DOI:10.16016/j.1000-5404.202102063

Notch 信号介导骨细胞过表达 BMP4 促进骨髓基质细胞成骨分化

谢正松[1],赵怡心[2],吕子灵[3],刘 宏[2],涂小林[1] 400016 重庆,重庆医科大学:生命科学研究院骨发育与再生实验室[1],附属第一医院生殖健康与不孕症中心[2],第一临床学院[3]

[摘要] **目的** 探究骨细胞 MLO-Y4 过表达骨形态发生蛋白 4(bone morphogenetic protein-4,BMP4)通过 Notch 信号对骨髓基质细胞 ST2 成骨分化的影响。**方法** 使用 BMP4 重组腺病毒(Ad-BMP4)以及阴性对照(Ad-GFP)分别感染 MLO-Y4 后与 ST2 共培养,分为 GFP 组及 BMP4 组;Western blot 检测 MLO-Y4 细胞 BMP4 蛋白表达;采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 MLO-Y4 的 BMP4 和 Notch 配体基因、共培养体系中成骨标志基因、Notch 靶基因以及促血管生成因子表达;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色及生化定量检测 ALP 活性;在共培养体系中加入 Notch 信号抑制剂 DAPT 后,再次检测上述指标。**结果** MLO-Y4 过表达 BMP4,上调 Notch 配体 Jag1、Jag2、Dll4 表达;ALP 染色以及生化定量结果显示共培养第 1 天 GFP 组和 BMP4 组 ALP 活性差异无统计学意义,在第 3、5 天,BMP4 组 ALP 活性更高($P<0.05$);BMP4 组成骨标志基因在第 1 天仅 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)显著升高($P<0.05$),第 3、5 天 BMP4 组 Alp、Runx2、骨钙蛋白(osteocalcin,Ocn)、Ⅰ型胶原(collagen Ⅰ)均显著增高($P<0.05$);第 3 天 BMP4 组 Notch 信号靶基因 Hey1、Hey2,血管内皮生长因子(vascular endothlial growth factor, VEGF)、低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1α, HIF1α)的表达也显著增高($P<0.05$);加入 DPAT 抑制 Notch 信号后,BMP4 组 ALP 活性、成骨标志基因以及促血管生成因子表达均显著下降($P<0.05$)。**结论** MLO-Y4 过表达 BMP4 可以促进 ST2 成骨分化,该过程可能与 Notch 信号增强有关。

[关键词] 骨细胞;骨形态发生蛋白 4;骨髓基质细胞;成骨分化;Notch 信号
[中图法分类号] R322.71; R329.28; R394.3 [文献标志码] A

Notch signaling-mediated osteocytic overexpression of BMP4 promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells

XIE Zhengsong[1], ZHAO Yixin[2], LYU Ziling[3], LIU Hong[2], TU Xiaolin[1] [1]Laboratry of Bone Development and Regeneration, Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, [2]Center of Reproduction Medicine and Infertility, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, [3]the First Clinical College of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) overexpression in MLO-Y4 osteocytes on osteogenic differentiation of bone marrow stromal ST2 cells through Notch signaling. **Methods** Ad-GFP or Ad-BMP4 infected MLO-Y4 cells were co-cultured with ST2 cells, and designated as GFP and BMP4 group respectively. Western blotting was used to detect the BMP4 protein level in MLO-Y4 cells. Real-time fluorescence quantitative analysis (qPCR) was applied to determine the mRNA expression of BMP4 and Notch ligands genes as well as osteoblast genes in the MLO-Y4 cells, and Notch target genes and angiogenesis factors in the co-cultured systems. The activity of alkaline phosphatase

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81672118);重庆市科委基础科学与前沿研究技术专项重点课题(cstc2015jcyjBX0119)
[通信作者] 涂小林,E-mail:xiaolint@hotmail.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

(ALP) was determined by ALP staining and biochemical quantification. Notch signal inhibitor DAPT was added to the co-culture system to detect the above indexes again. **Results** Overexpression of BMP4 upregulated the expression of Notch ligands Jag1, Jag2 and Dll4 in MLO-Y4 cells. ALP staining and biochemical quantitative results demonstrated that there was no significant difference in ALP activity at day 1 between the GFP and BMP4 groups, and stronger ALP activity was seen in the latter group at day 3 and 5 ($P<0.05$). In the BMP4 group, at day 1 among the osteoblast genes, only runt-related transcription factor 2 (Runx2) was obviously expressed ($P<0.05$), and the levels of Alp, Runx2, osteocalcin (Ocn), and collagen Ⅰ were all highly expressed in the BMP4 group ($P<0.05$). At day 3, Notch signaling target genes Hey1 and Hey2, angiogenesis factors vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia-inducible factor 1 (HIF1α) were also highly expressed in the BMP4 group compared with the control group ($P<0.05$). After addition of DAPT to inhibit Notch signaling, the activity of ALP and expression of osteoblast genes and angiogenesis genes were all decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of BMP4 in MLO-Y4 cells promotes osteogenic differentiation of ST2 cells, which may be related to the enhancement of Notch signaling.

