

·基础研究·

NICD 表达下调对辐射损伤小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 增殖和功能基因表达的影响

边佩鲜 杨冰 王靖雅 孙元明 龙伟

300192 天津, 中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室(边佩鲜、王靖雅、孙元明、龙伟); 300070, 天津医科大学基础医学院细胞生物学系(杨冰)

通信作者: 龙伟, Email: longwei@irm-cams.ac.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2018.02.007

【摘要】目的 利用 RNA 干扰抑制小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 表达 Notch 信号通路胞内结构域 (NICD), 探讨靶向抑制 NICD 表达对辐射损伤 MC3T3-E1 细胞的增殖和相关功能基因表达的影响。**方法** 建立抑制 NICD 表达的 MC3T3-E1 细胞株, 利用实时定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blot 法检测其 NICD 基因的表达。MC3T3-E1 细胞和 NICD RNA 干扰 MC3T3-E1 细胞经 2 Gy γ 射线照射后, 用 BrdU 掺入法和 qRT-PCR 法检测上述细胞的增殖及相关功能基因的表达水平。使用 Student-Newman-Keuls 进行组间差异分析, 两组间比较采用 t 检验。**结果** 用 RNA 干扰技术可靶向抑制 MC3T3-E1 细胞表达 NICD。抑制 NICD 表达可干扰前体成骨细胞和成骨细胞的增殖。2 Gy 照射后, 前体成骨细胞和成骨细胞以及 NICD RNA 干扰的成骨细胞的增殖明显下降, 各靶细胞的相关功能基因与照射前相比的变化如下: ①2 Gy 照射后的前体成骨细胞成骨特异性转录因子 (Runx2) 表达上调, 差异有统计学意义 ($t=2.353, P<0.05$), NICD RNA 干扰的前体成骨细胞 Runx2 表达下调, 差异有统计学意义 ($t=2.353, P<0.05$); ②2 Gy 照射后的前体成骨细胞和成骨细胞以及 NICD RNA 干扰的前体成骨细胞碱性磷酸酶 (ALP) 表达上调, 差异有统计学意义 ($t=3.182, 3.345, 3.555$, 均 $P<0.05$), NICD RNA 干扰的成骨细胞 ALP 表达下调, 差异有统计学意义 ($t=5.045, P<0.01$); ③2 Gy 照射后前体成骨细胞核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 表达下调, 差异有统计学意义 ($t=2.541, P<0.05$), 成骨细胞和 NICD 干扰的前体成骨细胞 RANKL 表达上调, 差异有统计学意义 ($t=3.299, P<0.05$; $t=10.212, P<0.01$), 而抑制 NICD 表达则发生相反变化, 差异无统计学意义 ($t=0.765, P>0.05$); ④2 Gy 照射后的前体成骨细胞和成骨细胞骨保护素 (OPG) 表达下调, 差异有统计学意义 ($t=2.994, 2.782$, 均 $P<0.05$), 抑制 NICD 表达使前体成骨细胞 OPG 表达上调, 差异有统计学意义 ($t=5.841, P<0.01$), 成骨细胞 OPG 表达下调, 差异有统计学意义 ($t=2.544, P<0.05$); ⑤2 Gy 照射后各靶细胞巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 表达变化趋势与 RANKL 表达变化情况一致。**结论** 在不同阶段的成骨细胞中抑制 NICD 表达对辐射损伤表现出的作用是不同的: ①可降低前体成骨细胞和成骨细胞的增殖, 对辐射损伤后的前体成骨细胞的增殖有保护作用; ②可通过调节 Runx2 从而明显抑制辐照后前体成骨细胞分化, 减少骨质丢失; ③辐照后各成骨细胞不会通过 RANKL/OPG/RANK 系统表现出对破骨细胞功能的调节作用; ④成骨细胞经过调节 M-CSF 表现出对破骨细胞的功能抑制作用。

【关键词】 Notch 信号通路胞内结构域; RNA 干扰; 辐射损伤, 实验性; MC3T3-E1 细胞**基金项目:** 国家自然科学基金 (81673106); 天津市自然科学基金 (14JCYBJC26700、16JQNJC12100); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2017-12M-1-012)

Effects of NICD expression downregulation on the proliferation and function-related gene expression of radiation-damaged MC3T3-E1 cells *Bian Peixian, Yang Bing, Wang Jinya, Sun Yuanming, Long Wei*
Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China (Bian PX, Wang JY, Sun YM, Long W); Department of Cell Biology, Institute of Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China (Yang B)

