

## 骨质疏松症大鼠脂肪干细胞成骨能力及 Mettl14和Notch1表达的探究\*

冯茂耕<sup>1</sup>, 杨双林<sup>2</sup>, 罗道文<sup>1</sup>, 彭双麟<sup>2</sup>, 娄方芝<sup>2</sup>, 肖金刚<sup>1,2△</sup>

1. 西南医科大学附属口腔医院 口腔颌面外科(泸州 646000);

2. 西南医科大学附属口腔医院 口腔颌面修复重建和再生实验室(泸州 646000)

**【摘要】目的** 比较骨质疏松症脂肪干细胞(osteoporosis adipose-derived stem cells, OP-ASCs)和正常脂肪干细胞(control adipose-derived stem cells, Ctrl-ASCs)成骨能力的差异,并探究RNA甲基化转移酶14(methyltransferase-like 14, Mettl14)以及Notch信号分子1(Notch signaling molecule 1, Notch1)的表达水平。**方法** 去势法(OVX)构建骨质疏松症SD大鼠动物模型(OP组),同时设立对照组(Ctrl组)。Micro-CT、HE和Masson染色鉴定骨质疏松症模型是否构建成功。贴壁法分离培养出OP-ASCs和Ctrl-ASCs。茜素红、阿利辛蓝和油红O染色检测OP-ASCs和Ctrl-ASCs三向分化能力,流式细胞术检测OP-ASCs和Ctrl-ASCs表面抗原CD29、CD44、CD90、CD31、CD34、CD45鉴定脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ASCs)。茜素红染色及Runx2相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)mRNA和蛋白的表达比较OP-ASCs和Ctrl-ASCs成骨能力的差异。实时荧光定量PCR、Western blot探究OP-ASCs和Ctrl-ASCs的Mettl14、Notch1在mRNA和蛋白水平上的表达差异。**结果** Micro-CT、HE和Masson染色显示OP组胫骨较Ctrl组骨小梁数量减少,间距增大,证明OP组建模成功。三向分化及流式细胞检测结果证明成功分离培养ASCs。成骨诱导后,茜素红染色显示OP-ASCs矿化结节较Ctrl-ASCs数量少、分布散在;OP-ASCs中Runx2表达较Ctrl-ASCs低( $P<0.05$ )。OP-ASCs的Mettl14以及Notch1表达较Ctrl-ASCs低( $P<0.05$ )。**结论** OP-ASCs成骨能力较Ctrl-ASCs低,OP-ASCs的Mettl14表达降低,Notch信号通路受到抑制。为进一步研究OP-ASCs成骨分化过程中Mettl14和Notch1的具体作用机制奠定了基础。

**【关键词】** 骨质疏松症大鼠 脂肪干细胞 骨向分化 RNA甲基化 Mettl14 Notch信号通路

### Osteogenic Capacity and Mettl14 and Notch1 Expression of Adipose-Derived Stem Cells from Osteoporotic Rats

FENG Mao-geng<sup>1</sup>, YANG Shuang-lin<sup>2</sup>, LUO Dao-wen<sup>1</sup>, PENG Shuang-lin<sup>2</sup>, LOU Fang-zhi<sup>2</sup>, XIAO Jin-gang<sup>1,2△</sup>. 1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Orofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory, the Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

△ Corresponding author, E-mail: drxiaojingang@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the differences in the osteogenic capacity of osteoporotic adipose-derived stem cells (OP-ASCs) and normal control adipose-derived stem cells (Ctrl-ASCs), and to examine the expression levels of RNA methyltransferase like 14 (Mettl14) and the Notch signaling molecule 1 (Notch1). **Methods** The osteoporosis (OP) model of SD rats was established with ovariectomy (OVX). Micro-CT, HE staining and Masson staining were performed to identify the successful establishment of the OP model, OP-ASCs and Ctrl-ASCs were isolated and cultured adherently. Then, the three-way differentiation capacity of the adipose-derived stem cells (ASCs) was determined through alizarin red staining, alcian blue staining and oil red O staining and flow cytometry was conducted to examine the surface antigens CD29, CD44, CD90, CD31, CD34, and CD45. Alizarin red staining and comparison of the mRNA and protein expression of Run-related transcription factor 2 (Runx2) were done to explore the differences in osteogenic potential of OP-ASCs and Ctrl-ASCs. Real-time PCR and Western blot were performed to explore the expression differences of Mettl14 and Notch1 at mRNA and protein levels between OP-ASCs and Ctrl-ASCs. **Results** Micro-CT, HE and Masson staining results showed that the number of trabecular bone decreased and the spacing increased in the tibias of the osteoporosis group (OP group) compared with those of the control group (Ctrl group), indicating that the OP model was established successfully. Three-way differentiation and flow cytometry results confirmed the successful isolation and culture of ASCs. After osteogenic induction, alizarin red staining showed that OP-ASCs had fewer number and more scattered distribution of mineralized nodules than Ctrl-ASCs did. The expression of Runx2 in OP-ASCs was lower than that in Ctrl-ASCs ( $P<0.05$ ). Mettl14 as well as Notch1 showed lower expression in OP-ASCs than they did in Ctrl-ASCs ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The osteogenic capacity of OP-ASCs was lower compared with that of Ctrl-ASCs, Mettl14 expression of

\* 国家自然科学基金(No. 81870746)、口腔疾病研究国家重点实验室开放课题(No. SKLOD2021OF08)和泸州市人民政府-西南医科大学合作项目(No. 2020LZXNYDZ09)资助

△ 通信作者, E-mail: drxiaojingang@163.com

OP-ASCs was decreased compared with that of Ctrl-ASCs, and the Notch signaling pathway was inhibited in OP-ASCs. The study helps build the foundation for further investigation in the specific mechanisms of Mettl14 and Notch1 during osteogenic differentiation of OP-ASCs.

