骨髓间充质干细胞成骨分化过程中关键信号通路的调控作用*

张莉¹综述,张波^{2△},刘鲁川^{1△}审校(1. 第三军医大学大坪医院口腔科,重庆 400042; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所,重庆 400042)

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 信号通路

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.24.049 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)24-3491-02

利用组织工程技术在人体内形成稳定的组织工程化骨组织并修复骨缺损,克服了传统方法中的不足,有望真正实现骨组织再生和功能重建^[1]。种子细胞是组织工程研究中最基本,也是首要的环节。骨髓间充质干细胞(BMSCs)是一种未充分分化的类中胚层细胞,可在一定条件下定向分化为成骨细胞。作为骨组织工程的种子细胞之一,具有取材方便、对机体损伤小、免疫源性小等优点。已有的分子和遗传学研究表明,BMSCs 成骨分化及成骨细胞分化成熟及矿化过程中,多种信号通路参与调节,并最终汇聚到成骨细胞的骨特异性转录因子 Runx2/Cbfa1,影响 Runx2/Cbfa1 的转录和成骨分化。本文结合国内外研究成果,对与 BMSCs 成骨分化和成骨细胞分化、成熟有着密切关系的信号通路的研究现状进行回顾。

1 FGFs/FGFRs 信号通路

成纤维细胞生长因子(FGFs)是一类肽类分子,属于肝素结合生长因子家族(HBGF),目前包括 23 个成员。FGFs 家族成员之间有着 30%~80% 相同的氨基酸序列,其中心区域有大约 120 个氨基酸序列存在高度的同源性。FGFs 以自分泌/旁分泌的作用与细胞表面的相应成纤维细胞生长因子受体(FGFRs)结合,将信号传递到胞内。FGFRs 属于免疫球蛋白样受体酪氨酸激酶(RTK)家族。目前已发现 5 种高度同源的 FGFR(FGFR1~5),其中 FGFR1~3 多在成骨和软骨细胞表达。作为跨膜受体,FGFRs 均由胞外区、跨膜区和胞内区三部分组成。当 FGFs 与 FGFRs 胞外段结合后产生一系列胞内蛋白质级联反应:首先 FGFRs 发生二聚体化,然后胞内段酪氨酸激酶活性区发生自身磷酸化,催化受体靶蛋白发生磷酸化,从而使 FGFs 的信号传递给细胞核。研究表明,FGFs/FGFRs 信号传递是血管新生、胚胎发育、骨骼形成、伤口愈合、纤维化及肿瘤形成的重要原因之一。

在 BMSCs 诱导过程中,FGF1、FGF2 和 FGF18 都可以通过 FGFR1 与 FGFR2 激活 Runx2 通路从而调控成骨分化^[2-3]。成骨细胞功能调节因子 PTH 可增加成骨细胞 FGF2 和 FGFR1 表达,并通过激活 cAMP 反应元件结合蛋白 CREBs 调节 Runx2 表达,表明内源性 FGF2 在 PTH 参与下对成骨细胞分化起调控作用^[4]。FGF8 可增强成骨细胞 NR4A 孤儿核受体,并可诱导成骨细胞 p42/p44 MAPK 磷酸化;MAPK 激酶抑制剂 U-0126 或 PI3K 抑制剂 LY-294002 不能抑制其丝裂原化作用^[5]。多种人类骨骼遗传疾病,包括颅缝早闭、软骨发育不良、侏儒症等都有 FGFRs 的基因突变,说明 FGFR 基因对于骨骼发育及成骨细胞分化起重要作用。但 FGFR1 和 FGFR2 对成骨细胞分化作用却截然相反。转染含 Pro250Arg 突变的 FGFR1 cDNA 可致细胞表达 Cbfa1,说明 FGFR1 突变通过促进

Cbfa1 表达引起成骨细胞分化能力异常增强,并最终导致颅缝早闭。而利用 FGFR2 突变小鼠模型研究却发现 FGFR2 突变小鼠颅缝成骨细胞的增生和分化能力无明显变化,其分化能力有时还会降低。用培养的成骨细胞转染突变型 FGFR2 表达载体后也发现成骨细胞的分化受到抑制,但成骨细胞凋亡受到促进。FGFR2 突变导致的颅缝提前闭合的原因可能是过度的凋亡导致成骨性干细胞的分裂增生降低,颅缝处可增殖的前成骨细胞减少。

