

· 综述 ·

全反式维甲酸在成骨分化中作用的研究现状

沈晨曦 毕文娟*

(华北理工大学口腔医学院 河北 唐山 063200)

[摘要] 全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)可上调多种细胞的成骨相关基因的表达,如成骨细胞、骨髓间充质干细胞等,并可促进细胞基质的矿化。利用 ATRA 的这种特点能够在临床中减少骨吸收,促进骨形成。但大剂量 ATRA 则会抑制成骨分化、促进破骨细胞分化,不利于骨质缺损的愈合。本研究就目前国内外关于 ATRA 对细胞成骨分化的影响研究作一综述。

[关键词] 全反式维甲酸 诱导成骨 成骨分化

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2018)10—1038—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.10.002

Role of All-trans Retinoic Acid in Osteogenic Differentiation. SHEN Chen-xi, BI Wen-juan*. North China University of Science and Technology, School of Stomatology, Tangshan 063200, China.

[Abstract] All-trans retinoic acid (ATRA) can up-regulate osteoblast-related gene expression of many cells, such as bone marrow stromal cells and osteoblasts. Besides, it can promote mineralization of matrix. The use of this feature of ATRA can reduce bone resorption and promote bone formation in the clinic. However, high dose of ATRA inhibits osteogenic differentiation and promotes osteoclast differentiation, which is not conducive to the healing of bone defects. This study reviews the effects of ATRA on osteogenic differentiation of cells at home and abroad.

[Key words] All-trans retinoic acid Induced osteogenesis Osteogenic differentiation

目前,大面积及极限骨质缺损及骨折在临床上常见,而临床治疗中自体骨移植会延长手术时间,增加手术的并发症,异体骨移植则有引入异体抗原的可能,研究者逐渐意识到细胞因子介入治疗可逐步代替骨移植治疗骨质缺损和骨折。已有的研究发现骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)能够促进未分化的和骨系细胞定向增殖分化成为骨组织^[1]。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)属于维生素 A 族,是 BMP-2 基因表达的正性转录因子,能够上调多种细胞成骨相关基因的表达,促进基质矿化。但也有研究结果表明 ATRA 在破骨细胞增殖、分化方面具有促进作用。本研究就目前国内外关于 ATRA 在细胞成骨方面的作用及其可能的机制作一综述。

1 ATRA 诱导成骨分化

ATRA 对细胞生长发育及代谢有着广泛的生物学特性,能够调控多种细胞的增殖^[2]。在小剂量 ATRA 作用下,

成骨细胞可进一步增殖,并促进骨和软组织的生长发生。有报道指出,适量的 ATRA 可以在不激活破骨细胞的同时促进鼠脂肪干细胞分化为骨源细胞^[3]。Zhang 等^[4]通过进行围产期鼠的肢体移植和体内间充质干细胞(mesenchymal progenitor cells, MPCs)植入实验评估骨的形成,研究发现 ATRA 可有效诱导 MPCs 中早期成骨标志物碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,也能增强晚期成骨标志物,如骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OC)的表达,增加基质矿化面积。牟钰钦等^[5]利用质粒萤光素酶报告系统测定成骨分化中的早期转录调节因子即与 Runt 相关的转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)的转录活性,Western blot 检测 OPN 和 OC 的蛋白表达,检测 ATRA 对 143B 细胞成骨分化不同时期标志物的影响,结果表明维甲酸核受体 RAR 及 RXR 在骨肉瘤细胞 143B 和 MG63 中均存在内源性表达。经 ATRA 处理后,含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme-3, Caspase-3)蛋白表达水平增加,且凋亡染色呈明显阳性,也表明了 ATRA 不仅使 Runx2 转录活性增加,还促进了 OPN 和 OC 的表达。

有研究在由脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的钛培养基中加入 ATRA,其矿化结节形成量增加,且 ALP 活性、OC、OPN 表达均高于对照组,结果表明 ATRA 能够促

基金项目 国家自然科学基金青年项目(编号:81600844)

河北省自然科学基金青年项目(编号:H2017209238)

华北理工大学博士科研启动基金(编号:618322jw)

