

骨形态发生蛋白 9 定向诱导多潜能干细胞成骨分化*

张 燕 文 巍 罗进勇**

(重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

摘要 为确认和评价骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)定向诱导多潜能干细胞成骨分化的能力, 以鼠间充质干细胞 C3H10、小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)和骨髓基质细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)三种多潜能干细胞为目标细胞, 用重组腺病毒的方法将 BMP9 导入细胞, 通过荧光素酶报告基因实验、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)定量测定、钙盐沉积实验、real time PCR、动物实验和组织化学染色等方法, 观察 BMP9 对于多潜能干细胞成骨分化的定向诱导作用。结果提示, BMP9 能诱导 C3H10、MEFs 和 BMSC 细胞 ALP 的表达, 且具有剂量依赖性。BMP9 在体外能够促进 C3H10 细胞和 MEFs 细胞的钙盐沉积。经 BMP9 刺激后, C3H10 细胞成骨相关基因 ALP、Runx2、骨桥素(osteopontin, OPN)和骨钙素(osteocalcin, OC)的 mRNA 水平均增加。荧光素酶报告基因实验证实, BMP9 可以活化 Smad 和成骨关键基因 Runx2。动物实验和组织化学染色检查显示, BMP9 可以诱导 C3H10 细胞在裸鼠皮下异位成骨, 因此, BMP9 具有定向诱导多潜能干细胞成骨分化的能力。

关键词 骨形态发生蛋白 9, 多潜能干细胞, 信号转导, 分化, 转化生长因子

学科分类号 Q254

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00191

多潜能干细胞(multipotent stem cells)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可分化为成骨细胞、软骨细胞、肌细胞、肝细胞等多种细胞^[1,2]。间充质干细胞是多潜能干细胞的一种, 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, 在再生医学研究中具有潜在应用前景^[3~6], 目前, 骨再生研究中就常使用间充质干细胞作为种子细胞^[6,7]。但是, 间充质干细胞等多潜能干细胞具有多向分化潜能, 因此寻找促进多潜能干细胞定向成骨分化的细胞因子, 是目前骨再生研究的关键领域和热点, 同时也是薄弱环节, 成为制约其进一步发展的瓶颈。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)属于转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF β)超家族成员, 是一类多功能的生长因子, 也是最主要的骨形成调控因子之一, 能够促进骨形成。目前发现, 有 20 多种 BMPs 存在, 其中对于 BMP2 和 BMP7 促成骨能力研究较多^[8~10], 人们也曾把解决成骨缓慢的希望寄托在 BMP2 和 BMP7 身上。但近来的研究和一系列临床实践却证明: BMP2 和 BMP7 并不能彻底解决骨再生这一医

学难题^[11], 使用 BMP2 后脊柱假关节(不融合)发生率为 7.7%^[12], 使用 BMP7 则高达 40%~50%^[11], 因此, 寻找更强的诱导细胞成骨分化的因子成为目前共同关注的课题, 也是临床的迫切需要。

BMP9(也称 GDF-2, growth differentiation factor 2)是 BMPs 中的一种, 大量存在于肝脏^[13], 已知 BMP9 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^[14,15]。但在众多的 BMPs 中, BMP9 的成骨能力却是研究较少的, 本研究主要目的就是确认 BMP9 对于多潜能干细胞定向成骨分化的诱导作用。利用重组腺病毒技术将 BMP9 导入鼠间充质干细胞 C3H10、小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)和骨髓基质细

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

** 通讯联系人。

Tel: 023-68485239, E-mail: luojinyong@sina.com

收稿日期: 2009-03-31, 接受日期: 2009-07-14

胞 (bone marrow stromal cell, BMSC), 观察在 BMP9 的刺激下, 这几种多能干细胞是否可以实现在定向成骨分化, 并通过与经典的促成骨因子 BMP2 的比较, 探讨 BMP9 作为定向诱导细胞成骨分化细胞因子的可能性和潜在价值。

1 材料和方法

1.1 材料

荧光素酶报告质粒 p12SBE-Luc、p(6OSE)-Luc 由芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠; BMP9、BMP2、空载腺病毒 GFP 均由本实验室构建和制备; 鼠间充质干细胞株 C3H10 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC); MEFs 和 BMSC 由本实验室分离和保存。

