基础研究论著

TRPV4调控人诱导多能干细胞来源间充质干细胞成骨分化的体外细胞实验

方文灿，田萧羽，朱　彪，赵立升，杨　烁，温　宁
解放军医学院，解放军总医院第一医学中心口腔医学研究所，口腔颌面战创伤军队重点实验室，北京 100853

摘要：背景　间充质干细胞(mesenchymal stem cells，MSCs)在骨缺损的临床研究中应用广泛。有研究发现瞬时受体电位香草素通道蛋白4(transient receptor potential vanilloid channel protein 4，TRPV4)在骨细胞、破骨细胞和软骨细胞中均有功能性表达。人类TRPV4上有多个自然突变位点，这些位点的突变与短臂畸形、脊椎干骺端发育不良、萎缩性发育不良等人类骨骼病理有关，但其在MSCs中的作用尚未明确。**目的**　探讨TRPV4对人源诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells，iPSCs)来源间充质干细胞(induced pluripotent stem cell derived mesenchymal stem cells，iMSCs)成骨分化的影响。**方法**　将iPSCs诱导成iMSCs，流式细胞术检测细胞表型；成骨、成脂、成软骨分化鉴定细胞的多向分化能力；对iMSCs进行成骨诱导，利用实时定量PCR和Western blot法分别检测在诱导后的不同时间点成骨相关基因表达以及TRPV4的基因和蛋白表达；茜素红染色检测小分子激动剂(GSK101)和抑制剂(GSK219)调控TRPV4功能对iMSCs成骨分化后钙盐沉积的影响；在不同硬度基质表面培养iMSCs，实时定量PCR和Western blot法分别检测TRPV4基因和蛋白表达。**结果**　本实验诱导的iMSCs具有间充质来源干细胞的典型特征；iMSCs成骨分化后成骨相关基因mRNA表达增加($P<0.01$)，TRPV4基因mRNA和蛋白表达均增加($P<0.01$)；TRPV4激动剂GSK101处理后iMSCs后茜素红染色面积较对照组增加($P<0.01$)，TRPV4拮抗剂GSK219处理iMSCs后茜素红染色面积较对照组减少($P<0.01$)；在表面具有高硬度基质的细胞培养板上培养的iMSCs，其TRPV4基因mRNA和蛋白表达增加($P<0.01$)。**结论**　TRPV4在iMSCs成骨分化过程中发挥正向调控作用；通过增加培养基质硬度可促进TRPV4表达从而调节iMSCs的成骨分化。

关键词：间充质干细胞；细胞分化；机械转导；成骨；离子通道
中图分类号：R78　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**2095-5227(2025)05-0468-08
DOI：10.12435/j.issn.2095-5227.24080803
引用本文：方文灿，田萧羽，朱彪，等.TRPV4调控人诱导多能干细胞来源间充质干细胞成骨分化的体外细胞实验［J］.解放军医学院学报，2025，46（5）：468-475.

TRPV4 regulates osteogenic differentiation of induced pluripotent stem cell derived mesenchymal stem cells in vitro

FANG Wencan, TIAN Xiaoyu, ZHU Biao, ZHAO Lisheng, YANG Shuo, WEN Ning
Chinese PLA Medical School, Institute of Stomatology & Oral Maxilla Facial Key Laboratory, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Corresponding author: WEN Ning. Email: wenningchn@163.com

Abstract: Background　Mesenchymal stem cells (MSCs) play a crucial role in bone defect repair and are widely used in clinical research. Studies have found that the transient receptor potential vanilloid channel protein 4 (TRPV4) can promote osteogenesis in bone cells and is functionally expressed in osteoblasts, osteoclasts, and chondrocytes. There are multiple natural mutation sites on the human TRPV4, and mutations at these sites are associated with human skeletal pathologies such as brachydactyly, spondylometaphyseal dysplasia, and atrophic dysplasia. However, its role in MSCs remains unclear. **Objective**　To investigate the effect of TRPV4 on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (iMSCs) derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). **Methods**　iPSCs were induced into iMSCs and their phenotypes were detected by flow cytometry. The differentiation ability of osteoblastic, lipogenic and chondrogenic cells was evaluated. The expression of osteogenic genes and TRPV4 were found at various stages following osteogenic induction of iMSCs by using real-time quantitative PCR and Western

收稿日期：2024-08-08
基金项目：国家自然科学基金项目(52072023)
第一作者：方文灿，学士。Email: wencanfang7989@163.com
通信作者：温宁，博士，主任医师，教授。Email: wenningchn@163.com

blot, respectively. Alizarin red staining was used to detect the effects of TRPV4 small molecule agonist (GSK101) and inhibitor (GSK219) treatment of iMSCs on calcium salt deposition. iMSCs were cultured on different hardness substrates, and TRPV4 gene and protein expression were detected by real-time quantitative PCR and Western blot, respectively. **Results** The iMSCs induced by this experiment had the typical characteristics of mesenchymal stem cells. After osteogenic differentiation of iMSCs, the expressions of osteogenic mRNAs and the expressions of TRPV4 mRNA and protein all increased. The alizarin red staining area of iMSCs treated with TRPV4 agonist GSK101 increased significantly compared with the control group, which was opposite in the TRPV4 antagonist GSK219 group. mRNA and protein expression of TRPV4 gene increased after iMSCs were cultured on a cell culture plate with a high hardness substrate. **Conclusion** TRPV4 plays a positive regulatory role in the osteogenic differentiation of iMSCs. The increased hardness of the culture matrix can regulate the osteogenic differentiation of iMSCs by promoting TRPV4 expression. The results of this study expand the understanding of the osteogenic differentiation process of iMSCs, and provide new ideas for regulating the osteogenic differentiation of iMSCs and promoting the effect of clinical transplantation to repair bone defects.

