

骨科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000394

骨形态发生蛋白-7对胚胎小鼠髓核细胞成骨分化和 Notch 信号表达的影响

张健¹, 欧云生¹, 李开庭¹, 蒋电明¹, 杨博¹, 龚梦嘉², 何通川², 毕杨²

(1. 重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所干细胞实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:探索骨形态发生蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)诱导胚胎小鼠椎间盘髓核细胞(nucleus pulposus, NP)的成骨分化及对经典 Notch 信号通路的调控作用。**方法:**重组腺病毒 BMP-7(recombinant adenovirus-mediated bone morphogenetic protein-7, Ad-BMP-7)、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, Ad-GFP)在 HEK293 细胞中扩增,感染 NP 细胞。实验分为 BMP-7 组($n=3$)、GFP 组($n=3$)、空白组($n=3$)。RT-PCR 检测 BMP-7 的 mRNA 水平表达;Real-time PCR 检测成骨指标骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)以及经典 Notch 信号通路分子的 mRNA 表达水平;Western blot 检测成骨转录因子 Runx2 和 OPN 的蛋白表达水平;采用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)读数和 ALP 染色检测 ALP 活性。**结果:**Ad-BMP-7 和 Ad-GFP 在 HEK293 细胞中高滴度的扩增。NP 细胞中 BMP-7 的基础表达很低,Ad-BMP-7 感染 NP 细胞可高表达 BMP-7,并明显提高 OPN、OPG 的 mRNA 水平表达(OPN: BMP-7 组 21.16 ± 0.45 , GFP 组 1.00 ± 0.07 , 空白组 2.84 ± 1.27 , $F=613.815$, $P=0.000$, BMP-7 组与 GFP 组、空白组比较均 $P=0.000$; OPG: BMP-7 组 2.05 ± 0.37 , GFP 组 1.00 ± 0.06 , 空白组 1.22 ± 0.36 , $F=10.046$, $P=0.012$, BMP-7 组与 GFP 组比较 $P=0.016$, 与空白组比较 $P=0.047$),成骨转录因子 Runx2 及 OPN 的蛋白表达水平也均高于对照组,特异性成骨指标 ALP 的活性明显增强,ALP 染色呈紫蓝色,明显高于对照组(BMP-7 组 $222\ 676.8 \pm 7\ 643.2$, GFP 组 $31\ 455.5 \pm 4\ 930.6$, 空白组 $42\ 407.3 \pm 10\ 926.8$, $F=513.417$, $P=0.000$, BMP-7 组与 GFP 组、空白组比较均 $P=0.000$)。Ad-BMP-7 感染 3 d 可促进 Notch 信号通路 Notch-1、Notch-2、Jag-1、Hey-1 的 mRNA 水平表达增高(Notch-1: BMP-7 组 5.90 ± 0.66 , GFP 组 2.83 ± 0.32 , 空白组 1.00 ± 0.05 , $F=94.574$, $P=0.002$, BMP-7 组与 GFP 组比较 $P=0.003$, 与空白组比较 $P=0.004$; Notch-2: BMP-7 组 150.35 ± 11.78 , GFP 组 1.94 ± 0.46 , 空白组 1.01 ± 0.19 , $F=318.962$, $P=0.001$, BMP-7 组与 GFP 组、空白组比较均 $P=0.000$; Jag-1: BMP-7 组 7.97 ± 0.00 , GFP 组 2.22 ± 0.71 , 空白组 1.00 ± 0.00 , $F=166.476$, $P=0.001$, BMP-7 组与 GFP、空白组比较均 $P=0.000$; Hey-1: BMP-7 组 11.23 ± 0.4 , GFP 组 0.42 ± 0.04 , 空白组 1.00 ± 0.10 , $F=1\ 082.054$, $P=0.000$, BMP-7 组与 GFP 组、空白组比较均 $P=0.000$),但第 7 天回复到基础表达水平,其余信号分子表达无明显差异。**结论:**腺病毒介导的 BMP-7 可诱导 NP 细胞成骨分化,可能与 Notch 信号通路部分分子的一过性上调相关。

【关键词】髓核细胞;骨形态发生蛋白-7;Notch 信号通路;成骨分化;脊柱发育**【中图分类号】**R682.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-12-16

Effects of BMP-7 on osteogenic differentiation of prenatal mouse nucleus pulposus cell and Notch signaling pathway

Zhang Jian¹, Ou Yunsheng¹, Li Kaiting¹, Jiang Dianming¹, Yang Bo¹, Gong Mengjia², He Tongchuan², Bi Yang²

(1. Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Stem Cell Biology and Therapy Laboratory, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of recombinant adenovirus-mediated bone morphogenetic protein-7 (Ad-BMP-7) over-expression on osteogenic differentiation of prenatal mouse intervertebral disc nucleus pulposus (NP) cell, and to explore whether BMP-7 regulates classic Notch signal pathway in this process. **Methods:** Recombinant Ad-BMP-7 and adenovirus-mediated green fluorescent protein (Ad-GFP) were amplified by HEK293 cell and were used to infect NP cells. The experiment was designed into BMP-7 group ($n=3$), GFP group ($n=3$) and blank group ($n=3$). Real-time PCR was performed to detect the mRNA expression level of BMP-7,

real-time PCR was carried out to detect the mRNA expression level of osteogenesis index osteopontin (OPN), osteoprotegerin (OPG) as well as the classic Notch signal pathway members. Western blot was used to detect the protein expressions level of osteogenesis transcription factor Runx2 and OPN. Alkaline phosphatase (ALP) activity was measured by using ALP assay and staining. **Results:** The high titers Ad-BMP-7 and Ad-GFP were generated by adenovirus amplification in HEK293. The basic

