

• 干细胞与组织工程 •

# 环指蛋白 11 调控 Akt 信号通路促进 BMSCs 成骨分化的机制研究

邓雯<sup>1</sup>, 龙婷<sup>2</sup>, 杜英<sup>3</sup>

1. 中山大学孙逸仙纪念医院生物治疗技术中心(广州 510120)

2. 中山大学中山医学院(广州 510080)

3. 郑州大学基础医学院微生物学与免疫学系(郑州 450001)

**【摘要】** 目的 研究 BMSCs 成骨分化过程中环指蛋白 11 (ring finger protein 11, RNF11) 对 Akt 信号通路的调节作用, 为进一步阐明 BMSCs 成骨分化机制和用于临床治疗提供思路。方法 从健康人体新鲜骨髓中分离培养 BMSCs 并传代, 取第 4 代细胞经流式细胞术, 成骨、成软骨和成脂诱导培养鉴定后用于实验。BMSCs 成骨诱导分化培养 0~14 d, 通过茜素红染色和 ALP 染色检测其成骨分化程度, 并用 Western blot 法检测 RNF11 蛋白表达。取第 4 代 BMSCs, 分为空白对照组(A 组)、空载慢病毒(Lv-NC)组(B 组)和敲低 RNF11(Lv-ShRNF11)组(C 组), 成骨诱导分化培养 0~14 d, 采用 Western blot 检测 RNF11 蛋白表达, 茜素红染色和 ALP 染色检测其成骨分化程度, 14 d 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 检测 BMSCs 成骨标志物 Runx2、骨钙素(osteocalcin, OCN)及骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的 mRNA 相对表达量; 采用 Western blot 检测 Akt、Smad1/5/8 及  $\beta$ -catenin 信号通路蛋白相对表达量, 以磷酸化前后比值表示。为研究 RNF11 对 Akt 信号通路的影响机制, 取第 4 代 BMSCs 分为 Lv-NC 转染组(A1 组)、Lv-ShRNF11 转染组(B1 组)和添加 Akt 信号通路激活剂 SC79 的 Lv-ShRNF11 转染组(C1 组), 14 d 时采用 Western blot 检测 RNF11 和 Akt 信号通路蛋白相对表达量, 茜素红染色、ALP 染色及 qRT-PCR 检测成骨相关指标。**结果** 流式细胞术及成骨、成软骨和成脂诱导培养鉴定显示分离培养细胞为 BMSCs。RNF11 蛋白相对表达量随成骨分化时间延长而逐渐增加( $P<0.05$ ); 下调 RNF11 后, 茜素红和 ALP 染色示 C 组相较于 A、B 组 BMSCs 成骨分化程度降低, qRT-PCR 检测示 Runx2、OCN、OPN mRNA 相对表达量减少( $P<0.05$ )。随成骨分化时间延长, RNF11 与 Akt 信号通路蛋白相对表达量均上升( $P<0.05$ )。下调 RNF11 后, C 组相较于 A、B 组, 其 Akt 信号通路蛋白相对表达量显著降低( $P<0.05$ ), 而对 Smad1/5/8 以及  $\beta$ -catenin 信号通路蛋白相对表达量无明显影响( $P>0.05$ )。B1、C1 组相较于 A1 组, 其 RNF11 蛋白相对表达量减少( $P<0.05$ ), B1 组相较于 A1、C1 组, 其 Akt 信号通路蛋白相对表达量降低( $P<0.05$ ); 茜素红与 ALP 染色示 C1 组 BMSCs 成骨分化程度稍低于 A1 组( $P>0.05$ ), 而明显高于 B1 组( $P<0.05$ ); qRT-PCR 检测示 C1 组 Runx2、OCN、OPN mRNA 相对表达量稍低于 A1 组( $P>0.05$ ), 而明显高于 B1 组( $P<0.05$ )。**结论** RNF11 通过正向调控 Akt 信号通路激活水平促进 BMSCs 向成骨细胞分化。RNF11 可作为提高 BMSCs 修复骨缺损疗效以及治疗骨代谢病的潜在靶点。

**【关键词】** BMSCs; 成骨分化; 环指蛋白 11; Akt 信号通路; 组织工程骨; 骨缺损修复

## Mechanism of ring finger protein 11 regulating Akt signaling pathway to promote osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

DENG Wen<sup>1</sup>, LONG Ting<sup>2</sup>, DU Ying<sup>3</sup>

1. Biotherapy Center, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou Guangdong, 510120, P. R. China

2. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou Guangdong, 510080, P. R. China

3. Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou Henan, 450001, P. R. China

Corresponding author: DU Ying, Email: duyong@zzu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the role and regulatory mechanism of ring finger protein 11 (RNF11) on Akt signaling pathway in the process of osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) to provide ideas