作者简介 沈晨曦(1990~),女,河北唐山人,硕士在读,主要从事口腔颌面外科学研究。

* 通讯作者 毕文娟, E-mail: bixiaobi2003@163.com

进细胞成骨分化,这对于治疗种植体周围骨缺损有着重要的临床意义^[6]。研究发现在人源性脂肪来源的基质细胞(adipose derived stromal cells, ADSCs)培养中加入 ATRA 可刺激 ALP 活性,促进 Runx2、编码骨钙蛋白基因 Bglap1、编码碱性磷酸酶基因 Alpl 表达,同时可抑制细胞脂肪化^[7]。另有实验发现 8 周龄无 RAR γ 小鼠与野生型同龄小鼠相比,骨小梁明显减少,且经过组织形态学分析,其骨表面的破骨面积更大^[8]。体外培养使用高浓度选择性受体激动剂由核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)诱导分化的野生型小鼠和 RAW264.7 细胞,结果显示 RAR γ 比 RAR α 有更强的抑制作用,这也表明 RAR γ 是破骨细胞形成中作用较强的抑制剂。对体内类维生素 A 族效应的调查结果显示,连续 10 d 口服 5 mg/kg ATRA 能防止骨质流失,也从侧面反映出 ATRA 能够促进骨质形成。

2 ATRA 诱导成骨分化的作用机制

ATRA 是一种细胞增生和分化因子,能够促进多种细胞的增殖分化,它对成骨细胞的促增殖和分化作用与细胞周期调控蛋白有着紧密的联系。研究表明,由酶 Cyp26 引导的被时间和空间限制的维甲酸(retinoic acid, RA)信号能减弱体内成骨细胞的成熟以及其体外的活动^[9]。也有研究发现 RA 信号在促进成骨分化过程中能够协同 BMP-9 MPC 的活动^[10]。有研究探讨了细胞周期调控蛋白(Cyclin D)部分作用机制,发现在 ATRA 作用下,Cyclin D1 蛋白的表达下降并且 ATRA 可以激活由 Smad 介导的部分信号,以促进细胞成骨分化来抑制肿瘤的生长^[11]。

ATRA 也是 BMP-2 基因表达的正性转录因子,能够提高细胞 BMP-2 mRNA 的表达水平,而 BMP 规律性表达是保证骨愈合的重要因素。研究发现 ATRA 在体内和体外均能够扩大 BMP-9 诱导的成骨分化且阻碍其诱导的成脂分化,而且 ATRA 提高 BMP-9 的表达并激活了 BMP/Smad 信号,因此两者能够联合应用以探讨治疗骨质疏松等相关疾病^[12]。此外,应用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和 Western blot 分析,在 mRNA 水平和蛋白质水平测定 ATRA 对急性视网膜色素上皮 19 细胞(acute retinal pigment epithelium-19, ARPE-19)的作用发现,ATRA 诱导 RAR β 负转录调控并且能够促进细胞分泌 BMP-2 和基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)^[13]。

有研究发现 ATRA 可增强 BMP-9 介导的 Smad 信号活性,上调 BMP-9 的表达,进一步上调成骨相关转录因子的表达,抑制成脂相关转录因子的表达。利用 RNA 干扰(RNA interfere, RNAi)技术能够减弱 ATRA 促进的成骨分化,抑制 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路方式的同时可抑制 BMP-9 诱导的成脂方向的分化。研究表明激活 Wnt/ β -catenin 信号则可促进 BMP-9 诱导的成骨分化而抑制成脂分化^[14]。此外,在多功能干细胞分化的早期,ATRA 能够通过上调 Smad1 以及 Smad5 信号通路的作用来

促进 BMP 对于软骨细胞分化进行的诱导^[15]。研究表明 ATRA 和 BMP-2 不仅能在早期促进间充质细胞向成骨细胞分化,并且破骨细胞活性能够被激活。故而需要通过进一步的研究来发现合适的 ATRA 浓度,以保证能够单纯促进骨形成而不发生骨吸收。

3 ATRA 与 BMP 协同促进成骨

大量研究结果已经表明 BMP 可诱导成骨,在辅助治疗骨缺损和加速骨联合方面具有很好的效果,适宜浓度的 ATRA 与 BMP 联合应用能促进新骨的生成,同时也能明显减少 BMP 的使用剂量,两者联合应用能促进间充质干细胞向成骨细胞分化,并且促进与成骨相关基因以及蛋白的表达。有研究指出 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化能够被 BMP-2/7 促进,随着 BMP-2/7 浓度升高,细胞会更多地分化为成骨细胞,BMP-2/7 和 ATRA 则可协同诱导 SD 大鼠 BMSCs 的 ALP 活性表达,促进其成骨方向的早期分化^[16,17]。Wang 等^[18]通过评估 ATRA 和 BMP-2/7 在增殖、分化、矿化、成骨相关基因表达中的作用,结果发现两者既发挥协同作用又存在拮抗作用,ATRA 能够显著抑制 BMSC 的增殖和 OC 的表达,增强 ALP 活性,而在实验第 21 天,BMP-2/7 能够对抗 ATRA 的抑制作用,显著提高骨形成。

