DOI:10.16016/j.1000-5404.201407116

论著

Notch1在BMP9诱导iMEF细胞成骨分化中的作用

杨伦韵,张晓艳,廉 静,曹俊杰,罗进勇,唐 敏 (400016 重庆,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)

[摘要] **目的** 研究Notch信号中Notch1受体在骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic proteins 9, BMP9)诱导的永生化小鼠胚胎成纤维细胞(immortalized mouse embryonic fibroblasts, iMEF)成骨分化中的作用。**方法** 利用Notch1受体显性负性突变体(dominant negative mutant, dnNotch1)处理iMEF细胞,首先分别采用细胞化学染色、活性测定和RT-PCR了解Notch1对早期成骨指标碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和晚期成骨指标骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OCN)的影响;其次用Western blot、荧光素酶和RT-PCR检测Notch1对BMP9经典信号通路中Smad1/5/8磷酸化和Smad结合元件(smad-binding element, SBE)活性影响;最后用结晶紫染色和流式细胞仪分析其对细胞增殖、周期及凋亡的影响。**结果** 与对照组相比,dnNotch1处理iMEF第3、5、7天后,ALP活性均降低($P<0.05$),并呈剂量依赖性,11 d时OPN和OCN表达量也下调($P<0.05$);BMP9经典通路中Smad1/5/8蛋白量没有明显变化,而p-Smad1/5/8蛋白及SBE活性受到了抑制($P<0.05$);结晶紫染色及流式细胞仪分析结果显示dnNotch1能够抑制BMP9诱导的iMEF早期细胞增殖,但对细胞凋亡无影响。**结论** dnNotch1竞争抑制Notch1信号,使BMP9诱导iMEF的成骨分化能力显著下降,其可能通过抑制BMP信号通路的活化和iMEF早期增殖两方面来实现。

[关键词] Notch1;骨髓间充质干细胞;永生化小鼠胚胎成纤维细胞;骨形态发生蛋白9
[中图法分类号] R322.71 R329.21;R329.26 [文献标志码] A

Role of Notch1 signaling in the process of BMP9-induced osteogenetic differentiation of immortalized mouse embryonic fibroblasts

Yang Lunyun, Zhang Xiaoyan, Lian Jing, Cao Junjie, Luo Jinyong, Tang Min (Key Laboratory of Medical Diagnostics of Ministry of Education, the College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of Notch1 in the osteogenic differentiation of immortalized mouse embryonic fibroblasts (iMEF) induced by bone morphogenetic proteins 9 (BMP9). **Methods** iMEF cells were treated with dominant negative mutant adenovirus AdRdnNotch1/dnNotch1 and BMP9. And the cells treated by the adenovirus vector containing red fluorescence protein (RFP) served as control. The early osteogenic index alkaline phosphatase (ALP) was observed by ALP staining and its activity was determined. While the late osteogenic indexes osteopontin (OPN) and osteocalcin (OCN) were measured with qRT-PCR. The protein expression of p-Smad1/5/8 and Smad binding element (SBE) activity were studied by Western blotting and luciferase detection. The effects of dnNotch1 on the cell proliferation, cycle and apoptosis were determined with crystal violet staining and flow cytometry. **Results** Compared with the control cells, the ALP activity was significantly decreased in 3, 5 and 7 d after the treatment of dnNotch1

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10004);重庆市教委科学技术研究项目(KJ130305)
[通信作者] 唐 敏,E-mail:catom@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1530.072.html(2014-12-02)

combined with BMP9 in a dose-dependent manner ($P<0.05$). On the 11th day, the expression of OPN and OCN was obviously decreased ($P<0.05$), but the level of Smad1/5/8 had no remarkable change though the protein level of p-Smad1/5/8 and the activity of SBE were inhibited significantly ($P<0.05$). Crystal violet staining and flow cytometric analysis indicated that dnNotch1 suppressed cell proliferation induced by BMP9 at the early stage, but had no effect on cell apoptosis. **Conclusion** dnNotch1 can competitively inhibit the Notch1 signal, and thus significantly decrease the osteogenesis induced by BMP9, which might be due to suppressing the activity of BMP signal pathway and the early proliferation of iMEF cells, suggesting that Notch1 may play a promoting role in BMP9-induced osteogenesis.