DOI: 10.7507/1002-1892.202107108

通信作者: 杜英, Email: duyong@zzu.edu.cn

for further clarifying its osteogenesis mechanism and its use in clinical treatment in the future. **Methods** BMSCs were isolated and cultured from fresh bone marrow of healthy donors and subcultured. The 4th generation cells were used in experiments after identification by flow cytometry, and osteogenic, chondrogenic, and adipogenic induction. BMSCs were cultured in osteogenic differentiation medium for 0-14 days. The degree of osteogenic differentiation was detected by Alizarin red staining and alkaline phosphatase (ALP) staining, and the protein expression of RNF11 was detected by Western blot. The 4th generation BMSCs were divided into blank control group (group A), empty lentivirus (Lv-NC) group (group B), and knockdown RNF11 (Lv-ShRNF11) group (group C). Osteogenesis was induced and cultured for 0-14 days. The expression of RNF11 protein was detected by Western blot, the degree of osteogenic differentiation was detected by Alizarin red staining and ALP staining, and the relative mRNA expressions of Runx2, osteocalcin (OCN), and osteopontin (OPN) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The protein relative expressions of Akt, Smad1/5/8, and  $\beta$ -catenin signaling pathway were detected by Western blot, expressed as the ratio before and after phosphorylation. In order to study the effect mechanism of RNF11 on Akt signaling pathway, the 4th generation BMSCs were divided into Lv-NC transfection group (group A1), Lv-ShRNF11 transfection group (group B1), and Lv-ShRNF11 transfection supplemented with Akt signaling pathway activator SC79 group (group C1). The protein relative expressions of RNF11 and Akt signaling pathway were detected by Western blot, the related osteogenesis indexes were detected by Alizarin red staining, ALP staining, and qRT-PCR. **Results** The flow cytometry, and osteogenic, chondrogenic, adipogenic induction culture identification showed that the isolated and cultured cells were BMSCs. The protein relative expression of RNF11 increased gradually with the extension of osteogenic differentiation time ( $P < 0.05$ ); after knockdown RNF11, Alizarin red and ALP stainings showed that the degree of osteogenic differentiation of BMSCs in group C were significantly lower than those in groups A and B, and qRT-PCR detection showed that the relative expression of Runx2, OCN, and OPN mRNA significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The protein relative expressions of RNF11 and Akt signaling pathway significantly increased with the extensions of osteogenic differentiation time ( $P < 0.05$ ). After knockdown RNF11, the protein relative expression of Akt signaling pathway in group C was significantly lower than that in groups A and B ( $P < 0.05$ ), while Smad1/5/8 and  $\beta$ -catenin signaling pathway had no significant effect ( $P > 0.05$ ). Compared with group A1, the protein relative expression of RNF11 in groups B1 and C1 significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with groups A1 and C1, the protein relative expression of Akt signaling pathway in group B1 was significantly lower ( $P < 0.05$ ); Alizarin red and ALP stainings showed that the degree of osteogenic differentiation of BMSCs in group C1 were slightly lower than that of group A1 ( $P > 0.05$ ), but significantly higher than that of group B1 ( $P < 0.05$ ); qRT-PCR detection showed that the relative expressions of Runx2, OCN, and OPN mRNA in group C1 were slightly lower than those of group A1 ( $P > 0.05$ ), but were significantly higher than those of group B1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** RNF11 promotes the differentiation of BMSCs into osteoblasts by positively regulating the activation level of Akt signaling pathway. RNF11 can be used as a potential target to improve the bone repair efficacy of BMSCs and treat bone metabolic diseases.

**【Key words】** Bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenesis; ring finger protein 11; Akt signaling pathway; tissue engineered bone; bone defect repair

骨缺损是骨科常见疾病之一, 其治疗手段主要有自体骨、同种异体骨或人工骨移植修复, 但自体骨移植取材较复杂且增加了患者痛苦, 同种异体骨移植存在免疫排斥、疾病传播等问题, 人工骨移植优点较多, 但也存在诸多局限<sup>[1-2]</sup>。组织工程骨技术是骨缺损治疗的主要发展方向。MSCs 是一种在体内分布广泛、来源丰富的多能祖细胞, 免疫原性低, 具有成脂、成软骨和成骨多向分化潜能<sup>[1-3]</sup>。在附着于生物材料的情况下, MSCs 可快速分化为成骨细胞, 形成膜内骨<sup>[4-5]</sup>, 不仅极大程度解决了免疫排斥问题, 还可以结合 3D 打印技术实现精准、可控的骨缺损修复<sup>[6-7]</sup>。Maruyama 等<sup>[8-9]</sup>研究还发现,

MSCs 与免疫细胞共同参与骨愈合的炎症阶段, 相互拮抗以调节骨愈合过程。然而, 调控 MSCs 成骨分化的分子机制尚未完全阐明, 阻碍了临床上基于 MSCs 的骨缺损细胞疗法进一步发展<sup>[1]</sup>。因此, 有必要进一步阐明 MSCs 成骨分化的分子调控机制。

Akt 是 PI3K 的下游效应分子, PI3K/Akt 信号通路在细胞增殖、分化、凋亡过程中起着重要作用, 尤其是软骨细胞、成骨细胞、成肌细胞和脂肪细胞<sup>[10]</sup>。PI3K/Akt 信号通路的活化有助于抑制骨质疏松<sup>[11]</sup>。Peng 等<sup>[12]</sup>发现当敲除 Akt1 和 Akt2 基因时, 小鼠会表现出严重的生长发育障碍, 包括骨骼发育迟缓、皮肤发育不全、骨骼肌萎缩和成脂障

碍。环指蛋白 11 (ring finger protein 11, RNF11) 是环指蛋白家族中的重要成员之一, 由 154 个氨基酸构成, 在生物进化过程中有高度保守性<sup>[13-15]</sup>。RNF11 在生物体内发挥重要作用, 包括细胞中的物质运输、信号传导以及肿瘤发生等<sup>[16]</sup>, 其通过 E3 泛素连接酶属性参与多种生理及病理过程<sup>[14, 17-19]</sup>。既往研究已发现 RNF11 在骨骼中表达丰度很高<sup>[20]</sup>, 但在骨骼发育中的作用却鲜有研究。本研究通过敲低 RNF11 在 BMSCs 中的表达后, 检测 Akt 信号通路蛋白的表达, 探讨 RNF11 如何参与调控 BMSCs 成骨分化过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

健康人体新鲜骨髓样品由志愿者捐赠。293T 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司)。DMEM 培养基 (HyClone 公司, 美国); 聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (Millipore 公司, 德国); Trizol (Invitrogen 公司, 美国); 重组慢病毒载体 (上海吉凯基因医学科技股份有限公司); Prime-Script II cDNA 合成试剂盒 (D6210A) (Takara 公司, 日本); 茜素红 (上海中乔新舟生物科技有限公司); 阿利新蓝、ALP、油红 O 染色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。Merinton MA1000 显微分光光度计 (北京美林恒通仪器有限公司); LightCycler480 PCR system (Roche 公司, 瑞士); Immobilon Western Chemiluminescent 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 底物曝光 (Millipore 公司, 德国); Coulter 流式细胞仪系统 (Beckman Coulter 公司, 美国); 石蜡切片机、石蜡包埋机 (Leica 公司, 德国)。

### 1.2 BMSCs 分离、培养及鉴定

**1.2.1 BMSCs 分离培养** 取健康人体新鲜骨髓样品, 分离、纯化后接种至 12 孔板, 使用含 10%FBS 的 DMEM 培养基进行重悬和培养 (培养条件为 37℃、5%CO<sub>2</sub>), 每 3 天更换 1 次培养液。当细胞融合度达 90% 左右时进行传代, 取第 4 代细胞进行以下实验。

**1.2.2 BMSCs 鉴定** ① 流式细胞术: 取获得的第 4 代细胞与抗 CD14、CD45、HLA-DR、CD29、CD44、CD105 抗体于 4℃ 下孵育 30 min, 然后离心洗涤细胞, 通过流式细胞仪系统进行分析。② BMSCs 分化潜能检测: 取获得的第 4 代细胞, 行成骨、成软骨及成脂诱导分化 14 d 后, 分别行茜素红染色、阿利新蓝染色和油红 O 染色观察。

