

· 论 著 ·

FSH β 在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化中的作用研究

成亚琳¹ 曾继涛¹ 黄敏² 刘俊银³ 涂小林³ 刘宏^{1*}

1.重庆医科大学附属第一医院生殖健康与不孕症中心,重庆 400016

2.成都市第五人民医院,四川 成都 611130

3.重庆医科大学生命科学研究院骨发育与再生实验室,重庆 400016

中图分类号: R322.54;R322.71;R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 06-0775-08

摘要: **目的** 探讨卵泡刺激素 β 亚基 (follicle-stimulating hormone β -subunit, FSH β) 在骨形态发生蛋白 9 (bone morphogenetic protein 9, BMP9) 诱导间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 成骨分化中的作用及可能的机制。 **方法** 利用细胞化学染色方法检测处理因素 (重组腺病毒或 γ 分泌酶抑制剂 DAPT) 作用于间充质干细胞 5 d 后细胞中碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色的变化。通过实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, Q-PCR) 检测 BMP9 mRNA、FSH β mRNA 和 Notch 信号通路靶基因 (Hey1) mRNA 的表达水平。利用茜素红 S (alizarin red S, ARS) 染色检测腺病毒感染间充质干细胞 21 d 后细胞中钙盐的沉积情况。 **结果** FSH β 处理组 ALP 表达较 GFP 对照组无明显改变, BMP9 处理组 ALP 表达较 GFP 对照组明显增加, 而 BMP9 与 FSH β 联合处理组 ALP 表达较 BMP9 处理组显著增加。另外, BMP9 处理组晚期成骨标志物钙盐结节、Notch 信号靶基因 Hey1 mRNA 表达水平较 GFP 对照组显著增加 ($P < 0.01$), 而 BMP9 与 FSH β 联合处理组较 BMP9 处理组表达显著增加 ($P < 0.01$)。使用药物 DAPT 抑制 Notch 信号后, BMP9 与 DAPT 联合处理组较 BMP9 单独处理组, ALP 染色、Hey1 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$); 且 BMP9+FSH β +DAPT 联合处理组较 BMP9+FSH β 联合处理组 ALP 染色、Hey1 mRNA 表达也显著降低 ($P < 0.05$)。 **结论** FSH β 可增强 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化, Notch 信号通路可能在其中发挥重要作用。

关键词: 骨形态蛋白 9; 卵泡刺激素; 间充质干细胞; Notch; DAPT

The study on the role of FSH β in BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells

CHENG Yalin¹, ZENG Jitao¹, HUANG Min², LIU Junyin³, TU Xiaolin³, LIU Hong^{1*}

1. Department of Reproduction Health and Infertility, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016

2. Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130

3. Laboratory of Skeletal Development and Regeneration, Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

* Corresponding author: LIU Hong, Email: 3367009927@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the role of FSH β (follicle-stimulating hormone β -subunit) in BMP9 (bone morphogenetic protein 9)-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Methods** The cytochemical staining method was used to detect the change of ALP (alkaline phosphatase) expression in the cells on the 5th day after the treatment factors (recombinant adenovirus or γ -secretase inhibitor DAPT) were applied to MSCs. Quantitative real-time PCR (Q-PCR) was used to detect the changes of mRNA expression levels of BMP9, FSH β and Notch signaling pathway target genes (Hey1). Alizarin Red S staining was used to detect the deposition of calcium salts in the cells on the 21st day after adenovirus-infection of MSCs. **Results** The ALP staining of FSH β treatment group was not significantly changed compared with the GFP group; the ALP staining of BMP9 treatment group was significantly higher than the GFP group; and the ALP activity of BMP9 and FSH β treatment group was significantly higher than the BMP9 treatment group. In addition, the expression levels of late osteogenic markers (calcium salt

* 通信作者: 刘宏, Email: 3367009927@qq.com

nodules) and Notch signaling target gene Hey1 mRNA in the BMP9 treatment group were significantly higher than those in the GFP group ($P < 0.01$), and further increased in the combined treatment group than the BMP9 treatment group ($P < 0.01$). After inhibiting Notch signal by DAPT, the ALP staining and the expression of Hey1 mRNA in the combined treatment group of BMP9+DAPT were significantly reduced compared with the separate treatment group of BMP9 ($P < 0.05$). Moreover, the ALP staining and the expression of Hey1 mRNA in BMP9+FSH +DAPT combined treatment group were significantly lower than that in BMP9+FSH combined treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** FSH β can enhance the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by BMP9, and Notch signaling may play an important role in it.

