·论著·

p44/42 和 p38 MAPKs 在骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中发挥不同的功能

廖清船 肖洲生 秦艳芳 赵彦 潘玮 刘霆 周宏灏

【摘要】 **目的** 观察 p44/42MAPK、p38 MAPK 通路在维生素 C(Vit C)、β-磷酸甘油(β-GP)诱导骨髓间充质干细胞(BMSCs)向成骨细胞分化过程中的作用。**方法** 用[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率法反映细胞增殖情况;测定碱性磷酸酶活性与钙沉积量反映细胞向成骨细胞分化状态;用 Western-blotting 法反映 MAPK 的表达情况。**结果** 与溶剂对照组相比,在促成骨细胞分化剂 Vit C、β-GP 作用下,骨髓间充质干细胞(BMSCs) p44/42MAPK、p38 MAPK 通路均提前 5 d 激活。p44/42MAPK 通路阻断剂(PD98059)明显减少[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率,抑制 BMSCs 的增殖;而 p38 MAPK 通路的阻断剂(SB203580)则显著降低 ALP 活性及钙沉积量,抑制 BMSCs 向成骨细胞的分化。**结论** p44/42MAPK 通路在 BMSCs 的增殖过程中起重要作用,而 p38 MAPK 通路可能与 BMSCs 向成骨细胞分化调节有关。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 增殖; 成骨细胞分化; p44/42MAPK; p38 MAPK

p44/42 and p38 MAPKs exert differences functions in osteoblastic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell cultures *LIAO Qingchuan, XIAO Zhousheng, QIN Yanfang, et al. Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Changsha* 410078, China

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the roles of p44/42 and p38MAPK signaling cascades on BMSCs differentiation into osteoblasts induced by Vit C and β-GP. **Methods** The cell proliferation was assayed by [^{3}H]-thymidine incorporation. The osteoblastic differentiation in BMSCs was assessed by determination of alkaline phosphatase activity (ALP) and calcium deposition. The MAPK signaling activity was detected by Western blotting. **Results** Western blotting analysis showed that the differentiation media (Vit C and β-GP) resulted in 5 days earlier activation than the control in both p44/42MAPK and p38 MAPK pathways. Vit C and β-GP dramatically increased [^{3}H]-thymidine incorporation and proliferation, and induced ALP activity and clcium deposition in BMSCs cultures. PD98059 (10-25 μM), an inhibitor of p44/42MAPK signaling cascades, resulted in dose-dependent decrease in [^{3}H]-thymidine incorporation, while SB203580 (1-10 μM), an inhibitor of p38MAPK signaling cascades, resulted in dose-dependent reduction in ALP activity and calcium deposition in BMSCs cultures. **Conclusion** p44/42 MAPK pathway plays an essential role in the proliferation of BMSCs, while p38 MAPK pathway might be involved in osteoblastic differatiation of BMSCs cultures.

【**Key words**】 Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; Proliferation; Osteoblastic differentiation; p44/42MAPK; p38 MAPK

来源于骨髓的间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)具有较强的增殖和多向分化潜能,在不同的诱导条件下可分别向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞分化[1-4]。目前已证实在 Vit C 和 β-GP 的诱导下,骨髓间充质干细胞可以向成骨细胞分化[1],但 Vit C 和 β-GP 诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的具体分子机理尚需探讨。现已知丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导途径是细胞外信号引起细胞核内反应的通路之一,可参与细胞的增殖、分化、凋亡等多种生理过程[5]。然而,MAPK 信号转导途径是否参与,或者怎样参与骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的调节尚

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171085);教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划(TRAPOYT)资助项目(200026)

作者单位:410078 长沙,中南大学临床药理学研究所(廖清船、肖洲生、潘玮、周宏灏);暨南大学医学院病理教研室(秦艳芳);中南大学基础医学院(赵彦、刘霆)

通讯作者:肖洲生

不清楚。笔者将研究 p44/42MAPK、p38MAPK 通路在 Vit C 和 β-GP 诱导下骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化过程中的作用。

