0254-6124/2008/28(1)-087-10 *Chin. J. Space Sci.* 空间科学学报

Huang Guoping, Zheng Qiang, Yang Jinfeng, Guo Chunjuan, Shen Dan, Shi Dongyan, Xu Yulin, Pan Zhijun, Wang Jinfu. Analysis of effects of modeled microgravity on signaling pathways involved in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Chin. J. Space Sci.*, 2008, **28**(1): 87∼96

模拟微重力对人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中细胞信号通路影响的分析*

黄国平[1] 郑 强[2] 杨金凤[1] 郭春娟[1] 沈 丹[3]
石东燕[1] 徐玉林[1] 潘志军[2] 王金福[1]

[1](浙江大学生命科学学院 杭州 310058)

[2](浙江大学附属第二医院)

[3](浙江大学附属第一医院)

摘 要 通过模拟来研究微重力对 hMSC 向成骨细胞分化的影响，并利用相关信号通路的激活剂或抑制剂来调节这一分化过程. 研究结果表明，在成骨细胞分化诱导条件下，微重力降低了 hMSC 向成骨细胞定向分化的能力，并且成骨细胞标记性基因的表达明显降低， Runt 相关转录因子 2 (Runx2) 的表达受到抑制. 相反, 过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPARγ2) 的表达则增加. 同时，微重力也降低了 ERK 的磷酸化水平, 而增加了 p38MAPK 的磷酸化水平. 使用 p38MAPK 的抑制剂 SB203580 能够抑制 p38MAPK 的磷酸化，但不能降低 PPARγ2 的表达水平. 骨形态发生蛋白 (BMP) 能增加 Runx2 的表达水平. 成纤维细胞生长因子 2 (FGF2) 增加了 ERK 的磷酸化水平，但也不能显著增加成骨细胞标记性基因的表达水平. 采用 BMP, FGF2 和 SB203580 三种因子组合来调控微重力下的成骨细胞分化能力，结果表明三者的协同作用能显著逆转微重力对成骨细胞定向分化的生物学效应. 研究结果还说明，模拟微重力应该是通过不同的细胞信号通路来抑制成骨细胞分化和提升脂肪细胞分化的.

关键词 脂肪形成；人骨髓间充质干细胞；微重力；成骨形成；信号通路

中图法分类号 V 524

Analysis of Effects of Simulated Microgravity on Signaling Pathways Involved in Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells

HUANG Guoping[1] ZHENG Qiang[2] YANG Jinfeng[1] GUO Chunjuan[1]
SHEN Dan[3] SHI Dongyan[1] XU Yulin[1] PAN Zhijun[2] WANG Jinfu[1]

[1](*Department of Cell Biology, College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou* 310058)

[2](*The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University*)

[3](*The First Affiliated Hosptial, Zhejiang University*)

Abstract Microgravity (MG) results in reduction of bone formation. Bone formation is bound up with osteogenic differentiation from human mesenchymal stem cells (hMSC) in bone marrow. We

* 国家自然科学基金项目 (30671071), 浙江省重大科技计划项目 (2006C13022) 和浙江省医学重点学科医学组织工程学项目共同资助
2007-08-22 收到原稿， 2007-10-09 收到修定稿

simulated MG to determine its effects on osteogenesis of hMSC and used activators or inhibitors of signaling factors to modulate osteogenic differentiation. Under osteogenic induction, MG reduceds osteogenic differentiation of hMSC and decreaseds the expression of osteoblast gene markers. The expression of Runx2 was likewise inhibited. However, the expression of PPARγ2 increased. MG also decreased phosphorylation of ERK, but increased phosphorylation of p38MAPK. SB203580, a p38MAPK inhibitor, was able to inhibit the phosphorylation of p38MAPK, but not able to reduce the expression of PPARγ2. Bone morphogenetic protein (BMP) increased the expression of Runx2. Fibroblast growth factor 2 (FGF2) increased the phosphorylation of ERK, but did not increase significantly the expression of osteoblast gene markers. The combination of BMP, FGF2 and SB203580 significantly reversed the effect of MG on osteogenic differentiation of hMSC. Our results suggests that simulated MG inhibits the osteogenic differentiation and increases the adipogenic differentiation of hMSC through different signaling pathways. Therefore the effect of MG on the differentiation of hMSC could be reversed by the mediation of signaling pathways.

Key words Adipogenesis, Human mesenchymal stem cells, Microgravity, Osteogenesis, Signaling pathways

1 引言

在空间飞行期间微重力会引起骨质疏松. 脊柱、颈部股骨、转节及盆骨处平均每月的骨质密度丢失 (BMD) 为 1.0%~1.6%. 而整个身体和腿部每月的骨量损失为 0.3%~0.4%[1]. 在空间飞行 6 个月会引起跟骨宽频超声衰减值降低 13.2%, 网状胫骨和骨皮质的含量分别减少 4.5% 和 2.9%[2]. 因此, 预防和治疗骨丢失, 并为宇航员创造一个更加健康的生活显得十分重要. 重力和机械负荷是成骨细胞形成、分化以及维持骨骼组织的重要因素. 机械负荷可以通过与细胞表面整合素结合的细胞外基质 (ECM) 来激活黏着斑激酶 (FAK) 和 MAPK 信号通路的分支 MEK/ERK 通路 [3]. ERK 可以调节成骨细胞的形成与分化相关的基本转录因子 Runx2 活性 [4].

人骨髓间充质干细胞 (hMSC) 是成人骨髓中的一类多能干细胞. 它具有增殖和分化为不同间充质组织的潜能, 例如分化为骨、软骨、脂肪、肌肉和骨髓基质 [5]. 在正常重力作用下, hMSC 可以在特定诱导条件下分化为成骨细胞 [6]. 周期性的应变力可增强这一作用 [7]. 然而, 模拟的微重力抑制了 hMSC 向成骨细胞分化, 并促进向脂肪细胞分化 [8]. 在微重力影响下, 过氧化物酶体增殖激活受体 (PPARγ2) 和其他一些与脂肪细胞形成相关蛋白质的高表达会抑制 Runt 相关转录因子 2 (Runx2) 的表达. 此外, 微重力会降低 ERK 磷酸化水平, 增强 p38MAPK 的磷酸化水平, 而 ERK 可以调节 Runx2 的表达. p38MAPK 和 PPARγ2 的活化与 Runx2 表达的抑制对 hMSC 分化为脂肪细胞来说是很重要的 [9].

