

Wnt 诱导分泌蛋白 3 对软骨细胞增殖分化的作用

黄 佼 马丽珍 詹宇红 陈 军

摘 要 **目的** 研究重组人 Wnt 诱导分泌蛋白 3 (rhWISP3) 对人永生软骨细胞株 T/C-28a2 增殖和分化的作用, 探讨其作用是否通过胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 信号通路发生。**方法** 分别应用不同浓度 rhWISP3 干预 T/C-28a2 细胞株, 用 [^3H] - 脱氧胸腺嘧啶 ([^3H] - TdR) 摄入法测定细胞增殖活性。rhWISP3 与重组人 IGF-1 蛋白 (rh IGF-1) 同时干预 T/C-28a2 细胞, [^3H] - TdR 摄入法测定细胞增殖活性。免疫印迹法检测不同浓度 rhWISP3 干预的 T/C-28a2 细胞 II 型胶原表达变化。用 IGF-1 信号通路阻断剂 JB1 干预细胞后, 免疫印迹法检测 rhWISP3 对 T/C-28a2 细胞 II 型胶原表达的影响。**结果** rh-WISP3 对软骨细胞增殖无明显影响。rh IGF-1 明显促进 T/C-28a2 细胞增殖, rhWISP3 对 rh IGF-1 促 T/C-28a2 细胞增殖作用无影响。rhWISP3 明显促进软骨细胞 II 型胶原的表达, 呈浓度依赖性。rh IGF-1 干预 T/C-28a2 细胞能明显促进软骨细胞 II 型胶原的表达。IGF-1 信号通路阻断剂 JB1 能阻断 rh IGF-1 促进软骨细胞 II 型胶原的表达作用, 不能阻断 rhWISP3 促进软骨细胞 II 型胶原的表达作用。**结论** rhWISP3 对 T/C-28a2 细胞增殖作用无明显影响, 呈浓度依赖型促进 II 型胶原的表达, 这种促表达的作用可能是通过独立于 IGF-1 信号通路而产生。

关键词 Wnt 诱导分泌蛋白 3 晚发型脊柱骨骺发育不良伴进行性骨关节病 软骨细胞

Effects of WISP3 on Proliferation and Differentiation in Chondrocytes. Huang Jiao, Ma Lizhen, Zhan Yuhong, Chen Jun. Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310000, China

Abstract **Objective** To observe the effects of recombinant human WISP3 (rhWISP3) on the proliferation and differentiation in human immortalized chondrocytes cell lines T/C-28a2. To investigate whether the effects is through the IGF-1 signaling pathway. **Methods** T/C-28a2 cell lines were treated with various rhWISP3 concentrations with or without recombinant human IGF-1 (rh IGF-1), and the proliferation of cell lines was determined by [^3H] - Tdr incorporation. The expression of collagen II of chondrocytes treated by RhWISP3 was determined by Western blot. The cell lines were treated with an IGF-1 signaling pathway inhibitor JB1, and the expression of collagen II of chondrocytes was determined by Western blot. **Results** RhWISP3 had no effect on the proliferation of T/C-28a2 cell lines. RhIGF-1 promoted proliferation of cell lines significantly, and rhWISP3 also had no effect on the proliferation of cell lines treated with RhIGF-1. RhWISP3 increased the production of collagen II in a dose dependent manner. RhIGF-1 also had effect on production of collagen II. JB1 inhibited the increasing expression of collagen II treated with rh IGF-1, but had no effect on increasing expression of collagen II treated with rhWISP3. **Conclusion** RhWIS3 has no effect on the proliferation of T/C-28a2 cell lines, but increases the production of collagen II in a dose dependent manner, possibly through IGF-1 independent signaling.

