

SDF-1/CXCR4在BMP9介导C2C12细胞成骨分化过程中的作用研究

刘晨 杨丹丹 白慧丽 李宝林 何方 张汝益 严树涓 施琼*

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

摘要 为了观察SDF-1/CXCR4信号轴在BMP9促C2C12细胞成骨分化过程中的作用, 通过重组腺病毒过表达BMP9, 检测对C2C12细胞中SDF-1及受体CXCR4 mRNA和蛋白表达水平的影响; 同时利用重组腺病毒或中和抗体干扰SDF-1/CXCR4, 与BMP9先后作用于C2C12细胞, 通过定量测定碱性磷酸酶(ALP)、染色测定ALP表达、免疫细胞化学测定骨钙蛋白(OCN)表达、茜素红S染色测定钙盐沉积、Real-time PCR检测成骨相关转录因子Runx2和Osx的表达、Western blot检测成骨分化信号通路MAPK和Smad的变化。结果显示, BMP9能明显抑制C2C12细胞中SDF-1、CXCR4的表达($P<0.01$), 且具有剂量和时间依赖性; 预先干扰SDF-1/CXCR4能明显影响由BMP9介导的早、中期成骨标志物ALP、OCN及早期转录因子Runx2、Osx的表达($P<0.01$)和MAPK、Smad信号通路相关蛋白的变化($P<0.05$); 外源性SDF-1并不能影响晚期成骨标志物钙盐沉积。提示SDF-1/CXCR4信号轴在由BMP9介导的C2C12细胞成骨分化早、中期过程中发挥重要作用。

关键词 SDF-1; CXCR4; BMP9; 成骨分化; C2C12细胞

The Role for SDF-1/CXCR4 Signal Axis in BMP9-induced Osteogenic Differentiation of C2C12 Cells

Liu Chen, Yang Dandan, Bai Huili, Li Baolin, He Fang, Zhang Ruyi, Yan Shujuan, Shi Qiong*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To elucidate the role of SDF-1/CXCR4 signal axis during BMP9-induced osteogenic differentiation in C2C12 cells, BMP9 was introduced by using recombinant adenoviruses assay. The mRNA and protein expression levels of SDF-1 and CXCR4 induced by Ad-BMP9 were detected in C2C12 cells. At the same time, the recombinant adenovirus and neutralizing antibody were used to perturbing the SDF-1/CXCR4 signal axis in C2C12 cells before or after the addition of BMP9. The alkaline phosphatase (ALP) quantitative assay and fast blue RR salt staining were used to determine the expression of ALP. Immunocytochemistry was used to determine the expression of osteocalcin (OCN), while calcium deposition was determined by alizarin red S staining. The expression of the osteogenic transcription factor Runx2 and Osx were detected by real time PCR. Western blot was used to detect the change of osteogenic differentiation signaling pathway MAPK and Smad. The results showed that BMP9

收稿日期: 2012-10-22 接受日期: 2012-11-14

国家自然科学基金资助项目(批准号: 30872770)、重庆市自然科学基金资助项目(批准号: 2011BB5131)和重庆市教育委员会科学技术研究项目(批准号: KJ120327)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485239, E-mail: anniesq8718@yahoo.com.cn

Received: October 22, 2012 Accepted: November 14, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.NSFC30872770), the Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (Grant No.2011BB5131) and the National Ministry of Education Foundation of China (Grant No.KJ120327)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485239, E-mail: anniesq8718@yahoo.com.cn

significantly inhibited SDF-1 and CXCR4 expression ($P<0.01$) in C2C12 cells, in a dose- and time-dependent. Pretreatment of C2C12 cells with SDF-1/CXCR4 could significantly affect the early and mid osteogenic markers ALP, OCN, the transcription factors of Runx2, Osx expression ($P<0.01$), and the Smad, MAPK signaling pathway ($P<0.05$). Addition of exogenous SDF-1 did not affect the changes of the late osteogenic marker calcium deposition. Our data indicated a co-requirement of the SDF-1/CXCR4 signal axis in BMP9-induced the early- and mid-process of osteogenic differentiation of C2C12 cells.

Key words SDF-1; CXCR4; BMP9; osteogenic differentiation; C2C12 cells

伴有骨缺损的骨不连接在临床上极为常见,是严重危害人类生存质量的骨骼系统的严重疾病,当合并糖尿病、骨质疏松、酗酒和重度吸烟时,发生率更高^[1]。我国每年骨不连、骨缺损和脊柱融合术,加上骨肿瘤病人切除术后的保肢治疗,共近150万例,提高其治愈率成为亟待解决的热点问题。前期发现, BMP2具有促进小鼠C2C12间质成肌细胞向成骨分化的功能^[2]。以间质细胞为细胞源的骨组织再生工程已证实其安全性和有效性,如何促进其成骨分化是骨组织工程技术的关键环节和研究热点^[3]。

SDF-1属CXC型趋化因子,与其七次跨膜受体CXCR4构成的信号轴表达于机体多种组织和细胞,尤其是在间充质干细胞的修复、再生和归巢过程中发挥重要作用^[4]。Zhu等^[5]证明SDF-1与BMP2在C2C12细胞成骨分化过程中共同发挥作用,且阻断SDF-1/CXCR4信号轴可抑制由BMP2介导的小鼠骨髓基质细胞的成骨分化^[6]。

促进成骨分化的因子有多种, BMPs(骨形态发生蛋白)是其中最具有应用前景的因子之一。BMPs属于转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族^[7],目前共分离和鉴定了20余种BMPs。其中rhBMP2和rhBMP7已应用于临床上的骨再生治疗^[8-9],并取得了一定的效果。实验室前期研究发现BMP9是诱导间充质干细胞成骨分化作用最强的因子之一^[10],但机制至今不明。因此,本研究通过体外实验观察干扰C2C12细胞中SDF-1/CXCR4表达对由BMP9介导的成骨分化过程的影响,进一步阐明BMP9促成骨作用的机制,推动BMP9在骨组织工程乃至临床中的应用。

