

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2020.01.003

· 基础研究 ·

IGF1通过BMP2-Smad1/5信号通路调控犬上颌窦黏膜干细胞成骨分化

廖春晖¹, 李明飞², 叶金梅¹, 彭伟², 陈松龄²

1. 广州市妇女儿童医疗中心口腔正畸科, 广东 广州(510000); 2. 中山大学附属第一医院口腔科, 广东 广州(510080)

【摘要】 目的 探讨骨形态形成蛋白2(bone morphogenetic protein2, BMP2)-Smad1/5及p38MAPK信号通路在胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF1)介导的促犬上颌窦黏膜干细胞(maxillary sinus membrane stem cells, MSMSCs)成骨分化中的作用。方法 构建表达胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor1, IGF1)基因的重组腺病毒载体(recombinant adenovirus, rAdv)Ad-IGF1。感染Ad-IGF1的犬上颌窦黏膜干细胞,经成骨诱导培养后,qRT-PCR和Western blot检测BMP-Smads信号通路中重要信号蛋白Smad1/5的磷酸化水平和BMP2蛋白的表达;免疫组化观察磷酸化Smad1/5核转位情况;qRT-PCR及Western blot检测BMP-Smads通路抑制剂Noggin和p38MAPK信号通路抑制剂SB203580对IGF1介导的促犬MSMSCs成骨分化的影响。结果 成功构建IGF1基因表达重组腺病毒载体Ad-IGF1;感染Ad-IGF1的犬MSMSCs,经成骨诱导培养后,Smad1/5的磷酸化水平和BMP2蛋白的表达升高,IGF1可促使Smad1/5核转位;BMP-Smads信号通路抑制剂Noggin可抑制Smad1/5的磷酸化,降低成骨标志物Runx2、OPN和ALP mRNA的表达,钙结节形成减少。p38MAPK信号通路抑制剂SB203580不能降低Ad-IGF1犬MSMSCs的p38磷酸化水平,亦不能降低成骨标志物Runx2、OPN和ALP mRNA的表达。结论 犬MSMSCs成骨分化过程中,IGF1通过经典的Smads蛋白依赖性信号转导通路BMP2-Smad1/5促进成骨,而Smads蛋白非依赖性信号转导通路p38MAPK在IGF1介导的犬MSMSCs成骨过程中可能并不发挥作用。

【关键词】 胰岛素样生长因子1; 上颌窦黏膜干细胞; BMP2-Smad1/5信号通路; p38MAPK信号通路; 成骨分化; Runx2; 骨桥蛋白; 碱性磷酸酶

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2020)01-0016-08

【引用著录格式】 廖春晖,李明飞,叶金梅,等. IGF1通过BMP2-Smad1/5信号通路调控犬上颌窦黏膜干细胞成骨分化[J]. 口腔疾病防治, 2020, 28(1): 16-23.

The regulatory mechanisms of IGF1 in the osteogenic differentiation of canine MSMSCs via BMP2-Smad1/5 signaling pathway LIAO Chunhui¹, LI Mingfei², YE Jinmei¹, PENG Wei², CHEN Songling². 1. Department of Orthodontics, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510000, China; 2. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital, SunYat-sen University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: CHEN Songling, Email: 1029279220@qq.com, Tel: 86-20-87755766

【Abstract】 Objective To investigate the role of the bone morphogenetic protein 2 (BMP2)-Smad1/5 and p38MAPK signaling pathways in the osteogenic differentiation of MSMSCs by insulin-like growth factor 1 (IGF1). **Methods** A recombinant adenovirus (RAD) and IGF1 expressing IGF1 gene were constructed. After osteogenic induction, qRT-PCR and Western blot were used to detect the phosphorylation level of Smad1/5 and the expression of the BMP-2 protein in the BMP-Smad signaling pathway; immunohistochemistry was used to observe the nuclear translocation of Smad1/5; qRT-

【收稿日期】 2019-07-17; **【修回日期】** 2019-09-23

【基金项目】 广东省自然科学基金项目(2018A030313173);国家自然科学基金项目(81371111);广州市妇女儿童医疗中心儿科研究所内部科研基金项目(YIP-2018-017)

【作者简介】 廖春晖,主治医师,硕士,Email:954222137@qq.com

【通信作者】 陈松龄,主任医师,博士,Email: 1029279220@qq.com, Tel: 86-20-87755766



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

PCR and Western blot were used to detect IGF with Noggin and SB203580, inhibitors of the p38MAPK signaling pathway 1-mediated osteogenic differentiation of MSMSCs. **Results** The recombinant IGF1 adenovirus was constructed successfully. MSMSCs were cultured in inductive medium after infection with different concentrations of Ad-IGF1, and then, the protein levels of BMP2 and p-Smad1/5 increased. IGF1 can also induce nuclear translocation of Smad1/5. In addition, Noggin significantly reduced the phosphorylation level of Smad1/5 and the formation of mineralized nodules in the MSMSCs. The mRNA levels of Runx2, OPN and ALP also decreased. In contrast, SB203580 decreased neither the phosphorylation level of p38 nor the mRNA expression of Runx2, OPN and ALP in the Ad-IGF1 MSMSCs. **Conclusion** IGF1 can promote the osteogenic differentiation of MSMSCs via the BMP2-Smad1/5 signaling pathway. In contrast, IGF1 may not promote the osteogenic differentiation of MSMSCs via the p38MAPK signaling pathway.

【Key words】 insulin-like growth factor 1; maxillary sinus membrane stem cells; BMP2-Smad1/5 signaling pathway; p38 MAPK signaling pathway; osteogenic differentiation; Runx2; osteopontin; alkaline phosphatase

J Prev Treat Stomatol Dis, 2020, 28(1): 16-23.

