

骨 科 学

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000247

AP2 α 在 BMP9 诱导 C3H10 成骨分化中的作用及机制探讨

龚梦嘉,李娅莎,毕 杨

(重庆医科大学附属儿童医院儿研所干细胞实验室,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,
重庆市干细胞治疗工程技术研究中心,重庆 400014)

【摘要】目的:研究转录蛋白 2(activator protein 2,AP2) α 在骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)9 诱导小鼠间充质干细胞 C3H10 成骨分化中的作用及可能的分子机制。**方法:**重组腺病毒 Ad-BMP9 感染小鼠 C3H10 细胞,显性负性突变体 AP2 α - Δ bHLH 和 AP2 α - Δ TAD 抑制 AP2 α 转录活性,通过 RT-PCR、real-time PCR 检测 AP2 α 、BMP9 及成骨相关基因的表达水平,Western blot 检测骨桥蛋白(osteopontin,OPN)表达,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性测定、茜红素染色实验观测 C3H10 成骨分化。**结果:**BMP9 具有强促成骨分化的作用,对 AP2 α 的表达水平无影响,AP2 α 显性负性突变体可抑制 BMP9 诱导的成骨基因骨钙蛋白(osteocalcin,OC)、OPN 及骨保护素(osteoprotegerin,OPG)表达的增高(OC: $F=56.929$, $P=0.000$;OPN: $F=54.789$, $P=0.000$;OPG: $F=159.451$, $P=0.000$),ALP 活性($F=69.776$, $P=0.000$)及红色钙盐沉积减少。**结论:**BMP9 可能通过影响 AP2 α 的转录活性调控成骨分化进程。

【关键词】转录蛋白 AP2 α ;显性负性突变体;骨形态发生蛋白 9;成骨分化

【中国分类号】R34

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-10

Effect of activator protein 2 α on BMP9-induced osteogenesis differentiation of C3H10 and its mechanism

Gong Mengjia, Li Yasha, Bi Yang

(Stem Cell Biology and Therapy Laboratory, the Children's Hospital, Chongqing Medical University;
Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders;
Engineering Technical Center of Stem Cell Therapy in Chongqing)

【Abstract】Objective: To research the effect of activator protein 2 α on the process of bone morphogenetic protein 9(BMP9)-induced osteogenesis differentiation of mouse mesenchymal stem cells(C3H10) and its mechanism. **Methods:** C3H10 cells were infected with Ad-BMP9. Adenovirus-mediated dominant negative mutants Ad-dnAP2 α - Δ bHLH and Ad-dnAP2 α - Δ TAD were used to inhibit AP2 α transcriptional activity. RT-PCR, real-time PCR and Western blot methods were used to detect the expression of AP2 α , BMP9 and osteogenesis related markers. Alkaline phosphatase reading/staining and alizarin red staining were performed to detect the status of osteogenesis differentiation. **Results:** Over-expression of BMP9 could accelerate osteogenesis differentiation but did not affect the expression of AP2 α . AP2 α dominant negative mutants could inhibit the BMP9-induced increase of osteogenesis related markers osteocalcin (OC), osteopontin (OPN) and osteoprotegerin (OPG) expression (OC: $F=56.929$, $P=0.000$; OPN: $F=54.789$, $P=0.000$; OPG: $F=159.451$, $P=0.000$) and reduce the alkaline phosphatase activity ($F=69.776$, $P=0.000$) and red staining of calcium salt deposition. **Conclusion:** AP2 α transcription activity might regulate the process of BMP9-induced osteogenesis differentiation.

【Key words】 activator protein 2 α ; dominant negative mutant; bone morphogenetic protein 9; osteogenesis differentiation

成骨活性因子是骨组织工程的三大重要因素之一,通过调节细胞增殖、分化并改变细胞产物的

合成而作用于成骨过程^[1]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)9 具有最强的促成骨分化作用,体内可诱导异位新骨的形成,在骨折、骨不连接和骨缺损等临床治疗中具有潜在的应用前景^[2]。BMP9 诱导成骨分化的具体分子机制还不完全明确,单一 BMP9 基因诱导的成骨效果并不能满足组织工程骨的修复效果。

转录蛋白 2(activator protein 2,AP2)是一类 DNA

作者介绍:龚梦嘉,Email:gmj0710@cqmu.edu.cn,

研究方向:干细胞与再生医学。

通信作者:毕 杨,Email:yangbi1981@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81100309);重庆市教委科学技术研究项目(编号:KJ110301)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1108.005.html>