1 材料与方法

1.1 试剂

引物由Invitrogen公司合成, RNA提取试剂Tri-

zol购于Invitrogen公司, RT-PCR试剂盒、Real-time PCR试剂盒购于TaKaRa公司, DMEM高糖培养基、MEM培养基、胎牛血清购于Hyclone公司, SDF-1 ELISA检测试剂盒购于RayBio公司, ALP定量检测试剂盒购于BD公司, naphthol AS-MX phosphate、Fast Blue BB Salt、茜素红S染料、维生素C和 β -磷酸甘油购自Sigma公司, 抗SDF-1中和抗体购于R&D公司, CXCR4抗体、OCN抗体、 β -actin抗体购于Santa Cruz公司, Erk1/2抗体、pErk1/2抗体、Smad1/5/8抗体、pSmad1/5/8抗体购于Cell Signaling公司, 山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG、兔抗山羊IgG和SP免疫组化检测试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司, Western blot ECL检测试剂盒购于Millipore公司。其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 细胞与病毒

小鼠间质成肌细胞株C2C12、人结直肠癌细胞株HCT-116由美国芝加哥大学分子医学研究室何通川教授惠赠。重组腺病毒Ad-GFP、Ad-RFP、Ad-BMP9(同时表达GFP)、Ad-SDF-1(同时表达RFP)、Adsi-CXCR4(同时表达RFP)由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室实验室前期利用AdEasy系统构建, 保存备用。

1.3 实验方法

1.3.1 C2C12细胞的培养及分组 C2C12细胞常规培养于DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 g/mL链霉素), 培养条件为37 °C、5%CO₂、饱和湿度, 每1~2 d用0.25%的胰酶消化传代备用。随机将细胞分为5组, 即空白对照组(medium)、阴性对照组(Ad-RFP)、重组腺病毒过表达SDF-1组(Ad-SDF-1)、100 ng/mL中和抗体干扰表达SDF-1组(anti-SDF-1)和重组腺病毒干扰表达CXCR4组(Adsi-CXCR4)。

1.3.2 条件培养基的制备 HCT116细胞常规培养

于MEM培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 g/mL链霉素),培养条件为37 °C、5%CO₂、饱和湿度。待细胞融合度60%左右时,加入24 h荧光感染效率60%滴度的Ad-BMP9或Ad-GFP,病毒感染6 h后换液为无血清的DMEM高糖培养基,并分别在24 h和48 h后收集培养基,离心后4 °C保存备用,即为BMP-CM或GFP-CM,同时设置未加入腺病毒的HCT-116细胞收集培养基为Control-CM作为空白对照。一周内用完。

1.3.3 Real-time PCR 收集各组细胞,TRIZOL法抽提细胞总RNA,将总RNA逆转录为cDNA,Real-time PCR检测不同基因mRNA表达,采用GAPDH作为内参。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($\Delta\Delta CT$),相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta CT}=2^{-(\Delta CT_{处理}-\Delta CT_{对照})}=\frac{2^{-(\Delta CT_{处理}-\Delta CT_{内参})}}{2^{-(\Delta CT_{对照}-\Delta CT_{内参})}}$ 。数据取3次重复的平均值。根据GenBank上发布的基因序列设计引物,所用引物序列见表1。

1.3.4 ELISA 收集各组细胞培养基,1 000 r/min收集上清液,按照ELISA试剂盒说明书进行操作,酶标仪检测各孔D值,使用Curve Expert软件根据标准曲线计算各组细胞中SDF-1表达水平。数据取3次重复的平均值。

1.3.5 Western blot 收集各组细胞总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量。各取100 μ L样品上样进行SDS-PAGE,通过湿转仪将蛋白转移到PVDF膜上,5%BSA室温封闭2 h, I 抗4 °C孵育过夜后, II 抗室温孵育1.5 h, TBST洗涤后按ECL试剂盒说明进行电化学发光检测,并用Bio-Rad显影仪采集图像。以 β -actin为内参,数据取3次重复的平均值。

1.3.6 ALP活性定量检测及染色 取对数生长期C2C12细胞,待细胞融合度50%左右时。处理7 d后,弃去培养基,用预冷的PBS冲洗2次,裂解液裂解5 min后,离心取上清液按试剂盒操作说明定量测定

ALP活性。并用BCA法检测细胞内总蛋白含量,校正ALP的定量结果。用于ALP染色的细胞同样在处理7 d后弃去培养基,用预冷的PBS洗2次,加入0.1 mg/mL naphthol AS-MX phosphate和0.6 mg/mL Fast Blue BB Salt混合液200 μ L进行染色,室温避光45 min,显微镜下观察成像并保存结果。重复3次。

1.3.7 免疫细胞化学检测OCN 细胞经处理14 d后弃去培养基,用预冷的PBS洗2次,采用链霉卵白素-生物素-辣根过氧化物法(SP法)进行免疫细胞染色检测OCN的表达,其中I抗为OCN抗体(1:50)、II抗为兔抗羊抗体(1:5 000)显微镜下观察成像并保存结果。重复3次。

1.3.8 茜素红S染色检测细胞钙盐沉积 细胞经处理1 d后,在培养基中加入终浓度为50 μ g/mL的维生素C和10 mmol/L的 β -磷酸甘油,连续培养21 d后进行茜素红S染色:弃去培养基,PBS洗涤3次,0.05%戊二醛固定10 min, ddH₂O洗涤3次,加入0.4%茜素红S染液,在显微镜下观察,待出现红色物质堆积时,弃去染液, ddH₂O终止反应和洗涤,显微镜下观察成像并保存结果。重复3次。