[**Key words**] Notch1; mesenchymal stem cells; immortalized mouse embryo fibroblast; bone morphogenetic proteins 9

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10004) and the Project of Science and Technology Research of Chongqing Commission of Education (KJ130305). Corresponding author: Tang Min, E-mail: catom@126.com

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种具有很强自我更新能力和多向分化潜能的干细胞,在一定的诱导条件下,其可向成骨、成肌、成脂等多种细胞分化[1-2],因此,在再生医学领域,MSCs一直被作为理想种子细胞用于多种组织的修复[3],也被用于骨质疏松、难治性骨折等骨科疾病治疗的研究。本课题组构建的永生化小鼠胚胎成纤维细胞(immortalized mouse embryonic fibroblasts, iMEF)具备MSCs特征,可用于体内外MSCs相关实验中[4]。BMP9在体外可以诱导MSCs向成骨分化,是目前已经分离并鉴定的20余种BMPs中诱导MSCs成骨分化能力最强的因子[5-6],但具体机制不清楚。Notch1是Notch信号通路受体之一,有研究表明其在MSCs成骨分化中发挥重要作用[7-10]。那么在BMP9诱导的MSCs成骨分化过程中,Notch1扮演什么样的角色呢?本研究探讨Notch1在BMP9诱导的iMEF细胞成骨分化中的作用,以期对MSCs成骨分化的研究提供更可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及腺病毒 永生化小鼠胚胎成纤维细胞(immortalized mouse embryonic fibroblasts, iMEF)、dnNotch 1、红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)、骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)、绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)均由芝加哥大学何通川惠赠并由本实验室保存、人结肠癌细胞株HCT116由重庆医科大学分子实验室保存。

1.1.2 主要试剂 DMEM及MEM高糖培养基(Hyclone公司),胎牛血清(Gibco公司),小牛血清(Hyclone公司),磷酸盐粉(中杉金桥公司),RNA提取试剂Trizol(Invitrogen公司),ALP染色试剂(Sigma公司),荧光素酶检测试剂(Promega公司),SYBR Green Ⅰ试剂(TaKaRa公司),引物(Invitrogen公司合成),Western及IP细胞裂解液(碧云天公司),牛血清粉BSA(Sigma公司),p-Smad1/5/8抗体(CST公司),Smad1/5/8抗体和β-actin单抗隆抗体(Santa Cruz公司),羊抗鼠、羊抗兔抗体(中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理 复苏iMEF细胞培养于含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素(P/S)、DMEM高糖培养基中。HCT116细胞培养于含10%小牛血清、1%(P/S),MEM/EBSS高糖培养基中。37 ℃、5% CO_2条件下培养。待细胞贴壁生长并融合至80%左右时,用适量胰蛋白酶进行消化传代。

1.2.2 ALP活性测定与染色 将iMEF细胞接种至24孔板,按2×10^4/孔,待细胞融合至30%左右时,加入RFP或dnNotch1后换液,待红色荧光出现后(约36 h),加入适当量的条件培养基,继续培养5 ~7 d进行ALP染色与ALP活性定量分析。ALP染色:吸引器吸去培养基,每孔200 ~500 μL ALP染色液,避光,10 ~30 min后观察染色。ALP活性定量分析:吸引器吸去培养基,加入1×细胞裂解液100 μL/孔,静置5 min。刮下细胞裂解物并收集至EP管,离心(13 000 r/min, 5 min)。另一EP管中加入ALP底物与Lupo Buffer混合液(1∶3)20 μL。吸取5 μL裂解上清至上述EP管内,混匀,避光静置45 ~60 min后上机检测。

1.2.3 SBE荧光素酶检测 将iMEF细胞接种至T25中,待细胞融合至50%左右时,利用脂质体2000将SBE质粒转染入细胞内,37 ℃、5% CO_2培养过夜,铺24孔板,同时加入dnNotch1和BMP9,感染率均约50%,8 h后换液,36 h后检测SBE荧光素酶活性。

1.2.4 PCR检测 培养iMEF至一定时间收集细胞,用TRIzol试剂提取细胞总RNA,通过琼脂电泳验

证mRNA的质量并进行定量,取1 μg RNA逆转录为cDNA,并将cDNA置于-20 ℃保存以普通PCR和实时荧光定量PCR备用。RT-PCR:20μL体系,反应条件,95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,26~30个循环;72 ℃ 10 min。2%琼脂糖凝胶跑电泳,凝胶成像,引物见表1。qRT-PCR:10 μL体系,反应条件,预变性94 ℃ 2 min; 92 ℃ 20 s;68 ℃ 30 s; 72 ℃ 20 s,延伸末尾采集荧光,40个循环;融解曲线荧光采集(65~99 ℃)。

