

GIT1 通过 Notch 信号通路促进骨髓细胞向破骨细胞分化

恽 波,周灵杰,凡 进,殷国勇*

(南京医科大学第一附属医院骨科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究 G 蛋白偶联受体激酶结合蛋白 1(G-protein coupled receptor kinase-interacting protein 1,GIT1)是否通过 Notch 信号通路影响骨髓细胞向破骨细胞分化。方法:取 8 周龄 GIT1 野生型(GIT1^{+/+})和 GIT1 基因敲除(GIT1^{-/-})小鼠各 8 只,分离培养小鼠骨髓细胞并向破骨细胞诱导分化。分别在诱导后的 4、7 d,检测细胞中抗酒石酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase,TRAP)活性。在诱导后 4、7 d,用 real-time RT-PCR 检测破骨细胞相关基因组织蛋白酶 K(cathepsin K,CTSK)、降钙素受体(calcitonin receptor,CTR)和基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase,MMP-9)的表达,同时检测 Notch 信号通路受体、配体和目的基因的表达。结果:小鼠骨髓细胞向破骨细胞诱导分化过程中,基因敲除组破骨细胞的大小、数量、密度均低于野生型组;基因敲除组破骨细胞 CTSK、CTR 和 MMP-9 的表达均明显低于野生型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);基因敲除组 Notch 信号通路配体 Jagged1、受体 Notch2 和目的基因 Hes1 的表达明显高于野生型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:GIT1 缺失可能通过上调 Notch 信号通路的表达来抑制骨髓细胞向破骨细胞分化。

[关键词] GIT1;Notch;破骨细胞;骨髓细胞

[中图分类号] R336

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)09-1036-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160903

GIT1 regulates differentiation of bone marrow cells into osteoclasts through Notch signaling pathway

Yun Bo,Zhou Lingjie,Fan Jin,Yin Guoyong*

(Department of Orthopedics,the First Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210029,China)

[Abstract] **Objective:** To research whether G-protein coupled receptor kinase-interacting protein 1(GIT1) regulates the differentiation of bone marrow cells into osteoclasts through Notch signaling pathway. **Methods:** Bone marrow cells, which obtained from eight GIT1^{+/+} and eight GIT1^{-/-} mice of 8-week-old, were isolated and cultured, then were induced to osteoclast differentiation. The tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity was detected to evaluate the osteoclast differentiation at day 4 and 7. Real-time RT-PCR were performed to detect the expression of cathepsin K (CTSK), calcitonin receptor (CTR), matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and Notch signaling pathway at day 4 and 7. **Results:** The size, number and density of osteoclasts were lower in the GIT1 gene knockout group compared with the wild type group. The expression of CTSK, CTR and MMP9 in GIT1 gene knockout group was significantly lower than that of the wild type group ($P < 0.05$). However, The expression of Jagged1, Notch2 and Hes1 in the GIT1 gene knockout group was significantly higher than that of the wild type group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The deficiency of GIT1 inhibited the differentiation of bone marrow cells into osteoclasts through upregulating Notch signaling pathway.

[Key words] GIT1;Notch;osteoclast;bone marrow cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(09): 1036-1040]

G 蛋白偶联受体激酶结合蛋白 1(G-protein coupled receptor kinase-interacting protein 1,GIT1)是用酵母双杂交法发现的和 G 蛋白偶联受体激酶 2

(G protein coupled receptor kinase 2,GRK2)相结合的蛋白,它最初确定的功能是调节细胞表面 G 蛋白偶联受体在细胞内的运行过程^[1]。现认为 GIT1 是细胞内一种特异性的穿梭蛋白,可与多种蛋白激酶相互作用从而调节细胞整体功能^[2]。本课题组前期研究已经表明,GIT1 在调节破骨细胞的功能中起重要作用

[基金项目] 国家自然科学基金(81271988)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:guoyong_yin@sina.com

用,但具体机制尚未明确。

小鼠骨髓中含有多种细胞,主要分为两大类:造血细胞和非造血细胞。其中骨髓间充质干细胞是一种主要存在于骨髓中的非造血干细胞,具有多向分化潜能和高度自我更新能力,在一定条件下可向成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等分化^[3],其中向破骨细胞分化的研究尚未十分明确。骨髓细胞的自我更新和定向分化能力受到多种生长因子和信号通路的影响,探究这些信号通路的作用机制对骨髓细胞在组织工程和临床医学中的应用起重要作用。

