

阻断 ERK1/2 激酶可增强骨形态发生蛋白 9 诱导的间充质干细胞成骨分化*

宋涛 何娟文 王锦 唐敏 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 骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)具有很强的诱导间充质干细胞定向成骨分化的能力。但对于其所涉及的相关分子机理了解并不深入。利用 BMP9 重组腺病毒感染间充质干细胞, Western blot 检测 ERK1/2 激酶的磷酸化, ERK1/2 的特异性抑制剂 PD98059 阻断 ERK1/2 活性, 或以 RNA 干扰抑制 ERK1/2 表达, 通过体外细胞实验和体内动物实验, 初步分析和揭示 ERK1/2 对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化的调控作用及其可能机制。结果发现: BMP9 可以促进 ERK1/2 激酶的磷酸化, ERK1/2 抑制剂 PD98059 可增强由 BMP9 诱导的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)表达和钙盐沉积, 并促进由 BMP9 诱导的 Runx2 基因的表达和转录活性, 以及 Smad 经典途径的活化; 而 RNA 干扰导致 ERK1/2 基因沉默同样也可进一步促进 BMP9 诱导的 ALP 活性和钙盐沉积, 并促进 BMP9 诱导的间充质干细胞在裸鼠皮下异位成骨。因此, BMP9 可以促进 ERK1/2 蛋白激酶的活化, 而阻断 ERK1/2 蛋白激酶可进一步增强 BMP9 诱导的成骨分化, ERK1/2 极可能对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化起着负向调控作用。

关键词 骨形态发生蛋白 9, ERK1/2, 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.1206.2012.00170

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是多潜能干细胞的一种, 主要存在于结缔组织和器官间质中, 以骨髓组织含量最为丰富, 间充质干细胞具有强大的增殖能力以及多向分化潜能, 在适宜的体内或体外环境条件下可以分化成为骨细胞、软骨细胞、心肌细胞、神经细胞等多种细胞^[1-2]。在再生医学研究中, 间充质干细胞常被作为种子细胞, 用以修复、重建受伤或发生病变的多种组织器官, 因而具有广阔的应用前景^[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]。间充质干细胞在定向成骨的过程中要受到许多细胞因子的调控, 其中骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)家族发挥了重要的作用。BMPs 是属于转化生长因子 β (transform growth factor- β , TGF- β)超家族的成员, 目前分离和鉴定的 BMPs 已经超过 20 种, 而其中的 BMP2, 4, 6, 7 等已被证实具有明确的诱导成骨的活性^[6-8]。

BMP9 (也称生长分化因子 2, growth differentiation factor 2, GDF2)是 BMPs 家族中的一员, 首先从胎鼠肝脏中被分离鉴定出来^[9]。BMP9 已被证实的功能有: 调节葡萄糖和脂肪酸代谢、诱导和维持胚胎神经元的类胆碱分化、调节体内铁的动态平衡等^[10-12]。但是对于 BMP9 在骨形成及骨再生中的作用, 一直以来都缺乏详细的研究和了解。课题组前期研究发现: BMP9 也具有较弱的诱导间充质干细胞成骨分化和骨形成的作用, 其作用效果甚至强于 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。

* 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: 023-68485239, E-mail: luojinyong888@hotmail.com

收稿日期: 2012-04-06, 接受日期: 2012-07-06

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)是一类几乎在所有细胞中均表达的蛋白激酶. 目前发现, 哺乳动物 MAPK 至少包括 4 个亚家族成员, 即 ERK1/2、p38、JNK 和 ERK5 (也称 MAPK7 或 BMK1)^[15], MAPK 是许多信号转导过程中的关键组分, 因而在调控细胞生长、运动、凋亡、增殖及分化中发挥着重要的作用. 已有研究证实, BMP2 和 BMP4 等均可以通过活化 MAPK 而调控成骨分化^[16-19]. 那么, 作为成骨性 BMPs 家族的一员, BMP9 是否亦可通过活化 MAPK 而调控间充质干细胞成骨分化, 目前鲜见相关报道. 本课题组最新的研究工作发现, BMP9 也可通过活化 p38 而促进间充质干细胞成骨分化^[20], 提示 MAPK 家族成员在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的过程中发挥了重要的调控作用. 本研究则继续对于 MAPK 家族的另一重要成员 ERK1/2 进行了分析, 首先确认在间充质干细胞中 ERK1/2 激酶是否可被 BMP9 活化, 再利用 ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 阻断 ERK1/2 激酶活性, 以及 RNA 干扰技术抑制 ERK1/2 激酶表达后, 观察其对 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化的影响, 初步分析和探讨 ERK1/2 对于 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的调控作用及其可能的机制.

