DOI:10.16016/j.1000-5404.202001048

体外激活骨细胞 Notch 信号对骨髓基质细胞成骨分化的影响

谢映春,涂小林 400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院骨发育与再生平台

[**摘要**] **目的** 探究体外激活骨细胞 Notch 信号对骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)成骨分化的影响。**方法** 设置 Cre 重组腺病毒(Ad-Cre)及对照腺病毒 GFP(Ad-GFP),分别转染 $Rosa^{Notch}$ 小鼠骨细胞后与野生 C57BL/6 小鼠 BMSCs 共培养为 Ad-Cre 组及 Ad-GFP 组,设置仅 BMSCs 为 Blank 组。碱性磷酸酶染色及生化定量测定碱性磷酸酶(ALP);qPCR 检测转染后骨细胞 Notch 信号靶基因及共培养产物成骨相关标志物、Notch 信号配体及成血管相关标志物,茜素红染色检测成骨诱导 21 d 钙盐沉积水平。**结果** Ad-Cre 成功激活 $Rosa^{Notch}$ 小鼠骨细胞 Notch 信号,ALP 染色及生化定量结果显示 Ad-Cre 组 ALP 表达相较 Ad-GFP 组及 Blank 组显著降低($P<0.05$),Ad-GFP 组与 Blank 组间无统计学差异;qPCR 结果显示 Ad-Cre 组共培养产物成骨标志物 ALP、核心结合因子 a1(Runx2)、特异性骨转化因子(Ostrix)及 Notch 配体 Dll4 mRNA 转录水平相较 Ad-GFP 组及 Blank 组显著降低($P<0.05$),Jag1 mRNA 转录水平显著降低($P<0.05$);血管内皮生长因子(VEGF)、低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1α,HIF1α)、血小板内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31/PECAM-1)及内皮粘蛋白(endomucin, EMCN)mRNA 转录水平相较 Ad-GFP 组及 Blank 组显著增高($P<0.05$);茜素红染色结果显示 Ad-Cre 组在成骨诱导培养基作用 21 d 后钙盐沉积水平相较 Ad-GFP 组及 Blank 组显著降低。**结论** 体外激活骨细胞 Notch 信号抑制骨髓基质细胞成骨分化。

[**关键词**] 骨细胞;Notch 信号;骨髓基质细胞;成骨分化
[**中图法分类号**] R322.71; R329.2; R394-33 [**文献标志码**] A

Impact of activating Notch signaling in osteocytes on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells *in vitro*

XIE Yingchun, TU Xiaolin Bone Development and Regeneration Platform, Life Sciences Institute, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and underlying mechanism of activating Notch signaling in osteocytes on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs). **Methods** The osteocytes derived from $Rosa^{Notch}$ mice were infected with recombinant adenovirus expressing Cre or GFP respectively, and then the obtained cells were co-cultured with BMSCs isolated from wild-type C57BL/6 mice, and named as Ad-Cre group and Ad-GFP group, with a BMSCs group without any treatment as blank control. Alkaline phosphatase (ALP) staining and detection of ALP relative activity were used to measure the expression of ALP. The mRNA expression levels of the target genes in osteocyte of $Rosa^{Notch}$ and ligands of Notch signaling, osteogenic markers, and angiogenic makers in the co-cultured product were detected by qPCR. Alizarin red staining was applied to test the matrix mineralization on day 21. **Results** Infection of recombinant adenovirus Ad-Cre could successfully activate Notch signaling. ALP staining and detection of ALP activity showed that the expression level of ALP was significantly lower in the Ad-Cre group than the

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81672118)
[**通信作者**] 涂小林,E-mail:xiaolint@hotmail.com

Ad-GFP group and Blank group ($P<0.05$), and there was no statistical difference in the level between the latter 2 groups. The results of qPCR indicated that the mRNA levels of osteogenic makers ALP, Osterix, Runx2 and Notch ligand Dll4 were deceased significantly, while those of Jag1, VEGF, hypoxia-inducible factor 1α (HIF1α), platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31/PECAM-1), and endomucin (EMCN) were statistically increased in the Ad-Cre group when compared with the Ad-GFP group and Blank group ($P<0.05$). Alizarin red staining displayed that the Ad-Cre group had more calcium deposition in 21 d after co-culture than the Ad-GFP group and blank group ($P<0.05$). **Conclusion** Activating Notch signaling in osteocytes inhibits osteogenic differentiation of BMSCs *in vitro*.

[**Key words**] osteocytes; Notch signaling; bone marrow stromal cells; osteogenic differentiation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81672118). Corresponding author: TU Xiaolin, E-mail: xiaolint@hotmail.com

Notch 信号属五大基础发育信号,经典 Notch 信号主要由 Notch 配体(Jag1, Jag2, Delta-like1、3、4)及 Notch 受体(Notch1~4)组成[1-2],在细胞增殖、分化、迁移、凋亡等生理过程中具有重要作用[3-6]。Notch 配体结合膜受体经 furin 样转化酶(furin-like convertase)、金属蛋白酶(metalloprotease, ML)/肿瘤坏死因子-α 转换酶(TNF-α converting enzyme, TACE)及 r-分泌酶(r-secretase)水解后形成可溶性 Notch 胞内结构域(NICD)转移至细胞核,上调下游 Hes 家族及 Hey 家族靶基因的表达激活 Notch 信号[7-8]。

骨髓间充质干细胞/基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)具有强大的增殖及多向分化的潜能,可形成成纤维细胞克隆集落(CFU-F)或骨、软骨类似聚集体[9],被广泛用于骨组织工程基础及临床研究。骨细胞由间充质干细胞/基质细胞经历成骨细胞分化而来,占骨骼细胞的 90%~95%[10],形成能及时响应激素和机械变化的特殊网管结构,动态调控骨微环境影响 BMSCs 成骨分化[11-12]。近年来大量研究证实,骨细胞亦具有分泌功能,其本身及分泌的生物因子能产生特定微环境直接或间接影响骨髓基质细胞成骨分化及部分骨科疾病的发生发展[13-16]。

