

· 论 著 ·

EphB/EphrinB 信号通路对成骨分化能力的影响

刘军¹ 李旭升¹ 甄平¹ 田琦² 周胜虎¹ 王伟¹ 李玉娟² 何晓乐^{3*}

1. 中国人民解放军联勤保障部队 940 医院(原兰州军区兰州总医院)全军骨科中心, 甘肃 兰州 730050

2. 中国人民解放军联勤保障部队 940 医院(原兰州军区兰州总医院)手麻科, 甘肃 兰州 730050

3. 空军军医大学西京医院老年病科, 陕西 西安 710032

中图分类号: R684.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 03-0345-08

摘要: 目的 探讨 EphB/EphrinB 信号通路对去势小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)的成骨分化能力和绝经后骨质疏松动物模型骨量的影响。方法 将 24 只 8 周龄健康雌性 BALB/c 小鼠随机分为去势组(OVX 组)和假手术组(Sham 组),检测小鼠 BMSCs 中 EphB/EphrinB 信号通路表达水平。②将去势小鼠分为 4 组,分别进行腹腔注射相应 Eph 受体激动剂:EfnB1-Fc 及 EfnB2-Fc, Eph 受体抑制剂 EphB2-Fc,对照组腹腔注射 human IgG-Fc。各组分别于术后 10 周将小鼠脱颈处死,在 Micro-CT 分析下比较股骨骨质情况。去势组和假手术组小鼠取股骨与胫骨骨髓,经密度梯度离心法分离培养并鉴定其骨髓间充质干细胞至 P3 用于实验,各组 BMSCs 在成骨诱导条件下 7 d 后,通过 Realtime PCR 检测成骨相关基因(Runx2、ALP、Osterix)及破骨细胞分化相关基因(OPG、RANKL)的表达水平,成骨分化 14、21 d 后,采用 ALP 染色和茜素红染色观察成骨分化能力。结果 与假手术组(Sham 组)相比较,去势组(OVX 组)中 EfnA2、EphB4、EfnB2、EfnB1 及 EphA4 表达显著增高($P<0.01$);Sham 组中 EphA2 及 EfnB2 表达显著降低($P<0.01$)。10 周后 Micro-CT 结果显示,与去势对照 Fc 组比较,Sham 组、EfnB1-Fc、EfnB2-Fc 及 EphB2-Fc 去势组骨小梁结构均较完整、骨小梁密度较好($P<0.01$);与 EfnB1-Fc、EfnB2-Fc 去势组相比较,Sham 组和 EphB2-Fc 去势组的骨密度及骨体积分数均明显增高($P<0.01$)。Realtime PCR 检测成骨相关基因提示,与去势对照 Fc 组比较,EfnB1-Fc、EfnB2-Fc 和 EphB2-Fc 去势组中 ALP 与 Osterix 的表达明显升高($P<0.01$);EfnB1-Fc 和 EphB2-Fc 可显著提高 BMSCs 成骨分化中 ALP 的活性和骨基质矿化能力,以 EphB2-Fc 效果最为显著($P<0.01$)。与去势对照 Fc 组比较,EfnB1-Fc、EfnB2-Fc 和 EphB2-Fc 去势组中 RANKL 的表达未见明显差异($P>0.05$),但 OPG 的表达明显升高($P<0.01$),其中,EfnB1-Fc 去势组与 EphB2-Fc 去势组中 OPG/RANKL 的比率升高最为明显($P<0.01$)。结论 EphB2/EfnB1 双向信号通路可逆转去势所导致的骨量减少,上调 ALP 与 Osterix 的表达,促进 BMSCs 的成骨分化能力,并可通过调节 OPG/RANKL 比率影响去势骨髓间充质干细胞的功能,从而间接影响破骨细胞系的分化。

关键词: EphB/EphrinB 信号通路;去势小鼠;骨髓间充质干细胞;成骨分化

Effect of EphB/EphrinB signaling pathway on the osteogenic differentiation

LIU Jun¹, HE Xiaole^{3*}, LI Yujuan², ZHEN Ping¹, TIAN Qi¹, ZHOU Shenghu¹, WANG Wei¹, LI Xusheng¹

1. Department of Joint Surgery, Institute of Orthopedics, the 940th Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Lanzhou 730000, China

2. Department of Surgical anesthesiology, the 940th Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Lanzhou 730000, China

3. Department of Gerontology, Xijing Hospital, the Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

* Corresponding author: HE Xiaole, Email: tutuheht@163.com

Abstract: Objective To explore the effect of EphB/EphrinB signaling pathway on the osteogenic differentiation of mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and the postmenopausal osteoporosis animal model in mice. **Methods** 1) Twenty-four healthy 8-week-old BALB/c mice were randomly divided into castration group (OVX group) and sham operation group (Sham group). The expression level of Eph/Ephrin signaling pathway in BMSCs was detected. 2) The ovariectomized mice were divided into 4 groups. The Eph receptor agonists EfnB1-Fc and EfnB2-Fc, Eph receptor inhibitor EphB2-Fc, and human IgG-Fc as

基金项目: 国家自然科学基金(81371983);全军后勤科研计划面上项目(CWH17J009);全军医学科技青年培育计划(19QNP047);甘肃省青年科技基金(1606RJYA300);甘肃省卫生行业科研计划项目(GWSKY2018-21);甘肃省自然科学基金(1606RJZA208)

