

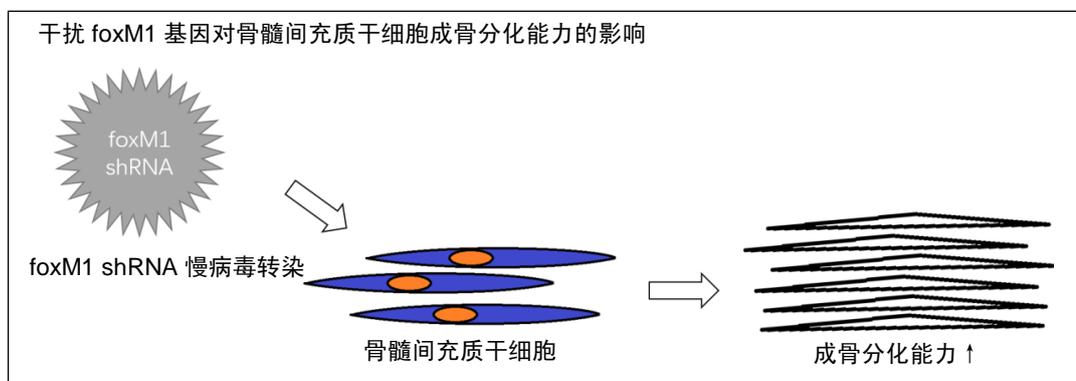
干扰foxM1基因表达可增强骨髓间充质干细胞的成骨分化能力

陈钦桂, 曾勉, 何婉媚, 张莉珊, 郑海崇(中山大学附属第一医院内科重症监护病房, 广东省广州市 510080)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1564

ORCID: 0000-0001-9179-902X(曾勉); 0000-0001-9669-0007(陈钦桂)

文章快速阅读:



陈钦桂, 男, 1993年生, 广东省普宁市人, 汉族, 中山大学附属第一医院在读硕士, 医师, 主要从事间充质干细胞治疗急性肺损伤的相关研究。

通讯作者: 曾勉, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 中山大学附属第一医院内科重症监护病房, 广东省广州市 510080

文献标识码:A

稿件接受: 2018-11-02

文题释义:

FoxM1: 叉头框蛋白 M1(FoxM1)是由 foxM1 基因编码的一种蛋白质, 属于叉头框(Fox)转录因子家族的成员, 具有 FoxM1A、FoxM1B 和 FoxM1C 三种同工型, 其中 FoxM1A 被认为是基因转录的抑制者, 后两者则是激活者。FoxM1 在有丝分裂中具有重要作用, 且能影响干细胞的命运, 对干细胞分化潜能可能起着重要的调控作用。

RNA 干扰: 是一种由双链 RNA 介导基因沉默的分子生物学现象, 其主要机制是双链 RNA 通过阻碍特定基因的转录或翻译来抑制基因表达。由于其高效性和简单性, RNA 干扰是基因功能研究的重要工具, 是实现基因沉默的重要手段。向细胞中导入与目的 mRNA 编码区同源的双链 RNA, 即可通过降解该 mRNA 而导致基因表达沉默。

摘要

背景: foxM1 基因被认为参与了干细胞分化命运的调控, 但其对间充质干细胞成骨分化的影响尚未见报道, 关于 foxM1 基因的研究也主要集中于肿瘤领域。

目的: 探索干扰 foxM1 基因表达水平对骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响。

方法: 全骨髓贴壁法培养 SD 大鼠(中山大学实验动物中心提供)骨髓间充质干细胞, 构建含嘌呤霉素抗性基因的 foxM1 shRNA 重组慢病毒载体并转染大鼠骨髓间充质干细胞, 经嘌呤霉素筛选建立 foxM1 稳定敲低细胞株, 另设置空病毒载体组以及未转染组。使用骨髓间充质干细胞成骨诱导分化培养基诱导培养并行茜素红染色检测其成骨分化能力, 使用定量 RT-PCR 检测成骨相关基因的表达水平, 同时提取胞核蛋白, Western blot 检测 β -catenin 蛋白表达水平。

结果与结论: ①与空病毒载体组以及未转染组比较, foxM1 敲低的大鼠骨髓间充质干细胞经成骨诱导分化后形成的骨结节数量明显增多, 成骨相关基因 col1a1 和 runx2 表达水平均显著升高, 但胞核 β -catenin 蛋白水平无明显改变; ②干扰 foxM1 基因表达可增强骨髓间充质干细胞的成骨能力。

关键词:

骨髓间充质干细胞; 成骨; 诱导分化; 慢病毒载体; foxM1 基因; 基因干扰; β -catenin; 国家自然科学基金

主题词:

叉头转录因子类; RNA 干扰; 骨髓; 间质干细胞; 细胞分化; 成骨细胞; 组织工程

中图分类号: R459.9; R394.2

基金资助:

国家自然科学基金(81670066), 项目负责人: 曾勉; 广东省省级科技计划项目(2016A020216009), 项目负责人: 曾勉; 贝朗蛇牌学院重症科学研究基金资助项目(2017), 项目负责人: 曾勉

缩略语:

骨髓间充质干细胞: bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs

Knockdown of foxM1 strengthens osteogenic differentiation ability of bone marrow mesenchymal stem cells

Chen Qingui, Zeng Mian, He Wanmei, Zhang Lishan, Zheng Haichong (Medical Intensive Care Unit, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China)

Chen Qingui, Master candidate, Physician, Medical Intensive Care Unit, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zeng Mian, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Medical Intensive Care Unit, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China



Abstract

BACKGROUND: FoxM1 is thought to be involved in the regulation of stem cell differentiation fate, but its effect on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells has not been reported. The research on foxM1 gene is mainly focused on the tumor field.