### 1.3 RNF11 在 BMSCs 成骨分化过程中的表达

**1.3.1 BMSCs 成骨分化规律** 于 BMSCs 成骨诱导分化 0、3、7、10、14 d, 分别行茜素红染色 [以 562 nm 处吸光度 (A) 值作为阳性染色钙结节数量] 和 ALP 染色 (检测 ALP 活性) 定量检测, 观察 BMSCs 的成骨分化规律。

**1.3.2 Western blot 检测 RNF11 在 BMSCs 成骨分化过程中的表达** 于 BMSCs 成骨诱导分化第 0、3、7、10、14 天, 使用 RIPA 裂解 BMSCs, 提取细胞裂解液, 于 4℃ 以离心半径 20 cm、12 000 r/min 离心 30 min, 然后加入 Loading buffer 混匀煮沸。用等量蛋白质上样至 10%SDS-PAGE 中, 电泳分离, 再转印至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂奶粉封闭 1 h; 加入 GAPDH、RNF11 一抗 (1 : 1 000) 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次; 用 HRP 偶联的二抗 (1 : 3 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次; 最后用 Immobilon Western Chemiluminescent HRP 底物曝光检测 RNF11 蛋白相对表达量。

### 1.4 下调 RNF11 对 BMSCs 体外成骨分化能力的影响

**1.4.1 实验分组** 取第 4 代 BMSCs, 分为空白对照组 (A 组)、空载慢病毒 (Lv-NC) 组 (B 组) 和敲低 RNF11 (Lv-ShRNF11) 组 (C 组)。A 组不作任何处理, B、C 组细胞分别转染慢病毒 Lv-NC 和 Lv-ShRNF11。慢病毒转染方法: 选一段最佳敲除序列构建慢病毒载体, 然后通过转染将质粒包装至 293T 细胞中; 转染 72 h 后以离心半径 20 cm、12 000 r/min 离心 30 min, 将含有慢病毒的上清液转移至另一管中并浓缩; 将浓缩液与聚丙烯酰胺添加至 BMSCs 中孵育 24 h, 然后将培养基更换为成骨诱导分化培养基。

**1.4.2 观测指标** ① 各组成骨诱导分化 3、7、10、14 d, 同上述法采用 Western blot 检测 RNF11 蛋白表达, 茜素红染色定量检测阳性钙结节数量, ALP 染色检测 ALP 活性。② 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 检测: 各组成骨诱导分化 14 d 去除培养基, 加入 1 mL Trizol 裂解细胞, 室温孵育 5 min, Trizol 提取细胞 RNA, 用 Merinton MA1000 显微分光光度计在 260 nm 和 280 nm 处测量 A 值, 用 PrimeScript II cDNA 合成试剂盒 (D6210A) 生成 cDNA 模板, 然后用 LightCycler480 PCR system 进行 qRT-PCR 检测, 以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 BMSCs 成骨标志物 Runx2、骨钙素 (osteocalcin, OCN) 及骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 的 mRNA 相

对表达量。引物序列见表 1。

### 1.5 RNF11 对 Akt 信号通路的影响

**1.5.1 RNF11 与 Akt 信号通路蛋白相对表达量在 BMSCs 成骨分化过程中的表达** 取第 4 代 BMSCs 行成骨诱导分化培养, 培养 0、7、14 d 时, 同法采用 Western blot 检测 RNF11 及 Akt 信号通路蛋白相对表达量, 后者以磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, p-Akt)/Akt 比值表示。

**1.5.2 下调 RNF11 对 Akt 信号通路的影响** 同 1.4.1 方法分组, 于各组成骨诱导分化培养 14 d, 采用 Western blot 检测  $\beta$ -catenin、Akt 及 Smad1/5/8 信号通路蛋白相对表达量, 分别以 p- $\beta$ -catenin/ $\beta$ -catenin、p-Akt/Akt、p-Smad1/Smad1 比值表示。

### 1.6 RNF11 对 Akt 信号通路的影响机制

**1.6.1 实验分组** 取第 4 代 BMSCs, 分为 Lv-NC 转染组 (A1 组)、Lv-ShRNF11 转染组 (B1 组) 和添加 Akt 信号通路激活剂 SC79 (3  $\mu$ g/mL) 的 Lv-ShRNF11 转染组 (C1 组)。慢病毒转染方法同

1.4.1。转染后各组行成骨诱导分化。

**1.6.2 观测指标** 各组成骨诱导分化 14 d, 同法采用 Western blot 检测 RNF11 和 Akt 信号通路蛋白相对表达量, 茜素红染色定量检测阳性钙结节数量, ALP 染色检测 ALP 活性, qRT-PCR 检测 Runx2、OCN、OPN mRNA 相对表达量。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计量资料均符合正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验; 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 BMSCs 鉴定

流式细胞术检测示, 所培养细胞表面标志物 CD14、CD45、HLA-DR 表达呈阴性, 而 CD29、CD44 及 CD105 表达呈阳性, 与 MSCs 表面标志物表达模式一致。见图 1。成骨诱导分化 14 d 后茜素

表 1 qRT-PCR 各基因引物序列

Tab.1 Primer sequences of qRT-PCR genes

基因 Gene	引物序列 (5'→3')	
	上游 Forward	下游 Reverse
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
Runx2	TCAACGATCTGAGATTTGTGGG	GGGGAGGATTTGTGAAGACGG
OCN	CACTCCTCGCCCTATTGGC	CCCTCCTGCTTGGACACAAAG
OPN	GAAGTTTCGCAGACCTGACAT	GTATGCACCATTCAACTCCTCG

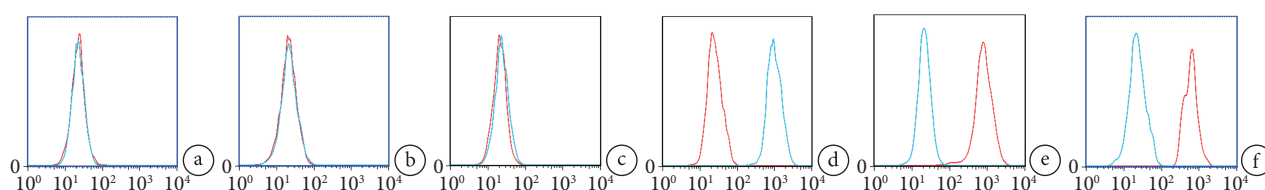


图 1 BMSCs 流式细胞术鉴定 a. CD14; b. CD45; c. HLA-DR; d. CD29; e. CD44; f. CD105

Fig.1 Identification of BMSCs by flow cytometry a. CD14; b. CD45; c. HLA-DR; d. CD29; e. CD44; f. CD105