* 通信作者: 何晓乐, Email: tutuheht@163.com

control, were intraperitoneally injected, respectively. The mice were sacrificed by cervical dislocation 10 weeks after the surgery. The femoral bones were compared under micro-CT analysis. The bone marrow of the femurs and the tibia was extracted from the ovariectomized and sham-operated mice. BMSCs were isolated and cultured by density gradient centrifugation and identified to P3. After osteogenic induction for 7 days, the expression levels of Runx2, ALP, Osterix, OPG, and RANKL were detected using real-time PCR. After 14 days and 21 days of osteogenic differentiation, the ability of osteogenic differentiation was observed with ALP staining and Alizarin red staining. **Results** Compared with those in the OVX group, the expressions of EfnA2, EphB4, EfnB2, EfnB1, and EphA4 in the Sham group increased significantly ($P < 0.01$), and the expression difference was similar to those in humans. The expressions of EfnA2 and EfnB2 reduced significantly in the Sham group ($P < 0.01$). After 10 weeks, the result of micro-CT showed that compared with the control group, the trabecular structure in the Sham group, and EfnB1-Fc, EfnB2-Fc, and EphB2-Fc in the castration group was relatively intact and the trabecular bone density was better ($P < 0.01$). Compared with those in EfnB1-Fc and EfnB2-Fc castration groups, the bone mineral density and bone volume fraction in the Sham group and EphB2-Fc castration group increased significantly ($P < 0.01$). The result of real-time PCR for detection of osteogenesis-related genes indicated that the expressions of ALP and Osterix in EfnB1-Fc, EfnB2-Fc, and EphB2-Fc castration groups were significantly higher than those in human IgG-Fc castration group. EfnB1-Fc and EphB2-Fc increased ALP activity and mineralization by BMSCs, and it is more obvious in EphB2-Fc group. Compared with that in the control group, the expression of RANKL in EfnB1-Fc, EfnB2-Fc, and EphB2-Fc castration groups was not significantly different ($P > 0.05$), but the expression of OPG increased significantly ($P < 0.01$). Among those, the increase of OPG/RANKL ratio in EfnB1-Fc and EphB2-Fc group was the most significant ($P < 0.01$). **Conclusion** EphB2/EfnB1 signaling pathway can reverse the bone loss caused by castration, up-regulate ALP and Osterix expression, promote osteogenic differentiation of BMSCs, and affect the function of BMSCs in ovariectomized mice by regulating OPG/RANKL ratio, indirectly affecting the differentiation of osteoclasts.

Key words: EphB/EphrinB signaling pathway; ovariectomized mice; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

国内外研究表明, EphB/EphrinB 双向信号转导通路可在破骨细胞与成骨细胞之间发挥重要作用, 而其中 EphB4/EphrinB2 双向信号转导通路在解决相同位置上骨吸收转向骨形成的有序性问题中的影响尤为关键。EphB4/EphrinB2 信号通路可以接触依赖性的方式存在于成熟破骨细胞与成骨前体细胞之间, 在正向正向信号转导促进成骨细胞分化增殖的同时, 反向信号转导则可抑制破骨细胞的形成及其骨吸收活性^[1-2]。对转基因小鼠的试验结果表明, 成骨细胞中特异性 EphB4 过表达的小鼠最终股骨颈密度显著增加, 破骨细胞数量减少、增殖能力明显下降, 与骨吸收能力相关的尿液分解标志物脱氧吡啶啉 (deoxypyridinoline, DPD) 水平降低^[3]。既往诸多研究表明, Eph/Ephrin 双向信号转导与 BMP/Smads、JAK/STAT 及 MAPK 等通路存在交叉作用, 彼此之间相互协调, 参与调节疼痛、抑郁发生发展、神经-生理学系统等生物行为^[4-6], 但 Eph/Ephrin 信号通路在骨平衡及骨生长吸收等过程中的研究尚不深入。Compagni 等^[7]研究表明, 在 EphrinB1 表达受到抑制的试验小鼠中可出现脊柱及四肢关节骨骼发育异常, 其主要特点为脊椎椎体紊乱、关节融合及四肢远端小关节软骨发育不完善等问题, 而脊柱及四肢异常骨增生问题同样可出现在 EphB2/EphB3 受

体突变的小鼠中。Davy 等^[8]的研究发现, 在 EphrinB1 及 EphB2/EphB3 表达突变的试验小鼠中, 可出现颅骨锁骨发育不全及胸骨骨化缺失等骨发育缺陷现象。本研究拟对 EphB/EphrinB 信号通路和去势小鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化能力及绝经后骨质疏松动物模型骨量的相关性进行初步探讨, 为 EphB/EphrinB 信号通路在骨稳态失衡疾病中的作用提供一定试验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Ficoll 细胞分离液购自美国 Sigma 公司, α -MEM 培养基、胎牛血清、青链霉素购自美国 Hyclone 公司, RNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司, SYBRPrimeScript™ RT-PCR Kit 购自日本 Takara 公司, 基因引物购自中国上海生工生物公司, 倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司, 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 小鼠骨髓基质干细胞来源

研究动物购自中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院 (原兰州军区兰州总医院) 实验动物中心, 8 周龄健康雌性 BALB/c 小鼠 24 只, 平均体重 (20.0 ± 3.2) g, 术后 10 周处死, 无菌条件下取小鼠

双下肢股骨和胫骨髓腔内骨髓,贴壁培养骨髓间充质干细胞,鉴定后方用于后续细胞试验。所有实验动物均按照我国“实验室动物饲养和使用指南”纳入研究,本研究经中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院动物伦理委员会批准。

1.3 方法

1.3.1 小鼠卵巢去除术:将健康雌性 BALB/c 小鼠 24 只随机分为以下两组:假手术组及去势组,每组各 12 只。采用如下手术方法:① 在小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(0.1 g/kg)进行常规麻醉;② 对小鼠采用俯卧位,并将其四肢展开后固定于动物手术台

