DOI:10.16016/j.1000-5404.202001002

过表达 Notch 配体 Delta-like 基因的 MLO-Y4 骨细胞株的建立及其对骨髓基质细胞成骨分化的作用

冯 玮,谢正松,罗 岑,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** 建立稳定表达外源 Dll1、Dll3、Dll4 基因的 MLO-Y4 骨细胞株,研究骨细胞 Notch 信号 Delta-like 配体 Dll1、Dll3、Dll4 对骨髓基质细胞成骨分化的影响。**方法** 用过表达 Dll1、Dll3、Dll4 基因的重组慢病毒液感染 MLO-Y4 样骨细胞,嘌呤霉素筛选分别稳定表达 Dll1、Dll3 及 Dll4 基因的 MLO-Y4 骨细胞株。采用实时荧光定量 PCR(real time fluorescence quantitative,qPCR)对筛选出来的 MLO-Y4 骨细胞株中 Dll1、Dll3 及 Dll4 基因的表达进行鉴定。将 3 种细胞株分别与野生型小鼠骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells,BMSCs)进行共培养,采用碱性磷酸酶(ALP)染色及 ALP 定量检测共培养 3 d ALP 活性变化;qPCR 检测共培养 3 d 成骨相关标志基因及 Notch 信号靶基因的表达水平,在使用 Notch 信号抑制剂 DAPT 后检测上述指标。**结果** 与阴性对照组相比,Dll1、Dll3 及 Dll4 转染组中 Dll1、Dll3 及 Dll4 mRNA 的水平显著增加($P<0.05$)。共培养 3 d 后,骨细胞中 Dll4 基因的过表达促进了 BMSC 的 ALP 活性,与阴性对照组相比有统计学差异($P<0.05$)。qPCR 结果显示,MLO-Y4-Dll4 组的 ALP、Runx2、OPN 及 Collagen Ⅰ成骨相关标志基因的表达均有所升高($P<0.05$),Notch 信号靶基因 Hey1、HeyL、Hes1 及 Hes7 的表达也有所升高($P<0.05$)。而在加入 DAPT 后,MLO-Y4-Dll4 组的 ALP 活性下降,成骨相关标志基因及 Notch 信号靶基因的表达有所下降($P<0.05$)。**结论** 建立了稳定表达外源 Dll1、Dll3 或 Dll4 基因的 MLO-Y4 骨细胞株,在骨细胞中过表达 Dll4 能促进骨髓基质细胞的早期成骨分化,经典 Notch 信号通路在其中可能发挥了重要作用。

[关键词] 慢病毒;Delta-like 基因;过表达;小鼠骨样细胞;骨髓基质细胞;成骨分化;DAPT
[中图法分类号] R322.71; R329.2; R394-33 [文献标志码] A

Construction of MLO-Y4 cells with overexpression of Delta-like genes and their effects on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells

FENG Wei, XIE Zhengsong, LUO Cen, TU Xiaolin Bone Development and Regeneration Platform, Life Science Institute, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To construct the MLO-Y4 cell strains stably expressing exogenous genes of ligands for Notch receptors Delta like-1 (Dll1), Dll3, and Dll4 and determine the effects of these ligands on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. **Methods** MLO-Y4 cells were infected with recombinant lentiviral vectors carrying Dll1, Dll3 and Dll4 genes. Puromycin was used to choose the MLO-Y4 cells with stable expression of these genes. Then, real-time fluorescence quantitative (qPCR) was applied to identify the expression of above genes in the selected MLO-Y4 cells. The 3 cell strains were respectively co-cultured with wild-type mouse bone marrow stromal cells (BMSCs). In 3 d after co-culture, alkaline phosphatase (ALP) staining and ALP quantitative detection were used to detect changes in ALP activity, and qPCR was employed to detect the expression levels of osteogenesis-related markers and target genes of Notch signal. The above indicators were measured again after DAPT, a Notch signaling inhibitor was added in the culture medium. **Results** Compared with the blank group and the negative control, the mRNA levels of Dll1,

[基金项目] 国家自然科学基金-广东联合基金项目(U1601220)
[通信作者] 涂小林,E-mail:xiaolint@hotmail.com

Dll3, and Dll4 were significantly increased in the corresponding transfection cells ($P<0.05$). After 3 days of co-culture, the overexpression of Dll4 gene in MLO-Y4 cells promoted the ALP activity in the BMSCs, which was significantly stronger than that of the negative control group ($P<0.05$). qPCR results showed that the expression levels of osteogenesis-related marker genes, such as ALP, Runx2, OPN and Collagen Ⅰ in the MLO-Y4-Dll4 group were all risen ($P<0.05$), and so were those of Notch signaling target genes, Hey1, HeyL, Hes1 and Hes7 ($P<0.05$). However, the addition of DAPT inhibited the ALP activity in the MLO-Y4-Dll4 group, and decreased the expression levels of above osteogenesis-related markers and Notch signaling target genes ($P<0.05$). **Conclusion** MLO-Y4 cell strains stably expressing the exogenous genes Dll1, Dll3 and Dll4 are established successfully. Overexpression of Dll4 in osteocytes can promote early osteogenic differentiation of BMSCs, and the classic Notch signaling pathway may play an important role in this process.

[**Key words**] lentivirus; Delta-like genes; overexpression; murine osteocyte-like cells; bone marrow stromal cells; osteogenic differentiation; DAPT

Supported by the China-Guangdong Joint Fund of National Natural Science Foundation (U1601220). Corresponding author: TU Xiaolin, E-mail: xiaolint@hotmail.com

骨量高低由骨形成和骨吸收之间的平衡决定。过去人们普遍认为骨形成和骨吸收是基于成骨细胞和破骨细胞的活性。而越来越多的研究表明,骨细胞也通过直接或间接方式控制成骨细胞和破骨细胞参与骨的合成代谢[1-5],表明骨细胞具有强大的生理调控功能。TU 等[6]建立了只在骨细胞特异表达的小鼠模型,率先发现骨细胞是 Wnt/β-catenin 信号的效应细胞,激活后产生了骨的合成代谢,从而发现骨细胞通过 Wnt 信号反向调控骨形成和骨吸收的功能。

