

## 系统性红斑狼疮模型鼠骨 BMP/Smads 信号通路状态的研究

宋冬明<sup>1</sup>, 崔婷<sup>1</sup>, 裘影影<sup>1</sup>, 芮金兵<sup>1</sup>, 费小明<sup>2</sup>, 徐欣欣<sup>2</sup>, 李晶<sup>1</sup>, 汤郁<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>江苏大学附属医院风湿科,<sup>2</sup>血液科,江苏 镇江 212001)

**[摘要]** 目的:探讨狼疮鼠(MRL/lpr)骨 BMP/Smads 信号通路表达情况。方法:分离小鼠股骨制备组织切片,常规苏木素-伊红(HE)染色,观察骨质情况;免疫组化观察骨组织中骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)表达;密度梯度离心法和贴壁筛选法分离培养骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs),细胞爬片后免疫荧光法观察 BMP-2、p-Smad1/5/8 蛋白表达情况;BMP-2 诱导 BMMSCs 向成骨细胞分化,RT-PCR 法检测 BMMSCs ALP、Runx2 基因 mRNA 水平,ALP 染色鉴定早期成骨情况。结果:狼疮鼠骨皮质较正常鼠减少,皮质骨占骨体积比例较正常鼠减低( $P < 0.01$ );狼疮鼠股骨 BMP-2 表达与正常鼠无明显差别 ( $P > 0.05$ );细胞免疫荧光显示狼疮鼠 BMMSCs BMP-2、p-Smad1/5/8 表达减弱 ( $P < 0.05$ );狼疮鼠 BMMSCs BMP-2 刺激 7 d 后 ALP 活性较正常鼠减低,BMP-2 刺激 3 d 后 ALP mRNA 水平较正常鼠减弱 ( $P < 0.01$ ),Runx2 mRNA 水平较正常鼠无明显差别( $P > 0.05$ )。结论:狼疮鼠骨 BMP/Smads 信号通路处于抑制状态。

**[关键词]** 系统性红斑狼疮;骨组织;间充质干细胞;BMP/Smads 信号通路

**[中图分类号]** R593.24\*1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)03-299-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150301

## Status of BMP/Smads signaling on the bone from mouse model of systemic lupus erythematosus

Song Dongming<sup>1</sup>, Cui Ting<sup>1</sup>, Qiu Yingying<sup>1</sup>, Rui Jinbin<sup>1</sup>, Fei Xiaoming<sup>2</sup>, Xu Xinxin<sup>2</sup>, Li Jing<sup>1</sup>, Tang Yu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Rheumatism,<sup>2</sup>Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the status of BMP/Smads signaling pathway on the bone of lupus mice(MRL/lpr). **Methods:** The femurs of the mice were isolated, and the bone structure was detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein expression levels of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) were measured by immunohistochemistry. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) were isolated by the density gradient centrifugation and the adherence screening methods. After BMMSCs growing on coverslips, the protein of BMP-2 and pSmad1/5/8 was valued by immunofluorescence method. The mRNA expressions of ALP, Runx2 of BMMSCs were measured by Real-time PCR, and the Alkaline phosphatase(ALP) staining was performed for measuring the early osteogenic differentiation induced by BMP-2. **Results:** Compared with the controlled mice, the cortex of MRL/lpr mice were reduced ( $P < 0.01$ ). There was no difference in the BMP-2 expression on the bone of the two groups by immunohistochemistry detection ( $P > 0.05$ ). The expressions of BMP-2 and pSmad1/5/8 in BMMSCs of lupus mice were lower than those of the control group ( $P < 0.05$ ). After 7 days of BMP-2 stimulation, ALP activities of BMMSCs from lupus mice were decreased compared with the control group. The mRNA levels of ALP in lupus mice were lower than that of C3He/HeJ mice ( $P < 0.01$ ), while there were no differences in the Runx2 mRNA levels between the two groups after BMP-2 stimulation ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** BMP/Smads signaling was inhibited in the bone of lupus mouse.

