

研究论文

钙离子通道亚基 *Cacnb3* 对小鼠脂肪间充质干细胞成骨分化的促进作用

伏玺 王峰*

(天津医科大学基础医学院遗传学系, 天津 300070)

摘要 间充质干细胞在治疗骨相关疾病中具有重要意义, 但在成骨分化中的机制尚未完全阐明。该研究通过分析GEO数据库中有关组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACi)处理过的小鼠成骨前体细胞(MC3T3-E1 preosteoblasts)的生物芯片数据, 筛选出22个在成骨分化中上调, 在成脂分化中下调, 且受HDACi紧密调控的基因。这22个基因中有6个基因(*Cacnb3*、*Lpcat2*、*Cd248*等)与Ca²⁺调节功能相关, 提示Ca²⁺可能在MSCs分化中发挥重要作用。在后续实验中, 我们观察到电压依赖性钙通道亚单位β3(calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 3, *Cacnb3*)和磷脂酰基转移酶2(lysophosphatidylcholine acyltransferase 2, *Lpcat2*)在小鼠脂肪间充质干细胞(ADSCs)、人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)和小鼠成骨前体细胞(MC3T3-E1)的成骨分化过程中上调, 提示*Cacnb3*、*Lpcat2*可能参与ADSCs的体外成骨分化。此外, 利用钙离子荧光探针检测方法, 发现敲低*Cacnb3*后3T3-E1细胞内Ca²⁺浓度明显低于对照组, 同时, 成骨相关基因(*ALP*、*Runx2*)表达显著下调, 表明*Cacnb3*可能通过影响Ca²⁺浓度调控细胞的成骨分化, 该研究为进一步探索间充质干细胞成骨分化的机制奠定了基础。

关键词 脂肪组织; 间充质干细胞; 钙离子; 细胞分化; 基因表达谱

Promoted Role of Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Beta 3 in the Osteogenic Differentiation of Mouse Adipose-Derived Stem Cells

Fu Xi, Wang Feng*

(Department of Genetics, School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Mesenchymal stem cells(MSCs) play an important role in the treatment of bone-related diseases, but their mechanisms in osteogenic differentiation have not been fully elucidated. Here, Gene expression profiles related to vehicle-treated cells were assessed by microarray analysis. 22 genes were screened out based on their expression profiles, which were up-regulated in osteogenic differentiation, down-regulated in adipogenic differentiation and under tightly control of HDACi treatment. Interestingly, 6 genes (including *Cacnb3*, *Lpcat2*, *Qpct*, etc.) of

收稿日期: 2019-03-05 接受日期: 2019-05-28

国家重点研发计划(批准号: 2017YFC1001904)、国家自然科学基金(批准号: 91649102、31771520、31471293、81772243、21177091)和天津市自然科学基金(批准号: 17JCYBJC42700)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18822695897, E-mail: wangf@tmu.edu.cn

Received: March 5, 2019 Accepted: May 28, 2019

This work was supported by the Ministry of Science and Technology (Grant No.2017YFC1001904), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91649102, 31771520, 31471293, 81772243, 21177091) and the Natural Science Foundation of Tianjin City (Grant No.17JCYBJC42700)

*Corresponding author. Tel: +86-18822695897, E-mail: wangf@tmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-09-12 15:58:12 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190912.1557.052.html>

these 22 genes are associated with calcium regulation, suggesting that calcium ions may play an important role in MSCs differentiation. In subsequent experiments, we observed that *Cacnb3* and *Lpcat2* were up-regulated during the osteogenic differentiation of several types of cells, including mouse adipose mesenchymal stem cells (ADSCs), human mesenchymal stem cells (hBMSCs) and MC3T3-E1 pre-osteoblasts. It is suggested that *Cacnb3* and *Lpcat2* might play an important role in the osteogenic differentiation of ADSCs and may promote osteogenic differentiation of ADSCs *in vitro*. In addition, we found that the intracellular calcium ion concentration was significantly lower than that of the control group after knocking down *Cacnb3* with calcium ion fluorescence probe, and the expression of osteogenic related genes (*ALP*, *Runx2*) was significantly down-regulated, which indicated that *Cacnb3* may affect the osteogenic differentiation of cells by the change of Ca^{2+} concentration. This study laid the foundation for further exploring the mechanism of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.

Keywords adipose tissue; mesenchymal stromal cells; calcium ion; cell differentiation; gene expression profiles

退行性疾病、手术、创伤、遗传变异会造成骨丢失或骨损伤等症状,这严重影响了患者的生活质量^[1-2]。成骨不全症又称脆骨症,是一类常染色体显性遗传的结缔组织疾病,主要临床特征表现为骨密度降低、骨骼发育性畸形、骨骼脆性增加并反复骨折,同时也可累及眼、耳、皮肤、牙齿等,出现蓝巩膜、耳聋、皮肤异常以及牙本质发育不全等临床症状^[3]。目前,临床上主要的治疗方法有药物治疗、外科手术治疗等^[4-5],但存在治疗周期较长、治愈率低下、患者痛苦等诸多局限。骨具有自身修复的内在能力,但在许多情况下,骨完全再生是不可能发生的,需要相应的刺激,才能完成修复^[6]。之前患有骨缺损的患者往往通过接受骨移植或替代治疗^[7],在临床中所应用的标准接骨方法有自体骨或异体骨移植^[8-9]。近年来发展起来的骨组织工程技术为骨缺损修复提供了一项新的选择,其主要受种子细胞、支架材料和生长因子等多种因素影响^[10-11],而寻找适合的种子细胞也成为组织工程技术成功的关键所在。近年来,研究发现,通过分离脂肪可获得大量的间充质干细胞,其被称为脂肪源性间充质干细胞(ADSCs),这种细胞能向多种细胞定向诱导分化,并可作为多种组织工程的种子细胞,在组织工程领域应用广泛^[12-13]。

在骨代谢的调节中,激素和细胞因子发挥了重要作用。其中激素包括甲状旁腺激素(parathyroid Hormone, PTH)、降钙素、 $1-\alpha,25$ 双羟维生素D3和雌激素等;细胞因子包括转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)、粒细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, MCSF)、表

皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、内皮素-1(endothelin-1)、血凝素(thrombin)和前列腺素E1(prostaglandin E1)等^[14]。研究发现,PTH可通过调控钙离子通道影响细胞的 Ca^{2+} 水平,进而调控成骨和骨吸收^[15],证实 Ca^{2+} 在骨形成过程中发挥极为重要的作用。

有研究表明,高水平的 Ca^{2+} 通过刺激成骨细胞增殖、趋化、分化和矿化来调节骨形成。此外,细胞外 Ca^{2+} 可激活钙感受体(CaSR),通过PLC/IP3途径激活细胞内 Ca^{2+} 的释放。CaSR在不同类型的成骨细胞中均有功能表达,对成骨细胞的生长、分化和矿化具有重要意义,此外,破骨细胞的表面也表达钙感受体,能够感受细胞内外 Ca^{2+} 水平的变化,因此,CaSR在骨重塑的调控和机体钙稳态的维持中均发挥了至关重要的作用^[16]。

电压门控钙通道能够调控 Ca^{2+} 内流, Ca^{2+} 作为电信号的第二信使,能够启动许多不同的细胞事件。电压门控的钙离子通道(voltage gated calcium channel, VGCC)一般可分为L、N、P和T四种亚型。成骨细胞中主要包括L型和T型钙离子通道。典型的VGCC是由 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2/\delta$ 、 β 和 γ 中3个以上亚单位构成的复合体。其中 $\beta 3$ 由*Cacnb3*基因编码,属于电压门控钙通道的调节亚单位,可产生L型钙电流,并能增加CACNA1B、CACNA1C的峰值钙电流^[17]。敲除*Cacnb3*可导致钙转运的调节异常,影响肾对 Ca^{2+} 的吸收^[18]。

目前关于钙离子通道相关蛋白影响成体干细胞成骨分化的研究较少,尤其是鼠源性成体干细胞上的研究还未见报道。因此钙离子通道相关蛋白通过影响细胞内钙离子水平进而促进成骨的分子机制

仍需进一步研究。本研究将探索*Cacnb3*等钙离子通道相关蛋白对ADSCs体外成骨分化的影响,为进一步探索间充质干细胞的成骨分化机制奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞和芯片数据

小鼠成骨前体细胞系MC3T3-E1、人骨髓间充质干细胞hBMSCs均由本实验室保存。

表达谱芯片数据来源于美国国立生物技术信息中心(NCBI) GEO数据库,编号分别为GSE9247和GSE79815,其中GSE9247生物芯片为MC3T3-E1前成骨细胞在组蛋白去乙酰化酶抑制HDACi(trichostatin A, MS-275, VPA)或DMSO成骨诱导处理18 h的结果,收集该生物芯片样本。GSE79815表达谱数据是骨髓来源的间充质干细胞在成骨或成脂诱导培养基中分化至第7天或第15天,随后用空载体或100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃处理细胞24 h,最后进行mRNA提取和测序以及ChIP实验、文库构建、测序的结果。总样本有168个,包含24个RNA-seq样本,144个ChIP-seq样本。数据集分别由GPL1261和GPL13112这两个芯片平台采集。

1.2 试剂和仪器

FITC-CD45、PE-CD44、PE-CD29、PE-Sca1抗体购自美国Thermo Fisher公司; α -MEM购自美国Hyclone公司; 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶购自美国Gibco公司; β -甘油磷酸钠、地塞米松、维生素C购自美国Sigma公司; DEPC水购自北京天根生化科技有限公司; 青-链霉素双抗、I型胶原酶、4%多聚甲醛购自北京索莱宝科技有限公司; Opti-MEM无血清培养基购自美国Gibco公司; 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 茜素红购自美国赛业公司; Trizol Reagent购自美国Invitrogen公司; RNA逆转录试剂盒、SYBR Green荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自南京诺维赞生物科技有限公司。

普通PCR仪购自美国ABI公司; 流式细胞仪购自美国Thermo公司; 全自动反转录聚合酶链反应(RT-PCR)仪购自德国QIAGEN公司; 荧光倒置显微镜购自日本Nikon公司; NanoDrop 2000购自美国Thermo公司; *Cacnb3* siRNA、对照siRNA(Control siRNA)、转染试剂siRNA-Mate购自苏州吉玛基因有限公司; C57BL/6小鼠购自北京维通利华实验动

物有限公司。

1.3 数据处理及差异基因分析

原始数据集采用DECenter软件进行数据处理。处理后的数据采用差异倍数(fold change, FC)和FDR(false discovery rate)进行差异基因筛选,定义 $FC \geq 1.2$, $FDR < 0.05$ 为有效基因。筛选3组数据集中共有有效基因作为最终差异表达基因进行后续分析,将3种HDACi所影响的共有基因与成骨基因集做合集分析。

1.4 小鼠ADSCs的原代培养

取5~6周龄C57BL/6小鼠腋下、腹股沟皮下和附睾外的白色脂肪组织,放置在含双抗的PBS中,用剪刀将脂肪充分剪碎; 0.08% I型胶原酶37 °C恒温摇床消化40 min; 消化结束后,迅速向离心管中加入15%胎牛血清的 α -MEM细胞培养基终止消化,用40 μ m的细胞筛过滤脂肪-培养基混合液; 将过滤好的液体放置于离心机中1 500 r/min离心5 min; 弃上清,完全培养基重悬后,接种于10 cm²培养皿中。将ADSCs置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。72 h换半液,96 h换全液,并在倒置显微镜下观察细胞生长情况,待细胞贴壁融合80%左右时进行传代培养。

1.5 流式细胞术检测ADSCs表面标志物

采用第3代ADSCs, 10⁶个细胞重悬于100 μ L PBS中,充分吹打至单细胞悬液,分别加入流式抗体1 μ L FITC-CD45、PE-CD44、PE-CD29和PE-Sca1, 4 °C孵育30 min, PBS洗去未标记抗体,并加入500 μ L PBS重悬细胞。以不加抗体作为阴性对照。流式细胞仪检测细胞表型,采用FlowJo10软件进行分析。