作者介绍: 张健, Email: 384251886@qq.com,

研究方向: 脊柱外科。

通信作者: 欧云生, Email: ouyunsheng2001@163.com。

基金项目: 重庆市科学技术委员会科技攻关资助项目(编号: CSTC2012gg-yyjs10018); 重庆市卫生局中医药科技资助项目(编号: 2011-2-97)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1107.002.html>
(2014-10-30)

mRNA expression of BMP-7 was almost undetectable in NP cell. Compared with those in blank group, Ad-BMP-7 mediated over-expression of BMP-7 significantly increased the mRNA expressions of OPN, OPG and the protein expressions of osteogenesis transcription factor Runx2, OPN (OPN: $F=613.815$, $P=0.000$; BMP-7 group vs. GFP group and blank group, $P=0.000$; OPG: $F=10.046$, $P=0.012$; BMP-7 group vs. GFP group $P=0.016$; BMP-7 group vs. blank group, $P=0.047$). The activity of ALP, a specific indicator for osteogenesis in Ad-BMP-7 group was statistically higher than that in blank group ($F=513.417$, $P=0.000$; BMP-7 group vs. GFP group and blank group, $P=0.000$), with enhanced positive purple-blue stained cells. After 3 days of Ad-BMP-7 infection, the mRNA expression of classic Notch signal pathway members Notch-1, Notch-2, Jag-1, Hey-1 significantly increased (Notch-1: $F=94.574$, $P=0.002$; BMP-7 group vs. GFP group, $P=0.003$; BMP-7 group vs. blank group $P=0.004$) (Notch-2: $F=318.962$, $P=0.001$; BMP-7 group vs. GFP group and blank group, $P=0.000$) (Jag-1: $F=166.476$, $P=0.001$, BMP-7 group vs. GFP group and blank group $P=0.000$) (Hey-1: $F=1082.054$, $P=0.000$; BMP-7 group vs. GFP group and blank group, $P=0.000$), while reversed to the baseline at day 7. There was no difference in others Notch signal pathway members among treated groups. **Conclusion:** Adenovirus-mediated BMP-7 over-expression can induce osteogenic differentiation of NP cell, which partly due to transient up-regulation of some classic Notch signal pathway members.

[Key words] nucleus pulposus cell; bone morphogenetic protein-7; notch signaling pathway; osteogenesis differentiation; vertebral column development

先天性脊柱侧弯 (congenital scoliosis, CS) 和青少年特发性脊柱侧弯 (adolescent idiopathic scoliosis, AIS) 是常见的脊柱发育异常性疾病, 但发病原因不明。脊柱结构学说认为成骨异常是脊柱侧弯发生的重要原因^[1]。一些研究表明椎间盘髓核细胞 (nucleus pulposus, NP) 的异常成骨分化可能在脊柱侧弯的发生发展中起着始发的重要作用^[2-3]。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 是多功能生长因子, 具有诱导成骨分化的生物学效应, 其在脊柱发育中也发挥着至关重要的作用^[4]。BMP-7 是其中成骨能力最强的亚型之一, 能诱导祖细胞分化为成骨细胞^[5], 然而 BMP-7 对可能在脊柱发育过程中起关键作用的 NP 细胞的成骨作用研究较少。Notch 信号通路是生物体生长发育过程中一个十分保守的信号通路, 在脊椎发育中扮演着重要角色^[6-8], 研究也提示 BMPs 信号通路与 Notch 信号通路之间存在相互作用^[9-12], 但 BMP-7 与 Notch 的相关性在脊椎发育或脊椎发育相关疾病中没有报道。因此, 本实验首先证实了 BMP-7 对 NP 细胞的成骨分化作用; 在此基础上探讨了 BMP-7 对经典 Notch 信号通路的调控作用。为今后从 BMPs/Notch 信号通路入手, 了解脊椎发育性疾病提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及病毒 胚胎小鼠椎间盘 NP 细胞及重组腺病毒 BMP-7 (recombinant adenovirus-mediated bone morphogenetic protein-7, Ad-BMP-7), 其表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP), 均由美国芝加哥大学分子肿瘤中心何通川

教授馈赠。表达绿色荧光蛋白的重组腺病毒 (adenovirus-mediated green fluorescent protein, Ad-GFP) 由该实验室提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM 高糖培养基和胎牛血清购自美国 HyClone 公司, Polybrene 购自美国 Sigma 公司, real-time PCR 引物序列 (表 1) 由华大基因公司合成。RNA 提取试剂盒和 real-time PCR 反应试剂盒购自北京百泰克公司, PCR mix 购自东盛生物科技有限公司。碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色试剂盒购自美国 Sigma 公司, ALP 读数试剂盒购自美国 Promega 公司。蛋白提取试剂盒和 Western blot 凝胶配制试剂盒购自碧云天公司。PVDF 膜购自美国 Minipore 公司。小鼠来源的 β -actin 抗体、兔来源的 Runx2 多克隆抗体及羊抗兔、兔抗鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司, 兔来源的骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 多克隆抗体购自美国 ImmunoWay 公司。