**[Key words]** systemic lupus erythematosus; bone tissue; mesenchymal stem cells; BMP/Smads signaling pathway

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03): 299-303, 314]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81202358);镇江市社会发展项目(SH2013028);2013年镇江市学术技术带头人专项基金;江苏省“六大人才高峰”项目(WSN-039)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: cattlemouse@sohu.com

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种常见的累及多脏器、多系统的自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。近年来随着对该病诊断水平的提高及治疗手段的增多,患者生存率明显提高。骨质疏松已成为影响SLE患者生活质量的主要问题之一。

我们前期体外研究发现SLE患者骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)成骨分化能力较正常人减弱,BMP/Smads信号通路被抑制,NF- $\kappa$ B、MAPK通路被活化<sup>[2-3]</sup>,可能参与了SLE骨质疏松的机制,本研究将进一步在体内检测狼疮鼠骨的BMP/Smads信号通路,探索SLE患者骨质疏松的发病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

狼疮组,雌性MRL/lpr狼疮小鼠(清洁级)6只,12~14周龄,体重(40.0  $\pm$  2.0)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。对照组,雌性C3He/HeJ小鼠(清洁级)8只,12~14周龄,体重(38.0  $\pm$  2.0)g,购自南京大学模式动物实验室,所有实验动物均饲养于江苏大学动物实验中心无特定病原体(SPF)屏障环境。

#### 1.1.2 主要试剂和材料

低糖DMEM培养基(L-DMEM)、胎牛血清、磷酸盐缓冲液(PBS)(Gibco公司,美国),1.077 g/L Ficoll淋巴细胞分离液(天津TDB生物有限公司),骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)抗体(ab14933, Abcam 美国, 美国), p-Smad1/5/8 抗体(sc12353, Santa Cruz 公司, 美国), TRIzol(Invitrogen Life Technologies 公司, 美国), 定量检测试剂 SYBR PrimeScript™ RT PCR Kit (TaKaRa 公司, 日本), ABI 7900 HTPCR 仪(应用生物系统公司, 美国),  $\beta$ -磷酸甘油、坏血酸(Sigma 公司, 美国), rhBMP-2(Pepro Tech 公司, 美国), 10%EDTA 脱钙液(上海江莱生物科技有限公司), 盖玻片、6孔、24孔培养板、100 cm<sup>2</sup> 培养皿(Corning 公司, 英国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 骨组织化学染色

分离小鼠股骨,置于10%中性甲醛溶液的小瓶中固定、脱水、脱钙、石蜡包埋,制取4  $\mu$ m切片,常规进行HE染色。同时按如下步骤进行骨组织免疫组化染色:切片经0.01 mol/L柠檬酸热修复,冷却至室温,PBS漂洗3次,13%过氧化氢室温孵育10 min, PBS漂洗3次,分别滴加抗BMP-2及p-Smads抗体

4℃过夜,漂洗后室温下二抗孵育40 min,滴加新鲜配制的DAB染液,显微镜下观察2~3 min,冲洗,苏木素复染,PBS返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。镜下观察并拍照,用Photoshop作图软件于小鼠股骨干骺端截取3.2 cm $\times$ 4.0 cm大小图像,通过Image-Proplus 6.0软件计算骨小梁占骨组织的百分比。

#### 1.2.2 BMMSCs 分离培养

密度梯度离心法和贴壁筛选法分离培养BMMSCs。具体方法详见文献[4]。

#### 1.2.3 定向诱导 BMMSCs 向成骨细胞分化

选取P3~P4代细胞接种于6孔板内,生长接近70%融合度后,弃去原培养液,加入成骨诱导液(含10 mmol/L  $\beta$ -磷酸甘油、50  $\mu$ g/ml 抗坏血酸、100 ng/ml BMP-2),每3~4 d换液。