实验中所用 RNA 提取试剂盒、real time PCR 试剂盒、dNTP、RNA 酶抑制剂和随机六聚引物购自 Takara 公司; M-MLV 逆转录酶、荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司; 碱性磷酸酶(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; 脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司; 高糖 DMEM 培养基、优质胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; 其他试剂均为进口分装或国产分析纯, real time PCR 引物由 Takara 公司合成。

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 C3H10、MEFs、BMSC 至 24 孔细胞培养板, 密度为 30%, 待细胞贴壁后, 分别加入适量的 BMP9、BMP2 和 GFP 腺病毒, 分别继续培养 5 天和 7 天后进行 ALP 染色和定量测定(操作严格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 钙盐沉积实验. 接种 C3H10、MEFs 细胞至 24 孔细胞培养板, 密度为 30%, 待细胞贴壁后, 向孔内分别加入适量的 BMP9、BMP2 和 GFP 腺病毒, 继续培养, C3H10 在培养 20 天后、MEFs 在培养 14 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 300 μ l, 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。

1.2.3 real time PCR 实验. C3H10 细胞接种至 T-25 细胞培养瓶, 密度为 30%, 分别加入适量的 BMP9 和 GFP 腺病毒, 继续培养 3、5、7、10 和 14 天后, 提取细胞 RNA, 经逆转录制备 cDNA, real time PCR 检测成骨相关基因 ALP、Runx2、OPN 和 OC 的表达, 用 GAPDH 基因作为内参照。ALP、Runx2、OPN 和 OC 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, 所用引物序列如表 1。

Table 1 The sequence of primers for real time PCR

Gene	Forward primer	Reversed primer
ALP	CCCCATGTGATGGCGTAT	CGGTAGGGAGAGCACAGC
Runx2	CCGGTCTCCTTCCAGGAT	GGGAAGTCTGTGGCTTC
OPN	CCTCCCGGTGAAAGTGAC	CTGTGGCGCAAGGAGATT
OC	CCAAGCAGGAGGGCAATA	TCGTCACAAGCAGGGTCA
GAPDH	GGCTGCCCAAGAACATCAT	CGGACACATTGGGGGTAG

1.2.4 荧光素酶报告基因实验. 接种 C3H10 至 T-25 细胞培养瓶, 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 或 p(6OSE)-Luc 质粒各 1 μ l, 转染后 4 h 换为完全 DMEM 培养基。继续培养 24 h 后, 再将细胞接种至 24 孔细胞培养板, 然后分别加入适量的 BMP9、BMP2(阳性对照)和 GFP 腺病毒(阴性对照), 继续培养 24 h 和 48 h 后按试剂盒说明书进行荧光素酶活性测定。

1.2.5 动物实验和组织化学染色. C3H10 细胞接种至 100 mm 细胞培养皿, 培养至细胞密度 60%左右, 分别加入适量的 BMP9 和 GFP 腺病毒, 使感染率为 40%, 待细胞生长至密度为 80%时, 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, 组织化学染色(H&E、Trichrome 和 Alcain blue 染色)观察包块内细胞的成骨分化情况, 成像并保存。

1.2.6 统计分析. 数据用($\bar{x} \pm s$)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 诱导多潜能干细胞 ALP 的表达

ALP 是细胞成骨分化的早期指标, 为了确认 BMP9 是否可以诱导 C3H10、MEFs 和 BMSC 细胞

ALP 的表达, 将实验设置为 3 组: BMP9 组、BMP2 组(阳性对照组)、GFP(空载腺病毒, 阴性对照组), 然后分别在感染 5 天和 7 天后染色和定量检测 ALP 活性, 结果显示, 与 BMP2 一样, BMP9 也可以刺激 C3H10、MEFs 和 BMSC 表达 ALP (图 1), 且在感染率相同(30%)的情况下, BMP9 诱导的 ALP 活性强于由 BMP2 所诱导的 ALP 活性 (图 1), 因此可以初步推测, 在 BMP9 的作用下, C3H10、MEFs 和 BMSC 发生了定向成骨分化而表现出 ALP 活性明显增加。

