DOI:10.16016/j.1000-5404.201511008

全反式维甲酸调控 BMP9 诱导 3T3-L1 前脂肪细胞成骨和成脂分化

刘 洋,李锐冬,聂 茂,梁凯路 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院骨科)

[摘要] **目的** 研究全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)调控骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导前脂肪细胞成骨和成脂分化的作用及相关机制。**方法** 首先用 RT-PCR 检测维甲酸受体在 3T3-L1 前脂肪细胞中的表达;用 BMP9 编码序列的重组腺病毒感染 3T3-L1 细胞,再以 1 μmol/L 的 ATRA 干预不同时间后,利用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性测定和染色、Western blot 检测骨桥素(osteopontin,OPN)、骨钙素(osteocalcin,OC)和脂肪酸结合蛋白(adipocyte fatty acid binding protein,aP2)表达,茜素红染色检测钙盐沉积水平,油红 O 染色检测脂质积聚研究 BMP9 和 ATRA 对前脂肪细胞成骨和成脂分化的作用;利用荧光素酶报告质粒和 Western blot 检测 ATRA 对 BMP9 介导的 BMPR-Smad 信号通路活性的影响。**结果** 前脂肪细胞中,除视黄醇受体 γ 外其余 5 种维甲酸受体均有表达;BMP9 能增加前脂肪细胞 ALP 活性($P<0.01$),并促进 OPN 及 OC 蛋白表达和钙盐沉积,ATRA 能进一步增强该作用($P<0.01$);BMP9 能促进前脂肪细胞中脂质积聚,并诱导 aP2 表达,但该作用被 ATRA 抑制;ATRA 还能够上调细胞中 BMP9 的 mRNA 和蛋白表达,BMP9 合并 ATRA 组的 Samd1/5/8 磷酸化水平明显强于 BMP9 组,BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性也呈相同变化趋势($P<0.01$)。**结论** 在前脂肪细胞中,ATRA 能增强 BMP9 的成骨诱导活性,并抑制其诱导的成脂分化;ATRA 的作用可能与进一步激活 BMP9 介导的 BMPR-Smad 信号有关。

[关键词] 骨形态发生蛋白 9;全反式维甲酸;BMPR-Smad 信号;前脂肪细胞;细胞分化
[中图法分类号] R329.2; R341; R986 [文献标志码] A

All-trans retinoic acid regulates BMP9-induced osteogenic and adipogenic differentiation in 3T3-L1 preadipocytes

Liu Yang, Li Ruidong, Nie Mao, Liang Kailu (Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on bone morphogenetic protein 9 (BMP9)-induced osteogenic and adipogenic differentiation in preadipocytes and explore the underlying molecular mechanism. **Methods** Expression of retinoic acid receptors(RARs) in 3T3-L1 preadipocytes was measured by RT-PCR. The 3T3-L1 preadipocytes were infected by recombinant adenovirus BMP9 and treated with 1 μmol/L ATRA. Alkaline phosphatase (ALP) activities were tested at different time points (days 5, 7 and 9 after treatment). The protein level of osteopontin (OPN), osteocalcin (OC) and adipocyte fatty acid binding protein(aP2) was detected by Western blotting after treatment of BMP9 and/or ATRA for 12 d. The mineralization and lipid accumulation in preadipocytes were tested with Alizarin red staining and Oil red O staining after the treatment for 14 d. The activation of BMPR-Smad signaling was studied with BMPR-Smad binding site luciferase reporter assay, and Western blotting was performed to determine the phosphorylation of Smad1/5/8. **Results** Except retinoic X receptor γ, the other 5 subtypes of RARs were expressed in the preadipocytes. BMP9 increased the ALP activity ($P<0.01$), elevated the

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81301573);重庆市科委面上项目(CSTC2013jcyjA10090)
[通信作者] 梁凯路,电话:(023)63693558,E-mail: liang-kai-lu@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160126.1535.017.html(2016-01-26)

expression of OPN and OC as well as the deposition of mineral calcium. Addition of ATRA enhanced BMP9-induced osteogenic differentiation in the preadipocytes compared to the cells treated by BMP9 or ATRA alone ($P<0.01$). BMP9 also induced aP2 expression and fat accumulation, but this effect was suppressed by ATRA. ATRA upregulated the expression of BMP9 at mRNA and protein levels, and promoted BMP9-induced phosphorylation of Smad-1/5/8. This synergistic action of ATRA and BMP9 was consistently found in BMPR-Smad luciferase reporter assay. Luciferase activity was significantly increased in ATRA and BMP9 group compared to BMP9 alone ($P<0.05$). **Conclusion** ATRA enhances BMP9-induced osteogenic differentiation and blocks BMP9-induced adipogenic differentiation in 3T3-L1 preadipocytes, which might be partly medicated by BMP9-induced BMPR-Smad signaling.

