

骨形态发生蛋白 9 通过 JNKs 激酶途径调控 间充质干细胞成骨分化*

徐 静¹⁾ 赵 丹^{1, 2)} 王 箭¹⁾ 王文娟¹⁾ 罗进勇^{1)**}

(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)

摘要 前期研究发现骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)除了通过经典 Smad 途径外, 也可通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)中的 p38 激酶途径调控间充质干细胞成骨分化. 本研究继续探讨 MAPKs 的重要成员 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNKs)对于 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的调控作用. 利用 BMP9 重组腺病毒感染间充质干细胞, 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 JNKs 激酶途径调控间充质干细胞成骨分化. 结果表明: BMP9 可通过促进 JNKs 激酶磷酸化而导致其活化; JNKs 抑制剂 SP600125 可抑制由 BMP9 诱导的间充质干细胞的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和骨钙素(osteocalcin, OCN)表达以及钙盐沉积; 利用抑制剂 SP600125 抑制 JNKs 激酶活性后, BMP9 诱导 Runx2 的表达和转录活性, 以及 Smad 经典途径的激活也相应受到抑制; RNA 干扰导致 JNKs 基因沉默同样也可抑制 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化以及裸鼠皮下异位成骨. 因此, BMP9 可通过活化 JNKs 激酶途径, 从而调控间充质干细胞成骨分化.

关键词 骨形态发生蛋白 9, JNKs, 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, R34

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00620

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是属于中胚层的一类多能干细胞, 多存在于骨髓, 具有强大的自我更新能力和多向分化潜能, 在适宜的条件下可向成骨细胞、肌细胞、软骨细胞、基质细胞、肝细胞等多种细胞分化^[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, 因而广泛应用于生物工程和再生医学研究中^[1-3], 如在骨再生的研究中, 就经常用间充质干细胞作为种子细胞^[4-5]. 有多种细胞因子参与调控间充质干细胞的成骨分化, 其中, 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是研究最早和最有潜力的细胞因子. BMPs 是转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族的重要成员, 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].

骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic proteins 9,

BMP9)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]. 但是对于 BMP9 在骨发育及骨再生中的作用, 长期以来都缺乏研究和了解. 近来的相关研究工作证明: BMP9 也具有较强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, 如 BMP2 和 BMP7 等^[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, 目前却缺乏深入了解.

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein

* 国家自然科学基金(81272006, 31071304)和重庆市基础与前沿研究计划(cstc2013jcyjA10061)资助项目.

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2013-07-04, 接受日期: 2013-09-02

kinases, MAPKs)是一类丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 在几乎所有细胞中均存在. MAPKs 家族主要有四个成员即 ERK1/2、ERK5、p38 和 JNKs^[15], 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作用^[16-19]. 本课题组最新研究发现, BMP9 可以通过活化 MAPKs 中的 p38 激酶调控间充质干细胞成骨分化^[20]. 提示 MAPKs 家族成员在 BMP9 诱导成骨分化的过程中发挥了重要作用. 本研究则继续对于 MAPKs 家族的另一重要成员 JNKs 进行了分析. 首先确认在间充质干细胞中 JNKs 激酶可被 BMP9 活化, 再利用 JNKs 选择性抑制剂 SP600125 阻断 JNKs 激酶活性, 以及 RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)抑制 JNKs 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 JNKs 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 材料与方法

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)由课题组分离保存; BMP9 腺病毒 Ad-BMP9、空载腺病毒 Ad-GFP 由本课题组构建和保存; JNKs 干扰腺病毒(AdR-si-JNKs)和对照腺病毒(AdR-si-NC), 荧光素酶报告质粒 p12SBE-Luc、pBG2-AP1-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; JNKs 抑制剂 SP600125 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.

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, 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; 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.

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)(sc-21742)和骨钙素(osteocalcin, OCN)(sc-23790)一抗均购自 Santa cruz 公司; Phosphor-JNKs(p-JNKs, #4668)一

抗购自 Cell Signaling 公司; 总 JNKs(#9252)一抗购自 Cell Signaling 公司; Phosphor-Smad1/5/8(p-Smad1/5/8, #9511)一抗购自 Cell Signaling 公司; 总 Smad1/5/8(sc-6031-R)一抗购自 Santa cruz 公司; Runx2(#8486)一抗购自 Cell Signaling 公司; β -actin(sc-47778)一抗购自 Santa cruz 公司.

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 SP600125 预处理 4 h, 或加入适量 AdR-si-JNKs(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).

1.2.2 蛋白质印迹分析. 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 的维生素 C 和 10 mmol/L 的 β -磷酸甘油. 用 SP600125 预处理 4 h, 或加入适量 AdR-si-JNKs(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, 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.

