

PTH 通过 Notch 信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化

王维东,万博文,周灵杰,凡进,殷国勇*

(南京医科大学第一附属医院骨科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究内源性甲状旁腺激素(parathyroid hormone,PTH)是否通过 Notch 信号通路调控骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化。方法:取 8 周龄 PTH 野生型(PTH^{+/+})和 PTH 基因敲除型(PTH^{-/-})小鼠各 6 只,分离培养小鼠骨髓间充质干细胞并向成骨细胞诱导分化。分别在诱导后的 3、7、10、14 d,用 Western blot 方法检测 Notch 信号通路受体和配体的表达。在诱导后的 3、7 d,检测细胞中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性,用 Western blot 方法检测成骨指标 runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2,Runx2)、骨钙素(osteocalcin,OCN)的表达。结果:在野生型组和 PTH 基因敲除组的小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化过程中,Notch 信号通路的受体和配体以及各成骨指标上调。PTH 基因敲除组中 Notch 信号通路配体 Jagged1 和受体 Notch1 表达明显低于野生型组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。PTH 基因敲除组中各成骨指标 Runx2、OCN 蛋白表达和 ALP 活性均低于野生型组。结论:内源性 PTH 缺失可能通过下调 Notch 信号通路 Jagged1 配体和 Notch1 受体的表达来抑制骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化。

[关键词] PTH;Notch;骨髓间充质干细胞;成骨分化

[中图分类号] R336

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1517-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20151104

PTH induces differentiation of bone mesenchymal stem cells into osteoblasts through Notch signaling pathway

Wang Weidong, Wan Bowen, Zhou Lingjie, Fan Jing, Yin Guoyong*

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study whether parathyroid hormone regulates the differentiation of bone mesenchymal stem cells into osteoblasts through Notch signaling pathway. **Methods:** Six PTH^{+/+} and six PTH^{-/-} mice of 8-week-old were used in this study. Bone mesenchymal stem cells obtained from mouse femurs were isolated and cultured, then osteogenic differentiation was induced. Western blot was performed to detect the expression of Notch signaling pathway at day 3, 7, 10, 14. The alkaline phosphatase (ALP) activity was detected to evaluate the early osteogenic differentiation at day 3 and 7. Western blot was performed to detect the expression of Runx2 and OCN proteins. **Results:** The receptor and ligand of Notch signal pathway and the osteogenic index was increased in the wild type group and PTH gene knockout group after osteogenic differentiation. The expression of Jagged1 and Notch1 protein in PTH gene knockout group was significantly lower than that of the wild type group ($P < 0.01$). Compared with the wild type group, Runx2 and OCN protein levels were lower in PTH gene knockout group, with the same trends as ALP results. **Conclusion:** The deficiency of endogenous PTH inhibited the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts, by reducing the expression of Notch1 and Jagged1 proteins.

[Key words] PTH; Notch; bone mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1517-1521]

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种主要存在于骨髓中的多能干细

胞, 具有向其他细胞分化的潜能。在不同条件下, BMSCs 可以被诱导为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等^[1]。其中, BMSCs 向成骨细胞分化是骨折愈合和软骨内成骨的重要过程。因此, 对 BMSCs 分化机制的研究, 将有助于 BMSCs 在骨折愈合和骨生

[基金项目] 国家自然科学基金(81271988)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: guoyong_yin@sina.com

发中的临床应用。

甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)是一种由甲状旁腺分泌的多肽类激素,作为调节血钙的主要生理激素,PTH在骨形成中有重要作用。动物实验证实,PTH间歇性给药后骨痂成骨祖细胞增殖增加,碱性磷酸酶(alcaline phosphate, ALP)、runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2) 的 mRNA 表达和骨钙素(osteocalcin, OCN)的蛋白表达增加^[2],提示 PTH 可能通过促进 BMSCs 分化为成骨细胞来加速骨折愈合。

