

网络出版时间: 2023-05-30 17:16:58 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1633.013.html>

Bmp2 影响脂肪干细胞成骨能力的研究

赖文涛^{1,2} 赵志军^{2,3} 张春阳^{2,3}

摘要 目的 探究在大鼠脂肪干细胞内过表达骨形态发生蛋白 2 (Bmp2) 后成骨基因的表达情况以及成骨能力的变化。方法 通过电转染 Bmp2 至大鼠脂肪干细胞内,以空白组作为对照,分为空白对照组 (Control 组)、空载组 (Vector 组)、成骨诱导组 (Inducement 组)、过表达组 (Bmp2 组),采用 Western blot、qRT-PCR 及免疫荧光对比成骨基因表达情况,采用碱性磷酸酶染色与茜素红染色观察硫化钴沉淀及钙盐沉积情况。结果 Western blot 与 qRT-PCR 检测显示,与 Control 组相比,Bmp2 组的 Bmp2、Bmp4、骨桥蛋白 (OPN)、骨钙蛋白 (OCN)、矮小相关转录因子 2 (Runx2)、磷酸化大鼠信号转导分子 1/5 (p-Smad1/5)、远端缺失同源框 2 (Dlx2)、骨涎蛋白 (BSP) 表达显著增高 ($P < 0.05$),而 Smad1/5 的表达情况差异无统计学意义;免疫荧光检测显示,与 Control 组相比,Bmp2 组的 OPN、Runx2 荧光强度显著增高 ($P < 0.05$);茜素红染色及碱性磷酸酶染色结果显示,与 Control 组相比,Bmp2 组细胞周围钙盐沉积增多,硫化钴沉淀增多,碱性磷酸酶活性增强。结论 过表达 Bmp2 增强了脂肪干细胞的成骨基因表达,提高了其成骨能力。

关键词 脂肪干细胞; Bmp2; 成骨分化

中图分类号 R 651.1+5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0963-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.015

近些年来,骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, Bmps) 被证明在诱导成骨分化过程中发挥

重要作用^[1]。在 Bmps 的 16 个亚型中,Bmp2、4、6、7、9 被认为是最具骨诱导性的^[2]。通过外源性的添加 Bmp2 或在骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 中过表达 Bmp2 都能够发挥其成骨分化的作用,以此来达成骨缺损修复的目的^[3]。Gromolak et al^[4] 研究表明在体外用 FGF2 和 Bmp2 处理绵羊 BMSCs 后显示 OCN 和 I 型胶原蛋白表达的增加,以及相关成骨基因的表达增高。因此,Bmps 介导的骨缺损修复治疗具有广阔的研究价值。

脂肪干细胞 (adipose-derived stem cells, Adscs) 相比于其他类型的干细胞而言,具有来源广泛、易于获取、多向分化潜能、免疫原性低等特点。Caetano et al^[5] 报道支架/干细胞复合体骨再生更为显著,表明了 Adscs 对修复骨组织缺损有积极影响。Adscs 还可通过旁分泌的方式将生物活性因子如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等来促进缺损部位血管的形成。Han et al^[6] 研究表明低氧预处理后的外泌体能更高效的促进血管形成。这些特点有助于干细胞复合组织异体移植后降低免疫排斥反应,在临床上应用前景广泛。因此,该研究通过构建过表达 Bmp2-Adscs 模型,来探讨 Bmp2 对于 Adscs 成骨分化能力的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 DMEM 购自大连美仑生物技术有限公司,茜素红、碱性磷酸酶试剂盒购自北京天根有限公司,2 × SYBR Green qPCR Mix 购自上海 bio-sharp 公司,Runx2 一抗、OPN 一抗、Bmp2 一抗、Bmp4 一抗、Smad1/5 与 p-Smad1/5 一抗均购自武汉博奥森有限公司,OCN 一抗购自美国 Invitrogen 公司,Dlx2 一抗、羊抗兔二抗均购自美国 Abcam 公司,β-actin 一抗购自上海 Santa 有限公司,电穿孔转染试剂盒套装、酶标仪均购自美国 Thermo Fisher 公司。激光共聚焦显微镜 Nikon A1 购自日本 Nikon 公司,PCR 仪 7900HT 购自美国 ABI 公司,紫外分光光度计购自美国 Thermo Fisher 公司,Bmp2 质粒购自武汉森灵平台。

1.2 实验方法

2023-03-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81660214、81960238); 内蒙古自治区自然科学基金 (编号: 2020MS08013); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (编号: NJZZ20168); 内蒙古自治区科技成果转化项目 (编号: NM2019BT052); 包头市医学重点学科建设项目 (编号: BWXK201910); 包头医学院科学研究基金 (编号: BYJJ-YF-2018004); 国家临床重点专科建设项目 (编号: Z155080000004)