Keywords: mesenchymal stem cells; cell differentiation; mechanotransduction cellular; osteogenesis; ion channels

Cited as: Fang WC, Tian XY, Zhu B, et al. TRPV4 regulates osteogenic differentiation of induced pluripotent stem cell derived mesenchymal stem cells in vitro[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(5): 468-475.

临床上常见因骨病、外伤、严重感染、先天性畸形和肿瘤切除等造成的骨缺损，骨骼具有较强的再生能力，但大面积的骨缺损通常不能通过身体的修复机制自发愈合。诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells，iPSCs)衍生的间充质干细胞(mesenchymal stem cells，MSCs)具有与MSCs相似的成纤维细胞样形态、表面抗原谱[1]，与成体来源(如骨髓、脂肪、牙髓等)的MSCs比较，人诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(induced pluripotent stem cell derived mesenchymal stem cells，iMSCs)具有较强的增殖能力和不易复制衰老的优势，可以持续为临床治疗提供所需的大量细胞[2]。

2021年诺贝尔生理学或医学奖授予了分别发现热敏感离子通道TRPV1和机械敏感离子通道Piezo的David Julius和Ardem Patapoutian[3-4]。机械信号对细胞分化和功能的影响成为近年来干细胞领域的研究热点。机械敏感离子通道TRPV4参与将外部机械信号转化为电信号或生物化学信号转导到特定细胞内的过程[5]。但TRPV4在iMSCs骨分化中的作用国内外尚无报道。我们研究了TRPV4在调节iMSCs成骨分化中的作用，为促进iMSCs在组织工程骨中的应用提供依据，为增强人工骨修复材料的修复提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、材料、设备

人诱导性多能干细胞(RC01001-A，血液来源，通过非整合重编程技术诱导)、人多能干细胞(human pluripotent stem cell，hPSC)培养基、Blebbistatin (10 mmol/L)、EDTA传代工作液、hPSC-间充质干细胞分化试剂盒、hMSC培养基、Solase细胞消化液、成脂诱导试剂盒、成软骨诱导试剂盒均购自首宁生物公司；成骨诱导试剂盒、茜素红染液、阿利新兰乳液购自Oricell公司；Matrigel购自Corning公司；CD34-FITC、CD90-FITC、CD79a-FITC、CD HLA-DR-FITC、CD45-FITC、CD14-FITC、APC anti-human CD73、PE anti-CD105抗体均购自BioLegend公司；BCA蛋白定量试剂盒购自Biomed公司；兔抗TRPV4抗体购自Abcam公司；鼠抗β-actin抗体购自Zenbio公司；油红O染液购自碧云天公司；具有不同硬度的细胞培养6孔板购自CellSoft公司；TRPV4小分子激动剂GSK101(10 mmol/L)、TRPV4小分子抑制剂GSK219(10 mmol/L)均购自Selleck公司；所有引物均由上海生工生物科技有限公司合成；RIPA裂解缓冲液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂购自CWBIO公司；Tris-Glycine Transfer Buffer购自康为世纪公司；SYBR Green Mix试剂盒购自Takara公司；倒置显微镜购自日本尼康公司；细胞培养箱、流式细胞仪均购自美国赛默飞世尔公司；实时荧光定量PCR仪购自美国罗氏公司；化学发光成像系统FluorChem E购自美国普诺森生物科技公司。

1.2 iPSCs的培养与传代

1.2.1 iPSCs复苏 将1 mL的Matrigel添加到6孔培养板，然后在37℃培养箱中静置60 min后去除液体。取出iPSCs细胞，立即在37℃水浴中解冻，随后加入10 mL的DMEM/F12培养基并轻轻摇动混合。1 300 r/min离心5 min后，使用2 mL的ncTarget培养基和0.025%的Blebbistatin混合液重新悬浮iPSCs细胞。将细胞放置在培养箱中培养24 h后，吸去孔板中的旧培养基，并用2 mL的ncTarget培养基替换，继续培养至细胞融合率达85%。

1.2.2 iPSCs传代 去除培养孔中的培养基，加入DPBS轻柔洗涤1次后加入2 mL EDTA传代工作液

使溶液完全覆盖孔底，置于37℃培养箱中消化8 min后吸弃，及时加入2 mL预温的ncTarget全培养基 + 0.025% Blebbistatin，水平十字摇晃6孔板使细胞脱离基质，按照1∶10的比例传代至新的培养孔中，将细胞放置在培养箱中培养24 h后去除孔板中的培养基，更换2 mL新鲜配制的ncTarget全培养基培养至细胞融合率达85%，如此传代5次。

1.3　iPSCs分化诱导

将P6代iPSCs按照1.2节中的方法接种至新的培养孔中，按照分化试剂盒说明书中的时间点添加分化培养基直至13～14 d，细胞长满，此时细胞为P0代的iMSCs。

1.4　iMSCs的三系分化

1.4.1　iMSCs成骨诱导和茜素红染色　在12孔板中每孔加入1 mL成骨分化培养基，培养12 d后，用4%多聚甲醛进行固定后用PBS轻柔洗涤3次，每孔中加入0.5 mL经过滤后的茜素红染液，室温下避光染色10 min后去除染色剂，并使用PBS溶液轻柔洗涤1～2次，以终止染色并清除多余染色剂。在显微镜下观察细胞的染色情况。

1.4.2　iMSCs成脂肪诱导和油红O染色　在12孔培养板每孔中加入1 mL脂肪诱导分化培养基，培养14 d后，用4%的多聚甲醛进行固定后用PBS轻柔洗涤3次。每孔中加入0.5 mL油红O染色剂，避光条件下孵育30 min后去除染色剂，并使用PBS溶液轻柔洗涤1～2次，以终止染色过程并清除多余的染色剂。在显微镜下观察细胞的染色情况。

