

机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001463

过表达 NICD 通过下调基因 JunB 的表达抑制 BMP9 诱导间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化

王 南¹, 谭 涛¹, 林端阳¹, 罗小辑²

(1. 重庆医科大学第一临床学院, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究 Notch 信号通路在骨形态发生蛋白 9 (bone morphogenetic protein 9, BMP9) 诱导小鼠间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化过程中的作用及其机制。**方法:**将细胞分为 5 组:空白组 (Blank, $n=3$), BMP9 处理组 (BMP9, $n=3$), 空白质粒对照组 (BMP9+Control, $n=3$), 过表达 Notch1 胞内段质粒 (Notch1 intracellular domain, NICD) 处理组 (BMP9+NICD, $n=3$), DAPT 处理组 (BMP+DAPT, $n=3$)。通过碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色和钙盐染色分别验证过表达 NICD 对成骨分化早晚期情况的影响。进一步采用定量逆转录 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 和 Western blot 检测基因 NICD、Hey1 及成骨相关基因 Smad-1/5/8、p-Smad-1/5/8、OPN、Runx2、OCN、JunB 的表达。**结果:**早期 ALP 活性及染色结果显示, NICD 组较 Control 组能显著抑制 C3H10T1/2 细胞成骨分化过程中 ALP 的形成 [5 d: (33 167.66 ± 2 018.45) vs. (146 451.00 ± 14 889.67), $P=0.000$; 7 d: (58 981.33 ± 4 724.70) vs. (89 588.66 ± 5 928.32), $P=0.000$], γ -分泌酶抑制剂 (N-[N-(3,5-difluorophenyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester, DAPT) 完全抑制 Notch 通路时得到相同的结果 [5 d: (44 812.66 ± 4 174.94) vs. (146 451.00 ± 14 889.67), $P=0.000$; 7 d: (64 622.93 ± 4 724.70) vs. (89 588.66 ± 5 928.32), $P=0.000$]。茜素红 S 染色结果显示, NICD 抑制钙盐结节的形成, 而 DAPT 阻断 Notch 通路明显促进钙盐结节形成。qRT-PCR 结果表明, NICD 组中 NICD 及靶基因 Hey1 的表达较 Control 组明显增加 [(3.90 ± 0.02) vs. (0.35 ± 0.01), $P=0.000$; (19.79 ± 0.01) vs. (11.80 ± 0.02), $P=0.000$], Western blot 得到相同结果 [(1.32 ± 0.01) vs. (0.19 ± 0.01), $P=0.000$], 且 NICD 明显抑制成骨分化相关基因 JunB、Runx2、OCN、OPN 等的表达 [(0.10 ± 0.01) vs. (0.53 ± 0.01), $P=0.000$; (0.18 ± 0.01) vs. (0.30 ± 0.02), $P=0.000$; (0.36 ± 0.01) vs. (0.62 ± 0.02), $P=0.000$; (0.07 ± 0.01) vs. (0.48 ± 0.01), $P=0.000$], 而转录因子 Smad-1/5/8、p-Smad-1/5/8 的表达不受影响 [(0.74 ± 0.02) vs. (0.73 ± 0.03), $P=0.000$; (0.63 ± 0.01) vs. (0.58 ± 0.04), $P=0.000$], DAPT 阻断 Notch 通路后上述相关基因的表达明显增加。**结论:**本实验结果首次证明, NICD 激活 Notch 通路对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化的抑制作用可能是通过抑制 JunB 基因发挥作用, 而非调控 BMP9/Smad (bone morphogenetic protein 9/drosophila mothers against decapentaplegic) 信号通路。

【关键词】骨形态发生蛋白 9; Notch 信号通路; 间充质干细胞; 成骨分化**【中图分类号】**R683.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-08-09

Notch pathway inhibits BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells C3H10T1/2 by down-regulating expression of gene JunB

Wang Nan¹, Tan Tao¹, Lin Duanyang¹, Luo Xiaoji²

(1. First Medical College of Chongqing Medical University; 2. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role and mechanism of Notch signaling pathway in bone morphogenetic protein 9 (BMP9) induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells line C3H10T1/2. **Methods:** The cells were divided into five groups: the blank ($n=3$), BMP9 ($n=3$), BMP9+Control ($n=3$), BMP9+NICD ($n=3$), BMP9+DAPT ($n=3$). The effect of Notch pathway on early and late osteogenic differentiation was detected by ALP and calcium staining. Furthermore, the expressions of NICD, Hey1 and the osteogenesis-related genes Smad-1/5/8, p-Smad-1/5/8, OPN, Runx2, OCN, JunB were detected by qRT-PCR and Western blot after transfecting

