

中胚叶叉头-1 在骨成形蛋白-2 诱导肌胚细胞 C2C12 转化成骨细胞过程中的作用

付 艳^{1)*} 邓伟国²⁾ 杨晓丽³⁾

(¹⁾ 吉林大学第一医院妇产科, 长春 130021; (²⁾ 吉林大学公共卫生学院营养与食品卫生教研室, 长春 130021;

(³⁾ 吉林大学基础医学院生物化学教研室, 长春 130021)

摘要 为了研究中胚叶叉头-1 (MFH-1) 基因在骨骼形成和细胞分化中的作用, 利用基因重组、杂交瘤技术制作 MFH-1 单克隆抗体, 利用蛋白质印迹和 RNA 印迹分析观察了骨成形蛋白-2 (BMP-2) 诱导小鼠肌胚细胞 C2C12 表达 MFH-1、产生碱性磷酸酶和骨钙蛋白。小鼠肌胚细胞 C2C12 低水平地表达内源性 MFH-1 蛋白以及导入小鼠 MFH-1 cDNA 的人膀胱癌细胞 HTB9 也表达小鼠 MFH-1 蛋白, 这种蛋白质定位于细胞核中。用 BMP-2 处理后, MFH-1 蛋白和 mRNA 在 C2C12 细胞中的表达显著地增加。用反义 MFH-1 序列转染小鼠肌胚细胞 C2C12 可降低内源性 MFH-1 水平, BMP-2 不能诱导导入反义 MFH-1 序列的肌胚细胞 C2C12 产生 MFH-1 蛋白, 也不能诱导碱性磷酸酶 (ALP) 活性和骨钙蛋白量的增加。结果表明, BMP-2 诱导的 MFH-1 蛋白在调节肌胚细胞 C2C12 向成骨细胞分化方面起关键作用。

关键词 中胚叶叉头-1, 骨成形蛋白-2, 成骨细胞, 肌胚细胞

学科分类号 Q786, Q813.11

骨成形蛋白-2 (bone morphogenic protein-2, BMP-2) 能使多潜能中胚叶原始细胞分化为成骨细胞或软骨细胞^[1~6], 产生碱性磷酸酶 (ALP) 和骨钙蛋白。向肌胚细胞 C2C12 的培养基中加入 BMP-2, 可促使肌胚细胞 C2C12 转化为成骨细胞系, 成为体外研究骨形成分子机制的一个实用的模型^[7]。

中胚叶叉头-1 (mesenchyme forkhead-1, MFH-1) 蛋白是翼状螺旋/叉头转录因子家族中的一员。其分子质量约 62 ku^[8]。MFH-1 蛋白在发育中的小鼠软骨组织、肾脏和主动脉弓表达^[9~11]。缺乏 MFH-1 基因的小鼠表现出轴向骨骼和主动脉发育缺陷^[10, 12, 13], 但其作用机制尚不清楚。本文探讨了 MFH-1 蛋白在体外骨形成过程中的作用, 发现 MFH-1 对 BMP-2 的应答促进肌胚细胞 C2C12 向成骨细胞分化。

1 材料与方法

1.1 质粒的组建

反复筛选从交配 10.5 d 的小鼠 poly (A)⁺ RNA 制得的, 含全长小鼠 MFH-1 cDNA 序列的 pMS-1 克隆 (日本滨松医科大学生化学第二讲座三浦直行教授惠赠, EMBL/GenBank 数据库专利号 X74040), 按文献 [8] 的方法组建 CX-MFH-1 质粒。然后将 CX-MFH-1 质粒的 *EcoR* I 片段导入 pCX-N2 载体的 *EcoR* I 位点筛选组建反义 CX-

