

研究论文

过表达S100A6对BMP9诱导的小鼠间充质干细胞C3H10T1/2成骨分化的影响

叶立伟 武睿 段亮 张昀源 杨霞 陈娴 王海燕 何通川 周兰*

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 以骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)作为诱导小鼠间充质干细胞C3H10T1/2定向成骨分化的细胞因子, 观察过表达S100A6对成骨分化的影响。用重组腺病毒AdBMP9与AdS100A6共感染C3H10T1/2细胞, 随后检测成骨分化标志物, 包括Runx2、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨桥素(osteopontin, OPN)和钙盐沉积; 检测方法包括免疫细胞化学、ALP染色、活性分析以及茜素红S染色; 同时, 用Western blot检测 β -catenin的表达。过表达S100A6对所诱导的间充质干细胞C3H10T1/2成骨分化的早期指标Runx2的蛋白水平无明显影响($P>0.05$; ICC法), 对第7天的ALP和第18天钙盐的沉积也无明显影响($P>0.05$); 但是, 能够引起第12天的OPN升高($P<0.05$); 同时, S100A6对BMP9诱导的C3H10T1/2细胞中的 β -catenin水平的影响在第3、7天不明显($P>0.05$), 但在第12天时可致 β -catenin水平下调($P<0.05$)。过表达S100A6可促进BMP9诱导的C3H10T1/2细胞中OPN的表达, 但对最终的成骨分化无明显影响。

关键词 S100A6; 骨形态发生蛋白9(BMP9); C3H10T1/2; 成骨分化; β -catenin

Effect of Overexpressed S100A6 on Osteogenic Differentiation of BMP9 Induced Mesenchymal Stem Cell C3H10T1/2

Ye Liwei, Wu Rui, Duan Liang, Zhang Yunyuan, Yang Xia, Chen Xian, Wang Haiyan, He Tongchuan, Zhou Lan*
(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To investigate the effects of S100A6 in BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cell line C3H10T1/2, C3H10T1/2 cells were co-infected with the recombinant adenovirus AdBMP9 and AdS100A6. Immunocytochemistry, alkaline phosphatase staining, activity analysis, and alizarin red S staining were used to detect the markers of osteogenic differentiation, including Runx2, alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN), and calcium deposition; Western blot was used to measure the β -catenin expression. S100A6 had neither significant effects on Runx2 protein levels at 3 d nor ALP at 7 d, and the same to calcium deposition at 18 d ($P>0.05$). But, it increased OPN at 12 d ($P<0.05$). Meanwhile, S100A6 decreased the β -catenin level at 12 d ($P<0.05$), but it didn't change the level of β -catenin at 3 d and 7 d ($P>0.05$). S100A6 over-expression can promote the OPN expression and decrease the β -catenin level in BMP9-induced C3H10T1/2 cells, but it has no significant effect on the final osteogenic differentiation.

Key words S100A6; bone morphogenetic protein 9; C3H10T1/2; osteogenic differentiation; β -catenin

收稿日期: 2012-12-03 接受日期: 2013-05-24

*通讯作者: Tel: 023-68485161, E-mail: zhoulan0111@foxmail.com

Received: December 3, 2012 Accepted: May 24, 2013

*Corresponding author: Tel: 023-68485161, E-mail: zhoulan0111@foxmail.com

网络出版时间: 2013-07-25 14:14 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130725.1414.004.html>

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是最常见的原发性骨恶性肿瘤,好发于10~14岁的青少年,在儿童恶性肿瘤中居于第八位,多见于长骨的干骺端(主要是股骨)^[1],发病隐匿,极易转移(80%的骨肉瘤患者就诊时已有转移,而X光片只能发现其中15%~20%);目前的治疗是保肢术并联合多种药物化疗;然而,OS预后并没有因积极的治疗而改善,临床随访发现只有未发生转移的部分病人可以达到无病生存,且复发和转移后的骨肉瘤对化疗药物多不敏感,因此预后极差,给病人、家庭和社会带来严重影响,而预后不良的主要原因在于对其病因和发生机制所知甚少^[2]。

