DOI:10.16016/j.1000-5404.201506036

PTEN 在骨形态发生蛋白 9 诱导小鼠胚胎成纤细胞骨向分化中的作用

伍秋香,任春美,陈振华,陈前昭,袁霜雪,王东旭,曾于桦,李 洋,邵 英,黄 军,何百成 (400016 重庆,重庆医科大学药理学教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室)

[**摘要**] **目的** 研究 PTEN 对骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9,BMP9)诱导小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)成骨分化的影响,并分析 PTEN 调节 BMP9 功能的可能机制。**方法** 采用定量 PCR 检测 PTEN 在间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)中的表达,分析在 MEFs 中 BMP9 对 PTEN 表达的影响。采用组织化学染色法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,PCR 检测 OPN 和 OCN 的表达水平,茜素红染色检测钙盐沉积,分析 PTEN 对 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化的影响;利用荧光素酶报告质粒和蛋白印迹等方法分析 PTEN 对骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins,BMPs)/Smads 信号转导的影响。**结果** PTEN 在几种常见 MSCs 中均有表达;BMP9 在 MEFs 中明显抑制 PTEN 的表达。抑制 PTEN 能促进 BMP9 诱导 MEFs 的 ALP 活性增加,但过表达 PTEN 对 BMP9 诱导 MEFs 的 ALP 活性有明显抑制作用。抑制 PTEN 明显促进 BMP9 在 MEFs 细胞中诱导的 OCN 表达,并增强钙盐沉积。报告质粒分析结果显示,抑制 PTEN 能明显增强 BMPR-Smad 报告质粒的转录活性,并增加 Smad1/5/8 的磷酸化水平。**结论** 下调 PTEN 表达可能是 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化重要途径之一,其机制可能与促进 BMPs/Smads 信号转导有关。

[**关键词**] 骨形态发生蛋白 9;PTEN;小鼠胚胎成纤维细胞;成骨分化;BMPs/Smads
[**中图法分类号**] R322.71; R329-33; R329.2 [**文献标志码**] A

Role of PTEN in bone morphogenetic protein 9 induced osteogenic differentiation in mouse embryonic fibroblasts

Wu Qiuxiang, Ren Chunmei, Chen Zhenhua, Cheng Qianzhao, Yuan Shuangxue, Wang Dongxu, Zeng Yuhua, Li Yang, Shao Ying, Huang Jun, He Baicheng (Department of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) on bone morphogenetic protein 9 (BMP9) induced osteogenic differentiation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and investigate the possible molecular mechanism. **Methods** Real-time PCR was employed to detect the endogenous expression of PTEN in mesenchymal stem cells (MSCs), and the effect of BMP9 on the expression of PTEN in the MEFs. Histochemical staining was used to assay the activity of alkaline phosphatase (ALP), PCR to detect the expression of osteopontin (OPN) and osteocalcin (OCN) induced by BMP9 in MEFs, and Alizarin Red S staining to detect the effect of PTEN on BMP9 induced matrix mineralization. Finally, BMPR-Smad luciferase reporter and Western blot assay were employed to determine the effect of PTEN on BMPs/Smads signaling pathway. **Results** PTEN was expressed in MSCs, and BMP9 inhibited the expression of PTEN in MEFs. Exogenous expression of PTEN inhibited the enhanced ALP activity induced by BMP9, whereas over-expression of PTEN suppressed the induced activity

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81372120)
[**通信作者**] 何百成,E-mail: hebaicheng99@yahoo.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151202.1622.002.html(2015-12-02)

enhancement. Inhibition of PTEN improved the BMP9-induced expression of OCN in MEFs and promoted matrix mineralization. PTEN inhibitor potentiated BMP9-induced activation of BMPs/Smads signaling and phosphorylation of Smad1/5/8 in MEFs. **Conclusion** Down-regulation of PTEN plays an important role in the promotion of osteogenic differentiation induced by BMP9 in MSCs, which may be mediated by enhancing BMPs/Smads signaling transduction initialized by BMP9.

