

p38 MAPK信号通路在BMP-2诱导人牙囊细胞成骨分化中的作用

陈学鹏^{1*} 施洁珺¹ 叶青松² 蔡霞³ 张天厚^{4*}

(¹浙江大学医学院附属口腔医院正畸科, 杭州 310006; ²詹姆斯库克大学牙学院正畸科, 凯恩斯 4870, 澳大利亚;

³浙江大学医学院附属口腔医院牙周科, 杭州 310006; ⁴浙江大学医学院附属第二医院口腔科, 杭州 310009)

摘要 该文主要探讨p38 MAPK信号通路在人骨形态发生蛋白-2(BMP-2)诱导人牙囊细胞成骨分化中的作用。从人成骨肉瘤细胞株MG-63中克隆hBMP-2基因, 通过基因重组技术构建pcDNA3.1(+)-hBMP-2真核表达质粒, 采用脂质体法转染人牙囊细胞, 以G418筛选得到能够稳定表达BMP-2的细胞克隆。Quantitative Real-time RT-PCR及Western blot检测BMP-2目的基因和蛋白的表达。以p38 MAPK特异性抑制剂SB203580作用于稳定表达BMP-2的人牙囊细胞, 观察MAPKAP激酶-2磷酸化蛋白、碱性磷酸酶活性及成骨相关基因表达水平变化。结果显示, 通过基因重组和基因转染获得能够稳定表达BMP-2的人牙囊细胞。SB203580明显降低MAPKAP激酶-2磷酸化蛋白的表达水平。BMP-2水平持续高表达能诱导人牙囊细胞碱性磷酸酶活性升高, 同时增强OSX、Runx2、OCN、BSP及OPN等成骨相关基因的表达水平, 但BMP-2诱导人牙囊细胞成骨分化的作用被SB203580抑制。这表明, p38 MAPK信号通路在BMP-2诱导人牙囊细胞成骨分化中发挥调控作用。

关键词 牙囊细胞; 骨形态发生蛋白-2; 成骨分化; p38 MAPK信号通路

Effect of p38 MAPK Signaling Pathway on BMP-2-induced Osteogenic Differentiation of Human Dental Follicle Cells

Chen Xuepeng^{1*}, Shi Jiejun¹, Ye Qingsong², Cai Xia³, Zhang Tianhou^{4*}

(¹Department of Orthodontics, Stomatological Hospital Affiliated to Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China;

²Department of Orthodontics, School of Medicine and Dentistry, James Cook University, Cairns 4870, Australia;

³Department of Periodontology, Stomatological Hospital Affiliated to Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; ⁴Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital to Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

Abstract The aim of this paper is to study whether p38 MAPK signaling pathway is involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of human dental follicle cells (HDFO). hBMP-2 gene was cloned from human osteosarcoma cell line MG-63. The eukaryotic plasmid pcDNA3.1(+)-hBMP-2 was constructed by recombinant DNA technology and transduced into HDFO by liposome-mediated cellular delivery. After selection with G418, the resistant clones which can stably overexpress the exogenous BMP-2 were obtained. The expression levels of BMP-2

收稿日期: 2013-02-12 接受日期: 2013-03-25

国家自然科学基金(批准号: 81100752)、浙江省自然科学基金(批准号: LQ12H14001)、浙江省医药卫生一般研究计划(批准号: 2012KYA126)和浙江省中医药科学研究基金计划(批准号: 2012ZB101)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-87217222, E-mail: cyp1979@163.com; Tel: 0571-86458528, E-mail: fancyee@gmail.com

Received: February 12, 2013 Accepted: March 25, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81100752), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LQ12H14001), the Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Health Department (Grant No.2012KYA126) and Traditional Chinese Medicine Science Research Fund of Zhejiang Province (Grant No.2012ZB101)

*Corresponding author. Tel: +86-571-87217222, E-mail: cyp1979@163.com; Tel: +86-571-86458528, E-mail: fancyee@gmail.com

网络出版时间: 2013-05-23 09:32

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130523.0932.001.html>

mRNA and protein were determined by quantitative real-time RT-PCR and Western blot respectively. The effect of p38 MAPK specific inhibitor SB203580 on the expression of phospho-MAPKAP kinase-2 protein was examined. Finally, the effect of SB203580 on BMP-2-induced ALP activity and expression of osteogenesis-related genes were investigated. The results showed that HDFC which can stably overexpress the exogenous BMP-2 were obtained by gene recombination and transfection. SB203580 could significantly decrease the protein level of phospho-MAPKAP Kinase-2. Overexpression of BMP-2 could increase ALP activity and enhance the expression of osteogenesis-related genes such as *OSX*, *Runx2*, *OCN*, *BSP* and *OPN*. However, the effect of BMP-2-induced osteogenic differentiation was inhibited by SB203580. These findings suggest that p38 MAPK signaling pathway is involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of HDFC.

