

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.002

文章编号: 1005-8982(2016)15-0006-05

论著

神经营养因子-3 通过 Wnt 通路促进人骨髓间充质干细胞生长和成骨分化的研究*

张善强, 李永涛, 孙石柱, 姚立杰, 徐桂清, 沈雷

(齐齐哈尔医学院 解剖教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:目的 阐明神经营养因子-3(NT-3)促进人骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞的能力,并分析 Wnt 通路的作用机制。**方法** 正常培养的人骨髓间充质干细胞为对照组;NT-3 刺激的人骨髓间充质干细胞为 NT-3 组;加入 ICG-001 作用 30 min 后,用 NT-3 刺激者为 Wnt 抑制剂组,每组进行成骨诱导实验。利用噻唑蓝细胞增殖、酶联免疫吸附试验、Western blot 检测、茜素红染色等实验分别检测各组人骨髓间充质干细胞增殖、细胞凋亡、碱性磷酸酶、骨形态发生蛋白-1(BMP-1)等蛋白表达及钙结节形成能力。**结果** 与对照组比较,NT-3 组间充质干细胞(MSC)增殖吸光度值增高($P < 0.01$);NT-3 组碱性磷酸酶活性、BMP-1 等蛋白表达或茜素红染色效果均高于对照组($P < 0.01$);与 NT-3 组比较,Wnt 抑制剂组 MSC 增殖吸光度值降低($P < 0.01$);而 Wnt 抑制剂组的碱性磷酸酶活性、BMP-1 等蛋白表达均低于 NT-3 组($P < 0.01$)。**结论** NT-3 通过 Wnt 通路,促进人骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化。

关键词: 神经营养因子-3;人骨髓间充质干细胞;成骨分化;Wnt 通路

中图分类号: R318.0

文献标识码: A

Neurotrophin-3 promotes growth and osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells through Wnt pathway*

Shan-qiang Zhang, Yong-tao Li, Shi-zhu Sun, Li-jie Yao, Gui-qing Xu, Lei Shen
(Department of Anatomy, Qiqihaer Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: Objective To clarify the ability of neurotrophin-3 (NT-3) in promoting the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSCs) into osteoblasts, and analyze the mechanism of Wnt pathway. **Methods** Normal cultured hMSCs were into control group, hMSCs stimulated by NT-3 were into NT-3 group, hMSCs added with ICG-001 acting for 30 min before stimulation of NT-3 were taken as Wnt inhibitor group. The experiment of osteogenic induction was performed in each group. MTT, ELISA, Western blot and alizarin red staining were used to detect hMSC proliferation, apoptosis, alkaline phosphatase activity (ALP), bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) and other proteins, and ability of calcium nodule formation respectively in each group. **Results** Compared with the control group, the OD value of hMSC proliferation in the NT-3 group significantly increased ($P < 0.01$); the expressions of ALP, BMP-1 and other proteins, and the effect of alizarin red staining of the NT-3 group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). Compared with the NT-3 group, the OD value of hMSC proliferation in the Wnt inhibitor group significantly decreased ($P < 0.01$); the expressions of ALP, BMP-1 and other proteins of the Wnt inhibitor group were lower than those in the NT-3 group ($P < 0.01$). **Conclusions** NT-3 promotes the proliferation and osteogenic differentiation of hMSCs through Wnt pathway

Keywords: neurotrophin-3; human mesenchymal stem cell; osteogenic differentiation; Wnt pathway

收稿日期: 2016-01-28

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81541137); 齐齐哈尔医学院博士基金(No: QY2015B-04)

[通信作者] 沈雷, E-mail: shenleiby@126.com; Tel: 0452-2663205

肿瘤、外伤、炎症原因所造成的骨质损伤,严重威胁患者的健康和生存质量。促进骨损伤的修复一直是组织工程等领域的研究热点^[1]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)可以向骨、软骨、血管内皮细胞等多种细胞分化^[2],已成为组织工程中种子细胞的主要来源。

临床工作发现,骨折区如果缺少血管营养或神经支配,断离的骨质往往难以愈合^[3]。人体神经组织的生长与血管网络的形成相互作用、伴行生长^[4-5]。因此笔者设想,神经因子可能在骨修复及骨再生中发挥重要作用。

