

激活共培养体系中骨细胞MLO-Y4的Wnt微环境 对骨髓基质细胞ST2成骨分化的影响

王波¹ 罗义胜² 李忠俊^{1*}

(¹陆军军医大学第二附属医院新桥医院临床检验医学中心输血科, 重庆 400037;

²重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010)

摘要 该研究通过小分子药物C91(CHIR99021)预处理激活骨细胞MLO-Y4的Wnt信号, 继而将其与ST2细胞共培养, 以观察该微环境对ST2细胞成骨分化的调控作用。CCK8实验检测不同浓度CHIR99021(C91)对骨细胞MLO-Y4活性的影响, 并确定用于后续实验的C91浓度; 碱性磷酸酶(ALP)染色、茜素红(ARS)染色和定量分析检测成骨分化水平; 荧光定量PCR检测ST2细胞成骨分化标志基因 *Alp*、*Runx2*、*Osx*, 成血管因子 *Vegf*, Wnt信号靶基因 β -catenin、*Axin2*和 *Lef1*以及成骨抑制因子 *Sost*的mRNA表达水平; 免疫荧光染色检测 β -catenin入核情况; Western blot实验检测细胞中 β -catenin蛋白表达水平。鉴于C91在2.5 μ mol/L和5 μ mol/L浓度下处理MLO-Y4细胞(12 h/24 h)均未影响其增殖活力, 该浓度被确定为后续实验的安全工作浓度; C91可促进骨细胞MLO-Y4中Wnt信号靶基因 β -catenin、*Axin2*、*Lef1*和破骨因子 *Sost*的mRNA表达水平以剂量依赖性方式显著升高($P<0.05$), 并使蛋白 β -catenin的表达水平上调($P<0.05$); C91能够显著加快骨细胞MLO-Y4中 β -catenin的入核过程; C91激活共培养体系中骨细胞MLO-Y4的Wnt微环境后, 以剂量依赖性方式促进ST2细胞的 *Alp*、*Runx2*、*Osx*和成血管因子 *Vegf*的mRNA表达水平升高($P<0.05$), 但是使成骨分化因子 *Ocn*的表达水平显著降低($P<0.05$)。C91处理在促进共培养体系中ST2细胞早期成骨分化(表现为碱性磷酸酶表达水平升高)的同时, 却抑制了其晚期基质矿化。

关键词 CHIR99021; 共培养; 成骨分化; 矿化

Effect of Activation of Wnt Microenvironment of MLO-Y4 Osteocytes in Co-Culture System on Osteogenic Differentiation of ST2 Bone Marrow Stromal Cells

WANG Bo¹, LUO Yisheng², LI Zhongjun^{1*}

(¹Department of Blood Transfusion, Clinical Laboratory Medicine Center, Second Affiliated Hospital of the Army Medical University, Chongqing 400037, China; ²Department of Laboratory, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract The aim of this article was to investigate the effects of activation of the Wnt microenvironment of osteoblast MLO-Y4 by the small molecule drug C91 (CHIR99021) on the osteogenic differentiation of ST2 cells after co-culturing the treated osteoblast MLO-Y4 cells (without C91) with bone marrow stromal cells ST2 cells. CCK8 assay was performed to detect the effects of different concentrations of C91 on osteoblastic MLO-Y4 activity and to determine the concentration of C91 used for subsequent experiments; ALP (alkaline phosphatase) staining, ARS (alizarin red S) staining and quantitative analysis were used to detect the level of osteogenic differ-

收稿日期: 2025-06-23

接受日期: 2025-07-31

*通信作者。Tel: 023-68755114, E-mail: zhongjun_li@yeah.net

Received: June 23, 2025

Accepted: July 31, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-23-68755114, E-mail: zhongjun_li@yeah.net

entiation; fluorescence quantitative PCR was used to detect the mRNA expression levels of the ST2 cell osteogenic differentiation marker genes *Alp*, *Runx2*, *Osx*, the vasculogenic factor *Vegf*, and the Wnt signaling target genes β -catenin, *Axin2* and *Lef1*, as well as the osteogenic inhibitory factor *Sost*; immunofluorescence staining detected the entry of β -catenin into the nucleus; Western blot detected the protein expression level of β -catenin in the cells. When the concentration of C91 was 2.5 $\mu\text{mol/L}$ and 5 $\mu\text{mol/L}$, C91 had no effect on the proliferative activity of osteoblast MLO-Y4 regardless of the action time of 12 h and 24 h, which can be used as the maximum safe concentration for the subsequent experiments; C91 promoted the mRNA expression of the Wnt signaling target genes β -catenin, *Axin2*, *Lef1*, and osteoclastogenic factor *Sost* in a dose-dependent manner ($P<0.05$), and the expression level of β -catenin protein was up-regulated ($P<0.05$); C91 was able to significantly promote the nucleation process of β -catenin in osteoblasts MLO-Y4; following activation of the Wnt microenvironment in the co-culture system of bone cells MLO-Y4 by C91, the mRNA expression levels of *Alp*, *Runx2*, *Osx*, and the angiogenic factor *Vegf* in ST2 cells increased in a dose-dependent manner ($P<0.05$), however, the expression level of the osteogenic differentiation factor *Ocn* was significantly reduced ($P<0.05$). C91 treatment promotes early osteogenic differentiation of ST2 cells in co-culture systems (as evidenced by elevated alkaline phosphatase expression), while simultaneously inhibiting their late-stage matrix mineralization.

Keywords CHIR99021; co-culture; osteogenic differentiation; mineralization

根据世界卫生组织的数据,全球年龄 ≥ 60 岁的人的比例将从2015年的12%增加到2050年的22%,即从9亿增至20亿^[1]。值得注意的是,由于生理功能的自然恶化(例如骨质疏松和骨折)引起的几种与年龄相关的慢性疾病已经变得越来越突出,并受到了广泛的关注^[2]。骨质疏松症是一种与年龄相关的骨骼疾病,其特征是骨骼质量降低、骨微结构退化和骨骼脆弱性增加。值得注意的是,它降低了骨骼的强度并增加了脆性骨折的风险^[3]。根据最新数据,中国40岁以上成年人的骨质疏松症总体患病率高达19.2%,其中男性与女性的患病率分别为6.0%和32.1%^[4]。该疾病显著增加了老年患者的致残率和死亡率。

