基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001200

FSHβ 在骨形态蛋白 9 诱导小鼠胚胎成纤维细胞成骨分化中的作用研究

苏晓娅，黄　敏，刘　宏

（重庆医科大学附属第一医院生殖健康与不孕症中心，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：探讨卵泡刺激素 β 亚基（follicle-stimulating hormone β，FSHβ）对骨形态发生蛋白 9（bone morphogenetic protein 9，BMP9）诱导小鼠胚胎成纤维细胞（mouse embryonic fibroblasts，MEFs）成骨分化中的作用。**方法**：采用 AdEasy 系统构建表达绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）、FSHβ 和 BMP9 的重组腺病毒（Ad-GFP、Ad-FSHβ 和 Ad-BMP9），实验分组为：Ad-GFP 组、Ad-BMP9 组、Ad-FSHβ 组和 Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组。运用化学发光定量和组织化学染色法分别检测各组 3、5、7 d 碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）活性；Western blot 检测成骨分化早期转录因子（Runx2 和 DLX5）的蛋白表达水平；RT-PCR 检测成骨分化晚期指标骨钙蛋白（osteocalcin，OCN）和骨桥蛋白（osteopontin，OPN）的 mRNA 表达水平；茜素红染色检测钙盐沉积；流式细胞技术检测各实验组细胞的周期分布。**结果**：在 MEFs 中，过表达 FSHβ 能明显促进 BMP9 诱导 MEFs 骨化过程中第 3 天（6 874.67 ± 224.93 vs. 11 935.67 ± 568.76，P=0.000）、第 5 天（43 434.67 ± 2 047.57 vs. 98 913.33 ± 4 606.26，P=0.000）、第 7 天（38 198.00 ± 2 376.43 vs. 78 534.67 ± 2 114.56，P=0.000）的 ALP 活性，转录因子 Runx2（1.171 ± 0.105 vs. 1.350 ± 0.053，P=0.026）、DLX5（1.382 ± 0.123 vs. 1.738 ± 0.286，P=0.001）和晚期成骨指标 OCN（1.300 ± 0.045 vs. 1.471 ± 0.046，P=0.002）、OPN（1.300 ± 0.084 vs. 1.479 ± 0.038，P=0.016）的表达水平，以及钙盐沉积。此外，FSHβ 和（或）BMP9 对 MEFs 细胞周期没有明显影响（G1 期：F=0.226，P=0.876；G2 期：F=0.147，P=0.929；S 期：F=0.027，P=0.994）。**结论**：在不影响 MEFs 细胞周期的情况下，FSHβ 协同 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化。

【关键词】骨形态发生蛋白 9；卵泡刺激素 β 亚基；小鼠胚胎成纤维细胞；成骨分化

【中图分类号】R322.54；R322.71；R329.2　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-07-30

Role of FSHβ in BMP9-induced osteogenic differentiation in mouse embryonic fibroblasts

Su Xiaoya，Huang Min，Liu Hong

（Department of Reproduction Health and Infertility，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University）

【Abstract】***Objective***：To study the effect of follicle-stimulating hormone β（FSHβ）on bone morphogenetic protein 9（BMP9）-induced osteogenic differentiation in mouse embryonic fibroblasts（MEFs）. ***Methods***：AdEasy system was used for generating target recombinant adenoviruses（Ad-GFP，Ad-FSHβ，and Ad-BMP9），and our investigation was designed into four groups：Ad-GFP group，Ad-BMP9 group，Ad-FSHβ group，and Ad-BMP9+Ad-FSHβ group. Chemiluminescence technique and histochemical staining were conducted to assay alkaline phosphatase（ALP）activity on day 3，5，and 7，Western blot to test the protein expression of Runx2 and Dlx5，RT-PCR to measure the mRNA expression of osteocalcin（OCN）and osteopontin（OPN），and Alizarin Red S staining to detect the matrix mineralization. In addition，Flow cytometry was utilized for analysing the cell cycle of different groups. ***Results***：Exogenous expression of FSHβ dramatically enhanced the ALP activity on day 3（6 874.67 ± 224.93 vs. 11 935.67 ± 568.76，P=0.000），day 5（43 434.67 ± 2 047.57 vs. 98 913.33 ± 4 606.26，P=0.000），and day 7（38 198.00 ± 2 376.43 vs. 78 534.67 ± 2 114.56，P=0.000），and the protein expression of Runx2（1.171 ± 0.105 vs. 1.350 ± 0.053，P=0.026）and DLX-5（1.382 ± 0.123 vs. 1.738 ± 0.286，P=0.001），and the mRNA expression of late osteogenic makers，namely OCN（1.300 ± 0.045 vs. 1.471 ± 0.046，P=0.002）and OPN（1.300 ± 0.084 vs. 1.479 ± 0.038，P=0.016），and matrix mineralization induced by BMP9 in MEFs. Moreover，efficient infection of Ad-FSHβ or/and Ad-BMP9 remains no apparent influence on cell cycle in MEFs（G1-phase：F=0.226，P=0.876；G2-phase：F=

作者介绍：苏晓娅，Email：756805545@qq.com，研究方向：分子医学。

通信作者：刘　宏，Email：3367009927@qq.com。

基金项目：重庆市科学技术委员会资助项目（编号：cstc2012jjA10113）。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1132.074.html（2017-03-13）

0.147, P=0.929; S-phase: F=0.027, P=0.994). ***Conclusion***: FSHβ promotes BMP9-induced osteogenic differentiation without substantial effect on cell cycle in MEFs.