1.6 体外成骨分化

采用第3代ADSCs,以2 \times 10⁵个/孔的密度接种于6孔板,当细胞贴壁后融合率为70%~80%后,更换为成骨诱导液(10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/mL 抗坏血酸、10⁻⁷ mmol/L地塞米松、10% FBS的细胞培养基)。用成骨诱导培养基进一步诱导分化,于成骨诱导后的第7天取样,后续进行相关实时定量PCR(qRT-PCR)检测; 分别于成骨诱导后的第14天和21天时,用ALP染色和茜素红染色检测钙化情况和矿化基质的产生。

1.7 ALP染色和茜素红染色

采用碧云天ALP染色试剂盒,按照产品说明书进行ALP染色实验。采用茜素红染色检测诱导后期的钙化,用PBS洗涤6孔板中的细胞2~3次,4%多聚甲醛

溶液固定30 min, 加入茜素红染液室温下染色5 min, 弃染液, 用PBS洗涤2次后进行倒置显微镜下观察染色情况, 并拍照记录。

1.8 实时荧光定量核酸扩增检测系统(Real-time quantitative PCR detecting system)

检测mRNA表达: 按实验分组处理细胞7天, 使用Trizol Reagent提取细胞总RNA, Nano Drop 2000检测RNA浓度及纯度, 取1 μ g RNA为模板, 使用RNA逆转录试剂盒逆转录为cDNA。SYBR Green染料法, 以*GAPDH*为内参进行实时荧光定量PCR检测, 每个样本设3个复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算结果。引物序列见表1。

1.9 MC3T3-E1 细胞的转染

设计并合成*Cacnb3* siRNA及Control siRNA。*Cacnb3* siRNA的序列为: 正义链5'-GCA CCU GGC UGA AUA CUU ATT-3', 反义链5'-UAA GUA UUC AGC CAG GUG CTT-3'。Control siRNA的序列为: 正义链5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3', 反义链5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。在MC3T3-E1细胞的转染中, 以转染*Cacnb3* siRNA

为实验组, 而转染Control siRNA为对照组。在转染实验之前的18~24 h, 6孔板中各孔分别加入 2×10^5 个MC3T3-E1细胞(确保转染时细胞密度在30%~50%)。配制转染体系: 无菌的1.5 mL EP管中分别依次加入200 μ L Opti-MEM无血清培养基、100 pmol(1 400 ng)待转染的siRNA、10 μ L siRNA-Mate 转染试剂, 快速涡旋10 s使其完全混匀; 室温静置10 min, 使siRNA和转染试剂形成转染复合物。将静置完毕的200 μ L转染复合物加入已换新鲜培养基的孔中, 终体系为1 700 μ L, siRNA终浓度为66.7 nmol/L。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中静置培养细胞, 转染24 h后更换新鲜的 α -MEM完全培养基。48 h内收集样本检测基因mRNA表达水平。

1.10 细胞内钙离子水平检测

待检测的细胞, 去除培养基后用PBS洗3次。加入1 mL Fluo-4 AM工作液(5 μ mol/L), 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min; 随后用PBS洗涤3次, 使用倒置荧光显微镜检测Fluo-4的荧光, 观察细胞内钙离子染色情况, 拍照记录。使用ImageJ软件进行荧光密度分析, 并对每组数值进行统计分析。

表1 实验中所用的引物序列

Table 1 The sequences of primers used in experiments

编码基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物长度(bp) Product (bp)	基因编号 Genebank accession
<i>GAPDH</i> (mouse)	Forward 5'-GGT TGT CTC CTG CGA CTT CA-3'	183	NM_008084
	Reverse 5'-TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC-3'		
<i>Cacnb3</i> (mouse)	Forward 5'-GGT TCA GCC GAC TCC TAC AC-3'	132	NM_007581.3
	Reverse 5'-AGG TTT GTG CTT GGC TCT TTC-3'		
<i>Lpcat2</i> (mouse)	Forward 5'-CCC TTC GTC CAG CAG ACT AC-3'	109	NM_173014.2
	Reverse 5'-GCA GCA AAA TTA TTC CAA CCA GT-3'		
<i>Runx2</i> (mouse)	Forward 5'-GCA GCA GCA GCA GCA GGA G -3'	182	NM_001146038.2
	Reverse 5'-GCA CGG AGC ACA GGA AGT TGG-3'		
<i>ALP</i> (mouse)	Forward 5'-CAC GGC GTC CAT GAG CAG AAC-3'	83	NM_007431.3
	Reverse 5'-CAG GCA CAG TGG TCA AGG TTG G-3'		
<i>Colla1</i> (mouse)	Forward 5'-GAC AGG CGA ACA AGG TGA CAG AG-3'	86	NM_007742.4
	Reverse 5'-CAG GAG AAC CAG GAG AAC CAG GAG-3'		
<i>GAPDH</i> (human)	Forward 5'-CAG GAG GCA TTG CTG ATG AT-3'	138	NM_002046.7
	Reverse 5'-GAA GGC TGG GGC TCA TTT-3'		
<i>Runx2</i> (human)	Forward 5'-AAC AGC AGC AGC AGC AGC AG-3'	183	NM_001024630.4
	Reverse 5'-GCA CCG AGC ACA GGA AGT TGG -3'		
<i>Cacnb3</i> (human)	Forward 5'-ATC TCC ATC ACC CGA GTC AC-3'	184	NM_000725.4
	Reverse 5'-TGT CAG CGT CCA ACA CTA CT-3'		
<i>Lpcat2</i> (human)	Forward 5'-GGC AGC ATT GAC TTC CGA GAG-3'	300	NM_017839.5
	Reverse 5'-CGT CTG GAG GTC TAG GTA TGT TGT-3'		

1.11 统计学方法

使用 GraphPad 6.0 软件进行数据作图和分析, 结果以平均值 \pm S.E.M. 表示, 两组数间比较采用单尾 Student's *t* test, 多组间比较用 One-Way 或者 Two-Way ANOVA。 $P < 0.05$, 具有统计学意义。