骨质疏松症的核心发病机理在于骨重建过程失衡,主要表现为成骨细胞介导的骨形成不足与破骨细胞介导的骨吸收过度,从而导致骨代谢紊乱、骨量严重减少及骨微结构恶化^[5]。骨细胞是骨骼中最丰富的细胞群,占有骨细胞的90%~95%。值得注意的是,它们的寿命很长,并介导对机械负荷和激素刺激的适应性反应,以维持骨平衡^[6-7]。骨骼的发育和维持,取决于成骨细胞的骨形成作用与破骨细胞的骨吸收作用之间的动态平衡^[8]。细胞-细胞间信号转导的一种重要机制是缝隙连接通讯。缝隙连接是一种介导相邻细胞间直接通讯的跨膜通道,允许小分子物质(如离子和第二信使)通过,从而实现电化学信号的传递^[9-11]。骨量的维持与骨细胞产生和分泌

的分子有关,这些分子是成骨细胞和破骨细胞活性的调节因子,如骨保护因子OPG^[12]和成骨抑制因子Sost^[13]。大量研究证实,骨细胞通过其复杂的信号网络调控成骨细胞的分化过程。特别是近十年来的证据不断阐明,Wnt/ β -catenin通路在这一调控机制中发挥着核心作用^[14-16]。Wnt家族成员在成骨过程中起着关键作用。Wnt配体与受体Frizzled和LRP5/6结合,稳定细胞质中的 β -catenin, β -catenin积累并进入细胞核,再与DNA结合因子家族成员TCF/LEF结合,进而激活靶基因^[17-18]。Sost是成熟的骨细胞标志物。该蛋白是骨形成的负调控因子,通过与Wnt共受体LRP5/6结合来阻断Wnt/ β -catenin信号通路^[19]。有研究表明,小分子药物C91(CHIR99021)可通过直接激活Wnt信号通路促进间充质干细胞(mesenchymal stem cells)的成骨分化和矿化^[20]。但是由于骨细胞是骨骼中最丰富的细胞,所以我们将目光聚焦在骨细胞上。因此,本文旨在探究用小分子Wnt激活剂C91预处理骨细胞MLO-Y4以激活其Wnt微环境后,将其与骨髓基质细胞ST2共培养,对ST2细胞成骨分化的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞

骨细胞MLO-Y4和ST2细胞购于美国组织培养库(American Tissue Culture Collection, ATCC)。骨细胞MLO-Y4系是目前为止常用于研究骨细胞功能的

细胞系, 而野生小鼠骨髓基质细胞系ST2细胞常用于成骨分化功能研究。

1.2 试剂

C91(Wnt信号激动剂)购自美国MedChemExpress公司; BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; α -MEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司; 青-链霉素及胰酶购自美国HyClone公司; TRIzol、逆转录试剂盒及实时荧光定量PCR试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; PCR引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 细胞培养

将骨细胞MLO-Y4和ST2细胞用含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的 α -MEM培养基培养。当ST2细胞密度大约为90%时用胰酶于37 $^{\circ}$ C消化传代, 或以 3×10^4 /孔的密度接种于24孔板中, 再将其置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件下培养。

1.4 构建共培养模型

小分子药物C91处理骨细胞MLO-Y4 24 h后, 进行与ST2细胞的直接接触共培养: 吸弃含有C91的培养基。加入1 mL PBS轻柔清洗MLO-Y4细胞2次, 彻底吸净残留液体。向每个孔中加入500 μ L预先准备好的共培养新鲜完全培养基(成分为: α -MEM, 含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)。将消化、重悬并计数后的ST2细胞, 以ST2:MLO-Y4=1:1的细胞数量比例重悬于适量的共培养培养基中, 取100 μ L细胞悬液加入对应孔内。轻轻晃动培养板使细胞分布均匀, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中共培养48 h。在共培养24 h后, 可根据细胞状态, 小心吸弃500 μ L旧培养基, 再加入500 μ L新鲜预热的共培养培养基。共培养48 h后, 收取样品进行后续分析。

1.5 CCK8实验

为了评估C91对骨细胞MLO-Y4增殖活力的影响, 将细胞接种于96孔板(5 000/孔)中, 并过夜贴壁。为了评估骨细胞MLO-Y4的增殖情况, 用不同浓度的C91(0、500 nmol/L、1 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L、15 μ mol/L)处理骨细胞MLO-Y4, 分别作用12 h和24 h。然后每孔加入10 μ L的CCK8试剂(上海陶素生物科技有限公司), 100 μ L完全培养基继续在37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中避光孵育2 h。然后在450 nm波长处使用酶标仪测定细胞的吸光度(D)值。

1.6 ALP染色和定量

用C91处理骨细胞MLO-Y4, 作用24 h后, 经处

理后的骨细胞MLO-Y4与ST2细胞共培养, 加入含有10% FBS、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的完全培养基, 诱导培养2天, 然后用PBS清洗2次, 4%甲醛常温固定10~15 min。然后用BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒配制染色液, 于37 $^{\circ}$ C避光孵育15~30 min显色, 染色达到要求后去除显色液并及时拍照保存, 再用100 mmol/L的氯化十六烷基吡啶(cetylpyridinium chloride, CPC; 货号: C9002-25G; 美国Sigma公司)收集染色后的沉淀物, 并在波长为560 nm处读取吸光度值。

1.7 茜素红染色和定量

茜素红(alizarin red S, ARS)染色法评价基质矿化情况。用不同浓度的C91(0 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5 μ mol/L)处理骨细胞MLO-Y4, 作用1天时间, 然后将其与ST2细胞共培养14天, 中间每2天更换1次成骨诱导培养基, 然后收样。细胞在4%甲醛中室温固定10~15 min。去除固定液, 在PBS中清洗2次, 然后在37 $^{\circ}$ C水浴锅中用pH7.5的2%茜素红染液(美国Sigma公司)染色30 min。用PBS清洗多余的染液, 以消除非特异性染色, 并拍照保存。为了定量钙沉积, 再加入100 mmol/L的氯化十六烷基吡啶(CPC; 货号: C9002-25G; 美国Sigma公司)收集沉淀物。在波长为560 nm处读取吸光度值。

1.8 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

TRIzol法提取细胞总RNA, 通过反转录得到cDNA, cDNA反应液进行5倍稀释后, 作为qRT-PCR反应的模板。使用SYBR Premix Ex Taq™试剂(湖南艾科瑞生物工程有限公司)在qRT-PCR仪上进行扩增。反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C预变性30秒; 95 $^{\circ}$ C变性5 s、60 $^{\circ}$ C退火/延伸30 s(在此阶段采集荧光信号), 40个循环; 最后进行熔解曲线分析以确认扩增特异性。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析, 以GAPDH的表达水平作为标准。所使用的引物见表1。

1.9 Western blot检测 β -catenin的蛋白水平

收集细胞, 提取细胞总蛋白质, BCA法检测蛋白质的浓度, 取35 μ g的蛋白质经10%的SDS-PAGE分离, 然后在300 mA恒流下进行湿转, 将蛋白质转移到PVDF膜上, 5% BSA室温封闭2 h后加入兔源 β -catenin一抗(1:1 000, 沈阳万类生物科技公司), 在4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 第2天用TBST洗去游离抗体, 加入羊抗兔GAPDH二抗(1:1 000, 沈阳万类生物科技公司), 室温孵育1 h; TBST洗膜3次, 每次10 min, ECL发光