4 ATRA 与 BMP 协同促进成骨的机制

研究发现,转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)信号在细胞膜传递至细胞核的过程中,Smad 蛋白发挥着重要作用。ATRA 能够在干细胞分化早期通过 Smad1 及 Smad5 促进软骨分化。经干细胞移植发现 BMP-9 与 RAR 及 RXR 共同表达可显著增加类骨质形成,促进松质骨发生^[19]。通过对围产期鼠肢体外植体发现,ATRA 能够以剂量依赖性方式显著增强 BMP-9 诱导的 ALP 活性,ATRA 与 BMP-9 能够协同促进 MPCs 的成骨分化,同时也能共同促进在生长板软骨细胞区的肥厚性扩张。用定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)分析发现 ATRA 至少部分通过上调 BMP-9 的表达和激活 BMP-Smad 信号传导系统而发挥协同效应。此外,经器官培养实验发现 BMP-9 和 ATRA 可协同作用加速软骨细胞的扩张肥大和软骨内骨形成。研究发现, BMP-9 和 RXR α 或 RAR α 的联合应用能够显著增加骨小梁和矿化骨质的形成^[10]。有研究发现 ATRA、BMP-9 都可以诱导 C3H10T1/2 细胞的 ALP 活性增强,但与单用 ATRA 或者 BMP-9 组相比,ATRA 与 BMP-9 合并组的 ALP 活性、OC 表达水平、钙盐沉积面积以及 Smad1/5/8 磷酸化水平均明显升高,证实了 ATRA 能增强 BMP-9 诱导间充质干细胞成骨分化的作用,其机制可能与促进 Smad 信号传导活性有关^[20]。

5 ATRA 抑制成骨分化及其机制

在抑制细胞增殖和分化方面 ATRA 也有着积极作用。在大剂量的 ATRA 作用下,骨的生长以及骨形态发生会被强烈抑制,并且刺激破骨细胞的骨吸收功能,使骨改建活跃,

处于高转化状态。高水平的类视黄醇衍生物与骨折风险升高相关,可改变成骨细胞分化,诱导破骨细胞分化^[7]。有研究发现 ATRA 能够抑制小鼠原成骨细胞 MC3T3-E1 的成骨分化,也可以抑制 BMSCs 的中晚期成骨分化,抑制其细胞外基质矿化,并且 ATRA 可抑制低浓度 BMP-2/7 诱导细胞成骨分化的能力^[17]。

研究表明, 1×10^{-6} mol/L 和 1×10^{-5} mol/L 的 ATRA 能显著下调鼠间充质干细胞中性别决定基因组 9 (sex determining region Y-box 9, Sox9)、II 型胶原 $\alpha 1$ 链 (collagen type II $\alpha 1$, Col2a1)、Pitx1 基因 (pituitary homeobox 1 gene, Pitx1)、肿瘤相关因子蛋白 63 (p63) 的表达,从而抑制骨形成。实验在 24、48 h 检测发现,与对照组相比, 1×10^{-6} mol/L ATRA 引起 25% 的间充质干细胞减少, 1×10^{-5} mol/L ATRA 引起 75% 的间充质干细胞减少,表明了 ATRA 呈剂量依赖性地抑制间充质干细胞增殖。研究发现,对照组软骨结节的平均面积为 $(0.15 \pm 0.03) \text{ mm}^2$,而 1×10^{-6} mol/L 和 1×10^{-5} mol/L 作用后分别为 (0.13 ± 0.02) 、 $(0.03 \pm 0.01) \text{ mm}^2$,说明 ATRA 呈剂量依赖性地抑制细胞凝聚。实验发现高剂量的 ATRA 通过下调原代间充质干细胞中的 Pitx1、Sox9 以及 Col2a1 表达抑制软骨形成。RT-PCR 检测结果显示:与对照组相比, 1×10^{-5} mol/L ATRA 引起 72% 的上述基因 mRNA 表达减少,而 1×10^{-7} mol/L ATRA 在三者 mRNA 表达中没有引起明显变化^[21]。