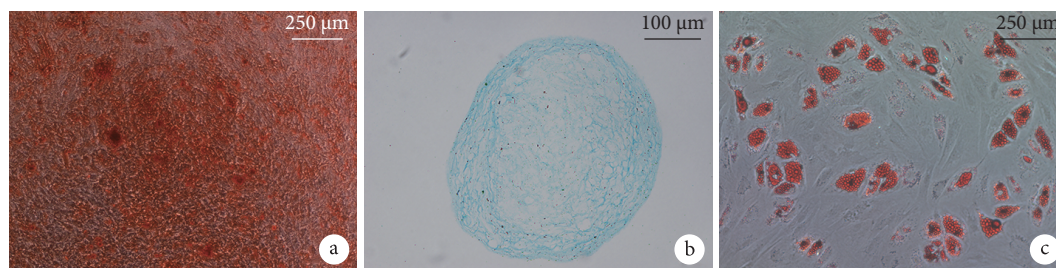


图 2 BMSCs 各向分化潜能鉴定 a. 茜素红染色 ( $\times 40$ ); b. 阿尔新蓝染色 ( $\times 100$ ); c. 油红 O 染色 ( $\times 40$ )

Fig.2 Identification of multipotential differentiation of BMSCs a. Alizarin red staining ( $\times 40$ ); b. Alcian blue staining ( $\times 100$ ); c. Oil red O staining ( $\times 40$ )

红染色可见红色钙结节,成软骨诱导分化 14 d 阿利新蓝染色可见深蓝色结节,成脂诱导分化 14 d 油红 O 染色可见红色脂滴。见图 2。提示分离获得的细胞为 BMSCs。

## 2.2 RNF11 在 BMSCs 成骨分化过程中的表达

随 BMSCs 成骨诱导分化时间延长,茜素红染色阳性钙结节数量和 ALP 活性均逐渐增加,成熟程度逐渐上升,各时间点间差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ),符合 MSCs 成骨的一般规律。见图 3、4。Western blot 检测示,随 BMSCs 成骨诱导分化时间延长,RNF11 蛋白相对表达量亦呈逐渐增加趋势,各时间点间差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ),提示 RNF11 可能参与了 BMSCs 成骨分化过程。见图 5。

## 2.3 下调 RNF11 对 BMSCs 体外成骨分化能力的影响

各组成骨诱导分化 14 d 检测示,C 组 RNF11 蛋白相对表达量、阳性钙结节数量、ALP 活性及 Runx2、OCN、OPN mRNA 相对表达量均显著低于 A、B 组,差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。提示下调 BMSCs 中 RNF11 表达将抑制其成骨分化能力。见图 6、7。

## 2.4 RNF11 对 Akt 信号通路的影响

随 BMSCs 成骨诱导分化时间延长,RNF11 与 Akt 信号通路蛋白相对表达量均逐渐增加,各时间点间差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见图 8。

下调 RNF11 实验中,各组  $\beta$ -catenin 及 Smad1/5/8 信号通路蛋白相对表达量差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ); C 组 Akt 信号通路蛋白相对表达量显著低于 A、B 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见图 9。提示 RNF11 可能是通过影响 Akt 信号通路激活来参与 BMSCs 的体外成骨分化过程。

## 2.5 RNF11 对 Akt 信号通路的影响机制

B1、C1 组 RNF11 蛋白相对表达量显著低于 A1 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); B1、C1 组间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与 A1、C1 组比较,B1 组 Akt 信号通路蛋白相对表达量、阳性钙结节数量、ALP 活性及成骨标志物 Runx2、OCN、OPN mRNA 相对表达量均显著下调,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 添加了 SC79 的 C1 组可逆转上述效果,与 A1 组比较上述指标差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见图 10、11。提示 RNF11 可能通过激活 Akt 信号通路促进 BMSCs 成骨分化。

## 3 讨论

组织工程骨技术修复骨缺损虽然目前仍在研究阶段,但有极大临床应用前景。BMSCs 作为组织工程骨的三大要素之一,研究其成骨分化过程的调控因子和机制一直是此领域的热点。

RNF11 是环指蛋白家族中的重要成员之一,通过 PY 基序结合 HECT 型 E3 泛素连接酶 Smurf2 和 AIP4,介导多种细胞蛋白的降解<sup>[21]</sup>。尽管已有研究表明 RNF11 减少或功能受损可能与神经退行性疾病有关<sup>[22-23]</sup>,但与 BMSCs 成骨分化相关研究较少。Gao 等<sup>[20]</sup>在研究成骨机制过程中发现,在小鼠成骨发育的体外模型中,胚胎成骨过程中最早阶段表达的转录因子 Est1 能够结合 RNF11 的启动子,且 RNF11 水平与成骨分化程度成正相关,但并未深入研究。本研究中,我们发现 RNF11 在 BMSCs 成骨分化过程中表达明显上调,且与之成正相关;以慢病毒构建敲低 RNF11 的 BMSCs 模型,茜素红、ALP 染色示 C 组成骨分化程度低于 A、B 组,提示 RNF11 参与 BMSCs 成骨分化过程,与 Gao 等的研究结果一致。

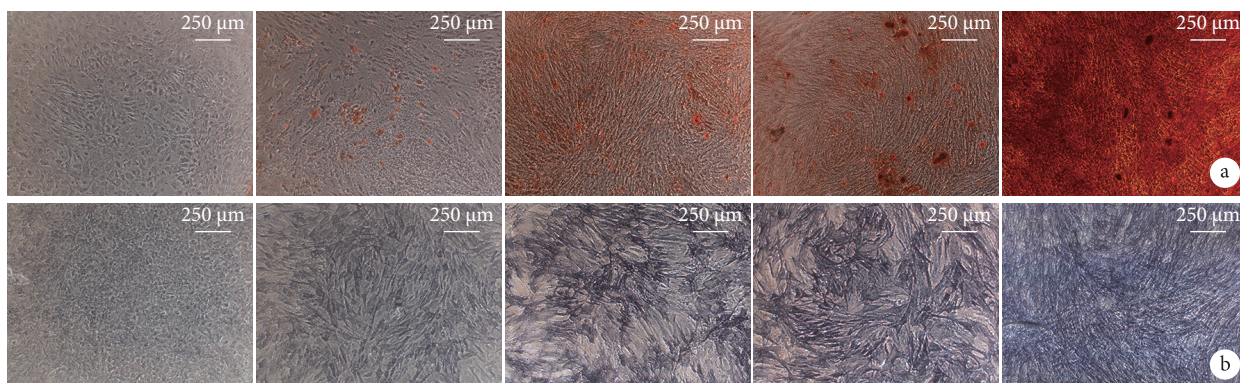


图 3 BMSCs 成骨分化规律观察 ( $\times 40$ ) 从左至右分别为培养 0、3、7、10、14 d a. 茜素红染色; b. ALP 染色

Fig.3 Observation on the osteogenic differentiation regularity of BMSCs ( $\times 40$ ) From left to right for cultured 0, 3, 7, 10, and 14 days a. Alizarin red staining; b. ALP staining