[**Key words**] bone morphogenetic protein 9; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; mouse embryonic fibroblasts; osteogenic differentiation; BMPs/Smads

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372120). Corresponding author: He Baicheng, E-mail: hebaicheng99@yahoo.com

间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)属于多能干细胞,可被定向诱导分化为脂肪细胞、肌细胞、成骨细胞及软骨细胞等。MSCs 被认为是骨组织工程的理想种子细胞之一,在临床治疗骨缺损及骨不连接等疾病中有巨大潜能[1];如何有效地促进 MSCs 成骨分化是目前骨组织工程的主要研究热点之一。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins,BMPs)属于转化生长因子 β(transforming growth factor-β,TGF-β)超家族成员,对骨骼的发育和成年骨缺损修复过程有重要作用[2]。BMP9 是目前诱导 MSCs 成骨分化能力最强的 BMPs[3],但其诱导 MSCs 成骨分化的具体机制还不清楚。PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)是一种重要的抑癌基因,其主要功能是调节 PI3K/Akt 信号通路,阻止细胞过度增殖,在多种肿瘤细胞中存在缺失或突变[4]。PTEN 的缺失导致骨密度增加,这一作用可能与 PI3K/Akt 活性增加有关[5]。PTEN 对 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化是否具有调节作用尚不清楚。因此,本研究探讨 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化与 PTEN 的关系,并初步分析 PTEN 调节 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化的可能机制,以期为进一步研究 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化的机制及影响因素提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及试剂

小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)为课题组提取的原代细胞,C3H10T1/2、C2C12 和 MC3T3-E1 等细胞株均购自 American Type Culture Collection(ATCC)公司。细胞培养条件为 5% CO_2及 37 ℃;采用 DMEM 培养基(高糖,含 10% 胎牛血清、青霉素 100 kU/L 和链霉素 100 mg/L)。PTEN 抑制剂 VO-OHpic trihydrate(VO)购自 Sigma-Aldrich 公司。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒购自碧云天生物科技有限公司。本实验所用抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。

1.2 重组腺病毒的构建

本研究所用重组腺病毒均采用 AdEasy 系统构建[6]。用 PCR 扩增目的基因编码序列并克隆到穿梭质粒。将穿梭质粒线性化后与 BJ5183-AdEasy 细菌重组,将重组正确的质粒线性化并转染到 HEK-293 细胞(human embryonic kidney-293)进行病毒包装,得到目的基因编码序列的重组腺病毒。即 GFP 重组腺病毒(AdGFP)、BMP9 重组腺病毒(AdBMP9)和 PTEN 重组腺病毒(AdPTEN)。AdGFP 作为重组腺病毒对照。

1.3 细胞免疫化学实验

调整好细胞浓度,制成细胞爬片,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 充分冲洗、晾干,3% H_2O_2室温孵育 20 min,PBS 冲洗,滴加 30 μL 山羊血清封闭液,室温孵育 30 min 后倾去,滴加 1∶100 稀释的一抗 30 μL/片(PBS 稀释),置湿盒内 4 ℃过夜,滴加 1∶200 稀释的生物素化二抗 30 μL/片(PBS 稀释),37 ℃湿盒内温育 30 min,加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 30 μL/片,37 ℃孵育 30 min,DAB 显色(除滴加山羊血清封闭液外,每步反应前均用 PBS 冲洗 5 min×3 次),镜下观察显色后充分水洗,苏木精复染,常规脱水、透明、中性树胶封片。

1.4 实验分组及腺病毒滴度测定

MEFs 细胞分为对照组、PTEN 抑制剂组(VO 4 nmol/L 和 16 nmol/L)、BMP9 组及 BMP9 合并不同浓度 PTEN 抑制剂组。对照组用 Ad-GFP 处理并同时给予与 PTEN 抑制剂体积相同的 DMSO。PTEN 抑制剂组用不同浓度的 VO 合并 Ad-GFP 处理细胞。BMP9 组用 Ad-BMP9 感染细胞并同时给予与 PTEN 抑制剂体积相同的 DMSO。BMP9 合并 PTEN 抑制剂组为 Ad-BMP9 感染细胞并同时给予不同浓度的 PTEN 抑制剂。实验前先对每种腺病毒在 MEFs 中的滴度进行测定(相对滴度)。先将 MEFs 按实验要求种于 24 孔板,待

细胞贴壁后,分别加入0.5、1、2、4、8、16 μL病毒液于孔板中;24 h后,进行荧光观察,确定BMP9(高、中、低)感染效率所需的腺病毒液的体积(图1)。最后,通过预试确定实验所需的最佳腺病毒感染率。

