

成骨细胞来源的 IL-7 通过激活 mTORC1 信号通路抑制骨形成

王华磊

摘要 **目的** 本研究探讨成骨细胞分泌的白介素-7(IL-7)通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号来调节骨形成。**方法** 将 IL-7 基因的编码框构建于慢病毒表达载体,导入 MC3T3-E1 成骨细胞中,应用 qRT-PCR 和 ELISA 方法检测 IL-7 基因 mRNA 和蛋白的表达效率。Western blot 方法检测 MC3T3-E1 细胞 P-S6、S6、I 型胶原(collagen I, Col I)以及骨钙素(osteocalcin, Ocn)表达情况。用 0.1 nmol/L mTORC1 特异性抑制剂雷帕霉素刺激过表达 IL-7 基因的 MC3T3-E1 成骨细胞,Western blot 方法检测 P-S6、S6、Col I 以及 Ocn 表达情况。**结果** 过表达 IL-7 基因的慢病毒载体感染 MC3T3-E1 细胞可使其 IL-7 mRNA 表达上调 4.6 倍,ELISA 从蛋白水平证实过表达组细胞上清的 IL-7 含量增加 3.9 倍;过表达 IL-7 的 MC3T3-E1 细胞 P-S6 蛋白表达显著增强,而 Col I 和 Ocn 蛋白表达显著降低;雷帕霉素处理 IL-7 过表达的 MC3T3-E1 细胞导致其 P-S6 蛋白表达显著降低,而 Col I 和 Ocn 蛋白表达上调。**结论** 成骨细胞来源的 IL-7 通过促进 mTORC1 信号通路抑制其发育成熟。

关键词 成骨细胞 白介素-7 mTOR 骨形成

中图分类号 R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.12.039

Osteoblast-derived IL-7 Prohibits Bone Formation through Activating mTORC1 Signaling. Wang Hualai. Department of Orthopaedics, Nanyang City Center Hospital, Henan 473000, China

Abstract **Objective** To investigate the regulation of bone formation by osteoblast-derived interleukin-7 (IL-7) through the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Methods** The lentiviral vector with encoding frame of IL-7 gene was transfected into mouse MC3T3-E1 osteoblasts, and the expression levels of IL-7 mRNA and protein were detected, respectively, by qRT-PCR and ELISA method. Western blot method was used to detect the expression levels of P-S6, S6, collagen I (Col I) and Osteocalcin (Ocn) in MC3T3-E1 cells and in MC3T3-E1 cells stimulated by 0.1 nmol/L mTORC1-specific inhibitor rapamycin. **Results** The IL-7 mRNA level of MC3T3-E1 cells transfected with upregulated 4.6 times, and ELISA assay showed an increase of 3.9 times of IL-7 level in osteoblastic supernatants. After transfected using lentiviral vector with encoding frame of IL-7 gene, the expression levels of P-S6 protein increased significantly, while the expression levels of Col I and Ocn protein decreased significantly. However, rapamycin treatment of over-expressed IL-7 MC3T3-E1 cells resulted in a decline of P-S6 protein levels, but an increase of Col I and Ocn protein levels. **Conclusion** Osteoblast-derived IL-7 may inhibit its maturation by promoting mTORC1 signaling pathway.

Key words Osteoblast; Interleukin-7; mTOR; Bone formation

骨髓中白介素-7(IL-7)主要由骨髓基质细胞产生,是调控淋巴细胞发育的关键性细胞因子^[1]。IL-7 在人类很多疾病的发生过程中发挥重要作用^[2]。绝经期妇女骨质疏松症与破骨细胞活性增强密切相关,而 IL-7 是促进破骨细胞生成的决定性因素^[3,4]。用含 IL-7 的培养基培养小鼠头盖骨发现,骨发生蛋白-2(BMP-2)生成减少,使得骨生成受到抑制。给予小鼠腹腔注射外源性重组 IL-7,小鼠骨量明显减少^[5]。给予摘除卵巢的小鼠腹腔注射抗