#### 1.2.4 Real time-PCR

TRIzol 抽提淋巴细胞 RNA, SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit 法检测 ALP、Runx2 mRNA 的表达量,以 GAPDH 作为内参照,每个样本设置 3 个复孔,取其平均值进行比较。引物序列分别为:ALP 上游 5'-GGACAGGACACACACACA-3', 下游 5'-CAAACAGGAGAGCCACTTCA-3'; Runx2 上游 5'-AGGGACTATGGCGTCAAACA-3', 下游 5'-GGCTCACGTCGCTCATCTT-3'。Real time-PCR 后获得其 CT 值(即循环阈值,表示 Real time-PCR 过程中,每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数),与 GAPDH 的 CT 差值记为  $\Delta$ CT,以  $2^{-\Delta\text{CT}}$  表示 ALP 和 Runx2 的相对表达量。

#### 1.2.5 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色

定向成骨诱导 7 d 后进行 ALP 染色,弃去培养基,PBS 洗 3 次后按照说明书进行操作。

#### 1.2.6 细胞爬片免疫组织化学

将 P3 代 BMMSCs 以  $4 \times 10^4$  个/ml 密度接种于载盖玻片的 24 孔板内,培养 24 h 后吸尽培养液;PBS 洗 3 次,10%福尔马林固定 20 min;PBS 冲洗后滴加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水,室温孵育 20 min, PBS 洗 3 次;滴加 0.3% Triton X-100 通透 20 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min;5%羊血清封闭,室温 10 min,倾去;分别滴加一抗,4℃过夜;PBS 冲洗分别滴加二抗,室温孵育 20 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加 DAB 液显色 5 min;苏木素复染 4 min,盐酸乙酸分化,温水蓝化,依次在 75% $\rightarrow$ 85% $\rightarrow$ 95% $\rightarrow$ 100%浓度酒精中浸泡 3 min 脱水;中性树胶封片,镜下观察。分离的股骨依次经 10%中性甲醛溶液固定、脱水、脱钙、石蜡包埋,制取 4  $\mu$ m 切片,进行免疫组化

检测 BMP-2 及 p-Smad1/5/8。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件包,数据均采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用成组 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 骨组织 HE 染色

骨组织 HE 切片显示:狼疮组骨小梁较对照组骨小梁减少,且其排列紊乱(图 1)。狼疮组骨小梁比

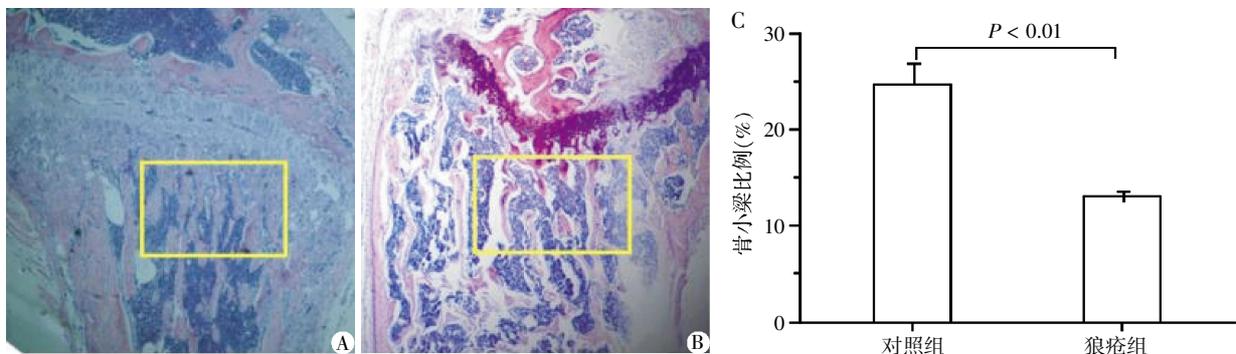
例明显少于对照组( $P < 0.01$ )。

### 2.2 狼疮鼠骨组织 BMP-2 蛋白表达

骨组织免疫组化及定量分析显示狼疮组 BMP-2 表达较对照组无显著差异 ( $0.79 \pm 0.03$  vs  $0.80 \pm 0.03$ ,  $P > 0.05$ ,图 2)。

