

抑制 Dickkopf - 1 和 Sclerostin 表达对人成骨肉瘤细胞 MG63 骨代谢调节相关蛋白表达水平的影响

王吉利¹, 万雷¹, 张志海¹, 黄宏兴¹, 黄红², 肖本浩¹, 魏合伟¹, 曾国勇³

(1. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510240;

2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006;

3. 广东省茂名市中医院, 广东 茂名 525000)

摘要 目的: 观察抑制 Dickkopf - 1 和 Sclerostin 表达对人成骨肉瘤细胞 MG63 骨代谢调节相关蛋白表达水平的影响。方法: 培养 MG63 细胞, 构建沉默 Dickkopf - 1 重组腺病毒载体和沉默 Sclerostin 重组腺病毒载体。将培养好的 MG63 细胞(每孔 2×10^5 个)分为 4 组, Scr 组以 Scr 腺病毒转染、Dickkopf - 1 组以沉默 Dickkopf - 1 重组腺病毒载体转染、Sclerostin 组以沉默 Sclerostin 重组腺病毒载体转染、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组以沉默 Dickkopf - 1 重组腺病毒载体和沉默 Sclerostin 重组腺病毒载体共同转染。各组 MG63 细胞转染重组腺病毒 48 h 后以 Western Blot 法测定各组细胞中骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 - 5(low density lipoprotein receptor - related protein - 5, Lrp - 5)、骨形态发生蛋白 - 2(bone morphogenetic protein - 2, BMP - 2)、成纤维细胞生长因子 - 2(fibroblast growth factor - 2, FGF - 2)、Runt 相关转录因子 - 2(Runt - related transcription factor - 2, Runx - 2)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor - α , TNF - α)等骨代谢调节相关蛋白的表达水平。结果: Dickkopf - 1 组的 OPG 表达量与 Scr 组、Sclerostin 组比较, 组间差异均无统计学意义($P = 0.050$, $P = 0.196$); Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 OPG 表达量均高于 Scr 组($P = 0.010$, $P = 0.000$); Dickkopf - 1 组和 Sclerostin 组的 OPG 表达量均低于 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$, $P = 0.000$)。Dickkopf - 1 组、Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 Lrp - 5 表达量均高于 Scr 组($P = 0.012$, $P = 0.010$, $P = 0.000$); Dickkopf - 1 组的 Lrp - 5 表达量与 Sclerostin 组比较, 差异无统计学意义($P = 0.119$); Dickkopf - 1 组和 Sclerostin 组的 Lrp - 5 表达量均低于 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$, $P = 0.000$)。Dickkopf - 1 组的 BMP - 2 表达量与 Scr 组比较, 差异无统计学意义($P = 0.185$); Dickkopf - 1 组的 BMP - 2 表达量低于 Sclerostin 组($P = 0.037$); Dickkopf - 1 组和 Sclerostin 组的 BMP - 2 表达量均低于 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$, $P = 0.000$)。Dickkopf - 1 组、Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 FGF - 2 表达量均高于 Scr 组($P = 0.010$, $P = 0.000$, $P = 0.000$); Dickkopf - 1 组的 FGF - 2 表达量低于 Sclerostin 组和 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$, $P = 0.000$); Sclerostin 组的 FGF - 2 表达量低于 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$)。Dickkopf - 1 组、Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 Runx - 2 表达量均高于 Scr 组($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$); Dickkopf - 1 组的 Runx - 2 表达量低于 Sclerostin 组和 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$, $P = 0.000$); Sclerostin 组的 Runx - 2 表达量低于 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$)。Dickkopf - 1 组、Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 CTGF 表达量均高于 Scr 组($P = 0.010$, $P = 0.000$, $P = 0.010$); Dickkopf - 1 组的 CTGF 表达量与 Sclerostin 组比较, 差异无统计学意义($P = 0.080$); Dickkopf - 1 组和 Sclerostin 组的 CTGF 表达量均低于 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$, $P = 0.004$)。Dickkopf - 1 组、Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 OPN 表达量均高于 Scr 组($P = 0.002$, $P = 0.000$, $P = 0.000$); Dickkopf - 1 组和 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 OPN 表达量与 Sclerostin 组比较, 差异均无统计学意义($P = 0.050$, $P = 0.170$); Dickkopf - 1 组的 OPN 表达量低于 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$)。Dickkopf - 1 组、Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 TNF - α 表达量均低于 Scr 组($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$); Dickkopf - 1 组的 TNF - α 表达量高于 Sclerostin 组和 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$, $P = 0.000$); Sclerostin 组和 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 TNF - α 表达量比较, 差异无统计学意义($P = 0.125$)。结论: 抑制 MG63 细胞 Dickkopf - 1 和 Sclerostin 表达, 均能上调具有骨形成和双向调节作用的骨代谢调节相关蛋白表达水平、下调具有骨吸收作用的骨代谢调节相关蛋白表达水平, 其中抑制 Sclerostin 表达对骨代谢调节相关蛋白表达水平的影响强于抑制 Dickkopf - 1 表达, 而且抑制 Dickkopf - 1 和 Sclerostin 表达在调节骨代谢调节