这些发现促使我们去考虑微重力是怎样抑制 ERK/Runx2 信号通路和激活 p38MAPK/PPARγ2 信号通路的. 是不是可以在微重力存在的情况下, 通过干扰成骨形成和脂肪形成相关的信号分子来调节 hMSC 的成骨细胞或脂肪细胞分化能力? 可以通过分析微重力下 hMSC 分化为成骨细胞和脂肪细胞的潜力, 并应用抑制剂或激活剂干扰信号通路来调节分化过程, 从而研究提高宇航员体内成骨形成和降低骨量流失的可能性.

2 材料与方法

2.1 hMSC 的分离与培养

骨髓由浙江第一人民医院提供. 供者为平均年龄 25 岁 (21~29 岁) 的健康成人. hMSC 的分离与培养是在先前所报道的方法上稍加修改 [10]. 简单地说就是把细胞悬液用磷酸缓冲液 (PBS) 1:1 稀释到 6 mL 后加入到 3 mL 人淋巴细胞分离液中. 900 g 离心 25 min 后, 可从梯度界面中获得单个核细胞层, 并用 PBS 洗涤. 再将细胞在 900 g 离心 6 min 后用完全培养液 (α-MEM 、10% 胎牛血清、每毫升 100 单位青霉素、每毫升 100 μg 链霉素、 2 mmol L-谷氨酰胺) 重悬. 细胞以每平方厘米 1×10^6 个细胞的密度接种于 25 cm^2 的培养瓶中, 在 37°C 、 5%

的 CO_2 中培养. 48 h 后，未贴壁细胞被吸掉，贴壁细胞用 PBS 洗 2 次. 每 3~4 天换上新鲜的培养液. 大概 14 天细胞便能达到 70%~90% 的融合. 然后用含 0.25% 胰酶的 EDTA 消化，并以 1:3 稀释传代. 所分离得到的 hMSC 具有分化多潜能性，并表现为 CD44, CD29, CD90, CD166, SH2 和 SH3 阳性， CD34, CD45 和 CD117 阴性 [11], 这与人间充质干细胞表面抗原一致. 研究中所采用的细胞为 3 代和 4 代细胞.

2.2 微重力下的细胞培养和分化

把收集到的 hMSC 接种于塑料微载体上，用含 10% 胎牛血清的 DMEM 于低粘附培养板中培养 7 天. 89.4%±2.8% 的细胞成功贴附在微载体上. 然后在模拟微重力下将塑料微载体上的 hMSC ($n = 5$) 用成骨诱导液在 RWV 生物反应器 (Model HARV) 中诱导培养 14 天. 该生物反应器以 16 r/min 的转速转动，致使里面的细胞-磁珠体聚集并悬浮. 同时也将该接种有细胞的微载体于正常重力 ($1\,g$) 下在 100 mm 的培养板中诱导，作为对照. 成骨诱导液为含有 10% 胎牛血清、 50 nmol 地塞米松、 10 mmol β-磷酸甘油和 50 μmol 2-磷酸化抗坏血酸的 DMEM. 为了激活或者抑制信号因子，接种在塑料微载体上的细胞在诱导前先血清饥饿 12 h，再用抑制剂或激活剂预处理 2 h. 然后在模拟微重力下用加有抑制剂或激活剂的成骨诱导液进行诱导. 抑制剂和激活剂包括 10^{-6} mol/L SB203580, 100 ng/mL BMP-2, 20 ng/mL FGF2. 细胞在不加抑制剂或激活剂条件下的诱导作为对照. 为检测其分化为成骨细胞或脂肪细胞的潜能，我们用含 0.25% 胰酶的 EDTA 消化分离微珠上的诱导细胞，然后接种到孔板中孔直径为 3.5 cm 的培养板中，用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养. 培养 6~7 天后用改良 Gomori 钙钴法或用油红 O 染色诱导的细胞. ALP 的活性用 pNP 比色法在 Olympus AU2700 化学免疫分析仪上检测，脂滴积累值依据 Green 和 Kehinde 方法进行检测 [12]. 每 3 天更换一次培养液，在微重力下培养 14 天后提取 mRNA 和蛋白质.

2.3 RNA 提取与反转录 PCR

利用 RNeasy 试剂盒提取总 RNA，并用凝胶电泳检测 RNA 的含量. 取 1 μg 总 RNA，用随机引物和反转录试剂盒合成 cDNA. PCR 聚合酶为 Taq DNA 聚合酶. 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 45 s, 60°C 延伸 60 s, 共循环 30 次. PCR 引物如下：碱性磷酸酶 ALP, A-1 (正向) 5′-CCA TTC CCA CGT CTT CAC ATT-3′ 和 5′-AAG GGC TTC TTG TCT GTG TCA CT-3′, 可扩增出 96 bp 条带； Runx2, B-1 (正向) 5′-GAT GAC ACT GCC ACC TCT GAC TT-3′ 和 5′-AAA AAG GGC CCA GTT CTG AAG-3′, 可扩增出 88 bp 条带； COL IA1, 5′-GAG ACT GTT CTG TTC CTT GTG TAA CTG T-3′ 和 5′-TGC CCC GGT GAC ACA TC-3, 可扩增出 95 bp 条带；骨粘连蛋白 (osteonectin), 5′-CCT CCT TTA CCT TTC AGT GCA GTT-33′ 和 5′-CAG TCC GTG CTC CCA AAA GT-3′, 可扩增出 71 bp 条带；骨钙蛋白 (osteocalcin), 5′-CGC AGC CAC CGA GAC ACC AT-3′ 和 5′-GGG CAA GGG CAA GGG GAA GA-3′, 可扩增出 405 bp 条带； PPARγ2, 5′-AAA CTC TGG GAG ATT CTC CT-3′ 和 5′-TCT TGT GAA TGG AAT GTC TT-3′, 可扩增出 248 bp 条带；降脂蛋白 (adipsin), 5′-CAA GCA ACA AAG TCC CGAGC-3′ 和 5′-CCT GCG TTC AAG TCA TCC TC-3′, 可扩增出 258 bp 条带；瘦蛋白 (leptin), 5′-GTG CGG ATT CTT GTG GCT TT-3′ 和 5′-GGA ATG AAG TCC AAA CCG GTG-3′, 可扩增出 174 bp 条带； β-actin, 5′-GGC GAC GAG GCC CAG A-3′ 和 5′-CGA TTT CCC GCT CGG C-3′, 可扩增出 463 bp 条带. 扩增后产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳，再用 ImageQuant 分析软件 (Version 5.0) 进行分析. 每个基因的检测值与对照基因 (肌动蛋白) 的比值即为其相对表达值.

