

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.04.003

· 基础研究 ·

山奈酚通过 mTORC1 信号促进牵张力下小鼠骨髓间充质细胞成骨分化机制研究

崔琳娜^{1,2}, 蒋校文^{1,2}, 黄华庆^{1,2}, 陈金勇^{1,2}

1. 郴州市第一人民医院口腔科 南华大学转化医学研究所, 湖南 郴州(423000); 2. 南方医科大学口腔医学院, 广东 广州(510515)

【摘要】 目的 探讨山奈酚(kaempferol, Kae)对周期性单轴牵张力下小鼠骨髓间充质细胞(bone marrow mesenchymal cells, BMMCs)成骨分化过程中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)信号通路的作用。方法 对体外分离培养的小鼠 BMMCs 施加形变量 10% 的单轴动态牵张力, 通过细胞毒性试验筛选出合适浓度 Kae, 并添加工具药 pp242 改变内源性 mTOR 信号, 在牵张后 4 h 利用化学比色法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性变化、ELISA 法检测骨钙素(osteocalcin, OCN)表达量, 流式细胞仪检测细胞内钙离子相对含量; 利用 Western Blot 检测内源性 mTORC1 信号通路主要分子哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、核糖体蛋白 S6 激酶(ribosomal protein S6 kinases, S6K)、4E/BP1 的磷酸化表达及成骨转录因子 Runx2 和 Osterix 的表达变化, qRT-PCR 检测上述因子 mRNA 表达水平。结果 10 μmol/L Kae 对细胞的抑制作用较小, 且成骨能力最强。加力结束后 4 h, Kae 能够有效促进 BMMCs 成骨分化, ALP 表达为(153.04 ± 18.72)U/mg, OCN 表达为(1.64 ± 0.25)U, 成骨转录因子 Runx2、Osterix 的 mRNA 水平和蛋白水平表达上调, 细胞内钙离子含量下降, 同时 mTORC1 信号通路中 mTOR、S6K mRNA 水平及蛋白磷酸化表达上调, 4E/BP1 mRNA 水平及蛋白磷酸化表达下调; 在加入 pp242 抑制 mTORC1 信号表达后, mTOR、S6K mRNA 水平及蛋白磷酸化表达下调, 4E/BP1 mRNA 水平及蛋白磷酸化表达上调, BMMCs 成骨分化效应显著被抑制, Runx2、Osterix 的 mRNA 水平和蛋白表达显著下调, ALP 及 OCN 表达下调, 细胞内钙离子含量增高。结论 Kae 通过 mTORC1 信号通路促进牵张力下小鼠 BMMCs 成骨分化。

【关键词】 骨髓间充质细胞; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1; 单轴牵张力; 牵张成骨; 碱性磷酸酶; 骨钙素; Runt 相关转录因子; 核糖体蛋白 S6 激酶; 山奈酚

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)04-0234-07



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 崔琳娜, 蒋校文, 黄华庆, 等. 山奈酚通过 mTORC1 信号促进牵张力下小鼠骨髓间充质细胞成骨分化机制研究[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(4): 234-240. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.04.003.

Kaempferol promotes osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal cells under tension stress via the mTORC1 signaling pathway CUI Linna^{1,2}, JIANG Xiaowen^{1,2}, HUANG Huaqing^{1,2}, CHEN Jinyong^{1,2}. 1. Department of Stomatology, The First People's Hospital of Chenzhou City, Institute of Translation Medicine, University of China South, Chenzhou 423000, China; 2. School of Stomatology of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: JIANG Xiaowen, Email: jxw0927@163.com, Tel: 86-735-2343899

【Abstract】 Objective To investigate the activation of the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling pathway molecules during the process by which kaempferol (Kae) promotes osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal cells (BMMCs) under cyclic and uniaxial tension. **Methods** BMMCs isolated and cultured

【收稿日期】 2020-07-21; **【修回日期】** 2020-08-31

【基金项目】 国家自然科学基金(81301651); 湖南省自然科学基金(2018JJ2015); 郴州市第一人民医院重点项目(N2019-003)