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠间充质干细胞株 C3H10T1/2 和 C2C12 均购自美国典型菌种保藏中心(ATCC); 小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)由本课题组分离保存; BMP9 腺病毒 Ad-BMP9、空载腺病毒 Ad-GFP 均由本实验室构建和保存; ERK1/2 干扰腺病毒(AdR-si-ERK1/2)和对照腺病毒(AdR-si-NC), 荧光素酶报告质粒 p12SBE-Luc 和 p(6OSE)-Luc 均由美国芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠; ERK1/2 抑制剂 PD98059 购自 Santa Cruz 公司, 溶解于 DMSO, 配制成浓度为 50 mmol/L 的储存液, -20℃ 保存备用.

ALP 活性定量检测试剂盒购自 BD 公司; Fast Blue RR salt、Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution、维生素 C、 β -磷酸甘油和茜素红 S 购自 Sigma 公司; RNA 提取试剂 Trizol 和转染试剂 Lipofectamin2000™ 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; 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.

OPN 一抗购自 Santa Cruz 公司(sc-21742); Phosphor-ERK1/2 (p-ERK1/2) 一抗购自 Cell Signaling 公司(#4370); 总 ERK1/2 一抗购自 Cell Signaling 公司(#4695); 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); Runx2 一抗购自 Cell Signaling 公司(#8486); β -actin 一抗购自 Santa Cruz 公司(sc-47778).

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、MEFs 和 C2C12 细胞至 24 孔细胞培养板, 密度为 30%, 待细胞贴壁后, 用 PD98059 预处理 4h, 或加入适量 AdR-si-ERK1/2(或 AdR-si-NC)腺病毒感染 24 h. 随后再加入适量 Ad-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 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.

1.2.3 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 β -磷酸甘油. 用 PD98059 预处理 4 h, 或加入适量 AdR-si-ERK1/2(或 AdR-si-NC)腺病毒感染 24 h. 随后再加入适量 Ad-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, 重蒸水洗涤 3 次, 弃去重蒸水, 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, 重蒸水终止反应和洗涤,

显微镜观察和成像。

1.2.4 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 Lipofectamin2000™ 转染 p12SBE-luc(或 p(6OSE)-Luc)质粒 1 μl, 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 PD98059 预处理 4 h, 或加入适量 AdR-si-ERK1/2 (或 AdR-si-NC)腺病毒感染 24 h, 随后再加入适量 Ad-BMP9 腺病毒, 继续培养 24 h 和 36 h 后分别进行荧光素酶活性测定(按试剂盒说明书进行).

1.2.5 Real time PCR. C3H10T1/2 细胞接种 T-25 细胞培养瓶, 密度为 60%, 细胞贴壁后, 先加或加入适量 AdR-si-ERK1/2(或 AdR-si-NC)腺病毒感染 24 h, 再加入适量 Ad-BMP9 腺病毒, 在加入 Ad-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	AAGATCGGCTGTGGCAGC	CCAACAGCGTCTGGAGT
GAPDH	GGCTGCCAGAACATCAT	CGGACACATTGGGGGTAG

1.2.6 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-ERK1/2(或 AdR-si-NC)腺病毒感染 24 h, 再加入适量 AD-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 μl 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 μl 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.

1.2.7 统计分析. 数据用均数±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 ERK1/2 激酶的磷酸化

首先, 用 Ad-BMP9 和 Ad-GFP 腺病毒感染间充质干细胞 C3H10T1/2、C2C12 和 MEFs, 感染 36 h 后提取细胞总蛋白, Western blot 检测 ERK1/2 激酶的总蛋白水平和磷酸化水平. 结果发现, 在 BMP9 的诱导之下, ERK1/2 的总蛋白水平并未发生变化, 但 ERK1/2 激酶的磷酸化水平明显增加(图 1). 这提示 BMP9 可以促进间充质干细胞 ERK1/2 激酶的磷酸化而导致其活化.

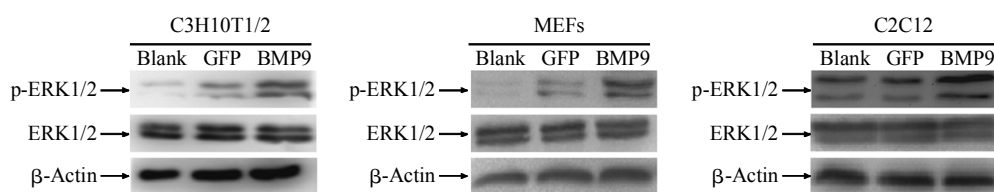


Fig. 1 BMP9 increased the phosphorylated form of ERK1/2 kinase

C3H10T1/2, MEFs and C2C12 cells were infected with Ad-BMP9 or Ad-GFP virus. At 36 h after infection, cells were lysed and subjected to Western blot.