Key words: bone morphogenetic protein 9; follicle stimulating hormone; mesenchymal stem cells; Notch; DAPT

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于脂肪组织、骨髓、骨外膜、肌肉等^[1-2]的,具有成骨、成软骨、成脂、成肌等多系分化潜能的有自我更新能力的干细胞^[3-5],是再生医学骨组织修复的重要研究目标^[6]。C3H10T1/2细胞是从C3H小鼠分离建立的间充质干细胞株,是组织工程骨常用材料之一,研究不同信号通路在间充质干细胞成骨分化中的相互作用是组织工程骨研究的重要途径。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)超基因家族的重要成员之一,大量研究均证明它在出生后骨形成、心血管系统、神经系统发育中扮演着重要角色。自19世纪60年代由Urist发现并命名^[7-8]至今,已鉴定并克隆出20多种成员,其中BMP2、4、7已被临床用于骨折、骨不连等的辅助治疗。BMP9又称为生长分化因子2或GDF2^[9],最先在胎鼠肝脏中分离得到^[10],其前体与BMP2、4、5、6、7有50%~55%的相同氨基酸序列^[11],以自分泌和旁分泌形式分泌^[12],其在维持血管壁的完整性^[13]、抑制心肌纤维化^[14]、抑制肝纤维化^[15]、诱导成骨分化^[16]等方面具有重要作用。BMP9作为最具潜力的诱导成骨分化的骨形态发生蛋白之一^[17],部分BMP包括BMP4和BMP7已在临床中广泛用于骨缺损、骨再生及脊柱融合术^[18-19]。

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是常见的原发性骨质疏松症,特征是骨量减少和骨微结构破坏,骨脆性增加并易于骨折。以前的研究认为,PMOP主要原因是雌激素水平的降低,且雌激素用于其治疗可降低骨量丢失。但近10年的研究发现^[20],在围绝经期,雌激素水平尚维持在正常范围,卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)已显著升高,且此期骨量丢失较绝经后骨量丢失更高,提示FSH与PMOP有强烈相关性。FSH是来源于垂体前叶的促性腺激素,包括 α 和 β 两个亚基,其中 β 亚基是发挥其特异性功能的主要组成部分^[21],调节卵泡生长和成熟^[22],随着研究的深入,

发现其除与生殖功能相关外,还与绝经后内脏性肥胖^[23]、骨的重塑密切相关。部分学者认为^[24],FSH- β 主要通过增强骨的吸收来促进PMOP的发生;而Allan等^[25]则发现,FSH- β 转基因雌性小鼠能促进骨的形成。因此,FSH对骨的重塑功能和机制尚存争议。本课题组前期研究发现,FSH β 在BMP9诱导间充质干细胞成骨分化中起到促进作用,但具体机制并不明确。

Notch是至关重要的生长发育信号。当邻近细胞的受体与配体结合激活Notch信号后,Notch受体在肿瘤坏死因子 α 转化酶(TNF- α converting enzyme, TACE)和 γ -促分泌酶(γ -secretase)/早老素(presenilin, PS)两次裂解下,生成胞内域(intracellular notch, ICN)进入细胞核,调控靶基因(Hes1/5/7、Hey1/2/L)转录。有研究认为,内皮来源的Notch能调控骨内血管和骨的生成^[26];也有研究认为,Notch信号能通过抑制间充质干细胞成骨分化来维持骨髓中的干细胞数量^[27],表明Notch信号在骨中的作用错综复杂。此外,许多研究证实^[28-29], γ -促分泌酶的抑制剂DAPT是Notch信号的特异性抑制剂,通过阻断Notch信号,调节其在骨生长发育中的作用。有相关报道发现,Notch信号也在BMP9诱导间充质干细胞成骨分化中扮演着重要作用^[11],但对FSH β 增强BMP9促进间充质干细胞成骨分化中的影响未见报道。

因此,本研究旨在探讨Notch信号在FSH β 增强BMP9诱导间充质干细胞成骨分化中的具体作用,进一步拓宽FSH β 在骨骼方面的研究,为骨折、骨不连、骨质疏松症等骨骼疾病的防治提供依据。

1 材料及方法

1.1 试剂与细胞培养

C3H10T1/2细胞和人胚胎肾上皮细胞-293T均购买于American Type Culture Collection(ATCC)。细胞在DMEM培养基:高糖(90%)、胎牛血清(10%)、链霉素(100 mg/L)和青霉素(100 kU/L)中

培养,并置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中生长。本实验中使用的碱性磷酸酶染色试剂盒购买于碧云天生物科技有限公司;茜素红 S 染料购买于塞米克生物科技有限公司;所用反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购买于宝日医生物技术有限公司;TRIzol 购买于赛默飞世尔科技有限公司;DAPT 购买于 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 目标重组腺病毒(GFP、BMP9、FSH β)构建

采用 AdEasy 系统^[30]构建本研究中需要用到的重组腺病毒 Ad-GFP、Ad-BMP9 和 Ad-FSH β ,所有上述 3 种重组腺病毒均表达绿色荧光蛋白,其中 Ad-GFP 用作对照组。利用 293T 细胞扩增腺病毒。