【作者简介】 崔琳娜, 医师, 硕士研究生在读, Email: 490460953@qq.com

【通信作者】 蒋校文, 主任医师, 博士, Email: jxw0927@163.com, Tel: 86-735-2343899

in vitro were subjected to uniaxial dynamic tension with a 10% shape variable. The appropriate concentration of Kae was selected by cytotoxicity testing. The endogenous mTOR signal was inhibited by pp242. Four hours after traction, alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) were detected by chemical colorimetry and ELISA, and the relative concentration of intracellular calcium was detected by flow cytometry. Phosphorylation of mTOR, 4E/BP1, and ribosomal protein S6 kinases (S6K), which are the main molecules of the endogenous mTORC1 signaling pathway, and expression of osteogenic transcription factors (Runx2 and Osterix) were detected by western blotting (WB), and mRNA expression levels of the above factors were detected by qRT-PCR. **Results** The cytotoxicity test showed that 10 $\mu\text{mol/L}$ Kae had little inhibitory effect on cell proliferation but had the strongest osteogenic ability. Four hours after stretching, Kae effectively promoted the osteogenic differentiation of BMMCs. The expression of ALP was (153.04 ± 18.72) U/mg, the expression of OCN was (1.64 ± 0.25) U. The mRNA and protein levels of Runx2 and Osterix were upregulated, and the intracellular calcium content was decreased. The mRNA and protein phosphorylation of mTOR and S6K was upregulated, and the opposite effect was observed with 4E/BP1. After pp242 was added to inhibit mTOR signaling, mTOR and S6K mRNA and protein phosphorylation were downregulated, but 4E/BP1 mRNA and protein phosphorylation was upregulated. The osteogenic differentiation of BMMCs was also significantly inhibited, mRNA and protein expression of Runx2 and Osterix were significantly downregulated, ALP and OCN expression were downregulated, and intracellular calcium content was increased. **Conclusion** Kae promotes osteogenic differentiation of mouse BMMCs under uniaxial dynamic tension through the mTORC1 signaling pathway.

【Key words】 bone marrow mesenchymal cells; mammalian target of rapamycin complex 1; cyclic uniaxial tension; distraction osteogenesis; alkaline phosphatase; osteocalcin; runt related transcription factors; ribosomal protein S6 kinase; kaempferol

J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(4): 234-240.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No.81301651); Natural Science Foundation of Hunan Province (No.2018JJ2015); Key Project of the First People's Hospital of Chenzhou City (No. N2019-003)

牵张成骨作为口腔颌面外科及整形外科治疗先天、后天畸形缺损等的重要整复手段在临床上具有明显优势,目前其治疗周期长、并发症相对较多等不足限制其临床广泛应用^[1-2]。学者们使用了生长因子、细胞治疗、基因治疗等多种治疗手段试图促进成骨缩短治疗周期,但均停留在实验层面,上述治疗手段不仅价格昂贵,且受到伦理、安全等因素限制,短时间难以在临床广泛推广。近来研究发现,山奈酚(kaempferol, Kae)不仅具有抗氧化、抗炎、抗癌等作用,而且能够防治骨质疏松、促进成骨。本研究以多单元细胞拉伸装置为平台,对Kae处理后的小鼠骨髓间充质细胞(bone marrow mesenchymal cells, BMMCs)施加周期性单轴牵张力,同时通过工具药抑制内源性哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)信号通路的表达,旨在观察Kae促进细胞张应力下成骨分化过程中该信号通路的作用,为改善牵张成骨效果提供实

