DOI:10.16016/j.1000-5404.201507192

BMPs-ERK5 信号通路调控人牙周膜干细胞成骨分化的研究

蒋 琳[1,2],周鹏飞[3],王 佳[2],张 燕[3] (401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医院:预防口腔科[1],重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室[2],口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室[3])

[**摘要**] **目的** 比较骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)2、7、9 对人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)成骨分化的诱导作用,探讨 BMPs-ERK5 信号通路在成骨分化中的作用。**方法** 首先采用组织块酶消化法分离培养原代 hPDLSCs 并鉴定,利用腺病毒载体介导的 GFP、BMP2、BMP7 和 BMP9(Ad-GFP、Ad-BMP2、Ad-BMP7、Ad-BMP9)分别感染 hPDLSCs,通过早期成骨分化指标碱性磷酸酶活性定性和定量检测、茜素红染色检测晚期成骨分化指标钙盐结节沉积情况、qRT-PCR 检测细胞成骨分化相关基因骨钙蛋白和骨桥蛋白 mRNA 表达,比较发现 BMP9 对细胞成骨分化的作用最强;采用 Ad-BMP9 感染 hPDLSCs 24 h 后,检测 BMP9 作用 PDLSCs 后对 ERK5 磷酸化水平的影响和 ERK5 信号通路特异性抑制剂 BIX02189 预处理后 BMP9-ERK5 通路对 hPDLSCs 成骨分化的影响。**结果** ①分离培养的 hPDLSCs 为成纤维细胞样,呈漩涡状生长,抗波形蛋白表达阳性,抗角蛋白表达阴性,具有间充质属性和克隆形成能力。②BMP2、BMP7 和 BMP9 均有促进细胞成骨分化作用,其中 3 组的碱性磷酸酶定量结果和成骨分化相关基因相对表达量与 GFP 组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),且 BMP9 效力最强。③Western blot 检测显示 BMP9 增强 p-ERK5 的表达。而抑制剂 BIX02189 呈剂量依赖性地抑制 p-ERK5 的表达。BIX02189 预处理细胞后、感染 Ad-BMP9 的结果显示,BMP9 对细胞的促成骨作用较未处理组明显降低,其中 BMP9 组的碱性磷酸酶定量分析结果与成骨分化相关基因相对表达量与 BIX02189 处理组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** BMP9 具有较强的促 hPDLSCs 成骨分化作用,ERK5 信号转导途径在 BMP9 诱导 hPDLSCs 成骨分化过程中发挥了正向调节作用。

[**关键词**] 骨形态发生蛋白;牙周膜干细胞;成骨分化;细胞外信号调节激酶 5
[**中图法分类号**] R322.41; R329.21; R329.26 [**文献标志码**] A

Bone morphogenetic proteins-ERK5 signaling pathway mediates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells

Jiang Lin[1,2], Zhou Pengfei[3], Wang Jia[2], Zhang Yan[3] ([1]Department of Preventive Dentistry, [2]Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Chongqing Higher Education, [3]Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Affiliated Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401147, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine osteogenic differentiation effects of bone morphogenetic proteins (BMP 2, 7 and 9) on human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs), and determine the effect of BMPs-extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) signaling pathway on osteogenic differentiation. **Methods** hPDLSCs were isolated from fresh periapical tissues and cultured by tissue block and enzyme digestion, and then identified. After hPDLSCs were infected by adenovirus vectors carrying GFP, BMP2, BMP7 and BMP9 respectively (Ad-GFP, Ad-BMP2, Ad-BMP7 and Ad-BMP9), the activity and quantity of alkaline phosphatase were determined for early osteogenic differentiation, and calcium nodule deposition was studied by

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金一般项目(CSTC2012jjA10156);重庆市渝北区科研项目[2014(社)16 号];重庆高校创新团队建设计划(2013)
[**通信作者**] 张 燕,E-mail:lexiner82@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151203.1310.022.html(2015-12-03)

alizarin red staining for late osteogenic differentiation. And the expression levels of some genes related to osteogenic differentiation and osteopontin were detected by qRT-PCR. After BMP9 was determined as exerting strongest effect on osteogenic differentiation, the phosphorylation of ERK5 was detected after hPDLSCs were intervened with Ad-BMP9 and BIX02189 (inhibitor of ERK5 signaling pathway) for 24 h respectively for the effect of the signaling pathway on osteogenic differentiation. **Results** The isolated and cultured hPDLSCs were fibroblast-likes, in swirl-like arrangement, positive to vimentin while negative to keratin, and showing mesenchymal properties and clone forming ability. Adenovirus vectors Ad-BMP2, BMP7 and BMP9 all had inducing effects on osteogenic differentiation in hPDLSCs, and enhanced the activity of alkaline phosphatase and the mRNA expression of relative genes than Ad-GFP vector ($P<0.05$), what's more, adenovirus vector BMP9 had strongest effects. Western blotting showed that BMP9 up-regulated the phosphorylation of ERK5, and BIXO2189 decreased the phosphorylation of ERK5 in a dose-dependent manner. And BIX02189 attenuated BMP9-induced osteogenic differentiation of hPDLSCs. The activity of alkaline phosphatase and mRNA expression levels of relative genes were significantly lower in the BIX02189 groups than the BMP9 group ($P<0.05$). **Conclusion** BMP9 has strong the osteogenesis induction effect on hPDLSCs. ERK5 signaling pathway exerts a positive regulatory effect on BMP9-induced osteogenic differentiation.