OBJECTIVE: To investigate the effect of shRNA-mediated knockdown of foxM1 on the osteogenic differentiation ability of bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats were isolated and cultured by the whole bone marrow adherence method. Recombinant lentivirus carrying foxM1-specific shRNA and puromycin-resistance gene was constructed and transfected into the rat bone marrow mesenchymal stem cells, and foxM1-knockdown bone marrow mesenchymal stem cells were acquired after puromycin screening. Alizarin red staining was performed to investigate the osteogenic differentiation ability of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in osteogenic differentiation medium. Expression levels of several osteogenesis-related genes were examined using quantitative PCR. The nuclear expression of β -catenin was detected using western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Knockdown of foxM1 in bone marrow mesenchymal stem cells enhanced the capability to form mineralized nodules and significantly increased the mRNA expressions of col1a1 and runx2, while no significant difference was found in the nuclear protein expressions of β -catenin. These results suggest that knockdown of foxM1 can promote the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

Subject headings: Forkhead Transcription Factors; RNA Interference; Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Cell Differentiation; Osteoblasts; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81670066 (to ZM); the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, No. 2016A020216009 (to ZM); the Critical Care Research Funding of the Aesculap Academy, No. 2017 (to ZM)

0 引言 Introduction

骨缺损在临床上并不罕见,它是一种由创伤、肿瘤、感染等多种原因引起的病理性骨吸收,其处理亦较棘手^[1-2]。传统的标准治疗方法主要是自体骨移植,但受制于自体骨来源不足、修复范围有限等原因,自体骨移植的应用仍十分有限,而且患者往往可能还伴随着营养状况差、炎症状态、基础疾病复杂等较多不利于自体骨移植的条件,总体上面临着现有治疗措施效果有限、理想骨移植材料缺乏的不利局面,故急需探索新的有效治疗方法^[3-4]。

间充质干细胞是干细胞家族中的重要成员,来源于发育早期的中胚层和外胚层,因其组织来源广泛、增殖能力强、免疫原性低且具有多向分化潜能,已成为重要的组织工程种子细胞,是再生医学领域的研究重点之一,不仅仅在骨缺损,在许多其他骨骼疾病亦是如此^[5-6]。已有大量的体外研究与少量临床试验显示了间充质干细胞成骨分化治疗骨缺损或其他骨骼疾病的疗效,尽管距真正应用于临床仍存在不少问题^[7-9]。

间充质干细胞最早发现于骨髓中,随后发现其在体内分布广泛,但仍以骨髓来源间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)研究应用最多^[10]。BMSCs具有取材方便、扩增迅速、可自体移植等优点,具有成骨分化潜能是BMSCs治疗骨缺损等骨骼疾病的重要理论基础。尽管成骨分化潜能已成为鉴定BMSCs的重要标准之一^[11],且BMSCs体外诱导成骨的条件已相当成熟,但是调控BMSCs在体内环境下成骨分化却还有许多需要探索的地方^[12]。已有较多研究探索了如何增强BMSCs诱导分化成骨的能力,其中Wnt/ β -catenin通路是研究较多的信号通路之一^[13-14],亦有一些学者通过基因修饰间充质干细胞达到促进成骨分化的目的,如Lampert等^[15]发现过表达Hif-1 α 可增强间充质干细胞对骨缺损的修复作用;Baker等^[16]发现敲低caveolin-1可增强间充质干细胞的成骨分化能力。尽管这些研究仍处于临床前试验阶段,但即使抛开临床应

用不讲,这些研究本身也为深入了解间充质干细胞成骨分化调控过程提供了新的思路与启示,具有重要科学价值和意义。

FoxM1蛋白被认为是一种参与细胞周期和细胞增殖调控的转录因子,目前的研究主要集中于肿瘤领域^[17],但也有些研究提示了FoxM1蛋白可能参与了干细胞多能性的维持,如Hou等^[18]发现FoxM1对于维持造血干细胞的静止和自我更新能力至关重要,下调FoxM1将破坏CD34⁺造血干细胞和祖细胞的静止;Sun等^[19]发现lncRNA MEG3可通过促进FoxM1的降解而不利于间充质干细胞向内皮细胞的分化;Xu等^[20]报道了间充质干细胞的衰老与FoxM1的下调密切相关。然而,FoxM1是否参与间充质干细胞成骨分化的调控目前尚无相关报道。研究显示对成骨分化具有负向调控作用的Twist1蛋白可上调FoxM1的表达水平^[21-22],但也有研究显示对成骨分化具有正向调控作用的OPN蛋白也可上调FoxM1的表达水平^[23-24],提示FoxM1可能参与了间充质干细胞成骨分化的复杂调控过程。Zhang等^[25]在对神经胶质瘤的研究中发现FoxM1可促进 β -catenin蛋白入核而激活Wnt/ β -catenin通路。为此,该研究通过干扰foxM1基因对FoxM1是否参与调控BMSCs成骨分化进行了初步探索,以期加深对BMSCs成骨分化调控机制的了解以及探索促进BMSCs成骨分化的有效方法。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验主要于2017年3月至2018年8月在中山大学附属第一医院普通外科实验室以及中山大学附属第一医院转化医学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验仪器 生物安全柜、超净工作台、二氧化碳培养箱(Thermo Fisher公司);低温高速离心机(Eppendorf公