[**Key words**] osteocytes; bone morphogenetic protein-4; bone marrow stromal cells; osteogenic differentiation; Notch signaling

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81672118) and the Special Key Project of Basic Science and Froterier Technology of Chongqing Science and Technology Commission (cstc2015jcyjBX0119). Corresponding author: TU Xiaolin, E-mail: xiaolint@hotmail.com

骨质疏松症是一种全身性代谢性骨病,表现为骨量减少、骨组织微结构改变,导致骨强度降低、脆性增加,易引起骨折,是中老年人致残、死亡的重要原因之一[1]。基于骨发育的健康骨重塑对于骨质疏松症的治疗和康复极为重要。这一目标的实现仍存在诸多难题,骨髓基质细胞体内自我更新和成骨分化的调控是关键。

过去认为骨细胞是静止细胞,近来研究表明在机械和激素刺激下,骨细胞可以反向调控骨形成与骨吸收[2-6],对骨细胞及其细胞内分子机制的研究正在迅速兴起。本课题组前期研究发现,特异性激活小鼠骨细胞 Wnt/β-catenin 信号,促进骨合成代谢,增加骨量,证实了发育终端的骨细胞具有反向调控成骨分化的作用,并且在激活 Wnt 信号的骨细胞中检测到骨形态发生蛋白 4 (bone morphogenetic protein-4, BMP4)的表达升高[7]。有研究报道指出成骨细胞中敲除 BMP Ⅰ型受体 A(BMPR1A)后,sclerostin 表达降低,从而增加 Wnt 信号促进骨形成,导致小鼠骨量上升[8-9]。BMP4 作为 BMP 信号的配体之一,在骨折愈合过程中可以促进骨折区域的血管生成和骨再生[10-11],还可以调节胚胎干细胞向内皮细胞的分化,并刺激内皮细胞的迁移和管腔的形成[12]。然而,骨细胞中的 BMP4 对骨形成以及血管生成的影响尚有待研究。

Notch 信号是一条进化过程中高度保守的信号通路,对成骨分化以及血管生成起着至关重要的作用[13-14]。有研究报道 Notch 信号参与 BMP2、BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化[15],但是 Notch 信号是否参与骨细胞 BMP4 反向调控骨髓基质细胞成骨分化的过程没有相关报道。因此,本研究首先使用 Ad-BMP4 感染骨细胞 MLO-Y4 后与 ST2 细胞进行共培养,探究骨细胞过表达 BMP4 的促成骨和促成血管功能;并在此基础上探讨了 Notch 信号是否介导这一过程,旨在揭示骨细胞 BMP4 发挥促骨形成的生理作用与机制,为 BMP4 靶向骨细胞治疗骨质疏松提供依据以及为研发促骨形成药物提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验材料:骨细胞 MLO-Y4、骨髓基质细胞 ST2 均由美国 Lynda Bonewald 教授赠予。α-MEM 培养基以及 TRIzol RNA 抽提液购自美国 Thermo Fisher 公司;胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司;Polybrene 购自美国 Sigma 公司;BCA 检测试剂盒、RIPA 裂解液 BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒以及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒均购自上海碧云天生物工程公司;反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购买于日本 TaKaRa 公司;DAPT 购买于美国 MCE 公司;一抗 BMP4 购自沈阳万类生物科技有限公司;一抗 GAPDH 及二抗均购自武汉三鹰生物科技有限公司;显影液购自上海雅酶生物医药科技有限公司。

实验仪器:37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱(新加坡,

ESCO)、低温高速离心机(德国,Sigma)、倒置荧光显微镜(德国,Leica)、qPCR 仪(美国,Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MLO-Y4 细胞与 ST2 细胞均使用含有 10%胎牛血清的 α-MEM 完全培养基在 37 ℃、5% CO_2 的条件下培养。

1.2.2 骨细胞系 MLO-Y4 感染腺病毒 当 MLO-Y4 细胞密度达到 90%时,使用胰酶消化、计数后,按照 2×10^4/孔的密度铺板至 24 孔板,分别加入加腺病毒 Ad-BMP4 或者 Ad-GFP 感染细胞,同时加入 polybrene 促感染,24 h 后,观察荧光以及收集 RNA 检测 BMP4 以及 Notch 配体基因的表达,收集蛋白样品检测 BMP4 的表达。实验分组为 Ad-GFP 组与 Ad-BMP4 组。

1.2.3 MLO-Y4 细胞与 ST2 细胞共培养以及 DAPT 干预 ①感染 Ad-BMP4 或 Ad-GFP 的 MLO-Y4 细胞,使用胰酶消化并计数后,按照 2×10^4/孔铺入 24 孔板,ST2 细胞 8×10^4/孔,铺板至同一 24 孔板共培养 1、3、5 d。②在培养基中添加 DAPT 抑制共培养体系 Notch 信号,DAPT 终浓度 10 μmol/L。实验分为:GFP 组、GFP+DAPT 组、BMP4 组、BMP4+DAPT 组。

1.2.4 碱性磷酸酶(ALP)活性检测 ①ALP 染色:待细胞共培养 1、3、5 d 后,吸弃培养基并用 PBS 润洗,4%甲醛固定 10 min,再用 PBS 润洗 2 次,最后按碱性磷酸酶显色试剂盒说明书加入染液,室温避光反应 30 min 后用 PBS 润洗去除染液,观察并拍照。②ALP 定量:细胞共培养后,吸弃培养基并使用 PBS 润洗,然后每孔加入 300 μL Tris (50 mmol/L,pH=7.4),收集细胞于 EP 管中,使用超声破碎仪破碎细胞, 4 ℃ 15 000×*g* 离心 3 min,收集上清液按 ALP 检测试剂盒说明书检测不同样本与底物反应体系在 405 nm 的光密度值,并根据标准底物浓度曲线计算酶活性。

1.2.5 RNA 提取及 RT-PCR 细胞培养完成后,吸弃培养基,每孔加入 200 μL TRIzol 裂解细胞,根据 TRIzol 法提取细胞 RNA,并测定其浓度;取 1 μg RNA,按 TaKaRa 反转录试剂盒操作说明去除基因组 DNA 后,进行反转录反应获得 cDNA,对 cDNA 进行 5 倍稀释后进行后续 qPCR 检测。