Notch 信号通路是一种广泛存在于细胞间的重要信号通路。Notch 信号通路作用广泛,在调节细胞增殖、分化、凋亡中都有重要作用,由一组分子组成,主要包括 Notch 信号通路受体分子、配体分子以及效应分子。在哺乳动物中,Notch 信号通路有 4 种受体,分别为 Notch1、2、3、4;5 种配体分别为 Jagged1、2 和 Delta 1、3、4^[3]。有研究表明,Notch 信号通路有促进 BMSCs 向成骨细胞分化的作用^[4]。但也有研究表明,Notch 信号通路能抑制某一成骨细胞的前体细胞向成骨细胞分化^[5]。体内实验显示,在骨折愈合的过程中,Notch 信号通路的受体和配体上调^[6]。

有实验证实,外源性给予 PTH(1-34)能够上调骨小梁和皮质骨中的 Notch 信号^[7]。然而内源性的 PTH 对 Notch 信号通路的影响尚未见报道。本研究通过 PTH 基因敲除小鼠的体外实验,探索内源性 PTH 和 Notch 信号通路对 BMSCs 向成骨细胞分化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

同窝 8 周龄 PTH 野生型 (PTH^{+/+}, WT) 和 PTH 基因敲除型 (PTH^{-/-}, KO) 小鼠各 6 只(从加拿大 McGill 大学引进,饲养于南京医科大学 SPF 级实验动物中心),雌雄不限。

α -MEM 培养基、胎牛血清、双抗(HyClone 公司,美国),维生素 C、 β -甘油磷酸钠、地塞米松(Sigma 公司,美国),抗小鼠 Notch1、Jagged1、OCN、Runx2 抗体、内参 β -actin 抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(Abcam 公司,美国),ALP 检测试剂盒、基因组 DNA 小量抽提试剂盒、RIPA 裂解液(杭州碧云天),PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本),发光液(Millipore 公司,美国)。

完全培养基配制: α -MEM 培养基加入 10% 的胎牛血清,双抗终浓度为 100 U/mL,维生素 C 终浓度

为 50 mg/L。

成骨细胞诱导液配制: α -MEM 培养基加入 10% 的胎牛血清,双抗终浓度为 100 U/mL,维生素 C 终浓度为 50 mg/L,地塞米松终浓度为 0.1 μ mol/L, β -甘油磷酸钠终浓度为 10 mmol/L。

1.2 方法

1.2.1 动物基因型的鉴定

剪取出生 10 d 左右小鼠尾巴,应用基因组 DNA 小量抽提试剂盒提取 DNA,通过 PCR 进行小鼠基因型鉴定。PTH 的正向引物序列 5'-GGTGTTCGCCAGGTTGTCATAA-3',反向引物序列 5'-AAGATGATGTCTGCAAACACCGTGG-3',Neo 基因的正向引物序列 5'-TCCAGACTGC CTTGGGAAAA-GCGC-3',反向引物序列为:5'-AAGATGATGTCTGCAAACACCGTGG-3'。所有引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,58 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共进行 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 骨髓间充质干细胞的分离和诱导培养

BMSCs 的分离:分别取 8 周龄 PTH^{-/-}和 PTH^{+/+}小鼠各 6 只,颈椎脱臼处死,浸入 75%酒精 5 min。在超净台内用眼科剪剥离小鼠后肢的皮肤,并将后肢分离,剔除肌肉,取股骨、胫骨。将注射器插入骨端,完全培养基冲洗骨髓腔,将骨髓细胞冲出,并反复吹打。将 5×10^7 个细胞种入 100 mm 的培养皿,加 10 mL 培养基,放入 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 饱和湿度的培养箱培养。每 3 d 换液,待生长到 80%~90%融合时,使用 2.5 g/L 胰酶和 0.02 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)于 37 $^{\circ}$ C 消化 3~5 min,根据显微镜下观察到的细胞皱缩程度终止消化,吹打混匀,1 000 r/min 离心 5 min,加入完全培养基按 1:2 传代继续培养,如此反复获得第 3 代 BMSCs。

BMSCs 的诱导培养:取第 3 代 BMSCs,待其生长到 80%~90%,更换完全培养基为成骨细胞诱导液。置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,每 3 d 换 1 次培养液,培养至预定时间点。

