

骨形态发生蛋白 9 诱导成骨相关 TGF β II 型受体的鉴定分析*

赵迎泽 张 燕 罗进勇**

(重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

摘要 前期研究发现骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)具有较强的诱导骨形成的能力,但目前对其诱导骨形成相关的分子机制了解甚少.采用重组腺病毒的方法成功构建显性负性突变的转化生长因子(TGF) β II 型受体的腺病毒,将其与 BMP9 共同导入靶细胞,通过体外细胞实验和体内动物实验,初步鉴定分析与 BMP9 诱导成骨密切相关的 TGF β II 型受体.体外细胞实验发现:三种显性负性突变的 TGF β II 型受体,即 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 在体外能抑制由 BMP9 诱导的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)表达和钙盐沉积,并可抑制 BMP9 诱导的 Smad 信号途径的激活.动物实验也显示, dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 可抑制 BMP9 诱导的异位成骨,提示相应的野生型 TGF β II 型受体即 BMPR II、ActR II 和 ActR II B 很可能与 BMP9 诱导成骨有关.而靶细胞中均只表达 BMPR II 和 ActR II,并不表达 ActR II B.随后,采用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)对 BMPR II 和 ActR II 进行基因沉默,结果发现 BMPR II 和 ActR II 的表达受到抑制后,由 BMP9 诱导的荧光素酶活性和 ALP 活性也相应受到抑制.因此, BMPR II 和 ActR II 是与 BMP9 诱导成骨分化相关的 TGF β II 型受体.

关键词 骨形态发生蛋白 9, 转化生长因子, 信号转导, 分化, RNA 干扰

学科分类号 Q254, R34

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00022

在骨再生和骨组织工程研究中,寻找更有效地促进间充质干细胞等种子细胞成骨分化的细胞因子,一直是目前的薄弱环节和亟待解决的关键问题.多种细胞因子能够诱导细胞成骨分化,其中,骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是研究最早和最有力的因子.在 20 余种 BMPs 中, BMP2 和 BMP7 是公认的具有诱导成骨活性的 BMPs^[1-3].但是,最近的临床实际应用却发现,使用 BMP2 后脊柱假关节(不融合)发生率为 7.7%^[4],使用 BMP7 则高达 40%~50%^[5], BMP2 和 BMP7 并不能彻底解决骨再生这一医学难题.因此,继续寻找强效的诱导成骨的细胞因子就成为目前共同关注的热点课题.

BMP9 是 BMPs 中的一种,主要大量存在于肝脏^[6].对于 BMP9 在骨形成及骨再生中的作用,长期以来都缺乏研究和了解.课题组前期研究工作证明: BMP9 也具有强烈的诱导成骨的作用,并且其诱导成骨作用效果远强于传统应用的 BMP2 和

BMP7^[7-9].但是,对于 BMP9 的信号转导过程和诱导成骨的机制,目前却了解很少.

BMPs 是转化生长因子(transforming growth factor β , TGF β)超家族的成员之一,主要是通过经典的 TGF β /Smad 信号通路传递信号,发挥生物学功能^[10].在该信号通路中,与 BMPs 相结合的 TGF β II 型受体连接并磷酸化 TGF β I 型受体, TGF β I 型受体随后再磷酸化下游的转录因子 Smad,从而激活信号转导.因此,在 BMPs 信号转导中, TGF β II 型受体起着承上(与 BMPs 结合)和启下(磷酸化 TGF β I 型受体)的作用,是 BMPs 信号转导的源头,并与其诱导成骨活性关系密切^[11-12].

* 国家自然科学基金(30800658)和重庆市科委自然科学基金(2009BB5060)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 023-68485239, E-mail: luojinyong@sina.com

收稿日期: 2010-05-28, 接受日期: 2010-07-14

但是, 在 4 种 TGF β II 型受体(TGF β R II、BMPR II、ActR II 和 ActR II B)中, 目前并不清楚哪些受体参与和介导了 BMP9 的信号转导和诱导成骨功能的发挥, 这也限制了对 BMP9 诱导成骨的机制进行研究和解释. 因此, 本研究以 BMP9 信号转导的源头和关键节点 TGF β II 型受体为切入点, 首先利用显性负性突变型 TGF β II 型受体(dominant negative TGF β type II receptor, dn-type II TGF β receptor)竞争性抑制 BMPs 配体功能的特点, 通过体外细胞实验和动物实验初步筛选出可能与 BMP9 诱导成骨相关的 TGF β II 型受体. 随后, 利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)抑制相应受体的表达, 进一步探讨和分析 BMP9 诱导成骨相关 TGF β II 型受体对于 BMP9 诱导成骨活性的影响, 为深入揭示 BMP9 诱导成骨早期分子机制提供新的实验和理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料

荧光素酶报告质粒 p12SBE-Luc、TGF β II 型受体干扰腺病毒(siBMPR II 和 siActR II)由芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠; BMP9 腺病毒、空载腺病毒 GFP 和 RFP、显性负性突变型 TGF β II 型受体腺病毒(分别命名为 Ad-dnTGF β R II、Ad-dnBMPR II、Ad-dnActR II 和 Ad-dnActR II B)均由本实验室构建和保存; 小鼠间充质干细胞株 C3H10、小鼠肌源性干细胞 C2C12 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC); 小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)和小鼠骨髓基质细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)由本实验室分离和保存.

实验所用 RNA 提取试剂 Trizol 和脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶、荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司; 常规 PCR 试剂盒、Real Time PCR 试剂盒购自 Takara 公司; PCR 引物由 Takara 公司合成; 碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒及定量检测试剂盒购自 BD 公司; 茜素红 S (Alizerin Red S)、维生素 C 和 β -磷酸甘油购自 Sigma 公司; 高糖 DMEM 培养基、优质胎牛血清购自 Hyclone 公司; 其他试剂均为进口分装或国产分析纯.