2.2 阻断 ERK1/2 激酶活性可增强由 BMP9 诱导的间充质干细胞早期成骨分化

本课题组已经证实, BMP9 可以促进 p38 活

化, 且抑制 p38 活性可以减弱 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化^[20], 因此, p38 对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化可能是正向调控作用. 那

么, 作为 MAPK 的一员, ERK1/2 在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化中是否也有调控作用, 其作用是否也和 p38 类似呢. 为此, 我们利用不同浓度(10 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$)的 ERK1/2 激酶特异性抑制剂 PD98059 预处理间充质干细胞, 再给予 BMP9 的刺激, 在 BMP9 刺激后第 7 天检测早期成骨指标 ALP 的活性, 结果发现: 与抑制 p38 激酶产生的效应相反, ERK1/2 激酶抑制剂

PD98059 可以进一步增强由 BMP9 诱导的 ALP 活性, 且随着抑制剂 PD98059 剂量的增加, ALP 的活性也相应增加(图 2a, b). 在 MEFs 和 C2C12 细胞中也有类似结果(图 2c, d). 因此, ERK1/2 激酶抑制剂 PD98059 可以增强由 BMP9 诱导的间充质干细胞早期成骨分化, 故推测 ERK1/2 对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化的调控作用很可能与 p38 相反, 是负向调控作用.

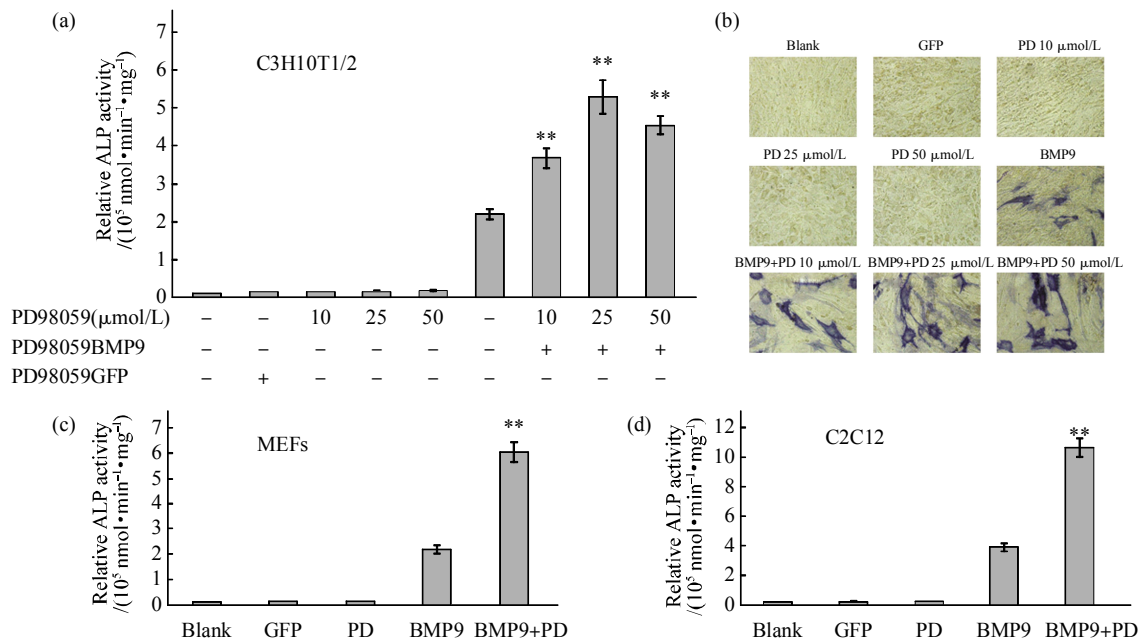


Fig. 2 Effect of the ERK1/2 inhibitor PD98059 on BMP9-induced early osteogenic differentiation of MSCs

(a) PD98059 increased 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 BMP9, $**P < 0.01$ vs BMP9. (b) PD98059 increased BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cell in a dose-dependent manner detected by ALP staining assay, $\times 100$. (c) PD98059(25 $\mu\text{mol/L}$) increased BMP9-induced ALP activity of MEFs determined by ALP quantitative assay. Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments, $**P < 0.01$ vs BMP9. (d) PD98059(25 $\mu\text{mol/L}$) increased BMP9-induced ALP activity of C2C12 cell determined by ALP quantitative assay. Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments, $**P < 0.01$ vs BMP9.

2.3 阻断 ERK1/2 激酶活性可增强由 BMP9 诱导的间充质干细胞晚期成骨分化

为了进一步证实此推测, 我们检测了阻断 ERK1/2 激酶活性后, 对于 BMP9 诱导的间充质干细胞晚期成骨分化指标 OPN 和钙盐沉积的影响. 首先利用 25 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 预处理间充质干细胞 C3H10T1/2, 再用 Ad-BMP9 腺病毒感染细胞. 在 Ad-BMP9 腺病毒感染 12 天后, 提取细胞总蛋白, Western blot 检测 OPN 的表达, 结果发现, 与对照

组相比, 在 PD98059 预处理后, 由 BMP9 诱导的 OPN 的表达明显增强(图 3a); 而在 Ad-BMP9 腺病毒感染 21 天后, 茜素红 S 染色则发现: 在 PD98059 预处理组中, 由 BMP9 诱导的红色钙盐结节也明显增加, 这表明 PD98059 促进了由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞钙盐沉积(图 3b). 综合 OPN 和钙盐沉积实验结果表明: 在利用 PD98059 阻断 ERK1/2 激酶活性后, 可以增强由 BMP9 诱导的间充质干细胞晚期成骨分化.