Notch 信号通路是一条高度保守的信号转导途径,广泛存在于各种生物体内,在机体生长发育过程中起关键作用,多方面调控细胞增殖、分化及凋亡。Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体和 CSL(一种 DNA 结合蛋白)3 部分组成,是跨膜受体蛋白的家族成员,起着介导细胞命运的关键作用,通过 Notch 受体(Notch1-4)及配体(Jagged1、Jagged2、Dll1、Dll3 和 Dll4)结合启动。Notch 信号通路由相邻两个细胞的 Notch 受体和配体相互作用而激活,受体与配体结合导致受体构象发生改变,跨膜部分被连续切割,并释放胞内区(Notch intracellular domain, NICD)。NICD 转移至细胞核,并与转录因子 CSL 及共活化分子结合,活化下游靶基因 Hes 家族和 Hey 家族,进而调控下游蛋白表达^[4]。有研究表明,Notch 信号通路有调控骨髓细胞向破骨细胞分化的作用^[5]。

本研究分离培养 GIT1 野生型(GIT1^{+/+}, WT)和 GIT1 基因敲除型(GIT1^{-/-}, KO)小鼠的骨髓细胞,探讨 GIT1 及 Notch 信号通路在骨髓细胞向破骨细胞分化过程中的作用机制,为临床骨质疏松的治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

同窝 8 周龄 GIT1 野生型(GIT1^{+/+}, WT)和 GIT1 基因敲除(GIT1^{-/-}, KO)小鼠各 8 只(由美国罗切斯特大学心血管病研究所和医学系 Berk 教授构建并赠送,饲养于南京医科大学 SPF 级实验动物中心),雌雄不限。动物饲养条件:屏障环境饲养,温度 22~26℃,湿度 45%~75%。

α -MEM 培养基、胎牛血清、双抗(HyClone 公司,美国),核因子 κ B 受体活化因子配基(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、巨噬细胞

集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, MCSF)(Abcam 公司,美国)、抗小鼠 Notch2、Jagged1、Hes1 抗体、内参 β -actin 抗体(Abcam 公司,美国),基因组 DNA 小量抽提试剂盒、RIPA 裂解液(杭州碧云天),PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本),引物合成(Invitrogen 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 GIT1 基因敲除小鼠的构建和鉴定

敲除小鼠 GIT1 基因的第 III 外显子,代以抗新霉素基因作为筛选,获得 GIT1 基因敲除小鼠。剪取出生约 10 d 小鼠的尾巴,应用基因组 DNA 小量抽提试剂盒提取 DNA,通过 PCR 进行小鼠基因型鉴定。所有引物由美国 Invitrogen 公司合成。反应条件:94℃预变性 4 min;94℃变性 45 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,共进行 30 个循环;72℃延伸 10 min。

1.2.2 骨髓细胞的分离和诱导培养

分别取 8 周龄 GIT1^{-/-}和 GIT1^{+/+}小鼠各 8 只,颈椎脱臼处死,浸入 75%酒精 5 min。在超净台内用眼科剪剥离小鼠后肢的皮肤,并将后肢分离,剔除肌肉,取股骨、胫骨。1 mL 注射器抽取 5 mL PBS 冲洗骨髓腔,收集细胞悬液,1 400 r/min 离心 4 min,用 α -MEM 培养基重悬细胞,接种至 5 cm 培养皿中。于 37℃培养箱中孵育 12 h 后收集未贴壁细胞,用含 100 ng/mL MCSF 的 α -MEM 培养基重悬细胞,均匀接种于 12 孔板培养皿中。于 37℃培养箱中孵育 48 h 后换成含 60 ng/mL MCSF 和 100 ng/mL RANKL 的 α -MEM 培养基。置 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养,每 2 d 换 1 次培养液,培养至预定时间点。

1.2.3 细胞的抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色

骨髓细胞按浓度 2×10^4 个/mL 接种于 12 孔板,每孔细胞约 2 000 个(1 mL 培养基),置 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养,每 2 d 更换 1 次培养基。于诱导的 4、7 d,按 TRAP 染色试剂盒的说明进行 TRAP 染色。

1.2.4 免疫印迹

用 RIPA 裂解液(Beyotime Biotechnology 公司,美国)裂解细胞,提取蛋白,使用 Bradford 法测量蛋白浓度。蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后,转移到 PVDF 膜(Millipore Billerica 公司,美国)。使用相应的一抗孵育 PVDF 膜,4℃过夜,HRP 标记的二抗 37℃孵育 2 h。加入 ECL 发光液(Beyotime Biotechnology 公司,美国)显影,蛋白条带使用 Quantity One 软件检测(Bio-Rad 公司,美国)。