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
<i>GAPDH</i>	Forward: GCA CAG TCA AGG CCG AGA AT Reverse: GCC TTC TCC ATG GTG GTG GTG AA
<i>Alp</i>	Forward: ACA CCA ATG TAG CCA AGA ATG TCA Reverse: GAT TCG GGC AGC GGT TAC T
<i>Runx2</i>	Forward: CCG TGG CCT TCA AGG TTG T Reverse: TTC ATA ACA GCG GAG GCA
<i>Osx</i>	Forward: CCC TTC TCA AGC ACC ATT GG Reverse: AAG GGT GGG TAG TCA TTT GCA TA
<i>Lef1</i>	Forward: CCT ACA GCG ACG AGC ACT TTT Reverse: CCT TGC TTG GAG TTG ACA TCT G
<i>Axin2</i>	Forward: TGA GCG GCA GAG CAA GTC CAA Reverse: GGC AGA CTC CAA TGG GTA GCT
<i>Sost</i>	Forward: TGA GAA CAA CCA GAC CAT Reverse: ACA TCT TTG GCG TCA TAG
<i>Vegf</i>	Forward: CCC ACC CAC ATA CAT ACA TT Reverse: CTC CCA ACT CAA GTC CAC A
<i>β-catenin</i>	Forward: TGG CAA CCA AGA AAG CAA G Reverse: CTG AAC AAG AGT CCC AAG GAG
<i>Ocn</i>	Forward: CTG ACC TCA CAG ATC CCA AGC Reverse: TGG TCT GAT AGC TCG TCA CAA G

液显色。显色结果用Image Lab软件分析灰度值, 蛋白质相对表达水平=目的蛋白质灰度值/β-actin蛋白质灰度值。

1.10 免疫荧光染色实验

MLO-Y4细胞在12孔板中培养, 并分别使用C91处理12 h和24 h。处理结束后, 弃去培养基, 使用PBS轻轻洗涤细胞2次, 随后进行免疫荧光染色, 简要步骤如下。细胞于室温下固定在4%甲醛中10 min, 在0.05% Triton X-100中透化30 min, 然后在5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)中封闭30 min。TBST洗涤后, 与抗β-catenin(1:500; 英国Abcam公司)抗体在4 °C下孵育过夜。然后将细胞与荧光二抗(1:1 000稀释)于室温避光孵育2 h, 细胞核用2-(4-脒基苯基)-6-吡啶卡脒二盐酸盐(DAPI)(上海碧云天生物技术有限公司)染色5 min。在荧光显微镜(EU5888; 德国Leica公司)下观察荧光情况并拍照保存。

1.11 统计分析

每组实验均独立重复3次, 定量数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析比较多组间差异, *t*检验比较两组间差异。 *P*<0.05表示差异有统计学意义。

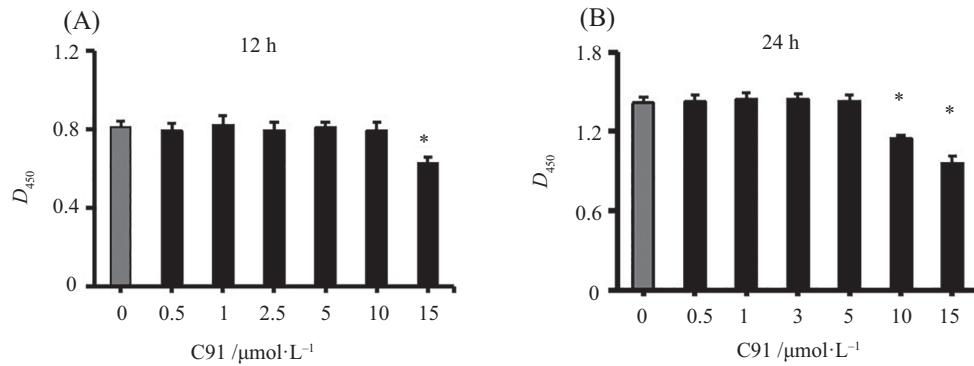
2 结果

2.1 不同浓度的C91对骨细胞MLO-Y4增殖活力的影响

我们研究了C91对骨细胞MLO-Y4增殖活力的影响。CCK8实验结果表明, 在0~5 μmol/L浓度范围内, C91处理12 h或24 h均未对MLO-Y4细胞的增殖活力产生显著影响(图1)。但是当用10 μmol/L C91处理骨细胞MLO-Y4, 作用24 h时, 骨细胞MLO-Y4的增殖活力呈下降趋势, 并有统计学意义。所以0~5 μmol/L的C91是处理骨细胞MLO-Y4的最大安全浓度范围。基于上述结果, 我们选定2.5 μmol/L和5 μmol/L作为后续研究的主要浓度。

2.2 C91激活骨细胞MLO-Y4的Wnt/β-catenin信号通路

我们研究了C91对骨细胞MLO-Y4的Wnt/β-catenin信号通路的影响, qRT-PCR结果显示: 小分子药物C91能够显著促进骨细胞MLO-Y4中的Wnt相关基因β-catenin、Axin2和Lef1的表达水平升高(*P*<0.05)(图2A); 与此同时, C91激活骨细胞MLO-Y4的Wnt信号也会使Sost基因的表达水平升高(*P*<0.05)。β-catenin和GAPDH的蛋白印迹结果如图2B所示, 与预期结果一样, C91处