上,于肋下 1 cm 处,脊柱两侧 2 cm 处剪除毛发,并使用碘附消毒皮肤,然后切开背肌约 1 cm,便可见两侧被黄色脂肪组织包绕的卵巢以及紧密相联的子宫角(见图 1);③ 用显微器械尺镊将小鼠脂肪组织夹起并拉出创口,于子宫角上部和输卵管近子宫端切断子宫角并将卵巢进行摘除,观察术部无明显出血点后将脂肪组织送回腹腔,逐层缝合皮下组织后,关闭伤口;④ 假手术组仅仅去除卵巢周围脂肪组织后逐层关伤口;⑤ 术后常规肌肉注射青霉素 40 万单位 3 d,1 次/d。

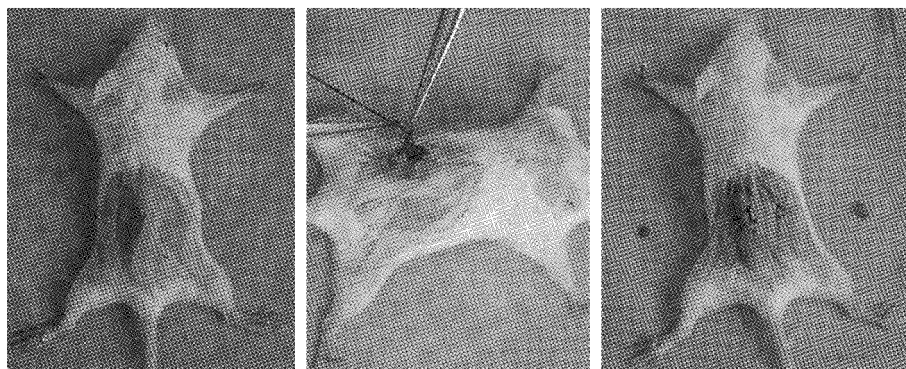


图 1 小鼠卵巢摘除术

Fig.1 Mouse ovarian ablation

1.3.2 腹腔内注射 EphB 受体激动剂 EphrinB-Fc 蛋白:将去势组雌性 BALB/c 小鼠共计 12 只按随机数字表法分为 4 组,各组动物分别于术后 2、4、6、8 周腹腔内注射不同 Fc。注射步骤:① 碘附消毒小鼠外侧腹部皮肤;② 各组小鼠称重,用 PBS 缓冲液溶解不同 Fc 粉剂,一次性过滤器过滤;③ 使用微量注射器,按 1 mg/kg 分别给不同处理的小鼠腹腔内注射相应 EphB 受体激动剂 EphrinB-Fc 蛋白:EfnB1-Fc 组(OVX + EfnB1-Fc 组)、EfnB2-Fc 组(OVX + EfnB2-Fc 组),给予注射 EphB 受体抑制剂 EphB2-Fc 组(OVX+EphB2-Fc 组),对照组给予注射 human IgG-Fc(OVX+Con+Fc 组),注射剂量均为 0.5 mL,注射部位均选择两大腿根连线与腹中线交叉点外侧约 1 cm 处,注射后使用棉签压迫注射点 30 s。

1.3.3 Micro-CT 检测动物模型股骨骨量:各组分别注射 Fc 制剂后,于术后 10 周将 24 只小鼠脱颈处死,然后取各组股骨置于 Micro-CT 扫描试管内进行 Micro-CT 扫描分析,扫描电压为 80 kVp,电流为 80 mA。沿着股骨的长轴方向进行扫描,分辨率为 1024×1024 像素,层间距为 15 μm。扫描后所获得的平面采用 Microview ABA 2.1.2 软件进行三维重

建并测定骨密度(BMD)及骨体积分数(BV/TV)。

1.3.4 小鼠骨髓间充质干细胞的培养及鉴定:① 取去势组和假手术组术后 10 周小鼠,每组各为 12 只,颈椎脱臼处死后,将试验小鼠放置在 75%酒精中 5 min,在无菌条件下暴露小鼠股骨及胫骨,去除骨组织附带的肌肉和骨膜,切断股骨和胫骨两端,用 PBS 液冲洗取下标本。② 将 4 mL 冲洗液缓缓加入盛有等体积 Ficoll 细胞分离液试管内,后以 1 000 r/min 将分离液试管离心 10 min,试验用滴管吸出试管内的乳白色云雾状单核细胞层,PBS 液将单核细胞层充分漂洗 3 次。漂洗后弃去上清的细胞重悬于含 10% FBS 及 100 U/mL 青链霉素的 α-MEM-低糖培养液,按试验要求的密度在 9 孔培养基中接种后,置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中,平均每 3 天 1 次全量换液。③ 待细胞汇合成单层后加入 0.25%的胰酶消化,按照 1:2 的比例进行传代接种培养(此为第一代 P1),以此类推。待培养到 P3 代,用于后续实验。

1.3.5 对培养鉴定后的骨髓间充质干细胞使用实时定量 PCR(Realtime-PCR)检测 Runx2、ALP、Osterix、OPG 及 RANKL 表达水平:通过 SYBR Green I 对基因

表达进行相对定量分析,试验过程遵照 $\Delta\Delta Ct$ 解析研究方法进行全程设计,主要测定在人与小鼠骨髓间充质干细胞表达的骨重建相关 EphB/EphrinB 信号通路关键分子的表达情况,引物由上海生工生物工程公司合成,见表1。具体实验步骤如下:① RT-PCR 检测反应体系,见表2。② Realtime-PCR 选择两步法反应程序测定,见表3。③ 选择 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值法对研究中 RT-PCR 的试验结果进行分析。