表1 引物信息

引物	引物序列	产物长度(bp)
Notch1	上游 5′-CCTGCCACTATGGTTCCTGT-3′ 下游 5′-CCCTTGAGGCATAAGCAGAG-3′	175
Notch2	上游 5′-CCTGAACGGGCAGTACATTT-3′ 下游 5′-GCGTAGCCCTTCAGACACTC-3′	165
Notch3	上游 5′-CTCAACTCCAGGCTCACCTC-3′ 下游 5′-GGCTGAGCCAAGAGAACAAC-3′	165
Notch4	上游 5′-AATGGGGGTACCTGTGTGAA-3′ 下游 5′-GTATAGCCAGGGCTGCAGAG-3′	179
dnRNotch1	上游 5′-GCAGAACAACAAGGAGGAGACT-3′ 下游 5′-GAGGTCCTTAGCTTCCTTGCTAC-3′	361
Hey 1	上游 5′-GGCCTGCTTGGCTTTTCT-3′ 下游 5′-CCAAGTGCAGGCAAGGTC-3′	120
OPN	上游 5′-ACACTTTCACTCCAATCGTCC-3′ 下游 5′-TGCCCTTTCCGTTGTTGTCC-3′	240
OCN	上游 5′-TCTGACAAAGCCTTCATGTCC-3′ 下游 5′-AAATAGTGATACCGTAGATGG-3′	199
Runx2	上游 5′-GGTGAAACTCTTGCCTCGTC-3′ 下游 5′-AGTCCCAACTTCCTGTGCT-3′	243
Colla Ⅰ	上游 5′-CGGCTCCTGCTCCTCTTA-3′ 下游 5′-TTCATTGCATTGCACGTCAT-3′	183
Id 1	上游 5′-ACGACATGAACGGCTGCT-3′ 下游 5′-CAGCTGCAGGTCCCTGAT-3′	122
Id 2	上游 5′-CAGCATCCCCCAGAACAA-3′ 下游 5′-TCTGGTGATGCAGGCTGA-3′	122
Id 3	上游 5′-CTACGAGCGGTGTGCTG-3′ 下游 5′-GCGCGAGTAGCAGTGGTT-3′	120
GAPDH	上游 5′-GGCTGCCCAGAACATCAT-3′ 下游 5′-ATGATGTTCTGGGCAGCC-3′	180

1.2.5 结晶紫染色 细胞培养待汇合至50%左右时,加入RFP和dnNotch1,感染36 h后加入GFP或BMP9条件培养基,诱导培养3 d后行结晶紫染色,吸去24孔板内培养基,PBS洗2~3遍,加入10%甲醇(400 μL/孔),固定5 min,加入0.05%结晶紫溶液(400 μL/孔),染色2~5 min后观察染色情况,吸去染色液终止反应,加入ddH_2O洗1遍,扫描成像。

1.2.6 Western blot检测 iMEF细胞培养待细胞融合至70%左右时加入dnNotch或RFP,病毒持续感染36 h后加入BMP9条件培养基,诱导1 h后提取总蛋白。用冰PBS洗涤细胞3次,并将残余液体吸净,加0.2 mL细胞裂解液,置于冰上5 min;用橡皮刮刮下细胞,移入离心管;4 ℃ 13 000 r/min离心20 min,取上清至另一个EP管中,并加入50 μL的5×蛋白上样缓冲液,最后沸水浴5~10 min,分装后-20℃保存备用。配制浓缩胶和分离胶,100 V恒压电压下SDS-PAGE凝胶电泳,200 mA恒流电流转膜,依次加一抗和二抗孵育、洗膜,化学法发光底物进行显影。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期、细胞凋亡 细胞周期检测:吸去培养基,用胰酶将细胞消化下来,用冰1×PBS洗涤细胞3次,离心沉淀细胞,弃上清,用70%预冷的乙醇重悬,4 ℃存储过夜,上机检测。细胞凋亡检测:吸去培养基,用胰酶将细胞消化下来,用冰1×PBS洗涤细胞3次,离心沉淀细胞,弃上清,上机检测。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,实验独立重复3次,数据以$\bar{x} \pm s$表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用t检验,检验水准$\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 dnNotch1能够竞争抑制Notch1信号通路

采用qRT-PCR检测iMEF内Notch受体内源性表达情况,结果显示:Notch各受体表达并不一致,其中Notch1在4种Notch受体中表达最多,而Notch4几乎不表达(图1)。用dnNotch1/RFP感染iMEF细胞,培养48 h后RT-PCR检测dnNotch1,结果显示:dnNotch1作用下,dnNotch1表达显著增加(图2、3);qRT-PCR检测Notch信号通路靶基因Hey1,结果显示:处理组Hey 1的表达较空白对照组显著下调(0.75±0.08 *vs* 1.40±0.23,$P<0.05$)。