材料和方法

1. 细胞培养与成骨细胞增殖、分化指标检测

选 6～8 周昆明种雌性小鼠(由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供),颈椎脱臼,无菌操作分离股骨和胫骨,剪去干骺端,用含 15% FBS、100 KU/L 青霉素 G、100 mg/L 硫酸链霉素的 α-MEM(含酚红)冲洗骨髓腔得到骨髓细胞悬液,镜下计数,并将细胞浓度调整为 1×10^7/ml,种入 12 孔培养板,置 37℃、5% CO_2 培养箱内培养。第 3 天换液一半,在第 5 天全部换液后贴壁生长细胞即为骨髓间充质干细胞(BMSCs)。将 BMSCs 培养条件改为含成骨细胞分化培养剂的无酚红 α-MEM(含 10% FBS, VitC 和 β-Gp)培养液(并计为 0 d),继续培养 12 d。以后每 3 天换液 1 次。成骨细胞增殖用[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率来反映,成骨细胞分化用细胞内碱性磷酸酶(ALP)活性以及钙沉积量(Calcium Deposition)[6,7]来反映。细胞蛋白质含量用考马斯亮蓝法测定并校正。

2. 实验设计与分组

为观察维生素 C(Vit C)、β-磷酸甘油(β-GP)对 BMSCs 的促成骨细胞分化作用,实验可分为对照组(CON 组)(无酚红 α-MEM, 10% FBS),促成骨细胞分化组(DF 组)(无酚红 α-MEM, 10% FBS, 5 mmol/L β-GP, 25 μg/ml Vit C),为观察分别阻断 p44/42 MAPK 通路(阻断剂为 PD98059)和 p38MAPK 通路(阻断剂为 SB203580)后 BMSCs 向成骨细胞的分化情况,实验又可按不同的阻断剂浓度分为促成骨细胞分化组(DF 组)、含阻断剂组(无酚红 α-MEM, 10% FBS, 5 mmol/l β-GP、25 μg/ml; Vit C,不同浓度的 PD98059 (10 μmol、25 μmol)或 SB203580(1 μmol, 5 μmol, 10 μmol)。

3. Western blotting 方法

实验分两组,对照组(CON 组)(不含 Vit C、β-GP),促分化组(DF 组)(含 Vit C、β-GP),分别在第 5, 12 天细胞换液后 5 min, 15 min, 1 h, 3 h, 6 h 收集蛋白质,检测 pp44/42、pp38 的时间表达情况。然后在表达高峰时间收集每天换新鲜培养液后的蛋白,作 Western-blotting 检测。

培养细胞用冰冷的 PBS 洗涤细胞,加细胞裂解液,在冰上将细胞迅速刮下,冰浴条件下超声破碎细胞,离心 10 min,吸出上清液体,用 Bradford 方法进行蛋白质浓度测定,取提取的蛋白质样品(25 μg)加入等体积上样缓冲液,100℃煮 5 min,电泳后电转移至 PVDF 膜上,封闭 1 h, 1∶1000 加入兔抗大鼠磷酸化 p38 MAPK 单克隆抗体、兔抗大鼠磷酸化 p44/42 MAPK 单克隆抗体(或兔抗大鼠非磷酸化 p38 MAPK 单克隆抗体,兔抗大鼠非磷酸化 p44/ 42 MAPK 单克隆抗体),4℃孵育过夜,TBST 洗涤。1∶2000 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h,TBST 洗涤。然后,浸入含化学发光试剂 A(LumiGL)、B(Peroxide)的水溶液中激发荧光,在暗室中压 X 光片,然后显影,定影。

4. 统计学处理

差异显著性用 t 检验(CON 组与 DF 组)或单因素方差分析(DF 组与各阻断剂组)。

结 果

1. [^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率测定

在图 1.A 和 B 中可以看出,与对照组(CON)相比,VitC 和 β-GP(DF 组)可显著增加[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶的掺入率,其作用可被 p44/42MAPK 途径阻断剂 PD98059 阻断(图 1.A)($P < 0.05$);但 p38 MAPK 途径阻断剂 SB203580 则对 VitC 和 β-GP 增加[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶的掺入率没有阻断作用,甚至增加[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶的掺入率(见图 1.B),其中以 1 μmol/L 的 SB203580 作用最明显($P < 0.05$)。这一结果表明 p44/42 MAPK 途经可能参与了 BMSCs 细胞的增殖调节,而 p38 MAPK 途经在 BMSCs 细胞的增殖过程中可能起着负反馈性的调节作用。