上颌后牙区骨量不足牙种植目前仍是种植领域的难题^[1]。上颌窦底提升术是解决上颌后牙种植区骨量不足的常用的方法,其核心机制是窦底提升术后的空间成骨效应^[2]。上颌窦黏膜在窦底提升术后不仅起到天然生物屏障作用,同时因其本身具有成骨潜能的干细胞,在上颌窦底提升术后空间成骨扮演着重要的作用^[3]。现有的研究多关注于上颌窦黏膜干细胞(maxillary sinus membrane stem cells, MSMSCs)的成骨能力,而对其核心的分子调控机制的研究甚少。为明确胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor1, IGF1)参与调控MSMSCs成骨分化的分子调控机制,本研究拟将构建的IGF1基因表达重组腺病毒Ad-IGF1感染上颌窦黏膜干细胞,通过Western blot、免疫组化染色观察在上颌窦黏膜干细胞分化过程中,BMP-Smads通路中重要信号蛋白骨形态形成蛋白2(bone morphogenetic protein2, BMP2)和Smad1/5的磷酸化水平以及核转位变化情况;利用BMP-Smads通路抑制剂Noggin和p38MAPK的通路抑制剂SB203580处理感染Ad-IGF1的细胞,观察成骨标志物的表达变化;并观察抑制剂处理感染Ad-IGF1的细胞后磷酸化Smad1蛋白表达变化情况。本研究获得中山大学附属第一医院伦理委员会批准。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

Beagle犬(高要市康达实验动物科技有限公司),年龄1~2周岁,体重15~20 kg。胎牛血清(Gibco,美国);中性蛋白酶(Roche,美国);Ⅱ型胶原酶(Gibco,美国); α -MEM基础培养基(武汉市博

士德公司);CD146磁珠分选试剂盒(Macs,美国);Lipofectamine™2000(Invitrogen,美国);Trizol Reagent(Invitrogen,美国);DAB试剂盒(Abcam,英国);荧光定量PCR检测试剂盒(Takara,日本);兔抗犬Runx2、OPN、p-p38、p-Smad1/5、Smad1/5、BMP2多克隆抗体(Abcam,英国);羊抗兔IgG-HRP(Abcam,英国);图像Pro 5.0分析系统(Media Cybernetics,美国);茜素红(Thermo Fisher Scientific,美国)。

1.2 犬上颌窦黏膜干细胞的分离与培养

Beagle犬上颌窦黏膜的取材按本课题组前期报道的方法去采集^[3]。使用酶消化法进行细胞的原代培养,培养至70%~80%汇合时传代,按照1:3的比例进行传代扩增培养。按照CD146磁珠分选试剂盒操作方法进行免疫磁珠法分选CD146阳性细胞,简述如下:单细胞悬液中按4 μ L/mL加入小鼠抗犬CD146免疫磁珠,混合均匀后置于4 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS润洗2次,避免干燥。准备磁力架和磁柱, PBS润洗2次,把结合了磁珠的细胞悬液放入磁柱中,过柱, PBS清洗混匀。并取样品滴于载玻片和细胞计数器上,分别进行细胞纯度分析和活力测定。用倒置相差显微镜观察细胞生长情况及细胞形态。

1.3 IGF1基因表达重组腺病毒Ad-IGF1载体构建

根据IGF1基因序列,设计末端带NheI和HindⅢ的酶切位点的特异性引物,将通过PCR扩增的IGF1基因序列克隆到PDC316-mCMV-ZsGreen载体中,构建PDC316-mCMV-ZsGreen-IGF1腺病毒载体(图1),即Ad-IGF1载体。IGF1引物扩增总长度为462 bp,引物序列设计如下。IGF1-NheI-F: 5'-CTAGCTAGCACCATGGGAAAAATCAGCAGTCTTCC-3'; IGF1-HindⅢ-R: 5'-CCAAGCTTCTACATTCTG-

TAGTTCTTGTTCCTG-3'。

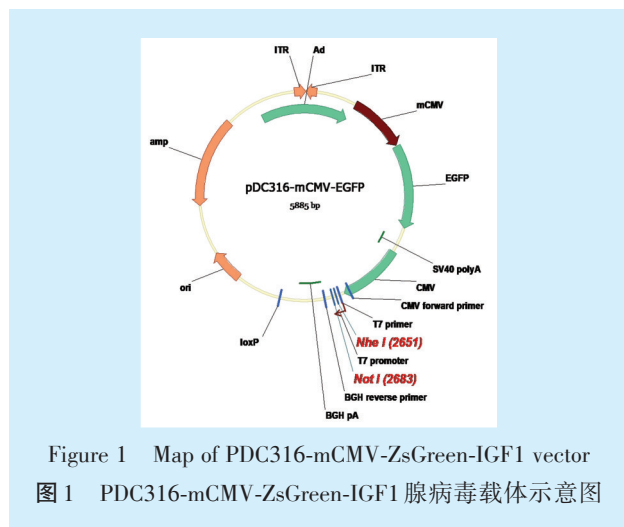


Figure 1 Map of PDC316-mCMV-ZsGreen-IGF1 vector

图1 PDC316-mCMV-ZsGreen-IGF1腺病毒载体示意图

1.3.1 PCR扩增目的基因 PCR扩增IGF1,在引物中引入NheI+HindIII酶切位点,按以下组分制备PCR反应体系:5×Fastpfu buffer 10 μL, dNTP Mix (2.5 mM) 4 μL, 正向引物 (10 μM) 2 μL, 反向引物 (10 μM) 2 μL, Fastpfu polymerase 1 μL, 模板DNA (100 ng/μL) 1 μL, ddH₂O 30 μL, Total 50 μL。按以下条件设置反应程序进行PCR反应:变性95℃×3 min 1个循环,变性95℃,退火55℃×30 s 30个循环,延伸72℃×2 min,延伸72℃×5 min 1个循环。琼脂糖凝胶回收目的条带进行分析。