【Key words】bone morphogenetic protein 9; follicle-stimulating hormone β; mouse embryonic fibroblasts; osteogenic differentiation

绝经后期骨质疏松(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是临床上骨科常见的女性骨缺损、骨不连接疾病，表现为循环中卵泡刺激素水平(follicle-stimulating hormone, FSH)增高和雌激素水平(estradiol, E2)降低，目前以激素替代疗法为主，但常引发一系列副作用[1]。组织工程骨是治疗该疾病的理想材料，间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为骨组织工程的种子细胞之一[2]，小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)是常用的一种 MSCs，具有自我复制和多向分化潜能，研究如何将其快速、高效地用于临床也成为近年热点[3]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)属于转化生长因子 β(transforming growth factor-β, TGF-β)超家族成员，对骨发育和骨缺损修复有重要作用[4]，其中，骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)被认为是目前诱导 MSCs 骨向分化最具潜力的 BMPs 之一[5]，但其具体机制尚不明确。

FSH 是哺乳动物中调节生殖的重要因子，属于垂体分泌的二聚体(由 α、β 亚基组成，β 亚基发挥其特异性功能)糖蛋白，FSH 对围绝经期女性的骨重塑有重要调节作用[6]。虽然大多数学者认为FSH是促进骨吸收、抑制骨形成的主要因子[6-8]，但是，运用转基因技术在雌小鼠中过表达 FSHβ，却能显著促进骨的形成[9]，表明 FSH 对骨代谢的具体调节作用尚存争议。由此猜想，如果将 MSCs 作为研究和治疗 PMOP 的组织工程种子细胞，必须同时考虑 PMOP 患者特殊的生理水平，增高的 FSH 水平与 BMP9 联合应用是否对 MSCs 诱导成骨效应有影响，目前鲜有报道。

考虑到 FSHβ 通常与 FSH 受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)特异性结合来执行 FSH 功能[10]；以及 BMP9 高效诱导 MSCs 成骨分化的特性，本研究采用 AdEasy 方法[11]构建过表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)、FSHβ 和 BMP9 的重组腺病毒载体，探讨 FSHβ 对BMP9 诱导 MEFs 骨向分化的作用，为临床有效地预防和治疗 PMOP 提供理论依据，并进一步拓展BMP9 诱导 MSCs骨向分化的影响因子及应用范围。

1 材料及方法

1.1 试剂与细胞培养

MEFs 和人胚胎肾细胞-293(human embryonic kidney-293, HEK-293)购自 American Type Culture Collection(ATCC)。采用 DMEM 培养液(高糖、含 10%胎牛血清、链霉素 100 mg/L 和青霉素 100 kU/L)培养细胞；孵育在 5% CO_2 饱和湿度、37 ℃培养箱。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒购自碧云天生物科技有限公司，ALP 化学发光试剂盒购自 BD Clontech 公司。Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。实验所用抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 目标重组腺病毒构建

本实验均采用 AdEasy[11]系统构建重组腺病毒。运用 PCR 扩增从小鼠 EST 克隆中的目的基因编码序列，并克隆到穿梭质粒(均用 CMV 启动子)，再将穿梭质粒线性化后与BJ5183-AdEasy 细菌重组，最后将正确重组的质粒线性化后转染 HEK-293 细胞，进而得到目标基因编序列重组的腺病毒，即 GFP 重组腺病毒(Ad-GFP)、BMP9 重组腺病毒(Ad-BMP9)及 FSHβ 重组腺病毒(Ad-FSHβ)。Ad-GFP 用作实验对照组。

1.3 腺病毒滴度检测与实验分组

实验前将各目标腺病毒(Ad-GFP、Ad-BMP9 及 Ad-FSHβ)液在 MEFs 细胞中分别进行相对滴度测定，将指数生长的细胞接种于 24 孔板(5.0×10^5 个/孔)，待其贴壁之后分别加入不同体积(0.5、1、2、4、8、16 μL/孔)的病毒液于孔板中，24 h 后观察荧光，确定目标腺病毒感染率所需病毒液体积；最后，根据实验设计确定最佳腺病毒感染率。实验分组分为对照组(Ad-GFP 组)和实验组(Ad-BMP9 组、Ad-FSHβ 组及 Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组)。