1.5 RT-PCR检测

将处于指数生长状态的细胞均匀种接于T25培养瓶,待细胞贴壁后按实验设计加入相应的处理因素,并用含1%胎牛血清的完全培养基培养,于培养9、11 d采用TRIzol法提取细胞总RNA,根据试剂盒说明书逆转录反应制备cDNA。通过RT-PCR检测相关晚期成骨指标基因表达情况。每组实验重复3次。

1.6 Western blot检测

将生长状态良好的细胞均匀种接于6孔板,待细胞贴壁后加入相应处理因素,常规方法于不同时间点提取细胞总蛋白。采用BCA法测定提取的总蛋白浓度,根据测得蛋白浓度,用常规方法进行Western blot实验。最后,利用ECL化学发光法显影,然后使用凝胶成像仪成像。每组实验重复3次。

1.7 ALP活性测定

将细胞种于24孔板,细胞贴壁后按实验分组加入相应处理因素,于第5天和第7天参照文献[3,7]测定ALP活性,具体操作按试剂盒说明进行。每组实验重复3次。

1.8 茜素红染色检测钙盐沉积

将细胞种于24孔板,细胞贴壁后按分组加入相应处理因素,于第20天参照文献[8]进行茜素红染色。每组实验重复3次。

1.9 报告质粒检测实验

将细胞种于T25培养瓶,待细胞贴壁后用Lipofectamine转染2 μg BMPR-Smad报告质粒(p12xSBE-Luc)[9]。16 h后,将细胞消化并重新种于24孔板,细胞贴壁后加入相应处理因素。24 h后裂解细胞,按试剂盒操作说明测定荧光素酶活性。另用BCA法测定蛋白浓度,用于校正荧光素酶活性。每组实验重复3次。

1.10 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Office软件对组间差异行 t 检验。

2 结果

2.1 BMP9抑制PTEN在MEFs中表达

定量PCR检测结果显示,在MEFs、C3H10T1/2、C2C12和MC3T3-E1等细胞中均能检测到内源性PTEN表达(图2A);同时,PCR和Western blot检测结果表明,在MEFs中BMP9明显抑制PTEN表达(图2B、C);细胞免疫化学染色结果也显示BMP9能明显抑制PTEN的表达水平(图3)。提示下调PTEN表达很可能与BMP9诱导MEFs成骨分化有关。

2.2 PTEN影响BMP9在MEFs中诱导ALP活性增加

ALP染色检测显示,在MEFs中抑制PTEN能促进BMP9诱导ALP活性增加(图4A);外源性过表达PTEN则抑制BMP9诱导ALP活性增加(图4B)。同时,Western blot验证BMP9和PTEN重组腺病毒(图4C、D)。提示,PTEN在BMP9诱导MEFs骨向分化过程中可能具有重要作用。