Key words WISP3; Spondyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy; Chondrocytes

Wnt 诱导分泌蛋白 3 (Wnt-inducible secreted protein 3, WISP3) 基因定位于染色体 6q21~22, 编码 1 个 354 个氨基酸的蛋白质, 分子质量大约 40kDa, 由 4 个结构域构成, 每一个结构域由对应的基因外显子编码, 外显子 1 编码信号肽, 外显子 2 编码的结构域与胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP) 氨基末端同源, 根据 WISP3 蛋白结构提示其功能与某些其他蛋白质具有相似性。WISP3 基因突变与晚发型脊柱骨骺发育不良伴进行性骨关节病 (spondyloepiphyseal

dysplasia tarda with progressive arthropathy, SEDT-PA) 的发病密切相关^[1,2]。SEDT-PA 是一种主要累及软骨组织的常染色体隐性遗传性疾病, 1982 年由 Wynne-Davies 等首先报道, 该病的组织学表现为静止带和生长带的软骨细胞呈巢样聚集, 提示该疾病可能是由于关节软骨的原发性病变所致^[3]。

研究证明胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 可介导软骨细胞外基质的上调 WISP3 蛋白质结构域 1 与胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBPs) 的结构同源, 推测 WISP3 促进软骨细胞 II 型胶原和蛋白聚糖的表达可能与 IGF-1 信号通路有关^[4~6]。本实验研究 WISP3 蛋白对人永生软骨细胞增殖和分化的作用,

作者单位: 310000 杭州市第一人民医院内分泌科

通讯作者: 黄佼, 电子信箱: huangjiao2001@yahoo.com.cn

并初步探讨这些作用是否与 IGF-1 信号通路相关,并为进一步阐明 SEDT-PA 发病机制提供一定的理论基础。

材料与方法

1. 实验细胞及主要试剂:无酚红的 DMEM 培养液、胰酶-EDTA、Aprotinin 和苯甲基磺酰氟 (PMSF) (Sigma 公司, St. Louis, MO, USA); 胎牛血清 (FBS) (GIBICO 公司, Grand Island, NY); β -actin 鼠抗 (Sigma 公司, St. Louis, MO, USA); 兔抗 WISP3 多克隆抗体; 羊抗 II 型胶原多克隆抗体; 辣根过氧化物酶标记的抗兔、抗羊、抗鼠的二抗 Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA); 预染蛋白质分子质量 Marker 购自 Fermentas 公司; 人重组 WISP3 蛋白 (rhWISP3), 人重组 IGF-1 蛋白 (rhIGF-1) (Peprotech, London, UK); 硝酸纤维素膜和 ECL 试剂盒购于 Amersham Pharmacia 公司 (Arkington Heights, IL, USA)。人永生软骨细胞株 T/C-28a2 由 Mary B. Goldring 教授惠赠。

2. T/C-28a2 细胞株培养及干预:人软骨细胞株 T/C-28a2 用 DMEM/Ham'F-12 (1:1, v/v) 混合培养液 (Sigma, D0547) 在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养。每 3~5 天换液 1 次, 细胞汇片后用 0.05% 胰酶-EDTA (0.05% 胰酶, 0.53mmol/L EDTA, GIBICO#25300-054) 消化。T/C-28a2 细胞接种于 24 孔板, 接近汇片时弃培养液, 换无血清培养基 (含 0.25% BSA) 饥饿 24h, 用重组 WISP3 蛋白 0、100、200、400、800、1600ng/ml 干预 24h, 抽提细胞总蛋白用免疫印记分析软骨细胞 II 型胶原的表达。

3. 细胞增殖测定: T/C-28a2 细胞接种到 24 孔板, 每孔 500 μ l 培养液, 每组设 3 个平行孔。接近汇片时弃培养液, 换无血清培养基 (含 0.25% BSA) 饥饿 24h, 在有或无 20ng/ml rhIGF-1 诱导下, 用 rhWISP3 0、100、200、400、800、1600ng/ml 干预 24h。80%~90% 融合时加入 [³H]-脱氧胸腺嘧啶进行 ([³H]-TdR) 标记, 继续培养 8h 后轻轻弃去培养液, 加入 2ml 预冷的 10% 三氯乙酸 (TCA) 液 10min, 10% TCA 液反复洗涤 3 次。24 孔板加入 0.3N NaOH·SDS 液 0.5ml, 60℃, 30min。冷却到室温, 收集细胞裂解液, 加入 3ml 闪烁液, 液闪仪测量各孔每分钟放射性活性 (cpm 值)。通过测定细胞内标记的量 [³H]-TdR, 反映细胞增殖活性。