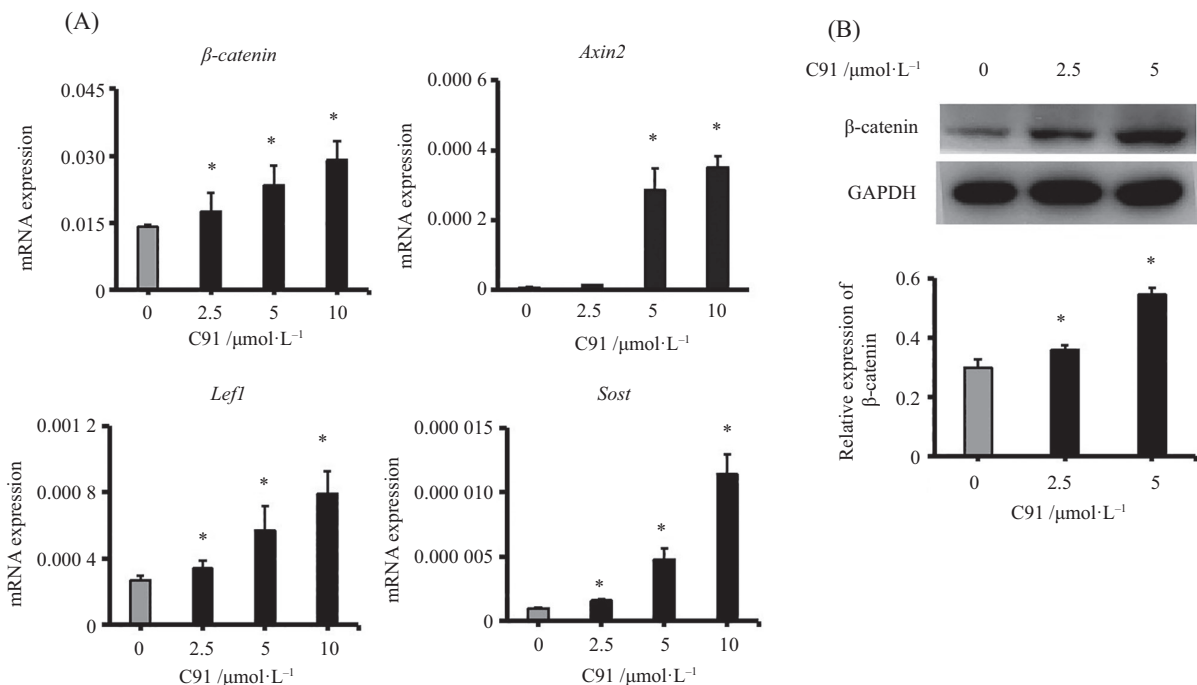


A, B: 用不同浓度的C91(0、500 nmol/L、1 μmol/L、2.5 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、15 μmol/L)分别处理MLO-Y4细胞12 h和24 h后, CCK8实验检测MLO-Y4细胞的增殖情况。* $P < 0.05$, 与0 μmol/L C91组相比。

A, B: after MLO-Y4 cells were treated with different concentrations of C91 (0, 500 nmol/L, 1 μmol/L, 2.5 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L, 15 μmol/L) for 12 h and 24 h, CCK8 experiments were used to detect the proliferation of MLO-Y4 cells. * $P < 0.05$ compared with 0 μmol/L C91 group.

图1 不同浓度的C91对MLO-Y4细胞增殖活力的影响

Fig.1 The effect of different concentrations of C91 on the proliferation of MLO-Y4 cells



A: C91作用MLO-Y4细胞24 h, 然后采用qRT-PCR方法分析β-catenin、Axin2、Lef1和Sost的mRNA水平。B: Western blot检测细胞中β-catenin的表达情况。* $P < 0.05$, 与0 μmol/L C91组相比, $n = 3$ 。

A: C91 acted on MLO-Y4 cells for 24 h, and then the mRNA levels of β-catenin, Axin2, Lef1 and Sost were analyzed by qRT-PCR. B: Western blot detects the expression of β-catenin in cells. * $P < 0.05$ compared with the 0 μmol/L C91 group, $n = 3$.

图2 C91激活MLO-Y4细胞的Wnt信号通路

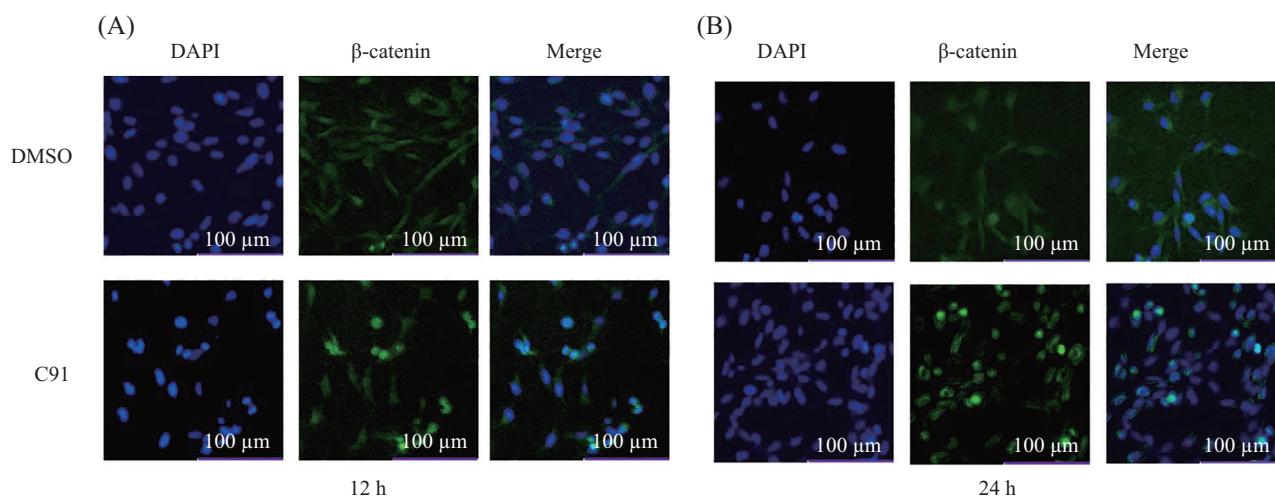
Fig.2 C91 activates the Wnt signaling pathway of MLO-Y4 cells

理组的β-catenin的蛋白表达水平显著高于对照组。

2.3 C91加快骨细胞MLO-Y4中的β-catenin的入核过程

β-catenin是经典Wnt信号通路的重要下游因子, 进入细胞核内与T细胞因子/淋巴样增强因子(TCF/LEF)家族成员结合, 然后激活Wnt下游靶基因表达^[21]。我们发现C91激活骨细胞MLO-Y4的

Wnt信号, 影响了胞内β-catenin的稳定性。β-catenin免疫荧光染色结果显示, 无论C91作用时间为12 h还是24 h, C91处理组的荧光密度和强度都明显高于DMSO对照组(图3A和图3B)。β-catenin不仅在细胞质中表达, 而且在细胞核中也有表达。有研究表明C91通过稳定胞内β-catenin的量来激活Wnt信号^[22], 同时, C91处理24 h诱导的β-catenin核内积聚