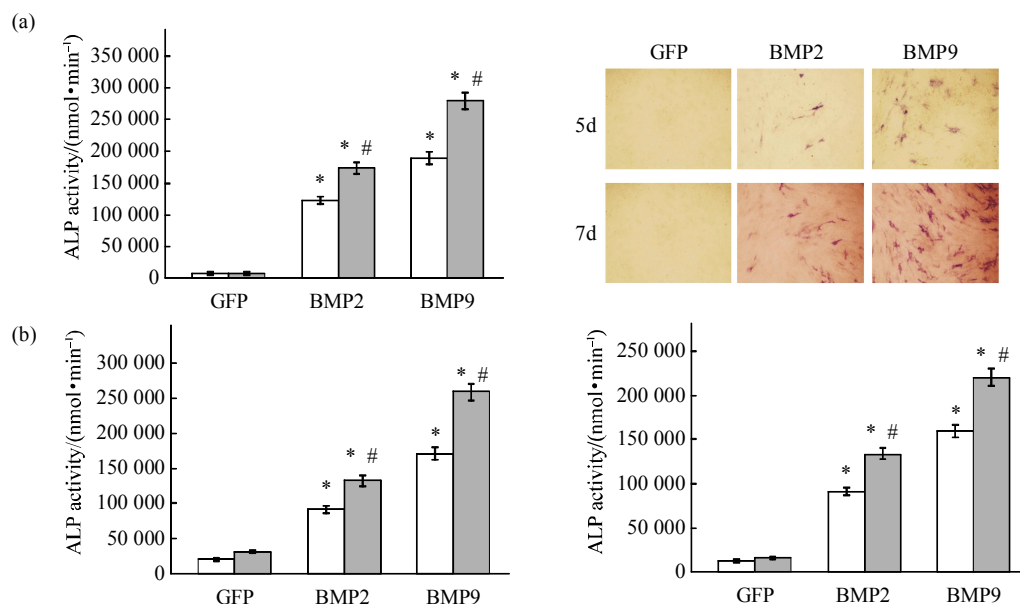


Fig. 1 BMP9 induced ALP activity in multipotent stem cells

C3H10 cells were infected with BMP9 or BMP2 or GFP virus. At 5 and 7 days after infection, cells were collected and subjected to ALP staining and quantitation. (a) BMP9 was shown to induce ALP activity of C3H10. (b) BMP9 promoted ALP activity of MEFs (left panel) and BMSC (right panel). Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments (* $P < 0.01$ vs GFP, # $P < 0.05$ vs BMP2). Magnification, 100. □: 5d; ■: 7d.

2.2 BMP9 诱导 C3H10 和 MEFs 细胞 ALP 的活性增加具有剂量依赖性

为了确认增加 BMP9 的刺激量, 细胞定向成骨分化的趋势是否增加, 选择 C3H10 和 MEFs, 分别给予不同剂量的 BMP9 腺病毒(高、中、低)刺激, 结果发现, BMP9 诱导 C3H10 和 MEFs 细胞 ALP 的活性增加具有剂量依赖性(图 2), 随着 BMP9 刺激的增加, 细胞 ALP 的活性出现增加的趋势, 这提示, 增加 BMP9 的刺激量, 可以更好地促进 C3H10 和 MEFs 细胞成骨分化。

2.3 BMP9 诱导 C3H10 和 MEFs 细胞钙盐沉积

除了 ALP 以外, 钙盐沉积是细胞成骨分化的

另一个经典的检测指标, 且是比 ALP 更晚期的指标, 为了证实在 BMP9 的刺激下, C3H10 和 MEFs 可以持续向成骨晚期分化, 利用 BMP9 刺激 C3H10 和 MEFs, 在刺激后相应时间点(C3H10 在第 20 天, MEFs 在第 14 天), 通过茜素红 S 染色发现: 在 BMP9 的作用下, C3H10 和 MEFs 细胞有非常明显的钙盐沉积(图 3), 且在感染率相同(30%)的情况下, BMP9 诱导的钙盐沉积比 BMP2 更为明显(图 3)。提示在 BMP9 的作用下, C3H10 和 MEFs 细胞向成骨晚期继续分化。