司); EPICS XL-MCL流式细胞仪(Beckman Coulter公司); Axio Observer A1倒置荧光显微镜(Zeiss公司); 酶标仪(Sunrise公司); 电泳仪(Bio-Rad公司); ImageQuant LAS 4000数字成像系统(General Electric公司); StepOnePlus™实时定量PCR仪(Thermo Fisher公司)。

1.3.2 实验药品与试剂 低糖DMEM培养基(Cat No.11885084, Thermo Fisher公司); 胎牛血清(Cat No.A3160801, Thermo Fisher公司); 0.25%胰酶-0.02% EDTA溶液(Cat No.25200056, Thermo Fisher公司); 青霉素-链霉素(Cat No.15070063, Thermo Fisher公司); PBS (Cat No.C0221A, Beyotime公司); PE Mouse Anti-Rat CD90(Cat No.551401, BD Pharmingen公司); Anti-Mouse/Rat CD29 PE(Cat No. 12-0291, eBioscience公司); PE-CD117(Cat No.561075, BD Pharmingen公司); LV-Foxm1-shRNA-PURO(滴度 $\geq 1 \times 10^8$ TU/mL); LV-PURO(滴度 $\geq 1 \times 10^8$ TU/mL); 嘌呤霉素(Cat No.ST55 1-10 mg, Beyotime公司); RIPA裂解液(Cat No.P0013B, Beyotime公司); 细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(Cat No.P0027, Beyotime公司) PMSF(Cat No.ST506, Beyotime公司); SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(Cat No.P0015L, Beyotime公司); BCA蛋白浓度测定试剂盒(Cat No.P0010, Beyotime公司); SDS-PAGE电泳液(自配); Western转膜液(自配); PVDF膜(0.45 μm , Merck millipore公司); Western封闭液(Cat No.P0252, Beyotime公司); Anti-FOXM1抗体(Cat No.ab175798, Abcam公司); Anti- β -catenin 抗体(Cat No.#8480, Cell Signaling Technology公司); Anti-GAPDH抗体(Cat No.#5174, Cell Signaling Technology公司); Anti-PCNA 抗体(Cat No.#13110, Cell Signaling Technology公司); TBST缓冲液(自配); 超灵敏ECL化学发光试剂盒(Cat No.P0018A, Beyotime公司); TRIzol Reagent(Invitrogen公司); PrimeScript RT Master Mix(Cat No.#RR036Q, TaKaRa公司); SYBR Premix Ex Taq II (Cat No.#RR820A, TaKaRa公司)。

大鼠BMSCs成骨诱导分化培养基(Cat No.RASMIX-90021, Cyagen公司, 主要包括基础培养基175 mL、血清20 mL、青霉素-链霉素2 mL、谷氨酰胺2 mL、抗坏血酸400 μL 、 β -甘油磷酸钠2 mL、地塞米松20 μL); 大鼠BMSCs成脂诱导分化培养基(Cat No.RASMIX-90031, Cyagen公司, 主要包括: ①诱导培养基: 基础培养基175 mL、血清20 mL、青霉素-链霉素2 mL、谷氨酰胺2 mL、胰岛素400 μL 、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤200 μL 、罗格列酮200 μL 、地塞米松200 μL ; ②维持培养基: 基础培养基175 mL、血清20 mL、青霉素-链霉素2 mL、谷氨酰胺2 mL、胰岛素400 μL 。

引物由TIAN YI HUI YUAN公司合成, 各引物序列(5'→3')为: alpl: F, CCA CTA TGT CTG GAA CCG CAC;

R, GCC TTT GGG ATT CTT TGT CAG; runx2: F, CGG ACG AGG CAA GAG TTT CAC; R, TGT CTG TGC CTT CTT GGT TCC; spp1: F, TGA ACA GTA TCC CGA TGC CAC; R, GTC TTC CCG TTG CTG TCC TGA; col1a1: F, AGA CGC AGA AGT CAT AGG AGT; R, AAG CAA AGT TTC CTC CAA GAC; gapdh: F, CAG TGC CAG CCT CGT CTC AT; R, AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC。

1.3.3 实验动物 雄性SD大鼠2只, 8周龄, SPF级, 由中山大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2016-0029。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠BMSCs的分离培养 采用与之前报道类似的全骨髓贴壁法分离培养SD大鼠BMSCs^[26], 即采用颈椎脱臼法处死SD大鼠后经体积分数为75%乙醇浸泡5 min, 于超净工作台中使用无菌手术器械分离得到大鼠胫骨、股骨, 剪开两骨骺端, 使用1 mL注射器抽取0.5 mL低糖DMEM培养基(含体积分数为10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及0.1 g/L链霉素)冲出骨髓腔内容物, 连续重复3次, 随后将所获得骨髓内容物于低糖DMEM培养基中培养, 前3 d每天均予换液, 当细胞汇合度达80%时予以消化传代, 至第3代细胞时用于后续实验。

1.4.2 大鼠BMSCs的鉴定 取第3代BMSCs使用0.25%胰酶-0.02%EDTA溶液消化, 经预冷PBS洗涤2次后重悬为细胞浓度为 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的单细胞悬液, 加入2 mg/L PE标记的抗大鼠CD29、CD90、CD117单克隆抗体, 避光冰上孵育30 min, 再经PBS洗涤2次后予300 \times g离心5 min并重悬于500 μL 预冷PBS, 上流式细胞仪检测, 使用FlowJ V10.0.7进行数据分析。