1.2.5 real-time RT-PCR

细胞培养后,用 TRIzol 提取总 RNA,逆转录为 cDNA,以 GAPDH 作为内参,按照 real-time RT-PCR 相关试剂盒操作说明,检测相关基因。引物由 Invitrogen 公司合成,序列见表 1。反应体系为 10 μL,反应程序:预变性 94℃ 2 min;92℃ 20 s,

68℃ 30 s,72℃ 20 s,延伸末尾采集荧光,30 个循环。

1.3 统计学方法

使用统计分析软件 SPSS20.0,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 real-time RT-PCR 引物

Table 1 Primers for real-time RT-PCR

名称	引物序列(5'→3')	种属	Tm(°C)	产物长度(bp)
MMP-9	CTGGACAGCCAGACACTAAAG	小鼠	55	144
	GAGACTTCTCGAATCGGCGC	小鼠	55	132
CTSK	GACGCAGCGATGTCAACTAA	小鼠	53	152
	TCAACACCTGAGACACGACC	小鼠	53	134
CTR	ACCGACGAGCAACGCCTACGC	小鼠	55	146
	CATGGACTTCCGACACTCCG	小鼠	55	135
Jagged1	CCTCGGGTCAGTTTGAGCTG	小鼠	56	121
	ATGAAGTTTCACACGGAGTTCC	小鼠	56	106
Notch2	GAGAAAAACCGCTGTCACTGG	小鼠	55	127
	CTCCTGACGGTTATGAGCTGG	小鼠	55	142
Hes1	CCAGCCAGTGTCAACACGA	小鼠	54	133
	TGTTTCTATCGAGGGCCGTAA	小鼠	54	103

2 结果

2.1 GIT1 基因敲除型小鼠破骨细胞形成减少

骨髓细胞诱导分化后 4、7 d,TRAP 染色显示,随着骨髓细胞向破骨细胞诱导分化,无论是 GIT1 野生型组还是 GIT1 基因敲除组,破骨细胞的数量、密度均呈递增趋势。GIT1 基因敲除组中破骨细胞的数量、密度均低于野生型组($P < 0.05$,图 1)。

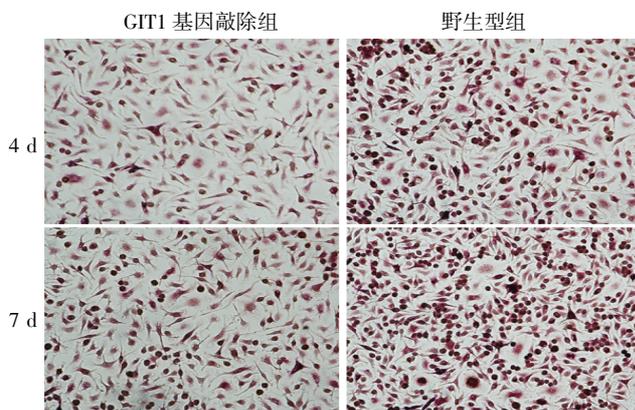
2.2 GIT1 野生型和 GIT1 基因敲除小鼠中破骨细胞特异性基因表达存在异常

骨髓细胞诱导分化后 4、7 d,real-time RT-PCR

显示,随着骨髓细胞向破骨细胞诱导分化,GIT1 基因敲除组中破骨细胞相关基因组织蛋白酶 K (cathepsin K,CTSK)、降钙素受体(calcitonin receptor,CTR)和基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase,MMP-9)的表达均明显低于 GIT1 野生型组(图 2, $P < 0.05$)。

2.3 GIT1 野生型和 GIT1 基因敲除小鼠中 Notch 信号通路表达存在异常

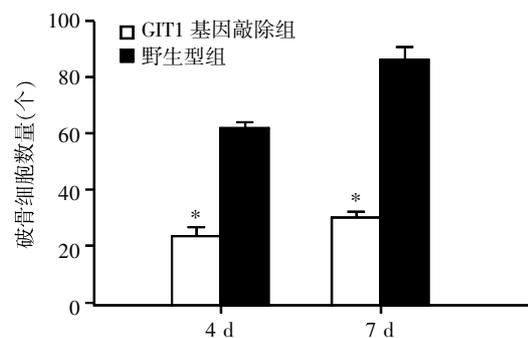
骨髓细胞诱导分化后 4、7 d,real-time RT-PCR 显示,GIT1 基因敲除组中 Notch 信号通路受体 Notch2、配体 Jagged1 和目的基因 Hes1 的表达均明显高于 GIT1 野生型组($P < 0.05$,图 3)。