(2014-04-28)

结合蛋白家族,参与胚胎发育、细胞分化及肿瘤发生中的基因调控。其中 AP2 α 在小鼠胚胎期的成骨及软骨分化及发育过程中,起着重要的转录调控作用。课题组前期发现 BMP9 诱导成骨的过程中能显著增高 AP2 α 的转录活性^[3]。本研究采用 AP2 α 的显性负性突变体,证实调控 AP2 α 转录活性对 BMP9 诱导 C3H10 成骨分化中的影响,AP2 α 的调控可能有助于增强 BMP9 的成骨分化效应,为深入揭示 BMP9 诱导成骨分化的具体分子机制及其作为成骨活性因子应用于骨组织工程提供重要的依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

小鼠间充质干细胞 C3H10 购自 ATCC 细胞库,腺病毒 Ad-AP2 α 及其显性负性突变体 Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 和 Ad-dnAP2 α - Δ TAD 腺病毒由本实验室前期构建^[4-5]。携带绿色荧光蛋白(green flurescent protein,GFP)基因的空载腺病毒,携带红色荧光蛋白(red flurescent protein,RFP)基因的空载腺病毒,Ad-BMP9 重组腺病毒由美国芝加哥大学何通川教授馈赠。

DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 HyClone 公司,蛋白提取试剂盒、RNA 提取试剂盒及 real-time PCR 试剂盒购自 Biotek 公司,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)染色试剂盒、polybrene 购自美国 Sigma 公司,ALP 读数试剂盒、逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司,小鼠来源的 β -actin 一抗、骨桥蛋白(osteopontin,OPN)一抗、羊抗鼠二抗购自 Santa Cruz 公司,胰酶、青链霉素、维生素 C、茜素红及 β -磷酸甘油购自碧云天公司,PCR 引物合成由华大基因公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 重组腺病毒感染小鼠间充质干细胞 C3H10 将 C3H10 接种于 24 孔板,1 $\times$ 10⁵ 个/孔,设置 3 复孔,培养过夜,每 1 ml 完全培养基加入 5 μ l 病毒作用增强剂 polybrene(终浓度 10 μ g/ml)及重组腺病毒(MOI:1:4),设计实验组为:①Ad-BMP9+Ad-RFP 组;②Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 组;③Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组,同时设置空白对照组(control)和空病毒组(Ad-GFP+Ad-RFP)。本实验所用的 AP2 α 显性负性突变体 AP2 α - Δ bHLH 及 AP2 α - Δ TAD 分别为 AP2 α 缺失 bHLH 区域及缺失 TAD 区域,均可抑制 AP2 α 的转录活性。

1.2.2 RT-PCR 及 real-time PCR 检测 mRNA 水平的表达 重组腺病毒感染 10 d 后,试剂盒提取各组细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA。RT-PCR 及 real-time PCR 扩增相关基因,引物序列见表 1,AP2 α (TAD)为特异性扩增 AP2 α 全基因中 TAD 反式转录激活区域,骨钙素(osteocalcin,OC)、OPN 和骨保护素(osteoprotegerin,OPG)是 mRNA 水平检测细胞成骨分化的常用基因,以 β -actin 为内参标化模板。RT-PCR 反应体系为:

cDNA 2 μ l,上下引物各 1 μ l,PCR 反应液 6 μ l,加水至 15 μ l。real-time PCR 反应体系为:cDNA 2 μ l,上下引物各 1 μ l,2 $\times$ SYBR Green 反应液 7.5 μ l,加水至 20 μ l。RT-PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min;93 $^{\circ}$ C 20 s,65 $^{\circ}$ C~55 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,每循环降低 1 $^{\circ}$ C,28 个循环;93 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,30 个循环;real-time PCR 反应条件为:72 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,共 40 个循环;溶解曲线 65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C,每 5 s 增加 0.5 $^{\circ}$ C,读板。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequence

引物名称	序列(5'→3')
AP2 α (TAD)正义链	CAGTCGCAAGATCCTTACTC
AP2 α (TAD)反义链	GTGTGTGTAAGAGCCCAGAT
BMP9 正义链	CTGCTTCTTCCCCTTGGCTGA
BMP9 反义链	TGCCCTCGTAATGCTACTTGAGG
OC 正义链	CCTTCATGTCCAAGCAGGA
OC 反义链	GGCGGTCTTCAAGCCATAC
OPN 正义链	CCTCCCGGTGAAAGTGAC
OPN 反义链	CTGTGGCGCAAGGAGATT
OPG 正义链	GTTCTGTCACAGCTTCACAA
OPG 反义链	AAACAGCCCAGTGACCATTTC

1.2.3 Western blot 检测蛋白水平的表达 重组腺病毒感染 10 d 后,提取各组细胞总蛋白,取 20 μ g 经 10% SDS-PAGE 分离后,电转移至 PVDF 膜上,室温下 5%脱脂奶粉封闭反应 1.5 h,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,分别加入 1:200 稀释的 OPN 一抗和 1:400 稀释的小鼠抗小鼠 β -actin 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,10 min/次,分别加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗,室温作用 1 h;ECL 发光。

1.2.4 ALP 染色及 ALP 读数

1.2.4.1 ALP 染色 将 C3H10 接种于 24 孔板,1 $\times$ 10⁵ 个/孔,设置 3 复孔,培养过夜,按上述各组分,病毒感染 7 d。按每孔 250 μ l 染料配制染液:取适量 ddH₂O,加入适量 Fast Blue BB salt 粉末,震荡使粉末溶解得到浅黄色溶液,加入上述溶液体积的 1/25 AS-MX 碱性磷酸盐溶液,混合均匀备用。细胞吸去培养基,PBS 轻洗 3 遍,将染液加入 24 孔板中,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min,吸去染液,PBS 轻洗 2 遍,显微镜下摄片。

1.2.4.2 ALP 读数 将 C3H10 接种于 24 孔板,1 $\times$ 10⁵ 个/孔,设置 3 复孔,培养过夜,按上述各组分,病毒感染 7 d。吸去培养基,PBS 轻洗 3 遍,每孔加入 100 μ l ALP 裂解液,室温反应 5 min,吹打细胞并转移至 1.5 ml EP 管中,13 000 r/min,离心 3 min,取上清 5 μ l 至另一 EP 管中,加入 1 $\times$ LUPO buffer 15 μ l,ALP 底物 5 μ l,共 25 μ l 混合体系,均匀混合后,室温下避光孵育 30 min,单管式发光检测仪读数。余下的细胞裂解液用 BCA 法检测蛋白浓度,标化各组 ALP 读数。

1.2.5 钙结节染色检测钙盐沉积 细胞分组及诱导同 1.2.4。加入终浓度为 50 μ g/ml 的维生素 C 和 10 mmol/L 的 β -磷酸甘油的完全培养基,21 d 后进行茜素红染色:吸弃孔内培养基,PBS 轻洗 3 次;每孔加入 200 μ l 4%多聚甲醛固定

30 min,吸弃多聚甲醛,PBS 洗涤 3 次,洗净;每孔加入 250 μ l 2%的茜素红 S,37 $^{\circ}$ C避光孵育 30 min,出现红色沉淀即将染液弃去,PBS 洗涤净后镜下观察和成像保存。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行统计学分析,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组腺病毒对小鼠间充质干细胞 C3H10 的感染

细胞经腺病毒感染后,生长状态良好,感染 72 h 后,荧

光观察各组细胞的荧光表达率均为 60%~70%(图 1),可保证后续实验的可行性和均一性。

2.2 Real-time PCR 检测成骨基因的表达情况

RT-PCR 结果(图 2A)及 real-time PCR 结果显示(表 2,图 2B),外源性 BMP9 不影响细胞本身 AP2 α 的表达,可显著上调成骨基因 OC、OPN 和 OPG 的表达。AP2 α 显性负性突变体组的 BMP9 表达与 BMP9 组无统计学差异,而 3 个成骨基因的表达明显低于 BMP9 组,且 Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组下降趋势更为明显。提示降低 AP2 α 转录活性可抑制 BMP9 诱导的成骨分化。