Key words dental follicle cell; bone morphogenetic protein-2; osteogenic differentiation; p38 MAPK signaling pathway

牙囊细胞是一种具有多向分化潜能的细胞,能在一定的时间和阶段向牙周膜成纤维细胞、成骨细胞、成牙骨质细胞分化,是目前在牙周组织工程研究中受到广泛关注的候选种子细胞之一^[1]。但牙囊细胞多向分化的机理目前尚不完全清楚。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)是已知的所有生长因子中骨形成作用最强的一种,具有诱导未分化的间充质干细胞向成骨细胞定向分化与增殖的能力^[2-3]。目前研究证实, BMP-2能促进牙囊细胞向成骨细胞/成牙骨质细胞分化^[4]。p38 MAPK为丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)的一重要亚型,并被证实与体内成骨细胞的分化有关^[5]。然而, p38 MAPK信号通路在BMP-2诱导人牙囊细胞成骨分化中的作用尚未见报道,本实验将对这一问题进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒 人成骨肉瘤细胞株MG-63(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心); pcDNA3.1(+)载体(美国Invitrogen公司); pGEM-T载体(美国Promega公司); pLEGFP-C1载体(美国Clontech公司)。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM培养液(美国Hyclone公司); 胎牛血清及胰蛋白酶(美国Gibco公司); LipofectamineTM 2000试剂盒、T4 DNA连接酶及Trizol(美国Invitrogen公司); 质粒小提试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒及DNA凝胶纯化试剂盒(德国Qiagen公司); 限制性内切酶及Premix Taq(SYBR)(日本TaKaRa公司); 小鼠抗人BMP-2单克隆抗体、辣

根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(美国Sigma公司); 兔抗人磷酸化MAPKAP激酶-2(MAPKAP kinase-2; MK-2)单克隆抗体、兔抗人osterix(OSX)多克隆抗体、小鼠抗人Runx2单克隆抗体、兔抗人骨钙素(osteocalcin, OCN)单克隆抗体、小鼠抗人骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)单克隆抗体、小鼠抗人骨桥蛋白(osteopontin, OPN)单克隆抗体及小鼠抗人 β -actin单克隆抗体(英国Abcam公司); SB203580(美国Calbiochem公司); 逆转录试剂盒(美国Promega公司); PCR试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司); BCA蛋白检测试剂盒(美国Pierce公司); EnzoLyteTM pNPP碱性磷酸酶试剂盒(美国AnaSpec公司); CO₂细胞培养箱(美国Forma Scientific公司); YJ-875型超净工作台(苏州净化设备厂); 倒置相差显微镜及照像系统(日本Olympus公司); 凝胶成像分析仪(英国Ultra-Violet Products Ltd); 核酸蛋白定量分析仪及Mastercycler梯度PCR仪(德国Eppendorf公司); PCR仪(美国M J Research公司); API PRISM 7300 Real-time PCR仪(美国Applied Biosystems公司); 酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 质粒构建

1.2.1 PCR扩增BMP-2基因序列 用Trizol从人成骨肉瘤细胞株MG-63中提取总RNA, 紫外分光光度计测定总RNA浓度和纯度。逆转录反应按照逆转录试剂盒说明书操作, 合成cDNA第一链, 然后以其为模板进行PCR反应。人BMP-2的引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。BMP-2上游引物: 5'-CCG GAA TTC ATG GTG GCC GGG ACC CGC TGT CTT CT-3', 下游引物: 5'-TTT AGC GGC CGC CTA GCG ACA CCC ACA ACC CTC CA-3'。在

PCR管中加入20 μL 反应体系,包括Premix-Taq 10 μL 、cDNA模板1 μL 、上下游引物各0.5 μL 、灭菌蒸馏水8 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,1个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s,30个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min,冷却至4 $^{\circ}\text{C}$ 。将PCR扩增产物以1%琼脂糖凝胶进行电泳,紫外灯下观察电泳结果并照相。

1.2.2 PCR产物的纯化回收 PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离,按DNA凝胶回收试剂盒说明书操作回收约1.2 Kb的目的片段。回收后按DNA纯化试剂盒说明书进行,纯化目的基因。

1.2.3 重组质粒pGEM-T-*hBMP-2*的构建 将回收纯化的PCR产物和pGEM-T载体片段等摩尔数混合,加入T4 DNA连接酶于16 $^{\circ}\text{C}$ 下连接反应,过夜,然后将连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。将转化菌于含100 mg/L氨苄青霉素的LB平板上37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育16 h,挑选20个白色单菌落扩大培养。采用质粒小提试剂盒提取质粒,经EcoR I和Not I双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,筛选阳性克隆。以阳性克隆DNA为模板进行PCR反应(引物同1.2.1中RT-PCR反应引物),PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳进一步验证重组质粒是否含有目的cDNA片段。将阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司作DNA测序。