2.4 蛋白质的制备与免疫印迹

细胞用预冷的、含蛋白酶抑制剂和 1 mmol 原钒酸钠的 RIPA 缓冲液 (50 mmol Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol NaCl, 1% NP-40 、 0.5% 脱氧胆酸、 0.1% SDS) 裂解. 裂解液在 4°C 下 14 000 r/min (13 000 g) 离心 30 min, 得到的蛋白质沉淀用 DC Protein Assay kit 进行分析. 总蛋白质 (每个泳道 20 μg) 用 SDS-PAGE 分离，并转移到 PVDF 膜上. 先加入一抗温育，再加入结合有过氧化物酶的抗免第二抗体，然后用化学放光法显色. 采用的抗体有 Erk1/2, P-Erk1/2, p38, P-p38 和 Ras.

利用沉淀实验分析 Ras 活性是在 Busca等 [13] 所描述的方法上稍作修改进行的. 细胞裂解同上，裂解产物离心后取上清与含 30 μg GST 融合蛋白的谷胱苷肽-琼脂糖微珠共同培养. 采用 Herrmann等 [14] 使用的方法获得 GST-B-Raf RBD 来检测 Ras-GTP.

在 4°C 下培养 2 h 后，用 RIPA 缓冲液洗涤微珠 3 次，再用 Laemmli 缓冲液重悬后煮沸. 所获样品用 SDS-PAGE (12.5%) 分离后转移到 PVDF 膜上. 再按照上述方法，利用 Ras 抗体检测总 Ras 和活性 Ras.

2.5 统计学分析

实验结果用平均值 ±SEM 表示, 并用 Student's t-test 进行统计学比较.

3 研究结果

3.1 模拟微重力对 hMSC 分化为成骨细胞的效应

为了研究微重力对 hMSC 分化为成骨细胞的效应，我们用成骨细胞诱导液分别在模拟微重力和正常重力条件下诱导 hMSC 14 天, 然后用改良 Gomori 钙钴法对诱导细胞进行染色，如图 1(a) 所示. 在正常重力下诱导细胞呈典型的立方体状，且表达碱性磷酸酶 (ALP). 在模拟微重力下诱导细胞则表达低水平的 ALP. 如图 2(a) 所示，对硝基苯酚比色分析显示在正常重力下的诱导细胞中 ALP 活性明显高于模拟微重力下的诱导细胞 ($P < 0.01$). 通过油红 O 染色可见在微重力诱导下的细胞有脂滴的积累，如图 1(b) 所示，其 OD 值为 0.08 ± 0.02, 但在正常重力下则没有检测到 (见表 1). 这说明在正常重力下，hMSC 可成功诱导分化为成骨细胞，而在模拟微重力下成骨细胞分化的潜能降低，脂肪细胞分化的潜能增强.

为了验证组织化学观测结果，我们检测了正常重力和模拟微重力下诱导细胞的 ALP 、 I 型胶原 (COL1)、骨钙蛋白 (OC)、骨粘连蛋白 (ON)、降脂蛋白 (adipsin) 和瘦蛋白 (leptin) mRNAs 的表达，如图 3(a) 和 3(b) 所示. 结果显示在模拟微重力作用下，成骨细胞特异性基因的表达受到抑制，而脂肪细胞特异性基因的表达上升 (见表 2).

还检测了正常重力和模拟微重力下诱导细胞的 Runx2 和 PPARγ2 mRNA 的表达. 如图 3(c) 所示, 在模拟微重力下 Runx2 基因的表达受到抑制，PPARγ2 基因的表达则增强 (见表 2). Runx2 和 PPARγ2 可分别调节 hMSC 分化为成骨细胞和脂肪细胞. Runx2 和 PPARγ2 的活化受 MAPK 信号通路的调控, 因此还检测了模拟微重力对活化 MAPK 信号通路的影响. 图 3(d) 和图 3(e) 显示模拟微重力诱导的细胞中， ERK 和 p38 的总表达水平没有改变，但对活化的 MAPK 磷酸化检测时显示 ERK 磷酸化水平降低， p38 磷酸化水平升高. Runx2 和 PPARγ2 mRNA 表达的改变以及 MAPK 磷酸化水平的变化说明, 模拟微重力可通过降低 Runx2 的表达水平和活性来抑制 hMSC 分化为成骨细胞，提高 PPARγ2 的表达水平和活性来促进 hMSC 分化为脂肪细胞. 上述结果与 Zayzafoon 等的研究结果 [8] 是一致的.

表 1 诱导细胞中脂肪泡积累的 OD 值
Table 1 OD values of lipid vacuole accumulation

treatment	OD
G	0
MG	$0.08 \pm 0.02^*$
MG	0.07 ± 0.03
MG+S	0
MG	0.07 ± 0.02
MG+B	0.06 ± 0.03
MG	0.09 ± 0.04
MG+F	0.07 ± 0.03
MG	$0.07 \pm 0.02^*$
MG+SBF	0

注 S: SB203580. B: BMP-2. F: FGF2. SBF: SB203580 + BMP-2 + FGF2. 诱导细胞中脂肪泡积累 OD 值的差异: $^*P < 0.01$.