验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

3月龄雄性小鼠(南华大学转化研究所动物实验中心, SYXK <湘> 2020-0002)。

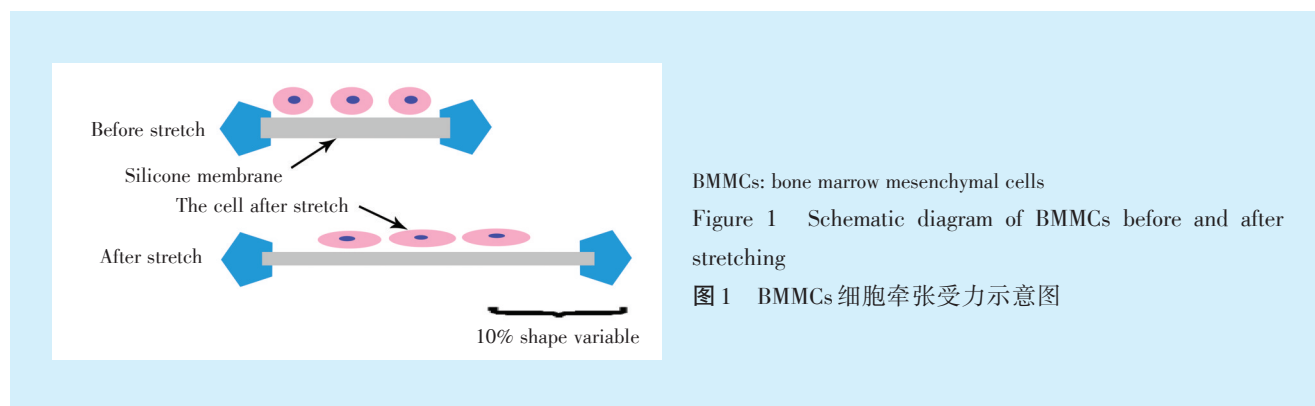
多单元细胞拉伸装置(四川大学);分光光度仪(Roch, 瑞士);流式细胞仪(Thermo, 美国)。Percoll分离液(Pharmacia, 美国);10%胎牛血清(Hyclone, 美国);LG-DMEM培养液(Gibico, 美国);二甲基亚砜(Dimethylsulfoxide, DMSO)(Thermo, 美国);茜素红S染色液(索莱宝, 中国);细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(建成, 中国);骨钙素(osteocalcin, OCN)试剂盒(RD, 美国);BCA蛋白定量试剂盒(Thermo, 美国);Trizol试剂盒(Gibico, 美国);反转录试剂盒(Takara, 大连)。p-mTOR一抗(Abcam, 英国);p-S6K一抗(Cell Signaling, 美国);p-4E/BP1一抗(Cell Signaling, 美国),

Osterix一抗(Abcam,英国);Runx2一抗(SantaCruz,英国),GAPDH一抗(SantaCruz,英国),羊抗兔二抗(中杉,中国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠BMMCs的分离、培养及加力 无菌条件分离3月龄雄性小鼠双侧股骨和胫骨,冲出骨髓组织,利用密度梯度离心法提取BMMCs。离心后去除脂肪组织吹打成细胞悬液,加Percoll分离液后离心吸取交界面细胞层,清洗后加入10%胎牛血清及双抗的LG-DMEM培养液,吹匀后接种于培

养瓶内,2~3 d后更换培养基,当细胞融合达70%~80%时胰酶消化传代,选用第3代细胞进行下一步实验,每个检测指标收集8个样本行检测。按照原有方法^[3]制备硅胶膜,将 2×10^4 个细胞悬液接种于硅胶膜后在37℃体积分数5% CO₂培养箱培养24 h后补加含10%胎牛血清的培养基10 mL培养24 h,更换无血清培养液同步化12 h后利用多单元细胞拉伸装置(四川大学)施加10%形变量的单轴动态牵张力2 h(频率为0.2 Hz,工作原理示意图见图1)。



BMMCs: bone marrow mesenchymal cells

Figure 1 Schematic diagram of BMMCs before and after stretching

图1 BMMCs细胞牵张受力示意图

1.2.2 筛选合适浓度Kae 对无血清同步化后的细胞加力单元加入1、5、10、50、100 μmol/L, Kae(以DMSO为溶剂)后行2 h动态牵张,牵张结束后进行细胞毒性试验、细胞计数和茜素红染色。

1.2.2.1 细胞毒性试验 牵张结束后加入200 μL MTT溶液(5 mg/mL),4 h后吸除培养基,加入5 mL DMSO,放在摇床上低速振荡10 min后使用分光光度计检测各加力单元490 nm波长下的OD值并计算抑制率。

1.2.2.2 细胞计数 牵张结束后1、4、8 h,胰酶消化并悬浮细胞后利用细胞计数板在倒置显微镜下计算细胞个数。

1.2.2.3 茜素红染色 牵张结束后继续在细胞培养箱中培养,2~3 d换液,7 d后去除培养液,PBS清洗后取出硅胶膜,修剪后置入方形培养皿中加4%多聚甲醛固定30 min,弃液后再次清洗加入茜素红S染色液反应5 min,弃除染液清洗至不变色后拍照。

1.2.3 细胞分组 设立四组细胞加力,A组:对照组;B组:mTORC1信号通路抑制组;C组:Kae处理组;D组:Kae处理后抑制mTORC1信号通路组。加力前,C组和D组加入10 μmol/L Kae,A组和B组在加力前加入等体积DMSO;加力后,