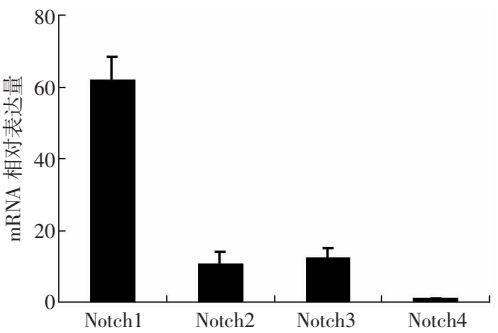


图1 qRT-PCR检测iMEF细胞内源性Notch受体表达

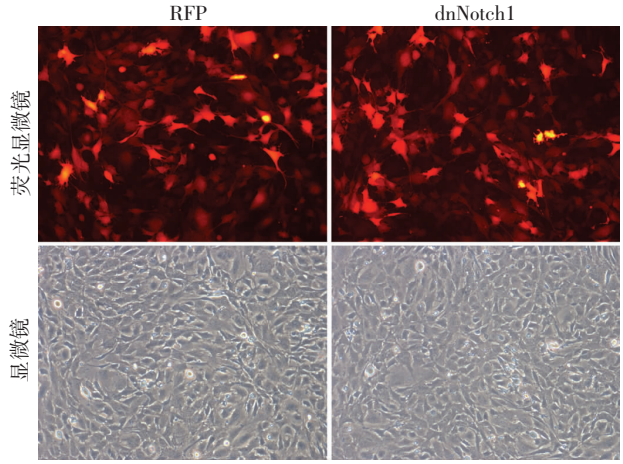
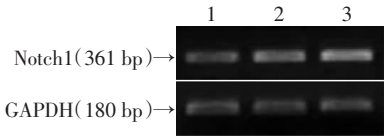


图2 腺病毒 RFP 和 dnNotch1 的感染效率 （×100）

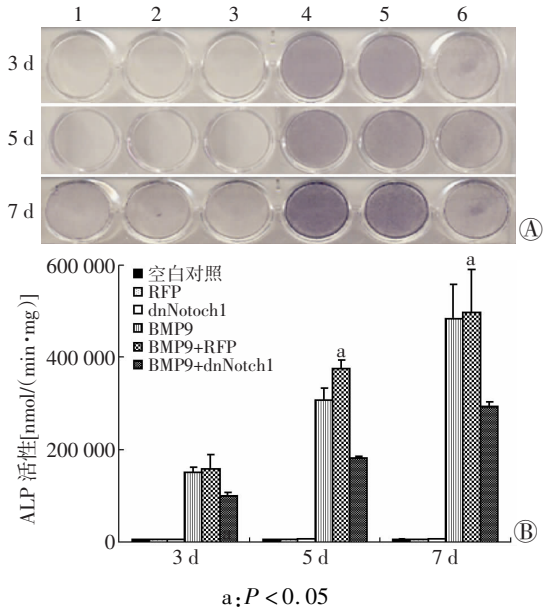


1:空白对照;2:RFP;3:dnNotch1

图3 RT-PCR 检测腺病毒 dnNotch1 处理后 iMEF 细胞内 Notch1（胞外段）的表达

2.2 下调 Notch1 信号通路活性后可抑制 BMP9 诱导的 iMEF 细胞早晚期成骨分化

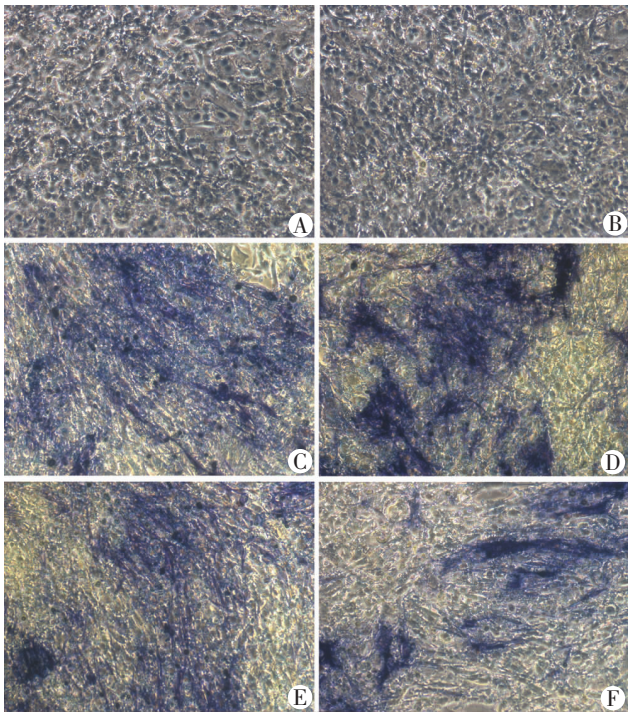
用腺病毒 RFP 或 dnNotch1 感染 iMEF 细胞，感染效率约50%，待红色荧光表达后加入 GFP 或 BMP9 条件培养基，诱导分化3、5、7 d 后检测 ALP 活性及染色变化。结果显示：dnNotch1 能降低 BMP9 诱导的早期成骨指标 ALP 活性（图4），且呈剂量依赖性（图5）；同时降低晚期成骨指标 OCN、OPN 的表达（图6）。

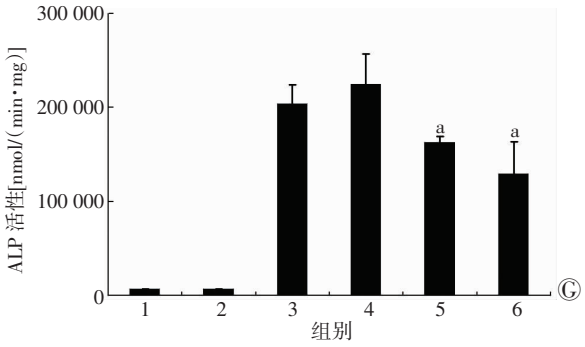


a:$P<0.05$

1:空白对照；2:RFP;3:dnNotch1;4:BMP9；5:BMP9 + RFP;6:BMP9 + dnNotch1;a:$P<0.05$，与 BMP9 + dnNotch1 比较