[**Key words**] bone morphogenetic protein; periodontal ligament stem cells; osteogenic differentiation; extracellular signal-regulated kinase 5

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10156), the Scientific Research Project of Yubei District of Chongqing (2014-16) and the Project of Innovation Team Construction Plan of Chongqing Higher Education (2013). Corresponding author: Zhang Yan, E-mail: lexiner82@126.com

随着对牙周炎发病机制的深入研究和牙周组织工程技术的不断发展,牙周治疗的重点已从阻止炎症进展转变为促进牙周支持组织的重建,其中牙槽骨的再生是决定牙齿功能的关键修复部分。牙周韧带组织来源的牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)因具有高度增殖、自我更新能力和多向分化潜能,成为牙周缺损修复和牙周组织再生最直接和最理想的种子细胞[1]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是诱导干细胞成骨分化能力较强的一类生长因子,其中 BMP2、7、9 是目前经验证作用最突出的亚型[2],其作用机制的研究也备受关注。有研究发现,BMPs 可以激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)通路,而细胞外信号调节激酶 5(extracellular signal-regulated kinase 5, ERK5)作为 MAPKs 家族的一个新成员,在细胞分化、血管生成等方面也发挥了重要作用。因此,阐明 BMPs 与 ERK5 通路间的调控关系将为深入研究 BMPs 诱导牙周膜干细胞成骨分化的作用及机制提供新的理论依据。

本实验首先采用组织块酶消化法分离培养原代人 PDLSCs,利用腺病毒载体介导的 BMP2、BMP7 和 BMP9 蛋白分别感染 PDLSCs,比较、确认 BMP9 对细胞成骨分化的最强作用;然后检测 BMP9 作用于 PDLSCs 后对 ERK5 通路的激活情况和特异性抑制剂 BIX02189 预处理后 BMP9-ERK5 通路对 PDLSCs 成骨分化的影响,探讨 ERK5 参与 BMP9 诱导 PDLSCs 骨向分化的作用途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

腺病毒载体:Ad-GFP、Ad-BMP2、Ad-BMP7、Ad-BMP9 由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室何通川教授惠赠。人牙周膜干细胞来源:征得患者本人及家属同意后,取 10~15 岁因正畸需要拔除的健康前磨牙。主要试剂:Ⅰ型胶原酶(Sigma 公司),DMEM/F12 培养基(HyClone 公司),胎牛血清(Gibco 公司),维生素 C、β-磷酸甘油(Sigma 公司),角蛋白抗体、波形蛋白抗体、荧光兔二抗(中杉金桥公司),p-ERK5 抗体(CST),抑制剂 BIX02189(Selleck 公司),碱性磷酸酶活性检测试剂盒、碱性磷酸酶显色试剂盒(碧云天公司),茜素红染液(Solarbio 公司),qRT-PCR 试剂盒(天根公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Western blot 相关试剂(碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 人牙周膜干细胞的分离、培养 牙齿拔除后立即放入预冷的含双抗的 DMEM/F12 培养基中,观察牙周膜组织附着是否完整,迅速转移入实验室生物安全柜内,用含 2×双抗的生理盐水反复冲洗根面,直至完全去除根面血液,用手术刀片刮取根中 1/3 牙周膜

组织放入1.5 mL离心管内,加入0.1% Ⅰ型胶原酶1 mL,置于37 ℃水浴箱30 min,每5 min振荡1次。离心,去除上清液后加入含有10% FBS的DMEM/F12培养液1 mL漂洗1次,离心后将组织块转移到铺有一层血清的细胞培养瓶内,倒置加入3 mL DMEM/F12完全培养液,置于孵箱(37 ℃,5% CO_2)倒置培养过夜,后翻瓶正置培养。待细胞爬出组织块,每3天换液1次,直至细胞生长达80%~90%融合时,消化传代。

1.2.2 细胞免疫荧光染色鉴定hPDLSCs来源 取第3代细胞接种于24孔板内爬片上,待细胞融合度达80%左右时去除培养液,1×PBS清洗3次,每次5 min,4%多聚甲醛固定30 min,1×PBS清洗3次,每次5 min,0.1% Triton-100孵育15 min,1×PBS清洗3次,每次5 min,1% BSA封闭30 min,滴加抗波形蛋白一抗或抗角蛋白一抗孵育,4 ℃过夜;PBS清洗后,加入兔二抗,37 ℃孵育1 h,DIPA染核5 min,自来水终止,抗淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.2.3 细胞克隆形成实验 取第3代细胞消化,吹打至单细胞悬液,接种400个细胞至6 cm细胞培养皿内,置于孵箱培养,每天观察细胞生长情况,以50个细胞为1个克隆形成单位,10~14 d取出培养皿,4%多聚甲醛固定30 min,漂洗后结晶紫染色30 min,PBS终止染色漂洗,于倒置显微镜下观察拍照。