B组和D组立即加入mTOR信号抑制剂pp242(100 nmol/L),A组和C组加入等体积PBS,4 h后进行后续检测。

1.2.4 化学比色法检测ALP活性 胰酶消化收集细胞后,与3 mL带血清培养基混匀,离心清洗后反复冻融3次,离心后收集上清液50 μL加入试剂盒中基质液和缓冲液各500 μL,37℃水浴15 min后加入显色剂1.5 mL,立即检测其520 nm波长下吸光度值,根据公式($y = 1000x/17.9$)计算出ALP活性。

1.2.5 ELISA法检测OCN含量 将加力单元内培养液1 mL离心后收集上清,在酶标包被板中入待测样本10 μL,再加样本稀释液40 μL,混匀后37℃温育30 min,弃液洗板甩干,加入工作液50 μL,37℃温育30 min后弃液洗板甩干后再加入显色剂50 μL混匀,37℃避光显色15 min后加终止液50 μL终止反应后检测其450 nm波长下吸光度值,通过标准品测量后的标准曲线的直线回归方程($y = 3.732x + 0.929$)方程计算出培养液内骨钙素相对浓度。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞内钙离子相对含量 收集洗涤细胞后加入Fluo-4,AM工作液至终浓度为5 μmol/L,置于细胞培养箱孵育30 min,去除

Fluo-4, AM工作液,用PBS洗涤细胞后重悬细胞,制成 1×10^5 个/mL的溶液再置于细胞培养箱孵育10 min后在流式细胞仪下进行荧光钙离子检测(激发波长506nm,发射波长526nm),获得细胞内钙离子的相对含量(平均荧光强度)。

1.2.7 Western Blot 检测 mTORC1 信号通路主要分子及成骨转录因子 收集硅胶膜上的细胞裂解后得到总蛋白,以牛血清为标准品,利用BCA蛋白定量试剂盒建立标准曲线,计算总蛋白浓度,取总蛋白20 μ g行SDS-PAGE电泳,转PVDF膜,脱脂奶粉封闭后一抗孵育过夜后二抗37 $^{\circ}$ C孵育1 h,置于自动成像仪暗匣中加显影液,计算机扫描收集图像,检测 GAPDH、p-mTOR、p-S6K、4E/BP1、Osterix、Runx2蛋白表达水平,GAPDH作为内参。

1.2.8 qRT-PCR 检测 mTORC1 信号通路主要分子及成骨转录因子 mRNA 水平 收集硅胶膜上的细胞按 Trizol 试剂盒流程提取细胞中总 RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,进一步对总 RNA 行过柱纯化。qRT-PCR 测定 mTORC1 信号通路及成骨转录因子 mRNA,以 GAPDH 为内参。采用反转录试剂盒在 BioRad 1000™ 上反转录成 cDNA。再以第一链 cDNA 为模板,采用 SYBR Green I 染料进行 qRT-PCR 反应。PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环。

1.3 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 软件进行数据分析。组间比较使用采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primers for qRT-PCR

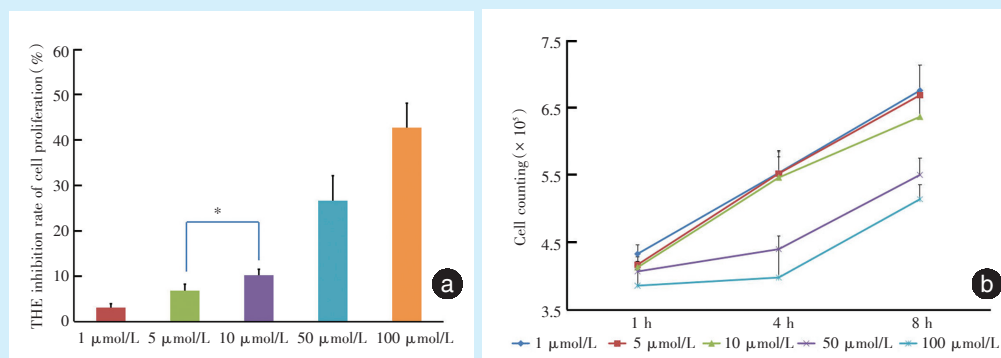
Gene	Primer sequences
GAPDH	F: AGTGCCAGCCTCGTCTCATAG R: CGTTGAACCTTGCCGTGGGTAG
Runx2	F:TGGCATCATCTTCATTGTCC R: CAGAGCATTGTCCTCCCACT
Osterix	F:GCCAGAGTGGTTATCTTTTGATG R: AGTGTGTTATCCCTGCTGTAC
mTOR	F:TTGGAGAACCAGCCATAAGA R: ATGAGATGCTGCTTGCTTGATAA
4E/BP1	F:ATAATGCTGGGGAGGATGC R: TAGGGTGTGCTGTGGAAAT
S6K	F:ACTATTCCAGACCCACGAC R: ACACAATCTCCGCACCGTA