[**Key words**] bone morphogenic protein 9; all-trans retinoic acid; BMPR-Smad signaling; preadipocytes; cell differentiation

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81301573) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2013jcyjA10090). Corresponding author: Liang Kailu, Tel: 86-23-63693558, E-mail: liang-kai-lu@163.com

研究证实,骨质疏松症(osteoporosis,OP)在骨量减少的同时还伴有过多的髓内脂肪组织生成[1-3],表明脂肪组织在 OP 的发生和发展中起着重要的病理作用。骨髓脂肪细胞和成骨细胞均来源于骨髓间充质干细胞(mechenchymal stem cells, MSCs)。在 OP 患者中,MSCs 成骨分化能力和水平明显降低,但成脂分化潜能却显著增强[4-6],表明 MSCs 的成骨和成脂分化平衡出现紊乱,MSCs 以成骨细胞数量减少为代价产生过多脂肪细胞,最终引起骨量丢失。此外,脂肪细胞还能促进破骨细胞分化成熟并增强其活性[7-9],从而促进骨吸收,进一步导致骨量减少,加重骨质疏松程度。因此,MSCs 成骨和成脂分化失衡导致脂肪细胞异常增多是 OP 发生的重要原因之一。

在成脂分化过程中,MSCs 首先分化为前脂肪细胞,随后前脂肪细胞再进一步分化成熟。那么,如果以前脂肪细胞为靶点,寻找一种有效的细胞因子诱导该细胞转分化为成骨细胞,则不仅能减少髓内脂肪,还能增加成骨细胞数量以促进骨形成和修复,有望提供一种治疗 OP 的新策略。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)属于转化生长因子超家族成员,现已经鉴别出 20 多种 BMPs,其中多种亚型均具有较强的成骨诱导作用。近期研究发现,BMP9 是目前发现的 BMPs 中成骨诱导活性最强的因子[10-11]。由于前脂肪细胞并不具备与 MSCs 相似的多向分化潜能,因此 BMP9 是否能诱导该细胞成骨分化目前并不明确。维甲酸(retinoic acid,RA)是维生素 A 的代谢中间产物,RA 信号已被证实具有促进成骨和抑制成脂的生物学活性。基于此,本研究探讨了 BMP9 和 RA 信号在诱导前脂肪细胞成骨和成脂分化中的作用,并对相关分子机制进行了初步探索,为寻求一种治疗 OP 的新方法提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

BMP9 重组腺病毒(AdBMP9)、绿色荧光蛋白重组腺病毒(AdGFP)利用 AdEasy 系统构建[12];荧光素酶报告质粒 p12xSBE-Luc 由芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠;小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC);全反式维甲酸(all-trans retinoic acid,ATRA)购自 Sigma 公司,采用二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)化学发光检测试剂盒购自 BD 公司,采用 Promega 光度计(GloMax20/20)测定;ALP 染色试剂盒购自碧云天公司;茜素红 S 及油红 O 染料购自 Sigma 公司;实验所用抗体均购自 Santa Cruz 公司;DMEM 高糖培养基和优质胎牛血清购自 Hyclone 公司;Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司。

1.2 实验分组

分为 ATRA 处理组、AdBMP9 处理组及 ATRA 合并 AdBMP9 处理组,以 DMSO 或 AdGFP 处理为对照组,ATRA 处理终浓度为 1 μmol/L。将细胞铺于 24 或 6 孔板时,初始密度为 30%,重组腺病毒感染效率为 20%。

1.3 细胞培养和 ALP 活性测定及染色

3T3-L1 前脂肪细胞采用 DMEM 高糖培养基培养(含 10% 胎牛血清、青霉素 100 kU/L 和链霉素 100 mg/L),培养条件为 5% CO_2 及 37 ℃。用 1 μmol/L 的 ATRA 和 1% DMSO 预处理细胞,随后用 AdGFP 或 AdBMP9 感染细胞。处理 5、7、9 d 后,对 ALP 活性进行测定。