1.2.3 ALP 活性检测

分别在 BMSCs 向成骨细胞诱导分化的 3、7 d 后,吸去培养基,用 PBS 清洗 3 次。加入裂解液后,离心取上清,按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 茜素红染色

BMSCs 向成骨细胞诱导分化 21 d 后,吸去培养基,用 PBS 清洗 3 次。95%酒精固定 15 min,茜素红染色 5 min,蒸馏水冲洗,干燥,拍照。

1.2.5 Western blot 检测 Notch1、Jagged1、OCN、Runx2 的表达

分别在 BMSCs 向成骨细胞诱导分化的 3、7、10、14 d 后,吸去培养基,用 PBS 漂洗 3 次。加入蛋白裂解液,提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度。采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离。然后转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h。加入 Notch1、Jagged1、OCN、Runx2 抗体 4℃ 过夜。第 2 天,室温下 PBST 洗膜 3 次后加入山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次后用化学发光液进行曝光显影。

1.3 统计学方法

使用统计分析软件 SPSS20.0,结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,进行单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定结果

PCR 完成后行琼脂糖凝胶电泳,仅有 451 bp PTH 基因扩增产物条带为 PTH 野生型 (PTH^{+/+}),仅有 276 bp Neo 基因扩增产物条带为 PTH 纯合子 (PTH^{-/-}),2 条扩增产物均有的为 PTH 杂合子 (PTH^{+/-}) (图 1)。

2.2 BMSCs 向成骨细胞诱导过程中,Notch 信号通路受体和配体表达上调

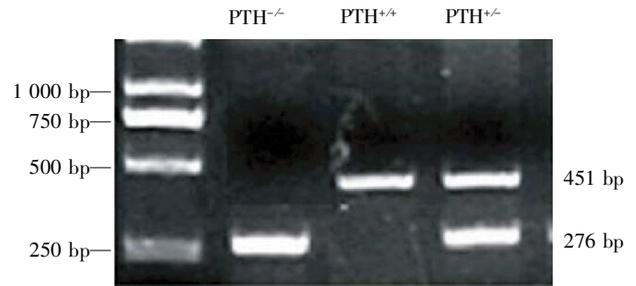


图 1 PTH 基因敲除小鼠基因型鉴定图

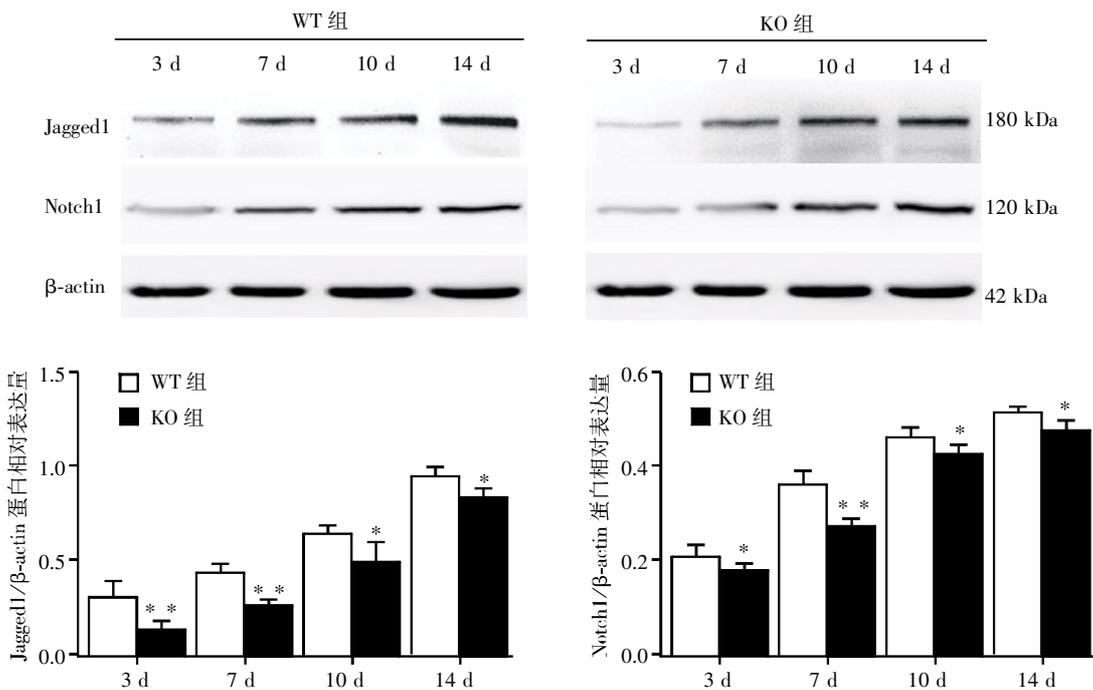
Figure 1 Identification of genotyped PTH of knockout mice