目前有一种假说认为,骨肉瘤是一种间充质干细胞向成骨分化发生障碍所引起的^[2-3]。而S100A6又称为钙周期蛋白(calicyclin),是钙结合蛋白S100家族的成员之一,其基因位于人1q21,而此区带基因的扩增和/或重排常见于包括骨肉瘤在内的多种肿瘤^[4-5]。S100A6表达的变化与肿瘤的进程、恶性程度等有一定相关性^[4,5-7];而且,S100A6在骨肉瘤的表达也明显高于正常的间充质细胞^[8]。我们前期的研究还提示,S100A6可能通过影响Wnt/ β -catenin信号途径活性而抑制骨肉瘤的增殖和促进其凋亡^[9],而Wnt/ β -catenin信号途径是调节成骨分化的重要信号途径^[1,10],同时在骨肉瘤中呈现异常激活^[11-13]。因此,我们假设S100A6可能通过Wnt/ β -catenin信号途径参与成骨分化障碍的发生。为此,我们用骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导小鼠间充质干细胞C3H10T1/2的定向成骨分化^[14],研究S100A6对成骨分化过程的影响,同时观察Wnt/ β -catenin信号途径的重要分子 β -catenin在其中的变化。

1 材料与方 法

1.1 材 料

小鼠间充质干细胞C3H10T1/2、重组腺病毒AdS100A6、AdBMP9和AdGFP均由美国芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠;鼠抗人S100A6单克隆抗体、兔抗鼠Runx2多克隆抗体、鼠抗鼠OPN单克隆抗体和兔抗人 β -catenin多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司;碱性磷酸酶(ALP)定量检测试剂盒购自BD公司;Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution和Fast Blue RR salt及茜素红S购自Sigma公司;免疫组化试剂盒及DAB试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

C3H10T1/2用含10%胎牛血清(Hyclone公司)、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL硫酸链霉素的DMEM/High Glucose培养基(Hyclone公司)在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件下培养,待其贴壁生长至70%~80%融合率时,用含0.25%的胰酶消化,进行传代。

1.3 实验分组

实验分组:(1)空白组:不施加任何处理因素的C3H10T1/2细胞;(2)实验对照组:AdBMP9组、AdS100A6组、AdBMP9+AdGFP共感染组、AdS100A6+AdGFP共感染组;(3)实验组:AdBMP9+AdS100A6共感染组。实验至少重复3次。

1.4 碱性磷酸酶染色及活性分析

将细胞按 1×10^4 /孔的细胞量接种于24孔细胞培养板中,用AdBMP9或AdGFP感染细胞,感染效率约为30%~40%,感染6~8 h后换液,再加入AdS100A6和AdGFP,6~8 h后换液此时开始计时。C3H10T1/2细胞按实验分组设计进行诱导分化,7天后,弃去培养基,做碱性磷酸酶染色,并用化学发光法检测ALP的活性,具体操作见参考文献[15];光镜下观察结果,扫描仪扫描24孔板,留存结果,Image-pro Plus 6.0分析结果。

1.5 免疫细胞化学

将细胞按 5×10^3 /孔的细胞量接种于24孔细胞培养板中,按实验分组加入处理因素。在24 h、3天、12天分别检测细胞中S100A6(抗体浓度1:100)、Runx2(抗体浓度1:80)、OPN(抗体浓度1:200)的表达,具体操作见北京中杉金桥公司免疫组化试剂盒说明书。胞浆中有棕黄色颗粒为阳性。Image-pro Plus 6.0分析结果。

1.6 钙盐沉积实验

C3H10T1/2细胞按实验设计进行诱导分化,并在培养基中加入终浓度为50 μ g/mL的维生素C和10 mmol/L的 β -磷酸甘油,连续培养18天后进行茜素红S染色,具体操作见参考文献[17],显微镜下观察钙结节的形成情况,成像,留存结果。

1.7 RT-PCR

C3H10T1/2细胞按实验设计进行诱导分化3、7、12天后,从CO₂培养箱中取出,PBS洗2次,提取细胞总RNA,微量检测仪检测RNA的浓度,计算逆转录的RNA用量,即时进行cDNA转化;以合成的cDNA为模版进行PCR扩增,mouse β -catenin引物上