同时,利用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒于处理第 7 天进行 ALP 染色(按试剂盒说明书进行操作)。

1.4 钙盐沉积实验

将细胞接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后按 1.2 处理细胞,并加入成骨诱导培养基,连续培养 14 d 后用茜素红 S 进行染色:弃去培养基,PBS 洗 1 次,加入 200 μL/孔 0.05% 戊二醛固定 10 min,以去离子水洗 1 次,加入 250 μL/孔 0.4% 茜素红 S 溶液,观察有红色物质堆积时弃去染液,用去离子水终止染色,在显微镜下成像。

1.5 油红 O 染色

用异丙醇配制 0.5% 的油红 O 染液为储存液,使用时将其以 3∶2 的比例与蒸馏水混合为工作液。将 3T3-L1 细胞用不同因素处理 14 d 后,用 PBS 冲洗,10% 甲醛固定 10 min,然后用去离子水洗 1 次,加入 250 μL/孔油红 O 工作液染色 30 min,用去离子水终止染色,在显微镜下成像。

1.6 Western blot

3T3-L1 细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后按 1.2 处理细胞,在相应时间点提取细胞裂解液,然后经 SDS PAGE、转膜、BSA 封闭、4 ℃敷一抗过夜、37 ℃敷二抗 1 h 等过程后,显影成像保存。

1.7 荧光素酶报告基因的检测

将细胞接种于 T25 培养瓶中,贴壁后用 Lipofectamine 转染 BMPR-Smad 结合位点荧光素酶报告质粒 p12xSBE-Luc 3 μg,4 h 后换液。12 h 后将细胞消化重新种于 24 孔板,贴壁后加入不同处理因素。24 h 后,裂解细胞并按照试剂盒说明进行荧光素酶活性测定。

1.8 RT-PCR

将指数生长的 3T3-L1 细胞接种于 T25 培养瓶中,贴壁后加入不同处理因素处理细胞。在相应时间点采用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取总 RNA,通过 RT-PCR 制备 cDNA,利用 PCR 检测目的基因表达情况。所用引物见表 1。

表 1 引物序列

基因	上游(5′-3′)	下游(5′-3′)
RARα	TCTCCCTGGACATTGACCTC	GTGTCTTGCTCAGGCGTGTA
RARβ	AATGCCACCTCTCATTCAGG	GAATGTCTGCAACAGCTGGA
RARγ	AGGCAGCAGACTGACCATTT	TTCTGGTAGGTGTGCAGCAG
RXRα	ACCCAGTTAGGGTGGGAATC	AACTGGGGGACATGACAGAG
RXRβ	GGCAACACTTAGCAGGGTTC	GCCAAATGAGAAGGAAGCAG
RXRγ	TGTGGTCAACAGTGTCAGCA	AGAAGCCTTTGCAACCTTCA
BMP9	TTCCTTCAGAGCAAACAGCA	GTTGTGCTCAAATCCCCATT
GAPDH	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG

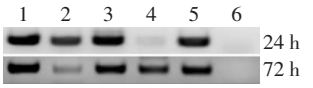
1.9 统计学分析

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Excel 统计软件进行数据整理和统计。所有实验均重复 3 次,两组间比较采用 t 检验,采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。以 $P<0.05$ 视为有统计学差异。

2 结果

2.1 维甲酸受体在 3T3-L1 前脂肪细胞中的内源性表达情况

应用 RT-PCR 检测了 3T3-L1 细胞中内源性 RARs 和 RXRs 表达情况。结果如图 1 所示:在 3T3-L1 细胞中,RARα、RARβ、RARγ 和 RXRβ 有稳定的内源性表达;继续培养至 3 d,RARβ 表达下降,RXRα 表达增加;细胞中未检测到 RXRγ 的表达。