实验动物选用 6~8 周龄的健康雄性免疫缺陷 BALB/c 裸鼠, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 喂养于严格消毒的无菌层流动物房内, 环境温

度维持在 25℃, 空气湿度为 60%~70%, 饲料和水经消毒后自由进食.

1.2 方法

1.2.1 ALP 染色和定量检测. 接种 C3H10、C2C12、MEFS 和 BMSC 至 24 孔细胞培养板, 密度为 30%, 待细胞贴壁后, 先加入适量显性负性突变型 TGF β II 型受体腺病毒(或 TGF β II 型受体干扰腺病毒); 24 h 后, 再加入适量 BMP9 腺病毒. 随后, C3H10 细胞继续培养 7 天和 9 天后(C2C12、MEFS 和 BMSC 继续培养 5 天和 7 天后)分别进行 ALP 染色和定量测定(操作按试剂盒说明书进行), 比较和分析 ALP 活性的变化情况.

1.2.2 钙盐沉积实验. 接种 C3H10 细胞和 MEFs 细胞至 24 孔细胞培养板, 密度为 30%, 待细胞贴壁后, 加入终浓度为 50 mg/L 维生素 C 和 10 mmol/L 的 β -磷酸甘油. 先加入适量显性负性突变的 TGF β II 型受体腺病毒, 24 h 后, 再加入适量 BMP9 腺病毒, 继续培养 20 天后进行茜素红 S 染色. 彻底弃去细胞培养板孔内液体, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 0.1%戊二醛固定 10 min, 双蒸水洗涤 3 次. 弃去双蒸水, 加入 0.4%茜素红 S, 在显微镜下观察, 待出现红色物质堆积时, 弃去孔内染液, 双蒸水终止反应和洗涤, 显微镜观察和成像.

1.2.3 荧光素酶报告基因实验. 接种 C3H10 细胞至 T-25 细胞培养瓶(底面积 25 cm²), 密度为 30%, 待细胞贴壁后, 换用无血清、无双抗的 DMEM 培养基, 随后用脂质体 2000 转染 p12SBE-Luc 质粒 1 μ l, 转染后 4 h 换为完全 DMEM 培养基. 继续培养 24 h, 再将细胞接种至 24 孔细胞培养板, 待细胞贴壁后, 先加入适量的显性负性突变的 TGF β II 型受体腺病毒(或 TGF β II 型受体干扰腺病毒), 24 h 后, 再加入适量 BMP9 腺病毒, 继续培养 8 h 和 24 h 后分别进行荧光素酶活性测定(按试剂盒说明书进行)

1.2.4 Real-time PCR 实验. C3H10 细胞接种至 T-25 细胞培养瓶, 密度为 60%, 培养 24 h 后, 提取细胞 RNA, 检测 4 种内源性 TGF β II 型受体的相对表达水平; C3H10 细胞接种 T-25 细胞培养瓶, 密度为 60%, 细胞贴壁后, 先加入适量的显性负性突变的 TGF β II 型受体腺病毒, 24 h 后, 再加入适量 BMP9 腺病毒, 在加入 BMP9 腺病毒后 0 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 分别提取细胞 RNA, 经逆转录反应制备 cDNA, real time PCR 检测 Smad6 和 Smad7 的表达, 采用 GAPDH 基因作为内参

照. 目的基因的表达根据标准曲线得出 mRNA 的分子拷贝, 用 GAPDH 的拷贝数作为校正基数, 即目的基因 mRNA 相对表达量=目的基因拷贝数 / GAPDH 拷贝数. 所用引物序列见表 1

Table 1 The sequence of primers for real time PCR		
Gene	Forward primer	Reversed primer
TGFβR II	CTCAACCACCAGGGCATC	CGGATGCTCCAGCTCACT
BMPR II	AGCGTCACAAGCCTGTCC	TTTGTGGCGTGCAAATGT
ActR II	GGCTCCAGAGGTGTTGGA	CCATCTGCAGCAGTGCAA
ActR II B	GGGACCATGATGCAGAGG	GGTGACGGAGGTCACCAG
Smad6	ATCACCTCTGCCCTGT	CTGGGGTGGTGTCTCTGG
Smad7	AAGATCGGCTGTGGCATC	CCAACAGCGTCTGGAGT
GAPDH	GGCTGCCCAACATCAT	CGGACACATTGGGGGTAG

1.2.5 动物实验和组织化学染色. C3H10 细胞接种至 100 mm 细胞培养皿, 培养至细胞密度 60%左右, 先加入适量显性负性突变的 TGFβ II 型受体腺病毒, 24 h 后, 再加入适量 BMP9 腺病毒, 继续培养 24 h, 彻底弃去细胞培养皿中的液体, 用 2 ml 0.25%胰蛋白酶消化 2 min, 8 ml 含 10%血清的

DMEM 中和, 吸管吹打成为单细胞悬液, 500 g 离心 2 min, 弃去上清, 用 50 μl 含 100U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 PBS 重悬细胞沉淀. 每只 BALB/c 裸鼠用 1 ml 注射器接种 50 μl 细胞悬液于背部, 每周观察裸鼠皮下成骨包块的大小. 细胞接种 5 周后, 断颈处死裸鼠, 取皮下包块观察大小并成像. 用福尔马林固定包块后, 经脱钙, 石蜡包埋切片, 组织化学染色(H&E、Trichrome 和 Alcain blue 染色)观察包块内细胞的成骨分化情况, 成像并保存.

1.2.6 统计分析. 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 q 检验, 统计学数据均用 SAS8.2 软件包处理.