2 结果

2.1 通过 MTT 试验、细胞计数、茜素红染色筛选出 10 μ mol/L Kae

通过 MTT 细胞试验发现牵张结束后 4 h,浓度为 1、5、10、50、100 μ mol/L 的 Kae 对应的细胞抑制率(图 2a)分别为 $(3.11 \pm 0.88)\%$ 、 $(6.87\% \pm 1.40)\%$ 、 $(10.17 \pm 1.34)\%$ 、 $(26.63 \pm 5.46)\%$ 和 $(42.61 \pm 5.44)\%$,除 5 μ mol/L 与 10 μ mol/L 的组间差异无统计学意义($P = 0.073$);其余各组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

牵张结束后 1、4、8 h,可以发现浓度为 50、100 μ mol/L 的 Kae 组细胞增殖能力(图 2b)明显受到抑制,而浓度为 1、5、10 μ mol/L 的 Kae 组细胞增殖能力基本一致。



a: inhibition rates of cell proliferation 4 hours after stretching. The difference between groups was statistically significant, except for the 5 μ mol/L vs. 10 μ mol/L ($P = 0.073$); b: cells counting, 1 h: 1 μ mol/L vs. 5 μ mol/L, 5 μ mol/L vs. 10 μ mol/L, 5 μ mol/L vs. 50 μ mol/L, 10 μ mol/L vs. 50 μ mol/L, $P > 0.05$; 4 h: 1 μ mol/L vs. 5 μ mol/L; 1 μ mol/L vs. 10 μ mol/L, 5 μ mol/L vs. 10 μ mol/L, $P > 0.05$; 8 h: 1 μ mol/L vs. 5 μ mol/L; 5 μ mol/L vs. 10 μ mol/L, $P > 0.05$; cell proliferation was significantly inhibited in group 50 μ mol/L and 100 μ mol/L.

Figure 2 Inhibition of cell proliferation and cell counting 4 h after stretching under various concentrations of Kae

图2 加入不同浓度 Kae 进行细胞加力后 4 h 细胞抑制率和细胞计数

牵张结束后7 d发现10 μmol/L的Kae组茜素红染色(图3)最为明显,5 μmol/L的Kae组染色其

次,其余各组染色不明显。



a: 1 μmol/L; b: 5 μmol/L; c: 10 μmol/L; d: 50 μmol/L; e: 100 μmol/L

Figure 3 Alizarin staining images 7 days after stretching under various concentrations of Kae

图3 加入不同浓度Kae牵张后7 d茜素红染色结果

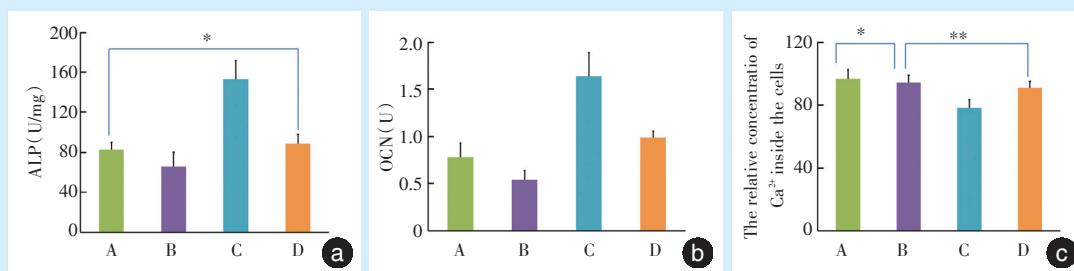
2.2 牵张后4 h 4组ALP、OCN、细胞内钙离子相对含量表达

牵张后4 h A组、B组、C组、D组ALP分别为:(82.56 ± 7.61)U/mg、(65.78 ± 14.51)U/mg、(153.04 ± 18.72)U/mg、(88.73 ± 9.09)U/mg,除A组与D组间差异无统计学意义($P = 0.359$),其余各组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)(图4a)。