游: AAG TTC TTG GCT ATT ACG ACA, 下游: ACA GCA CCT TCA GCA CTCT, Tm值为55.5 °C, 28个循环; mouse GAPDH RT-PCR引物上游: GGC TGC CCA GAA CATC AT, 下游: CGG ACA CAT TGG GGG TAG, Tm值为53 °C, 28个循环。1.5%的琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物, 凝胶成像仪采集图像; Quantity One 4.5.0软件测定各条带的灰度值。

1.8 Western blot

C3H10T1/2细胞按实验设计进行诱导分化3、7、12天后, 从CO₂培养箱中取出, PBS洗2次, 提取细胞总蛋白, 分光光度法测蛋白浓度, 以200 μg/孔的量上样, 兔抗人β-catenin多克隆抗体(稀释度: 1:1 000), ECL成像, Quantity One 4.6.2分析条带的灰度值。

1.9 计学分析

数据经Excel表汇总, 以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 统计学分析用SPSS 16.0软件处理, 两组间比较采用 t 检验, 两组以上比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒携带的S100A6基因在C3H10T1/2细胞中成功表达

荧光显微镜下观察: AdGFP和AdS100A6分别感染C3H10T1/2细胞24 h, 荧光显微镜下观察, 表达绿色荧光蛋白的细胞数均约30%~40%(图1)。

ICC法示AdS100A6感染的细胞中S100A6的表达水平明显高于对照组, IPP软件量化分析发现, 其

表达量是GFP组的(3.56±0.78)倍($P<0.001$)。表明重组腺病毒携带的S100A6在被感染的C3H10T1/2细胞中成功表达(图1)。

2.2 S100A6对BMP9诱导的C3H10T1/2细胞早期成骨分化指标RUNX2的表达无影响

RUNX2是间充质干细胞成骨分化的一个经典的检测指标, 且比ALP出现得更早。本实验用AdBMP9与AdS100A6同时作用3天后, 用免疫细胞化学检测RUNX2的表达。如图2所示, BMP9可致细胞中RUNX2的表达增加, 且多在胞核; 经IPP软件分析棕色颗粒的平均光密度值(average optical density, AOD)和SPSS统计后发现, BMP9+S100A6组与BMP9+GFP组之间无明显差异($P>0.05$), 而空白组、S100A6组及S100A6+GFP组未见RUNX2的表达。

以上结果提示: S100A6对BMP9所诱导的C3H10T1/2细胞早期成骨分化指标RUNX2的表达无明显影响。

2.3 S100A6对BMP9诱导的C3H10T1/2细胞早期成骨分化指标碱性磷酸酶无明显影响

从图3A可以看出, BMP9组、BMP9+S100A6组和BMP9+GFP组的碱性磷酸酶(ALP)染色为阳性, 但是BMP9+S100A6组与BMP9+GFP组之间的染色强度无差异($P>0.05$)。

碱性磷酸酶活性分析显示(图3B), BMP9组、BMP9+S100A6组和BMP9+GFP组同样出现ALP的活性升高, 但BMP9+S100A6组与BMP9+GFP组之间的差异并无统计学意义($P>0.05$)。