神经营养因子-3(Neurotrophin-3, NT-3)是近年来发现的一种重要的神经营养家族成员^[6],具有维持神经元存活、促进 MSC 分化为神经细胞^[7]和促血管新生等作用^[8]。如果挖掘 NT-3 对 MSC 成骨分化的影响,将对应用 NT-3 和 MSC 的组织工程技术,促进骨组织血管、神经再生,修复骨损伤等具有重要作用。目前,以 NT-3 促进 MSC 成骨分化的研究却鲜有报道。本实验拟阐明 NT-3 对人 MSC 生长和成骨分化能力的影响,为骨组织工程研究奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与分组

人骨髓间充质干细胞(广州赛业生物有限公司),以含 10%胎牛血清(美国 Gibco 公司),1 μ mol/L 青霉素(美国 Sigma 公司),100 u/ml 链霉素(美国 Sigma 公司),2 mmol/L 谷氨酰胺(美国 Hyclone 实验室)的 α -MEM 培养基为 MSC 基础培养基。含 1×10^{-7} mol/L 地塞米松(美国 Sigma 公司)、50 mg/L 抗坏血酸 C(美国 Sigma 公司)、10 mmol/L β -甘油磷酸钠(美国 Sigma 公司)的 α -MEM 培养基为成骨诱导培养基。

NT-3 组中加入 100 ng/ml 人 NT-3 重组蛋白(美国 RD 公司);在成骨诱导培养基中预先加入 100 mmol/L ICG-001(美国 RD 公司)作用 30 min,0.01 mmol/L 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 3 次,用 100 ng/ml NT-3 刺激者为 Wnt 抑制剂组;无刺激者为对照组。

1.2 方法

1.2.1 噻唑蓝[3-(4,5)-dimethylthiazolyl-2-(2,4,6-trimethylphenyl)tetrazolium bromide, MTT] 实验检测细胞增殖 根据 MSC 诱导实验的分组情况,将各组细胞按每孔 2×10^3 接种于 96 孔培养板,37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳 CO₂ 培养 48 h,每孔中加入 20 μ l、5 mg/ml MTT

(美国 Sigma 公司),孵育 4 h,加入 150 μ l 二甲基亚砷(美国 Sigma 公司),连续振荡 10 min 后,用 Emax 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)在 490 nm 波长检测每组样品吸光度(optical density, OD)值。

1.2.2 Western blot 检测 Caspase-3 蛋白的表达 培养每组 5×10^6 个细胞,裂解细胞,25 μ g 蛋白样品;依次经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE)凝胶电泳、转膜、封闭等步骤;一抗使用小鼠抗人 Caspase-3 抗体(1:150,英国 Abcam 公司),二抗使用辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白 G;增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)检测蛋白表达,Image-Pro Plus 6.0 软件分析各蛋白条带相对吸光度作定量计算。选用 β -actin(英国 Abcam 公司)为内参对照组。

1.2.3 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨形态发生蛋白-1(bone morphogenetic protein-1, BMP-1)的表达。 使用人 ELISA 试剂盒(美国 RD 公司)检测各实验组中 ALP、BMP-1 蛋白表达,严格按照说明书进行操作。

1.2.4 茜素红染色 各组 MSC 诱导 14 d 后,用 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 遍,4%多聚甲醛溶液固定 60 min,1%茜素红染色 15 min,再用 0.01 mol/L PBS 漂洗,IX 显微镜(日本 Olympus 公司)观察。Image-Pro Plus 6.0 软件分析各组茜素红染色的光密度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用方差分析,若方差齐则两两比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSC 细胞增殖检测结果

对照组细胞增殖的 OD 值为(0.440 \pm 0.257),NT-3 组为(0.980 \pm 0.248),Wnt 抑制剂组为(0.685 \pm 0.251),经方差分析,差异有统计学意义($F = 20.720, P = 0.000$)。NT-3 组与对照组的 MSC 增殖 OD 值比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义($t = 6.415, P = 0.001$),NT-3 组 MSC 增殖 OD 值高于对照组;Wnt 抑制剂组与 NT-3 实验组的 MSC 增殖 OD 值比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义($t = 3.547, P = 0.001$),Wnt 抑制剂组 MSC 增殖 OD 值低于 NT-3 实验组。见图 1。