### 2.3 BMMSCs 体外分离培养

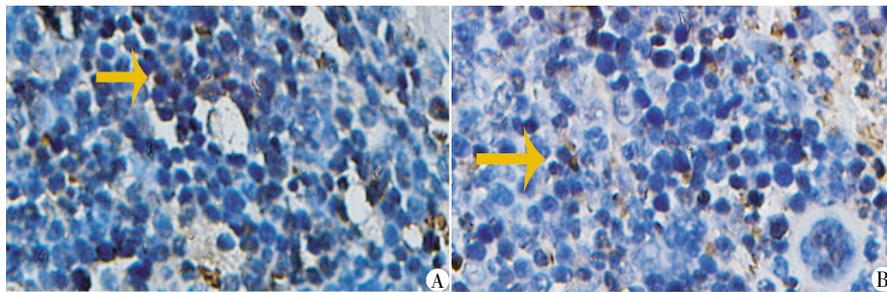
狼疮组骨髓单核细胞原代培养 3~4 d 后,倒置显微镜下可见单个或少数集落生长的贴壁细胞,7~10 d 后,细胞集落形成融合单层,对照组 BMMSCs 形成融合单层需 5~7 d,两组细胞在倒置显微镜下观察均为短梭形(图 3)。



A:对照组骨结构( $\times 200$ );B:狼疮组骨结构,方框为计算骨小梁比例的取样部位( $\times 200$ );C:骨小梁占总骨体积百分比( $n=3$ )。

图 1 两组小鼠骨结构

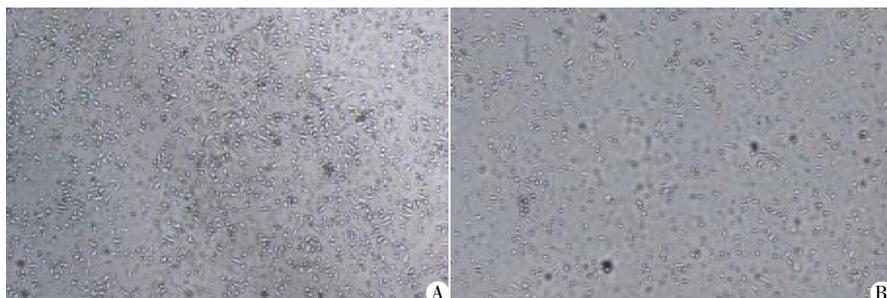
Figure 1 Bone structure of the mouse in two groups



A:对照组;B:狼疮组。

图 2 骨组织免疫组织化学染色( $\times 400$ )

Figure 2 Immunohistochemistry of bone structure( $\times 400$ )



A:对照组;B:狼疮组。

图 3 原代培养第 6 天的骨髓间充质干细胞

Figure 3 The primary bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured on day 6