1.2.4 碱性磷酸酶染色 取第4代细胞,按照30%密度接种于24孔板,设GFP、BMP2、BMP7、BMP9 4组。待细胞贴壁后分别加入适量的Ad-GFP、Ad-BMP2、Ad-BMP7、Ad-BMP9,荧光感染率约为50%,8 h后换液,连续培养5 d或7 d时终止,PBS冲洗,4%多聚甲醛固定30 min,PBS冲洗,每孔加入250 μL BCIP/NBT染色工作液,室温避光孵育30 min。吸弃染液,用ddH_2O洗涤2次终止显色反应,倒置显微镜成像拍照。取第5代细胞,按照相同方法接种细胞,设空白、GFP、BMP9、BMP9+2.5 μmol/L BIX02189和BMP9+10 μmol/L BIX02189 5组。待细胞贴壁后,按分组分别加入适量的Ad-BMP9和Ad-GFP,8 h后换液,加入2.5 μmol/L和10 μmol/L BIX02189,7 d后,同上方法进行碱性磷酸酶染色实验。

1.2.5 碱性磷酸酶活性检测 铺板步骤和分组同碱性磷酸酶染色。Ad-GFP、Ad-BMP2、Ad-BMP7、Ad-BMP9感染细胞3、5 d或7 d时终止,每孔加入200 μL 0.2% Triton X-100裂解细胞,刮取裂解物至1.5 mL EP管中,离心12 000 r/min 5 min,取上清液置-80 ℃暂存,待所有时间段样本收集完毕,根据碱性磷酸酶检测试剂盒说明书进行定量检测。设立3个复孔,根据标准曲线及作用时间计算得出样本的碱性磷酸酶活性值。取第5代细胞,按照相同方法接种细胞,并加入适量的Ad-BMP9和Ad-GFP,8 h后换液,加入2.5 μmol/L和10 μmol/L BIX02189,7 d后,同上方法进行碱性磷酸酶活性检测。

1.2.6 茜素红染色实验 铺板步骤和分组同碱性磷酸酶染色,荧光感染率约为30%的Ad-GFP、Ad-BMP2、Ad-BMP7、Ad-BMP9感染细胞8 h后换液(含10 mmol/L β-磷酸甘油和50 mg/L维生素C),连续培养21 d后,PBS冲洗,4%多聚甲醛固定30 min,PBS冲洗,每孔加入200 μL 0.2%茜素红染色室温孵育1 h,吸弃染液,用ddH_2O洗涤2次终止显色反应,倒置显微镜成像拍照。取第5代细胞,按照相同方法接种细胞,并加入适量的Ad-BMP9和Ad-GFP,8 h后换液,加入2.5 μmol/L和10 μmol/L BIX02189,21 d后,同上方法进行茜素红染色实验。

1.2.7 qRT-PCR检测 取第4代细胞按照30%密度接种于6 cm细胞培养皿中,设GFP、BMP2、BMP7、BMP9 4组。待细胞贴壁,分别加入适量的Ad-GFP、Ad-BMP2、Ad-BMP7、Ad-BMP9,荧光感染率为50%左右,8 h后换液,连续培养7 d,PBS冲洗,提取细胞总RNA,微量核酸蛋白检测仪测定样本浓度和纯度。按照qRT-PCR试剂盒说明书将mRNA逆转录为cDNA,Bio-rad CFX实时荧光定量PCR仪检测成骨相关基因OCN、OPN mRNA的表达,40个循环。以β-actin基因作为内参照,利用Bio-Rad CFX Manager软件分析得出基因相对表达量。取第5代细胞,按照相同方法接种细胞,设空白、GFP、BMP9、BMP9+2.5 μmol/L BIX02189和BMP9+10 μmol/L BIX02189 5组。待细胞贴壁后,按分组分别加入适量的Ad-BMP9和Ad-GFP,8 h后换液,加入2.5 μmol/L和10 μmol/L BIX02189,7 d后,同上方法进行成骨分化相关基因OCN、OPN、OSX、RUNX2 mRNA的检测。所用引物序列见表1。

表1 基因序列

基因	引物序列(5′→3′)	产物大小(bp)
OCN	正向:GAGTTGGCTGACCACATCG 反向:AAAGAAGGGTGCCTGGAGAG	122
OPN	正向:GCCGTGGGAAGGACAGTTAT 反向:GCTCATTGCTCTCATCATTGG	114
OSX	正向:GAGGTTCACTCGTTCGGATG 反向:TGGTGTTTGCTCAGGTGGT	120
RUNX2	正向:GACGAGGCAAGAGTTTCACC 反向:GGTTCCCGAGGTCCATCTAC	106
β-actin	正向:CCTGGCACCCAGCACAAT 反向:GGGCCGGACTCGTCATAC	200