1.2.4 真核表达载体pcDNA3.1(+)-*hBMP-2*的构建和测序 将经测序鉴定正确的pGEM-T-*BMP-2*质粒和pcDNA3.1(+)真核表达载体分别用EcoR I和Not I双酶切,回收纯化目的基因片段*BMP-2*和线性化的pcDNA3.1(+).用T4 DNA连接酶将二者连接后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。分别按照菌落PCR鉴定、酶切鉴定和测序鉴定来筛选阳性克隆。

1.3 人牙囊细胞的培养及基因转染

人牙囊组织的取材及本实验研究方案经浙江大学医学院附属口腔医院伦理委员会批准。人牙囊细胞的原代培养参照我们以前报道的方法进行^[6]。待原代培养的牙囊细胞生长至80%丰度时,用0.25%胰酶消化,1:2传代,通过差速传代法提纯牙囊细胞,大约传代2次即可纯化细胞。取生长状态良好的第4代人牙囊细胞用于基因转染。转染前一天,将处于对数生长期的细胞用胰酶消化后,将细胞浓度调整为 $3 \times 10^5/\text{mL}$,接种于6孔板,每孔2 mL。待细胞融合铺满板底80%左右时进行转染,转染按照LipofectamineTM 2000试剂盒说明书进行。转染后的细胞

采用400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418进行筛选,阳性克隆形成后继续扩增培养4周。以转染pLEGFP-C1空载体的牙囊细胞作为阳性对照。将转染*BMP-2*及*GFP*基因的牙囊细胞分别命名为HDFC-BMP2和HDFC-GFP,未转染的牙囊细胞命名为HDFC-C。

1.4 BMP-2目的基因和蛋白的检测

取生长状态良好的HDFC-BMP2、HDFC-GFP及HDFC-C细胞,接种到75 cm^2 培养瓶中,当细胞生长至80%丰度时,每个培养瓶换成12 mL无血清的DMEM培养液,继续孵育24 h后,采用quantitative real-time RT-PCR(qRT-PCR)和Western blot分别检测三组细胞*BMP-2*基因和蛋白的表达。

qRT-PCR参照我们以前报道的方法^[7]进行。简言之,提取细胞总RNA后,按照逆转录试剂盒说明书操作进行逆转录,完成cDNA第一链的合成。*BMP-2*及 β -actin的引物序列见表1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将引物浓度调整到20 $\mu\text{mol}/\text{L}$,采用温度梯度PCR,确定最适退火温度为58 $^{\circ}\text{C}$ 。上API PRISM 7300 real-time PCR仪,以 β -actin为内参照(管家基因),每个体系作3个复孔。20 μL 反应体系包括:cDNA 0.5 μL 、ROX Reference Dye(一种染料)0.4 μL 、Premix Taq(SYBR) 10 μL 、上下游引物各0.4 μL 、灭菌蒸馏水8.3 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min,1个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性60 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸60 s,45个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算*BMP-2*基因的相对表达量。

Western blot参照我们以前报道的方法^[7]进行,以*BMP-2*/ β -actin的灰度比值表示*BMP-2*蛋白的相对表达水平。

1.5 MK-2磷酸化蛋白表达水平检测

将HDFC-BMP2和HDFC-C细胞用胰酶消化后接种到75 cm^2 培养瓶中,当细胞生长至80%丰度时,将培养液换成12 mL无血清的DMEM培养液。2 h后将培养的细胞随机分成三组,分别为HDFC-C组(每个培养瓶加无血清的DMEM培养液12 mL)、HDFC-BMP2组(每个培养瓶加无血清的DMEM培养液12 mL)和HDFC-BMP2+SB203580组(每个培养瓶加含50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SB203580的无血清DMEM培养液12 mL)。每组6瓶,继续孵育24 h后终止培养。采用Western blot检测三组细胞MK-2磷酸化蛋白表达水平。