IL-7 中和性抗体,不但能够抑制破骨细胞导致的骨丢失,还能刺激新骨形成^[6]。可见,IL-7 在调控骨形成中起着重要作用,但是成骨细胞来源的 IL-7 对骨形成的作用及调控机制尚未阐明。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)能够整合能量、营养和生长因子等多种细胞外信号,调控基因转录和蛋白翻译,在细胞增殖、分化及凋亡过程中发挥重要的作用。mTOR 及其相关信号通路参与人类许多疾病的发生、发展,比如肿瘤形成、代谢性疾病等^[7]。mTOR 主要以两种不同的复合物形式存在于细胞内:mTORC1 (mTOR

complex 1) 和 mTORC2 (mTOR complex 2), 二者分别接受不同的上游信号刺激发挥不同的生理功能。mTORC1 由 mTOR、Raptor、mLST8 和 PRAS40 组成, 对雷帕霉素最为敏感, 雷帕霉素能够特异性抑制 mTORC1 活性。活化的 mTORC1 主要通过磷酸化下游靶蛋白 40S 核糖体 S6 蛋白激酶 (S6K1) 及真核启动因子 4E-结合蛋白-1 (4E-BP1) 来调节下游蛋白质翻译。活化的 S6K1 能够促进核糖体蛋白 S6 磷酸化, 而活化的 4E-BP1 与转录起始因子 eIF4E 分离, 从而促使 cap 依赖的翻译。因此, P-S6 和 p-4E-BP1 的活性可代表 mTORC1 活性^[8]。mTORC2 则由 mTOR、Rictor、mLST8、PRR5 和 mSin1 组成, 其主要是通过 Akt (S473) 和 SGK1 来调控细胞的存活以及介导肌动蛋白骨架重组^[9]。文献报道, mTORC1 一方面能够促进成骨细胞增殖, 一方面抑制其分化成熟^[10]。IL-7 能够激活 mTORC1 信号发挥各种生理功能, 比如, IL-7 通过激活 mTORC1 信号抑制 T 细胞活性^[11,12]。因此, 笔者假设成骨细胞来源的 IL-7 可能通过激活 mTORC1 信号来调控骨形成。

笔者在本论文研究中构建过表达 IL-7 的成骨细胞系, 研究其分化成熟情况, 并进一步分析相关的分子机制, 为骨形成调节机制寻找新的突破点。

材料与方法

1. 材料: 小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞系和人胚肾 293T 细胞 (ATCC), DMEM 高糖培养基、Opti-MEM、胎牛血清 (美国 Gibco 公司), 胰酶 (南京凯基生物), 慢病毒载体 (吉凯基因), 限制性内切酶、Age I 酶和 T4 连接酶 (美国 New England Biolabs 公司), M-MLV 反转录酶、dNTP 和 RNA 酶抑制剂 (美国 Promega 公司), IL-7 开放阅读框 cDNA 克隆 (美国 OriGene 公司), PCR 引物 (美国 Invitrogen 公司), TRIzol (美国 Sigma 公司), Lipofectam in 2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司), PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), 雷帕霉素 (美国 Sigma 公司), 小鼠 IL-7 的 ELISA 试剂盒 (美国 R&D Systems 公司), 抗 p-S6、抗 S6 抗体 (美国 Abcam 公司), 抗 Col I、抗 Con、抗 β -actin 抗体 (美国 Cell signaling Technology 公司)。

2. 构建 IL-7 基因表达载体并包装慢病毒颗粒并感染 MC3T3-E1 细胞: 根据 Gene bank 中 mouse IL-7 (M29697) 序列, 设计 IL-7 的 PCR 扩增引物。根据关晓燕等^[12]的实验方法制备 IL-7 基因表达载体并包装慢病毒颗粒。空载体为对照组。将 IL-7 慢病毒按照感染复数 (MOI) 为 20, 感染 6 孔培养板

中的小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞, 慢病毒携带的 IL-7 基因表达序列整合入 MC3T3-E1 细胞从而获得稳定表达, 感染 4 天后提取细胞上清、细胞总 RNA 和总蛋白。