Notch 信号转导是进化上高度保守的信号转导通路,不仅在决定细胞命运中发挥核心作用,而且在胚胎发育期间及出生后维持各种器官的组织稳态[7]。Notch 受体蛋白在与 Jagged 和 Delta-like 家族的配体直接相互作用后,经过蛋白酶的 3 次裂解释放 Notch 细胞内结构域(NICD),并转位于细胞核,诱导 Notch 靶基因 Hes、Hey 等的转录。理论上,Notch 受体与其中至少一个配体结合,即 Jag1、Jag2、Dll1、Dll3 和 Dll4,就可以触发 Notch 信号级联。对于骨细胞中单个 Notch 配体在骨形成中是否发挥调控作用,以及发挥怎样的作用并不清楚。

因此,本研究选用 MLO-Y4 细胞,建立稳定表达 Delta-like 基因 Dll1、Dll3、Dll4 的 MLO-Y4 骨细胞株,以此研究骨细胞中 Delta-like 基因的过表达对骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells,BMSCs)成骨分化的影响,体外初步探讨骨细胞 Notch 信号 Delta-like 配体对成骨分化的影响,为体内探究骨细胞 Notch 配体在骨发育及骨稳态中的作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

MLO-Y4 细胞由 Lynda Bonewald 教授馈赠。

1.2 试剂与仪器

试剂:BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂(上海碧云天);α-MEM 培养基、DMEM/F12 培养基及胎牛血清(Gibco);青、链霉素及胰酶(HyClone);聚凝胺(Solarbio);DAPT(Sigma);TRIzol、逆转录及实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa);qPCR 引物合成(上海生工)。仪器:CO_2 培养箱(Thermo);倒置荧光显微镜(Nikon);台式低温离心机(Thermo);qPCR 仪(Bio-Rad)。

1.3 细胞的分离与培养

1.3.1 MLO-Y4 细胞系培养 MLO-Y4 细胞系是目前为止用于研究骨细胞功能常用的细胞系,在 37 ℃、5% CO_2 的条件下用含 10%胎牛血清及 1%青、链霉素的 α-MEM 完全培养基培养 2~3 代后传代。

1.3.2 BMSC 的分离与培养 根据 TU 等[8]提供的方法与本研究室 BMSC 培养方法结合,在无菌条件下解剖取下 2 月龄野生型小鼠双侧股骨、胫骨,将软组织去除干净,浸泡在冲洗液中。去掉两端的骨骺,将骨髓腔中的骨髓冲洗出来,并收集到离心管中。猛烈冲洗≥4 次。800 r/min 离心 5 min 后弃上清液,用含 10%胎牛血清及 1%青、链霉素的 DMEM/F12 完全培养基重悬细胞沉淀,接种于 T25 培养瓶,于 37 ℃、5% CO_2 的条件下培养 6~9 d。待细胞生长至 70%~80%的融合度时,37 ℃胰酶消化细胞,以 8×10^4/孔接种于 24 孔板,与 MLO-Y4 细胞进行共培养。

1.4 Delta-like 过表达慢病毒感染 MLO-Y4 细胞及稳定转染细胞株的筛选

将 MLO-Y4 细胞以 1×10^5/孔接种于 6 孔板,用最佳 MOI 值的慢病毒液转染,72 h 后在倒置荧光显微镜下观察细胞表达情况。观察到荧光后,将细胞重新以

5×10^4/孔接种于6孔板,用含4 μg/mL嘌呤霉素完全培养基培养筛选3 d,再用含2 μg/mL嘌呤霉素完全培养基培养筛选7 d,每2天更换一次含药物的新鲜培养基。筛选10 d后,获得稳定转染的MLO-Y4阳性细胞株。转染及筛选过程中分为4组,分别为pLent-GFP-control、pLent-GFP-Dll1、pLent-GFP-Dll3及pLent-GFP-Dll4。

1.5 稳定转染MLO-Y4细胞的鉴定

稳定转染MLO-Y4细胞培养24 h后,使用TRIzol提取细胞总RNA,并按照反转录试剂盒说明书将其逆转录为cDNA。用qPCR仪检测Dll1、Dll3、Dll4在相应转染MLO-Y4细胞中的表达情况。以GAPDH作为内参。扩增条件为95 ℃ 30 min,95 ℃ 5 min,60 ℃ 30 min,39个循环;65~95 ℃,5 min。引物见表1。

表1 Notch配体Delta-like基因引物序列

基因	引物(5′→3′)
Dll1	正义链 CTGTGCTGCTGTGGTGGTCTG
	反义链 AGTCCGCCTTCTTGTTGGTGTTC
Dll3	正义链 CGCCGCACTCTTGGTCATCC
	反义链 CCAGCACCGTCTTGTAACCTCAG
Dll4	正义链 TACCTTGACCTGCGCGGACTC
	反义链 TCGGCTTGGACCTCTGTTCTGG
GAPDH	正义链 GCACAGTCAAGGCCGAGAAT
	反义链 GCCTTCTCCATGGTGGTGAA

1.6 BMSC成骨能力鉴定

将筛选出的MLO-Y4细胞以2×10^4/孔接种于24孔板,提取的BMSC以8×10^4/孔接种于同一24孔板,共培养3 d。具体实验分组:MLO-Y4-GFP;MLO-Y4-Dll1;MLO-Y4-Dll3;MLO-Y4-Dll4;MLO-Y4-GFP+DAPT;MLO-Y4-Dll1+DAPT;MLO-Y4-Dll3+DAPT;MLO-Y4-Dll4+DAPT。

1.6.1 碱性磷酸酶ALP染色 3种MLO-Y4稳转株细胞与BMSC共培养3 d后进行ALP染色。用PBS清洗2遍,4%多聚甲醛固定10 min。然后按照BCIP/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒配制染色液加入培养板中,避光孵育30 min,显色。每组实验重复3次。

1.6.2 碱性磷酸酶ALP活性测定 将共培养3 d的细胞用PBS润洗后,每孔加入300 μL裂解液,超声破碎细胞后4 ℃离心,取上清液加入显色底物,37 ℃孵育30 min,加入终止液后测定样品在405 nm处的光密度值。同时吸取上清液加入BCA工作液,测定562 nm处光密度值。以405 nm与562 nm处的光密度比值作为样品的ALP活性。每组实验重复3次。