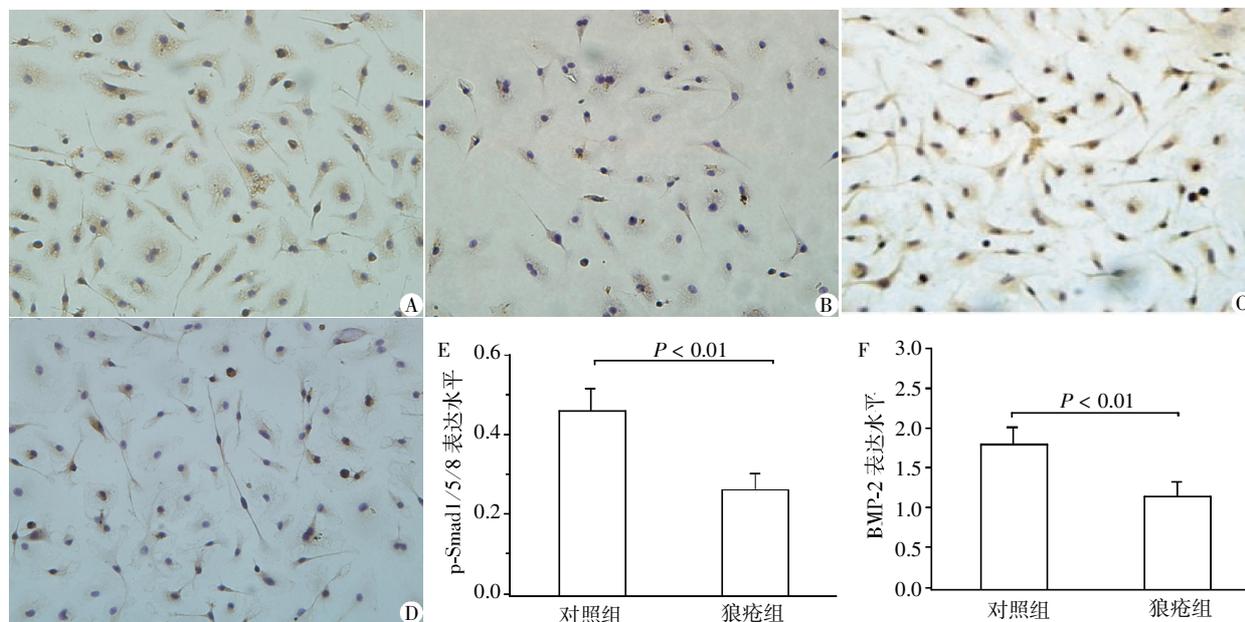
### 2.4 免疫细胞化学

将狼疮组小鼠 BMMSCs 及对照组小鼠 BMMSCs 爬片后行免疫组织化学显示：狼疮组 BMP-2 和 p-Smad1/5/8 蛋白表达较对照组减少；定量分析显示 BMP-2(1.16 ± 0.46 vs. 1.8 ± 0.99, n=3) 差异有统计

学意义(P < 0.01)、p-Smad1/5/8(0.26 ± 0.04 vs. 0.46 ± 0.09, n=3) 差异有统计学意义(P < 0.01, 图 4)。

### 2.5 BMMSCs 成骨分化

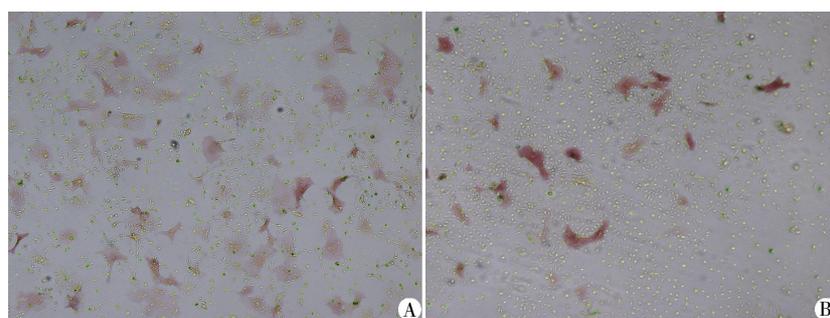
用 BMP-2 诱导 BMMSCs 成骨分化, 第 7 天行 ALP 染色, 狼疮鼠 BMMSCs ALP 活性低于对照组(图 5)。



A: 对照组 p-Smad1/5/8 表达情况; B: 狼疮组 p-Smad1/5/8 表达情况; C: 对照组 BMP-2 表达情况; D: 狼疮组 BMP-2 表达情况; E、F: p-Smad1/5/8(E)、BMP-2(F) 定量分析(n=3)。