1.3 实验分组与重组腺病毒滴度、药物浓度测定

根据研究目的将实验分为对照组(Ad-GFP)和实验组(Ad-FSH β 、Ad-BMP9 和 Ad-BMP9 + Ad-FSH β)。在实验前,将对数生长期 C3H10T1/2 细胞以适当密度(约 5×10^5 /孔)接种于 24 孔板,贴壁后,按不同倍数稀释重组腺病毒,以如下体积:0.1、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、15.0、20.0 μ L/孔感染细胞,24 h 后观察绿色荧光,选定重组腺病毒感染率所需稀释倍数,并根据研究目的选择最佳感染率。最后根据实验设计将不同浓度的 DAPT 加入联合感染腺病毒组,根据碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色结果确定药物的最佳使用浓度。

1.4 ALP 表达检测

将对数期生长 C3H10T1/2 细胞以适当密度(约 5×10^5 /孔)接种于 24 孔板,细胞贴壁后,加入对照组和实验组选定滴度的重组腺病毒或者药物,并于第 5 天按照试剂盒的使用说明对细胞进行 ALP 染色。各组实验重复 3 次。

1.5 茜素红 S 染色测定钙盐结节

将对数期生长 C3H10T1/2 细胞以适当密度(约 5×10^5 /孔)接种于 24 孔板,细胞贴壁后,按研究目标分别加入实验组和对照组的重组腺病毒感染细胞,并于病毒感染细胞后第 3 天将普通培养基更换为工作浓度为 10 mmol/L β -磷酸甘油钠、50 μ g/mL 维生素 C 的选择培养基,继续培养至 21 d 后按照说明书进行茜素红 S 染色。每组实验重复 3 次。

1.6 细胞总 RNA 提取、逆转录以及实时荧光定量 PCR 实验

将对数期生长 C3H10T1/2 细胞以适当密度(约 5×10^5 /孔)接种于 24 孔板,细胞贴壁后,按研究目标分别加入相应的处理因素,于指定时间点(腺病毒感染后第 5 天)采用 TRIzol 法从各组细胞中提取总 RNA,并进行逆转录制备 cDNA,最后采用 Q-PCR 技术测定相应日的基因 mRNA 的表达水平。每组实验重复 3 次。各目的基因引物序列见表 1。

表 1 Q-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences table of Q-PCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
BMP9	TCTTCTCCAATGACCGCAGCAATG(24 bp)	CTCCTCCTCTTGGCTCTCACCTG(23 bp)
FSH β	CTTCAAGGAGCTGGTATACGAGAC(24 bp)	CAGTCAGTGCTGTCGCTGTC(20 bp)
Hey1	CACTGCAGGAGGGAAGGTTAT(22 bp)	CCCCAACTCCGATAGTCCAT(21 bp)
CHOB	CAGAATGCTAGGAAGGTCACG(21 bp)	CGAATGCTGTAATGGCGTATC(21 bp)

1.7 数据分析

本研究使用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析,并用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;组间比较通过 Student *t*-test 进行,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 C3H10T1/2 细胞感染重组腺病毒后相应腺病毒 mRNA 的表达检测和 ALP 检测

C3H10T1/2 细胞在各组腺病毒(Ad-GFP、Ad-FSH β 及 Ad-BMP9)感染 48 h 后提取总 RNA 并检测 FSH β 和 BMP9 mRNA 的表达水平。利用 Q-PCR 方法检测后,分析其 mRNA 表达水平的相对定量值;于腺病毒感染 5 d 后利用 ALP 染色方法观察细

胞中 ALP 的表达变化。结果显示,BMP9 处理组较 GFP 对照组 BMP9 mRNA 表达水平显著增高,FSH β 处理组较 GFP 对照组 FSH β mRNA 表达水平显著增高,且差异均有统计学意义($P < 0.01$,图 1A、1B);此外,ALP 染色显示,BMP9 处理组 ALP 染色较 GFP 对照组深(图 1C);而 FSH β 处理组 ALP 染色较 GFP 对照组无显著改变(图中未显示)。提示各腺病毒成功感染 C3H10T1/2 细胞并表达,且 BMP9 能诱导间充质干细胞成骨分化,而单独的 FSH β 则无诱导其成骨功能。