1.4 统计学分析

数据经Excel汇总,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用SPSS 14.0统计软件进行统计分析,两组数据采用 t 检验,两组以上比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

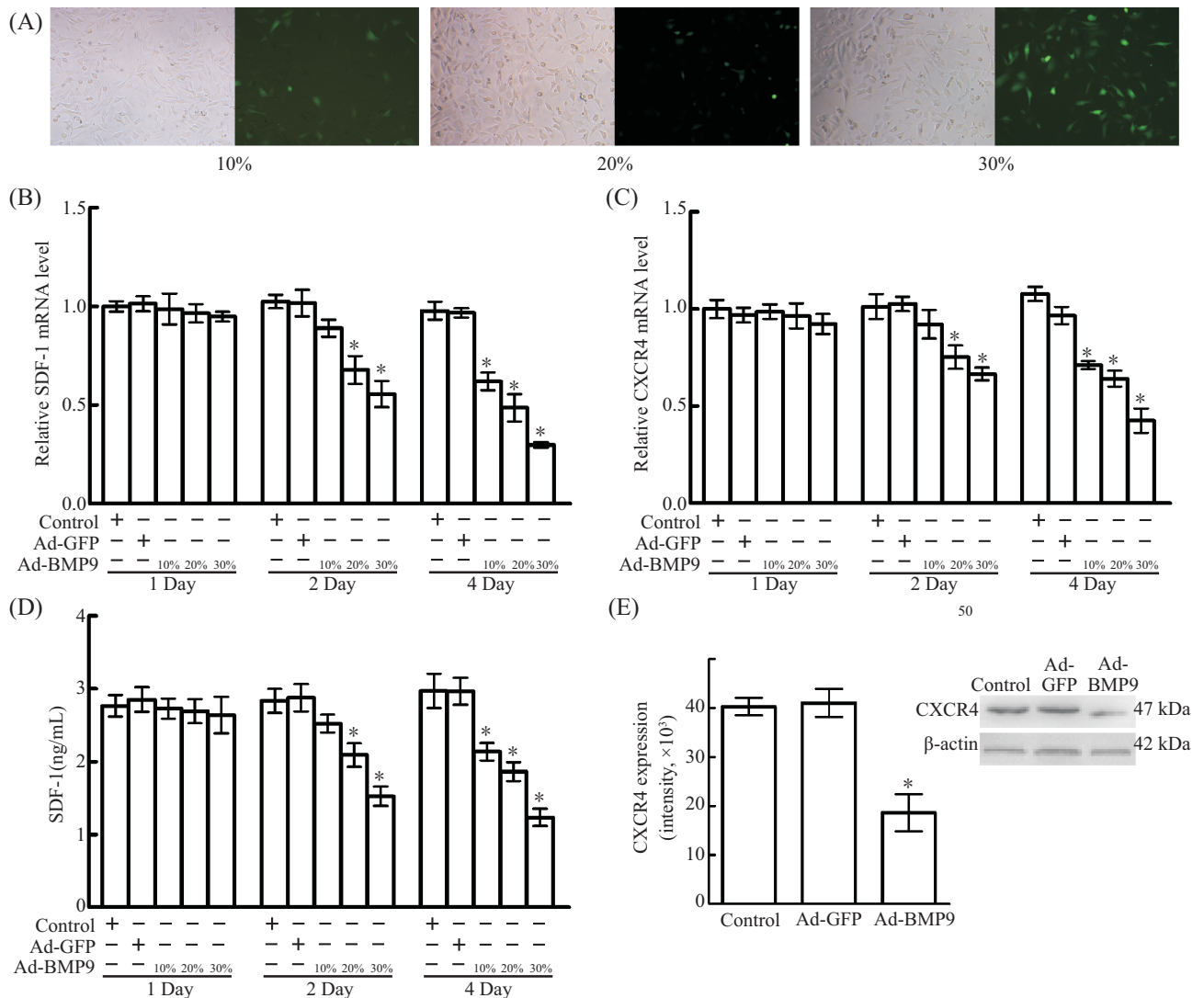
2.1 BMP9抑制C2C12细胞中SDF-1/CXCR4 mRNA和蛋白水平的表达

荧光显微镜下观察感染Ad-BMP9后24 h荧光感染效率分别为10%、20%、30%的C2C12细胞(图1A)。按24 h荧光感染效率10%、20%和30%分别加入不同滴度的Ad-BMP9,同时设置阴性对照组

表1 扩增基因引物序列

Table 1 The sequence of PCR primers for each gene

基因 Genes	上游引物(5'-3') Forword primers(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primers(5'-3')	PCR产物长度(bp) Amplified fragments(bp)
<i>SDF-1</i>	AGA GTC CGA GGA ACG CTG C	CCC TGG CAC TGA ACT GGA	119 bp
<i>CXCR4</i>	GGA TCA GCA TCG ACT CCT TC	AGG CAT AGA GGA TGG GGT TC	137 bp
<i>Runx2</i>	TAA GAA GAG CCA GGC AGG TG	TAG TGC ATT CGT GGG TTG G	111 bp
<i>Osx</i>	CCC TTC TCA AGC ACC AAT GG	AGG GTG GGT AGT CAT TTG CAT AG	85 bp
<i>GAPDH</i>	GGC TTC CCA GAA CAT CAT	CGG ACA CAT TGG GGG TAG	120 bp



A: 荧光显微镜下观察感染Ad-BMP9后24 h荧光感染效率分别为10%、20%、30%的C2C12细胞(100×); B: Real-time PCR检测各组细胞1, 2, 4 d *SDF-1* mRNA的表达情况; C: Real-time PCR检测各组细胞1, 2, 4 d *CXCR4* mRNA的表达情况; D: ELISA检测各组细胞1, 2, 4 d SDF-1蛋白的表达; E: Western blot检测各组细胞4 d CXCR4蛋白的表达, 以 β -actin为内参; * $P < 0.01$, 与control组1 d相比较。

A: 24 h fluorescent infection efficiency 10%, 20%, 30% of C2C12 cells after infected with Ad-BMP9 were observed by fluorescence microscopy(100×); B: the 1, 2, 4 d expression of *SDF-1* mRNA were detected by real time PCR; C: the 1, 2, 4 d expression of *CXCR4* mRNA were detected by real time PCR; D: the 1, 2, 4 d expression of SDF-1 protein were detected by ELISA; E: the 4 d expression of CXCR4 protein were detected by Western blot, expression levels of β -actin served as control; * $P < 0.01$ compared with the 1 d control group.