**【Key words】** Osteoporotic rat Adipose-derived stem cells Osteogenic differentiation RNA methylation Mettl14 Notch signaling pathway

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种慢性进展性疾病,OP患者具有高骨折风险,且骨折或骨缺损后难以愈合<sup>[1]</sup>。研究OP病因、发病机制,最终达到预防和治疗OP,具有重大的经济和社会价值<sup>[2-3]</sup>。

真核细胞RNA上的化学修饰广泛参与细胞各种生命活动,这些化学修饰以甲基化为主,其中针对mRNA内部修饰丰富度最高的腺苷酸N<sup>6</sup>的甲基化修饰(N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A)研究较为深入,有研究表明,m<sup>6</sup>A甲基化可能对骨质疏松症的发生和发展起到重要作用<sup>[4-6]</sup>。m<sup>6</sup>A甲基化修饰由甲基转移酶复合体、脱甲基酶和功能管理者组成<sup>[7-8]</sup>。RNA甲基化转移酶14(methyltransferase like 14, Mettl14)是Writers重要成员,能促进RNA底物的结合和增强复合物的稳定性。骨质疏松症脂肪干细胞(osteoporosis adipose-derived stem cells, OP-ASCs)成骨能力改变可能与Mettl14表达改变有关。

Notch信号通路是进化上高度保守的一类级联通路,通过与其他信号分子之间相互作用,影响干细胞的增殖、分化和凋亡等细胞过程。有研究提出Notch信号通路通过影响成骨细胞和破骨细胞的增殖、分化从而调节骨代谢<sup>[9-11]</sup>。但Notch调节骨吸收的机制尚不完全清楚。我们推测OP-ASCs成骨能力改变可能与Notch信号通路有关。

因此本研究拟通过去势法构建OP大鼠模型,探究OP-ASCs和正常脂肪干细胞(control adipose-derived stem cells, Ctrl-ASCs)成骨能力的差异及Mettl14和Notch信号分子1(notch signaling molecule 1, Notch1)在大鼠OP-ASCs中的表达水平变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与仪器

**1.1.1 动物** SPF级SD雌性大鼠26只,许可证号:SYXK(川)2018-065,体质量(180±10)g,购于西南医科大学动物实验中心。

**1.1.2 主要试剂** CD29, APC(美国eBioscience公司); PE Mouse Anti-Rat CD31, PECY7 Mouse Anti-Rat CD90, PECY5 Mouse Anti-Rat CD45, FITC Mouse Anti-Rat CD44H(美国BD公司); CD34抗体(ICO115)PE(美国Santa cruz公司); Runx2抗体(美国Abcam公司); Notch1抗体(中国优宁维公司); Mettl14抗体(中国爱博泰克公司);

OriCell™ SD大鼠脂肪干细胞成骨诱导分化培养基试剂盒,SD大鼠脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基,SD大鼠脂肪间质干细胞成软骨诱导分化完全培养基(中国赛业公司)。

**1.1.3 仪器** 倒置相差显微镜(日本OLYMPUS IX 710公司);免疫荧光倒置相差显微镜,正置荧光显微镜(日本OLympus公司);qPCR仪(美国Thermo公司);SDS-PAGE电泳仪(美国Bio-rad公司)等。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验分组和OP大鼠动物模型的构建** 将26只SD大鼠随机均分为骨质疏松症组(OP组)和对照组(Ctrl组),每组13只。OP组采用切除双侧卵巢法(即去势法,OVX)构建OP模型:注射适量1%戊巴比妥(40 mg/kg)于大鼠腹腔麻醉。剃毛消毒后于大鼠背部约肋缘下1 cm、脊柱旁1.5 cm剪开,找到卵巢并结扎,摘除卵巢组织,缝合伤口。对照组仅切除卵巢周围等量脂肪组织。

**1.2.2 影像学和组织学检测** 建模12周后,从OP组和Ctrl组中分别随机取6只大鼠腹腔注射过量1%戊巴比妥(40 mg/kg)处死,其中3只大鼠双侧股骨胫骨送至西南医科大学附属医院核医学科行Micro-CT检查[检测指标为骨体积分数,即选取的骨体积(bone volume, BV)与总体积(total volume, TV)之比(BV/TV)值、骨小梁数量(trabecular number, Tb.N)值、骨小梁分离度(trabecular separation, Tb.Sp)值];剩下3只大鼠的双侧股骨胫骨固定,脱钙,制成石蜡切片,行HE和Masson染色。根据两组骨组织在影像图和切片图下骨小梁数目和分离度的差异来判断OP大鼠模型是否建立成功。

**1.2.3 细胞的分离培养** 建模12周后,在OP组与Ctrl组各取1只大鼠用上述同种方法处死,剪取脂肪组织培养脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ASCs),贴壁法分离并培养ASCs,做好组别标记,分别于P0代7 d和P1代5 d时光镜下观察并采图。