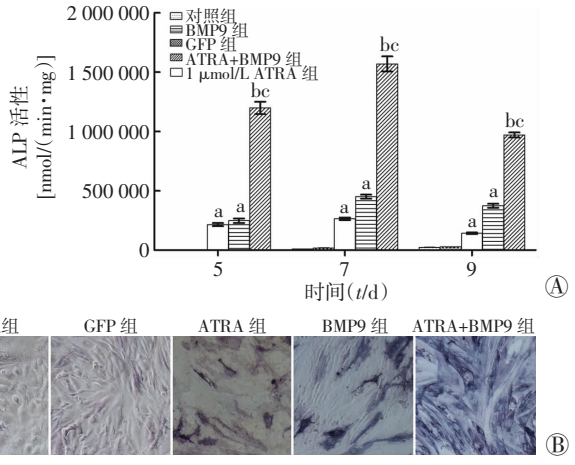


1:RARα(196 bp);2:RARβ(180 bp);3:RARγ(185 bp);4:RXRα(185 bp);5:RXRβ(183 bp);6:RXRγ(185 bp)

图 1 RT-PCR 检测 3T3-L1 前脂肪细胞中内源性维甲酸受体 mRNA 表达情况

2.2 ATRA 增强 BMP9 诱导的 3T3-L1 前脂肪细胞 ALP 活性

ALP 活性测定结果显示 ATRA 和 BMP9 都能诱导 3T3-L1 细胞早期成骨指标 ALP 活性上升,在二者联合刺激时 ALP 活性增加更为明显($P<0.05$,图 2A)。ALP 染色也得到了一致的结果:ATRA + BMP9 组染色结果明显强于 ATRA 或 BMP9 单独刺激组(图 2B)。

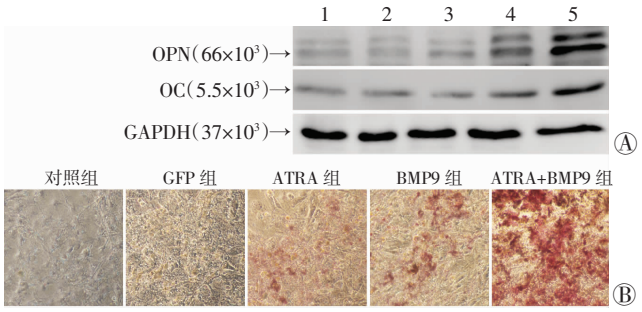


A:诱导 5、7 和 9 d 后 ALP 活性检测结果;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 ATRA 组比较;c:$P<0.01$,与 BMP9 组比较;B:组织学染色观察各处理组 7 d 时 ALP 表达水平(×100)

图 2 ATRA 促进 BMP9 诱导前脂肪细胞 ALP 活性增加

2.3　ATRA 促进 BMP9 诱导的 3T3-L1 前脂肪细胞晚期成骨分化标志物 OPN 和 OC 表达及钙盐沉积

如图3A 所示:处理12 d 后,ATRA 未能明显刺激晚期成骨指标骨桥素(osteopontin,OPN)和骨钙素(osteocalcin,OC)的表达,而 BMP9 可在一定程度上增加 OPN 和 OC 表达;ATRA 和 BMP9 联合刺激后,OPN 和 OC 的表达进一步增强。茜素红 S 染色结果显示(图3B),ATRA 显著增加了 BMP9 诱导细胞产生钙结节的作用。

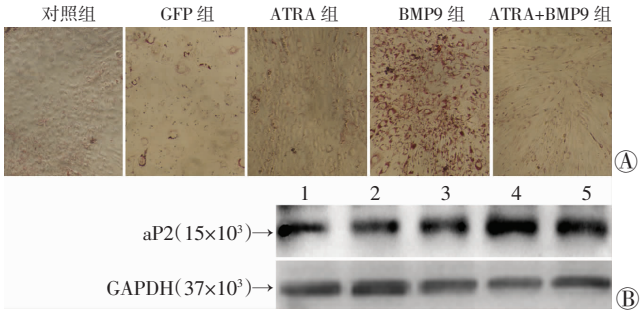


A:处理 12 d 后前脂肪细胞成骨晚期标志物 OPN 和 OC 的蛋白表达　1:对照组;2:GFP 组;3:ATRA 组;4:BMP9 组;5:ATRA + BMP9 组;B:茜素红 S 染色观察钙盐沉积情况(×100)

图3　ATRA 促进 BMP9 诱导的前脂肪细胞晚期成骨分化

2.4　ATRA 抑制 BMP9 诱导的 3T3-L1 前脂肪细胞脂质集聚和成脂标志物 aP2 表达

油红 O 染色结果显示:BMP9 能明显促进前脂肪细胞中脂质积聚;而 ATRA 和 BMP9 共同处理后,细胞中脂质与 BMP9 单独处理组相比明显减少(图4A)。此外,BMP9 明显促进了成脂标志物 aP2 的表达,但该作用被 ATRA 明显抑制(图4B)。