作者单位: ¹ 内蒙古科技大学包头医学院, 包头 014010

² 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院神经外科, 包头 014010

³ 内蒙古自治区骨组织再生与损伤修复工程技术中心, 包头 014010

作者简介: 赖文涛,男,硕士研究生;

赵志军,男,副主任医师,责任作者, E-mail: 41419761@qq.com

1.2.1 Adscs 的提取及鉴定 大鼠购自维通利华生物技术有限公司。在整个研究过程中,所有大鼠都被保持在 1 个 12 h 的光/暗周期中,可以自由获得食物和水。仰卧固定大鼠;从双侧腹股沟皮垫下取出脂肪,并去除多余组织,剪碎后放入含双抗 PBS 中进行冲洗。然后置换入离心管,加入 0.1% 的胶原酶;在温箱中摇床消化 1 h,用 1 ml 注射器反复吹打均匀后,分别用 200 目与 400 目的细胞筛过滤,滤液放入离心机中离心 10 min,条件 1 365 r/min,弃上清液,保留沉淀。使用流式细胞仪,CD90 一抗鉴定 Adscs。

1.2.2 细胞诱导分化及分组 培养大鼠 Adscs,镜下观察细胞长至 40% ~ 50% 的融合度后对细胞进行成骨诱导分化。使用补充了 Supplement Mix 的成骨分化培养基(MSC Osteogenic)培养 24 h 后,更换新鲜培养基。培养至 80% ~ 90% 的生长密度后,使用 4% 多聚甲醛固定,用 PBS 清洗后,通过茜素红染色试剂盒进行染色,镜下可见细胞被染成橘红色。将诱导完成的细胞定位阳性对照,未经诱导分化的 Adscs 为空白对照组(Control 组),转染空载质粒的细胞为阴性对照组(Vector 组),采用成骨诱导培养基培养的 Adscs 为成骨诱导组(Inducement 组),转染 Bmp2 质粒的细胞为实验组。

1.2.3 Bmp2 质粒转染 取 1×10^6 个生长状态良好的 Adscs,按照 Neon Transfection System 电转染试剂盒提供的方法进行 GFP-Bmp2 质粒电转染。条件设定为电压 1 200 mV、脉冲 2 次、间隔 20 ms,转染成功 24 h 后在荧光显微镜下观察细胞状态。

1.2.4 茜素红与碱性磷酸酶染色 各组培养 14 d 后,以 4% 多聚甲醛固定并以 PBS 冲洗,按茜素红试剂盒说明逐步加入茜素红染液,并在 37 °C 摇床中孵育,然后在镜下观察各组染色情况;同样的,按碱性磷酸酶染色试剂盒说明逐步加入碱性磷酸酶染液,在暗室中孵育,然后在镜下观察染色情况,图像使用 Image J 分析。

1.2.5 qRT-PCR 实验 提取各组 RNA,并测定 RNA 浓度。将 RNA 反转录为 cDNA。每组 cDNA 各取 1 μ l,利用 SYBR Green I 试剂盒进行 real time PCR 扩增,根据所得各组的 Ct 值,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 Bmp2、Bmp4、BSP、OPN、OCN、Runx2、Smad1、Smad5、Dlx2 的 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.6 Western blot 实验 各组分别加入 RIPA,超声辅助裂解。在低温超速离心机中离心,条件为 12 000 r/min,15 min,并测定蛋白浓度。然后上样

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
Bmp2	F: GTTTGGCCTGAAGCAGAGAC R: CGTCACTGGGGACAGAAGCTT
OCN	F: GCAATAAGGTAGTGAACAGACTCC R: GTTTGTAGGCGGTCTTCAAGC
β -actin	F: ACCCAGACTGTGCCATCTAC R: GCCATCTCCTGCTCGAAGTC
BSP	F: GGAGGGGGCTTCACTGAT R: AACAATCCGTGCCACCA
Dlx2	F: CATGGGCTCCTACCACTACCAC R: TCGGATTTCAGGCTCAAGGTC
Smad1	F: ACCTGCTTACCTGCCTCCTG R: CATAAGCAACCGCCTGAACA
Smad5	F: CTGGGATTACAGGACTTGACC R: AAGTTCCAATTAAGAGGGAGGA
OPN	F: TGCACCCAGATCCTATAGCC R: CTCCATCGTCATCATCATCG
Bmp4	F: GGCAGAGGAGGAGGGAGGGAAGGAGC R: CACTAGCGGGCTCGCCAGCAGCAGCTCCTG
Runx2	F: AACTTCCTGTGCTCCGTGCTG R: TCGTTGAACCTGGCTACTTGG

进行电泳,电泳结束后使用 400 mA 恒流 4 °C 转膜过夜将蛋白转移到 0.22 μ m 的 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,0.1% TBST 冲洗,4 °C 孵育过夜。TBST 冲洗,室温条件下孵育羊抗兔二抗 1 h,TBST 冲洗后使用 ECL 超敏发光液进行化学发光显影,使用 Image J 对蛋白条带的灰度进行扫描。