**1.2.4 流式细胞术鉴定ASCs表面抗原** 选取P3代对数生长期细胞制成细胞悬液,加入流式管中并离心,去上清液,重悬,加入鉴定抗体,避光孵育,空白对照不加试剂。孵育后重悬,离心,去上清液,再重悬,上机检测OP-ASCs和Ctrl-ASCs是否表达表面抗原CD29、CD44、CD90、CD31、CD34、CD45。

**1.2.5 细胞多向分化能力检测** 选取P2代对数生长期ASCs细胞,制成细胞悬液。

成骨能力检测: 悬液按 $5 \times 10^4$ 细胞/孔接种于6孔板, 12 h后, 培养基更改为成骨诱导液(SD大鼠脂肪间质干细胞成骨诱导分化基础培养基175 mL, 成骨诱导分化专用血清20 mL, 双抗2 mL, 谷氨酰胺2 mL, 抗坏血酸400  $\mu$ L,  $\beta$ -甘油磷酸钠2 mL, 地塞米松20  $\mu$ L, 按比例混合后吸取适量加入孔板), 每3 d换液, 2周后, 吸尽成骨诱导液, PBS漂洗3次, 加入体积分数4%的多聚甲醛固定20 min, PBS漂洗2次, 以1 mL/孔加入茜素红染液, 静置3~5 min。吸尽染液后, 用PBS洗3次, 倒置显微镜下观察并采图。

成脂能力检测: 悬液按 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 细胞/孔接种于6孔板。12 h后, 培养基更改为成脂诱导液(SD大鼠脂肪间质干细胞成脂诱导分化基础培养基A 175 mL, 专用胎牛血清20 mL, 谷氨酰胺2 mL, 双抗2 mL, 胰岛素400  $\mu$ L, 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤200  $\mu$ L, 罗格列酮200  $\mu$ L, 地塞米松200  $\mu$ L, 按比例混合后吸取适量加入孔板中), 3 d后换为B液(SD大鼠脂肪间质干细胞成脂诱导分化基础培养基B 175 mL, 专用胎牛血清20 mL, 双抗2 mL, 谷氨酰胺2 mL, 胰岛素400  $\mu$ L, 按比例混合后吸取适量加入孔板中), 1 d后再次换为A液, A、B液交替处理3周后, 吸尽成脂诱导液, PBS漂洗3次, 加入体积分数4%的多聚甲醛固定20 min, PBS漂洗2次。加入油红O染液, 静置30 min。吸尽染液后, 用PBS洗3次。倒置显微镜下观察并采图。

成软骨能力检测: 悬液按 $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ 细胞/管转移到15 mL离心管, 加入500  $\mu$ L成软骨诱导分化培养基(SD大鼠脂肪间质干细胞成软骨诱导分化基础培养基194 mL, 地塞米松20  $\mu$ L, 抗坏血酸600  $\mu$ L, 胰岛素转铁蛋白2 mL, 丙酮酸钠200  $\mu$ L, 脯氨酸200  $\mu$ L, 转化生长因子 $\beta$ 3 2 mL, 按比例混合后吸取适量加入孔板中), 拧松管盖正置放于37  $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>的孵育箱, 48 h后出现细胞团块, 换液时轻弹管壁使细胞团块脱落。每3 d换液。持续诱导3~4周, 福尔马林固定软骨球, 石蜡包埋处理, 切片, 行阿利辛蓝染色。正置荧光显微镜下进行采图。

**1.2.6 qPCR检测两组脂肪干细胞Runx2、Mettl14和Notch1的mRNA表达差异** 成骨诱导5 d后, 提取细胞总RNA, 逆转录得到cDNA, 在96孔板中加入实验试剂并混匀。每个样本平行设计3个副孔, 设置好反应程序, 以GAPDH为内参, 进行qPCR反应。之后分析扩增基因的熔解曲线、扩增曲线, 用GraphPadPrism6.0软件分析实验结果, 目的基因表达量按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。PCR引物由上海生物工程股份有限公司和成都擎科梓熙生物技术有限公司设计并合成。各引物序列见表1。

表1 Runx2、Mettl14、Notch1、GAPDH引物序列

Table 1 Primer sequences of Runx2, Mettl14, Notch1 and GAPDH

Primer	Sequences (5'-3')
Runx2	F: GAACCAAGAAGGCACAGAC
	R: AATGCGCCCTAAATCACTG
GAPDH	F: TCTTTGCTTGGGTGGGT
	R: GGGTCTGGCATTGTCT
Mettl14	F: AGTTTGGGAGCTGAGAGTG
	R: GTATCATAGGAAGCCCTGCA
Notch1	F: AGGCTCTGCCGACATCA
	R: AGGAAGGGGTGCTCTGG

**1.2.7 Western blot检测两组脂肪干细胞Runx2、Mettl14和Notch1的蛋白表达差异** 成骨诱导5 d后, 行全蛋白提取, 检测并调整蛋白样品浓度, 制胶并上样进行SDS-PAGE电泳, 结束后将凝胶和PVDF膜进行转膜并用脱脂牛奶封闭, 然后将膜放入一抗溶液孵育, 洗膜, 加入二抗溶液孵育, 再洗膜。膜于ECL发光液中泡置后进行曝光。以GAPDH为内参蛋白, 将目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值作为目的蛋白相对表达量。用Image J和GraphPad Prism6.0软件分析实验结果。

### 1.3 统计学方法

采用配对t检验进行两组比较实验的统计,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OP大鼠模型建立情况