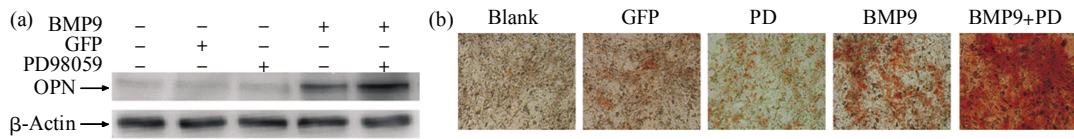


Fig. 3 Effect of the ERK1/2 inhibitor PD98059 on BMP9-induced late osteogenic differentiation of MSCs

(a) PD98059(25 $\mu\text{mol/L}$) increased BMP9-induced OPN expression of C3H10T1/2 cells detected by Western blot. (b) PD98059(25 $\mu\text{mol/L}$) enhanced BMP9-induced calcium depositon of C3H10T1/2 cells detected by Alizarin Red S, $\times 100$.

2.4 阻断 ERK1/2 激酶可增强由 BMP9 诱导的成骨关键基因 Runx2 的表达和转录活性

Runx2 在多条成骨相关信号通路中起着枢纽作用, 是成骨的关键控制基因之一, BMP9 可通过 Runx2 促进间充质干细胞成骨分化^[14]. 那么, 阻断 ERK1/2 激酶是否会使 BMP9 诱导的 Runx2 的活性发生变化呢? 为此, 首先利用 Western blot 检测了抑制 ERK1/2 活性后, Runx2 蛋白表达的变化, 结果发现 PD98059 可使 BMP9 诱导 Runx2 的表达进一步增强(图 4a). 荧光素酶报告质粒 p(6OSE)-Luc 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^[6], 因此利用 p(6OSE)-Luc 检测了 Runx2 的转录活性变化. 结果

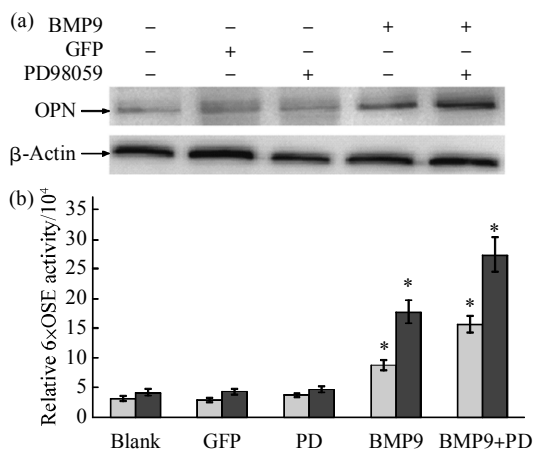


Fig. 4 Effect of the ERK1/2 inhibitor PD98059 on BMP9-induced Runx2 expression and transcriptional activity

(a) PD98059 (25 $\mu\text{mol/L}$) enhanced BMP9-induced Runx2 expression of C3H10T1/2 cells detected by Western blot. (b) PD98059(25 $\mu\text{mol/L}$) enhanced BMP9-induced Runx2 transcriptional activity in C3H10T1/2 cells detected by luciferase reporter assay. Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments, * $P < 0.05$ vs BMP9. □: 24 h; ■: 36 h.

发现, BMP9 刺激可以活化 Runx2, 从而启动荧光素酶表达, 而 PD98059 则可进一步促进 BMP9 诱导的 p(6OSE)-Luc 的荧光素酶活性(图 4b). 结合 Western blot 结果表明阻断 ERK1/2 激酶可增强 BMP9 诱导的 Runx2 表达及转录活性.

2.5 阻断 ERK1/2 激酶活性可增强由 BMP9 诱导的 Smad 信号的进一步活化

课题组已经证实 BMP9 可以激活 Smad 经典途径^[14, 20]. Smad6 和 Smad7 作为 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, 是 Smad 经典信号途径激活的标志之一^[14, 20]. 为确认阻断 ERK1/2 激酶活性后, BMP9 诱导的 Smad 经典途径活化情况, 首先通过 Real time PCR 检测了 Smad6 和 Smad7 的表达, 结果发现: 在 PD98059 预处理间充质干细胞 C3H10T1/2 后, 由 BMP9 所诱导 Smad6 和 Smad7 的 mRNA 表达水平进一步增加($P < 0.01$, 图 5a, b), 这表明阻断 ERK1/2 激酶活性后, 由 BMP9 激活 Smad 途径所致的 Smad6 和 Smad7 表达上调趋势受到进一步的加强. 由此推测: 阻断 ERK1/2 激酶活性后, 极有可能导致 BMP9 所激活的 Smad 经典信号活化增加.

