

骨形态发生蛋白 9 通过 p38 激酶途径调控间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化*

赵 丹^{1, 2)} 王 箭¹⁾ 罗进勇¹⁾ 刘悦亮¹⁾ 王 虹¹⁾ 曾照芳¹⁾ 袁 军^{1, 3)**}

¹⁾ 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016; ²⁾ 重庆医科大学学生工作处, 重庆 400016;

³⁾ 重庆医科大学科研处, 重庆 400016)

摘要 前期研究发现骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)具有较强的诱导间充质干细胞成骨分化的能力。为进一步揭示其诱导和调控间充质干细胞成骨分化的机理, 利用 BMP9 重组腺病毒感染间充质干细胞 C3H10T1/2, 通过体外细胞实验和体内动物实验, 初步分析 BMP9 是否可通过 p38 激酶途径调控间充质干细胞成骨分化。结果发现, BMP9 可以通过促进 p38 激酶磷酸化而导致其活化, p38 抑制剂 SB203580 可抑制由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)表达和钙盐沉积, 而且利用抑制剂 SB203580 抑制 p38 激酶活性后, BMP9 诱导的 Smad 经典途径的激活也相应受到抑制, RNA 干扰导致 p38 基因沉默同样也可抑制 BMP9 诱导的 ALP 活性、OPN 表达、钙盐沉积以及裸鼠皮下异位成骨。因此, BMP9 可通过活化 p38 激酶途径调控间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化。

关键词 骨形态发生蛋白 9, p38, 间充质干细胞, 成骨分化, 丝裂原活化蛋白激酶

学科分类号 Q257, R341

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00200

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是属于中胚层的一类多能干细胞, 具有强大的增殖能力和多向分化潜能, 在适宜的体内或体外环境下不仅可分化为成骨细胞, 还具有分化为肌细胞、软骨细胞、基质细胞、肝细胞等多种细胞的能力^[1-2]。作为种子细胞, 间充质干细胞可以修复、重建受伤或发生病变的多种组织器官, 因而在再生医学研究中具有潜在应用前景^[1-3], 目前骨再生研究中就常使用间充质干细胞作为种子细胞^[4-5]。而如何促进和调控具有多向分化能力的间充质干细胞定向成骨分化, 一直是目前骨再生研究的热点和关键领域。多种细胞因子可以调控间充质干细胞成骨分化, 其中, 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是研究最早和最有潜力的因子。BMPs 是属于转化生长因子 β (transform growth factor- β , TGF- β)超家族的成员, 目前共分离和鉴定了 20 余种 BMPs, 其中已报道的具有诱导成骨活性的 BMPs 主要为 BMP2, 4, 6, 7 等^[6-8]。

BMP9(也称 GDF-2, growth differentiation factor 2)是 BMPs 中的一种, 主要大量存在于肝脏^[9]。BMP9 已被证实具有诱导和维持胚胎神经元的类胆碱分化、调节葡萄糖和脂肪酸代谢、调节体内铁的动态平衡等多种重要功能^[10-12]。而长期以来, 对于 BMP9 在骨形成及骨再生中的作用, 都缺乏研究和了解。近来的相关研究工作证明: BMP9 也具有强烈的诱导间充质干细胞成骨分化的作用, 并且其作用效果强于 BMPs 家族的其他成员^[8, 13-14], 但是, 对于 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的分子机制, 目前却了解很少。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein

* 国家自然科学基金(30800658, 31071304)和重庆市科委自然科学基金(2009BB5060)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 023-68485555, E-mail: Yj6848@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-05-12, 接受日期: 2011-07-12

kinase, MAPK) 主要有 4 个亚家族成员即 ERK1/2、ERK5、p38 和 JNK^[15], 它们在调控细胞的生长、分化及凋亡中发挥重要的作用. 众多研究表明, BMP2 等成骨性 BMPs 均可以活化 MAPK 途径而发挥诱导成骨分化的功能^[16-19]. 而作为 BMPs 家族的一员, BMP9 在诱导间充质干细胞成骨分化过程中, 是否也如 BMP2 等一样可通过活化 MAPK 而发挥调控作用, 目前还未见相关报道. 因此, 本研究首先确认在间充质干细胞 C3H10T1/2 中, MAPK 亚家族成员 p38 激酶可被 BMP9 活化; 再利用 p38 激酶特异性抑制剂 SB203580 抑制 p38 激酶活性以及 RNA 干扰技术抑制 p38 激酶表达后, 观察其对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化的影响, 初步分析 BMP9 通过活化 p38 激酶途径而调控间充质干细胞成骨分化的作用及其分子机制.

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠间充质干细胞株 C3H10T1/2 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC); BMP9 腺病毒 Ad-BMP9、空载腺病毒 Ad-GFP 均由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室构建和保存; 荧光素酶报告质粒 p12SBE-luc、p38 干扰腺病毒(AdR-si-p38)和对照腺病毒(AdR-si-NC)由芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠; p38 抑制剂 SB203580 购自 Santa Cruz 公司, 溶解于 DMSO, 配制成浓度为 20 mmol/L 的储存液, -20℃ 保存备用.

OPN 一抗购自 Santa Cruz 公司(sc-21742); Phosphor-p38(p-p38)一抗购自 Cell Signaling 公司(#4511); 总 p38 一抗购自 Cell Signaling 公司(#9212); Phosphor-Smad1/5/8(p-Smad1/5/8)一抗购自 Cell Signaling 公司(#9511); 总 Smad1/5/8 一抗购自 Santa Cruz 公司(sc-6031-R); β -actin 一抗购自 Santa Cruz 公司(sc-47778).

实验所用 RNA 提取试剂 Trizol 和转染试剂 Lipofectamin2000TM 购自 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶、荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司; Real Time PCR 试剂盒购自 Takara 公司; PCR 引物由 Takara 公司合成; ALP 染色试剂盒及定量检测试剂盒购自 BD 公司; 茜素红 S(Alizerin Red S)、维生素 C 和 β -磷酸甘油购自 Sigma 公司; 高糖 DMEM 培养基、优质胎牛血清购自 Hyclone 公司; 其他试剂均为进口分装或国产分析纯.