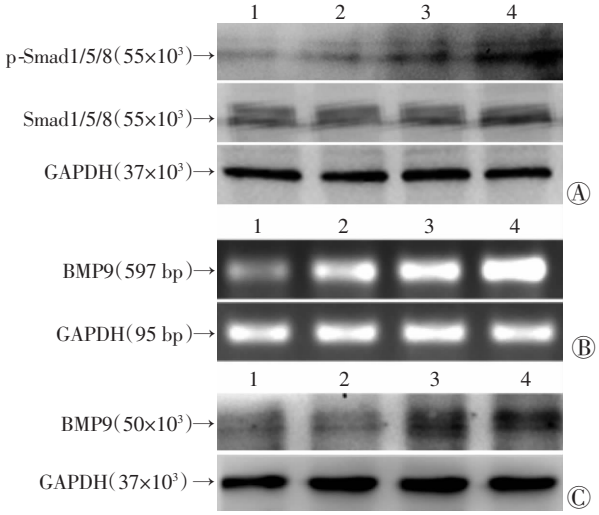


A:油红 O 染色观察前脂肪细胞中脂质积聚情况(×100);B:前脂肪细胞成脂分化标志物 aP2 的蛋白表达　1:对照组;2:GFP 组;3:ATRA 组;4:BMP9 组;5:ATRA + BMP9 组

图4　ATRA 促进 BMP9 诱导的前脂肪细胞晚期成骨分化

2.5　ATRA 增强 BMP9 在 3T3-L1 细胞中介导的 BMPR-Smad 信号活性并诱导 BMP9 表达

与对照组(3 208.2 ± 714.6)相比,BMP9 能明显增加 BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性(339 543.4 ± 21 994.8)($P<0.05$),ATRA 也能增加 BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性(54 535.4 ± 10 235.9)($P<0.05$);BMP9 与 ATRA 合用后,BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性(480 886.0 ± 39 497.6)较 BMP9 组明显增加($P<0.05$);Smad-1/5/8 磷酸化检测结果也呈现相同变化趋势;最后,RT-PCR 和 Western blot 结果还显示 ATRA 能够上调前脂肪细胞中 BMP9 的基因和蛋白表达(图5)。



A: Smad1/5/8 磷酸化水平检测结果　1:对照组;2:ATRA 组;3:BMP9 组;4:ATRA + BMP9 组;B、C:BMP9 的 mRNA 表达和蛋白表达　1:对照组;2~4:ATRA 组

图5　ATRA 增强 BMP9 在前脂肪细胞中介导的 BMPR-Smad 信号通路活性

3　讨论

众多研究结果表明,骨髓内脂肪组织异常增生与 OP 的发生发展密切相关[1-3]。脂肪细胞和成骨细胞均来源于 MSCs,MSCs 成骨和成脂分化受到特定细胞因子和相关激素的调控,例如在成骨转录因子 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2,Runx2)、Osterix 和远端缺失同源盒 5(distal-less homeobox5,DLX5)的调控下 MSCs 进行成骨分化,而过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ(peroxisome proliferator activated receptor γ, PPARγ)和 CCAAT/增强子结合蛋白(CCAAT/enhance binding proteins,C/EBPs)等转录因子则促使 MSCs 脂向分化[13]。二者在生理情况下呈现为一种稳定和平衡的状态。而在病理情况下,MSCs 成骨和成脂分化可能出现失衡,最终以成骨细胞减少为代价生成过多脂肪细胞。在成脂分化过程

中,MSCs 首先定向分化为前脂肪细胞,那么如能以前脂肪细胞为靶点,诱导其成骨分化,则不仅能减少脂肪细胞数量,同时还能促进成骨,有望为 OP 提供一种新的治疗策略。