2 Wnt/ β -catenin 信号通路

Wnt 蛋白是一类富含半胱氨酸的糖脂蛋白,由 Wnt 基因编码产物所介导的信号传导通路称为 Wnt 信号通路。Wnt 信号通路主要成员包括细胞外因子(Wnts)、跨膜受体(frizzled)、胞质蛋白(β -catenin)及核内转录因子(TCF/LEF)。除此还有 LRP5、DKKS、sfrps、GSK3 β 等成分参加。Wnt 通路的下游靶基因多数是参与细胞增生与凋亡的基因。越来越多的研究表明,Wnt 信号通路在骨重建过程中起着至关重要的作用。

Wnt 信号通路包括 3 条分支:(1)Wnt/ β -catenin 途径;(2)Wnt/planar cell polarity 或者 Wnt/JNK 途径;(3)Wnt/ Ca^{2+} 途径。Wnt/ β -catenin 途径又称经典 Wnt 通路,Wnt/JNK 和 Wnt/ Ca^{2+} 途径又称非经典 Wnt 通路。目前对经典 Wnt 通路的研究最为充分。细胞未激活时,细胞质中的 β -catenin 与细胞黏附分子相互结合,共同定位在细胞连接处起维持细胞连接的作用。经典信号通路以 β -catenin 稳定表达及向核内转移为特征,其基本转录过程如下:在 Wnts 配体缺乏情况下, β -catenin 与 Axin、APC 结合,经 GSK3 β 、CK1 α 的磷酸化,被泛素/蛋白酶体降解。当某种 Wnt 配体与胞膜上的受体 Frizzled、LRP-5/6 相互作用,形成 LRP-5/6-Axin-FRAT 复合体,从而引起 Axin 降解。 β -catenin 从 APC/Axin/GSK3 β 复合体解离出来,使胞内 β -catenin 水平升高, β -catenin 核转位增加并在胞核内与 TCF/LEF 转录因子家族成员结合,激活转录因子,诱导靶基因 c-myc、cyclinD1 等的表达^[6]。Wnt/ β -catenin 信号途径对未分化的 BMSCs 可以增强其碱性磷酸酶(ALP)活性。 β -catenin 的稳定表达和 TCF1 的激活能够启动 Runx2 表达,从而来决定 BMSCs 向成骨细胞的分化。Wnt/ β -catenin 信号途径由 19 种分泌蛋白家族组成,如 Wnt1、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt7a、Wnt7b、Wnt10b 等。Wnt3a 可以激活 CCN1/Cyr61 基因,从而促进 BMSCs 向成骨细胞的分化。Wnt10b 也可促进 BMSCs 向成骨细胞的分化,并且通过促进前成骨细胞的分化成熟来促进骨形成,增加全身的骨量^[7]。Dkk、Sfrp 是 Wnt 信号抑制分子。成骨细胞过表达 Dkk1 转基因小鼠成骨细胞数

* 基金项目:“973”专项课题基金(2011CB964701);重庆市科委基金(cstc2012jjA0427)。

△ 通讯作者,E-mail:zhangbo67184@163.com;E-mail:liuluchuan1957@126.com。

量减少、骨量减少。Sfrp1 敲除小鼠骨小梁数量增加^[8-9]。虽然 β -catenin 是成骨细胞分化及骨形成中的枢纽分子,但在成骨细胞发展不同阶段发挥的作用不同。一旦 BMSCs 启动了向成骨方向的分化,经典 Wnt/ β -catenin 信号通路促进干细胞向成骨方向分化,但在分化的终末又会抑制成骨细胞的最终分化成熟。