Corresponding author: Long Wei, Email: longwei@irm-cams.ac.cn

【Abstract】 Objective RNA interference (RNAi) is used to inhibit Notch intracellular domain (NICD) expression in MC3T3-E1 cells. The aim of RNAi is to observe the effect of the inhibition of the NICD expression on cell proliferation and function-related gene expression in MC3T3-E1 cells exposed to 2 Gy radiation. **Methods** The MC3T3-E1 cells were established to inhibit the NICD. The NICD expression of cells was detected by using qRT-PCR and Western blot. MC3T3-E1 and inhibited NICD MC3T3-E1 cells were irradiated with 2 Gy. Then, the proliferation and function-related gene expression were detected through BrdU incorporation and qRT-PCR. **Results** NICD expression in MC3T3-E1 cells could be inhibited by the RNAi technology. The inhibition of NICD expression could interfere with the proliferation of precursor osteoblasts and osteoblasts. The proliferation of precursor osteoblasts, osteoblasts, and NICD RNAi osteoblasts significantly decreased after 2 Gy irradiation. The function-related gene expression of each target cell is as follows. ① The expression of Runt-related transcription factor 2 (Runx2) was upregulated in precursor osteoblasts ($t = 2.353, P < 0.05$) and downregulated in the NICD RNAi precursor osteoblasts ($t = 2.353, P < 0.05$) after 2 Gy irradiation. ② The expression of alkaline phosphatase (ALP) was upregulated in precursor osteoblasts and osteoblasts and the NICD RNAi precursor osteoblasts ($t = 3.182, 3.345, 3.555$, all $P < 0.05$) and was downregulated in the NICD RNAi osteoblasts ($t = 5.045, P < 0.01$) after 2 Gy irradiation. ③ The expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) was downregulated in precursor osteoblasts ($t = 2.541, P < 0.05$) and was upregulated in osteoblasts and NICD RNAi precursors osteoblast ($t = 3.299, P < 0.05; t = 10.212, P < 0.01$) after 2 Gy irradiation. However, the inhibition of the NICD expression could cause an opposite change in other cells ($t = 0.765, P > 0.05$). ④ The expression of osteoprotegerin (OPG) was downregulated in precursor osteoblasts and osteoblasts ($t = 2.994$ and $2.782, P < 0.05$) after 2 Gy irradiation. However, the inhibition of the NICD expression could cause expression upregulation in precursor osteoblasts and expression downregulation in osteoblasts ($t = 5.841, P < 0.01$). ⑤ The expression of macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) in the target cells exhibited the same trend as the expression of RANKL after 2 Gy irradiation. **Conclusions** The inhibition of the NICD expression exerts different effects on the differentiation of irradiated osteoblasts. The inhibition of the NICD expression could cause a series of changes including: ① It may decrease the proliferation of precursor osteoblasts and osteoblasts and protect the proliferation of differentiating precursor osteoblasts after irradiation. ② It can significantly inhibit the differentiation of precursors osteoblasts after irradiation and reduce bone loss through regulating the expression of Runx2. ③ The osteoblasts did not show the regulated function of the osteoclasts through the RANKL/OPG/RANK system. ④ The osteoblasts can exhibit the inhibited function of the osteoclasts through the expression of M-CSF.

【Key words】 Notch intracellular domain; RNA interference; Radiation injuries, experimental; MC3T3-E1 cell

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81673106); National Natural Science Foundation of Tianjin (14JCYBJC26700, 16JCQNJC12100); CAMS Innovation Fund for Medical Science (2017-12M-1-012)

临床上,放疗是治疗肿瘤的主要且有效的手段,但是射线在杀伤肿瘤细胞的同时会对患者机体带来骨损伤^[1-2]。临床数据表明肿瘤放疗可导致骨组织减少8%~23%^[3]。长期的放疗可以导致患者产生骨密度减少、骨质疏松、骨变薄、骨折、骨坏死等骨损伤^[4]。小鼠全身受到2 Gy照射后,骨密度明显减

少,进一步的研究结果表明小鼠全身受2 Gy照射后,早期会出现破骨细胞数量的增加和功能的提升^[5-6]。

MC3T3-E1细胞系是源于C57BL/6小鼠颅盖骨的成骨细胞系,是研究成骨细胞的良好模型^[7]。Notch信号转导通路对成骨细胞的增殖、分化和功能有重要影响^[8-9]。转基因小鼠实验结果表明,Notch通路

对成骨细胞的分化具有抑制作用^[10]。Notch 信号通路胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD)是 Notch 信号通路中重要的信号分子,其在 Notch 信号通路中起关键的承上启下作用。

我们利用 RNA 干扰技术抑制 NICD 表达建立稳定抑制 NICD 表达的 MC3T3-E1 细胞株,并于体外诱导分化为前体成骨细胞和成骨细胞。在辐射损伤后,对前体成骨细胞和成骨细胞的生长和功能基因的变化进行了观察。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

MC3T3-E1 细胞系购买于中国医学科学院基础医学研究所。DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); Opti-MEM 培养基、Lipofectamine 2000 转染试剂、Trizol 试剂、M-MLV 逆转录酶试剂盒、实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)试剂盒(美国 Invitrogen 公司); G418、Roche Cell Proliferation ELISA、5-溴-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)(colorimetric)试剂盒(德国 Sigma-Aldrich 公司); 蛋白浓度测定试剂盒(上海生工生物工程有限公司); 鼠源 β -actin 单抗(日本 Santa Cruz Biotechnology 公司); 兔源 NICD 多抗(美国 Millipore 公司)。