C3H10T1/2 cells with NICD plasmid. **Results:** The staining and activity of ALP showed that the NICD-activated Notch pathway could significantly inhibit the formation of ALP on 5 d and 7 d during the C3H10T1/2 cell differentiation [5 d: (33 167.66 ± 2 018.45) vs. (146 451.00 ± 14 889.67), $P=0.000$; 7 d: (58 981.33 ± 4 724.70) vs. (89 588.66 ± 5 928.32), $P=0.000$], and when DAPT inhibited Notch pathway, it came to the same result [5 d: (44 812.66 ±

作者介绍: 王 南, Email: 100449865@qq.com,

研究方向: 间充质干细胞成骨分化。

通信作者: 罗小辑, Email: 41047862@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (编号: 81272171); 重庆市自然科学基金一般资助项目 (编号: cstc2017jcyjAX0039)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180105.1108.014.html> (2018-01-05)

4 174.94) vs. (146 451.00 ± 14 889.67), $P=0.000$; 7 d: (64 622.93 ± 4 724.70) vs. (89 588.66 ± 5 928.32), $P=0.000$]. Alizarin S staining showed that NICD inhibited the formation of alcium salt nodules, while DAPT blocking Notch pathway significantly promoted the formation of calcium salt nodules during the osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells. qRT-PCR results showed that the expression of NICD and target gene Hey1 in NICD group was significantly higher than that in the control group[(3.90 ± 0.02) vs. (0.35 ± 0.01), $P=0.000$; (19.79 ± 0.01) vs. (11.80 ± 0.02), $P=0.000$], and Western blot got the same result. Furthermore, the expressions of JunB, Runx2, OCN and OPN were markedly inhibited by NICD[(0.10 ± 0.01) vs. (0.53 ± 0.01), $P=0.000$; (0.18 ± 0.01) vs. (0.30 ± 0.02), $P=0.000$; (0.36 ± 0.01) vs. (0.62 ± 0.02), $P=0.000$; (0.07 ± 0.01) vs. (0.48 ± 0.01), $P=0.000$], but the expressions of Smad-1/5/8 and p-Smad-1/5/8 were not affected[(0.74 ± 0.02) vs. (0.73 ± 0.03), $P=0.000$; (0.63 ± 0.01) vs. (0.58 ± 0.04), $P=0.000$]; however, the expressions of the above-mentioned related genes significantly increased after DAPT blocking Notch pathway. **Conclusion:** The results first demonstrate that the inhibitory effect of NICD on the BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells may be mediated by the inhibition of JunB gene, rather than the regulation of BMP9/Smad signaling pathway.

[Key words] bone morphogenetic protein 9; Notch signaling pathway; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

骨缺损、骨不连和骨折延迟愈合一直是骨科临床工作的一项难题,传统治疗以自体骨移植最优,但是自体骨来源有限,并且会对供体造成新的缺损。由于传统治疗方法存在不足,当前利用组织工程学技术修复骨缺损、骨不连、促进脊柱融合等疾病,在临床上具有愈来愈广阔的应用前景。其中利用间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的成骨分化能力是当今组织工程医学研究的热点^[1], MSCs 具有向成骨细胞、肌细胞、脂肪细胞等多种细胞分化的能力^[2],因此明确定向诱导 MSCs 成骨分化的机制十分必要。研究证明骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、Notch、Wnt 等多条信号通路参与 MSCs 的分化调控^[3-5],其中 BMP 亚型 2、7 已用于临床治疗^[6],且前期研究发现亚型 BMP9 诱导间充质干细胞成骨能力明显强于其他各亚型^[7]。另外, Notch 信号通路在胚胎发育、器官形成、细胞分化中扮演着重要角色^[8-11],且越来越多的研究表明 Notch 通路与 BMP 通路在成骨分化过程中存在相互调控作用,但结果仍存在争议,即有的研究指出两者存在相互协同作用^[12],部分表明 Notch 信号通路通过其靶基因 Hey1 或 Hes1 抑制 BMPs 诱导的成骨分化^[13-17]。本实验拟采用过表达 NICD 激活 Notch 通路或采用 DAPT 阻断 Notch 通路,明确 Notch 通路在 BMP9 诱导干细胞成骨分化过程中的作用及机制,为 BMP9 作为新的促成骨因子应用于临床研究提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

C3H10T1/2 细胞、Ad-BMP9 腺病毒由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室赠送,重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存,DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基购自Hyclone

