

论著

文章编号:1000-5404(2013)04-0328-04

全反式维甲酸增强骨形态蛋白9诱导间充质干细胞成骨分化作用

黄帆¹, 刘映孜², 杨秋璐², 周龙洋², 周岐新², 罗进勇³, 何百成², 邓忠良¹ (400010 重庆, 重庆医科大学附属第二医院骨科¹; 400016 重庆, 重庆医科大学: 药理教研室², 检验学院³)

[摘要] 目的 研究全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对骨形态蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导间充质干细胞成骨分化的影响及可能机制。方法 采用组织化学染色检测各组第5、7天碱性磷酸酶活性变化。Western blot检测各组第9、11天骨桥素蛋白表达水平。茜素红染色检测各组第14、20天钙盐沉积水平。采用Western blot检测各组Smad-1/5/8蛋白磷酸化水平,以及用荧光素酶报告质粒检测BMPR-Smad信号通路的活化程度。结果 ATRA及BMP9均诱导C3H10T1/2细胞碱性磷酸酶活性升高,但ATRA合并BMP9组碱性磷酸酶活性明显强于单用ATRA或BMP9组;BMP9合并ATRA组骨桥素蛋白表达水平高于BMP9组;BMP9合并ATRA较单用BMP9能明显促进钙盐沉积。BMP9合并ATRA组Smad1/5/8磷酸化水平明显强于单用BMP9组,BMPR-Smad报告质粒荧光素酶活性也呈相同变化趋势($P < 0.01$)。结论 ATRA能增强BMP9诱导间充质干细胞成骨分化的作用,其机制可能与促进Smads信号转导活性有关。

[关键词] 全反式维甲酸;骨形态蛋白9;间充质干细胞;Smad信号

[中图分类号] R322.71;R965;R986 **[文献标志码]** A

All-trans retinoic acid enhances BMP9-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells

Huang Fan¹, Liu Yingzi², Yang Qiuju², Zhou Longyang², Zhou Qixin², Luo Jinyong³, He Baicheng², Deng Zhongliang¹ (¹Department of Orthopaedics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; ²Department of Pharmacology, ³College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on the osteogenesis induced by bone morphogenetic protein 9 (BMP9) in mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** Histochemical staining was used to test the alkaline phosphatase (ALP) activities when C3H10T1/2 cells were treated with BMP9 and/or ATRA for 5 or 7 d. Then, the protein level of osteopontin in the C3H10T1/2 cells after treatment of BMP9 and/or ATRA for 9 or 11 d was detected by Western blotting. The mineralization in the cells were tested with Alizarin red staining after the treatment for 14 or 20 d. Finally, the activation of BMP-Smad signaling was studied with BMPR-Smad binding site luciferase reporter assay and Western blotting to determine the phosphorylation level of Smad1/5/8. **Results** The activities of ALP were increased by BMP9 and/or ATRA, but the ALP activities in the cells treated by BMP9 and ATRA are more pronounced than that the cells by BMP9 or ATRA alone. ATRA potentiated the osteopontin expression and mineralization induced by BMP9 in C3H10T1/2 cells. ATRA promoted the phosphorylation level of Smad-1/5/8 and increased the luciferase activity of BMPR-Smad luciferase reporter. **Conclusion** ATRA potentiates the osteogenesis induced by BMP9 in MSCs, which may be mediated by increase of the BMP-Smad signaling transduction.

[Key words] all-trans retinoic acid; bone morphogenetic protein; mesenchymal stem cell; Smad signaling

Corresponding author: Deng Zhongliang, Tel:86-23-63693558, E-mail:deng7586@gmail.com

骨折、骨缺损及骨不连接是临床常见的骨科疾病,目前的治疗方法并不能达到理想的治疗效果。组织工程骨是治疗这类疾病的理想材料,间充质干细胞是组

织骨工程中的理想种子细胞,但如何有效促进种子细胞骨向分化是该领域的研究热点之一^[1]。骨形态蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)属于转化生长因子 β 超家族的成员之一,目前认为BMP9是诱导干细胞成骨分化能力最强的因子之一,多种因子能影响BMP9诱导干细胞成骨分化^[2-4]。因此,寻找能促

[通信作者] 邓忠良,电话:(023)63693558, E-mail:deng7586@gmail.com
[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121129.1108.002.html> (2012-11-29)