1.3.2 载体质粒PDC316-mCMV-ZsGreen及目的基因NheI+HindIII双酶切 酶切反应在37℃水浴反应2 h,载体质粒酶切体系如下:质粒PDC316-mCMV-ZsGreen/IGF1 1 μg, 10×Buffer 2 μL, 10×BSA 2 μL, NheI 1 μL, HindIII 1 μL。分别回收质粒PDC316-mCMV-ZsGreen酶切大片段和目的基因酶切产物。

1.3.3 质粒PDC316-mCMV-ZsGreenNheI+HindIII回收大片段与目的基因连接 连接反应在22℃反应2 h,连接反应体系如下:目的基因6 μL, PDC316-mCMV-ZsGreen 2 μL, 10×DNA Ligase Buffer 1 μL, T4 DNA Ligase 1 μL。

1.3.4 连接产物转化 取10 μL上述连接产物和100 μL JM109感受态细菌混合均匀后冰浴30 min,在42℃下热激45 s,立即放置冰上2 min,放入预热至室温的400 μL的LB培养基,在37℃恒温摇床培养1 h后,4 000 rpm离心1 min,弃400 μL上清液,用移液器混匀剩余100 μL后均匀涂布在含100 μg/mL Ampicillin抗性LB板上,在37℃恒温培养箱中倒置培养过夜。

1.3.5 重组质粒提取、挑选鉴定及病毒包装 选取4个单菌落接种于含有100 ug/mL Ampicillin抗性的5 mL LB培养液中,250 rpm,在37℃恒温摇床培养过夜,使用小量质粒抽提试剂盒提取质粒,经质粒NheI+HindIII双酶切鉴定,克隆并切出462 bp条带。测序验证鉴定正确的重组克隆。测序引物为:CMV-F(CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG)。PDC316-mCMV-ZsGreen-IGF1与PDC316-mCMV-ZsGreen腺病毒病毒包装。用携带有目的基因的重组质粒PDC316-mCMV-ZsGreen、PDC316-mCMV-ZsGreen-IGF1和骨架质粒共转染HEK293细胞,获得携有目的基因的腺病毒,然后通过扩增技术获得高滴度的病毒,标记为AD-IGF1,对照病毒为仅携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的AD-GFP。

1.3.6 基因表达重组腺病毒Ad-IGF1感染效率检测 取对数生长期P3代MSMSCs,以 2.5×10^5 个/瓶接种于到T25培养瓶中,分为IGF1感染组(Ad-IGF1)和阴性对照组(Ad-GFP),仅携带GFP的空载体腺病毒Ad-GFP作为阴性对照组。在37℃,5% CO₂ α-MEM基础培养中培养。待细胞贴壁后,将IGF1基因表达重组腺病毒Ad-IGF1按感染复数(multiplicity of infection, MOI)为50~200感染细胞,感染细胞后更换α-MEM成骨诱导培养基培养24 h。每组重复3瓶。24 h后对感染Ad-IGF1和Ad-GFP的细胞进行显微镜拍照。收集实验组和对照组的细胞,用于qRT-PCR检测。

1.4 Noggin或者SB203580处理感染Ad-IGF1的细胞

取感染Ad-IGF1的P3代MSMSCs以 1×10^5 个/孔接种于6孔板中,分为Noggin处理组(Ad-IGF1+Noggin),单纯Ad-IGF1感染的对照组(Ad-IGF1)以及Ad-IGF1感染合并α-MEM培养基培养的空白对照组(Ad-IGF1+medium)。采用BMP-Smad依赖性抑制剂Noggin,进行功能实验探索IGF1在MSMSCs成骨中作用机制。具体细胞处理步骤如下:感染Ad-IGF1的P3代MSMSCs以 1×10^5 个/孔接种于6孔板中,37℃,5% CO₂ α-MEM基础培养基中培养。待细胞贴壁后100 g/mL BMP-Smads信号通路抑制剂Noggin或者等体积的α-MEM培养基预处理细胞1 h,之后更换α-MEM成骨诱导培养基培养3 d,单纯感染Ad-IGF1细胞在α-MEM成骨诱导培养基中培养3 d,并作为对照组,每组重复3孔。

同上,p38MAPK特异性抑制剂SB203580处理及分组和Noggin处理一致,其预处理浓度为20

μM, 分组为单纯 Ad-IGF1 感染的对照组 (Ad-IGF1) 以及 SB203580 处理组 (Ad-IGF1+ SB203580)。

1.5 茜素红染色

为了明确不同实验组 (Ad-IGF1、Ad-IGF1+ Noggin、Ad-IGF1+ medium) 的 MSMSCs 钙盐沉积情况, 使用茜素红染色进行分析。具体步骤如下: 4% 的多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 0.1% 的茜素红 (pH 7.2) 染色 10 min, PBS 漂洗后拍照。

1.6 免疫组化染色

细胞爬片收集后, 经过固定, 透膜和抗原修复后, 加入 1:400 的 p-Smad1/5 抗体, 4 °C 下孵育过夜, 1:500 羊抗兔 IgG-HRP 耦联一抗, DAB 显色, 苏木素复染, 拍照并分析。