1.4 ALP 活性检测

将指数生长的 MEFs 接种于 24 孔板(5.0×10^5 个/孔)，待其贴壁后按实验设计施加相应处理，于实验第 3、5、7 天参照文献[12]进行 ALP 染色和 ALP 活性定量测定，按具体试剂盒说明规范操作，另用 BCA 法测定蛋白浓度，以校正 ALP 活性。每组实验重复 3 次。

1.5 Western blot 实验

将指数生长的 MEFs 接种于 6 孔板(2×10^6 个/孔)，待其贴壁后按实验设计施加相应处理，于特定时间点提取各组总蛋白。采用 BCA 法检测各组蛋白浓度，按常规操作方法进行目标蛋白检测。最后运用 ECL 试剂盒显影成像。每组实验重复 3 次。

1.6 RNA 提取与 RT-PCR 实验

将指数生长的 MEFs 接种于 T25 培养瓶(5×10^6 个/瓶)，待其贴壁后按实验设计施加不同处理，于特定时间点采用

TRIzol法提取总 RNA，再逆转录制备 cDNA，最后进行 PCR 检测目的基因 mRNA 表达水平。每组实验重复 3 次。PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列表

Tab.1 Sequences of PCR primers

基因	序列(5'-3')	大小(bp)
GAPDH	上游:ACCCAGAAGACTGTGGATGG	170
	下游:CACATTGGGGGTAGGAACAC	
OCN	上游:CAGACATCTATCCGGGAGGA	196
	下游:CGCCTGGGTCTCTTCACTAC	
OPN	上游:TGAAACGAGTCAGCTGGATG	186
	下游:TGAAATTCATGGCTGTGGAA	

1.7 茜素红染色测定钙盐沉积

将指数生长的 MEFs 接种于 24 孔板(5.0×10^5 个/孔)，待其贴壁后按实验设计施加相应处理，48 h 后，加入终浓度为 50 μg/mL 的维生素 C 和 10 mmol/L 的 β-磷酸甘油，培养第 21 天参照文献[13]进行茜素红染色。每组实验重复 3 次。

1.8 流式细胞技术测细胞周期

将指数生长的 MEFs 接种于 6 孔板(2×10^6 个/孔)，待其贴壁后按实验设计施加相应处理，于 48 h 后收集细胞，通过流式细胞技术检测细胞周期。每组实验重复 3 次。

1.9 统计学分析

应用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行实验数据统计学分析，数据结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多样本均数比较采用单因素方差分析，加入时间变化趋势时，采用重复测量方差分析，两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 α=0.05。

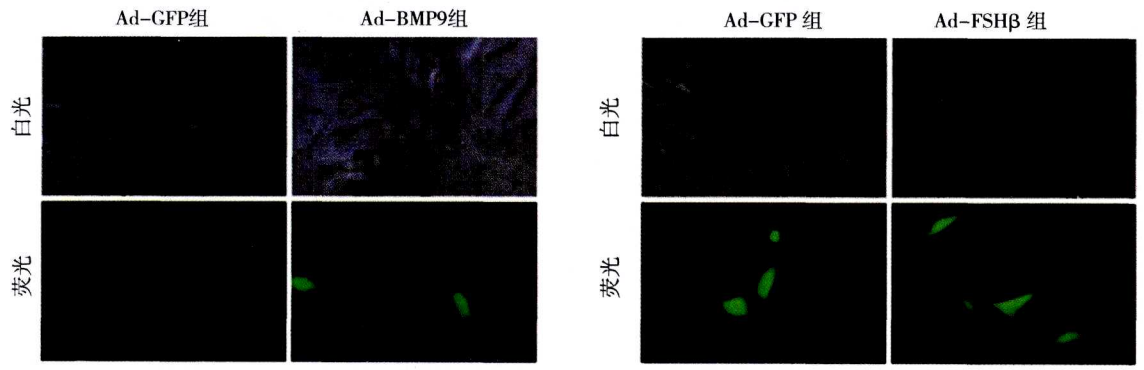
2 结 果

2.1 重组腺病毒对 MEFs 的感染以及相应重组腺病毒的蛋白检测

MEFs 经重组腺病毒(Ad-GFP，Ad-FSHβ 和 Ad-BMP9)感染 24 h 后，生长状态良好，荧光倒置显微镜下观察感染率为 30%~40%(图 1A、B)。Western blot 结果显示在 MEFs 中 Ad-FSHβ 和 Ad-BMP9 的病毒检测结果(图 1C、D)，提示实验用病毒构建成功。