4. IGF-1 信号通路的初步研究: T/C-28a2 细胞接种到 24 孔板接近汇片时弃培养液, 换无血清培养基 (含 0.25% BSA) 饥饿 24h 后, 在有或无 IGF-1 信号通路的阻断剂 JBI (1.0 μ g/ml) 干预的情况下, 用 rhWISP3 (400 μ g/ml) 和 (或) rhIGF-1 (20ng/ml) 干预 24h, 抽提细胞总蛋白用免疫印记分析软骨细胞 II 型胶原的表达。

5. 蛋白免疫印迹 (Western blot): 取细胞 40 μ g 总蛋白与 4 $\times$ SDS 加样缓冲液混匀, 100℃ 加热蛋白变性 5min, 点样于 10% SDS-PAGE 胶中电泳, 再电转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBS-吐温封闭 1h, 用含人 II 型胶原抗体 (1:500 稀释) 的 PBS 温育 2h, PBS-吐温洗膜 10min $\times$ 3 次。用含辣根过氧化物酶标记抗鼠二抗 (1:4000 稀释) 的

PBS 孵育 1h, PBS-吐温洗膜 10min $\times$ 3 次, 洗膜后 ECL 发光自显影, 洗片显带。同一张膜洗脱后, 用 1:1000 稀释的羊抗鼠 β -actin (sc1616, Santa Cruz 公司) 一抗, 辣根过氧化物酶标记抗羊二抗 (1:4000 稀释) 重新杂膜, 发光自显影, 洗片显带作为内对照。所有杂交信号在成像分析仪系统测定条带密度。II 型胶原蛋白目的条带水平以 II 型胶原/ β -actin 的光密度比值表示。

6. 统计学方法: 各实验独立重复 3 次以上, 重复性好。所选图表为重复实验的结果之一。数据结果均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 采用 SPSS 11.0 软件进行统计, 组间比较用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. rhWISP3 对软骨细胞增殖的作用: 根据 [³H]-TdR 参入法, 与对照组比较 100、200、400、800、1600ng/ml rhWISP3 蛋白干预对软骨细胞增殖无明显影响。各浓度液闪仪计数 cpm 值分别为 76500.3 $\pm$ 1200.8、76202.8 $\pm$ 1005.6、77463.6 $\pm$ 1356.3、75100.5 $\pm$ 2423.6、75036.2 $\pm$ 1698.3、74632.8 $\pm$ 1896.4 次/分 (图 1)。

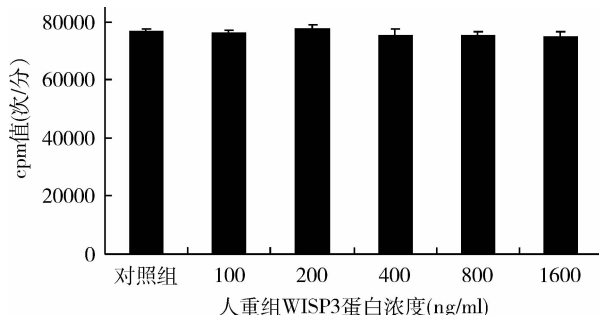


图 1 不同浓度 rhWISP3 对 T/C-28a2 细胞增殖活性的影响

各浓度 rhWISP3 干预后细胞增殖活性, 与对照组相比无明显差异 ($P > 0.05$)

2. rh IGF-1 对软骨细胞增殖的作用: 与对照组比较, 20ng/ml rhIGF-1 (对照组 1) 干预显著促进软骨细胞增殖 (130134.7 $\pm$ 1789.6 次/分, 76500.3 $\pm$ 1200.8 次/分, 图 2)。

3. rhWISP3 对 rh IGF-1 促进软骨细胞增殖的作用: 不同浓度 rhWISP3 干预对 rh IGF-1 促增殖作用无明显影响 (130134.7 $\pm$ 1789.6, 132580.3 $\pm$ 2563.2, 130069.4 $\pm$ 1963.4, 131523.3 $\pm$ 2203.9, 133567.3 $\pm$ 2765.3, 129980.6 $\pm$ 2253.6, 图 2)。

4. rhWISP3 促进软骨细胞表达 II 型胶原, 呈剂量依赖性: Western blot 印记杂交检测显示 rhWISP3 不同浓度能显著促进 T/C-28a2 细胞表达 II 型胶原, 从 50~1600ng/ml 呈剂量依赖性 (图 3)。