1.6.3 qPCR检测Notch信号靶基因及成骨相关基因mRNA的表达 稳定转染MLO-Y4细胞与BMSC共培养3 d后,按照1.5中所述,使用qPCR仪检测Notch信号靶基因Hey1、HeyL、Hes1、Hes7及成骨相关基因ALP、Ⅰ型胶原(Collagen Ⅰ)、骨桥蛋白(osteopontin,OPN)、Runt相关转录因子2(runt-related transcription factor 2,Runx2)的表达。引物见表2。

表2 Notch信号靶基因的引物序列

基因	引物(5′→3′)
Hey1	正义链 TCAGATAGTGAGCTGGACGAGACC
	反义链 ACATGGAACACAGCGCCGAAC
HeyL	正义链 CGCAGAGACCGCATCAACAGTAG
	反义链 CCAGAGGCATGGAGCATCTTCAAG
Hes1	正义链 CGGCATTCCAAGCTAGAGAAGGC
	反义链 GGTCACCTCGTTCATGCACTCG
Hes7	正义链 GATGCTGAAGCCGTTGGTGGAG
	反义链 TCCAGGAGCAGCAGCCTCAG
GAPDH	正义链 GCACAGTCAAGGCCGAGAAT
	反义链 GCCTTCTCCATGGTGGTGAA

表3 成骨相关标志基因的引物序列

基因	引物(5′→3′)
ALP	正义链 CACGGCGTCCATGAGCAGAAC
	反义链 CAGGCACAGTGGTCAAGGTTGG
Collagen Ⅰ	正义链 GAGCGGAGAGTACTGGATCG
	反义链 GCTTCTTTTCCTTGGGGTTC
OPN	正义链 CCTCCCGGTGAAAGTGAC
	反义链 CTGTGGCGCAAGGAGATT
Runx2	正义链 AACAGCAGCAGCAGCAGCAG
	反义链 GCACGGAGCACAGGAAGTTGG
GAPDH	正义链 GCACAGTCAAGGCCGAGAAT
	反义链 GCCTTCTCCATGGTGGTGAA

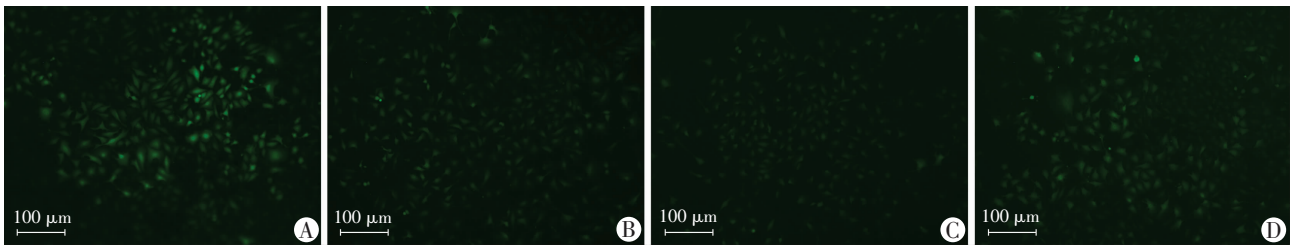
1.7 统计学分析

采用GraphPad Prism统计软件进行分析,数据以$\bar{x}\pm s$表示。检测稳转MLO-Y4细胞的Delta-like基因表达时采用非配对t检验;其他组间比较采用单因素方差分析,其中两两比较采用newman-keuls t检验,检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

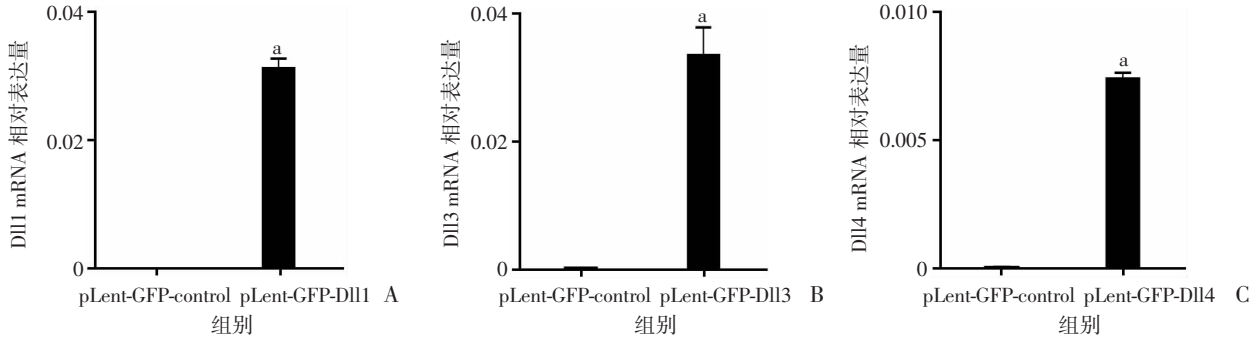
2.1 稳定转染Dll1、Dll3及Dll4基因的MLO-Y4细胞株的建立

以最佳MOI值慢病毒转染MLO-Y4细胞,72 h后观察到绿色荧光。3个目的基因重组慢病毒转染率均在80%以上(图1)。嘌呤霉素筛选10 d后获得稳定转染的阳性MLO-Y4细胞。



A:pLent-GFP-control;B:pLent-GFP-Dll1;C:pLent-GFP-Dll3;D:pLent-GFP-Dll4

图 1 最佳 MOI 值的重组过表达慢病毒转染 MLO-Y4 细胞



A:Dll1 基因的表达;B:Dll3 基因的表达;C:Dll4 基因的表达;a:$P<0.05$,与 pLent-GFP-control 比较

图 2 qPCR 检测经筛选后 Delta-like 基因在相应转染 MLO-Y4 细胞中的表达

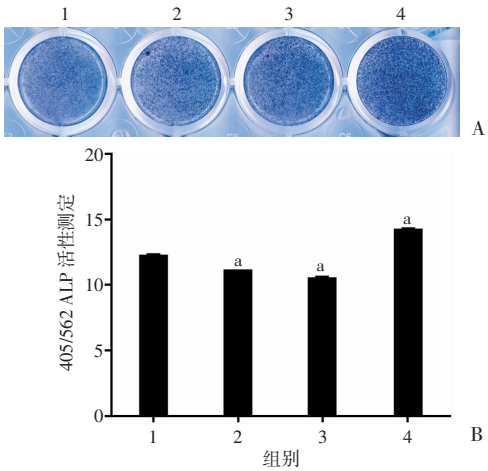
2.2 Dll1、Dll3 及 Dll4 基因在 MLO-Y4 稳转株细胞中高表达