2 结果

2.1 利用生物信息技术筛选成骨相关基因

已有文献报道组蛋白去乙酰化酶抑制剂具有促进成骨分化的功能, 经 DECenter 软件分析, 从数据集 GSE9247 中得到 591 个受 HDACi 调控的差异表达基因。用 R 软件分析, 从数据集 GSE79815 中获得 353 个在成骨诱导中高表达、在成脂诱导中低表达的基因。将以上两个数据集分析得到的基因做合集分析, 得到共同差异表达上调基因 22 个(表 2), 这些基因均受 MS-275、VPA 和 TSA 这 3 种 HDAC 抑制剂调控, 并

且在成骨中高表达, 在成脂中低表达。这 22 个基因中有 6 个基因与 Ca^{2+} 调节相关, 包括 *Cacnb3*、*Lpcat2*、*CD248*、*Nid2*、*Notch3* 和 *Thbd*, 其中 *Qpct* 基因与锌离子调节功能相关。

2.2 小鼠脂肪间充质干细胞鉴定分析

流式细胞仪检测分离培养的小鼠 ADSCs 表面标志, 结果显示, 培养的第 3 代小鼠 ADSCs 间充质干细胞特异性表面标记 CD29、CD44、Sca-1 阳性率分别是 100%、98.3%、99.9%; 而血源性细胞标记物 CD45 的阳性率分别为 0.175%, 符合间充质干细胞表型特点(图 1)。小鼠 ADSCs 经成骨诱导液培养 14 天和 21 天后, 分别进行茜素红和 ALP 染色。非诱导组, 茜素红染色显示阴性, 细胞中未见红色结节。诱导组染色后可见细胞重叠样排列, 细胞间可见大量明显的红色矿化结节(图 2A)。ALP 染色均出现阳性, 但诱导组染色信号强于非诱导组(图 2B)。以上结果

表 2 三种 HDAC 抑制剂调控基因的差异性表达
Table 2 Genes differentially regulated by all three HDIs

基因描述 Gene description	诱导(差异倍数) Induced (fold change)		
	TSA	MS-275	VPA
Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 3	1.591	1.521	1.243
CD248 antigen, endosialin	1.712	1.460	1.246
Glutaminy-peptide cyclotransferase (glutaminy cyclase)	5.082	2.381	2.355
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	2.577	1.203	1.273
<i>Nidogen 2</i>	2.149	1.477	1.313
<i>Notch3</i>	2.627	1.635	1.797
Thrombomodulin	1.508	1.439	1.277
Cysteine rich hydrophobic domain 1	1.326	1.359	1.488
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	1.559	1.230	1.440
Embigin	1.641	1.813	1.208
G protein subunit beta 4	1.508	1.363	1.608
Hexosaminidase Subunit Beta	2.815	1.341	1.362
Leucine rich repeat containing 15	1.976	1.581	1.797
Membrane spanning 4-domains A4A	1.520	2.235	1.681
Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2	1.484	1.592	1.712
<i>Netrin 4</i>	1.383	1.611	1.352
Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class F	1.499	1.331	1.292
Plasminogen activator, tissue type	1.676	1.523	1.278
RAB3A interacting protein like 1	1.777	1.259	1.327
Ribonuclease, RNase a family 4	1.352	1.332	1.759
Solute carrier family 1 member 6	2.531	1.590	1.434
Trans-golgi network vesicle protein 23 homolog A	1.614	1.243	1.314

All genes were present at a FDR of 0.05 (95% confidence) relative to the vehicle control.
相对于对照, 所有基因 FDR 值为 0.05 (95% 置信度)。

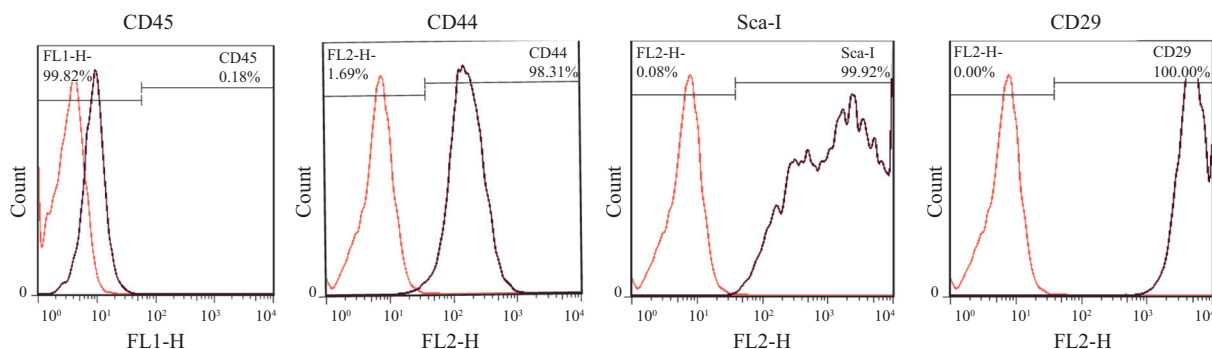
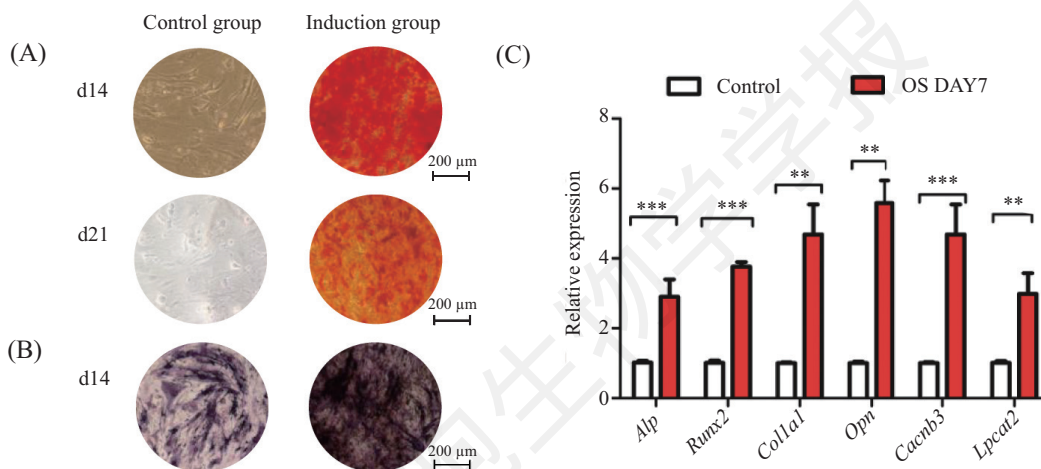