MFH-1 质粒 (AS)。

1.2 抗小鼠 MFH-1 单克隆抗体的制备

将小鼠 MFH-1 cDNA 的 *Nat* I / *EcoR* I 片段^[9]用 *EcoR* I 接头插入并连接到 *EcoR* I 切割的 PGEX-2T 质粒中, 制成 GST-MFH-1 质粒。用常规方法将 GST-MFH-1 质粒转染到 *Escherichia coli* LE 392 大肠杆菌中, 用 0.5 mmol/L 异丙基 β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷促进 GST-MFH-1 蛋白的表达。收集, 裂解细菌后, 于 Glutathione-Sepharose 4B 凝胶中层析, 分离纯化 GST-MFH-1 蛋白。用纯化的 GST-MFH-1 蛋白免疫 Wistar 大鼠 3 周, 采集血清。经对转导了 CX-MFH-1 基因的小鼠 L 细胞免疫荧光染色确定该大鼠体内产生抗 MFH-1 抗体后, 加强免疫一次。将该大鼠脾淋巴细胞与小鼠 P3U1 骨髓瘤细胞融合, 筛选分泌抗 MFH-1 抗体的细胞株进行克隆扩增。将克隆的分泌抗 MFH-1 抗体的细胞注入用姥鲛烷处理的裸鼠腹腔以获得腹水, 经 Protein A-Sepharose 4B 层析纯化抗小鼠 MFH-1 单克隆抗体。

1.3 细胞转染与培养

用磷酸钙沉淀法将 20 μ g CX-MFH-1 质粒和

* 通讯联系人。

Tel: 0431-5612482, E-mail: fyanguo@hotmail.com

收稿日期: 2001-07-09, 接受日期: 2001-08-30

CX-N2 空质粒, 转染培养在 PRMI1460 培养基中的人膀胱癌细胞 HTB9. 用同样方法将 20 μg 反义 CX-MFH-1 质粒 (AS) 和 CX-N2 对照空载体, 转染培养在 DMEM 培养基中的小鼠肌胚细胞 C2C12 (Riken cell bank; Tsukuba, Japan), 2 d 后, 用含有 400 mg/L G418 的 DMEM 培养基替换原培养基, 共 3 周, 建成 2 株反义细胞系 (AS 1, AS 2) 和两个对照细胞系 (C 1, C 2). 为了观察 BMP-2 和转移生长因子 (TGF- β) 在小鼠肌胚细胞 C2C12 分化过程中的作用, 把小鼠肌胚细胞 C2C12 接种到 12 孔培养板中, 密度为 2×10^4 个/ cm^2 . 24 h 后, 更换含 300 μg /L BMP-2 或 10 μg /L TGF- β 的 DMEM 培养基, 继续培养 0.5, 1, 2, 3 和 6 d.

1.4 蛋白质印迹分析

将收集的细胞用 PRPA 裂解缓冲液 (50 mmol/L 三羟甲基胺基甲烷-盐酸, pH 6.8, 0.1% 十二烷基磺酸钠, 150 mmol/L 氯化钠, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 1 mmol/L 二硫苏糖醇和 2 mmol/L 苯甲基磺酰氟) 裂解. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离裂解物, 转移到固相聚二氯乙烯膜上, 抗小鼠 MFH-1 单克隆抗体 (抗体效价 1:1000) 免疫印迹, 连接辣根过氧化物酶的猪抗大鼠 IgG 抗体和 ELC 试剂盒 (Amersham, Buckinghamshire, UK) 显影.

1.5 RNA 印迹分析

把从细胞中提纯的总 RNA 12 μg 置于 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 并印迹到 GeneScreen plus

hybridization transfer membrane (NEN Life Science, USA). 用 [^{32}P] -dCTP 标记的 1.1 kb 小鼠 MFH-1 cDNA 的 *Nat* I / *Eco*RI 片段作为探针进行杂交, 42 $^{\circ}\text{C}$ 过夜. 放射自显影记录杂交带.

1.6 骨钙蛋白的产量和 ALP 活性鉴定

使用小鼠骨钙蛋白试剂盒 (Biomedical Technologies Inc. USA) 测定骨钙蛋白和按 Katagiri 法^[7]测定 ALP 活性, 活性单位为 nmol 硝基苯酚每分钟每毫克蛋白质.

2 结 果

2.1 CX-MFH-1 在细胞表达和 MFH-1 抗体特异性

将 CX-MFH-1 质粒和 CX-N2 空质粒转染人膀胱癌细胞 HTB9 2 d 后, 经用抗小鼠 MFH-1 单克隆抗体 (抗体效价 1:1000) 进行蛋白质印迹分析. 肌胚细胞 C2C12 和转化 CX-MFH-1 基因的 HTB9 细胞中可检测到相对分子质量为 62×10^3 的带 (图 1a、2、3). 而转染 CX-N2 空质粒的 HTB9 细胞无免疫沉降带被检出 (图 1a、1). 免疫荧光染色显示 (方法见图 1 的图注) (抗小鼠 MFH-1 单克隆抗体效价 1:2500), 转染 CX-N2 空质粒的 L 细胞胞质和核内均未见 MFH-1 蛋白的表达 (图 1b), 但 MFH-1 蛋白在被转染的 HTB9 细胞核中过表达 (图 1c). 在肌胚细胞 C2C12 的核中可检测到内源性 MFH-1 蛋白 (图 1d). 这些结果表明抗小鼠 MFH-1 单克隆抗体特异性地识别小鼠 MFH-1 蛋白.