为了验证筛选的 MLO-Y4 细胞是否有效且稳定表达 Dll1、Dll3 和 Dll4 基因,采用 qPCR 检测 Dll1、Dll3 及 Dll4 基因在相应稳转株细胞中的表达,结果表明与阴性对照 pLent-GFP-control 相比,Dll1、Dll3 及 Dll4 基因在相应稳转株细胞株中高表达($P<0.05$,图 2)。表明稳定表达 Dll1、Dll3 和 Dll4 基因的 MLO-Y4 细胞建立成功。

2.3 Delta-like 基因在骨细胞中表达促进 BMSC 成骨分化

为了研究骨细胞中 Delta-like 基因的表达对 BMSC 成骨分化的影响,将阴性对照 MLO-Y4-GFP 细胞及 MLO-Y4-Dll1、Dll3 及 Dll4 3 种稳转株细胞与野生型小鼠的 BMSC 进行共培养。共培养 3 d 后,检测 MLO-Y4 细胞对 BMSC ALP 活性的影响。结果显示在骨细胞中过表达 Dll4 基因后显著增强了 BMSC 的 ALP 活性($P<0.05$,图 3)。

定量检测成骨相关标志基因的表达结果显示,与阴性对照相比,共培养 3 d 后 MLO-Y4-Dll4 组 ALP、Runx2、OPN 及 Collagen Ⅰ表达均有所升高($P<0.05$)。但是过表达 Dll1 及 Dll3 基因的处理组与阴性对照相比,仅见 ALP、Runx2 升高($P<0.05$),其他成骨标志物未见升高。结果表明,骨细胞中 Delta-like 基因的表达具有促进 BMSC 早期成骨分化的潜能,其中作用最显著的是 Dll4 基因。见图 4。

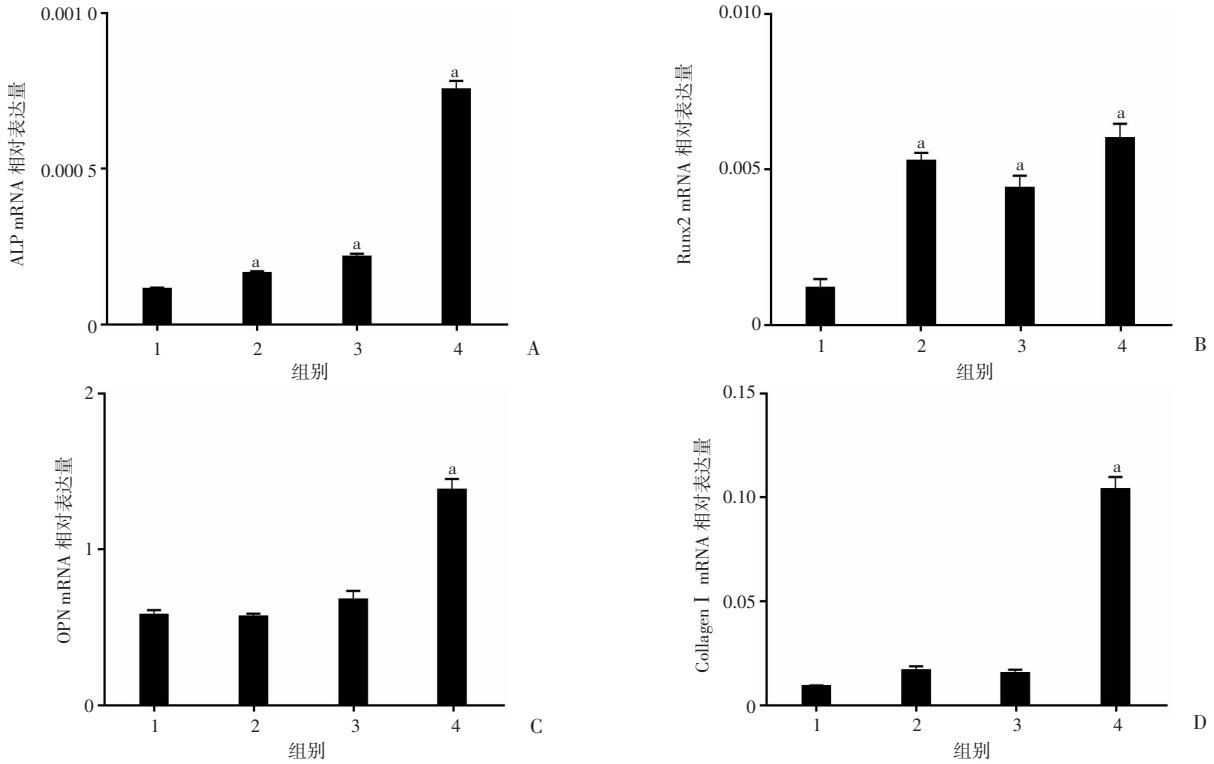


A:ALP 染色结果;B:活性测定结果;1:MLO-Y4-GFP;2:MLO-Y4-Dll1;3:MLO-Y4-Dll3;4:MLO-Y4-Dll4;a:$P<0.05$,与 MLO-Y4-GFP 比较

