

# 间充质干细胞向成骨细胞分化的信号通路

曾芬芳 黄河\*

(浙江大学医学院附属第一医院骨髓移植中心, 杭州 310003)

**摘要** 间充质干细胞具有向成骨细胞分化的潜能,可体外分离、培养和扩增,是骨组织工程中理想的种子细胞。近年的研究表明间充质干细胞的成骨分化受到多种信号通路的调控,现就其中研究较为深入的 MAPK 和 Notch 通路的情况作一简要综述。

**关键词** 间充质干细胞;成骨细胞分化;信号通路

近几年,骨组织工程研究取得了巨大的进展。与其他组织工程一样,骨组织工程必须具备三要素:种子细胞、支架材料和生长分化因子。用间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为种子细胞的研究是该领域的热点之一。MSCs 属于成体干细胞(somatic stem cells),具有干细胞的共性:即有自我更新及多向分化能力。在不同诱导条件下,能够向成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、肌腱细胞、脂肪细胞及基质细胞等中胚层细胞分化<sup>[1]</sup>,同时 MSCs 还可以向外胚层的神经元细胞和内胚层的肝卵圆细胞分化<sup>[2]</sup>。因为 MSCs 具有成骨潜能、来源广泛、取材简便、体外培养要求条件不高、细胞增殖快、生长稳定、经多次传代成骨能力不减弱,以及由于 MSCs 属于未分化的干细胞、其细胞表型尚不成熟、自体或同种异体移植后排斥反应轻等,因此 MSCs 作为理想的骨组织工程种子细胞受到重视。然而目前对 MSCs 的研究多集中于其分化特性上,对其分化机制的研究还不够充分。

MSCs 向成骨细胞分化是个复杂的过程,涉及多种信号通路的调控,近几年研究得较为深入的是促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)及 Notch 通路。

## 1 MAPK通路

MAPK 属丝氨酸/苏氨酸激酶,是一类分布于胞浆中具有丝氨酸和酪氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶。MAPK 信号通路是细胞外信号引起细胞核内反应的通路之一。其基本的信号转导通路为:细胞外信号与膜上的受体结合后募集鸟核苷酸交换因子,使 GTP 与 GDP 之间进行交换,从而启动 MAPK 链,MAPK 转入核内,引发核内事件,从而引起生物效应<sup>[3]</sup>。

MAPK 途径通过保守的三级酶促级联反应(MAPKKK-MAPKK-MAPK)激活转录因子,调节特定的基因表达(图 1)。目前在真核细胞中已确定有 4 条 MAPK 信号转导通路:即细胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun N 端激酶(JNK, 又称 SAPK)、p38 和 ERK5 通路。近年研究表明 ERK、p38 和 JNK 通路参与了成骨细胞分化增殖的信号转导。