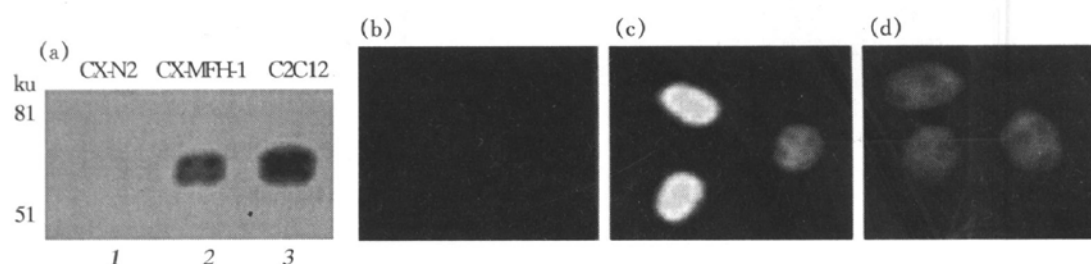


Fig. 1 Western blot analysis of MFH-1 protein in C2C12 cells and HTB9 cells transfecting CX-MFH-1 plasmid by anti-mouse MFH-1 monoclonal antibody

A band with 62 ku was detected in HTB9 cells transfecting CX-MFH-1. MFH-1 protein was constitutively expressed in C2C12 cells (a). L cells transfected with CX-N2 (b), CX-MFH-1 (c) and C2C12 cells (d) were immunostained with anti-mouse MFH-1 monoclonal antibody followed by FITC-conjugated anti-rat IgG. Overexpressed MFH-1 protein (c) and endogenous MFH-1 protein (d) were present in the nucleus of the cells. The magnification is 490.

2.2 BMP-2 诱导 C2C12 细胞表达 MFH-1 蛋白

用含有 BMP-2 的培养基孵育后, MFH-1 蛋白在 C2C12 细胞中表达的经时过程表明: 在缺乏 BMP-2 时, 重铺板的 C2C12 细胞在第 12 小时和第

24 小时表达 MFH-1 蛋白, 从第 2 天开始, MFH-1 蛋白的表达量逐渐降低 (图 2-2、4、6、8 和 10). 然而, 用 BMP-2 处理的 C2C12 细胞从 12 h 开始至第 6 天持续高水平地表达 MFH-1 蛋白 (图

2-1、3、5、7和9)。相反,培养在含TGF- β 的培养基中的C2C12细胞,仅能在第12小时到第2天内短暂地检测到MFH-1蛋白(图像未显示)。

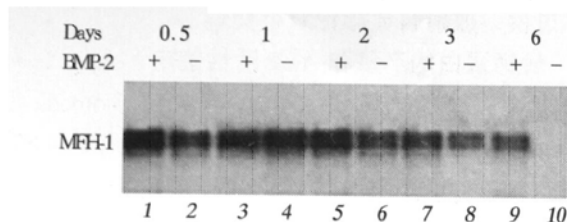


Fig. 2 Effects of BMP-2 on MFH-1 protein expression in C2C12 cells

C2C12 cells were incubated in DMEM containing 5% FCS in the present (lanes 1, 3, 5, 7 and 9) or absence (lanes 2, 4, 6, 8 and 10) of BMP-2 (300 µg/L). After solubilizing these cells, MFH-1 protein was determined by Western blot (50 µg/lane).