取第3代BMSCs, 分别使用成骨、成脂肪诱导分化培养基按厂商提供的说明书要求进行诱导分化与染色。①成骨诱导分化的主要步骤为: 将BMSCs按照 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种在已包被0.1%明胶的6孔板中, 常规条件下培养至细胞融合度达到60%-70%, 更换为成骨诱导分化完全培养基, 每隔3 d换液1次, 诱导4周后, 吸弃培养基, PBS漂洗2次, 每孔加入2 mL体积分数为4%中性甲醛溶液固定30 min, 吸弃中性甲醛溶液, PBS漂洗2次, 每孔加入1 mL茜素红染液染3-5 min, 吸弃茜素红染液, PBS漂洗3次, 于显微镜下观察成骨染色效果; ②成脂诱导分化的主要步骤为: 将BMSCs按照 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种在6孔板中, 常规条件下培养至细胞融合度达到100%或者过融合, 更换为成脂诱导培养基培养3 d, 随后更换为维持培养基培养1 d, 如此交替作用5次后, 用维持培养基继续培养直至4周, 吸弃培养基, PBS漂洗2次, 每孔加入2 mL体积分数为4%中性甲醛溶液固定30 min, 吸弃中性甲醛溶液, PBS漂洗2次, 每孔加入1 mL油红O染料工作液染色30 min, 吸

弃油红O染色液, PBS漂洗3次, 于显微镜下观察成脂肪染色效果。

1.4.3 重组慢病毒载体转染BMSCs 实验分为3组: foxM1干扰组(转染LV-foxM1-shRNA-PURO)、阴性对照病毒组(转染LV-PURO)及空白对照组(无转染病毒)。取第3代BMSCs消化重悬后以 1×10^5 /孔接种至6孔板中, 37℃、体积分数为5% CO₂条件下培养24 h后以MOI=50加入相应的重组慢病毒载体, 继续培养, 于感染后第3天加入嘌呤霉素5 mg/L(空白对照组除外; 5 mg/L为经过测试可使空白对照组细胞完全死亡的嘌呤霉素质量浓度)继续培养3 d, 每天更换含嘌呤霉素的培养基, 当细胞汇合度达60%予以传代, 传代2次后收集细胞。取经嘌呤霉素筛选后的细胞用于后续实验。

1.4.4 Western blot检测foxM1干扰效果 使用RIPA强裂解液(含1 mmol/L PMSF)裂解上述3组BMSCs, 4℃、15 000×g离心10 min, 取上清用于后续实验。采用BCA法测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液后进行常规SDS-PAGE电泳及转膜, 用Western封闭液封闭30 min, 一抗4℃孵育过夜, TBST缓冲液洗涤5 min×3次, 二抗室温孵育1 h, TBST缓冲液洗涤5 min×3次, 滴加ECL发光试剂显影后使用数字成像系统记录成像。

1.4.5 各组BMSCs增殖能力 取生长状态良好的上述3组BMSCs, 以 1×10^7 L⁻¹细胞浓度接种至24孔板(1 mL/孔), 于37℃、体积分数为5% CO₂细胞培养箱中连续培养7 d, 每24 h取3孔消化后使用血细胞计数板计数, 绘制增殖曲线。

1.4.6 BMSCs诱导分化成骨 取上述3组BMSCs消化重悬后按 2×10^4 /cm²的细胞密度接种于已包被0.1%明胶的6孔板中, 于37℃、体积分数为5% CO₂条件下培养, 当细胞汇合度达60%~70%时换用成骨诱导分化完全培养基继续培养, 每3 d换液1次, 连续诱导培养4周后使用茜素红染色观察或用于后续实验。

1.4.7 定量RT-PCR检测相关基因表达水平 取3组BMSCs按上述步骤进行成骨诱导分化4周后, Trizol试剂提取总RNA, 经PrimeScript RT Master Mix试剂盒反转录为cDNA, 使用SYBR Premix Ex Taq II试剂盒构建反转录体系进行定量PCR检测。以gapdh为内参照, 分析alpl、runx2、spp1和col1a1基因的表达情况, 结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.4.8 Western blot检测胞核蛋白中β-catenin蛋白水平 取3组BMSCs按上述步骤进行成骨诱导分化4周后, 使用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒裂解BMSCs, 提取胞核蛋白, 再按1.4.4步骤进行Western blot, 检测胞核蛋白中β-catenin蛋白水平。

1.5 主要观察指标 ①BMSCs相关表面标志物表达及多向分化能力; ②重组慢病毒载体转染后各组BMSCs中FoxM1蛋白表达水平; ③各组BMSCs增殖能力; ④各组BMSCs诱导成骨水平; ⑤各组BMSCs成骨相关基因mRNA表达水平; ⑥各组BMSCs核内β-catenin蛋白水平。

1.6 统计学分析 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用SPSS 24.0统计软件进行数据处理, 3组间比较采用单因素方差分析。使用ImageJ软件对茜素红染色以及Western blot条带进行定量化, 研究中每部分实验均重复3次($n=3$)。α=0.05。

2 结果 Results

2.1 BMSCs相关表面标志物表达及多向分化能力 采用全骨髓贴壁法培养至第3代的细胞均为贴壁生长, 光镜下呈均匀一致的纺锤形, 当细胞密度较大时可见典型的巢状生长, 见图1A。经成骨及成脂肪分化培养基诱导处理后, 行相应的特殊染色可见骨结节及脂肪滴, 提示所培养细胞具有成骨分化及成脂肪分化的潜能, 见图1B和图1C。流式细胞术检查结果显示, 所培养细胞高度表达表面标志物CD29与CD90(阳性率接近100%), 且几乎不表达造血干细胞表面标志物CD117(阳性率接近0%), 见图1D、图1E和图1F。上述结果提示所培养细胞符合BMSCs的生物学特性。