1.2.4 荧光素酶报告基因实验. 接种细胞至 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, 或 pBG2-AP1-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,

添加各种处理因素, 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 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-JNKs(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, 用 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 100U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 PBS 重悬细胞沉淀. 用 1 ml 注射器将 50 μ l 细胞悬液接种于每只 BALB/c 裸鼠背部, 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 染色和 Masson Tricrome 染色观察包块内的成骨情况, 成像保存. Masson Tricrome 染色采用 Image-Pro Plus 图像分析骨成熟度.

1.2.6 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 促进间充质干细胞中 JNKs 激酶的活化

首先, 利用蛋白质印迹检测 BMP9 刺激间充质干细胞株 C3H10T1/2 后, JNKs 激酶的总蛋白水平和磷酸化水平. 结果发现, BMP9 腺病毒感染 C3H10T1/2 细胞 36 h 后, JNKs 的总蛋白水平无明显变化, 但其磷酸化水平明显增加, 而 JNKs 抑制剂 SP600125 则可以使 BMP9 诱导的 JNKs 磷酸化减弱(图 1a). 在 C2C12 和 MEFs 细胞中, BMP9 均可促进 JNKs 的磷酸化(图 1b, c). JNKs 可以磷酸化转录因子 AP1, 从而导致其活化^[21], 荧光素酶报告质粒 pGB2-AP1-luc 在报告基因前插入了 AP1 启动子区域中的 JNKs 反应元件(JNKs-responsive elements)序列, 通过荧光素酶的活性变化可以反映 JNKs 的激活程度. 结果显示: BMP9 可以使 pGB2-AP1-luc 荧光素酶增加, 进一步提示 BMP9 可活化 JNKs, 而 SP600125 则可以抑制 BMP9 所诱导的荧光素酶活性($P < 0.01$, 图 1d). 由此提示: BMP9 可以在间充质干细胞中活化 JNKs 激酶途径. 而活化的 JNKs 是否可以调控 BMP9 诱导的间充质细胞成骨分化, 值得进一步关注.

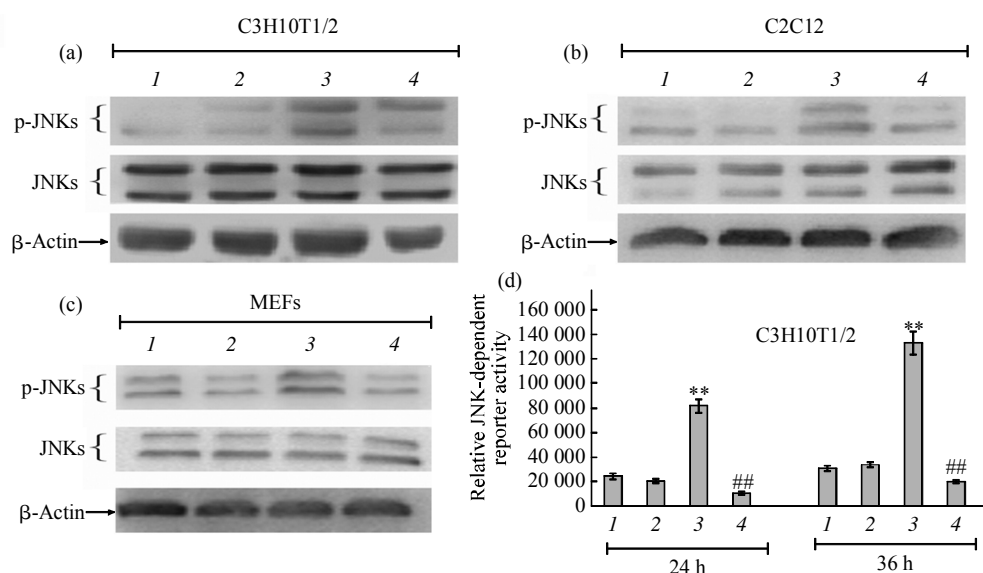


Fig. 1 BMP9 activated JNKs kinase in MSCs

(a) C3H10T1/2 cells were infected with Ad-BMP9 or Ad-GFP virus. At 36 h after infection, cells were lysed and subjected to Western blot. (b) C2C12 cells were infected with Ad-BMP9 or Ad-GFP virus. At 36 h after infection, cells were lysed and subjected to Western blot. (c) MEFs cells were infected with Ad-BMP9 or Ad-GFP virus. At 36 h after infection, cells were lysed and subjected to Western blot. (d) BMP9 induced activation of JNKs in C3H10T1/2 cells detected by luciferase reporter assay. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ of triplicates experiments. ** $P < 0.01$ vs GFP; ## $P < 0.01$ vs BMP9. 1: Blank; 2: GFP; 3: BMP9; 4: BMP9+SP(30 μ mol/L).