实验动物选用 6~8 周龄的健康雄性免疫缺陷 BALB/c 裸鼠, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 喂养于严格消毒的无菌层流动物房内, 环境温度维持在 25℃, 空气湿度为 60%~70%, 饲料和水经消毒后自由进食.

1.2 方法

1.2.1 ALP 染色和定量检测. 接种 C3H10T1/2 至 24 孔细胞培养板, 密度为 30%, 待细胞贴壁后, 用 SB203580 预处理 4 h, 或加入适量 si-p38(或 si-NC)腺病毒感染 24 h. 随后再加入适量 BMP9 腺病毒, 继续培养至相应时间点进行 ALP 染色和定量测定(操作按试剂盒说明书进行), 比较和分析 ALP 活性的变化情况.

1.2.2 免疫组化. 在 24 孔板上按 30%密度接种 C3H10T1/2 细胞, 待细胞贴壁后, 用 SB203580 预处理 4 h, 或加入适量 si-p38(或 si-NC)腺病毒感染 24 h. 随后再加入适量 BMP9 腺病毒, 继续培养 12 天后, 采用链霉卵白素-生物素-辣根过氧化物法(SP 法)进行免疫组化染色检测骨桥蛋白的表达, 显微镜观察和成像.

1.2.3 Western blot. C3H10T1/2 细胞接种于 100 mm 细胞培养皿, 经不同的处理因素处理后, 细胞裂解液 RIPA 裂解细胞, 离心获得细胞裂解液. BCA 法测定裂解液浓度. 裂解液样品经 SDS-PAGE、转膜、5%牛血清白蛋白封闭、一抗孵育、洗膜、HRP 标记的二抗孵育等过程后, 加入化学发光显色液显色, 成像保存.

1.2.4 钙盐沉积实验. 接种 C3H10 T1/2 细胞至 24 孔细胞培养板, 密度为 30%, 待细胞贴壁后, 加入终浓度为 50 mg/L 维生素 C 和 10 mmol/L 的 β -磷酸甘油. 用 SB203580 预处理 4 h, 或加入适量 si-p38(或 si-NC)腺病毒感染 24 h. 随后再加入适量 BMP9 腺病毒, 继续培养 21 天后进行茜素红 S 染色. 彻底弃去细胞培养板孔内液体, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 0.1%戊二醛固定 10 min, 双蒸水洗涤 3 次. 弃去双蒸水, 加入 0.4%茜素红 S, 在显微镜下观察, 待出现红色物质堆积时, 弃去孔内染液, 双蒸水终止反应和洗涤, 显微镜观察和成像.

1.2.5 荧光素酶报告基因实验. 接种 C3H10T1/2 细胞至 T-25 细胞培养瓶(底面积 25 cm²), 密度为 30%, 待细胞贴壁后, 换用无血清、无双抗的 DMEM 培养基, 随后用脂质体 2000 转染 p12SBE-luc 质粒 1 μ l, 转染后 4 h 换为完全 DMEM 培养基. 继续培养 24 h, 再将细胞接种至

24 孔细胞培养板, 待细胞贴壁后, 用 SB203580 预处理 4 h, 随后再加入适量 BMP9 腺病毒, 继续培养 8 h 和 24 h 后分别进行荧光素酶活性测定(按试剂盒说明书进行)。

1.2.6 Real-time PCR 实验. C3H10T1/2 细胞接种于 T-25 细胞培养瓶, 密度为 60%, 细胞贴壁后, 先加或加入适量 si-p38(或 si-NC)腺病毒感染 24 h, 再加入适量 BMP9 腺病毒, 在加入 BMP9 腺病毒

后 24 h 提取细胞 RNA, 经逆转录反应制备 cDNA, Real-time PCR 检测 Smad6 和 Smad7 的表达, 采用 GAPDH 基因作为内参照. 目的基因的表达根据标准曲线得出 mRNA 的分子拷贝, 用 GAPDH 的拷贝数作为校正基数, 即目的基因 mRNA 相对表达量 = 目的基因拷贝数 / GAPDH 拷贝数. 所用引物序列见表 1.

Table 1 The sequence of primers for Real time PCR

Gene	Forward primer	Reversed primer
Smad6	ATCACCTCCTGCCCTGT	CTGGGGTGGTGTCTCTGG
Smad7	AAGATCGGCTGTGGCATC	CCAACAGCGTCCTGGAGT
GAPDH	GGCTGCCAGAACATCAT	CGGACACATTGGGGGTAG

1.2.7 动物实验和组织化学染色. C3H10T1/2 细胞接种至 100 mm 细胞培养皿, 培养至细胞密度 60%左右, 加入适量 AdR-si-p38(或 AdR-si-NC)腺病毒感染 24 h, 再加入适量 BMP9 腺病毒, 继续培养 24 h, 彻底弃去细胞培养皿中的液体, 用 2 ml 0.25%胰蛋白酶消化 2 min, 8 ml 含 10%血清的 DMEM 中和, 吸管吹打成为单细胞悬液, 500 g 离心 2 min, 弃去上清, 用 50 μ l 含 100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 PBS 重悬细胞沉淀. 每只 BALB/c 裸鼠用 1 ml 注射器接种 50 μ l 细胞悬液于背部, 每周观察裸鼠皮下成骨包块的大小. 细胞接种 5 周后, 断颈处死裸鼠, 取皮下包块观察大小并成像. 用福尔马林固定包块后, 经脱钙, 石蜡包埋切片, H&E 染色、Masson Tricrome 染色和 Alcian Blue 染色观察包块内的成骨情况, 成像并保存.

1.2.8 统计分析. 数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 q 检验, 统计学数据均用 SAS8.2 软件包处理.