1.2 仪器设备

¹³⁷Cs γ 射线放射源(加拿大 Gamma II40, 吸收剂量率 0.99 Gy/min); CFX96Touch™ Real time PCR 仪、ChemiDoc™ XRS+ 成像系统、Mini-PROTEAN® Tetra 电泳槽、Sub-Cell® GT Cell 水平小型电泳槽、Trans-Blot® 半干转印槽、Gene Pulser MXcell™ 电穿孔系统(美国 Bio-Rad 公司); M200 酶标仪(瑞士 Tecan 公司); Nanodrop 2000 UV-Vis 分光光度计、HEPA Class100 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司); 倒置显微镜(上海蔡康光学仪器厂); -80℃超低温冰箱(美国 Thermo Forma 公司); 4℃冰箱(广东容声电器股份有限公司); -20℃冰箱(日本三洋电器); 高速台式离心机(上海嘉鹏科技有限公司); 5430R 小型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf); 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); 微量恒温器(绍兴市卫星医疗设备制造有限公司)。

1.3 MC3T3-E1 细胞的培养、传代及诱导分化

将 MC3T3-E1 细胞系细胞加入含 10% 胎牛血清、

青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 pg/mL)的 DMEM 完全培养液中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度恒温培养箱中培养,每 2~3 d 更换培养液 1 次。待细胞贴壁生长至 70%~80% 融合时,弃去培养液, PBS 清洗,消化,室温离心 5 min(1000 r/min, 离心半径 5 cm),用于细胞实验。

MC3T3-E1 细胞贴壁生长至 70%~80% 融合时,根据文献[11]和[12]将培养液更换为成骨细胞分化培养液(osteoblast differentiation medium, OBDM)培养,同样每 2~3 d 更换培养液 1 次,培养 8 d 左右则可分化为前体成骨细胞,培养 18 d 左右分化为成熟的成骨细胞。OBDM 完全培养液中含有 10⁻⁸ mol/L β 甘油磷酸钠、50 μ g/mL 维生素 C 和 10⁻⁸ mol/L 地塞米松。

1.4 细胞照射

将培养 5 d 的前体成骨细胞和培养 15 d 的成骨细胞以 ¹³⁷Cs γ 射线放射源分别进行 2 Gy 照射。同时,参照文献 [13],继续培养 3 d 后,将细胞样品用于实验分析。

1.5 RNA 提取及逆转录

用 Trizol 法提取细胞样品中的 RNA。根据 M-MLV 逆转录试剂盒说明书进行逆转录。逆转录后的 cDNA 分装,置于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.6 利用 RNA 干扰技术建立稳定抑制 NICD 表达的 MC3T3-E1 细胞株

选取 NICD 序列 1691 作为干扰位点,干扰序列设计、合成和表达载体 pGPH1/GFP/Neo 构建由上海吉码公司完成。NICD 的 RNA 干扰序列正反向分别是 5'-CACCGCATATGTATGCCAGGTTATGTTCAAG-3' 和 5'-AGACATAACCTGGCATAACATATGCTTTTTTG-3'。

将生长良好的 MC3T3-E1 细胞置于 96 孔板中,每孔 100 μ L,含细胞 1 \times 10⁴ 个,培养过夜。每孔换用无抗生素的完全培养基 100 μ L,培养过夜。将 4 μ g 的 NICD 的 RNA 干扰序列载体 DNA 加入 250 μ L 无血清的 Opti-MEM 培养基中。加入 5 μ L Lipofectamine 2000 于 250 μ L 相同的无血清 Opti-MEM 培养基中。将上述两种液体混匀,室温下放置 30 min,使 cDNA 和 Lipofectamine 2000 形成复合物。弃去转染培养液,将之前形成的复合物加到 96 孔板中,每孔 100 μ L,培养 24 h 后,用 G418 进行筛选,成功转染后的细胞将具有 G418 抗性。倒置荧光显微镜下

观察结果。

1.7 细胞增殖实验

根据 colorimetric 试剂盒说明书进行操作, 将照射后 3 d 的 MC3T3-E1 细胞离心(1000 转/min, 离心半径为 5 cm)弃去培养基, 用 PBS 洗 3 遍, 每孔加入 100 μ L 已经加入胎牛血清和 L-谷氨酰胺的 α -MEM 培养基。每孔加入 10 μ L BrdU 标记溶液(终浓度为 10 μ mol/L)后, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中继续培养 2 h。弃去培养液, 每孔加入 200 μ L FixDenat 溶液, 室温孵育 30 min 后, 弃去。每孔加入连接有过氧化氢酶的 BrdU 单抗(anti-BrdU-POD)100 μ L, 室温孵育 90 min 后, 弃去。使用 PBS 洗 3 遍, 弃去 PBS, 每孔加入 100 μ L TMB(四甲基联苯胺)底物溶液室温孵育 5~30 min, 直至显色足够进行检测为止。置于 BioTek Synergy HT 多功能微孔板检测仪上, 测定每孔在 370 nm 和 492 nm 波长处的吸光度值。

1.8 qRT-PCR

根据 Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Super Mix-UDG with ROX 试剂盒说明书, 用 qRT-PCR 仪进行 qRT-PCR 反应。反应条件: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法^[4]来评价目的基因 mRNA 的表达水平。靶基因引物由 Invitrogen 公司合成, 序列见表 1。