图1 小鼠脂肪间充质干细胞(ADSC)表面标志物流式鉴定

Fig.1 Flow analysis of surface markers of mouse adipose mesenchymal stem cells (ADSCs)



A: 小鼠脂肪间充质干细胞成骨诱导14天和21天后对照组与诱导组茜素红染色; B: 小鼠脂肪间充质干细胞成骨诱导14天后对照组与诱导组ALP染色; C: 用成骨诱导培养基和正常增殖培养基培养小鼠脂肪间充质干细胞7天, 检测成骨相关基因和钙离子相关基因。*** $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 。

A: alizarin red staining of ADSCs in the control group and the induction group after 14 and 21 days of osteogenic induction in mice; B: ALP staining of ADSCs in the control group and the induction group after 14 days of osteogenic induction in mice; C: ADSCs were cultured in osteogenic induction medium and normal proliferation medium for 7 days to detect osteogenic genes and calcium ion genes. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图2 C57BL/6J小鼠脂肪间充质干细胞的成骨诱导

Fig.2 Osteogenic induction of adipose mesenchymal stem cells in C57BL/6J mice

证实, 本研究中所提取的ADSCs具有良好的成骨分化能力, 符合间充质干细胞的特点。同时我们对小鼠成骨前体细胞MC3T3-E1的成骨能力进行评估, MC3T3-E1细胞成骨诱导14天后, 诱导组与非诱导组茜素红和ALP染色均呈阳性, 但诱导组的染色信号强于非诱导组(图2B、图3A和图3B), 表明小鼠成骨前体细胞成骨诱导成功。

2.3 *Cacnb3*基因在细胞成骨诱导过程中表达升高

小鼠脂肪间充质干细胞在成骨诱导7天后, 实验组的成骨相关转录因子*Runx2*、*Alp*、*Colla1*和*Opn*的转录水平显著高于对照组($P < 0.01$), 两个钙离

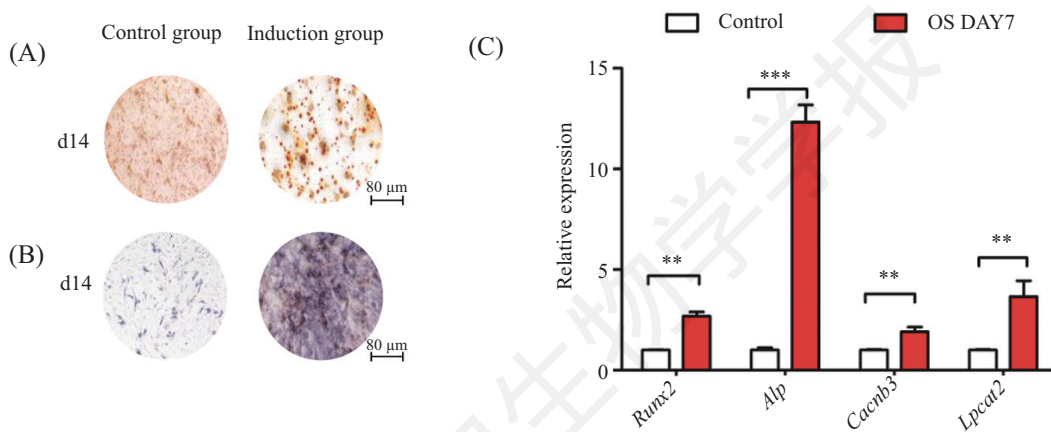
子相关基因表达也显著升高, 电压门控通道钙离子亚基*Cacnb3*显著上调4.2倍($P < 0.001$), 溶血卵磷脂酰基转移酶2(*Lpcat2*)升高近3倍($P < 0.001$)(图2C)。为了进一步验证*Cacnb3*在其他类型细胞成骨诱导后的转录水平, 我们分别对MC3T3-E1细胞和人骨髓间充质干细胞hBMSC细胞进行成骨诱导。MC3T3-E1成骨诱导7天后, 成骨相关的基因*Alp*和*Runx2*表达显著增加($P < 0.001$); 钙离子相关基因*Cacnb3*显著增加1.7倍, *Lpcat2*上调3.6倍($P < 0.001$)(图3C)。hBMSC细胞成骨诱导7天和15天, 成骨相关的基因*Runx2*表达升高; 钙离子相关基因*Cacnb3*在7天($P < 0.001$)和15

天时显著升高($P<0.05$), 然而, *Lpcat2*在7天和15天无显著性差异(图4)。结果证实, *Cacnb3*在上述三种细胞成骨诱导条件下, 转录升高, 而*Lpcat2*仅在小鼠干细胞和成骨前体细胞的成骨分化过程中转录有所升高。

2.4 敲低*Cacnb3*抑制MC3T3-E1细胞成骨分化

为进一步明确*Cacnb3*的生物学功能, 我们对*Cacnb3*基因进行敲低, 并对敲低后细胞系中的成骨相关基因进行检测, 明确其对成骨诱导的作用。qRT-PCR结果显示, 转染*Cacnb3* siRNA之后, 3T3-E1

细胞内*Cacnb3*基因的mRNA表达水平明显下调, 敲除效率约70%, 差异有统计学意义($P<0.001$)。同时, 我们对成骨相关基因*Alp*和*Runx2*的表达进行了检测, 发现在*Alp*和*Runx2*在48 h与对照组相比, 表达有所上升, 但没有显著性差异, 5天成骨相关基因*Alp*和*Runx2*表达显著下调($P<0.05$)(图5)。此外, 我们利用钙离子荧光探针Fluo-4 AM, 检测3T3-E1细胞内的钙离子水平, 发现siRNA-*Cacnb3*敲低组荧光强度明显弱于siRNA-NC 对照组, 表明敲低*Cacnb3*后会降低细胞内的钙离子水平(图6)。以上结果表明, *Cacnb3*