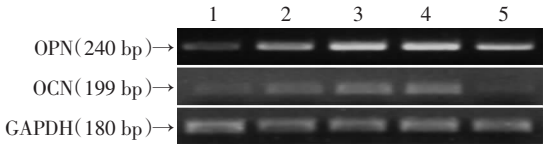
图4 各组3、5、7 d ALP 染色观察（A）及活性分析（B）





A:空白对照；B:dnNotch1;C:BMP9；D:BMP9 + dnNotch1（L）;E:BMP9 + dnNotch1（M）;F:BMP9 + dnNotch1（H） dnNotch1低（L）、中（M）、高（H）滴度分别为0.1、0.5、1.0 μL;A～F:ALP染色（×100）;G:ALP 活性分析 1～6:分别为空白对照、dnNotch1、BMP9、BMP9 + dnNotch1（L）、BMP9 + dnNotch1（M）、BMP9 + dnNotch1（H）;a:$P<0.05$，与 BMP9 比较

图5 不同滴度 dnNotch1 处理后第5天 ALP 染色活性检测



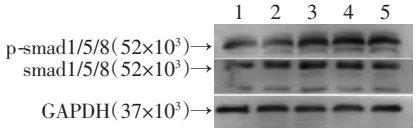
1:空白对照；2:dnNotch1；3:BMP9；4:BMP9 + RFP；5:BMP9 + dnNotch1

图6 RT-PCR 检测各组细胞处理后第9天 OPN 和 OCN 表达

2.3 dnNotch1 对 BMP9 诱导的 iMEF 成骨分化过程中经典信号通路的影响

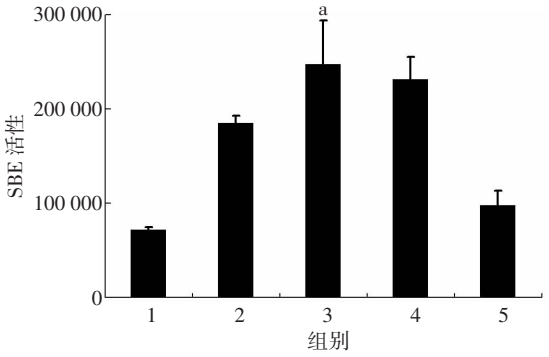
Western blot 检测结果显示：BMP9 能够上调 p-Smad1/5/8 的蛋白水平，加入 dnNotch1 后，抑制了

BMP9 诱导的 p-Smad1/5/8 的蛋白水平(图 7)。同时,BMP9 能够增加 SBE 荧光素酶活性,加入 dnNotch1 后,抑制了 BMP9 诱导的 SBE 荧光素酶活性(图 8)。上述结果提示:阻断 Notch1 信号通路后可一定程度上削弱 BMP9 对 BMP 信号的激活作用。同时,PT-PCR 结果发现,BMP9 能够上调 Runx2 和 Id1 成骨相关靶基因,而 dnNotch1 抑制了这一上调作用,但对 Id2 和 Id3 影响并不明显(图 9)。



1:空白对照; 2:BMP9 + dnNotch1; 3:BMP9 + RFP; 4:BMP9; 5:dnNotch1

图 7 Western blot 检测不同处理组 BMP 通路 smad1/5/8 改变



1:空白对照; 2:BMP9 + dnNotch1; 3:BMP9 + RFP; 4:BMP9; 5:dnNotch1; a:$P<0.05$,与 BMP9 + dnNotch1 比较

图 8 荧光素酶检测不同处理组 SBE 活性改变

2.4 dnNotch1 对 BMP9 诱导的间充干细胞增殖、周期、凋亡的影响

结晶紫染色结果显示,诱导培养 3 d 后,BMP9 + RFP 组细胞总数多于 BMP9 + dnNotch1 组,说明 dnNotch1 一定程度上能够抑制了 BMP9 诱导的促 iMEF 细胞增殖作用(图 10)。流式细胞仪检测 dnNotch1 对 BMP9 作用下 MEF 细胞周期(图 11)及凋亡(图 12),结果显示:GFP + dnNotch1 组、GFP + RFP 组、BMP9 + dnNotch1 组、BMP9 + RFP 组的增殖指数($S+G_2$)分别为 47.86%、48.32%、55.31%、66.82%,提示 BMP9 在早期具有一定的促 MSCs 增殖的作用,而 dnNotch1 可以抑制该作用,结晶紫染色得到相似结果;另一方面,dnNotch1 对 BMP9 作用下的细胞凋亡并没有显著影响。