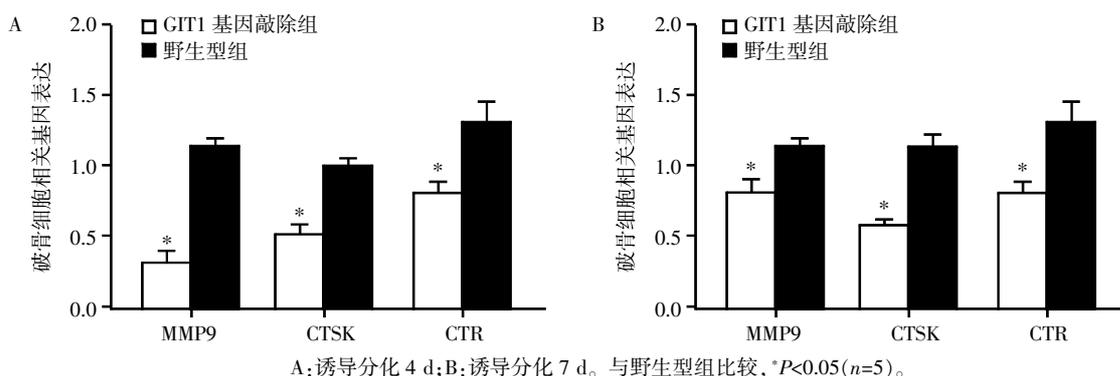


与野生型组比较,* $P < 0.05$ ($n=5$)。

图 1 TRAP 染色检测破骨细胞数量($\times 200$)

Figure 1 TRAP staining test for the number of osteoclasts($\times 200$)

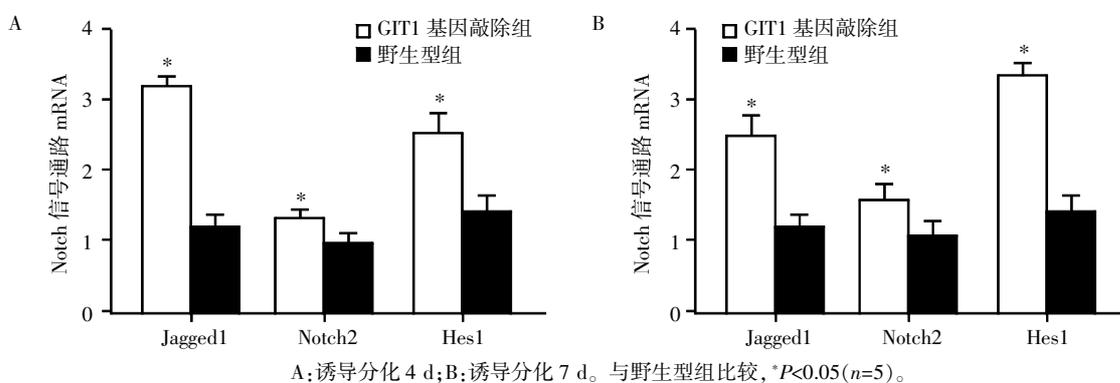




A: 诱导分化 4 d; B: 诱导分化 7 d。与野生型组比较, * $P < 0.05 (n=5)$ 。

图 2 Real-time RT-PCR 检测破骨细胞特异性基因表达

Figure 2 Real-time RT-PCR test for the expression of osteoclast specific genes



A: 诱导分化 4 d; B: 诱导分化 7 d。与野生型组比较, * $P < 0.05 (n=5)$ 。

图 3 Real-time RT-PCR 检测 Notch 信号通路

Figure 3 Real-time RT-PCR test for the expression of Notch signaling pathway

3 讨论

随着人口老龄化,骨质疏松症已成为全球关注的重要健康问题,骨质疏松通常是由骨代谢失衡引起。骨代谢平衡依靠成骨细胞和破骨细胞之间的动态平衡^[6]。临床防治骨质疏松的药物主要有两大类:抑制骨吸收药物和刺激骨形成药物^[7]。本研究致力于探讨 GIT1 对骨髓细胞向破骨细胞分化的影响,为临床抗骨质疏松治疗提供理论基础。

GIT1 是一种在血管形成和破骨细胞活性方面起重要作用的支架蛋白^[8-9]。GIT1 结构包含:氨基末端锌指样结构和激活 GTPase 的蛋白结构、Ankyrin 重复区、SHD (Spa2p homology domain)、3 个盘绕结构(coiledcoil structure, CC)和碳末端的 paxillin 结合区。GIT1 和许多细胞骨架蛋白如 paxillin 和 FAK 相结合,并且共同受 Src 的调节,促进细胞迁移^[10]。本课题组之前已证实 GIT1 敲除的小鼠可损害破骨细胞足小体形成从而导致骨吸收能力减低^[11]。