进 BMP9 诱导干细胞成骨分化能力的因子对组织骨工程发展具有重要意义。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)能促进多种前体细胞分化,已成功用于急性早幼粒细胞白血病的治疗^[5]。但 ATRA 对干细胞成骨分化的作用存在争议^[6-8],本课题组前期研究发现 ATRA 能抑制人骨肉瘤细胞生长,其机制可能与促进人骨肉瘤细胞骨向分化有关^[9]。本研究旨在明确 ATRA 对 BMP9 诱导干细胞成骨分化的影响,为进一步增强 BMP9 诱导干细胞成骨分化寻找一种新的方法,以利于组织骨工程发展和提高临床相关骨疾病的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 试剂及细胞培养

间充质干细胞 C3H10T1/2 购自美国标准培养收集所,全反式维甲酸(ATRA,购自 BIMOL),采用 DMSO 作为溶剂(北京索宝来科技有限公司),碱性磷酸酶染色试剂盒购自 Sigma-Aldrich 公司(Cat # 85L-2),实验所用抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,茜素红(Alizarin Red S)购自成都格雷西亚化学技术有限公司,油红 O(Red-Oil O,购自 Amresco 公司),Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司,用 DMEM 培养基(高糖)培养细胞(含 10% 胎牛血清、100 U/mL 的青霉素及 100 μg/mL 的链霉素),细胞培养条件:5% CO₂ 及 37 °C。

1.2 构建表达绿色荧光蛋白和 BMP9 的重组腺病毒

本实验所用重组腺病毒均采用 Ad-Easy^[10] 系统构建,由芝加哥大学 He 教授提供。构建方法:从 EST 克隆中用 PCR 将目的基因的编码序列扩增,然后克隆到穿梭质粒。最后将穿梭质粒线性化并与含腺病毒骨架序列的质粒进行重组,将重组正确的质粒线性化并转染到 HEK-293 细胞(human embryonic kidney-293)进行病毒包装,得到目的基因编码序列的重组腺病毒,即 GFP 重组腺病毒(Ad-GFP)和 BMP9 重组腺病毒(Ad-BMP9)。

1.3 实验分组

分为 ATRA 处理组、Ad-BMP9 处理组及 ATRA 合并 Ad-BMP9 处理组,以 DMSO 合并 Ad-GFP 处理为对照组。将细胞铺于 24 或 6 孔板时,初始密度为 30%,重组腺病毒感染效率为 20%。

1.4 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色

将细胞种于 24 孔板,按实验分组加入相应处理因素,分别于第 5、7 天进行 ALP 染色。ALP 染色按试剂盒操作说明进行。每组实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测骨桥素(osteopontin, OPN)表达及 Smad-1/5/8 磷酸化

将细胞种于 6 孔板中,待细胞贴壁后按实验分组加入相应处理因素。于第 9、11 天提取各组总蛋白,采用 BCA 法测定总蛋白浓度。用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,按常规方法进行 Western blot 操作。最后采用 ECL 化学发光法显色,使用凝胶成像仪成像。每组实验重复 3 次。

1.6 茜素红染色检测钙盐沉积

参照文献^[11],将细胞种于 24 孔板,待细胞贴壁后按实验分组加入相应处理因素,于给药后第 14、20 天染色。用 2.5%

的戊二醛固定 10 min,吸去固定液后用 PBS(pH = 4.2)清洗 2 次。用 2% 的茜素红染液处理细胞 20 min,然后用上述 PBS 清洗 2 次。每组实验重复 3 次。

1.7 荧光素酶报告质粒实验检测 BMPR-Smad 信号的转录活性

将细胞种于 T25 培养瓶中,待细胞贴壁后利用 lipofectamine 转染 3 μg BMPR-Smad 结合位点报告质粒(BMPR-Smad Binding Sites reporter, p12XSBE-Luc。该报告质粒是以 Smad-1/5/8 与 DNA 结合的序列为基础建立的)^[12],4 h 后换液。12 h 后将细胞消化并种于 24 孔板,细胞贴壁后,按实验分组分别感染 Ad-GFP、Ad-BMP9,并加入相应浓度的 ATRA。24 h 后裂解细胞并按照试剂盒说明进行荧光素酶活性测定。BCA 法测定细胞裂解液总蛋白浓度,用于对荧光素酶活性进行校正。每组实验重复 3 次,结果取平均值。