2.3 Western blot 检测 OPN 蛋白的表达情况

Western blot 显示检测,Ad-BMP9+Ad-RFP 组与空病毒

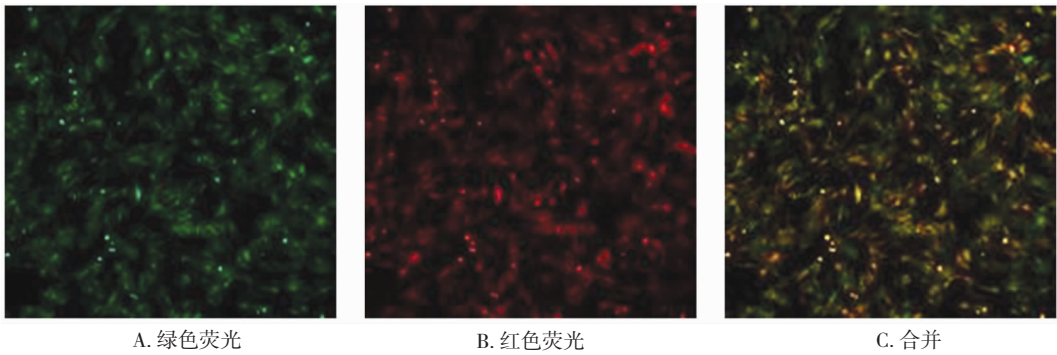


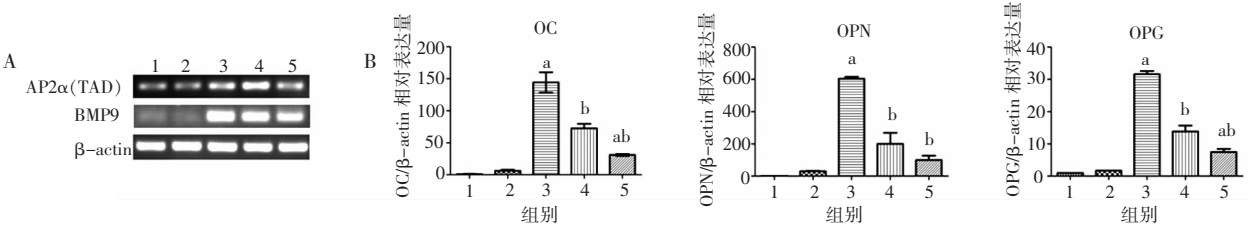
图 1 重组腺病毒感染 C3H10 72 h 的荧光显微镜观察 (以 Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 为例,100 $\times$)
Fig.1 Fluorescent microscopy of C3H10 72 h after infection with recombinant adenovirus
(take Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD for example,100 $\times$)

表 2 Real-time PCR 检测成骨基因的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 mRNA expression of osteogenesis gene detected by real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	OC	OPN	OPG
空白对照组 (组 1)	1.129 $\pm$ 0.741	1.003 $\pm$ 0.108	1.000 $\pm$ 0.029
空病毒组 (组 2)	6.196 $\pm$ 2.385	30.651 $\pm$ 4.550	1.755 $\pm$ 0.071
Ad-BMP9+Ad-RFP 组 (组 3)	144.285 $\pm$ 2.619	604.383 $\pm$ 1.726	31.575 $\pm$ 1.392
Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 组 (组 4)	72.683 $\pm$ 1.806	200.621 $\pm$ 0.963	13.880 $\pm$ 2.540
Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组 (组 5)	31.114 $\pm$ 1.885	100.220 $\pm$ 3.740	7.497 $\pm$ 1.304
<i>F</i> 值	56.929	54.789	159.451
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注:OC:组 3 与组 2 相比, $P=0.000$;组 5 与组 3 相比: $P=0.002$;组 4 与组 3 相比, $P=0.001$;组 5 与组 3 相比, $P=0.000$;OPN: 组 3 与组 2 相比, $P=0.000$;组 4 与组 3 相比, $P=0.000$;组 5 与组 3 相比, $P=0.000$;OPG:组 3 与组 2 相比, $P=0.000$;组 5 与组 3 相比: $P=0.000$;组 4 与组 3 相比, $P=0.000$;组 5 与组 3 相比, $P=0.000$



1. 空白对照组;2. 空病毒组;3. Ad-BMP9+Ad-RFP 组;4. Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 组;5. Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组;
a: $P<0.05$,与空病毒组相比 b: $P<0.05$,与 Ad-BMP9+Ad-RFP 组相比