1.6 碱性磷酸酶活性的检测

将HDFC-BMP2和HDFC-C细胞用胰酶消化

表1 Quantitative Real-time RT-PCR引物序列	
Table 1 Primer sequences used for quantitative Real-time RT-PCR	
基因	引物序列(5'→3')
Gene	Primer sequence(5'→3')
BMP-2	Forward: ATG GAT TCG TGG TGG AAG TG
	Reverse: GTG GAG TTC AGA TGA TCA GC
OSX	Forward: CCC CAC CTC TTG CAA CCA
	Reverse: GGC TCC ACC ACT CCC TTC TAG
Runx2	Forward: GCA GCA CGC TAT TAA ATC CAA ATT
	Reverse: GGC ACG AAG GCT CAT CAT TC
OCN	Forward: CCT CAC ACT CCT CGC CCT ATT
	Reverse: CCC TCC TGC TTG GAC ACA AA
BSP	Forward: AAA CGA AGA AAG CGA AGC AGA A
	Reverse: GCT GCC GTT GCC GTT TT
OPN	Forward: GCC GAC CAA GGA AAA CTC ACT A
	Reverse: CAG AAC TTC CAG AAT CAG CCT GTT
β-actin	Forward: GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG
	Reverse: GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG

后,以每孔 2×10^3 细胞接种到96孔板上,每孔加含5% FBS的DMEM培养液100 μL。当细胞生长至70%丰度时,将培养液换成100 μL无血清的DMEM培养液。2 h后将培养的细胞随机分成三组: HDFC-C组(每孔加无血清的DMEM培养液100 μL)、HDFC-BMP2组(每孔加无血清的DMEM培养液100 μL)和HDFC-BMP2+SB203580组(每孔加含50 μmol/L SB203580的无血清DMEM培养液100 μL),分别在0, 24, 48, 72 h终止培养,每组各时间点均设10个复孔。

终止培养后,每小组取5孔,收集上清液按照BCA蛋白检测试剂盒说明进行细胞蛋白质含量的测定。选择560 nm波长测定各孔吸光度值。然后每小

组另取5孔,取上清液按照EnzoLyte™ pNPP碱性磷酸酶试剂盒要求操作,选择405 nm波长测定各孔吸光度值。碱性磷酸酶活性的计算按下面公式进行: $M=D_{405\text{ nm}}(405\text{ nm吸光度值})/D_{560\text{ nm}}(560\text{ nm吸光度值})$,碱性磷酸酶活性变化百分比=[(实验组的M值-对照组的M值)/对照组的M值] $\times 100^{[6]}$ 。计算时,以HDFC-C 0 h组作为对照组。

1.7 成骨相关基因(蛋白)的检测

细胞分组及预处理同1.5。采用qRT-PCR和Western blot分别检测3组细胞OSX、Runx2、OCN、BSP、OPN基因和蛋白的表达。qRT-PCR引物序列见表1。

1.8 统计学方法

所有实验均重复3次,定量实验结果的所有数据均以均数±标准差表示,采用统计软件包SPSS 16.0进行统计分析,各组之间差异的比较采用独立样本t检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 hBMP-2真核表达质粒的构建

2.1.1 RT-PCR扩增目的基因 以人成骨肉瘤细胞株MG-63总RNA为模板,RT-PCR扩增,其产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,在1.2 Kb左右有特异性扩增条带,大小与预期相符,提示扩增产物为BMP-2基因片段(图1A)。

2.1.2 重组质粒pGEM-T-hBMP-2的构建和酶切鉴定 重组质粒pGEM-T-hBMP-2经EcoR I和Not I双酶切后,1%琼脂糖凝胶电泳可见1.2 Kb的BMP-2条带和3.0 Kb的载体片段,酶切BMP-2条带与RT-PCR产物电泳带处于相同位置(图1B)。