Western blot 显示(图 2),随着 BMSCs 向成骨细胞诱导分化,无论是 PTH 野生型组 (WT 组) 还是 PTH 基因敲除组 (KO 组) 中的 Notch 信号通路受体和配体的蛋白表达都呈递增趋势。在向成骨细胞诱导后的 3、7 d, Notch 信号通路的相关蛋白表达量上升较为明显,在诱导后 10、14 d,相关蛋白表达量增幅减小。

2.3 WT 组和 KO 组中 Notch 信号通路相关蛋白表达存在差异

Western blot 显示 (图 2), 在向成骨诱导后的 KO 组 BMSCs 各个时期, Notch 信号通路受体和配体表达均低于 WT 组 ($P < 0.05$)。

2.4 BMSCs 向成骨细胞诱导过程中,WT 组各成骨指标高于于 KO 组



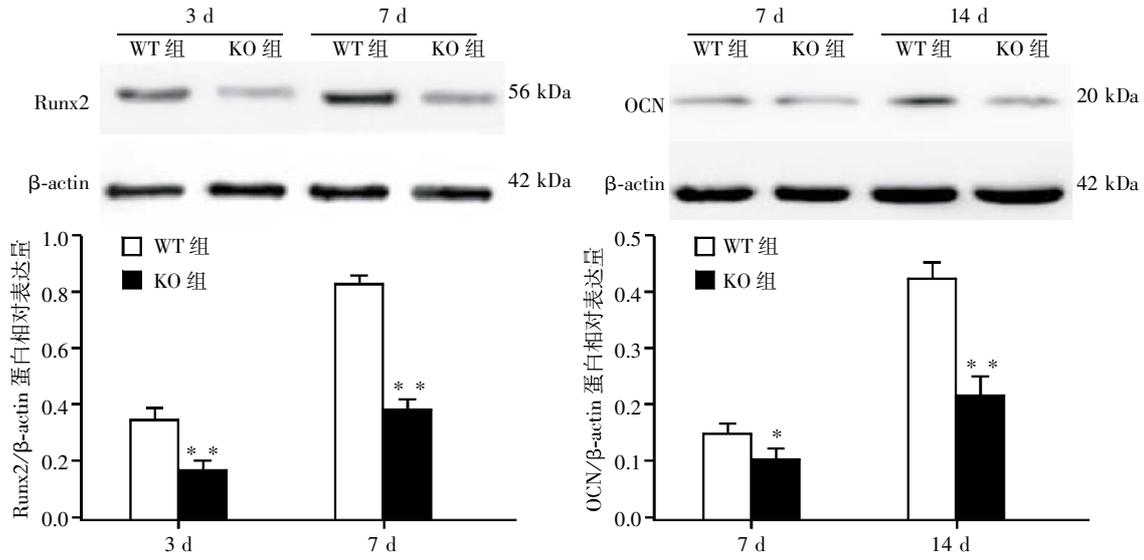
与 WT 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 2 Western blot 检测 Notch1、Jagged1 表达