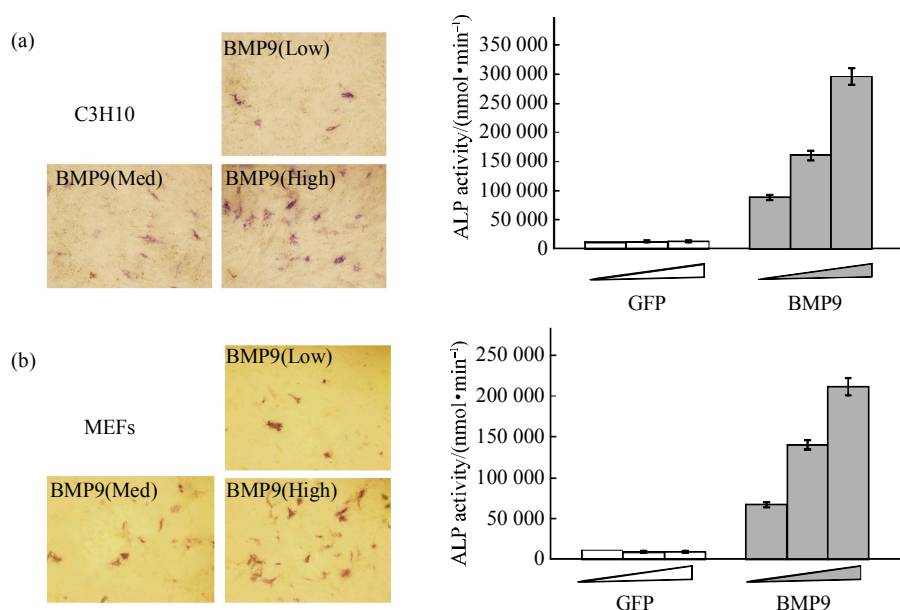


Fig. 2 BMP9 induced ALP activity of C3H10 and MEFs in a dose dependent manner

C3H10 cells were infected with varying titers of BMP9 or GFP virus. At 7 days after infection, cells were collected and subjected to ALP staining and quantitation. (a) BMP9 induced ALP activity of C3H10 in a dose dependent manner. (b) BMP9 stimulated ALP activity of MEFs in a dose dependent manner. Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. Magnification, 100.

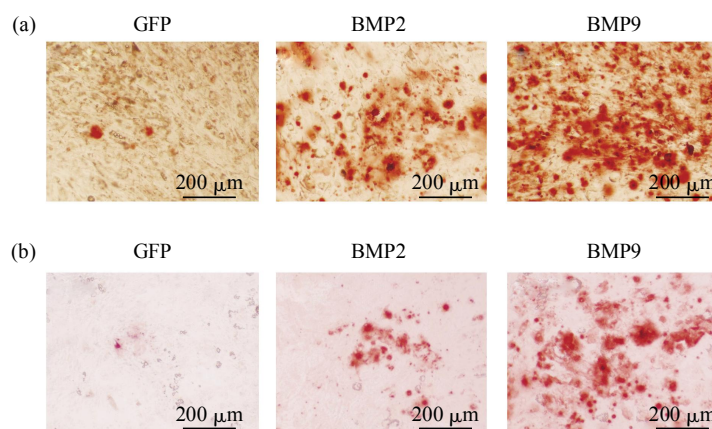


Fig. 3 BMP9 promoted calcium deposition of in C3H10 and MEFs

C3H10 and MEFs were infected with a fixed titer of BMP9 or BMP2 or GFP virus. At 14 (MEFs) and 20 days (C3H10) after infection, cells were fixed and subjected to Alizarin Red S staining. Representative images are shown. (a) BMP9 increased calcium deposition of C3H10 at day 20. (b) BMP9 promoted calcium deposition of MEFs at day 14. Magnification, 100.

2.4 BMP9 增加 C3H10 细胞成骨分化相关基因的表达但变化趋势不同

为分析在 BMP9 诱导下, 细胞成骨相关基因的表达变化, 用 BMP9 刺激 C3H10 细胞, 在刺激后 3、5、7 和 14 天, 分别检测 ALP、Runx2、OPN 和 OC 的 mRNA 表达。结果发现: 与对照 GFP 相比, 在 BMP9 的作用下, ALP 表达开始逐渐增加, 至第 7 天达到最高, 随后下降(图 4a), 这是因为 ALP 是早期成骨指标, 因此在 7 天表达水平达最高后, 随着细胞的进一步分化和主要表达其