1.4.3　iMSCs成软骨诱导和阿利新兰乳液染色　在12孔板中每孔加入1 mL成软骨分化培养基，培养14 d后，用4%多聚甲醛进行固定10 min后，将iMSCs颗粒用包埋剂包埋，厚度调节为10 μm切片，将载玻片浸泡于DPBS中清洗2遍，每次摇床洗10 min，充分晾干后切片样本滴加Oricell阿利新兰乳液，染液全部覆盖样本，置于湿盒中，放入37℃干燥箱中染色30 min后用流水缓慢洗涤载玻片3 min，充分晾干后显微镜下观察染色效果。

1.5　流式细胞术检测间充质干细胞标志物

将9个iMSCs样品(每个样品不少于1×10^6个细胞)加入1.5 mL离心管中，加入1 mL FACS流式洗涤液悬浮细胞沉淀。除空白对照管外，其余各管中分别加入5 μL CD34-FITC、CD90-FITC、CD79a-FITC、CD HLA-DR-FITC、CD45-FITC、CD14-FITC、APCa nti-human CD73、PE anti-CD105抗体，轻弹管壁混匀，4℃避光孵育20～30 min。避光结束后加入1 mL FACS流式洗涤液悬浮细胞2次；加入500 μL FACS混匀后流式细胞仪检测。

1.6　在成骨分化培养基中添加TRPV4小分子激动剂GSK101和TRPV4小分子抑制剂GSK219

取1 μL TRPV4小分子激动剂GSK101母液(10 mmol/L)，用1 mL PBS稀释混匀后，在每毫升成骨培养基中添加4 μL稀释液，混匀后得到含有4 μmol/L的GSK101的成骨诱导培养基。在每毫升成骨培养基中添加1 μL TRPV4小分子激动剂GSK219(10 mmol/L)母液，混匀后得到含10 nmol/L GSK219的成骨诱导培养基。

1.7　实时荧光定量PCR检测iMSCs成骨相关基因和TRPV4基因mRNA表达水平

使用Trizol试剂提取iMSCsRNA，按照实时荧光定量PCR仪制造商的程序反转录成cDNA。用SYBR Green Mix试剂盒测定相对mRNA含量，每个样本设3个复孔，实验重复3次。用于RT-qPCR的靶基因和管家基因的引物序列均由上海生工生物科技有限公司提供(表1)。

1.8　Western blot检测iMSCs内TRPV4蛋白表达水平

将接种在培养孔中的iMSCs细胞用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液处理，随后利用细胞刮刀将裂解后的细胞从孔中刮取并转移到1.5 mL的EP离心管里。接着，使用高速离心机

表1　RT-qPCR引物序列

Tab. 1　Primer sequences of RT-qPCR

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
hBMP2	TCTTCTCCAATGACCGCAGCAATG	CTCCTCCTCTTGGCTCTCACCTG
hRUNX2	AGGCAGTTCCCAAGCATTTCATCC	TGGCAGGTAGGTGTGGTAGTGAG
hOCN	AGGGCAGCGAGGTAGTGAAGAG	GGTCAGCCAACTCGTCACAGTC
hALP	GCTTGACCTCCTCGGAAGACACTC	CGCCTGGTAGTTGTTGTGAGCATAG
hTRPV4	ACGAGATGCTGGCTGTGGAG	TAGTAGGCGGTGAGAGTGAAGATG
hβ-actin	TGACGTGGACATCCGCAAAGA	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG

hBMP2：骨形态发生蛋白2；hRUNX2：Runt相关转录因子2；hOCN：骨钙素；hALP：碱性磷酸酶。

以12 000/r离心20 min，分离出上清液进行BCA方法的蛋白浓度测定。根据测定结果，取13.34 μg的蛋白质样本进行凝胶电泳和膜转移。使用5%脱脂奶粉在室温下摇床封闭膜2 h。在4℃下，TRPV4一抗和β-actin一抗孵育膜过夜。第2天，在室温下摇床孵育相应二抗1 h，用TBST缓冲液洗涤3次，每次10 min后，加入ECL发光液进行曝光。最后，用Image J软件对曝光后的条带进行灰度值分析，实现蛋白的相对定量。

1.9　在不同硬度培养板表面培养iMSCs

在使用培养板前打开盖子照射紫外灯30 min，PBS轻柔冲洗1次，加入2 mL新鲜培养基后加入适量细胞悬液，水平十字摇晃3次后将细胞放置在培养箱中培养。

1.10　统计学分析

使用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析和绘图。两组数据采用独立样本t检验，多组数据使用单因素方差分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　iMSCs的诱导

将iPSCs复苏后传代5次，更换分化培养基开始向iMSCs诱导分化。在iPSCs诱导的第1天细胞集落紧致、平坦，与胚胎干细胞相似，细胞呈圆形，细胞核体积大、细胞质体积相对较小。诱导第3天细胞密集生长。诱导第8天细胞逐渐扁平化表现为多角形。见图1。

2.2　iMSCs的分化和鉴定

通过流式细胞术对诱导得到的iMSCs进行鉴定，流式细胞术结果表明，iMSCs表面相对特异性CD分子：CD90(98.50%)、CD73(99.40%)、CD105(98.20%)阳性表达，CD45(4.04%)、CD HLA-DR(3.82%)、CD34(4.42%)、CD79a(3.31%)、CD14(3.71%)阴性表达，证明本实验诱导的iMSCs具有间充质来源干细胞的典型细胞表型特征(图2)。光学显微镜下见iMSCs均成短梭形，经过第3代后的反复传代，细胞贴壁的大小和形态逐渐趋于均匀，长势良好(图3A)。iMSCs经茜素红、油红O和阿里新兰乳液染色后显微镜下观察发现明显的钙结节、脂滴和软骨细胞外基质。三系分化结果表明iMSCs具有成骨、成脂肪、成软骨能力(图3B～图3F)。