1.2.8　Western blot 检测　　取第 4 代细胞接种至 10 cm 细胞培养皿中,密度为 60%。设 GFP、BMP9、BMP9 + DMSO、BMP9 + 2.5 μmol/L BIX02189、BMP9 + 5 μmol/L BIX02189 和 BMP9 + 10 μmol/L BIX02189 6 组。待细胞贴壁后,加入一定浓度的抑制剂 BIX02189(2.5、5、10 μmol/L)预处理 1 h,后分别加入适量的 Ad-GFP 或 BMP9 继续培养 24 h,提取总蛋白质,BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行浓度测定。将所得蛋白样本进行电泳,转膜,封闭,加入 p-ERK5 一抗(1∶1 000)或 β-actin 一抗(1∶5 000),4 ℃过夜孵育,加入 HRP 标记的二抗(1∶5 000),ECL 化学发光法进行显色。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件对计量资料进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　原代人牙周膜干细胞的培养及鉴定

采用组织块酶消化法分离人牙周膜细胞,5 ~ 7 d 即可观察到大量细胞从组织块周围爬出,细胞为成纤维细胞样,多呈长梭形,传代后呈漩涡状生长。细胞免疫荧光染色鉴定示抗波形蛋白表达阳性,抗角蛋白表达阴性,说明细胞来源于中胚层间充质细胞,而非上皮细胞。克隆形成能力检测示:细胞生长 2 周后显微镜下即可见克隆形成,克隆中心细胞密度较大,多呈圆形,结晶紫染色可见克隆成蓝色团(图 1)。

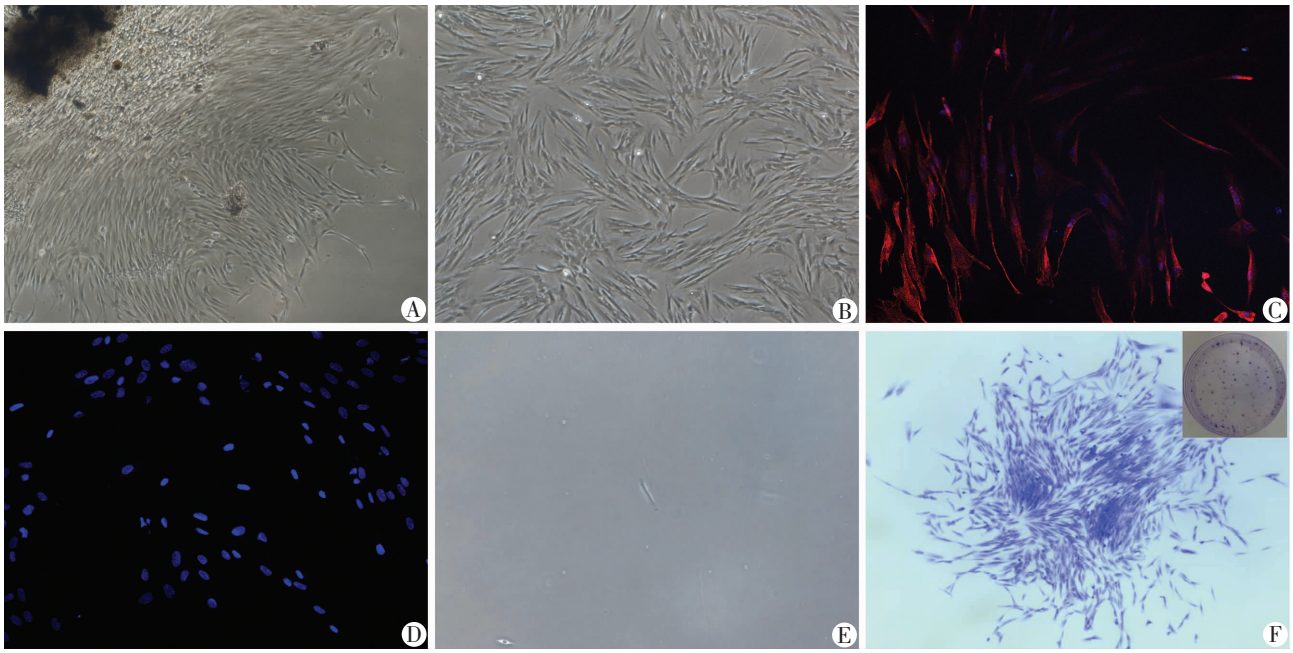
2.2　BMPs 促进 hPDLSCs 细胞成骨分化

ALP 染色和活性检测结果显示:第 5 天和第 7 天时,与 GFP 组比较,BMP2、BMP7 和 BMP9 组的 ALP 表达均明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 BMP9 组高于 BMP2 和 BMP7 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。可见 BMP9 早期成骨 ALP 表达最强,BMP2 次之,染色和活性结果一致(图 2A、B)。

qRT-PCR 检测结果显示:与 GFP 组比较,BMP2、BMP7 和 BMP9 组的细胞成骨分化相关基因 OCN 和 OPN mRNA 的表达均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 BMP9 组明显高于 BMP2 和 BMP7 组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2C)。