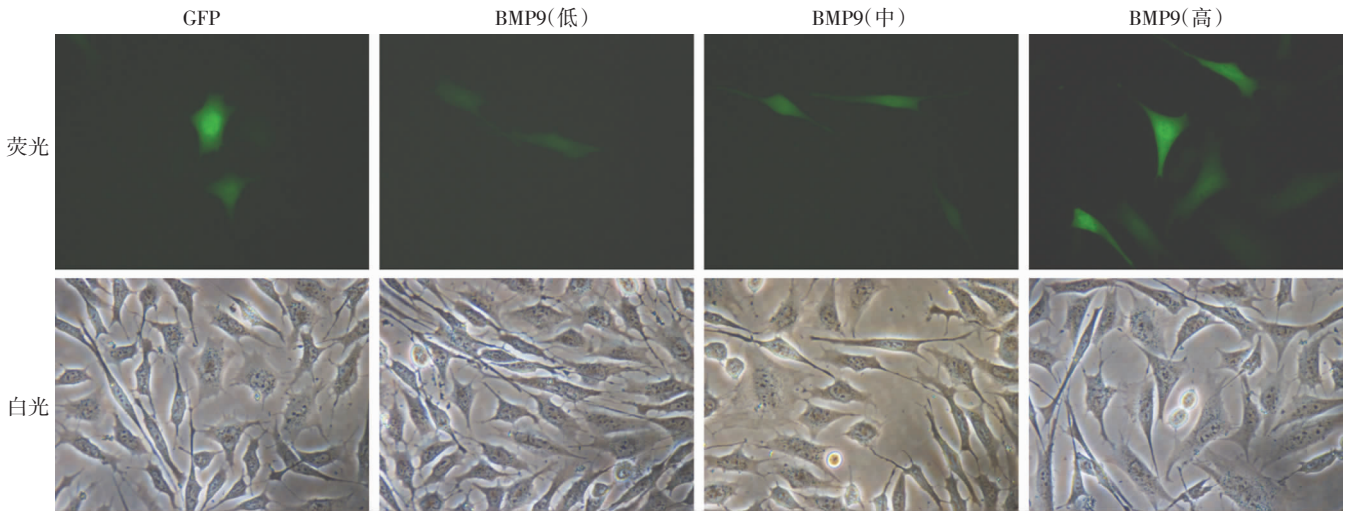
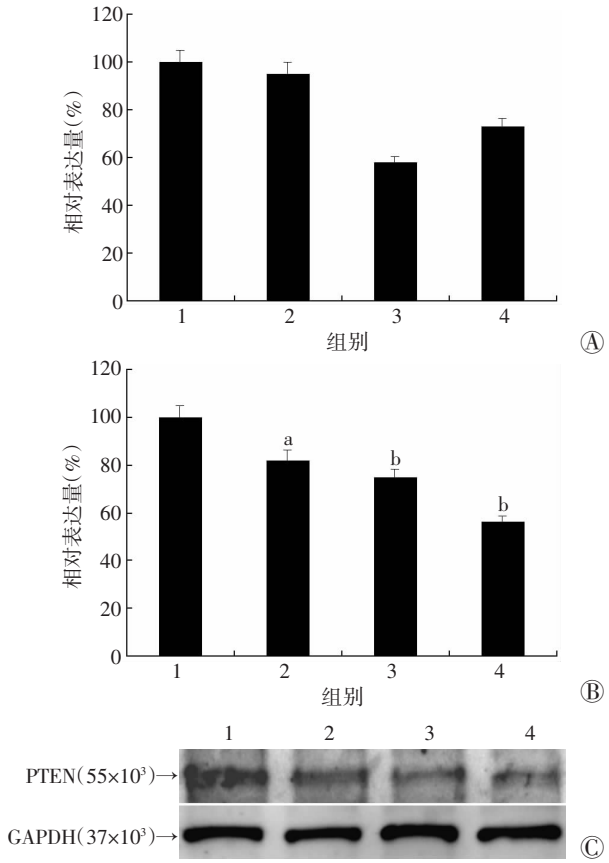
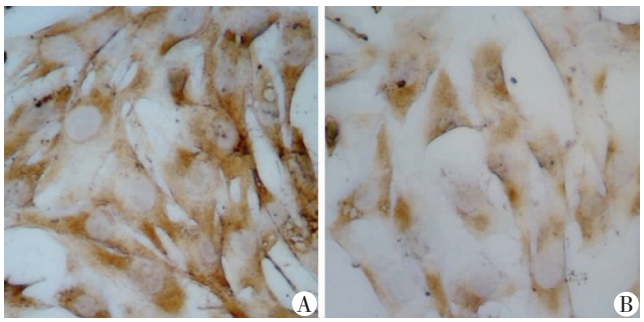


图1 荧光倒置显微镜确定AdBMP9的感染效率 (×200)



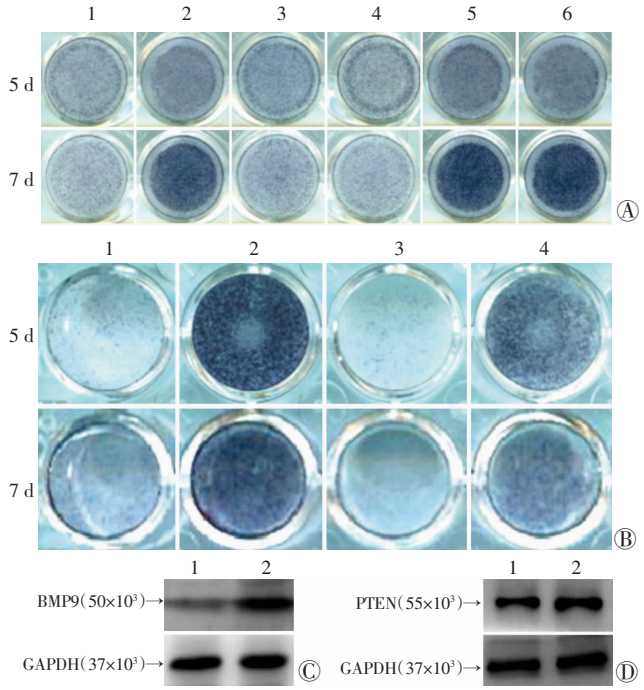
A:不同细胞中定量 PCR 检测 PTEN 的表达　1:MEFs;2:C3H10T1/2;3:C2C12;4:MC3T3-E1;B:定量 PCR 检测 BMP9 对 PTEN 表达的影响　1:对照组;2: BMP9(低);3: BMP9(中);4: BMP9(高)　a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组比较;C:Western blot 检测 BMP9 对 PTEN 表达的影响　1:对照组; 2: BMP9(低);3: BMP9(中);4: BMP9(高)