2 结果与分析

2.1 BMP9 促进间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化并活化 p38 激酶

首先, BMP9 腺病毒感染 C3H10T1/2 细胞 48 h 后, 提取细胞 RNA, 逆转录合成 cDNA, PCR 扩增, 上游引物选用 BMP9 的 5'端特异性引物, 下游引物选用腺病毒上 SV40 polyA 的特异性引

物, 以排除内源性受体的干扰. 结果发现 BMP9 腺病毒可在 C3H10T1/2 细胞中有效表达, 从而出现 350 bp 左右的扩增片段(图 1a). 表明 BMP9 腺病毒可以在 C3H10T1/2 细胞中有效表达外源性 BMP9.

在 BMP9 病毒感染后 5 天、7 天和 9 天后分别染色和定量检测 ALP 活性, 在感染 21 天后茜素红 S 染色检测钙盐沉积, 结果发现, BMP9 可以明显促进早期成骨指标 ALP 的活性增加($P < 0.01$, 图 1b), 其中在第 7 天的 ALP 活性最强. 而与对照组相比, BMP9 刺激后细胞内的红色钙盐结节增多, 钙盐沉积也明显增强(图 1c). 以上结果表明 BMP9 可以促进间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化, 与已有的相关研究结果相一致^[13-14].

随后, 利用 Western blot 检测了转录因子 Smad1/5/8 以及 p38 激酶的总蛋白水平和磷酸化水平, 结果发现, BMP9 腺病毒感染细胞 24 h 后, 转录因子 Smad1/5/8 的磷酸化水平增加, 表明 BMP9 可以活化 Smad1/5/8, 从而激活经典 Smad 途径, 这与相关报道一致^[14]. 值得注意的是: BMP9 虽然不改变 p38 的总蛋白水平, 但却可以使 p38 的磷酸化水平增加(图 1d), 由此提示: BMP9 可以促进间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化, 该过程中还伴随有 p38 激酶的活化, 故 BMP9 很可能通过活化 p38 激酶途径而诱导和调控 C3H10T1/2 细胞成骨分化.

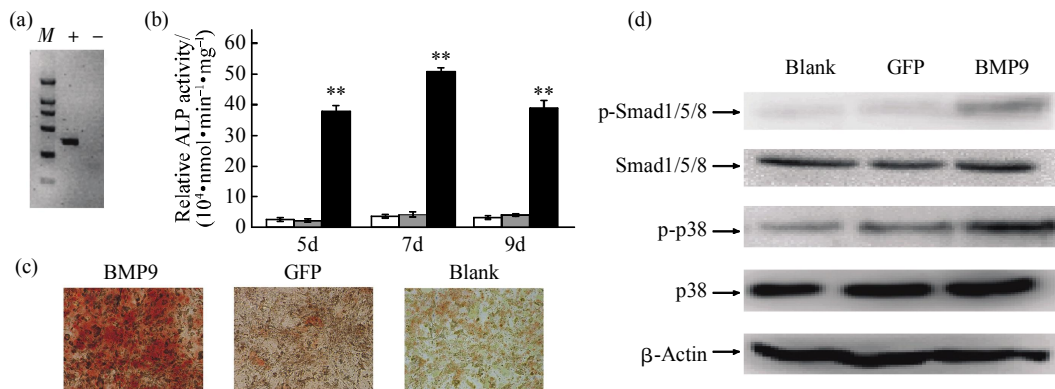


Fig. 1 BMP9 activated p38 kinase through osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells

(a) Exogenous expression of BMP9 mediated by adenovirus in C3H10T1/2. +: PCR products from +RT reactions of the original cDNA synthesis; -: PCR products from -RT reactions of the original cDNA synthesis; M: DNA marker. (b) C3H10T1/2 cells were infected with Ad-BMP9 or Ad-GFP virus. At 5, 7 and 9 days after infection, cells were collected and subjected to ALP staining and quantitation assay, BMP9 was shown to induce ALP activity of C3H10T1/2. Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. $^{**}P < 0.01$ vs GFP and Blank. □: Blank; ■: GFP; ■: BMP9. (c) BMP9 promoted calcium deposition of C3H10T1/2 at day 21, $\times 100$. (d) BMP9 increased the phosphorylated form of transcription factor Smad1/5/8 and p38 kinase.

2.2 阻断 p38 激酶活性可抑制由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞早期成骨分化

由于在 BMP9 促进间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化的过程中, 伴随有 p38 激酶的活化, 因此推测 BMP9 可通过活化 p38 激酶而调控 C3H10T1/2 成骨分化. 为证实此推测, 首先利用不同浓度 (2 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$) 的 p38 激酶特异性抑制剂 SB203580 预处理 C3H10T1/2 细胞, 再给

予 BMP9 的刺激, 在 BMP9 刺激后第 7 天检测 ALP 活性, 结果表明: 与对照组相比, SB203580 可以抑制由 BMP9 诱导的早期成骨指标 ALP 的活性, 且随着抑制剂 SB203580 剂量的增加, ALP 活性的受抑制程度也相应增加(图 2a 和 2b). 因此, p38 激酶的特异性抑制剂 SB203580 可以剂量依赖性地抑制由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞早期成骨分化.

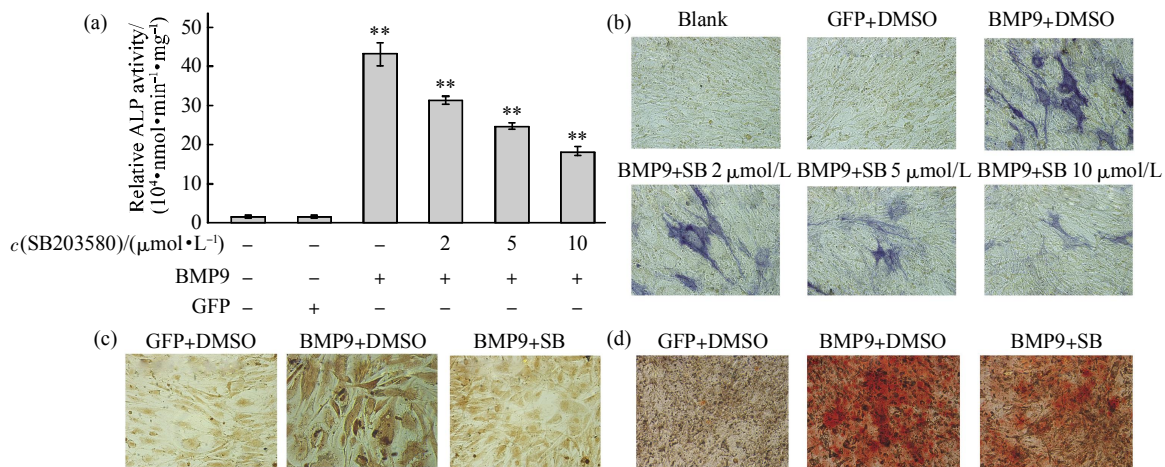


Fig. 2 Effect of the p38 inhibitor SB203580 on BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cell