他晚期成骨相关基因(如 OPN 和 OC), ALP 的表达反而会下降。而晚期成骨相关基因 OPN 和 OC 的表达与 ALP 不同, 在初期增加并不明显, 在 5 天开始逐渐增加, 而在 14 天达最高(图 4c, 4d)。Runx2 的表达则从一开始就呈现明显增加趋势(图 4b), Runx2 是成骨的关键控制基因(master gene), BMP9 促进其表达持续增加, 这表明 BMP9 很可能通过调节成骨关键控制基因 Runx2 的表达, 实现定向诱导 C3H10 细胞成骨分化。

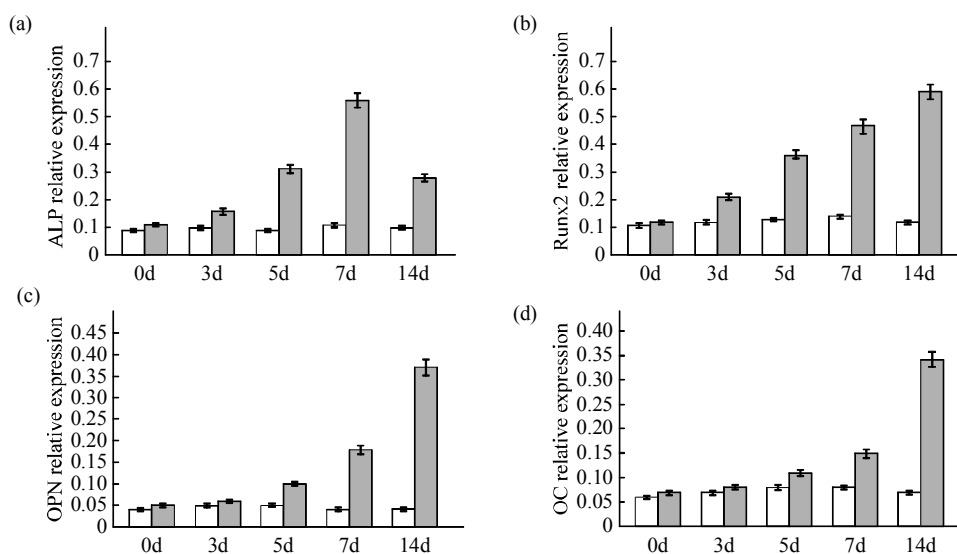


Fig. 4 BMP9 induced expression of osteogenic gene in C3H10 cells

C3H10 cells were infected with BMP9 or GFP (control) virus. At 0 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d after infection, total RNA was collected and subjected to real time PCR analysis using primers corresponding to the target genes respectively; all samples were normalized for GAPDH. (a) BMP9 was shown to induce ALP mRNA expression in the early osteogenic differentiation stage of C3H10. (b) BMP9 promoted expression of Runx2 of C3H10. (c), (d) BMP9 induced expression of OPN and OC in the late osteogenic differentiation stage of C3H10. Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. □: GFP; ■: BMP9.

2.5 BMP9 活化转录因子 Smad 及成骨关键基因 Runx2

大多数 BMPs 通过经典 TGF β -Smad 信号通路, 活化转录因子 Smad, 随后启动下游一系列基因表达而发挥作用^[14], 荧光素酶报告质粒 p12SBE-Luc 在报告基因前插入了 2 个连续的 SBE(smad binding element)序列, 只有活化的 Smad 才可以结合到 SBE 上, 启动荧光素酶的表达^[15]. 结果发现, 在 BMP9 的刺激下, 由 Smad 控制的荧光素酶活性明显增加, 这提示: BMP9 也可以活化 Smad, 因此, BMP9 功能的发挥很可能是通过激活 TGF β -Smad 信号通路而实现的.

荧光素酶报告质粒 p(6OSE)-Luc 的荧光素酶表达是受 Runx2 控制的, 只有活化的 Runx2 才可以启动荧光素酶的表达^[16]. real time PCR 已经证实 BMP9 可以促进 Runx2 表达, 而荧光素酶实验结果发现, p(6OSE)-Luc 转染 C3H10 细胞后, 加以 BMP9 刺激, 即可以活化 Runx2, 从而启动荧光素酶表达(图 5), 结合 real time PCR 结果, 提示 BMP9 不但可以促进 Runx2 的表达, 还可以促进其活化.