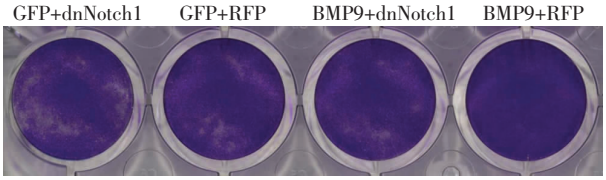
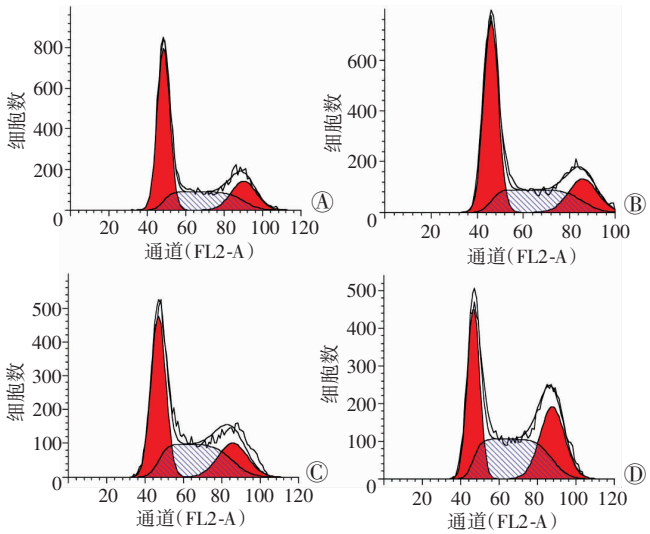
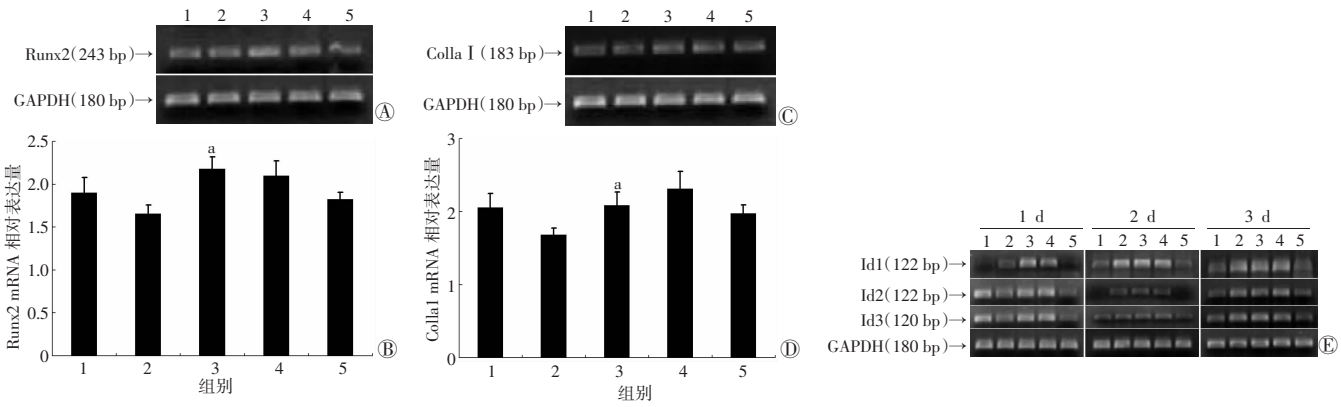


图 10 结晶紫染色观察不同处理对 iMEF 增殖的影响



A: GFP + dnNotch1; B: GFP + RFP; C: BMP9 + dnNotch1; D: BMP9 + RFP

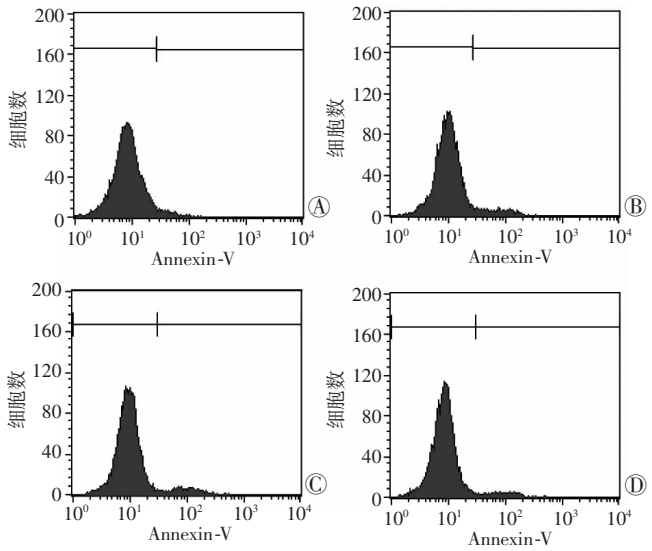
图 11 流式细胞仪检测不同处理对 iMEF 周期的影响



1:空白对照; 2:BMP9 + dnNotch1; 3:BMP9 + RFP; 4:BMP9; 5:dnNotch1; a:$P<0.05$,与 BMP9 + dnNotch1 比较