(a) SB203580 inhibited BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cell in a dose-dependent manner determined by ALP quantitative assay, Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. $^{**}P < 0.01$ vs GFP. (b) SB203580 inhibited BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cell in a dose-dependent manner determined by ALP staining assay, $\times 100$. (c) SB203580 inhibited BMP9-induced OPG expression of C3H10T1/2 cell detected by immunocytochemistry assay, $\times 100$. (d) SB203580 inhibited BMP9-induced calcium precipitation of C3H10T1/2 cell determined by Alizarin Red S staining assay, $\times 100$.

2.3 阻断 p38 激酶活性可抑制由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞晚期成骨分化

除了 ALP 以外, OPN 和钙盐沉积是细胞成骨分化的另外两个经典的检测指标, 且是比 ALP 更晚期的指标. 因此, 为了确认阻断 p38 激酶活性后, 对于 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞晚期成骨分化的影响, 首先利用 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 SB203580 预处理 C3H10T1/2 细胞, 再用 BMP9 腺病毒感染细胞, 在 BMP9 腺病毒感染 12 天后, 免疫组化检测 OPN 的表达. 结果发现, 与对照组相比, SB203580 预处理组中由 BMP9 诱导的 OPN 的表达明显下降(图 2c), 而通过茜素红 S 染色则发现, 在 SB203580 预处理组中由 BMP9 诱导的红色钙盐结节明显减少, 这表明 SB203580 抑制了由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞钙盐沉积(图 3c). 综合 OPN 和钙盐沉积实验结果表明, 在利用 SB203580 阻断 p38 激酶活性后, 可以抑制由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞晚期成骨分化.

2.4 阻断 p38 激酶活性可抑制由 BMP9 诱导的 Smad 经典信号途径的激活

我们发现, BMP9 可以导致 C3H10T1/2 的 Smad1/5/8 磷酸化水平增加(图 1c), 这表明 BMP9 可以激活 Smad 经典途径. Smad6 和 Smad7 则是 Smad 经典途径的负性调控因子, 在 Smad 经典途径激活后表达迅速增加, 起到反馈抑制和调控信号强度的作用, 是 Smad 经典信号途径激活的标志之一^[20]. 为确认阻断 p38 激酶活性后, Smad 经典途径的变化情况, 首先通过 Real-time PCR 检测了 Smad6 和 Smad7 的表达, 结果发现, 在 SB203580 预处理 C3H10T1/2 细胞后, 与对照组相比, 由 BMP9 所诱导的 Smad6 和 Smad7 的 mRNA 表达水平明显下降($P < 0.01$, 图 3a 和 3b), 这表明阻断 BMP9 诱导的 p38 激酶活性后, 由 BMP9 激活 Smad 途径所致的 Smad6 和 Smad7 表达上调趋势受到抑制. 由此推测: 阻断 p38 激酶活性后, 继而有可能导致 BMP9 所激活的 Smad 经典信号通路也相应受到抑制.

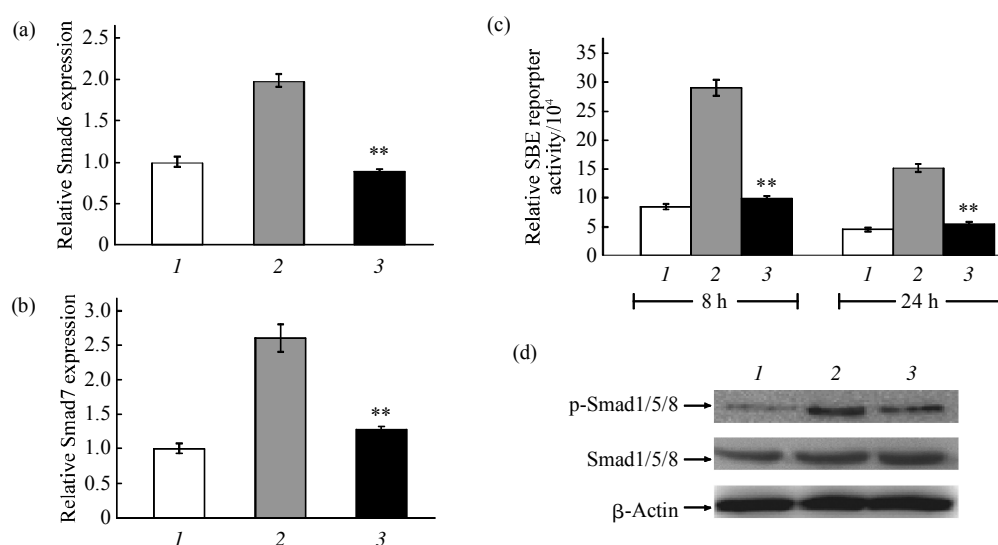


Fig. 3 Effect of the p38 inhibitor SB203580 on BMP9-induced activation of canonical Smad pathway in C3H10T1/2 cells

(a) SB203580 inhibited BMP9-induced Smad6 expression of C3H10T1/2 cells detected by Real time PCR, data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. $**P < 0.01$ vs BMP9+DMSO. (b) SB203580 inhibited BMP9-induced Smad7 expression of C3H10T1/2 cells detected by Real time PCR, data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. $**P < 0.01$ vs BMP9+DMSO. (c) SB203580 inhibited BMP9-induced luciferase activity of C3H10T1/2 cells, data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. $**P < 0.01$ vs BMP9+DMSO. (d) SB203580 decreased the phosphorylated form of Smad1/5/8 promoted by BMP9 in C3H10T1/2 cells determined by Western blot. 1: GFP+DMSO; 2: BMP9+DMSO; 3: BMP9+SB.