1.1.3 主要仪器 Thermo 细胞培养箱, T100™ Bio-Rad PCR 反应仪, C1000™ real-time PCR 反应仪, Beckman 低温离心机, Nikon 荧光显微镜, Syngene Gene Genius 全自动凝胶成像仪, Modulus™ 单管型多功能检测仪。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒在 HEK293 细胞中的扩增 在 HEK293 细胞生长至 80%~90% 更换新鲜培养基添加病毒。使病毒感染 48 h 后, HEK293 细胞的 GFP 阳性率 30% 左右, 持续培养共 5~7 d, 90% 以上的细胞变圆, 1/3 以上细胞漂浮时收集细胞, 离心 (4 ℃, 800 r/min × 10 min), 弃去上清。用无血清 DMEM 1 ml 重悬细胞沉淀。-80 ℃ 及 37 ℃ 反复冻融 4 次, 离心 (4 ℃, 5 000 r/min × 10 min) 取上清分装病毒。

1.2.2 重组腺病毒感染 NP 细胞最适感染体积测定 将 NP 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 24 孔板中, 待细胞生长至 60% 时加入终浓度 10 μ g/ml 的 Polybrene 以及不同稀释浓度的 Ad-BMP-7 和 Ad-GFP。倒置荧光显微镜下观察腺病毒感染 48 h 的 GFP 阳性细胞比例 (60%~70%) 以及细胞的形态变化, 确定病毒最适感染体积。

1.2.3 Real-time PCR 验证 BMP-7 mRNA 水平的表达 将 1×10^6 个 NP 细胞种于 6 孔板中, 分为 3 组: BMP-7 组 ($n=3$)、

GFP组($n=3$)、空白组($n=3$)。在 3 d 和 7 d 提取各组细胞的 RNA,测定 RNA 浓度,并调整至相同浓度,逆转录合成 cDNA,用于检测 BMP-7 的 mRNA 水平。反应体系共 10 μ l;2 $\times$ PCR Mix 5 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,cDNA 模板 2 μ l,DEPC 水 2 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min;92 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,-1 $^{\circ}$ C/循环,72 $^{\circ}$ C 30 s,10 $\times$;92 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,28 $\times$;72 $^{\circ}$ C 3 min,1.5%琼脂糖电泳成像。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列表

Tab.1 Sequences of PCR primers

基因	序列(5'~3')	大小(bp)
β -actin	上游:AGGGAAATCGTCGCTGAC	146
	下游:CGCTCGTTGCCAATACTGA	
BMP-7	上游:TCGTGGAACATGACAAGGAA	163
	下游:CTGATCCGGAACGTCTCATT	
OPN	上游:CCTCCCGGTGAAAAGTGAC	124
	下游:CTGTGGCGCAAGGAGATT	
OPG	上游:GTTCTGTCACAGCTTCACAA	121
	下游:AAACAGCCCAGTGACCATTC	
Notch-1	上游:CCTGCCACTATGTTCTCTGT	175
	下游:CCCTTGAGGCATAAGCAGAG	
Notch-2	上游:CCTGAACGGGCACTACATTT	165
	下游:GCGTAGCCCTTCAGACACTC	
Notch-3	上游:GGCTCTTCTCTGCTCAAAGC	185
	下游:GGCTGAGCCAAGAGAACAAC	
Notch-4	上游:GGACGGGACTACACCTTTGA	197
	下游:TGTCTGGGCATCTTTATCC	
Jag-1	上游:GTCCCACTGGTTTCTCTGGA	172
	下游:GTGCTACGGCAGTGGTCTTT	
Jag-2	上游:CAGATCCGACTACGCTGTGA	153
	下游:GGCTTCTTTGCAATCTTTGC	
DLL-1	上游:GAAGCCACTGCAAGCTCTCT	159
	下游:CTTCGTCTGGCTTTCAGTCC	
DLL-3	上游:CCAGTAGCTGCCTGAACTCC	168
	下游:CACATCGAAGCCCGTAGAAT	
DLL-4	上游:ACCTTTGGCAATGTCTCCAC	189
	下游:GTTTCTGCGCAAGTCTCTG	
Hey-1	上游:ATGGACTATCGGAGTTTGGG	134
	下游:TGGGATGCGTAGTTGTTGAG	

1.2.4 Real-time PCR 检测成骨指标 OPN、骨保护素(osteoprotegerin,OPG)以及经典 Notch 信号通路分子的 mRNA 水平 将上述逆转录合成的 cDNA 再用于检测成骨指标 OPN、OPG 和经典 Notch 信号通路分子的 mRNA 水平。real-time PCR 反应体系共 20 μ l;2 $\times$ Premix 10 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,模板 2 μ l,DEPC 水 7 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,39 $\times$;溶解分析(65 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C),以 β -actin 为内参照标准化各组 cDNA 模板。

1.2.5 Western blot 检测各组细胞 Runx2 和 OPN 的蛋白表达水平 将 1×10^6 个 NP 细胞种于 6 孔板中,同上设置各组。在 3 d 和 7 d 提取蛋白,分别用于检测 Runx2 和 OPN 的蛋白表达水平。BCA 法测定各组蛋白浓度,取 50 μ g/孔上样,10% SDS-PAGE 胶分离后,250 mA,1 min/kD 湿转至 PVDF 膜上,