3.2 模拟微重力下细胞信号调节对 hMSC 分化的影响

为了研究细胞信号的调节能否逆转模拟微重力对 hMSC 向成骨细胞分化的效应，我们采用 BMP, FGF2, SB203580 及其组合来干涉细胞信号通路.

hMSC 在经过血清饥饿和预处理后加入含有 p38 抑制子 SB203580 的成骨分化诱导液，在模拟微重力下培养 14 天. 图 1(c) 显示，在模拟微重力下 SB203580 不能促进 hMSC 分化成骨细胞，图 2(b) 和图 1(c) 显示，细胞中 ALP 活性水平与不加 SB203580 的成骨诱导液诱导的细胞相比没有显著差异 ($P > 0.05$), 但是 SB203580 能抑制脂肪细胞分化. 在不加 SB203580 的成骨诱导液诱导的细胞中可检测到有脂滴积累，而在加 SB203580 的成骨诱导液诱导的细胞中则未检测到 (见表 1). 这些结果说明 SB203580 可以抑制 p38 的磷酸化，最终降低脂肪细胞标记性基因的表达，如图 3(f), 图 3(g) 和表 2 所示. RT-PCR 结果显示 Runx2 和 PPARγ2

mRNA 的表达水平与不加 SB203580 的成骨诱导液培养的细胞没有显著差异，如图 3(h) 和表 2 所示.

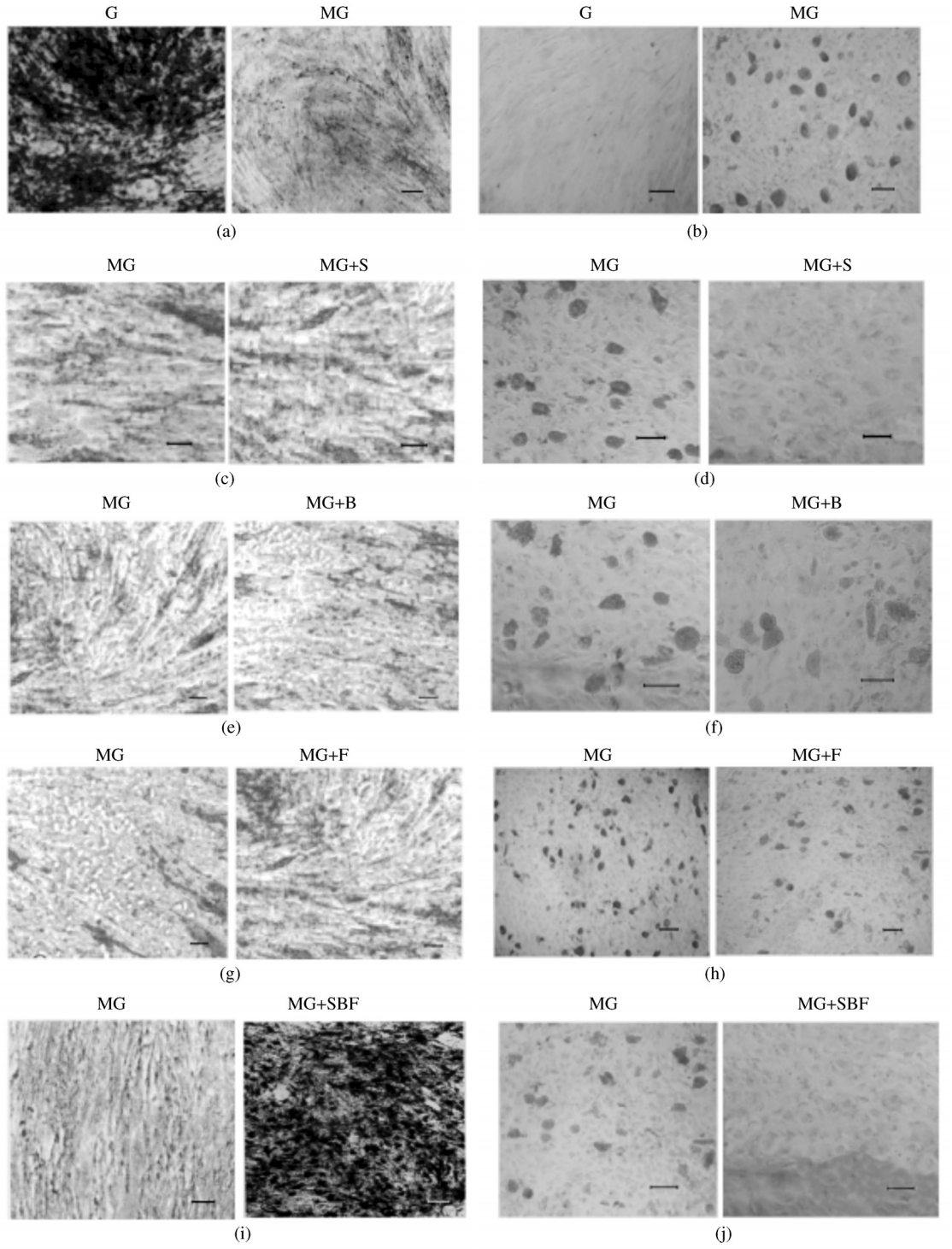


图 1 模拟微重力对 hMSC 分化为成骨细胞和脂肪细胞的效应 (S: SB203580. B: BMP-2. F: FGF2. SBF: SB203580 + BMP-2 + FGF2)

Fig.1 Effects of modeled microgravity on osteogenesis and adipogenesis of hMSC

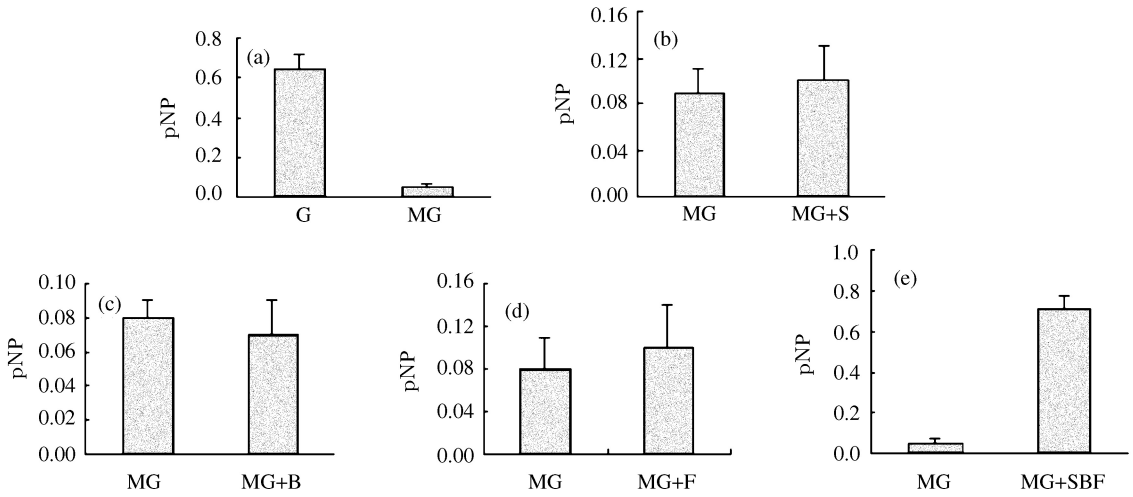


图 2 诱导细胞中 ALP 的活性水平 (pNP/ 每分钟 10^6 个细胞.
S: SB203580. B: BMP-2. F: FGF2. SBF: SB203580 + BMP-2 + FGF2)
Fig.2 Activity levels of ALP in induced cells