2.3　iMSCs成骨诱导后成骨相关基因mRNA的表达

通过实时荧光定量PCR技术检测未成骨诱导和成骨诱导6 h、24 h、3 d、7 d、14 d、21 d的iMSCs中成骨相关基因mRNA的表达，RT-qPCR结果显示，随着iMSCs成骨诱导时间的增加，成骨相关基因BMP2、RUNX2、OCN、ALP的mRNA表达水平增加(图4)。

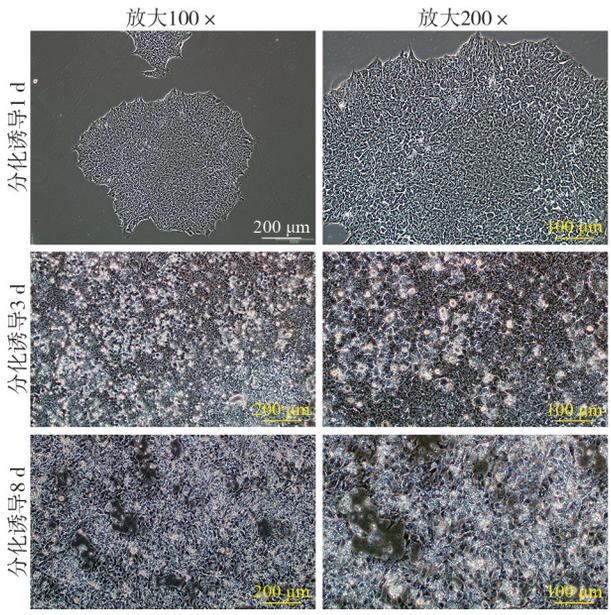


图1　不同分化诱导时间点iPSCs的形态学观察

Fig. 1　Morphological observation of iPSCs at different differentiation induction time points

2.4　iMSCs成骨诱导对TRPV4基因mRNA和蛋白表达的影响

光学显微镜下见成骨诱导2 d的iMSCs形态(图5A)。通过实时荧光定量PCR和Western blot技术检测未成骨诱导和成骨诱导6 h、24 h、3 d、7 d、14 d、21 d的iMSCs中TRPV4基因mRNA和蛋白表达，RT-qPCR结果显示，iMSCs成骨诱导6 h后，TRPV4基因的mRNA表达水平与未诱导的对照组(PM组)增加，并呈逐渐增加趋势(图5B)。Western blot结果显示，iMSCs成骨诱导后24 h后，TRPV4蛋白表达水平增加(图5C～图5D)。

2.5　TRPV4小分子激动剂GSK101/抑制剂GSK219处理iMSCs对其成骨分化的影响

为了进一步明确TRPV4的作用，在iMSCs的成骨诱导培养基中添加GSK101(4 nmol/L)，结果显示茜素红染色面积较对照组增加(图6A～图6B)，表明TRPV4的激活可促进iMSCs的成骨分化；在成骨诱导培养基中添加GSK219(5 μmol/L)后茜素红染色面积则较对照组减少(图7A～图7B)，表明TRPV4的抑制可减弱iMSCs的成骨分化。以上结果表明TRPV4是iMSCs成骨分化的调节因子。

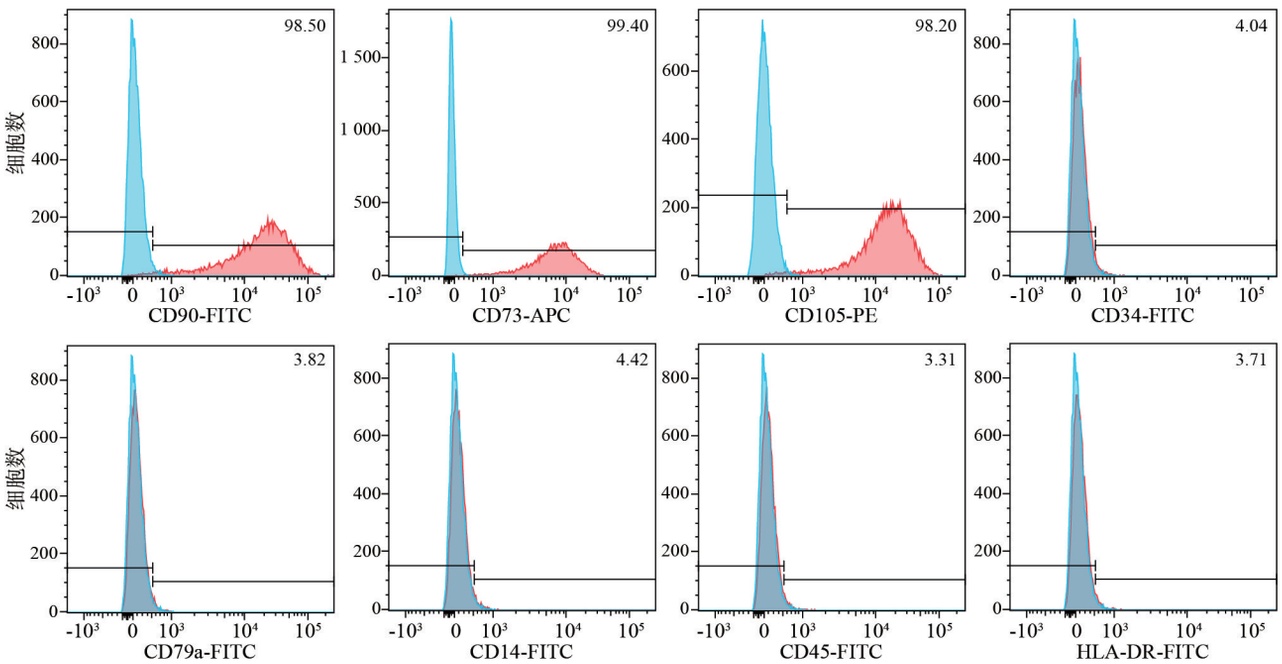
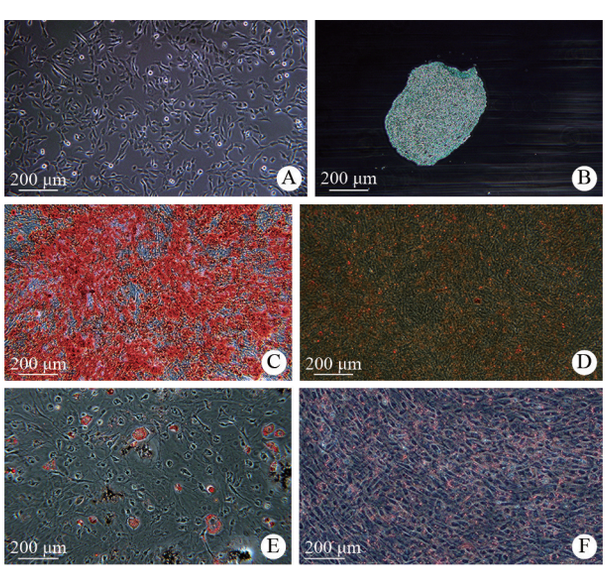