A、B:Runx2 基因;C、D:Colla Ⅰ基因;E:Id1、2、3 基因

图 9 不同处理组 Runx2 基因、Colla Ⅰ基因和 Id1、2、3 基因表达



A：GFP + dnNotch1；B：GFP + RFP；C：BMP9 + dnNotch1；D：BMP9 + RFP

图12 流式细胞仪检测不同处理对iMEF凋亡的影响

3 讨论

MSCs是一种来源于骨髓基质具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞。因其具有取材方便，易于分离培养等优点，在细胞替代治疗、基因治疗以及组织器官再造中具有重要的临床应用价值[11-12]。Notch信号是细胞与细胞之间直接作用的主要信号通路之一，与多种肿瘤的发生、发展密切相关，对多种细胞命运起决定性作用[13]。Notch1是Notch受体之一，属于Ⅰ型跨膜蛋白，由胞内区、跨膜区和胞外区组成[14]。研究发现，Notch1在MSCs的多向分化中发挥重要作用[15]；Hiltion等[16]研究表明显示Notch1有抑制MSCs成骨分化的作用；而Jung等[17]发现蚕丝蛋白通过抑制Notch1和其下游靶基因的表达促进MSCs成骨分化，从而促进骨折愈合；Xu等[8]证明，在缺氧的状态下，MSCs内Notch信号通路活性和Notch1表达水平增加，但MSCs的成骨分化能力减弱，而抑制Notch1的活性可以恢复缺氧条件下MSCs向成骨分化的潜能。

本课题在证实dnNotch1能竞争性抑制iMEF细胞内源性Notch1表达，降低Notch信号通路活性的基础上，进一步发现dnNotch1能导致BMP9诱导iMEF早晚期成骨分化能力减弱，提示Notch1具有促进BMP9诱导MSCs成骨分化作用，与我们前期研究[18]结果相一致；但与文献[16-19]提出Notch1抑制MSCs成骨分化观点不一致。导致造成此种差异的原因可能有：①研究所用细胞系的不同、同一细胞系分化阶段和动物背景的不同；②诱导MSCs成骨分化条件不同，有的是用BMP2诱导，而本实验是用BMP9诱导；③使用的载体系统不同，有的是逆转录病毒，有的是腺病毒；④构建载体所用启动子变异，有研究发现，当NICD cDNA置于长度是2.3 kb的Colla Ⅰ启动子时，转基因鼠呈现高骨量的表型[20]；而当NICD cDNA置于长度是3.6 kb的Colla Ⅰ启动子时，转基因鼠呈现低骨量的表型，而患上骨质疏松症[21]；⑤体内外环境的差异，体内环境较体外环境更复杂，除Notch1信号外，还有其他多种信号通路和分子参与MSCs向成骨分化的调控，如BMP、Wnt、Hedgehog和MAPK等信号通路[22]，而且多条信号通路间存在交互串话，共同调节着MSCs的成骨分化。

综上所述，本研究证实dnNotch1抑制BMP9诱导iMEF向成骨分化，支持Notch信号通路促进BMP9诱导MSCs成骨分化的观点，但Notch1信号通路乃至整个Notch在不同情况下参与MSCs成骨分化的具体机制还需要进一步研究。

参考文献：

[1] Greenbaum A, Hsu Y M, Day R B, *et al*. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance[J]. Nature, 2013, 495(7440): 227-230.

[2] Yang X, Du J, Xu X, *et al*. IFN-γ-secreting-mesenchymal stem cells exert an antitumor effect *in vivo via* the TRAIL pathway[J]. J Immunol Res, 2014, 2014: 318098.

[3] Nelson F R, Brighton C T, Ryaby J, *et al*. Use of physical forces in bone healing[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2003, 11(5): 344-354.

[4] Huang E, Bi Y, Jiang W, *et al*. Conditionally immortalized mouse embryonic fibroblasts retain proliferative activity without compromising multipotent differentiation potential[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32428.

[5] Kang Q, Song W X, Luo Q, *et al*. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(4): 545-559.

[6] He T C. Distinct osteogenic activity of BMPs and their orthopaedic applications[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2005, 5(4): 363-366.

[7] Wharton K A, Yedvobnick B, Finnerty V G, *et al*. opa: a novel family of transcribed repeats shared by the Notch locus and other developmentally regulated loci in D. melanogaster[J]. Cell, 1985, 40(1): 55-62.

[8] Xu N, Liu H, Qu F, *et al*. Hypoxia inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts by activation of Notch signaling[J]. Exp Mol Pathol, 2013, 94(1): 33-39.

[9] Zanotti S, Canalis E. Notch and the skeleton[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(4): 886-896.