2. 细胞内碱性磷酸酶(ALP)活性测定

在图 1.C 和 D 中可以看出,与对照组相比,VitC 和 β-GP(DF 组)可显著增加细胞内碱性磷酸酶(ALP)活性($P < 0.05$),其作用可被 SB203580 呈剂量依赖性的阻断(图 1.D)($P < 0.05$),而 PD98059 对 VitC 和 β-GP 升高细胞内碱性磷酸酶(ALP)活性没有抑制作用,甚至提高 DF 组中 ALP 的活性(图 1.C)。由于细胞内碱性磷酸酶(ALP)为成骨细胞分化的有效指标,这一结果表明 VitC 和 β-GP 促进 BMSCs 细胞向成骨细胞的分化可能通过 p38MAPK 途经,而 p44/42 途经在成骨细胞的分化中也可能起负反馈调节作用。

3. 钙沉积量的测定

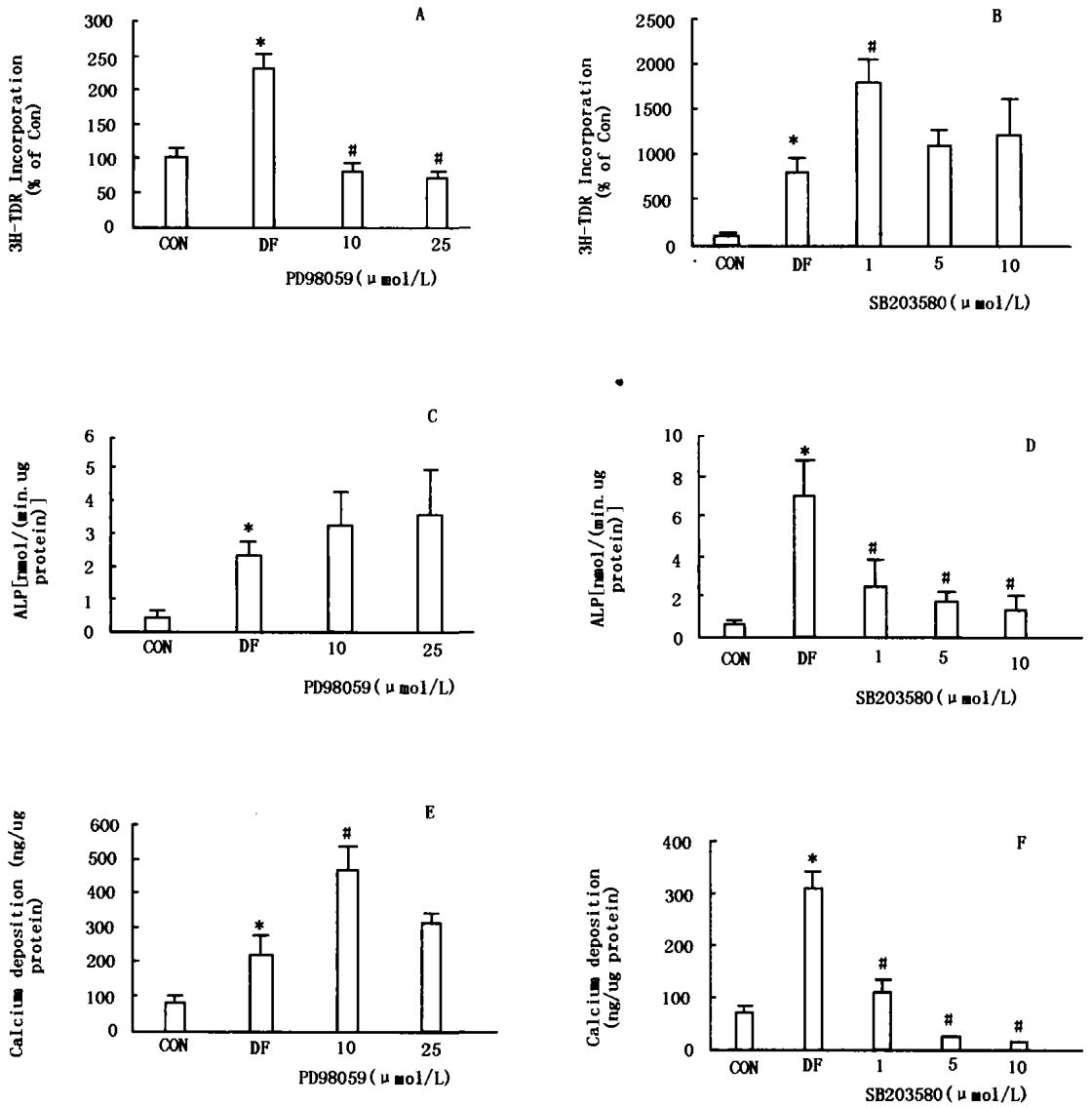
在图 1.E 和 F 中可以看出,与 ALP 酶活性相似,Vit C 和 β-GP(DF 组)可显著增加钙沉积量($P < 0.05$),其作用可被 SB203580 剂量依赖性的阻断(图