2.2 重组慢病毒载体转染后各组BMSCs中FoxM1蛋白表达水平 与转染空病毒载体的BMSCs以及野生型BMSCs相比, 转染携带foxM1 shRNA慢病毒载体后BMSCs的FoxM1蛋白表达水平显著下降, 差异均有显著性意义($P < 0.05$), 但各组BMSCs的增殖能力差异无显著性意义, 见图2。

2.3 各组BMSCs诱导成骨水平 由茜素红染色可见, 与转染空病毒载体的BMSCs以及野生型BMSCs相比, 转染foxM1 shRNA慢病毒载体的BMSCs在成骨诱导后形成骨结节的数量明显增多, 见图3。

2.4 各组BMSCs成骨诱导后成骨相关基因mRNA表达水平 在经过成骨诱导后, 检测foxM1干扰组、阴性对照病毒组以及空白对照组BMSCs多个成骨相关基因的mRNA水平。结果显示, foxM1干扰组col1a1和runx2的mRNA水平较另外两组均显著升高, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 但alpl与spp1的mRNA水平各组间差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图4。

2.5 各组BMSCs成骨诱导后核内β-catenin蛋白水平 在经过成骨诱导后, 各组间的核内β-catenin蛋白水平差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图5。

3 讨论 Discussion

本研究通过构建重组慢病毒载体调控BMSCs的FoxM1蛋白表达水平, 率先探索了foxM1基因对BMSCs成骨分化能力的影响, 初步研究结果显示foxM1基因的表达水平可调控BMSCs成骨分化潜能, foxM1敲低的BMSCs经成骨诱导分化培养基诱导培养后形成的骨结节数量明显增多, 同时伴随着成骨相关基因col1a1和runx2表达水平的显著上升, 但此过程中BMSCs胞核β-catenin蛋白水平未观察到明显改变。

经检索,目前国内外尚未见关于FoxM1与间充质干细胞成骨分化的相关研究报道。除外与肿瘤干细胞的相关研究^[27-29],近年来在干细胞领域FoxM1的研究主要集中于造血干细胞、胚胎干细胞以及神经干细胞方面,如Hou等^[18]报道了FoxM1蛋白对维持造血干细胞静息及自我更新能力的重要性;Kwok等^[30]报道了FoxM1在胚胎干细胞中的作用,认为其对维持胚胎干细胞的增殖以及抵抗氧化应激损伤均是必要的;Besharat等^[31]应用新一代测序技术证实了FoxM1通过参与miRNA调控网络维持神经干细胞干性的作用。尽管尚无FoxM1与间充质干细胞的相关研究,但上述研究提示了FoxM1可能同样对于间充质干细胞的干性维持以及分化方向具有调控作用。从作者的研究结果看,干扰foxM1基因的表达水平可促进BMSCs形成骨结节,伴随着col1a1和runx2基因转录水平的提高,提示FoxM1可能具有调控BMSCs成骨分化能力的作用,干扰其表达水平对于成骨分化具有积极作用。从这个角度看,该研究与前述FoxM1在其他非肿瘤领域的干细胞研究结果基本一致,即FoxM1对于干细胞特性的维持具有重要作用,干扰其表达水平可能会促使其进一步分化而失去干细胞特性。

需注意的是,尽管敲低foxM1可能有助于促进BMSCs的成骨分化,但其是否具有临床应用价值是另一个值得讨论的有趣问题。一方面,foxM1基因被认为可能在细胞增殖方面具有重要调控作用,下调该基因虽然增强了成骨分化能力,但是否会严重影响其增殖能力?考虑到对于组织工程而言,成功移植骨组织还有赖于其中的细胞能够增殖并与受体一起生长,因此作者对各组BMSCs的增殖水平进行了检测,但未发现显著差异,而在体内水平是否仍是如此,尚需动物水平的实验进一步验证。另一方面,Sun等^[19]发现FoxM1能够与血管生长因子的启动子结合,直接在转录水平上调血管生长因子的表达,促进血管形成。考虑到骨组织移植后血管形成的重要性,干扰foxM1是否不利于移植后血管形成?这显然是一个重要的有待解答的问题,同样需要继续进行探索。

为进一步探索FoxM1对BMSCs成骨分化的调控机制,作者对Wnt/ β -catenin通路的关键分子 β -catenin进行了检测。Wnt/ β -catenin通路在BMSCs成骨分化过程中的调控作用已有较多文献报道^[12-32-33],但不同研究的结果并不一致,显示出促进成骨或抑制成骨的作用,提示Wnt/ β -catenin通路对于BMSCs成骨分化的调控可能具有多向性^[13-14]。关于FoxM1与 β -catenin的相互调控作用,近年来也已有一些研究报道,如Zhang等^[25]在对神经胶质瘤的研究中通过免疫共沉淀技术观察到FoxM1蛋白可与 β -catenin蛋白直接结合而调控Wnt/ β -catenin通路;Chen等^[34]研究显示Wnt/ β -catenin通路反过来可促进FoxM1蛋白的去泛素化使其维持稳定,而后者对于 β -catenin/TCF4的反式激活是必要的,提示FoxM1与 β -catenin的调控作用是相互促进的。然而,从作者的研究结果看,FoxM1蛋白表达水平不同的各