Micro-CT检测发现 OP组大鼠胫骨的BV/TV值及Tb.N值比Ctrl组低, Tb.Sp值比Ctrl组高( $P < 0.05$ )。见图1。HE染色和Masson染色显示(图2), OP组胫骨相较Ctrl组的骨皮质变薄, 骨髓腔增大, 骨小梁减少。结合Micro-CT结果, 证明OP大鼠动物模型建立成功。

### 2.2 ASCs分离培养

分离培养的细胞培养至P0代7 d时, 呈束状或旋涡状; 传代培养至P1代5 d时, 细胞呈放射状或旋涡状排列, 有立体感(图3)。

### 2.3 ASCs细胞表面抗原流式鉴定结果

两组ASCs P3代对数生长期细胞表面抗原CD29、CD44、CD90均阳性表达, CD31、CD34、CD45几乎无阳性表达, 结果符合ASCs表面抗原的特征。见图4。

### 2.4 ASCs细胞多向分化能力鉴定结果

分离培养出的ASCs P2代细胞成骨诱导2周后, 茜素红染色可见矿化结节(图5A), P2代细胞成骨诱导3~4周后, 阿利辛蓝染色石蜡切片可见蓝色软骨细胞基质

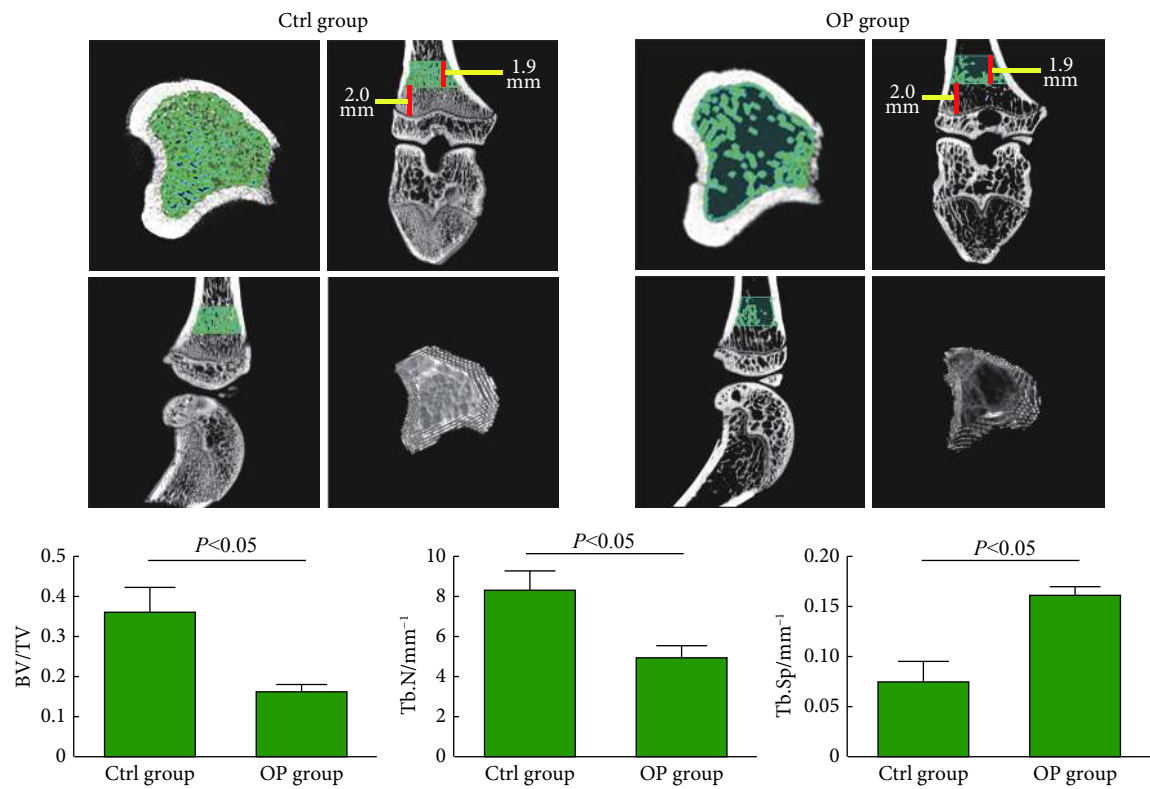


图 1 对照组和骨质疏松组大鼠胫骨Micro-CT扫描结果 (n=3)

Fig 1 Micro-CT analysis of the tibias of the control group and the osteoporosis group (n=3)

BV/TV: Bone volume/total volume; Tb.N: Trabecular number; Tb.Sp: Trabecular separation.

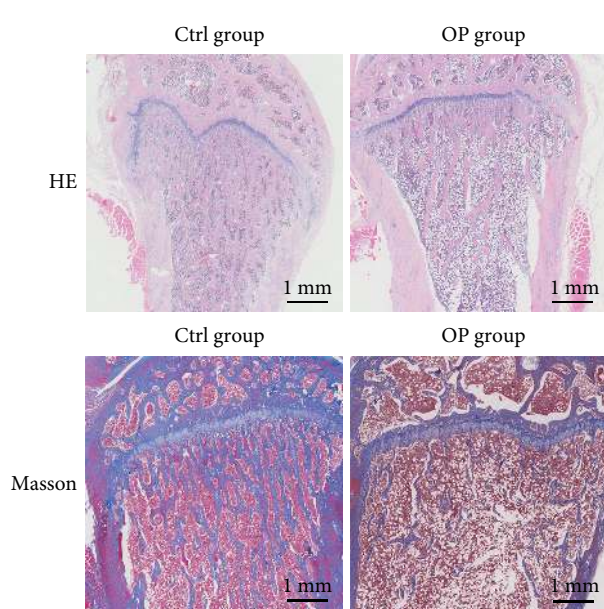


图 2 对照组与骨质疏松组的HE染色和Masson染色

Fig 2 The images of HE staining and Masson staining of control group and osteoporosis group