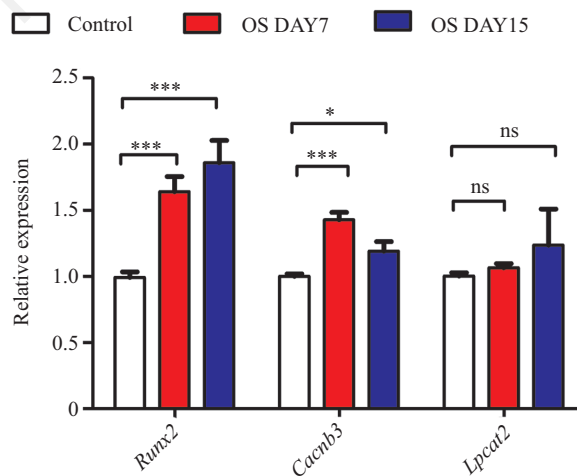


A: 小鼠成骨前体细胞成骨诱导两周后对照组与诱导组茜素红染色; B: 小鼠成骨前体细胞成骨诱导14天后非诱导组与诱导组ALP染色; C: 用成骨诱导培养基和正常增殖培养基培养3T3-E1细胞7天, 检测成骨相关基因和钙离子相关基因。* $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: alizarin red staining of 3T3-E1 in the control group and the induction group after 14 days of osteogenic induction in mice; B: ALP staining of 3T3-E1 in the control group and the induction group after 14 days of osteogenic induction in mice; C: 3T3-E1 were cultured in osteogenic induction medium and normal proliferation medium for 7 days to detect osteogenic genes and calcium ion genes ($n=3$). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 小鼠成骨前体细胞3T3-E1的成骨诱导

Fig.3 Osteogenic induction of preosteoblasts 3T3-E1 in mice



* $P<0.05$, *** $P<0.001$, ns: no significant differences.

图4 人骨髓间充质干细胞的成骨诱导

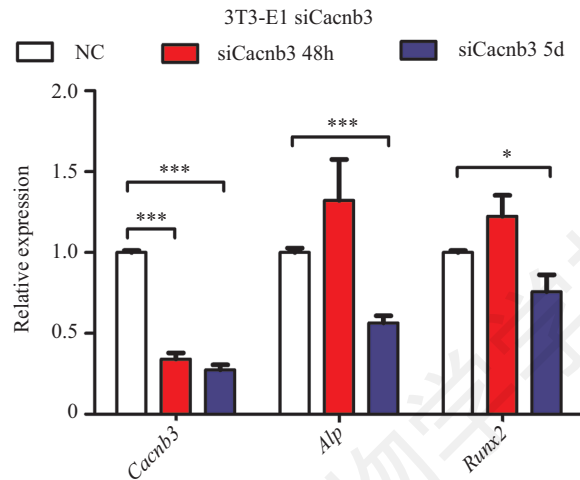
Fig.4 Osteogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells

可能是通过调控Ca²⁺浓度影响干细胞的成骨分化。

2.5 成骨不全小鼠中*Cacnb3*表达降低

*Cacnb3*对成骨分化可能具有促进作用,而成骨不全(osteogenesis imperfecta, OI)是一种成骨功能异常导致的疾病,因此在本实验中我们试图明确成骨不全个体中*Cacnb3*的表达水平。我们对WT野生型

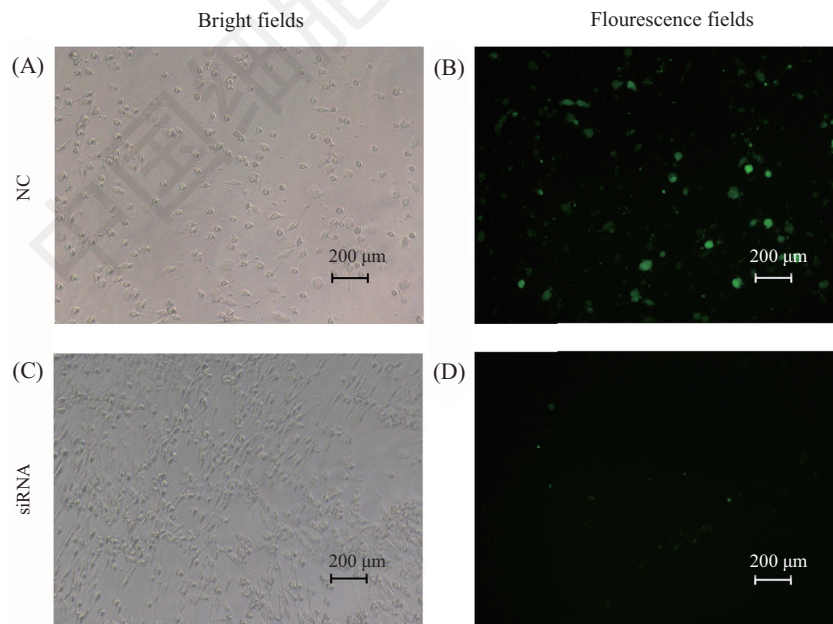
小鼠和OI模型鼠中的*Cacnb3*基因以及成骨相关基因*Colla1*表达水平进行检测。证实*Colla1*基因在OI小鼠中表达下调,是WT小鼠的50%($P<0.001$),钙离子相关基因*Cacnb3*在OI中的表达也低于WT,是WT的76%($P<0.01$)。同时,我们对OI与WT小鼠的股骨组织中的*Colla1*和*Cacnb3*基因转录进行检测,结果



* $P<0.05$, *** $P<0.001$.