为进一步探究 RNF11 如何影响 BMSCs 成骨分化, 分别检测 A、B、C 组与 BMSCs 成骨分化密切相关的 Akt、Smad1/5/8、 $\beta$ -catenin 信号通路的激活水平<sup>[24]</sup>。Western blot 结果显示, 相较于 A、B 组, C 组的 Akt 信号通路显著受抑制, 而对 Smad1/5/8 和  $\beta$ -catenin 信号通路激活水平无明显影响, 且 RNF11 蛋白表达和 Akt 信号通路激活水平均与 BMSCs 成骨分化程度成正相关。提示在此过程中两者可能共同发挥作用。为探究两者的关系, 我们在实验中添加 Akt 信号通路激活剂 SC79<sup>[25]</sup>, 茜素

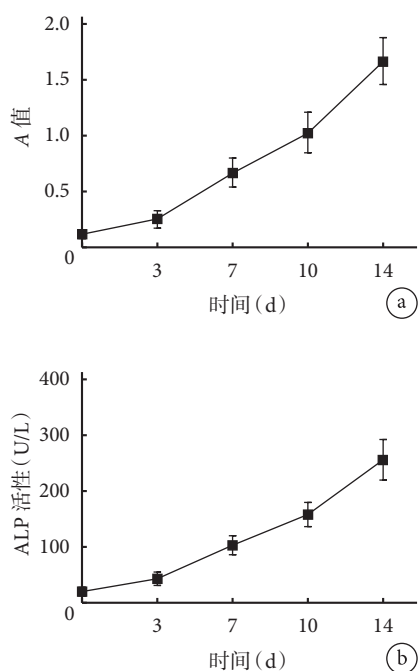


图 4 BMSCs 成骨分化定量检测 a. 茜素红染色; b. ALP 活性  
Fig.4 Quantitative detection of BMSCs osteogenesis a. Alizarin red staining; b. ALP activity

红、ALP 染色以及对成骨标志物 Runx2、OCN 及 OPN mRNA 的定量分析结果显示, C1 组成骨分化水平略低于 A1 组, 但明显高于 B1 组。分析原因可能是 RNF11 在 BMSCs 分化过程中通过激活 Akt 信号通路表达来促进成骨分化, 成骨细胞合成大量 Runx2、OCN 及 OPN, 因此下调 RNF11 时, Akt 信号通路激活受抑制, 成骨分化水平降低; 添加 SC79 使 Akt 信号通路激活水平升高后, 成骨分化水平重新升高, 但激活不完全, 因而略低于 A1 组。

RNF11 在机体还具有抑制炎症反应的作用。据报道, 由 A20-TAX1BP1-Itch-RNF11 共同构成的 A20 泛素编辑酶复合物能够下调 NF- $\kappa$ B 信号通路,

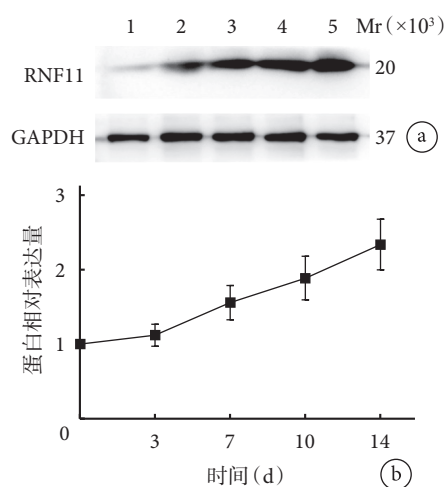


图 5 Western blot 检测 RNF11 在 BMSCs 成骨分化过程中的表达 a. 电泳图 Mr: 相对分子质量 1: 0 d 2: 3 d 3: 7 d 4: 10 d 5: 14 d; b. RNF11 蛋白相对表达量  
Fig.5 Expression of RNF11 during BMSCs osteogenesis detected by Western blot a. Electrophoresis Mr: Relative molecular weight 1: 0 day 2: 3 days 3: 7 days 4: 10 days 5: 14 days; b. RNF11 protein relative expression

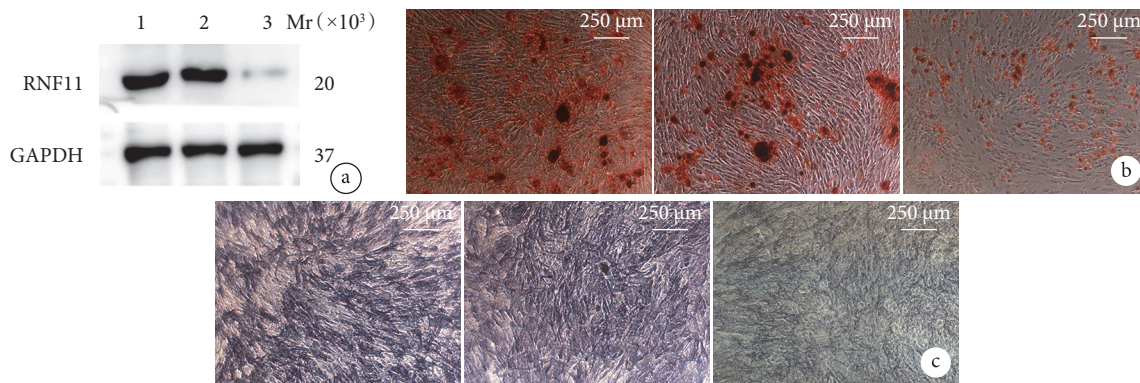


图 6 下调 RNF11 对 BMSCs 体外成骨分化能力的影响 a. Western blot 检测电泳图 Mr: 相对分子质量 1: A 组 2: B 组 3: C 组; b. 茜素红染色 ( $\times 40$ ) 从左至右依次为 A、B、C 组; c. ALP 染色 ( $\times 40$ ) 从左至右依次为 A、B、C 组  
Fig.6 The influence of knockdown RNF11 on osteogenic differentiation of BMSCs *in vitro* a. Electrophoresis of Western blot Mr: Relative molecular weight 1: Group A 2: Group B 3: Group C; b. Alizarin red staining ( $\times 40$ ) From left to right for groups A, B, and C, respectively; c. ALP staining ( $\times 40$ ) From left to right for groups A, B, and C, respectively