基金项目: 国家自然科学基金项目(81302991, 81373653); 广东省自然科学基金项目(S2013040016828, 2014A030310127); 广东省科技计划项目(2013B021800058); 广州中医药大学青年英才项目(QNYC20120119); 2014 广东省“优青计划”项目(yq2014041)

通讯作者: 万雷 E-mail: gzw1802@163.com

第一作者为广州中医药大学 2015 级硕士研究生

相关蛋白表达水平方面具有协同作用。

关键词 骨质疏松;基因沉默;Dickkopf-1;Sclerostin;腺病毒;MG63 细胞

Effect of suppression of Dickkopf-1 and Sclerostin expression on bone metabolism regulatory protein expression levels in human osteosarcoma MG63 cells

WANG Jili¹, WAN Lei¹, ZHANG Zhihai¹, HUANG Hongxing¹, HUANG Hong², XIAO Benhao¹, WEI Hewei¹, ZENG Guoyong³

1. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510240, Guangdong, China

2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China

3. Maoming Hospital of Traditional Chinese Medicine, Maoming 525000, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of suppression of Dickkopf-1 and Sclerostin expression on bone metabolism regulatory protein expression levels in human osteosarcoma MG63 cells. **Methods:** The MG63 cells were cultured and Dickkopf-1 silencing recombinant adenovirus vectors and Sclerostin silencing recombinant adenovirus vectors were constructed. The MG63 cells were divided into 4 groups, two hundred thousand cells in one hole, and were transfected with Scr adenovirus (Scr group), Dickkopf-1 silencing recombinant adenovirus vectors (Dickkopf-1 group), Sclerostin silencing recombinant adenovirus vectors (Sclerostin group) and Dickkopf-1 silencing recombinant adenovirus vectors combined with Sclerostin silencing recombinant adenovirus vectors (Dickkopf-1-Sclerostin group) respectively. At 48 hours after recombinant adenovirus transfection, Western Blot was used to measure the expression levels of bone metabolism regulatory protein, including osteoprotegerin (OPG), low density lipoprotein receptor-related protein-5 (Lrp-5), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), Runt-related transcription factor-2 (Runx-2), connective tissue growth factor (CTGF), osteopontin (OPN) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Results:** There was no statistical difference in the expression of OPG between Dickkopf-1 group and Scr group and between Dickkopf-1 group and Sclerostin group ($P=0.050, P=0.196$). The expression of OPG was higher in Sclerostin group and Dickkopf-1-Sclerostin group compared to Scr group ($P=0.010, P=0.000$), and was lower in Dickkopf-1 group and Sclerostin group compared to Dickkopf-1-Sclerostin group ($P=0.000, P=0.000$). The expression of Lrp-5 was higher in Dickkopf-1 group, Sclerostin group and Dickkopf-1-Sclerostin group compared to Scr group ($P=0.012, P=0.010, P=0.000$). There was no statistical differences in the expression of Lrp-5 between Dickkopf-1 group and Sclerostin group ($P=0.119$). The expression of Lrp-5 was lower in Dickkopf-1 group and Sclerostin group compared to Dickkopf-1-Sclerostin group ($P=0.000, P=0.000$). There was no statistical differences in the expression of BMP-2 between Dickkopf-1 group and Scr group ($P=0.185$). The expression of BMP-2 was lower in Dickkopf-1 group compared to Sclerostin group ($P=0.037$), and was lower in Dickkopf-1 group and Sclerostin group compared to Dickkopf-1-Sclerostin group ($P=0.000, P=0.000$). The expression of FGF-2 was higher in Dickkopf-1 group, Sclerostin group and Dickkopf-1-Sclerostin group compared to Scr group ($P=0.010, P=0.000, P=0.000$), and was lower in Dickkopf-1 group compared to Sclerostin group and Dickkopf-1-Sclerostin group ($P=0.000, P=0.000$). The expression of FGF-2 was lower in Sclerostin group compared to Dickkopf-1-Sclerostin group ($P=0.000$). The expression of Runx-2 was higher in Dickkopf-1 group, Sclerostin group and Dickkopf-1-Sclerostin group compared to Scr group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$). The expression of Runx-2 was lower in Dickkopf-1 group compared to Sclerostin group and Dickkopf-1-Sclerostin group ($P=0.000, P=0.000$), and was lower in Sclerostin group compared to Dickkopf-1-Sclerostin group ($P=0.000$). The expression of CTGF was higher in Dickkopf-1 group, Sclerostin group and Dickkopf-1-Sclerostin group compared to Scr group ($P=0.010, P=0.000, P=0.010$). There was no statistical differences in the expression of CTGF between Dickkopf-1 group and Sclerostin group ($P=0.080$). The expression of CTGF was lower in Dickkopf-1 group and Sclerostin group compared to Dickkopf-1-Sclerostin group ($P=0.000, P=0.004$). The expression of OPN was higher in Dickkopf-1 group, Sclerostin group and Dickkopf-1-Sclerostin group compared to Scr group ($P=0.002, P=0.000, P=0.000$). There was no statistical differences in the expression of OPN between Dickkopf-1 group and Sclerostin group and between Dickkopf-1-Sclerostin group and Sclerostin group ($P=0.050, P=0.170$). The expression of OPN was lower in Dickkopf-1 group compared to Dickkopf-1-Sclerostin group ($P=0.000$). The expression of TNF- α was lower in Dickkopf-1 group, Sclerostin group and Dickkopf-1-Sclerostin group compared to Scr group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$), and