2.2 阻断 JNKs 激酶活性可抑制由 BMP9 诱导的间充质干细胞早期成骨分化

课题组前期工作已经证实, BMP9 可以促进 p38 激酶活化, 且抑制 p38 激酶可使 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化减弱^[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. 本研究发现 BMP9 也可促进间充质干细胞中 JNKs 激酶的活化. 那么, 作为 MAPKs 的一员, JNKs 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, 利用不同浓度(10、20、30 $\mu\text{mol/L}$)的 JNKs 激酶抑制剂 SP600125 预处理 C3H10T1/2 细胞, 再

给予 BMP9 的刺激, 在 BMP9 刺激 7 天后检测早期成骨指标 ALP 活性, 结果表明: SP600125 可抑制由 BMP9 诱导的早期成骨指标 ALP 的活性, 且随着抑制剂 SP600125 剂量的增加, ALP 活性的受抑制程度也相应增加($P < 0.01$, 图 2a, b). 在 MEFs 和 C2C12 细胞中也有类似结果($P < 0.01$, 图 2c). 因此, JNKs 激酶的选择性抑制剂 SP600125 可以剂量依赖性地抑制由 BMP9 诱导的间充质干细胞早期成骨分化. 故推测 JNKs 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 一致, 是正向调控作用.

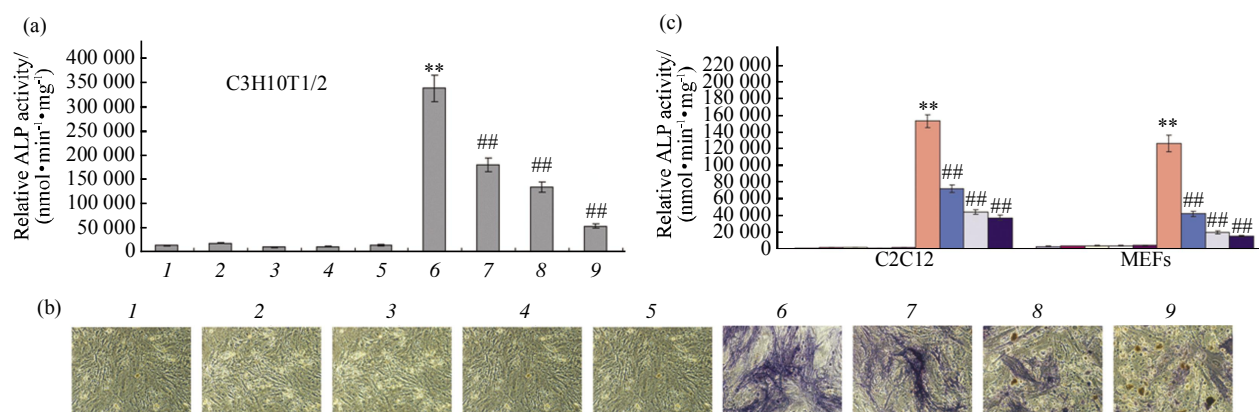


Fig. 2 Effect of the JNKs inhibitor SP600125 on BMP9-induced early osteogenic differentiation of MSCs

(a) SP600125 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; $^{##}P < 0.01$ vs BMP9. (b) SP600125 inhibited BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cell in a dose-dependent manner determined by ALP staining assay, Magnification, 100. (c) SP600125 inhibited BMP9-induced ALP activity of C2C12 and MEFs cells detected by determined by ALP quantitative assay. Data are the $\bar{x} \pm s$ of triplicates experiments. $**P < 0.01$ vs GFP; $^{##}P < 0.01$ vs BMP9. 1: Blank; 2: SP(10 $\mu\text{mol/L}$); 3: SP(20 $\mu\text{mol/L}$); 4: SP(30 $\mu\text{mol/L}$); 5: GFP; 6: BMP9; 7: BMP9+SP(10 $\mu\text{mol/L}$); 8: BMP9+SP(20 $\mu\text{mol/L}$); 9: BMP9+SP(30 $\mu\text{mol/L}$). $\square$: Blank; $\blacksquare$: SP(10 $\mu\text{mol/L}$); $\square$: SP(20 $\mu\text{mol/L}$); $\square$: SP(30 $\mu\text{mol/L}$); $\blacksquare$: GFP; $\blacksquare$: BMP9; $\blacksquare$: BMP9+SP(10 $\mu\text{mol/L}$); $\blacksquare$: BMP9+SP(20 $\mu\text{mol/L}$); $\blacksquare$: BMP9+SP(30 $\mu\text{mol/L}$).

2.3 阻断 JNKs 激酶活性可抑制 BMP9 诱导的间充质干细胞晚期成骨分化

作为早期成骨分化的指标, ALP 并不能准确反映细胞的晚期分化情况. 而钙盐沉积、骨桥蛋白以及骨钙蛋白则是细胞晚期成骨分化的经典检测指标. 因此, 利用 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 SP600125 预处理 C3H10T1/2 细胞, Ad-BMP9 腺病毒感染细胞. 在 BMP9 腺病毒感染 21 天后, 茜素红 S 染色检测钙盐沉积情况, 结果发现, 与对照组相比,

SP600125 预处理组中由 BMP9 诱导的钙盐沉积明显下降(图 3a); 而通过 Western blot 检测则发现: 在 SP600125 处理组中, BMP9 诱导的 OPN 和 OCN 蛋白表达明显减少(图 3b), 这表明 SP600125 抑制了由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞的 OPN 和 OCN 表达. 综合该部分实验结果表明: 在利用 SP600125 阻断 JNKs 激酶活性后, 可抑制 BMP9 诱导的间充质干细胞晚期成骨分化.