2 结果与分析

2.1 靶细胞中内源性 TGFβ II 型受体表达水平

Real time PCR 检测了 C3H10、BMSC、MEFs 和 C2C12 4 种靶细胞中内源性 TGFβ II 型受体的表达情况. 在这 4 种靶细胞中, 内源性 TGFβ II 型受体的表达丰度虽不尽相同, 但总的趋势是: 在 4 种细胞中均只有 TGFβR II、BMPR II 和 ActR II 的表达, 而不表达 ActR II B(图 1).

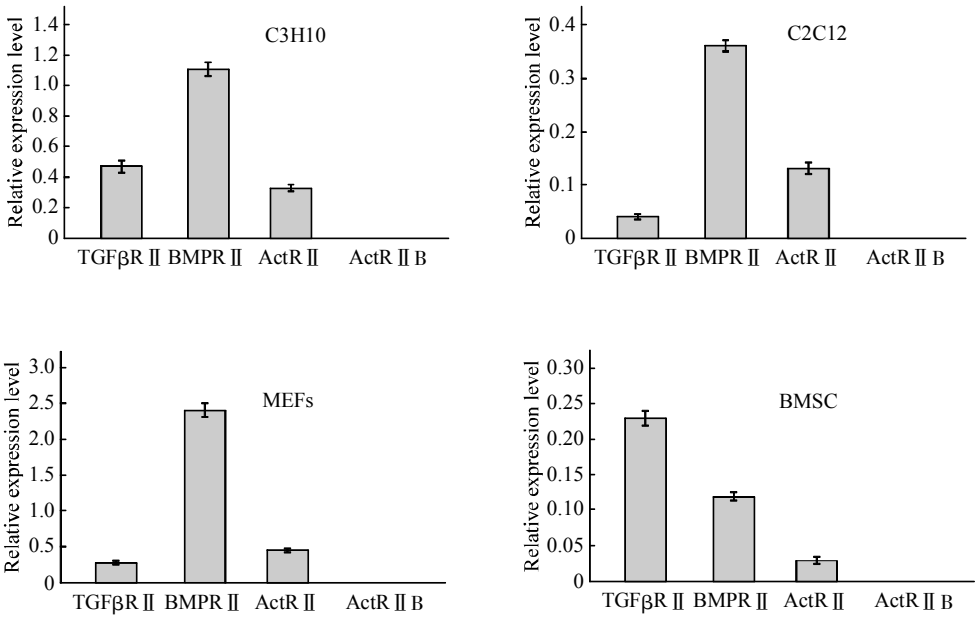


Fig. 1 Endogenous expression level of type II TGFβ receptors in target cell lines

C3H10, C2C12, MEFs and BMSC were seeded to T-25 flask the day before test. Total RNA was isolated after 24 h and real time PCR assay was applied to analyze the expression of four type II TGFβ receptors using corresponding primers, respectively. Data are shown as the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments.

2.2 显性负性突变型 TGF β II 型受体腺病毒能够感染靶细胞并有效表达

实验室构建并包装了 4 种显性负性突变型 TGF β II 型受体腺病毒, 即将 TGF β II 型受体胞内结构域剔除(图 2a), 只保留胞外结构域和跨膜结构域, 此类受体可以和配体结合, 但是却不能触发信号转导, 起到抑制配体功能的作用。

显性负性突变型 TGF β II 型受体腺病毒感染 C3H10 细胞 24 h 后, 荧光显微镜观察, 发现所有

4 种显性负性突变型 TGF β II 型受体腺病毒均能感染 C3H10 细胞并在其中表达, 细胞内可以观察到红色荧光的产生; 腺病毒感染 C3H10 细胞 48 h 后, 提取细胞 RNA, 逆转录合成 cDNA, PCR 扩增, 上游引物选用受体 5'端特异性引物, 下游引物选用腺病毒上 SV40 polyA 的特异性引物, 以排除内源性受体的干扰。结果显示, 所有 4 种显性负性突变型 TGF β II 型受体腺病毒均可在 C3H10 细胞中表达而且有 500~700 bp 的扩增片段(图 2b, 2c)。

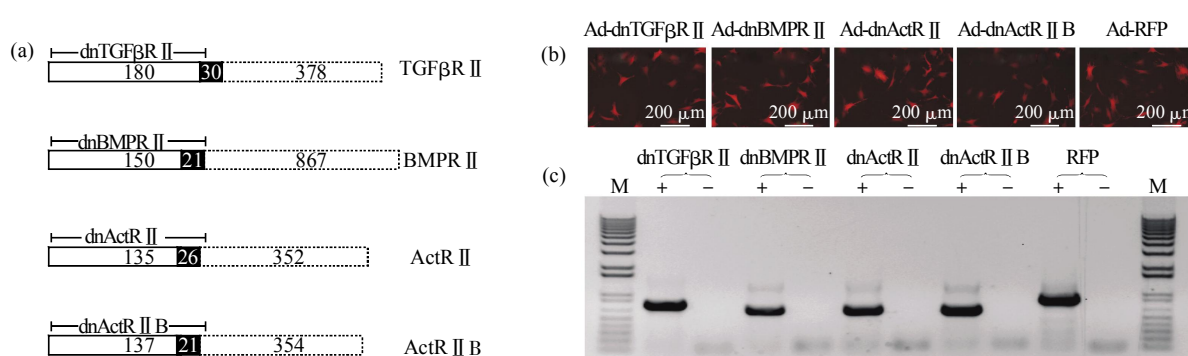


Fig. 2 Construction and validation of dn-type II TGF β receptors

(a) Schematic features of the dn-type II TGF β receptors. Intracellular domain of type II receptors (indicated by dashed line) was deleted to generate each dn-type II TGF β receptors. (b) Efficient infection of dn-type II TGF β receptor virus to C3H10 was validated by fluorescence microscope ($\times 100$). (c) Efficient expression of dn-type II TGF β receptor virus in C3H10 was confirmed by RT-PCR using receptor-specific primers. Resultant products ranged from 500~700 bp. +: PCR products from +RT reactions of the original cDNA synthesis; -: PCR products from -RT reactions of the original cDNA synthesis; M: 1-kb Plus ladder from Invitrogen.