图 2 Real-time PCR 检测成骨基因的 mRNA 水平表达

Fig.2 mRNA expression of osteogenesis gene detected by real-time PCR

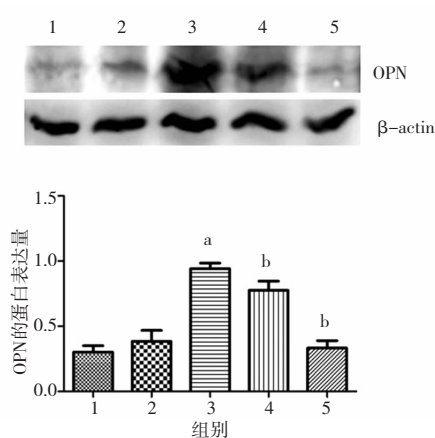
组相比,OPN 蛋白表达量明显增高,提示 BMP9 刺激可显著增高 OPN 的蛋白水平表达,Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 组及 Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组与 Ad-BMP9+Ad-RFP 组相比,OPN 蛋白表达量均有所降低,且 Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组降低幅度更大,提示加入 AP2 α 显性负性突变体可抑制 BMP9 诱导的 OPN 蛋白水平表达,以 Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组更为明显(图 3),表明显性负性突变体 Ad-dnAP2 α - Δ TAD 抑制 OPN 蛋白表达作用更为突出,与 mRNA 表达情况一致。空白对照组、空病毒组、Ad-BMP9+Ad-RFP 组、Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 组及 Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组与内参 β -actin 灰度值之比为目的基因蛋白表达量(表 3)。

表 3 Western blot 检测 OPN 蛋白的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.3 Protein expression of OPN detected by Western blot ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	OPN 蛋白表达量
空白对照组(组 1)	0.302 $\pm$ 0.068
空病毒组(组 2)	0.384 $\pm$ 0.118
Ad-BMP9+Ad-RFP 组(组 3)	0.941 $\pm$ 0.061
Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 组(组 4)	0.775 $\pm$ 0.099
Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组(组 5)	0.333 $\pm$ 0.079
F 值	22.191
P 值	0.002

注:组 3 与组 2 相比, $P=0.001$;组 4 与组 3 相比, $P=0.005$;组 5 与组 3 相比, $P=0.001$



1. 空白对照组;2. 空病毒组;3. Ad-BMP9+Ad-RFP 组;4. Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 组;5. Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组;
a: $P<0.05$,与空病毒组相比;b: $P<0.05$,与 Ad-BMP9+Ad-RFP 组相比

图 3 Western blot 检测成骨基因 OPN 的蛋白水平表达

Fig.3 Protein expression of OPN detected by Western blot

2.4 ALP 染色及读数结果

ALP 广泛存在于机体各组织器官中,主要是肝、肾、胎盘、小肠和骨。ALP 是成骨细胞所分泌的一种酶蛋白,是成骨细胞分化的特异性标志,是最常见评价成骨细胞早期功能的指标之一。染色结果显示(图 4),空白对照组和空病毒对照组

均无蓝染细胞,BMP9 诱导组有大面积的紫蓝色染色区域,提示 BMP9 具有很强的诱导早期成骨分化的作用。与此相比,Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 和 Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 组蓝紫色染色面积有所减少且颜色稍浅。ALP 读数结果与 ALP 染色结果一致,其中 Ad-dnAP2 α - Δ TAD 的抑制作用更强(表 4,图 5)。提示 AP2 α 显性负性突变体可减弱 BMP9 对 C3H10 的成骨分化作用。

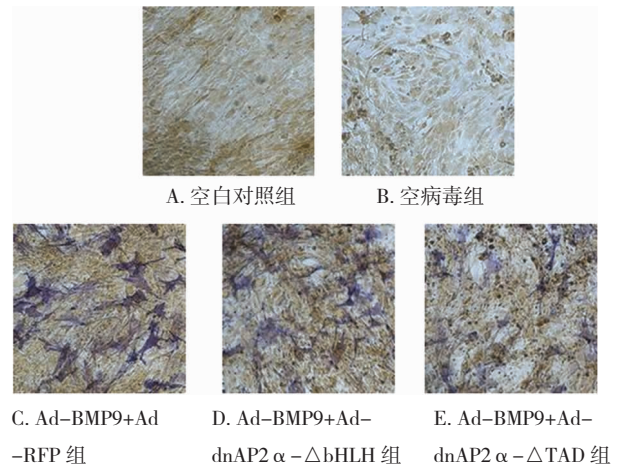


图 4 ALP 染色结果 (200 $\times$)