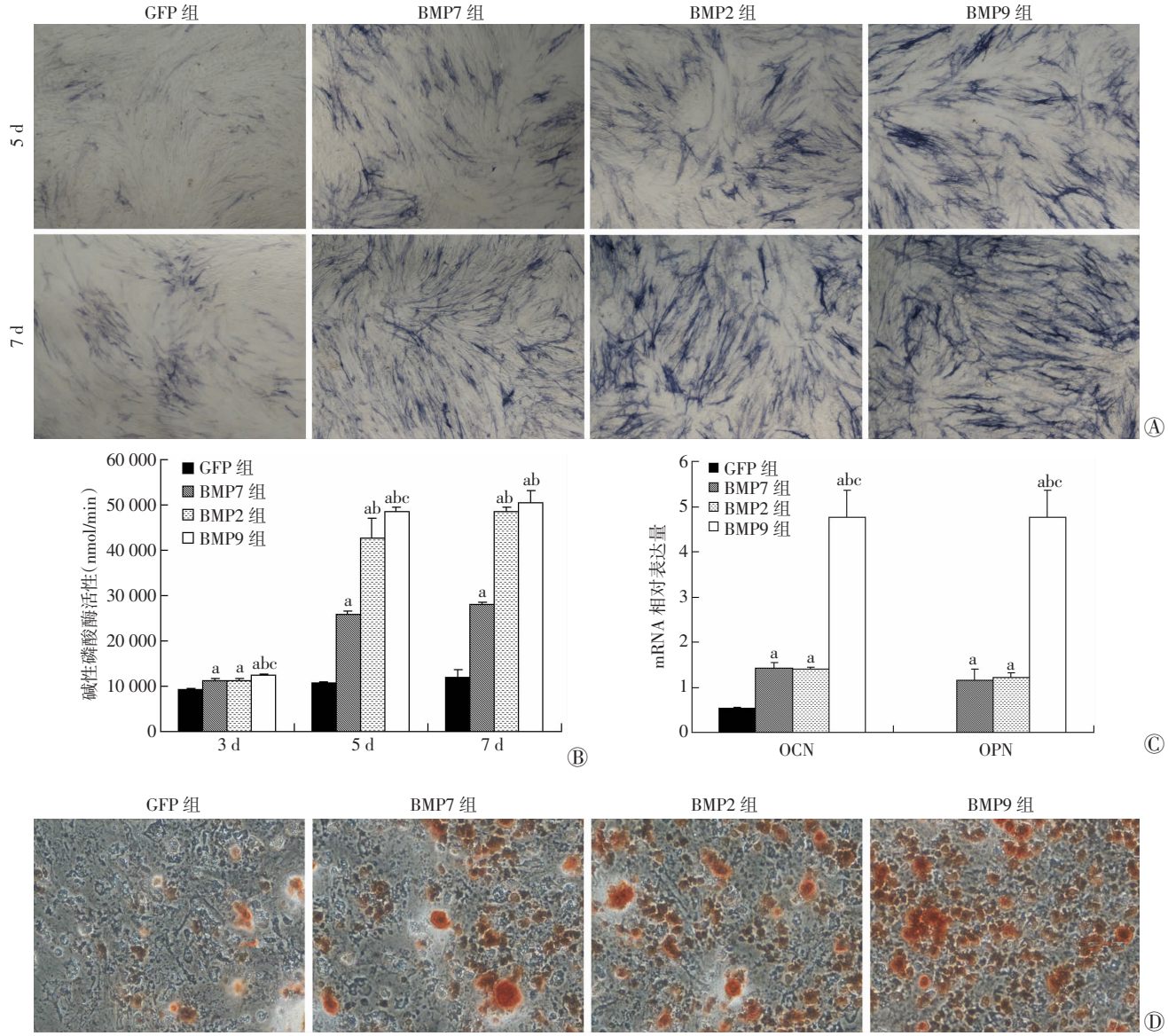
茜素红染色显示:与 GFP 组比较,BMP2、BMP7 和 BMP9 组的钙盐结节沉积均明显增多,其中 BMP9 的晚期成骨诱导作用最强(图 2D)。

通过对细胞早期成骨分化指标、晚期成骨分化指标和成骨分化相关基因的检测,说明 BMP9 促进 hPDLSCs 成骨分化作用强于 BMP2 和 BMP7,后续将以 BMP9 作为研究 BMPs-ERK5 通路的实验对象。



A:人牙周膜组织培养第 5 天(×40);B:第 2 代人牙周膜细胞(×40);C:波形蛋白表达阳性(×100);D:角蛋白表达阴性(×100);E:克隆形成实验单细胞悬液铺板(×40);F:结晶紫染色示单个细胞克隆形成(×40)

图 1　原代人牙周膜干细胞的培养及鉴定

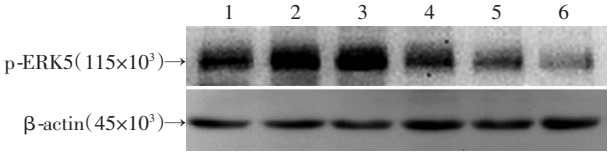


A:成骨早期分化指标碱性磷酸酶(ALP)定性染色(×40);B:碱性磷酸酶活性定量分析;C:qRT-PCR 检测成骨分化相关基因 OCN 和 OPN mRNA 的表达;D:茜素红染色检测成骨晚期分化指标钙盐沉积(×40) a:$P<0.05$,与 GFP 组比较;b:$P<0.05$,与 BMP7 组比较;c:$P<0.05$,与 BMP2 组比较