TBST 洗膜 3 次 $\times$ 10 min 后,用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,TBST 再洗膜 3 次 $\times$ 10 min;加入一抗:兔抗鼠 Runx2(1:500 稀释),兔抗鼠 OPN(1:500 稀释),鼠抗鼠 β -actin(1:500 稀释);常温孵育 1 h,然后 4 $^{\circ}$ C 孵育至少 12 h,TBST 洗膜 3 次 $\times$ 10 min,常温孵育对应的二抗 1 h,最后 TBST 洗膜 3 次 $\times$ 10 min,ECL 发光成像。

1.2.6 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)读数 将 2×10^5 个 NP 细胞接种于 24 孔板,同上设置各组,病毒感染 7 d 后检测。去除培养基,PBS 轻洗细胞 2 遍;每孔加 $1 \times$ Luciferase 细胞裂解液 100 μ l 裂解细胞 5 min,将悬液转移至 EP 管中离心(13 000 r/min $\times$ 3 min);取离心上清液 5 μ l,加 ALP 底物 5 μ l,1 $\times$ Lupo 缓冲液 15 μ l,避光反应 30 min,单孔荧光检测仪检测 562 nm 波长处吸光度(absorbance,A)值;余下的上清用 BCA 法测各组蛋白浓度,标化 ALP 读数。

1.2.7 ALP 染色 细胞分组及培养同 1.2.6。将少量的 Fast Blue BB salt 粉末加入 ddH₂O 中,使其成为淡黄色即可;向上述液体中加 1/25 体积的 AS-MX 染料,配置成染液。PBS 轻洗细胞 2 遍,每孔加 200 μ l 染液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,吸除染液,PBS 轻洗,显微镜下选择 10 个非重复视野,摄片并分析阳性细胞数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件分析。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组腺病毒在 HEK293 细胞中高滴度的扩增

重组腺病毒感染 HEK293 细胞 5 d 后可见大量 GFP 表达,呈云雾状(图 1)。表明腺病毒扩增成功,反复感染 HEK293 细胞获得大量高滴度病毒备用。

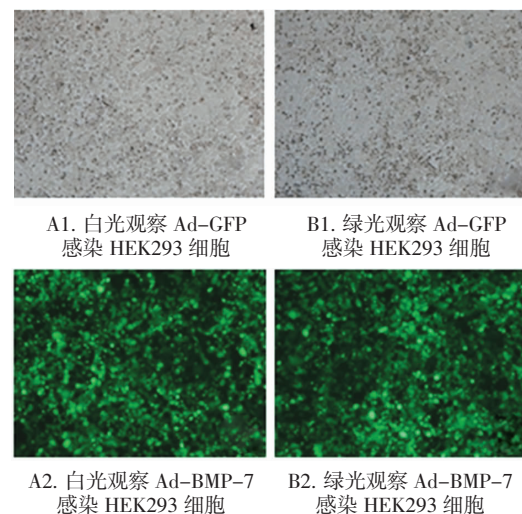
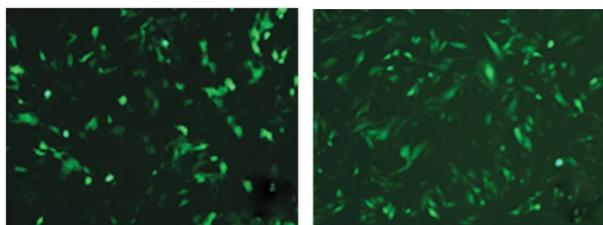


图 1 倒置荧光显微镜下观察重组腺病毒感染 HEK293 细胞 5 d 后的情况 (100 $\times$)

Fig.1 HEK293 cells observed on d5 after recombinant adenovirus infection under the inverted fluorescence microscope (100 $\times$)

2.2 重组腺病毒感染 NP 细胞并确定最适滴度

24 孔板在添加 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 Polybrene 情况下各病毒的最适感染体积:Ad-BMP-7(0.8 μl)、Ad-GFP(0.1 μl);此剂量感染 NP 细胞 48 h,各 GFP 阳性细胞比例 60%~70%(图 2)。



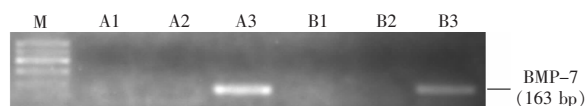
A. Ad-GFP 感染 NP 细胞 48 h B. Ad-BMP-7 感染 NP 细胞 48 h

图 2 倒置荧光显微镜下观察重组腺病毒感染 NP 细胞 48 h 后的情况 (100 $\times$)

Fig.2 GFP expression of NP cells observed at 48 h after recombinant adenovirus infection under the inverted fluorescence microscope (100 $\times$)

2.3 腺病毒介导 BMP-7 在 NP 细胞中的高表达

Ad-BMP-7 处理 NP 细胞 3 d 和 7 d 均检测到 BMP-7 mRNA 水平高表达,且 3 d 表达强于 7 d;Ad-GFP 和空白组均无表达(图 3)。



M. Marker; A1. 空白组 3 d; A2. GFP 组 3 d; A3. BMP-7 组 3 d; B1. 空白组 7 d; B2. GFP 组 7 d; B3. BMP-7 组 7 d

图 3 Real-time PCR 在第 3 天和第 7 天检测 BMP-7 的 mRNA 水平
Fig.3 mRNA expression level of BMP-7 detected by real-time PCR on 3 d and 7 d after infection