A组、B组、C组、D组OCN表达分别为(0.78 ±

0.15)U、(0.54 ± 0.10)U、(1.64 ± 0.25)U、(0.99 ± 0.07)U,各组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)(图4b)。

牵张结束后A组、B组、C组、D组细胞内钙离子相对含量为96.63 ± 5.97、94.23 ± 4.61、78.23 ± 5.08、90.84 ± 4.33,除A组与B组($P = 0.35$)、B组与D组($P = 0.189$)间差异无统计学意义,其余各组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图4c)。



a: ALP, there was significant difference between groups ($P < 0.05$) except group A vs. group D, *: $P = 0.359$; b: OCN, there was significant difference between groups ($P < 0.05$); c: relative concentration of intracellular calcium, there was significant difference between groups ($P < 0.05$) except group A vs. group B, group B vs. group D, *: $P = 0.350$, **: $P = 0.189$; group A: control group; group B: pp242 group; group C: Kae group; group D: Kae+pp242 group; OCN: osteocalcin; ALP: alkaline phosphatase

Figure 4 Levels of ALP, OCN and relative concentration of intracellular calcium in four groups 4 hours after application of dynamic tensile force

图4 牵张后4 h 4组ALP、OCN及细胞内钙离子相对含量表达

2.3 牵张后4 h mTORC1通路主要分子及成骨转录因子表达变化

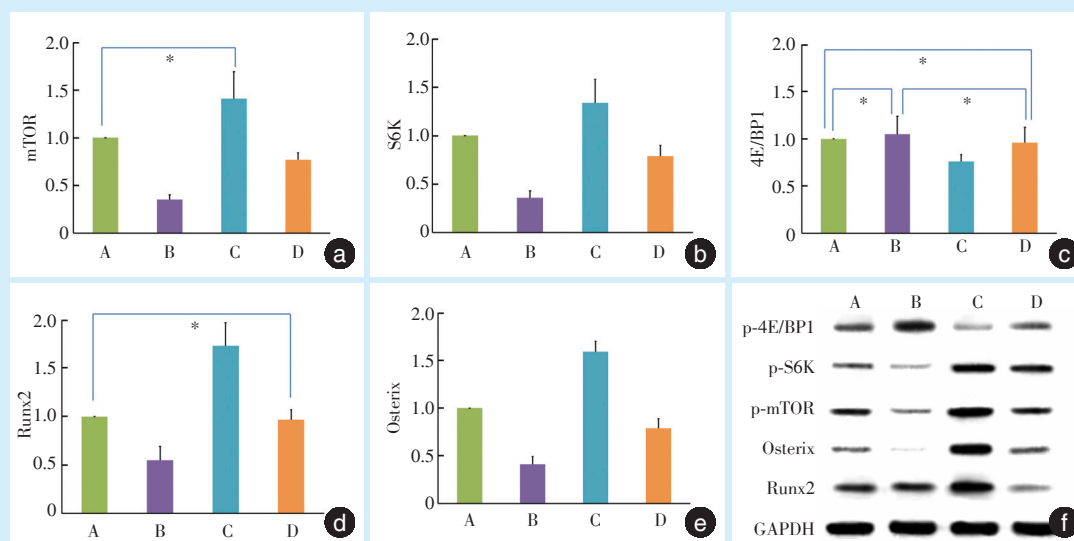
2.3.1 qRT-PCR结果 与对照组A组相比:B组mTOR、S6K mRNA水平明显受到抑制,4E/BP1 mRNA水平无明显变化,Runx2及Osterix mRNA水平明显下调;C组mTOR、S6KmRNA水平均上调,4E/BP1 mRNA水平下调,Runx2及Osterix mRNA水平上调。与C组相比:D组中被Kae上调的mTOR、S6KmRNA、Runx2及Osterix mRNA水平被pp242明显抑制,被Kae下调的4E/BP1 mRNA水平被pp242