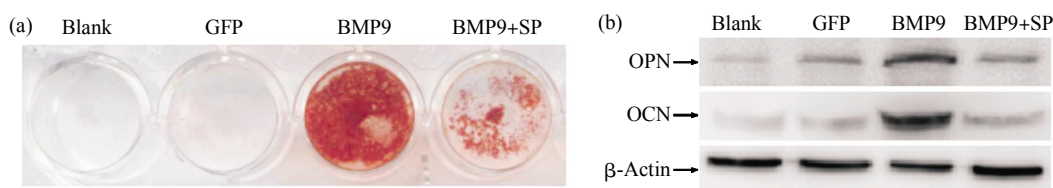


Fig. 3 Effect of the JNKs inhibitor SP600125 on BMP9-induced late osteogenic differentiation of MSCs

(a) SP600125 (30 μ mol/L) decreased BMP9-induced calcium deposition of C3H10T1/2 cells detected by Alizarin Red S. (b) SP600125 (30 μ mol/L) decreased BMP9-induced OPN and OCN expression of C3H10T1/2 cells detected by Western blot.

2.4 阻断 JNKs 激酶可抑制 BMP9 诱导的成骨关键转录因子 Runx2 的表达和转录活性

Runx2 是控制成骨的关键转录因子, 在多条成骨相关信号通路中起着枢纽作用. BMP9 可通过活化 Runx2 促进间充质干细胞成骨分化^[14]. 那么, 阻断 JNKs 激酶是否会使 BMP9 诱导的 Runx2 的活性发生变化呢? 为此, 在抑制 JNKs 活性后, 利用 Western blot 检测了 Runx2 蛋白表达的变化, 结果发现 SP600125 可使 BMP9 诱导的 Runx2 蛋白表达

减弱(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^[14], 因此利用 p(6OSE)-Luc 检测了 Runx2 的转录活性变化. 结果发现 BMP9 可以活化 Runx2, 从而启动荧光素酶表达, 而 SP600125 则可抑制 BMP9 诱导的 p(6OSE)-Luc 的荧光素酶活性($P < 0.01$, 图 4b). 由此表明阻断 JNKs 激酶可抑制 BMP9 诱导的 Runx2 的表达及其转录活性.

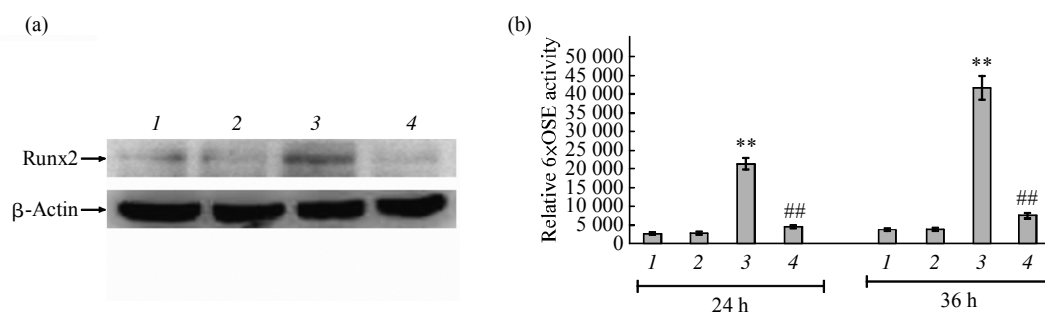


Fig. 4 Effect of the JNKs inhibitor SP600125 on BMP9-induced protein expression and transcriptional activity of Runx2 in C3H10T1/2 cells

(a) SP600125 inhibited BMP9-induced Runx2 protein expression of C3H10T1/2 cells detected by Western blot. (b) SP600125 inhibited BMP9-induced Runx2 transcriptional activity in C3H10T1/2 cells detected by luciferase reporter assay. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ of triplicates experiments. ** $P < 0.01$ vs GFP; ## $P < 0.01$ vs BMP9. 1: Blank; 2: GFP; 3: BMP9; 4: BMP9+SP(30 μ mol/L).