为证实此推测, 利用荧光素酶报告基因方法检测了 BMP9 所诱导的荧光素酶的活性. 荧光素酶报告质粒 p12SBE-luc 在报告基因前插入了 12 个连续的 SBE(Smad binding element)序列, Smad 经典

途径激活后, 可以随之启动荧光素酶的表达^[21]. 结果显示: SB203580 可抑制 BMP9 所导致的 Smad 经典途径的激活, 从而使荧光素酶活性降低($P < 0.01$, 图 3c). 而 Western blot 则进一步证实: SB203580

预处理后, 由 BMP9 所诱导的 Smad1/5/8 磷酸化水平降低(图 3d), 表明转录因子 Smad1/5/8 的活化受到抑制. 综合上述结果表明, 阻断 p38 激酶活性的确可抑制由 BMP9 诱导的 Smad 经典信号途径的激活.

2.5 p38 基因沉默可抑制由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化

为进一步证实 BMP9 通过 p38 激酶途径对于 C3H10T1/2 细胞成骨分化的调控作用, 利用 p38 干

扰腺病毒 (si-p38) 和对照腺病毒 (si-NC) 感染 C3H10T1/2 细胞(图 4a), Western blot 确认 si-p38 可以有效降低 p38 激酶的蛋白质表达水平, 从而导致 p38 基因沉默(图 4b). 而在 p38 基因沉默后, BMP9 诱导的细胞早期成骨指标 ALP 的活性明显降低($P < 0.01$, 图 4c 和 4d), 同时, C3H10T1/2 细胞晚期成骨指标 OPN 表达和钙盐沉积也相应受到抑制(图 5a 和 5b), 表明 p38 基因沉默也可导致由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞体外成骨分化减弱.

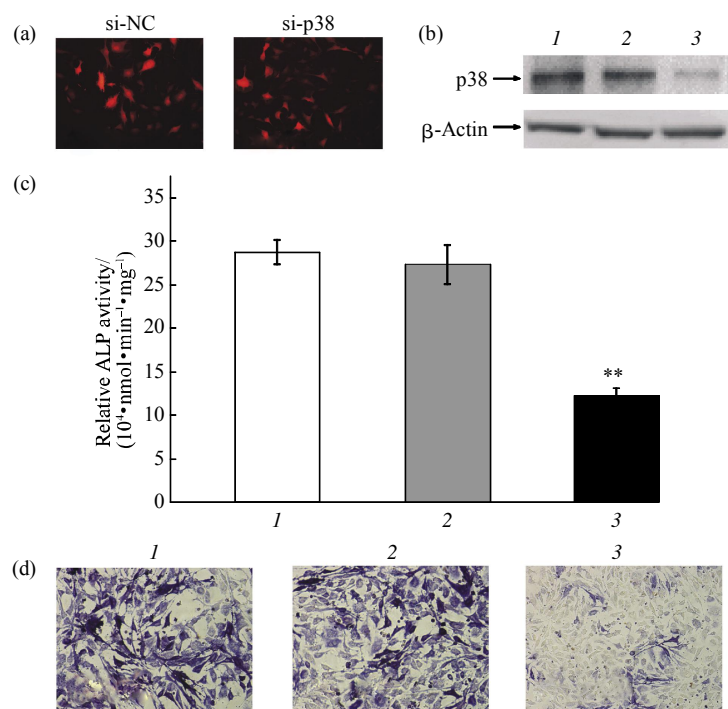


Fig. 4 Gene silence of p38 blocked BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cells

(a) Efficient infection of adenovirus AdR-si-p38 and AdR-si-NC to C3H10T1/2 cells. (b) The expression of p38 was reduced by RNA interference determined by Western blot. (c) Gene silence of p38 inhibited BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cells determined by ALP quantitative assay, data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. $**P < 0.01$ vs si-NC. (d) Gene silence of p38 inhibited BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cells determined by ALP staining assay, $\times 100$. 1: Blank; 2: si-NC; 3: si-P38.

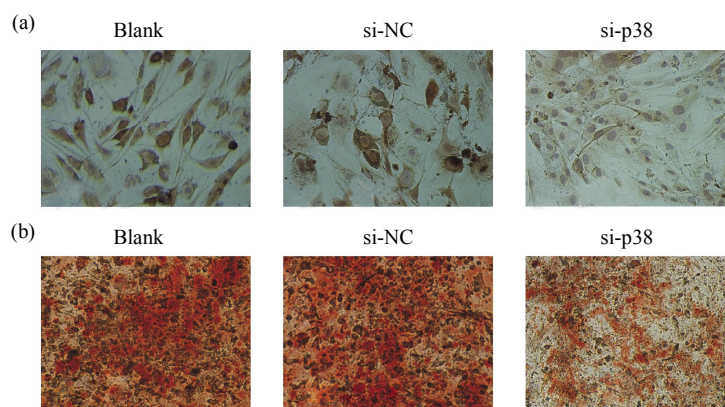


Fig. 5 Gene silence of p38 decreased BMP9-induced OPN expression and calcium deposition of C3H10T1/2 cells

(a) Gene silence of p38 inhibited BMP9-induced OPN expression of C3H10T1/2 cells determined by immunocytochemistry assay, $\times 100$. (b) Gene silence of p38 blocked BMP9-induced calcium deposition of C3H10T1/2 cells determined by Alizarin Red S staining assay, $\times 100$.