2.3 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 抑制 BMP9 诱导的 ALP 活性

ALP 是细胞成骨分化的早期指标, 实验以 RFP 为对照, 显性负性突变型 TGF β II 型受体腺病毒感染 4 种靶细胞, 感染 24 h 后加以 BMP9 腺病毒刺激, 分别在 BMP9 刺激后不同时间点进行 ALP 染色和定量。结果显示: 在 4 种细胞中, 与对照组 RFP 相比, dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 组均能明显抑制 BMP9 诱导的早期成骨指标 ALP 的表达($P < 0.01$)。而且, 在这几种显性负性突变型 TGF β II 型受体腺病毒感染率相同的情况下, dnActR II B 抑制作用是最强的(图 3)。因此, dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 能抑制 BMP9 诱导的细胞早期成骨分化。

2.4 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 抑制 BMP9 诱导的细胞钙盐沉积

除了 ALP 以外, 钙盐沉积是细胞成骨分化的另一个经典的检测指标, 且是比 ALP 更晚期的指标。为了明确显性负性突变型 TGF β II 型受体对于 BMP9 诱导钙盐沉积的影响, 利用显性负性突变型 TGF β II 型受体腺病毒和 BMP9 腺病毒共感染 C3H10 和 MEFs 细胞。在病毒感染后相应时间点(C3H10 在第 20 天, MEFs 在第 14 天), 通过茜素红 S 染色发现: 与对照组 RFP 相比, dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 组细胞钙盐沉积明显减少(图 4)。提示 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 能够抑制 BMP9 诱导的 C3H10 和 MEFs 细胞的晚期成骨分化。

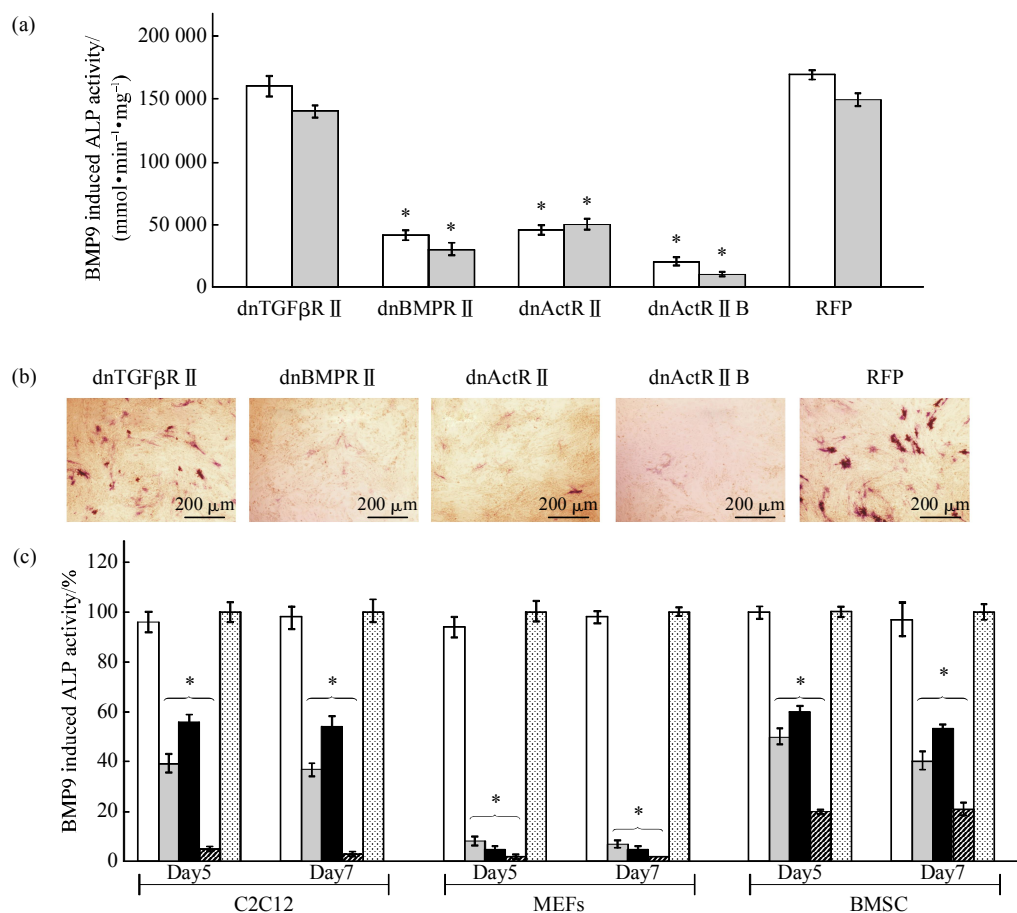


Fig. 3 Effect of dn-type II receptors on BMP9 induced ALP activity

C3H10, C2C12, MEFs and BMSC cell lines were infected with virus expressing dn-type II TGFβ receptors and BMP9. At 7 and 9 days (for C2C12, MEFs and BMSC, at 5 and 7 days) after infection, cells were collected and subjected to ALP staining and quantitative assay. (a) dnBMPR II, dnActR II and dnActR II B inhibited BMP9-induced ALP activity of C3H10 determined by ALP quantitative assay. □: Day 7; ▤: Day 9. (b) dnBMPR II, dnActR II and dnActR II B inhibited BMP9 induced ALP activity of C3H10 determined by ALP staining assay. (c) dnBMPR II, dnActR II and dnActR II B inhibited BMP9 induced ALP activity of C2C12, MEFs and BMSC. □: dnTGFβR II; ▤: dnBMPR II; ■: dnActR II; ▨: dnActR II B; ▩: RFP. Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments (* $P < 0.01$ vs RFP). $\times 100$.