图 3 Delta-like 基因在骨细胞中的过表达对 BMSC ALP 活性的影响

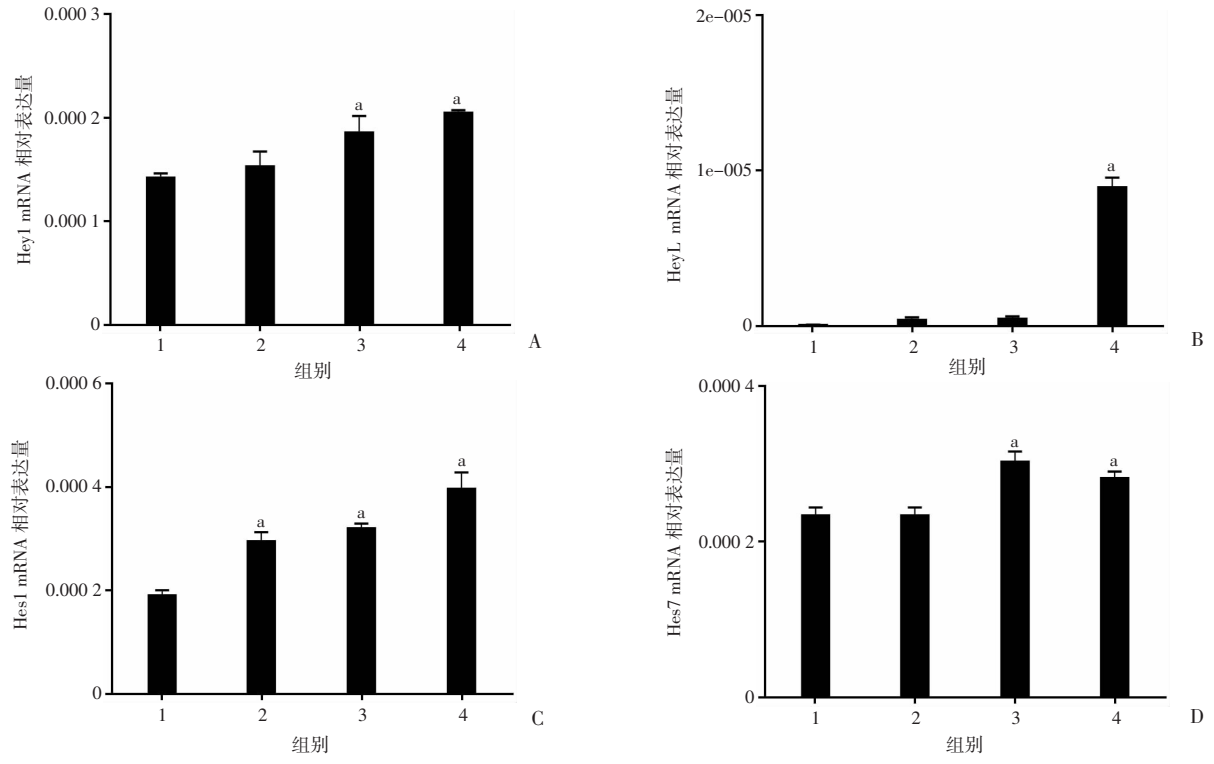
2.4 Delta-like 基因在骨细胞中表达激活 BMSC 中 Notch 信号

在共培养 3 d 的体系中发现,在骨细胞中过表达 Dll4 导致 Notch 信号靶基因 Hey1、HeyL 及 Hes1、Hes7 的激活($P<0.05$),尤其是 HeyL 的升高最显著($P<0.05$,图 5)。Dll1 和 Dll3 也表现出了 Notch 信号激活的现象。猜想在骨细胞中表达 Dll4 促进 BMSC 成骨分化是通过激活经典 Notch 信号实现的。



A:ALP 的表达;B:Runx2 的表达;C:OPN 的表达;D:Collagen Ⅰ的表达;1:MLO-Y4-GFP;2:MLO-Y4-Dll1;3:MLO-Y4-Dll3;4:MLO-Y4-Dll4;a:$P<0.05$,与 MLO-Y4-GFP 比较

图 4 qPCR 检测骨细胞中 Delta-like 基因的过表达对 BMSC 成骨相关标志基因表达的影响



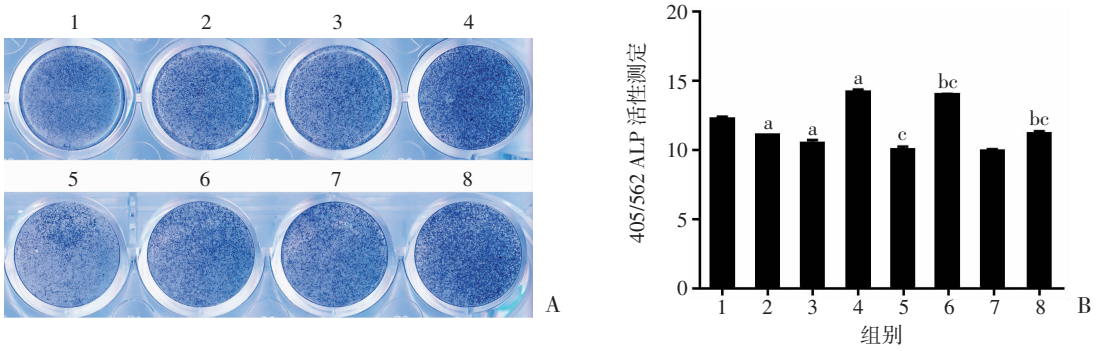
A:Hey1 的表达;B:HeyL 的表达;C:Hes1 的表达;D:Hes7 的表达;1:MLO-Y4-GFP;2:MLO-Y4-Dll1;3:MLO-Y4-Dll3;4:MLO-Y4-Dll4;a:$P<0.05$,与 MLO-Y4-GFP 比较