激活骨细胞 Notch 信号突变鼠表型不一:有研究发现激活骨细胞 Notch 信号导致骨髓基质细胞成骨分化成熟障碍导致骨量增加[17-18];另有研究发现激活骨细胞 Notch 信号可抑制祖细胞向成骨分化导致骨量降低[19-22]。为了明确激活骨细胞 Notch 对 BMSCs 成骨分化的影响,本研究在体外利用 Ad-Cre 激活 Notch 信号的骨细胞与 BMSCs 共培养观察其对成骨分化的影响,并探究潜在的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验小鼠 4~6 周龄野生 C57BL/6 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心;4~6 周龄 $Rosa^{Notch}$ 小鼠购自美国 Jackson 实验室,由重庆医科大学实验动物中心代养繁殖。$Rosa^{Notch}$ 老鼠携带靶向构建编码 NICD 的 DNA 序列的 Rosa26 基因座,前部携带可经 Cre 工具酶作用后缺失导致可溶性 Notch 胞内结构域(NICD)组成型表达的双侧 loxP 位点修饰的 STOP 盒。实验过程中所有动物实验操作符合重庆医科大学动物实验中心伦理及操作要求。

1.1.2 主要试剂 完全培养基:10%胎牛血清(FBS, Gibco)+89% α-MEM/DMEM/F12-DMEM/DMEM(HyClone)+1%青霉素-链霉素(PS, HyClone);0.25%胰蛋白酶(HyClone);Ad-Cre、Ad-GFP(重庆德诺和生物科技);BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色及碱性磷酸酶检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天);TRIzol(Invitrogen);逆转录试剂盒、Syber Green Supermix(大连宝生物公司),Vit C、β-磷酸甘油、地塞米松、茜素红(塞米克)、qPCR 引物由上海生工设计并由武汉金斯瑞生物科技有限公司合成,具体引物序列见表 1、2。

表 1 Notch 信号靶基因、配体引物序列

基因	正义链(5′→3′)	反义链(5′→3′)
GAPDH	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA
Hes1	TACCCCAGCCAGTGTCAACA	TCCATGATAGGCTTTGATGACTTTC
Hey1	CACTGCAGGAGGGAAAGGTTAT	CCCCAAACTCCGATAGTCCAT
HeyL	GAAGCGCAGAGGGATCATAGA	CCAATCGTCGCAATTCAGAA
Jag1	TGGCCGAGGTCCTACACTT	GCCTTTTCAATTATGCTATCAGG
Jag2	TCCTCCTGCTGCTTTGTGAT	TTGCAGGGCTGAAAGACAC
Dll1	GGGACAGAGGGGAGAAGATG	TCCATGTTGGTCATCACACC
Dll3	GGGGGCAGCTGTAGTGAA	ACATCGAAGCCCGTAGAATC
Dll4	AGGTGCCACTTCGGTTACAC	GGGAGAGCAAATGGCTGATA

表 2 骨细胞、成骨、成血管标志物引物序列

基因	正义链(5′→3′)	反义链(5′→3′)
DMP1	CATTCTCCTTGTGTTCCTTTGG	TCAGTATTGTGGTATCTGGCAACT
Sost	CGTGCCTCATCTGCCTACTTGTG	CCGGTTCATGGTCTGGTTGTTCTC
ALP	ACACCAATGTAGCCAAGAATGTCA	GATTCGGGCAGCGGTTACT
Runx2	CCGGTCTCCTTCCAGGAT	GGGAACTGCTGTGGCTTC
Osterix	CCCTTCTCAAGCACCAATGG	AAGGGTGGGTAGTCATTTGCATA
VEGF	AGCACAGCAGATGTGAATGC	AATGCTTTCTCCGCTCTGAA
HIF1α	AGTTCCGCAAGCCCTGAAAGC	TCAGTGGTGGCAGTGGTAGTGG
CD31	GCCTAGTGTGGAAGCCAACA	GAGCCTTCCGTTCTCTTGGT
EMCN	CCACAGTGAGGACGGCAAAGATG	CGATGCCTGGTATTGTGACAGAGG

1.1.3 实验仪器 37 ℃ 5% CO_2 细胞培养箱(Thermo Fisher),常温高速、低速离心机(平凡仪器),低温高速离心机(Sigma),倒置荧光显微镜(Nikon)。

1.1.4 实验细胞 人胚肾 293 细胞(human embryonic kidney-293, HEK 293)购自 ATCC 公司,野生 C57BL/6 小鼠 BMSCs,$Rosa^{Notch}$ 小鼠骨细胞于重庆医科大学生命科学研究院细胞培养室培养。

1.2 *方法*

1.2.1 基因型鉴定 采集出生后 14 d 左右新生鼠耳部组织于含 0.1 mg/mL 蛋白酶 K 消化液中 56 ℃消化过夜,提取 DNA 进行普通 PCR 扩增后于 1.5%琼脂糖凝胶中进行凝胶电泳分离,并采集图像分析鉴定。