2.4 Ad-BMP-7 感染 NP 细胞后成骨相关基因的表达检测

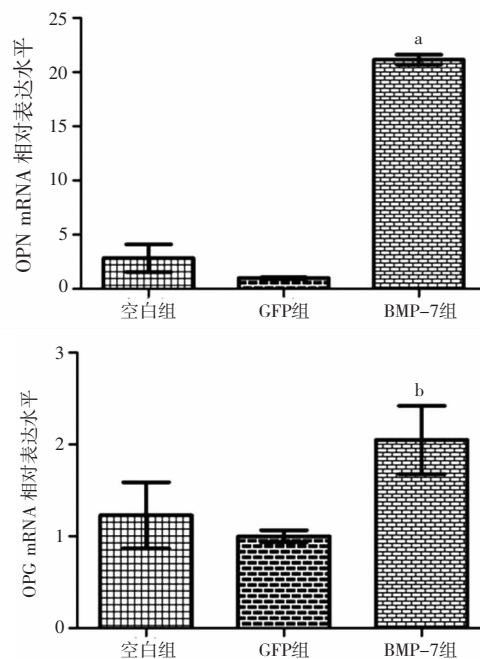
Ad-BMP-7 感染 7 d 可明显增强 NP 细胞 OPN、OPG 的 mRNA 水平表达,较 Ad-GFP、空白组具有统计学意义(OPN:与 GFP 组、空白组比较均 $P=0.000$;OPG:与 GFP 组比较 $P=0.016$,与空白组比较 $P=0.047$)(表 2、图 4)。NP 细胞 Runx2 和 OPN 的基础表达水平较低,Ad-BMP-7 感染 3 d 可明显促进 NP 细胞表达成骨转录因子 Runx2 蛋白(图 5),7 d 后可明显提高 OPN 的蛋白表达水平(图 6)。

表 2 各组 OPN 和 OPG 的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 mRNA expression of OPN and OPG in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	OPN 的 mRNA 水平表达	OPG 的 mRNA 水平表达
空白组	2.84 ± 1.27	1.22 ± 0.36
GFP 组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.06
BMP-7 组	21.16 ± 0.45^a	2.05 ± 0.37^{bc}
F 值	613.815	10.046
P 值	0.000	0.012

注:a,BMP-7 组与空白组、GFP 组比较 $P=0.000$;b,BMP-7 组与空白组比较 $P=0.047$;c,BMP-7 组与 GFP 组比较 $P=0.016$



BMP-7 组与空白组和 GFP 组比较差异有统计学意义, $a, P<0.001$; $b, P<0.05$

图 4 Real-time PCR 检测感染后 7 d OPN、OPG 的 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 mRNA expression of OPN and OPG detected by real-time PCR on 7 d after infection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

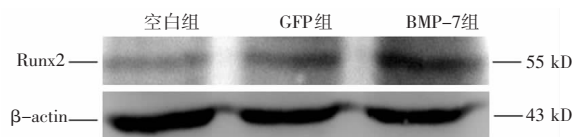


图 5 Western blot 检测感染后第 3 天 Runx2 蛋白表达水平
Fig.5 Protein expression of Runx2 detected by Western blot on 3th d after infection



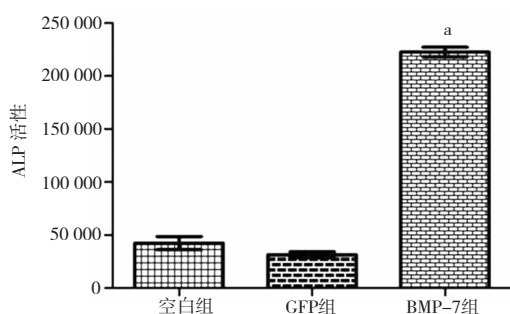
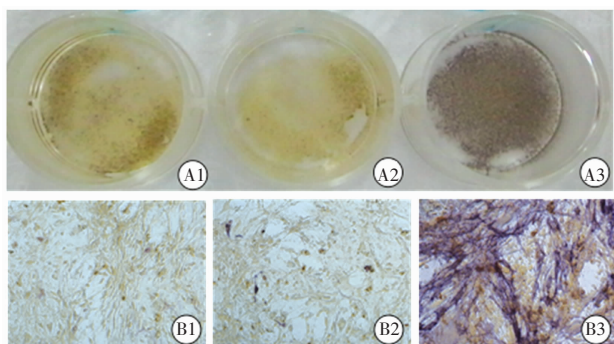
图 6 Western blot 检测感染后第 7 天 OPN 蛋白表达水平
Fig.6 Protein expression of OPN detected by Western blot on 7th d after infection

2.5 ALP 读数及染色

ALP 是成熟成骨细胞的标志性酶之一,其读数和染色可反映 ALP 的活性。Ad-BMP-7 过表达可明显提高 ALP 读数,较 GFP 组及空白组具有统计学意义(与 Ad-GFP、空白组比较均 $P=0.000$)(图 7)。未处理的 NP 细胞几乎未见 ALP 染色阳性(细胞质蓝染),Ad-BMP-7 感染细胞质蓝染的 NP 细胞比例较 GFP 组、空白组明显增多,与 ALP 读数趋势一致(表 3、图 8)。

表 3 重组腺病毒感染 7 d 时 ALP 度数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab.3 ALP activity on 7 d after recombinant adenovirus infection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ALP 度数
空白组	42 407.3 $\pm$ 10 926.8
GFP 组	31 455.5 $\pm$ 4 930.6
BMP-7 组	222 676.8 $\pm$ 7 643.2 ^a
F 值	513.417
P 值	0.000