1.9 Western blot

用哺乳动物细胞总蛋白抽提试剂裂解细胞提取蛋白。使用二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离抽提蛋白, 在转印槽内进行半干转, 将目的蛋白转到硝酸纤维素膜上, 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 分别用各靶蛋白的一抗与相应二抗孵育、洗脱及化学发光显色, 最后用 BIO-RAD Chemi-Doc[™] XRS+ 成像系统检测蛋白表达。其中, 兔源 NICD 多抗的工作浓度为 1:500, 抗兔源的 NICD 二抗的工作浓度为 1:5000; 鼠源 β -Actin 单抗的工作浓度为 1:1000, 抗鼠源 β -Actin 的二抗的工作浓度为 1:5000。

1.10 统计学分析

采用 OriginPro 8 绘图分析软件进行柱状图的绘制, 用 SPSS 12.0 统计软件处理

数据, 对各细胞增殖、相关功能基因的表达实验数据进行分析, 各组数据均来自正态分布总体, 符合正态分布和方差齐性。使用 Student-Newman-Keuls 进行组间显著性差异分析, 并对组间进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定抑制 NICD 表达的 MC3T3-E1 细胞株的 NICD 表达水平

NICD 的 RNA 干扰序列表达载体 pGPH1/GFP/Neo 转染 MC3T3-E1 细胞, 经 G418 筛选, 在荧光显微镜下可见转染 MC3T3-E1 的细胞有荧光出现, 并随着培养时间延长, 带有荧光的细胞增多(图 1)。对该细胞进行 qRT-PCR 和 Western blot 检测, 结果表明, 与对照组 MC3T3-E1 相比, NICD 的表达水平明显降低, 两者之间的差异有统计学意义 ($t = 4.774$, $P < 0.01$)(图 2)。

2.2 辐射对 MC3T3-E1 和 NICD RNA 干扰的 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

MC3T3-E1 和 NICD RNA 干扰的 MC3T3-E1 细胞分别在 OBDM 中培养 5 d 和 15 d, 各自分别接受 2 Gy 照射, 3 d 后进行 BrdU 掺入实验。各种细胞 BrdU 掺入量依次是: 前体成骨细胞 > 成骨细胞 > NICD RNA 干扰的前体成骨细胞 > NICD RNA 干扰的成骨细胞。RNA 干扰的成骨细胞与成骨细胞相比 BrdU 掺入量下降, 差异有统计学意义 ($t = 2.828$, $P < 0.05$), 这表明 RNA 干扰抑制成骨细胞的增殖。与 0 Gy 相比, 经过 2 Gy 照射后, 前体成骨细胞和成骨细胞以及 NICD RNA 干扰的成骨细胞的 BrdU 掺入量明显下降, 差异有统计学意义 ($t = 3.365$ 、 3.451 、 3.213 , 均 $P < 0.01$)。照射前后, NICD RNA

表 1 成骨细胞功能靶基因引物序列

Table 1 The primer sequences of target genes in osteoblasts

基因	前导链(5'-3')	后随链(5'-3')
ALP	TCAGGGCAATGAGGTACATC	CACAATGCCCCACGGACTTC
Runx2	CGGCCCTCCCTGAACTCT	TGCCTGCTGGGATCTGTA
M-CSF	CATCGAGACCCTCAGACATT	GCTGCTTCTTTCATCCAGTC
RANKL	CCAAGATCTCTAACATGACG	CACCATCAGCTGAAGATACT
OPG	ACAGAGACCAGGAAATGGTG	CTCTCCATCAAGGCAAGAAG
β -Actin	GAGACCTTCAACACCCAGCC	AATGTCAGGCACGATTTCCC

注: 表中, ALP: 碱性磷酸酶; Runx2: 成骨特异性转录因子 2; M-CSF: 巨噬细胞集落刺激因子; RANKL: 核因子 κ B 受体活化因子配体; OPG: 骨保护素; β -Actin: β 肌动蛋白。

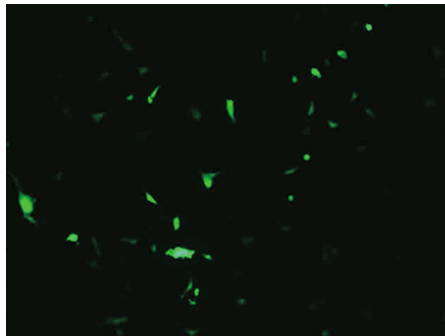


图1 倒置荧光显微镜($\times 20$)下 RNA 干扰 Notch 信号通路胞内结构域的 MC3T3-E1 细胞

Fig.1 Notch intracellular domain RNAi MC3T3-E1 cells under the inverted fluorescence microscope ($\times 20$)

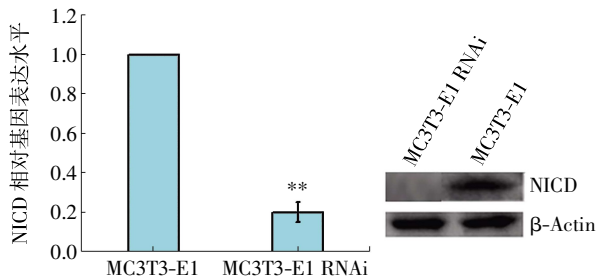


图2 实时定量 PCR 和 Western blot 检测 NICD 表达水平 图中, RNAi: RNA 干扰; NICD: Notch 信号通路胞内结构域; β -Actin: β 肌动蛋白; ** 表示与对照组 MC3T3-E1 相比, NICD 的表达水平明显降低, 两者之间的差异有统计学意义 ($t=4.774, P<0.01$)。