### 1.1 ERK 通路

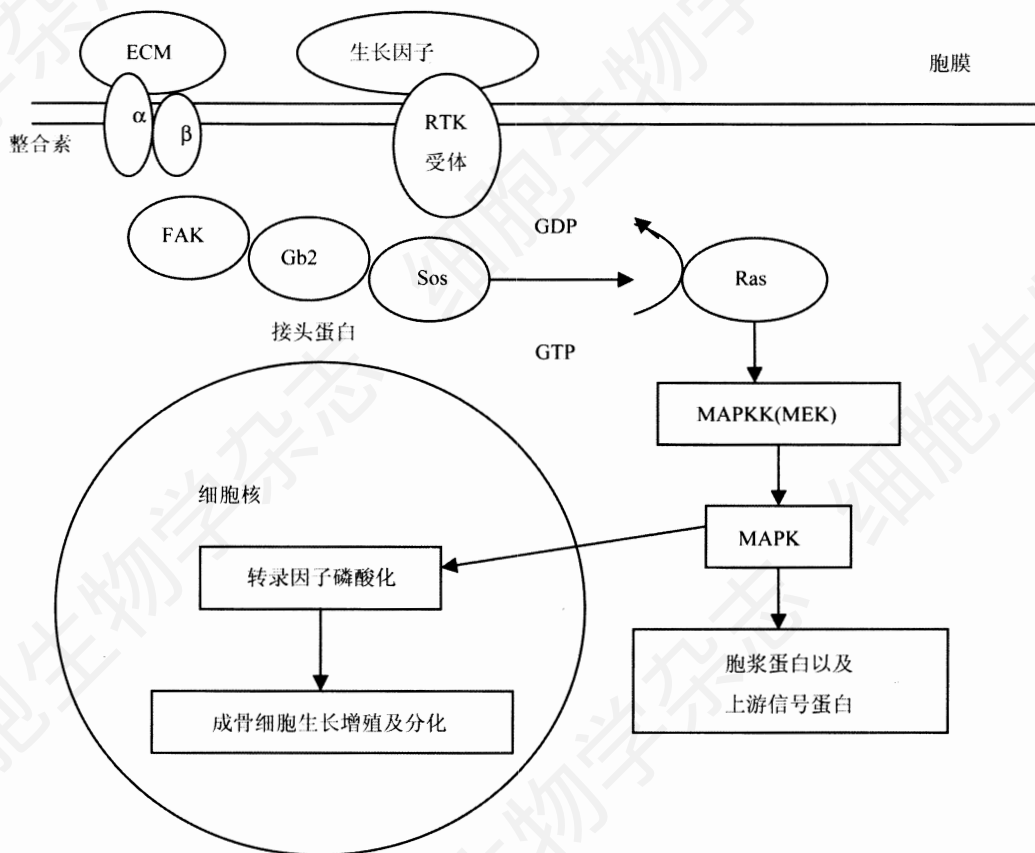
ERK 信号通路是目前研究最为彻底的 MAPK 通路,它是多数生长因子、细胞因子调控细胞增殖的重要途径。其在信号转导方面有以下特点:(1)活化的 ERK 通过转位方式进入细胞核,激活其下游底物,主要是一些编码核转录因子的早期反应基因表达,调控细胞生长反应,导致次级反应基因的异常表达,影响细胞的功能。(2)ERK 可将多个不同受体系统(如 G-蛋白偶联受体和蛋白酪氨酸激酶受体)介导的信号加以整合,起着多种信号交汇点或共同通路的作用。成骨细胞又称骨母细胞,常见于生长期的骨组织中,多聚集在新形成的骨质表面。它由骨内膜和骨外膜深层以及骨髓的骨祖细胞分化而成。在膜内成骨和软骨质内成骨中, MSCs 分化为成骨细胞,同时分泌胞外基质(ECM),随着 ECM 的钙化,成骨细胞被包埋在骨质中成为骨细胞。此过程中,ECM 与细胞(主要是成骨前体细胞)的接触及相互作用是激发 MAPK 途径,促使其进一步分化增殖及成熟的关键。ECM 与细胞表面整合素受体(主要是  $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_1\beta_1$ )结合,受体异源二聚化,并自身磷酸化,继而使黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)磷酸化并活化,然后募集鸟核苷

收稿日期: 2006-10-24 接受日期: 2006-12-26

浙江省科技厅重点科研项目资助(No.2003C23015)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-87236706, E-mail: hehuangyu@126.com