表 2 成骨细胞标志性基因 Runx2 和脂肪细胞标记性基因 PPARγ2 的相对表达水平

Table 2 Expression levels of osteoblast and adipocytic gene markers, Runx2 and PPARγ2

	ALP	COL1	OC	ON	adipsin	leption	Runx2	PPARγ2
G	$0.85 \pm 0.09^{**}$	$1.09 \pm 0.14^{**}$	$1.58 \pm 0.21^{**}$	$0.55 \pm 0.04^{**}$	$0.07 \pm 0.02^{**}$	$0.05 \pm 0.01^{**}$	$1.06 \pm 0.22^{*}$	$0.02 \pm 0.01^{*}$
MG	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02	1.64 ± 0.15	0.68 ± 0.08	0.05 ± 0.02	0.72 ± 0.17
MG					$0.67 \pm 0.08^{**}$	$0.95 \pm 0.10^{**}$	0.07 ± 0.02	1.01 ± 0.19
NG+S					0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.04	1.03 ± 0.25
MG	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01			$0.06 \pm 0.02^{**}$	
MG+B	0.09 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02			1.12 ± 0.11	
MG	0.06 ± 0.02	0.15 ± 0.05	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.01				
MG+F	0.06 ± 0.01	0.16 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.02				
MG	$0.05 \pm 0.02^{**}$	$0.04 \pm 0.02^{**}$	$0.05 \pm 0.03^{**}$	$0.06 \pm 0.02^{*}$				
MG+SBF	0.91 ± 0.11	1.35 ± 0.09	1.05 ± 0.13	0.71 ± 0.05				

注 S: SB203580. B: BMP-2. F: FGF2. SBF: SB203580 + BMP-2 + FGF2.
诱导细胞中相关基因表达水平的差异: $^{*}P < 0.01$, $^{**}P < 0.05$.

在 hMSC 诱导分化过程中加入 BMP-2, 图 3(i), 图 1(e) 和表 2 表明, 它可以提高 Runx2 mRNA 的表达, 但不能逆转模拟微重力对 hMSC 分化为成骨细胞的效应. 图 2(c) 显示, 加 BMP-2 的成骨诱导液所诱导的细胞中 ALP 活性与不加 BMP-2 的成骨诱导液所诱导的细胞相比没有显著差异 ($P > 0.05$). 图 3(j) 和表 2 的 RT-PCR 结果显示, 成骨细胞特异性基因的表达水平与不加 BMP-2 的成骨诱导液所诱导的细胞相比没有显著差异. 此外, 图 1(f) 和表 1 显示, 模拟微重力下 BMP-2 不能降低 hMSC 向脂肪细胞分化的分化潜能, 在加和不加 BMP-2 的两种诱导体系中脂滴积累的 OD 值也没有显著差异 ($P > 0.05$).

FGF2 是体内影响骨骼发育与生长的一个重要调节因子. 将 hMSC 在含有 FGF2 的成骨诱导液中培养 14 天后通过沉降实验检测 FGF2 对 Ras 活性的影响, 结果如图 3(k) 所示, FGF2 可促进 Ras 的活性. 此外, 图 3(l) 所示的免疫印迹的结果证明, FGF2 可以提高模拟微重力下诱导细胞的 ERK 磷酸化水平, 但从图 3(m) 和表 2 可以看出, 其成骨细胞特异性基因的表达与不加 FGF2 的成骨诱导液所诱导的细胞没有显著差异. 图 1(g) 和图 2(d) 显