1.F)($P < 0.05$),而 PD98059 对 Vit C 和 β-GP 增加钙沉积量没有抑制作用,10 μmol/L PD98059 明显增加 DF 组的钙沉积量,可能与其促进 BMSCs 细胞的增殖有关(图 1.E)($P < 0.05$)。因为钙沉积量测定是反映成骨细胞分化的另一有效指标,进一步提示 BMSCs 向成骨细胞的分化是通过 p38MAPK 途经。

4.Western blotting 分析

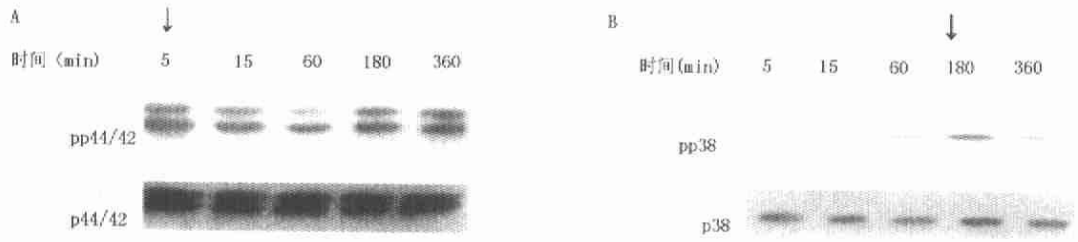
DF 组换液后 pp44/42 的表达在 5 min 达到最高,如图 2.A 所示,在第 5,12 天均可检测到 pp44/42 的表达(图 2.A 为第 5 天)。DF 组换液后 pp38 的表达在 3 h 达到最高峰,但在第 5 天可检测到低量 pp38 的表达,图 2.B 为第 12 天结果。而在 CON 组第 5 天均没有检测到明显的 pp44/42、pp38 的表达(结果未显示)。这一实验表明 VitC 和 β-GP 能引起 p44/42、p38MAPK 途径的激活。

收集每天(第 4 ~ 11 天)换液后 5 min 的蛋白检测 pp44/42,收集每天(第 4 ~ 12 天)换液后 3 h 的蛋白检测 pp38,以便观察在整个培养周期中 pp44/42,pp38 的动态变化。在第 4 ~ 11 天的培养周期中,pp44/42 的表达在 CON 组与 DF 组相比,有明显的差别,CON 组 p44/42 在第 9 ~ 11 天才有微弱的激活效应(图 3.A),而在 DF 组中,第 4 ~ 11 天 p44/42 都有



1.PD98059 明显抑制[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率(图 1.A, $P < 0.05$),10 μmol/L 的 PD98059 同时增强 ALP 活性(图 1.C)和 Ca 钙沉积量(图 1.E, $P < 0.05$)。2.SB203580 剂量依赖性降低 ALP 活性(图 1.D, $P < 0.05$)和 Ca 钙沉积量(图 1.F, $P < 0.05$),1 μmol/L 的 SB203580 同时增加[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率(图 1.B, $P < 0.05$)。与对照比较 * $P < 0.05$;与 DF 比较 # $P < 0.05$

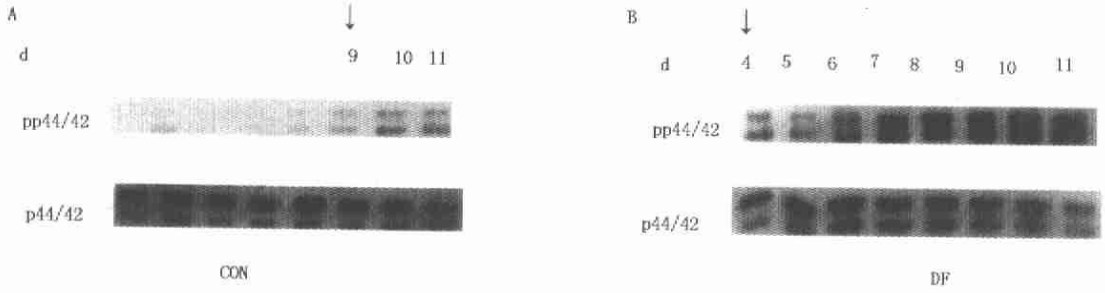
图 1 PD98059 和 SB203580 对培养 BMSCs 的[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率、ALP 活性、Ca 钙沉积量的影响