图 4 细胞爬片免疫组化

Figure 4 Immunocytochemistry results of BMMSCs after they growing on coverslips



A: 对照组; B: 狼疮组。

图 5 两组 BMMSCs ALP 染色结果(x40)

Figure 5 The ALP staining of BMMSCs(x40)

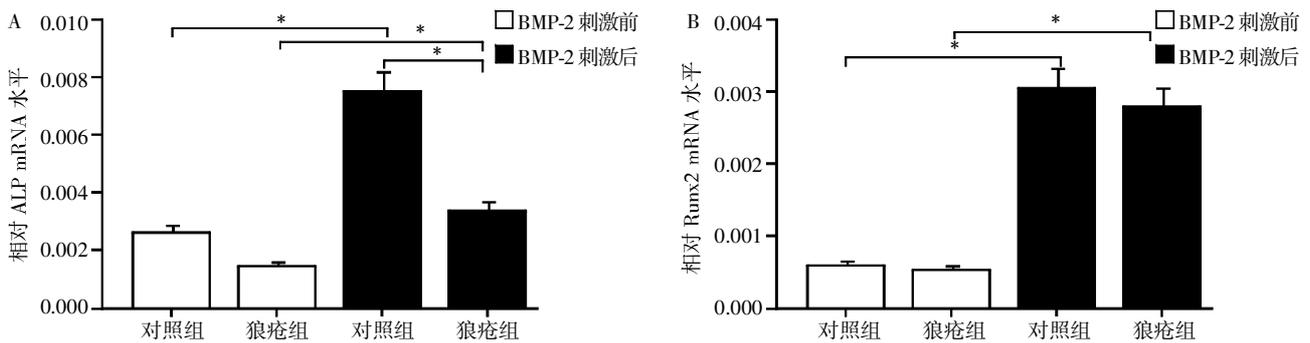
### 2.6 BMMSCs 成骨分化 ALP、Runx2 mRNA 水平

BMMSCs ALP、Runx2 mRNA 低水平表达, 经 BMP-2 刺激 3 d 后 mRNA 明显增加, 均较刺激前具有统计学意义(刺激前后狼疮组 ALP 水平分别为 0.000 5 ± 0.000 2、0.002 8 ± 0.000 8, 刺激前后对照组 ALP 水平分别为 0.001 9 ± 0.000 8, 0.007 7 ± 0.002 5; 刺激前后狼疮组 Runx2 水平分别为 0.003 ± 0.002、0.000 6 ± 0.000 01, 刺激前后对照组 Runx2 水平分别为 0.000 7 ± 0.000 1、0.003 5 ± 0.000 7,

n=3, P < 0.01)。狼疮组 BMMSCs BMP-2 刺激后 Runx2 mRNA 水平与对照组 BMP-2 刺激后相比无明显差异(0.003 2 ± 0.000 8 vs. 0.003 5 ± 0.000 7, P > 0.05); ALP 水平较对照组 BMP-2 刺激后减弱(0.002 8 ± 0.000 8 vs. ± 0.007 7 ± 0.002 5, P < 0.01), 差异具有统计学意义(图 6)。

### 3 讨论

SLE 是一种病因未明的自身免疫性疾病, 由于



A: ALP mRNA 水平; B: Runx2 mRNA 水平; 两组相比, \* $P < 0.01$ 。

图 6 RT-PCR 检测 ALP、Runx2 mRNA 表达情况

Figure 6 The mRNA levels of ALP and Runx2 by RT-PCR

多因素的影响, SLE 患者往往成为骨质疏松的高发人群, 研究显示 SLE 合并骨质疏松的发生率为 3%~42%<sup>[5]</sup>, 积极预防和控制骨质疏松越来越受到临床医生的重视, 探讨 SLE 并发骨质疏松的具体分子机制可以为治疗提供线索, 狼疮鼠是目前研究 SLE 分子病理机制的理想工具。