1.2.7 细胞免疫荧光染色 各组细胞分别计数 1×10^6 个,转移至带玻璃爬片的 24 孔板内进行培养,72 h 后弃掉培养基,并使用 4% 多聚甲醛固定,PBS 清洗,使用 10% 山羊血清封闭 1 h,封闭完成后使用 OPN、Bmp2、Runx2 一抗 4 °C 孵育过夜,0.3% PBST 清洗 3 次后使用 Alexa Fluor488、Alexa Fluor594 荧光二抗室温条件下避光孵育 4 h,孵育完成后使用 0.3% PBST 清洗 3 次后使用 Hoechst 33342 进行核复染 10 min,甘油封片后使用激光共聚焦显微镜观察荧光强度。

1.3 统计学处理 所有实验数据均使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,免疫荧光、茜素红染色与碱性磷酸酶染色均采用 Image J 进行分析,各成骨基因与 Bmp2 间关系通过皮尔逊相关性分析来实现,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Adscs 免疫荧光鉴定及验证转染效率 首先,通过对 Adscs 以 CD90 进行荧光标记(图 1A),阳性

率 >90% ,即细胞纯度 >90% ,然后通过对各组 Adscs 进行 Bmp2 的荧光标记(图 1B) ,相较于对照组 ,成骨诱导组与 Bmp2 组的 Bmp2 基因水平显著上调 ($P < 0.05$) ,说明质粒转染成功。

2.2 Bmp2 对 Adscs 成骨潜能的影响 首先 ,通过 Bmp2 的 mRNA 与蛋白表达水平验证诱导分化(图 2A) ,相较于对照组 ,成骨诱导组与 Bmp2 组的 Bmp2 基因水平显著上调 ($P < 0.05$) ,说明诱导分化成功。相较于对照组 ,骨形态发生蛋白家族中 Bmp4、P-Smad1/5 均显著升高 ($P < 0.05$) ,说明 Bmp 通路高度激活。而 BSP、OPN、OCN、Runx2、Dlx2 的表达相比对照组均显著升高 ,说明 Bmp 通路的激活可以促进 Adscs 向成骨细胞方向分化 ($P < 0.05$) 。在转录水平(图 2B-G) ,qRT-PCR 结果显示 Bmp2 及 Bmp4 表达水平显著上调 ,说明转染过表达 Bmp2 质粒效率高。相较于对照组 ,成骨基因 BSP、OPN、OCN、Runx2 以及 Dlx2 在过表达 Bmp2 后均显著升高 ($P < 0.05$) ,说明不管是在转录水平还是翻译水平 ,激活 Bmp2 信号通路均可以提高 Adscs 向成骨细胞分化。为了验证实验结果 ,该实验使用皮尔逊

相关性分析对 Bmp2 蛋白表达和成骨蛋白 OPN、OCN、Dlx2、Runx2、BSP 进行相关性分析(图 2H-L) ,结果显示 Bmp2 及 OPN、OCN、Dlx2、Runx2、BSP 的表达呈现显著的正相关关系 ,说明 Bmp2 过表达明确促进成骨基因表达 ,使 Adscs 向成骨细胞分化得到增强。

2.3 Bmp2 对 Adscs 成骨分化的影响 茜素红、碱性磷酸酶染色结果如图所示(图 3A) ,过表达 Bmp2 后 ,Adscs 茜素红标记颜色显著加深 ,这与阳性对照诱导骨化组趋势一致 ,说明激活 Bmp 通路能促进 Adscs 的成骨分化(图 3B) 。碱性磷酸酶染色结果提示(图 3C) ,Bmp2 组有更多的硫化钴沉淀 ,表明激活 Bmp2 通路可促使 Adscs 向成熟的成骨细胞转化。

2.4 Bmp2 对 Adscs 表达 Runx2 及 OPN 的影响 为了进一步验证 Bmp2 对 Adscs 成骨分化的影响 ,该研究使用 Runx2 及 OPN 进行荧光标记(图 4A) ,结果显示(图 4B~C) ,成骨基因 Runx2 以及 OPN 在过表达 Bmp2 的情况下荧光强度均显著升高 ($P < 0.05$) 。