为证实此推测, 利用 Western blot 检测发现: 在 PD98059 预处理细胞后, 由 BMP9 所诱导的 Smad1/5/8 磷酸化水平也有所增加(图 5c), 表明转录因子 Smad1/5/8 的活化进一步加强了. 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]. 荧光素酶报告基因结果显示: PD98059 可加强 BMP9 所导致的 Smad 经典途径的激活, 从而使荧光素酶活性增加($P < 0.01$, 图 5d). 综合以上结果表明, 阻断 ERK1/2 激酶活性的确可增加由 BMP9 诱导的 Smad 经典信号途径的激活.

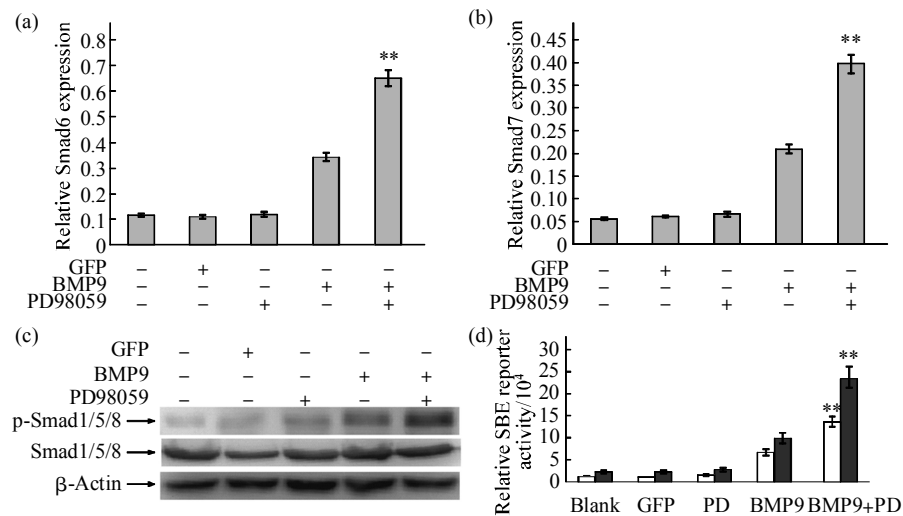


Fig. 5 Effect of the ERK1/2 inhibitor PD98059 on BMP9-induced activation of canonical Smad pathway in C3H10T1/2 cells

(a) PD98059 increased 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. (b) PD98059 increased BMP9-induced Smad7 expressions of C3H10T1/2 cells detected by Real time PCR, data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. $**P < 0.01$ vs BMP9. (c) PD98059 increased the phosphorylated form of Smad1/5/8 promoted by BMP9 in C3H10T1/2 cells determined by Western blot. (d) PD98059 enhanced BMP9-induced SBE luciferase reporter activity of C3H10T1/2 cells, data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. $**P < 0.01$ vs BMP9. □: 24 h; ■: 36 h.

2.6 ERK1/2 基因沉默可促进由 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化

我们发现, 利用 PD98059 抑制 ERK1/2 活性后, 可以进一步增强 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化, ERK1/2 可能对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化起负向调控作用. 为了排除抑制剂可能带来的非特异性抑制效应, 利用 RNA 干扰技术对于 ERK1/2 激酶进行了有效的基因沉默(图 6a). 并进一步分析了 ERK1/2 基因沉默后对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化的影响. 荧光素酶报告基因实验发现: 在 ERK1/2 基因沉默后, BMP9 诱导的 Smad 经典途径的激活进一步加强了(图 6b). 而 BMP9 所诱导的早期成骨指标 ALP 的活性和晚期成骨指标钙盐沉积均相应增强(图 6c, d, e), 表明 ERK1/2 基因沉默也可导致由 BMP9 诱导的间充质干细胞体外成骨分化进一步加强.

2.7 ERK1/2 基因沉默可促进由 BMP9 诱导间充质干细胞在裸鼠皮下异位成骨

体外实验已经证实, 阻断 ERK1/2 激酶可以导致 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化加强. 为了证实阻断 ERK1/2 激酶在体内是否同样可以促进

BMP9 诱导的间充质干细胞异位骨形成, 分别将 ERK1/2 干扰腺病毒(或对照腺病毒)和 BMP9 腺病毒共感染间充质干细胞 C3H10T1/2(图 7a), 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有明显差异, BMP9+si-ERK1/2 组皮下包块比 BMP9+si-NC 组体积进一步增加(图 7b, c).

皮下包块经过石蜡包埋、切片, 进行 H&E、Masson Trichome 和 Alcian Blue 染色, 与对照组相比, H&E 染色显示 ERK1/2 基因沉默后, 可以进一步增强 BMP9 诱导的异位骨形成数量, 因此骨小梁(TB, trabecular bone)数量明显增加, 并连为片状(图 7d). 但是 ERK1/2 并未对于骨成熟度有明显的影响, 因为在 Masson Trichome 染色下成熟的骨基质 (bone matrix, BM)的数量, 以及在 Alcian Blue 染色下的软骨基质成分(CM, chondroid matrix)与对照组相比并无明显差异(图 7d). 因此, 皮下包块组织化学染色提示: ERK1/2 基因沉默可导致 BMP9 所诱导的间充质干细胞的异位成骨的数量增加, 使得骨小梁数目增多, 但是对于骨的成熟度并无直接影响.