1.2.2 骨髓基质细胞及骨细胞的分离培养 取 4~6 周龄 $Rosa^{Notch}$ 小鼠提取骨细胞[23],即无菌条件下去除双侧股骨、胫骨肌肉组织及干骺端后剪至 1~2 mm^3,1 mg/mL Ⅰ型胶原酶 37 ℃ 120 r/min 消化 3 次,5 mmol/L EDTA 和 1 mg/mL Ⅰ型胶原酶溶液 37 ℃、120 r/min 交替消化各 3 次;收集每次处理后消化液并加入等体积含 10%FBS 的 α-MEM 完全培养基中和置冰上保存。合并前 3 次消化所得细胞称 f1-3,合并中间 3 次细胞称 f4-6,合并最后 3 次细胞称 f7-9,骨碎片生长出细胞称 BC。f1-3、f4-6、f7-9 及 BC 各组细胞以 2×10^5/孔铺板,α-MEM 完全培养基 37 ℃ 5% CO_2 孵箱中培养 5 d 后进行 ALP 染色、ALP 生化定量检测,qPCR 检测成骨细胞标志物 ALP 及骨细胞标志物 DMP1、Sost mRNA 转录水平。1 mL 无菌注射器冲出 4~6 周龄野生 C57BL/6 小鼠骨髓腔内细胞[24],800 r/min 离心 5 min 重悬后加入 F12/DMEM 完全培养基,置 37 ℃ 5% CO_2 孵箱中培养。骨碎片中生长出的细胞经形态学观察及特异性标志物[25]检测后鉴定为骨细胞(图 1)。

1.2.3 腺病毒扩增及感染滴度测定 实验过程中所用到的病毒均由 HEK293 细胞(DMEM 完全培养基中培养)利用 Ad-Easy 系统扩增,并利用按照绿色荧光蛋白标记法进行滴度测定[26],滴度测定结果分别为:Ad-GFP:2.07×10^{11} GFU/mL,Ad-Cre:1.83×10^{11} GFU/mL。骨细胞按照 2×10^4/孔铺板(24 孔板)贴壁后,分别加入稀释 10 倍后的 Ad-GFP 及 Ad-Cre 2、4、8、16、32、64 μL 进行感染($n=3$),倒置荧光显微镜下观察最佳感染滴度,最终本实验中 Ad-GFP 及 Ad-Cre 病毒原液的使用量均为 1.6 μL/2×10^4。

1.2.4 骨细胞与 BMSCs 共培养 骨细胞以 2×10^4/孔铺板,贴壁后加入相应腺病毒作用 24 h 后,无菌 PBS 缓冲液清洗后分别向 Blank 组、Ad-GFP 组及 Ad-Cre 组中加入 8×10^4/孔野生 C57BL/6 小鼠 BMSCs 共培养,共培养 5 d 后进行 ALP 染色,提取 ALP 生化定量样本及 RNA 样本进行后续操作($n=3$)。

1.2.5 ALP 染色 细胞培养 5 d 后按照 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒说明书进行 ALP 染色,去离子水清洗后显微镜下观察并采集图像($n=3$)。

1.2.6 ALP 活性测定 BCA 蛋白浓度测定:培养 5 d 后每孔加入 300 μL 50 mmol/L pH=7.4 Tris-HCl,超声破碎仪破碎细胞后离心收集上清,按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒操作检测 λ=592 nm 处光密度值,并根据标准曲线计算样品蛋白量。ALP 含量及活性测定:根据碱性磷酸酶测定试剂盒操作测定 λ=405 nm 处光密度并记录作用时间,根据标准底物浓度曲线计算 ALP 物质的量;根据蛋白量与 ALP 物质的量及作用时间计算 ALP 相对活性($n=3$)。

1.2.7 细胞总 RNA 提取、逆转录及 qPCR 共培养 5 d 后,Trizol 提取总 RNA,按照 TaKaRa 逆转录试剂盒操作说明于冰上依次加入相应试剂制备 cDNA,产物 5 倍稀释后采用 qPCR 技术测定相应目的基因 mRNA 的转录水平。所有基因转录水平均以 GAPDH 基因表达量作为对照($n=3$)。引物序列见表 1、2。

1.2.8 茜素红染色(钙盐沉积实验) 共培养 3 d 后将 α-MEM 完全培养基更换为含 50 mg/L Vit C、0.1 μmol/L 地塞米松及 10 mmol/L β-磷酸甘油的成骨诱导培养基,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 21 d 后按照茜素红染色试剂盒说明书进行染色,去离子水清洗后普通光学显微镜下观察并采集图像($n=3$)。

1.2.9 统计学分析 使用 SPSS17.0 对实验数据进行分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示;采用单因素方差分析比较多组间差异,student t 检验比较两组间差异。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 $Rosa^{Notch}$ 小鼠基因型及骨细胞鉴定

提取 $Rosa^{Notch}$ 小鼠 DNA 扩增后分别对 WT 和 Mut 序列进行 PCR 扩增及鉴定,仅表达 Mut 序列(flox 序列)不表达 WT 基因者为 $Rosa^{Notch}$ 小鼠(f/f),仅表达 WT 基