1. p44/42MAPK 被快速激活，5 min 后达最高(图 2.A)。2. p38MAPK 在 15 min 后可见被激活，180 min 后达最高(图 2.B)。

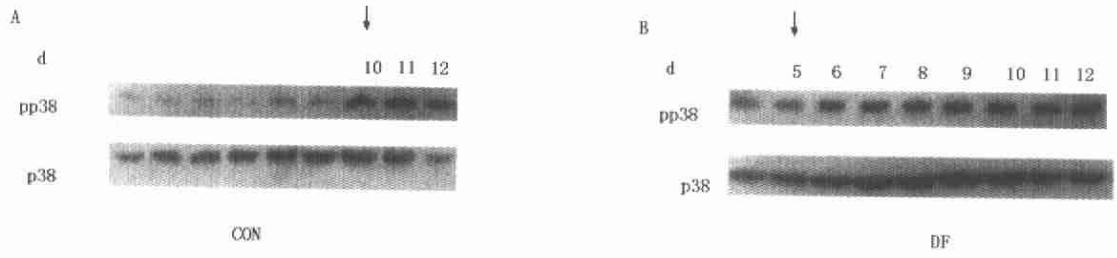
图 2 含诱导分化剂培养基对 BMSCs 的 p44/42MAPK 和 p38MAPK 激活的时间曲线

明显的激活(图 3.B)。pp38 的表达在 DF 组与 CON 组也有明显区别，CON 组在第 10 天才可以看到 pp38 的表达(图 4.A)，而 DF 组在第 5 天就可以看到 pp38 的表达(图 4.B)，与 CON 组相比，DF 组提前 5 天促进 pp38 的活化表达。



1. 对照组(CON)(不含促分化剂)第 9 天才见 p44/42MAPK 微弱激活(图 3.A)。2. 促成骨细胞分化组(DF)第 4 天即可见 p44/42MAPK 明显激活(图 3.B)

图 3 培养周期中 p44/42 MAPK 激活的时间曲线



1. 对照组(CON)(不含促分化剂)第 10 天才见 p38MAPK 激活(图 4.A)。2. 促成骨细胞分化组(DF)第 5 天即可见 p38MAPK 明显激活(图 4.B)

图 4 培养周期中 p38 MAPK 激活的时间曲线

讨 论

我们以前的研究表明：在促成骨细胞分化剂作用下骨髓间充质干细胞(BMSCs)可向成骨细胞分化，并证实 NOS-NO 通路参与了这一调节过程[6,7]。然而 BMSCs 细胞的增殖、分化是一个复杂的过程，可能涉及到多条信号通路的调控，其中 MAPK 通路可能起着极其重要的调节作用[5]。为此，我们以 VitC、β-GP 为促成骨细胞分化剂，诱导小鼠的 BMSCs 向成骨细胞分化，观察 p44/42、p38 两条 MAPK 途径在 BMSCs 向成骨细胞分化过程的作用。实验结果显示：①与 CON 组比较，在促成骨细胞分化剂作用下，DF 组 BMSCs 培养细胞增殖明显加快，出现成骨细胞表型分化。该过程同时伴随 p44/42 与 p38 的激活，表明这两条通路都参与 BMSCs 向成骨细胞的增殖与分化过程调节。②与 CON 组比较，在 4～11 d 的培养周期中，DF 组中的 p44/42 与 p38 要提前 5 d 开始激活并维持，而 CON 组中的 p44/42、p38 均推

迟才出现微弱激活。③p44/42通路阻断剂PD98059能够显著降低[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率，但对ALP活性、钙沉积量没有抑制作用。10 μmol/L PD98059反而能增强ALP活性以及增加钙沉积量，表明p44/42可能是参与BMSCs的增殖调节。而p38阻断剂SB203580能剂量依赖性地减弱ALP活性、减少钙沉积量，但对[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率不仅没有抑制作用，甚至1 μmol/L SB203580能够增加[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率，表明p38对BMSCs向成骨细胞特异性分化可能起着重要的调节作用。