2.3 BMP-2 诱导 C2C12 细胞表达 MFH-1 mRNA

C2C12 细胞用含有低剂量促细胞分裂素及 300 µg/L BMP-2 或无 BMP-2 的培养基中培养 2 d 后,用 RNA 印迹分析 C2C12 细胞中总 RNA。结果表明:在缺乏 BMP-2 时,C2C12 细胞仅有微量的 3.0 kb 的 MFH-1 mRNA 被检出(图 3a2);用

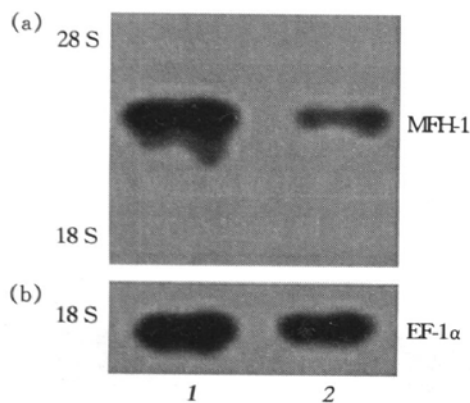


Fig. 3 Northern blot analysis of total RNA from C2C12 cell

Northern blot analysis of total RNA from C2C12 cells cultured in DMEM in the presence (lane 1) or absence (lane 2) of 300 µg/L of BMP-2 (a). 32 P-labeled mouse MFH-1 cDNA was used for probe. The same blot was reprobed with elongation factor-1 (EF-1 α) cDNA to assess the quantity of total RNA in cells (b).

BMP-2 处理的 C2C12 细胞则显示出强烈的 MFH-1 mRNA 的表达(图 3a1)。用延长因子-1 α (elongation factor-1 α , EF-1 α) mRNA 作为内参照 RNA 的 RNA 印迹分析表明 BMP-2 组和无 BMP-2 组细胞总 mRNA 的量相当(图 3b1, 2)。

2.4 反义 MFH-1 抑制 MFH-1 蛋白质表达

两株转染反义 MFH-1 表达结构 CX-MFH-1 的 C2C12 细胞 (AS1 和 AS2) 中内源性 MFH-1 蛋白显著地降低,而转染空质粒 CX-N2 的 C2C12 细胞 (C1, C2) 表达 MFH-1 蛋白的量与其亲代细胞相似(图像未显示)。当给予这些细胞 BMP-2 后,AS1 和 AS2 细胞中 MFH-1 蛋白的表达(图 4-8, 10)明显地低于 C1, C2 和亲代 C2C12 细胞(图 4-4, 6 和 2)。这些结果提示,反义 MFH-1 基因能够抑制 BMP-2 诱导的 MFH-1 蛋白的表达。

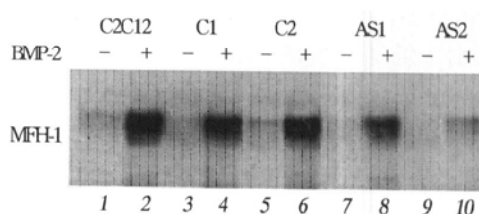


Fig. 4 Antisense MFH-1 inhibited the BMP-2-induced expression of MFH-1 protein

C2C12 cells, C2C12 cell lines transfecting CX-N2 (C1, C2) and cell lines transfecting antisense CX-MFH-1 (AS1, AS2) were cultured in DMEM in absence (lanes 1, 3, 5, 7 and 9) and presence (lanes 2, 4, 6, 8 and 10) of 300 µg/L of BMP-2 for 2 days. MFH-1 protein were determined by Western blot analysis (50 µg/lane).

另外,我们检查了转染反义 CX-MFH-1 质粒和 CX-N2 空质粒的 C2C12 细胞,在 BMP-2 诱导后 ALP 活性和骨钙蛋白的产量(成骨细胞的标志酶)。结果表明,用 BMP-2 处理 1, 3 和 6 d 后,转染 CX-N2 空质粒的 C2C12 细胞 (C1, C2) 细胞系 ALP 活性和骨钙蛋白产量均显著地增加 ($P < 0.01$);相反,转染反义 CX-MFH-1 质粒 AS1 和 AS2 细胞系 ALP 活性仅维持较低的水平,骨钙蛋白也没有明显的增加(表 1)。

Table 1 Antisense MFH-1 inhibited BMP-2-induced ALP activity and osteocalcin production in myoblasts C2C12