公司,胎牛血清 FBS 购自 Gibco 公司, NICD 过表达质粒购自上海吉凯公司, DAPT 购自 CST 公司, ALP 染色试剂盒购自碧云天公司, ALP 化学发光检测试剂盒、茜素红 S、维生素 C 和 β -磷酸甘油购自 Sigma 公司, 转染试剂 Lipofectamine 2000、Ploybrene 购自 Invitrogen 公司, PCR 试剂盒、Real time PCR 试剂盒购自 Takara 公司, PCR 引物由 Takara 公司合成, 兔抗小鼠 Runx2、OCN、OPN、JunB 抗体购自 Abcam 公司, 兔抗小鼠 Smad1/5/8、p-Smad1/5/8、PCNA、Cyclin D1 抗体购自 Santa 公司。其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 复苏冻存的 C3H10T1/2 细胞,并在含 10% FBS, 1% 青霉素/链霉素的 DMEM/HIGH GLUCOSE 基础培养基, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 对数生长期传代; 实验细胞分为 5 组: 空白组 (Blank, $n=3$), BMP9 处理组 (BMP9, $n=3$), 空白质粒对照组 (BMP9+Control, $n=3$), 过表达质粒 NICD 处理组 (BMP9+NICD, $n=3$), DAPT 处理组 (BMP+DAPT, $n=3$)。

1.2.2 病毒及质粒转染 在细胞汇合度到达 60% 左右时, 按照转染试剂说明书进行操作, 将 NICD 质粒及腺病毒 BMP9 共转染到细胞 C3H10T1/2 中, 6 h 后换基础培养基, 隔日换 1 次基础培养基, 24 h 后荧光显微镜观察转染效率, 30% 细胞出现绿色荧光视为转染有效。

1.2.3 碱性磷酸酶染色及活性测定 在 24 孔板上按 30% 密度接种 C3H10T1/2 细胞, 待细胞汇合度到达 60% 时共转染 Ad-BMP9 腺病毒和过表达质粒 NICD, 继续培养至既定时间 5、7 d 后, 吸去培养基, 用 PBS 冲洗 2 次, 按 ALP 染色试剂盒及发光试剂盒说明进行染色和活性测定。

1.2.4 钙盐沉积实验 在 24 孔板上按 30% 密度接种 C3H10T1/2 细胞, 同样待细胞汇合度达 60% 左右时共转染 Ad-BMP9 腺病毒和过表达质粒 NICD, 24 h 后加入 50 μ g/mL 维生素 C 和 10 mmol/L 的 β -磷酸甘油, 继续培养 14 d 后进行茜素红 S 染色: 弃去细胞培养板内液体, PBS 洗 3 次, 0.1% 戊二醛固定 10 min, 重蒸水 (ddH₂O) 洗 3 次, 加入 0.4% 茜素红 S, 在显微镜下观察, 待出现红色颗粒时, 弃去染液, ddH₂O 终止反应并洗涤 3 次, 显微镜下观察并拍照保存图像。

1.2.5 qRT-PCR 细胞处理至设定时间点后, 提取细胞总

RNA, 逆转录为 cDNA。qRT-PCR 检测各基因的表达水平, 引物信息见表 1, 所有样本的结果以 GAPDH 的表达做相对定量分析, 数据分析采用比较 Ct 法, 目的基因相对表达量 = $2^{-[(G \text{ 处理} - G \text{ 内参}) - (G \text{ 对照} - G \text{ 内参})]}$, 所有数值取 3 次重复的平均值。

表 1 引物序列(小鼠)

基因	扩增片段长度	序列(5'→3')
Runx2	196 bp	上游: 5'-CCAACTTCCTGTGCTCCGTG-3' 下游: 5'-TCGTTGAACCTGGCTACTTTGG-3'
JunB	182 bp	上游: 5'-TACCTCCCACATGCACCACC-3' 下游: 5'-CGCTTTCGCTCCACTTTGAT-3'
GAPDH	117 bp	上游: 5'-GACATCAAGAAGGTAATGAAGC-3' 下游: 5'-GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTT-3'
Hey1	123 bp	上游: 5'-TATCGGAGTTTGGGGTTTCG-3' 下游: 5'-TCCGTAGTTGTTGAGATGGGAG-3'
NICD	93 bp	上游: 5'-CCGTGGATGACCTAGGCAAGT-3' 下游: 5'-TGTGGCTCCGTTCTTCAGG-3'
OCN	199 bp	上游: 5'-TCTGACAAAGCCTTCATGTCC-3' 下游: 5'-AAATAGTGATACCGTAGATGCG-3'
OSX	132 bp	上游: 5'-GGGAGCAGAGTGCACAAGA-3' 下游: 5'-TACTCTGGCGCATAGGG-3'