组BMSCs胞核内 β -catenin蛋白水平并未见显著差异,Wnt/ β -catenin通路是否在FoxM1对BMSCs成骨分化的调控过程中发挥作用,尚需进一步明确。

尽管研究结果为明确FoxM1对BMSCs成骨分化能力的影响以及进一步认识BMSCs成骨分化过程中的调控机制提供了一定的研究证据与启示,但不可避免地存在一些有待改进的地方。首先,该研究仅在细胞水平进行了探索,FoxM1调控BMSCs成骨分化的作用在动物水平上是否仍然存在尚不得而知。其次,该研究仅通过茜素红染色以及检测若干成骨相关基因的mRNA水平作为检测成骨分化的指标,而且仅检测了诱导4周这一时间点,可能难以很好地反映FoxM1对成骨调控的整个动态过程。考虑到BMSCs诱导成骨往往需要较长时间,尽管多数类似研究中采用的时间均为三四周^[35],该研究也同样选择了4周的诱导时间,但这是否足够用于探索FoxM1对成骨分化能力的调控效应,可能需要通过更多实验进一步确认,包括更多的检测时间点、更多的反映成骨分化水平的指标。此外,鉴于过表达FoxM1可能带来肿瘤风险增加,作者未研究BMSCs过表达FoxM1对其成骨分化能力的影响,这削弱了研究的论证强度,属于研究的局限之一。最后,研究中对于Wnt/ β -catenin通路的分析仅局限于胞核 β -catenin蛋白水平的检测,考虑到 β -catenin通过入核而发挥作用,作者未同时检测胞质 β -catenin水平及其核质比,同样属于研究的局限之一。若能进一步采用荧光素酶报告基因检测技术、免疫共沉淀技术等,将有助于增加研究结论的证据强度。

总而言之,该研究初步探索了干扰foxM1基因对BMSCs成骨分化能力的可能影响,研究结果显示干扰foxM1或可增强BMSCs成骨分化能力,加深了对BMSCs成骨分化的调控机制认识,有望为骨缺损的创新治疗提供新的启发,但受限于研究设计上的不足,仍需要更多研究进一步探索,尤其是其中具体的调控过程。

致谢: 主要实验在中山大学附属第一医院外科实验室完成,该实验室由 985 或 211 课题普通外科学科建设基金、十五“211”基金(2004-8000-3123002)资助。部分实验在中山大学附属第一医院转化医学实验室完成。

作者贡献: 课题设计为通讯作者,实验实施、资料收集主要由第一作者完成,其他作者协助完成部分工作。

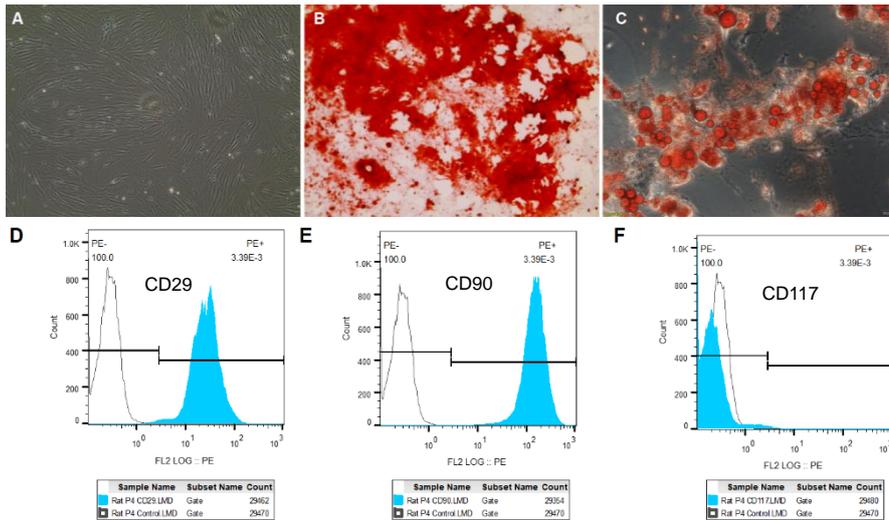
经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81670066)”、“广东省省级科技计划项目(2016A020216009)”、“贝朗蛇牌学院重症科学研究基金项目(2017)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

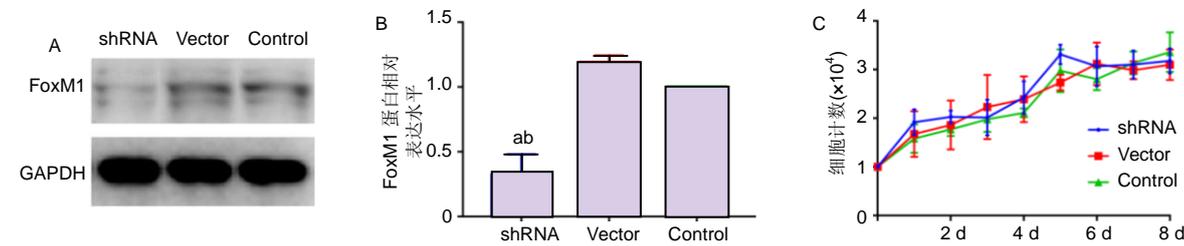
机构伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例,实验方案中有关动物伦理问题已经中山大学附属第一医院医学伦理委员会临床科研和实验动物伦理委员会讨论批准。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。