注: a, BMP-7 组与空白组、GFP 组比较 $P=0.000$ BMP-7 组与空白组和 GFP 组比较有统计学意义, a, $P=0.000$ 图 7 第 7 天 ALP 读数定量检测各组细胞的 ALP 活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig.7 ALP activity quantitatively detected by ALP assay on 7th d ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A1/B1: 空白组; A2/B2: GFP 组; A3/B3: BMP-7 组

图 8 第 7 天 ALP 染色检测 ALP 活性 (200 $\times$)Fig.8 ALP activity evaluated by ALP staining on 7th d (200 $\times$)表 4 重组腺病毒感染 3 d 后 Notch 信号分子的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab.4 mRNA expression level Notch signaling pathway members on 3 d after recombinant adenovirus infection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Notch-1	Notch-2	Notch-3	Notch-4	Jag-1	Jag-2	DLL-1	DLL-3	DLL-4	Hey-1
空白组	1.00 $\pm$ 0.05	1.01 $\pm$ 0.19	1.01 $\pm$ 0.21	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.10
GFP 组	2.83 $\pm$ 0.32	1.94 $\pm$ 0.46	0.60 $\pm$ 0.01	1.85 $\pm$ 0.32	2.22 $\pm$ 0.71	1.87 $\pm$ 0.49	2.30 $\pm$ 1.02	1.80 $\pm$ 0.56	0.68 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.04
BMP-7 组	5.90 $\pm$ 0.66 ^{ab}	150.35 $\pm$ 11.78 ^c	0.97 $\pm$ 0.05	3.30 $\pm$ 0.67	7.97 $\pm$ 0.00 ^c	1.78 $\pm$ 0.71	3.07 $\pm$ 0.82	1.30 $\pm$ 0.70	0.97 $\pm$ 0.09	11.23 $\pm$ 0.44 ^c
F 值	94.574	318.962	6.540	14.394	166.476	1.788	3.784	1.211	14.073	1 082.054
P 值	0.002	0.001	0.081	0.029	0.001	0.308	0.151	0.411	0.030	0.000

注: a, BMP-7 组与空白组比较 $P=0.004$; b, BMP-7 组与 GFP 组比较 $P=0.003$; c, BMP-7 组与空白组、GFP 组比较均 $P=0.000$

2.6 Ad-BMP-7 感染 NP 细胞后 Notch 信号通路分子表达水平检测

感染后第 3 天检测经典 Notch 信号通路分子的表达变化,提示 Ad-BMP-7 较 Ad-GFP、空白组可明显增加 Notch-1、Notch-2、Jag-1、Hey-1 的 mRNA 表达(Notch-1:与 GFP 组比较 $P=0.003$,与空白组比较 $P=0.004$;Notch-2:与 Ad-GFP、空白组比较均 $P=0.000$;Jag-1:与 Ad-GFP、空白组比较均 $P=0.000$;Hey-1:与 Ad-GFP、空白组比较均 $P=0.000$),分别为 5 倍、150 倍、7 倍、11 倍;其余信号通路分子表达各组间无明显差异(Notch-3:与 GFP 组比较 $P=0.181$,与空白组比较 $P=1.000$;Notch-4:与 GFP 组比较 $P=0.135$,与空白组比较 $P=0.039$;DLL-1:与 GFP 组比较 $P=1.000$,与空白组比较 $P=0.217$;DLL-3:与 Ad-GFP、空白组比较均 $P=1.000$;DLL-4:与 GFP 组比较 $P=0.066$,与空白组比较 $P=1.000$;Jag-2:与 GFP 组比较 $P=1.000$,与空白组比较 $P=0.657$)(表 4、图 9)。但上述 Notch 信号分子的 mRNA 表达呈一过性的增加,在第 7 天回复到基础表达水平(Notch-1:与 GFP 组比较 $P=0.769$,与空白组比较 $P=0.880$;Notch-2:与 GFP 组、空白组比较均 $P=1.000$;Jag-1:与 GFP 组比较 $P=1.000$,与空白组比较 $P=0.277$;Hey-1:与 GFP 组比较 $P=0.130$,与空白组比较 $P=1.000$)(表 5、图 10)。

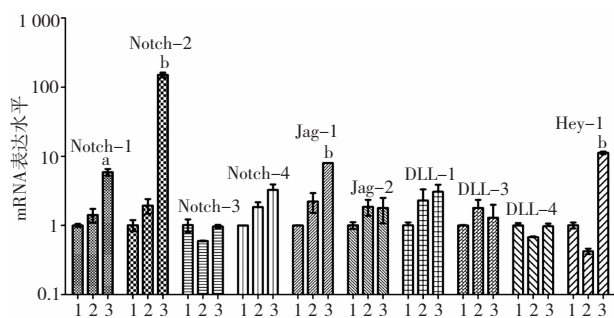
1. 空白组; 2. GFP 组; 3. BMP-7 组; BMP-7 组与空白组和 GFP 组比较具有统计学意义, a, $P<0.01$, b, $P<0.001$ 图 9 Real-time PCR 在第 3 天检测经典 Notch 信号通路分子的 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig.9 Classic Notch signaling pathway members mRNA expression level detected by real-time PCR on 3 d ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 5 重组腺病毒感染 7 d 后部分 Notch 信号分子的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.5 mRNA expression level some of Notch signaling pathway members on 7 d after recombinant adenovirus infection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Notch-1	Notch-2	Jag-1	Hey-1
空白组	1.04 ± 0.42	1.06 ± 0.51	0.25 ± 0.02	1.00 ± 0.14
GFP组	0.24 ± 0.07	0.17 ± 0.00	0.13 ± 0.03	0.69 ± 0.16
BMP-7组	0.32 ± 0.08 ^a	0.12 ± 0.00 ^a	0.11 ± 0.09 ^a	1.12 ± 0.04 ^a
<i>F</i> 值	1.196	0.830	3.618	6.110
<i>P</i> 值	0.415	0.517	0.159	0.088