2.2 FSHβ 使 BMP9 诱导 MEFs 的 ALP 活性增加

ALP 广泛存在于机体各组织器官中，是成骨细胞的特异性标志，是常用于评价成骨细胞早期分化的特异性指标。考虑实验组是检测第 3、5、7 天的 ALP 活性趋势有无变化，采用重复测量方差分析进行统计，ALP 活性读数结果(表 2)显示，与 GFP 对照组相比，BMP9 组能显著诱导 ALP 活性增加(P<0.000)，说明 BMP9 有诱导早期成骨分化的作用；结果也显示 FSHβ 组与对照组差异无统计学意义，说明单独运用 FSHβ 并不能诱导 ALP 活性增加。但是 BMP9 与 FSHβ 联合组比单独 BMP9 处理组更能促进 MEFs 中 ALP 活性增加(P<0.000)，在第 3、5、7 天都呈现出相同的趋势(表 2，图 2A)。ALP 染色结果与 ALP 活性读数结果一致(图 2B)。提示FSHβ 在 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化中可能具有重要作用。



A. 荧光倒置显微镜下示 GFP 和 BMP9 重组腺病毒感染 MEFs24 h 后的感染率(200×)

B. 荧光倒置显微镜下示 GFP 和 FSHβ 重组腺病毒感染 MEFs24 h 后的感染率(200×)



C. Western blot 结果示 GFP 和 BMP9 重组腺病毒感染 MEFs24 h 后 BMP9 的表达

D. Western blot 结果示 GFP 和 FSHβ 重组腺病毒感染 MEFs24 h 后 FSHβ 的表达

图 1 GFP、FSHβ 和 BMP9 的重组腺病毒分别感染 MEFs 细胞 24 h 后的有效感染率(200×)和相应的蛋白表达水平

Fig.1 Efficient infections of GFP, FSHβ and BMP9 recombinant adenovirus (200×) and the corresponding expression level of proteins in MEFs

2.3 FSHβ 促进 BMP9 诱导 MEFs 早、中晚期成骨相关指标的表达

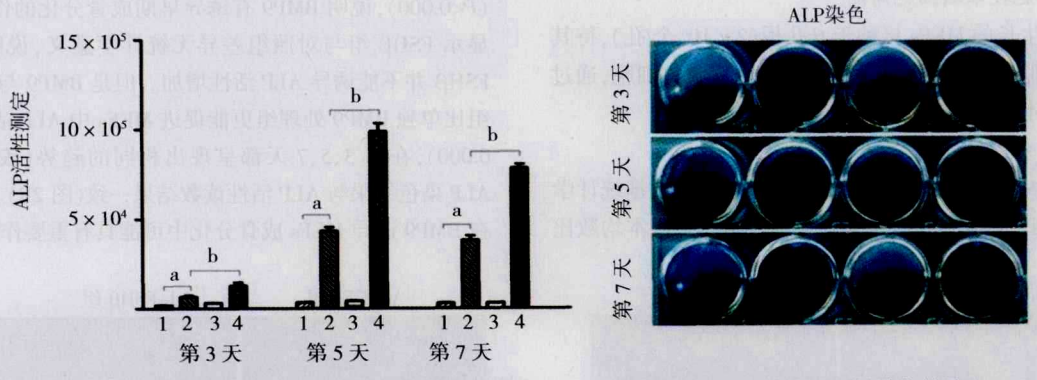
在各实验组施加处理因素后，于第 24 小时提取各组蛋白，运用 Western blot 检测各组 Runx2 和 DLX-5 的蛋白表达水平，以及 Image J 软件定量测定各组条带的相对灰度值，Runx2 蛋白在各组的相对表达量为：Ad-GFP 组（1.000 ± 0.000）、Ad-BMP9 组（1.171 ± 0.105）、Ad-FSHβ 组（0.867 ± 0.109）、Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组（1.349 ± 0.537），且组间比较有统计学差异（F=20.327，P=0.000）；DLX-5 蛋白在各组的相对表达量为：Ad-GFP 组（1.000 ± 0.000）、Ad-BMP9 组（1.382 ± 0.123）、Ad-FSHβ 组（1.276 ± 0.094）、Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组（1.350 ± 0.286），且组间比较有统计学差异（F=37.753，P=0.000）。结果显示，FSHβ 与 BMP9 联合能增强 BMP9 在 MEFs 中诱导早期成骨转录因子 Runx2（P=0.026）、DLX5（P=0.001）的蛋白表达水平（图 3），单独 FSHβ 组与对照组相比，只增加了 DLX-5（P=0.004）的蛋白表达水平，但对 Runx2（P=0.076）的

表 2 FSHβ 对 BMP9 诱导 MEFs 的 ALP 活性的影响（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Tab.2 Effect of FSHβ on BMP9-initiated quantitative ALP activities in MEFs（$\bar{x} \pm s$，n=3）