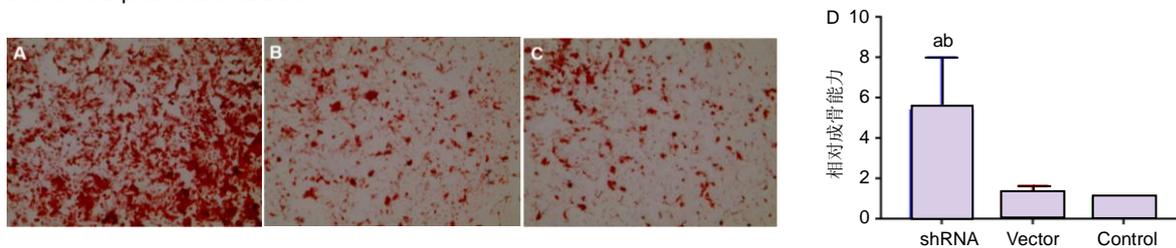
图注: 图中 A 为生长汇合状态下骨髓间充质干细胞的形态(x100); B 为骨髓间充质干细胞成骨诱导分化后行茜素红染色(x200); C 为骨髓间充质干细胞成脂肪诱导分化后行油红染色(x200); D-F 分别为流式细胞术检测骨髓间充质干细胞 CD29、CD90 及 CD117 表面标志物表达水平(n=3)。
图 1 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的鉴定
Figure 1 Identification of bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats



图注: shRNA: foxM1 干扰组; Vector: 阴性对照病毒组; Control: 空白对照组。图中 A 为各组骨髓间充质干细胞中 FoxM1 蛋白表达条带; B 为各组骨髓间充质干细胞以内参蛋白 GAPDH 为参照时 FoxM1 蛋白的相对表达水平, 与阴性对照病毒组相比, ^aP < 0.05(n=3), 与空白对照组相比, ^bP < 0.05(n=3); C 为各组骨髓间充质干细胞的增殖曲线。

图 2 重组慢病毒载体转染调控骨髓间充质干细胞 FoxM1 蛋白表达水平及其增殖能力的影响

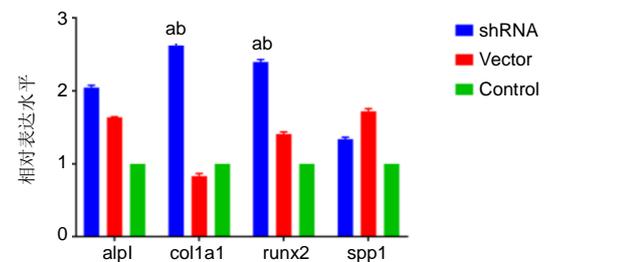
Figure 2 Recombinant lentiviral vectors transfection regulates expression levels of FoxM1 in bone marrow mesenchymal stem cells and affects their proliferation abilities



图注: shRNA: foxM1 干扰组; Vector: 阴性对照病毒组; Control: 空白对照组。图中 A-C 分别为 foxM1 干扰组、阴性对照病毒组以及空白对照组骨髓间充质干细胞在成骨诱导分化后的骨结节形成情况(茜素红染色, x100); D 为各组骨结节数量的相对水平。与阴性对照病毒组相比, ^aP < 0.05(n=3), 与空白对照组相比, ^bP < 0.05(n=3)。

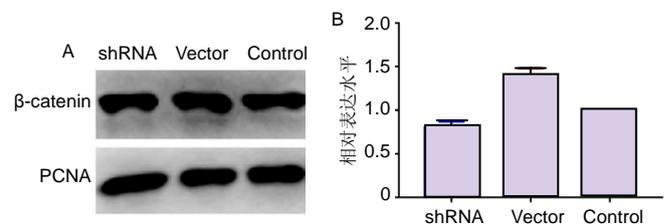
图 3 各组骨髓间充质干细胞的成骨分化能力

Figure 3 Osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in each group



图注: shRNA: foxM1 干扰组; Vector: 阴性对照病毒组; Control: 空白对照组。与阴性对照病毒组相比, ^aP < 0.05(n=3); 与空白对照组相比, ^bP < 0.05(n=3)。

图 4 各组骨髓间充质干细胞成骨诱导后成骨相关基因的表达水平
Figure 4 Expression levels of osteogenic related genes after osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells with different expression levels of foxM1



图注: shRNA: foxM1 干扰组; Vector: 阴性对照病毒组; Control: 空白对照组。图中 A 为各组骨髓间充质干细胞成骨诱导后核内 beta-catenin 蛋白表达条带; B 为各组骨髓间充质干细胞以胞核内参蛋白 PCNA 为参照时 beta-catenin 蛋白的相对表达水平(n=3)。

图 5 各组骨髓间充质干细胞成骨诱导后核内 beta-catenin 蛋白水平
Figure 5 Expression levels of nuclear beta-catenin after osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells with different expression levels of foxM1