图1 BMP9影响C2C12细胞中SDF-1/CXCR4 mRNA和蛋白水平的表达

Fig.1 BMP9 affected the mRNA and protein expression levels of SDF-1/CXCR4 in C2C12 cells

(Ad-GFP)和空白对照组(Control)。通过Real-time PCR检测BMP9作用下*SDF-1*、*CXCR4* mRNA的表达水平, 经处理1 d后二者表达均无明显变化; 而处理2 d后相比较Control组, Ad-GFP组mRNA水平变化不明显, 10% Ad-BMP9组并不能明显降低*SDF-1*和*CXCR4* mRNA的表达, 但20%组和30%组均能明显降低二者mRNA的表达, 其中20%组分别下降32.2%、24.7%, 30%组分别下降44.4%、33.4%, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 处理4 d后, Ad-GFP组依

旧不能引起*SDF-1*和*CXCR4* mRNA的表达变化, 说明阴性对照组设置成功, 但经BMP9处理后, 各感染滴度组均能明显降低二者mRNA的表达, 其中10%组分别下降38.0%、28.8%, 20%组分别下降51.5%、35.8%, 30%组分别下降70.2%、57.4%, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$, 图1B-1C)。通过ELISA检测BMP9作用下SDF-1的蛋白表达水平, 结果与mRNA表达水平相似。处理2 d后, 20%组下降24.4%, 30%组下降44.8%; 处理4 d后, 10%组下降22.7%, 20%组

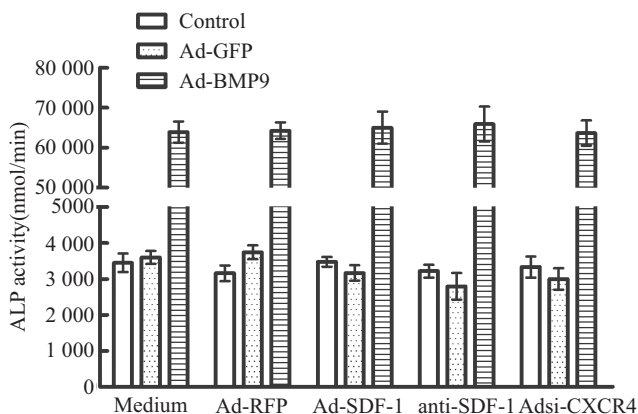
下降32.7%, 30%组下降55.4%, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 其余处理组均无明显变化(图1D)。通过Western blot检测BMP9作用下CXCR4的蛋白表达水平, I抗分别为CXCR4抗体(1:500)和 β -actin抗体(1:1 000), II抗均为羊抗鼠IgG(1:5 000)。结果显示, 24 h荧光感染效率为30%滴度的Ad-BMP9作用4 d后, CXCR4蛋白表达水平明显降低, 为对照组46.3%($P < 0.01$, 图1E)。这说明BMP9能降低C2C12细胞中SDF-1/CXCR4 mRNA和蛋白水平的表达, 且具有时间和剂量依赖性。

2.2 经BMP9预处理后干扰SDF-1/CXCR4并不影响C2C12细胞ALP的表达

首先利用BMP9-CM在C2C12细胞中过表达BMP9, 同时以Control-CM为空白对照、GFP-CM为阴性对照。24 h后将细胞分5组, 分别加入不同处理因素。ALP活性定量检测分析结果显示, 经过7 d处理, 相比较Control-CM组, BMP9-CM能够明显增加C2C12细胞中ALP活性, 而GFP-CM组中ALP活性与Control-CM组无明显区别; Ad-SDF-1组、anti-SDF-1组和Adsi-CXCR4组均不能明显改变C2C12细胞中由BMP9介导的ALP活性, 差异均不具有统计学意义($P > 0.05$, 图2)。

2.3 预先干扰SDF-1/CXCR4影响由BMP9介导的C2C12细胞的早、中期成骨分化

C2C12细胞随机分为5组, 分别加入相应处理因素, 24 h后每组又分别以Control-CM、GFP-CM和BMP9-CM



加入处理因素后7 d定量检测各组细胞ALP活性。

ALP activity detected by quantitative assay at 7 d after stimulated with processing factors.

图2 BMP9预处理后干扰SDF-1/CXCR4不影响C2C12细胞中ALP活性

Fig.2 Perturbing the SDF-1/CXCR4 signal axis after stimulated with BMP9 did not affect ALP activity in C2C12 cells