com

图1 成骨细胞 Ras-MAPK 信号转导途径<sup>[3]</sup>

酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF), 促使与 Ras 结合的 GDP 脱落而结合 GTP, 从而激活了 Ras。而当胞外信号为生长或分化因子时, 与胞膜上相对应受体结合, 引起受体酪氨酸蛋白激酶(RTK)二聚化并自身磷酸化, 继而通过 Sos 激发 Ras<sup>[4]</sup>。ERK 的上游激酶是 ERK1/2, 主要通过 Ras-Raf-ERK1/2 被激活。ERK 一旦激活, 就可以磷酸化 ELK-1, 促使其与即刻早期基因 c-fos 启动子的转录因子结合, 启动即刻早期基因的表达, 产物参与调节细胞生长、分化有关的基因表达。Salaszyk 等<sup>[5]</sup>发现 ECM 能驱动 MSCs 向成骨细胞分化, 并对其机制进行了深入的研究。他们发现加入  $\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  整合素阻滞抗体能抑制 ECM 诱导的 ERK 活性, 从而抑制成骨转录因子 runx2/cbfa-1 丝氨酸的磷酸化、成骨基因的表达及钙离子的沉积。这些结果证明了 ERK 对 ECM 诱导的 MSCs 的成骨分化有重要的驱动作用。Klees 等<sup>[6]</sup>的实验也得出了类似的结果。他们将 MSCs 种植在富含层黏连蛋白(ECM 的成员之一)的培养基上, 并观察 ERK 的磷酸化水平。结果 30 min 内种植在富含层黏连蛋白(Ln-5)培养基上的细胞 ERK1 及 ERK2 磷

酸化水平是对照组的 4~6 倍。8 天内磷酸化的成骨转录因子 Runx2/Cbfa 增加 3 倍, 16 天内成骨标记基因的表达水平上升, 21 天出现矿物质沉积, 这些都预示着成骨分化, 而添加阻滞 ERK 活性的 MEK1 抑制剂 PD98059 则可使上述各种作用均减弱。Salaszyk 等<sup>[7]</sup>的研究发现 ECM, 特别是层黏连蛋白(Ln-5)通过 ERK 相关的信号通路对 MSCs 的成骨分化起着有效的诱导作用。

## 1.2 p38 MAPK 通路

p38 信号途径是 MAPK 家族中的重要组成部分, 经外界刺激或应激而激活, 故又称为 MAPK 应激信号通路。近来的研究表明 p38 通路在 MSCs 的成骨分化中有非常重要的作用。Lampasso 等<sup>[8]</sup>的研究表明, 通过抑制 p38 MARK 通路, 可下调蛋白激酶 C(PKC) 的活性, 而 PKC 在细胞的成骨分化中发挥重要作用。Lee 等<sup>[9]</sup>则在实验中发现, 转化生长因子和骨形态发生蛋白(BMP)-2 可通过 p38 MAPK 通路诱导 Runx2/Cbfa1 转录表达。而 Runx2 是影响成骨活性的关键靶基因<sup>[10]</sup>。Cbfa1 则在转录水平定向调控 MSCs 分化为成骨细胞<sup>[11]</sup>。廖清船等<sup>[12]</sup>以维生素 C 和  $\beta$  磷酸甘油

为促成骨细胞分化剂,诱导小鼠的MSCs向成骨细胞分化,观察p38 MAPK通路在MSCs向成骨细胞分化过程的作用,用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印迹法反映MAPK的表达情况。结果与对照组相比,在促成骨细胞分化剂维生素C和 $\beta$ 磷酸甘油作用下, MSCs p38 MAPK通路提前5天激活。p38 MAPK通路的阻断剂(SB203580)则显著降低碱性磷酸酶(ALP)活性及钙盐沉积,抑制MSCs向成骨细胞的分化。这说明p38 MAPK通路可能与MSCs向成骨细胞分化调节有关。Celil等<sup>[13]</sup>的研究也支持p38通路对成骨分化中发挥了一定的作用。

### 1.3 JNK通路

JNK在转导胞外信号至核转录因子时起着重要作用,可以提高转录能力。JNK信号途径存在于多种生命过程中,如细胞生长、细胞分化和细胞死亡。目前对JNK通路的研究不多。Guicheux等<sup>[14]</sup>和Suzuki等<sup>[15]</sup>发现JNK能改变骨钙素的mRNA水平,BMP-2从转录水平活化JNK,从而诱导成骨细胞分化。Celil等<sup>[13]</sup>发现JNK和其他三条MAPK通路一起促进Osx的表达,从而促进成骨分化。