1.2.6 实时定量 PCR 按照 SYBR Green Supermix 试剂盒说明书依次加入 5 μL SYBR Premix *Ex Taq* Ⅱ (2×)、正反引物各 0.4 μL(10 μmmol/L)、1.2 μL cDNA,用 Mili Q 水补足至 10 μL。反应条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,循环 40 次; GAPDH 基因作为内参,每组 3 个样品,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.7 Western blot 细胞培养后,吸弃培养基,用 PBS 清洗 1 遍,加入适量 RIPA 裂解液,用细胞刮刮下细胞后收集至 1.5 mL EP 管中。按照说明书使用 BCA 试剂盒测量蛋白浓度,加上样缓冲液,金属浴 100 ℃ 10 min。使用试剂盒配胶完成后按总蛋白量 30 μg 上样。使用 70 V 恒压待样品进入分离胶后加压至 120 V 恒压电泳全程,转膜按恒流 250 mA 1 h 后,使用 5%脱脂奶粉封闭 2 h。然后敷一抗 4 ℃过夜,第 2 天使用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,敷二抗室温 2 h,再使用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min ,最后采集图像。

表 1 qPCR 引物序列

基因名称	上游引物(5′-3′)	下游引物(5′-3′)	产物长度/bp
GAPDH	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA	151
BMP4	GAGGAGTTTCCATCACGAAGA	GCTCTGCCGAGGAGATCA	122
Jag1	CCAACACGGTCCCCATTA	TTGGCAAAGCGGACTTTC	124
Jag2	CACGCTGGCATGATCAAC	TGTTGCAGGTGGCACTGT	124
Dll4	GGGCCTTCCTTCTGCATT	ACTCTTGGCGGGTTCACA	122
ALP	ACACCAATGTAGCCAAGAATGTCA	GATTCGGGCAGCGGTTACT	77
Runx2	CCGGTCTCCTTCCAGGAT	GGGAACTGCTGTGGCTTC	122
OCN	CAGCGGCCCTGAGTCTGA	GCCGGAGTCTGTTCACTACCTTA	71
Collagen Ⅰ	GCTGGCAAGAATGGCGAC	AAGCCACGATGACCCTTTATG	161
VEGF	ACCACAGCAGATGTGAATGC	AATGCTTTCTCCCGCGCTGAA	88
HIFα	TGCTCATCAGTTGCCACTTCC	TGCCTTCATCTCATCTTCACTGTC	139
Hey1	GGCCTGCTTGGCTTTTCT	CCAAGTGCAGGCAAGGTC	120
Hey2	CAGCTGCACACAGCTTCC	CTGCGGATACCGACAAGG	123

1.3　统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析。每个实验独立重复 3 次,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 Student-t 检验。$P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2　结果

2.1　腺病毒感染 MLO-Y4 过表达 BMP4

Ad-GFP 或 Ad-BMP4 分别感染 MLO-Y4,24 h 后于倒置荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光蛋白表达情况,光镜下显示细胞状态良好,感染效率高于 90%(图 1A)。qPCR 及 Western blot 结果显示:在基因及蛋白水平,Ad-BMP4 组表达 BMP4 较 Ad-GFP 组显著增加($P<0.05$,图 1B~D),提示 Ad-BMP4 感染 MLO-Y4 过表达 BMP4。

2.2　MLO-Y4 过表达 BMP4 促进 ST2 成骨分化

ALP 染色与生化定量结果显示,共培养第 1 天,BMP4 组与 GFP 组 ALP 活性无明显差异,第 3、5 天,BMP4 组 ALP 活性相比于 GFP 组显著增强($P<0.05$,图 2A、B)。