1.2.6 Western blot 不同处理组 C3H10T1/2 细胞在 100 mm 细胞培养皿培养 5 d 后, 细胞裂解液 RIPA 裂解细胞并离心收集细胞, 提取细胞总蛋白, 采用核酸微量测定仪测定蛋白浓度, 各处理组取 250 μ g 样品上样进行 SDS-PAGE 电泳、转膜, 5% 牛血清白蛋白封闭, 一抗孵育, 洗膜, HRP 标记二抗孵育 1 h 后, 洗膜, 加入化学发光显色液显像后, 保存图像。

1.3 统计学分析

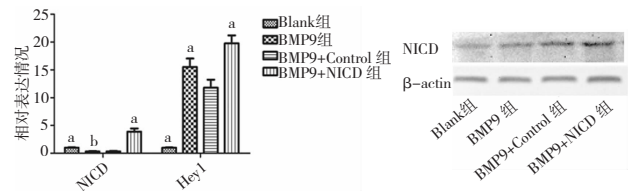
采用 SPSS 18.0 进行统计学分析, 所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 过表达 NICD 激活 Notch 信号通路抑制 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化

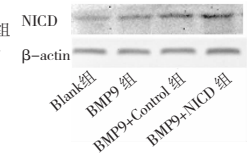
过表达质粒 NICD 在目的细胞的中表达情况如下。在 C3H10T1/2 中转染 NICD 质粒继续培养 3 d 后分别提取蛋白质及 RNA, 通过 qRT-PCR 检测 NICD 处理组中 NICD 和 Notch 靶基因 Hey1 的 RNA 表达水平。结果显示, 与对照组相比, NICD 和 Hey1 的表达明显上调 (3.90 ± 0.02 vs. 0.35 ± 0.01 , $P=0.000$; 19.79 ± 0.01 vs. 11.80 ± 0.02 , $P=0.000$) (图 1A), 采用 Western blot 检测得到同样的结果 (表 2; 图 1B、C)。为明确 Notch 信号通路在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化过程中的作用, 分别在处理细胞 5、7 d 后检测早期成骨指标 ALP 表达, 结果显示, 与对照组相比, NICD 处理组中 ALP 染色及活性明显减弱 (5 d, $33\ 167.66 \pm 2\ 108.45$ vs. $146\ 451.00 \pm 14\ 889.67$, $P=0.000$; 7 d, $58\ 981.33 \pm 4\ 724.70$ vs. $89\ 588.66 \pm 5\ 928.32$, $P=0.000$) (图 1D、E); 在处理 14 d 后检测钙盐沉积情况, 结果显示, 与对照组相比, NICD 明显抑制 BMP9 诱导的钙盐沉积 (图 1F)。根据上述数据可以初步推测, Notch 信号通路在

BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化过程可能扮演负性调控的角色。

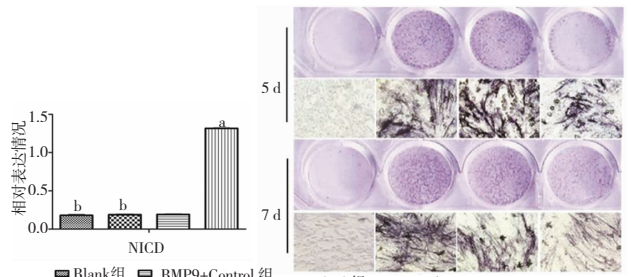


a: 与 BMP9+Control 组相比较, $P < 0.05$;
b: 与 BMP9+Control 组相比较, $P > 0.05$

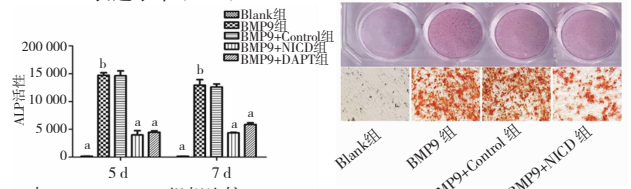
A. qRT-PCR 检测各组 NICD、Hey1 的表达



B. Western blot 检测各组 NICD 蛋白的表达



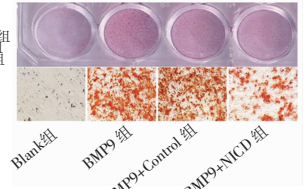
a: 与 BMP9+Control 组相比较, $P < 0.05$;
b: 与 BMP9+Control 组相比较, $P > 0.05$

C. 定量分析各组 NICD 蛋白的表达水平 ($n=3$)

a: 与 BMP9+Control 组相比较, $P < 0.05$;
b: 与 BMP9+Control 组相比较, $P > 0.05$

E. 各组 ALP 活性检测结果

D. 各组 ALP 染色结果



F. 各组钙盐结节茜素红染色结果

图 1 NICD 抑制 C3H10T1/2 细胞的成骨分化

表 2 各组中 NICD 的蛋白表达水平 ($n=3$)