有研究发现 ATRA 未能诱导基质矿化和骨粘连蛋白的表达,并且会引起脂质累积^[18],此外,ATRA 可以诱导骨形态发生蛋白受体 I 磷酸化 (bone morphogenetic protein receptor I phosphorylates, BMP-RIA) 表达,在含有 ATRA 的成骨培养基中,骨形态发生蛋白受体 II (bone morphogenetic protein receptor II, BMP-R II) 和 Smad5 mRNA 均可被诱导,因而 ATRA 抑制骨生成且促进 BMSCs 脂肪化,由此可见 ATRA 可能是诱导骨吸收和造成骨质疏松的重要机制。也有实验表明 ATRA 与 BMP 联合作用能够抑制 MEPM 细胞的成骨发生,促进脂肪形成^[22]。

6 展望

临床中骨质缺损修复、骨折愈合是复杂的过程,尤其是当存在大面积及极限骨缺损时,可以采用细胞因子介入治疗来促进骨愈合和新骨形成,合理利用 ATRA 本身所具备的成骨以及破骨效应,联合相关生长因子如 BMP,选择适宜的剂量及比例,利用细胞因子间的协同促进成骨的作用可修复临床骨缺损,加速诱导骨形成,促进骨改建。

参考文献

[1] 陈宁. 双基因 NGF-IRES-BMP2 真核质粒转染大鼠 BMSCs 诱导成骨的实验研究[D]. 桂林医学院, 2015

[2] Napoli JL. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(1): 152-167

[3] Wan DC, Siedhoff MT, Kwan MD, et al. Refining retinoic acid stimulation for osteogenic differentiation of murine adi-

pose-derived adult stromal cells [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(7): 1623-1631

[4] Zhang W, Deng ZL, Chen L, et al. Retinoic acids potentiate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11917

[5] 牟钰钦, 周龙洋, 杨秋珺, 等. 全反式维甲酸对骨肉瘤细胞 143B 生长的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(8): 1091-1095

[6] Yan Q, Li Y, Cheng N, et al. Effect of retinoic acid on the function of lipopolysaccharide-stimulated bone marrow stromal cells grown on titanium surfaces [J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(1): 63-70

[7] Henning P, Conaway HH, Lerner UH. Retinoid receptors in bone and their role in bone remodeling [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6: 31

[8] Green AC, Poulton IJ, Vrahnas C, et al. RAR γ is a negative regulator of osteoclastogenesis [J]. *J Steroid Biochem Mol Bio*, 2015, 150: 46-53

[9] Laue K, Jänicke M, Plaster N, et al. Restriction of retinoic acid activity by Cyp26b1 is required for proper timing and patterning of osteogenesis during zebrafish development [J]. *Development*, 2008, 135(22): 3775-3787

[10] Massaro GD, Massaro D, Chambon P. Retinoic acid receptor- α regulates pulmonary alveolus formation in mice after, but not during, perinatal period [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284(2): 431-433

[11] Yang QJ, Zhou LY, Mu YQ, et al. All-trans retinoic acid inhibits tumor growth of human osteosarcoma, by activating Smad signaling-induced osteogenic differentiation [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 153-160

[12] Yang L, Deng ZL. All-trans retinoic acid modulates bone morphogenetic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/ β -catenin signaling pathways [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 47: 47-56

[13] Gao Z, Huo L, Cui D, et al. The expression of bone morphogenetic protein 2 and matrix metalloproteinase 2 through retinoic acid receptor beta induced by all-trans retinoic acid in cultured ARPE-19 cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150831

[14] 刘洋. ATRA 调控 BMP9 诱导 3T3-L1 前脂肪细胞成骨和成脂分化的作用及机制研究[D]. 重庆医科大学, 2014

[15] Chen W, Jia W, Wang K, et al. Retinoic acid regulates germ cell differentiation in mouse embryonic stem cells through a Smad-dependent pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(3): 571-577

[16] Bi W, Gu Z, Zheng Y, et al. Heterodimeric BMP-2/7 antagonizes the inhibition of all-trans retinoic acid and promotes the osteoblastogenesis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78198