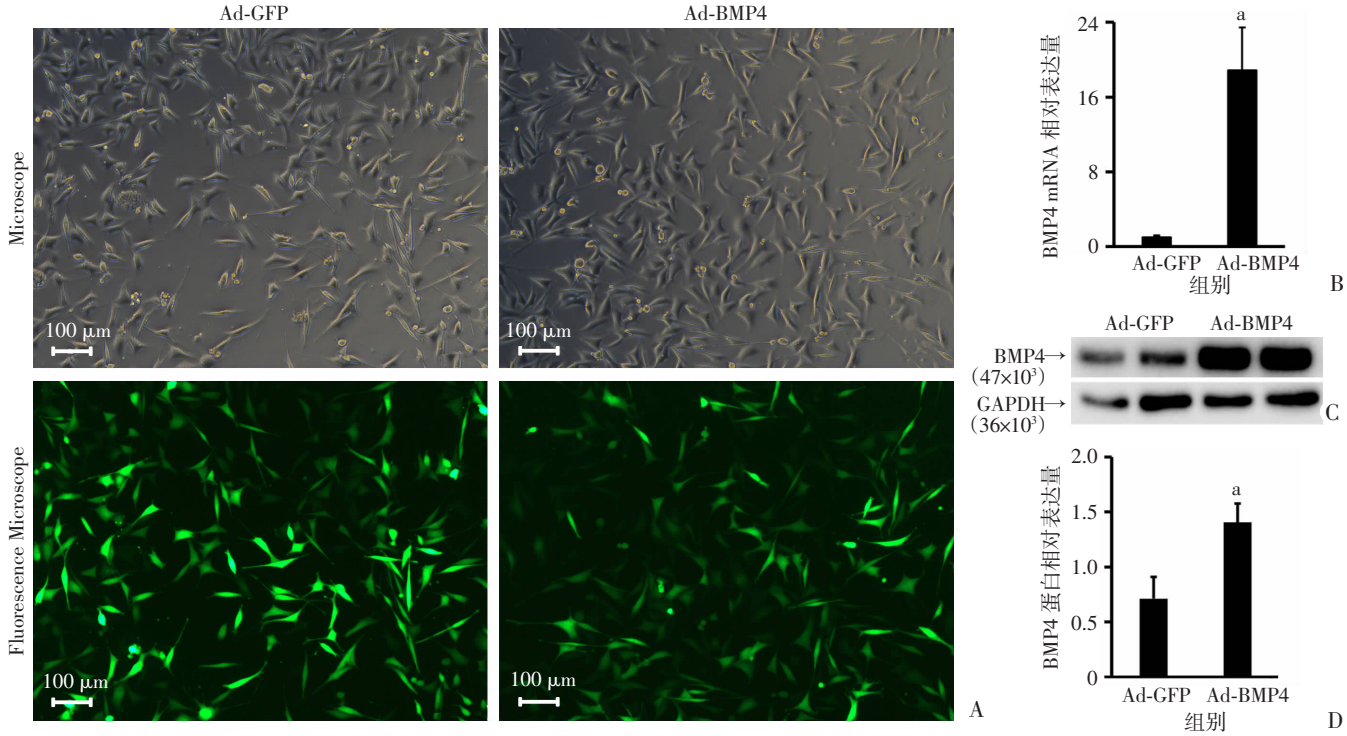
qPCR 检测共培养体系细胞成骨标志基因 Alp、Runx2、Ocn、Collagen Ⅰ的 mRNA 表达。结果显示,在共培养第 1 天,BMP4 组仅 Runx2 表达高于 GFP 组($P<0.05$,图 2C~F),第 3、5 天,BMP4 组成骨标志基因 Alp、Runx2、Ocn、Collagen Ⅰ的表达均显著高于 GFP 组($P<0.05$,图 2C~F)。以上结果表明,骨细胞 MLO-Y4 过表达 BMP4 促进骨髓基质细胞 ST2 成骨分化,且成骨分化随共培养时间增加而增强。

2.3　共培养体系中 Notch 信号表达增加

通过 qPCR 检测共培养第 3 天体系中 Notch 信号靶基因的表达,与 GFP 组相比,BMP4 组 Hey1 与 Hey2 的表达升高($P<0.05$,图 3)。