Notch 信号通路广泛存在于动物细胞中,在调节细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要作用,它的配体和受体都是细胞膜表面蛋白,因此 Notch 信号是

介导细胞间通讯的一种重要方式^[12]。许多研究表明,Notch 信号通路与骨发育密切相关。之前有学者发现,抑制 Notch 受体的共同核内转录因子 RBP-J 可完全阻断 Notch 信号通路,导致骨髓中破骨细胞数量增多,活性增强^[13]。使用慢病毒装载 Notch 信号通路胞内域 NICD,并将其转染至骨髓细胞上调 Notch 信号通路,结果显示可以减少骨髓细胞表达和分泌破骨细胞增殖相关的细胞因子 MCSF,从而抑制破骨细胞的增殖分化。这说明了 Notch 信号通路在成骨-破骨偶联中起到不可忽视的作用,也进一步证实了 Notch 信号通路与破骨细胞分化的紧密联系。

本研究通过诱导小鼠骨髓细胞向破骨细胞分化的过程发现,随着骨髓细胞向破骨细胞分化,Notch 信号通路受体和配体表达发生变化,提示 Notch 信号通路可能在骨髓细胞向破骨细胞分化的过程中起调控作用。与 GIT1 野生型小鼠相比,GIT1 基因敲除小鼠骨髓细胞向破骨细胞分化不良,各破骨指标都明显低于 GIT1 野生型组,提示 GIT1 缺失抑制了骨髓细胞向破骨细胞分化。同时,本研究还使用 Real-time RT-PCR 检测了两组细胞在破骨分化过程中 Notch 信号通路受体和配体的表达,结果

显示在向破骨细胞分化的过程中,GIT1 基因敲除组中 Notch 信号通路受体 Notch2、配体 Jagged1 和目的基因 Hes1 的表达高于 GIT1 野生型组,提示 GIT1 缺失可能通过增强 Jagged1/Notch2 信号通路从而影响骨髓细胞向破骨细胞分化。

综上所述,Notch 信号通路可能在骨髓细胞向破骨细胞诱导分化中起抑制作用。GIT1 的缺失抑制了骨髓细胞向破骨细胞的分化。这种抑制可能是通过上调 Notch 信号通路的配体 Jagged1 和受体 Notch2 来实现的。但是 GIT1 通过何种途径影响 Notch 信号通路,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Premont RT, Claing A, Vitale N, et al. Beta-2 adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(24):14082-14087
- [2] Rui Z, Li X, Yin G, et al. GIT1Y321 phosphorylation is required for ERK1/2 and PDGF dependent VEGF secretion from osteoblasts to promote angiogenesis and bone healing[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(40):819-825
- [3] Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy [J]. Hum Gene Ther, 2011, 22(1):3-17
- [4] Shigeru C. Notch signaling in stem cell systems[J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2006, 24(11):2437-2447
- [5] Ashley JW, Ahn J, Hankenson KD. Notch signaling promotes osteoclast maturation and resorptive activity [J]. J Cell Biochem, 2015, 116(11):2598-2609
- [6] Ma Z, Li Y, Xu X, et al. Predictors of ibandronate efficacy for the management of osteoporosis: a meta-regression analysis[J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0150203
- [7] Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. From disease to treatment; from rare skeletal disorders to treatments for osteoporosis[J]. Endocrine, 2016, 52(3):414-426
- [8] Pang J, Hoefen R, Pryhuber GS, et al. GIT1 is required for pulmonary vascular development[J]. Circulation, 2009, 119(11):1524-1532
- [9] Yin G, Haendeler J, Yan C, et al. GIT1 functions as a scaffold for MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation by angiotensin II and epidermal growth factor[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(2):875-885
- [10] Natarajan K, Yin G, Berk BC. Scaffold directs Src-specific signaling in response to angiotensin II: new roles for Cas and GIT1[J]. Mol Pharmacol, 2004, 65(4):822-828
- [11] Yin G, Berk BC. Impaired angiogenesis during fracture healing in GPCR kinase 2 interacting protein-1 (GIT1) knock out mice[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e89127
- [12] McClarren KW, Lo R, Grbavec D, et al. The mammalian basic helix loop helix protein HES-1 binds to and modulates the transactivating function of the runt-related factor Cbfa 1[J]. J Biol Chem, 2000, 275(1):530-538
- [13] Dong Y, Jesse AM, Hilton MJ, et al. RBPj-dependent Notch signaling regulates mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation during skeletal development[J]. Development, 2010, 137(9):1461-1471

[收稿日期] 2016-03-13