处理, 于7, 14, 21 d后分别检测成骨早期标志物ALP、成骨中期标志物OCN和成骨晚期标志物钙盐沉积。

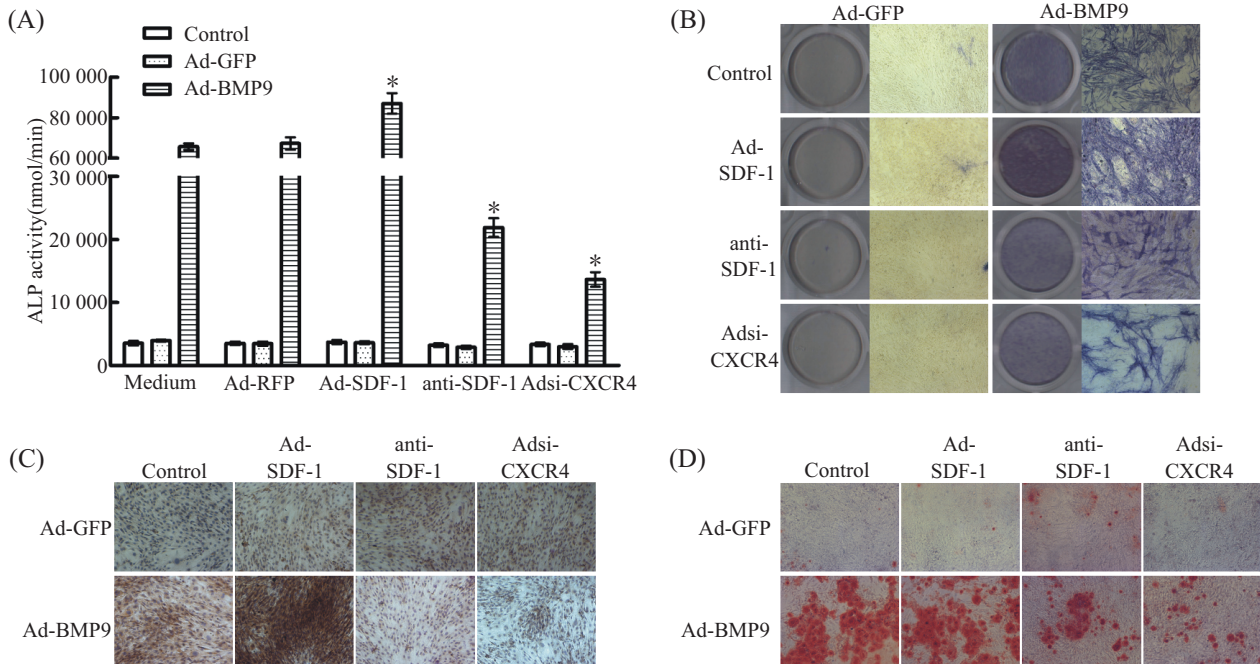
ALP活性定量检测分析结果显示, 经过7 d处理, 除BMP9-CM各组均能够明显增加ALP活性外, anti-SDF-1组和Adsi-CXCR4组均能明显抑制由BMP9介导的细胞ALP的表达, 与单独处理BMP9组相比分别降低66.6%和79.2%($P < 0.01$); 而Ad-SDF-1组能使BMP9介导的细胞ALP表达明显上升, 约上升32.5%($P < 0.01$); 单独以Ad-SDF-1、anti-SDF-1和Adsi-CXCR4处理并不能影响细胞ALP的表达水平(图3A)。同时, ALP染色结果与活性定量结果一致, BMP9-CM诱导C2C12细胞7 d后ALP染色程度增强, anti-SDF-1组和Adsi-CXCR4组能明显抑制ALP染色, Ad-SDF-1组能明显增强ALP染色(图3B)。

OCN免疫细胞化学结果显示, 经过14 d处理, BMP9能够明显增加OCN的表达, anti-SDF-1组和Adsi-CXCR4组能够使C2C12细胞中BMP9介导的OCN的表达明显降低; 与ALP结果类似的, Ad-SDF-1组能明显增强这一作用(图3C)。以上结果说明, 干扰SDF-1/CXCR4信号轴能明显改变由BMP9介导的C2C12细胞早、中期成骨标志物的表达。

钙盐沉积茜素红S染色结果显示, 经过21 d处理, BMP9能够明显增加钙盐沉积, anti-SDF-1组和Adsi-CXCR4组能够明显抑制BMP9介导的这一作用; 但Ad-SDF-1组并不能增强这一作用(图3D)。这说明SDF-1/CXCR4信号轴与BMP9介导的C2C12细胞晚期成骨分化关系不大。

2.4 预先干扰SDF-1/CXCR4影响C2C12细胞中由BMP9介导的Runx2、Osx表达

C2C12细胞随机分为5组, 分别加入相应处理因素, 12 h后每组又分别以Control-CM、GFP-CM和BMP9-CM处理。6 h后, Real-time PCR结果显示, anti-SDF-1组和Adsi-CXCR4组能够使细胞中BMP9介导的Runx2的表达分别降低41.0%和54.5%, Ad-SDF-1组则能使BMP9介导的Runx2表达上升58.9%($P < 0.01$), 单独以Ad-SDF-1、anti-SDF-1和Adsi-CXCR4处理并不能影响细胞Runx2的表达水平(图4A); 与Runx2结果相似, anti-SDF-1组和Adsi-CXCR4组也可使细胞中Osx的表达降低, 分别为54.9%和59.8%, Ad-SDF-1组则能使Osx表达上升35.5%($P < 0.01$, 图4B)。