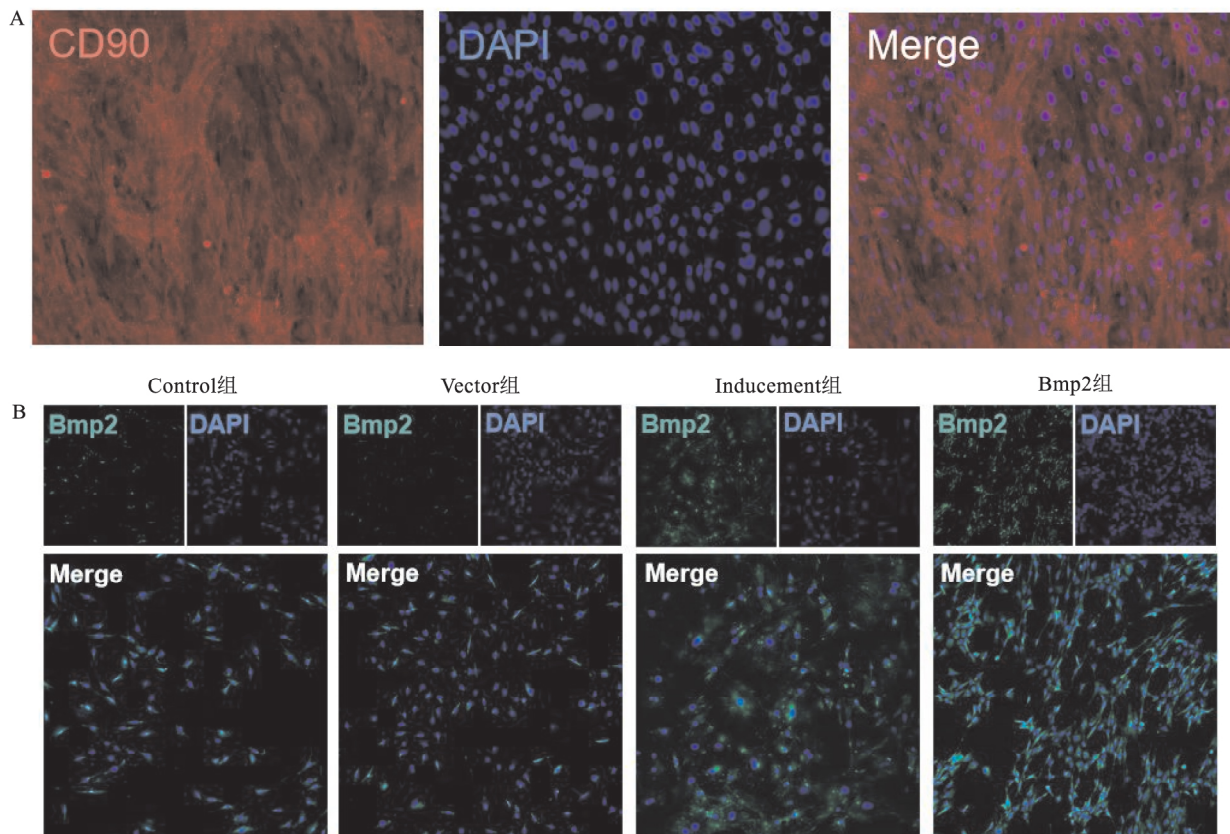


图1 脂肪干细胞荧光鉴定与转染效率的验证 ×400

A: CD90 标记 Adscs 后 ,免疫荧光显示阳性率 >90% ,即细胞纯度 >90% ; B: 过表达 Bmp2 后 ,在 Adscs 中荧光标记 Bmp2 以验证转染效率