[10] Tu X, Chen J, Lim J, *et al*. Physiological notch signaling maintains bone homeostasis *via* RBPjk and Hey upstream of NFATc1[J]. PLoS Genet, 2012, 8(3): e1002577.

[11] Loebel C, Czekanska E M, Bruderer M, *et al*. *In vitro* osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio[J]. Tissue Eng Part A, 2014, [Epub ahead of print].
[12] Inomata K, Aoto T, Binh N T, *et al*. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation[J]. Cell, 2009,137(6): 1088-1099.
[13] Tan T, Lu B, Zhang J, *et al*. Notch1 signaling antagonizes transforming growth factor-β pathway and induces apoptosis in rabbit trophoblast stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(8): 813-822.
[14] Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. Science, 1999, 284(5415): 770-776.
[15] Boopathy A V, Pendergrass K D, Che P L, *et al*. Oxidative stress-induced Notch1 signaling promotes cardiogenic gene expression in mesenchymal stem cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(2):43.
[16] Hilton M J, Tu X, Wu X, *et al*. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation[J]. Nat Med, 2008, 14(3): 306-314.
[17] Jung S R, Song N J, Yang D K, *et al*. Silk proteins stimulate osteoblast differentiation by suppressing the Notch signaling pathway in mesenchymal stem cells[J]. Nutr Res, 2013,33(2): 162-170.
[18] 谢佳瑛, 胥文春, 徐道晶, 等. Notch信号参与BMP9诱导的间充质干细胞成骨分化及其机制的初步探讨[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(11):14-22.
[19] Ann E J, Kim H Y, Choi Y H, *et al*. Inhibition of Notch1 signaling by Runx2 during osteoblast differentiation[J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(2): 317-330.
[20] Engin F, Yao Z, Yang T, *et al*. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis[J]. Nat Med, 2008, 14(3): 299-305.
[21] Zanotti S, Smerdel-Ramoya A, Stadmeyer L, *et al*. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia[J]. Endocrinology, 2008, 149(8): 3890-3899.
[22] Long F. Targeting intercellular signals for bone regeneration from bone marrow mesenchymal progenitors[J]. Cell Cycle, 2008, 7(14): 2106-2111.

(**收稿**:2014-07-19;**修回**:2014-09-17)
(编辑 邓强庭)

DOI:10.16016/j.1000-5404.201407033

个案与短篇

抗中性粒细胞胞质抗体阴性显微镜下多血管炎1例

王 苒,杨晓春,孙耕耘 (230001 合肥,安徽医科大学第一附属医院呼吸内科)

[**关键词**] 显微镜下多血管炎;抗中性粒细胞胞质抗体
[**中图法分类号**] R543 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者男性,69岁,因"发热伴呼吸困难40余天"于2014年3月7日入住我科。患者40余d前出现发热,体温最高达40 ℃,以下午及夜间为主。曾在外院住院治疗,先后诊断上呼吸道感染、肺炎,给予多种广谱抗生素抗感染治疗和激素治疗,但病情无明显改善,且出现呼吸困难症状。我院门诊以"肺炎"收入我科。查体:口唇轻度紫绀,双肺呼吸音粗,双肺底可闻及Velcro啰音,心率108/min,率齐,双下肢无水肿。入院后实验室检查:血常规示白细胞8.49×10^9/L,中性粒细胞百分比79.44%,红细胞3.84×10^{12}/L,血小板330×10^9/L;尿常规示尿隐血为(++),尿蛋白定性为(+);ESR 55 mm/h;C-反应蛋白167.2 mg/L;抗中性粒细胞胞浆抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody,ANCA)、补体、抗核抗体十三项均阴性;肾功能未见异常;肿瘤指标均正常;痰培养无致病菌生长,G实验及GM实验均阴性,抗核抗体十三项均阴性。考虑诊断为间质性肺疾病,肺部感染,给予抗感染、化痰、营养支持治疗。但患者症状无明显改善。外院胸部CT示双下肺间质性改变。入院后复查胸部CT示:双肺透亮度降低,弥漫分布斑片状索条状密度增高影,交织成网格状(图1A)。虽ANCA表现为阴性,但考虑诊断ANCA相关性血管炎,显微镜下多血管炎可能性大。给予甲泼尼龙40 mg,q12h使用,并继续给予抗感染治疗。但患者体温控制仍然不佳,呼吸困难症状无明显减轻,且复查核周型ANCA阳性(1∶80),抗髓过氧化物抗体(MPO):阳性。经患者同意加用环磷酰胺治疗。经积极治疗,患者体温降至正常,呼吸困难症状减轻,3月30日复查胸部CT示:双肺弥漫分布的斑片状索条状密度增高影,较前明显吸收(图1B)。激素及环磷酰胺逐渐减量,治疗过程中检测核周型ANCA为1∶40、1∶10,

(下转73页)

[**基金项目**] 国家临床重点专科建设项目(2012年)
[**通信作者**] 孙耕耘,E-mail:sungengyun@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141208.1340.012.html (2014-12-08)