(图5B), P2代细胞成脂诱导3周后, 油红O染色可见脂滴形成(图5C)。结合细胞流式检测结果, 可证明所分离的细胞为ASCs。

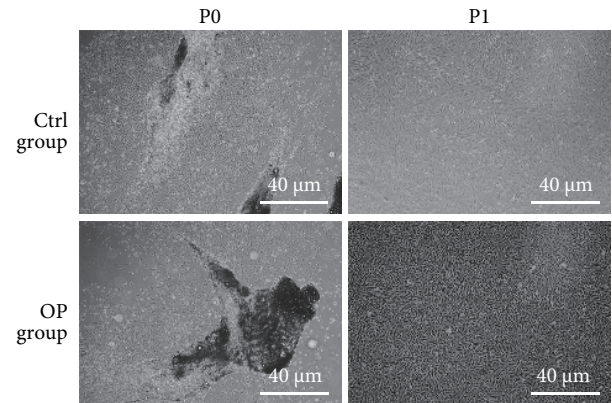


图 3 对照组和骨质疏松组脂肪干细胞光镜下的细胞形态

Fig 3 The images of cell morphology of Ctrl-ASCs and OP-ASCs under light microscope

### 2.5 成骨诱导2周后两组细胞成骨能力比较

成骨诱导2周后, 经茜素红染色可见, OP组较Ctrl组矿化结节数量少, 且分布散在(图6)。

### 2.6 成骨诱导5 d后, 两组ASCs细胞Runx2、Mettl14和Notch1的mRNA和蛋白表达

OP组Runx2、Mettl14、Notch1在mRNA水平与蛋白水平表达(图7、图8、图9)均低于Ctrl组, 差异均有统计学意义(P<0.05)。

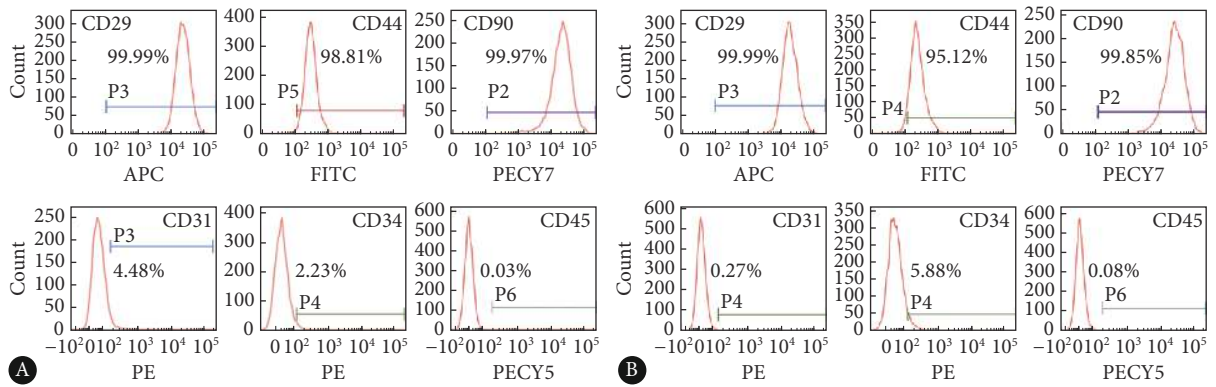


图4 对照组 (A) 和骨质疏松组 (B) 脂肪干细胞表型流式鉴定结果

Fig 4 Surface antigen flow cytometry identification of Ctrl-ASCs (A) and OP-ASCs (B)

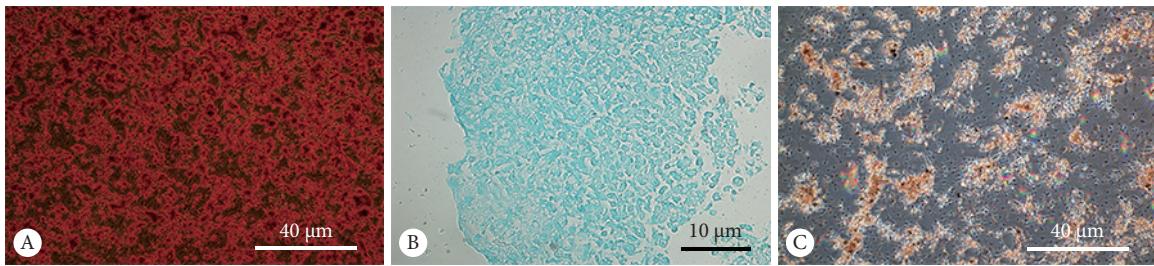


图5 对照组脂肪干细胞三向分化能力镜下观

Fig 5 The three-way differentiation of Ctrl-ASCs under microscope

A: Alizarin red staining (osteogenic capability); B: Alcian blue staining (chondrogenic capability); C: Oil red O staining (adipogenic capability).