2.5 阻断 JNKs 激酶活性可抑制 BMP9 诱导的 Smad 经典信号途径的激活

BMP9 可以激活经典的 Smad 信号, 从而促进间充质干细胞成骨分化^[14]. 本课题组已经报道, p38 激酶对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化的调控作用可能是通过影响经典的 Smad 信号实现的^[20]. 我们推测, JNKs 很有可能也影响经典的

Smad 信号, 从而发挥对 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的调控作用. 为证实此推测, 利用蛋白质印迹检测发现: SP600125 预处理后, 由 BMP9 所诱导的 Smad1/5/8 磷酸化水平降低(图 5a). 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^[14, 20]. 荧

光素酶报告基因实验结果显示: SP600125 可抑制 BMP9 所诱导的 Smad 经典途径的激活, 从而使荧光素酶活性降低($P < 0.01$, 图 5b), 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 JNKs 激酶活性的确可抑制由 BMP9 诱导的 Smad 经典信号途径的激活。

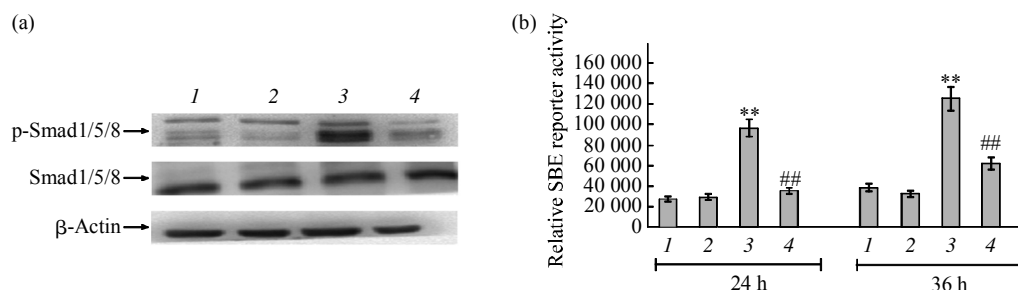


Fig. 5 Effect of the JNKs inhibitor SP600125 on BMP9-induced activation of canonical Smad pathway in C3H10T1/2 cells
(a) SP600125 inhibited BMP9-induced phosphorylation of Smad1/5/8 in C3H10T1/2 cells detected by Western blot. (b) SP600125 inhibited BMP9-induced SBE-controlled luciferase activity of C3H10T1/2 cells. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ of triplicates experiments. ** $P < 0.01$ vs GFP; ## $P < 0.01$ vs BMP. 1: Blank; 2: GFP; 3: BMP9; 4: BMP9+SP(30 $\mu\text{mol/L}$).

2.6 JNKs 基因沉默可抑制 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化和 Smad 途径激活

利用 SP600125 抑制 JNKs 活性后, 可抑制 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化。因此, JNKs 极可能对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化

起正向调控作用。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 JNKs 激酶进行了有效的基因沉默(图 6a)。并进一步分析了 JNKs 基因沉默后, 对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化的影响。结果发现: 在 JNKs 被有效沉

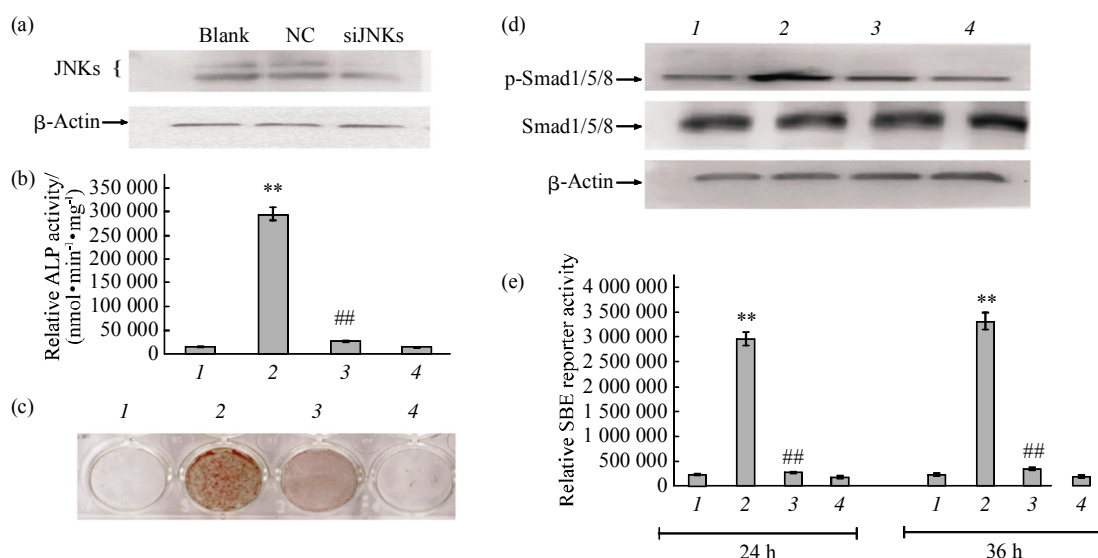


Fig. 6 Gene silence of JNKs blocked BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cells