Fig.2 Real-time quantitative PCR and Western blot examined Notch intracellular domain(NICD) expression in NICD RNAi MC3T3-E1 and MC3T3-E1 cells

干扰的前体成骨细胞 BrdU 掺入量没有明显改变, 这表明 NICD RNA 干扰抑制前体成骨细胞和成骨细胞的增殖。2 Gy 照射对 NICD 低表达的前体成骨细胞增殖的抑制作用不敏感, 差异无统计学意义 ($t=0.714, P>0.05$), 但对成骨细胞增殖的抑制作用明显, 差异有统计学意义 ($t=3.377, P<0.01$) (图3)。

2.3 辐射对 MC3T3-E1 细胞和 NICD RNA 干扰的 MC3T3-E1 细胞功能基因表达水平的影响

qRT-PCR 检测各靶细胞功能基因表达水平, 以 0 Gy、2 Gy 照射的细胞 cDNA 为模板, 通过 qRT-PCR 分别检测各受照射剂量的成骨特异性转录因子 2(Runt-related transcription factor 2, *Runx2*)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, *ALP*)、骨保护素(osteoprotegerin, *OPG*)、核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor κ B ligand,

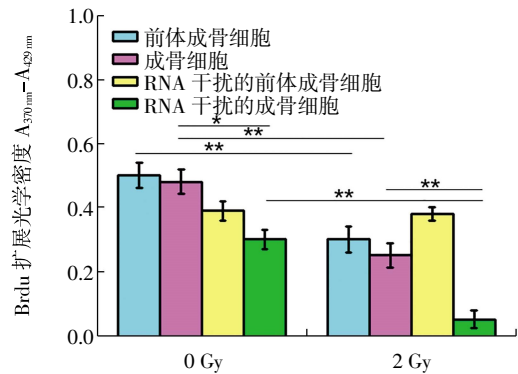


图3 2 Gy 照射对 MC3T3-E1 和 NICD RNA 干扰的 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 图中, BrdU: 5-溴-2'-脱氧尿嘧啶核苷; NICD: Notch 信号通路胞内结构域。除 RNA 干扰的前体成骨细胞外, 2 Gy 照射组各细胞增殖状况与 0 Gy 对照组相比, 差异有统计学意义($t=3.365, 3.451, 3.213$, 均 $P<0.01$); 成骨细胞与 RNA 干扰的成骨细胞增殖相比, 差异有统计学意义 ($t=2.828, P<0.05$); 2 Gy 照射组成骨细胞与 RNA 干扰的成骨细胞增殖相比, 差异有统计学意义($t=3.377, P<0.01$); * 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$ 。

Fig.3 Effect of 2 Gy radiation on proliferation of MC3T3-E1 and Notch intracellular domain(NICD) RNAi MC3T3-E1 cells

RANKL)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage-colony stimulating factor, *M-CSF*)和 β 肌动蛋白(β -Actin)的 mRNA 表达量(图4)。辐射对各细胞功能基因(*Runx2*、*ALP*、*RANKL*、*OPG* 和 *M-CSF*)表达的影响如下。①*Runx2*: 与 0 Gy 相比, 2 Gy 照射后的前体成骨细胞表达小幅度上调, 差异有统计学意义($t=2.353, P<0.05$), 成骨细胞表达小幅度下调, 差异有统计学意义($t=2.342, P<0.05$), NICD RNA 干扰的前体成骨细胞和成骨细胞的表达小幅度下调, 差异有统计学意义($t=2.353, 2.543, P<0.05$)。②*ALP*: 与 0 Gy 相比, 2 Gy 照射后的前体成骨细胞、成骨细胞和 NICD RNA 干扰的前体成骨细胞表达上调, 差异有统计学意义 ($t=3.182, 3.345, 3.555, P<0.05$), NICD RNA 干扰的成骨细胞表达下调, 差异有统计学意义($t=5.045, P<0.01$)。③*RANKL*: 与 0 Gy 相比, 2 Gy 照射后成骨细胞和 NICD RNA 干扰的前体成骨细胞表达上调, 差异有统计学意义($t=3.299, P<0.05; t=10.212, P<0.01$), 前体成骨细胞表达下调, 差异有统计学意义($t=2.541, P<0.05$), NICD RNA 干扰的成骨细胞表达变化不明显, 差异无统计学意义 ($t=0.765, P>0.05$)。④*OPG*: 与 0 Gy 相比, 2 Gy 照射后的前体成骨细胞、成骨细胞和 NICD RNA 干扰的成骨细

胞表达下调, 差异有统计学意义($t=2.994$ 、 2.782 、 2.544 , $P<0.05$), NICD RNA 干扰的前体成骨细胞的表达上调, 差异有统计学意义($t=5.841$, $P<0.01$)。⑤M-CSF: 与 0 Gy 相比, 2 Gy 照射后前体成骨细胞的表达下调, 差异有统计学意义($t=2.379$, $P<0.05$), 成骨细胞的表达上调, 差异有统计学意义($t=2.353$, $P<0.05$), NICD RNA 干扰的前体成骨细胞表达为不明显上调, 差异无统计学意义($t=0.752$, $P>0.05$), NICD RNA 干扰的成骨细胞表达明显下调, 差异有统计学意义($t=7.453$, $P<0.01$)。