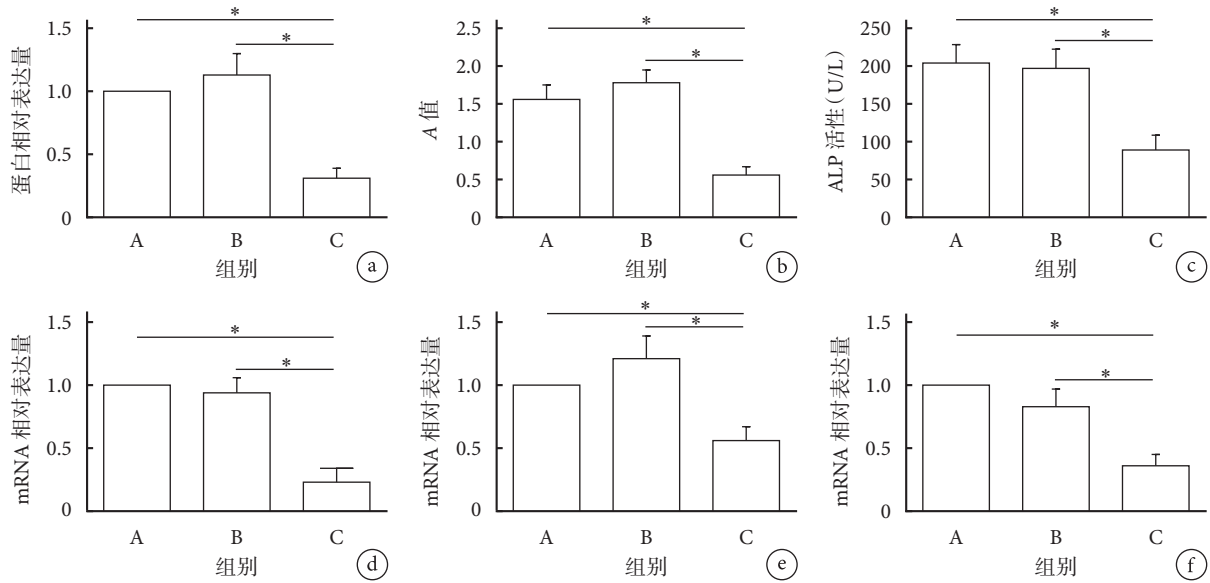


图7 下调RNF11对BMSCs体外成骨分化能力影响定量分析 \*P<0.05 a. RNF11蛋白相对表达量; b. 茜素红染色; c. ALP活性; d~f. qRT-PCR检测Runx2、OCN、OPN mRNA相对表达量

Fig.7 Quantitative analysis of the influence of knockdown RNF11 on osteogenic differentiation of BMSCs in vitro \*P<0.05 a. RNF11 protein relative expression; b. Alizarin red staining; c. ALP activity; d-f. Relative expressions of Runx2, OCN, and OPN mRNA detected by qRT-PCR

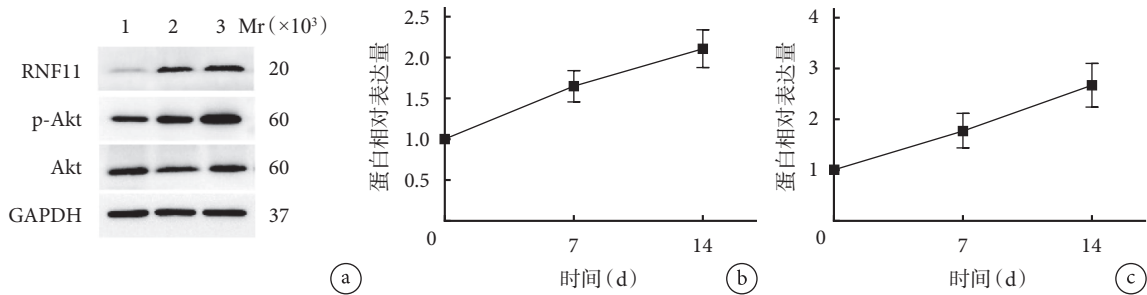


图8 Western blot检测成骨分化前后RNF11与Akt信号通路蛋白表达 a. 电泳图 Mr: 相对分子质量 1: 0 d 2: 7 d 3: 14 d; b. RNF11蛋白相对表达量; c. Akt信号通路蛋白相对表达量

Fig.8 Western blot detection of RNF11 and Akt signaling pathway protein expressions before and after osteogenic differentiation a. Electrophoresis Mr: Relative molecular weight 1: 0 day 2: 7 days 3: 14 days; b. RNF11 protein relative expression; c. Relative protein expression of Akt signaling pathway

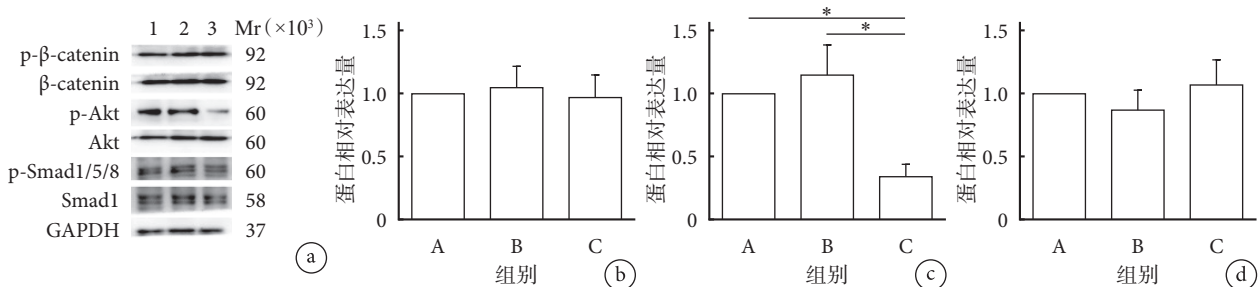


图9 下调RNF11对Akt信号通路的影响 a. Western blot检测电泳图 Mr: 相对分子质量 1: A组 2: B组 3: C组; b~d. 分别为beta-catenin、Akt、Smad1/5/8信号通路蛋白相对表达量 \*P<0.05