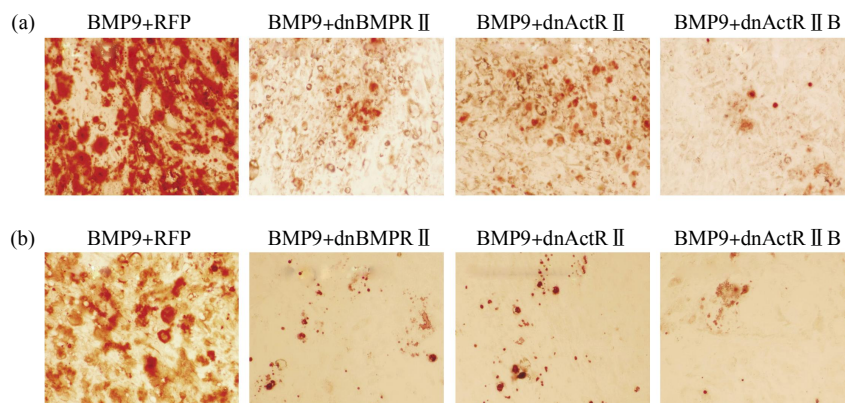


Fig. 4 Effect of dnBMPR II, dnActR II, dnActR II B on BMP9 induced calcification in C3H10 and MEFs cell lines

C3H10 and MEFs were infected with virus expressing dn-type II TGFβ receptors and BMP9. At 20 days (C3H10) and 14 days (MEFs) after infection, cells were fixed and subjected to Alizarin Red S staining. Representative images are shown. (a) dnBMPR II, dnActR II and dnActR II B inhibited BMP9 induced calcium deposition of C3H10 at day 20. (b) dnBMPR II, dnActR II and dnActR II B inhibited BMP9 induced calcium deposition of MEFs at day 14. $\times 100$.

2.5 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 抑制 BMP9 诱导的 TGF β /Smad 信号通路激活

Smad6 和 Smad7 是 BMPs 的靶基因, 在 BMPs 信号激活后表达迅速增加, 起到反馈抑制 BMPs 信号的作用, 是 BMPs 信号激活的标志之一^[13]. Real time PCR 结果发现: 与对照组 RFP 相比, dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 可抑制 BMP9 诱导 Smad6 和 Smad7 的表达($P < 0.01$, 图 5a), 这表明, 在 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 的作用下, BMP9 诱导的信号通路激活受到了抑制.

BMPs 通过经典 TGF β /Smad 信号通路, 活化

转录因子 Smad, 随后启动下游一系列基因表达而发挥生物学作用. 荧光素酶报告质粒 p12SBE-Luc 在报告基因前插入了 12 个连续的 SBE(smad binding element)序列, 只有活化的 Smad 才可以结合到 SBE 上, 启动荧光素酶的表达^[14]. 荧光素酶实验结果发现: dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 可抑制 BMP9 诱导的荧光素酶活性($P < 0.01$, 图 5b), 提示 Smad 的活化受到抑制. 综合 real time PCR 和荧光素酶结果表明: dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 能够抑制 BMP9 诱导的 TGF β /Smad 信号通路激活.

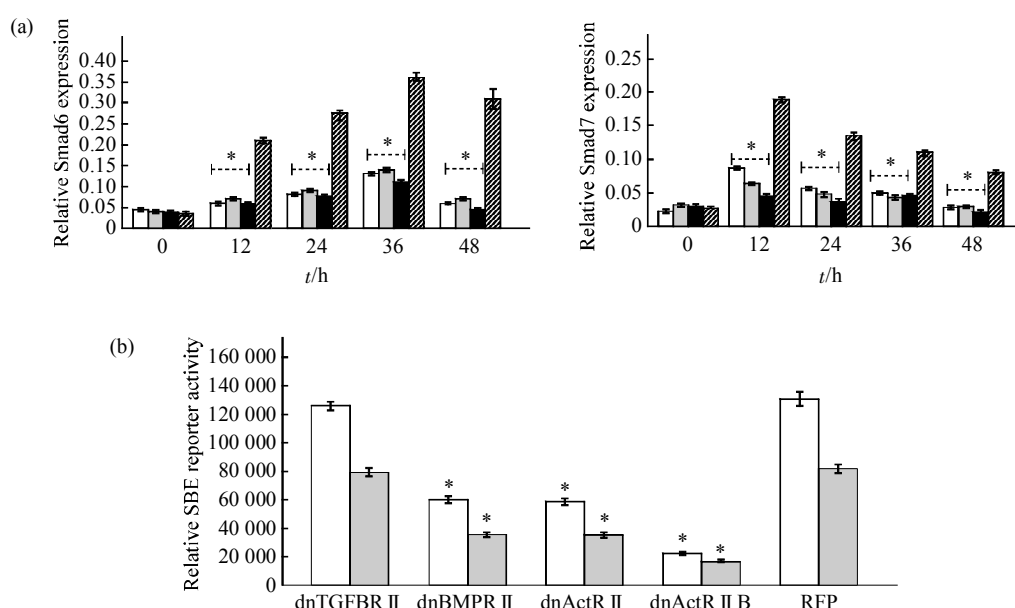


Fig. 5 Effect of dn-type II receptors on BMP9 induced activation of TGF β /Smad pathway

12 h, 24 h, 36 h and 48 h after infection by virus expressing dn-type II TGF β receptors and BMP9, total RNA of C3H10 and MEFs was extracted and subjected to real time PCR analysis using primers corresponding to the target genes respectively; all samples were normalized by GAPDH. (a) dnBMPR II, dnActR II and dnActR II B inhibited expression of Smad6 and Smad7 induced by BMP9. □: dnBMPR II; ▤: dnActR II; ■: dnActR II B; ▨: RFP. (b) dnBMPR II, dnActR II and dnActR II B inhibited luciferase activity controlled by SBE element promoted by BMP9. □: 8 h; ▤: 24 h. Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments (* $P < 0.01$ vs RFP).