3 讨论

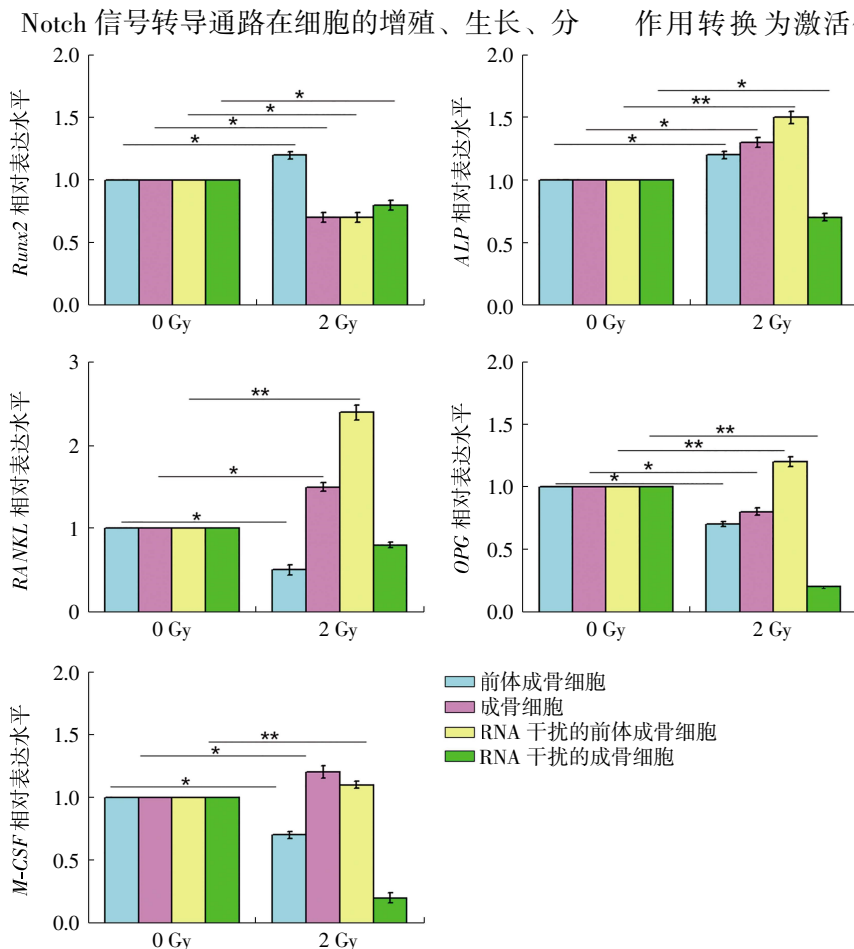


图 4 实时定量 PCR 检测辐射对 MC3T3-E1 RNAi 和 MC3T3-E1 细胞的前体成骨细胞及成骨细胞中各基因表达水平的影响 图中, ALP: 碱性磷酸酶; Runx2: 成骨特异性转录因子 2; M-CSF: 巨噬细胞集落刺激因子; RANKL: 核因子 κ B 受体活化因子配体; OPG: 骨保护素; * 表示, 0 Gy 与 2 Gy 照射后相比, 各基因表达水平之间的差异有统计学意义 ($t=2.342 \sim 3.555$, 均 $P<0.05$); ** 表示, 0 Gy 与 2 Gy 照射后相比, 各基因表达水平之间的差异有统计学意义 ($t=5.045 \sim 10.212$, 均 $P<0.01$)。

Fig.4 Real-time quantitative PCR detects the effect of radiation on genes expression in the precursor osteoblasts and osteoblasts derived from MC3T3-E1 and Notch intracellular domain RNAi MC3T3-E1 cells

化和凋亡等生理过程中至关重要。在哺乳动物中, Notch 信号通路有多种受体和配体, 这些配体和受体都是单跨膜蛋白, 需要细胞之间的相互作用才能激活。当相邻细胞的 Notch 配体和受体结合后, 诱导靠近跨膜区域的 Notch 受体细胞内部分的 C 端被切割, NICD 释放, 进入细胞核内。在细胞核内没有 NICD 时, CSL (人为 CBF1, 鼠为 RBPJ, 果蝇为 Suppressor of hairless, 线虫为 Lag1) 和组蛋白去乙酰复合物 (histone deacetylase complexes, HDAC) 与 DNA 结合, 抑制转录。NICD 进入细胞核后, 替换该复合物, 与 CSL 和 Mastermind-like 蛋白形成三元复合体, 将 CSL 蛋白原来的转录抑制作用转换为激活作用^[15]。NICD 在 Notch 信号通路中起到了非常重要的作用。在成骨细胞分化早期, NICD 过表达可以导致成骨细胞数量减少, 进而导致骨质疏松; 但在成骨细胞分化晚期, NICD 过表达将会影响成骨细胞的成熟, 导致成骨细胞不能形成正常的骨组织。当 NICD 表达被干扰抑制后, 成骨细胞激活破骨细胞的作用明显减少^[16-18]。已有文献报道, 2 Gy 照射全身的小鼠出现明显骨丢失^[5]。所以我们选用了 MC3T3-E1 细胞, 经 2 Gy 照射后, 来探讨 NICD 表达下调对成骨细胞的增殖和功能的影响。