1.7 qRT-PCR

Trizol 收集各个时间点各组细胞的 RNA, 经过萃取, 酒精清洗后得到干净的 RNA, Nanodrop 测定浓度后, 逆转录 1 000 ng/样本为 cDNA, 按照表 1 设计引物, 其中 GAPDH 为内参, 定量检测 IGF1、Runx2、ALP 和 OPN mRNA 表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of the qRT-PCR primers

Primer	Sequence (5'→3')
IGF1-F	5'-GGAGCTGTGATCTAAGGAGGC-3'
IGF1-R	5'-GGGCTGATACTTCTGGGTCTT-3'
Runx2-F	5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'
Runx2-R	5'-CATTCCGG-AGCTCAGCAGAATAA-3'
OPN-F	5'-GCCGACCAAGGAAAACACTACT-3'
OPN-R	5'-GGCACAGGTGATGCCTAGGA-3'
ALP-F	5'-ATGGAGAGCAAAGCCCTGCTC-3'
ALP-R	5'-GTTAGGTCCAGCT-GGATCGAG-3'
GAPDH-F	5'-AGCCGCATCTTCTTTTGGCGTC-3'
GAPDH-R	5'-TCATATTTGGCAGGTTTTTCT-3'

1.8 Western blot 检测

RIPA 收集细胞蛋白, BCA 法测量浓度后, 取 20 μg 蛋白进行定量, 电泳分离不同大小蛋白, 使用 PVDF 膜进行蛋白转膜, 裁剪不同分子量大小的膜, 经过封闭, 清洗后, 孵育一抗 (BMP2、Smad1/5、p-Smad1/5、RUNX2、OPN、p-p38) 过夜; 次日进行清洗, HRP 显影, 定量分析。

1.9 统计学方法

实验数据用均数 ± 标准差表示, 采用 SPSS19.0 统计学软件分析, 采用独立样本 *t* 检验来比较两组差异, 采用单因素方差分析比较三组及以上差

异。P < 0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF1 基因表达重组腺病毒构建及感染效率

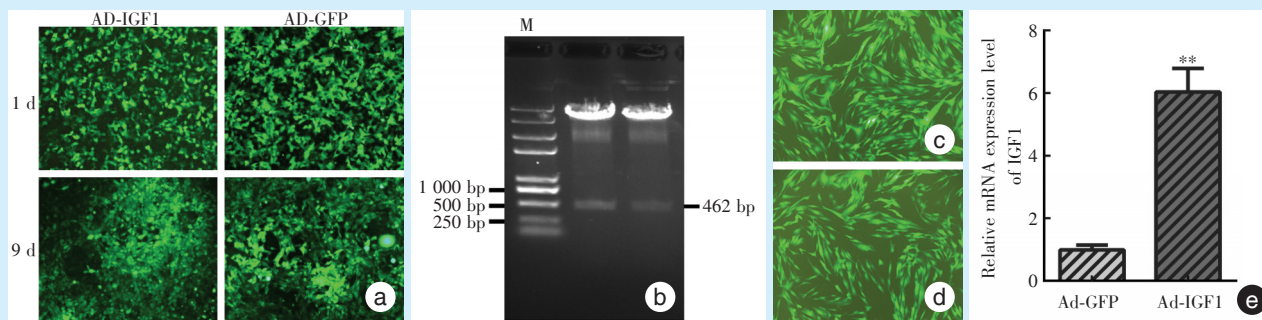
在 AD-IGF1 和 AD-GFP 包装第 1 天, 通过荧光显微镜观察 HEK293 细胞内可见绿色荧光, 呈满天星状分布, 包装第 9 天, 呈彗星状分布, 说明 IGF1 和 GFP 基因表达腺病毒包装过程顺利 (图 2a)。同时经凝胶电泳检测质粒酶切后的两个产物均为阳性克隆, 产物大小为 462 bp 的 IGF1 目的基因条带 (图 2b)。MSMSCs 感染携带有绿色荧光蛋白的 AD-IGF1 和 AD-GFP 后, 免疫荧光检测细胞形态没有明显改变, 仍然呈多角形或长梭形, 细胞质中可见绿色荧光信号 (图 2c、2d)。MSMSCs 细胞感染 Ad-IGF1 培养 24 h 后 IGF1 mRNA 表达量明显升高, 较感染 AD-GFP 组升高了 5 倍, 两组间表达量差异有统计学意义 (图 2e)。

2.2 MSMSCs 的 IGF1 上调促进磷酸化 Smad1/5 核转位, 并呈时间和剂量依赖性正向调控 BMP2 及磷酸化 Smad1/5 的表达

通过免疫组化结果显示, 感染 Ad-IGF1 的 MSMSCs 高表达磷酸化 Smad1/5, 表达部位主要位于胞核, 部分胞浆亦可见表达; 感染 Ad-GFP 细胞的胞核和胞浆不表达或低表达磷酸化 Smad1/5, 空白对照不表达 (图 3a~3c)。进一步通过使用不同浓度的 Ad-IGF1 (MOI 50-100、150-200、250-300) 作用于 MSMSCs。细胞成骨诱导 3 d 后, 基于免疫印迹实验发现, 与 Ad-GFP 阴性对照组相比, BMP2 蛋白表达逐渐增强, 且随着 Ad-IGF1 滴度增加呈梯度上升, 各实验组与对照组相比, 差异均有统计学意义 (图 3d)。Smad1/5 总蛋白量无变化, 而 Smad1/5 磷酸化 (p-Smad1/5) 水平增高, 且随着 Ad-IGF1 滴度增加呈梯度上升, 各实验组与对照组相比, 差异均有统计学意义 (图 3e)。同时观察了不同时间点 (3 h、6 h、12 h、24 h、48 h) 的 BMP2 和 p-Smad1/5 的动态变化。与 0 h 组相比, BMP2 蛋白水平呈时间依赖性增强趋势, 在 24 h 时达到高峰, 48 h 后表达开始轻微减弱, 但 48 h 组仍高于 0 h 组 (图 3f)。Smad1/5 总蛋白量无变化, Smad1/5 的磷酸化水平在 12 h 时达到高峰, 24 h 后表达轻微减弱, 但 24 h 和 48 h 组仍高于 0 h 组 (图 3g)。