组别	第 3 天	第 5 天	第 7 天
Ad-GFP组	2 038.33 ± 113.36	3 593.00 ± 120.03	2 980.33 ± 116.36
Ad-BMP9组	6 874.67 ± 224.93	43 434.67 ± 2 047.57	38 198.00 ± 2 376.43
Ad-FSHβ 组	3 490.67 ± 381.41	4 306.33 ± 187.43	3 239.67 ± 51.64
Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组	11 935.67 ± 568.76	98 913.33 ± 4 606.26	78 534.67 ± 2 114.56

注：$F_{组别}$=2 409.637，$P_{组别}$=0.000；$F_{时间}$=1 092.910，$P_{时间}$=0.000；$F_{交互影响}$=453.177，$P_{交互影响}$=0.000



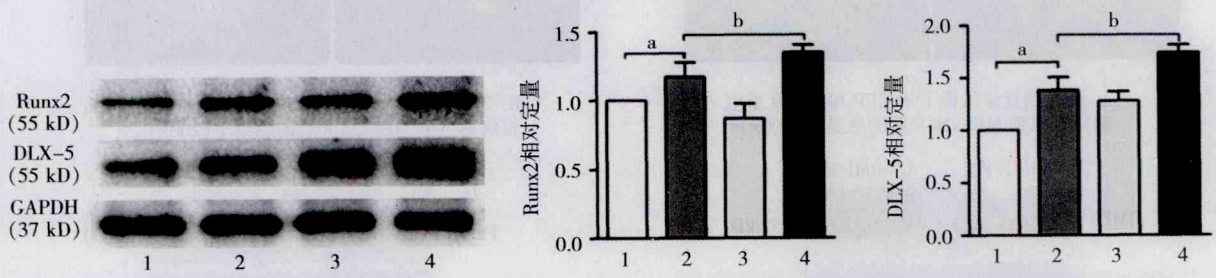
A. 各组第 3、5、7 天 ALP 活性定量测定　　B. 各组第 3、5、7 天 ALP 活性染色结果

1：Ad-GFP 组；2：Ad-BMP9 组；3：Ad-FSHβ 组；4：Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组

a：Ad-BMP9 组与 Ad-GFP 组相比，P=0.000；b：Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组与 Ad-BMP9 组相比，P=0.000

图 2 FSHβ 对 BMP9 诱导 MEFs 的 ALP 活性的影响

Fig.2 Effect of FSHβ on BMP9-initiated ALP activity in MEFs



A. Western blot 结果示各组 24 h 早期成骨转录因子的表达

B. Runx2 的相对定量结果

a：与 Ad-GFP 组相比，P=0.032；

b：与 Ad-BMP9 组相比，P=0.026

C. DLX-5 的相对定量结果

a：与 Ad-GFP 组相比，P=0.001；

b：与 Ad-BMP9 组相比，P=0.001

1：Ad-GFP 组；2：Ad-BMP9 组；3：Ad-FSHβ 组；4：Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组

图 3 Western blot 结果示 FSHβ 对 BMP9 诱导 MEFs 早期成骨转录因子表达的影响

Fig.3 Western blot results show the effect of FSHβ on BMP9-induced early osteogenic transcriptional factors in MEFs

蛋白表达水平差异并无统计学意义。

各实验组施加处理因素后，于第 11 天提取各组 mRNA，运用 RT-PCR 检测各组 OPN 和 OCN 的 mRNA 表达水平，以及 Image J 软件定量测定各组条带的相对灰度值，OPN 的 mRNA 在各组的相对表达量为：Ad-GFP 组（1.000 ± 0.000）、Ad-BMP9 组（1.305 ± 0.084）、Ad-FSHβ 组（1.080 ± 0.116）、Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组（1.479±0.038），且组间比较有统计学差异（F=25.565，P=0.000）；OCN 的 mRNA 在各组的相对表达量为：Ad-GFP 组（1.000 ± 0.000）、Ad-BMP9 组（1.300 ± 0.045）、Ad-FSHβ 组（1.027 ± 0.067）、Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组（1.471 ± 0.046），且组间比较有统计学差异（F=70.197，P=0.000）。结果显示，FSHβ 与 BMP9 联合作用 MEFs 后，比单独 BMP9 组增加了 OCN（P=0.002）、OPN（P=0.026）的 mRNA 表达水平（图 4），单独 FSHβ 组与对照组相比，OCN（P=0.500）和 OPN（P=0.225）的 mRNA 水平差异无统计学意义。