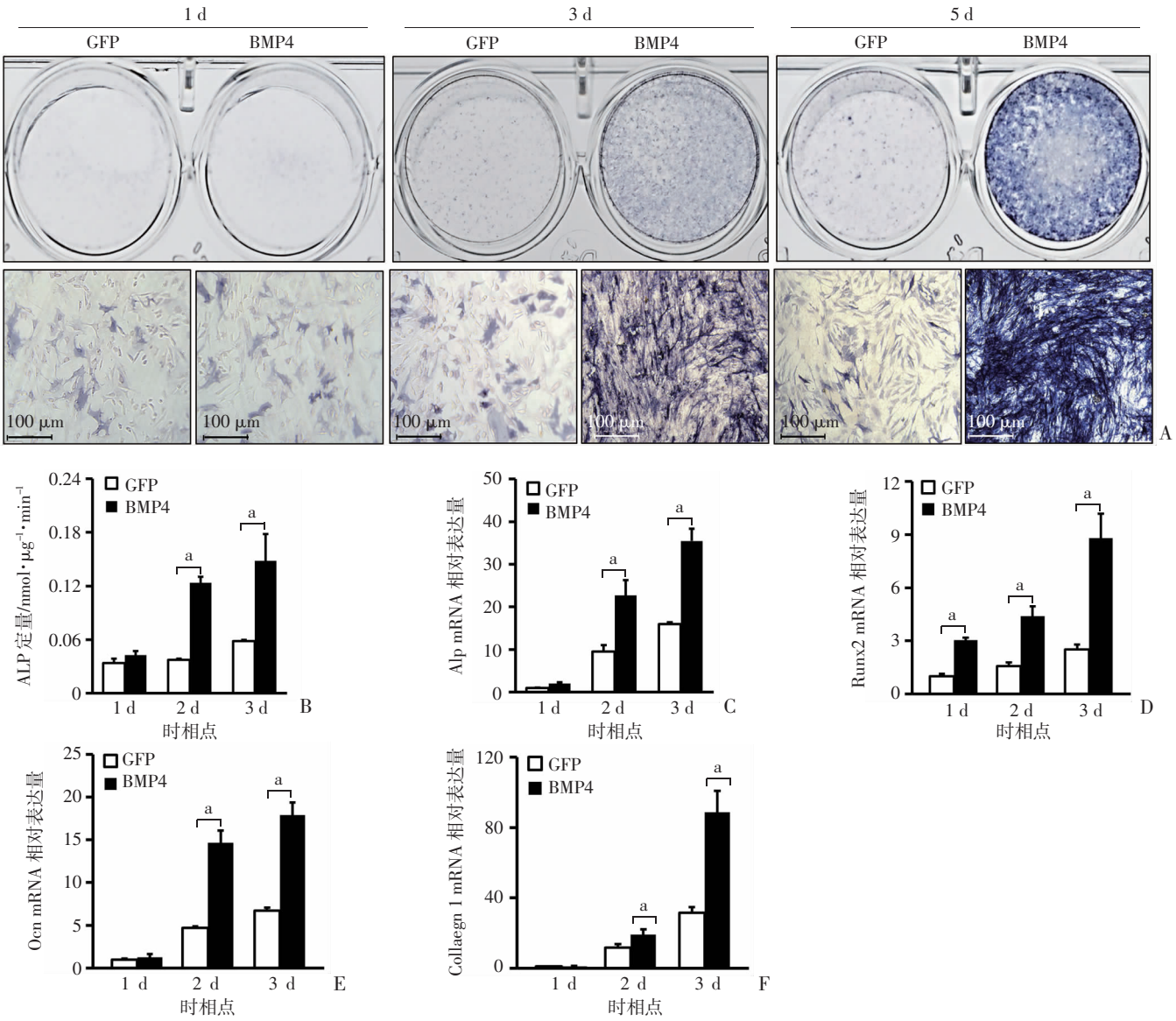
2.4　MLO-Y4 过表达 BMP4 上调 Notch 配体表达

Notch 信号的激活需要 Notch 配体与受体结合,为了验证 MLO-Y4 过表达 BMP4 对 Notch 配体表达的影响,qPCR 检测 Notch 配体在感染 Ad-BMP4 的 MLO-Y4 中的表达。结果显示:与 Ad-GFP 组比较,Ad-BMP4 组的 MLO-Y4 Notch 配体 Jag1、Jag2、Dll4 表达更高($P<0.05$,图 4)。



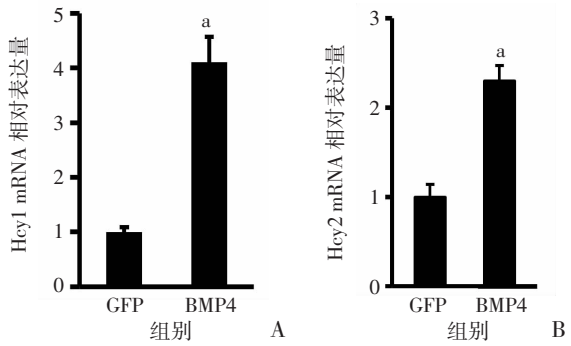
A:倒置荧光显微镜下观察 Ad-GFP、Ad-BMP4 转染 MLO-Y4 细胞;B:qPCR 检测 BMP4 在 MLO-Y4 细胞的表达($n=3,\bar{x}\pm s$),a:$P<0.05$,与 Ad-GFP 组比较;C:Western blot 检测两组 MLO-Y4 细胞 BMP4 蛋白表达;D:BMP4 蛋白相对表达量($n=3,\bar{x}\pm s$),a:$P<0.05$,与 Ad-GFP 组比较

图 1　骨细胞过表达 BMP4



A:ALP 染色;B:ALP 生化定量;C~F 分别为:成骨标志基因 Alp、Runx2、Ocn、Collagen Ⅰ 的表达,a:$P<0.05$,与 GFP 组比较

图 2 MLO-Y4 过表达 BMP4 对 ST2 成骨分化的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