图 2　PTEN 在间充质干细胞中的内源性表达以及 BMP9 在 MEFs 中对 PTEN 表达的影响



A:对照组;B:BMP9(低)

图 3　免疫组化观察 BMP9 在 MEFs 对 PTEN 表达的影响　(S-P ×400)

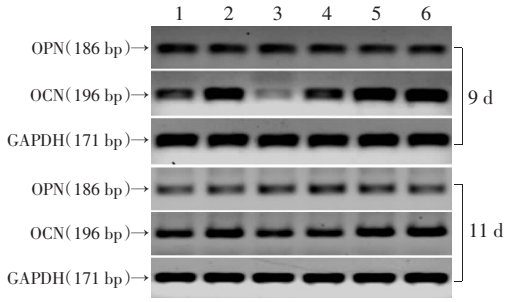


A: 抑制 PTEN 表达 ALP 染色分析　1:对照组;2:BMP9;3:VO 4 nmol/L组;4:VO 16 nmol/L 组;5:VO 4 nmol/L + BMP9 组;6:VO 16 nmol/L + BMP9 组;B:过表达 PTEN ALP 染色分析　1:对照组;2: BMP9 组; 3: PTEN 组; 4: BMP9 + PTEN 组; C: Western blot 检测 BMP9 的表达　1:对照组; 2: BMP9 重组腺病毒;D: Western blot 检测 PTEN 的表达　1:对照组;2:PTEN 重组腺病毒

图 4　PTEN 对 BMP9 诱导 MEFs 中 ALP 活性增加的影响及 BMP9 和 PTEN 重组腺病毒的功能验证

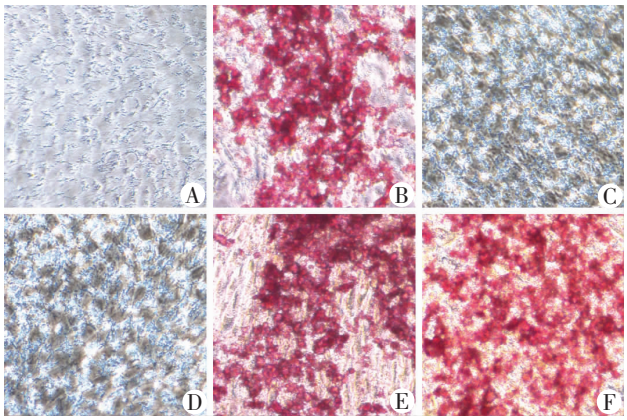
2.3　抑制 PTEN 促进 BMP9 诱导 MEFs 骨向分化

抑制 PTEN 不仅增强 BMP9 在 MEFs 中诱导 OCN 表达(图5),同时也明显促进 BMP9 在 MEFs 诱导钙盐沉积(图6)。提示,抑制 PTEN 对 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化具有明显促进作用。



1:对照组;2: BMP9 组;3:VO 4 nmol/L 组; 4:VO 16 nmol/L 组;5:VO 4 nmol/L + BMP9 组; 6:VO 16 nmol/L + BMP9 组