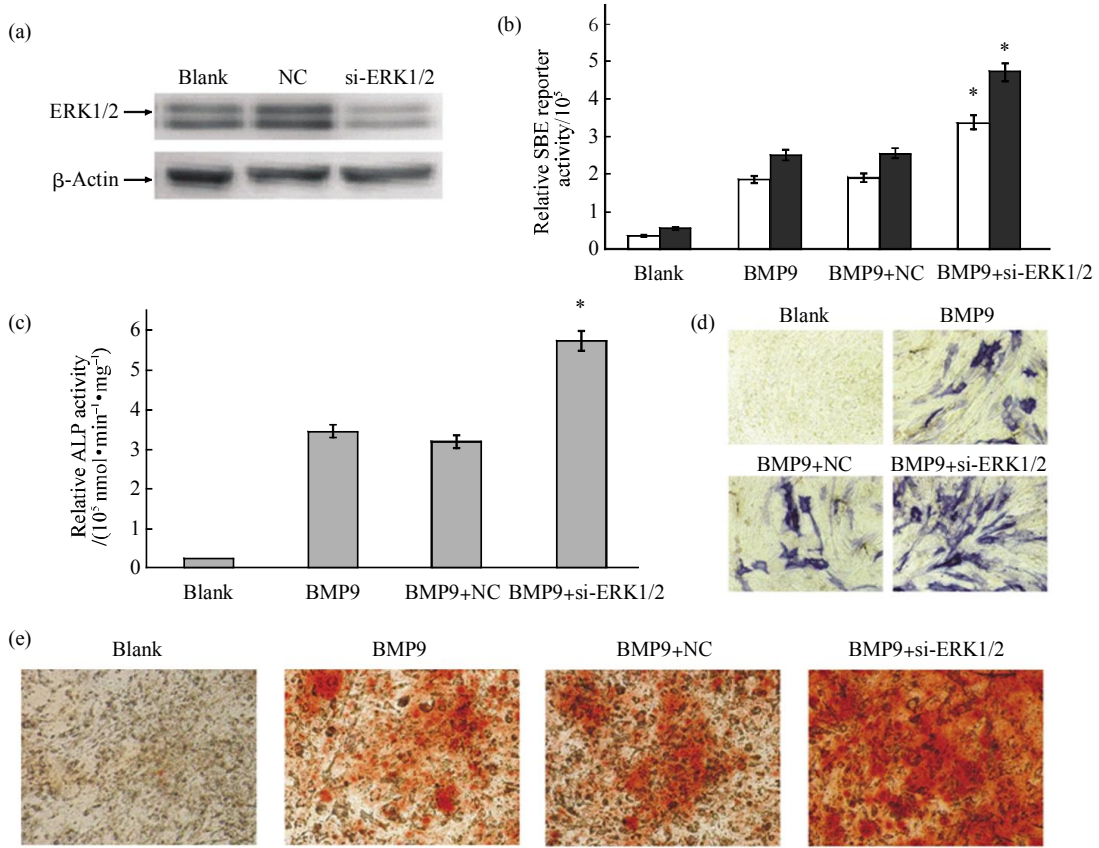


Fig. 6 Gene silencing of ERK1/2 enhanced BMP9-induced ALP activity and calcium deposition of C3H10T1/2 cells

(a) The expression of ERK1/2 was reduced by RNA interference determined by Western blot. (b) Gene silencing of ERK1/2 inhibited BMP9-induced activation of Smad pathway determined by luciferase assay, **P* < 0.05 vs BMP9+NC. □: 24 h; ■: 36 h. (c) Gene silencing of ERK1/2 increased BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cells determined by ALP quantitative assay, data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments. **P* < 0.05 vs BMP9+NC. (d) Gene silencing of ERK1/2 increased BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cells determined by ALP staining assay, $\times 100$. (e) Gene silencing of ERK1/2 blocked BMP9-induced calcium deposition of C3H10T1/2 cells determined by Alizarin Red S staining assay, $\times 100$.