因不表达 Mut 序列者为野生型小鼠(+/+)(图 1A)。

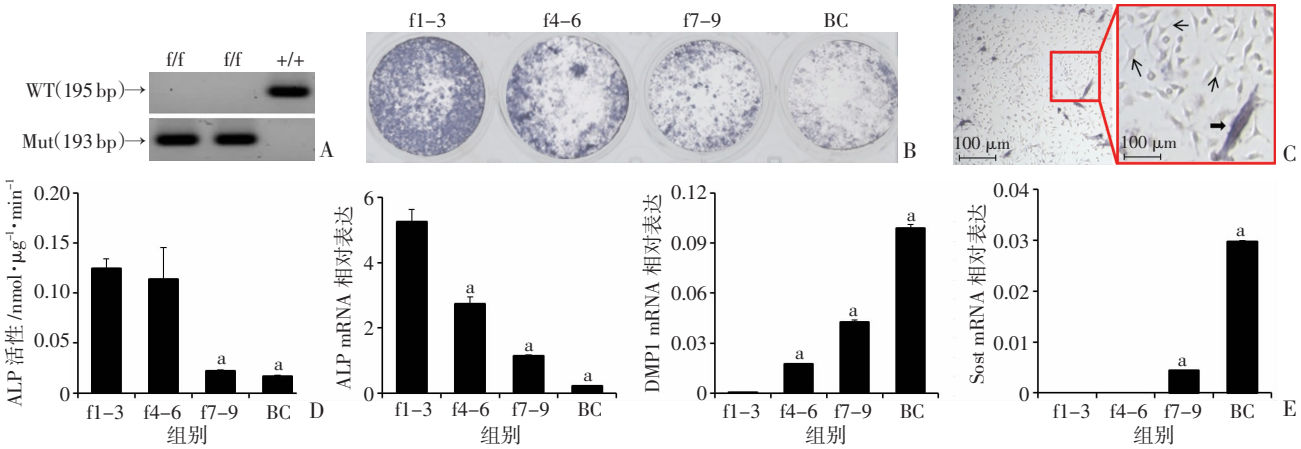
f1-3、f4-6、f7-9 及 BC 各组细胞以 2×10^5/孔铺板,5 d 后进行 ALP 染色、ALP 生化定量及 qPCR 检测。ALP 染色结果显示 BC 组展示最弱 ALP 染色强度(图 1B);普通光学显微镜下观察骨细胞突触多、体积小,成骨细胞突触少、体积大(图 1C);ALP 生化定量显示 f7-9 ALP 活性相较 f1-3、f4-6 显著降低($P<0.05$),BC 组 ALP 活性较 f7-9 显著降低($P<0.05$,图 1D);qPCR 结果显示成骨分化标志物 ALP mRNA 转录水平在各组中的表达相继降低($P<0.05$),该结果与 ALP 染色及 ALP 生化定量结果相符;骨细胞特异性标志物 DMP1、Sost 在 BC 中高度表达($P<0.05$),而在 f1-3、f4-6 中未检测到(图 1E)。以上结果提示 BC 组生长出的细胞绝大部分为骨细胞,可用于后续实验。

2.2　Ad-Cre 激活 $Rosa^{Notch}$ 骨细胞 Notch 信号

$Rosa^{Notch}$ 小鼠骨细胞以 2×10^5/孔铺板至 24 孔板,贴壁后分别加入 Ad-GFP 及 Ad-Cre 腺病毒,24 h 后于倒置荧光显微镜下观察骨细胞中绿色荧光蛋白表达情况,光镜下显示细胞状态良好,转染效率高于 50%(图 2A)。5 d 后提取 mRNA 检测 Notch 信号特异性靶基因表达。qPCR 结果显示 Ad-Cre 组 Notch 信号特异性靶基因 Hes1、Hey1、HeyL 相较 Ad-GFP 组显著增高($P<0.05$,图 2B),提示骨细胞 Notch 信号成功激活。

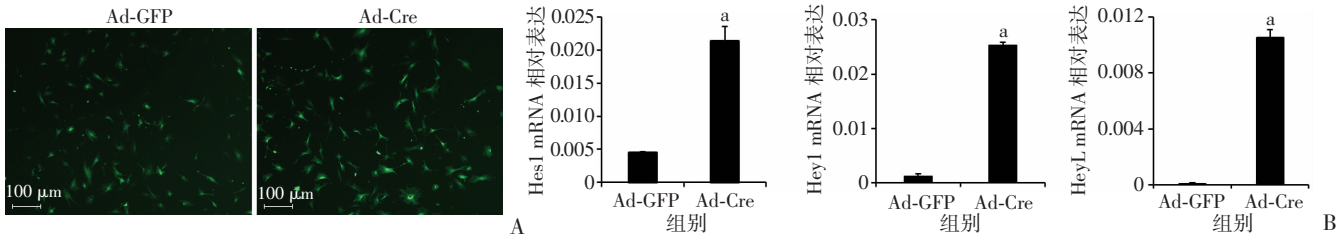
2.3　激活骨细胞 Notch 信号抑制 BMSCs 成骨分化标志物表达及钙盐沉积水平

根据实验设计检测共培养 5 d 后进行 ALP 染色、ALP 生化定量、成骨分化标志物及钙盐沉积水平检测。ALP 染色结果显示 Blank 组与 Ad-GFP 组无显著差异,Ad-Cre 组相较 Blank 组及 Ad-GFP 组显著降低(图 3A);该结果与 ALP 生化定量及 ALP mRNA 转录水平(图 3B、C)相符。qPCR 结果显示 Ad-Cre 组共培养物成骨标志物 Runx2 及 Osterix mRNA 转录水平相较 Ad-GFP 组及 Blank 组显著降低($P<0.05$)。茜素红染色结果显示成骨诱导培养基共培养 21 d 后 Ad-Cre 组钙盐沉积水平显著低于 Blank 组及 Ad-GFP 组,Blank 组与 Ad-GFP 组间未见统计学差异(图 3C、D)。因此,激活骨细胞 Notch 信号可抑制 BMSCs 成骨分化及钙盐沉积水平。