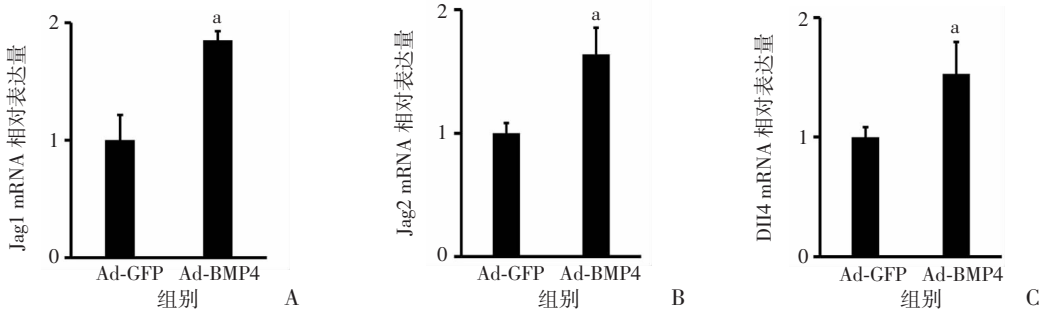


A:Hey1 基因的表达;B:Hey2 基因的表达;a:$P<0.05$,与 GFP 组比较

图 3 qPCR 检测 Notch 靶基因的表达 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

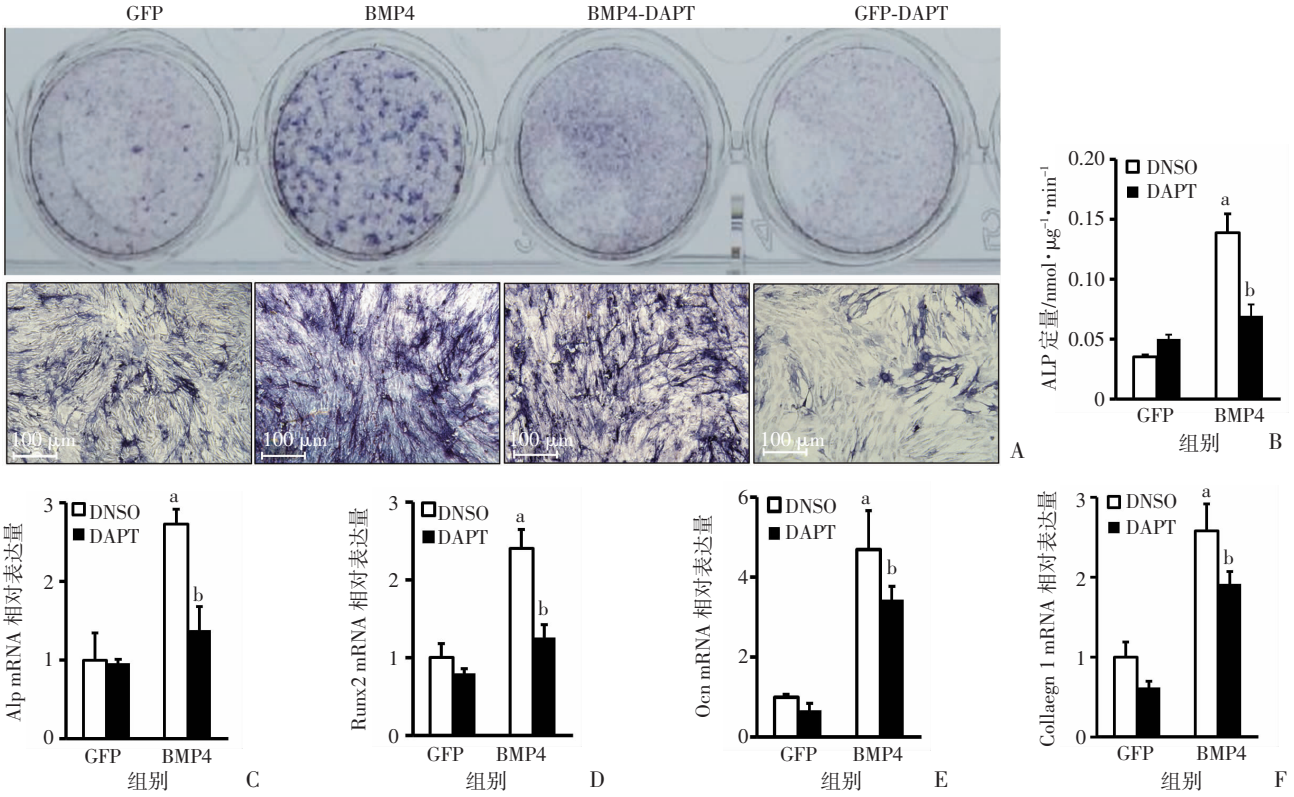
2.5 阻断 Notch 信号抑制 MLO-Y4 过表达 BMP4 诱导的 ST2 成骨分化

为了探讨 MLO-Y4 过表达 BMP4 促进 ST2 成骨分化这一现象是否与 Notch 信号上调有关。在共培养体系中加入 γ 分泌酶抑制剂 DAPT(10 μmol/L)抑制 Notch 信号。在第 3 天,ALP 染色及生化定量结果显示 BMP4+DAPT 组 ALP 活性高于 GFP 组和 GFP+DAPT 组,但显著低于 BMP4 组($P<0.05$,图 5A、B),与成骨标志基因 Alp、Runx2、Ocn 以及 Col1 的表达结果一致($P<0.05$,图 5C~F)。表明 DAPT 抑制共培养体系 Notch 信号后,部分抑制了 MLO-Y4 过表达 BMP4 对 ST2 成骨分化的促进作用。



A:Jag1;B:Jag2;C:Dll4 a:$P<0.05$,与 Ad-GFP 组比较

图 4 qPCR 检测 Ad-BMP4 感染的 MLO-Y4 细胞中 Notch 配体的表达 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A:ALP 染色;B:ALP 生化定量;C~F 分别为 Alp、Runx2、Ocn、Collagen Ⅰ基因的表达 a:$P<0.05$ 与 GFP 组比较;b:$P<0.05$,与 DMSO 比较

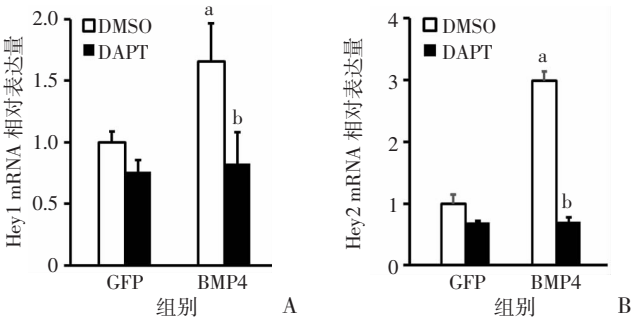
图 5 DAPT 抑制 MLO-Y4 过表达 BMP4 诱导的 ST2 成骨分化 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.6 DAPT 抑制 Notch 信号靶基因的表达

为了进一步论证 Notch 信号在 MLO-Y4 过表达 BMP4 促 ST2 成骨分化的重要作用,验证 DAPT 对 Notch 信号的有效抑制作用。检测了共培养体系 Notch 靶基因 Hey1 以及 Hey2 的表达,结果表明:DAPT 抑制 Notch 靶基因 Hey1、Hey2 的表达($P<0.05$)。表明 DAPT 作为 Notch 信号抑制剂成功抑制了共培养体系中的 Notch 信号(图 6)。

2.7 DPTA 抑制 MLO-Y4 过表达 BMP4 的促血管生成功能

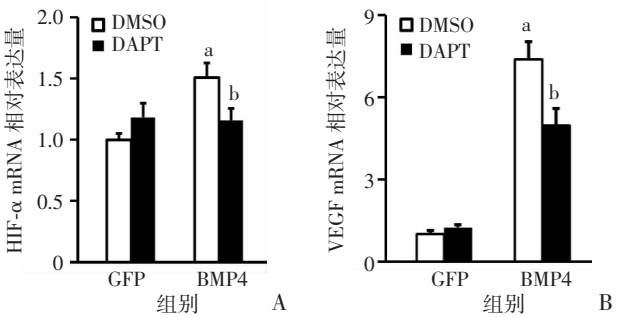
前述已证明过表达 BMP4 的 MLO-Y4 表达更高的



A:Hey1;B:Hey2 a:$P<0.05$,与 GFP 组比较;b:$P<0.05$,与 DMSO 比较

图 6 DAPT 抑制 Notch 信号靶基因的表达 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Notch 配体,而 BMP4 及 Notch 配体 Dll4 与血管生成紧密相关,进一步检测共培养 3 d 后促血管生长因子 HIF1α、VEGF mRNA 转录水平。qPCR 结果显示:与 GFP 组比较,BMP4 组的 VEGF、HIF1α 的表达显著升高($P<0.05$),当使用 DAPT 抑制共培养体系 Notch 信号以后,BMP4+DAPT 组 HIF1α、VEGF 较 BMP4 组表达降低($P<0.05$),表明骨细胞 MLO-Y4 过表达 BMP4 具有促血管生成功能,这可能与 Notch 信号激活有关(图 7)。