### 1.4 三条通路之间的关系

利用鼠颅骨源的成骨细胞系MC3T3-E1细胞研究发现,经过胎牛血清诱导,ERK可快速激活,而p38和JNK则大大延迟<sup>[16]</sup>。已有学者发现在内皮细胞中ERK介导激活JNK,但在MC3T3-E1细胞用MEK特异性抑制剂U0126时,ERK几乎完全抑制,对应的p38和JNK无影响,提示在成骨细胞系ERK与p38或JNK的激活无关。在成骨细胞中3种MAPK通路相对较独立,ERK通路在细胞发育的各期均可激活,增殖期尤为重要;p38通路在细胞开始分化时激活,调节ALP表达。p38通路和JNK通路常具有协同作用,它们与生长抑制信号和凋亡信号的转导有关。相反,ERK通路则是存活通路,即ERK级联反应介导的是抗凋亡作用。

### 1.5 MAPK通路的影响因素

一些生长因子[如BMP、转化生长因子(TGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、细胞因子、地塞米松甚至机械刺激均能影响MAPK通路对MSCs向成骨细胞分化的调节。Celil等<sup>[13]</sup>的研究发现BMP和IGF通过MAPK信号途径介导Osx在人类MSCs的表达,而Osx是新近发现的一个成骨细胞特异性转录因子,它能够促进MSCs分化为成骨

细胞,是成骨细胞分化,发育重要的调节因子<sup>[17,18]</sup>。BMP具有显著地诱导细胞向成骨细胞分化的作用,是启动MSCs中的成骨成分向成骨细胞分化的初始信号分子<sup>[19]</sup>。BMP不但可诱导细胞分化,还可维持分化向前发展。其作用机制为当BMP-2与细胞上的BMP-IB受体结合后,引起成骨特殊转录因子mRNA的表达,激活了成骨相关基因Osf2/Cbfa1、ALP及骨钙素(osteocalcin)mRNA的表达<sup>[20]</sup>。而TGF- $\beta$ 与IGF则共同促进成骨前体细胞向成骨细胞分化。多项研究表明这些生长因子经MAPK通路发挥其对MSCs向成骨分化的调节作用。Kanno等<sup>[21]</sup>发现TGF- $\beta$ 显著的诱导JNK磷酸化,在MSCs的成骨分化中起了重要作用。地塞米松也能促进成骨分化,刺激成骨细胞成熟。Phillips等<sup>[22]</sup>的研究发现地塞米松和成骨转录因子Runx2/Cbfa1协同刺激骨钙素表达,碱性磷酸酶活性和矿物沉积,这一过程通过上调MAPK磷酸酶-1的活性来完成。此外,力学因素也能影响MSCs的成骨分化能力<sup>[23]</sup>。其机制可能是应力作用激活了ERK1/2和p38活化MAPK通路,但对c-Jun的N端激酶磷酸化作用没有影响。应力诱导的基质钙化很大程度上由ERK1/2信号通路介导,当抑制ERK1/2则削弱了55%的钙盐沉积抑制p38通路导致了更成熟的成骨表型,说明在应力诱导成骨分化过程中p38信号起到了负调节作用。

### 1.6 MAPK通路在成骨过程中的介导效应

在成骨分化过程中MAPK激活了众多的靶蛋白,其中最重要的是转录因子复合物AP1和成骨细胞特异性转录因子Osf2/Cbfa1。AP1由Jun与Fos家族成员组成。研究表明,AP1在骨形成和成骨细胞分化中具有明确的作用:激活的骨形成细胞,表达高水平的c-fos和c-jun mRNA,AP1复合物还可以激发骨钙素的表达<sup>[24]</sup>。MAPK信号通路主要通过增加AP1的含量或直接刺激AP1的活性而影响其活化,从而介导成骨分化。Osf2/Cbfa1也是调节成骨分化重要的转录因子。Osf2/Cbfa1基因的表达受高度限制,仅在骨组织和成骨细胞中检测到<sup>[25]</sup>。体外实验已经证明MAPK可以导致Cbfa1磷酸化,从而促进成骨分化,而添加阻滞ERK活性的MEK1抑制剂PD98059则抑制成骨细胞特异性基因表达。这说明MAPK参与了对Osf2/Cbfa1的转录调节并在成骨细胞特异性基因表达中发挥重要作用。