表1 成骨细胞与破骨细胞分化相关基因引物

Table 1 Gene primers of osteogenic and osteoclast differentiation

基因	顺序列(5'-3')	反序列(5'-3')
CAPDH	aggecggtgctgagatgtc	tgctgttccacccttct
Runx2	cttctcgaacttgatttctac	ctacaggaatacgcacacaaca
ALP	aaccagacacaaagcattcc	ccagcaagaagaagcctttg
Osterix	agaagccatacgtgacattt	ccaggaatgagtgagggaag
OPG	cttctcagggttgctgttct	aa
RANKL	attgattcaggtgttcaacc	gtgggatgttttcaagtgt
		tcaagagagagggtgtgagtt

表2 RT-PCR 反应液配制表

Table 2 Table of solution preparation for RT-PCR reaction

试剂	使用量(μ L)
SYBR Premix Ex Taq II (2X)	12.5
PCR 前引物	1
PCR 后引物	1
cDNA 模板	2
无菌水	8.5
Total	25

表3 Realtime-PCR 反应程序

Table 3 Reaction procedure of real-time PCR

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 °C	30 s	1
变性	95 °C	5 s	40
退火	58 °C	15 s	
读板			

1.3.6 成骨碱性磷酸酶染色(ALP)及茜素红染色
观察成骨分化能力:ALP 染色:①细胞成骨诱导 14 d 后,PBS 进行冲洗 3 遍,4 °C 多聚甲醛固定 30 min,PBS 再重新冲洗 3 遍,每次漂洗时间为 5 min,选择 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒说明书按流程进行显色。② 遵循 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒的说明书要求进行染色液的配制。③将配制好的 BCIP/NBT 染色液加入经过 PBS 漂洗 3 次后的细胞中。④将混匀的细胞溶液进行 37 °C 下避光保存 30 min。⑤将混合细胞溶液中的 BCIP/NBT 染色液去除,PBS 漂洗 3 遍后进行拍照观察。

茜素红染色:①茜素红染液的配制:称取 0.1 g 茜素红溶于 Tris-HCl 100 mL (pH = 8.3) 中,4 °C 保

存。②将以上成骨培养组培养 21 d 后,弃去培养基,使用预冷的 PBS 将细胞洗涤 3 次,然后加入预冷的多聚甲醛,室温下固定 30 min。③加入事先配制好的茜素红染液,室温下进行染色 5 min,然后晾干拍照。

1.4 统计学处理

研究所得的全部数据采用 SPSS 17.0 统计学分析软件进行 ANOVA 分析。统计分析方法选择独立样本 *t* 检验,数据表示为均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠骨髓间充质干细胞中骨重建相关 Eph/Ephrin 信号通路表达水平

在小鼠来源的骨髓间充质干细胞中,与假手术组(Sham 组)相比较,去势组(OVX 组)中 EfnA2、EphB4、EfnB2、EfnB1 及 EphA4 表达显著增高($P<0.01$),去势组中 EphA2 及 EphB2 表达显著降低($P<0.01$)。见图 2。

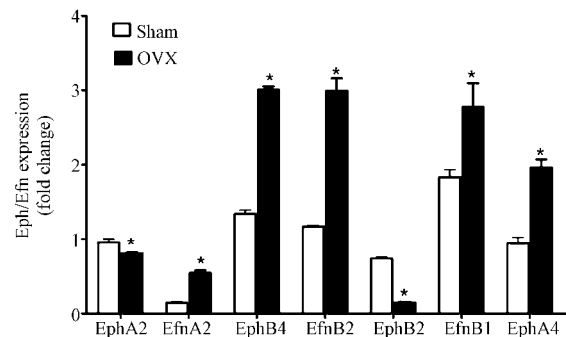


图2 OVX 组与 Sham 组小鼠骨髓间充质干细胞中骨重建相关 Eph/Ephrin 信号通路表达水平比较

注:与 Sham 组比较,* $P<0.01$ 。

Fig. 2 Comparison of expression of Eph/Ephrin signaling pathway in bone remodeling between OVX group and Sham group in bone mesenchymal stem cells

2.2 Micro-CT 分析检测动物模型股骨骨量结果

各去势组分别注射 Fc,于术后 10 周将小鼠脱颈处死,与 OVX human IgG-Fc (OVX+con+Fc) 组比较,Sham 组、OVX + EfnB1-Fc、OVX + EfnB2-Fc 及 OVX + EphB2-Fc 组骨小梁结构均较完整、骨小梁密度较好($P<0.01$)。与 OVX+EfnB1-Fc、OVX+EfnB2-Fc 去势组相比较,Sham 组和 OVX+EphB2-Fc 去势组的骨密度及骨体积分数均明显增高($P<0.01$)。见图 3。

2.3 Realtime-PCR 检测各组 Runx2、ALP、Osterix、OPG 及 RANKL 表达水平

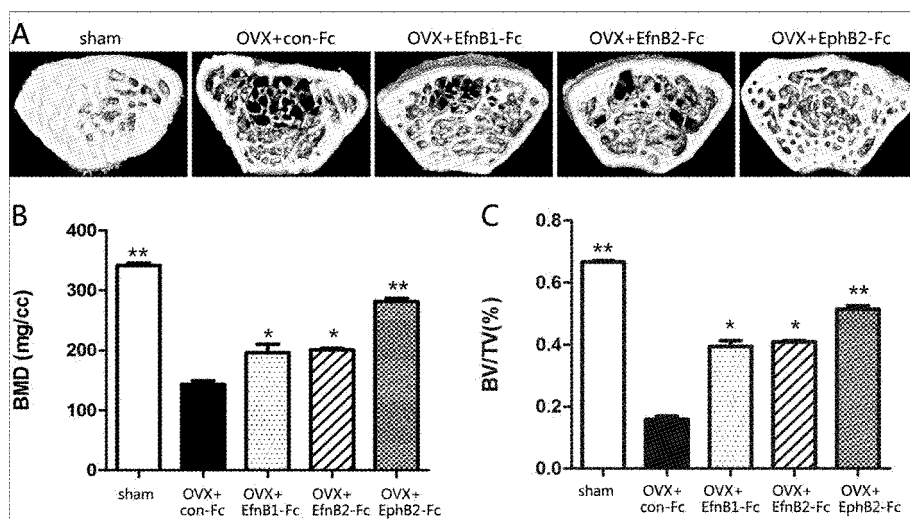


图3 各组小鼠 Fc 腹腔注射后 Micro-CT 结果分析

注: 与 OVX+Con+Fc 组比较, * $P < 0.01$; 与 OVX+EfnB1-Fc 和 OVX+EfnB2-Fc 去势组比较, ** $P < 0.01$ 。