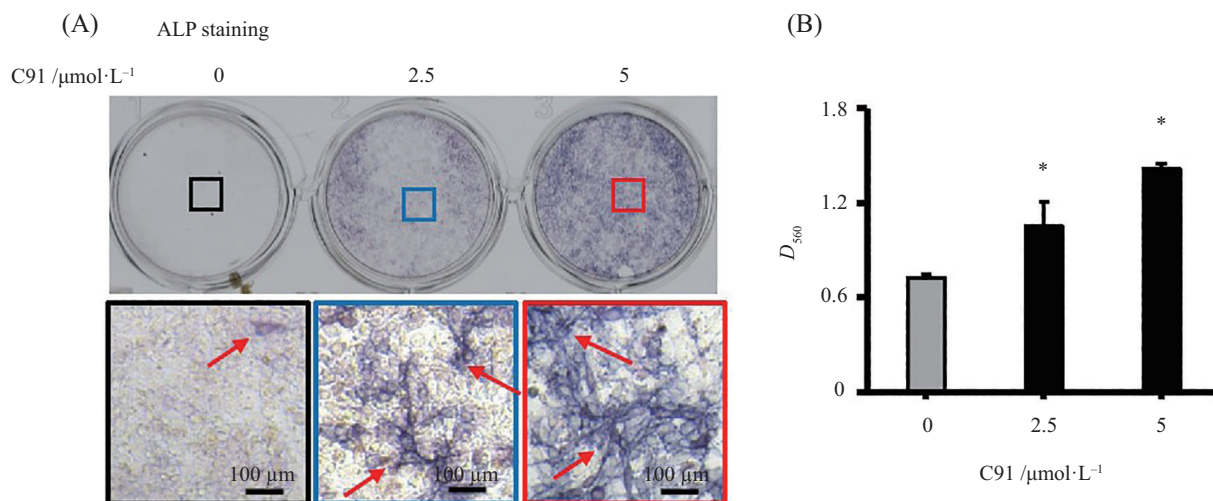


A: C91处理MLO-Y4细胞12 h后 β -catenin的免疫荧光染色图像。B: C91处理MLO-Y4细胞24 h后 β -catenin的免疫荧光染色图像。细胞核DAPI染色为蓝色, β -catenin为绿色荧光。

A: immunofluorescence staining image of β -catenin in MLO-Y4 cells treated with C91 for 12 h. B: immunofluorescence staining image of β -catenin in MLO-Y4 cells treated with C91 for 24 h. DAPI staining of the nucleus is blue, and β -catenin is green fluorescence.

图3 C91加快MLO-Y4细胞中 β -catenin的入核过程

Fig.3 C91 accelerates the process of β -catenin into the nucleus in MLO-Y4 cells



A: C91处理MLO-Y4细胞24 h, 然后与ST2细胞共培养2天, 再用碱性磷酸酶染色试剂盒对细胞进行染色, 红色箭头所指的是ALP活性阳性区域。B: ALP染色定量分析结果。* $P < 0.05$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ C91组相比, $n=3$ 。

A: C91 treated MLO-Y4 cells for 24 h, then co-cultured with ST2 cells for 2 days, and then cells were stained with alkaline phosphatase staining kit. The red arrow indicates the ALP-positive area. B: quantitative analysis results of ALP staining. * $P < 0.05$ compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ C91 group, $n=3$.

图4 C91通过激活MLO-Y4细胞Wnt信号间接促进共培养ST2细胞的早期成骨分化

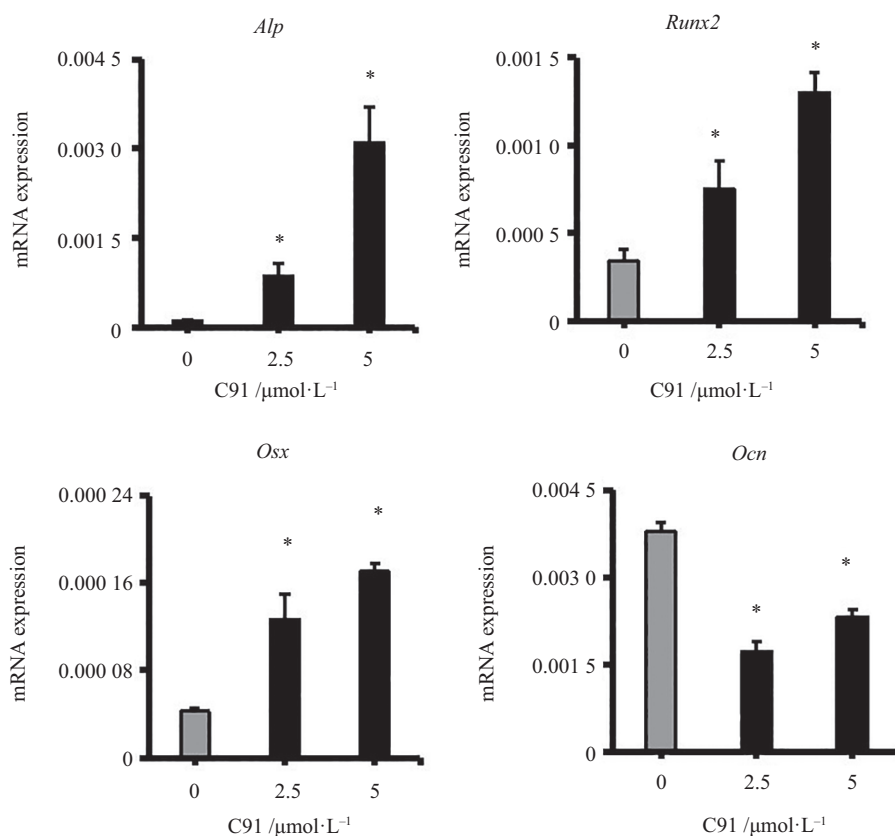
Fig.4 C91 indirectly promotes early osteogenic differentiation in co-cultured ST2 cells by activating Wnt signaling in MLO-Y4 cells

程度比处理12 h时更强。

2.4 C91通过激活MLO-Y4细胞Wnt信号间接促进共培养ST2细胞的早期成骨分化

除调控Wnt信号通路外, 骨细胞还被公认是一种重要的内分泌细胞, 在维持机体磷酸盐稳态、促进骨基质矿化以及介导骨骼与肌肉之间的交叉对话 (bone-muscle crosstalk) 中发挥关键作用^[23]。因此, 骨

细胞作为生物控制骨质量的关键细胞靶点正得到越来越多人的关注^[24]。我们研究了骨细胞产生的因子是否能够调节成骨细胞的生理分化过程, 碱性磷酸酶ALP是成骨分化的早期标志^[25], ALP染色结果和定量分析显示, 在共培养体系中, 经C91处理的骨细胞MLO-Y4以剂量依赖性的方式增加ST2细胞的碱性磷酸酶活性(图4A和图4B)。这表明激活共培养体



用C91处理MLO-Y4细胞24 h, 将其与ST2细胞共培养2天, 然后采用qRT-PCR方法分析*Alp*、*Runx2*、*Osx*和*Ocn*的mRNA水平。* $P < 0.05$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ C91组相比, $n=3$ 。

MLO-Y4 cells were treated with C91 for 24 h, then co-cultured with ST2 cells for 2 days, and then the mRNA levels of *Alp*, *Runx2*, *Osx* and *Ocn* were analyzed by qRT-PCR. * $P < 0.05$ compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ C91 group, $n=3$.