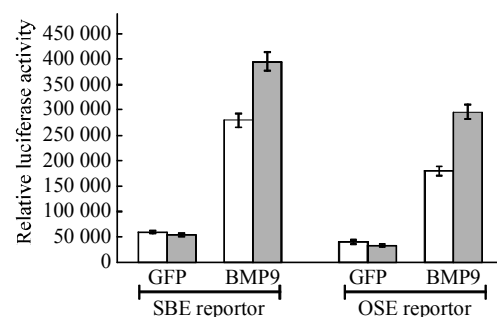


Fig. 5 BMP9 promoted luciferase activity controlled by BRE or OSE in C3H10 cells

C3H10 cells were transfected with SBE or OSE reporter and then infected with BMP9 or GFP (control) virus. At 24 h and 48 h after infection, cells were collected for luciferase assay. BMP9 was shown to promote luciferase activity controlled by BRE or OSE element, these results demonstrated that BMP9 can activate canonic TGF β -Smad pathway and promote osteogenic master gene Runx2 activity. Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. □: 24 h; ■: 48 h.

2.6 BMP9 促进 C3H10 在裸鼠皮下异位成骨

为证实 BMP9 是否可以异位诱导骨形成, 分别将 BMP9 和 GFP 感染的 C3H10 注射到裸鼠皮下, 观察发现, BMP9 组皮下有包块产生, 对照

组 GFP 则无包块产生. 5 周后, 将皮下包块取出观察大小, 并进行 H&E 染色、Alcian blue 和 Trichome 染色. H&E 染色和 Trichome 染色均发现有活跃的成熟成骨过程(图 6), 可见成熟的骨基质 (bone matrix, BM) 和骨细胞 (osteocyte, OC). 而

Trichom 和 Alcian blue 染色发现, 还有不成熟的成骨过程, 可见较多软骨基质(cartilage matrix, CM), 表明 BMP9 诱导的骨形成有部分通过软骨内成骨进行.

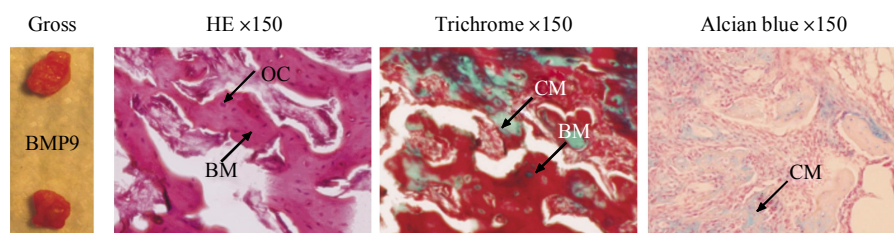


Fig. 6 BMP9 induced entopic bone formation of C3H10 cells

C3H10 cells were infected with BMP9 or GFP (control) virus. The infected cells were collected at 80% confluence and subjected to subcutaneous injection into athymic mice. At 5 weeks after implantation, animals were killed and bony masses were retrieved. The retrieved samples were then decalcified and subjected to H&E staining, Trichrome staining, and Alcian Blue staining. Representative images are shown. For the Trichrome stain, decalcified bone matrix stained dark red, whereas cartilage matrix stained blue. For the Alcian Blue stain, cartilage stained blue. BM, bone matrix; OC, osteocyte; CM, cartilage matrix. Magnification, 150.

3 讨 论

多潜能干细胞具有强大的增殖能力和多向分化潜能, 在特定的条件下, 可向各种细胞分化, 已被广泛应用于再生医学的研究中. 在骨再生研究中, 就常利用多潜能干细胞(如骨髓间充质干细胞)作为种子细胞, 而如何定向诱导细胞成骨分化, 则是目前研究的热点. BMPs 是具有多种生物学功能的形态原, 其中诱导骨形成是其重要功能之一, BMPs 中的许多成员都可以诱导骨形成, 其中对于 BMP2 和 BMP7 的成骨作用研究较多^[17-19], 而对于 BMP9 的成骨作用则研究较少, 本研究主要目的是确认 BMP9 对于几种多潜能干细胞定向成骨分化的诱导作用, 探讨其作为强效促成骨细胞因子的可能性.