Fig.3 Analysis of the results of micro-CT after intraperitoneal injection of Fc in mice of each group

各去势组 (EfnB1-Fc、EfnB2-Fc 及 EphB2-Fc) 小鼠原代成骨细胞诱导 7 d 后, Realtime PCR 检测成骨相关基因提示, 与去势对照组 (Con+Fc 组) 比较, EfnB1-Fc、EfnB2-Fc 和 EphB2-Fc 去势组中 ALP 与 Osterix 的表达水平升高 ($P < 0.01$), 与 EfnB1-Fc 去势组比较, EphB2-Fc 去势组中 ALP 与 Osterix 的表

达水平显著升高 ($P < 0.01$)。EfnB1-Fc、EfnB2-Fc 和 EphB2-Fc 去势组中 RANKL 的表达未见明显差异 ($P > 0.05$), 但 OPG 的表达水平明显升高 ($P < 0.01$), OPG/RANKL 的比率明显上调 ($P < 0.01$), 其中, EfnB1-Fc 去势组与 EphB2-Fc 去势组中 OPG/RANKL 的比率升高最为明显 ($P < 0.01$)。见图 4-a、图 4-b。

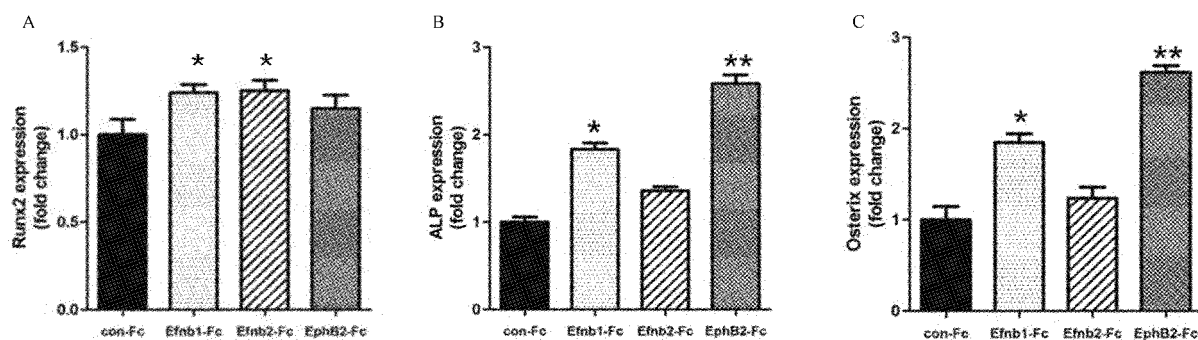


图 4-a 各 Fc 处理组的去势小鼠 BMSCs 成骨分化相关基因表达比较

注: 与 Con-Fc 组比较, * $P < 0.01$; 与 EfnB1-Fc 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Fig.4 -a Comparison of osteogenic differentiation-related gene expression in castrated mouse BMSCs between each Fc-treated group

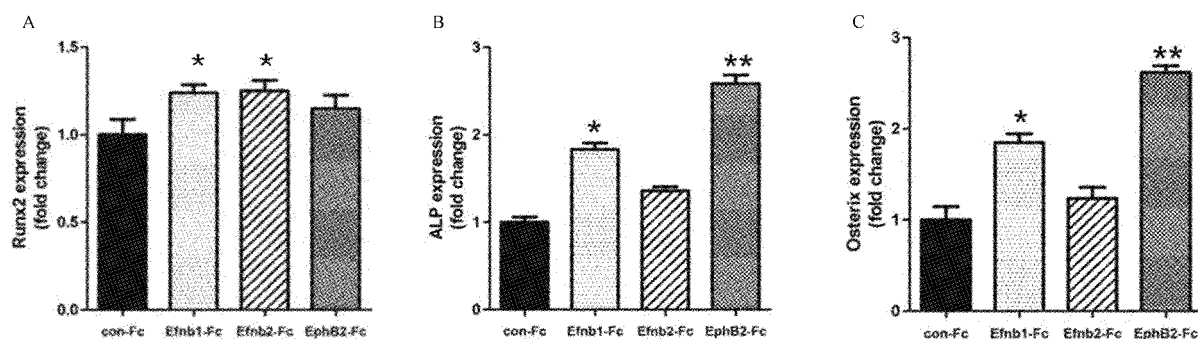


图 4-b 各 Fc 处理组的去势小鼠 BMSCs 的 OPG、RANKL 表达比较

注: 与 Con-Fc 组比较, * $P < 0.01$; 与 EfnB1-Fc 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Fig.4-b Comparison of OPG and RANKL expression in castrated mouse BMSCs between each Fc-treated group

2.4 成骨碱性磷酸酶染色 (ALP) 及茜素红染色观察各组成骨分化能力

各去势组 (EfnB1-Fc、EfnB2-Fc 及 EphB2-Fc) 小鼠原代成骨细胞诱导 14 d 后进行碱性磷酸酶染色, 诱导 21 d 后进行茜素红染色。与去势对照组 (Con+