明显上调(图5a~e)。

2.3.2 Western Blot结果 除B组Runx2蛋白表达与A组无明显差别外,各组p-mTOR蛋白、p-S6K蛋白、p-4E/BP1蛋白、Osterix蛋白、Runx2蛋白表达呈现与其mRNA表达水平一致的变化趋势(图5f)。

3 讨论

Kae是一种最先从姜科植物山奈中分离得到的黄酮醇类化合物,其大量存在于水果、蔬菜、豆



a-e: mRNA levels of mTOR(a), S6K(b), 4E/BP1(c), Runx2(d), and Osterix(e), group A: control group; group B: pp242 group; group c: Kae group; group D: Kae +pp242group; *: $P > 0.05$; f: protein levels of p-mTOR, p-S6K, p-4E/BP1, p-mTOR, Osterix, Runx2; mTOR: mammalian target of rapamycin; S6K: ribosomal protein S6 kinases

Figure 5 The mRNA levels of the major signaling molecules of the mTORC1 signaling pathway and osteogenic transcription factors in BMMCs 4 hours after application of dynamic tensile force

图5 牵张后4 h mTORC1 通路主要分子及成骨转录因子 mRNA 和蛋白表达情况

类和茶叶及中草药如沙棘、银杏叶中。研究发现其具有广泛的成骨活性。Kae能够在体外实验中促进成骨细胞增殖和分化,提高成骨细胞内ALP活性^[4-5],这种促进ALP活性是通过细胞外调节激酶和雌激素受体途径来实现^[6-7]。在卵巢切除动物模型中也发现Kae通过促进成骨细胞生成,抑制骨髓脂肪细胞的形成^[8-9]。本实验通过MTT细胞毒性试验发现随着Kae浓度的逐渐增高,细胞抑制率逐渐上升,细胞增殖能力下降。而茜素红染色提示在Kae浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 条件下的成骨效果最佳,说明在10%形变量的牵张力下10 $\mu\text{mol/L}$ 的Kae能够最有效促进成骨效果,且细胞增殖能力未受到明显抑制。

mTOR是一种保守的丝/苏氨酸蛋白质激酶,在细胞多种生理活动的调控中处于核心地位,其中研究较多的mTORC1由mTOR、Raptor和mLST8组成,能接受生长因子、应激等刺激并对雷帕霉素(rapamycin)敏感^[10-11]。S6K和4E/BP1是mTORC1发挥其主要下游效应分子。研究发现激活mTORC1信号促进S6K磷酸化,但抑制4E/BP1磷酸化^[12]。本研究加入pp242后,mTOR和下游S6K的mRNA水平及磷酸化蛋白表达均受到抑制,而4E/BP1表达没有受到明显影响,说明mTORC1信号通

路受到抑制。

Runx2是成骨细胞分化过程中的重要转录因子,是激活和促进骨髓间充质细胞向成骨细胞分化调节及促进成骨细胞成熟的关键。Osterix是一种成骨特异性因子,只在发育的骨组织中特异性表达。Chiou等^[13]发现Kae能够显著促进MC3T3-E1成骨细胞ALP活性,上调骨钙素、骨桥蛋白和I型胶原mRNA表达,诱导骨结节形成,而这种成骨作用与其增加Runx2的核移位有关。Kim等^[14]也在MC3T3-E1成骨细胞中发现Kae通过激活Runx2和Osterix基因表达促进成骨。本研究中,C组(Kae处理组)结果提示,Kae能够有效促进ALP、OCN的蛋白表达以及成骨转录因子Runx2和Osterix的基因及蛋白表达,与以上研究结果一致。而且,在加入mTOR抑制剂pp242^[11]后,mTORC1信号通路主要分子mTOR及S6K的基因表达及蛋白磷酸化水平均被抑制,另外ALP、OCN、Runx2和Osterix的表达也明显受到抑制,提示Kae通过mTORC1信号通路促进张应力下细胞成骨分化,而且Runx2、Osterix两种骨特异性转录因子可能处于mTOR信号通路下游。

Kae是一种线粒体钙离子单通道激活剂,能够降低心肌细胞线粒体钙离子^[15]。在细胞自噬实验

中发现,mTOR信号被抑制后,内质网-线粒体钙离子转运能力明显被抑制^[16]。本研究中,Kae处理后mTROC1信号通路被激活,而且细胞内钙离子浓度明显下降,但当内源性mTOR信号被抑制后这种钙外流现象被削弱,提示Kae通过mTOR通路加速细胞内钙离子的外流释放从而促进细胞外基质钙化是其促进张应力下细胞成骨分化的机制之一。