细胞成骨分化的两个经典指标是 ALP 和钙盐沉积, 在本实验中, 运用 ALP 染色和定量观察到 BMP9 可以诱导多潜能干细胞 (C3H10, MEFs, BMSC) 的 ALP 活性, 且具有剂量依赖性. 而 real time PCR 结果也发现在 BMP9 刺激下, C3H10 细胞 ALP 的 mRNA 水平在 BMP9 刺激早期就持续增加. 钙盐沉积实验则显示, BMP9 可以明显促进 C3H10 和 MEFs 细胞钙盐沉积, 而且, 与 BMP2 相比, 在两者感染率相同的情况下, BMP9 诱导细胞 ALP 活性和钙盐沉积的能力更强, 这初步表明, BMP9 可以促进多潜能干细胞定向成骨分化.

实验结果还发现, 在 BMP9 的刺激下, 成骨相关基因的表达增加, 但变化趋势并不尽相同, ALP 是先升高, 至第 7 天达最高, 随后开始降低, 这符合其成骨早期指标的特性. OPN 和 OC 是细胞成骨分化晚期指标, 因此, 其表达增加的时间较晚, 至细胞成骨分化晚期才达到最高. Runx2 在多条成骨相关信号通路中起着枢纽作用^[20-22], 是成骨的关键基因之一, real time PCR 显示 Runx2 是在 BMP9 刺激一开始就表达增加, 并随时间推移继续增加, 这表明, 成骨关键基因 Runx2 表达受到 BMP9 的调控.

BMP2 功能的发挥主要通过 TGF β -Smad 信号途径而发挥作用^[14], 那么, BMP9 是否也如 BMP2 一样, 是通过激活 TGF β -Smad 信号途径而发挥其功能呢? 通过荧光素酶报告基因实验发现, BMP9 的确可以活化 Smad, 从而启动荧光素酶的表达. 在 real time PCR 结果中, 已经发现 BMP9 可持续增加成骨关键基因 Runx2 的表达, 而荧光素酶报告基因的基因实验则进一步证实 BMP9 还可以活化 Runx2. 由此推测, BMP9 定向诱导多潜能干细胞成骨分化的功能, 很可能也是通过(或者至少部分通过)激活 TGF β -Smad 信号途径, 以及促进成骨关键基因 Runx2 的表达和活化而实现的.

体外实验已经证实, BMP9 的确可以定向诱导多潜能干细胞的成骨分化, 为进一步证实 BMP9

是否可以在体内促进骨形成, 我们在裸鼠皮下注射 BMP9 刺激的 C3H10 细胞, 并利用组织化学染色进行检测, 结果发现, BMP9 可以促进 C3H10 细胞在裸鼠皮下异位成骨, 这表明, 除了在体外可以诱导多能干细胞成骨分化外, BMP9 在体内同样可以诱导多能干细胞的定向分化从而导致异位骨形成。

结合体外细胞实验和动物实验结果, 本研究在体外和体内均证实了 BMP9 具有较为强大的定向诱导多潜能干细胞成骨分化的作用, 其诱导作用强于临床应用的 BMP2。BMP9 诱导多潜能干细胞分化的作用, 很可能也是通过激活 TGF- β -Smad 信号途径, 活化 Smad, 调控成骨关键基因 Runx2 的表达和活化, 继而启动下游成骨相关基因(如 ALP、OPN、OC)的表达而实现的。本研究结果表明, BMP9 是一种强效促成骨细胞因子, 为其在临床的应用提供了一定的实验和理论基础。