我们用 RNA 干扰技术抑制 MC3T3-E1 细胞的 NICD 表达, 在荧光倒置显微镜下观察到该转染细胞生长良好, qRT-PCR 和 Western blot 实验结果表明 NICD 表达下调, 表明 NICD RNA 干扰的 MC3T3-E1 细胞模型设置良好。为了观察 NICD RNA 干扰的 MC3T3-E1 细胞受到 2 Gy 照射损伤后对其增殖的影响, 采用 BrdU 掺入法进行

分析。BrdU可代替胸腺嘧啶核苷插入复制的DNA双链中,这种置换可稳定存在,并带到子代细胞中。用免疫学方法检测DNA中BrdU的含量,从而可以判断细胞的增殖能力。2 Gy照射剂量对前体成骨细胞、成骨细胞以及NICD RNA干扰的成骨细胞的增殖抑制作用是明显的,但2 Gy照射对NICD RNA干扰的前体成骨细胞的增殖无明显影响,这表明NICD低表达对MC3T3-E1的前体成骨细胞的增殖有保护作用。

为了揭示NICD RNA干扰的MC3T3-E1细胞受辐射损伤后的功能变化,我们分析了相关基因*Runx2*、*ALP*、*RANKL*、*OPG*和*M-CSF*的表达。*Runx2*是成骨细胞分化和骨质形成过程中一种重要的转录因子,是成骨细胞定向分化的重要标志。由MC3T3-E1细胞分化的前体成骨细胞经2 Gy照射后*Runx2*表达上升,而经NICD RNA干扰的前体成骨细胞受到2 Gy照射后*Runx2*表达下降可知,NICD RNA干扰对经2 Gy照射后的前体成骨细胞的定向分化有抑制作用。Wei等^[19]通过抑制*Runx2*相关的AMP依赖的蛋白激酶降解,使*Runx2*表达降低,进而发现可以抑制成骨细胞分化。有文献表明*Runx2*过表达的转基因小鼠会表现出骨质减少症状^[20]。抑制*Runx2*表达会减少成骨细胞的分化,同时ALP水平也会出现降低^[21]。ALP是成骨细胞分化的重要标志性分子^[22]。NICD RNA干扰的成骨细胞经2 Gy照射后ALP的表达水平下调,说明NICD表达下调能抑制受2 Gy照射后的成骨细胞的分化,减少骨质损伤。

成骨细胞对破骨细胞具有调控作用,这种调控是通过OPG/RANK/RANKL(RANK:核因子 κ B受体活化因子)系统来发挥作用的。成骨细胞表达的RANKL与破骨细胞表达的RANK结合,能诱导促进破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞。OPG是成骨细胞表达的分泌性乙二醇蛋白,与RANKL竞争性地结合RANK,但是并不能对破骨细胞发挥促进作用^[23]。经2 Gy照射后的成骨细胞对RANKL的表达上调,这表明照射后的成骨细胞能提高破骨细胞的功能;NICD RNA干扰的MC3T3-E1细胞的成骨细胞经2 Gy照射后RANKL的表达水平下调,但并没有表现出降低破骨细胞的功能作用。经2 Gy照射后的前体成骨细胞和成骨细胞对OPG的表达下调,这表明辐射损伤后的细胞激活了破骨细胞的

功能;而NICD RNA干扰的前体成骨细胞的OPG表达上调,表现出抑制破骨细胞功能的作用。M-CSF在破骨细胞的分化中起着非常重要的作用,其可以增强RANKL诱导的破骨细胞的骨吸收能力^[24-25],照射后成骨细胞的M-CSF表达上升,促进了破骨细胞功能。相比之下,NICD RNA干扰的成骨细胞经2 Gy照射后,对M-CSF的表达明显下降,降低了破骨细胞功能。

本研究结果证实,抑制NICD表达可降低MC3T3-E1诱导的前体成骨细胞的增殖与分化,降低成骨细胞的增殖,从而减少骨质损伤。同时,抑制NICD表达的前体成骨细胞及成骨细胞通过调节*Runx2*、*ALP*、*RANKL*、*OPG*、*M-CSF*等基因的表达抑制前体成骨细胞分化,实现对破骨细胞功能的调节与抑制作用,进而减少骨丢失。这表明,NICD在辐射引起的成骨细胞与破骨细胞功能及分化的抑制中起到了重要的作用。此外,*Runx2*、*ALP*、*RANKL*、*OPG*、*M-CSF*等基因在辐射损伤的成骨细胞与破骨细胞之间的调节中至关重要。本研究为后续探究辐射后的骨重塑提供了有力依据。

利益冲突 本研究有署名作者按以下贡献声明独立开展,不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 边佩鲜负责实验的实施、数据的提供、论文的起草与修订;杨冰、王静雅负责实验的实施与数据的提供;孙元明负责论文的审阅;龙伟负责论文命题的提出及方法设计。