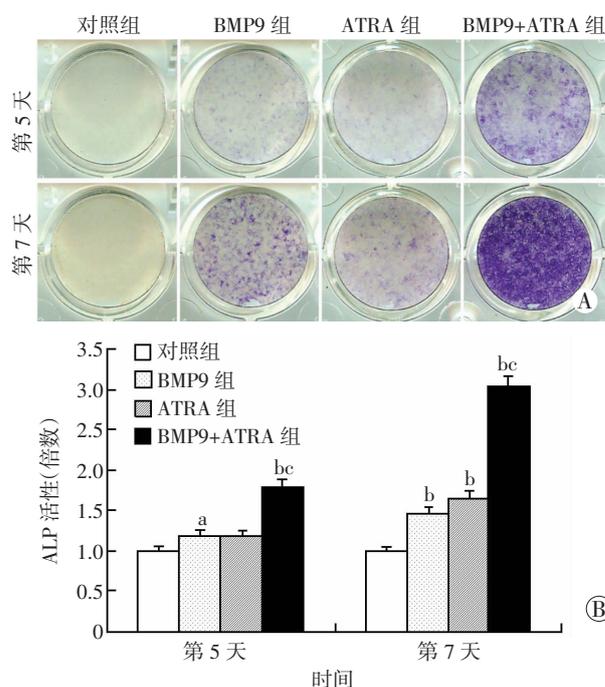
1.8 统计学分析

采用 Excel 2003 进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,*t* 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 ATRA 促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞 ALP 活性升高

BMP9 组 ALP 染色较对照组深(D7 的染色结果更明显);单用 ATRA 组 ALP 染色较 GFP 对照组有所增加($P < 0.01$),但不如单用 BMP9 增加明显($P < 0.05$);BMP9 合并 ATRA 组 ALP 染色明显较 BMP9 组和 ATRA 组深($P < 0.01$)(图 1)。提示 ATRA 对 BMP9 诱导的间充质干细胞 ALP 活性升高具有明显促进作用。



A: ALP 染色观察;B: 半定量分析结果 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.01$, 与 BMP9 组比较

图 1 ATRA 促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞 ALP 活性增加 ($n = 18, \bar{x} \pm s$)

2.2 ATRA 增强 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞 OPN 表达

BMP9 组与 ATRA 组 OPN 蛋白表达水平较对照组明显增加, BMP9 与 ATRA 合并使用组 OPN 表达水平明显高于 BMP9 组或 ATRA 组 (D9 变化更明显, 图 2)。提示 ATRA 能促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞 OPN 表达。

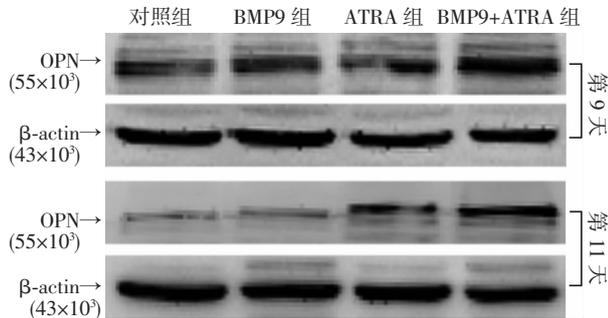
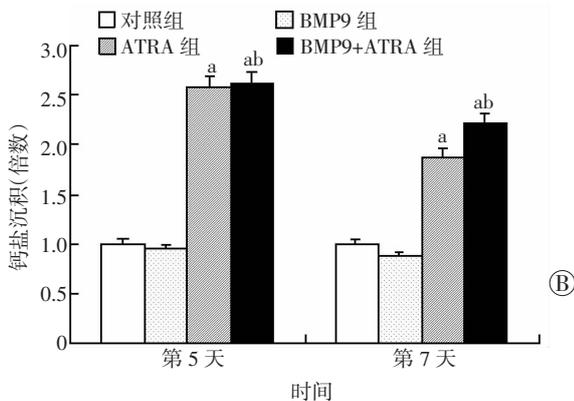
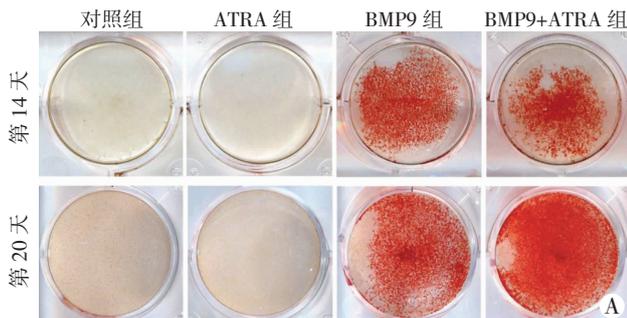