	<i>n</i>	ALP activity/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹			ρ (Osteocalcin)/µg·L ⁻¹		
		1 d	3 d	6 d	1 d	3 d	6 d
C1	12	31.3 ± 11.2	109.5 ± 18.7 ^{1), 2)}	499.1 ± 87.6 ^{1), 2)}	10.3 ± 2.4	240.5 ± 39.6 ^{1), 2)}	456.7 ± 98.3 ^{1), 2)}
C2	12	45.8 ± 14.4	100.1 ± 20.2 ^{1), 2)}	511.6 ± 62.9 ^{1), 2)}	15.4 ± 5.9	181.2 ± 48.9 ^{1), 2)}	425.8 ± 100.9 ^{1), 2)}
AS 1	12	23.4 ± 13.7	28.7 ± 13.6	110.9 ± 21.3	8.9 ± 2.7	12.4 ± 3.8	20.2 ± 44.6
AS 2	12	22.1 ± 12.2	25.5 ± 15.2	76.6 ± 13.5	9.1 ± 3.9	12.1 ± 4.1	19.8 ± 5.9

¹⁾ $P < 0.01$, vs group AS 1. ²⁾ $P < 0.01$, vs group AS 2.

3 讨 论

本研究结果显示,在肌胚细胞 C2C12 分化为成骨细胞过程中 BMP-2 诱导 MFH-1 持续地增加,进而用反义 MFH-1 序列转染 C2C12 抑制了该细胞表达 MFH-1; BMP-2 不能诱导反义 MFH-1 序列转染的 C2C12 细胞 ALP 活性增加和骨钙蛋白的分泌。这些结果表明 MFH-1 蛋白对 BMP-2 的应答在肌胚细胞 C2C12 分化为成骨细胞过程中起重要作用。

MFH-1 基因表达在胚胎发育中小鼠的脊柱、软骨、肾脏、主动脉弓以及中胚叶原始细胞如 C2C12^[9~11]。我们曾发现 MFH-1 基因也表达在人的骨、软骨、血管和成肾细胞系,表明这些体外培养细胞系中的 MFH-1 基因表达与在小鼠胚胎中的表达过程相似。小鼠缺乏 MFH-1 表现出颅面骨、脊柱和主动脉弓形成缺陷^[10, 12, 13],意味着 MFH-1 在颅面骨、轴向骨骼和主动脉弓的发育过程中起关键作用。

BMP-2 不仅能诱导成骨细胞和多潜能中胚叶原始细胞分化为成骨,而且还能改变肌胚细胞 C2C12 的分化途径成为成骨细胞^[7]。肌胚细胞 C2C12 能短暂地低量表达 MFH-1,但在 BMP-2 的促进下可持续地高水平表达 MFH-1 (图 2) 及 ALP 活性和骨钙蛋白量的增加。相反,用 TGF- β 处理的 C2C12 细胞仅在 12~24 h 内出现了 MFH-1 蛋白的增加,但无 ALP 活性的增加和骨钙蛋白的产生^[7, 8]。这些结果表明 BMP-2 对 C2C12 细胞的作用途径不同于 TGF- β ; BMP-2 信号系统作用于 C2C12 细胞的 MFH-1,并促使 C2C12 细胞向成骨细胞分化,但也不能排除 TGF- β 对 MFH-1 的作用有利于向其他细胞分化。

我们还不能直接证明 MFH-1 与 C2C12 细胞分化为肌肉组织有关。有报道称,当在含有低浓度的促细胞分裂素细胞培养基中培养 C2C12 细胞,2 d 后开始出现肌管蛋白,直到第 6 天浓度逐渐增加^[7]。在同样的条件下,本实验的结果显示培养到第 2 天时 MFH-1 的表达就已明显降低,到第 6 天时仅见到痕量的 MFH-1 蛋白 (图 2)。这表明 MFH-1 可能抑制肌胚细胞分化为肌肉组织。

有关 BMP-2 诱导产生 MFH-1 的分子机制所知甚少。目前有关 C2C12 细胞中 BMP-2 信号传导途径的研究表明, BMP-2 是通过它在细胞膜上的受体行使多种生物功能的^[14]。这个信号传导途径使

细胞浆中的 Smad 1 和 Smad 5 蛋白磷酸化并与 Smad 4 蛋白结合形成复合物,随之转移定位于核中^[15]。Smad 蛋白与各种核转录因子的活性有关。MFH-1 基因可能位于 BMP-2/Smad 信号途径中的下游,受到 BMP-2 的控制。为了明确 MFH-1 调节向成骨细胞分化的分子机制,尚需进一步研究 MFH-1 调节的靶基因。