图 2　流式细胞术鉴定细胞表型

Fig. 2　Identification of cell phenotype by flow cytometry



A：iMSCs P3代细胞形态；B：成软骨诱导21 d阿利新兰乳液染色；C：成骨诱导12 d茜素红染色；D：未诱导iMSCs同期茜素红染色；E：成脂肪诱导21 d油红O染色；F：未诱导iMSCs同期油红O染色(100×)。

图 3　iMSCs三系分化的形态学观察没有未诱导阿利新蓝乳液染色

Fig. 3　Morphological observation of three-line differentiation of iMSCs

2.6　基质硬度对iMSCs中TRPV4基因mRNA和蛋白表达的影响

iMSCs的移植时需复合不同的支架材料，因此，本研究分别在1 GPa、60 kPa、40 kPa、10 kPa和5 kPa的具有不同硬度的培养板表面培养iMSCs。通过实时荧光定量PCR和Western blot法检测基质硬度对iMSCs表达TRPV4基因mRNA和蛋白的影响，实验结果表明，与硬基质相比，在软基质表面生长的iMSCs的TRPV4基因的mRNA表达水平降低(图8A)；在软基质表面生长的iMSCs TRPV4蛋白表达水平亦降低(图8B)。

3　讨论

骨是一种坚硬的矿化组织，主要由无机羟基磷灰石纳米晶体散布着各种有机成分，包括细胞、胶原纤维和各种其他细胞外基质分子[6]。骨骼在机体行使基本功能时发挥重要作用，它可为肌肉和其他组织提供附着框架、保护内脏和器官免受伤害、维持矿物质稳态和酸碱平衡、为骨髓空间内的造血提供环境并作为生长因子和细胞因子的储存库[7]。尽管骨骼天生有较强的再生能力，但大面积的骨缺损通常不能通过身体的修复机制自发愈合。

近年来再生医学领域通过以干细胞为种子细胞的组织工程骨移植展现了良好的治疗前景。其中MSCs在临床前和临床研究中研究最为广泛。MSCs是基质干细胞组成的异质性亚群，可以从人骨髓、脐带血等在内的许多组织中分离扩增而获得，也可以通过多能干细胞诱导分化获得[8]。因其具有易获得性、较强的自我更新和多向分化能力，MSCs在骨组织工程的研究中被广泛应用[9-10]。骨髓是MSCs的首个来源，于1970年代由Friedenstein等首次在体外培养条件下分离和繁殖[11]。MSCs具

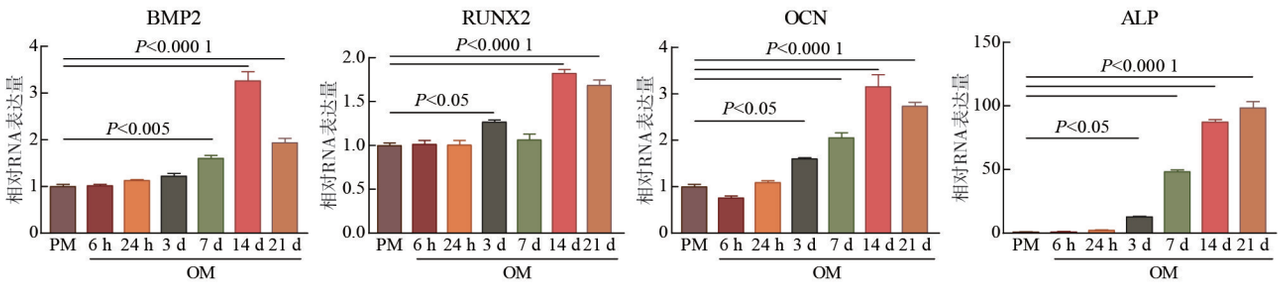
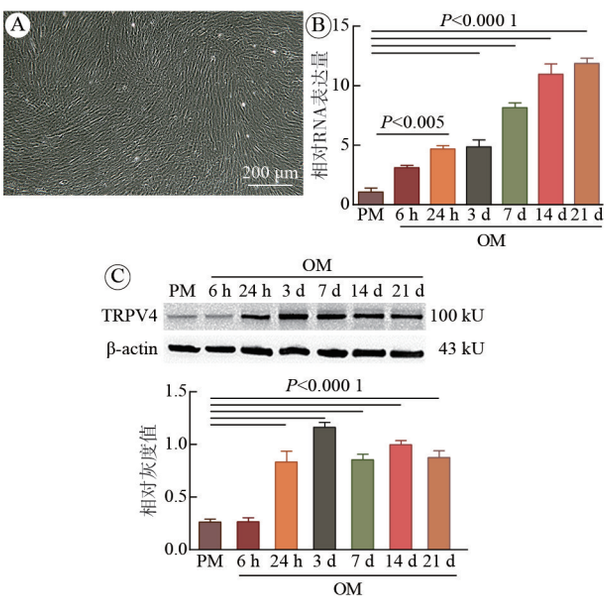