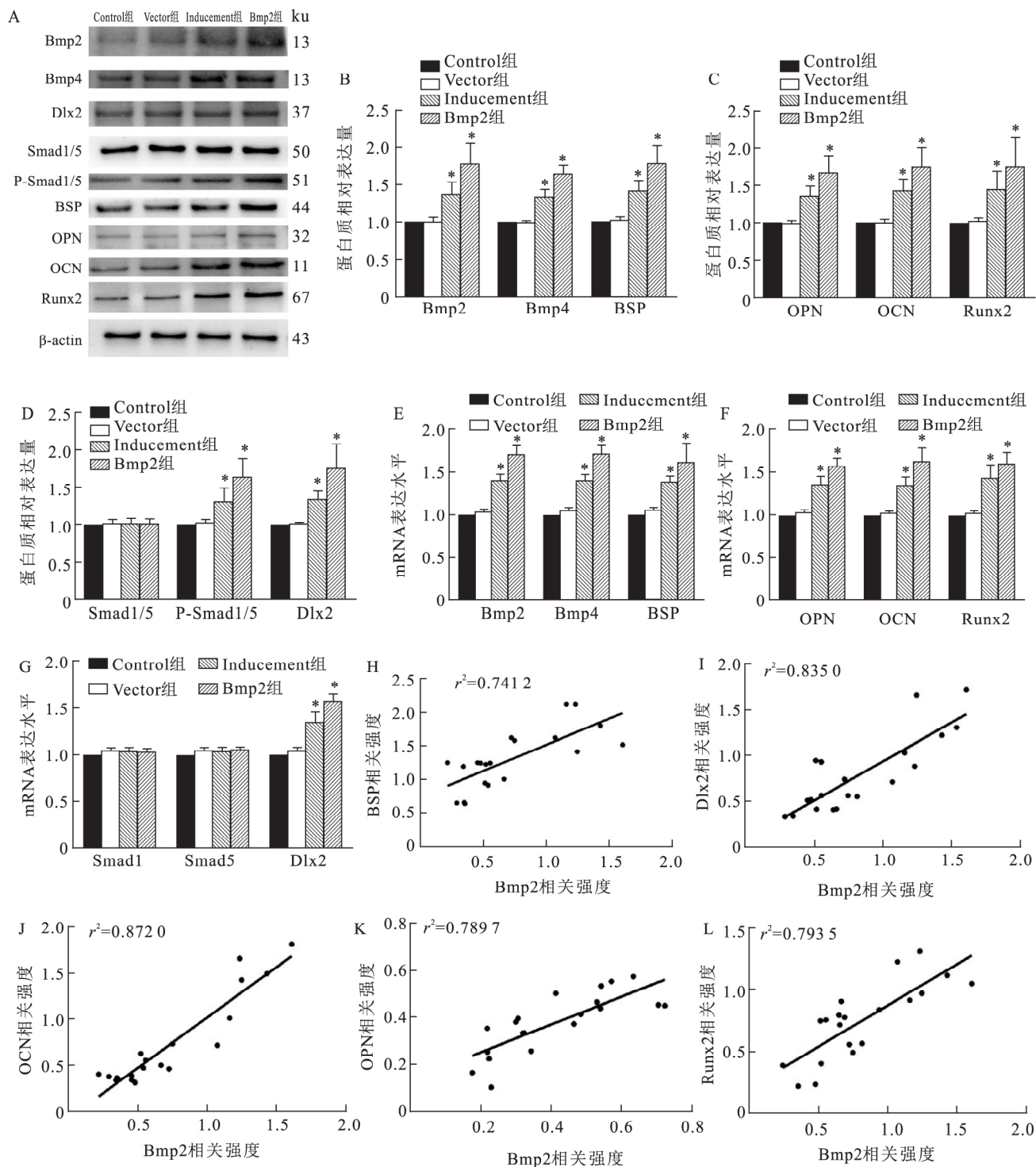


图2 成骨基因的表达情况与相关性分析

A: 蛋白印迹检测过表达 Bmp2 后 Adscs 内成骨基因的蛋白表达情况; B - D: 成骨基因蛋白表达的量化情况; E - G: 成骨基因 mRNA 表达的量化情况; H - L: Bmp2 分别与 BSP、Dlx2、OCN、OPN、Runx2 的相关性分析情况; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

对于骨缺损的基因疗法是指把一些成骨基因转运至靶细胞内,从而以自分泌或旁分泌的机制来促进骨形成。甚至可以多个基因一起转染,达到内源

性蛋白合成的协同调控,增强生物活性^[7]。因此,能在局部维持一定生物活性因子治疗浓度的基因疗法被认为是未来治疗骨缺损的可靠方法。在该研究中,为了证实 Bmp2 在体内所能发挥的成骨能力,将其转染至 Adscs 中,通过碱性磷酸酶以及茜素红染