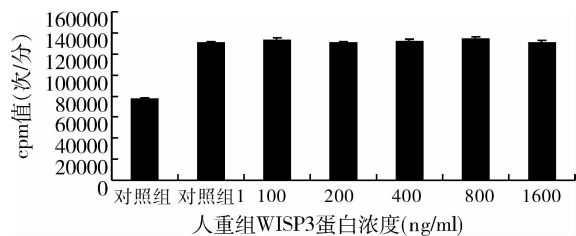


图2 不同浓度 rhWISP3 蛋白对 rhIGF - I 促细胞增殖活性的影响

对照组1表示单用 rhIGF - I 干预细胞,对照组1组与对照组比较其 cpm 值差异明显 (130134.7 ± 1789.6 次/分 vs 76500.3 ± 1200.8 次/分), 不同浓度 rhWISP3 蛋白对 rhIGF - I 促增殖活性无明显影响, $P > 0.05$

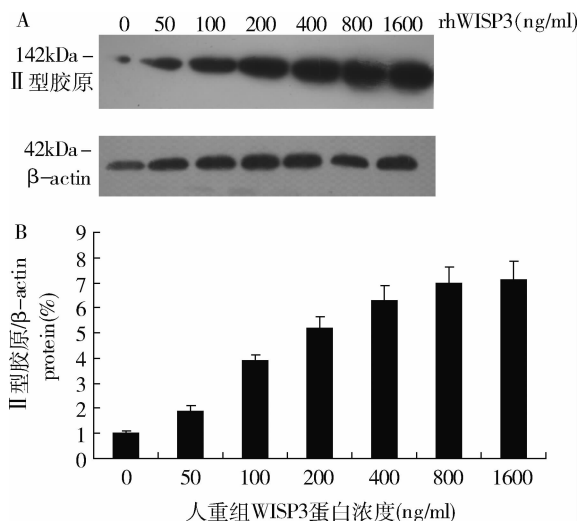


图3 rhWISP3 促进软骨细胞 II 型胶原表达

不同浓度 rhWISP3 干预细胞与对照组比较呈剂量依赖性上调 II 型胶原的表达 ($P < 0.05$)

5. rhWISP3 对 IGF - 1 信号通路的影响: Western

blot 印记杂交检测显示 rhWISP3 或 rh IGF - 1 单独干预 T/C - 28a2 细胞均能显著促进细胞表达 II 型胶原。IGF - 1 信号通路的阻断剂 JB1 干预的情况下, 能取消 rh IGF - 1 促进 II 型胶原表达的作用。JB1 不能取消 rhWISP3 促进软骨细胞 II 型胶原表达的作用 (图 4)。

讨 论

由于人原代软骨细胞难于获得, 且从活体分离后的细胞失去其正常的生活环境, 几乎没有增殖活性, 本实验选用的软骨细胞株 T/C - 28a2, 是来源于青少年的肋软骨, 通过原代细胞转染编码 SV40 抗原的反转录病毒获得永生化的软骨细胞株, 是现今研究软骨细胞特异性基因表达调节的一种重复性较好的软骨细胞模型, 能特异性的表达 II 型胶原、蛋白聚糖和