图 2 BMPs 促进 hPDLSCs 细胞成骨分化

2.3 ERK5 信号通路参与 BMP9 诱导人牙周膜干细胞成骨分化

Ad-GFP 或 Ad-BMP9 感染 hPDLSCs,经 ERK5 特异性抑制剂 BIX02189 预处理 hPDLSCs。Western blot 检测结果显示:p-ERK5 在 Ad-BMP9 组的表达较 Ad-GFP 组明显增强,且 p-ERK5 在 BIX02189 处理组的表达随着抑制剂剂量的增加而减低。说明 BMP9 可激活 ERK5 信号通路,BIX02189 可有效抑制 ERK5 通路的磷酸化激活作用且呈剂量依赖性(图 3)。



1:GFP 组;2:BMP9 组;3:BMP9 + DMSO 组;4:BMP9 + 2.5 μmol/L BIX02189 组;5:BMP9 + 5 μmol/L BIX02189 组;6:BMP9 + 10 μmol/L BIX02189 组

图 3 Western blot 检测各组细胞 p-ERK5 蛋白的表达

碱性磷酸酶染色定性和活性定量结果显示:第7天时BMP9+10 μmol/L BIX02189组和BMP9+2.5 μmol/L BIX02189组ALP表达较BMP9组明显降低,且呈剂量依赖性(图4A、B)。

qRT-PCR检测结果显示:BMP9+10 μmol/L BIX02189组和BMP9+2.5 μmol/L BIX02189组成骨分化相关基因OCN、OPN、OSX、RUNX2 mRNA表达水平较BMP9组明显降低,且呈剂量依赖性(图4C)。

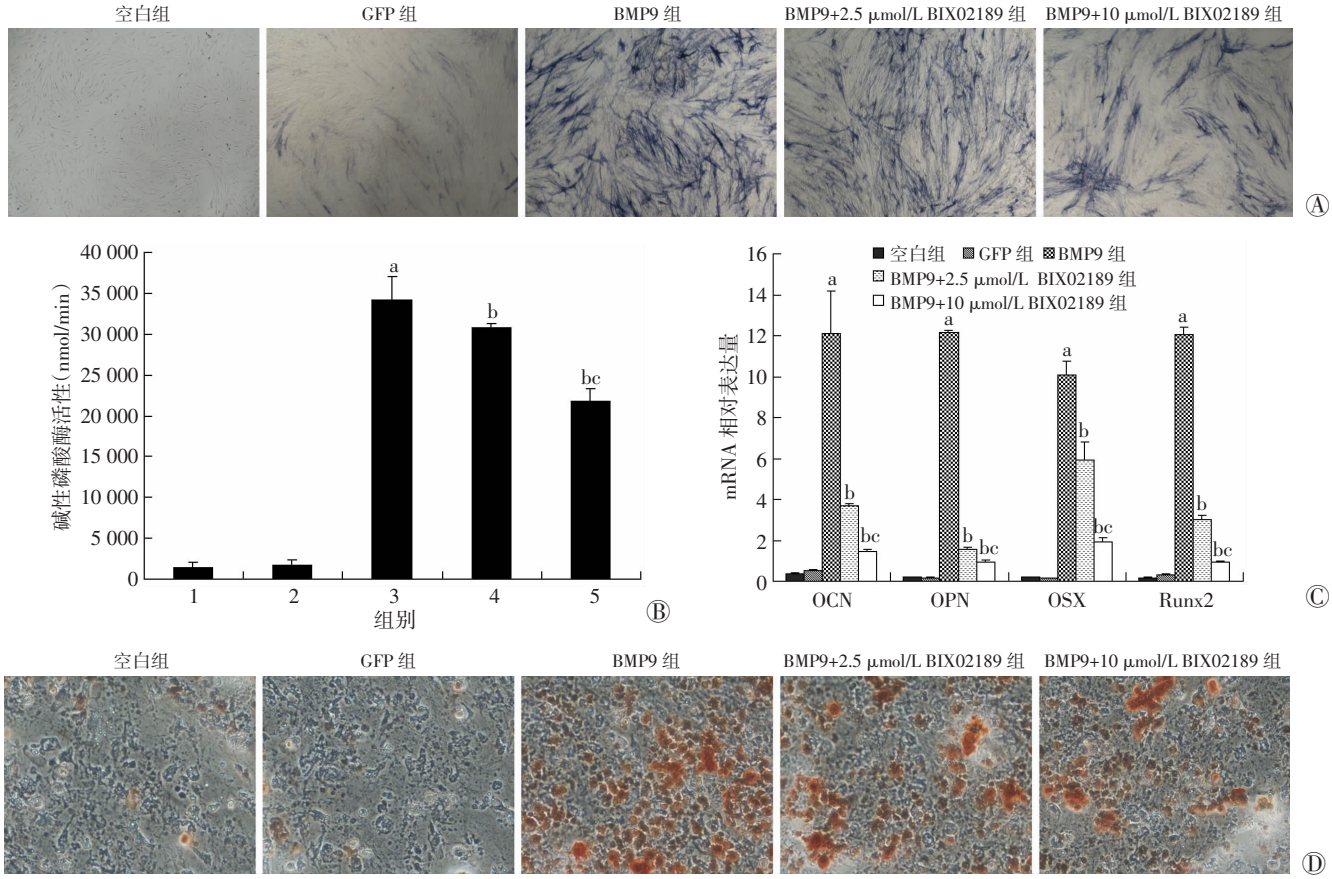
茜素红染色结果显示:第21天时BMP9+10 μmol/L BIX02189组和BMP9+2.5 μmol/L BIX02189组钙盐结节沉积较BMP9组明显减少,且呈剂量依赖性(图4D)。