参 考 文 献

- [1] Brown SA, Guise TA. Cancer treatment-related bone disease[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009, 19(1): 47-60. DOI: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v19.i1.20.
- [2] 杨文峰, 杨志祥, 胡燕, 等. 《外照射放射性骨损伤诊断标准》解读[J]. 国际放射医学与核医学杂志, 2012, 36(4): 227-230. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2012.04.008.
Yang WF, Yang ZX, Hu Y, et al. Explanation of Diagnostic Criteria for External Radiation Bone Injury[J]. Int J Radiat Med Nucl Med, 2012, 36(4): 227-230.
- [3] Hopewell JW. Radiation-therapy effects on bone density[J]. Med Pediatr Oncol, 2003, 41(3): 208-211. DOI: 10.1002/mpo.10338.
- [4] Willey JS, Lloyd SA, Nelson GA, et al. Space Radiation and Bone Loss[J]. Gravit Space Biol Bull, 2011, 25(1):14-21.
- [5] Willey JS, Lloyd SA, Robbins ME, et al. Early increase in osteoclast number in mice after whole-body irradiation with 2 Gy X rays[J]. Radiat Res, 2008, 170(3): 388-392. DOI: 10.1667/RR1388.1.
- [6] Hamilton SA, Pecaut MJ, Gridley DS, et al. A murine model for bone loss from therapeutic and space-relevant sources of radiation[J].

- J Appl Physiol (1985), 2006, 101(3): 789–793. DOI: 10.1152/jappphysiol.01078.2005.
- [7] Chaves NAH, Machado D, Yano CL, et al. Antioxidant defense and apoptotic effectors in ascorbic acid and β -glycerophosphate-induced osteoblastic differentiation[J]. Dev Growth Differ, 2011, 53(1): 88–96. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01232.x.
- [8] 唐泉, 杨冰, 仲蕾蕾, 等. 电离辐射对 MC3T3 细胞增殖和 Notch1、Jagged1 基因表达的影响[J]. 辐射损伤与辐射工艺学报, 2012, 30(6): 374–377.
Tang Q, Yang B, Zhong LL, et al. Effects of ionizing radiation on MC3T3 cell proliferation and expression of Notch1 and Jagged1[J]. J Radiat Res Radiat Process, 2012, 30(6): 374–377.
- [9] Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate [J]. Development, 2004, 131(5): 965–973. DOI: 10.1242/dev.01074.
- [10] Siebel C, Lendahl U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease[J]. Physiol Rev, 2017, 97(4): 1235–1294. DOI: 10.1152/physrev.00005.2017.
- [11] Zanotti S, Canalis E. Notch and the skeleton[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(4): 886–896. DOI: 10.1128/MCB.01285-09.
- [12] Bo Y, Yan L, Gang Z, et al. Effect of calcitonin gene-related peptide on osteoblast differentiation in an osteoblast and endothelial cell co-culture system[J]. Cell Biol Int, 2012, 36(10): 909–915. DOI: 10.1042/CBI20110562.
- [13] Pérez-Campo FM, May T, Zauers J, et al. Generation and characterization of two immortalized human osteoblastic cell lines useful for epigenetic studies[J]. J Bone Miner Metab, 2017, 35(2): 150–160. DOI: 10.1007/s00774-016-0753-z.
- [14] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101–1108.
- [15] Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC. The molecular logic of Notch signaling—a structural and biochemical perspective[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 19): 3109–3119. DOI: 10.1242/jcs.035683.
- [16] Mead TJ, Yutzey KE. Notch signaling and the developing skeleton [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 727: 114–130. DOI: 10.1007/978-1-4614-0899-4_9.
- [17] Engin F, Yao Z, Yang T, et al. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis[J]. Nat Med, 2008, 14(3): 299–305. DOI: 10.1038/nm1712.
- [18] Bai S, Kopan R, Zou W, et al. NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(10): 6509–6518. DOI: 10.1074/jbc.M707000200.
- [19] Wei J, Shimazu J, Makinistoglu MP, et al. Glucose Uptake and Runx2 Synergize to Orchestrate Osteoblast Differentiation and Bone Formation[J]. Cell, 2015, 161(7): 1576–1591. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.029.
- [20] Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways[J]. J Cell Biochem, 2003, 88(3): 446–454. DOI: 10.1002/jcb.10369.
- [21] Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures[J]. J Cell Biol, 2001, 155(1): 157–166. DOI: 10.1083/jcb.200105052.
- [22] Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, et al. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation[J]. J Biol Chem, 1999, 274(11): 6972–6978.
- [23] Pivonka P, Zimak J, Smith DW, et al. Theoretical investigation of the role of the RANK-RANKL-OPG system in bone remodeling[J]. J Theor Biol, 2010, 262(2): 306–316. DOI: 10.1016/j.jtbi.2009.09.021.
- [24] Hodge JM, Collier FM, Pavlos NJ, et al. M-CSF potently augments RANKL-induced resorption activation in mature human osteoclasts [J/OL]. PLoS One, 2011, 6(6): e21462[2018-01-24]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021462>. DOI: 10.1371/journal.pone.0021462.
- [25] 韩英, 杨冰, 唐泉, 等. 电离辐射对原代成骨细胞 M-CSF 表达的影响[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2013, 37(1): 5–8. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.01.002.
Han Y, Yang B, Tang Q, et al. Effects of radiation on macrophage colony stimulating factor in primary osteoblasts[J]. Int J Radiat Med Nucl Med, 2013, 37(1): 5–8.

(收稿日期: 2018-01-25)