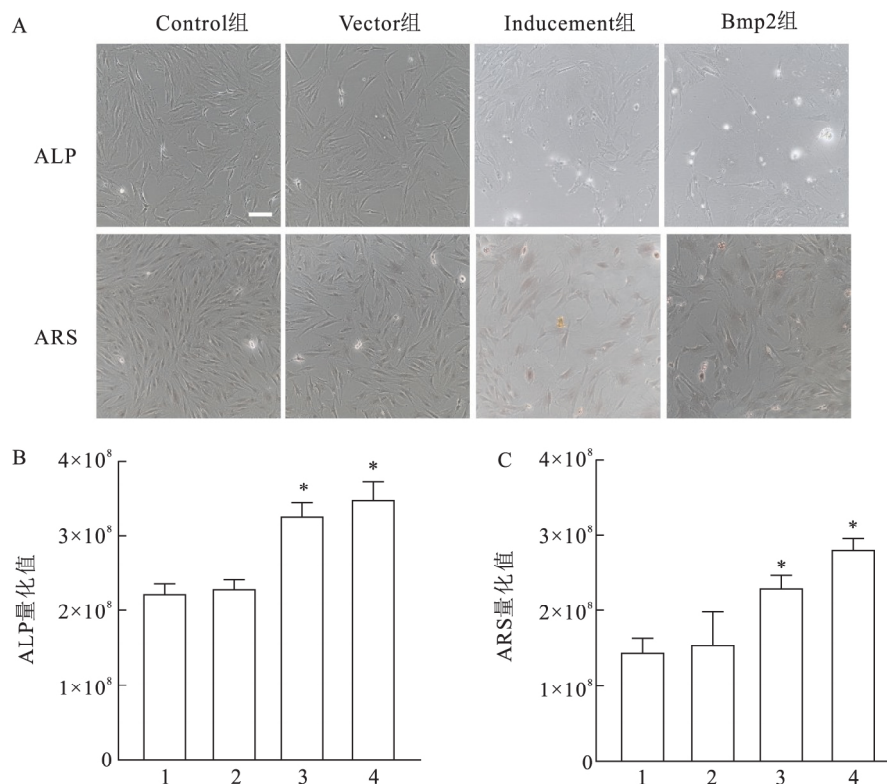


图3 ARS与ALP染色情况

A: 分别用茜素红与碱性磷酸酶染色观察钙盐沉积与硫化钴沉淀情况 $\times 200$; B: 碱性磷酸酶量化情况; C: 茜素红的量化情况; 1: Control 组; 2: Vector 组; 3: Inducement 组; 4: Bmp2 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

色分析显示, Bmp2 转染后的 Adscs 在培养皿中硫化钴沉淀及钙盐沉积增多, 这表明 Adscs 的矿化能力增强, 碱性磷酸酶、OCN 和 OPN 是成骨早期阶段的主要生物标志, 而钙沉积被认为是成骨后期的标志。Sun et al^[8] 通过收集猪小肠黏膜下层的细胞外基质与陶瓷骨相结合作为载体, 来观察移植的 BMSCs 的细胞增殖、细胞活力以及成骨分化能力, 结果显示 BMSCs 中成骨基因上调, 并通过激活 Smad1/5/8 的磷酸化来实现成骨分化, 这与该研究结果一致。通过 Western blot 实验显示, 其下游基因 Smad1/5 表达量并没有随之升高, 反而 P-Smad1/5 表达量增高, 这提示 Bmp2 在体内的成骨能力可能是通过磷酸化 Smad1/5 来实现的。该实验还检测了 Bmp4、OCN、OPN、Runx2、Dlx2、BSP 这 6 个与成骨相关的基因表达情况, 并通过 qRT-PCR 及免疫荧光进行了验证, 结果显示均有不同程度的表达上调。Chen et al^[9] 使用氟化物诱导 Bmp2 低甲基化及高表达, 结果显示氟可通过 Bmp2-Wnt/ β -catenin 通路提高 OCN、Runx2、OPN 的高表达, 从而促进成骨细胞的增殖和分化, 这与该实验结果一致。Zhu et al^[10] 在来源于牙根尖乳头的干细胞 (stem cells from apical papilla,

SCAPs) 内敲除 Bmp 拮抗剂 GREM1 来检测 OPN、OCN、BSP、Dlx2、Runx2、DSPP、OCX 的表达情况, 结果显示这些基因在第 1、2、3 周均有增加, 说明敲除 GREM1 能增强 SCAPs 的成骨/成齿分化和干性, 抑制 SCAPs 的增殖和衰老。GREM1 对 SCAPs 功能的影响可能是通过调节 Bmp 在 mRNA 水平上的基因表达实现的。由于实验条件所限, 未能找出更多的成骨相关基因来验证这点。但也在一定程度上表明, Bmp2 在体内的成骨作用至关重要。该研究采用电穿孔来进行转染, 属于瞬时转染, 目前有多种供选择的基因转移载体, 如质粒、脂质体、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒, 虽然病毒载体能够增加转染效率, 使靶基因表达时间延长, 但短效表达或许才是该研究需要的。Hsieh et al^[11] 指出, 腺病毒作为载体来递送 Bmp 基因进入细胞内是高效的方法, 但短期的 Bmp2 高表达, 已经足以启动成骨发生的级联反应, 并且 Bmp 的长期高表达, 也会增加成骨畸形, 骨刺形成等并发症。因此, 在合适的时机选择不同的载体, 也是该研究需要考虑的。Bai et al^[12] 利用薄膜涂层聚乳酸-乙醇酸 (PLGA) 和 PLGA/氢氧化镁支架开发了有效的给药系统, 使得 Bmp2 在