Fc 组) 比较, EfnB1-Fc 和 EphB2-Fc 去势组中 ALP 的活性和骨基质矿化能力显著增强 ($P < 0.01$), 与 EfnB1-Fc 组相比较, EphB2-Fc 去势组的 ALP 增强最为明显 ($P < 0.01$)。见图 5。

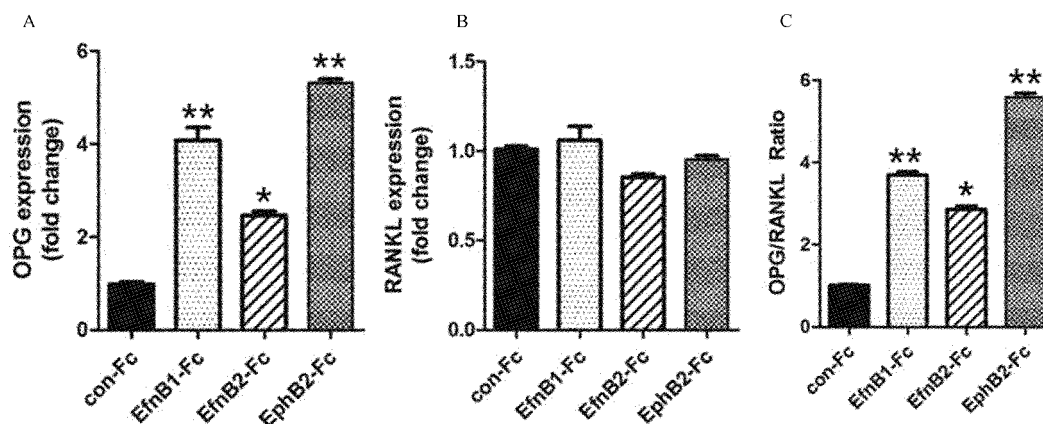


图5 各 Fc 处理组的去势小鼠 BMSCs 成骨分化的 ALP 及茜素红染色结果分析

注:与 Con-Fc 组比较, * $P < 0.01$; 与 EfnB1-Fc 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Fig.5 Comparison of ALP and Alizarin red staining results in castrated mouse BMSCs between each Fc-treated group

3 讨论

相关研究表明骨髓间充质干细胞 (bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 在体内分化为不同的组织细胞受复杂的调控机制所控制, 当调控机制发生紊乱, 将会导致相关疾病的发生^[9]。BMSCs 的分化异常与骨质疏松症的发生密切相关, 主要体现为在骨质疏松患者骨髓中成骨分化能力减弱, 成脂分化能力增加。目前主要有两种学说: ① BMSCs 的衰老导致了成熟的骨细胞生成减少, 进而造成了骨形成的减弱^[10]。在一个多样本的人群研究证实, 骨髓间充质干细胞的数量和增殖能力在骨质疏松患者中其数量以及增殖能力均是下降的^[11]。在绝经后骨质疏松患者中, 骨髓间充质干细胞成骨分化能力也是减弱的, 由于成骨细胞分化的减少, 使得骨保护素 OPG 生成减少, 这样间接的促进破骨细胞的生成, 加速骨量丢失^[12]。②在骨质疏松症患者中, 骨髓间充质干细胞成脂肪分化的增加抵消了其成骨分化^[13]。在老年性骨质疏松骨髓中, 脂质积累是增加的, 这意味着成骨与成脂之间是负相关的。卵巢切除术引起的骨量的减少同样也被证明脂肪细胞的分化是增加的。因此, 通过干预, 使得骨髓间充质干细胞成骨分化和成脂分化之间达到平衡, 可能会成为一个治疗骨质疏松症新的治疗靶点。

在人类基因组中, Eph (erythropoietin-producing hepatocyte kinases) 受体是酪氨酸蛋白激酶受体家族中最大的亚家族, Eph 的配体为 Ephrin (Eph receptor interacting proteins)^[14]。目前研究表明, 人类基因组中 Eph 受体共有 14 个成员, 其中包括 2 个亚类的 EphA (EphA1 ~ EphA8) 以及 EphB (EphB1 ~ EphB6)^[15]。Zhao 等^[16]团队率先研究报道, 在骨吸收与骨形成耦联过程中存在 Eph/Ephrin 双向信号转导, 并影响整个耦联过程。EphB4 过表达的转基因小鼠被研究证实骨密度高于对照组小鼠, 且其破骨细胞的增殖能力收到明显抑制。Kuroda 等^[17]对成骨细胞中 EphA4 研究发现, EphA4 蛋白在试验小鼠的成骨及软骨骨化方面发挥重要影响, 在成骨细胞和软骨细胞形成的终末期影响更为明显, 但与 EphA4 蛋白相互作用的 Ephrin 配体尚需进一步研究阐明。

在本研究中发现: 在小鼠来源的骨髓间充质干细胞中, 去势组小鼠的 EfnA2、EphB4、EfnB2、EfnB1 及 EphA4 较假手术组明显表达降低, 但去势组中 EfnA2 及 EfnB2 相比表达显著升高。使用 Micro-CT 分析检测动物模型股骨骨量结果提示: 各组分别注射 Fc, 于术后 10 周将小鼠脱颈处死, 加入 human IgG-Fc 去势组 (OVX+Con+Fc 组) 小鼠的骨小梁结构均破坏严重, 骨小梁密度下降。Sham 组和加入