2.2 FSH β 增加 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞的 ALP 表达

骨中 ALP 活性与骨的钙化作用密切相关,是评

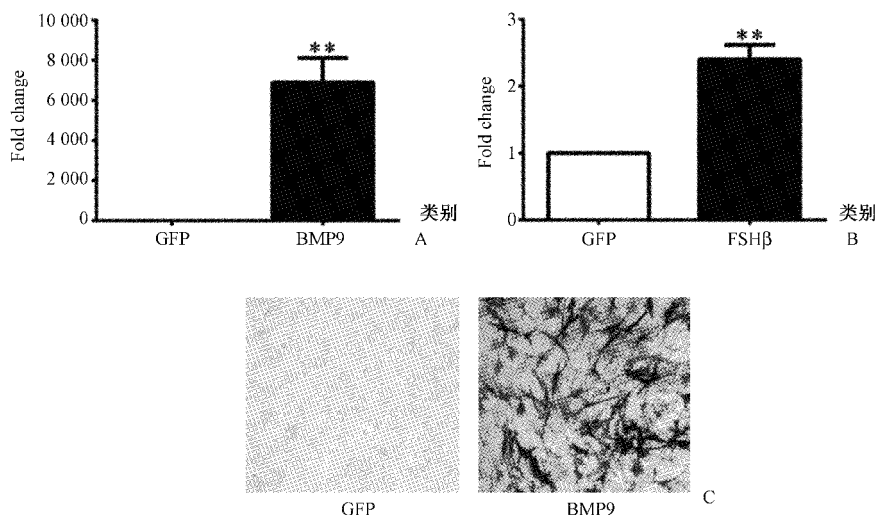


图1 GFP、BMP9 和 FSH β 重组腺病毒分别感染 C3H10T1/2 细胞后 48 h 相应 mRNA 表达水平及 5 d 后 ALP 表达检测 (100 $\times$) A: Q-PCR 结果显示 BMP9 重组腺病毒感染 C3H10T1/2 细胞 48 h 后 BMP9 mRNA 表达水平 ($n=3$, t -test, $^{**}P=0.0006$ vs GFP 组); B: Q-PCR 结果显示 FSH β 重组腺病毒感染 C3H10T1/2 细胞 48 h 后 FSH β mRNA 表达水平 ($n=3$, t -test, $^{**}P=0.0004$ vs GFP 组); C: ALP 染色结果显示 BMP9 重组腺病毒感染 C3H10T1/2 细胞 5 d 后 ALP 表达 (100 $\times$)

Fig.1 Corresponding mRNA expression levels of GFP, BMP9 and FSH β recombinant adenoviruses treated C3H10T1/2 cells at 48 h and ALP expression at 5 d (100 $\times$). A: Q-PCR analysis of BMP9 mRNA levels in C3H10T1/2 cells treated with BMP9 recombinant adenovirus for 48 h ($n=3$, t -test, $^{**}P=0.0006$ vs GFP group); B: Q-PCR analysis of FSH β mRNA levels in C3H10T1/2 cells treated with FSH β recombinant adenovirus for 48 h ($n=3$, t -test, $^{**}P=0.0004$ vs GFP group); C: The ALP staining of C3H10T1/2 cells treated with BMP9 recombinant adenovirus for 5 d (100 $\times$).

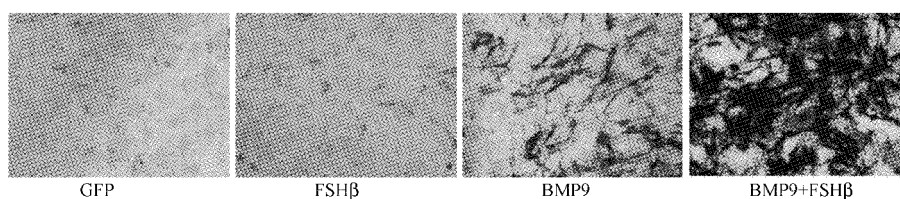


图2 光学显微镜下各组 ALP 染色情况 (100 $\times$)

Fig.2 The ALP staining in each group by the light microscope (100 $\times$)

价间充质干细胞成骨分化的早期指标。本研究利用各组重组腺病毒 (Ad-GFP、Ad-FSH β 及 Ad-BMP9) 感染 C3H10T1/2 细胞 5 d 后的 ALP 表达进行检测。结果显示, FSH β 处理组较 GFP 对照组 ALP 染色无显著区别, 提示 FSH β 对诱导 ALP 的表达无显著影响; 而 BMP9 处理组较对照组 ALP 染色深, 提示 BMP9 能显著诱导 ALP 的表达。此外, BMP9 与 FSH β 联合处理组较 BMP9 处理组 ALP 染色进一步加深 (图 2), 提示 FSH β 能增强 BMP9 诱导的 ALP 的表达。

2.3 FSH β 增强 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨中钙盐的沉积

在间充质干细胞分化为成骨细胞和骨细胞期间, 随着细胞继续分化, 骨基质矿化不断增多, 与之相关的钙盐沉积也会增加, 因而钙盐结节成为成骨分化的晚期标志物。基于本研究早期成骨分化标志物的表达情况, 进一步检测相同处理下各组钙盐沉积情况。结果显示, GFP 和 FSH β 处理组无明显的钙盐结节形成, 而 BMP9 处理组有明显的钙盐结节形成, 证实 BMP9 确有促进成骨的功能; 而 BMP9 与 FSH β 联合处理组, 钙盐结节的形成量较 BMP9 处理组显著增加 (图 3)。综上, 提示 FSH β 增加 BMP9

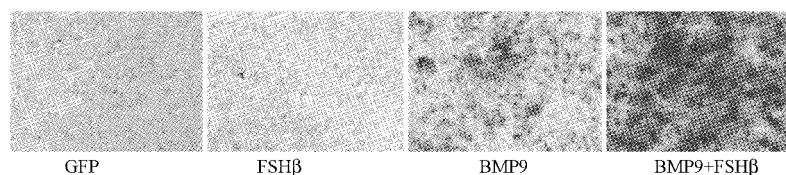


图3 光学显微镜下 FSH β 对 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞的钙盐沉积影响 (100 $\times$)