图5 小鼠成骨前体细胞3T3-E1 siRNA敲低*Cacnb3*

Fig.5 Knockdown of *Cacnb3* in preosteoblasts 3T3-E1 cells by siRNA

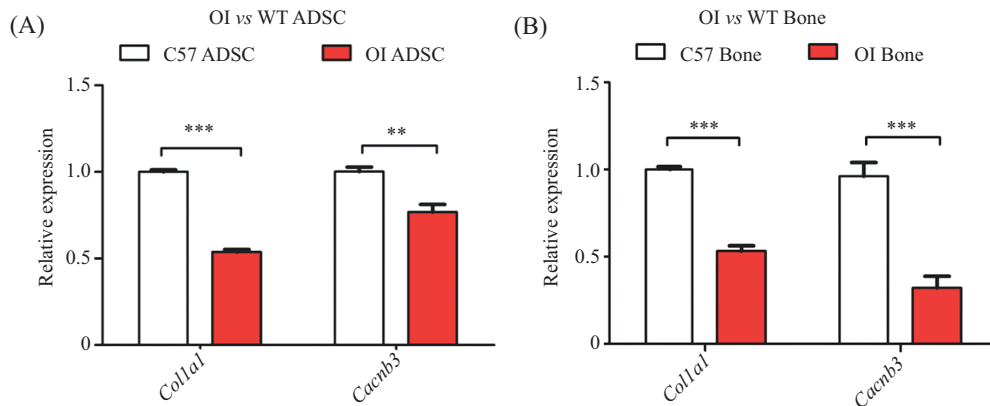


A、B: siRNA-NC为对照组; C、D: siRNA-Cacnb3为实验组。

A,B: siRNA-NC was the control group; C,D: siRNA-Cacnb3 was the experimental group.

图6 细胞内钙离子荧光染色

Fig.6 Intracellular calcium ion with fluorescence staining



A: OI成骨不全小鼠与C57野生型小鼠在脂肪间充质干细胞mRNA差异; B: OI成骨不全小鼠与C57野生型小鼠股骨mRNA差异。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: the differences in gene expression between OI and WT were verified at the cellular level ($n=2$); B: the differences in gene expression between OI and WT were verified at the level of femur ($n=3$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图7 OI成骨不全小鼠与C57野生型小鼠在脂肪间充质干细胞和股骨的mRNA比较

Fig.7 Comparison of mRNA levels in adipose mesenchymal stem cells and femur between osteogenesis imperfecta mice and C57 mice

显示, *Cacnb3*在OI中的表达是WT的32% ($P < 0.001$) (图7)。以上结果表明, 成骨不全小鼠中*Colla1*的表达低于野生小鼠, 同时钙离子通道可能存在功能紊乱, 这为在OI中过表达该基因进行治疗提供了理论依据。

3 讨论

原代小鼠传代后, 流式分析显示, 细胞高表达间充质干细胞特异性表面标记CD44、CD29、Sca-1, 低表达血源性细胞标记物CD45(图1), 符合间充质干细胞的表型特点。对分离培养的ADSCs进行成骨向诱导, 可形成矿化结节, ALP染色呈阳性, 以及成骨诱导7天, 成骨相关基因的表达明显升高, 证实本研究中所提取的ADSCs具有良好的多向分化能力, 符合间充质干细胞的特点, 能够满足本研究的需要。

Ca^{2+} 作为细胞内第二信使, 能够有效调控下游众多基因的转录, 进而调节细胞的增殖、迁移、分化等相关生物过程和功能。胞外钙离子的内流和胞内钙离子的释放在细胞的成骨分化过程中起着重要作用^[16]。有研究者发现, 细胞外高浓度钙离子可以使成骨分化相关基因的表达水平升高, 促进人牙髓干细胞(human dental pulp cells, hDPCs)向成骨细胞分化, 培养基中 Ca^{2+} 的含量对hDPCs的成骨分化有显著影响, 这在临床应用中具有重要意义^[19]。此外, 骨重塑是通过骨基质中的破骨细胞和成骨细胞相互协调,

不断循环来完成的^[20]。这一过程还需要成骨细胞迁移到骨重建部位。然而, 由于成骨细胞非增殖特性, 寿命较短, 因此持续性成骨需要骨髓间充质干细胞不断补充成骨细胞^[21]。事实上, 包括骨质疏松症在内的多种骨骼疾病均会引起骨髓间充质干细胞的募集缺陷^[22]。因此, 刺激骨髓间充质干细胞补充到骨形成部位是一种很有前景的骨再生策略。Lee等^[23]发现, 细胞外 Ca^{2+} 的升高能够促进间充质干细胞的增殖和基质矿化。此外, MSCs还能诱导骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的表达和分泌, 在细胞外 Ca^{2+} 升高时可促进骨髓间充质干细胞向骨重建部位的迁移。体外研究中发现, 破骨细胞能够介导小鼠颅骨切片的骨吸收, 使 Ca^{2+} 从骨吸收表面释放, 并改变骨髓间充质干细胞的增殖和迁移等多种表型。在骨重塑表面微环境中, Ca^{2+} 浓度的动态变化能够调节骨髓间充质干细胞的表型, 促进骨再生。本研究中, ADSCs、hBMSCs以及MC3T3-E1成骨诱导后, 钙离子相关基因*Cacnb3*和*Lpcat2*表达升高, 表明*Cacnb3*在成骨分化中可能具有促进作用(图2C、图3C和图4)。

骨骼的正常功能依赖于正常的血清钙水平, 骨骼在维持全身钙稳态方面也发挥着重要作用。人体99%的钙都储存在骨骼中, 有助于维持骨骼的机械特性和结构特性。因此, 骨骼需要足够的钙来维持其完整性。这种钙的供应主要取决于肠内钙的吸收和肾内钙的再吸收, 这些过程的失败, 可能会引起膳食钙摄入量不足、衰老和胃肠道、肾脏等疾病发生,

大大增加了钙失衡和骨丢失(骨质疏松)的风险^[24]。同时, 这些疾病还会减少骨钙的供应, 甚至会降低骨钙的含量, 骨骼能够将钙置换到血清中并显著促进钙的体外平衡, 因此, 保证血清中Ca²⁺的正常水平对骨钙的储存具有重要意义。