图5 C91通过激活MLO-Y4细胞的Wnt信号间接调控共培养ST2细胞的成骨分化
Fig.5 C91 indirectly regulates the osteogenic differentiation of co-cultured ST2 cells by activating the Wnt signaling pathway in MLO-Y4 cells

系中骨细胞MLO-Y4的Wnt信号, 间接促进了ST2细胞的早期成骨分化。

2.5 C91通过激活MLO-Y4细胞的Wnt信号间接调控共培养ST2细胞的成骨分化

qRT-PCR结果显示, C91处理组ST2细胞中早期成骨分化基因(*Alp*、*Runx2*、*Osx*)的mRNA水平显著上调(图5)。然而, 作为晚期成骨分化标志的*Ocn*, 其表达水平却显著降低。这一结果表明, C91激活的Wnt微环境主要促进ST2细胞成骨分化的早期进程, 但却可能抑制该过程向晚期成熟阶段的发展。

2.6 C91激活骨细胞Wnt微环境可能减弱共培养ST2细胞的基质矿化能力

钙结节是成骨细胞成熟的重要标志。茜素红染色和定量结果显示, C91处理组的ST2细胞中钙化结节的数量和体积都比0 $\mu\text{mol/L}$ C91组小, 说明在共培养体系中, C91激活骨细胞MLO-Y4的Wnt微环境后, 可能间接抑制了ST2细胞的晚期基质矿化, 如图6所

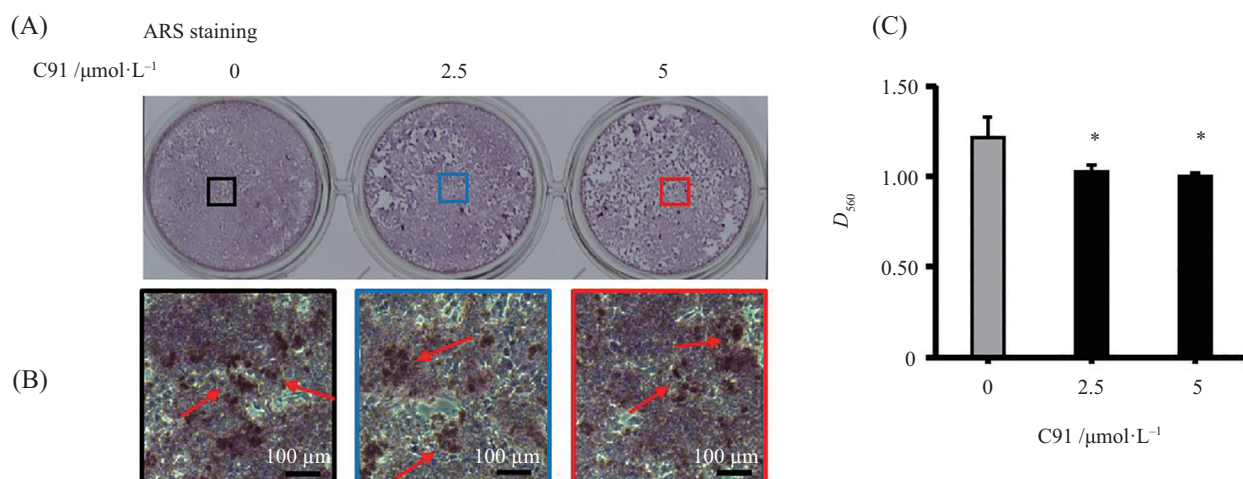
示, C91激活骨细胞MLO-Y4的Wnt信号后, 不仅显著降低了共培养体系中ST2细胞的成骨分化基因*Ocn*的表达水平, 还抑制了其晚期基质矿化过程。

2.7 C91通过激活MLO-Y4细胞Wnt信号促进共培养ST2细胞的促血管生成能力

成骨细胞可以分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 促进内皮细胞成血管^[26]。检测结果显示, C91激活骨细胞MLO-Y4的Wnt微环境后, 能提高共培养体系中ST2细胞中*Vegf*的表达水平(图7)。结果表明, C91通过激活骨细胞MLO-Y4的Wnt信号, 间接增强了共培养体系中ST2细胞的血管生成能力。

3 讨论

骨代谢的动态平衡对维持正常骨组织的功能起着重要作用。一旦平衡被打破, 就会出现骨质疏松症等骨代谢疾病。Wnt信号通路参与骨的发育和代谢,

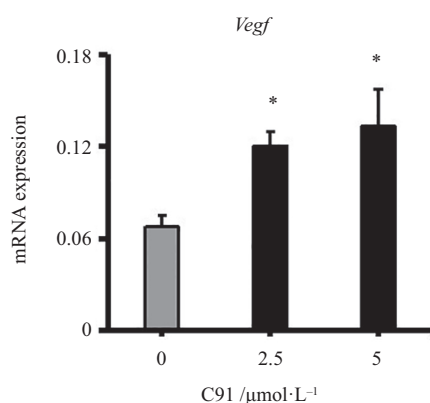


A: C91预处理的MLO-Y4细胞与ST2细胞共培养后的茜素红S染色图(共培养14天, 并于成骨诱导培养基中培养)。B: 图A的10 $\times$ 镜下图, 红色箭头所指为矿化结节。C: 茜素红染色定量分析。* $P<0.05$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ C91组相比, $n=3$ 。

A: alizarin red S staining of C91-preconditioned MLO-Y4 cells co-cultured with ST2 cells (co-cultured in osteogenic induction medium for 14 days). B: the image under the 10 $\times$ microscope of figure A, the red arrow indicates a mineralized nodule. C: alizarin red staining quantitative analysis. * $P<0.05$ compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ C91 group, $n=3$.

图6 C91激活骨细胞Wnt微环境可能减弱共培养ST2细胞的基质矿化能力

Fig.6 C91 activation of osteoblast Wnt microenvironment may attenuate the matrix mineralization capacity of co-cultured ST2 cells



C91处理MLO-Y4细胞24 h, 然后将其与ST2细胞共培养2天, 再采用qRT-PCR方法分析 *Vegf* 的mRNA水平。* $P<0.05$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ C91组相比, $n=3$ 。

MLO-Y4 cells were treated with C91 for 24 h and then co-cultured with ST2 cells for 2 days. The *Vegf* mRNA expression level was then analyzed by qRT-PCR. * $P<0.05$ compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ C91 group, $n=3$.