2.3 IGF1 依赖 BMP-Smad 信号通路而非 p38MAPK 信号通路调控 MSMSCs 的成骨分化

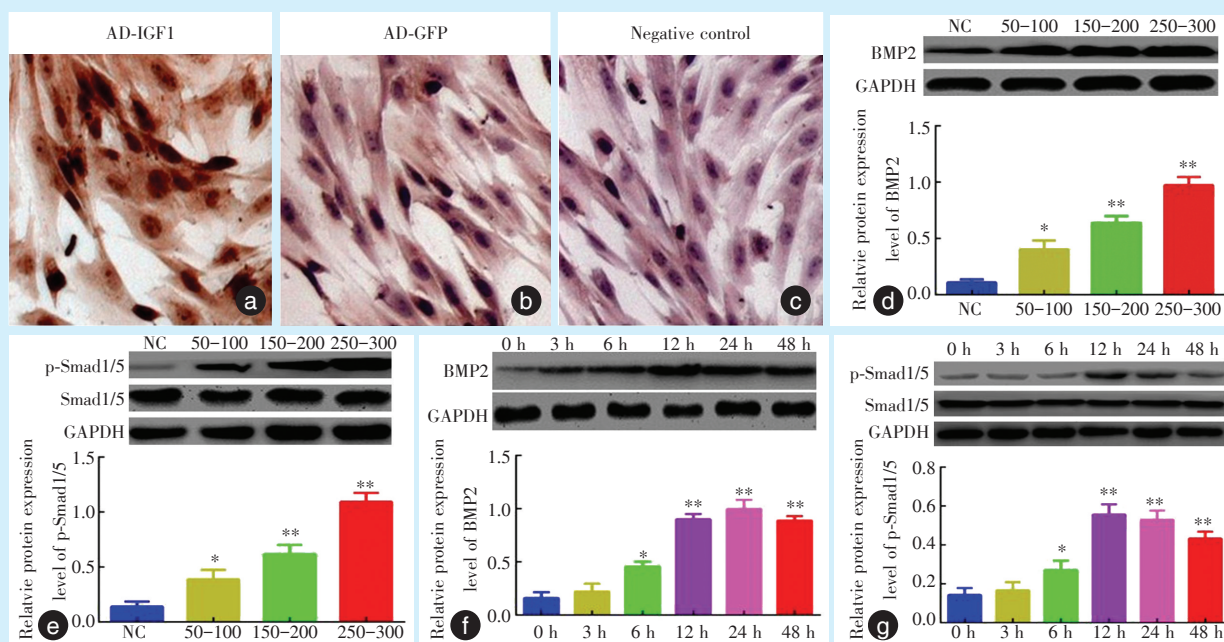
为了进一步探索 IGF1 介导 MSMSCs 的成骨分



a: fluorescence microscopy of AD-IGF carrying GFP and AD-GFP ($\times 100$); b: gel analysis after restriction digestion of the IGF1 gene with NheI and Hind III; c&d: detection of the efficiency of the AD-IGF1 (c) and AD-GFP (d) gene infection in the MSMSCs with fluorescence microscopy; e: the IGF1 mRNA expression of target genes in the MSMSCs after infection with Ad-IGF1 ($n = 3$, $**P < 0.01$)

Figure 2 Restriction of the AD-IGF1 gene and its infection efficiency

图2 IGF1 基因表达重组腺病毒构建及感染效率



a-c: protein expression and nuclear translocation of p-Smad1/5 in the MSMSCs after infection with Ad-IGF1 ($\times 400$); d: protein expression of BMP2 in the MSMSCs after infection with different concentrations of Ad-IGF1. Ad-IGF1 dose-dependently upregulates the BMP2 protein expression in MSMSCs; e: the phosphorylation level of Smad1/5 in the MSMSCs after infection with different concentrations of Ad-IGF1. Ad-IGF1 dose-dependently upregulated the phosphorylation level of Smad1/5 in MSMSCs; f: the protein expression of BMP2 in the MSMSCs after infection with Ad-IGF1 at different timepoints. The BMP2 protein level displays a wave-like fluctuation; of note, the peak was at the 24 h time point; g: the level of p-Smad1/5 in the MSMSCs after infection with Ad-IGF1 at different timepoints. The level of the p-Smad1/5 protein displays a wave-like fluctuation; of note, the peak was at the 24 h time point ($n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)

Figure 3 Upregulation of IGF1 promotes p-Smad1/5 protein nuclear translocation and positively regulates BMP2 and p-Smad1/5 protein expression in MSMSCs in a time- and dose-dependent manner