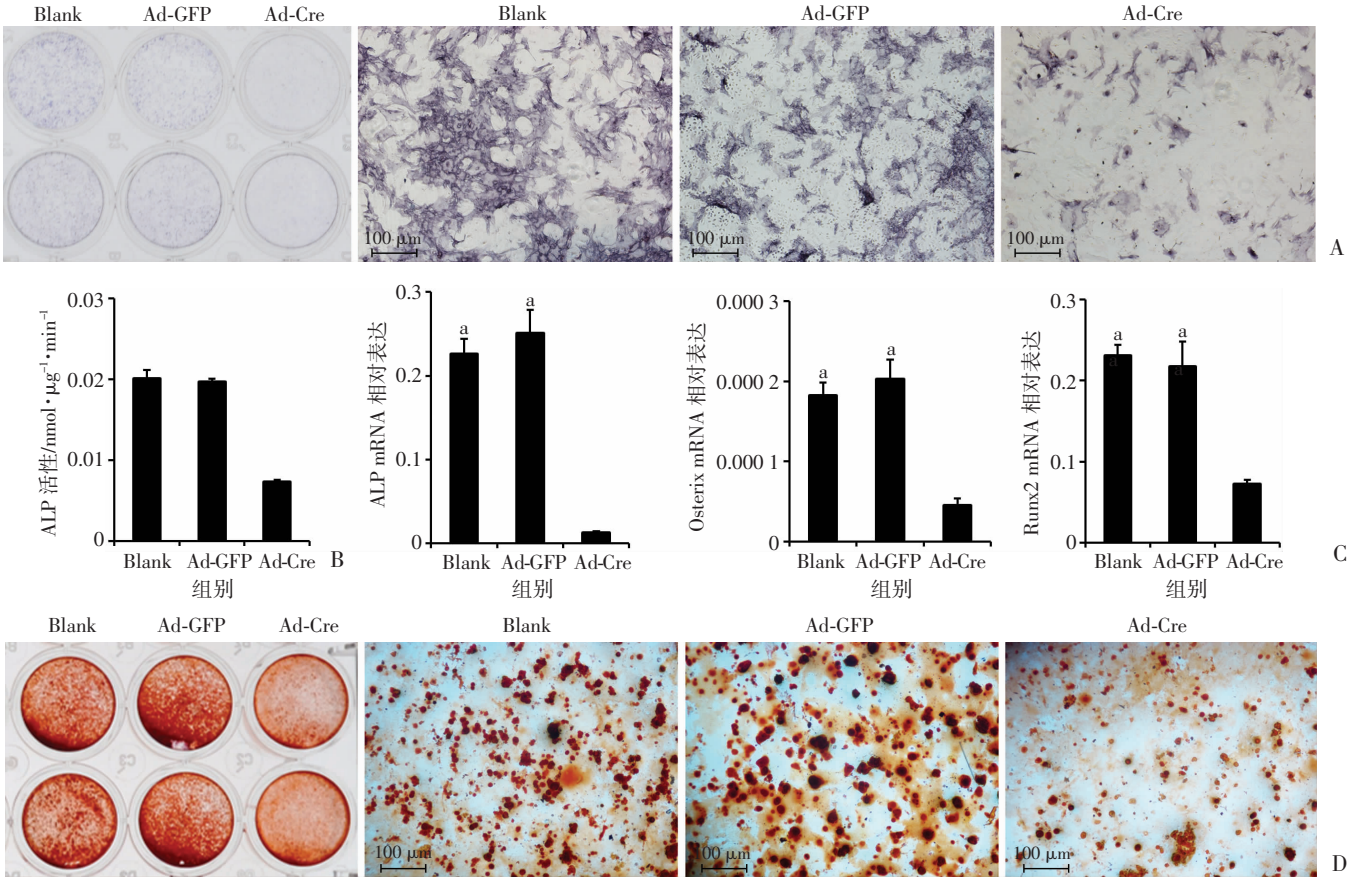
A:PCR 扩增后凝胶电泳鉴定小鼠基因型;B、D:对 f1-3、f4-6、f7-9、BC 中的细胞进行 ALP 染色及 ALP 生化定量检测;C:显微镜下观察骨细胞形态,粗箭头代表成骨细胞,细箭头代表骨细胞;E:qPCR 检测成骨分化标志物 ALP 及骨细胞标志物 DMP1、Sost($n=3$);a:$P<0.05$,与 f1-3 比较

图 1　小鼠基因型鉴定



A:荧光观察 Ad-GFP、Ad-Cre 感染 $Rosa^{Notch}$ 小鼠骨细胞;B:qPCR 检测骨细胞 Notch 信号靶基因 Hes1、Hey1、HeyL 表达情况($n=3$);a:$P<0.05$,与 Ad-GFP 组比较

图 2　Ad-Cre 激活 $Rosa^{Notch}$ 小鼠骨细胞 Notch 信号



A、B:ALP 染色及 ALP 生化定量检测 Ad-GFP 和 Ad-Cre 作用 $Rosa^{Notch}$ 骨细胞后与 BMSCs 共培养 ALP 表达水平;C:qPCR 检测激活 Notch 信号骨细胞与野生型 C57BL/6 小鼠 BMSCs 共培养成骨分化标志物 ALP、Osterix、Runx2 mRNA 转录水平($n=3$);D:茜素红染色检测 21 d 钙盐沉积水平;a:$P<0.05$,与 Ad-Cre 组比较

图 3 激活骨细胞中 Notch 信号对 BMSCs 成骨分化标志物转录水平及钙盐沉积的影响

2.4 激活骨细胞中 Notch 信号对 Notch 配体表达的影响

进一步检测激活 Notch 信号骨细胞与 BMSCs 共培养后 Notch 配体表达情况,qPCR 结果显示 Jag1 mRNA 转录水平较 Blank 组及 Ad-GFP 组显著升高($P<0.05$,图 4A),Jag2、Dll1 mRNA 转录水平较 Ad-GFP 及 Blank 组无统计学差异(图 4B、C);Ad-GFP 组及 Ad-Cre 组中 Dll3 的表达较 Blank 组均显著增高($P<0.05$,图 4D);Dll4 mRNA 转录水平较 Blank 组及 Ad-GFP 组显著降低($P<0.05$,图 4E)。