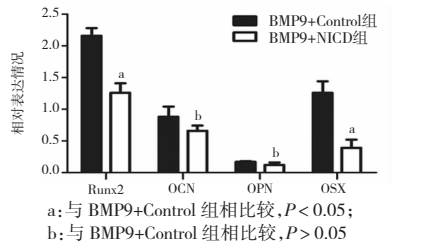
组别	NICD
Blank 组	$0.180\ 0 \pm 0.007\ 8^b$
BMP9 组	$0.188\ 3 \pm 0.006\ 5^b$
BMP9+Control 组	$0.191\ 9 \pm 0.004\ 9$
BMP9+NICD 组	$1.316\ 7 \pm 0.005\ 2^a$
F 值	25 027.702
P 值	0.000

注: a, 与 BMP9+Control 组比较, $P < 0.05$; b: 与 BMP9+Control 组比较, $P > 0.05$

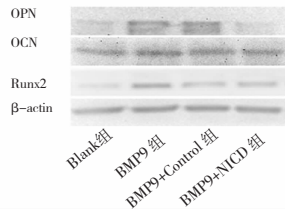
2.2 激活的 Notch 通路通过下调转录因子 Runx2 及其下游基因影响 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化

为进一步明确 Notch 通路调控 BMP9 诱导成骨分化过程的具体机制, 在 NICD、BMP9 处理细胞 3 d 后, 提取 RNA 及蛋白质分别检测成骨相关标志物 Runx2、OCN、OPN、OSX 等的变化。qRT-PCR 结果显示, NICD 处理组中 Runx2 的表达明显降低, 而成骨分化相关基因 OCN、OPN 虽是晚期成骨标志物, 但其早期的基本表达也受到 NICD 的影响而出现低表达 (图 2A); 进一步通过 Western blot 验证, 结果发现, NICD 处理 5 d 后, NICD 处理组中 Runx2、OCN、OPN 的表达下

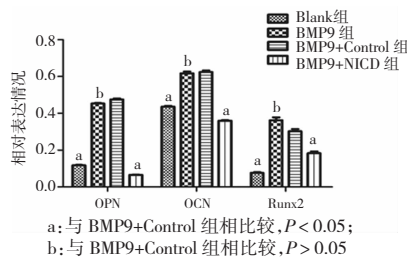
降,与 qRT-PCR 结果一致(表 3;图 2B、C)。因此,上述结果表明,激活的 Notch 信号通路通过影响转录因子 Runx2 及其下游成骨相关基因的表达,从而抑制 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的过程。



A. qRT-PCR 检测各组中成骨分化指标的表达



B. Western blot 检测各组 OPN、OCN、Runx2 蛋白的表达



C. 定量分析各组中 OPN、OCN、Runx2 蛋白的表达水平 (n=3)

图 2 NICD 抑制成骨分化相关基因 Runx2、OCN、OPN 的表达

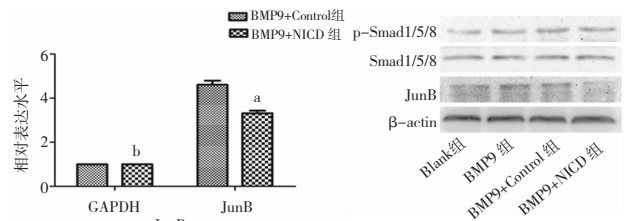
表 3 各组中 Runx2、OCN、OPN 的蛋白表达水平 (n=3)

组别	OPN	OCN	Runx2
Blank组	0.111 8 ± 0.004 0 ^a	0.436 3 ± 0.007 5 ^a	0.076 9 ± 0.005 8 ^a
BMP9组	0.452 9 ± 0.004 0 ^b	0.616 7 ± 0.017 7 ^b	0.362 6 ± 0.027 3 ^b
BMP9+Control组	0.476 0 ± 0.008 9	0.624 5 ± 0.014 9	0.302 0 ± 0.022 3
BMP9+NICD组	0.066 1 ± 0.002 0 ^a	0.360 0 ± 0.005 8 ^a	0.183 6 ± 0.015 7 ^a
F 值	4 441.537	335.687	126.697
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与 BMP9+Control 组比较,P<0.05;b:与 BMP9+Control 组比较,P>0.05

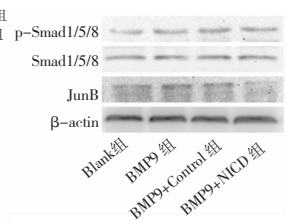
2.3 激活的 Notch 通过影响基因 JunB 的表达,进而调控 Runx2 表达,而非依赖 BMP/Smad1/5/8 途径