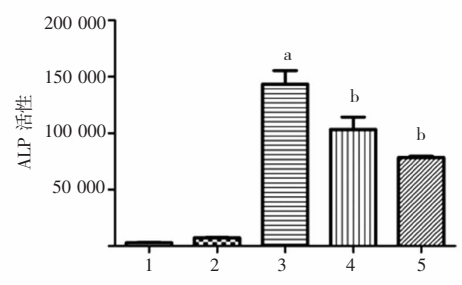
Fig.4 Staining results of alkaline phosphatase (ALP) (200 $\times$)

表 4 ALP 读数结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.4 Reading results of ALP ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ALP 读数
空白对照组(组 1)	3 063.500 $\pm$ 2.114
空病毒组(组 2)	7 464.000 $\pm$ 1.174
Ad-BMP9+Ad-RFP 组(组 3)	143 376.000 $\pm$ 1.695
Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 组(组 4)	103 280.000 $\pm$ 1.561
Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组(组 5)	78 390.500 $\pm$ 1.737
F 值	69.776
P 值	0.000

注:组 3 与组 2 相比, $P=0.000$;组 4 与组 3 相比, $P=0.002$;组 5 与组 3 相比, $P=0.001$



1. 空白对照组;2. 空病毒组;3. Ad-BMP9+Ad-RFP 组;4. Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ bHLH 组;5. Ad-BMP9+Ad-dnAP2 α - Δ TAD 组;
a: $P<0.05$,与空病毒组相比;b: $P<0.05$,与 Ad-BMP9+Ad-RFP 组相比

图 5 ALP 读数结果

Fig.5 Reading results of ALP

2.5 钙盐沉积染色结果

钙盐沉积常用于成骨分化晚期的功能检测。在病毒感染 21 d 后,通过 2%茜素红染色显示(图 6),Ad-BMP9 诱导的实验组钙盐沉积红染明显,显著强于 AP2 α 显性负性突变体 2 组,但 Δ TAD 与 Δ bHLH 2 组间差别不大。

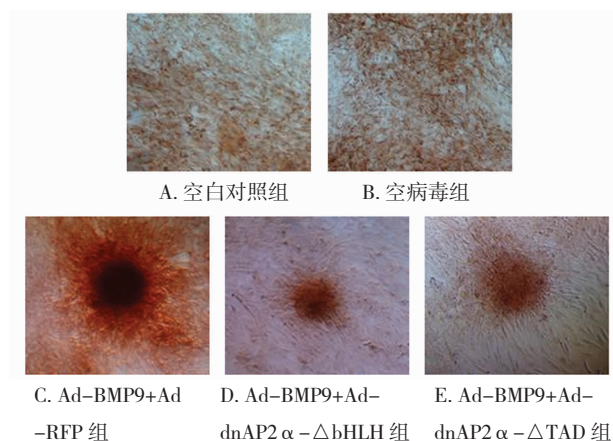


图 6 钙盐沉积茜素红染色结果 (100 ×)

Fig.6 Alizarin red staining results of Calcium salt deposition (100 ×)

3 讨论

1995 年 Crane 等^[6]系统的提出了骨组织工程的概念,引起了广大学者的关注。骨组织工程是将高浓度与功能相关的活组织细胞,种植于生物材料支架上生长后植入骨缺损部位,用以修复骨组织缺损,该技术可依据缺损情况任意塑型,达到理想的形态修复,从而实现真正意义上的功能重建^[7]。骨组织工程主要需解决种子细胞、生物材料支架及成骨活性因子三方面的问题,其中关于成骨活性因子的研究,包括确定哪些因子能够有效的促进新骨形成及这些因子如何发挥最佳作用,是骨组织工程基础研究中的重要部分。

BMP 属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族成员之一,从最初发现的成骨作用至今,已延伸到具有促进软骨细胞的成骨,血管发生,脂肪细胞的分化等多种生物学功能^[8]。目前 BMP2、4、6、7、9 都已被证实具有明显的成骨作用,由于 BMP9 的成骨作用强于传统的 BMP2 和 BMP7^[9],成为近年来研究的热点。BMP9 诱导成骨分化的具体分子机制还不完全明确,有报道 BMP9 可能通过 TGF- β /Smads 信号途径、经典 Wnt/ β -catenin 信号通路以及 MAPKs 信号通路等发挥作用^[10-11]。BMP9 体外能很好的诱导成骨,但是对于体内成骨的效应还