(a) The expression of JNKs was reduced by RNA interference determined by Western blot. (b) Gene silence of JNKs decreased BMP9-induced ALP activity of C3H10T1/2 cells determined by ALP quantitative assay. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ of triplicates experiments. ** $P < 0.01$ vs Blank; ## $P < 0.01$ vs BMP9+NC. (c) Gene silence of JNKs inhibited BMP9-induced calcium deposition of C3H10T1/2 cells determined by Alizarin Red S staining assay. Magnification, $\times 100$. (d) Gene silence of JNKs inhibited BMP9-induced phosphorylation of Smad1/5/8 determined by Western blot. (e) Gene silence of JNKs inhibited BMP9-induced activation of Smad pathway determined by luciferase assay. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ of triplicates experiments. ** $P < 0.01$ vs Blank; ## $P < 0.01$ vs BMP9+NC. 1: Blank; 2: BMP9+NC; 3: BMP9+siJNKs; 4: siJNKs.

默后, BMP9 所诱导的早期成骨指标 ALP 活性和晚期成骨指标钙盐沉积均相应减弱(图 6b, c). Western blot 和荧光素酶报告基因实验发现, 在 JNKs 基因沉默后, BMP9 诱导的 Smad1/5/8 的磷酸化减弱(图 6d), 其转录活性也相应降低($P < 0.01$, 图 6e), 提示 BMP9 所激活的 Smad 经典途径受到了抑制. 因此, JNKs 基因沉默可抑制由 BMP9 诱导的间充质干细胞体外成骨分化和 Smad 经典途径的激活.

2.7 JNKs 基因沉默可抑制 BMP9 诱导的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 JNKs 激酶可使 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化减弱. 为确认阻断 JNKs 激酶后, 对于 BMP9 诱导的间充质干细胞异位骨形成的影响, 分别将 JNKs 干扰腺病毒 AdR-si-JNKs(或对照 AdR-si-NC 腺病毒)和 BMP9 腺病毒共感染 C3H10T1/2 细胞(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-JNKs 组皮下包块比 BMP9+si-NC 组体积明显减小($P < 0.01$, 图 7b, c). 皮下包块经过石蜡包埋、切片, 进行 H&E 和 Masson Trichrome 染色, 在 BMP9+si-NC 组, 发现活跃的成骨情况, H&E 染色显示为大量成熟的骨基质 (bone matrix, BM), 并且可见排列整齐的成骨细胞 (osteoblast, OB). 而在 JNKs 表达受到抑制后, 由 BMP9 诱导的骨基质生成量减少, 而且有较多的未分化细胞存在(图 7d); Masson Trichrome 染色显示, si-JNKs 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, 其骨形成的成熟度偏低(图 7e, f). 因此, 动物实验和组织化学染色提示: JNKs 基因沉默可抑制 BMP9 所诱导的间充质干细胞的异位成骨, 使得骨生成的数量、质量和成熟度均减少.