此外, 钙和骨的稳态是密切相关的。一方面, 骨骼依靠充足的钙供应来维持其结构和力学性能, 因此在很大程度上依赖于钙在肠道的吸收和钙在肾脏的再吸收。另一方面, 骨骼作为钙的储备, 钙被调动起来以维持血液中正常的钙水平。因此, 外部钙的负平衡将会随时损害骨骼的完整性^[25]。除了外部钙平衡, 骨骼稳态还依赖于骨细胞的正常分化和功能, 这在很大程度上依赖于细胞内Ca²⁺信号。离子通道的瞬时受体电位(TRP)家族成员能够通过介导细胞外和细胞内Ca²⁺平衡过程从而影响骨骼稳态, 包括肠道钙吸收(TRPV6)、肾钙再吸收(TRPV5)、破骨细胞分化(TRPV1、TRPV2、TRPV4、TRPV5)、软骨细胞分化(TRPV4), 还有成骨细胞分化(TRPV1)^[24]。

TRPV1在成骨细胞和破骨细胞中均有表达, 能够促进两种细胞的分化。事实上, 药理学阻断TRPV1会抑制破骨细胞和成骨细胞的体外分化。此外, 体内抑制TRPV1的活性可以减少骨吸收并增加骨形成, 从而阻止了小鼠因卵巢切除引起的骨丢失^[26]。因此, TRPV1可能直接影响成骨细胞分化。研究表明, *Cacnb3*调控TRPV5并影响Ca²⁺水平, 最终可能影响细胞的成骨分化及钙沉积, 但具体的机制还有待深入研究。*Cacnb3*的敲除会影响TRPV5的表达变化, 这提示我们*Cacnb3*也可能对TRPV1的表达有影响。由于TRPV1在成骨细胞中表达, 可能对成骨分化有影响, 我们发现敲低*Cacnb3*会使成骨前体细胞的Ca²⁺水平降低(图7), 有可能进一步影响细胞内钙对骨的重塑。这可作为*Cacnb3*影响成骨分化的一个切入点, 但具体机制还有待深入研究。

综上所述, 本研究结果表明, *Cacnb3*在ADSCs的成骨分化中表达上调, 在成骨分化中可能具有促进作用, 且敲低*Cacnb3*能够影响细胞内钙离子水平, 表明*Cacnb3*可能是通过影响钙离子水平来调控细胞的成骨分化。以ADSCs和*Cacnb3*为基础的骨组织工程技术具有潜在的应用前景。

参考文献 (References)

1 Martino MM, Briquez PS, Maruyama K, Hubbell JA. Extracel-

- ular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 94: 41-52.
- 2 Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011; 42(6): 551-5.
- 3 Marini JC, Forlino A, Bachinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe A, *et al.* Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 17052.
- 4 Morello R. Osteogenesis imperfecta and therapeutics. *Matrix Biol* 2018; 71/72: 294-312.
- 5 Esposito P, Plotkin H. Surgical treatment of osteogenesis imperfecta: current concepts. *Curr Opin Pediatr* 2008; 20(1): 52-7.
- 6 Kim HD, Amirthalingam S, Kim SL, Lee SS, Rangasamy J, Hwang NS. Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering. *Adv Healthc Mater* 2017; doi: 10.1002/adhm.201700612.
- 7 Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64(12): 1292-309.
- 8 Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84(3): 454-64.
- 9 Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 2006; 3(1): 49-57.
- 10 Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 4937-61.
- 11 Marolt D, Knezevic M, Novakovic GV. Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1(2): 10.
- 12 Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, *et al.* Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells—a review. *Biotechnol Adv* 2018; 36(4): 1111-26.
- 13 Lu W, Ji K, Kirkham J, Yan Y, Boccaccini AR, Kellett M, *et al.* Bone tissue engineering by using a combination of polymer/Bioglass composites with human adipose-derived stem cells. *Cell Tissue Res* 2014; 356(1): 97-107.
- 14 Watson PH, Watson AJ, Hodsmann AB. Expression of growth factor ligand and receptor genes in rat cancellous bone trabeculae and marrow. *J Mol Endocrinol* 1996; 17(1): 45-54.
- 15 Guggino SE, Lajeunesse D, Wagner JA, Snyder SH. Bone remodeling signaled by a dihydropyridine- and phenylalkylamine-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(8): 2957-60.
- 16 Nakamura S, Matsumoto T, Sasaki J, Egusa H, Lee KY, Nakano T, *et al.* Effect of calcium ion concentrations on osteogenic differentiation and hematopoietic stem cell niche-related protein expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(8): 2467-73.
- 17 Collin T, Lory P, Taviaux S, Courtieu C, Guibault P, Berta P, *et al.* Cloning, chromosomal location and functional expression of the human voltage-dependent calcium-channel beta 3 subunit. *Eur J Biochem* 1994; 220(1): 257-62.
- 18 Bernardo JF, Magyar CE, Sneddon WB, Friedman PA. Impaired renal calcium absorption in mice lacking calcium channel beta 3 subunits. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87(7): 522-30.
- 19 An S, Gao Y, Ling J, Wei X, Xiao Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. *J Mater Sci Mater*

- Med 2012; 23(3): 789-95.
- 20 Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(11): 582-90.
- 21 Park D, Spencer JA, Koh BI, Kobayashi T, Fujisaki J, Clemens TL, *et al.* Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell* 2012; 10(3): 259-72.
- 22 Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, *et al.* Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum* 2009; 60(3): 813-23.
- 23 Lee MN, Hwang HS, Oh SH, Roshanzadeh A, Kim JW, Song JH, *et al.* Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. *Exp Mol Med* 2018; 50(11): 142.
- 24 Lieben L, Carmeliet G. Involvement of TRP channels in bone homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3:99.
- 25 Liu Y, Wang J, Wei Y, Zhang H, Xu M, Dai J. Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver. *Aquat Toxicol* 2008; 89(4): 242-50.
- 26 Idris AI, Landao-Bassonga E, Ralston SH. The TRPV1 ion channel antagonist capsaizepine inhibits osteoclast and osteoblast differentiation *in vitro* and ovariectomy induced bone loss *in vivo*. *Bone* 2010; 46(4): 1089-99.

中国细胞生物学学报