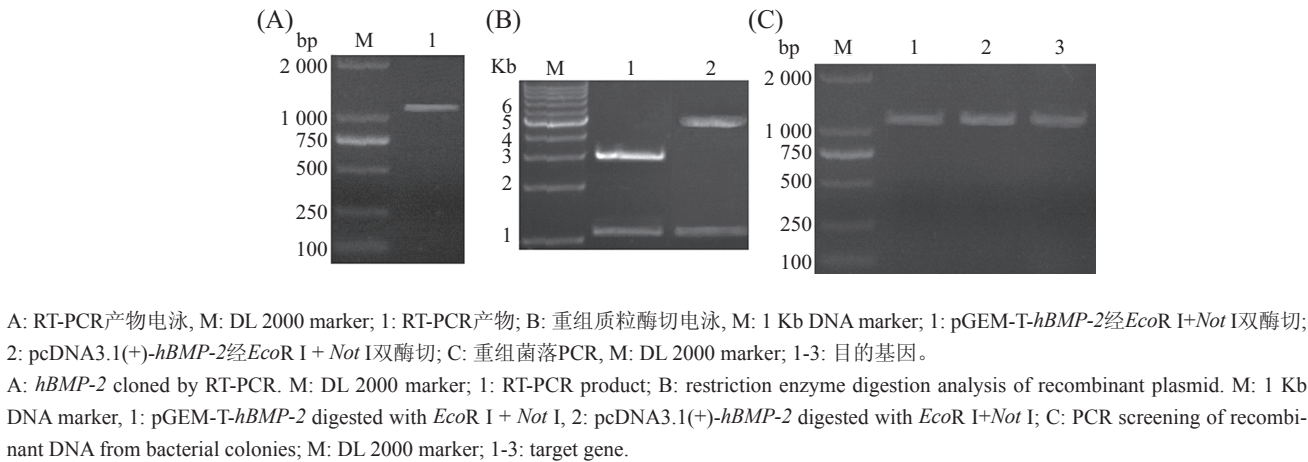
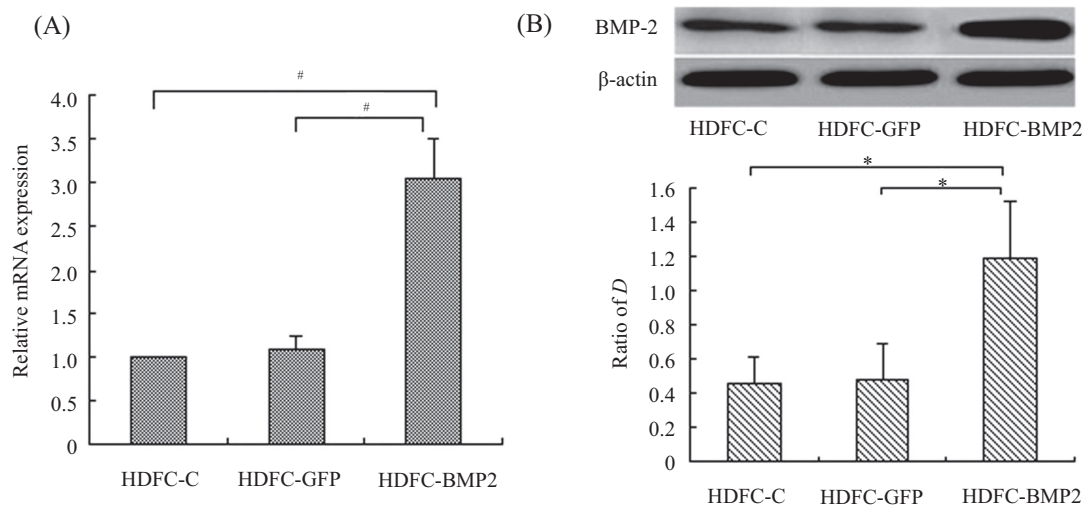


图1 人骨形态发生蛋白-2真核表达质粒的构建及鉴定

Fig.1 Construction and identification of human bone morphogenetic protein-2(hBMP-2) eukaryotic plasmid



A: 实时定量RT-PCR检测各处理组人牙囊细胞BMP-2转录水平, β -actin为内参, $^{\#}P<0.01$; B: Western blot检测各处理组人牙囊细胞BMP-2蛋白表达水平, β -actin为内参, $^*P<0.05$ 。

A: qRT-PCR analysis of *BMP-2* transcript levels in different HDFC groups, using β -actin as an internal control. $^{\#}P<0.01$; B: Western blot analysis of *BMP-2* protein levels in different HDFC groups, using β -actin as an internal control. $^*P<0.05$.

图2 各处理组人牙囊细胞BMP-2的表达

Fig.2 Expression of BMP-2 in different HDFC groups

2.1.3 真核表达载体pcDNA3.1(+)-*hBMP-2*的构建和酶切鉴定 菌落PCR结果可见1.2 Kb的*BMP-2*条带(图1C)。重组质粒pcDNA3.1(+)-*hBMP-2*经EcoR I和Not I双酶切后, 1%琼脂糖凝胶电泳可见1.2 Kb的

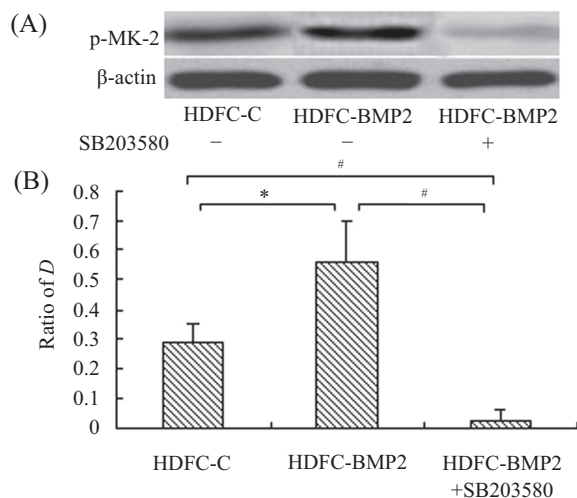
*BMP-2*条带和5.0 Kb的载体片段, 酶切*BMP-2*条带与RT-PCR产物电泳带处于相同位置(图1B), 重组质粒酶谱分析与预期一致。