2.2 MSC 细胞凋亡检测结果

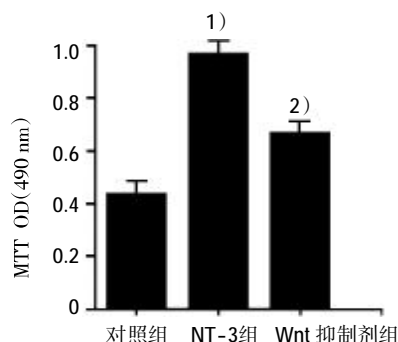
对照组 Caspase-3 蛋白相对含量为 (1.250 ± 0.254), NT-3 组为 (0.690 ± 0.239), Wnt 抑制剂组为 (0.889 ± 0.243), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=24.080, P=0.000$)。NT-3 组与对照组的 Caspase-3 蛋白相对含量比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=6.812, P=0.001$), NT-3 组 Caspase-3 蛋白相对含量低于对照组; Wnt 抑制剂组与 NT-3 组的 Caspase-3 蛋白相对含量比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=2.477, P=0.018$), Wnt 抑制剂组 Caspase-3 蛋白相对含量高于 NT-3 组。见图 2。

2.3 细胞的 ALP 和 BMP-1 的表达

对照组、NT-3 组和 Wnt 抑制剂组的 ALP、BMP-1 蛋白浓度比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P<0.01$) (见附表)。NT-3 组 ALP 和 BMP-1 蛋白与对照组比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=10.497$ 和 $19.792, P=0.001$), NT-3 组 ALP 和 BMP-1 蛋白均高于对照组; Wnt 抑制剂组 ALP 和 BMP-1 蛋白浓度与 NT-3 组比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=6.474$ 和 $10.919, P=0.001$), Wnt 抑制剂组 ALP 和 BMP-1 蛋白浓度均低于 NT-3 组。见图 3。

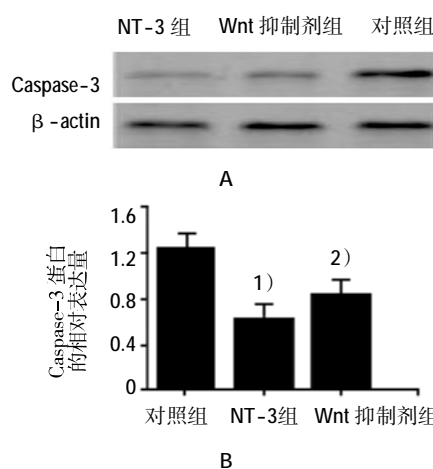
2.4 细胞茜素红染色结果

对照组茜素红染色的光密度值为 (0.426 ± 0.145), NT-3 组为 (0.857 ± 0.187), Wnt 抑制剂组为 (0.706 ± 0.159), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=$



1)与对照组比较, $P<0.01$; 2)与 NT-3 组比较, $P<0.01$

图 1 MTT 法检测各组 MSC 增殖的 OD 值

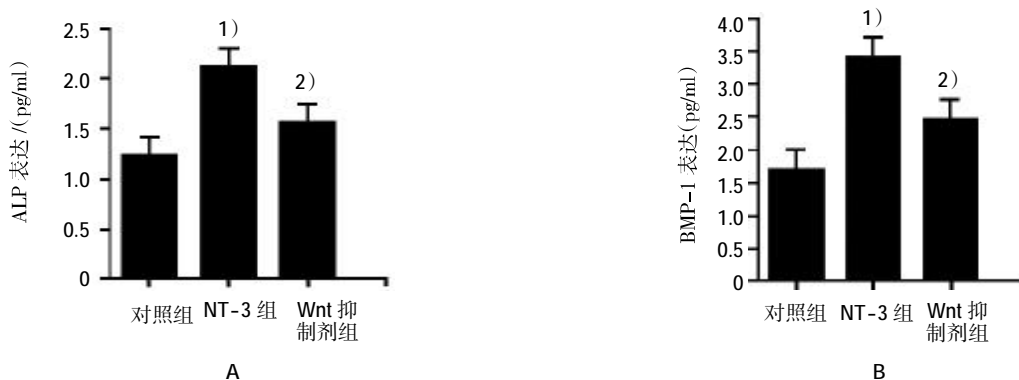


A: Western blot 检测各组 Caspase-3 蛋白的表达; B: 各组 Caspase-3 蛋白的相对含量比较; 1)与对照组比较, $P<0.01$; 2)与 NT-3 组比较, $P<0.01$