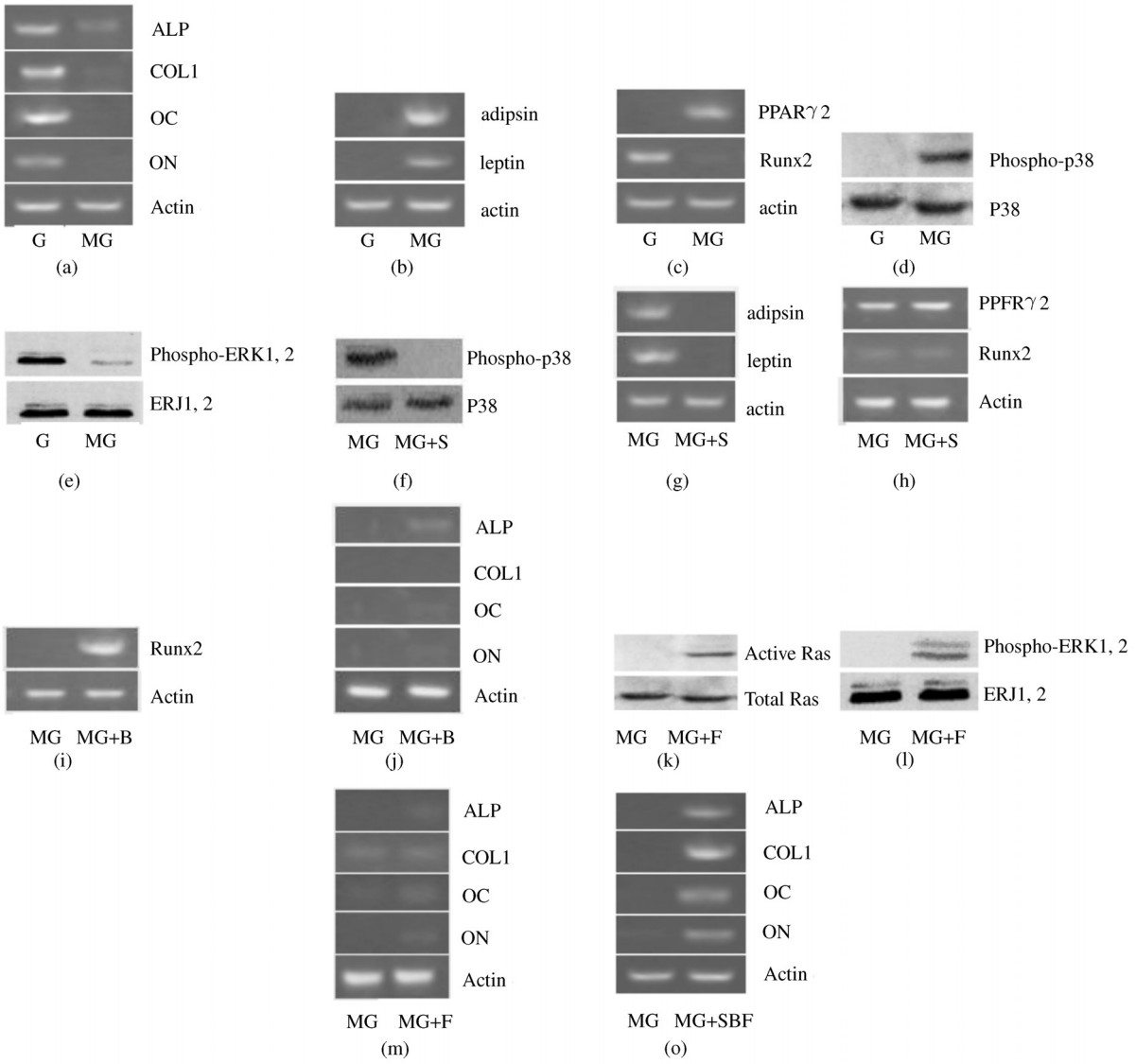


图 3 SB203580 (S), BMP (B), FGF2 (F) 及三者的协同作用对 ALP, COL1, OC, ON, adipsin, leptin, Runx2 和 PPARγ2 的 mRNA 表达以及 ERK, p38 和 Ras 蛋白活性的影响

Fig.3 Effects of SB203580 (S), BMP (B), FGF2 (F) and their combination on the expression of ALP, COL 1, OC, ON, adipsin, leptin, Runx2 and PPARγ2 mRNA and on the activity of ERK, p38 and Ras

示，在模拟微重力下 FGF2 不能显著提高诱导细胞中 ALP 的活性 ($P > 0.05$), 图 1(h) 和表 1 显示，其也不能抑制 hMSC 分化为脂肪细胞 ($P > 0.05$).

上述结果表明虽然每个信号抑制剂和激活剂都可以影响 Runx2 或 PPARγ2 的表达和活化，但不能完全逆转模拟微重力对 hMSC 分化为成骨细胞的影响. 于是我们在成骨诱导液中同时添加 SB203580, BMP-2 和 FGF2 这三个因子，培养 14 天. 图 3(o) 显示三者的协同作用提高了成骨细胞特异性基因的表达 (见表 2). 诱导细胞从微珠上分离和消化后，用普通的培养液在培养板上培养 6~7 天. 然后用组织化学方法检测 ALP 活性，如图 1(i) 所示. 图 2(e) 显示，联合诱导的细胞中 ALP 活性明显高于不加这三种因子的诱导液所诱导的细胞 ($P < 0.01$). 同时，模拟微重力下 hMSC 向脂肪细胞的分化能力被这三个因子的协同作用所抑制. 脂滴积累在没有加这些因子的成骨诱导中可以检测到 (见表 1), 图 1(j) 则显示出，在同时加有这三个因子的诱导中未检测到脂滴积累. 这些结果证明 SB203580, BMP-2 和 FGF2 的协同作用可以有效逆转模拟微重力对 hMSC 分化成骨细胞的效应.