Fig.9 The influence of knockdown RNF11 on Akt signaling pathway a. Electrophoresis of Western blot Mr: Relative molecular weight 1: Group A 2: Group B 3: Group C; b-d. Protein relative expressions of beta-catenin, Akt, and Smad1/5/8 signaling pathway, respectively \*P<0.05

确保炎症反应的短暂性, 其中RNF11的PPXY基序负责招募Itch到TAX1BP1形成A20泛素编辑酶复

合物<sup>[26]</sup>。由此推断, 若将RNF11运用到BMSCs对骨缺损的临床治疗中, 可能有一定抗炎作用, 能减

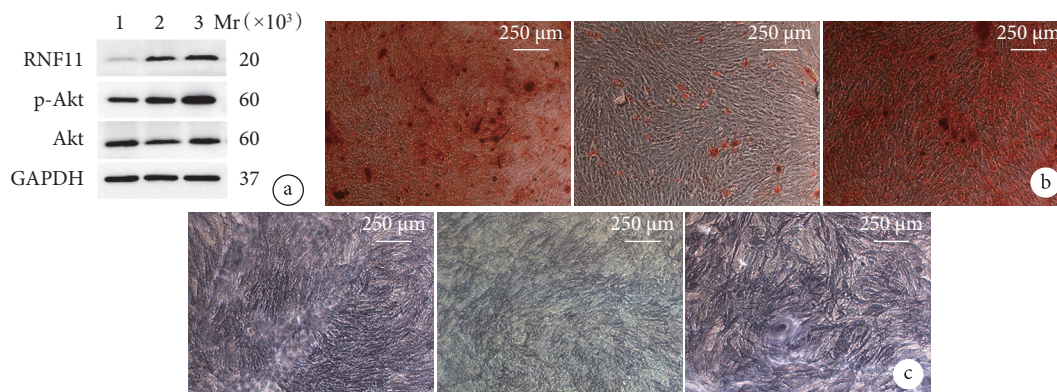


图 10 激活 Akt 信号通路对下调 RNF11 后 BMSCs 成骨分化的影响 a. Western blot 检测电泳图 Mr: 相对分子质量 1: A1 组 2: B1 组 3: C1 组; b. 茜素红染色(×40) 从左至右依次为 A1、B1、C1 组; c. ALP 染色(×40) 从左至右依次为 A1、B1、C1 组

Fig.10 The influence of activating Akt signaling pathway on osteogen a. Electrophoresis of Western blot Mr: Relative molecular weight 1: Group A1 2: Group B1 3: Group C1; b. Alizarin red staining (×40) From left to right for groups A1, B1, and C1, respectively; c. ALP staining (×40) From left to right for groups A1, B1, and C1, respectively

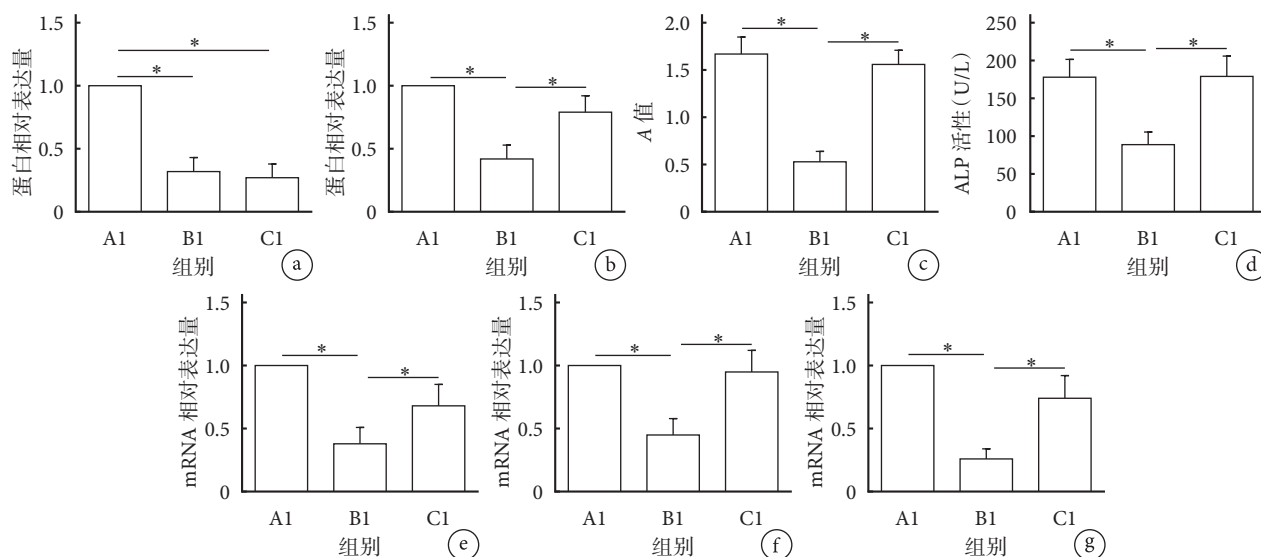


图 11 激活 Akt 信号通路对下调 RNF11 后 BMSCs 成骨分化影响的定量分析 \* $P < 0.05$  a. RNF11 蛋白相对表达量; b. Akt 信号通路蛋白相对表达量; c. 茜素红染色; d. ALP 活性; e~g. qRT-PCR 检测 Runx2、OCN、OPN mRNA 相对表达量

Fig.11 Quantitative analysis of the influence of activating Akt signaling pathway on osteogenic differentiation of BMSCs after knockdown RNF11 \* $P < 0.05$  a. Relative protein expression of RNF11; b. Relative protein expression of Akt signaling pathway; c. Alizarin red staining; d. ALP activity; e-g. Relative expressions of Runx2, OCN, and OPN mRNA detected by qRT-PCR

轻机体损伤,减少其他抗炎药物的使用,但有待进一步实验研究明确。

近年有很多关于 Akt 信号通路调控成骨分化的分子机制研究。Zhao 等<sup>[27]</sup>研究显示巨噬细胞 MSR1 通过激活 Akt 信号通路促进 BMSCs 成骨分化, Yang 等<sup>[28]</sup>研究表明 miRNA-21 通过激活 Akt 信号通路促进 BMSCs 成骨分化来促进犬颌面骨再生。提示 Akt 信号通路调控成骨分化受到多种因素的共同作用,分子间相互协同,共同完成骨修复过程。