3 TGF- β /BMPs 信号通路

TGF- β 由一组结构相关、功能相似的多功能活性肽组成,包括 TGF- β s、BMPs、activin 和 inhibin 等成员。TGF- β 的受体包括 I 型受体和 II 型受体,属于丝氨酸/苏氨酸激酶型受体。TGF- β 超家族分子主要通过与其细胞膜上的 II 型受体结合,使 I 型受体磷酸化,并与胞内 Smads 结合进行信号转导。Smads 蛋白是 TGF- β 信号转导途径中最重要的组成部分,其家族一共有 8 个成员,分别为受体激活型 R-Smad(Smad1、2、3、5、8)、通用型 Co-Smad(Smad4)和抑制型 I-Smad(Smad6、7)。TGF- β s 和 activin 信号主要由 Smad2、3 传递,BMPs 信号主要由 Smad1、5、8 传递。虽然 TGF- β 胞内信号主要由 R-Smad 传递,但 R-Smad 必须和 Co-Smad 结合形成异源二聚体,才能进入胞核调节靶基因转录^[10]。TGF- β 广泛存在于多种正常组织和转化细胞当中,在骨骼中含量最为丰富,通过对成骨细胞增殖及分化的调节,影响骨形成和骨吸收。

BMPs 是存在于骨基质中的酸性糖蛋白,有 20 余种成员。BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7 是 BMPs 家族中诱导成骨活性最强的成员,它们能引起多种细胞的增殖、分化和凋亡,在骨组织的再生和修复过程中发挥着重要的作用。BMPs 有 3 类受体:BMPr-I A、BMPr-I B、BMPr-II,也属于丝氨酸/苏氨酸激酶型受体。BMPs 能诱导成骨细胞和软骨细胞的分化成熟,促进新骨形成及骨的层次化,并能在体内诱导异位骨。骨髓基质细胞是 BMPs 的重要靶细胞,BMPs 能诱导不同细胞系的大鼠或小鼠分离的 MSCs 表达 ALP 并向成骨分化^[11]。Noggin 是 BMPs 的抑制分子,过表达 Noggin 的转基因小鼠骨量形成下降,成骨细胞分化受阻。BMP-2 是 BMPs 家族成员中骨形成作用最强的一种,与骨形成蛋白受体 BMPr 结合,激活成骨细胞特异性转录因子 Runx2/Cbfa1、osterix 和 TAZ,使转录因子与相应的成骨细胞特异蛋白基因启动子连接,促进细胞向成骨方向分化。研究发现,BMP-2 可促进 BMP-3、4 的表达,由此推断 BMP-2 可能是诱导成骨的启动子。Smads 蛋白是转导 TGF- β /BMPs 信号途径从细胞表面至胞核的关键转录辅助调节因子。在 C2C12 细胞,Smad1、5、8 可以诱导 ALP 活化并增加骨钙蛋白的产生^[12]。Smad3 敲除小鼠细胞 Collagen1 和骨钙素表达减少,骨矿密度降低,骨皮质变薄,骨量下降且成骨细胞凋亡增加。但是 BMPs 在 hMSCs 的作用机制比较特殊。多数 BMPs 不能诱导 ALP 表达,也不能对 hMSCs 产生矿化作用。但当 BMPs 同地塞米松联合作用于 hMSCs 细胞时,BMPs 可以上调 ALP 表达,提示地塞米松可能移除了抑制 BMPs 产生 ALP 的分子障碍。

4 MAPK/ERK 信号通路

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是广泛存在于真核生物细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,参与了细胞的增殖、分化、凋亡等多种生理过程。MAPK 包括 ERK、p38 和 JNK 3 条信号通路。ERK 通路是经典的 MAPK 信号通路,在细胞整个发育过程中均可被激活,调节细胞增殖和起始分化,而 p38 和 JNK 信号通路很可能与细胞晚期分化或者凋亡密切相关。ERK 由 8 个亚型构成,最广泛的是 ERK1/2。正常情况下 ERK1/2 位于细胞质内,其信号传递基本途径如下:多种生长因子→结合细胞表面受体→结合细胞内酪氨酸激酶→激活