2.6 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 抑制 BMP9 诱导的裸鼠皮下异位成骨

为证实 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 在体内是否可以抑制 BMP9 诱导的异位骨形成, 分别将 dnBMPR II、dnActR II、dnActR II B 腺病毒和 BMP9 腺病毒共感染 C3H10 细胞, 并接种至裸鼠皮下. 5 周后取皮下包块观察, 发现 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 组的皮下包块较小(图 6).

皮下包块经过石蜡包埋、切片, 进行 H&E、Alcian blue 和 Trichome 染色. 与对照组 RFP 相比, H&E 染色显示 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B

组的成熟骨基质 (bone matrix, BM) 生成量减少, 而且成骨细胞 (osteoblast, OB) 的量也减少(图 6). Alcian blue 染色显示 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 组有较多的软骨成分 (染为蓝色); Trichome 染色显示 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 组有较多的类骨质 (即不成熟的骨基质, 染为绿色, 图 6).

因此, 皮下包块组织化学染色提示: dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 抑制 BMP9 诱导的异位成骨, 使得骨生成的数量、质量和成熟度均减少.

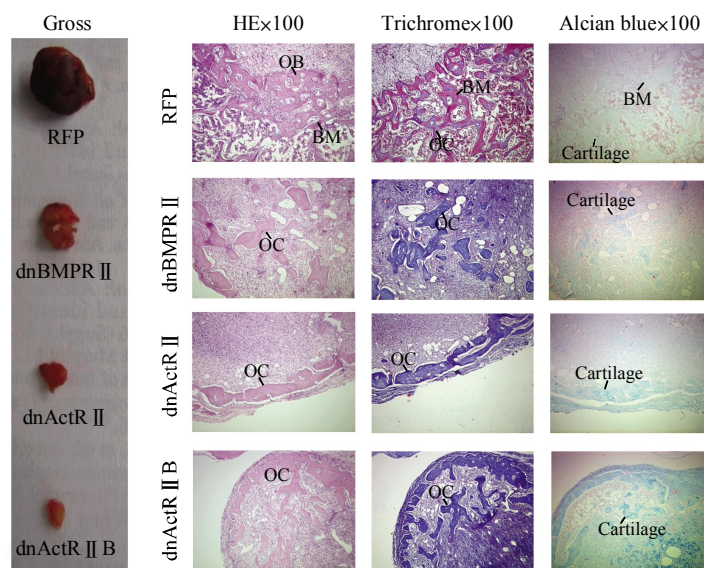


Fig. 6 Effect of dn-type II receptors on BMP9 induced ectopic bone formation

C3H10 cells were infected with virus expressing dn-type II TGF β receptors and BMP9. The infected cells were collected and subjected to subcutaneous injection into athymic mice. 5 weeks after implantation, animals were sacrificed and bony masses were retrieved. The retrieved samples were then decalcified and determined by H&E staining, Trichrome staining and Alcian blue staining. Representative images are shown of each group. For the Trichrome stain, decalcified bone matrix stained dark red, whereas osteoid stained blue. For the Alcian blue stain, cartilage stained blue. BM: Bone matrix; OB: Osteoblast; OC: Osteoid or cartilage-like matrix. $\times 100$.

2.7 BMPR II 和 ActR II 基因沉默抑制 BMP9 诱导的 Smad 活化和 ALP 活性

以上结果表明, dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 在体外和体内均可抑制 BMP9 诱导的细胞信号转导和成骨分化. 由此推测其相应的野生型受体(即 BMPR II、ActR II、ActR II B), 很可能就是与 BMP9 诱导成骨有关的 TGF β II 型受体. 但

是, 由于在本研究中使用的 4 种靶细胞均不表达 ActR II B, 由此推测, 在 BMP9 诱导细胞成骨分化的过程中, 发挥作用的可能是 BMPR II 和 ActR II.

为证实此推测, 我们使用 BMPR II 和 ActR II 的干扰腺病毒(siBMPR II 和 siActR II)实现了对于 C3H10 细胞中 2 种受体的有效基因沉默(图 7a). 利用荧光素酶和 ALP 活性检测, 分析 BMPR II 和

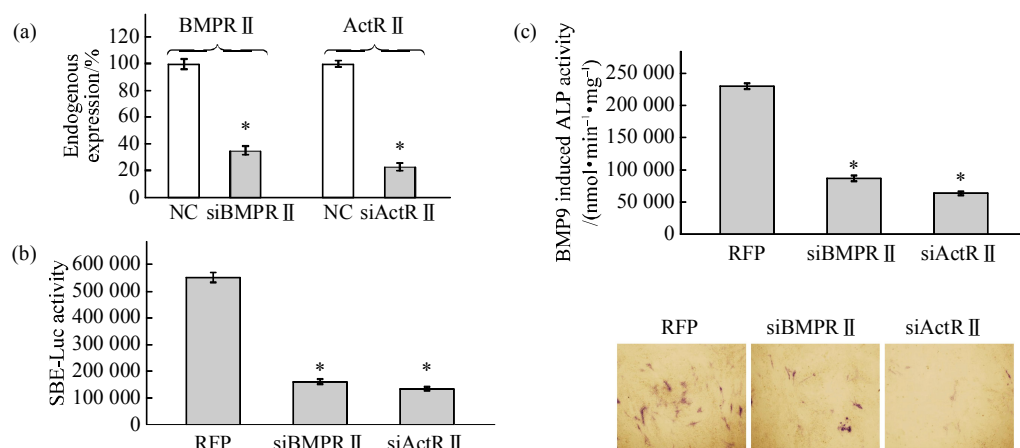


Fig. 7 Gene silence of BMPR II and ActR II inhibits BMP9 induced ALP and SBE-controlled luciferase activity