图7 C91通过激活MLO-Y4细胞Wnt信号促进共培养ST2细胞的促血管生成能力

Fig.7 C91 enhances the proangiogenic capacity of co-cultured ST2 cells by activating Wnt signaling in MLO-Y4 cells

与间充质干细胞、成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞的分化和增殖密切相关。基于Wnt信号通路在骨代谢中的作用, 越来越多的研究人员开始关注骨质疏松症的发病机制, 并通过抑制或激活Wnt信号通路来开发治疗骨质疏松症的药物。Wnt信号通路与BMSCs、成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞密切相关^[27]。Wnt信号是决定BMSCs向成骨细胞定向分化的关键分子。Wnt6、Wnt10a和Wnt10b通过Wnt/ β -catenin信号通路促进BMSCs成骨分化并抑制脂肪细胞分化。过表达Wnt10a会增加 β -catenin的相对表达水平, 进而

诱导成骨分化^[28]。C91是一种小分子Wnt信号激活剂, 通过抑制GSK-3 α/β 来稳定胞内 β -catenin的量, 进而激活Wnt信号^[29]。有研究认为水凝胶中加入C91可促进人诱导多能干细胞衍生心肌细胞(human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes)在3D模块中增殖, 增强3D模块中心脏微组织的收缩力^[30]。研究表明, 小分子药物C91通过稳定骨细胞MLO-Y4中的 β -catenin并促进其核转位, 进而激活Wnt/ β -catenin信号通路下游靶基因的表达。鉴于Wnt/ β -catenin信号通路功能的复杂性, 其异常激活在多种疾病中扮演

关键角色,如在胃癌中其能促进肿瘤转移^[31]。而在骨代谢领域,TU等^[32]的研究证实,该通路对成骨细胞活性具有核心调控作用。基于此,CHEN等^[33]在I型糖尿病模型中进一步证明,适度激活成骨细胞中的 β -catenin转导能有效增强骨形成、改善骨损伤。C91通过激活Wnt信号通路,增强了晚期内皮祖细胞(late endothelial progenitor cells)的增殖和血管生成能力,而且显著促进了晚期内皮祖细胞的迁移^[34]。而我们的研究表明,在共培养体系中小分子药物C91通过激活骨细胞MLO-Y4的Wnt微环境,间接增强成骨细胞ST2细胞的早期成骨分化和成血管能力。

Sost是Wnt/ β -catenin通路中产生的一种重要信号分子。成骨细胞和骨细胞中的Sost浓度与骨量和骨强度呈负相关。在骨质疏松症动物模型中,通过单克隆抗体奥莫索单抗(omosozumab)和布洛索单抗(blosozumab)抑制Sost蛋白的活性,可诱导成骨细胞分化和新骨形成,使骨量恢复正常,并改善骨结构和增加骨强度。临床试验也表明,抗硬骨素抗体治疗可显著增加骨形成,减少骨吸收^[35]。然而,我们的研究揭示了一个矛盾现象:在共培养体系中,小分子药物C91在通过激活骨细胞MLO-Y4的Wnt信号通路以间接促进ST2细胞早期成骨分化的同时,却增强了骨细胞中Sost的表达,并抑制了ST2细胞的晚期成骨标志基因Ocn的表达。最终,这一系列变化导致了ST2细胞的晚期基质矿化受到抑制。谢惠兰等^[36]的研究表明,C91能够通过激活Wnt/ β -catenin信号通路抑制大鼠牙髓干细胞的成骨分化。尽管C91激活了Wnt/ β -catenin信号,但却意外地表现出抑制成骨分化的效应。作者推测,这一看似矛盾的现象可能与牙髓干细胞在不同诱导时期的功能状态差异有关。也有研究表明,小分子药物C91在胚胎干细胞向成骨细胞分化的中期阶段对Wnt/ β -catenin信号通路没有显著影响;此外,该研究还提示,C91的促进作用并非在成骨诱导的所有阶段持续存在^[37]。我们推测小分子药物C91通过激活骨细胞MLO-Y4的Wnt微环境,促进共培养体系中骨髓基质细胞ST2的早期成骨分化。与此同时,C91增加了骨细胞MLO-Y4的Sost的表达水平,由骨细胞产生的Sost在控制骨形成和吸收中起着关键作用。破骨因子Sost的表达上调可能通过负反馈机制间接抑制了ST2细胞的晚期基质矿化;此外,在矿化阶段,Wnt/ β -catenin信号可能不再持续促进分化,其功能可能因细胞诱导阶段的不同而发生转换。

目前大部分关于骨发育的研究都将目光聚焦在干细胞成骨分化上,而由于骨细胞占骨髓细胞数的90%以上,所以我们将目光聚焦在骨细胞上。利用骨细胞和成骨细胞系的共培养模型来模拟体内环境,我们研究证明了C91可激活骨细胞的Wnt微环境,虽然Wnt微环境促进了共培养体系中ST2细胞的早期成骨分化,但同时因为成骨抑制因子Sost的存在和ST2细胞处于不同的诱导阶段,可能间接导致共培养体系中ST2细胞的晚期矿化基质的能力降低。本研究没有对不同诱导时间对ST2细胞的影响进行探讨,这是本实验的局限性。综上所述,本研究结果深化了对骨细胞Wnt信号通路在成骨分化中作用机制的理解,提示了骨细胞可作为干预骨代谢失衡(如骨质疏松)的潜在治疗靶点,对骨质疏松症的防治策略研究具有一定意义。

参考文献 (References)

- [1] CUI Z, MENG X, FENG H, et al. Estimation and projection about the standardized prevalence of osteoporosis in mainland China [J]. Arch Osteoporos, 2019, 15(1): 2.
- [2] CUI J, SHIBATA Y, ZHU T, et al. Osteocytes in bone aging: advances, challenges, and future perspectives [J]. Ageing Res Rev, 2022, 77: 101608.
- [3] DOLE N S, MAZUR C M, ACEVEDO C, et al. Osteocyte-intrinsic TGF- β signaling regulates bone quality through perilacunar/canalicular remodeling [J]. Cell Rep, 2017, 21(9): 2585-96.
- [4] DOOLITTLE M L, MONROE D G, FARR J N, et al. The role of senolytics in osteoporosis and other skeletal pathologies [J]. Mech Ageing Dev, 2021, 199: 111565.
- [5] SONG S, GUO Y, YANG Y, et al. Advances in pathogenesis and therapeutic strategies for osteoporosis [J]. Pharmacol Ther, 2022, 237: 108168.
- [6] BAROI S, CZERNIK P J, CHOUGULE A, et al. PPARG in osteocytes controls sclerostin expression, bone mass, marrow adiposity and mediates TZD-induced bone loss [J]. Bone, 2021, 147: 115913.
- [7] KIM H N, XIONG J, MACLEOD R S, et al. Osteocyte RANKL is required for cortical bone loss with age and is induced by senescence [J]. JCI Insight, 2020, 5(19): e138815.
- [8] ZHAO H, XIE Y, TIEDE-LEWIS L M, et al. Osteocytes acidify their microenvironment in response to PTHrP *in vitro* and in lactating mice *in vivo* [J]. J Bone Miner Res, 2017, 32(8): 1761-72.
- [9] NIU Y, XIAO H, WANG B, et al. Angelica sinensis polysaccharides alleviate the oxidative burden on hematopoietic cells by restoring 5-fluorouracil-induced oxidative damage in perivascular mesenchymal progenitor cells [J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 768-78.
- [10] LEZCANO V, BELLIDO T, PLOTKIN L I, et al. Role of connexin 43 in the mechanism of action of alendronate: dissociation of anti-apoptotic and proliferative signaling pathways [J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 518(2): 95-102.