图 2 Western blot 检测各组 Caspase-3 蛋白的表达

附表 各组细胞的 ALP 蛋白浓度方差分析 ($n=18, \bar{x} \pm s$)

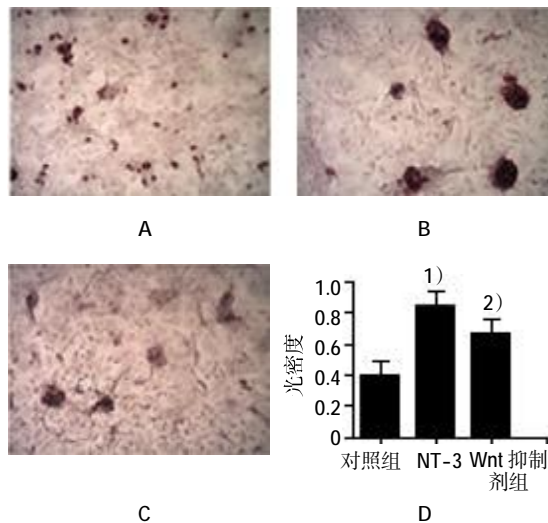
组别	ALP 蛋白浓度	F 值	P 值	BMP-1 蛋白浓度	F 值	P 值
对照组	1.255 ± 0.256			1.791 ± 0.213		
NT-3 组	2.190 ± 0.278	56.700	0.000	3.496 ± 0.297	205.920	0.000
Wnt 抑制剂组	1.605 ± 0.264			2.510 ± 0.242		



A: 各组细胞的 ALP 表达; B: 各组细胞的 BMP-1 表达; 1)与对照组比较, $P<0.01$; 2)与 NT-3 组比较, $P<0.01$

图 3 各组细胞的 ALP、BMP-1 表达

31.780, $P=0.000$)。NT-3 组茜素红染色的光密度与对照组比较,经 t 检验,差异有统计学意义($t=7.727$, $P=0.001$),NT-3 组茜素红染色的光密度高于对照组;Wnt 抑制剂组茜素红染色的光密度与 NT-3 组比较,经 t 检验,差异有统计学意义($t=2.610$, $P=0.013$),Wnt 抑制剂组茜素红染色的光密度低于 NT-3 组。见图 4。



A: 对照组 ($\times 200$); B: NT-3 组 ($\times 200$); C: Wnt 抑制剂组 ($\times 200$); D: 各组茜素红染色光密度比较; 1) 与对照组比较, $P<0.01$; 2) 与 NT-3 组比较, $P<0.01$

图 4 各组细胞茜素红染色结果

3 讨论

目前,以组织工程技术进行骨损伤的治疗方法主要有自体或异体骨移植及利用羟基磷灰石、脱钙骨等技术制作人工骨组织材料等^[9],虽然,这些方法各有优点,但同时也面临着诸如二次手术损伤、供体来源限制或存在免疫排斥反应、传播疾病、医学伦理等诸多问题^[10]。

目前,骨组织工程成为促进骨质修复的重要手段,高分子支架材料适应于 MSC 生长和骨组织的修复^[11]。MSC 广泛存在于人体骨髓、脂肪等部位,并具有向骨、软骨、血管内皮细胞等组织细胞分化的特性,被广泛应用于骨损伤、心血管系统等疾病的治疗中,并取得较好的疗效。若在 MSC 培养基中加入地塞米松、维生素 C 和 β -甘油磷酸钠,能够较好地促进 MSC 分化为成骨细胞^[12],笔者的实验以上述经典的成骨诱导培养基为基础进行实验。若单独应用 MSC 修复骨缺损,往往难以达到理想效果,MSC 向成骨细胞分化及促进成骨细胞增殖代谢等,还需要