3. qRT-PCR 检测 IL-7 基因表达水平: 应用 RT-PCR 扩增目的基因后, 进行实时荧光聚合酶链反应: 所有反应均在 Lightcycler 基因扩增仪上进行, 反应体系 25 μ l 包括: SYBR Premix Ex Taq ($2 \times$) 12.5 μ l、cDNA 2 μ l、上游和下游引物各 0.5 μ l、dH₂O 9.5 μ l, 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 10s, 随后 40 个循环包括 95 $^{\circ}$ C 10s, 65 $^{\circ}$ C 30s。小鼠 IL-7 上游引物: 5'-GGCA-CACAAACACTGGTGAAC-3', 下游引物: 5'-TG-CATCATCTCTTTTCTGTTCCCTT-3'; 内参 GAPDH 上游引物: 5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3', 下游引物: 5'-CAACAATCTCCACTTTGCCACTG-3'。

4. ELISA 检测细胞上清液中 IL-7 含量: 收集 MC3T3-E1 成骨细胞上清, 1000 $\times g$ 离心 3min, 再次收集上清; 根据 IL-7 ELISA 试剂盒说明书检测上清 IL-7 含量。

5. Western blot 法检测 p-S6、S6、Col I、Ocn 蛋白表达水平: 根据文献^[10]实验方法, 用 Western blot 方法检测 P-S6、S6、Col I、Ocn 蛋白的表达水平。P-S6 (1:4000), S6 (1:3000), Col I (1:2000), Ocn (1:2000), 用相应的二抗结合一抗后, 辣根过氧化物酶标记的发光液显色, X 射线胶片曝光, 扫描收集 Western blot 条带。

6. 统计学方法: 应用 SPSS 13.0 统计学软件分析, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 采用两样本 *t* 检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MC3T3-E1 细胞 IL-7 基因过表达效率验证: 采用 qRT-PCR 检测手段, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法统计基因相对表达丰度, 过表达慢病毒感染组 IL-7 基因的表达强度是对照组的 4.6 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1A)。

采用 ELISA 检测细胞上清中 IL-7 蛋白表达含量, 进一步证实 IL-7 过表达效率, 实验组为对照组的 3.9 倍 ($P < 0.05$, 图 1B)。

2. MC3T3-E1 细胞 IL-7 基因过表达对 mTORC1 活性的影响: 采用 Western blot 法检测 MC3T3-E1 成骨细胞过表达 IL-7 基因对 mTORC1 活性的影响。与对照组相比, 实验组 P-S6 蛋白表达显著上调, 两组中 P-S6 的本底蛋白 S6 表达无明显

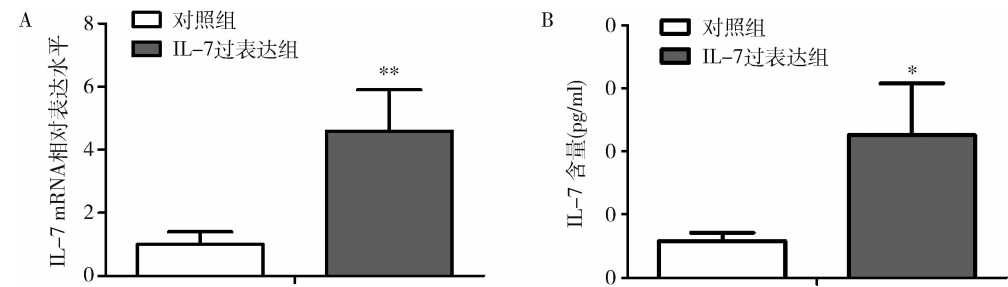


图1 MC3T3-E1 细胞的 IL-7 基因过表达效率
A. IL-7 mRNA 表达水平;B. 细胞上清液中 IL-7 蛋白含量;与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

差异(图2)。又由于 P-S6 代表 mTORC1 活性^[8]。所以 MC3T3-E1 成骨细胞过表达 IL-7 能够激活 mTORC1 信号。

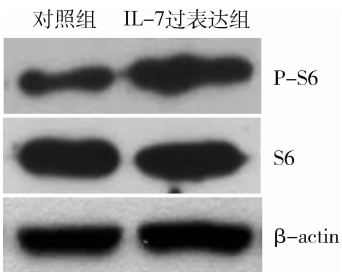


图2 MC3T3-E1 细胞 IL-7 基因过表达对 mTORC1 活性的影响

3. MC3T3-E1 细胞 IL-7 过表达对骨形成的影响:采用 Western blot 法检测 MC3T3-E1 成骨细胞过表达 IL-7 基因对骨形成的影响。与对照组相比,实验组成骨细胞分化成熟指标 I 型胶原 (Col I) 和骨钙素 (Ocn) 的表达均显著降低,说明 IL-7 过表达抑制成骨细胞发育成熟,骨形成受阻 (图3)。