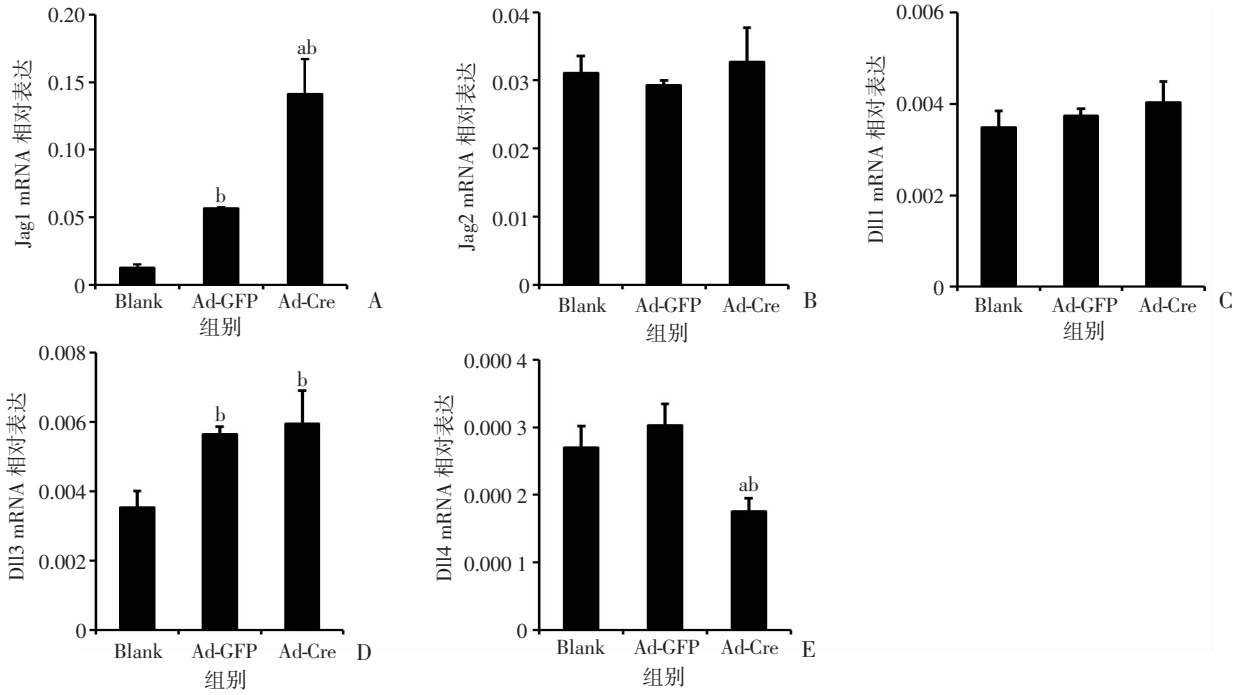
2.5 激活骨细胞 Notch 信号对成血管因子表达的影响

Notch 配体与血管生成紧密相关,本研究进一步检测成血管相关标志物 VEGF、CD31、HIF1α、EMCN mRNA 转录水平。qPCR 结果显示激活骨细胞 Notch 信号后共培养物 VEGF、CD31、HIF1α、EMCN mRNA 转录水平较 Blank 组及 Ad-GFP 组显著增高($P<0.05$),而 Blank 组与 Ad-GFP 组间无显著差异(图 5)。

3 讨论

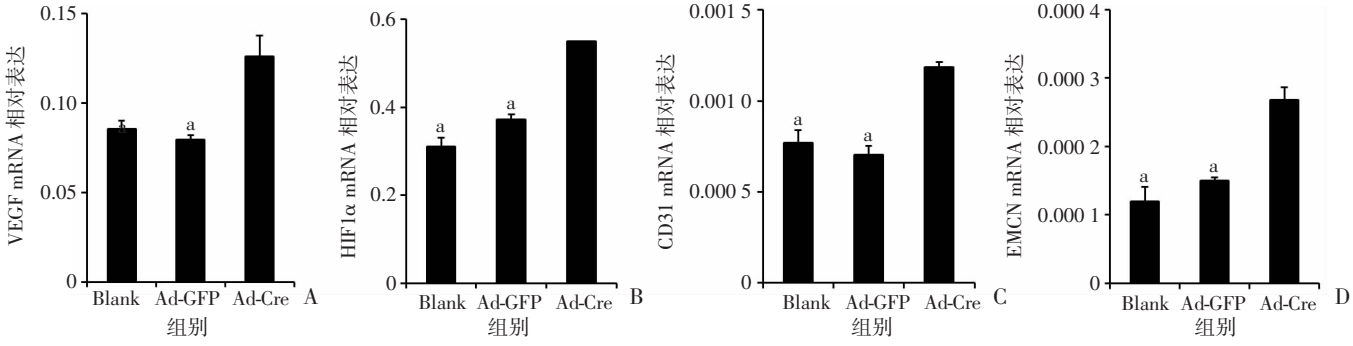
Notch 信号是高度保守的信号传导通路,研究显示激活同一细胞谱系不同分化状态细胞可造成不同影响[21,27-28]:激活 2.3 kb Ⅰ型胶原启动子通过直接结合 Runx2 抑制反式激活功能抑制早期成骨细胞的分化发育,刺激早期成骨细胞增殖[27],导致成骨细胞成熟障碍和功能异常的编织骨沉积,造成骨量增加和生长迟缓;激活 3.6 kb Ⅰ型胶原启动子控制的 NICD 通过抑制干细胞/祖细胞的成骨分化导致成骨细胞数量减少、骨量减少[21]。

CANALIS 等[19]利用 DMP1-10kb-Cre 激活骨细胞经典 Notch 信号可导致骨质疏松症,但该研究过程中同时激活突变鼠骨细胞及成骨细胞中 Notch 信号,因此该结果不能证实仅激活骨细胞 Notch 信号对 BMSCs 成骨分化的影响。本研究利用 Ad-Cre 体外激活骨细胞



A~E:qPCR 检测激活 Notch 信号骨细胞与 BMSCs 共培养产物中 Notch 配体 Jag1、Jag2、Dll1、Dll3、Dll4 mRNA 转录水平;a:$P<0.05$,与 Ad-GFP 组比较;b:$P<0.05$,与 Blank 组比较

图 4 激活 Notch 信号骨细胞与 BMSCs 共培养物 Notch 配体表达情况($n=3$)



A~D:分别为 VEGF、HIF1α、CD31、EMCN mRNA 转录水平;a:$P<0.05$,与 Ad-Cre 组比较

图 5 激活 Notch 信号骨细胞与野生型小鼠 BMSCs 共培养物成血管因子表达情况($n=3$)