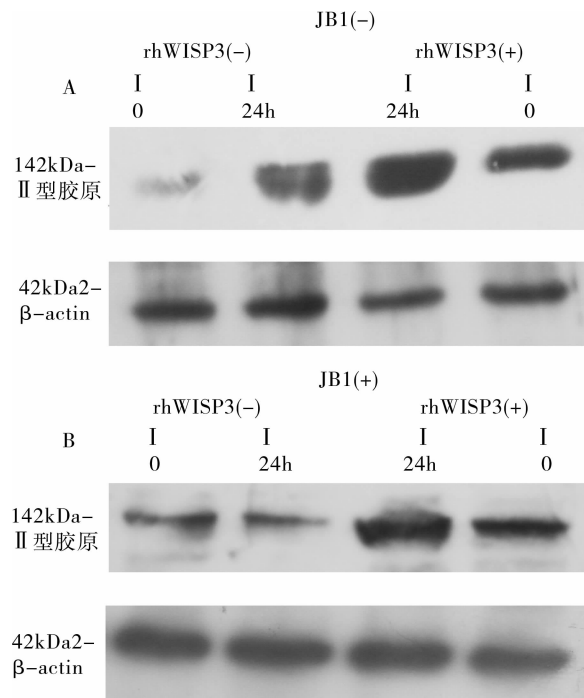


图4 JB1 干预细胞前后对 II 型胶原表达的影响

rhWISP3 或 rh IGF - 1 单独干预均能显著促进细胞表达 II 型胶原 (图 4A), JB1 不能取消 rhWISP3 促进软骨细胞 II 型胶原表达的作用 (图 4B)

SOX - 9^[8]。人永生化的软骨细胞株与原代细胞相比也有一些局限性, 如有较强的增殖活性, 而表达细胞外基质的能力较弱, 所以它并不能完全取代人原代软骨细胞用于研究软骨细胞功能。本研究发现 rh-WISP3 对 T/C - 28a2 软骨细胞增殖无明显影响, 而 rh IGF - 1 能显著促进软骨细胞增殖。rh IGF - 1 促增殖作用是通过活化 IGF - 1R, 继而活化下游的 IRS - 1 及 MAPK 信号通路而产生作用。不同浓度 rh-WISP3 干预对 rh IGF - 1 促增殖作用无明显影响。Matsumoto 等^[9]的实验证实 IGFBP - 3 能显著抑制 rh IGF - 1 促增殖作用, 而 IGFBP - 5 不能抑制 rh IGF - 1 促增殖作用。虽然 WISP3 结构域 IGFBP 与 IGFBPs 同源, 且可能具有类似的功能, 但是即使同属 IGFBPs 的 IGFBP - 3 和 IGFBP - 5 也可能对细胞增殖有不同的影响。

II 型胶原是软骨细胞外基质的主要特异性成分, 是成熟软骨细胞分化的典型标志, SEDT - PA 一个可能的发病机制是细胞成熟障碍^[10]。本实验研究发现 rhWISP3 促进软骨细胞表达 II 型胶原, 呈剂量依赖性, 表明 WISP3 基因能明显地促进软骨细胞的分化, 这与 Sen 等的实验结果相似。Sen 等将野生型和

SED_T-PA 相关的 WISP3 基因突变 (Cis⁷⁸ - Arg) 转染人永生化软骨细胞株 T/C - 28a2, 结果显示转染野生型 WISP3 基因 II 型胶原表达增加。但该实验结果并未在动物实验中复制成功, WISP3 基因敲除的小鼠并未出现 SED_T-PA 的表型, 转染 WISP3 基因的小鼠也未出现与野生型小鼠不同的表型, 体内实验与体外实验结果差异的原因至今仍未阐述清楚^[11,12]。

我们的实验欲初步探讨 WISP3 基因上调 II 型胶原表达是否通过 IGF - 1 信号通路。实验中使用 IGF - 1 信号通路的阻断剂 JB1。JB1 是一种 IGF - 1 的类似物, 能与 IGF - 1R 结合而抑制 IGF - 1R 自身的磷酸化, 在功能上表现为 IGF - 1 信号通路的阻滞剂。

多个实验室均证明 IGF - 1 上调 II 型胶原的表达, 本实验用 JB1 阻断 IGF - 1 信号通路的作用后, 取消了 IGF - 1 介导的 II 型胶原的上调^[13]。Western blot 印记杂交检测显示 rhWISP3 或 rh IGF - 1 均能显著促进 T/C - 28a2 表达 II 型胶原。IGF - 1 信号通路阻断剂 JB1 干预的情况下, 能取消 rh IGF - 1 促进 II 型胶原表达的作用, 但 JB1 不能取消 rhWISP3 促进软骨细胞 II 型胶原表达的作用。此实验结果提示 WISP3 可能不是通过 IGF - 1 信号通路产生促细胞外基质上调的作用。这与 Lorenzatti 等在炎性乳腺癌 (inflammatory breast cancer, IBC) 中的研究结果有差异, 他们的研究认为 rhWISP3 能通过 IGF - 1 信号通路抑制乳腺癌细胞转录因子 ZEB1 的表达, 减弱乳腺癌细胞的侵袭能力^[14]。不同位点的 WISP3 基因突变与 SED_T-PA 的发病密切相关, WISP3 基因也是一种肿瘤抑制基因, Kleer 等发现 80% IBC 组织中不表达 WISP3 基因, 稳定转染 WISP3 基因的 SUM149 细胞部分取消了 IBC 肿瘤组织血管生成能力^[15]。但 SED_T-PA 患者并没有报告有更高的 IBC 的发病率, 即使是同一个基因的不同突变形式也可能通过不同的信号通路发生作用, 产生不同的生物学功能。