2.6 p38 基因沉默可抑制由 BMP9 诱导的裸鼠皮下异位

为证实 p38 基因沉默在体内是否同样可以抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞异位骨形成, 分别将 p38 干扰腺病毒(或 si-NC 腺病毒)和 BMP9 腺病毒共感染 C3H10T1/2 细胞(图 6a), 并将细胞接种至裸鼠皮下。5 周后取皮下包块观察, 发现两组之间的皮下包块大小没有明显差异(图 6b)。

皮下包块经过石蜡包埋、切片, 进行 H&E、Masson Trichome 和 Alcian Blue 染色。与对照组 si-NC 相比, H&E 染色显示 si-p38 成熟的骨基质

(bone matrix, BM)生成量减少, 而且有较多的未分化细胞和软骨细胞存在(图 6c); Masson Trichome 染色显示, si-p38 组有较多的类骨质(即不成熟的骨基质, 染为蓝色), 而成熟的骨基质(染为红色偏少), 其骨的成熟度偏低(图 6b); Alcian Blue 染色也发现有较多的软骨基质成分(chondroid matrix, CM, 染为蓝色)。

因此, 皮下包块组织化学染色提示: p38 基因沉默可抑制 BMP9 所诱导的 C3H10T1/2 细胞的异位成骨, 使得骨生成的数量、质量和成熟度均减少。

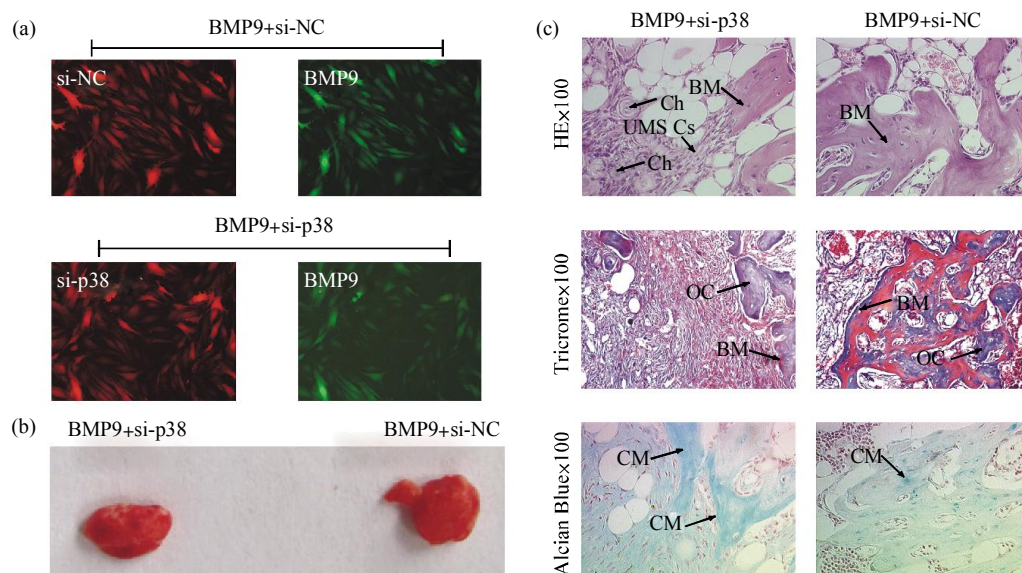


Fig. 6 Inhibition of BMP9-induced ectopic bone formation by gene silence of p38

(a) Co-infection efficiency of Ad-BMP-9 and AdR-si-p38 (or AdR-si-NC) to C3H10T1/2 cells under a fluorescence microscope. (b) Gross image of Retrieved samples. (c) H&E staining, Trichrome staining and Alcian Blue staining of Retrieved samples. BM: Bone Matrix; OC: Osteoid or cartilage like matrix; Ch: Chondrocyte; UMScs: Undifferentiated mesenchymal stem cells; CM: Chondroid Matrix, $\times 100$.

3 讨 论

BMP9 是一种强效的诱导骨形成的细胞因子, 但对于其诱导成骨的分子机制还缺乏详细了解。BMP9 首先与其相关的 TGF- β I 型和 II 型受体结合, 才能继而激发下游信号转导, 发挥诱导成骨等功能。目前研究证实 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化相关的 TGF- β I 型受体是 ALK1 和 ALK2^[22], 而与 BMP9 诱导成骨相关的 TGF- β II 型受体为 BMPRII、ActRII 和 ActRIIB^[23]。我们在本研究中证实, BMP9 可以活化 Smad1/5/8, 从而激活 Smad

途径(图 1c), 这与相关报道结果相一致^[14, 22-23]。由此表明, BMP9 与其相关受体结合后, 可以通过经典 Smad 途径传递信号和发挥功能。

大量的研究还表明, 除经典 Smad 信号途径外, BMP9 还可通过其他多种信号途径调控间充质干细胞成骨分化。在核受体 PPAR γ 基因沉默或基因敲除后, 可导致 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化明显减弱, 表明 BMP9 可通过核受体途径调控间充质干细胞成骨分化^[24]。而经典的 Wnt/ β -catenin 信号也被证实在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化过程中发挥了重要作用^[25]。这些研究结果提示我们: 除了经典的 Smad 信号途径之

外, BMP9 还可以通过其他多种非 Smad 的信号途径发挥作用, 这些信号途径与 Smad 信号途径相互补充, 互有联系, 形成 BMP9 诱导和调控间充质干细胞成骨分化的信号转导网络.

MAPK 是真核细胞将胞外信号转导至胞内引起细胞反应的一类重要信号系统. 它通过一系列激酶的磷酸化级联反应, 在细胞核内影响基因的转录和调控, 参与调节细胞增殖、分化、转化、凋亡等一系列基本生命活动. MAPK 信号途径根据最终执行功能的激酶的亚类不同, 又至少包括 ERK1/2、JNK、p38 和 ERK5 4 种途径. 研究证实: 成骨前体细胞可自分泌 BMP2、4、7 而促进自身成骨分化指标骨钙素(osteocalcin, OCN)和骨唾液蛋白(bone sialoprotein, BSP)的表达, 但在使用 ERK 抑制剂后, OCN 和 BSP 表达受抑制^[26]; 在 BMP4 定向诱导成骨样细胞成骨分化过程中, MAPK 中的 ERK2 激酶呈激活状态, 采用 RNA 干扰技术抑制 ERK2 后, 导致 OCN 和 ALP 表达下降^[19]; BMP2 可以通过激活 p38 和 JNK 而增加间充质干细胞中调控成骨的关键转录因子 Osx 的表达^[27]; 最近的研究还表明, BMP2 可激活 MAPK 上游激酶 M-Ras, 随后经 p38 和 JNK 促进间充质干细胞 C3H10T1/2、肌源性干细胞 C2C12 和成骨前体细胞的成骨分化^[17]. 由此可见, 多种 BMPs 均可以激活 MAPK 途径, 而且该途径的激活对于 BMPs 发挥诱导成骨分化功能也极为重要.