图2 ATRA 促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞骨桥素蛋白表达

2.3 ATRA 增强 BMP9 在 C3H10T1/2 细胞中诱导钙盐沉积

单用 BMP9 组钙盐沉积明显强于对照组 ($P < 0.01$), ATRA 组钙盐沉积与对照组相比无明显区别; BMP9 合并 ATRA 组钙盐沉积与 BMP9 组相比显著增强 (图 3) ($P < 0.01$)。提示 ATRA 能促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞钙盐沉积。

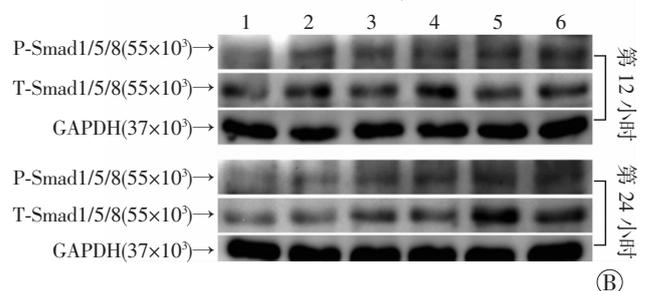
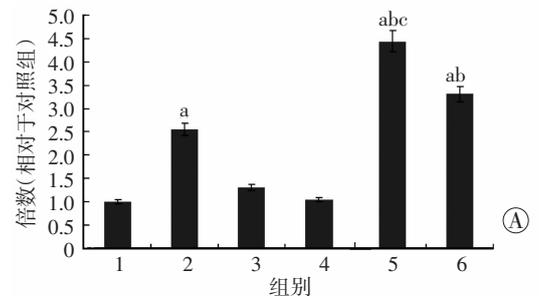


A: 钙盐沉积染色观察; B: 半定量分析结果 a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 与 BMP9 组比较

图3 ATRA 促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞钙盐沉积 ($n = 18, \bar{x} \pm s$)

2.4 ATRA 增强 BMP9 在 C3H10T1/2 细胞中诱导 BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性及促进 Smad-1/5/8 磷酸化

与对照组相比, BMP9 明显增加 BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性 ($P < 0.01$), ATRA 也能增加 BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性 ($P < 0.05$); BMP9 与 ATRA 合用后, BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性较 BMP9 组明显增加 ($P < 0.01$, 图 4A); Smad-1/5/8 磷酸化检测结果也呈现相同变化趋势 (图 4B)



1: 对照组; 2: BMP 组; 3: ATRA (+) 组; 4: ATRA (++) 组; 5: BMP + ATRA (+) 组; 6: BMP + ATRA (++) 组

A: 报告质粒检测 ($n = 12, \bar{x} \pm s$) a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, 与 BMP9 组比较; B: Western blot 检测结果

图4 ATRA 促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞 BMP-Smad 信号活化

3 讨论

本研究发现, 全反式维甲酸 (ATRA) 能明显促进 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化。其机制至少与 ATRA 增强 BMP9 诱导 BMP-Smad 信号转录活性有关。在组织骨工程中, 间充质干细胞是比较理想的种子细胞, 如何促进种子细胞成骨分化是目前亟待解决的关键问题之一^[1]。ATRA 是维生素 A 在体内代谢生成的一类化合物, 介导维生素 A 对个体生长和发育的作用。研究表明 ATRA 能促进干细胞或前体细胞终末分化, 并已成功用于急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 的治疗^[5]。ATRA 对干细胞成骨分化的影响存在争议, 有研究认为 ATRA 能抑制干细胞成骨分化^[6]; 另有研究显示 ATRA 能促进脂肪来源未分化的脂肪细胞以及间充质干细胞分化为成骨