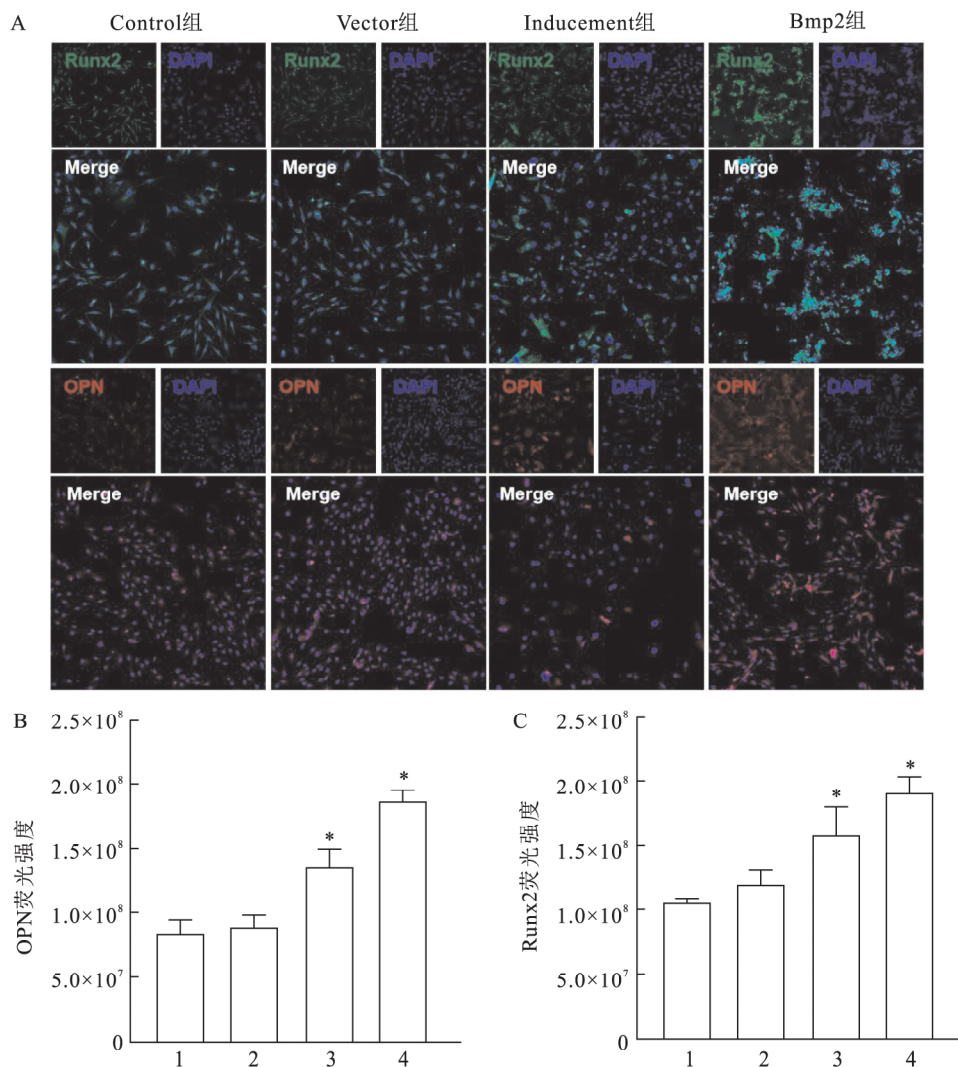


图4 Runx2与OPN荧光染色情况

A: 采用免疫荧光检测过表达Bmp2对OPN及Runx2的影响 $\times 400$; B: OPN荧光强度的量化统计; C: Runx2荧光强度的量化统计; 1: Control组; 2: Vector组; 3: Inducement组; 4: Bmp2组; 与Control组比较: * $P < 0.05$

需要的时候给予适当的剂量,以提高Bmp2在体内的成骨效率。

但该研究仍有一定局限,如能加入多基因进行共转染,或能较大提高Bmp2在体内的成骨潜能。Hu et al^[13]使用壳聚糖质粒共转染Bmp2及FGF2进入Adscs中,通过PCR、Western blot、ELISA检测显示,共转染后,Adscs内Bmp2、FGF2的mRNA和蛋白水平显著上调。与单独转染Bmp2或FGF2的细胞相比,共转染组的OCN和BSP mRNA水平也显著升高,说明共转染能显著促进成骨。其次,在动物实验中进行进一步研究将会对上述结果得到更多的验证。Vayas et al^[14]在大鼠临界颅骨缺损模型(直径4 mm)中对Bmp2与MMP10进行研究,得出MMP10与Bmp2在成骨作用方面呈正相关,即MMP10可增强Bmp2的成骨效应,从而实现颅骨缺损修复,这提

示MMP10和Bmp2的联合应用可能成为骨缺损修复和再生的一种有前途的策略。最后值得一提的是,外泌体作为近来研究的热点,相对Adscs而言或能提供更精准、高效的基因治疗能力,因其避免了移植细胞出现的存活率低、细胞流失、受体部位致瘤性等问题。Chen et al^[15]用慢病毒转染Adscs后,从稳定过表达miR-375的Adscs中提取富含miR-375的外泌体,并用水凝胶将其包埋移植入大鼠颅骨缺损模型中,结果显示Exo(miR-375)表现出缓慢和受控的释放,加快了颅骨缺损的修复过程。综上所述,Adscs治疗骨缺损的前景较大,也需要投入更多的研究来为临床治疗骨缺损提供大量理论依据。