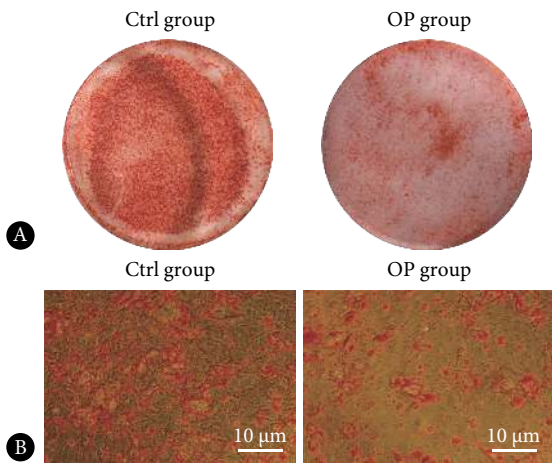


图6 对照组和骨质疏松症组脂肪干细胞成骨诱导2周茜素红染色肉眼观 (A) 和镜下观 (B)

Fig 6 The picture of alizarin red staining of control group and osteoporosis group ASCs on 2 weeks osteogenic induction by way of macroscopic observation (A) and microscopic observation (B)

### 3 讨论

OP是一种系统性骨病, 临床表现通常为骨小梁疏松、骨质变脆<sup>[12-14]</sup>。由于OP病程较长, 原因复杂, 临床人体实验风险过高, 因此构建实验动物模型是研究OP发病机制、治疗方法的基础。其中OVX建立的OP大鼠模型是

经典模型<sup>[15]</sup>。所以本研究采用去势法建立OP大鼠模型, 在术后12周, Micro-CT显示OP组胫骨的骨小梁数目和体积较Ctrl组低; HE、Masson染色表明OP组胫骨的骨皮质变薄, 骨髓腔增大, 骨小梁减少, 符合OP的临床表现和诊断依据<sup>[16]</sup>, 表明本研究采用的去势法成功构建OP大鼠模型。

OP患者的骨重建能力有限, 其骨缺损或骨折的修复重建一直是困扰临床的难题。近年来, 组织工程骨受到更多学者的关注, ASCs作为骨组织工程的种子细胞之一, 具有来源丰富、成骨向分化能力强等优点, 在治疗OP患者骨缺损的组织工程骨修复研究中具有良好的应用前景<sup>[17]</sup>。但取材过程中掺杂血管, 在原代培养的细胞中也存在杂细胞, ASCs的纯度和干性需要鉴定, 有文献报道采用流式细胞术鉴定细胞的表面抗原是一种有效的细胞类别检测方法<sup>[18]</sup>。因此本研究共选取CD29、CD44、CD90、CD31、CD34、CD45这6个表面抗原进行检测, 结果显示两组分离培养出的ASCs均为CD29、CD44、CD90阳性表达, CD31、CD34、CD45阴性表达, 结合三向分化潜能的检测结果提示本研究成功分离培养ASCs并且其纯度较高。

Runx2是转录因子RunxX家族成员之一, 是干细胞骨向分化过程的产物, 参与了骨代谢调控以及成骨细胞的分化, 对骨组织的形成和重建十分重要。研究表明, 骨形

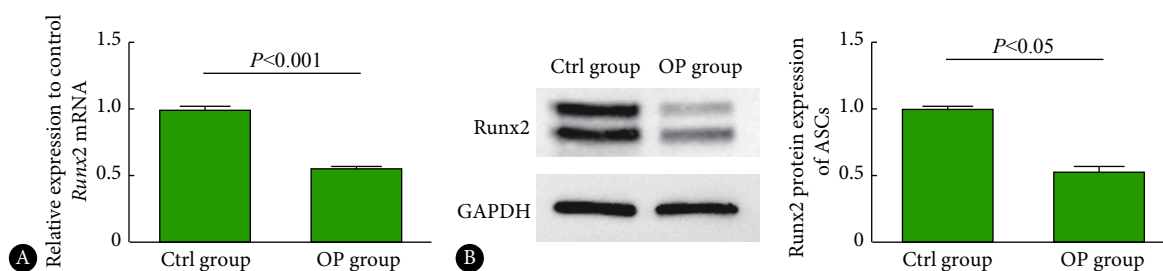


图 7 成骨诱导 5 d 后, 对照组和骨质疏松组 Runx2 在 mRNA 水平 (A) 和蛋白水平 (B) 的表达 ( $n=3$ )

Fig 7 The mRNA (A) and protein (B) expression of Runx2 in the Ctrl-ASCs and OP-ASCs after osteogenic induction for 5 d ( $n=3$ )

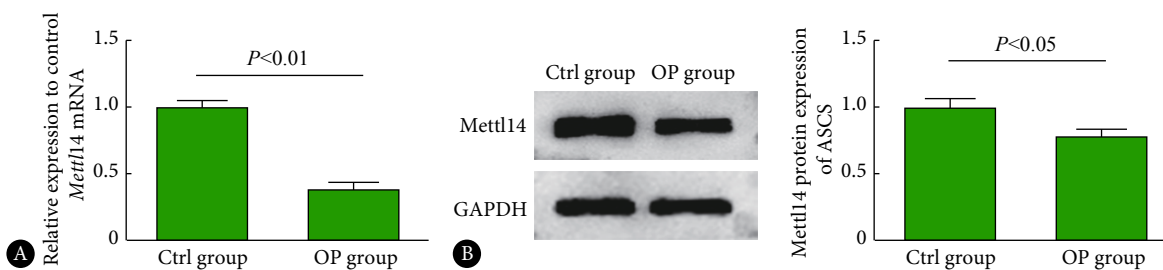


图 8 成骨诱导 5 d 后, 对照组和骨质疏松组 Mettl14 在 mRNA 水平 (A) 和蛋白水平 (B) 的表达 ( $n=3$ )