A: HIF1α;B: VEGF; a: $P<0.05$,与 GFP 组比较;b: $P<0.05$,与 DMSO 比较

图 7 DAPT 抑制 MLO-Y4 过表达 BMP4 的促血管生成功能($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

骨发育与再生受到多种信号通路调控,例如 Wnt、Notch 以及 BMP 信号等。BMP 信号通过调节细胞增殖、分化和凋亡,在机体的发育和维持中发挥关键作用[16]。本研究发现在骨细胞中过表达 BMP4 显著促进骨髓基质细胞的成骨分化,同时上调 VEGF 的表达,具有潜在促血管生成的作用,经典的 Nocth 信号可能在这一过程中发挥重要作用。

目前 BMP2、BMP7 等在临床上仅仅作为治疗骨不连药物,而未被作为增骨药物使用,其体内增骨作用仍未得到证明。BMP 信号在成骨发育过程中具有阶段性的作用,促进基质细胞的成骨分化[15];相反,有研究发现成骨细胞 BMP 信号抑制骨形成[11-12],随后通过 DMP1-Cre 敲除小鼠成骨及骨细胞中 BMPR1A,导致小鼠骨量、骨密度和机械强度显著增加[17],但其结果并不能特异性证明骨细胞 BMP 信号在骨形成中的作用,因此仍需对骨细胞中 BMP 信号进行进一步的研究。本研究使用骨细胞系 MLO-Y4,排除了成骨细胞的影响,结果表明骨细胞过表达 BMP4 促进骨髓基质细胞的成骨分化,为 BMP 作为增骨药物的临床应用提供重要依据。

Notch 信号已被证明在不同阶段调节成骨分化,导致不同的生物学反应[18-19]。在成骨细胞中激活 Notch 信号促进其矿化[20],而激活干细胞 Notch 信号抑制其成骨分化[21],另有研究表明单独激活 ST2 细胞中的 Notch 信号,抑制其成骨分化[22]。目前为止,大多数研究都依赖于 NICD 的过表达,这不能真实地代表生理性的 Notch 信号作用。经典 Notch 信号的传导需要严格的配体与受体结合,不同的 Notch 反应元件(配体/受体)具有不同的生物学功能[23-24]。本研究结果表明,骨细胞过表达 BMP4 促进骨髓基质细胞成骨分化,DAPT 抑制共培养体系 Notch 信号后,骨细胞过表达 BMP4 促骨髓基质细胞的成骨分化作用减弱,但仍然强于 GFP 组,证明骨细胞 BMP4 对骨髓基质细胞的促成骨分化作用,部分是通过 Notch 信号介导。我们进一步检测过表达 BMP4 对骨细胞自身 Notch 配体的表达的影响,结果表明 BMP4 上调骨细胞 Jag1/2、Dll4 的表达。根据我们前期研究表明骨细胞 Dll4 通过激活骨髓基质细胞 Notch 信号促成骨分化[25],因此,我们认为骨细胞过表达 BMP4 可能通过上调自身 Notch 配体 Dll4 的表达,从而激活骨髓基质细胞 Notch 信号,进而导致其成骨分化增强。但是 BMP4 同时还上调了骨细胞 Jag1、Jag2 的表达,其作用需要进一步验证。

在骨组织中,血管形成与骨形成的相互偶联促进骨骼生长发育和维持骨量平衡,骨血管生成能够促进成骨分化,成骨细胞也能够分泌 VEGF 调控血管内皮细胞的增殖及血管化[26]。有研究报道同时激活 BMP 和 Notch 信号通路能够促进骨髓间充质干细胞向成骨和血管分化[27]。在骨折愈合中 BMP4 能够促进骨形成与血管生成[28],同时检测到 Notch 信号表达上调[29]。BMP4 通过激活成骨细胞中的 p70S6 激酶来刺激 VEGF 的合成,成骨细胞系也被认为是 VEGF 的主要来源[30]。作为主要的促血管生成因子,VEGF 在血管生成过程中具有重要调控作用。

本研究结果表明骨细胞过表达 BMP4 促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化的同时,VEGF 的表达也上调,在抑制 Notch 信号后,成骨分化与 VEGF 表达下降。提示骨细胞过表达 BMP4 可能通过 BMP4-Dll4-Notch 信号途径发挥促成骨和促成血管功能。该结果对于骨组织工程修复骨缺损具有重要应用意义。

综上所述,本研究发现骨细胞过表达 BMP4 可以促进骨髓基质细胞的成骨分化以及具有潜在的促血管生成功能。这一过程可能与 Notch 信号的增强有关,

确切的机制需要进一步探讨。本研究下一步拟通过RNA-Seq技术从基因表达的角度进一步深入研究,揭示骨细胞BMP4与Notch信号协同调控骨形成的机制;通过构建仅在骨细胞中特异性过表达BMP4的小鼠模型,在体内论证骨细胞过表达BMP4的成骨和成血管功能。为BMP4的临床应用以及靶向骨细胞促骨形成药物研发提供理论依据。

参考文献:

[1] MEETA M, HARINARAYAN C V, MARWAH R, *et al*. Clinical practice guidelines on postmenopausal osteoporosis: An executive summary and recommendations-update 2019-2020[J]. J Midlife Health, 2020, 11(2): 96-112. DOI: 10.4103/jmh.jmh_143_20.