通过对细胞早晚期成骨分化指标和成骨分化相关基因的检测,说明抑制ERK5信号通路可降低BMP9诱导hPDLSCs细胞的成骨分化作用。

3　讨论

目前,公认的已分离出5种牙源性干细胞[3],其中牙周韧带组织来源的牙周膜干细胞因具有成骨样、脂肪样、神经细胞样或成软骨样多向分化潜能[4]和克隆形成能力,而成为牙周组织再生最直接和最理想的种子细胞。

在干细胞成骨研究领域,骨形态发生蛋白(BMPs)是目前发现的唯一能单独诱导成骨和成软骨分化的一类生长因子,已鉴定出20余种亚型,除BMP1外均属于转化生长因子(transforming growth factor-β,TGF-β)超家族成员。其中人重组骨形态发生蛋白2(recombinant human bone morphogenetic protein 2,rhBMP2)和rhBMP7已被美国FDA批准用于临床脊柱融合术和骨折治疗[5]。随着对BMPs蛋白的深入研究,发现BMP9



A:碱性磷酸酶染色定性分析(×40);B:碱性磷酸酶染色定量分析　1:空白组;2:GFP组;3:BMP9组;4:BMP9+2.5 μmol/L BIX02189组;5:BMP9+10 μmol/L BIX02189组;C:qRT-PCR检测成骨分化相关基因OCN、OPN、OSX和Runx2 mRNA的表达;D:茜素红染色检测成骨晚期分化指标钙盐沉积情况(×40)　a:$P<0.05$,与空白组和GFP组比较;b:$P<0.05$,与BMP9组比较;c:$P<0.05$,与BMP9+2.5 μmol/L BIX02189组比较

图4　BMP9-ERK5通路调控hPDLSCs细胞成骨分化

诱导骨髓间充质干细胞成骨分化作用强于 BMP2 和 BMP7[6]。本研究比较 BMP2、BMP7 和 BMP9 对牙周膜干细胞的成骨诱导作用,结果显示 Ad-BMP9 组的早期和晚期成骨均比 Ad-BMP2 和 Ad-BMP7 组有明显增强,证实 BMP9 诱导牙周膜干细胞成骨分化的作用最强,表明其在骨生成方面将有着良好的研究意义和应用前景,因此,后续实验皆用 BMP9 作为研究 BMPs-ERK5 信号通路的蛋白代表。

经典的 BMPs 信号通路是通过 Smad 途径调控靶基因的转录表达,近年来非经典途径及与其他通路的串话调控也逐渐引起研究者的关注,如 MAPKs、Wnt、Notch、Growth hormone(GH)通路[7]等。MAPKs 信号途径是刺激信号从细胞表面到核内的重要传递者,包括 P38MAPK、ERK1/2/5、JNK 等[8]。ERK5 作为 MAPKs 家族的一个新成员,为丝/苏氨酸蛋白激酶,被磷酸化激活后从胞浆转位至胞核,与转录因子 MEF 结合增强其转录活性,可调控细胞的生长、分化、抗凋亡、血管生成等生物学功能。在细胞骨代谢方面,有研究提出 MERK1/ERK1 可能对骨生成起着正向调节作用[9],而 MERK2/ERK2 起着负向调节作用[10],ERK5 的激活可能有助于破骨前体细胞的分化[11]。但 BMP9 与 ERK5 信号通路间的作用关系对牙周膜干细胞成骨分化的影响尚不清楚。本研究结果显示:BMP9 诱导 hPDLSCs 细胞 24 h 后可引起 p-ERK5 表达明显增强,说明 BMP9 在 hPDLSCs 中可促进 ERK5 的磷酸化,从而激活 ERK5 信号通路发挥下游调控作用。当采用 ERK5 的特异性阻断剂 BIX02189 干预后,发现 ERK5 的磷酸化水平成剂量依赖性的降低,同时,BMP9 诱导 hPDLSCs 成骨分化的早期和晚期成骨标志均随着 BIX02189 的剂量增加而减低。