目前,已有研究证实了前脂肪细胞的成骨分化潜能。Justesen 等[14]报道,皮下前脂肪细胞在体内外均能转分化为成骨细胞;另有研究显示,人骨髓脂肪细胞能够向成骨方向分化,但分化前需要先诱导脂肪细胞成为纤维细胞样的前脂肪细胞[15]。然而,目前调控前脂肪细胞成骨分化的相关细胞因子及分子机制并未完全明确。有研究显示,3T3-F442A 前脂肪细胞能够表达 BMP 受体,并且 BMP2 在该细胞成骨分化过程中起着重要的作用[16-17]。此外,在 3T3-L1 前脂肪细胞中过表达 BMP2 信号的下游靶基因 Runx2,能够有效地诱导其向成骨细胞转分化[18]。Liu 等[19]研究发现,富含血小板血浆(platelets-rich plasma,PRP)能够诱导 3T3-L1 前脂肪细胞成骨分化,而该作用部分是通过 PRP 上调细胞中 BMP2 的表达实现的。这些研究结果表明,前脂肪细胞在 BMP2 信号的刺激下能够转分化为成骨细胞。因 BMP9 是 BMPs 家族中诱导成骨能力最强的细胞因子,故我们推测其同样可能诱导前脂肪细胞向成骨细胞转分化。本研究中,BMP9 被证实确能显著提高前脂肪细胞中早期成骨指标 ALP 的活性,并诱导其表达晚期成骨标志物 OPN 和 OC 和促进钙盐沉积。然而,BMP9 同时也被发现亦能促进前脂肪细胞中脂质沉积并表达成脂特异性标志物。以上结果提示,BMP9 对前脂肪细胞成骨和成脂分化具有双向诱导作用,而为了进一步对该作用进行调控,则还需其他信号分子参与。

RA 是维生素 A 的衍生物,在胚胎发育和维持重要器官功能中发挥着关键作用,其中 ATRA 是体内 RA 的主要存在形式。RA 的生物效应由 RA 受体介导,该受体是细胞核受体超家族成员[20],主要分为 RAR 和 RXR,其中每种受体又分为 α、β、γ 3 种亚型。RA 信号存在时,RAR 和 RXR 形成异二聚体与调节性的 DNA 元件结合从而导致下游一系列级联反应,通过招募共同激活因子启动靶基因转录[21]。现已有许多研究表明 RA 信号对 BMP 诱导的干细胞或前脂肪细胞的成骨和成脂分化有重要影响[17,22-30],因此我们进一步探讨了 ATRA 对 BMP9 诱导的前脂肪细胞成骨和成脂分化的影响。首先,我们检测了 RAR 和 RXR 在 3T3-L1 细胞中的表达,结果显示除 RXRγ 之外,其余五种受体均有明显表达。由于 ATRA 是通过与 RARs 结合进行信号转导,故 RXRγ 表达缺失并不会影响 ATRA 激活 RA 信号,该结果为后续实验提供了可行性基础。下一步研究结果显示,在前脂肪细胞中,ATRA 不仅能增强 BMP9 的成骨诱导活性,同时还抑制了 BMP9 诱导的成脂分化,该结果与之前许多研究相一致。尽管总体上 RA 表现为促进 BMP 诱导的骨形成和抑制 BMP 诱导的脂肪形成,但 RA 对 BMP 生物学活性的影响仍存有争议。近期研究显示,ATRA 能够和 BMP 信号共同促进鼠骨髓基质细胞和胚胎腭突间充质细胞的成脂分化并抑制其成骨分化[27-28]。该结果提示,RA 对 BMP 信号的调控作用可能与细胞种类相关。