- [11] TSUKADA T, ISOWA Y, KITO K, et al. Identification of TGF β -induced proteins in non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF by SILAC-assisted quantitative mass spectrometry [J]. *Cell Tissue Res*, 2019, 376(2): 281-93.
- [12] NAGAO N, WAKABAYASHI H, MIYAMURA G, et al. CTLA-4Ig improves hyperalgesia in a mouse model of osteoporosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9479.
- [13] SPATZ J M, WEIN M N, GOOI J H, et al. The wnt inhibitor sclerostin is up-regulated by mechanical unloading in osteocytes *in vitro* [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(27): 16744-58.
- [14] ZHOU Z, ZHAO C, LI S, et al. BMP2-ERK-ATF4 axis-based 6-methoxybenzofuran compound I-9 acts as candidate drug for bone formation and anti-osteoporosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6): 3350.
- [15] KIM J H, LIU X, WANG J, et al. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2013, 5(1): 13-31.
- [16] ZHANG P, LIU Y, WANG Y, et al. SIRT6 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through BMP signaling [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10229.
- [17] XU M, HORRELL J, SNITOW M, et al. WNT10A mutation causes ectodermal dysplasia by impairing progenitor cell proliferation and KLF4-mediated differentiation [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15397.
- [18] HUA Y, YANG Y, LI Q, et al. Oligomerization of Frizzled and LRP5/6 protein initiates intracellular signaling for the canonical WNT/ β -catenin pathway [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(51): 19710-24.
- [19] KIM J, ADACHI T. Cell-fate decision of mesenchymal stem cells toward osteocyte differentiation is committed by spheroid culture [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13204.
- [20] GUO Q, CHEN J, BU Q, et al. Establishing stable and highly osteogenic hiPSC-derived MSCs for 3D-printed bone graft through microenvironment modulation by CHIR99021-treated osteocytes [J]. *Mater Today Bio*, 2024, 26: 101111.
- [21] LIU J, XIAO Q, XIAO J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3.
- [22] YOSHIDA Y, SOMA T, MATSUZAKI T, et al. Wnt activator CHIR99021-stimulated human dermal papilla spheroids contribute to hair follicle formation and production of reconstituted follicle-enriched human skin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(3): 599-605.
- [23] QUARLES L D. Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(5): 276-86.
- [24] DOLE N S, BETANCOURT-TORRES A, KAYA S, et al. High-fat and high-carbohydrate diets increase bone fragility through TGF- β -dependent control of osteocyte function [J]. *JCI Insight*, 2024, 9(16): e175103.
- [25] SAMIEI M, ABEDI A, SHARIFI S, et al. Early osteogenic differentiation stimulation of dental pulp stem cells by calcitriol and curcumin [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 9980137.
- [26] 钟刚, 裴福兴, 李胜富. 血管内皮生长因子(VEGF)基因转染促进成骨细胞成骨活性的实验研究[J]. *中华创伤骨科杂志* (ZHONG G, PEI F X, LI S F. Experimental study on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfection promoting osteogenic activity of osteoblasts [J]. *Chinese Journal of Orthopaedic Trauma*), 2004, 6(10): 1147-50.
- [27] SUN X, LI K, HASE M, et al. Suppression of breast cancer-associated bone loss with osteoblast proteomes via Hsp90ab1/moesin-mediated inhibition of TGF β /FN1/CD44 signaling [J]. *Theranostics*, 2022, 12(2): 929-43.
- [28] ZHANG X Y, LI H N, CHEN F, et al. Icariin regulates miR-23a-3p-mediated osteogenic differentiation of BMSCs via BMP-2/Smad5/Runx2 and WNT/ β -catenin pathways in osteonecrosis of the femoral head [J]. *Saudi Pharm J*, 2021, 29 (12): 1405-15.
- [29] NAUJOK O, LENTES J, DIEKMANN U, et al. Cytotoxicity and activation of the Wnt/beta-catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7: 273.
- [30] HESSELBARTH R, ESSER T U, ROSHANBINFAR K, et al. CHIR99021 promotes hiPSC-derived cardiomyocyte proliferation in engineered 3D microtissues [J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(20): e2100926.
- [31] WEI Y C, ZHANG F, ZHANG T, et al. LDLRAD2 overexpression predicts poor prognosis and promotes metastasis by activating Wnt/ β -catenin/EMT signaling cascade in gastric cancer [J]. *Aging*, 2019, 11(20): 8951-68.
- [32] TU X L, DELGADO-CALLE J, CONDON K W, et al. Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/ β -catenin signaling in bone [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(5): E478-86.
- [33] CHEN S, LIU D, HE S, et al. Differential effects of type 1 diabetes mellitus and subsequent osteoblastic β -catenin activation on trabecular and cortical bone in a mouse model [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(12): 1-14.
- [34] RETHINESWARAN V K, KIM D Y, KIM Y J, et al. CHIR99021 augmented the function of late endothelial progenitor cells by preventing replicative senescence [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4796.
- [35] BULLOCK W A, HOGGATT A M, HORAN D J, et al. Lrp4 mediates bone homeostasis and mechanotransduction through interaction with sclerostin *in vivo* [J]. *iScience*, 2019, 20: 205-15.
- [36] 谢惠兰, 方芳, 林毅. Chir99021调控Wnt/ β -catenin信号通路抑制大鼠牙髓干细胞成骨诱导分化的机制[J]. *解剖学报* (XIE H L, FANG F, LIN Y. Mechanism of Chir99021 regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway to inhibit osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells [J]. *Acta Anatomica Sinica*), 2024, 55(1): 67-72.
- [37] 何巧娟, 张娜娜, 殷应传, 等. Wnt/ β -catenin信号通路促进小鼠胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞分化[J]. *安徽医科大学学报* (HE Q J, ZHANG N N, YIN Y C, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway promotes differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-secreting cells [J]. *Journal of Anhui Medical University*), 2019, 54(12): 1841-8.