2.2 BMP-2目的基因和蛋白的检测

如图2所示, HDFC-BMP2组BMP-2 mRNA及蛋白的表达水平均明显高于HDFC-GFP及HDFC-C组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 MK-2磷酸化蛋白表达水平检测

如图3所示, HDFC-BMP2组MK-2磷酸化蛋白表达水平明显高于HDFC-C组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。HDFC-BMP2+SB203580组MK-2磷酸化

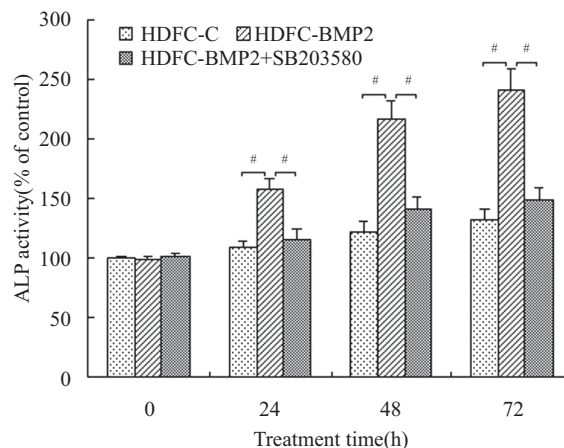


A: Western blot代表性电泳条带; B: 各处理组人牙囊细胞MK-2磷酸化蛋白相对表达量, 以 β -actin作为内参。 $^*P<0.05$, $^{\#}P<0.01$ 。

A: representative Western blot electrophoresis graph; B: relative densitometric analysis of phospho-MAPKAP kinase-2 (p-MK-2) protein in different HDFC groups, using β -actin as an internal control. $^*P<0.05$, $^{\#}P<0.01$.

图3 Western blot检测各处理组人牙囊细胞MK-2磷酸化蛋白表达水平

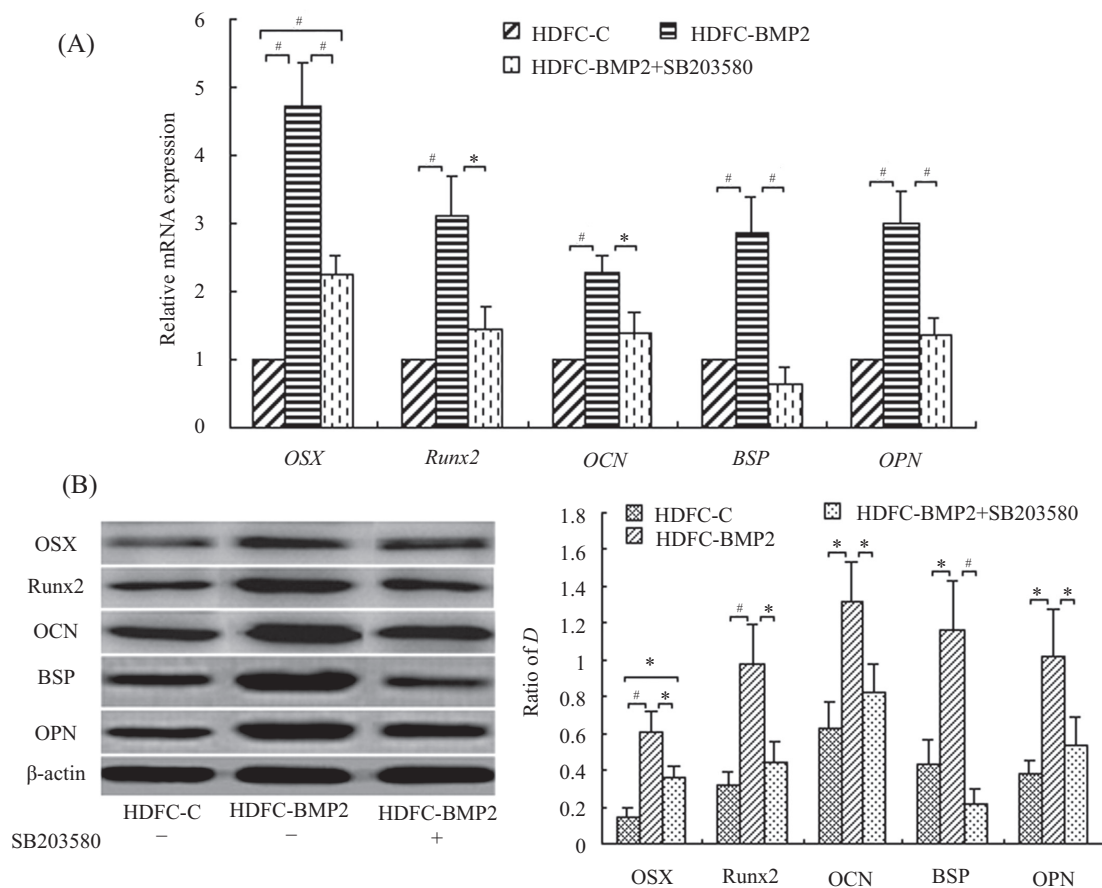
Fig.3 Western blot analysis of phospho-MAPKAP kinase-2 (p-MK-2) protein levels in different HDFC groups



$^{\#}P<0.01$.