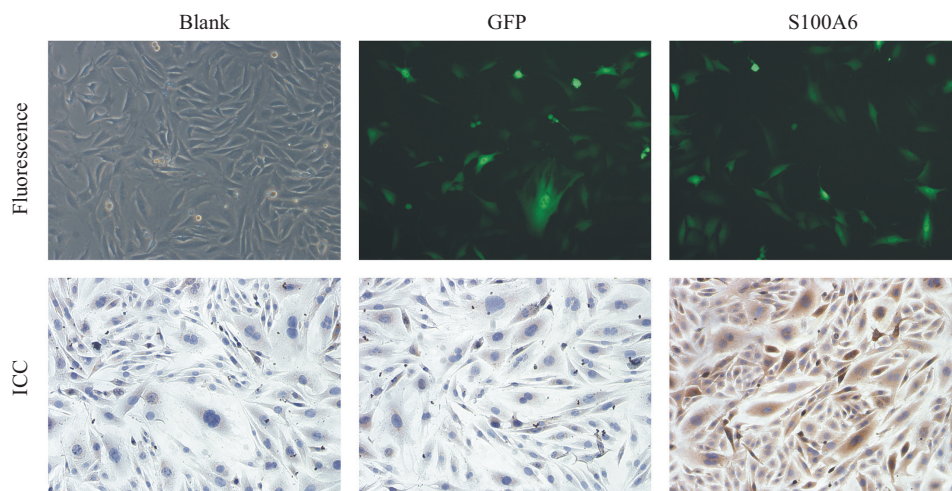


图1 重组腺病毒AdGFP和AdS100A6感染C3H10T1/2细胞后S100A6的表达增加
Fig.1 Increased expression of S100A6 in C3H10T1/2 cells infected by AdS100A6

2.4 S100A6与BMP9同时作用促进C3H10T1/2细胞中OPN的表达

干预12天后ICC检测,发现细胞中OPN的表达增加。镜下观察和IPP分析发现,BMP9组、BMP9+S100A6组和BMP9+GFP组中,OPN均为阳性(图4),但BMP9+S100A6组较BMP9+GFP组明显增高,前者是后者的(1.89±0.34)倍($P<0.01$)。

干预12天后分别提取细胞的总蛋白,检测其中OPN的水平。图4中可见,OPN在各组均有表达,在BMP9组、BMP9+S100A6组和BMP9+GFP组的表达

较其他三组均高,而在BMP9+S100A6组的表达量最高,是BMP9+GFP组的(1.78±0.45)倍($P<0.01$)。

ICC与Western blot结果一致提示:S100A6与BMP9同时作用可以促进C3H10T1/2细胞中OPN的表达。

2.5 S100A6对BMP9所诱导的C3H10T1/2细胞晚期成骨分化指标钙盐沉积无影响

钙盐沉积是细胞成骨分化的另一个经典的、比ALP和OPN更晚期的指标。茜素红S染色发现:在BMP9组、BMP9+GFP组和BMP9+S100A6组中红色

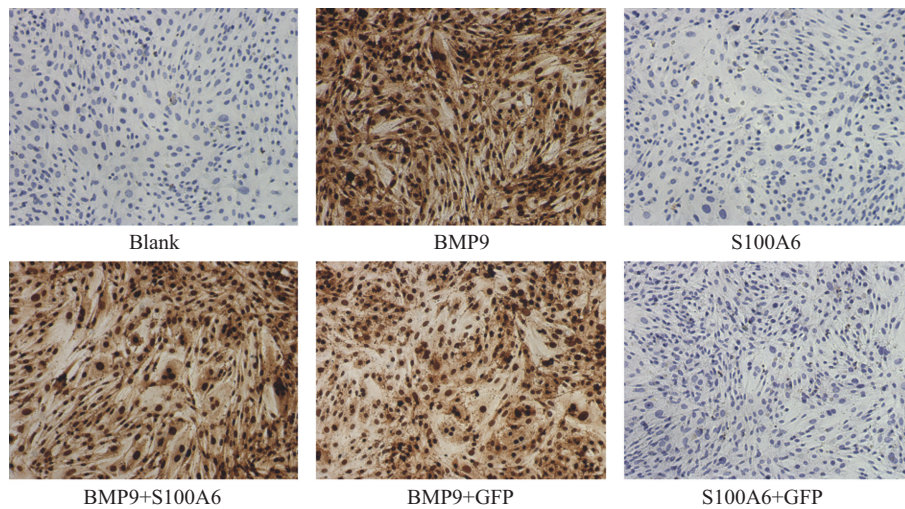
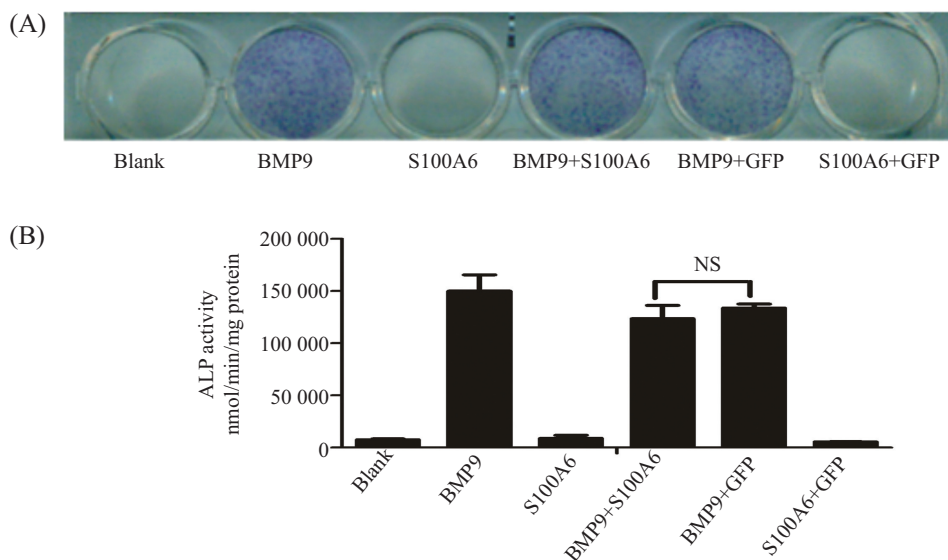