Fig 8 The mRNA (A) and protein (B) expression of Mettl14 in the Ctrl-ASCs and OP-ASCs after osteogenic induction for 5 d ( $n=3$ )

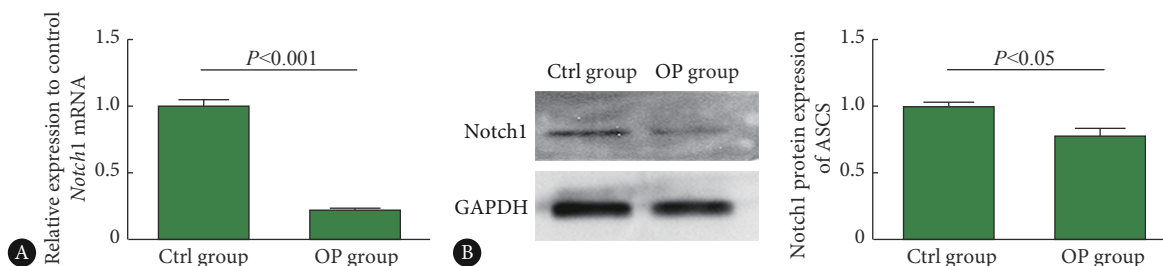


图 9 成骨诱导 5 d 后, 对照组和骨质疏松组 Notch1 在 mRNA 水平 (A) 和蛋白水平 (B) 的表达 ( $n=3$ )

Fig 9 The mRNA (A) and protein (B) expression of Notch1 in the Ctrl-ASCs and OP-ASCs after osteogenic induction for 5 d ( $n=3$ )

态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 和环状 Runt 相关转录因子 2 (circular runt-related transcription factor 2, circRunx2) 可诱导 Runx2 的表达刺激成骨细胞增殖而诱导骨形成<sup>[19-20]</sup>。本研究检测 OP-ASCs Runx2 在 mRNA 和蛋白水平表达均低于 Ctrl-ASCs。OP-ASCs 和 Ctrl-ASCs 成骨诱导后行茜素红染色显示 OP 组矿化结节数量较少。结果表明 OP 组 ASCs 成骨能力较 Ctrl 组低。

m<sup>6</sup>A 广泛存在于 mRNA 上的碱基修饰, 在翻译中有监管作用, 并响应相应的 mRNA 翻译<sup>[21-24]</sup>。研究表明, m<sup>6</sup>A 修饰不仅参与骨组织的生长, 而且 Writers 和 Erasers 能够调节成骨与成脂分化间的关系, 其中 Writers 的表达与干细胞成骨分化潜能呈正相关<sup>[4]</sup>。本研究检测 Mettl14 的表达发现, 相较于 Ctrl-ASCs, OP-ASCs 的 Mettl14 表达下降, 结合相关文献研究结果<sup>[25-26]</sup>, 我们推测 OP-ASCs 的成骨能力下降与 Mettl14 表达改变有关, 可通过调节 OP-ASCs Mettl14 表达来观测其成骨能力的改变。

Notch 信号通路是决定干细胞命运的通路之一, 在调

节细胞增殖、分化、凋亡等方面十分重要<sup>[27-29]</sup>。有研究报道, 被 Notch2 细胞内结构域激活的 Notch 信号会抑制骨髓间充质干细胞原代培养物中的成骨细胞的分化<sup>[9]</sup>。本研究检测 Notch1 表达发现, OP-ASCs 的 Notch1 表达下降, Notch 信号通路被抑制, 猜想 OP-ASCs 的成骨能力下降可能与 Notch1 表达改变有关, 可调节 Notch 通路来改变 Notch1 的表达, 进而观测其成骨能力的改变。

有研究报道, 在膀胱肿瘤起始细胞中, 调节 Mettl14 的表达会引起 Notch1 表达量的改变, 从而影响膀胱肿瘤起始细胞的自我更新, 而膀胱肿瘤起始细胞可以驱动膀胱肿瘤的发生和转移<sup>[30]</sup>。结合本研究结果, OP-ASCs 成骨能力下降的原因可能是其 Mettl14 表达下降, 抑制 Notch 信号通路, 导致成骨能力的降低。Mettl14 如何与 Notch 信号通路相互作用调控 OP-ASCs 成骨能力, 需要进一步探究。

综上所述, 本研究建立了 OP 大鼠模型, 成功分离培养 Ctrl-ASCs 和 OP-ASCs, 证明了相对于 Ctrl-ASCs, OP-ASCs 的成骨能力下降, OP-ASCs 的 Mettl14 表达下降, Notch 信