不能满足临床需要。

转录蛋白 AP2 为一转录因子家族,包含 AP2 α 、AP2 β 、AP2 γ 、AP2 δ 和 AP2 ϵ 5 个亚型,分子量约为 52 kDa,通常以二聚体形式结合到 GC 含量丰富的 DNA 元件上,特异性调控基因表达。AP2 家族广泛参与了脊椎动物生长发育,细胞增殖分化,并可双向调节肿瘤的发生,而其自身也受到多种信号分子及蛋白的影响^[12]。其中 AP2 α 被报道在小鼠胚胎期间对面部骨骼的发育过程中,是一个发挥重要调控作用的转录因子,基因敲 AP2 α 的小鼠在产后 15 d 表现出明显颅骨及颅面发育^[13]。同样,AP2 α 对小鼠四肢的软骨分化和骨骼发育有着重要的作用^[14]。

目前还尚未有关于转录蛋白 AP2 α 参与成骨分化分子机制的研究报道。课题组前期实验发现成骨分化相关的 BMPs 过表达可增强 AP2 α 的转录活性,且以 BMP9 最为显著,那 AP2 α 是否参与了 BMP9 诱导的成骨分化过程呢?由于 BMP9 过表达并不影响 AP2 α 的表达,因此采用 siRNA 抑制降低 AP2 α 基因表达和 BMP 影响 AP2 α 转录活性的方式可能不同,因此在本实验中,采用 AP2 α 显性负性突变体抑制 AP2 α 转录活性,竞争性抑制 AP2 α 与 DNA 靶位点的结合,从 mRNA、蛋白水平证实 AP2 α 显性负性突变体能够有效抑制 BMP9 诱导的成骨分化相关基因的表达。同时,不管从基因表达水平还是成骨功能的影响程度,dnAP2 α - Δ TAD 的效应均强于 dnAP2 α - Δ bHLH。其可能的原因在于 dnAP2 α - Δ TAD 为缺失 TAD 区域,但仍具有 DNA 结合区域,不仅可与野生型 AP2 α 结合成异源二聚体抑制其正常生物学,还能竞争性结合下游靶基因的启动子位点,较 dnAP2 α - Δ bHLH 对 AP2 α 转录活性的抑制作用更强。

转录因子 AP2 与骨形态发生蛋白 BMP 之间相互作用的分子机制报道较少。有研究显示,在早期外胚层发育中,BMP4 可直接通过 Smad 1 信号转导与 AP2 γ 启动子绑定来调控 AP2 γ 的表达^[15]。而本实验中,BMP9 可促进 AP2 α 转录活性增高,但不诱导 AP2 α 的表达,AP2 α 转录活性抑制不影响 BMP9 的表达,但显著抑制 BMP9 诱导的成骨分化效应,提示 AP2 α 在 BMP9 下游,而 BMP9 不是通过直接调控 AP2 α 的转录表达来影响其活性。AP2 α 是核转录因子,在胞核中以磷酸化的活性形式结合下游靶基因启动子区域 GC 丰富的 DNA 效应元件,发挥转录激活或抑制的作用,因此 AP2 α 的转录活性与其磷酸化状态和亚细胞定位密切相关。

综上所述,本研究证实转录蛋白 AP2 α 参与调

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000452

Mimics 与 Micro-CT 内置软件测量
小鼠颅骨缺损骨再生的对比研究张玉凤¹, 王 璐¹, 辜向东¹, 王 超², 吴小红¹

(1. 重庆医科大学附属口腔医院修复科, 重庆 401147; 2. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147)

【摘要】目的:对比分析 Mimics 软件与显微-CT(Micro-computed tomography, Micro-CT)内置分析软件对颅骨缺损内新生骨量及骨愈合率的测量结果, 评价 2 种测量方法的差异性。**方法:**在小鼠右侧颅顶骨制备直径 4 mm 圆形骨缺损, 分别于术后当天、6 周、12 周, 对小鼠颅骨进行活体 Micro-CT 扫描, 然后利用 Micro-CT 扫描仪内置软件重建颅骨缺损的三维图像并测量缺损内新生骨体积及愈合率, 且利用 Mimics 软件对 Micro-CT 扫描的二维图片进行三维重建, 并测量缺损内新生骨体积及愈合率。**结果:**与术后 6 周相比, 术后 12 周 Micro-CT 扫描仪内置软件和 Mimics 软件测量的缺损内新生骨体积和骨愈合率均增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 术后 6 周和 12 周, Mimics 软件的测量结果与 Micro-CT 扫描仪内置软件测量的颅骨缺损内新骨体积及骨愈合率相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**缺损术后 6 周和术后 12 周, Mimics 软件对 Micro-CT 扫描后的二维图片进行重建并计算出的颅骨缺损新生骨体积及骨愈合率, 与 Micro-CT 扫描仪内置软件的测量结果均一致, 且测量方法更简单。