Fig.3 Effect of FSH β on BMP9-induced calcium deposition in C3H10T1/2 cells under light microscopy (100 $\times$)

诱导间充质干细胞成骨分化过程中钙盐的沉积。

2.4 FSH β 增强 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化中 Notch 信号的表达

根据实验设计,本研究利用各组腺病毒感染细胞 5 d 后对相关信号靶基因 mRNA 进行检测,发现 Notch 信号靶基因 Hey1 mRNA 的表达水平显著增加。如图 4 所示,利用 Q-PCR 方法检测后,分析其 mRNA 表达水平的相对定量值。结果显示,FSH β 处理组较 GFP 对照组 Hey1 mRNA 表达无显著变化,BMP9 处理组较 GFP 对照组 Hey1 mRNA 的表达显著增加,且差异有统计学意义 ($P < 0.01$);而 BMP9 与 FSH β 联合处理组较 BMP9 处理组 Hey1 mRNA 的表达进一步增加,且差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图 4)。提示 FSH β 能增加 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化中 Hey1 mRNA 的表达水平,即 Notch 信号的表达。

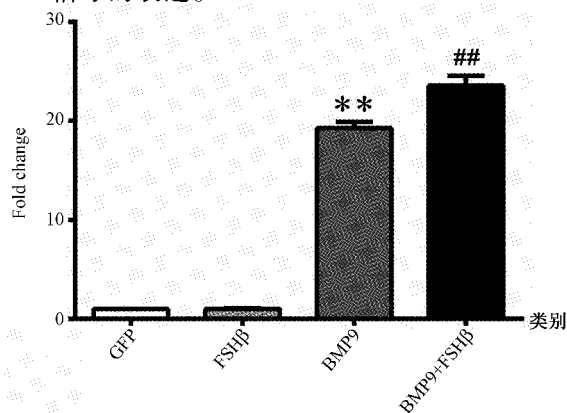


图4 FSH β 对 BMP9 诱导的间充质干细胞中 Notch 信号靶基因 Hey1 mRNA 表达水平的影响。Q-PCR 结果显示重组腺病毒感染 C3H10T1/2 细胞 5 d 后 Hey1 mRNA 表达水平 ($n = 3$, t -test, ** $P < 0.0001$ vs GFP 组; ## $P = 0.0032$ vs BMP9 组)

Fig.4 Effect of FSH β on the expression of Notch signaling target gene Hey1 mRNA in BMP9-induced mesenchymal stem cells. Q-PCR analysis of Hey1 mRNA levels in C3H10T1/2 cells treated with recombinant adenovirus for 5 d ($n = 3$, t -test, ** $P < 0.0001$ vs GFP group; ## $P = 0.0032$ vs BMP9 group).

2.5 DAPT 抑制 FSH β 增强 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化中 ALP 的表达

为了研究 Notch 信号通路抑制剂 DAPT (10 $\mu\text{mol/L}$) 是否能够有效抑制 FSH β 增强 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化,从而证实 Notch 信号通路在其中扮演着重要作用。将对数生长期的 C3H10T1/2 细胞铺在 24 孔板中,贴壁后将各组重组腺病毒及 DAPT (10 $\mu\text{mol/L}$) 分别按研究计划处理细胞,培养 5 d 后进行 ALP 染色。如图 5 所示,BMP9 能显著增加 ALP 染色,FSH β 与 BMP9 联合处理组 ALP 染色则较 BMP9 单独处理组进一步增加,而在加入处理因素 DAPT 后,BMP9 与 DAPT 联合处理组 ALP 染色较 BMP9 单独处理组降低,同时 BMP9 与 FSH β 、DAPT 联合处理组较 BMP9 与 FSH β 处理组 ALP 染色也显著降低。提示 DAPT 能抑制 BMP9 促进间充质干细胞成骨分化的作用,也能抑制 FSH β 增强 BMP9 促进间充质干细胞成骨分化的作用,从而反向证实 Notch 信号在 FSH β 增强 BMP9 促进间充质干细胞成骨分化中起到重要作用。

2.6 DAPT 抑制 FSH β 增强 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化中 Notch 信号的表达

为了进一步验证 Notch 信号在 FSH β 增强 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化过程中扮演的重要角色,将对数生长期的 C3H10T1/2 细胞铺在 24 孔板中,贴壁后将各处理因素按研究计划处理细胞,培养 5 d 后提取细胞总 RNA,采用 Q-PCR 检测 Notch 信号靶基因 Hey1 mRNA 表达。如图 6 所示,BMP9 处理组 Hey1 mRNA 表达较 GFP 处理组显著升高 ($P < 0.01$),BMP9 与 FSH β 处理组 Hey1 mRNA 表达较 BMP9 处理组进一步升高 ($P < 0.05$),而在加入处理因素 DAPT (10 $\mu\text{mol/L}$) 后,BMP9 与 DAPT 处理组 Hey1 mRNA 的表达较 BMP9 处理组降低 ($P < 0.05$);同时,BMP9 与 FSH β 、DAPT 联合处理 Hey1 mRNA 的表达也较 BMP9 与 FSH β 处理组降低 ($P < 0.05$)。提示 DAPT 能抑制 BMP9 促进 C3H10T1/2 细胞成骨分化中 Notch 信号的表达,也能抑制 FSH β 增强 BMP9 促进 C3H10T1/2 细胞成