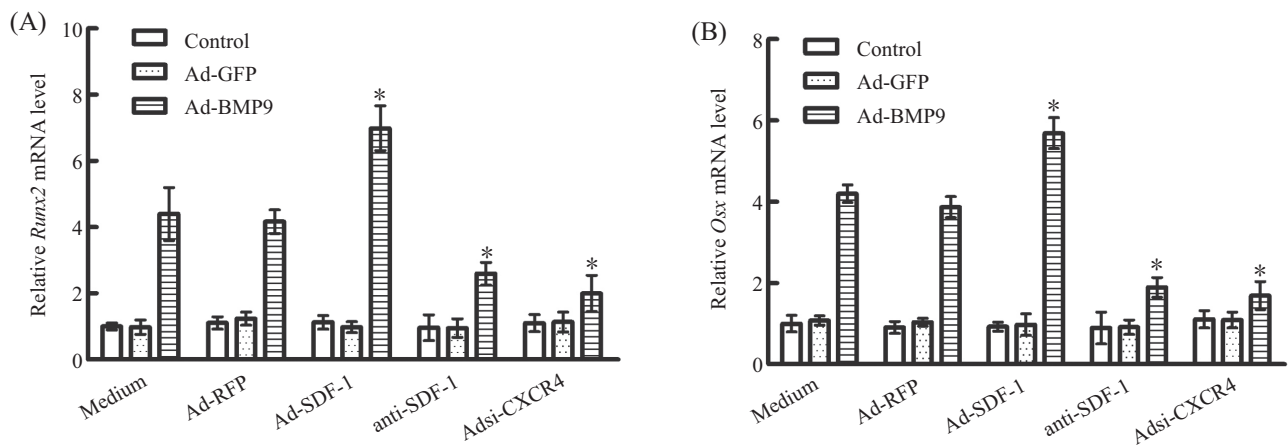


A: 加入处理因素后7 d定量测定各组细胞ALP活性; B: 加入处理因素后7 d染色检测ALP表达(100×); C: 加入处理因素后14 d免疫细胞化学检测OCN表达(100×); D: 加入处理因素后21 d茜素红染色检测钙盐沉积(100×); * $P < 0.01$, 与medium组和Ad-RFP组相比较。

A: ALP activity detected by quantitative assay at 7 d after stimulated with processing factors; B: immunocytochemistry staining of ALP expression at 7 d after stimulated with processing factors(100×); C: immunocytochemistry staining of OCN expression at 14 d after stimulated with processing factors(100×); D: alizarin red S staining of calcium deposition at 21 d after stimulated with processing factors(100×); * $P < 0.01$, compared with the medium group and Ad-RFP group.

图3 干扰SDF-1/CXCR4影响由BMP9介导的C2C12细胞成骨分化

Fig.3 Perturbing the SDF-1/CXCR4 signal axis affected BMP9-induced osteogenic differentiation in



A: Real-time PCR检测各组细胞Runx2 mRNA的表达情况; B: Real-time PCR检测各组细胞Osx mRNA的表达情况; * $P < 0.01$, 与medium组和Ad-RFP组相比较。

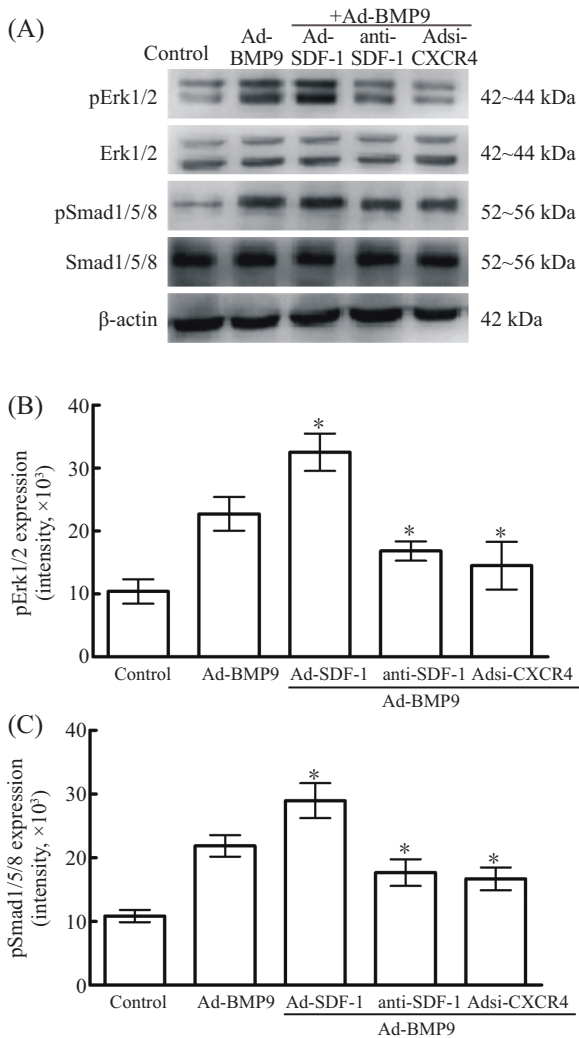
A: the expression of Runx2 mRNA were detected by Real-time PCR; B: the expression of Osx mRNA were detected by Real-time PCR; * $P < 0.01$, compared with the medium group and Ad-RFP group.

图4 干扰SDF-1/CXCR4影响由BMP9介导的C2C12细胞中Runx2、Osx表达

Fig.4 Perturbing the SDF-1/CXCR4 signal axis affected the expression of Runx2, Osx induced by BMP9 in C2C12 cells

2.5 预先干扰SDF-1/CXCR4影响C2C12细胞中由BMP9介导的MAPK、Smad相关蛋白活化

C2C12细胞随机分为5组,分别加入相应处理因素,12 h后每组又分别以Control-CM、GFP-CM和BMP9-CM处理,I抗分别为Erk1/2抗体(1:1 000)、pErk1/2抗体(1:1 000)、Smad1/5/8抗体(1:1 000)、pSmad1/5/8抗体(1:1 000)和 β -actin抗体(1:1 000),II抗均为羊抗兔IgG(1:5 000)或羊抗鼠IgG(1:5 000)。



Western blot检测各组细胞成骨信号通路MAPK、Smad中相关蛋白Erk1/2、Smad1/5/8的活化; * $P < 0.05$, 与Ad-BMP9组相比较。

The activation of Smad1/5/8, Erk1/2 proteins in MAPK and Smad signaling pathway were detected by Western blot; * $P < 0.05$, compared with the Ad-BMP9 group.