参考文献

- [1] Safari B, Davaran S, Aghanejad A. Osteogenic potential of the

- growth factors and bioactive molecules in bone regeneration [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175: 544–57.
- [2] Lowery J W, Rosen V. The Bmp pathway and its inhibitors in the skeleton [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(4): 2431–52.
- [3] Aghali A. Craniofacial bone tissue engineering: current approaches and potential therapy [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2993.
- [4] Gromolak S, Krawczyński A, Antończyk A, et al. Biological characteristics and osteogenic differentiation of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells stimulated with FGF-2 and Bmp-2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9726.
- [5] Caetano L C, Bonfleur M L, Ribeiro R A, et al. Taurine supplementation regulates I κ -B α protein expression in adipose tissue and serum IL-4 and TNF- α concentrations in MSG obesity [J]. *Eur J Nutr*, 2017, 56(2): 705–13.
- [6] Han Y, Ren J, Bai Y, et al. Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 109: 59–68.
- [7] Ferreira M V, Cabral E T, Coroadinha A S. Progress and perspectives in the development of lentiviral vector producer cells [J]. *Biotechnol J*, 2021, 16(1): e2000017.
- [8] Sun T, Yao S, Liu M, et al. Composite scaffolds of mineralized natural extracellular matrix on true bone ceramic induce bone regeneration through Smad1/5/8 and ERK1/2 pathways [J]. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24(5–6): 502–15.
- [9] Chen L, Zhang M, Ding Y, et al. Fluoride induces hypomethylation of Bmp2 and activates osteoblasts through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 356: 109870.
- [10] Zhu X Y, Diao S, Yang D M, et al. The mechanism of Gremlin's effect on osteogenic/odontogenic differentiation of stem cells from apical papilla [J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2021, 52(3): 409–15.
- [11] Hsieh M K, Wu C J, Chen C C, et al. BMP-2 gene transfection of bone marrow stromal cells to induce osteoblastic differentiation in a rat calvarial defect model [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 91: 806–16.
- [12] Bai Y, Moeinzadeh S, Kim S, et al. Development of PLGA-PEG-COOH and gelatin-based microparticles dual delivery system and E-beam sterilization effects for controlled release of Bmp2 and IGF-1 [J]. *Part Part Syst Charact*, 2020, 37(10): 2000180.
- [13] Hu Y, Zhao Q W, Wang Z C, et al. Co-transfection with Bmp2 and FGF2 via chitosan nanoparticles potentiates osteogenesis in human adipose-derived stromal cells *in vitro* [J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(3): 300060521997679.
- [14] Vayas R, Reyes R, Arnau M R, et al. Injectable scaffold for bone marrow stem cells and bone morphogenetic protein2 to repair cartilage [J]. *Cartilage*, 2021, 12(3): 293–306.
- [15] Chen S, Tang Y, Liu Y, et al. Exosomes derived from miR-375-overexpressing human adipose mesenchymal stem cells promote bone regeneration [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(5): e12669.

Study on the effect of Bmp2 on the osteogenic ability of adipose stem cells

Lai Wentao^{1,2}, Zhao Zhijun^{2,3}, Zhang Chunyang^{2,3}

(¹Baotou Medical College Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010;

²Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010; ³Engineering Technology Center for Bone Tissue Regeneration

and Injury Repair in Inner Mongolia Autonomous Region, Baotou 014010)

Abstract Objective To investigate the changes of osteogenic genes and osteogenic capacity after overexpression of bone morphogenetic protein 2 (Bmp2) in rat adipose stem cells. **Methods** Bmp2 was transfected into rat adipose stem cells by electroporation, and the blank group was used as control. The cells were divided into blank group (Control group), empty load group (Vector group), osteogenesis induction group (Inducement group), and overexpression group (Bmp2 group). Western blot, qRT-PCR and immunofluorescence were used to compare the expression of osteogenic genes, and alkaline phosphatase staining and alizarin red staining were used to observe cobalt sulfide precipitation and calcium salt deposition. **Results** Western blot and qRT-PCR showed that the expression of Bmp2, Bmp4, OPN, OCN, Runx2, P-Smad1/5, Dlx2, and BSP was significantly higher compared to the Control group ($P < 0.05$), while the expression of Smad1/5 was not statistically different. Immunofluorescence showed that the fluorescence intensity of OPN and Runx2 was significantly higher compared to the Control group ($P < 0.05$). The alizarin red staining and alkaline phosphatase staining showed that the Bmp2 group had increased pericellular calcium salt deposition, increased cobalt sulfide precipitation, and enhanced alkaline phosphatase activity compared to the Control group. **Conclusion** Overexpression of Bmp2 enhances osteogenic gene expression in adipose stem cells and improves their osteogenic ability.

Key words adipose-derived stem cells; Bmp2; osteogenic differentiation