参 考 文 献

- Deng Z L, Sharff K A, Tang N, *et al.* Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci*, 2008, **13**(1): 2001~2021
- Caplan A I, Bruder S P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*, 2001, **7**(6): 259~264
- He T C. Distinct osteogenic activity of BMPs and their orthopaedic applications. *J Musculoskeletal Neuronal Interactions*, 2005, **5**(4): 363~366
- Luo J, Sun M H, Kang Q, *et al.* Gene therapy for bone regeneration. *Curr Gene Ther*, 2005, **5**(2): 167~179
- Luu H H, Song W X, Luo X J, *et al.* Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 2007, **25**(5): 665~677
- Peng H, Huard J. Stem cells in the treatment of muscle and connective tissue diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, **3**(3): 329~333
- Prockop D J, Gregory C A, Spees J L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(Suppl): 11917~11923
- Govender S, Csimma C, Genant H K, *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am*, 2002, **84**(12): 2123~2134
- Açil 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
- Sandhu H S. Bone morphogenetic proteins and spinal surgery. *Spine*, 2003, **28**(15 Suppl): 64~67
- Kanayama M, Hashimoto T, Shigenobu K, *et al.* A prospective randomized study of posterolateral lumbar fusion using osteogenic protein-1 (OP-1) versus local autograft with ceramic bone substitute: emphasis of surgical exploration and histologic assessment. *Spine*, 2006, **31**(10): 1067~1074
- Hanisch O, Tatakis D N, Rohrer M D, *et al.* Bone formation and osseointegration stimulated by rhBMP-2 following subantral augmentation procedures in nonhuman primates. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1997, **12**(6): 785~792
- Muñoz Sanjuán I, Brivanlou A H. Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci*, 2002, **3**(4): 271~280
- Cao X, Chen D. The BMP signaling and *in vivo* bone formation. *Gene*, 2005, **357**(1): 1~8
- Laurent D, Christine M, Sabine M, *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
- Zhao M, Ko S Y, Liu J H, *et al.* Inhibition of microtubule assembly in osteoblasts stimulates BMP-2 expression and bone formation through the transcription factor Gli2. *Mol Cell Biol*, 2009, **29**(5): 1291~1305
- 戴克戎, 徐小良, 汤亭亭, 等. 骨形态发生蛋白 -2 基因修饰的组织工程化骨修复羊胫骨干骨缺损. *中华医学杂志*, 2003, **83**(15): 1345~1349
- Dai K R, Xu X L, Tang T T, *et al.* National Medical Journal of China, 2003, **83**(15): 1345~1349
- Dai K R, Xu X L, Tang T T, *et al.* Repairing of goat tibial bone defects with BMP-2 gene-modified tissue-engineered bone. *Calcif Tissue Int*, 2005, **77**(1): 55~61
- Koh J T, Zhao Z, Wang Z, *et al.* Combinatorial gene therapy with BMP2/7 enhances cranial bone regeneration. *J Dent Res*, 2008, **87**(9): 845~849
- Panos G, Ziros A, Efthimia K, *et al.* Runx2: of bone and stretch. *Inter J Biochem Cell Biol*, 2008, **40**(9): 1659~1663
- Patricia D, Zhang R, Valerie G, *et al.* Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, **89**(5): 747~754
- Harvard T, Charles A. Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by bone morphogenetic protein-7. *Mol Cell Endocrinol*. 2003, **205**(1-2): 121~129

BMP9 Induces Osteogenic Differentiation of Multipotent Stem Cell*

ZHANG Yan, WEN Wei, LUO Jin-Yong**

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

Abstract In order to validate and estimate the capability of BMP9 to induce osteogenic differentiation of multipotent stem cells, three multipotent stem cells (C3H10, MEFs and BMSC) were used as target cells, and BMP9 was introduced into these cells by using recombinant adenoviruses assay, the effect of BMP9 on osteogenic differentiation of multipotent stem cells was demonstrated by using luciferase reporter assay, alkaline phosphatase (ALP) quantitative assay, calcium deposition assay, real time PCR, animal experiment and histological staining assay. The results demonstrated that BMP9 can induce ALP expression of C3H10, MEFs and BMSC by a dose dependent manner. BMP9 can also stimulate calcium deposition of C3H10 and MEFs *in vitro*, the osteogenic markers (ALP, Runx2, osteopontin, osteocalcin) were increased after stimulated by BMP9. BMP9 can activate canonical TGF β -Smad pathway, and promote the expression of osteogenic master gene Runx2. The animal experiment and histological staining assay show that BMP9 can induce ectopic bone formation in naked mice. To sum up, BMP9 is a more powerful cell factor to induce osteogenic differentiation of multipotent stem cells.

Key words bone morphogenetic protein 9(BMP9), multipotent stem cells, signal transduction, differentiation, transforming growth factor

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00191

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

**Corresponding author.

Tel: 86-23-68485239, E-mail: luojinyong@sina.com

Received: March 31, 2009 Accepted: July 14, 2009