图5 干扰SDF-1/CXCR4影响由BMP9介导的C2C12细胞中MAPK、Smad相关蛋白的活化

Fig.5 Perturbing the SDF-1/CXCR4 signal axis affected the activation of proteins in MAPK and Smad signaling pathway induced by BMP9 in C2C12 cells

1 h后, Western blot结果显示, anti-SDF-1组和 Adsi-CXCR4组能明显抑制MAPK信号通路中Erk1/2蛋白的磷酸化,分别降低25.9%和36.2%, Ad-SDF-1组则能使Erk1/2活性上升43.2%($P < 0.05$, 图5A和图5B);与Erk1/2结果相似, anti-SDF-1组和 Adsi-CXCR4组也能明显抑制Smad信号通路中Smad1/5/8蛋白的磷酸化,分别降低19.2%和23.7%, Ad-SDF-1组则能使Smad1/5/8活性上升32.4%($P < 0.05$, 图5A和图5C)。

3 讨论

趋化因子(chemokine)是一组由组织细胞和炎性细胞产生的具有多种生物学功能的小分子生物活性肽家族,迄今发现的成员已逾60个。依其分子结构中氨基端半胱氨酸残基排列顺序分为四类亚族,即:CXC、CC、C、CX3C。CXC亚族成员之一SDF-1与其受体CXCR4构成的信号轴广泛表达于多种细胞和组织中,不仅在机体的发育中起了重要作用,还在包括中枢神经系统在内的多个系统中广泛表达^[11-12],参与多种神经退行性疾病的病理过程。同时,Orimo等^[13]指出,SDF-1通过与CXCR4信号轴的作用,既能够促进肿瘤组织的生长,又能使其沿着浓度梯度迁移至损伤区域并发挥修复作用^[14]。新近研究发现,SDF-1/CXCR4与干细胞动员、归巢以及损伤组织或器官的修复过程等有密切的联系^[15]。C2C12细胞是从成年小鼠损伤后的肌肉中分离出来,在缺乏细胞因子的普通培养基条件下培养最终向成肌细胞分化的一种细胞株^[16],在BMP2作用下能够被诱导分化为成骨细胞^[2]。本课题组前期实验证明,BMP9也具有诱导C2C12细胞成骨分化的功能,但机制不明。本研究以BMP9作为诱导C2C12细胞定向成骨分化的细胞因子,初步探讨SDF-1/CXCR4对BMP9介导的成骨分化的影响,并进一步了解其分子机制。

我们首先从基因表达和蛋白水平分别验证了利用重组腺病毒技术在C2C12细胞中过表达BMP9对细胞自身SDF-1及CXCR4表达的影响。结果发现,SDF-1及CXCR4在细胞中均有较高表达,这与Ratajczak等^[17]所指出的间充质干细胞能高表达SDF-1及CXCR4是一致的;随着时间的延长和病毒感染滴度的升高,二者的表达均明显被抑制,这也与Kortesidis等^[18]指出的经含地塞米松的成骨培养基培养能降低间充质干细胞SDF-1的表达相一致。其中,我们在感染C2C12时,所用的腺病毒分别为24 h荧光效率

10%、20%和30%的感染滴度;30%的感染滴度抑制SDF-1/CXCR4的作用最强,且未影响C2C12细胞的正常生长,因此在接下来试验中,我们多采用30%滴度的重组腺病毒感染细胞。

在成骨分化的过程中,由骨质分泌的ALP是成骨细胞的表型标志物之一,它可直接反映成骨细胞的活性或功能状况,一般作为成骨分化的早期指标。前期实验中我们发现,BMP9介导的成骨分化过程中,ALP一般在第3天开始表达,第7天达到峰值,第10天左右开始下降^[19],故在本实验中选择检测ALP在第7天的表达。OCN是由成骨合成和分泌的维生素K依赖性钙结合蛋白,大部分沉积在骨基质,骨钙蛋白由于其主要在矿化形成期出现,故被认为是成骨细胞向矿化发生期分化标记之一^[20]。钙盐是骨基质中的无机物通常又称为骨盐,钙盐的形成是成骨分化成熟的标志^[19]。故将OPN与钙盐沉积分别作为中、晚期成骨分化的标志物,分别于第14天和21天进行检测。故在本实验中将以上三个指标作为成骨分化标志物进行检测。首先,经BMP9-CM处理C2C12细胞后干扰SDF-1/CXCR4信号轴,发现并不影响ALP的表达。这可能是由于细胞中能表达足够多的SDF-1及受体CXCR4,并在BMP9介导成骨分化的早期阶段发挥重要作用;但在成骨分化信号通路启动后,即在本实验中加入外源性BMP9后,细胞成骨分化的过程已不再需要SDF-1/CXCR4信号轴,对其干扰也就不能明显影响成骨分化。这也就解释了前面我们指出的BMP9能降低细胞中SDF-1、CXCR4的表达的原因。其次,预先干扰SDF-1/CXCR4信号轴,能明显影响由BMP9介导的C2C12细胞的ALP和OCN表达。其中过表达SDF-1可使ALP和OCN表达明显升高,而干扰SDF-1及受体CXCR4能明显抑制二者的表达。同时,对钙盐沉积进行检测发现,虽然干扰SDF-1及受体CXCR4能明显抑制BMP9介导的钙盐沉积,但是过表达SDF-1不能增强这一作用。

Runx2是细胞成骨分化过程中骨钙蛋白、骨桥蛋白、I型胶原蛋白和胶原酶等标志物的转录因子^[21],在成骨分化的过程中表达相对较早,而Osx作为Runx2的下游基因发挥作用^[22],是成骨细胞分化和骨形成过程中所必须的转录因子^[23]。为了进一步研究其可能的作用机制,我们又对成骨分化早期相关转录因子Runx2、Osx的mRNA水平进行了检