## 2 Notch信号通路

Notch 基因编码一种膜蛋白受体, 它的配体也是膜蛋白, 在邻近细胞上表达. 当 Notch 与邻近细胞表面的配体相结合, 其胞内区(the intra-cellular domain of Notch, ICN)被切割, 从细胞膜上脱离, 转运进入细胞核并与 Notch 下游分子相互作用以传递 Notch 信号<sup>[26]</sup>. Notch 信号系统为一高度保守的转导机制系统, 其基本组成部分包括 Notch 分子、Notch 配体及细胞内效应器分子。Notch 配体有两类, Delta-like 与 Jagged, 其中第一类包括 Delta-like 1、3、4, 第二类包括 Jagged 1、2, 主要分布于骨髓基质细胞表面。Notch 配体与 Notch 分子结合后引起细胞内发生一系列信号转导反应, 最终使细胞定向分化或保持不分化状态。研究表明, 游离的 ICN 是 Notch 的活性形式, 通过载体介导将 ICN 转染细胞就可以在没有配体存在的条件下激活 Notch 信号, 为研究 Notch 信号的生物功能提供了方便。RT-PCR 检测到人骨髓来源的 MSCs 表达 Notch1, 其配体 Jagged1 及下游分子 DTX1, 表明 Notch 信号可能调节 MSCs 的增殖分化。但 Notch 信号途径是一个多步骤、多因素参与的信号转导过程, 在不同类型的细胞中有不同的生物学作用, 目前 Notch 对成骨细胞分化的调节作用尚存在争议。Tezuka 等<sup>[27]</sup>在实验中发现 Notch 不仅引起 MC3T3-E1 和 C3H10T1/2 等成骨细胞的成骨分化, 而且对 MSCs 的自发性及刺激后的成骨分化均有明显作用。他们以腺病毒为载体在 MSCs 上表达 EGFP-ICN, 感染 5 天后这些 MSCs 的 ALP 呈强阳性, 并形成特殊的结节, 成骨分化的早期标志物之一 I 型胶原质的表达也显著增强。鲁茁壮等<sup>[28]</sup>通过克隆 ICN 基因, 构建了携带 ICN 的逆转录病毒载体, 感染 MSCs 后用地塞米松诱导其向成骨细胞分化。转染 ICN 激活 Notch 信号的 MSCs 较对照细胞在分化过程中碱性磷酸酶活力升高, 钙盐的沉积增加, 表明 Notch 信号有促进 MSCs 向成骨细胞分化的作用。最近也有研究提到 Notch 的过度表达能抑制骨生成<sup>[29,30]</sup>。

### 3 小结

将骨髓间充质干细胞应用于骨组织工程中, 其成骨分化是重点。在 MSCs 向成骨细胞分化的过程中, MAPK 通路起了主要作用, 而 Notch 通路对之可能起

着协同作用。因为一些学者发现仅仅通过转染 ICN 激活 Notch 信号不足以诱导 MSCs 向成骨细胞分化, 还必须有诱导剂的存在, 它可能对其他信号起协同作用。Notch 信号如何与其他信号相联系? 其是否也影响 MSCs 向其他类型细胞分化? 这方面还需要进一步的研究。我们课题组在研究中发现骨髓增生异常综合征患者与正常人相比其 MSCs 向成骨细胞分化的能力更强, 其机制的研究可能有助于探讨骨髓增生异常综合征的发病机制。此外也有相关研究表明, MSCs 向成骨细胞分化还受到 Smad、NOS-NO 等多种途径的调控, 对其机制的深入研究有利于在体外诱导 MSCs 分化为成骨细胞, 以有助于骨组织工程学的发展。