图 4　不同时间点成骨相关基因的RT-qPCR检测(n=3)

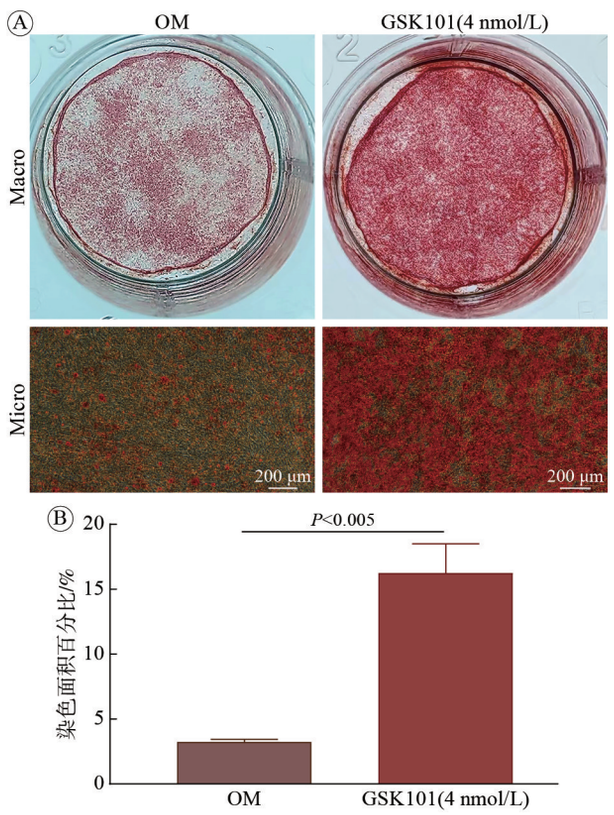
Fig. 4　RT-qPCR detection of osteogenic genes (n=3)



A：成骨诱导2 d后iMSCs形态(100×)；B：成骨诱导时间对iMSCs的TRPV4 mRNA表达影响(n=3)；C：成骨诱导时间对iMSCs的TRPV4蛋白表达影响(n=4)。

图 5　成骨诱导时间对iMSCs的TRPV4 mRNA和蛋白表达影响

Fig. 5　Effect of osteogenic induction time on TRPV4 mRNA and protein expression of iMSCs



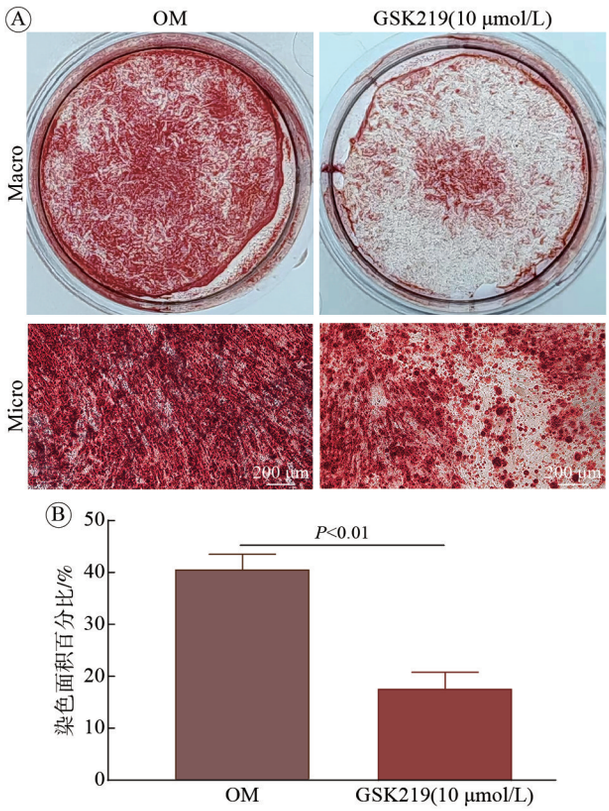
A：GSK101(4 nmol/L)处理iMSCs 12 d后茜素红染色(100×)；B：茜素红染色面积(n=3)。

图 6　GSK101处理iMSCs对其成骨诱导过程中钙沉积的影响

Fig. 6　Effect of GSK101 treatment of iMSCs on calcium deposition during osteogenesis induction