EfnB1-Fc、EphB2-Fc 去势组的骨密度及骨体积分数均明显增高,但 EphB2-Fc 去势组提高骨密度能力更好。此结果表明小鼠去势后可抑制 BMSCs 的成骨分化能力,而 EphB2-Fc 可刺激骨微环境,有利于去势小鼠骨量的维持。我们在体外试验中已验证了 EphB2/EphrinB1 双向信号通路对去势骨髓间充质干细胞成骨分化能力的作用,体内实验中再次验证其信号通路对去势小鼠骨量丢失的抑制作用,改善了去势小鼠的骨量丢失。采用成骨碱性磷酸酶染色 (ALP)、茜素红染色及 Realtime-PCR 检测 Runx2、ALP、Osterix、OPG 及 RANKL 表达水平的研究中结果提示:EfnB1-Fc 和 EfnB2-Fc 组中 Runx2 表达增高,EfnB1-Fc、EfnB2-Fc 和 EphB2-Fc 去势组中 ALP 与 Osterix 的表达水平升高,且 EphB2-Fc 去势组中 ALP 与 Osterix 的表达水平升高最为明显,EfnB1-Fc 和 EphB2-Fc 可显著提高 BMSCs 成骨分化中 ALP 的活性和骨基质矿化能力,以 EphB2-Fc 效果最为显著。EfnB1-Fc、EfnB2-Fc 和 EphB2-Fc 去势组中 OPG 的表达水平明显升高,进而 OPG/RANKL 的比率明显上调。其中,EfnB1-Fc 去势组与 EphB2-Fc 去势组中 OPG/RANKL 的比率升高最为明显。本研究结果显示:①EfnB1-Fc 与 EphB2-Fc 在抑制骨量丢失、促进骨基质矿化能力方面功能相似,其原因两个因素相关,即 EphrinB1 (EfnB1) 上调后可发挥促成骨抑制破骨,以及 EphrinB1 高亲和结合受体 EphB2 受到抑制剂作用后反向刺激 EphrinB1 信号通路,引起 EphrinB1 上调最终提高成骨分化能力相关。Eph/Ephrin 信号通路对骨重建的影响中,当 EphrinB2 缺乏时,EphrinB1 和其他因子可能起到代偿作用。②骨髓间充质干细胞中过表达的 Runx2,在骨髓间充质干细胞分化为成骨祖细胞时发挥重要作用,显著的增加骨髓间充质干细胞成骨分化以及骨矿化能力^[18]。③ALP 作为骨髓间充质干细胞成骨分化早中期的一个标志物,在钙化期开始达到高峰,提高骨髓间充质干细胞的成骨分化的能力。④Osterix 作为 Runx2 的下游作用元件,在成骨过程中出现的比 Runx2 晚,Osterix 本身作为重要影响因子,可在 Runx2 促进 BMCs 分化为成骨祖细胞之后,继续发挥促进前成骨细胞的形成作用,并影响前成骨细胞向功能完善的成骨细胞分化^[19]。⑤在成骨与破骨分化过程中,EphB/EphrinB 对骨髓间充质干细胞的调节不光局限于成骨分化能力,也间接影响破骨细胞系的分化功能,其中 EfnB2-Fc 对破骨细胞分化的抑制作用最为显著。⑥EphB/EphrinB 双向

信号通路中的反向信号转导可通过 EphrinB2 C 端的 YKV 基序部位与胞内含 PDZ 结构域的蛋白质结合作用,其产生的信号向下游转导,对 c-Fos-NFATc1 转录级联反应过程(负反馈)产生抑制作用,从而降低破骨细胞的分化^[20]。⑦经 EphB4 的正向信号使成骨前体细胞内的成骨分化标志物表达增强,促进了成骨细胞的分化,其胞内转导通路可能是降低 RhoA 活性促进成骨能力。

EfnB1-Fc 和 EphB2-Fc 处理可上调去势骨髓间充质干细胞的 ALP 和 Osterix 表达,这与 Arthur 等^[21]和 Xing 等^[22]分别在正常人类骨髓间充质干细胞和正常小鼠骨髓间充质干细胞的研究一致。文献报道在成骨细胞和破骨细胞偶联机制中 EphB4/EphrinB2 双向信号通路能促进成骨细胞分化,同时抑制破骨细胞分化。对于 OPG 的上调和 EfnB1-Fc 和 EphB2-Fc 处理组一致,提示 EfnB2-Fc 的作用主要表现应在于对破骨细胞分化的抑制。之所以没有选择 EphB4-Fc 作为刺激因素是因为 EphB4 是 EphrinB2 的主要受体,而 EphrinB2 的反向信号通路主要发生在破骨细胞中,抑制破骨细胞分化,在成骨细胞系中增加 EphB4-Fc 并不能起到促进成骨分化作用^[23]。

体外试验验证了 EphB2/EphrinB1 双向信号通路对去势骨髓间充质干细胞成骨分化能力的作用,并且发现 EphB/EphrinB 通过调节 OPG/RANKL 比率影响去势骨髓间充质干细胞的功能,从而间接影响破骨细胞系的分化。本研究证明 EphB/EphrinB 信号通路的刺激干预可以改善因去势后小鼠骨质疏松症的进一步加剧,阻止了骨小梁的大量破坏和丢失。在早期的研究中,通过骨髓腔内注射技术,对于去势造成的绝经后骨质疏松症模型给予骨髓间充质干细胞注射,有利于小鼠骨量的维持。在研究中,通过腹腔内注射 EfnB1-Fc、EfnB2-Fc、EphB2-Fc 片段,结合 EphB/EphrinB 对 OPG/RANKL 的研究,可以推测 EphB2-Fc 促进成骨作用比较显著,EfnB2-Fc 在调节骨髓间充质干细胞 OPG 的上调对骨微环境中破骨细胞的分化起到一定的抑制作用,进而减少了骨吸收,维持了骨量。提示 EphB/EphrinB 信号通路对于去势后破骨细胞系的作用机制应是下一步研究的方向之一。从而使 EphB/EphrinB 信号通路在整体骨重建过程中的调节作用机制更加明晰。