最后,我们对 ATRA 调控 BMP9 诱导前脂肪细胞分化的可能分子机制进行了初步探讨。与其它 BMPs 转导信号的方式相似,BMP9 亦与由Ⅰ型和Ⅱ型 BMPR 形成的丝氨酸苏氨酸激酶受体结合,以促进磷酸化的方式激活胞内 Smad 信号通路中的受体激活 Smads 分子(receptor-activated smads,R-Smads)Smad1/5/8[31]。被激活的 R-Smads(p-Smad1/5/8)与共介导 Smad(common-mediated Smad,C-Smad)分子 Smad4 结合形成复合体,随后进入细胞核内与不同的 DNA 链接蛋白结合激活下游靶基因的转录,从而诱导细胞分化。因此,笔者检测了 ATRA 对 BMP9 在前脂肪细胞中介导的 Smad 信号的影响。结果发现,BMP9 能有效激活前脂肪细胞中 BMPR-Smad 信号,ATRA 则能进一步增强 BMP9 介导的该信号的活性,而 ATRA 发挥该作用则可能通过上调细胞中 BMP9 表达实现。由于 BMP9 表现为对前脂肪细胞成骨和成脂分化的双向促进作用,所以 ATRA 增强 BMP9 成骨诱导的作用可能与促进 BMPR-Smad 信号转导有关。而 ATRA 抑制 BMP9 诱导成脂的作用则可能与 RA 信号本身能抑制成脂相关转录因子活性的生物学功能相关[32]。实际上,目前已经有许多研究结果表明 RA 对 BMPs 介导的 Smad 信号起着正向调控作用[29,33-35],但关于 RA 对 Smad 信号的调控作用目前仍存争议。例如,有研究报道 RA 能够明显抑制 BMP4 激活的 Smad 信号,从而阻止 BMP4 诱导 C3H10T1/2 细胞成脂分化[26]。Sheng 等[36]则通过研究提出,RA 能够增强 p-Smad1 和其泛素 E3 连接酶之间的相互作用,从而导致 p-Smad1 的泛素化和蛋白酶体降解,最终抑制 BMPR-Smad 信号通路。目前,产生这些不一致结果的原因和具体机制尚未完全阐明,但可以明确的是 RA 对 Smad 信号的具体影响与细胞种类、细胞分化程度和细胞所处的体内外环境有密切关系。

通过细胞实验,本研究发现 ATRA 能调控 BMP9

介导的前脂肪细胞成骨和成脂分化,并初步探讨了相关分子机制,本课题组将进一步通过动物实验对该生物学现象进行验证并探寻其具体调控机制,从而为深入了解 BMP9 的生理学功能提供新的实验和理论依据,并有望为 OP 等骨质减少类疾病开创一种新的治疗策略。

参考文献:

[1] Justesen J, Stenderup K, Ebbesen E N, *et al*. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis[J]. Biogerontology, 2001, 2(3): 165-171.

[2] Verma S, Rajaratnam J H, Denton J, *et al*. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(9): 693-698.

[3] Burkhardt R, Kettner G, Bohm W, *et al*. Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study[J]. Bone, 1987, 8(3): 157-164.

[4] Astudillo P, Rios S, Pastenes L, *et al*. Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) characterizes by impaired leptin action[J]. J Cell Biochem, 2008, 103(4): 1054-1065. DOI:10.1002/jcb.21516

[5] Rodriguez J P, Astudillo P, Rios S, *et al*. Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2008, 3(3): 208-218.

[6] Rodriguez J P, Montecinos L, Rios S, *et al*. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation[J]. J Cell Biochem, 2000, 79(4): 557-565.

[7] Goto H, Hozumi A, Osaki M, *et al*. Primary human bone marrow adipocytes support TNF-α-induced osteoclast differentiation and function through RANKL expression[J]. Cytokine, 2011, 56(3): 662-668. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.09.005

[8] Hozumi A, Osaki M, Goto H, *et al*. Bone marrow adipocytes support dexamethasone-induced osteoclast differentiation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 382(4): 780-784. DOI:10.1016/j.bbrc.2009.03.111

[9] Sakaguchi K, Morita I, Murota S. Relationship between the ability to support differentiation of osteoclast-like cells and adipogenesis in murine stromal cells derived from bone marrow[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2000, 62(5): 319-327. DOI:10.1054/plef.2000.0161

[10] 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. DOI:10.1089/scd.2008.0130

[11] 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.

[12] 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

[13] Zhang Y, Khan D, Delling J, *et al*. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. ScientificWorldJournal, 2012, 2012: 793823. DOI: 10.1100/2012/793823

[14] Justesen J, Pedersen S B, Stenderup K, *et al*. Subcutaneous adipocytes can differentiate into bone-forming cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Tissue Eng, 2004, 10(3/4):381-391.

[15] Park S R, Oreffo R O, Triffitt J T. Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro[J]. Bone, 1999, 24(6): 549-554.

[16] Ji X, Chen D, Xu C, *et al*. Patterns of gene expression associated with BMP-2-induced osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal progenitor cell 3T3-F442A[J]. J Bone Miner Metab, 2000, 18(3): 132-139.