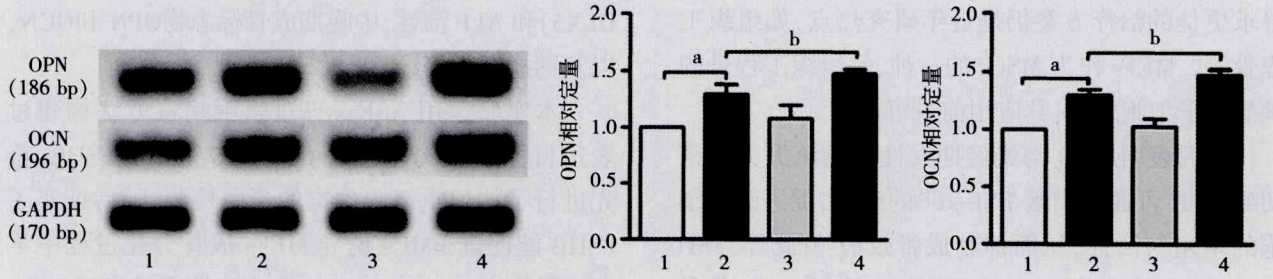
以上结果显示，FSHβ 显著促进 BMP9 诱导 MEFs 骨向分化过程中早期指标（Runx2 和 DLX-5）和中晚期指标（OCN 和 OPN）的表达水平，表明 FSHβ 对 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化具有明显促进作用。

2.4 FSHβ 促进 BMP9 诱导 MEFs 的钙盐沉积

在各实验组施加处理因素后，于第 3 天用钙盐诱导培养基培养，第 21 天用茜素红进行染色，结果显示 FSHβ 与 BMP9 联合能增强单独 BMP9 诱导 MEFs 的钙盐沉积，表现出更强的矿化作用（图 5）。结果提示，FSHβ 能促进 BMP9 诱导 MEFs 晚期骨向分化。

2.5 FSHβ 和（或）BMP9 对 MEFs 细胞周期没有明显影响

如前面所示，FSHβ 能促进 BMP9 诱导 MEFs 早、中、晚期骨向分化，而细胞的生长发育常常伴随增殖与分化两个过程，那么是否同时对 MEFs 的增殖周期也有影响。如前面所述各组处理因素，在 FSHβ 协同 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化中施加相同的重组腺病毒滴度，于 48 h 后收集细胞，用流式细胞技术检测细胞周期分析，各实验组（Ad-GFP 组、Ad-BMP9 组、Ad-FSHβ 组和 Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组）细胞的周期分布分别为：G1 期（44.122%、41.713%、41.151%和42.438%），组间比较 F=0.226，P=0.876；G2 期（10.274%、13.519%、12.636%和 11.481%），组间比较 F=0.147，P=0.929；S 期（45.604%、44.768%、45.213%和 46.081%），组间比较 F=0.027，P=0.994。由此得出各实验组间细胞周期的分布没有明显差异（图 6）。结果提示，可能在不影响 MEFs 细胞周期的情况下，FSHβ 协同刺激 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化。



A. RT-PCR 结果示各组第 11 天 OPN、OCN 的 mRNA 表达

B. OPN 的相对定量结果

C. OCN 的相对定量结果

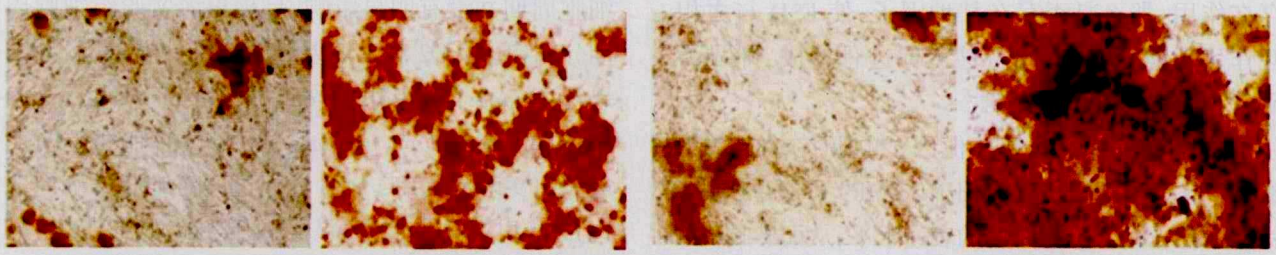
a：与 Ad-GFP 组相比，P=0.001；b：与 Ad-BMP9 组相比，P=0.016；

a：与 Ad-GFP 组相比，P=0.000；b：与 Ad-BMP9 组相比，P=0.002

1：Ad-GFP 组；2：Ad-BMP9 组；3：Ad-FSHβ 组；4：Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组

图 4 RT-PCR 结果显示 FSHβ 对 BMP9 诱导 MEFs 中 OCN、OPN 的 mRNA 表达的影响

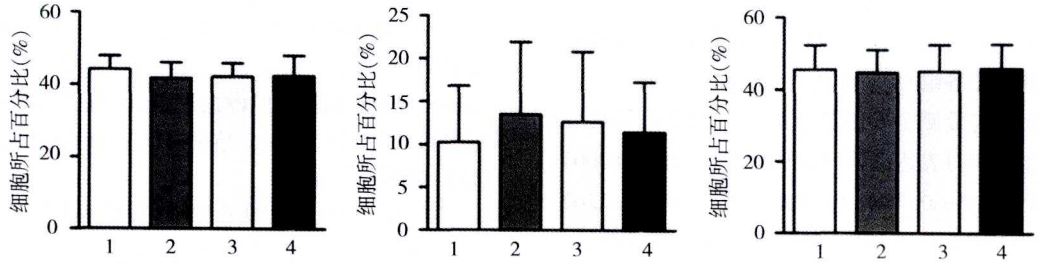
Fig.4 RT-PCR results exhibit the effect of FSHβ on BMP9-induced the expression of OCN and OPN in MEFs