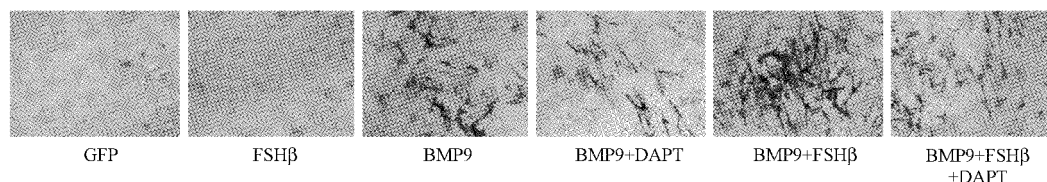


图5 光学显微镜下各组 ALP 染色情况 (100×)

Fig.5 The ALP staining in each group by the light microscope (100×)

骨分化中 Notch 信号的表达,进一步证实 Notch 信号在 FSH β 协同 BMP9 促进间充质干细胞成骨分化中起着重要作用。

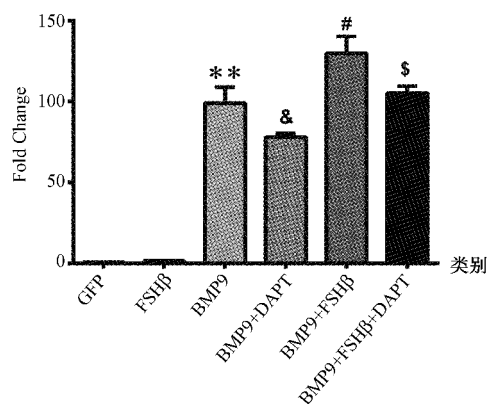


图6 Q-PCR 检测 DAPT (10 μ mol/L) 对 FSH β 协同 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化中 Hey1 mRNA 表达的影响。Q-PCR 结果显示不同处理因素处理 C3H10T1/2 细胞 5 d 后 Hey1 mRNA 表达水平 ($n=3$, t -test, ** $P<0.0001$ vs GFP 组; $^{\&}P=0.0226$ vs BMP9 组; $^{\#}P=0.0206$ vs BMP9 组; $^{\$}P=0.0197$ vs BMP9+FSH β 组)

Fig.6 Q-PCR detection of the expression of Hey1 mRNA in the osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells induced by FSH β , BMP9 and DAPT (10 μ mol/L). Q-PCR analysis of Hey1 mRNA levels in C3H10T1/2 cells treated with different processing factors for 5 d ($n=3$, t -test, ** $P<0.0001$ vs GFP group; $^{\&}P=0.0226$ vs BMP9 group; $^{\#}P=0.0206$ vs BMP9 group; $^{\$}P=0.0197$ vs BMP9 + FSH β group)

3 讨论

绝经后骨质疏松症是临床上绝经后女性常见的骨骼疾病,其防治一直是世界性难题。既往的研究认为,绝经后女性雌激素水平降低是骨质疏松的主要原因,雌激素替代疗法可以有效保护骨质流失^[31]。然而,伴随乳腺癌等副作用出现^[20],安全有效的治疗药物亟待解决。近期研究发现,PMOP 除与雌激素水平降低有关外,也与 FSH 水平升高有密切

切关系:当女性 FSH 水平超过 35 IU/L 时,较 FSH 8 IU/L 的骨密度显著降低^[32]。进一步研究发现,FSH 可能在骨的生成中发挥双重作用,但具体机制并不明确^[24-25]。

间充质干细胞来源广泛,具有多向分化潜能,自我更新能力强,是目前组织工程骨研究的理想种子细胞。研究证实,除破骨细胞外,间充质干细胞上也有与 G_{12 α} 偶联的 FSH 受体 (FSHR) 的存在,其可能通过 ERK1/2 磷酸化来抑制其向成骨细胞方向的分化^[20]。然而,与 FSH 诱导骨丢失相反的是,在 TgFSH 小鼠中,升高的 FSH 能以间接的方式增加骨小梁中的成骨细胞表面积,从而增加骨的合成代谢,且与雌激素水平无关^[25];另外,骨髓间充质干细胞移植可挽救卵巢功能不全所引起的 FSH 增加^[33]。因此,FSH 可能对间充质干细胞存在双向调节作用。此外,BMPs 是间充质干细胞成骨分化的重要诱导因子,并已有成员被允许用于临床辅助治疗骨折、骨不连等^[34]。然而,BMP9 作为 BMPs 中成骨作用最强的成员之一,在动物模型中也在促进脊柱融合、骨不连修复中起着重要作用^[35],但相关机制有待深入研究。