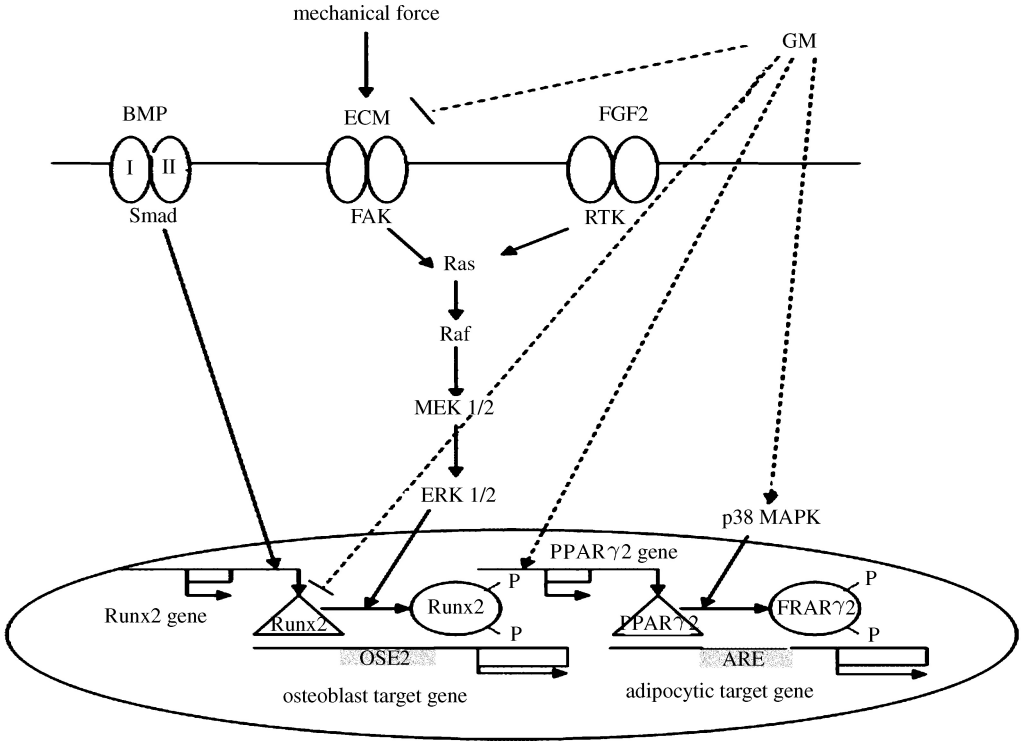


图 4 模拟微重力下与 hMSC 分化为成骨细胞相关的信号通路

Fig.4 Signaling pathways of osteogenesis of hMSC under modeled microgravity

4 讨论

微重力会改变细胞的一些性质, 包括细胞骨架, 凋亡速率和细胞对环境的反应. 在微重力条件下, 细胞骨架的所有组成成分, 包括微管 (MT)、中间纤维 (IF) 和微丝 (MF) 会变得紊乱, 适应一段时间后 (20~72 h) 又会重新组织, 但难以恢复之前的构型 [15]~[17]. 在这个过程中, 细胞凋亡也会受到影响. 这种不正常的构型可能会引起细胞过早凋亡, 或在该凋亡的时间却不凋亡 [18]. 微重力环境下基因表达的改变可能会引起细胞性质的改变. Hammond 等 [19] 发现人肾脏细胞中 1632 多个基因在微重力环境的表达发生了变化, 包括黏附分子、凋亡基因、细胞骨架蛋白、分化调节因子、药物代谢蛋白、选择性热击蛋白、细胞内信号蛋白、受体、转录因子和电子传递链的组成成分的变化.

机械负荷在调节骨内环境稳定和骨发育, 以及维持骨密度和骨强度过程中起着很重要的作用. 机械作用在很多细胞上都做过研究, 如上皮细胞、成纤维细胞、软骨细胞和成骨细胞 [20]. 在机械作用下形成的成骨细胞中, 骨桥蛋白、骨钙蛋白和骨胶原 I/Ⅲ mRNA 的表达水平上升 [21]~[22]. 相反, 如果人和动物的骨骼缺少负荷, 例如太空飞行中受到微重力影响, 会引起骨骼异常, 如骨量减少、骨形成能力降低 [23]~[24]、矿化减少 [25] 和骨强度降低 [26]. 但是细胞感知微重力信号并作出相应反应的机制在很大程度上还有待于进一步研究. Zayzafoon 等 [8] 证明, 短期的模拟微重力 (7 天) 可降低骨生长和矿化作用. 同时, 在 hMSC 分化为成骨过程中, 模拟微重力可以完全抑制 Runx2 的表达, 并增强 PPARγ2 表达, 我们的实验结果与上述研究成果一致. Runx2 表达降低和 PPARγ2 表达升高使得降脂蛋白和瘦蛋白 mRNA 的表达升高, 而 ALP, COL1, OC 和 ON mRNA 的表达降低, 这表明模拟微重力可刺激 hMSC 分化为脂肪细胞胜过分化为成骨细胞.

MAPK 通路是动力传导过程中一个主要的信号转导级联. 整合蛋白的作用是将细胞骨架连接到细胞外基质, 它可以调节很多细胞信号级联, 并且还能将机械刺激转换成生化信号 [3]. MacKenna 等 [27] 曾证实机械刺激可以活化 ERK2 但不能活化 p38, 并且活化过程中需要两种整合蛋白, $\alpha_4\beta_1$ 和非 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白及细胞外基质 (纤维连接蛋白) 的存在. 同

样，在 α_2 和 β_1 整合蛋白存在时使用机械压力处理成骨细胞也可以活化 MAPK[28]. Ziros 等 [29] 的实验说明，在人牙周膜细胞中 Runx2 可能是机械信号作用的靶信号分子. 若对牙周膜细胞施加低水平的连续机械牵张，就可以显著地促进 Runx2 结合到 OSE2 DNA 上，同时 Runx2 mRNA 和蛋白质的表达水平也有轻微的上升. 另外，由牵张力诱导提高 Runx2 结合 DNA 活性可被 U0126 (ERK1/2 活化的特殊抑制剂) 所逆转. 牵张力活化的 ERK 与 Runx2 相互作用，可使 Runx2 磷酸化. Wang 等 [30] 证实在人和鼠的骨髓基质细胞中，ERK 的活化和 Runx2 的磷酸化都需要机械信号的刺激. 体外震波碎石术是一种可以提高骨生长和腱修复的无损伤方法，它可以促进基质细胞的扩增及向成骨细胞的分化. 用最佳的体外震波碎石术处理骨髓基质细胞可以促进 [^{3}H]- 胸腺嘧啶掺入到 DNA 中，也可以提高碱性磷酸酶的活性及 OC 基因的表达和骨结的形成. 让人特别感兴趣的是，体外震波碎石术虽然不能改变 Runx2 的蛋白质水平，但却可以显著地促进 ERK 依赖的 Runx2 磷酸化作用. 由此可见，机械压力可以调节成骨细胞的增殖和分化，同时也能通过 MAPK 依赖的 Runx2 磷酸化作用调节骨形成.

我们的结果与之前的研究成果 [8] 相似，模拟的微重力不但可以抑制 Runx2 mRNA 的表达，也可以降低 ERK 的磷酸化程度，这最终导致 Runx2 活性的降低和它的靶基因 COL1 和 OC 表达的减少. 同时，模拟微重力可以提高 p38MAPK 的磷酸化水平，从而使 PPARγ2 的活性和它的靶基因降脂蛋白和瘦蛋白基因表达得以增强. 为了调节与多信号转导通路相关的 Runx2 和 PPARγ2[3], 我们在微重力条件下成骨细胞诱导过程中添加 SB203580, BMP-2 和 FGF2 来调节 hMSC 分化相关的信号通路. SB203580 是 p38MAPK 的抑制剂，可以降低 p38MAPK 的磷酸化水平. 虽然 SB203580 不能降低 PPARγ2 mRNA 的表达，但可以减少脂肪细胞特异性基因的表达. 由此可见，模拟微重力可能通过一条未知的、与 p38MAPK 不同的信号通路来提高 PPARγ2 的表达 (见图 4).