本研究进一步探讨了 BIX02189 干预下,BMP9 对 hPDLSCs 成骨分化相关基因的影响。Runx2 是与果蝇蛋白 Runt 同源的成骨相关转录因子,可与成骨特异顺式作用元件结合,调节 OCN、OPN、BSP 和Ⅰ型胶原基因的转录和表达,是间充质干细胞向成骨细胞分化的必要和充分条件[12]。OSX 是近年发现的成骨细胞分化和骨形成过程中所必需的另一个重要的转录因子,位于 Runx2 的下游,在成骨细胞终末分化成熟过程中发挥重要作用[13]。OPN 是一种酸性糖蛋白,与成骨过程密切相关,连接基质与矿化,是骨组织形成的早期标志。OCN 是骨基质中重要的胶原蛋白,与组织的成熟有关[14]。本研究结果显示,BMP9 刺激能明显增强 OSX 和 Runx2 两个重要转录因子 mRNA 的表达,同时 OCN 和 OPN mRNA 表达也增强,而抑制 ERK5 通路后表达均急剧下降,提示 ERK5 信号通路参与 BMP9 的成骨分化诱导过程。Lee 等[15]提出 OSX 作为 Runx2 的下游基因,BMP2 对 OSX 的诱导作用又不依赖于 Runx2 的存在,因此,在 BMP9 和 ERK5 协调作用过程中对 OSX 和 Runx2 的转录调控机制可能是决定细胞成骨分化的重要一环,值得我们深入研究。

有研究报道 ERK5 基因敲除小鼠表现为胚胎外血管和心血管发育迟缓[16],ERK5 可调节胚胎的血管生成[17],因此,BMP9 激活 ERK5 通路是否通过促进成血管作用从而增强细胞成骨分化和成熟还有待于进一步研究。

综上所述,本研究结果表明:BMP9 具有很强的促进 hPDLSCs 成骨分化作用,同时 ERK5 信号转导途径在这一过程中发挥了正向调节作用,为牙周膜干细胞分化调控研究提供了新的理论依据。

参考文献:

[1] Menicanin D, Mrozik K M, Wada N, *et al*. Periodontal-ligament-derived stem cells exhibit the capacity for long-term survival, self-renewal, and regeneration of multiple tissue types *in vivo*[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(9): 1001-1011. DOI:10.1089/scd.2013.0490

[2] Cheng H, Jiang W, Phillips F M, *et al*. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85-A(8): 1544-1552.

[3] Bojic S, Volarevic V, Ljujic B, *et al*. Dental stem cells: characteristics and potential[J]. Histol Histopathol, 2014, 29(6): 699-706.

[4] Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, *et al*. Stem cell properties of human periodontal ligament cells[J]. J Periodontal Res, 2006, 41(4):303-310. DOI:10.1111/j.1600-0765.2006.00870.x

[5] Bustos-Valenzuela J C, Fujita A, Halcsik E, *et al*. Unveiling novel genes upregulated by both rhBMP2 and rhBMP7 during early osteoblastic transdifferentiation of C2C12 cells[J]. BMC Res Notes, 2011, 4:370. DOI:10.1186/1756-0500-4-370

[6] Lamplot J D, Qin J, Nan G, *et al*. BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis[J]. Am J Stem Cells, 2013, 2(1): 1-21.

[7] Huang E, Zhu G, Jiang W, *et al*. Growth hormone synergizes with BMP9 in osteogenic differentiation by activating the JAK/

STAT/IGF1 pathway in murine multilineage cells[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(7): 1566 – 1575. DOI:10.1002/jbmr.1622

[8] Thouverey C, Caverzasio J. Focus on the p38 MAPK signaling pathway in bone development and maintenance[J]. Bonekey Rep, 2015, 4:711. DOI:10.1038/bonekey.2015.80

[9] Higuchi C, Myoui A, Hashimoto N, *et al*. Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(10): 1785 – 1794. DOI:10.1359/jbmr.2002.17.10.1785

[10] Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, *et al*. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways *in vitro*[J]. J Bone Miner Metab, 2014, 32(4): 378 – 392. DOI:10.1007/s00774-013-0514-1

[11] Amano S, Chang Y T, Fukui Y. ERK5 activation is essential for osteoclast differentiation[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0125054. DOI:10.1371/journal.pone.0125054

[12] Ducy P, Starbuck M, Priemel M, *et al*. A Cbfal-dependent genetic pathway controls bond formation beyond embryonie development[J]. Genes Dev, 1999, 13(8): 1025 – 1036.

[13] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, *et al*. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. Cell, 2002, 108(1): 17 – 29.

[14] Lian J B, Stein G S. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1992, 3(3): 269 – 305.

[15] Lee M H, Kwon T G, Park H S, *et al*. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(3):689 – 694.

[16] Regan C P, Li W, Boucher D M, *et al*. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(14): 9248 – 9253.

[17] Sohn S J, Sarvis B K, Cado D, *et al*. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression[J]. J Biol Chem, 2002, 277(45): 43344 – 43351.

(**收稿**:2015-07-31;**修回**:2015-09-07)

(编辑 张 维)