作者介绍:张玉凤, Email: 814336296@qq.com, 研究方向: 小鼠颅骨缺损愈合。
通信作者:吴小红, Email: hiwxh@hotmail.com。
基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81200767/H1402); 重庆市卫生局资助项目(编号: 2012-2-8)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150112.1707.017.html (2015-01-12)

控 BMP9 诱导的成骨分化进程。AP2 α 作为成骨分化的重要转录因子, 下一步课题组将探讨调控 AP2 α 转录因子活性是否协同增强 BMP9 的成骨效应。采用基因调控方式优化 BMP9 成骨诱导因子在组织工程人工骨中的成骨效应, 有助于开拓骨缺损疾病临床治疗的创新之路。

参 考 文 献

- [1] Jain AP, Pundir S, Sharma A, et al. Bone morphogenetic proteins: the anomalous molecules[J]. J Indian Soc Periodontol, 2013, 17(5): 583-586.
- [2] Lv Z, Yang D, Li J, et al. Bone morphogenetic protein 9 overexpression reduces osteosarcoma cell migration and invasion[J]. Mol Cells, 2013, 36(2): 119-126.
- [3] 龚梦嘉, 周建武, 毕 杨. AP2 α 荧光素酶报告基因的构建及在 BMPs 诱导成骨分化研究中的初步应用[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(11): 1571-1576.
- [4] 毕 杨, 何 昀, 李廷玉, 等. 显性负性突变体对 AP2 α 转录因子及其活性的影响[J]. 生命科学研究, 2011, 15(5): 402-409.
- [5] 毕 杨, 龚 敏, 陈 洁, 等. AP2 α 重组腺病毒质粒的构建及其在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(1): 13-17.
- [6] Crane GM, Lshaug SL, Mikos AG, et al. Bone tissue engineering[J]. Nat Med, 1995, 1(12): 1322-1324.
- [7] Yoshimaki T, Sato S, Tsunori K, et al. Bone regeneration with sys-

temic administration of lactoferrin in non-critical-sized rat calvarial bone defects[J]. J Oral Sci, 2013, 55(4): 343-348.

- [8] Lamplot JD, Qin J, He TC, et al. BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis[J]. Am J Stem Cells, 2013, 2(1): 1-21.
- [9] Wang W, Olson D, Liang G, et al. Collagen XXIV (Col24 α 1) promotes osteoblastic differentiation and mineralization through TGF- β /Smads signaling pathway[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(10): 1310-1322.
- [10] Zhang WB, Zhong WJ, Wang LA. signal-amplification circuit between miR-218 and Wnt/ β -catenin signal promotes human adipose tissue-derived stem cells osteogenic differentiation[J]. Bone, 2013, 58C: 59-66.
- [11] Zhao Y, Song T, Wang W, et al. P38 and ERK1/2 MAPKs act in opposition to regulate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43383.
- [12] Zarelli VE, Dawid IB. Inhibition of neural crest formation by Kctd15 involves regulation of transcription factor AP-2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(8): 2870-2875.
- [13] Ding X, Yang Z, Zhou F, et al. Transcription factor AP-2 α regulates acute myeloid leukemia cell proliferation by influencing Hoxa gene expression[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(8): 1647-1656.
- [14] Wenke AK, Anja K. Bosserhoff. Roles of AP-2 transcription factors in the regulation of cartilage and skeletal development[J]. FEBS J, 2010, 277(4): 894-902.
- [15] Qiao YB, Zhu Y, Sheng N, et al. AP2 γ regulates neural and epidermal development downstream of the BMP pathway at early stages of ectodermal patterning[J]. Cell Res, 2012, 22(11): 1546-1561.

(责任编辑: 关蕴良)