图2 S100A6对BMP9所诱导的C3H10T1/2细胞早期成骨分化标志物RUNX2的影响(ICC, 100×)

Fig.2 Over-expressed S100A6 had no effect on early osteogenic differentiation marker RUNX2 in BMP9-induced C3H10T1/2 cells (ICC, 100×)

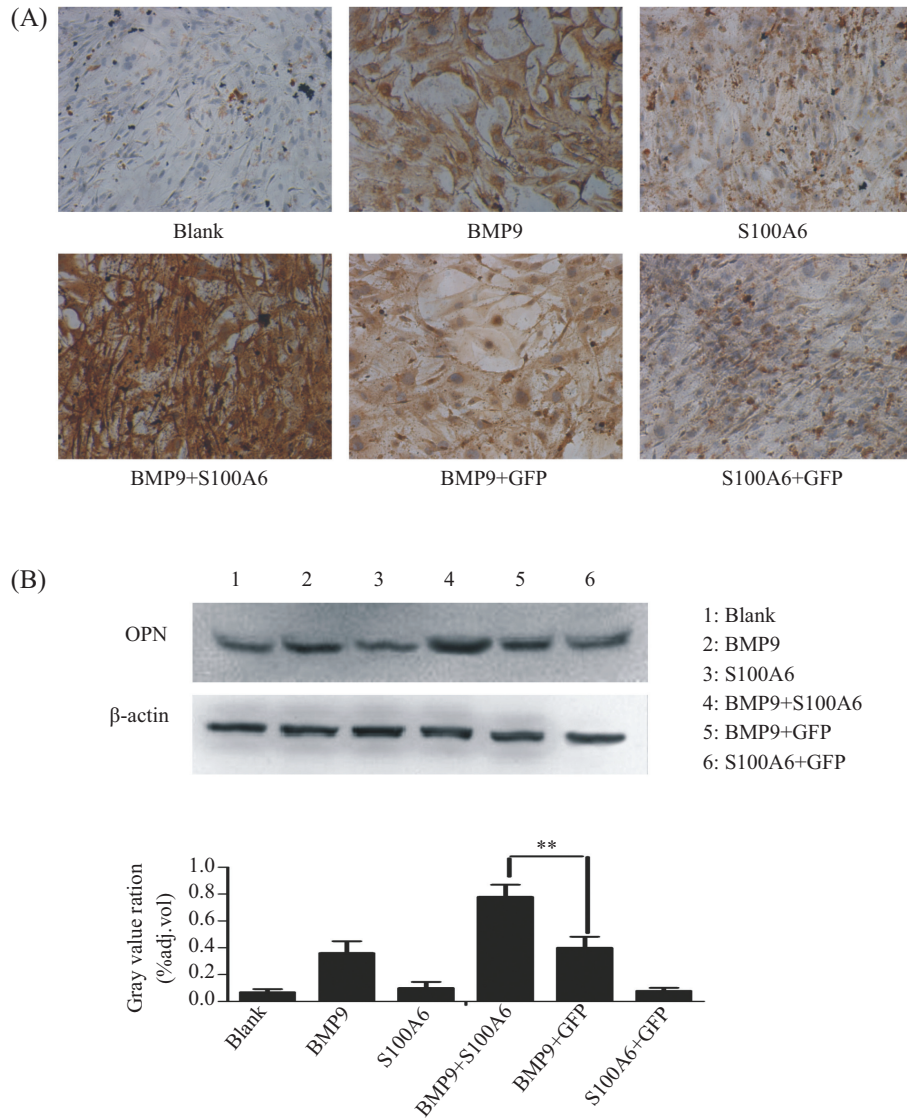


A: 碱性磷酸酶染色; B: 碱性磷酸酶活性分析(化学发光法, NS, $P>0.05$)。

A: histochemical staining of ALP activity at 7 d; B: ALP activity detected by quantitative assay at day 7 ($P>0.05$ compared with BMP9+GFP group).

图3 S100A6对BMP9所诱导的C3H10T1/2细胞早期成骨分化指标碱性磷酸酶的影响