图4 各处理组人牙囊细胞碱性磷酸酶活性的比较

Fig.4 Comparison of ALP activity in different HDFC groups



A: 实时定量RT-PCR检测各处理组人牙囊细胞成骨相关基因转录水平, β -actin为内参。* P <0.05, $^{\#}P$ <0.01; B: Western blot检测各处理组人牙囊细胞成骨相关基因的蛋白表达水平, β -actin为内参。* P <0.05, $^{\#}P$ <0.01。

A: qRT-PCR analysis of the transcript levels of different osteogenesis-related genes in different HDFC groups, using β -actin as an internal control. * P <0.05, $^{\#}P$ <0.01; B: Western blot analysis of the protein levels of different osteogenesis-related genes in different HDFC groups, using β -actin as an internal control. * P <0.05, $^{\#}P$ <0.01.

图5 各处理组人牙囊细胞成骨相关基因的表达

Fig.5 Expression of osteogenesis-related genes in different HDFC groups

蛋白表达水平明显低于HDFC-C组及HDFC-BMP2组, 差异有统计学意义(P <0.01)。

2.4 碱性磷酸酶活性的检测

如图4所示, 随时间延长, 各处理组牙囊细胞碱性磷酸酶活性均升高, 但在24~72 h, HDFC-BMP2组碱性磷酸酶活性明显高于相应的对照组(HDFC-C组及HDFC-BMP2+SB203580组)(P <0.01)。

2.5 成骨相关基因(蛋白)的检测

如图5所示, HDFC-BMP2组OSX、Runx2、OCN、BSP及OPN基因和蛋白的表达水平均明显高于HDFC-C组及HDFC-BMP2+SB203580组, 差异有统计学意义(P <0.05)。HDFC-BMP2+SB203580组OSX基因和蛋白的表达水平均高于HDFC-C组, 差异有统计学意义(P <0.05)。

3 讨论

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是一种多功能的生长因子, 能诱导成骨细胞和软骨细胞的分化成熟, 并能在体内诱导异位成骨, 是目前牙周组织工程研究的热点。其中, BMP-2是最主要的骨形成调控因子。在骨组织形成的过程中, BMP-2与骨形成蛋白受体BMPR结合, 通过细胞内信号转导, 活化下游转录因子, 使转录因子与相应的成骨细胞特异蛋白碱性磷酸酶、OCN、OPN等基因启动子连接, 促进细胞向成骨方向分化。研究表明, 将rhBMP-2作用于永生化的鼠牙囊细胞后, Runx2、OCN、BSP等基因表达增强, 诱导牙囊细胞向成骨细胞/成牙骨质细胞表型分化^[4]。但BMP-2诱导牙囊细胞成骨分化的机理尚不完全清楚。MAPK

信号通路是真核细胞介导细胞外信号到细胞内反应的重要信号转导系统,参与了细胞的增殖、分化、凋亡等多种生理过程^[8]。而在干细胞向成骨细胞表型分化过程中,p38 MAPK亚型起着重要的调控作用。研究表明,BMP-2可通过p38 MAPK信号通路,促进骨特异性转录因子Runx2的表达^[9]。牙囊细胞是一种具有多向分化潜能的细胞,具有干细胞的某些特性。最近的文献证实,BMP-9可通过p38 MAPK信号通路促进牙囊细胞向成骨细胞表型分化^[10]。我们推测p38 MAPK信号通路可能在BMP-2诱导牙囊细胞成骨分化过程中也发挥作用。

为了证实这一推测,本研究首先通过基因工程技术克隆并构建了pcDNA3.1(+)-*hBMP-2*真核表达载体,并通过基因转染将外源性BMP-2基因导入人牙囊细胞中。通过对BMP-2目的基因(蛋白)的检测证实,转染pcDNA3.1(+)-*hBMP-2*真核表达载体的人牙囊细胞能够在一定时期内稳定高表达BMP-2基因(蛋白)。在此基础上,将p38 MAPK信号抑制剂作用于转染BMP-2基因的人牙囊细胞以抑制p38 MAPK信号通路。SB203580是目前使用最为广泛的p38 MAPK信号抑制剂,它并不是通过抑制p38上游激酶的活性来发挥作用,而是通过直接占据p38 ATP结合位点,从而抑制下游底物MK-2的磷酸化及其功能发挥^[11]。本实验采用SB203580抑制p38 MAPK信号通路,Western blot结果显示,使用SB203580后MK-2磷酸化蛋白降至极低水平,表明p38 MAPK信号通路被有效抑制。