有在体外容易扩增的特性，但其增殖能力有限，多次传代后易老化。此外，其在复制性衰老过程中会发生分化潜力、分泌表型和免疫调节功能等功能改变，从而限制了体外移植功能细胞的数量和质量。同时，有研究表明与健康供体相比，在炎症环境下MSCs的体外和体外特性都存在缺陷[12]。此外，MSCs的治疗潜力也与供体年龄密切相关[13]。上述问题阻碍了MSCs在临床细胞治疗试验中的广泛应用。在这种情况下，从用多能因子重编程的体细胞中获得的iPSCs被认为是MSCs的替代来源。iPSCs来源于体细胞，人体中几乎所有的细胞类型都有可能成为iPSCs，它们克服了与人类胚胎干细胞相关的伦理和免疫原性挑战，同时可以自体移植以防止免疫排斥[14]。而iMSCs具有iPSCs和MSCs的特征。这些干细胞具有与MSCs相似的成纤维细胞样形态、表面抗原谱和多能性、较强的增殖能力和不易复制衰老的特点，可以为临床治疗持续提供所需的大量细胞。由于iMSCs可以从单个iPSCs克隆中获得，所以降低了MSCs的异质性，提供了产生高产量的患者特异性MSCs的可能性。本研究通过iPSCs的分化诱导得到了iMSCs。

在机械转导的过程中，细胞主要通过直接或间接调节离子通道、调节信号因子分泌、细胞表面受体3种途径感知外部机械信号[15]。其中机械敏感离子通道(mechanically sensitive ion channels，



A：GSK219(10 μmol/L)处理iMSCs 12 d后茜素红染色；B：茜素红染色面积(n=3)。

图7　GSK219处理iMSCs对其成骨诱导过程中钙沉积的影响

Fig. 7　Effect of GSK219 treatment of iMSCs on calcium deposition during osteogenesis induction

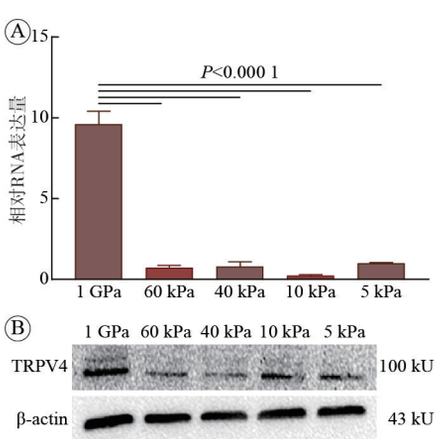


图8　基质硬度对iMSCs的TRPV4 mRNA(A)和蛋白(B)表达影响

Fig. 8　Effect of matrix stiffness on TRPV4 mRNA (A) and protein (B) expression of iMSCs

MIC)是将细胞外部的机械刺激转导为细胞内电信号或化学信号过程中活细胞表面的主要机械感受器[16]。近年来的研究热点分子为Piezo1，据报道在坚硬的基质(40 kPa)上培养骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs)时，细胞可以感知基质刚度并将细胞质Yes相关蛋白1(Yes-associated protein 1，Yap1)易位到细胞核，Piezo1缺陷的BMSCs失去了感知和响应坚硬底物的能力，细胞内Ca^{2+}信号较弱，Yap1在细胞质和细胞核中弥漫性定位的信号传导[17]。而本研究关注的TRPV4阳离子通道是TRP香草酸亚家族的成员之一[18]，是一种机械敏感、非选择性的Ca^{2+}渗透性阳离子通道，由871个氨基酸组成。先前的研究证明TRPV4定位于细胞内在流体剪切(oscillatory fluid shear，OFS)下的高应变区，特别是在初级纤毛区。这对于OFS诱导的钙信号和BMSCs中成骨基因表达至关重要。缺乏初级纤毛的BMSCs对可增强成骨的TRPV4激动剂无反应且TRPV4的敲低会减弱骨细胞中血流诱导的成骨[19-20]。本研究通过实时定量PCR和Western blot实验证明在iMSCs成骨分化过程中，成骨相关基因BMP2、RUNX2、OCN、ALP的mRNA表达均显著增加，且TRPV4在iMSCs成骨分化过程中发挥作用，随着成骨分化的时间增加，TRPV4基因mRNA和蛋白表达均显著增加。通过添加激动剂或拮抗剂，我们进一步证实了TRPV4在iMSCs的成骨分化中发挥着正性调控作用。

临床上常采用不同类型的生物支架材料复合干细胞移植用于骨缺损的修复。生物材料包括生物学强度较软的注射性壳聚糖、胶原、水凝胶等，还有生物学强度较硬的超多孔的磷酸三钙、磷酸钙水泥等[21-22]。一方面，为了促进大面积不规则骨缺损的再生，对移植材料的要求很高，易塑型且细胞黏附性好的软基质材料复合干细胞和生长因子是一个良好选择[23]；另一方面，从力学的角度来看，骨移植生物材料应该具有与被替换的皮质/松质骨相似的强度，这需要与骨相似的弹性模量相匹配以防止发生应力屏蔽[24-25]。这些材料通常是具有生物相容性的可降解材料，这意味着随着材料的吸收降解其强度也会逐渐降低。本研究通过实时定量PCR和Western blot实验证明在不同硬度基质上培养的iMSCs成骨分化的影响，基质硬度增加可显著增加TRPV4基因mRNA和蛋白表达，说明基质硬度可影响iMSCs的成骨分化进程，本研究结果表明在组织工程骨硬度不足的情况下我们可通过调控TRPV4的表达来促进骨修复。

综上所述，本研究证明了TRPV4在调节iMSCs成骨分化中发挥正性调控作用，可能为促进iMSCs在组织工程骨中的应用提供理论依据，为临床上骨缺损的修复提供新策略。TRPV4促进

iMSCs成骨分化的机制有待进一步深入研究。

作者贡献 方文灿：论文撰写；田萧羽、朱彪、赵立升、杨烁：审读和修订，监督指导；温宁：审读和修订。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取，Email：wencanfang7989@163.com。