注:a,BMP-7 组与空白组、GFP 组比较 $P > 0.05$

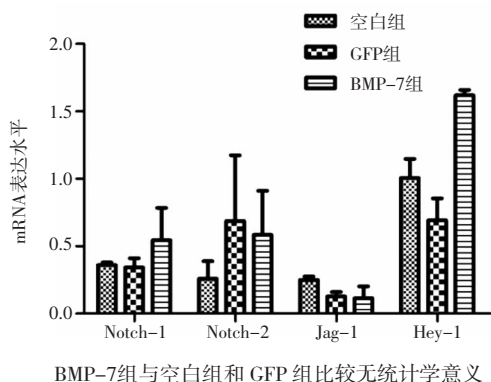


图 10 Real-time PCR 在第 7 天检测 Notch-1、Notch-2、Jag-1、Hey-1 的 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.10 Notch-1, Notch-2, Jag-1, Hey-1 mRNA expressions detected by real-time PCR on 7th d ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

NP 是椎间盘重要结构之一,最近研究认为 NP 细胞来源于胚胎时期的脊索细胞,在脊柱的发育过程中起着至关重要的作用^[13-15]。研究证明 BMPs 具有强烈的诱导成骨分化的生物学效应,可能在脊柱发育中发挥着作用^[4]。BMP-7 又名成骨蛋白-1 (osteogenic protein-1, OP-1),是 BMPs 家族中成骨作用最强的一员,能诱导多种祖细胞的成骨分化。本实验希望探讨 BMP-7 对胚胎小鼠 NP 细胞的成骨作用,为了解脊椎发育性疾病的病因和防治该类疾病提供实验基础。

OPN 在骨基质的矿化和吸收过程中起重要作用,是成骨细胞的表型之一^[9,16]。OPG 是破骨细胞抑制因子,主要由成骨细胞谱系的各种细胞产生,并随细胞的分化而增加^[17-18]。在 BMP-7 诱导 NP 细胞 7 d 时成骨基因 OPN、OPG 表达增加。本实验室有研

究发现 BMP-2 诱导胚胎小鼠椎间盘 NP 细胞 5 d 时,OPN 和 OPG 基因 mRNA 表达增加,而对成软骨基因 I 型胶原(collagen type I, Col I)、II 型胶原(collagen type II, Col II)、蛋白多糖(aggrecan, ACAN) mRNA 表达没有影响^[19]。这可能是由于 BMP-2 的成骨能力强于 BMP-7 所致,BMP-2 可诱导多潜能干细胞 C3H10T1/2 和祖细胞 C2C12 成骨分化,而 BMP-7 只能诱导祖细胞 C2C12 成骨分化^[5]。本实验所用的胚胎小鼠 NP 细胞处于祖细胞状态,这可能与 C2C12 细胞类似。

ALP 是成熟成骨细胞的标志性酶之一,BMP-7 诱导 NP 细胞 7 d 时 ALP 读数和染色发现 ALP 活性明显增强。Cheng 等^[5]证实 BMP-2、BMP-6、BMP-9 诱导 C3H10T1/2 细胞,ALP 活性在诱导 3、5、7、9 d 逐渐增强,且 9 d 均较 7 d 明显增强;而 BMP-2、BMP-6、BMP-9 诱导 C2C12 细胞 5 d 时 ALP 活性最强,BMP-7 诱导 C2C12 细胞 9 d 时 ALP 活性最强。这说明 ALP 活性升高的时间点取决于 BMPs 各亚型的成骨能力以及细胞所处于成骨细胞系的分化阶段,同时从侧面也反映了 ALP 可以作为细胞成骨分化的标志。

成骨特异性转录因子 Runx2 是成骨分化与骨形成的关键基因,可通过转录调控影响成骨相关基因的表达。本研究在第 7 天能检测到成骨分化诱导效果,但是 Runx2 表达无明显变化,考虑到 BMP-7 调控转录因子的表达及活性是诱导成骨的一个相对早期的时间,因此选择 3 d 时检测,并成功证实 BMP-7 可促进 Runx2 的表达。该结果提示 Runx2 可能是 OPN、OPG 和 ALP 的上游信号分子,Runx2 可能通过结合成骨相关基因的启动子区域发挥转录调控的作用^[20]。

Notch 信号通路在脊椎动物和无脊椎动物的发育过程中,对细胞命运的决定、神经系统的发育、器官的形成及体节的发生都有重要的作用^[21]。经典 Notch 信号通路相关分子包括 Notch 受体(Notch-1、Notch-2、Notch-3、Notch-4),Notch 配体(Jag-1、Jag-2、DLL-1、DLL-3、DLL-4)以及靶基因 Hey、Hes^[22]。研究证实 Notch 信号与脊柱发育密切关联,Sparrow 等^[6]研究显示携带 Notch-1 和 DLL-1 突变体的胚胎小鼠在短期缺氧的诱导下脊柱发育缺陷的机率明显增加;本实验室也有研究不同年龄段(1 d、1 周、1、3、6 月)小鼠椎间盘 Notch 信号通路分子的表达差异情况,发现 Notch 信号通路分子 mRNA 的表达随脊