[2] TRESGUERRES F G F, TORRES J, LÓPEZ-QUILES J, *et al*. The osteocyte: a multifunctional cell within the bone [J]. Ann Anat, 2020, 227: 151422. DOI: 10.1016/j.aanat.2019.151422.

[3] 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.

[4] ZHU X, CHAN Y T, YUNG P S H, *et al*. Subchondral bone remodeling: a therapeutic target for osteoarthritis[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 607764. DOI: 10.3389/fcell.2020.607764.

[5] XIONG J, ONAL M, JILKA R L, *et al*. Matrix-embedded cells control osteoclast formation[J]. Nat Med, 2011, 17(10): 1235-1241. DOI: 10.1038/nm.2448.

[6] BELLIDO T. Osteocyte-driven bone remodeling[J]. Calcif Tissue Int, 2014, 94(1): 25-34. DOI: 10.1007/s00223-013-9774-y.

[7] TU X, 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.

[8] KAMIYA N, YE L, KOBAYASHI T, *et al*. BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway[J]. Development, 2008, 135(22): 3801-3811. DOI: 10.1242/dev.025825.

[9] KAMIYA N, YE L, KOBAYASHI T, *et al*. Disruption of BMP signaling in osteoblasts through type IA receptor (BMPRIA) in-creases bone mass[J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(12): 2007-2017. DOI: 10.1359/jbmr.080809.

[10] KONDO A, OTSUKA T, KUROYANAGI G, *et al*. Resveratrol inhibits BMP-4-stimulated VEGF synthesis in osteoblasts: sup-pression of S6 kinase [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(4): 1013-1018. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1626.

[11] GAO X, USAS A, PROTO J D, *et al*. Role of donor and host cells in muscle-derived stem cell-mediated bone repair: differentiation vs. paracrine effects[J]. Faseb J, 2014, 28(8): 3792-3809. DOI: 10.1096/fj.13-247965.

[12] XIONG X, TU S, WANG J, *et al*. CXXC5: A novel regulator and coordinator of TGF-β, BMP and Wnt signaling [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(2): 740-749. DOI: 10.1111/jcmm.14046.

[13] 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.

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

[15] VIALE-BOURONCLE S, GOSAU M, MORSCZECK C. NOTCH1 signaling regulates the BMP2/DLX-3 directed osteogenic differentiation of dental follicle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 443(2): 500-504. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.120.

[16] LOWERY J W, ROSEN V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton [J]. Physiol Rev, 2018, 98(4): 2431-2452. DOI: 10.1152/physrev.00028.2017.

[17] KAMIYA N, SHUXIAN L, YAMAGUCHI R, *et al*. Targeted disruption of BMP signaling through type IA receptor (BMPR1A) in osteocyte suppresses SOST and RANKL, leading to dramatic increase in bone mass, bone mineral density and mechanical strength[J]. Bone, 2016, 91: 53-63. DOI: 10.1016/j.bone.2016.07.002.

[18] CANALIS E. Notch in skeletal physiology and disease [J]. Osteoporos Int, 2018, 29(12): 2611-2621. DOI: 10.1007/s00198-018-4694-3.

[19] TU X, CHEN J, LIM J, *et al*. Physiological notch signaling maintains bone homeostasis via RBPjk and Hey upstream of NFATc1[J]. PLoS Genet, 2012, 8(3): e1002577. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002577.

[20] 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.

[21] HILTON M J, TU X, WU X, *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.

[22] SCIAUDONE M, GAZZERRO E, PRIEST L, *et al*. Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation [J]. Endocrinology, 2003, 144(12): 5631-5639. DOI: 10.1210/en.2003-0463.

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

[24] 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.

[25] 冯玮, 谢正松, 罗岑, 等. 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 [J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(09): 899-907. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202001002.
FENG W, XIE Z S, LUO C, *et al*. Construction of MLO-Y4 cells with overexpression of Delta-like genes and their effects on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(9): 899-907. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202001002.

[26] MAES C, KOBAYASHI T, SELIG M K, *et al*. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels[J]. Dev Cell, 2010, 19(2): 329-344. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.07.010.

[27] LIAO J, WEI Q, ZOU Y, *et al*. Notch Signaling Augments BMP9-induced bone formation by promoting the osteogenesis-angiogenesis coupling process in mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. Cell Physiol Biochem, 2017,41(5): 1905-1923. DOI: 10.1159/000471945.

[28] YANG X, JIANG J, ZHOU L, *et al*. Osteogenic and angiogenic characterization of mandible and femur osteoblasts[J]. J Mol Histol, 2019, 50(2): 105-117. DOI: 10.1007/s10735-019-09810-6.

[29] WANG C C, INZANA J A, MIRANDO A J, *et al*. NOTCH signaling in skeletal progenitors is critical for fracture repair [J]. J Clin Investig, 2016, 126(4): 1471-1481. DOI: 10.1172/JCI80672.

[30] HU K, OLSEN B R. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair[J]. J Clin Invest, 2016, 126(2): 509-526. DOI: 10.1172/jci82585.

(**收稿**:2021-02-18;**修回**:2021-03-14)

(编辑 吴培红)