(a) Inhibition of BMPR II and ActR II expression after infected by siRNA-expressing virus (siBMPR II, siActR II) in C3H10 cells. (b) siBMPR II and siActR II inhibit BMP9 induced luciferase activity controlled by SBE in C3H10. (c) siBMPR II and siActR II inhibit BMP9 induced ALP activity in C3H10 determined by ALP quantitative and staining assay. Data are the ($\bar{x} \pm s$) of triplicates experiments (* $P < 0.01$ vs RFP or NC). $\times 100$.

dnActR II 基因沉默后对于 BMP9 诱导的 Smad 活化和 ALP 活性的影响。结果发现: siBMPR II 和 siActR II 降低 BMPR II 和 ActR II 表达后, 由 BMP9 引发的荧光素酶和 ALP 活性均受到抑制(图 7b, 7c)。提示 BMPR II 和 ActR II 基因沉默可以抑制 BMP9 诱导的 Smad 活化和早期成骨指标 ALP 的表达。因此, BMPR II 和 ActR II 的表达对于 BMP9 发挥诱导成骨活性极为重要。

3 讨 论

BMP9 是一种强效的诱导骨形成的细胞因子, 但对于其诱导成骨相关的分子机制还缺乏详细了解。鉴定分析与 BMP9 诱导成骨相关的 TGF β II 型受体将有助于从信号转导的源头揭示 BMP9 诱导成骨的机制。TGF β II 型受体在结构上包括 3 个结构域, 即胞外结构域, 跨膜结构域和胞内结构域^[9], 其中胞内结构域具有激酶活性, 是其发挥信号转导功能的重要结构域。显性负性突变 TGF β II 型受体由于丢失了胞内结构域而丧失激酶活性, 不能触发信号转导, 常被作为 TGF β /BMP 信号途径的抑制因素用于 TGF β /BMPs 信号转导及其机制的相关研究中^[11-12]。

在体外实验中, 发现 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 能抑制 BMP9 诱导的 ALP 表达和钙盐沉积。ALP 和钙盐沉积分别是经典的细胞成骨分化早期和晚期指标, 这表明 BMP9 诱导的细胞成骨分化受到了抑制。同时发现由 BMP9 诱导的 Smad6 和 Smad7 的表达也受到抑制, Smad6 和 Smad7 是 BMPs 信号激活后的靶基因, 其表达抑制表明由 BMP9 促发的信号转导受到抑制; 而荧光素酶实验证实, dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 可抑制 BMP9 诱导的 Smad 的活化。因此体外初筛结果表明: dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 抑制了 BMP9 诱导的 TGF β /Smad 信号通路激活, 并导致 BMP9 诱导的细胞成骨分化趋势减弱。

进一步在裸鼠皮下异位成骨实验中也发现: dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 使得 BMP9 诱导的异位成骨的数量和质量均下降, 表现为成骨数量较少, 而且骨的成熟度也受到抑制, 形成较多的软骨成分。由于骨形成包括膜内成骨和软骨内成骨两种方式^[10], 因此很可能在 BMP9 通过软骨内成骨促进骨形成的过程中, 由于 dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 的抑制作用, 使得 BMP9 所致的软骨内成骨的骨化趋势减慢, 导致软骨成分

增多, 骨成熟度相应降低。

体外和体内实验结果均提示, dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 抑制了 BMP9 的信号转导, 使得 BMP9 诱导成骨的活性下降。那么, dnBMPR II、dnActR II 和 dnActR II B 各自的野生型受体即 BMPR II、ActR II 和 ActR II B 很可能就是与 BMP9 结合, 并与 BMP9 诱导成骨密切相关的 TGF β II 型受体。但是, 由于 ActR II B 在本研究中所使用的 4 种靶细胞内均不表达, 因此, 推测在 BMP9 诱导 C3H10、C2C12、MEFs、BMSC 成骨分化的过程中, 起作用的可能是 BMPR II 和 ActR II。

为进一步证实这一推测, 我们利用 RNAi 对于 C3H10 细胞内 BMPR II 和 ActR II 两种受体进行了有效的基因沉默, 再给予 BMP9 的刺激。结果发现, BMP9 诱导的荧光素酶活性和 ALP 活性均明显降低。这进一步证实了 BMPR II 和 ActR II 是与 BMP9 诱导成骨密切相关的 TGF β II 型受体, 在抑制 BMPR II 和 ActR II 的表达后, BMP9 诱导细胞成骨的功能也受到抑制。

BMPR II、ActR II 和 ActR II B 在结构域上具有很高的相似性, 但 BMPR II 有一个长的 C 端尾巴(C-terminal tail), 该结构可以与许多蛋白质相互作用, 调节 BMPs 的信号转导^[7]。已有研究证实, BMPR II 是与 BMP2 和 BMP4 诱导间充质干细胞成骨相关的 TGF β II 型受体, ActR II 则是与 BMP6 和 BMP7 诱导成骨相关的 TGF β II 型受体^[18]。而本研究结果则表明, BMPR II 和 ActR II 在 BMP9 诱导成骨的过程中均具有重要作用, 是与 BMP9 诱导成骨相关的 TGF β II 型受体。而 Upton 等^[19]发现, 在肺动脉内皮细胞中与 BMP9 信号转导有关的 TGF β II 型受体也是 BMPR II 和 ActR II, 与本研究的结果一致。