BMPs 对 FSH 的作用也受到广泛关注,且不同成员对 FSH 功能产生不同甚至相反的影响。在母羊垂体中,BMP4 能以剂量依赖性的方式通过 BMP/SMAD4 经典途径抑制 FSH β mRNA 表达,降低 FSH 浓度^[36];而小鼠垂体细胞系中,BMP2 却以经典 BMP 信号途径方式刺激 FSH β 的表达,且活化素 A 能协同刺激其转录^[37]。以上研究表明,BMPs 与 FSH 在不同的种系和细胞中存在不同的相互作用。BMP9 作为 BMPs 家族的成员之一,且具有较强的成骨诱导功能,笔者猜想,FSH 在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化过程中可能也有作用,但既往的研究着眼于 BMP 经典信号通路上,对其他相关通路的研究并不多见。

Notch 信号通路是五大发育信号之一,在血管生成^[38]、肿瘤发生^[39]、免疫调节^[40]中扮演重要作

用,也与骨骼发育密切相关。研究发现,Notch 信号增强 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化^[17],Cao 等也证实 Notch 在 BMP9 诱导的成骨分化中起重要作用;此外,Sharff 等^[41]发现 Hey1 在其中发挥重要作用。因此,本研究猜想,Notch 信号传导途径也可能在 FSH β 增强 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化中起重要作用。本研究以 MSCs 细胞系 C3H10 T1/2 细胞为研究对象,将重组腺病毒 BMP9 和 FSH β 感染细胞,研究 Notch 信号转导途径在 FSH β 增强 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化过程中的变化,并将该信号阻断后反向证实其在该过程中的重要作用。结果发现,单独的 FSH β 表达组对 MSCs 中 ALP 表达并未产生影响,BMP9 却能明显增加其表达,而联合处理组则能在 BMP9 的基础上使其表达进一步增加,表明 FSH β 能增强 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化(图 2)。在钙盐沉积实验的检测中,结果呈现相似的变化(图 3)。进一步检测相关信号通路靶基因的表达后发现,Notch 信号靶基因 Hey1 mRNA 表达,在单独的 FSH β 处理组较 GFP 对照组并未产生影响,而单独的 BMP9 处理组较 GFP 对照组则显著增加其表达,BMP9 与 FSH β 联合处理组则较 BMP9 单独处理组表达量增加(图 4)。运用 DAPT(10 μ mol/L)药物阻断 Notch 通路后对细胞进行 ALP 染色发现,BMP9 与 DAPT 联合作用组较 BMP9 作用组 ALP 染色降低,BMP9、FSH β 和 DAPT 联合作用组较 BMP9 和 FSH β 联合作用组 ALP 染色也降低,即 ALP 表达在加 DAPT 处理后被逆转,表明 DAPT 能够抑制 BMP9 与 FSH β 诱导 MSCs 的 ALP 表达增加(图 5)。进一步检测 Notch 信号靶基因 Hey1 mRNA 的表达,BMP9 与 DAPT 联合作用组较 BMP9 作用组 Hey1 mRNA 表达降低,BMP9、FSH β 和 DAPT 联合作用组较 BMP9 和 FSH β 联合作用组 Hey1 mRNA 表达也降低,即 Hey1 mRNA 表达在 DAPT 处理后被逆转,表明 DAPT 能够抑制 FSH β 增强 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化中 Hey1 mRNA 表达增加(图 6)。因此,该研究证实,Notch 信号在 FSH β 增强 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化中起重要作用,但涉及的 Notch 信号过程中的分子机制有待进一步研究。因此,本课题组拟对 Notch 信号通路中涉及的受体、配体和酶等进行检测,为 FSH β 增强 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化提供具体的机制,为治疗由于绝经后卵泡刺激素水平增高引起的骨质疏松症的治疗提供可靠的理论依据。

致谢:感谢重庆医科大学生命科学研究院骨发

育与再生平台对本研究的大力支持。

【参 考 文 献】

- [1] Mahmoudifar N, Doran PM. Mesenchymal stem cells derived from human adipose Tissue [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1340: 53-64.
- [2] Dhinsa BS, Mahapatra AN, Khan WS. Sources of adult mesenchymal stem cells for ligament and tendon tissue engineering[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2015, 10(1): 26-30.
- [3] Mahla RS. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics[J]. *Int J Cell Biol*, 2016, 2016: 6940283.
- [4] Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(3): 252-260.
- [5] Wang JH, Liu YZ, Yin LJ, et al. BMP9 and COX-2 form an important regulatory loop in BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Bone*, 2013, 57(1): 311-321.
- [6] Wong SP, Rowley JE, Redpath AN, et al. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 151: 107-120.
- [7] Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(4): 203-221.
- [8] Urist MR. Bone: formation by autoinduction[J]. *Science*, 1965, 150(3698): 893-899.
- [9] Beederman M, Lamplot JD, Nan G, et al. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation[J]. *J Biomed Sci Eng*, 2013, 6(8A): 32-52.
- [10] Bi J, Ge S. Potential roles of BMP9 in liver fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 20656-20667.
- [11] Cao J, Wei Y, Lian J, et al. Notch signaling pathway promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by enhancing BMP9/Smad signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(2): 378-388.
- [12] Miller AF, Harvey SA, Thies RS, et al. Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(24): 17937-17945.
- [13] Akla N, Viallard C, Popovic N, et al. BMP9 (bone morphogenetic protein-9)/Alk1 (activin-like kinase receptor type I) signaling prevents hyperglycemia-induced vascular permeability[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(8): 1821-1836.
- [14] Morine KJ, Qiao X, York S, et al. Bone morphogenetic protein 9 reduces cardiac fibrosis and improves cardiac function in heart failure[J]. *Circulation*, 2018, 138(5): 513-526.
- [15] Li P, Li Y, Zhu L, et al. Targeting secreted cytokine BMP9 gates the attenuation of hepatic fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1864(3): 709-720.
- [16] Fujioka-Kobayashi M, Abd El Raouf M, Saulacic N, et al. Superior bone-inducing potential of rhBMP9 compared to rhBMP2 [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2018, 106(6): 1561-1574.
- [17] Liao J, Wei Q, Zou Y, et al. Notch signaling augments BMP9-