细胞^[7-8]。

骨形态蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)属于转化生长因子 β 超家族成员之一,对于干细胞成骨分化具有重要调控作用^[13]。Kang等^[2]发现除传统的BMP2和BMP7外,BMP4、BMP6和BMP9也能促进间充质干细胞成骨分化,并且BMP9诱导间充质干细胞成骨分化的能力明显强于其他BMP成员。因此,增强BMP9诱导干细胞成骨分化能力的因子具有重要意义。Tang等^[3]发现经典的Wnt/ β -catenin信号在BMP9诱导成骨分化过程中具有重要作用,Chen等^[4]研究表明胰岛素样生长因子-2(Insulin-like Growth Factor 2,IGF-2)能明显增强BMP9诱导的间充质干细胞成骨分化。

前期研究发现,ATRA能抑制骨肉瘤细胞增殖并增强曲格列酮对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用,其机制与ATRA能诱导或协同曲格列酮诱导骨肉瘤细胞骨向分化有关^[9,14]。ATRA对BMP9诱导的间充质干细胞成骨分化的影响尚不清楚,因此本研究通过体外实验,明确ATRA对BMP9诱导间充质干细胞成骨分化的可能影响。结果表明,ATRA单独应用虽然不能诱导间充质干细胞成骨分化,但能明显增强BMP9诱导间充质干细胞成骨分化的能力,即ATRA对BMP9诱导间充质干细胞ALP活性增加、OPN表达及钙盐沉积均具有明显促进作用。机制分析发现,ATRA能增强BMPs-Smad信号转导,与BMP9合用后这种作用进一步增强;通常认为BMP9通过经典的BMPs-Smad信号通路实现对干细胞成骨分化调节^[15]。提示ATRA增强BMP9诱导间充质干细胞成骨分化的作用可能与促进BMPs-Smad信号转导有关。实验结果证实ATRA能促进干细胞成骨分化,与其他文献报道不一致。我们认为出现这种情况可能是与不同实验所用干细胞种类、干细胞所处的分化阶段以及合用的诱导干细胞成骨分化因子不同有关。本研究为有效促进种子细胞成骨分化提供了一种可能更为有效的方法,将有利于组织骨工程的发展。

本研究仅从体外实验证实ATRA能促进BMP9诱导间充质干细胞成骨分化,尚缺乏体内实验证据。本课题组将进一步通过体内实验和组织培养实验,确证ATRA对BMP9诱导干细胞成骨分化的影响及其具体机制,为增强BMP9诱导干细胞成骨分化能力,促进组织骨工程发展提供理论及实验基础。

参考文献:

[1] Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of

multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 218(2): 237-245.

[2] 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[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(17): 1312-1320.

[3] Tang N, Song W X, Luo J, et al. BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/ β -catenin signalling[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 2448-2464.

[4] Chen L, Jiang W, Huang J, et al. Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) potentiates BMP-9-induced osteogenic differentiation and bone formation[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(11): 2447-2459.

[5] Kambhampati S, Verma A, Li Y, et al. Signalling pathways activated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2004, 45(11): 2175-2185.

[6] Wang A, Ding X, Sheng S, et al. Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(3): 435-439.

[7] Oki Y, Watanabe S, Endo T, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can trans-differentiate into osteoblasts *in vitro* and *in vivo* only by all-trans retinoic acid[J]. *Cell Struct Funct*, 2008, 33(2): 211-222.

[8] 胡伶平, 孙奋勇, 董群伟. 全反式维甲酸诱导小鼠间充质干细胞C3H10T1/2表达碱性磷酸酶[J]. *中国实用医药*, 2010, 5(13): 4-6.

[9] He B C, Chen L, Zuo G W, et al. Synergistic antitumor effect of the activated PPAR γ and retinoid receptors on human osteosarcoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(8): 2235-2245.

[10] Luo J, Deng Z L, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1236-1247.

[11] 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 [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(4): 545-559.

[12] Zhao M, Qiao M, Oyajobi B O, et al. E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor α 1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(30): 27939-27944.

[13] Rosen V, Nove J, Song J J, et al. Responsiveness of clonal limb bud cell lines to bone morphogenetic protein 2 reveals a sequential relationship between cartilage and bone cell phenotypes[J]. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(11): 1759-1768.

[14] 牟钰钦, 周龙洋, 杨秋璐, 等. 全反式维甲酸对骨肉瘤细胞143B生长的影响[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(8): 1091-1095.

[15] 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[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(10): 1291-1298.

(收稿:2012-10-13;修回:2012-11-19)

(编辑 龙亮)