肽), 灌肠, 纤维结肠镜减压, 中药治疗等。

(上接第 9 页)

患儿出现四肢发凉、面色苍白、血压下降、体温升高的表现, 需要及时向医师汇报, 采用科学的护理措施。同时, 输液护理也是一项非常重要的工作, 在患儿入院后, 需要短时间内输注大量液体与药物, 及时的纠正血容量与酸中毒, 为了不耽误后续的抢救, 需要及时地进行静脉穿刺, 如果穿刺困难, 可遵医嘱注射阿拉明, 若穿刺失败, 则应该将静脉切开^[4]。在整个治疗过程中, 密切观察患儿脉搏、血压、微循环与脉搏变化情况, 改善患儿的循环功能, 准确记录好出入数量, 尤其是针对无尿与少尿患儿, 要制定出科学的补液计划, 对于女患儿, 使用弯盘接尿, 男患儿, 使用塑料袋接尿, 若患儿无法自行排尿, 则可以协助患儿按摩, 帮助排尿。本研究对于 38 例患儿采用了系统的护理干预措施, 结果显示, 本组 38 例患儿之中, 35 例出现循环障碍, 6 例并发多脏器损伤, 36 例治愈, 2 例患儿死亡。

总而言之, 感染性休克是由于多种因素引起, 在小儿群体中尤为

综上所述, 肠梗阻临床上以机械性肠梗阻最为常见, 而结直肠肿瘤是机械性肠梗阻的主要病因, 肠粘连为次要原因。且在肠梗阻患者的治疗中, 主要以手术治疗为主。对肠梗阻患者的治疗, 充分认识肠梗阻产生的原因, 并采取相应的治疗策略, 对治疗效果有非常重要的影响。

参考文献:

[1] 吕云福. 肠梗阻的常见病因治疗策略与分类 [J]. *中华普外科手科学杂志 (电子版)*, 2011, 11 (03): 251-255.

[2] 谭琼, 谢伶俐, 李晖. 甘露醇联合鼻肠管减压治疗肠梗阻的效果观察 [J]. *当代护士 (中旬刊)*, 2013, 12 (07): 56-57.

[3] 杨维建, 张超, 钟海文. 肠梗阻的中西医结合诊治策略 [A]. 中华中医药学会继续教育分会. 中医药继续教育新论 2013[C]. 中华中医药学会继续教育分会: 2013: 6.

[4] 邹琪. 肠梗阻的术前和术后护理 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 11 (27): 213-214.

常见, 属于儿科临床中的危重症, 对于此类患儿, 需要进行系统、全面的护理, 这样才能够提升治疗效果。

参考文献:

[1] 吴明法, 罗慕华, 蔡康玲. 感染性休克患儿的血脂变化与预后的关系 [J]. *中国民族民间医药*, 2015, 14(06): 392-394.

[2] Claudio Chiesa, Fabio Natale, Roberto Pascone, John F. Osborn, Lucia Pacifico, Enea Bonci, Mario De Curtis. C reactive protein and procalcitonin: Reference intervals for preterm and term newborns during the early neonatal period [J]. *Clinica Chimica Acta*. 2011 (11).

[3] 陈勤玲, 肖善秋. 极低出生体重质量儿感染性休克抢救成功 1 例体会 [J]. *南昌大学学报 (医学版)*, 2010, 21(07): 177-179.

[4] 曹兰芳. 儿童难治性肺炎支原体肺炎的诊治现状和进展 [J]. *临床儿科杂志*, 2010, 17(01): 209-210.