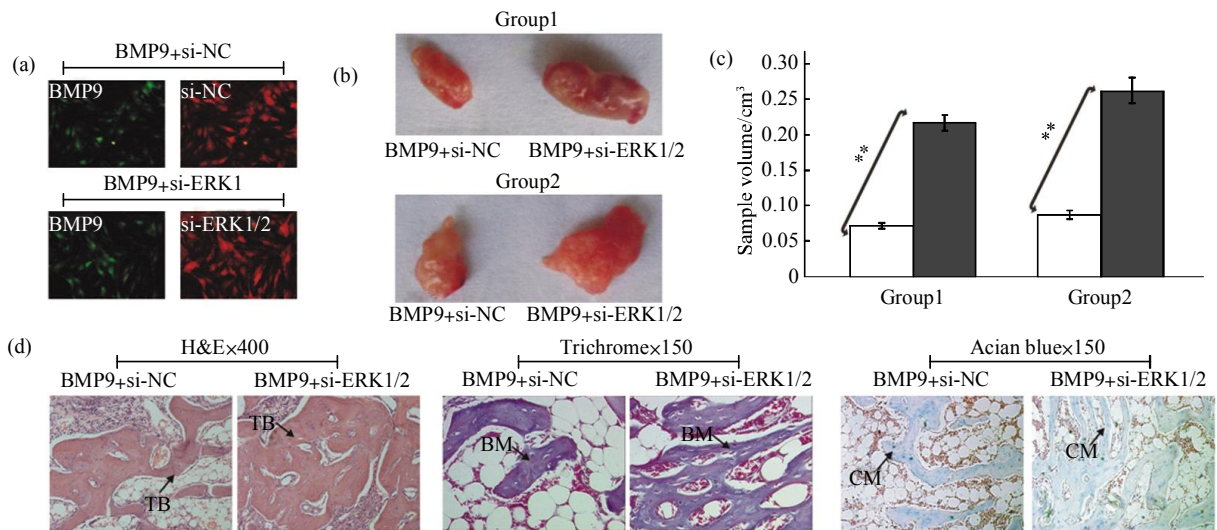


Fig. 7 Gene silencing of ERK1/2 enhanced BMP9-induced ectopic bone formation of C3H10T1/2 cells

(a) Co-infection efficiency of Ad-BMP-9 and AdR-si-ERK1/2 (or AdR-si-NC) to C3H10T1/2 cells under a fluorescence microscope. (b) Gross image of Retrieved samples. (c) Total volume of retrieved samples. □: BMP9+si-NC; ■: BMP9+si-ERK1/2. (d) H&E staining, Trichrome staining and Alcian Blue staining of retrieved samples. TB: Trabecular bone; BM: Bone matrix; CM: Chondroid matrix.

3 讨 论

作为成骨性的 BMPs 一员, BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的分子机制还缺乏详细了解. 本课题组研究证实 BMP9 可以活化转录因子 Smad1/5/8, 从而激活 Smad 途径^[14, 20], 这与相关报道结果相一致^[22]. 由此表明 BMP9 可以通过经典 Smad 途径传递信号和发挥功能. 近来研究发现, 除了可以激活经典的 Smad 途径之外, 多种成骨性 BMPs(如 BMP2、BMP4 和 BMP7)还可以激活 MAPK 途径, 而且 MAPK 途径的激活对于 BMPs 发挥诱导成骨分化的功能起着重要的调控作用^[16-19]. 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 信号途径而调控间充质干细胞成骨分化, 一直缺乏相关报道.

我们课题组新近证实了 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化需要 p38 激酶的参与, 阻断 p38 激酶可抑制 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化^[20]. 提示 MAPK 信号途径确实对于 BMP9 诱导成骨分化起着重要的调控作用. MAPK 信号途径根据最终执行功能激酶的亚类不同, 又至少包括 ERK1/2、JNK、p38 和 ERK5 4 种途径. 那么, MAPK 的其他成员是否也可以调控 BMP9 的成骨作用呢? 本研究继续对于 MAPK 亚家族成员 ERK1/2 的作用进行了分析. Western blot 检测发现, BMP9 能增加 ERK1/2 激酶的磷酸化水平而导致 ERK1/2 途径活化, 并由此推测 BMP9 可能通过活化 ERK1/2 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 ERK1/2 激酶的抑制剂 PD98059 处理间充质干细胞, 结果发现经 PD98059 处理后, 由 BMP9 所诱导的间充质干细胞的早期和晚期成骨分化均进一步增强, 而且, PD98059 抑制 ERK1/2 激酶活性后, 由 BMP9 诱导的成骨关键转录因子 Runx2 的表达和转录活性增强, Smad 经典途径的激活也相应增加. 这提示我们 BMP9 可通过活化 ERK1/2 激酶从而调控间充质干细胞成骨分化, 而且其调控机制可能部分与影响成骨关键转录因子 Runx2 和 Smad 经典途径有关. 随后, 利用 RNAi 技术抑制 ERK1/2 激酶的表达后, 也发现 ERK1/2 激酶基因沉默后, 由 BMP9 所诱导间充质干细胞 Smad 途径的活化、ALP 活性和钙盐沉积均进一步增强, 与使用抑制剂所得到的结果相一致. 同时在裸鼠皮下异位成骨实验中发现:

干扰 ERK1/2 表达可促进 BMP9 诱导间充质干细胞在裸鼠皮下异位成骨, 使得骨小梁的生成量进一步增加, 从而导致成骨量增加, 但是并不影响骨成熟度.