柱生长发育总体呈下降趋势,其中以 Jag-1、DLL-1 和 DLL-3 mRNA 下降趋势最为明显^[23]。本实验在 BMP-7 感染 NP 细胞 3 d 时检测 Notch 信号相关分子,发现 Notch-1、Notch-2、Jag-1、Hey-1 mRNA 表达明显增加,然而在第 7 天表达无明显差异,呈现一过性增高。这一现象可能由于腺病毒是瞬时转染,BMP-7 上调的 Notch 信号的刺激因素未持续存在,下游基因的变化将反馈抑制 Notch 信号的增加,以维持细胞间的稳态。Sharff 等^[9]报道 Hey-1 促进 Runx2 的转录活性正性调节 BMP-9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化,然而 Zamurovic 等^[17]报道的 Hey-1 通过抑制 Runx2 的转录活性负性调节 BMP-2 诱导小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 成骨分化。因此,对于 Notch 信号在 BMP-7 诱导胚胎小鼠 NP 细胞成骨分化过程中是正性作用还是负性作用尚需进一步研究。

综上所述,BMP-7 可诱导 NP 细胞成骨分化,部分经典 Notch 信号通路分子参与此过程,本实验为进一步研究 BMP-7 在脊椎发育中的作用及分子机制奠定重要基础,有助于脊柱发育性疾病的诊治提供重要的分子靶点。

参 考 文 献

- [1] Guo X, Chau WW, Chan YL, et al. Relative anterior spinal overgrowth in adolescent idiopathic scoliosis. Results of disproportionate endochondral-membranous bone growth[J]. J Bone Joint Surg Br, 2003, 85(7): 1026-1031.
- [2] Toyama Y. An experimental study on the pathology and role of intervertebral discs in the progression and correction of scoliotic deformity[J]. Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1988, 62(8): 777-789.
- [3] Roberts S, Menage J, Eisenstein SM. The cartilage end-plate and intervertebral disc in scoliosis: calcification and other sequelae[J]. J Orthop Res, 1993, 11(5): 747-757.
- [4] Monsoro-Burq AH, Duprez D, Watanabe Y, et al. The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development[J]. Development, 1996, 122(11): 3607-3616.
- [5] Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85(8): 1544-1552.
- [6] Sparrow DB, Chapman G, Smith AJ, et al. A mechanism for gene-environment interaction in the etiology of congenital scoliosis[J]. Cell, 2012, 149(2): 295-306.
- [7] Kim W, Matsui T, Yamao M, et al. The period of the somite segmentation clock is sensitive to Notch activity[J]. Mol Biol Cell, 2011, 22(18): 3541-3549.
- [8] Dunwoodie SL. The role of Notch in patterning the human vertebral column[J]. Curr Opin Genet Dev, 2009, 19(4): 329-337.
- [9] Sharff KA, Song WX, Luo X, et al. Hey1 basic helix-loop-helix protein plays an important role in mediating BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(1): 649-659.
- [10] Moya IM, Umans L, Maas E, et al. Stalk cell phenotype depends on integration of Notch and Smad1/5 signaling cascades[J]. Dev Cell, 2012, 22(3): 501-514.
- [11] Tang Y, Urs S, Boucher J, et al. Notch and transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling pathways cooperatively regulate vascular smooth muscle cell differentiation[J]. J Biol Chem, 2010, 285(23): 17556-17563.
- [12] Zhou Y, Tanzie C, Yan Z, et al. Notch2 regulates BMP signaling and epithelial morphogenesis in the ciliary body of the mouse eye[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(22): 8966-8971.
- [13] Ellis K, Bagwell J, Bagnat M. Notochord vacuoles are lysosome-related organelles that function in axis and spine morphogenesis[J]. J Cell Biol, 2013, 200(5): 667-679.
- [14] Fleming A, Keynes RJ, Tannahill D. The role of the notochord in vertebral column formation[J]. J Anat, 2001, 199(Pt 1-2): 177-180.
- [15] Dahia CL, Mahoney E, Wylie C. Shh signaling from the nucleus pulposus is required for the postnatal growth and differentiation of the mouse intervertebral disc[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35944.
- [16] Wagner ER, Luther G, Zhu G, et al. Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma[J]. Sarcoma, 2011, 2011: 325238.
- [17] Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D, et al. Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenetic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene Hey1 inhibits mineralization and Runx2 transcriptional activity[J]. J Biol Chem, 2004, 279(36): 37704-37715.
- [18] Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H. Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis[J]. Endocrinology, 2001, 142(8): 3632-3637.
- [19] 周建武, 何通川, 毕杨, 等. 骨形态发生蛋白-2、-3 对胚胎小鼠椎间盘细胞的成软骨及成骨作用[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(7): 977-982.
- [20] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance[J]. Science, 2000, 289(5484): 1501-1504.
- [21] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284(5415): 770-776.
- [22] Fiuza UM, Arias AM. Cell and molecular biology of Notch[J]. J Endocrinol, 2007, 194(3): 459-474.
- [23] 曹光彪, 李明, 何通川, 等. Notch 信号通路相关分子在脊椎生长过程中的差异表达及其对软骨细胞分化的调控作用[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(8): 1094-1099.

(责任编辑: 冉明会)