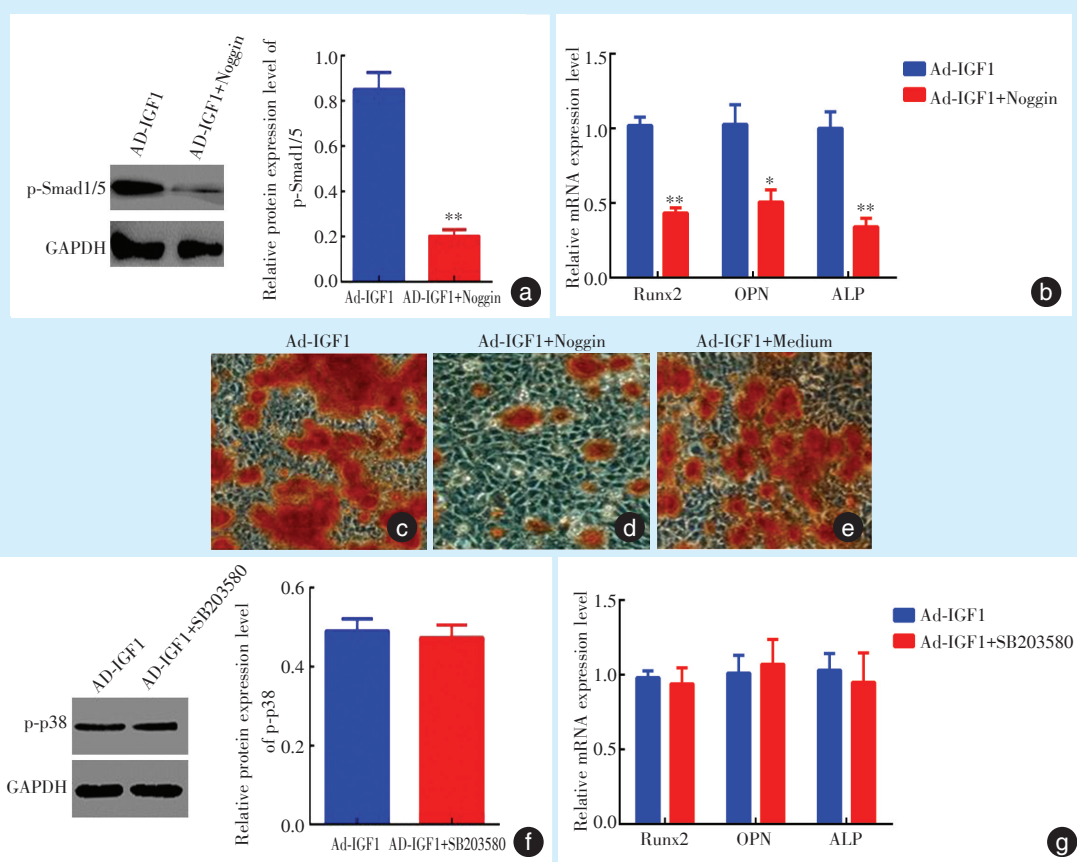
图3 MSMSCs 中 IGF1 上调促进 p-Smad1/5 核转位, 并呈时间和剂量依赖性正向调控 BMP2 及 p-Smad1/5 的表达

化的内在核心机制, 首先使用 BMP-Smads 信号通路抑制剂 Noggin 处理 Ad-IGF1 感染的 MSMSCs, 成

骨诱导培养 3 d, 发现磷酸化 Smad1/5 水平降低明显, 与单纯感染 Ad-IGF1 的对照组相比, 两组间表

达量差异有统计学意义(图4a)。并且成骨相关的标志物 Runx2、OPN 和 ALP mRNA 表达量降低明显,与对照组相比,各组间 mRNA 表达量差异有统计学意义(图4b)。更重要的是,茜素红染色结果表明单纯感染 Ad-IGF1 的细胞 α -MEM 成骨诱导培养基中培养 28 d 后,有大量染为红色的矿化结节形成;Noggin 处理 Ad-IGF1 感染的 MSMSCs 后,成骨诱导培养 28 d 也有矿化结节形成,但矿化结节明显减少;Medium 处理 Ad-IGF1 感染的 MSMSCs 后(空白对照),其矿化结节量和单纯感染 Ad-IGF1 类

似(图4c~4e)。然后验证 BMP-非 Smads 信号通路在 IGF1 调控 MSMSCs 成骨的作用。采用 p38MAPK 信号通路抑制剂 SB203580 处理 Ad-IGF1 感染的 MSMSCs 成骨诱导培养 3 d 后,p38 磷酸化水平与单纯感染 Ad-IGF1 的对照组相比,两组间表达量差异无统计学意义(图4f)。并且成骨相关的标志物 Runx2、OPN 和 ALP mRNA 表达量与单纯感染 Ad-IGF1 的对照组相比变化不明显(图4g)。这结果提示 IGF1 主要通过 BMP-Smads 信号通路调控 MSMSCs 成骨分化效应。



a: the phosphorylation level of Smad1/5 in the MSMSCs infected with Ad-IGF1 after treatment with noggin. Noggin significantly reduced the phosphorylation level of Smad1/5 in the MSMSCs; b: mRNA expression of osteogenesis markers in the MSMSCs infected with Ad-IGF1 after treatment with noggin. Noggin significantly decreased the mRNA levelsof Runx2, OPN and ALP in the MSMSCs; c-e: the effect on the formation of mineralized nodules in MSMSCs infected with Ad-IGF1 after treatment with noggin ($\times 200$); f: the phosphorylation level of p-p38 in the MSMSCs infected with Ad-IGF1 after treatment with SB203580. SB203580 cannot decrease the phosphorylation level of p-p38 in the MSMSCs; g: mRNA levels of osteogenesis markers in the MSMSCs infected with Ad-IGF1 after treatment with SB203580. SB203580 can not decrease the mRNA expression of Runx2, OPN or ALP in the MSMSCs ($n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)

Figure 4 IGF1 depends on the BMP-Smad but not the p38MAPK signaling pathway to regulate MSMSCs osteogenic differentiation