ERK1/2 是 MAPK 中的重要一员, 在调节细胞增殖、分化、凋亡中具有重要的作用. ERK1/2 激酶在成骨分化和骨形成的作用也早有报道. 有报道发现, 利用抑制剂阻断 ERK1/2 活性后可抑制成骨细胞的分化和成熟, 而在 ERK1/2 持续性激活后, 成骨细胞在体外的分化和成熟加速^[23], ERK1/2 可以增加成骨关键基因 Runx2 的磷酸化和转录活性^[24], 这部分结果提示 ERK1/2 可能对于成骨分化起正向调控作用. 但是也有 ERK1/2 在体外负向调节成骨分化的研究报道, 如 Higuchi 等^[25]发现, 阻断 ERK1/2 活性后可以加速细胞的成骨分化. 以上这些体外研究结果使得 ERK1/2 在成骨分化和骨形成中的作用未能有一致性意见, 这可能与相关研究所使用的细胞模型和处理因素等有关. 而最近由 Ge 等^[26]报道发现: 在小鼠体内 ERK1/2 激活后, 可以促进成骨分化和骨发育, 也提示了 ERK1/2 在体内对于成骨分化的调控作用. 本研究则发现: BMP9 可以活化 ERK1/2 激酶途径, 阻断 ERK1/2 可以增强 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化, 因此, ERK1/2 极可能负向调控 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化.

BMP9 诱导成骨分化的信号转导途径是极其复杂的, 存在有多种信号途径的联系和相互调控. 本研究主要针对 MAPK 的亚型之一 ERK1/2 激酶在 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化中的作用进行了一些初步的研究工作. 在接下来的研究中, 将构建 ERK1/2 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 ERK1/2 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 ERK1/2 激酶途径后, 成骨相关的关键调控基因 Osx、Sox9、Dlx5 等的表达和活化(磷酸化)情况, 从而深入分析 ERK1/2 激酶途径参与调控 BMP9 诱导成骨分化的分子机制.

结合前期 p38 激酶调控 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的研究结果^[20], 课题组发现, BMP9 可同时活化 MAPK 途径中的 p38 和 ERK1/2 激酶, 而且 p38 和 ERK1/2 活化后对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化的调控效应是不同的(极有可能

是相反或相互平衡的调控效应). 本课题组在研究工作中也同时对于 MAPK 其他两个重要成员 JNK 和 ERK5 进行了初步分析, 结果发现, BMP9 还可以促进 JNK 和 ERK5 的磷酸化(数据未显示). 因此, 后续还将继续深入分析 p38 及 ERK1/2 参与调控 BMP9 诱导成骨分化的分子机制, 并研究确认 MAPK 家族的其他亚型 ERK5 和 JNK 在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化过程中的调控作用及机理. 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分子的鉴定和分析, 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] Phimphilai 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] 赵丹, 王箭, 罗进勇, 等. 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. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(11): 1001-1010
Zhao D, Wang J, Luo J Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(11): 1001-1010
- [21] Chen D, Zhao M, Mundy G R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 2004, **22**(4): 233-241
- [22] Bergeron E, Senta H, Mailloux A, *et al.* Murine preosteoblast differentiation induced by a peptide derived from bone morphogenetic proteins-9. *Tissue Eng Part A*, 2009, **15**(11):3341-3349
- [23] 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
- [24] Xiao G, Jiang D, Thomas P, *et al.* MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem*, 2000, **275**(6): 4453-4459
- [25] Higuchi C, Myoui A, Hashimoto N, *et al.* Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res*, 2002, **17**(10): 1785-1794
- [26] Ge C, Xiao G, Jiang D, *et al.* Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol*, 2007, **176**(5): 709-718

Inhibition of ERK1/2 Kinase Enhances BMP9-induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells*

SONG Tao, HE Juan-Wen, WANG Jin, TANG Min, LUO Jin-Yong**

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

Abstract In our previous reports, BMP9 has shown potent function to induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, however, the underlying molecular mechanism of BMP9-induced osteogenesis is needed to be deep explored. In this study, BMP9 was introduced into mesenchymal stem cells by recombinant adenoviruses protocol, then, *in vitro* and *in vivo* assays were conducted to evidence whether BMP9 can regulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through ERK1/2 kinase pathway. The results showed that BMP9 can activate ERK1/2 kinase through increase the phosphorylated form of ERK1/2 kinase. ERK1/2 kinase inhibitor PD98059 can increase the ALP activity, OPN expression and calcium deposition of C3H10T1/2 cells induced by BMP9. Furthermore, PD98059 also led to enhancement of Runx2 activity and activation of canonical Smad pathway stimulated by BMP9. When ERK1/2 kinase was silenced by RNA interference, BMP9-activated Smad pathway was further enhanced. Moreover, ALP activity, calcium deposition and *in vivo* ectopic bone formation were accordingly increased along with knockdown of ERK1/2 kinase. Taken together, those results intensively suggested that BMP9 can activate ERK1/2 kinase, and inhibition of ERK1/2 kinase can enhance BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. ERK1/2 are highly capable of negatively regulate BMP9-induced osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells.

Key words bone morphogenetic proteins 9, ERK1/2, mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, mitogen activated protein kinase

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00170

*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: luojinyong888@hotmail.com

Received: April 6, 2012 Accepted: July 6, 2012