图 5 qPCR 检测骨细胞中 Delta-like 基因的过表达对 BMSC 中 Notch 信号的影响

2.5　DAPT 抑制骨细胞中 Delta-like 基因过表达诱导的 BMSC 成骨分化

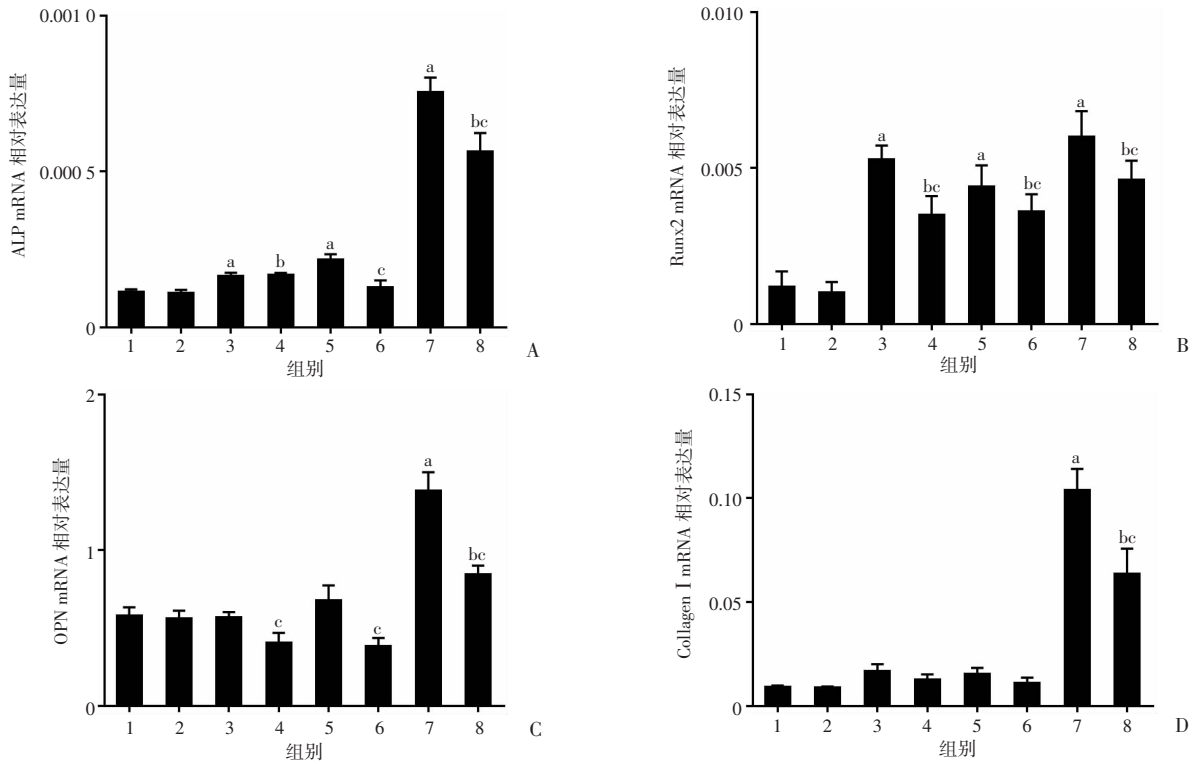
为了研究 Notch 信号通路抑制剂 DAPT(10 μmol/L)是否能够有效抑制骨细胞 Dll4 的表达引起的 BMSC 的成骨分化,向共培养体系中添加 DAPT,不添加 DAPT 作为对照,3 d 后检测 ALP 活性的变化及成骨相关基因的表达。结果显示,在加入 DAPT 后,MLO-Y4-Dll4 组 ALP 活性有所降低($P<0.05$),而 MLO-Y4-Dll1 组 ALP 活性有所升高($P<0.05$),见图 6。

而图 7 显示,在加入 DAPT 后 MLO-Y4-Dll4 组 ALP、Runx2、OPN 及 Collagen Ⅰ显著降低($P<0.05$),表明 Notch 经典信号在骨细胞 Dll4 引起的 BMSC 成骨分化中起到重要作用。虽然成骨分化被抑制,但与对照组相比,仍然促进了 ALP 的活性及成骨相关标志基因的表达($P<0.05$)。



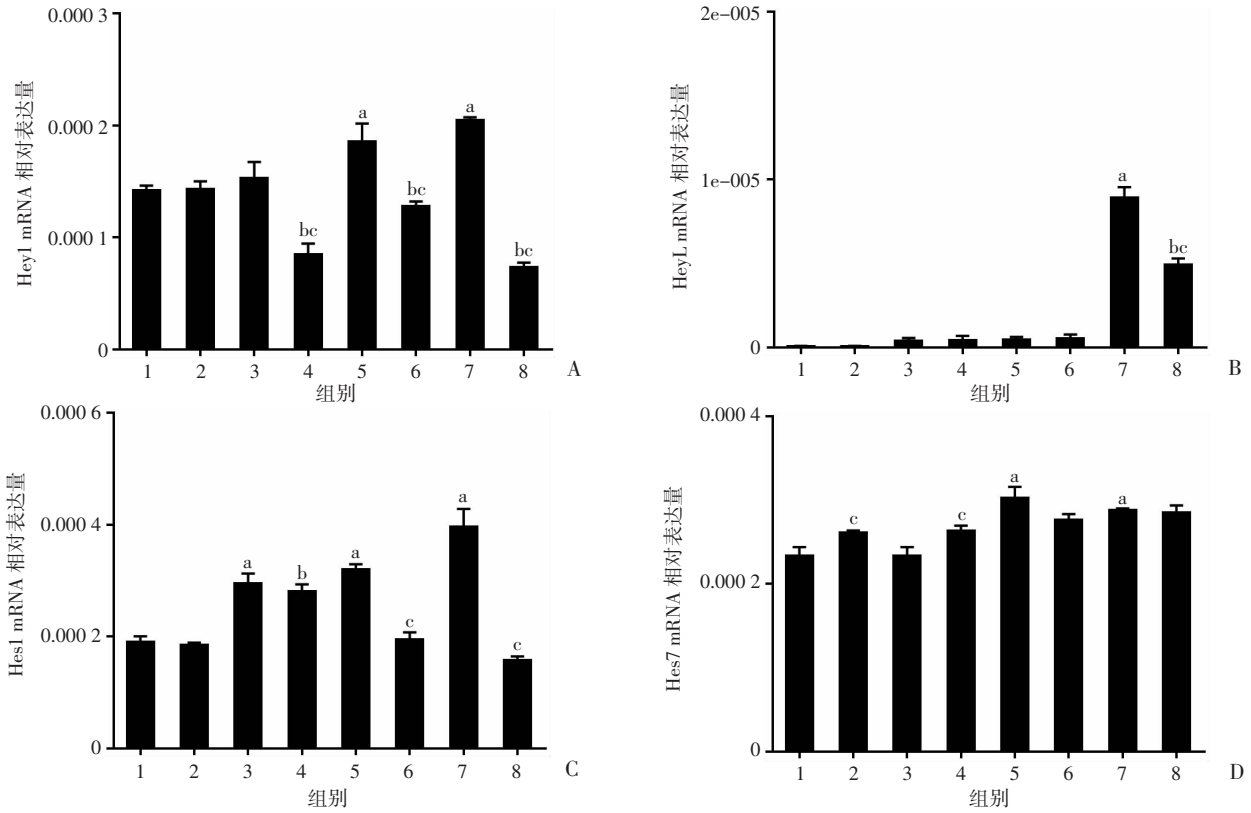
A:ALP 染色结果;B:活性测定结果;1:MLO-Y4-GFP;2:MLO-Y4-Dll1;3:MLO-Y4-Dll3;4:MLO-Y4-Dll4;5:MLO-Y4-GFP+DAPT;6:MLO-Y4-Dll1+DAPT;7:MLO-Y4-Dll3+DAPT;8:MLO-Y4-Dll4+DAPT;a:$P<0.05$,与 MLO-Y4-GFP 比较;b:$P<0.05$,与 MLO-Y4-GFP+DAPT 比较;c:$P<0.05$,与不加 DAPT 的相对应组别比较