SLE 患者的骨质疏松, 多认为是破骨细胞过度活化的结果<sup>[6]</sup>, 目前缺乏对 SLE 患者成骨细胞的研究。成骨细胞来源于 BMMSCs, 具有多向分化潜能, 可以分化为成骨细胞、软骨细胞、心肌细胞等<sup>[7]</sup>。有学者认为 SLE 是一种干细胞病, 越来越多的研究揭示 SLE 患者 BMMSCs 存在易衰老、传代能力低、成骨成脂分化能力减退等异常<sup>[2-3, 8-9]</sup>。我们既往的体外研究发现, SLE 患者的 BMMSCs 在 BMP-2 刺激下成骨分化减弱, 其 BMP/Smads 信号通路存在抑制状态, BMMSCs 的成骨分化减弱可能参与了骨质疏松的病理过程<sup>[2-3]</sup>, 但缺乏体内实验证据。本研究在体内实验证实, 狼疮鼠骨小梁排列紊乱, 骨皮质减少, 存在骨质疏松, 这与 Sun 等<sup>[8]</sup>的实验结果一致。

BMMSCs 成骨分化与多条信号转导通路有关, 其中 BMP/Smads 信号通路是经典的参与间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)成骨分化的主要通路之一。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 是一种具有广泛生物学活性的酸性糖蛋白, 属于转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- $\beta$  超家族成员, 目前已发现 20 余种, 其中 BMP-2 是诱导成骨细胞分化最重要的细胞外信号分子之一, 多项研究亦证实其具有促进 MSCs 成骨分化及异位成骨能力<sup>[4, 10-11]</sup>。BMP-2 通过激活 Smad1/5/8 的磷酸化, 转入核而发挥作用。MSCs 成骨分化后其细胞外基质中 BMP-2 分泌亦增加<sup>[3]</sup>。

通过免疫组化显示狼疮鼠股骨 BMP-2 表达与

对照组无明显差异, 但在组成骨的多种细胞, 包括成骨细胞、破骨细胞、骨细胞和间充质干细胞中, 具体每一种细胞的 BMP/Smads 信号通路情况未知。我们分离狼疮鼠的 BMMSCs, 细胞爬片的免疫组化显示其 BMP-2、磷酸化 Smad1/5/8(p-Smad1/5/8)表达弱于对照小鼠, 提示 BMMSCs 的 BMP/Smads 信号通路是处于抑制状态的。

BMP-2 通过 BMP/Smads 信号通路诱导 BMMSCs 的成骨分化。用 BMP-2 刺激 BMMSCs, RT-PCR 检测发现狼疮鼠及正常对照 BMMSCs 成骨指标 ALP、Runx2 mRNA 表达水平较未予 BMP-2 诱导前均有所增高, 但狼疮鼠 BMMSCs 上述基因的表达较对照组减少, ALP 染色表明狼疮鼠 BMMSCs 形成的钙盐较对照组减少, 显示 BMP-2 诱导下狼疮鼠 BMMSCs 成骨分化能力较正常组减低, 进一步证实了狼疮鼠 BMMSCs BMP/Smads 信号通路的低活化状态。

总之, 本研究在体内证实了狼疮鼠的骨质疏松, 狼疮鼠骨组织及 BMMSCs 中的 BMP/Smads 通路被抑制, BMMSCs 向成骨细胞分化的能力减弱。但 BMMSCs BMP/Smads 信号通路与骨质疏松的关系, 需要更多实验来证实。

#### [参考文献]

- [1] Tang XL, Griffith JF, Qin L, et al. SLE disease per se contributes to deterioration in bone mineral density, microstructure and bone strength[J]. *Lupus*, 2013, 22(11): 1162-1168
- [2] Tang Y, Ma X, Zhang H, et al. Gene expression profile reveals abnormalities of multiple signaling pathways in mesenchymal stem cell derived from patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 826182
- [3] Tang Y, Xie H, Chen J, et al. Activated NF- $\kappa$ B in bone (下转第 314 页)