那么, 作为成骨性 BMPs 中的重要一员, BMP9 是否也如 BMP2, BMP4, BMP7 等一样, 可以通过激活 MAPK 信号途径而调控成骨分化过程, 目前未见相关的报道. 我们利用 BMP9 刺激 C3H10T1/2 细胞后, Western blot 检测发现, BMP9 能增加 p38 激酶的磷酸化水平而导致 p38 激酶途径活化(图 1c), 并由此推测 BMP9 可能通过活化 p38 激酶途径而调控间充质干细胞成骨分化. 为证实此推测, 首先选用了 p38 激酶的特异性抑制剂 SB203580 处理 C3H10T1/2 细胞, 结果发现, 经 SB203580 处理后, 由 BMP9 所诱导的 C3H10T1/2 细胞的早期和晚期成骨分化均受到明显的抑制, 而且, 抑制剂 SB203580 抑制 p38 激酶活性后, 由 BMP9 诱导的 Smad 经典途径的激活也相应受到抑制, 表现为 Smad6 和 Smad7 的表达受到抑制、由 Smad 途径激活所诱导的荧光素酶活性减弱、以及 Smad1/5/8 磷酸化水平下降. 这提示我们 BMP9 可通过活化 p38 激酶从而调控间充质干细胞

C3H10T1/2 成骨分化, 而且其调控机制可能部分与影响 Smad 经典途径有关. 随后, 利用 RNAi 技术抑制 p38 激酶的表达后, 也发现 p38 激酶基因沉默后, 由 BMP9 所诱导 C3H10T1/2 细胞的 ALP 活性、OPN 表达、钙盐沉积均受到抑制, 与使用抑制剂所得到的结果相一致.

在接下来的裸鼠皮下异位成骨实验中发现: 干扰 p38 表达可抑制 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞在裸鼠皮下异位成骨, 使得骨基质生成量减少, 从而导致成骨量偏少. 同时, 干扰 p38 导致有较多的未分化的间充质干细胞存在, 表明间充质干细胞的成骨分化受到抑制, 干扰 p38 还导致存在较多的软骨细胞和软骨基质, 骨成熟度明显偏低. 由于骨形成包括膜内成骨和软骨内成骨两种方式^[28], 因此, 很可能是 BMP9 可以活化 p38 激酶, 继而通过软骨内成骨而促进骨形成, 在此过程中, 由于干扰了 p38 激酶, 使得 BMP9 所致的软骨内成骨过程趋势减慢, 软骨的骨化趋缓, 导致软骨成分增多, 骨成熟度相应降低.

BMP9 诱导成骨分化的信号转导途径是极其复杂的, 存在多种信号途径的联系和相互调控. 本研究初步证明了 BMP9 可以通过活化 MAPK 的亚型之一, p38 激酶, 诱导和调控间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化. 已有报道表明, BMPs 家族中的 BMP2 可以同时活化 Smad1 和 p38 激酶, 抑制 p38 激酶的活性可以导致 Smad1 的活化减弱^[16], 而在 Smad 中也确实存在 MAPK(包括 p38、JNK 等)的磷酸化位点^[29]. 我们的研究结果则显示, BMP9 通过 p38 激酶途径调控间充质干细胞成骨分化的调控机制也很可能与影响 Smad 经典途径有关. 因此, 深入揭示 p38 对于经典 Smad 途径的影响, 将有可能进一步完善 BMP9 通过 p38 激酶调控间充质干细胞成骨分化的机制.

在接下来的研究中, 将构建 p38 激酶的显性负性突变体(dominant negative mutant)和组成激活型突变体(constitutive activation mutant), 并利用这些突变体分别抑制和激活 p38 激酶途径, 进一步分析其对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化的影响. 同时, 将分析在抑制和激活 p38 激酶途径后, Smad 经典途径的变化以及成骨相关的关键调控基因 Runx2、Osx、Sox9 等的表达和活化(磷酸化)情况, 从而深入分析 p38 激酶途径参与 BMP9 诱导成骨分化的分子机制.

由于 MAPK 途径至少包括 ERK1/2、JNK、p38

和 ERK5 4 种途径, 因此, 我们在研究工作中也同时对于其他 3 条途径 ERK1/2、JNK 和 ERK5 进行了初步分析, 结果发现, BMP9 还可以促进 ERK1/2 的磷酸化. 尤其值得注意的是, 使用 ERK1/2 抑制剂 PD98059 抑制 ERK1/2 活性后, 由 BMP9 诱导的细胞成骨分化明显增强(数据未显示, 另文发表), 这与使用 p38 抑制剂所出现的抑制成骨分化的效应是相反的. 因此, 我们认为, BMP9 应该至少可活化 MAPK 途径中的激酶 p38 和 ERK1/2, 而且 p38 和 ERK1/2 活化后对于细胞成骨分化的调控效应是不同的(很可能是相反或相互平衡的效应), 因此, 对于 BMP9 通过 MAPK 途径调控间充质干细胞成骨分化的效应和机制值得深入分析和研究. 总之, BMP9 通过 MAPK 途径、Smad 途径等形成了一个调控间充质干细胞成骨分化的信号网络, 对于该信号网络下各种相关信号途径的分析, 将有助于全面解析 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的分子机制.