号通路受到抑制。为进一步研究OP-ASCs成骨分化过程中Mettl14和Notch1的具体调控机制奠定了实验基础。

\* \* \*

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] LI W, HOU S, YU B, *et al.* Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation. *Hum Genet*, 2010, 127(3): 249–285.
- [2] GENANT H, COOPER C, POOR G, *et al.* Interim report and recommendations of the World Health Organization task-force for osteoporosis. *Osteoporos Int*, 1999, 10(4): 259–264.
- [3] 游利. 骨质疏松症的现状、筛查和预防. *中国全科医学*, 2016, 19(14): 1616–1619.
- [4] CHEN X J, HUA W F, HUANG X, *et al.* Regulatory role of RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine modification in bone biology and osteoporosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 911[2021-04-15]. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00911>.
- [5] YAN G, YUAN Y, HE M, *et al.* m<sup>6</sup>A methylation of precursor-miR-320/RUNX2 controls osteogenic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 421–436.
- [6] ZHANG Q, RIDDLE R, YANG Q, *et al.* The RNA demethylase FTO is required for maintenance of bone mass and functions to protect osteoblasts from genotoxic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(36): 17980–17989.
- [7] BOKAR J, SHAMBAUGH M, POLAYES D, *et al.* Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N<sup>6</sup>-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, 1997, 3(11): 1233–1247.
- [8] LIU J, YUE Y, HAN D, *et al.* A Mettl3-Mettl14 complex mediates mammalian nuclear RNA N<sup>6</sup>-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2): 93–95.
- [9] LEE S Y, LONG F X. Notch signaling suppresses glucose metabolism in mesenchymal progenitors to restrict osteoblast differentiation. *J Clin Invest*, 2018, 128(12): 5573–5586.
- [10] WESTIN J. Status of PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2014, 14(5): 335–342.
- [11] BALDRIDGE D, SHCHELOCHKOV O, KELLEY B, *et al.* Signaling pathways in human skeletal dysplasias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2010, 11: 189–217.
- [12] YINGLING V, MITCHELL K, LUNNY M. Acute hypothalamic suppression significantly affects trabecular bone but not cortical bone following recovery and ovariectomy surgery in a rat model. *Peer J*, 2016, 12(4): 1575–1595.
- [13] LIU Z, LIANG W, KANG D, *et al.* Increased osteoblastic Cxcl9 contributes to the uncoupled bone formation and resorption in postmenopausal osteoporosis. *Clin Interv Aging*, 2020, 15: 1201–1212.
- [14] WU T, SUN J, TAN L, *et al.* Enhanced osteogenesis and therapy of osteoporosis using simvastatin loaded hybrid system. *Bioact Mater*, 2020, 5(2): 348–357.
- [15] BRENNAN O, SWEENEY J, O'MEARA B, *et al.* A natural, calcium-rich marine multi-mineral complex preserves bone structure, composition and strength in an ovariectomised rat model of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 2017, 101(4): 445–455.
- [16] RIANCHO J, OLMOS J, PINEDA B, *et al.* Wnt receptors, bone mass, and fractures: gene-wide association analysis of LRP5 and LRP6 polymorphisms with replication. *Eur J Endocrinol*, 2011, 164(1): 123–131.
- [17] CHEN H, LEE M, CHEN C, *et al.* Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(3): 582–593.
- [18] WANG L, HUANG C, LI Q, *et al.* Osteogenic differentiation potential of adipose-derived stem cells from ovariectomized mice. *Cell Prolif*, 2017, 50(2): e12328[2021-04-15]. <https://doi.org/10.1111/cpr.12328>.
- [19] JAVED A, AFZAL F, BAE J S, *et al.* Specific residues of Runx2 are obligatory for formation of BMP2-induced Runx2-SMAD complex to promote osteoblast differentiation. *Cells Tissues Organs*, 2009, 189(1/2/3/4): 133–137.
- [20] YIN Q, WANG J, FU Q, *et al.* CircRUNX2 through has-miR-203 regulates RUNX2 to prevent osteoporosis. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(12): 6112–6121.
- [21] ZHANG C X, CHEN Y S, SUN B F, *et al.* m<sup>6</sup>A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification. *Nature*, 2017, 549(7671): 273–276.
- [22] DOMINISSINI D, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, SCHWARTZ S, *et al.* Topology of the human and mouse m<sup>6</sup>A RNA methylomes revealed by m<sup>6</sup>Aseq. *Nature*, 2012, 485(7397): 201–206.
- [23] MEYER K, SALETORRE Y, ZUMBO P, *et al.* Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, 149(7): 1635–1646.
- [24] CARROLL S, NARAYAN P, ROTTMAN F. N<sup>6</sup>-methyladenosine residues in an intron-specific region of prolactin pre-mRNA. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(9): 4456–4465.
- [25] TIAN C, HUANG Y L, LI Q M, *et al.* Mettl3 regulates osteogenic differentiation and alternative splicing of vegfa in bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 551[2021-04-15]. <https://doi.org/10.3390/ijms20030551>.
- [26] WU Y, XIE L, WANG M, *et al.* Mettl3-mediated m<sup>6</sup>A RNA methylation regulates the fate of bone marrow mesenchymal stem cells and osteoporosis. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4772[2021-04-15]. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06898-4>.
- [27] BRAY S. Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(11): 722–735.
- [28] WEI C X, PHANG C W, JIAO R J. Epigenetic regulation of Notch signaling during drosophila development. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1218: 59–75.
- [29] MASHANOV V, AKIONA J, KHOURY M, *et al.* Active Notch signaling is required for arm regeneration in a brittle star. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232981[2021-04-15]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232981>.
- [30] GU C H, WANG Z Y, ZHOU N C, *et al.* Mettl14 inhibits bladder TIC self-renewal and bladder tumorigenesis through N<sup>6</sup>-methyladenosine of Notch1. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 168[2021-04-15]. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1084-1>.

(2021-02-01收稿, 2021-04-16修回)

编辑 汤洁