参 考 文 献

- 1 Wozney J M, Rosen V, Celeste A J, *et al.* Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 1988, **242** (4885): 1528~1534
- 2 Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro*. *J Cell Biol*, 1991, **113** (3): 681~687
- 3 Hay E, Hott M, Graulet A M, *et al.* Effects of bone morphogenetic protein 2 on human neonatal calvaria cell differentiation. *J Cell Biochem*, 1999, **72** (1): 81~93
- 4 Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, *et al.* The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T 1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **172** (1): 295~299
- 5 Thies R S, Bauduy M, Ashton B A, *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein 2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology*, 1992, **130** (3): 1318~1324
- 6 Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, *et al.* Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **220** (2): 366~371
- 7 Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, *et al.* Bone morphogenetic protein 2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 1994, **127** (6 pt 1): 1755~1766
- 8 Miura N, Iida K, Kakinuma H, *et al.* Isolation of the mouse (MFH-1) and human (FKHL 14) mesenchyme fork head-1 genes reveals conservation of their gene and protein structures. *Genomics*, 1997, **41** (3): 489~492
- 9 Miura N, Wanaka A, Tohyama M, *et al.* MFH-1, a new member of the fork head domain family, is expressed in developing mesenchyme. *FEBS Lett*, 1993, **326** (1~3): 171~176
- 10 Iida K, Koseki H, Kakinuma H, *et al.* Essential roles of the winged helix transcription factor MFH-1 in aortic arch patterning and skeletogenesis. *Development*, 1997, **124** (22): 4627~4638
- 11 Kaestner K H, Bleckman S C, Monaghan A P, *et al.* Clustered arrangement of winged helix genes *flklr-6* and *MFH-1*: possible implications for mesoderm development. *Development*, 1996, **122** (6): 1751~1758
- 12 Winner G E, Hargett L, Hogan B L M. The winged helix transcription factor MFH1 is required for proliferation and patterning of paraxial mesoderm in the mouse embryo. *Genes Dev*, 1997, **11** (7): 926~940
- 13 Furumoto T, Miura N, Akasaka T, *et al.* Notochord-dependent expression of MFH 1 and PAX 1 cooperates to maintain the proliferation of sclerotome cell during the vertebral column development. *Dev Biol*, 1999, **210** (1): 15~29

- 14 Nishimura R, Kato Y, Chen D, *et al.* Smad 5 and DPC 4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem*, 1998, **273** (4): 1872~ 1879
- 15 Yamamoto N, Akiyama S, Katagiri T, *et al.* Smad 1 and Smad 5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **238** (2): 574~ 580

The Effects of MFH-1 on BMP-2-induced Osteoblastic Differentiation of C2C12 Myoblasts

FU Yan^{1)*}, DENG Wei-Guo²⁾, YANG Xiao-Li³⁾

¹⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

²⁾ Department of Nutrition, School of Preventive Medicine, Jilin University, Changchun 130021, China;

³⁾ Department of Biochemistry, School of Preclinical Medicine, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract In order to investigate the possible role of mesenchyme forkhead-1 (MFH-1) in osteogenesis and osteoblast differentiation, the gene recombination and hybridization methods are used to produce anti-mouse MFH-1 monoclonal antibody. The expression of MFH-1 induced by bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in myoblasts C2C12 was examined by Western blot and Northern blot analysis. The alkaline phosphatase (ALP) activity and osteocalcin were used as the markers of the osteoblasts lineage, and also were measured. The results showed that the anti-mouse MFH-1 monoclonal antibody was able to identify specifically the mouse MFH-1 protein which was expressed in human bladder carcinoma HTB 9 cell transfected with CX-MFH-1 plasmid by Western blot analysis. The myoblasts C2C12 could express the endogenous MFH-1 protein in its nucleus. MFH-1 protein and MFH-1 mRNA both increased markedly in C2C12 cells after treatment with BMP-2; after lowering the endogenous MFH-1 level by stably transfecting C2C12 cells with antisense MFH-1 sequence, the alkaline phosphatase (ALP) activity and production of osteocalcin induced by BMP-2 were significantly lowered in antisense MFH-1 cell lines than in control cell lines. It can be concluded that the results suggest that the BMP-2-induced MFH-1 protein may play an essential role in regulating the osteoblastic differentiation of myoblasts C2C12.

Key words mesenchyme forkhead-1, bone morphogenetic protein-2, osteoblast, myoblasts C2C12

* Corresponding author. Tel: 86-431-5612482, E-mail: fyanguo@hotmail.com

Received: July 9, 2001 Accepted: August 30, 2001