图 6　DAPT 对骨细胞 Delta-like 基因过表达增强 BMSC 成骨分化中 ALP 活性的影响



A:ALP 的表达;B:Runx2 的表达;C:OPN 的表达;D:Collagen Ⅰ的表达;1:MLO-Y4-GFP;2:MLO-Y4-GFP+DAPT;3:MLO-Y4-Dll1;4:MLO-Y4-Dll1+DAPT;5:MLO-Y4-Dll3;6:MLO-Y4-Dll3+DAPT;7:MLO-Y4-Dll4;8:MLO-Y4-Dll4+DAPT;a:$P<0.05$,与 MLO-Y4-GFP 比较;b:$P<0.05$,与 MLO-Y4-GFP+DAPT 比较;c:$P<0.05$,与不加 DAPT 的相对应组别比较

图 7　qPCR 检测 DAPT 对骨细胞 Delta-like 基因过表达诱导的 BMSC 成骨分化中标志基因表达量的影响



A:Hey1 的表达;B:HeyL 的表达;C:Hes1 的表达;D:Hes7 的表达;1:MLO-Y4-GFP;2:MLO-Y4-GFP+DAPT;3:MLO-Y4-Dll1;4:MLO-Y4-Dll1+DAPT;5:MLO-Y4-Dll3;6:MLO-Y4-Dll3+DAPT;7:MLO-Y4-Dll4;8:MLO-Y4-Dll4+DAPT;a:$P<0.05$,与 MLO-Y4-GFP 比较;b:$P<0.05$,与 MLO-Y4-GFP+DAPT 比较;c:$P<0.05$,与不加 DAPT 的相对应组别比较

图 8 qPCR 检测 DAPT 对骨细胞 Delta-like 过表达激活的 BMSC Notch 信号的影响

2.6 DAPT 抑制骨细胞 Delta-like 基因过表达激活的 BMSC 中 Notch 信号

为了进一步验证 Notch 信号在骨细胞 Dll4 诱导的 BMSC 成骨分化中发挥重要作用,按照 2.5 中所述检测对照组与添加 DAPT 组 Notch 信号靶基因 Hey1、HeyL、Hes1、Hes7 的表达。结果见图 8,在加入 DAPT 后,MLO-Y4-Dll4 组的靶基因 Hey1、HeyL、Hes1 的表达显著下降($P<0.05$),只有 Hes7 不被抑制($P>0.05$)。MLO-Y4-Dll1 及 Dll3 组表现了同样的抑制现象。反向证实了 Notch 信号在骨细胞 Dll4 过表达诱导的 BMSC 成骨分化中起到重要作用。

3 讨论

本研究发现,骨细胞中 Dll4 基因的过表达显著促进了 BMSC 的成骨分化。Dll1、Dll3 及 Dll4 属于 Notch 配体 Delta-like 基因家族。目前对于 Notch 配体的研究大部分集中在成骨细胞上,而本研究针对 Notch 信号的其中一类配体 Delta-like 基因初步探究了骨细胞中 Dll1、Dll3、Dll4 的成骨功能,得出了骨细胞中 Dll4 的表达能够在体外显著促进骨髓基质细胞早期成骨分化的结论,经典 Notch 信号可能在这一过程中发挥了重要作用。

骨细胞作为骨组织中数量最多的细胞,包埋在骨基质中,寿命长,是成骨细胞系终末分化的高度分枝细胞[9]。由于其不如成骨及破骨细胞活跃,过去被人们认为其不参与调节骨形成与骨稳态。TU 等[6]的研究表明骨细胞也可以通过直接或者间接的方式调节成骨或者破骨细胞的活动来调节骨的合成代谢,因此骨细胞的作用也越来越不容小觑。由于骨细胞包埋的位置较深,生长增殖速度较慢,因此不容易获得也难以维持其形态。虽然近年来已经研究出许多方法分离骨细胞[10-12],但是骨细胞产量通常很低,而且容易受其他细胞如成纤维细胞等的竞争性生长抑制[13]。因此,目前为止大多数的体外实验还是依赖于成熟的骨细胞系

MLO-Y4 细胞[14]。

作为经典 Notch 信号激活不可或缺的分子,Notch 配体在骨发育、骨稳态及软骨的形成中发挥了重要的作用。有研究表明,Notch 配体 Dll3[15]、早老蛋白-1[16]的敲除会导致中轴骨不能正常形成。NOBTA 等[17]研究认为 Jag1 和 Dll1 在骨再生位点上调,而后 MUGURUMA 等[7]在成骨细胞中过表达 Dll1 发现其阻断成骨细胞的成熟,进而抑制破骨细胞的分化和成熟,从而导致严重的骨代谢抑制。在破骨细胞生成中根据其表达的 Notch 受体与配体的特定类型影响破骨细胞。据报道,Jag1 和 Notch1 抑制但 Dll1 和 Notch2 促进破骨细胞生成[18]。Notch 配体 Dll1 在软骨形成中表现出了抑制效应。ATSUMI 等[19]证实了 Notch 配体 Dll1 在体外抑制 ATDC5(一种永生化畸胎瘤细胞,可在体外分化出具有软骨细胞样的表型)细胞的软骨分化。尽管没有明显的研究表明 Dll4 能够直接调控成骨细胞与破骨细胞的分化及功能,但是 Dll4 一直是公认的促血管生成因子[20-21],而研究表明骨形成与血管生成是相互偶联的,Dll4 是否在骨形成中发挥了这样的作用还有待研究。