根据以往研究表明,BMP/Smad1/5/8 途径不能直接促进转录因子 Runx2 的表达,需先诱导合成中间基因 JunB 后,再调控 Runx2 的表达^[18]。为明确 JunB 基因是否参与 Notch 通路调控 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的过程。在 NICD 处理细胞 3、5 d 后,分别通过 qRT-PCR 及 Western blot 检测其表达,结果显示,NICD 处理组中基因 JunB 表达在 RNA 及蛋白水平都出现下调(表 4;图 3A、C),而 Smad1/5/8 及 p-Smad1/5/8 的表达在 NICD 处理组中未见明显变化(表 4;图 3B、C)。这些结果表明,NICD 激活的 Notch 通路可能是通过影响转录因子 Runx2 上游的启动基因 JunB 的表达,从而抑制 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的过程。

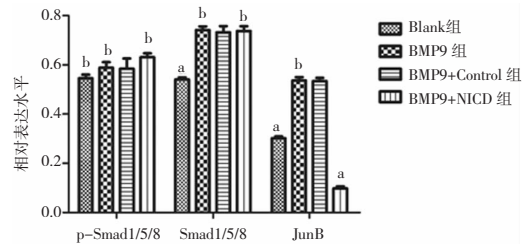


a: 与 BMP9+Control 组相比较,P<0.05;
b: 与 BMP9+Control 组相比较,P>0.05

A. qRT-PCR 检测各组中 JunB 的表达水平



B. Western blot 检测各组 Smad1/5/8 及 JunB 的表达



a: 与 BMP9+Control 组相比较,P<0.05;
b: 与 BMP9+Control 组相比较,P>0.05

C. 定量分析各组中 Smad1/5/8 及 JunB 的表达水平

图 3 NICD 抑制转录基因 JunB 的表达调控 C3H10T1/2 细胞成骨分化

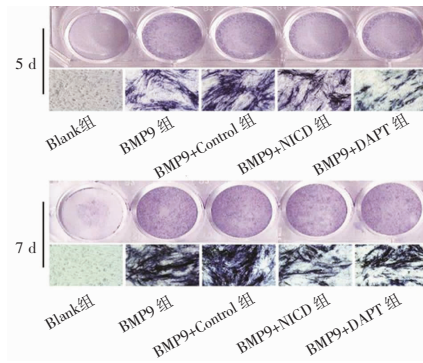
表 4 各组中的 JunB、Smad1/5/8 及 p-Smad1/5/8 蛋白表达水平 (n=3)

组别	p-Smad1/5/8	Smad1/5/8	JunB
Blank组	0.545 9 ± 0.014 2 ^b	0.540 8 ± 0.007 9 ^a	0.301 9 ± 0.006 9 ^a
BMP9组	0.588 4 ± 0.022 8 ^b	0.741 7 ± 0.014 9 ^b	0.536 5 ± 0.013 5 ^b
BMP9+Control组	0.584 4 ± 0.041 5	0.732 3 ± 0.025 1	0.534 6 ± 0.012 4
BMP9+NICD组	0.631 3 ± 0.015 5 ^b	0.737 4 ± 0.019 3 ^b	0.097 4 ± 0.008 8 ^a
F 值	5.462	89.605	1 158.253
P 值	0.024	0.000	0.000

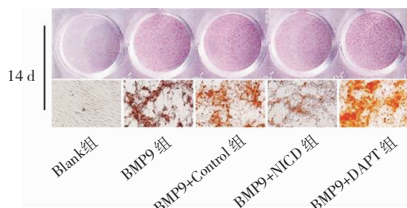
注:a,与 BMP9+Control 组比较,P<0.05;b:与 BMP9+Control 组比较,P>0.05

2.4 DAPT 阻断 Notch 信号通路后,部分解除了 Notch 通路对 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的抑制作用

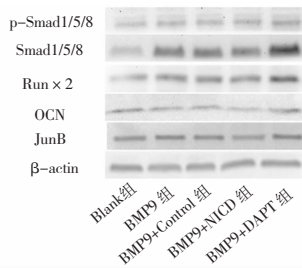
根据上述研究结果,Notch 通路在 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化过程中可能起负性调控作用,为了进一步明确其作用,采用 Notch 通路抑制剂 DAPT 处理目的细胞后,再次检测 ALP、钙盐沉积、成骨分化相关标志物的表达变化。结果显示,与对照组相比,在 DAPT 处理组检测到早期成骨标志物 ALP 在 5、7 d 的染色及活性减弱(5 d,44 812.66 ± 4 174.94 vs. 146 451.00 ± 14 889.67,P=0.000;7 d,64 622.93 ± 4 724.70 vs. 89 588.66 ± 5 928.32,P=0.000)(图 4A),而晚期标志物钙盐染色明显增强(图 4B),Western blot 结果显示,处理 5 d 后检测到成骨分化基因 JunB、Runx2、Smad1/5/8 及 p-Smad1/5/8 的表达在 DAPT 处理组中上调(图 4C、D)。这些结果表明,DAPT 抑制 Notch 通路后促进成骨相关基因 JunB、Runx2、Smad1/5/8 及 p-Smad1/5/8 表达(表 5),进一步证明 NICD 抑制 BMP9 介导的间充质干细胞成骨分化。