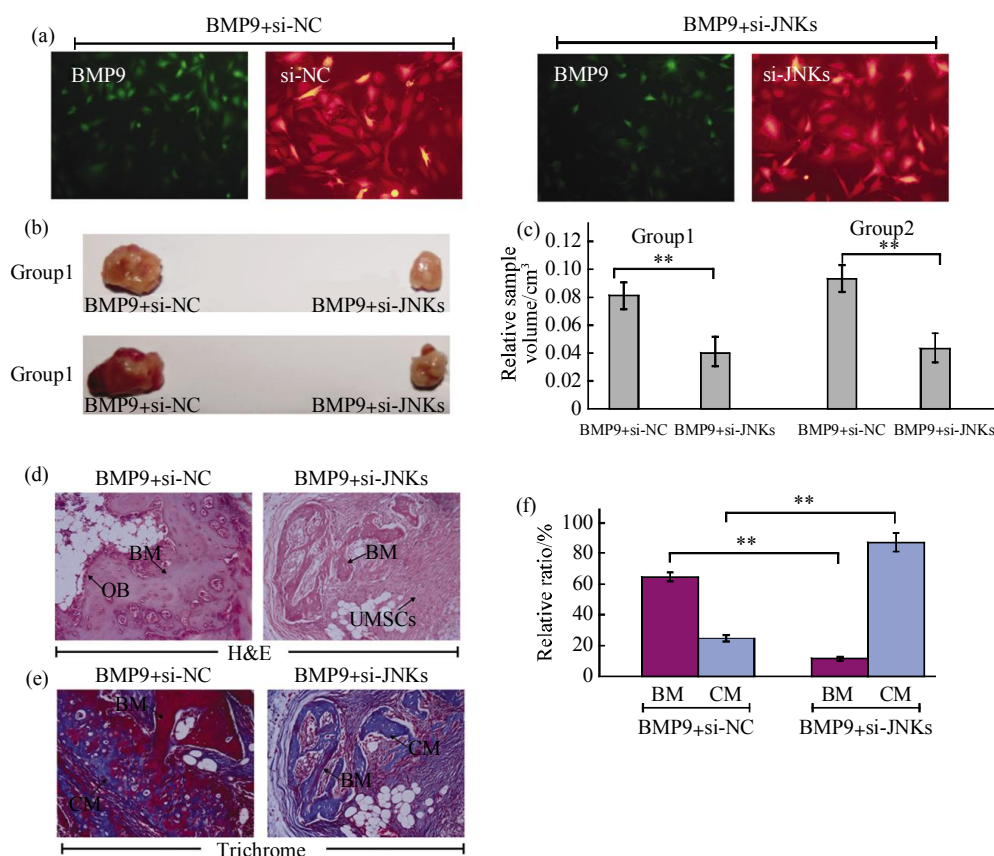


Fig. 7 Inhibition of BMP9-induced ectopic bone formation by gene silence of JNKs

(a) Co-infection efficiency of Ad-BMP9 and AdR-si-JNKs (or AdR-si-NC) to C3H10T1/2 cells under a fluorescence microscope. (b) Macrographic images of ectopic bone mass. (c) Total volume of retrieved samples. $**P < 0.01$. (d) H&E staining of retrieved samples. Magnification, $\times 150$. (e) Trichrome staining of retrieved samples. (f) Relative quantitative result of trichrome staining. BM: Bone matrix; UMSCs: Undifferentiated mesenchymal stromal cells; OB: Osteoblast; CM: Chondroid matrix. Magnification, $\times 100$.

3 讨 论

在骨再生和骨修复中, BMPs 作为诱导骨形成的细胞因子, 发挥着重要的作用. 目前证实 BMPs 首先与其相关的 I 型和 II 型受体结合, 处于持续活化状态的 II 型受体随之磷酸化 I 型受体导致其活化, 并进一步活化受体依赖型 Smad(R-Smad, 对于 BMPs 来说, 主要为 Smad1/5/8). 活化的 R-Smad 与 Smad4 结合形成复合物, 并转移至核内继而激发下游信号转导, 从而发挥诱导和调节骨形成等功能, 这就是 BMPs 的经典 Smad 信号途径^[2]. 除了经典 Smad 信号途径外, BMPs 还可以激活 MAPKs 途径, 且 MAPKs 途径的激活对于 BMPs 发挥诱导成骨的功能起着重要的调控作用^[16-19, 23-24].

BMP9 是一种强效的诱导骨形成的细胞因子, 但对于其诱导成骨具体的分子机制仍不明确. 本课题组研究证实 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化相关的 I 型受体是 ALK1 和 ALK2^[25], 而与 BMP9 诱导成骨相关的 II 型受体为 BMPRII、ActRII 和 ActRIIB^[26]. 而且还证实 BMP9 可以活化 Smad1/5/8, 从而激活 Smad 途径^[14, 25-26]. 由此表明, BMP9 与其相关受体结合后, 可通过经典 Smad 途径传递信号和发挥功能. 除了经典的 Smad 途径以外, 作为成骨性 BMPs 中的重要一员, BMP9 是否如 BMP2、BMP4 和 BMP7 等一样, 也可通过激活 MAPKs 信号途径而调控间充质干细胞成骨分化, 则一直缺乏相关报道. 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 诱导的间充质干细胞成骨分化^[20]. 提示 MAPKs 信号途径确实对于 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化起着重要的调控作用.

MAPKs 信号途径根据最终执行功能的激酶亚类不同, 又至少包括 ERK1/2、JNKs、p38 和 ERK5 四种成员. 那么, MAPKs 的其他成员是否也可以调控 BMP9 的成骨作用呢? 本研究继续分析了 MAPKs 家族成员 JNKs 对 BMP9 诱导成骨分化的调控作用. 蛋白质印迹和荧光素酶报告基因实验检测发现, BMP9 刺激之后, 间充质干细胞中 JNKs 激酶的磷酸化水平和转录调控活性均增加, 并由此证实 BMP9 可活化 JNKs. 推测 BMP9 很可能通过 JNKs 激酶途径调控间充质干细胞成骨分化.

为证实此推测, 首先选用了 JNKs 激酶的抑制剂 SP600125 处理间充质干细胞, 结果发现 SP600125 可抑制 BMP9 诱导的间充质干细胞早期

和晚期成骨分化. 而且, SP600125 抑制 JNKs 激酶活性后, 由 BMP9 诱导的成骨关键转录因子 Runx2 的表达和转录活性被抑制, Smad 经典途径的激活也相应减弱. 这提示 BMP9 可通过活化 JNKs 激酶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 JNKs 激酶的表达后, 也发现由 BMP9 诱导间充质干细胞的 ALP 活性、钙盐沉积和 Smad 途径的活化均明显减弱, 与使用抑制剂 SP600125 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: JNKs 激酶基因沉默后, 可抑制 BMP9 诱导的间充质干细胞在裸鼠皮下异位成骨, 使得骨基质的生成量减少, 而且骨成熟度也降低.