Fig.3 Role of overexpressed S100A6 on BMP9 induced ALP, early osteogenic differentiation index of C3H10T1/2 cells



A: 免疫细胞化学染色, 100 \times ; B: Western blot, $**P < 0.01$ 。

A: immunocytochemistry staining, 100 \times ; B: Western blot, $**P < 0.01$.

图4 S100A6对BMP9所诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化指标OPN的影响

Fig.4 Over-expressed S100A6 increased the expression of OPN in BMP9 induced osteogenic differentiation could be observed in the C3H10T1/2 cells by ICC and Western blot

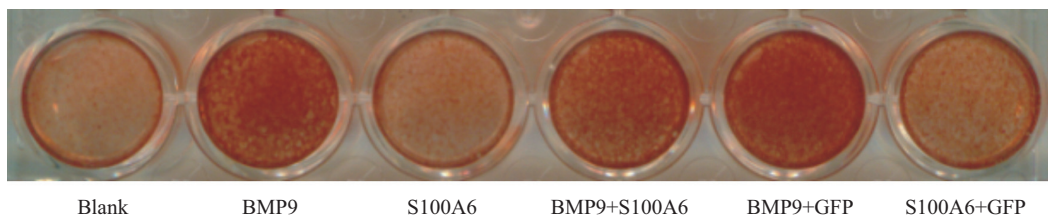
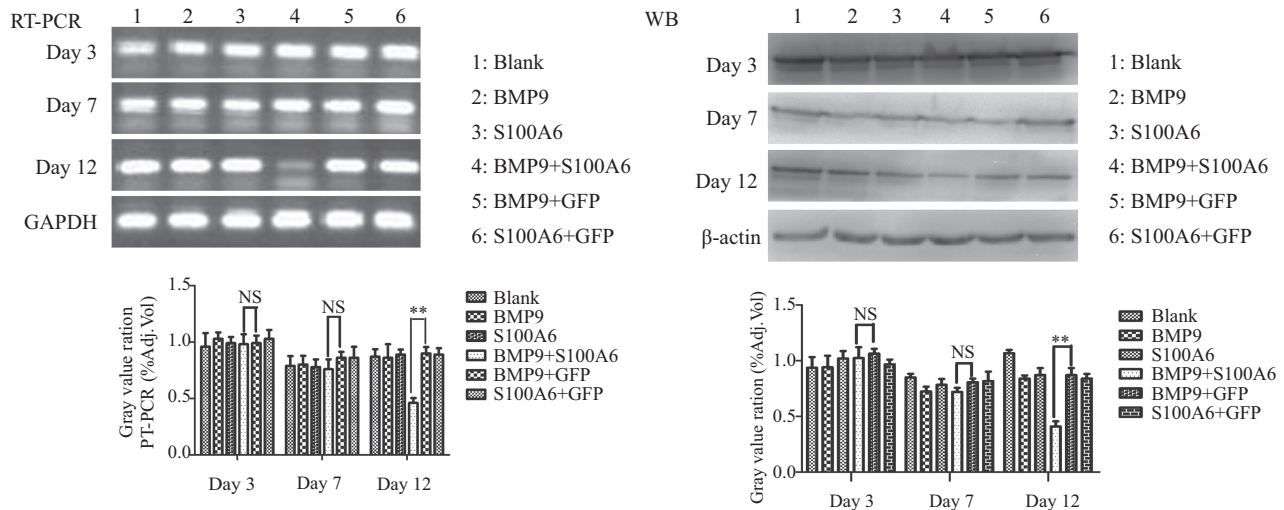