需要特别注意的是, 虽然 ActR II B 在 4 种靶细胞内不表达, 但是 dnActR II B 却对 BMP9 诱导成骨的能力具有很强的抑制作用, 这提示我们 ActR II B 可能和 BMP9 具有很强的亲和力, 那么, 在其他表达 ActR II B 的细胞中, ActR II B 对于 BMP9 功能的发挥, 应该也起着很重要的作用。BMP9 可同时通过 BMPR II 和 ActR II 发挥诱导成骨作用, 很可能是 BMP9 具有较强诱导成骨作用的机制之一。但同时, BMPR II 或 ActR II 也可与 BMP2、BMP4、BMP6 等结合, 因此我们推测, BMP9、BMP2、BMP4、BMP6 等与 BMPR II 或 ActR II 之间的亲和力可能存在差异, 这种差异或

许是 BMP9 具有较强诱导成骨能力的另一机制。以上推测还需要进一步的实验, 如表面等离子体共振进行亲和力的定量测定, 来进行验证, 以便为从信号转导的源头系统阐述 BMP9 诱导成骨的机制, 以及 BMP9 在临床的应用奠定理论基础。

参 考 文 献

- [1] McKay W F, Peckham S M, Badura J M. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop*, 2007, **31**(6): 729–734
- [2] Acil Y, Springer I N, Broek V, *et al.* Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. *J Cell Biochem*, 2002, **86**(1): 90–98
- [3] Sandhu H S. Bone morphogenetic proteins and spinal surgery. *Spine*, 2003, **28**(15 Suppl): 64–67
- [4] Hanisch O, Tatakis D N, Rohrer M D, *et al.* Bone formation and osseointegration stimulated by rhBMP-2 following subantral augmentation procedures in nonhuman primates. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1997, **12**(6): 785–792
- [5] Kanayama M, Hashimoto T, Shigenobu K, *et al.* A prospective randomized study of posterolateral lumbar fusion using osteogenic protein-1 (OP-1) versus local autograft with ceramic bone substitute: emphasis of surgical exploration and histologic assessment. *Spine*, 2006, **31**(10): 67–74
- [6] Miller A F, Harvey S A, Thies R S, *et al.* Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem*, 2000, **275**(24): 17937–17945
- [7] Luu H H, Song W X, Luo X, *et al.* Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 2007, **25**(5): 665–677
- [8] Kang Q, Sun M H, Cheng H, *et al.* Characterization of the distinct orthotopic bone forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther*, 2004, **11** (17): 1312–1320
- [9] 张 燕, 文 巍, 罗进勇. 骨形态发生蛋白 9 定向诱导多潜能干细胞成骨分化. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(10): 12911–12298
- Zhang Y, Wen W, Luo J Y. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(10): 12911–12298
- [10] Cao X, Chen D. The BMP signaling and *in vivo* bone formation. *Gene*, 2005, **29**; **357**(1): 1–8
- [11] Yamamoto H, Ueno H, Ooshima A, *et al.* Adenovirus-mediated transfer of a truncated transforming growth factor-beta (TGF-beta) type II receptor completely and specifically abolishes diverse signaling by TGF-beta in vascular wall cells in primary culture. *J Biol Chem*, 1996, **271**(27): 16253–16259
- [12] Choi M E, Ballermann B J. Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem*, 1995, **270**(36): 21144–21150
- [13] Chen D, Zhao M, Mundy G R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 2004, **22**(4): 233–241
- [14] David L, Mallet C, Mazerbourg S, *et al.* Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 2007, **109**(5): 1953–1961
- [15] Lönn P, Morén A, Raja E, *et al.* Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads. *Cell Res*, 2009, **19**(1): 21–35
- [16] 高英茂, 徐昌芬, 王亚平, 等. *组织学与胚胎学*. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 52–56
- Gao Y M, Xu C F, Wang Y P, *et al.* *Histology and Embryology*. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 52–56
- [17] Chan M C, Nguyen P H, Davis B N, *et al.* A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**(16): 5776–5789
- [18] Lavery K, Swain P, Falb D, *et al.* BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*, 2008, **283**(30): 20948–20958
- [19] Upton P D, Davies R J, Trembath R C, *et al.* Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem*, 2009, **284**(23): 15794–15804

Identification and Analysis of Type II TGF β Receptors in BMP9 Induced Osteogenesis*

ZHAO Ying-Ze, ZHANG Yan, LUO Jin-Yong**

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract In the previous reports, BMP9 has shown potent function to induce osteogenesis, but the underlying molecular mechanism of osteogenesis induced by BMP9 is needed to be deeply explored. Dominant negative type II TGF β receptors and BMP9 were constructed by following recombinant adenoviruses protocol and co-introduced into target cells. Then the type II TGF β receptors required for BMP9-induced osteogenesis was identified and analyzed through *in vitro* and *in vivo* assays. It was found that three dominant negative type II TGF β receptors, which are dnBMPR II, dnActR II and dnActR II B, can not only reduce alkaline phosphatase (ALP) activity induced by BMP9 and calcium deposition, but also repress the activation of Smad signal pathway. Moreover, dnBMPR II, dnActR II and dnActR II B also showed to inhibit ectopic bone formation induced by BMP9 *in vivo*. However, target cells expressed BMPR II and ActR II, but not ActR II B. Then, when BMPR II and ActR II were silenced by RNA interference in target cells, luciferase reporter activity and ALP activity induced by BMP9 was accordingly inhibited along with knockdown of BMPR II and ActR II. Taken together, those results intensively suggest that BMPR II and ActR II are the functional type II TGF β receptors required for BMP9 induced osteogenesis.

Key words bone morphogenetic proteins 9, transform growth factor(TGF), signal transduction, differentiation, RNA interference

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00022

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30800658) and Natural Science Foundation Project of Chongqing Science and Technology Commission (2009BB5060).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-68485239, E-mail: luojinyong@sina.com

Received: May 28, 2010 Accepted: July 14, 2010