A. Ad-GFP 组　B. Ad-BMP9 组　C. Ad-FSHβ 组　D. Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组

图 5 茜素红染色显示 FSHβ 对 BMP9 诱导 MEFs 钙盐沉积的影响（100×）

Fig.5 Alizarin Red S staining results show the effect of FSHβ on BMP9-induced matrix mineralization in MEFs（100×）



A. G1 期细胞数目所占百分比　B. G2 期细胞数目所占百分比　C. S 期细胞数目所占百分比

1：Ad-GFP 组；2：Ad-BMP9 组；3：Ad-FSHβ 组；4：Ad-BMP9+Ad-FSHβ 组

图 6　FSHβ 和（或）BMP9 对 MEFs 生长周期的影响

Fig.6　Effect of FSHβ and/or BMP9 on cell cycle of MEFs

3　讨　论

PMOP是临床上骨科常见的女性骨缺损、骨不连接疾病，与年龄增加、卵巢功能减退，以及骨代谢紊乱等因素相关，目前以激素替代疗法为主，并倾向于“预防-治疗-目标”个性化治疗策略[1,14]。但是，寻求更佳的治疗方案仍是近年研究热点，如组织工程骨等。MEFs 作为 MSCs 的一种，是组织工程骨的理想种子细胞之一，其应用前景可观[2]。

研究表明，FSH 与绝经期女性骨量流失关系密切[6]。FSH 可通过刺激 TNF-α[15]的产生，促进破骨细胞的增殖与活性，从而抑制成骨效应[16]；此外，FSH 可通过 FSHR 介导 Erk1/2 磷酸化来抑制 MSCs 的骨向发育[17]。但是，运用转基因模型在雌小鼠中过表达 FSHβ，却能显著增强骨强度、骨密度与骨形成[9]；且在相对年轻的绝经后期女性循环中，FSH 水平与降低的骨密度水平并不相关[18]。因此，FSH 对骨代谢可能存在双向调节作用。由于 PMOP 患者常呈现出骨吸收大于骨形成，而 FSH 对成骨细胞和破骨细胞均存在作用，那么是否存在某种因子，使 FSH 与之相互作用后能减慢骨吸收，甚至促进骨形成，即成为研究和治疗 PMOP 的关键。

FSH 的作用常受到其他因子的调控，如 BMPs 成员[19-20]。大鼠卵巢颗粒细胞中，BMP9 可通过BMPs/Smads 信号通路下调 FSH 的表达水平，从而影响FSH 诱导的甾体类激素表达[19]；小鼠颗粒细胞中 BMP2 却能增加 FSHβ 的转录水平[20]，这些研究表明不同细胞系和组织中 BMPs 和 FSH 之间存在相互作用。考虑到 BMP9 是目前发现的诱导 MSCs 成骨分化最强的 BMPs 之一[5]，于是猜想，FSH 对 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化可能具有调节作用。本实验中，采用 MEFs 作为成骨诱导细胞，虽然骨化过程十分复杂，但目前仍可通过检测一些成骨分化标志物来分析该过程，如早期成骨分化转录因子（Runx2、Osterix、DLX5）和 ALP 活性，中晚期成骨标志物OPN 和OCN，以及钙盐沉积等。

本实验运用 AdEasy[11]重组腺病毒方法构建过表达目标载体 Ad-GFP、Ad-BMP9 和 Ad-FSHβ，首先进行了构建重组腺病毒的蛋白检测，随后证实了 FSHβ 能促进 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化过程中早期成骨指标 Runx2、DLX-5 和中晚期成骨指标OCN、OPN 的表达水平，以及钙盐沉积，表现为 FSHβ 与 BMP9 联合组比单独应用 BMP9 组更能诱导 MEFs 成骨效应，而单独 FSHβ 组与对照组差异没有统计学意义。并且保持对 MEFs 成骨分化有效的 Ad-BMP9 和 Ad-FSHβ 感染滴度不变的情况下，运用流式细胞技术检测到 BMP9 和（或）FSHβ 对 MEFs 的细胞周期并没有明显影响，呈现出各实验组细胞周期分布在 G1、G2 和 S 期差异并无统计学意义，该结果与 Huang 等研究的 Pten（phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten）抑制剂协同促进 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化过程对细胞增殖周期也没有明显影响的结果一致[21]，推测当 FSHβ 与 BMP9 共同作用时，只是加速了 MEFs 的分化过程，而对细胞增殖周期并没有太大影响。