Ras 蛋白→活化 Raf 蛋白→磷酸化 MEK1/2→激活 ERK1/2→移位到细胞核激活转录因子→促进细胞增殖、分化相关基因表达→细胞增殖、分化^[13]。虽然 MAPK/ERK 信号通路在成骨细胞分化过程中起重要作用,但 ERK 信号通路对成骨细胞分化的调控是正性还是负性,迄今为止尚有争议。一些研究认为,MAPK/ERK 信号通路能促进成骨细胞的分化。利用 ERK1/2 信号通路的特异性抑制剂 PD98059 和 U0126 处理 MC3T3-E1 细胞后,磷酸化的 ERK1/2 减少,同时成骨相关基因的表达也减少;而 ERK1/2 持续性激活后,成骨细胞在体外的分化和成熟加速,Runx2 的磷酸化和转录活性增加^[14]。在 hMSCs 培养时添加成骨诱导剂,ERK 的活性在 7~11 d 时被激活,促进了 hMSCs 的分化,同时细胞外基质合成、钙沉积增加。另一些研究认为,MAPK/ERK 信号通路阻碍间充质干细胞向成骨细胞的分化。阻断 ERK1/2 激酶可增强由 BMP-9 诱导的 Runx2 的表达和转录活性,以及由 BMP-9 诱导的 Smad 信号的进一步活化^[15]。造成 ERK 信号通路效应不一致的原因,可能与细胞分化处于不同阶段,ERK 信号激活的强度和持续时间不同有关。

5 信号通路之间的协同作用

BMSCs 的成骨分化涉及到复杂信号网络的调控,任何一种细胞因子和信号通道都不能单独完善其促骨形成作用。研究发现, β -catenin 通过增强 BMP-2 对间充质干细胞的作用来诱导其向成骨细胞分化。GSK3 在 Wnt 通路中发挥关键作用,在 ERK 磷酸化 Smad1 之后,GSK3 β 将 Smad1 作为底物识别并磷酸化,进而促进 Smad1 的泛素化,增加 Wnt 通路对 Smad1 的调节^[16]。FGF2 可以活化 TGF- β /Smad2/3 信号通路,而该信号通路的激活会抑制成骨分化和骨形成。当 FGF2 和 BMP9 同时作用于 C3H10T1/2 细胞时,Runx2 的表达水平会下降,有可能是 FGF2 抑制了 BMP9 诱导的磷酸化 Smad1/5/8 的表达^[17]。FGF 还可通过 MAPK 途径的分支 ERK 信号通路,促进 Runx2 的转录活性和蛋白表达。有研究报道,用 U0126 注射小鼠时,FGFR2S252W 导致的小鼠颅缝早闭被拯救到正常的水平。其可能机制为 ERK1/2 信号通路通过调控 AP-1 的合成促进成骨细胞分化进而促进颅骨骨缝闭合。多种成骨性 BMPs (如 BMP-2、BMP-4 和 BMP-7)除了可以激活经典的 Smad 途径之外,也可以激活 MAPK 途径。BMPs 可诱导 MAPK 家族中 p38 直接磷酸化 Runx2、Osterix 或间接激活另外一些激酶使下游基因磷酸化来刺激成骨细胞的 ALP 和 OC 的表达,最终促进成骨细胞的成骨作用。在 BMSCs 成骨过程中,激活的 ERK 通路与 TGF β /BMPs 通路之间相互作用,共同调节成骨转录因子 Runx2,从而调节成骨分化。由此可见,不同信号通路通过在一些关键信号分子上的交互,共同完成对 BMSCs 成骨分化的调控。

6 小结

利用组织工程技术将 BMSCs 应用于骨缺损修复的研究才刚刚起步,将组织工程化骨组织真正应用于临床也还有待时日。然而一旦解决了干细胞的横向分化调控机制和分化发育之谜,相信在不远的将来骨组织再生和功能重建必定会随着干细胞领域的突破而发生飞跃。

参考文献

- [1] 曹谊林,刘伟,张文杰,等.组织工程研究进展[J].上海交通大学学报:医学版,2012,32(9):1241-1250.
- [2] Hamidouche Z,Fromigué O,Nuber U,et al. Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine(下转第 3495 页)