综上,本研究验证了 EphB/EphrinB 在去势骨质疏松小鼠中调节骨重建的作用,为进一步将 EphB/EphrinB 作为治疗绝经后骨质疏松治疗靶点的目标

提供了试验依据。

【参 考 文 献】

- [1] Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, et al. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling [J]. EMBO J, 2006, 25 (24): 5840-5851.
- [2] Sullivan SO, Naot D, Callon K, et al. Imatinib promotes osteoblast differentiation by inhibiting PDGFR signaling and inhibits osteoclastogenesis by both direct and stromal cell-dependent mechanisms [J]. J Bone Miner Res, 2007, 22 (11): 1679-1689.
- [3] Fu Y, Li R, Zhong J, et al. Adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells from ovariectomized mice [J]. Cell Prolif, 2014, 47(6): 604-614.
- [4] Zhang F, Zhang Z, Sun D, et al. Periostin: A downstream mediator of EphB4-induced osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 7241829.
- [5] Arvanitis D, Davy A. Eph/ephrin signaling: networks [J]. Genes Dev, 2008, 22(4): 416-429.
- [6] Egea J, Klein R. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance [J]. Trends Cell Biol, 2007, 17(5): 230-238.
- [7] Compagni A, Logan M, Klein R, et al. Control of skeletal patterning by ephrinB1-ephrinB2 interactions [J]. Dev Cell, 2003, 5 (2): 217-230.
- [8] Davy A, Bush JO, Soriano P. Inhibition of gap junction communication at ectopic Eph/ephrin boundaries underlies craniofrontonasal syndrome [J]. PLoS Biol, 2006, 4 (10): 1763-1776.
- [9] Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication [J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473(2): 201-209.
- [10] Edwards CM, Mundy GR. Eph receptors and ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis [J]. Int J Med Sci, 2008, 5 (5): 263-272.
- [11] Dong L, Cheng X, Zhou L, et al. Calcium channels are involved in EphB/ephrinB reverse signaling-induced apoptosis in a rat chronic ocular hypertension model [J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (2): 2465-2471.
- [12] Dong LD, Gao F, Wang XH, et al. GluA2 trafficking is involved in apoptosis of retinal ganglion cells induced by activation of EphB/ephrinB reverse signaling in a rat chronic ocular hypertension model [J]. J Neurosci, 2015, 35(13): 5409-5421.
- [13] Park I, Lee HS. EphB/ephrinB signaling in cell adhesion and migration [J]. Mol Cells, 2015, 38(1): 14-19.
- [14] 宋慧婷, 侯建明. 骨髓间充质干细胞对骨质疏松的治疗作用概述[J]. 创伤与急诊电子杂志, 2017, 5(1): 40-43.
- [15] Liu ST, Zhong SM, Li XY, et al. EphrinB/EphB forward signaling in Müller cells causes apoptosis of retinal ganglion cells by increasing tumor necrosis factor alpha production in rat experimental glaucomatous model [J]. Acta Neuropathol Commun, 2018, 6(1): 111.
- [16] Zhao C, Irie N, Takada Y, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis [J]. Cell Metab, 2006, 4 (2): 111-121.
- [17] Kuroda C, Kubota S, Kawata K, et al. Distribution, gene expression, and functional role of EphA4 during ossification [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(1): 22-27.
- [18] 李微, 张博, 张雨薇, 等. 雌激素调节骨代谢作用的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23 (2): 262-266.
- [19] 许闫严, 张克良, 魏忠民, 等. 雌激素对去势骨质疏松症大鼠骨密度和骨代谢影响的实验研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(6): 776-780.
- [20] 邵秉一, 于洋, 杨德琴, 等. 雌激素缺乏导致的骨质疏松发病过程中BMMSC的Fas表达增强后受破骨细胞凋亡的影响 [J]. 免疫学杂志, 2016, 32(10): 853-856.
- [21] Arthur A, Zannettino A, Panagopoulos R, et al. EphB/ephrin-B interactions mediate human MSC attachment, migration and osteochondral differentiation [J]. Bone, 2011, 48: 533-542.
- [22] Xing W, Kim J, Wergedal J, et al. Ephrin B1 regulates bone marrow stromal cell differentiation and bone formation by influencing TAZ transactivation via complex formation with NHERF1 [J]. Mol Cell Biol, 2010, 30: 711-721.
- [23] 艾菊青, 毛浩萍. 间充质干细胞移植治疗骨质疏松研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2018, 37(1): 84-88.

(收稿日期: 2019-02-02; 修回日期: 2019-03-03)

(上接第336页)

- [17] 张军, 吴燕燕, 张琦, 等. 甲亢患者血清I型前胶原氨基端肽、I型胶原羧基端肽变化及与甲状腺激素、骨密度的相关性 [J]. 医学综述, 2015, 21(24): 4595-4596.
- [18] 杨彦霞, 董进. 骨质疏松患者骨密度与骨代谢指标的相关研究 [J]. 中国现代医生, 2015, 53(19): 80-82.
- [19] Roux C. Osteoporosis in inflammatory joint diseases [J]. Osteoporos Int, 2011, 22: 421-433.
- [20] 邹伏英, 王友莲, 霍亚南. 类风湿关节炎患者的骨密度和疾病活动相关性研究 [J]. 江西医药, 2013, 48: 37-39.
- [21] 范义平, 陈恩祥, 蒋泰媛. 半髓与全髓置换术治疗老年股骨颈骨折的疗效比较 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32 (22): 4996-4997.

(收稿日期: 2019-01-04; 修回日期: 2019-04-10)