目前关于MAPK通路在BMSCs向成骨细胞特异性分化中的作用存在矛盾的报道。Jaiswal等[8]发现在诱导成人BMSCs向成骨细胞分化时有p44/42的激活，p44/42阻断剂PD98059能剂量依赖性的阻断其向骨组织的分化，并且出现向脂肪组织分化的增强。而Suzuki等[9]的实验发现，p44/42途径对MC3T3-E1细胞的增殖起重要作用，对其分化作用不明显，而p38途径在MC3T3-E1细胞的分化过程中起重要作用，对其增殖作用不明显，这一结果与我们观察到的结果非常一致。此外，MAPK通路对Runx2/Cbfal成骨特异性转录激活因子的调控也存在矛盾的报道。Xiao等[10]证明p44/42MAPK可以通过改变Runx2/Cbfal的蛋白磷酸化水平来参与对成骨细胞分化的调节。而Lee等[11]在实验中发现，TGF-β和BMP-2则可通过p38MAPK通路诱导Runx2/Cbfal转录表达。不管怎样，p44/42或p38可通过不同的方式影响Runx2/Cbfal的功能，为MAPK通路参与骨髓间充质干细胞增殖及向成骨细胞分化调控的重要机制之一。

现已有实验证明，p44/42、p38两条通路存在相互作用，Singh等[12]在HepG2细胞中用p38抑制剂SB202198阻断p38通路后出现p44/42通路持久的激活。而Zhang等[13]在Hela细胞、HEK293细胞中发现anisomycin通过激活p38 α而抑制p44/42的活化。在本实验中，p44/42抑制剂PD98059在10 μmol/L剂量时增强ALP活性以及增加钙的沉积也有可能是通过促进p38的活化而实现，而1 μmol/L SB203580能够增加[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率也有可能是SB203580通过促进p44/42的活化而实现。由于细胞的信号传导是一个非常复杂的网络系统，在我们的研究中SB203580对[^{3}H]-甲基胸腺嘧啶掺入率(图1.B)和PD98059对钙的沉积量(图1.E)的增加没有出现剂量依赖性的效应，这可能是由于高浓度的SB203580和PD98059影响到了信号传导网络系统中的其他成员，从而影响BMSCs的增殖与分化，相关的研究有待于进一步深入。

综上所述，我们的研究表明：在骨髓间充质干细胞向成骨细胞的增殖分化过程中，p44/42、p38途径既相互独立，又相互关联，但却有着不同的分工。p44/42途径介导细胞的增殖，而p38途径对BMSCs向成骨细胞的分化起着重要的作用。这为寻找药物促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化提供了新的靶点，从而为防治骨质疏松指明了一条新的思路。

参 考 文 献

1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999, 284: 143-147.

2 Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, et al. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res, 1998, 238: 265-372.

3 Gimble JM, Youkhana K, Hua X, et al. Adipogenesis in a myeloid supporting bone marrow stromal cell line. J Cell Biochem, 1992, 50: 73-82.

4 Wakitani S, Saito T, Caplan JA, et al. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells eposed to 5-aza. Muscle Nerve, 1995, 18: 1412-1413.

5 Chang L, Karin M. Mammalina MAP kinase signaling cascades. Nature, 2001, 410: 37-40.

6 Xiao ZS, Quarles LD, Chen QQ, et al. Effect of asymmetric dimethylarginine on osteoblastic differentiation. Kidney Int, 2001, 60: 1699-1704.

7 宋丽华，肖洲生，潘玮，等．环孢霉素A对成骨细胞分化的影响．中华器官移植杂志，2003，24：236-238.

8 Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder P, et al. Adult human mesencnymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogenic-activated protein kinase. J Bio Chem, 2000, 275: 9645-9652.

9 Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, et al. Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. Bone, 30: 91-98.

10 Xiao GZ, Jiang D, Peedikayil T, et al. MAPK pathway activates and phosphorylates the osteoblast-specific transcription factor, Cbfal. J Bio Chem, 2000, 275: 4453-4459.

11 Lee KS, Hong SH, Bae SC. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression follwing induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. Oncogene, 2002, 21: 7156-7163.

12 Singh, RP, Dhawan P, Golden C, et al. One-way cross-talk between p38(MAPK) and p42/44(MAPK). Inhibition of p38(MAPK) induces low density lipoprotein receptor expression through activation of the p42/44(MAPK) cascade. J Biol Chem, 1999, 274: 19593-19600.

13 Zhang H, Shi, XQ, Hampong M, et al. Stressinduced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. J Biol Chem, 2001, 276: 6905-6908.

(收稿日期：2003-11-18)