图 5　PCR 分析 PTEN 抑制剂对 BMP9 在 MEFs 中诱导 OCN 和 OPN 的影响

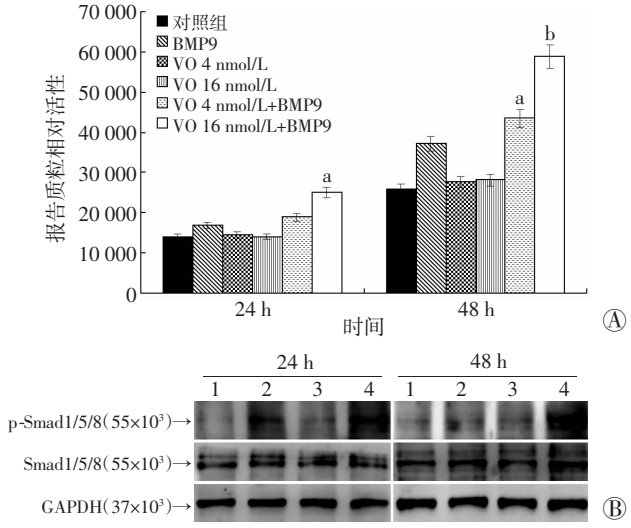


A:对照组; B: BMP9 组; C: VO 4 nmol/L 组; D: VO 16 nmol/L 组; E: VO 4 nmol/L + BMP9 组; F: VO 16 nmol/L + BMP9 组

图 6 茜素红染色观察 PTEN 抑制剂对 BMP9 在 MEFs 中诱导成骨标志物的影响 (×100)

2.4 抑制 PTEN 促进 BMP9 对 BMPs/Smads 信号的活化

抑制 PTEN 能明显增加 BMP9 诱导的 BMPR-Smad 报告质粒转录活性(图 7A)。Western blot 结果显示,在处理 24、48 h 后,抑制 PTEN 均明显提高 BMP9 诱导的 Smad1/5/8 磷酸化水平(图 7B)。提示抑制 PTEN 促进 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化可能与增强 BMPs/Smads 信号的转导活性有关。



A: 报告质粒转录活性 a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 BMP9 组比较; B: Western blot 检测 1: 对照组; 2: BMP9 组; 3: VO 16 nmol/L 组; 4: VO 16 nmol/L + BMP9 组

图 7 报告质粒及 Western blot 分析不同时间点 PTEN 抑制剂对 BMP9 诱导 BMPs/Smads 信号活化的影响

3 讨论

组织工程骨是治疗骨不连接与骨缺损等疾病的理想材料。MSCs 具有多向分化潜能,是骨组织工程的理想种子细胞。如何有效促进 MSCs 成骨分化是骨组织工程目前的研究热点之一[8]。BMP9 是目前已知诱导 MSCs 成骨分化能力最强的因子之一,在骨组织工程中具有很好的应用前景。本研究发现,BMP9 能抑制 PTEN 在 MSCs 中表达,并且抑制 PTEN 能明显促进 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化,这种作用可能与增强 BMPs/Smads 信号转导有关。

BMPs 除通过经典的 BMP/Smad 信号通路实现对相应生理过程调节外,也可通过非经典的 BMP/Smad 信号通路对相应的功能进行调节,如 MAPKs 和 PI3K/Akt 等[10-11]。BMPs 与受体(BMP Ⅰ型和Ⅱ型受体)结合后,使下游成骨性 Smad1/5/8 磷酸化,然后与 Smad4 形成复合物并转位入核,调节下游靶相关基因表达,如 Runx2 和 Dlx-5 等[12-13]。BMP9 是诱导 MSCs 成骨分化能力最强的 BMPs 成员[3]。因此,增强 BMP9 诱导干细胞成骨分化的能力,对于骨缺损、骨不连接及骨折等疾病的治疗具有重要意义,但 BMP9 诱导干细胞成骨分化的详细机制仍不十分清楚。

PTEN 作为一种抑癌基因,其主要功能是负性调节 PI3K/Akt 信号[4],其缺失或突变能导致 PI3K/Akt 信号过度激活,使细胞增殖失控从而导致肿瘤发生。除与肿瘤有关外,PTEN 也与骨代谢有关,机制可能与其调节 PI3K/Akt 信号活性有关[5]。PI3K/Akt 信号在 BMP9 诱导干细胞成骨分化过程中具有重要作用[11],而 PTEN 又能调节 PI3K/Akt 信号。因此,PTEN 可能对 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化具有调节作用。

干细胞成骨分化受多种因素调控,过程复杂。但可通过相应的标志物对过程进行分析,如:Runx2、Dlx-5 和 Osterx 等转录调节因子,ALP、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OCN)和钙盐沉积等[12-13]。本研究发现,PTEN 在多种 MSCs 中均有表达,BMP9 能抑制 PTEN 在 MEFs 中表达,提示 PTEN 对 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化过程可能具有重要调节作用。MEFs 是一种常用的 MSCs,课题组前期研究表明 BMP9 能诱导 MEFs 成骨分化[14],且 MEFs 对 BMP9 诱导的反应要强于 C3H10T1/2 细胞,所以本研究选用 MEFs 进行实验。结果显示,外源性过表达 PTEN 明显抑制 BMP9 诱导 MEFs 的 ALP 活性增加,但抑制 PTEN 却促进 BMP9 的这种作用;同样,抑制 PTEN 促进 BMP9 在 MEFs 诱导 OCN 表达以及钙盐沉积。结果与文献报一致,即 PTEN 缺失能增加骨密度[5]。提示 PTEN 确实对 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化具有调节作用。机制分析表明,抑制 PTEN 明显增强 BMP9 诱导