Notch 信号后与野生 C57BL/6 小鼠 BMSCs 共培养观察对 BMSCs 成骨分化的影响,结果显示野生 C57BL/6 BMSCs 与激活 Notch 信号骨细胞共培养 ALP 染色及 21 d 细胞外基质矿化水平相较 Ad-GFP 组及 Blank 组显著降低;qPCR 结果显示成骨分化标志物(ALP、Osterix、Runx2)表达相较 Ad-GFP 组及 Blank 组显著降低($P<0.05$),因此激活骨细胞 Notch 信号可抑制 BMSCs 早期成骨分化及晚期细胞外基质矿化水平。过去大量 Notch 信号过表达小鼠模型研究产生争议的原因可能系同时激活多阶段成骨细胞系细胞 Notch 信号,祖细胞、骨细胞 Notch 信号活性低,未产生显著抑制表型,而骨髓基质细胞或成骨细胞中 Notch 活性较强,可观察到骨量发生显著增加[29]。TU 等[30]的研究发现激活骨细胞 Wnt 信号小鼠骨量显著增高,Notch 信号受体及配体亦处于过表达状态,在此基础上利用 DAPT 抑制 Notch 信号可抑制由激活骨细胞 Wnt 信号促进的成骨分化[31];WANG 等[32]的研究发现激活 Notch 信号导致 Runx2 和早期成骨分化因子下调但不影响 p-Smad 1/5/8 的表达,DAPT 阻断 Notch 信号后通过过表达 p-Smad 1/5/8 影响成骨分化,故激活骨细胞 Wnt 信号及成骨细胞 Notch 信号的强大成骨作用将激活骨细胞内 Notch 信号的抑制成骨作用抵消,最终表现为

高骨量表型。Notch 信号在血管内皮发育过程中亦发挥重要作用[33],研究显示 Dll4 负调节血管内皮生长因子介导的血管发芽和分支[34];且 Notch 配体 Dll4 与 Jag1 在调节血管生成中的作用相反[35]。基于以上研究基础,本研究进一步检测血管生成标志物及 Notch 配体的表达情况,qPCR 结果显示成血管标志物 VEGF、HIF1α、CD31、EMCN 及 Notch 配体 Jag1 mRNA 转录水平显著增高($P<0.05$),Dll4 mRNA 转录水平显著降低($P<0.05$)。因此,研究结果提示激活骨细胞 Notch 信号可能通过增高 Jag1、降低 Dll4 促进 BMSCs 成血管因子及内皮细胞因子表达从而降低成骨分化。

激活不同分化阶段成骨谱系细胞 Notch 信号可对成骨分化产生不同影响,本研究证实体外激活骨细胞 Notch 信号抑制 BMSCs 成骨分化。接下来本研究将进一步明确具体作用机制,同时利用 DMP1-8kb-Cre 工具鼠与 $Rosa^{Notch}$ 小鼠构建激活骨细胞 Notch 信号的转基因小鼠,进行动、静态骨组织变化检测及转录组测序,进一步明确具体作用分子及作用机制。

参考文献:

[1] BI P P, KUANG S H. Notch signaling as a novel regulator of metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(5): 248-255. DOI:10.1016/j.tem.2015.02.006.

[2] CAMPBELL D P, CHRYSOSTOMOU E, DOETZLHOFER A. Canonical Notch signaling plays an instructive role in auditory supporting cell development[J]. Sci Rep, 2016, 6: 19484. DOI:10.1038/srep19484.

[3] CHEUNG L, LE TISSIER P, GOLDSMITH S G, *et al*. NOTCH activity differentially affects alternative cell fate acquisition and maintenance[J]. Elife, 2018, 7: e33318. DOI:10.7554/eLife.33318.

[4] COLOMBO M, THÜMMLER K, MIRANDOLA L, *et al*. Notch signaling drives multiple myeloma induced osteoclastogenesis[J]. Oncotarget, 2014, 5(21): 10393-10406. DOI:10.18632/oncotarget.2084.

[5] KUSHWAH R, GUEZGUEZ B, LEE J B, *et al*. Pleiotropic roles of Notch signaling in normal, malignant, and developmental hematopoiesis in the human[J]. EMBO Rep, 2014, 15(11): 1128-1138. DOI:10.15252/embr.201438842.

[6] WAHI K, BOCHTER M S, COLE S E. The many roles of Notch signaling during vertebrate somitogenesis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2016, 49: 68-75. DOI:10.1016/j.semcdb.2014.11.010.

[7] COLOMBO M, GALLETTI S, GARAVELLI S, *et al*. Notch signaling deregulation in multiple myeloma: a rational molecular target[J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 26826-26840. DOI:10.18632/oncotarget.5025.

[8] ZANOTTI S, CANALIS E. Notch signaling and the skeleton[J]. Endocr Rev, 2016, 37(3): 223-253. DOI:10.1210/er.2016-1002.

[9] NG A H, BAHT G S, ALMAN B A, *et al*. Bone marrow stress decreases osteogenic progenitors[J]. Calcif Tissue Int, 2015, 97(5): 476-486. DOI:10.1007/s00223-015-0032-3.

[10] BONEWALD L F. The role of the osteocyte in bone and nonbone disease[J]. Endocrinol Metab Clin N Am, 2017, 46(1): 1-18. DOI:10.1016/j.ecl.2016.09.003.

[11] ANSARI N, HO P W, CRIMEEN-IRWIN B, *et al*. Autocrine and paracrine regulation of the murine skeleton by osteocyte-derived parathyroid hormone-related protein[J]. J Bone Miner Res, 2018, 33(1): 137-153. DOI:10.1002/jbmr.3291.