参 考 文 献

- [1] Stappenbeck T S, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science*, 2009, **324** (5935): 1666-1669
- [2] Myers T J, Granero-Molto F, Longobardi L, *et al.* Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, **10**(12): 1663-1679
- [3] Wu Y, Zhao R C, Tredget E E. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem Cells*, 2010, **28**(5): 905-915
- [4] Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol*, 2009, **218**(2): 237-245
- [5] Deschaseaux F, Pontikoglou C, Sensébé L. Bone regeneration: the stem/progenitor cells point of view. *J Cell Mol Med*, 2010, **14**(1-2): 103-115
- [6] McKay W F, Peckham S M, Badura J M. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop*, 2007, **31**(6): 729-734
- [7] Acil Y, Springer I N, Broek V, *et al.* Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. *J Cell Biochem*, 2002, **86**(1): 90-98
- [8] Luu H H, Song W X, Luo X, *et al.* Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 2007, **25**(5): 665-677
- [9] Miller A F, Harvey S A, Thies R S, *et al.* Bone morphogenetic protein-9, an autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem*, 2000, **275**(24): 17937-17945
- [10] Chen C, Grzegorzewski K J, Barash S, *et al.* An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(3): 294-301
- [11] Truksa J, Peng H, Lee P, *et al.* Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(27): 10289-10291
- [12] López-Coviella I, Berse B, Krauss R, *et al.* Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP9. *Science*, 2000, **289**(5477): 313-316
- [13] Kang Q, Sun M H, Cheng H, *et al.* Characterization of the distinct orthotopic bone forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther*, 2004, **11** (17): 1312-1320
- [14] 张 燕, 文 巍, 罗进勇. 骨形态发生蛋白 9 定向诱导多潜能干细胞成骨分化. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(10): 12911-12298
Zhang Y, Wen W, Luo J Y. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(10): 12911-12298
- [15] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, **75**(1): 50-83
- [16] Nöth U, Tuli R, Seghatoleslami R, *et al.* Activation of p38 and Smads mediates BMP-2 effects on human trabecular bone-derived osteoblasts. *Exp Cell Res*, 2003, **291**(1): 201-211
- [17] Watanabe-Takano H, Takano K, Keduka E, *et al.* M-Ras is activated by bone morphogenetic protein-2 and participates in osteoblastic determination, differentiation, and transdifferentiation. *Exp Cell Res*, 2010, **316**(3): 477-490
- [18] Phimpililai M, Zhao Z, Boules H, *et al.* BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res*, 2006, **21**(4): 637-646
- [19] Chang S F, Chang T K, Peng H H, *et al.* BMP-4 induction of arrest and differentiation of osteoblast-like cells via p21CIP1 and p27KIP1 regulation. *Mol Endocrinol*, 2009, **23**(11): 1827-1838
- [20] Chen D, Zhao M, Mundy G R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 2004, **22**(4): 233-241
- [21] David L, Mallet C, Mazerbourg S, *et al.* Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 2007, **109** (5): 1953-1961
- [22] Luo J, Tang M, Huang J, *et al.* TGF β /BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*, 2010, **285**(38): 29588-29598
- [23] Wu N, Zhao Y, Yin Y, *et al.* Identification and analysis of type II TGF- β receptors in BMP-9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2010, **42**(10): 699-708
- [24] Kang Q, Song W X, Luo Q, *et al.* A Comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 2009, **18**(4): 545-558
- [25] Tang N, Song W X, Luo J, *et al.* BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional

- canonical Wnt/ β -catenin signaling. *J Cell Mol Med*, 2009, **13**(8B): 2448–2464
- [26] Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, *et al.* Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 2002, **17**(1): 101–110
- [27] Celil A B, Campbell P G. BMP-2 and insulin-like growth Factor-I mediate osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells *via* the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem*, 2005, **280**(36): 31353–31359
- [28] 高英茂, 徐昌芬, 王亚平, 等. 组织学与胚胎学. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 52–56
- Gao Y M, Xu C F, Wang Y P, *et al.* *Histology and Embryology*. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 52–56
- [29] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature*, 2003, **425** (6958): 577–584

Bone Morphogenetic Protein 9 Regulate Osteogenic Differentiation of C3H10T1/2 Mesenchymal Stem Cells Through p38 Kinase Pathway*

ZHAO Dan^{1,2)}, WANG Jian¹⁾, LUO Jin-Yong¹⁾, LIU Yue-Liang¹⁾,
WANG Hong¹⁾, ZENG Zhao-Fang¹⁾, YUAN Jun^{1,3)**}

⁽¹⁾ Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

⁽²⁾ Student Affair Office, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

⁽³⁾ Scientific Research Office, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract In the previous reports, bone morphogenetic protein 9 (BMP9) has shown potent function to induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, however, the underlying molecular mechanism of osteogenesis induced by BMP9 is needed to be deep explored. BMP9 was introduced into C3H10T1/2 mesenchymal stem cells by recombinant adenoviruses protocol, then, *in vitro* and *in vivo* assays were conducted to evidence whether BMP9 can induce osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells through p38 kinase pathway. The results showed that BMP9 can activate p38 kinase through increasing the phosphorylated form of p38 kinase. P38 kinase inhibitor SB203580 can inhibit the ALP activity, OPN expression and calcium deposition of C3H10T1/2 cells induced by BMP9. Furthermore, SB203580 also led to inhibition of canonical Smad pathway activated by BMP9. Moreover, when p38 kinase was silenced by RNA interference in C3H10T1/2 cells, BMP9-induced ALP activity, OPN expression, calcium deposition and *in vivo* ectopic bone formation were accordingly inhibited along with knockdown of p38 kinase. Taken together, those results intensively suggested that BMP9 can induce and regulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through activating p38 kinase pathway.

Key words bone morphogenetic protein 9, p38, mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, mitogen activated protein kinase

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00200

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30800658, 31071304), Natural Science Foundation Project of Chongqing Science and Technology Commission (2009BB5060).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-68485239, E-mail: Yj6848@yahoo.com.cn

Received: May 12, 2011 Accepted: July 12, 2011