图5 S100A6对BMP9所诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化晚期指标钙盐沉积的影响(茜素红S染色, $P > 0.05$)

Fig.5 Role of overexpressed S100A6 on BMP9 induced late osteogenic differentiation marker of Calcium precipitation in C3H10T1/2 cells (alizarin red S staining, $P > 0.05$)

钙盐结节明显增加(图5), 提示BMP9的存在促进了C3H10T1/2细胞晚期的成骨分化而使钙盐沉积增加, 但是在BMP9+S100A6组与BMP9+GFP组之间未见

差异; 空白组、S100A6组、S100A6+GFP组也可以见到少量的红色钙盐结节形成, 这可能与培养基中的维生素C和 β -磷酸甘油的作用有关。茜素红S染色



** $P < 0.01$.

图6 S100A6对BMP9诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化过程中 β -catenin表达量的影响

Fig.6 The effects of S100A6 on the levels of β -catenin expressed in BMP9-induced C3H10T1/2 cells detected by RT-PCR and Western blot

提示: S100A6对BMP9所诱导的C3H10T1/2细胞钙盐沉积无明显影响($P > 0.05$)。

2.6 S100A6降低BMP9诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化晚期的 β -catenin水平

腺病毒感染3、7、12天后分别提取细胞的总RNA和总蛋白, RT-PCR和Western blot分别检测其中 β -catenin的mRNA和蛋白表达水平。二者结果一致, 在第3和第7天, 无论是BMP9还是S100A6或二者共同作用均对 β -catenin的水平无明显影响($P > 0.05$); 但在第12天BMP9+S100A6组较BMP9+GFP组mRNA和蛋白水平分别降低($46.79 \pm 2.56\%$) ($P < 0.01$)和($44.56 \pm 5.71\%$) ($P < 0.01$), 而在其他组无论是BMP9或S100A6均不能引起 β -catenin的表达量发生明显变化(图6)。提示S100A6可以抑制BMP9诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化晚期 β -catenin的水平。

3 讨论

目前, 主要是用RUNX2、ALP、OPN和钙盐沉积作为监测成骨分化的过程, 而BMP9是目前认为成骨活性最强的因子之一^[14-15]。本实验以BMP9作为诱导定向成骨分化的细胞因子, 观察到表达S100A6对成骨分化的影响。在实验中, 我们观察到S100A6对早期成骨分化指标Runx2和ALP都无明显影响, 但S100A6可以上调中末期的OPN的表达, 但对钙盐沉积并没有明显的影响, 这可能与此时期 β -catenin的

下调有关, 因为在成骨的晚期Wnt/ β -catenin信号主要作用是与BMP一起共同促进细胞的进一步分化和矿化^[10]。所以当OPN上调和 β -catenin下调同时出现时, 可能导致两者的作用相互抵消, 使成骨分化的总趋势不变。