综上所述,本研究结果表明 RNF11 通过正向调

控 Akt 信号通路激活水平促进 BMSCs 向成骨细胞分化。但本研究也存在不足之处:首先,实验采用离体培养的 BMSCs,未在动物体内验证,可能会造成实验结果偏倚,也无法验证将其运用于机体时是否会对其他系统产生影响。第二,未探究在病理条件下 RNF11 对 BMSCs 的成骨分化作用是否会受影响。第三,未探究 RNF11 在 BMSCs 成骨分化其他重要过程中的作用,如破骨细胞形成、炎症等。以上不足有待进一步研究完善。

作者贡献:邓雯负责研究设计、数据收集整理、统计分析;



龙婷负责论文撰写；杜英负责对文章的知识性内容作批评性审阅。

**利益冲突：**所有作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题：**研究方案经郑州大学生命科学伦理审查委员会批准。

## 参考文献

- Oryan A, Kamali A, Moshiri A, *et al.* Role of mesenchymal stem cells in bone regenerative medicine: What is the evidence? *Cells Tissues Organs*, 2017, 204(2): 59-83.
- Aicher WK, Bühring HJ, Hart M, *et al.* Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells-potential and pitfalls. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(4-5): 342-351.
- Marie PJ, Fromigüé O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med*, 2006, 1(4): 539-548.
- Shih YR, Chen CN, Tsai SW, *et al.* Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. *Stem Cells*, 2006, 24(11): 2391-2397.
- Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, *et al.* The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1998, 80(7): 985-996.
- 袁宇, 徐林. 骨髓间充质干细胞联合 3D 生物打印技术治疗骨缺损的研究进展. *中国医学物理学杂志*, 2021, 38(1): 110-126.
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, *et al.* Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 2003, 75(3): 389-397.
- Maruyama M, Moeinzadeh S, Guzman RA, *et al.* The efficacy of lapine preconditioned or genetically modified IL4 over-expressing bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in corticosteroid-associated osteonecrosis of the femoral head in rabbits. *Biomaterials*, 2021, 275: 120972. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120972.
- Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, *et al.* Modulation of the inflammatory response and bone healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 386. doi: 10.3389/fendo.2020.00386.
- Fujita T, Azuma Y, Fukuyama R, *et al.* Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *J Cell Biol*, 2004, 166(1): 85-95.
- 史东梅, 董明, 陆颖, 等. PI3K/Akt 信号通路与骨破坏: 问题与机制. *中国组织工程研究*, 2020, 24(23): 3716-3722.
- Peng XD, Xu PZ, Chen ML, *et al.* Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev*, 2003, 17(11): 1352-1365.
- Kitching R, Wong MJ, Koehler D, *et al.* The RING-H2 protein RNF11 is differentially expressed in breast tumours and interacts with HECT-type E3 ligases. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1639(2): 104-112.
- Azmi P, Seth A. RNF11 is a multifunctional modulator of growth factor receptor signalling and transcriptional regulation. *Eur J Cancer*, 2005, 41(16): 2549-2560.
- Connor MK, Azmi PB, Subramaniam V, *et al.* Molecular characterization of ring finger protein 11. *Mol Cancer Res*, 2005, 3(8): 453-461.
- Mattioni A, Castagnoli L, Santonico E. RNF11 at the crossroads of protein ubiquitination. *Biomolecules*, 2020, 10(11): 1538. doi: 10.3390/biom10111538.
- Santonico E, Belleudi F, Panni S, *et al.* Multiple modification and protein interaction signals drive the Ring finger protein 11 (RNF11) E3 ligase to the endosomal compartment. *Oncogene*, 2010, 29(41): 5604-5618.
- Malonis RJ, Fu W, Jelcic MJ, *et al.* RNF11 sequestration of the E3 ligase SMURF2 on membranes antagonizes SMAD7 down-regulation of transforming growth factor  $\beta$  signaling. *J Biol Chem*, 2017, 292(18): 7435-7451.
- Budhidarmo R, Zhu J, Middleton AJ, *et al.* The RING domain of RING Finger 11 (RNF11) protein binds Ubc13 and inhibits formation of polyubiquitin chains. *FEBS Lett*, 2018, 592(8): 1434-1444.
- Gao Y, Ganss BW, Wang H, *et al.* The RING finger protein RNF11 is expressed in bone cells during osteogenesis and is regulated by Ets1. *Exp Cell Res*, 2005, 304(1): 127-135.
- Subramaniam V, Li H, Wong M, *et al.* The RING-H2 protein RNF11 is overexpressed in breast cancer and is a target of Smurf2 E3 ligase. *Br J Cancer*, 2003, 89(8): 1538-1544.
- Pranski EL, Dalal NV, Herskowitz JH, *et al.* Neuronal RING finger protein 11 (RNF11) regulates canonical NF- $\kappa$ B signaling. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 67. doi: 10.1186/1742-2094-9-67.
- Pranski EL, Dalal NV, Sanford CV, *et al.* RING finger protein 11 (RNF11) modulates susceptibility to 6-OHDA-induced nigral degeneration and behavioral deficits through NF- $\kappa$ B signaling in dopaminergic cells. *Neurobiol Dis*, 2013, 54: 264-279.
- 池玉磊, 卜宪敏, 查玉梅, 等. 骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损: 研究现状及前景展望. *中国组织工程研究*, 2019, 23(29): 4749-4756.
- Jo H, Mondal S, Tan D, *et al.* Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(26): 10581-10586.
- Shembade N, Parvatiyar K, Harhaj NS, *et al.* The ubiquitin-editing enzyme A20 requires RNF11 to downregulate NF- $\kappa$ B signalling. *EMBO J*, 2009, 28(5): 513-522.
- Zhao SJ, Kong FQ, Jie J, *et al.* Macrophage MSR1 promotes BMSC osteogenic differentiation and M2-like polarization by activating PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway. *Theranostics*, 2020, 10(1): 17-35.
- Yang C, Liu X, Zhao K, *et al.* miRNA-21 promotes osteogenesis via the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 $\alpha$  pathway and enhances bone regeneration in critical size defects. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 65. doi: 10.1186/s13287-019-1168-2.

收稿日期: 2021-07-26 修回日期: 2021-11-29

本文编辑: 王雁