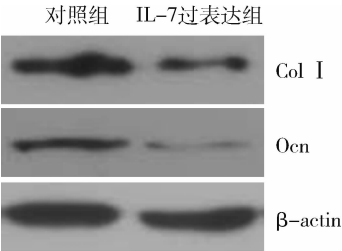


图3 MC3T3-E1 细胞 IL-7 过表达对骨形成的影响

4. 雷帕霉素逆转 MC3T3-E1 细胞过表达 IL-7 对骨形成的影响:参照文献^[10]用 0.1nmol/L 雷帕霉素 (Rapamycin, Rap) 处理过表达 IL-7 基因的 MC3T3-E1 成骨细胞,然后采用 Western blot 法检测雷帕霉素对 mTORC1 活性以及骨形成的影响。与无雷帕霉素处理组 (No-Rap) 相比,对应的雷帕霉素处

理组 (With-Rap) P-S6 蛋白表达明显下调,但是 I 型胶原 (Col I) 和骨钙素 (Ocn) 的表达均上调 (图4)。这些说明雷帕霉素抑制 mTORC1 活性,在一定程度上逆转 IL-7 过表达对骨形成的抑制作用,MC3T3-E1 成骨细胞过表达 IL-7 可能通过激活 mTORC1 信号来抑制成骨细胞发育成熟。

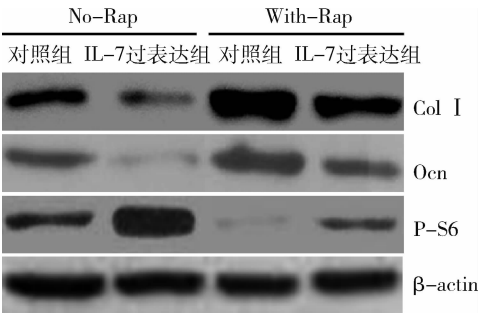


图4 雷帕霉素纠正过表达 IL-7 所导致的 MC3T3-E1 成骨细胞成熟障碍
Ctrl 为对照组,IL-7-OP 为 IL-7 过表达组

讨 论

IL-7 是一种破骨细胞生成因子,促进破骨细胞祖细胞发育成熟^[4]。IL-7 在 T、B 淋巴细胞发育成熟过程中也发挥重要作用^[1]。骨髓中,IL-7 主要由基质细胞和成骨细胞分泌^[1,13]。IL-7 在骨稳态中起着重要的调节作用^[14]。然而 IL-7 对成骨细胞的直接调控作用及分子机制尚无明确报道。笔者在本研究中发现,小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞过表达 IL-7, mTORC1 信号上调,成骨细胞自身分化成熟受到抑制,而 mTORC1 抑制剂雷帕霉素可以逆转这一过程。因此,在小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞中,IL-7 能够通过 mTORC1 信号通路调控细胞的分化成熟和骨形成。

研究表明,切除卵巢的小鼠 IL-7 分泌增多,导致破骨细胞数量增多及活性增强,最终导致小鼠发生

骨质疏松,而外源性的抗 IL-7 单克隆中和性抗体能够抑制因卵巢切除导致的骨丢失^[6]。给予正常小鼠腹腔注射外源性 IL-7 后导致骨量减少^[15]。然而在转基因小鼠实验中发现,与野生型小鼠相比,敲除 IL-7 (IL-7 KO) 小鼠在切除卵巢后表现为下肢骨小梁减少,但是皮质骨无明显差异。因此笔者认为,过多的 IL-7 或者过少的 IL-7 均可导致骨发生障碍。虽然在体内实验中证实成骨细胞过表达人源性 IL-7 导致破骨细胞活性减弱,使得小鼠骨量增多,而这一骨表型只发生于雌性小鼠^[14]。但是,本研究中的体外实验结果表明,成骨细胞过表达 IL-7 抑制成骨细胞 I 型胶原 (Col I) 和骨钙素 (Ocn) 表达,成骨细胞分泌过多的 IL-7 不利于骨形成。笔者认为这可能是脱离了成骨细胞自身的体内复杂环境,成骨细胞分泌 IL-7 不能与骨髓中的其他细胞发生联系,简单地以自分泌的形式分泌过多的 IL-7,并通过调控下游的细胞内信号途径抑制自身发育成熟障碍。