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过中山大学附属第一医院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Mumford JE, Simpson AHRW. Management of Bone Defects: A Review of Available Techniques. *Iowa Orthop J*. 1992;12:42-49.
- [2] Gupta A, Thussbas C, Koch M, et al. Management of glenoid bone defects with reverse shoulder arthroplasty-surgical technique and clinical outcomes. *J Shoulder Elbow Surg*. 2018;27(5):853-862.
- [3] Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater*. 2017;2(4):224-247.
- [4] Croes M, Kruyt MC, Loozen L, et al. Local induction of inflammation affects bone formation. *Eur Cell Mater*. 2017;33:211-226.
- [5] Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*. 2016;99:62-68.
- [6] Tam WL, Luyten FP, Roberts SJ. From skeletal development to the creation of pluripotent stem cell-derived bone-forming progenitors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018;373(1750):20170218.
- [7] Kon E, Filardo G, Roffi A, et al. Bone regeneration with mesenchymal stem cells. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2012; 9(1):24-27.
- [8] van der Stok J, Koolen MK, Jahr H, et al. Chondrogenically differentiated mesenchymal stromal cell pellets stimulate endochondral bone regeneration in critical-sized bone defects. *Eur Cell Mater*. 2014;27:137-148.
- [9] Nauth A, Schemitsch EH. Stem cells for the repair and regeneration of bone. *Indian J Orthop*. 2012;46(1):19-21.
- [10] Cordeiro-Spinetti E, de Mello W, Trindade LS, et al. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized in vitro manipulation. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:7.
- [11] Samsonraj RM, Rai B, Sathiyathanan P, et al. Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells*. 2015; 33(6):1878-1891.
- [12] James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:684736.
- [13] 潘京华, 黄浩, 查振刚. 间充质干细胞向成骨细胞分化中的Wnt信号通路[J]. *中国组织工程研究*, 2013,17(40):7144-7149.
- [14] 陈小静, 高艳虹. Wnt信号通路调控间充质干细胞成骨分化的研究进展 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2013,33(1):99-103.
- [15] Lampert FM, Kütscher C, Stark GB, et al. Overexpression of Hif-1 α in Mesenchymal Stem Cells Affects Cell-Autonomous Angiogenic and Osteogenic Parameters. *J Cell Biochem*. 2016;117(3):760-768.
- [16] Baker N, Sohn J, Tuan RS. Promotion of human mesenchymal stem cell osteogenesis by PI3-kinase/Akt signaling, and the influence of caveolin-1/cholesterol homeostasis. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:238.
- [17] Garte AL. FOXM1 in Cancer: Interactions and Vulnerabilities. *Cancer Res*. 2017;77(12):3135-3139.
- [18] Hou Y, Li W, Sheng Y, et al. The transcription factor Foxm1 is essential for the quiescence and maintenance of hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*. 2015;16(8):810-818.
- [19] Sun X, Luo LH, Feng L, et al. Down-regulation of lncRNA MEG3 promotes endothelial differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells in repairing erectile dysfunction. *Life Sci*. 2018;208:246-252.
- [20] Xu J, Huang Z, Lin L, et al. miRNA-130b is required for the ERK/FOXM1 pathway activation-mediated protective effects of isosorbide dinitrate against mesenchymal stem cell senescence induced by high glucose. *Int J Mol Med*. 2015;35(1):59-71.
- [21] Kronenberg HM. Twist genes regulate Runx2 and bone formation. *Dev Cell*. 2004;6(3):317-318.
- [22] Qian J, Luo Y, Gu X, et al. Twist1 promotes gastric cancer cell proliferation through up-regulation of FoxM1. *PLoS One*. 2013; 8(10):e77625.
- [23] Chen Q, Shou P, Zhang L, et al. An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014;32(2):327-337.
- [24] Xie Y, Li Y, Kong Y. OPN induces FoxM1 expression and localization through ERK 1/2, AKT, and p38 signaling pathway in HEC-1A cells. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):23345-23358.
- [25] Zhang N, Wei P, Gong A, et al. FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2011;20(4):427-442.
- [26] 陈钦桂, 郑海崇, 何婉媚, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离培养及其诱导分化为肺泡上皮细胞[J]. *医学研究生学报*, 2017,30(12):1283-1288.
- [27] Kelleher FC, O'Sullivan H. FOXM1 in sarcoma: role in cell cycle, pluripotency genes and stem cell pathways. *Oncotarget*. 2016;7(27): 42792-42804.
- [28] Lee Y, Kim KH, Kim DG, et al. FoxM1 Promotes Stemness and Radio-Resistance of Glioblastoma by Regulating the Master Stem Cell Regulator Sox2. *PLoS One*. 2015;10(10):e0137703.
- [29] Yuan B, Liu Y, Yu X, et al. FOXM1 contributes to taxane resistance by regulating UHRF1-controlled cancer cell stemness. *Cell Death Dis*. 2018;9(5):562.
- [30] Kwok CT, Leung MH, Qin J, et al. The Forkhead box transcription factor FOXM1 is required for the maintenance of cell proliferation and protection against oxidative stress in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res*. 2016;16(3):651-661.
- [31] Besharat ZM, Abballe L, Cicconardi F, et al. Foxm1 controls a pro-stemness microRNA network in neural stem cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):3523.
- [32] Zhang F, Luo K, Rong Z, et al. Periostin Upregulates Wnt/ β -Catenin Signaling to Promote the Osteogenesis of CTLA4-Modified Human Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells. *Sci Rep*. 2017;7:41634.
- [33] Yuan Z, Li Q, Luo S, et al. PPAR γ and Wnt Signaling in Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;11(3):216-225.
- [34] Chen Y, Li Y, Xue J, et al. Wnt-induced deubiquitination FoxM1 ensures nucleus β -catenin transactivation. *EMBO J*. 2016;35(6): 668-684.
- [35] Thiagarajan L, Abu-Awwad HAM, Dixon JE. Osteogenic Programming of Human Mesenchymal Stem Cells with Highly Efficient Intracellular Delivery of RUNX2. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(12):2146-2159.