OSX、Runx2是成骨细胞分化和骨形成过程中所必需的两种骨特异性转录因子,与骨形成密切相关^[12]。本研究表明,转染BMP-2基因的人牙囊细胞OSX、Runx2基因和蛋白表达水平均较对照组明显增强,但使用SB203580后,BMP-2诱导的人牙囊细胞OSX、Runx2基因和蛋白表达水平较不使用SB203580的HDFC-BMP2组明显降低,说明p38 MAPK信号通路在BMP-2诱导人牙囊细胞OSX、Runx2表达中发挥作用。但研究结果还发现,HDFC-BMP2+SB203580组OSX、Runx2基因和蛋白的表达水平均高于对照组,尤其是OSX基因和蛋白的表达水平与对照组有显著性差异。由于本实验最后使用的是无血清的培养液,基本排除了其他细胞因子对实验结果的干扰。这表明可能还有其他信号通路在BMP-2诱导人牙囊细胞OSX、Runx2表达中发挥

作用。研究表明,BMP-2能通过smad信号通路调控OSX、Runx2表达^[9,13],这表明在BMP-2诱导人牙囊细胞OSX、Runx2表达中有多条信号转导机制在发挥作用。

碱性磷酸酶、OCN、BSP、OPN是研究成骨细胞等具有矿化功能的细胞分化的重要指标。本实验采用SB203580抑制p38 MAPK信号通路,观察BMP-2诱导人牙囊细胞碱性磷酸酶活性及OCN、BSP、OPN基因和蛋白表达水平的变化。结果表明,BMP-2能诱导人牙囊细胞碱性磷酸酶活性升高,增强OCN、BSP、OPN基因和蛋白的表达水平,但SB203580能抑制BMP-2的这种诱导作用。结合SB203580抑制BMP-2诱导OSX、Runx2表达这一结果,本研究表明,在BMP-2诱导人牙囊细胞成骨分化过程中,p38 MAPK信号通路是参与细胞内信号转导的途径之一。目前,研究证实牙囊细胞中含有三种异质性细胞亚群,其形态、增殖能力和矿化特征均不相同^[14-15]。我们还不清楚究竟是所有的牙囊细胞亚群在BMP-2作用下都能向成骨细胞的表型分化,还是只有部分特定的细胞亚群(将分化成为成骨细胞或成牙骨质细胞的牙囊细胞)有这种能力,这些尚有待于我们做进一步的研究。

参考文献 (References)

- 1 Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsceck C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci* 2010; 52(4): 541-52.
- 2 Rosen V. BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20(5/6): 475-80.
- 3 Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* 2006; 366(1): 51-7.
- 4 Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman MJ. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res* 2002; 17(8): 1441-51.
- 5 Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, Miura Y, Oiso Y, Bonjour JP, *et al.* Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone* 2002; 30(1): 91-8.
- 6 Chen XP, Qian H, Wu JJ, Ma XW, Gu ZX, Sun HY, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in cultured human dental follicle cells and its biological roles. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28(7): 985-93.
- 7 陈学鹏, 段银钟, 钱红, 金作林. PKC、PKA信号通路在调控体外培养人牙囊细胞VEGF表达中的作用. *中国细胞生物学学报*(Chen Xuepeng, Duan Yinzong, Qian Hong, Jin Zuolin. Effect of protein kinase C (PKC) and protein kinase A (PKA) signaling

- path-ways on the expression of VEGF in cultured human dental follicle cells. *Chinese Journal of Cell Biology* 2012; 34(5): 447-53.
- 8 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410(6824): 37-40.
- 9 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. *Oncogene* 2002; 21(47): 7156-63.
- 10 Li C, Yang X, He Y, Ye G, Li X, Zhang X, *et al.* Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner. *Int J Med Sci* 2012; 9(10): 862-71.
- 11 Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263(3): 825-31.
- 12 Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Wakabayashi M, Yoneda T. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J Biochem* 2012; 151(3): 247-54.
- 13 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.
- 14 Luan X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TG. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev* 2006; 15(4): 595-608.
- 15 Guo W, Chen L, Gong K, Ding B, Duan Y, Jin Y. Heterogeneous dental follicle cells and the regeneration of complex periodontal tissues. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(5/6): 459-70.