Figure 2 Western blot analysis for the expression of Notch1 and Jagged1

Western blot 显示(图 3),在向成骨细胞诱导后的 3、7 d,WT 组和 KO 组中的 Runx2 表达量均上调,WT 组中的 Runx2 表达量高于 KO 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在向成骨细胞诱导后的 7、14 d,WT 组和 KO 组中的 OCN 表达量上调,WT 组中的 OCN 表达量高于 KO 组,差异具有统计

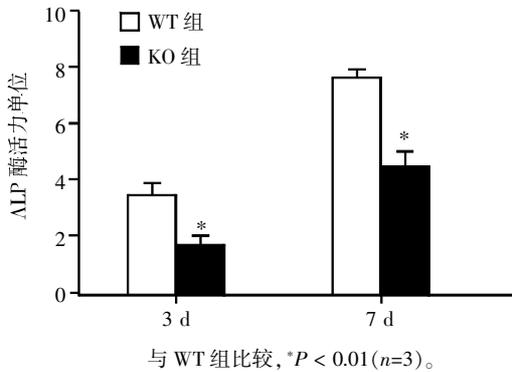
学意义($P < 0.05$)。ALP 活性显示,在向成骨细胞诱导后的 3、7 d,WT 组和 KO 组中的 ALP 活性升高,WT 组中的 ALP 活性高于 KO 组,差异具有统计学意义($P < 0.01$,图 4)。茜素红染色显示,WT 组诱导 21 d 后,钙结节形成更加明显,经茜素红染色后成红色结节。



与 WT 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 3 Western blot 检测 Runx2,OCN 表达

Figure 3 Western blot analysis for the expression of Runx2 and OCN



与 WT 组比较, * $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 4 BMSCs 向成骨细胞诱导培养 3、7 d 后 ALP 活性

Figure 4 The ALP activity of BMSCs in 3 d and 7 d after osteogenic differentiation

3 讨论

BMSCs 是一类重要的种子细胞,在骨的发生发展过程中起重要作用。因此,对其分化机制的研究,将有助于 BMSCs 在骨折愈合和骨生发中的临床应用。

PTH 是一种由 84 个氨基酸组成的多肽激素,在骨形成和分解中有重要作用。体外实验证实,间歇性给予 PTH(1-34)可以促进骨折愈合,减少骨折风险^[8-9],本课题组前期研究显示 PTH 基因敲除小

鼠骨折愈合缓慢^[10]。体内实验显示,外源性给予 PTH(1-34)也可促进 BMSCs 向成骨细胞的分化^[11]。

Notch 信号通路是一种广泛存在于细胞间的重要信号通路,在骨形成中也有重要作用。但对于 Notch 信号通路在骨形成中的作用,各家报道不一,McLarren 等^[12]发现,Notch 信号通路下游蛋白 Hes1 能和 Runx2 相互作用,促进成骨细胞特异性增强子的活化从而促进 BMSCs 向成骨细胞分化。而 Valerie 等^[13]发现,过表达 Notch1 信号抑制了成骨细胞分化。体外实验的结果不一可能和实验所选择的细胞不同以及 Notch 信号通路在骨形成各个阶段的作用不一致有关。

本实验通过诱导小鼠 BMSCs 向成骨细胞分化的过程发现,随着 BMSCs 向成骨细胞分化,Notch 信号通路的受体和配体上调,提示 Notch 信号通路可能在 BMSCs 向成骨细胞分化的过程中起积极作用。与 PTH 野生型小鼠相比,PTH 基因敲除小鼠 BMSCs 向成骨细胞分化不良,各成骨指标都明显低于 PTH 野生型组。提示内源性 PTH 缺失抑制了 BMSCs 向成骨细胞分化。

Runx2 是转录因子 Runx 家族成员之一,作为成骨细胞的特异转录因子,在成骨分化的早期调

控中起重要作用^[14]。OCN 则是成骨分化的一种晚期指标^[15]。在 PTH 基因敲除小鼠 BMSCs 向成骨细胞分化的过程中,Runx2 和 OCN 的表达都低于 PTH 野生型组。提示内源性 PTH 缺失在 BMSCs 向成骨细胞分化的全程中都起到了抑制作用。诱导 21 d 后,茜素红染色同样提示,PTH 基因敲除小鼠 BMSCs 向成骨细胞分化不良。