参考文献

1 Dias IX，Cordeiro A，Guimarães JAM，et al. Potential and limitations of induced pluripotent stem cells-derived mesenchymal stem cells in musculoskeletal disorders treatment ［J］. Biomolecules，2023，13（9）：1342.
2 Wruck W，Graffmann N，Spitzhorn LS，et al. Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells acquire rejuvenation and reduced heterogeneity ［J］. Front Cell Dev Biol，2021，9：717772.
3 Hill RZ，Loud MC，Dubin AE，et al. PIEZO1 transduces mechanical itch in mice ［J］. Nature，2022，607（7917）：104-110.
4 Zhang KH，Julius D，Cheng YF. Structural snapshots of TRPV1 reveal mechanism of polymodal functionality ［J］. Cell，2021，184（20）：5138-5150.
5 Di XP，Gao XS，Peng L，et al. Cellular mechanotransduction in health and diseases：from molecular mechanism to therapeutic targets［J］. Signal Transduct Target Ther，2023，8（1）：282.
6 Heng BC，Bai YY，Li XC，et al. Electroactive biomaterials for facilitating bone defect repair under pathological conditions［J］. Adv Sci （Weinh），2023，10（2）：e2204502.
7 López JM. Bone development and growth ［J］. Int J Mol Sci，2024，25（12）：6767.
8 Dupuis V，Oltra E. Methods to produce induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells：Mesenchymal stem cells from induced pluripotent stem cells ［J］. World J Stem Cells，2021，13（8）：1094-1111.
9 李琳，朱彪，田萧羽，等. 大麻二酚对衰老小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化影响的体外细胞实验［J］. 解放军医学院学报，2022，43（1）：75-80.
10 郭树琴，焦婷，赵立升，等. 细胞因子Irisin缓解高糖诱导骨髓间充质干细胞凋亡的机制研究［J］. 解放军医学院学报，2021，42（6）：629-633.
11 Phinney DG. Alexander friedenstein，mesenchymal stem cells，shifting paradigms and euphemisms ［J］. Bioengineering （Basel），2024，11（6）：534.
12 Čamernik K，Mihelič A，Mihalič R，et al. Comprehensive analysis of skeletal muscle- and bone-derived mesenchymal stem/stromal cells in patients with osteoarthritis and femoral neck fracture［J］. Stem Cell Res Ther，2020，11（1）：146.
13 Bagge J，Berg LC，Janes J，et al. Donor age effects on in vitro chondrogenic and osteogenic differentiation performance of equine bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells［J］. BMC Vet Res，2022，18（1）：388.
14 Teale MA，Schneider S，Eibl D，et al. Mesenchymal and induced pluripotent stem cell-based therapeutics：a comparison［J］. Appl Microbiol Biotechnol，2023，107（14）：4429-4445.
15 Romani P，Valcarcel-Jimenez L，Frezza C，et al. Crosstalk between mechanotransduction and metabolism［J］. Nat Rev Mol Cell Biol，2021，22（1）：22-38.
16 Miles L，Powell J，Kozak C，et al. Mechanosensitive ion channels，axonal growth，and regeneration［J］. Neuroscientist，2023，29（4）：421-444.
17 Zhou TF，Gao B，Fan Y，et al. Piezo1/2 mediate mechanotransduction essential for bone formation through concerted activation of NFAT-YAP1-ß-catenin［J］. Elife，2020，9：e52779.
18 Fan JP，Guo C，Liao DH，et al. Structural pharmacology of TRPV4 antagonists［J］. Adv Sci，2024，11（25）：2401583.
19 Corrigan MA，Johnson GP，Stavenschi E，et al. TRPV4-mediates oscillatory fluid shear mechanotransduction in mesenchymal stem cells in part via the primary Cilium［J］. Sci Rep，2018，8（1）：3824.
20 Lee KL，Guevarra MD，Nguyen AM，et al. The primary Cilium functions as a mechanical and calcium signaling nexus ［J］. Cilia，2015，4：7.
21 Gillman CE，Jayasuriya AC. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration［J］. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl，2021，130：112466.
22 单验博，乔波，杨烁，等. 口腔种植体新材料的研究进展［J］. 解放军医学院学报，2023，44（1）：74-78.
23 Qi J，Yu T，Hu B，et al. Current biomaterial-based bone tissue engineering and translational medicine［J］. Int J Mol Sci，2021，22（19）：10233.
24 Lu Y，Deshmukh S，Jones I，et al. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications［J］. Biomater Transl，2021，2（3）：214-235.
25 Chmielewska A，Dean D. The role of stiffness-matching in avoiding stress shielding-induced bone loss and stress concentration-induced skeletal reconstruction device failure［J］. Acta Biomater，2024，173：51-65.

（责任编辑：孟晓彤）

（上接第454页）

27 Mayadev J，Nunes AT，Li M，et al. CALLA：efficacy and safety of concurrent and adjuvant durvalumab with chemoradiotherapy versus chemoradiotherapy alone in women with locally advanced cervical cancer：a phase III，randomized，double-blind，multicenter study［J］. Int J Gynecol Cancer，2020，30（7）：1065-1070.
28 Casagrande S，Sopetto GB，Bertalot G，et al. Immune-related adverse events due to cancer immunotherapy：immune mechanisms and clinical manifestations［J］. Cancers （Basel），2024，16（7）：1440.
29 张书培，杨磊，顾康生. PD-1/PD-L1抑制剂治疗晚期肿瘤患者免疫相关不良事件的预后价值［J］. 临床肿瘤学杂志，2022，27（2）：109-116.
30 周宇欣，邵佳康，张正，等. PD-1/PD-L1抑制剂治疗小细胞肺癌疗效及预后的真实世界研究［J］. 解放军医学院学报，2024，45（2）：105-111.

（责任编辑：潘越，施晓亚）