尽管以上研究证明 Notch 配体在成骨细胞与破骨细胞生成、骨形成与骨稳态及软骨发育中起作用,但是 Notch 配体在骨细胞中是否具有调控作用进而影响骨稳态还未有此方面的研究。慢病毒载体具有转染效率高、可容纳大基因片段、不影响转染细胞的生物学特性,且操作稳定,因此被作为转移目的基因的理想载体。本研究选择了 Notch 配体的 Delta-like 家族,建立了稳定表达 Dll1、Dll3 及 Dll4 基因的 MLO-Y4 细胞株,Dll1、Dll3 及 Dll4 3 个目的基因均高表达,满足了后续实验要求。与阴性对照相比,Delta-like 基因过表达的 3 种 MLO-Y4 细胞与野生型小鼠 BMSC 共培养 3 d 后,ALP 活性增强,成骨标志基因的表达也有所增高。其中作用最显著的是 Dll4 基因。说明在骨细胞中过表达 Dll4 基因能够显著促进骨髓基质细胞的早期成骨分化。同时我们发现 Notch 信号靶基因的激活现象,而在加入 Notch 信号抑制剂 DAPT 后,ALP 活性降低,成骨相关标志基因及 Notch 信号靶基因的表达也下降,反向证明了经典 Notch 信号在骨细胞 Dll4 促进 BMSC 的成骨分化中起到了重要作用。有趣的是,我们在加入 DAPT 后,虽然骨细胞 Dll4 促进 BMSC 的成骨分化降低,但是与阴性对照组相比,依然具有显著差异。因此,我们猜想在这一过程中不仅是 Notch 信号发挥了重要作用,可能存在其他的机制,我们也将继续关注。

综上所述,本研究成功建立稳定表达 Delta-like 基因 Dll1、Dll3 及 Dll4 的 MLO-Y4 细胞株,在骨细胞中过表达 Dll4 基因能够促进骨髓基质细胞的早期成骨分化,经典 Notch 信号通路在其中可能发挥了重要作用。

参考文献:

[1] BLACK D M, ROSEN C J. Postmenopausal osteoporosis[J]. N Engl J Med, 2016, 374(3): 254-262. DOI:10.1056/NEJMcp1513724.

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

[3] DEMPSTER D W, LAMBING C L, KOSTENUIK P J, *et al*. Role of RANK ligand and denosumab, a targeted RANK ligand inhibitor, in bone health and osteoporosis: a review of preclinical and clinical data[J]. Clin Ther, 2012, 34(3): 521-536. DOI:10.1016/j.clinthera.2012.02.002.

[4] DRAKE M T, KHOSLA S. Hormonal and systemic regulation of sclerostin[J]. Bone, 2017, 96: 8-17. DOI:10.1016/j.bone.2016.12.004.

[5] OMINSKY M S, BOYCE R W, LI X D, *et al*. Effects of sclerostin antibodies in animal models of osteoporosis[J]. Bone, 2017, 96: 63-75. DOI:10.1016/j.bone.2016.10.019.

[6] 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.

[7] MUGURUMA Y, HOZUMI K, WARITA H, *et al*. Maintenance of bone homeostasis by DLL1-mediated notch signaling[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(9): 2569-2580. DOI:10.1002/jcp.25647.

[8] TU X L, JOENG K S, NAKAYAMA K I, *et al*. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation[J]. Dev Cell, 2007, 12(1): 113-127. DOI:10.1016/j.devcel.2006.11.003.

[9] BONEWALD L F. The amazing osteocyte[J]. J Bone Mineral Res, 2011, 26(2): 229-238. DOI:10.1002/jbmr.320.

[10] VAN DER PLAS A, NIJWEIDE P J. Isolation and purification of osteocytes[J]. J Bone Miner Res, 2009, 7(4): 389-

396. DOI:10.1002/jbmr.5650070406.

[11] NIJWEIDE P J, VAN DER PLAS A, ALBLAS M J, *et al*. Osteocyte isolation and culture[J]. Methods Mol Med, 2003, 80: 41-50. DOI:10.1385/1-59259-366-6:41.

[12] STERN A R, STERN M M, VAN DYKE M E, *et al*. Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice[J]. Bio Techniques, 2012, 52(6): 361-373. DOI:10.2144/0000113876.

[13] KALAJZIC I, MATTHEWS B G, TORREGGIANI E, *et al*. *In vitro* and *in vivo* approaches to study osteocyte biology[J]. Bone, 2013, 54(2): 296-306. DOI:10.1016/j.bone.2012.09.040.

[14] BONEWALD L F. Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4[J]. J Bone Miner Metab, 1999, 17(1): 61-65. DOI:10.1007/s007740050066.

[15] DUNWOODIE S L, CLEMENTS M, SPARROW D B, *et al*. Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene Dll3 are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm[J]. Development, 2002, 129(7): 1795-1806.

[16] WONG P C, ZHENG H, CHEN H, *et al*. Presenilin 1 is required for Notch1 and DII1 expression in the paraxial mesoderm[J]. Nature, 1997, 387(6630): 288-292. DOI:10.1038/387288a0.

[17] NOBTA M, TSUKAZAKI T, SHIBATA Y, *et al*. Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280(16): 15842-15848. DOI:10.1074/jbc.M412891200.

[18] SEKINE C, KOYANAGI A, KOYAMA N, *et al*. Differential regulation of osteoclastogenesis by Notch2/delta-like 1 and Notch1/Jagged1 axes[J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(2): R45. DOI:10.1186/ar3758.

[19] ATSUMI T, IKAWA Y, MIWA Y, *et al*. A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells[J]. Cell Differ Dev, 1990, 30(2): 109-116. DOI:10.1016/0922-3371(90)90079-c.

[20] 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.

[21] RAMASAMY S K, KUSUMBE A P, WANG L, *et al*. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone[J]. Nature, 2014, 507(7492): 376-380. DOI:10.1038/nature13146.

(**收稿**:2020-01-01;**修回**:2020-01-26)

(编辑 张 维)