- induced bone formation by promoting the osteogenesis-angiogenesis coupling process in mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(5): 1905-1923.
- [18] Wang D, Liu W, Cao Y, et al. BMP-4 polymorphisms in the susceptibility of cervical spondylotic myelopathy and its outcome after anterior cervical corpectomy and fusion [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(1): 210-217.
- [19] Kaito T, Johnson J, Ellerman J, et al. Synergistic effect of bone morphogenetic proteins 2 and 7 by ex vivo gene therapy in a rat spinal fusion model [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95(17): 1612-1619.
- [20] Zhu LL, Blair H, Cao J, et al. Blocking antibody to the beta-subunit of FSH prevents bone loss by inhibiting bone resorption and stimulating bone synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(36): 14574-14579.
- [21] Smits J, Wolfenson C, Chappel S, et al. Follicle-stimulating hormone: A review of form and function in the treatment of infertility [J]. *Reprod Sci*, 2016, 23(6): 706-716.
- [22] Howles CM. Role of LH and FSH in ovarian function [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 161(1-2): 25-30.
- [23] Endo I. Body weight and bone/calcium metabolism. FSH and obesity, osteoporosis [J]. *Clin Calcium*, 2018, 28(7): 941-945.
- [24] Sun L, Peng Y, Sharrow AC, et al. FSH directly regulates bone mass [J]. *Cell*, 2006, 125(2): 247-60.
- [25] Allan CM, Kalak R, Dunstan CR, et al. Follicle-stimulating hormone increases bone mass in female mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(52): 22629-22634.
- [26] Ramasamy SK, Kusumbe AP, Wang L, et al. Endothelial notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone [J]. *Nature*, 2014, 507(7492): 376-380.
- [27] 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.
- [28] Wang N, Liu W, Tan T, et al. Notch signaling negatively regulates BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells by inhibiting JunB expression [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(65): 109661-109674.
- [29] Mouillessaux KP, Wiley DS, Saunders LM, et al. Notch regulates BMP responsiveness and lateral branching in vessel networks via SMAD6 [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13247.
- [30] Luo J, Deng ZL, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1236-1247.
- [31] Fan JZ, Yang L, Meng GL, et al. Estrogen improves the proliferation and differentiation of hBMSCs derived from postmenopausal osteoporosis through notch signaling pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 392(1-2): 85-93.
- [32] Sowers MR, Jannausch M, McConnell D, et al. Hormone predictors of bone mineral density changes during the menopausal transition [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(4): 1261-1267.
- [33] Bao R, Xu P, Wang Y, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation rescues premature ovarian insufficiency induced by chemotherapy [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(4): 320-326.
- [34] Garrison KR, Donell S, Ryder J, et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review [J]. *Health Technol Assess*, 2007, 11(30): 1-150.
- [35] 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.
- [36] Faure MO, Nicol L, Fabre S, et al. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary [J]. *J Endocrinol*, 2005, 186(1): 109-121.
- [37] Lee KB, Khivansara V, Santos MM, et al. Bone morphogenetic protein 2 and activin A synergistically stimulate follicle-stimulating hormone beta subunit transcription [J]. *J Mol Endocrinol*, 2007, 38(1-2): 315-330.
- [38] Korbel C, Gerstner MD, Menger MD, et al. Notch signaling controls sprouting angiogenesis of endometriotic lesions [J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(1): 37-46.
- [39] Al Labban D, Jo SH, Ostano P, et al. Notch-effector CSL promotes squamous cell carcinoma by repressing histone demethylase KDM6B [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(6): 2581-2599.
- [40] Laky K, Evans S, Perez-Diez A, et al. Notch signaling regulates antigen sensitivity of naive CD4+ T cells by tuning co-stimulation [J]. *Immunity*, 2015, 42(1): 80-94.
- [41] 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.

(收稿日期: 2018-07-19; 修回日期: 2018-09-21)