BMP-2 在 Smad 通路的活化过程中起着重要的作用. 它可以在模拟微重力下提高 Runx2 mRNA 的表达，但不能逆转模拟微重力对 hMSC 分化为成骨细胞的影响. FGF2 是一个通过活化自身受体上的受体酪氨酸激酶 (RTK) 来激活 Ras 信号通路的激活剂，它可以提高 ERK 的磷酸化水平，但不能明显提高成骨细胞特异性基因的表达. 因此，模拟微重力对 hMSC 分化的效应可归因为 ERK 活性和 Runx2 mRNA 水平的同时降低，以及 p38MAPK 活性和 PPARγ2 mRNA 水平的同时升高. SB203580, BMP-2 和 FGF2 的联合作用可完全逆转模拟微重力对 hMSC 分化为成骨细胞的影响. 在这种协同作用下，成骨细胞特异性基因的表达明显高于非协同作用下的水平. 然而，我们还需要进一步的研究来解答以下问题：在模拟微重力下，①是什么信号通路与 PPARγ2 mRNA 水平的提高和 Runx2 mRNA 水平的降低有关，②除了 Ras 通路外是否还有另外的未知通路影响 ERK 的磷酸化，③什么信号通路与 p38MAPK 的磷酸化有关.

对于微重力效应下 hMSC 分化为成骨细胞的信号通路研究，目前所做的工作还只是一个开始. 虽然我们的结果显示模拟微重力可以调节 MAPK 的活性 (ERK 和 p38) 以及与成骨和脂肪细胞分化相关的转录因子 (Runx2 和 PPARγ2) 的表达，但是模拟微重力下与 hMSC 分化方向转换相关的一些交叉信号通路还需要做进一步研究. 利用抑制剂和激活剂的联合作用来逆转模拟微重力对 hMSC 分化为成骨细胞的效应，为将来宇航员治疗骨骼异常提供了研究模型.

致射：感谢生物制药工程和生物仪器学院的杨永博士在模拟微重力仪器上所给予的帮助.

参考文献

[1] LeBanc A. Summary of research issue in human studies. *Bone*, 1998, **22**:117~118

[2] Collet P, Uebelhart D, Vico L, Hartmann D, Roth M, Alexandre C. Effects of 1- and 6-month spaceflight on bone mass and biochemistry in two humans. *Bone*, 1997, **20**:547~551

[3] Franceschi R T, Xiao G Z. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J. Cell. Biochem.*, 2003, **88**:446~454

[4] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall A L, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, **89**:747~754

[5] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, Moorman M A, Simonetti D W, Craig S, Marshak D R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, **284**:143~147

[6] Phinney D G, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop D J. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.*, 1999, **75**:424∼436

[7] Simmons C A, Matlis S, Thornton A J, Chen S, Wang C Y, Mooney D J. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *J. Biomech.*, 2003, **36**:1087∼1096

[8] Zayzafoon M, Gathings W E, McDonald J M. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis. *Endocrinology*, 2004, **145**:2421∼2432

[9] Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman E J, Kajkenova O, Lipschitz D A, Manolagas S C, Jilka R L. Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARγ2. *J. Cell. Biochem.*, 1999, **74**:357∼371

[10] Digirolamo C M, Stokes D, Colter D, Phinney D G, Class R, Prockop D J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Brit. J. Haematol.*, 1999, **107**:275∼281

[11] Qiu L Y, Wang J F, Shen D, Jin J. Expansion and chondrogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Zhejiang Univ.*, 2004, **31**:337∼342

[12] Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 1975, **5**:19∼27

[13] Busca R, Abbe P, Mantoux F, Aberdam E, Peyssonnaux C, Eychene A, Ortonne J P, Ballotti R. Ras mediates the camp-dependent activation of extrancellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO J.*, 2000, **19**:2900∼2910

[14] Herrmann C, Martin A G, Wittinghofer A. Quantitative analysis of the comples between $p21^{ras}$ and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**:2901∼2905

[15] Uva B M, Masini M A, Sturla M, Prato P, Passalacqua M, Giuliani M, Tagliafierro G, Strollo F. Clinoration-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture. *Brain Res.*, 2002, **934**:132∼139

[16] Sundaresan A, Riain D, Pellis N R. Loss of signal transduction and inhibition of lymphocyte locomotion in a ground-based model of microgravity. *Vitro Cell Dev. Biol. Animal.*, 2002, **38**:118∼122

[17] Gaboyard S, Blachard M P, Travo B T, Viso M, Sans A, Lehouelleur J. Weightlessness affects cytoskeleton of rat utricular hair cells during maturation in vitro. *Neuro. Report.*, 2002, **13**:2139∼2142

[18] Zahir N, Weaver V M. Death in the third dimension. *Cur. Opin. Gen. Dev.*, 2004, **14**:71∼80

[19] Hammond T G, Benes E, O'reilly K C, Wolf D A, Linnehan R M, Taher A, Kaysen J H, Allen P L, Goodwin T J. Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle. *Physiol. Genom.*, 2000, **3**:163∼173

[20] Banes A J, Tsuzaki M, Yamamoto J, Fischer T, Brigman B, Brown T, Miller L. Mechanoreception at the cellular level: The detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem. Cell Biol.*, 1995, **73**:349∼365

[21] Harter L V, Hruska K A, Duncan R L. Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. *Endocrinology*, 1995, **136**:528∼535

[22] Carvalho R S, Schaffer J L, Gerstenfeld L C. Osteoblasts induce osteopontin expression in response to attachment on fibronectin: Demonstration of a common role for integrin receptors in the signal transduction processes of cell attachment and mechanical stimulation. *J. Cell. Biochem.*, 1998, **70**:376∼390

[23] Morey E R, Baylink D J. Inhibition of bone formation during space flight. *Science*, 1978, **201**:1138∼1141

[24] Wronski T J, Morey E R. Recovery of the rat skeleton from the adverse effects of simulated weightlessness. *Met. Bone Dis. Rel. Res.*, 1983, **4**:347∼352

[25] Turner R T. Invited review: what do we know about the effects of spaceflight on bone. *J. App. Physiol.*, 2000, **89**:840∼847

[26] Spengler D M, Morey E R, Carter D R, Turner R T, Baylink D J. Effects of spaceflight on structural and material strength of growing bone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1983, **174**:224∼228

[27] MacKenna D A, Dolfi F, Vuori K, Ruoslahti E. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH_2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrindependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, 1998, **101**:301∼310

[28] Schmidt C, Pommerenke H, Durr F, Nebe B, Rychly J. Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**:5081∼5085

[29] Ziros P G, Gil A P, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra E K, Papavassilious A G. The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**:23 934∼23 941

[30] Wang F S, Wang C J, Sheen-Chen S M, Kuo Y R, Chen R F, Yang K D. Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**:10 931∼10 937