进一步的分子机制研究发现,成骨细胞过表达 IL-7 能够激活雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号。有研究已经证实成骨细胞分化成熟需要低活性 mTORC1^[10]。因此,IL-7 调节的成骨细胞 mTORC1 活化可能导致成骨细胞分化成熟障碍。接下来的实验证实了这一观点,mTORC1 特异性抑制剂雷帕霉素不仅抑制了过表达 IL-7 基因的 MC3T3-E1 成骨细胞的 mTORC1 活性,而且促进了成骨细胞 I 型胶原和骨钙素的表达,在一定程度上逆转了因过表达 IL-7 导致的细胞分化成熟缺陷。这些说明 MC3T3-E1 成骨细胞过表达 IL-7 是通过活化 mTORC1 信号来抑制骨生成的。

参考文献

- 1 Henney CS. Interleukin 7: effects on early events in lymphopoiesis [J]. *Immunol Today*, 1989, 10(5): 170-173
- 2 Lundström W, Fewkes NM, Mackall CL. IL-7 in human health and disease[J]. *Seminars Immunol*, 2012, 24(3): 218-224
- 3 Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis[J]. *N Engl J Med*, 1995, 332(5): 305-311
- 4 Sato T, Watanabe K, Masuhara M, *et al.* Production of IL-7 is increased in ovariectomized mice, but not RANKL mRNA expression by osteoblasts/stromal cells in bone, and IL-7 enhances generation of osteoclast precursors in vitro[J]. *J Bone Mineral Metab*, 2006, 25(1): 19-27
- 5 Weitzmann MN, Roggia C, Toraldo G, *et al.* Increased production of IL-7 uncouples bone formation from bone resorption during estrogen deficiency[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(11): 1643-1650
- 6 Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease[J]. *Cell*, 2017, 168(6): 960-976
- 7 Elfenbein A, Simons M. Syndecan-4 signaling at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 17): 3799-3804
- 8 Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(14): 1296-1302
- 9 Huang B, Wang Y, Wang W, *et al.* mTORC1 prevents preosteoblast differentiation through the Notch signaling pathway[J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(8): e1005426
- 10 Batista A, Barata JT, Raderschall E, *et al.* Targeting of active mTOR inhibits primary leukemia T cells and synergizes with cytotoxic drugs and signaling inhibitors[J]. *Exp Hematol*, 2011, 39(4): 457-472
- 11 Allgauer A, Schreiner E, Ferrazzi F, *et al.* IL-7 Abrogates the immunosuppressive function of human double-negative T cells by activating Akt/mTOR signaling [J]. *J Immunol*, 2015, 195(7): 3139-3148
- 12 关晓燕,周卫兵,黄隽,等. CDK2-AP1 基因过表达对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及周期的影响[J]. *中南大学学报:医学版*, 2012, (10): 990-996
- 13 Aguila HL, Mun SH, Kalinowski J, *et al.* Osteoblast-specific overexpression of human interleukin-7 rescues the bone mass phenotype of interleukin-7-deficient female mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(5): 1030-1042
- 14 Miyaura C, Onoe Y, Inada M, *et al.* Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(17): 9360-9365
- 15 Lee SK, Kalinowski JF, Jacquin C, *et al.* Interleukin-7 influences osteoclast function in vivo but is not a critical factor in ovariectomy-induced bone loss[J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(5): 695-702

(收稿日期:2017-03-31)

(修回日期:2017-04-17)

《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统的启事

《医学研究杂志》已经启用远程稿件处理系统,请各位作者登陆《医学研究杂志》网站:<http://www.yxyjzz.cn>,注册登陆投稿系统,填写作者相关信息后进行投稿。咨询电话:010-52328679(单政编辑)。

《医学研究杂志》编辑部