综上所述, 在体外实验中 rhWISP3 显著促进了 II 型胶原的表达, 这种促表达的作用可能是通过独立于 IGF - 1 信号通路而产生的, 但 SED_T-PA 的具体发病机制仍需进一步的研究。

参考文献

- Ye J, Zhang HW, Wang T, *et al.* Clinical diagnosis and WISP3 gene mutation analysis for progressive pseudorheumatoid dysplasia [J]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2010, 48(3): 194 - 198
- Temiz F, Ozbek MN, Kotan D, *et al.* Ahomozygous recurring mutation in WISP3 causing progressive pseudorheumatoidarthropathy [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2011, 24(1 - 2): 105 - 108
- Hurvitz JR, Suwairi WM, Van HW, *et al.* Mutations in the CCN gene family member WISP3 cause progressive pseudorheumatoid dysplasia [J]. *Nat Genet*, 1999, 23(1): 94 - 98
- Wang Y, Cheng Z, Elalieh HZ, *et al.* IGF - 1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(7): 1437 - 1446
- Clemmons DR, Busby WH, Garmong A, *et al.* Inhibition of insulin - like growth factor binding protein 5 proteolysis in articular cartilage and joint fluid results in enhanced concentrations of insulin - like growth factor 1 and is associated with improved osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(3): 694 - 703
- Sen M, Cheng YH, Goldring MB, *et al.* WISP3 - dependent regulation of type II collagen and aggrecan production in chondrocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(2): 488 - 497
- Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, *et al.* Interleukin - 1 beta - modulated gene expression in immortalized human chondrocytes [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(6): 2307 - 2316
- Chiu LH, Chen SC, Wu KC, *et al.* Differential effect of ECM molecules on re - expression of cartilaginous markers in near quiescent human chondrocytes [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(8): 1981 - 1988
- Matsumoto T, Tsurumoto T, Goldring MB, *et al.* Differential effects of IGF - binding proteins, IGFBP - 3 and IGFBP - 5, on IGF - I action and binding to cell membranes of immortalized human chondrocytes [J]. *J Endocrinol*, 2000, 166(1): 29 - 37
- Kutz WE, Gong Y, Warman ML, *et al.* WISP3, the gene responsible for the human skeletal disease progressive pseudorheumatoid dysplasia, is not essential for skeletal function in mice [J]. *Mol Cell Biol*. 2005, 25(1): 414 - 421
- Nakamura Y, Cui Y, Fernando C, *et al.* Normal growth and development in mice over - expressing the CCN family member WISP3 [J]. *J Cell Commun Signal*, 2009, 3(2): 105 - 113
- Yang Y, Liao E. Mutant WISP3 triggers the phenotype shift of articular chondrocytes by promoting sensitivity to IGF - 1 hypothesis of spondyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy (SED_T-PA) [J]. *Med Hypotheses*, 2007, 68(6): 1406 - 1410
- Lorenzatti G, Huang W, Pal A, *et al.* CCN6 (WISP3) decreases ZEB1 - mediated EMT and invasion by attenuation of IGF - 1 receptor signaling in breast cancer. [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124 (Pt 10): 1752 - 1758
- Ye J, Zhang HW, Qiu WJ, *et al.* Patients with progressive pseudorheumatoid dysplasia: from clinical diagnosis to molecular studies. [J]. *Mol Med Report*, 2012, 5(1): 190 - 195
- Kleer CG, Zhang Y, Pan Q, *et al.* WISP3 is a novel tumor suppressor gene of inflammatory breast cancer [J]. *Oncogene*, 2002, 21(20): 3172 - 3180

(收稿: 2011 - 10 - 28)

(修回: 2011 - 11 - 17)