图4 IGF1 依赖 BMP-Smad 信号通路而非 p38MAPK 信号通路调控 MSMSCs 的成骨分化

3 讨论

上颌窦黏膜干细胞是一类具有成骨潜能的上颌窦黏膜来源的细胞,在上颌窦底提升术后空间成骨及维持黏膜内稳态中扮演重要作用^[4]。IGF1是一种具有内分泌和旁分泌特性的多功能肽,通过与细胞表面的IGF1受体结合来激活受体的酪氨酸激酶活性,然后使受体-配体复合物发生内化并激活信号反应来调节细胞生长、分化和细胞外基质中多种因子的表达^[5-6]。课题组在前期研究工作中发现IGF1上调可以促进上颌窦黏膜干细胞的碱性磷酸酶、RUNX2和OPN的表达,正向参与上颌窦黏膜干细胞的成骨分化效应,然而IGF1内在的成骨调控通路未进行深入探讨^[7]。在骨髓间充质干细胞成骨向分化过程中,有研究表明BMP2刺激细胞成骨分化的功能需依赖于IGF1激活相关信号通路如PI3K/AKT或MAPK信号通路^[8]。而BMP2为骨基质中存在的重要骨生长因子,可通过与细胞膜上I型和II型受体结合,激活下游信号蛋白Smad1或Smad5蛋白质羧基末端,从而磷酸化Smad1/5,磷酸化的Smad1/5与Smad4结合,形成复合物后由胞浆进行核转位,在核内蓄积后直接作用于下游的靶基因,或与其它转录调节因子一起调控下游靶基因^[9-10]。因此课题组推测IGF1是否可以在细胞成骨分化过程中激活BMP-Smads信号转导通路调控上颌窦黏膜干细胞的成骨效应。

为了揭示IGF1和BMP2-Smads的关系,本研究采用PDC316-mCMV-ZsGreen-IGF1载体构建重组腺病毒Ad-IGF1,经测序证明载体所连序列正确。然后以不同滴度的Ad-IGF1(50-100、150-200、250-300)作用于上颌窦黏膜干细胞成骨诱导培养24 h后,通过Western blot检测发现,BMP2蛋白表达逐渐增强,且随着Ad-IGF1滴度增加呈梯度上升,Smad1/5蛋白被激活,磷酸化水平逐渐升高。并且在不同时间点检测BMP2蛋白水平和磷酸化Smad1/5水平变化,有趣的是,IGF1可呈浓度和时间依赖性上调BMP2表达和Smad1/5活性。免疫组化结果也证实IGF1可以促使磷酸化Smad1/5从上颌窦黏膜干细胞的胞浆转移到核内。随后,为进一步探讨BMP-Smads信号在IGF1介导的促上颌窦黏膜干细胞成骨分化中的作用,采用Noggin进行BMP-Smads信号抑制。Noggin是BMP-Smads信号通路的直接抑制剂,其结构上存在典型的“胱氨酸结”结构域,线性排列的Noggin二聚体同呈蝴蝶形的BMP二聚体结合,形成一个较大的戒指样结构,

能够有效地屏蔽BMP上的受体结合位点,抑制BMP受体的激活和下游靶蛋白的磷酸化^[11-13]。使用Noggin处理Ad-IGF1感染的细胞后,再对细胞进行成骨诱导分化,发现与单纯感染Ad-IGF1组相比,磷酸化Smad1/5蛋白表达量明显降低,成骨相关标志物Runx2、OPN和ALP mRNA表达量降低明显,矿化结节明显减少。说明BMP-Smads信号通路是IGF1活化成骨效应不可或缺的。据此,本实验研究结果表明IGF1可通过BMP2-Smad1/5信号通路,促进BMP2的表达并诱导细胞内Smad1/5磷酸化和核转位机制,调控上颌窦黏膜干细胞成骨分化效应。

随着对BMPs信号通路研究增加,逐渐明确BMPs通路可分为2种:一种是Smads蛋白依赖性信号转导通路,这种信号传导通路需通过经典的Smads信号分子传递信号;另外一种是非Smads蛋白非依赖性信号转导通路,这种信号传导通路不直接依赖转录因子Smads的激活^[14-16]。更重要的是,在成骨机制研究中证实细胞成骨分化除了依赖经典的BMP-Smads信号转导通路外,也可通过Smads蛋白非依赖性信号通路(如MAPK、PI3K等)进行信号传导^[17-18]。其中p38MAPK是其中一条重要的通路,可以通过胞外信号激活MAPK,继而激活MKK3/MKK6,再激活p-p38来调控信号转导过程^[19]。现有的研究发现p38MAPK信号转导可激活相关的转录因子,引起细胞增殖、分化,参与细胞的应激反应和介导细胞的骨架重构等一系列生物学效应,在成骨细胞分化中具有重要的调控作用^[20-21]。然而p38MAPK信号通路是否能在IGF1介导下调控上颌窦黏膜干细胞的成骨效应尚不明确。

基于此,本研究进一步探讨p38MAPK信号通路是否参与IGF1介导的上颌窦黏膜干细胞成骨分化进程。使用p38MAPK信号通路抑制剂SB203580进行功能实验。SB203580,4-(4-氟苯基)-2-(4-甲基亚磺酰苯基)-5-(4-吡啶基)-咪唑,一种药理学的化学合成物,可以抑制p38MAPK对MAPK/APK-2的激活以及后续磷酸化的级联反应,是p38MAPK的选择性抑制剂^[22]。SB203580处理Ad-IGF1感染的细胞后成骨诱导培养3 d,与单纯感染Ad-IGF1的对照组相比,磷酸化p38水平无明显变化,成骨标志物Runx2、OPN和ALP mRNA表达水平亦无明显变化,实验结果提示p38MAPK信号通路可能在IGF1介导的促上颌窦黏膜干细胞成骨分