### 参考文献 (References)

- [1] Devine SM *et al.* *Cancer J*, 2001, **7**: S76
- [2] Jiang Y *et al.* *Nature*, 2002, **418**: 41
- [3] Tang K *et al.* *Mol Pharmacol*, 1998, **54**: 59
- [4] King WG *et al.* *Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 4406
- [5] Salasnyk RM *et al.* *Cell Commun Adhes*, 2004, **11**: 137
- [6] Klees RF *et al.* *Mol Biol Cell*, 2005, **16**: 881
- [7] Salasnyk RM *et al.* *J Cell Biochem*, 2006, **100**: 499
- [8] Lampasso JD *et al.* *Int J Mol Med*, 2006, **17**: 1125
- [9] Lee KS *et al.* *Oncogene*, 2002, **21**: 7156
- [10] Salincarnboriboon R *et al.* *Endocrinology*, 2006, **147**: 2296
- [11] Xiao G *et al.* *J Biol Chem*, 2005, **280**: 30689
- [12] 廖清船等. *中国骨质疏松杂志*, 2004, **10**: 267
- [13] Celil AB *et al.* *J Biol Chem*, 2005, **280**: 31353
- [14] Guicheux J *et al.* *J Bone Miner Res*, 2003, **18**: 2060
- [15] Suzuki A *et al.* *J Bone Miner Res*, 2006, **21**: 674
- [16] Suzuki A *et al.* *Bone*, 2002, **30**: 91
- [17] Ohyama Y *et al.* *Endocrinology*, 2004, **145**: 4685
- [18] Cao Y *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**: 1124
- [19] Lane JM *et al.* *Clin Orthop Relat Res*, 1999, **361**: 216
- [20] Chen D *et al.* *J Cell Biol*, 1998, **142**: 295
- [21] Kanno Y *et al.* *Horm Metab Res*, 2005, **37**: 140
- [22] Phillips JE *et al.* *J Cell Sci*, 2006, **119**: 581
- [23] Jagodzinski M *et al.* *Eur Cells Mater*, 2004, **7**: 35
- [24] Oyama M *et al.* *Histol Histopathol*, 1998, **13**: 671
- [25] Harada H *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 6972
- [26] Martinez Arias A *et al.* *Curr Opin Genet Dev*, 2002, **12**: 524
- [27] Tezuka K *et al.* *J Bone Miner Res*, 2002, **17**: 231
- [28] 鲁茁壮等. *科学通报*, 2004, **49**: 554
- [29] 王胜朝等. *口腔医学研究*, 2005, **21**: 389
- [30] Deregowski V *et al.* *J Biol Chem*, 2006, **281**: 6203

## Signaling Pathways in Osteogenic Differentiation of the Mesenchymal Stem Cells

Fen-Fang Zeng, He Huang\*

(The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

**Abstract** Mesenchymal stem cells are multi-potent stem cells capable of differentiating into multiple cell types present in many different tissues, e.g. osteoblasts, chondroblasts, adipocytes, etc. Mesenchymal stem cells can be readily isolated and easily expanded. Therefore, it is thought to be a readily available source of cells for many tissue engineering especially in bone tissue engineering. The osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by many signaling pathways. Many signaling involved in osteoblastic cell differentiation have not yet been fully understood. This review describes the recent advances in mitogen-activated protein kinase and Notch pathways.

**Key words** mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; signaling pathways

Received: October 24, 2006 Accepted: December 26, 2006

This work was supported by the key Project of Science & Technology Department of Zhejiang Province (No.2003C23015)

\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-87236706, E-mail: hehuangyu@126.com