[17] Skillington J, Choy L, Derynck R. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes[J]. J Cell Biol, 2002, 159(1): 135-146. DOI:10.1083/jcb.200204060

[18] Takahashi T. Overexpression of Runx2 and MKP-1 stimulates transdifferentiation of 3T3-L1 preadipocytes into bone-forming osteoblasts in vitro[J]. Calcif Tissue Int, 2011, 88(4): 336-347. DOI:10.1007/s00223-011-9461-9

[19] Liu H Y, Wu A T, Tsai C Y, *et al*. The balance between adipogenesis and osteogenesis in bone regeneration by platelet-rich plasma for age-related osteoporosis[J]. Biomaterials, 2011, 32(28):6773-6780. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.080

[20] Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, *et al*. The nuclear receptor superfamily: the second decade[J]. Cell, 1995, 83(6): 835-839.

[21] Germain P, Iyer J, Zechel C, *et al*. Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy[J]. Nature, 2002, 415(6868): 187-192. DOI:10.1038/415187a

[22] Hisada K, Hata K, Ichida F, *et al*. Retinoic acid regulates commitment of undifferentiated mesenchymal stem cells into

osteoblasts and adipocytes[J]. J Bone Miner Metab, 2013, 31(1): 53 - 63. DOI:10.1007/s00774-012-0385-x

[23] Wan D C, Shi Y Y, Nacamuli R P, *et al*. Osteogenic differentiation of mouse adipose-derived adult stromal cells requires retinoic acid and bone morphogenetic protein receptor type IB signaling[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(33): 12335 - 12340. DOI:10.1073/pnas.0604849103

[24] Sun F, Pan Q, Wang J, *et al*. Contrary effects of BMP-2 and ATRA on adipogenesis in mouse mesenchymal fibroblasts[J]. Biochem Genet, 2009, 47(11/12): 789 - 801. DOI:10.1007/s10528-009-9277-8

[25] Oki Y, Watanabe S, Endo T, *et al*. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can trans-differentiate into osteoblasts in vitro and in vivo only by all-trans retinoic acid [J]. Cell Struct Funct, 2008, 33(2): 211 - 222.

[26] Lee J S, Park J H, Kwon I K, *et al*. Retinoic acid inhibits BMP4-induced C3H10T1/2 stem cell commitment to adipocyte via downregulating Smad/p38MAPK signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 409(3): 550 - 555. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.05.042

[27] Chen M, Huang H Z, Wang M, *et al*. Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of mouse embryonic palate mesenchymal cells[J]. Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol, 2010, 88(11): 965 - 970. DOI:10.1002/bdra.20723

[28] Wang A, Ding X, Sheng S, *et al*. Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 375(3): 435 - 439. DOI:10.1016/j.bbrc.2008.08.036

[29] Zhang W, Deng Z L, Chen L, *et al*. Retinoic acids potentiate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells [J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11917. DOI: 10.1371/journal.pone.0011917

[30] 黄帆, 刘映孜, 杨秋珺, 等. 全反式维甲酸增强骨形态蛋白9诱导间充质干细胞成骨分化作用[J]. 第三军医大学学报,2013,35(4):328 - 331. DOI:10.16016/j.1000-5404.2013.04.025

[31] Xu D J, Zhao Y Z, Wang J, *et al*. Smads, p38 and ERK1/2 are involved in BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells[J]. BMB Rep, 2012, 45(4): 247 - 252.

[32] Schwarz E J, Reginato M J, Shao D, *et al*. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(3): 1552 - 1561.

[33] Chen W, Jia W, Wang K, *et al*. Retinoic acid regulates germ cell differentiation in mouse embryonic stem cells through a Smad-dependent pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418(3): 571 - 577. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.01.078

[34] Li X, Schwarz E M, Zuscik M J, *et al*. Retinoic acid stimulates chondrocyte differentiation and enhances bone morphogenetic protein effects through induction of Smad1 and Smad5[J]. Endocrinology, 2003, 144(6): 2514 - 2523. DOI:10.1210/en.2002-220969

[35] Hallahan A R, Pritchard J I, Chandraratna R A, *et al*. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect[J]. Nat Med, 2003, 9(8): 1033 - 1038. DOI:10.1038/nm904

[36] Sheng N, Xie Z, Wang C, *et al*. Retinoic acid regulates bone morphogenic protein signal duration by promoting the degradation of phosphorylated Smad1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(44): 18886 - 18891. DOI: 10.1073/pnas.1009244107

(**收稿**:2015-11-02;**修回**:2015-12-13)

(编辑 张 维)