- tematic review of literature [J]. *Injury*, 2009, 40 (10): 1031-1035.
- [15] Cullinane DC, Schiller HJ, Zielinski MD, et al. Eastern Association for the Surgery of Trauma practice management guidelines for hemorrhage in pelvic fracture—update and systematic review[J]. *J Trauma*, 2011, 71(6):1850-1868.
- [16] Lindahl J, Handolin L, Sederlund T, et al. Angiographic embolization in the treatment of arterial pelvic hemorrhage: evaluation of prognostic mortality-related factors [J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2013, 39(1):57-63.
- [17] Niola R, Pinto A, Sparano A, et al. Arterial bleeding in pelvic trauma: priorities in angiographic embolization[J]. *Curr Probl Diagn Radiol*, 2012, 41(3):93-101.
- [18] Matiyahu A, Marmor M, Elson JK, et al. Acute complications of patients with pelvic fractures after pelvic angiographic embolization[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2013, 471(9):2906-2911.
- [19] Fang JF, Shih LY, Wong YC, et al. Repeat transcatheter arterial embolization for the management of pelvic arterial hemorrhage [J]. *J Trauma*, 2009, 66(2):429-435.
- [20] Flint L, Cryer HG. Pelvic fracture; the last 50 years[J]. *J Trauma*, 2010, 69(3):483-488.
- [21] Evsen MS, Sak ME, Soyidine HE, et al. Internal iliac artery ligation for severe postpartum hemorrhage [J]. *Ginekol Pol*, 2012, 83(9):665-668.
- [22] Tai DK, Li WH, Lee KY, et al. Retroperitoneal pelvic packing in the management of hemodynamically unstable pelvic fractures: a level I trauma center experience[J]. *J Trauma*, 2011, 71(4):79-86.
- [23] Burlew CC, Moore EE, Smith WR, et al. Preperitoneal pelvic packing/external fixation with secondary angioembolization: optimal care for life-threatening hemorrhage from unstable pelvic fractures[J]. *J Am Coll Surg*, 2011, 212(4):628-635.
- [24] 胡海波, 禹宝庆, 刘辉. 不稳定型骨盆骨折治疗中损伤控制骨折的应用[J]. *实用骨科杂志*, 2008, 14(10):584-586.
- [25] Magnone S, Coccolini F, Manfredi R, et al. Management of hemodynamically unstable pelvic trauma: results of the first Italian consensus conference [J]. *World J Emerg Surg*, 2014, 9(1):18.
- [26] Nicola R. Early Total Care versus Damage Control: Current Concepts in the Orthopedic Care of Polytrauma Patients[J]. *ISRN Orthop*, 2013, 10(5):20-21.

(收稿日期:2014-02-10 修回日期:2014-06-19)

(上接第 3492 页)

- mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 224(2): 509-515.
- [3] Kodama N, Nagata M, Tabata Y, et al. A local bone anabolic effect of rhFGF2-impregnated gelatin hydrogel by promoting cell proliferation and coordinating osteoblastic differentiation[J]. *Bone*, 2009, 44(4):699-707.
- [4] Sabbieti MG, Agas D, Xiao L, et al. Endogenous FGF-2 is critically important in PTH anabolic effects on bone[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219(1):143-151.
- [5] Lammi J, Aarnisalo P. FGF-8 stimulates the expression of NR4A orphan nuclear receptors in osteoblasts[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 295(1/2):87-93.
- [6] Huang H, He X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(2):119-125.
- [7] Bennett CN, Ouyang H, Ma YL, et al. Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(12):1924-1932.
- [8] Li J, Sarosi I, Cattley RC, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia[J]. *Bone*, 2006, 39(4):754-766.
- [9] Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(5):1222-1237.
- [10] Nohe A, Keating E, Knaus P, et al. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors [J]. *Cell Signal*, 2004, 16(3):291-299.
- [11] Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation[J]. *Gene*, 2005, 357(1):1-8.
- [12] Yamamoto N, Akiyama S, Katagiri T, et al. Smad1 and smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238(2):574-580.
- [13] 奉水旺, 杨丽, 王攀攀, 等. ERK 信号通路在槲皮素促大鼠 MSCs 成骨分化中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(8):1477-1481.
- [14] Chen C, Koh AJ, Datta NS, et al. Impact of the mitogen-activated protein kinase pathway on parathyroid hormone-related protein actions in osteoblasts[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(28):29121-29129.
- [15] 宋涛, 何娟文, 王锦, 等. 阻断 ERK1/2 激酶可增强骨形态发生蛋白 9 诱导的间充质干细胞成骨分化[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(12):1197-1206.
- [16] Fuentealba LC, Eivers E, Ikeda A, et al. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal[J]. *Cell*, 2007, 131(5):980-993.
- [17] Mbalaviele G, Sheikh S, Stains JP, et al. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 94(2): 403-418.

(收稿日期:2014-03-18 修回日期:2014-07-05)