JNKs 是 MAPKs 中的一员, 在调节细胞增殖、分化、凋亡中具有重要作用. JNKs 激酶在 BMPs 诱导成骨分化和骨形成的作用也早有报道. BMP2 可通过激活 JNKs 而增加调控成骨的关键转录因子 Osx 的表达^[24]. 最近的研究还表明, BMP2 可激活 JNKs 从而促进间充质干细胞 C3H10T1/2、C2C12 和成骨前体细胞的成骨分化^[17, 27-28]. 这部分结果提示, JNKs 可能对于成骨分化起正向调控作用. 但是, 也有 JNKs 在体外负向调节成骨分化的研究报道, 如 Huang 等^[29]发现, JNKs 通过磷酸化 Runx2 的 104 位丝氨酸, 从而负向调节 BMP2 诱导的间充质干细胞成骨分化. 以上这些体外研究结果使得 JNKs 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. 本研究则发现: BMP9 可活化 JNKs 激酶途径, 阻断 JNKs 可抑制 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化, 因此, JNKs 极可能正向调控 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化.

BMP9 诱导成骨分化和骨形成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. 本研究对 MAPKs 的重要成员 JNKs 激酶在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化中的调控作用及机理进行了初步分析. 在后续研究中, 将构建 JNKs 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 JNKs 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 JNKs 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,

从而深入解析 JNKs 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 诱导的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 MAPKs 途径中的 p38 和 JNKs 激酶, 而且 p38 和 JNKs 均正向调控 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化。课题组推测 p38 和 JNKs 途径可能对于 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化同等重要, 因为只要抑制 p38 和 JNKs 其中之一, 由 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化即明显受抑制。p38 和 JNKs 的调控作用可能与 Smad 信号途径的活化及成骨关键调控基因 Runx2 等有关, 但是还需要进一步实验来证实。课题组在研究工作中也对 MAPKs 另一重要成员 ERK1/2 进行了初步分析, 结果发现, BMP9 也可促进 ERK1/2 磷酸化, 但是 ERK1/2 可能是负向调控 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化, 因为阻断 ERK1/2 可以增强 BMP9 的成骨活性(数据未显示, 另文发表)。因此, 后续还将继续深入分析 MAPKs 各成员参与调控 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的分子机制。总之, BMP9 通过 MAPKs 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, 对于该信号网络中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): 1291-1298
Zhang Y, Wen W, Luo J Y. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(10): 1291-1298
- [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, Seghatolleslami 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] 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] Widmann C, Gibson S, Jarpe M B, *et al.* Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 1999, **79**(1): 143-180
- [22] Chen D, Zhao M, Mundy G R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 2004, **22**(4): 233-241

- [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] 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
- [25] 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
- [26] 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
- [27] Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res*, 2003, **18**(11): 2060–2068
- [28] Gallea S, Lallemand F, Atfi A, *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone*, 2001, **28**(5): 491–498
- [29] Huang Y F, Lin J J, Lin C H, *et al.* c-Jun N-terminal kinase 1 negatively regulates osteoblastic differentiation induced by BMP2 *via* phosphorylation of Runx2 at Ser104. *J Bone Miner Res*, 2012, **27**(5): 1093–1105

BMP9 Regulates Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through JNKs Kinase Pathway*

XU Jing¹⁾, ZHAO Dan^{1,2)}, WANG Jian¹⁾, WANG Wen-Juan¹⁾, LUO Jin-Yong^{1)**}

⁽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)

Abstract In addition to Smad pathway, our previous study has shown that BMP9 can induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) through p38 MAPKs pathway. In this study, we explore the possible involvement and detail role of JNKs (c-Jun N-terminal kinases) in BMP9-induced osteogenic differentiation of MSCs. BMP9 was introduced into MSCs by recombinant adenoviruses protocol, then, *in vitro* and *in vivo* assays were conducted to detect whether BMP9 can induce osteogenic differentiation of MSCs through JNKs kinase pathway. The results showed that BMP9 can activate JNKs kinase through increase the phosphorylated form of JNKs kinase. JNKs kinase inhibitor SP600125 can inhibit ALP activity, OPN and OCN expression, as well as calcium deposition induced by BMP9 in MSCs. Furthermore, SP600125 also led to a decrease in BMP9-induced Runx2 activity and canonical Smad signaling. Moreover, when JNKs kinase was silenced by RNA interference in MSCs, BMP9-induced osteogenic differentiation *in vitro* and ectopic bone formation *in vivo* were accordingly inhibited along with knockdown of JNKs. Taken together, those results intensively suggested that BMP9 can induce and regulate osteogenic differentiation of MSCs through activating JNKs kinase pathway.

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

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00620

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81272006, 31071304) and The Natural Science Foundation Project of Chongqing Science and Technology Commission (cstc2013jcyjA10061).

**Corresponding author.

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

Received: July 4, 2013 Accepted: September 2, 2013