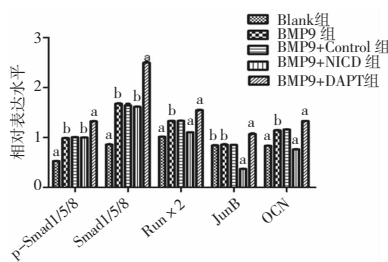
A. 各组 ALP 染色结果



B. 各组钙盐结节茜素红染色结果



C. Western blot 检测各组成骨分化指标的蛋白表达



a: 与 BMP9+Control 组相比较, $P < 0.05$;
b: 与 BMP9+Control 组相比较, $P > 0.05$

D. 定量分析各组中成骨分化指标的蛋白表达水平

图 4 DAPT 阻断 Notch 通路促进 C3H10T1/2 细胞成骨分化

3 讨论

组织工程技术定向诱导多能干细胞成骨分化是目前临床组织工程技术研究热点,但由于干细胞分化的多样性,导致如何精准调控干细胞定向精准分化为目的细胞是当前面临的首要问题。BMPs 蛋白家族因其较强的体内诱导成骨能力,目前其家族中某些亚型已用于临床治疗,但其成骨效果及各种副作用面临着挑战,因此有必要寻求一种成骨效率更强、副作用更少的诱导因子。前期研究表明 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的能力优于其他各亚型^[7],但仍出现向脂肪、软骨分化的现象^[19],而越来越多的研究证明 Notch 信号通路参与调控 BMP 介导的间充质干细胞成骨分化过程,但其作用及具体机制不明确^[5, 13, 16, 20]。因此,本实验主要目的是探讨 Notch 通路在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化过程中的作用及具体的调控机制。

首先通过检测 2 个经典早晚期成骨标志物 ALP、钙盐沉积,观察到 NICD 激活 Notch 通路后能明显抑制 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的 ALP 表达、钙盐沉积,表明 Notch 通路可能负性调控 BMP9 诱导成骨分化过程,这一结果与 Notch2 失活后促进松质骨骨量形成相符^[21]。为进一步明确 NICD 抑制作用的机制,qRT-PCR 及 Western blot 检测结果显示,在 NICD 处理组中 Runx2、OCN、OPN 的蛋白表达水平明显下降,而晚期成骨基因 OCN、OPN 的 mRNA 水平表达变化不明显,这些结果表明 Runx2 在成骨分化早期有重要作用^[22],而 DAPT 抑制 Notch 通路后,成骨分化相关基因表达上调,说明 Notch1/2/3/4 各亚型及其靶基因 Hey1、Hes1 在成骨分化过程中可能有着不同作用^[20, 23-24]。Western blot 结果意外发现,在 NICD 抑制 Runx2 表达的情况下,Runx2 上游转录复合 Smad1/5/8 及 p-Smad1/5/8 表达却未

表 5 各组中的 JunB、Smad1/5/8、p-Smad1/5/8、OCN、Runx2 蛋白表达水平 (n=3)

组别	p-Smad1/5/8	Smad1/5/8	Runx2	OCN	JunB
Blank组	0.529 7 ± 0.001 1 ^a	0.859 8 ± 0.010 7 ^a	1.050 2 ± 0.146 2 ^a	0.842 4 ± 0.010 4 ^b	0.834 6 ± 0.004 2 ^a
BMP9组	0.988 9 ± 0.006 5 ^b	1.678 3 ± 0.017 7 ^b	1.331 9 ± 0.009 2 ^b	0.857 5 ± 0.014 2 ^b	1.144 7 ± 0.008 5 ^b
BMP9+Control组	1.005 4 ± 0.011 1	1.643 6 ± 0.058 0	1.333 9 ± 0.006 8	0.850 5 ± 0.005 8	1.160 3 ± 0.008 0
BMP9+NICD组	1.000 8 ± 0.004 0 ^b	1.616 7 ± 0.009 2 ^b	1.104 0 ± 0.002 1 ^b	0.370 8 ± 0.005 8 ^a	0.764 2 ± 0.003 8 ^a
BMP9+DAPT组	1.323 3 ± 0.009 8 ^a	2.498 0 ± 0.026 5 ^a	1.548 9 ± 0.011 9 ^a	1.072 3 ± 0.019 4 ^a	1.328 3 ± 0.006 8 ^a
F 值	4 327.523	1 100.376	704.669	27.958	1 320.360
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与 BMP9+Control 组比较, $P < 0.05$;b:与 BMP9+Control 组比较, $P > 0.05$