化过程中并不发挥作用。SB203580抑制效果在上颌窦黏膜干细胞中p-p38及成骨基因变化不明显的原因可能是因为:①SB203580通过与ATP结合区连接来抑制p38MAPK的催化活性,但是不能抑制上游激酶对p38MAPK的磷酸化^[23],因此p-p38的表达变化不明显;②p38MAPK信号通路在炎症调节及发生发展中具有重要意义,其可能在上颌窦黏膜干细胞成骨分化中,其成骨效应作用甚微,从而成骨基因变化不明显;③不排除在上颌窦黏膜干细胞成骨分化进程中存在p38竞争性结合因子,从而影响了抑制剂本身的药物机理。实验结果较倾向于p38MAPK可能在IGF1介导的上颌窦黏膜干细胞成骨过程中并不是主导的信号调节通路。

总之,上颌窦黏膜干细胞成骨分化过程中,IGF1通过经典的Smads蛋白依赖性信号转导通路BMP2-Smad1/5促进成骨,而Smads蛋白非依赖性信号转导通路p38MAPK在IGF1介导的上颌窦黏膜干细胞成骨过程中可能并不发挥作用。

参考文献

- [1] Lundgren S, Cricchio G, Hallman M, et al. Sinus floor elevation procedures to enable implant placement and integration: techniques, biological aspects and clinical outcomes[J]. *Periodontol* 2000, 2017, 73 (1): 103-120.
- [2] Berbéri A, Al-Nemer F, Hamade E. Mesenchymal stem cells with osteogenic potential in human maxillary sinus membrane: an *in vitro* study[J]. *Clin Oral Investig*, 2017, 21(5): 1599-1609.
- [3] Rong Q, Li X, Chen SL, et al. Effect of the Schneiderian membrane on the formation of bone after lifting the floor of the maxillary sinus: an experimental study in dogs[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2015, 53(7): 607-612.
- [4] Srouji S, Ben-David D, Lotan R, et al. The innate osteogenic potential of the maxillary sinus (Schneiderian) membrane: an ectopic tissue transplant model simulating sinus lifting[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2010, 39(8): 793-801.
- [5] Chen S, Hu M, Shen M, et al. IGF-1 facilitates thrombopoiesis primarily through Akt activation[J]. *Blood*, 2018, 132(2): 210-222.
- [6] Bär L, Feger M, Fajol A, et al. Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(22): 5804-5809.
- [7] Zhu S, Peng W, Li X, et al. miR-1827 inhibits osteogenic differentiation by targeting IGF1 in MSMSCs[J]. *Sci Re*, 2017, 7: 46136.
- [8] Lau KW, Rundle CH, Zhou XD, et al. Conditional deletion of IGF-1 in osteocytes unexpectedly accelerates bony union of the fracture gap in mice[J]. *Bone*, 2016, 92: 18-28.
- [9] Decambon A, Devriendt N, Larochette N, et al. Effect of the bone morphogenetic protein-2 doses on the osteogenic potential of human multipotent stromal cells- containing tissue engineered constructs[J]. *Tissue Eng Part A*, 2019, 25(7/8): 642-651.
- [10] Bradford STJ, Ranghini EJ, Grimley E. High-throughput screens for agonists of bone morphogenetic protein (BMP) signaling identify potent benzoxazole compounds[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(9): 3125-3136.
- [11] Hashimi SM. Exogenous noggin binds the BMP-2 receptor and induces alkaline phosphatase activity in osteoblasts[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 13237-13242.
- [12] Yu X, Kawakami H, Tahara N, et al. Expression of Noggin and Gremlin1 and its implications in fine-tuning BMP activities in mouse cartilage tissues[J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(8): 1671-1682.
- [13] AlShaibi HF, Ahmed F, Buckle C, et al. The BMP antagonist Noggin is produced by osteoblasts in response to the presence of prostate cancer cells[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2018, 65(3): 407-418.
- [14] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling[J]. *Nature*, 2003, 425 (6958): 577-84.
- [15] Budi EH, Duan D, Derynck R. Transforming growth factor-beta receptors and smads: regulatory complexity and functional versatility [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(9): 658-672.
- [16] Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF-beta family signaling[J]. *Sci Signal*, 2019, 12(570): 5183.
- [17] Takeno A, Kanazawa I, Notsu M, et al. Inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses bone morphogenetic protein-2-induced mineralization of osteoblasts via Smad-independent mechanisms[J]. *Endocr J*, 2018, 65(3): 291-298.
- [18] Fourel L, Valat A, Faurobert E, et al. beta3 integrin-mediated spreading induced by matrix-bound BMP-2 controls Smad signaling in a stiffness-independent manner[J]. *J Cell Biol*, 2016, 212(6): 693-706.
- [19] Bonney EA. Mapping out p38MAPK[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2017, 77(5): 12652.
- [20] Elango J, Robinson J, Zhang J, et al. Collagen peptide upregulates osteoblastogenesis from bone marrow mesenchymal stem cells through MAPK- Runx2[J]. *Cells*, 2019, 8(5): e446.
- [21] Yodthong T, Kedjarune-Leggat U, Smythe C, et al. 1-Quebrachitol promotes the proliferation, differentiation, and mineralization of MC3T3-E1 cells: involvement of the BMP-2/Runx2/MAPK/Wnt/beta-Catenin signaling pathway[J]. *Molecules*, 2018, 23(12): e3086.
- [22] Zhang X, Fan L, Wu J. Macrophage p38alpha promotes nutritional steatohepatitis through M1 polarization[J]. *J Hepatol*, 2019, 71(1): 163-174.
- [23] Luo M. Inhibition of the kinase cascade can be quantitative [J]. *Biochem*, 2017, 56(34): 4443-4444.

(编辑 张琳,曾曙光)



官网



公众号