的 BMPs/Smads 报告质粒转录活性,并使 Smad1/5/8 磷酸化水平增加。提示,PTEN 对 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化的调节很可能与经典的 BMPs/Smads 信号有关,但具体机制尚不清楚。

本研究结果表明,抑制 PTEN 可能是 BMP9 促进 MSCs 成骨分化的重要途径之一,PTEN 对 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化可能具有负性调节作用,机制可能与影响 BMPs/Smads 信号的转导活性有关。虽然本研究发现抑制 PTEN 可以促进 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化,但详细机制还不清楚;课题组将进一步通过沉默 PTEN 等多种方法分析 PTEN 调节这一过程的可能分子机制。

参考文献:

[1] Sukul M, Nguyen T B, Min Y K, *et al*. Effect of Local Sustainable Release of BMP2-VEGF from Nano-Cellulose Loaded in Sponge Biphasic Calcium Phosphate on Bone Regeneration [J]. Tissue Eng Part A, 2015, 21(11/12): 1822 – 1836. DOI:10.1089/ten.TEA.2014.0497

[2] Hong C C, Yu P B. Applications of small molecule BMP inhibitors in physiology and disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(5/6):409 – 418. DOI:10.1016/j.cytogfr.2009.10.021

[3] 惠慧, 罗聪, 毕杨. 肝细胞生长因子促进骨形态发生蛋白 9 诱导小鼠骨髓间充质干细胞 C3H10 成骨分化的研究[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(23):2380 – 2384.

[4] Song M S, Salmena L, Pandolfi P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(5):283 – 296. DOI:10.1038/nrm3330

[5] Suzuki E, Ochiai-Shino H, Aoki H, *et al*. Akt activation is required for TGF-β1-induced osteoblast differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e112566. DOI:10.1371/journal.pone.0112566

[6] Luo J, Deng Z L, Luo X, *et al*. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system [J]. Nat Protoc, 2007, 2(5):1236 – 1247. DOI:10.1038/nprot.2007.135

[7] Wang N, Wang X, Cheng W, *et al*. Puerarin promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis *in vitro*[J]. Chin Med, 2013, 8(1):17. DOI:10.1186/1749-8546-8-17

[8] Fakhry M, Hamade E, Badran B, *et al*. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts[J]. World J Stem Cells, 2013, 5(4): 136 – 148. DOI:10.4252/wjsc.v5.i4.136

[9] Kim H J, Park J W, Lee K H, *et al*. Plant homeodomain finger protein 2 promotes bone formation by demethylating and activating Runx2 for osteoblast differentiation[J]. Cell Res, 2014, 24(10):1231 – 1249. DOI:10.1038/cr.2014.127

[10] Zhao Y, Song T, Wang W, *et al*. P38 and ERK1/2 MAPKs act in opposition to regulate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. PLoS One, 2012, 7(8):e43383. DOI:10.1371/journal.pone.0043383

[11] Liu Y, Liu Y, Zhang R, *et al*. All-trans retinoic acid modulates bone morphogenic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/β-catenin signaling pathways[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 47:47 – 56. DOI:10.1016/j.biocel.2013.11.018

[12] Chen L, Jiang W, Huang J, *et al*. Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) potentiates BMP-9-induced osteogenic differentiation and bone formation[J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(11): 2447 – 2459. DOI:10.1002/jbmr.133

[13] 张燕, 文巍, 罗进勇. 骨形态发生蛋白 9 定向诱导多潜能干细胞成骨分化[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(10): 1291 – 1298.

[14] Wang J H, liu Y Z, Yin L J, *et al*. BMP9 and COX-2 form an important regulatory loop in BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Bone, 2013, 57(1): 311 – 321. DOI:10.1016/j.bone.2013.08.015

(**收稿**:2015-06-08;**修回**:2015-07-19)

(编辑 龙 亮)