[17] Bi W, Gu Z, Zheng Y, et al. Antagonistic and synergistic effects of bone morphogenetic protein 2/7 and all-trans reti-

- noic acid on the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells [J]. *Dev Growth Differ*, 2013, 55(9) : 744-754
- [18] Wang A, Ding X, Sheng S, et al. Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(3) : 435-439
- [19] 王林红, 郑园娜. 全反式维甲酸与骨形态发生蛋白的联合成骨作用研究进展[J]. *口腔生物医学*, 2012, 3(4) : 208-211
- [20] Lie KK, Moren M. Retinoic acid induces two osteocalcin isoforms and inhibits markers of osteoclast activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) ex vivo cultured craniofacial tissues [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2012, 161(2) : 174-184
- [21] Green AC, Martin TJ, Purton LE. The role of vitamin A and retinoic acid receptor signaling in post-natal maintenance of bone [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 155(Pt A) : 135-146
- [22] Chen M, Huang HZ, Wang M, et al. Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of mouse embryonic palate mesenchymal cells [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2010, 88(11) : 965-970
- [收稿日期: 2017-09-18] (本文编辑 关隽)

自然指数期刊 *Advanced Functional Materials* 再次发表我院肿瘤外科团队最新研究成果

近日, 我院孙志军教授团队与武汉大学物理科学与技术学院赵兴中教授、刘威教授团队合作, 在仿生癌症诊疗领域获得重要创新成果。相关研究成果发表在国际纳米研究领域自然指数期刊《先进功能材料》(*Advanced Functional Materials*), 并被选为 *Frontispiece* 文章。

论文题目为 *Myeloid-Derived Suppressor Cell Membrane-Coated Magnetic Nanoparticles for Cancer Theranostics by Inducing Macrophage Polarization and Synergizing Immunogenic Cell Death* (《髓源抑制性细胞膜包裹的磁性纳米颗粒在癌症诊疗中的应用—基于诱导巨噬细胞极化并协同免疫源性细胞死亡》)。武汉大学口腔医学院口腔生物医学教育部重点实验室(湖北省口腔基础医学重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地)为第一完成单位。本院口腔颌面—头颈肿瘤外科 2016 级博士研究生于光涛为论文第一作者, 物理科学与技术学院 2015 级博士生饶浪为论文共同第一作者, 口腔颌面—头颈肿瘤外科孙志军教授和物理科学与技术学院刘威教授为论文通讯作者。该研究受到国家自然科学基金面上项目、国家自然科学基金优秀青年基金项目、国家重点研发计划的资助。

癌症作为最主要的公共健康问题之一, 目前主要治疗手段包括外科手术、放疗及化疗。这些传统的治疗方式对肿瘤微环境靶向能力有限。髓源性抑制细胞(MDSC)是肿瘤微环境中一种重要的负性免疫调控细胞, 抑制免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤能力。基于 MDSC 细胞的特性, 课题组首次提出应用同源的 MDSC 的细胞膜包裹已被美国食品和药物管理局(FDA)批准的光敏感性的磁性氧化铁纳米颗粒, 合成具有主动靶向肿瘤微环境的 MNP[®] MDSC 复合纳米颗粒。

这种复合纳米颗粒集成了 MDSC 及 Fe₃O₄ 纳米颗粒的功能, 展现了优异的抗吞噬、长循环时间以及主动靶向肿瘤微环境的能力, 表现出优异的光热治疗效果(PTT)、核磁共振成像(MRI)能力以及显著的抗肿瘤能力。分子机制研究发现应用该纳米颗粒进行光治疗可引起肿瘤细胞免疫原性细胞死亡, 促进 M2 型巨噬细胞向抗肿瘤的 M1 型分化, 协同促进了机体的抗肿瘤免疫反应。小动物正电子发射计算机断层显像(PET)检测提示 MNP[®] MDSC 纳米颗粒治疗后肿瘤的代谢能力明显减低, 从而抑制肿瘤生长。

近几年来, 口腔医学院孙志军教授团队与物理与技术学院刘威教授、国世上教授团队通过医工交叉合作, 取得丰硕成果, 研究论文已先后发表在 *Advanced Materials*、*Advanced Functional Materials*、*Angew. Chem. Int. Ed.*、*Small*、*Nanoscale*、*ACS Applied Materials & Interfaces* 等期刊。

论文全文链接: <https://doi.org/10.1002/adfm.201801389>