BMP-1、表皮细胞生长因子、血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子等成骨诱导生物活性因子参与^[13-14]。如果找到合适的骨活性因子,促进 MSC 成骨能力,必将加快成骨效果,对骨损伤修复具有重大意义。

临床工作发现,缺少神经支配或神经支配减弱的骨骼容易骨折或骨质疏松,笔者考虑神经因素在骨修复中扮演极为重要的角色。神经血管病变,会使骨组织失去神经血管支配或营养,而导致骨组织重塑修复功能障碍^[15]。上述研究结果提示笔者,与其利用细胞因子单纯的促进 MSC 向成骨细胞分化,不如寻找一种能够促进神经、血管新生,并对 MSC 成骨分化具有效果的多功能细胞因子。

NT-3 作为神经营养因子家族的重要成员,能够激活 Trk C 发挥生物学效应,促进脊髓损伤平面神经元存活及其轴突再生。NT-3 还能够激活 Wnt 通路,Wnt 通路在胚胎血管、肢体等形成或发育过程中发挥重要作用。Wnt 通路活化,可以使胞质内的 β -catenin 积聚,导致下游 *Kremen*、*Ngn2*、*Pax6* 等基因高表达,促进血管内皮细胞、神经轴突等迁移,重塑肢体骨骼形成^[16-17]。同时发现,NT-3 也可有效地促进 MSC 向神经元分化^[18]。近年来发现,NT-3 与血管内皮细胞表面的 Trk C 受体结合,在血管新生的过程中发挥重要作用^[19],NT-3 修饰的 MSC 能有效地促进 MSC 增殖并分化为血管内皮细胞,加快糖尿病性小鼠皮肤溃疡的愈合^[12]。而脑源性神经营养因子、神经肽 Y、NT-4 能够促进 MSC 向成骨细胞分化^[20],但有关 NT-3 对骨组织再生及修复的研究鲜见报道。

本实验发现,NT-3 组的 MSC 增殖显著增高,而 Wnt 抑制剂组的 MSC 增殖却明显降低,提示 NT-3 与 MSC 细胞膜上 NT-3 的特异性受体 Trk C 结合,激活 Wnt 通路^[21],通过 Wnt 通路而促进 MSC 的增殖。MSC 成骨分化实验中发现,与对照组比较,NT-3 组的茜素红染色效果显著优于对照组,其钙化结节数量多,面积大,说明 NT-3 能诱导细胞聚集生长和钙盐沉积,具有明显的促 MSC 成骨作用;与 NT-3 组比较,Wnt 抑制剂组的钙化结节数量明显降低,团块状也较前者小,说明 Wnt 抑制剂组的促 MSC 成骨作用明显低于 NT-3 组。ALP 作为 MSC 早期成骨分化的指标,能够反映 MSC 成骨分化的能力。本实验发现,NT-3 组 MSC 成骨分化效果明显,ALP 表达较高,Wnt 抑制剂组 ALP 表达降低,证明 NT-3 激活 MSC 内的 Wnt 通路,促使 MSC 向成骨细胞分化,证明 NT-3 能够重新启动成骨分化机制,间接证明神经

因子在 MSC 成骨分化中的重要作用。如果在临床适当应用神经因子将加快骨折等疾病的修复和重建。也有研究发现,NT-3 尚能通过激活 Akt 通路,而促进高糖环境 MSC 旁分泌血管内皮生长因子等细胞因子^[8,12,20]。因此不排除 NT3 在促进 MSC 成骨分化的过程中,可能会存在 Akt、Erk 等信号机制^[22]。

综上所述,NT-3 能有效促进 MSC 向成骨细胞分化。NT-3 具备作为良好骨诱导活性因子和促进神经血管新生的潜质。笔者将探讨 MSC 联合生物活性因子及生物支架,开发原位诱导性生物材料,以期达到骨组织工程支架材料的优化与整合,更好地发挥神经血管源性细胞因子和 MSC 等干细胞在骨再生及修复中的作用,为骨组织工程修复的发展奠定研究基础。

参 考 文 献:

- [1] DIMITRIOU R, JONES E, MCGONAGLE D, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions [J]. BMC Med, 2011, 9: 66.
- [2] NEOFYTOU E, DEUSE T, BEYGUI R E, et al. Mesenchymal stromal cell therapy: different sources exhibit different immunobiological properties[J]. Transplantation, 2015, 99(6): 1113-1118.
- [3] SARAN U, GEMINI P S, CHATTERJEE S. Role of angiogenesis in bone repair[J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 561(2): 109-117.
- [4] MELANI M, WEINSTEIN B M. Common factors regulating patterning of the nervous and vascular systems[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2010, 26: 639-665.
- [5] TABBAA S M, HORTON C O, JERAY K J, et al. Role of vascularity for successful bone formation and repair [J]. Crit Rev Biomed Eng, 2014, 42(3/4): 319-348.
- [6] CHALAZONITIS A. Neurotrophin-3 as an essential signal for the developing nervous system[J]. Mol Neurobiol, 1996, 12(1): 39-53.
- [7] DONG Y, YANG L, YANG L, et al. Transplantation of neurotrophin-3-transfected bone marrow mesenchymal stem cells for the repair of spinal cord injury[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(16): 1520-1524.
- [8] CRISTOFARO B, STONE O A, CAPORALI A, et al. Neurotrophin-3 is a novel angiogenic factor capable of therapeutic neovascularization in a mouse model of limb ischemia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(6): 1143-1150.
- [9] GARCIA-GARETA E, COATHUP M J, BLUNN G W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration[J]. Bone, 2015, 81: 112-121.
- [10] AGARWAL R, GARCIA A J. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 94: 53-62.
- [11] SUN H, YANG H L. Calcium phosphate scaffolds combined with bone morphogenetic proteins or mesenchymal stem cells in bone tissue engineering[J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128(8): 1121-1127.
- [12] SHEN L, ZENG W, WU Y X, et al. Neurotrophin-3 accelerates wound healing in diabetic mice by promoting a paracrine response in mesenchymal stem cells[J]. Cell Transplant, 2013, 22(6): 1011-1021.
- [13] AMBIKAIPALAN A, WONG J M, KHAN W S. Preclinical and clinical studies on the use of stem cells for bone repair: a systematic review[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8(3): 210-216.
- [14] FISHER D M, WONG J M, CROWLEY C, et al. Preclinical and clinical studies on the use of growth factors for bone repair: a systematic review[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8(3): 260-268.
- [15] CHEN W H, MAO C Q, ZHUO L L, et al. Beta-nerve growth factor promotes neurogenesis and angiogenesis during the repair of bone defects[J]. Neural Regen Res, 2015, 10(7): 1159-1165.
- [16] UDARTSEVA O O, ANDREEVA E R, BURAVKOVA L B. WNT-associated gene expression in human mesenchymal stromal cells under hypoxic stress[J]. Dokl Biochem Biophys, 2015, 465(1): 354-357.
- [17] YU Q, LIU L, DUAN Y, et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(2): 297-302.
- [18] ZHANG Y Q, HE L M, XING B, et al. Neurotrophin-3 gene-modified Schwann cells promote TrkC gene-modified mesenchymal stem cells to differentiate into neuron-like cells in poly(lactic-acid-co-glycolic acid) multiple-channel conduit[J]. Cells Tissues Organs, 2012, 195(4): 313-322.
- [19] CHEN Y F, ZENG X, ZHANG K, et al. Neurotrophin-3 stimulates migration of mesenchymal stem cells overexpressing TrkC[J]. Curr Med Chem, 2013, 20(24): 3022-3033.
- [20] HE S, SHEN L, WU Y, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor on mesenchymal stem cell-seeded electrospinning biomaterial for treating ischemic diabetic ulcers via milieu-dependent differentiation mechanism[J]. Tissue Eng Part A, 2015, 21(5/6): 928-938.
- [21] KRYLOVA O, HERREROS J, CLEVERLEY K E, et al. WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons [J]. Neuron, 2002, 35(6): 1043-1056.
- [22] WANG W X, HU X Y, XIE X J, et al. Nerve growth factor induces cord formation of mesenchymal stem cell by promoting proliferation and activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(12): 1483-1490.

(童颖丹 编辑)