见明显变化,这说明 Runx2 表达可能在基因启动阶段受到影响或在其上游还存在其他的调控基因,查阅文献发现,BMP/Smad 在诱导转录基因 Runx2 前需先合成一个新蛋白 JunB^[18],且缺失 JunB 基因致小鼠出现严重骨质疏松^[25],提示基因 JunB 在成骨分化中扮演重要角色。而 Western blot 结果验证了在 NICD 组中 JunB 表达受到明显抑制,这表明基因 JunB 可能受 Notch 通路调控,进而影响成骨分化过程^[18]。

综上所述,Notch 信号通路在 BMP9 介导的间充质干细胞成骨分化过程中起着重要的调控作用,而本实验首次证实 Notch 通路调控 JunB 影响成骨分化基因 Runx2、OCN、OPN 等的表达,进而抑制 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的过程,而非依赖影响转录复合体 p-Smad1/5/8 或直接影响 Runx2 的表达。另外,激活的 Notch 信号通路是否通过其转录因子 NICD 或靶基因 Hey1、Hes1 影响基因 JunB 的表达和其具体机制是需要进一步研究的重点。

参 考 文 献

- [1] Giuliani N, Lisignoli G, Magnani M, et al. New insights into osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and their potential clinical applications for bone regeneration in pediatric orthopaedics[J]. *Stem Cells Int*, 2013, 2013: 312501.
- [2] Phinney DG. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(9): 2806–2812.
- [3] Gori F, Thomas T, Hicok KC, et al. Differentiation of human marrow stromal precursor cells; bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation[J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(9): 1522–1535.
- [4] Bennett CN, Ouyang H, Ma YL, et al. Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(12): 1924–1932.
- [5] Engin F, Yao Z, Yang T, et al. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis[J]. *Nat Med*, 2008, 14(3): 299–305.
- [6] Chenard KE, Teven CM, He TC, et al. Bone morphogenetic proteins in craniofacial surgery: current techniques, clinical experiences, and the future of personalized stem cell therapy[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 601549.
- [7] Kang Q, Sun MH, 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.
- [8] Cornell RA, Eisen JS. Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16(6): 663–672.
- [9] Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology[J]. *Development*, 2007, 134(15): 2709–2718.
- [10] Duncan AW, Rattis FM, Dimascio LN, et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(3): 314–322.
- [11] Zanotti S, Canalis E. Notch Signaling and the Skeleton[J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(3): 223–253.
- [12] 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.
- [13] Hilton MJ, Tu X, Wu X, et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation[J]. *Nat Med*, 2008, 14(3): 306–314.
- [14] Fu Y, Chang A, Chang L, et al. Differential regulation of transforming growth factor beta signaling pathways by Notch in human endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(29): 19452–19462.
- [15] Sun Y, Lowther W, Kato K, et al. Notch4 intracellular domain binding to Smad3 and inhibition of the TGF-beta signaling[J]. *Oncogene*, 2005, 24(34): 5365–5374.
- [16] Shang X, Luo Z, Wang X, et al. Deletion of RBPK in mesenchymal stem cells enhances osteogenic activity by up-regulation of bmp signaling[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135971.
- [17] Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(12): 3491–3501.
- [18] Lee KS, Hong SH, Bae SC. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein[J]. *Oncogene*, 2002, 21(47): 7156–7163.
- [19] Lamplot JD, Qin J, Nan G, et al. BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis[J]. *Am J Stem Cells*, 2013, 2(1): 1–21.
- [20] Zanotti S, Smerdel-Ramoya A, Stadmeier L, et al. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(8): 3890–3899.
- [21] Yorgan T, Vollersen N, Riedel C, et al. Osteoblast-specific Notch2 inactivation causes increased trabecular bone mass at specific sites of the appendicular skeleton[J]. *Bone*, 2016, 87: 136–146.
- [22] Xu J, Li Z, Hou Y, et al. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(12): 2527–2535.
- [23] Zhu F, Sweetwyne MT, Hankenson KD. PKCdelta is required for Jagged-1 induction of human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(6): 1181–1192.
- [24] Tezuka K, Yasuda M, Watanabe N, et al. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch[J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(2): 231–239.
- [25] Kenner L, Hoebertz A, Beil FT, et al. Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects[J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(4): 613–623.

(责任编辑:张辉洁)