此外, 虽然现在的研究多赞同骨肉瘤是一种间充质干细胞成骨分化障碍性疾病这一观点^[2-3], 但是癌症的发展是多因素、多步骤的过程, 其中涉及多个基因突变, 比如大肠癌^[17], 从细胞向癌变演进(正常上皮细胞 \rightarrow 腺瘤 \rightarrow 癌)的过程, 其中涉及癌基因激活(*K-ras*、*c-myc*、*EGFR*)、抑癌基因失活(*APC*、*DCC*、*p53*)、错配修复基因突变(*HMSH1*、*PMS1*、*PMS2*、*GTBP*)及基因的危险修饰(*COX-2*、*CD44-v*)。APC基因失活致杂合性缺失, 错配修复基因突变致基因不稳定, 导致遗传性非息肉病结肠癌综合征(hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)的出现; 而*p53*和*DCC*突变才使得晚期腺瘤转变成癌。因此我们推测, 单纯的改变一个因素例如S100A6虽然可以影响成骨分化的某一个过程, 而最终能否发展成癌也要看这因素在癌变过程中是否起关键作用。

致谢——

衷心感谢美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤实验室何通川教授。

参考文献 (References)

- 1 Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2004; 93(6): 1210-30.
- 2 Wagner ER, Luther G, Zhu G, Luo Q, Shi Q, Kim SH, *et al.* Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma. *Sarcoma* 2011; 2011: 325238.
- 3 Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466(9): 2114-30.
- 4 Leśniak W, Słomnicki ŁP, Filipek A. S100A6 - new facts and features. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390(4): 1087-92.
- 5 Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, von Eggeling F. Colon-derived liver metastasis, colorectal carcinoma, and hepatocellular carcinoma can be discriminated by the Ca(2+)-binding proteins S100A6 and S100A11. *PLoS One* 2008; 3(12): e3767.
- 6 Yang YQ, Zhang LJ, Dong H, Jiang CL, Zhu ZG, Wu JX, *et al.* Upregulated expression of S100A6 in human gastric cancer. *J Dig Dis* 2007; 8(4): 186-93.
- 7 Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC, Rehman I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* 2005; 46(3): 256-69.
- 8 Luo X, Sharff KA, Chen J, He TC, Luu HH. S100A6 expression and function in human osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466(9): 2060-70.
- 9 陈英华, 卫佳, 李星星, 吴丽美, 马闻, 张彦, 等. 外源性S100A6对人骨肉瘤细胞株U2OS的增殖、凋亡及 β -catenin表达的影响. *重庆医科大学学报*(Chen Yinghua, Wei Jia, Li Xingxing, Wu Limei, Ma Wen, Zhang Yan, *et al.* Effect of exogenous S100A6 on human osteosarcoma cell line U2OS proliferation, apoptosis and β -catenin expression. *Journal of Chongqing Medical University*) 2009; 34(7): 817-21.
- 10 Itasaki N, Hoppler S. Crosstalk Between. Wnt and bone morphogenetic protein signaling: A turbulent relationship. *Dev Dyn* 2010; 239(1): 16-33.
- 11 Dieudonné FX, Marion A, Hay E, Marie PJ, Modrowski D. High Wnt signaling represses the proapoptotic proteoglycan syndecan-2 in osteosarcoma cells. *Cancer Res* 2010; 70(13): 5399-408.
- 12 Haydon RC, Deyrup A, Ishikawa A, Heck R, Jiang W, Zhou L, *et al.* Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. *Int J Cancer* 2002; 102(4): 338-42.
- 13 Leow PC, Tian Q, Ong ZY, Yang Z, Ee PL. Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/ β -catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Invest New Drugs* 2010; 28(6): 766-82.
- 14 Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, *et al.* Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(8): 1544-52.
- 15 赵丹, 罗进勇. BMP9促进间充质干细胞C3H10T1/2成骨分化的研究. *临床和实验医学杂志*(Zhao Dan, Luo Jinyong. The promotive effect of BMP9 in osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*) 2011; 10(16): 1225-6.
- 16 Luu HH, Song WX, Luo X, Manning D, Luo J, Deng ZL, *et al.* Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2007; 25(5): 665-77.
- 17 郑树, 汪建平. *外科学*, 第6版. 北京: 人民卫生出版社(Zheng Shu, Wang Jianping. *Surgery*, 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House Co. LTD) 2006, 510-5.