测。结果显示,过表达SDF-1可使Runx2、Osx表达明显升高,而干扰SDF-1及受体CXCR4能明显抑制二者的表达。这说明干扰SDF-1/CXCR4信号轴对BMP9介导的成骨分化的影响是通过干扰BMP9所介导的早期转录相关因子Runx2与Osx的表达而完成的。BMP9可以通过经典的Smad信号途径而发挥诱导成骨分化的作用^[24]。而近来的研究表明,除此之外,MAPK信号也参与了BMP9诱导成骨分化的功能发挥^[25]。Western blot结果显示,过表达SDF-1能明显增强Erk1/2和Smad1/5/8蛋白的磷酸化,而干扰SDF-1和受体CXCR4的表达能明显抑制这一作用。这说明干扰SDF-1/CXCR4信号轴对BMP9介导的成骨分化的影响是通过干扰MAPK与Smad信号通路的活化而完成的。

综上所述,本研究证实了:(1)SDF-1/CXCR4信号轴在BMP9介导的C2C12细胞成骨分化早、中期发挥重要作用;(2)C2C12细胞能够表达足够多的SDF-1及受体CXCR4,以支持BMP9介导的成骨分化,但随着成骨分化的启动就不再需要SDF-1/CXCR4的表达,二者表达逐渐降低。下一步工作我们将继续探究SDF-1/CXCR4在BMP9介导的间充质干细胞成骨分化、成软骨分化中的作用及分子机制,进一步推动BMP9在骨组织工程乃至临床中的应用。

参考文献 (References)

- 1 Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Persson GR, Renvert S. Long-term stability of surgical bone regenerative procedures of peri-implantitis lesions in a prospective case-control study over 3 years. *J Clin Periodontol* 2011; 38(6): 590-7.
- 2 Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994; 127(6 Pt 1): 1755-66.
- 3 Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol* 2009; 218(2): 237-45.
- 4 Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, *et al.* Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007; 13(5): 947-55.
- 5 Zhu W, Boachie-Adjei O, Rawlins BA, Frenkel B, Boskey AL, Ivashkiv LB, *et al.* A novel regulatory role for stromal-derived factor-1 signaling in bone morphogenetic protein-2 osteogenic differentiation of mesenchymal C2C12 cells. *J Biol Chem* 2007; 282(26): 18676-85.
- 6 Hosogane N, Huang Z, Rawlins BA, Liu X, Boachie-Adjei O, Boskey AL, *et al.* Stromal derived factor-1 regulates bone morphogenetic protein 2-induced osteogenic differentiation of

- primary mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(7): 1132-41.
- 7 Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 2010; 147(1): 35-51.
- 8 Tsuda H, Wada T, Yamashita T, Hamada H. Enhanced osteoinduction by mesenchymal stem cells transfected with a fiber-mutant adenoviral BMP2 gene. *J Gene Med* 2005; 7(10): 1322-34.
- 9 Smajilagic A, Al-Khalil MY, Redjic A, Filipovic S, Hadjihasanovic B, Lappalainen S. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 and bone marrow as a substitute for bone graft in reconstruction defect of rabbit mandible. *Saudi Med J* 2005; 26(9): 1398-402.
- 10 Kang Q, Sun MH, Cheng H, Peng Y, Montag AG, Deyrup AT, *et al.* Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther* 2004; 11(17): 1312-20.
- 11 Wang Y, Li G, Stanco A, Long JE, Crawford D, Potter GB, *et al.* CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration. *Neuron* 2011; 69(1): 77-90.
- 12 Li M, Ransohoff RM. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: A migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* 2008; 84(2): 116-31.
- 13 Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: A novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 2006; 5(15): 1597-601.
- 14 Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 2007; 137(6): 491-502.
- 15 Sauv e K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A. Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res* 2009; 69(14): 5793-800.
- 16 费琴明, 陈统一, 张光健, Boden SD, Titu L. Smurf1拮抗BMP-2对C2C12细胞的诱导成骨作用. 复旦学报(医学版)(Fei Qiming, Chen Tongyi, Zhang Guangjian, Boden SD, Titu L. Smurf1 inhibits osteoblast differentiation of C2C12 induced by BMP-2. *Fudan University Journal of Medical Sciences*) 2006; 33(5): 657-61.
- 17 Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, Drukala J, Pietrkowski Z, Peiper S, *et al.* Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells* 2003; 21(3): 363-71.
- 18 Kortesisidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, Lapidot T, Gronthos S. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 2005; 105(10): 3793-801.
- 19 赵丹, 罗进勇. BMP9促进间充质干细胞C3H10T1/2成骨分化的研究. 临床和实验医学杂志(Zhao Dan, Luo Jinyong. The promotive effect of BMP9 in osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*) 2011; 10(16): 1225-26, 1230.
- 20 Luegmayr E, Varga F, Glantschnig H, Fratzl-Zelman N, Rumpler M, Ellinger A, *et al.* 1,25-Dihydroxy vitamin D3 and tri-iodothyronine stimulate the expression of a protein immunologically related to osteocalcin. *J Histochem Cytochem* 1998; 46(4): 477-86.
- 21 Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, Lee MH, Kim HN, Jin YH, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem* 2006; 281(24): 16502-11.
- 22 Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, *et al.* BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2008; 283(43): 29119-25.
- 23 Ohya Y, Nifuji A, Maeda Y, Amagasa T, Noda M. Spatiotemporal association and bone morphogenetic protein regulation of sclerostin and osterix expression during embryonic osteogenesis. *Endocrinology* 2004; 145(10): 4685-92.
- 24 Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* 2005; 357(1): 1-8.
- 25 徐道晶, 王锦, 何娟文, 胡晶, 翁亚光, 罗进勇. p38蛋白激酶参与BMP9诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化. 中国生物工程杂志(Xu Daojing, Wang Jin, He Juanwen, Hu Jing, Weng Yaguang, Luo Jinyong. p38 Kinase Participated in BMP9-induced Osteogenic Differentiation of C3H10T1/2 Mesenchymal Stem Cells. *China Biotechnology*) 2011; 31(5): 15-21.