本实验初步揭示了 FSHβ 对 BMP9 诱导 MEFs

成骨分化过程中的促进作用。但是，该研究结果仅从单一的体外实验所得，没有考虑到其他细胞（如破骨细胞）和细胞因子的相互作用，并且选择 MEFs 作为成骨诱导细胞与实际 PMOP 的研究还有一定差异，后期可以考虑采用成骨细胞与破骨细胞共培养，以及 PMOP 动物造模，并提取造模动物 MSCs 等深入分析。

本研究表明，在不影响 MEFs 细胞周期的情况下，FSHβ 协同 BMP9 诱导 MEFs 成骨分化。该研究为临床深入研究和有效治疗 PMOP 提供理论依据，并进一步拓展 BMP9 诱导 MSCs 骨向分化中的影响因子和可能机制。

参 考 文 献

[1] Figueroa-Casas PR. Current status of hormone therapy during the menopausal transition and post-menopause[J]. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba, 2005, 62(2S1): 32-36.

[2] Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair[J]. J Cell Physiol, 2009, 218(2): 237-245.

[3] Sukul M, Nguyen TB, Min YK, et al. Effect of local sustainable release of BMP2-VEGF from nano-cellulose loaded in sponge biphasic calcium phosphate(BCP) on bone regeneration[J]. Tissue Eng Part A, 2015, 21(11-12): 1822-1836.

[4] Ali IH, Brazil DP. Bone morphogenetic proteins and their antagonists: current and emerging clinical uses[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(15): 3620-3632.

[5] Luu HH, Song WX, Luo X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. J Orthop Res, 2007, 25(5): 665-677.

[6] Zaidi M, Blair HC, Iqbal J, et al. New insights: elevated follicle-stimulating hormone and bone loss during the menopausal transition[J]. Curr Rheumatol Rep, 2009, 11(3): 191-195.

[7] Colaianni G, Cuscito C, Colucci S. FSH and TSH in the regulation of bone mass: the pituitary/immune/bone axis[J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 67-78.

[8] Garcia-Martin A, Reyes-Garcia R, Garcia-Castro JM, et al. Role of serum FSH measurement on bone resorption in postmenopausal women [J]. Endocrine, 2012, 41(2): 302-308.

[9] Allan CM, Kalak R, Dunstan CR, et al. Follicle-stimulating hormone increases bone mass in female mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(52): 22629-22634.

[10] Kaiser UB, Conn PM, Chin WW. Studies of gonadotropin-releasing hormone(GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines[J]. Endocr Rev, 1997, 18(1): 46-70.

[11] Luo J, Deng ZL, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1236-1247.

[12] Wang N, Wang X, Cheng W, et al. Puerarin promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis in vitro[J]. Chin Med, 2013, 8(1): 17.

[13] Fakhry M, Hamade E, Badran B, et al. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts[J]. World J Stem Cells, 2013, 5(4): 136-148.

[14] Andreopoulou P, Bockman RS. Management of postmenopausal osteoporosis[J]. Annu Rev Med, 2015, 66: 329-334.

[15] Iqbal J, Sun L, Kumar TR, et al. Follicle-stimulating hormone stimulates TNF production from immune cells to enhance osteoblast and osteoclast formation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(40): 14925-14930.

[16] Wang J, Zhang W, Yu C, et al. Follicle-stimulating hormone increases the risk of postmenopausal osteoporosis by stimulating osteoclast differentiation[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0134986.

[17] Tourkova IL, Witt MR, Li L, et al. Follicle stimulating hormone receptor in mesenchymal stem cells integrates effects of glycoprotein reproductive hormones[J]. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1335: 100-109.

[18] Gourlay ML, Specker BL, Li C, et al. Follicle-stimulating hormone is independently associated with lean mass but not BMD in younger postmenopausal women[J]. Bone, 2012, 50(1): 311-316.

[19] Hosoya T, Otsuka F, Nakamura E, et al. Regulatory role of BMP-9 in steroidogenesis by rat ovarian granulosa cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015, 147: 85-91.

[20] Wang Y, Ho CC, Bang E, et al. Bone morphogenetic protein 2 stimulates noncanonical SMAD2/3 signaling via the BMP type 1A receptor in gonadotrope-like cells: implications for FSH synthesis[J]. Endocrinology, 2014, 155(5): 1970-1981.

[21] Huang J, Yuan SX, Wang DX, et al. The role of COX-2 in mediating the effect of PTEN on BMP9 induced osteogenic differentiation in mouse embryonic fibroblasts[J]. Biomaterials, 2014, 35(36): 9649-9659.

（责任编辑：冉明会）