[12] TOKARZ D, MARTINS J S, PETIT E T, *et al*. Hormonal regulation of osteocyte perilacunar and canalicular remodeling in the hyp mouse model of X-linked hypophosphatemia[J]. J Bone Miner Res, 2018, 33(3): 499-509. DOI:10.1002/jbmr.3327.

[13] DELGADO-CALLE J, ANDERSON J, CREGOR M D, *et al*. Bidirectional notch signaling and osteocyte-derived factors in the bone marrow microenvironment promote tumor cell proliferation and bone destruction in multiple myeloma[J]. Cancer Res, 2016, 76(5): 1089-1100. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-1703.

[14] JÄHN K, KELKAR S, ZHAO H, *et al*. Osteocytes acidify their microenvironment in response to PTHrP *in vitro* and in lactating mice *in vivo*[J]. J Bone Miner Res, 2017, 32(8): 1761-1772. DOI:10.1002/jbmr.3167.

[15] LIU W, WANG Z Y, YANG J, *et al*. Osteocyte TSC1 promotes sclerostin secretion to restrain osteogenesis in mice[J]. Open Biol, 2019, 9(5): 180262. DOI:10.1098/rsob.180262.

[16] NAKASHIMA T, HAYASHI M, FUKUNAGA T, *et al*. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression[J]. Nat Med, 2011, 17(10): 1231-1234. DOI:10.1038/nm.2452.

[17] CANALIS E, ADAMS D J, BOSKEY A, *et al*. Notch signaling in osteocytes differentially regulates cancellous and cortical bone remodeling[J]. J Biol Chem, 2013, 288(35): 25614-25625. DOI:10.1074/jbc.M113.470492.

[18] XU Y, SHU B, TIAN Y, *et al*. Notch activation promotes osteoblast mineralization by inhibition of apoptosis[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(10): 6921-6928. DOI:10.1002/jcp.26592.

[19] CANALIS E, BRIDGEWATER D, SCHILLING L, *et al*. Canonical Notch activation in osteocytes causes osteopetrosis [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2016, 310(2): E171-E182. DOI:10.1152/ajpendo.00395.2015.

[20] ZANOTTI S, CANALIS E. Activation of Nfatc2 in osteoblasts causes osteopenia[J]. J Cell Physiol, 2015, 230(7): 1689-1695. DOI:10.1002/jcp.24928.

[21] ZANOTTI S, SMERDEL-RAMOYA A, STADMEYER L, *et al*. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia[J]. Endocrinology, 2008, 149(8): 3890-3899. DOI: 10.1210/en.2008-0140.

[22] DEREGOWSKI V, GAZZERRO E, PRIEST L, *et al*. Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing wnt/β-catenin but not bone morphogenetic protein signaling [J]. J Biol Chem, 2006, 281(10): 6203-6210. DOI:10.1074/jbc.m508370200.

[23] SHAH K M, STERN M M, STERN A R, *et al*. Osteocyte isolation and culture methods[J]. Bonekey Rep, 2016, 5: 838. DOI:10.1038/bonekey.2016.65.

[24] MARIDAS D E, RENDINA-RUEDY E, LE P T, *et al*. Isolation, culture, and differentiation of bone marrow stromal cells and osteoclast progenitors from mice[J]. J Vis Exp, 2018(131): 56750. DOI:10.3791/56750.

[25] ISO T, KEDES L, HAMAMORI Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2003, 194(3): 237-255. DOI:10.1002/jcp.10208.

[26] KRATZER R F, KREPPEL F. Production, purification, and titration of first-generation adenovirus vectors [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1654: 377-388. DOI:10.1007/978-1-4939-7231-9_28.

[27] ENGIN F, YAO Z Q, YANG T, *et al*. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis[J]. Nat Med, 2008, 14(3): 299-305. DOI:10.1038/nm1712.

[28] HILTON M J, TU X L, WU X M, *et al*. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation[J]. Nat Med, 2008, 14(3): 306-314. DOI:10.1038/nm1716.

[29] SHAO J, ZHOU Y H, XIAO Y. The regulatory roles of Notch in osteocyte differentiation *via* the crosstalk with canonical Wnt pathways during the transition of osteoblasts to osteocytes[J]. Bone, 2018, 108: 165-178. DOI:10.1016/j.bone.2018.01.010.

[30] TU X L, DELGADO-CALLE J, CONDON K W, *et al*. Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/β-catenin signaling in bone[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(5): E478-E486. DOI: 10.1073/pnas.1409857112.

[31] 任磊, 代光明, 林枭, 等. 骨细胞 Wnt/β-Catenin 通过 Notch 信号促进 BMSCs 成骨分化[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(5): 600-605.
REN L, DAI G M, LIN X, *et al*. Wnt/β-Catenin induces osteoblastic differentiation of BMCS *via* Notch signaling pathway by osteocytes[J]. Chin J Osteoporos, 2018, 24(5): 600-605.

[32] WANG N, LIU W, TAN T, *et al*. Notch signaling negatively regulates BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells by inhibiting JunB expression[J]. Oncotarget, 2017, 8(65): 109661-109674. DOI: 10.18632/oncotarget.22763.

[33] BIGAS A, ROBERT-MORENO A, ESPINOSA L. The Notch pathway in the developing hematopoietic system[J]. Int J Dev Biol, 2010, 54(6/7): 1175-1188. DOI:10.1387/ijdb.093049ab.

[34] FRASER H M, HASTINGS J M, ALLAN D, *et al*. Inhibition of delta-like ligand 4 induces luteal hypervascularization followed by functional and structural luteolysis in the primate ovary[J]. Endocrinology, 2012, 153(4): 1972-1983. DOI:10.1210/en.2011-1688.

[35] BENEDITO R, ROCA C, SÖRENSEN I, *et al*. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis[J]. Cell, 2009, 137(6): 1124-1135. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.025.

(**收稿**:2020-01-07;**修回**:2020-02-23)

(编辑 张 维)