同时,本研究还用 Western blot 检测了两组细胞在成骨分化过程中 Notch 信号通路受体和配体的表达,结果显示在向成骨细胞分化的过程中,PTH 基因敲除组中 Notch 信号通路受体 Notch1 和配体 Jagged1 的表达均低于 PTH 野生型组,提示内源性 PTH 缺失可能通过抑制 Jagged1/Notch1 信号通路从而影响 BMSCs 向成骨细胞分化。

综上所述,Notch 信号通路可能在 BMSCs 向成骨细胞诱导分化中起积极作用。内源性 PTH 的缺失抑制了 BMSCs 向成骨细胞的分化。这种抑制可能是通过下调 Notch 信号通路的配体 Jagged1 和受体 Notch1 来实现的。

但本研究仍有一些不足之处,本研究是在体外探讨内源性 PTH 缺失对 Notch 信号通路的影响,但在体内内源性 PTH 缺失对 Notch 信号通路的影响可能更加复杂。PTH 通过与靶细胞膜上的 G 蛋白偶联受体结合后,激活 cAMP/PKA、NonPLC/PKC 和 PLC/PKC 等信号通路发挥作用^[16],究竟通过何种途径影响 Notch 信号通路,还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(1):3-17

[2] Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34) [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(11):2038-2047

[3] Shigeru C. Notch signaling in stem cell systems [J]. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2006, 24(11):2437-2447

[4] Michael S, Ina F, Leo G, et al. Differential expression of Notch genes in human osteoblastic cells [J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9(3):229-232

[5] Stefano Z, Anna SR, Lisa S, et al. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia [J]. *Endocrinology*,

2008, 149(8):3890-3899

[6] Dishowitz MI, Terkhorst SP, Bostic SA, et al. Notch signaling components are upregulated during both endochondral and intramembranous bone regeneration [J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(2):296-303

[7] Weber JM, Forsythe SR, Christianson CA, et al. Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged 1 in osteoblastic cells [J]. *Bone*, 2006, 39(3):485-493

[8] Satoshi K, Satoshi M, Tasuku M, et al. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates the fracture healing process of woven to lamellar bone replacement and new cortical shell formation in rat femora [J]. *Bone*, 2005, 36(4):678-687

[9] Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(19):1434-1441

[10] 胡兆兴, 王维东, 范军界, 等. 内源性甲状旁腺激素促进小鼠骨折愈合 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2014, 34(4):457-461

[11] Yu B, Zhao XL, Yang GZ, et al. Parathyroid hormone induces differentiation of mesenchymal stromal/stem cells by enhancing bone morphogenetic protein signaling [J]. *J Bone Mine Res*, 2012, 27 (9):2001-2014

[12] McLaren KW, Lo R, Grbavec D, et al. The mammalian basic helix loop helix protein HES-1 binds to and modulates the transactivating function of the runt - related factor Chfa 1 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(1):530-538

[13] Valerie D, Elisabetta G, Leah P, et al. Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/beta-catenin but not bone morphogenetic protein signaling [J]. *J Biol*, 2006, 281(10):6203-6210

[14] Liu JC, Lengner CJ, Gaur T, et al. Runx2 protein expression utilizes the Runx2 P1 promoter to establish osteoprogenitor cell number for normal bone formation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(34):30057-30070

[15] Peter KF, Christoph W, Elisabeth H, et al. GDF-5 and BMP-2 regulate bone cell differentiation by gene expression of MSX1, MSX2, Dlx5 and Runx2 and influence OCN gene expression *in vitro* [J]. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2012, 32(3):285-293

[16] Yang D, Guo J, Divieti P, et al. Parathyroid hormone activates PKC-delta and regulates osteoblastic differentiation via a PLC-independent pathway [J]. *Bone*, 2006, 8(4):485-496

[收稿日期] 2015-02-27