本研究结果提示,Kae提高了牵张力下BMMCs成骨活性,增加Runx2和Osterix以及mTOR通路下游调节因子p-4E/BP1和p-S6K的表达水平,而pp242干预则逆转了Kae对骨形成的积极促进作用。研究表明,Kae通过mTORC1信号通路促进单轴牵张力作用下的小鼠BMMCs成骨分化过程。

【Author contributions】 Cui LL, Huang HQ, Chen JY performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. Jiang XW designed the study and revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Hvid I, Horn J, Huhnstock S, et al. The biology of bone lengthening[J]. *J Child Orthop*, 2016, 10(6): 487-492. doi: 10.1007/s11832-016-0780-2.
- [2] Zhang RS, Lin LO, Hoppe IC, et al. Risk factors for perioperative respiratory failure following mandibular distraction osteogenesis for micrognathia: a retrospective cohort study[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2019, 143(6): 1725 - 1736. doi: 10.1097/PRS.00000000000005651.
- [3] 彭海艳, 蒋校文, 黄华庆, 等. mTORC1信号通路在张应力下小鼠骨髓间充质细胞成骨分化过程中的作用[J]. *口腔疾病防治*, 2020, 28(4): 219-223. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2020.04.003. Peng HY, Jiang XW, Huang HQ, et al. The role of the mTORC1 signaling pathway during osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal cells under tension stress[J]. *J Prev Treat Stomatol Dis*, 2020, 28(4): 219 - 223. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2020.04.003.
- [4] Guo AJ, Choi RC, Zheng KY, et al. Kaempferol as a flavonoid induces osteoblastic differentiation *via* estrogen receptor signaling [J]. *Chin Med*, 2012, 7(1): 10. doi: 10.1186/1749-8546-7-10.
- [5] Yang L, Takai H, Utsunomiya T, et al. Kaempferol stimulates bone sialoprotein gene transcription and new bone formation[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(6): 1342-1355. doi: 10.1002/jcb.22649.
- [6] Miyake M, Arai N, Ushio S, et al. Promoting effect of kaempferol on the differentiation and mineralization of murine pre-osteoblastic cell line MC3 T3-E1[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(6): 1199-1205. doi: 10.1271/bbb.67.1199.
- [7] Prouillet C, Mazière JC, Mazière C, et al. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67(7): 1307-1313. doi: 10.1016/j.bcp.2003.11.009.
- [8] Kumar A, Gupta GK, Khedgikar V, et al. *In vivo* efficacy studies of layer-by-layer nano-matrix bearing kaempferol for the conditions of osteoporosis: a study in ovariectomized rat model[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 82(3): 508 - 517. doi:10.1016/j.ejpb.2012.08.001.
- [9] Trivedi R, Kumar S, Kumar A, et al. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 289(1/2): 85-93. doi: 10.1016/j.mce.2008.02.027.
- [10] Ben-Sahra I, Manning BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 72 - 82. doi: 10.1016/jceb.2017.02.012.
- [11] Kumar V, Evans LC, Kurth T, et al. Therapeutic suppression of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling prevents and reverses salt-induced hypertension and kidney injury in Dahl salt-sensitive rats[J]. *Hypertension*, 2019, 73(3): 630-639. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12378.
- [12] Howell JJ, Manning BD. mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2011, 22(3): 94-102. doi: 10.1016/j.tem.2010.12.003.
- [13] Chiou WF, Lee CH, Liao JF, et al. 8-prenylkaempferol accelerates osteoblast maturation through bone morphogenetic protein-2/p38 pathway to activate runx2 transcription[J]. *Life Sci*, 2011, 88(7/8): 335-342. doi: 10.1016/j.lfs.2010.12.009.
- [14] Kim IR, Kim SE, Baek H, et al. The role of kaempferol-induced autophagy on differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 333. doi: 10.1186/s12906-016-1320-9.
- [15] Hamilton S, Terentyeva R, Kim TY, et al. Pharmacological modulation of mitochondrial Ca²⁺ content regulates sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release *via* oxidation of the ryanodine receptor by mitochondria-derived reactive oxygen species[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1831. doi:10.3389/fphys.2018.01831.
- [16] Ulises AC, Eduardo SP, Alenka L, et al. MTOR-independent autophagy induced by interrupted endoplasmic reticulum-mitochondrial Ca²⁺ communication: a dead end in cancer cells[J]. *Autophagy*, 2019, 15(2): 358-361. doi: 10.1080/15548627.2018. 1537769.

(编辑 张琳, 曾曙光)



官网



公众号