was higher in Dickkopf - 1 group compared to Sclerostin group and Dickkopf - 1 - Sclerostin group ($P = 0.000$, $P = 0.000$). There was no statistical differences in the expression of TNF - α between Sclerostin group and Dickkopf - 1 - Sclerostin group ($P = 0.125$). **Conclusion:** By suppressing the expression of Dickkopf - 1 and Sclerostin in MG63 cells, the expression levels of bone metabolism regulatory proteins which has accelerating effects on bone formation and which has bidirectional regulatory effects on bone metabolism can be upregulated, and the expression levels of bone metabolism regulatory proteins which has accelerating effects on bone resorption can be downregulated. The expression levels of bone metabolism regulatory proteins are influenced more by suppression of Sclerostin expression than suppression of Dickkopf - 1 expression, and the suppression of expression of Dickkopf - 1 and Sclerostin has a synergistic effect on regulating the expression levels of bone metabolism regulatory proteins.

Key words osteoporosis; gene silencing; Dickkopf - 1; Sclerostin; adenovirus; MG63 cells

Wnt 信号通路参与骨质疏松相关骨代谢, 其中的 2 个负调控因子 Dickkopf - 1 和 Sclerostin 在调节骨形成和骨代谢中发挥着重要作用^[1-5]。我们前期的研究已证实, 过表达 Dickkopf - 1 重组腺病毒载体和过表达 Sclerostin 重组腺病毒载体可降低人成骨肉瘤细胞 MG63 活性, 影响骨代谢调节相关蛋白表达水平^[6]。为更深入地研究骨发育和骨重塑的分子基因机制, 本研究构建了沉默 Dickkopf - 1 重组腺病毒载体和沉默 Sclerostin 重组腺病毒载体并转染人成骨肉瘤细胞 MG63, 观察了骨代谢调节相关蛋白的表达情况, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验材料 人成骨肉瘤细胞 MG63 (中国科学院上海细胞所细胞库), HEK 293A 细胞 (ATCC), DMEM 培养基、胎牛血清、Pen/Strep、Opti - MEM 培养基 (Gibco 公司), Lipofectamine、TRIzol Reagent、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒、One Shot® Stbl3™ E. coli 感受态细胞、BP Clonase II enzyme mix、LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen 公司), 胶回收/纯化试剂盒、质粒提取试剂盒 (天根生化科技有限公司), DH5 α 感受态细胞 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司), Age I、EcoR I、Pac I、T4 DNA 连接酶 (NEB 公司), RIPA 细胞裂解液、XCT - 790 (Sigma 公司), DKK1 抗体 (CST 公司), 抗 Sclerostin 抗体、抗骨形态发生蛋白 - 2 (bone morphogenetic protein - 2, BMP - 2) 抗体、抗骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 抗体、抗肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor - α , TNF - α) 抗体、抗骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 抗体、抗 Runt 相关转录因子 - 2 (Runt - related transcription factor - 2, Runx - 2) 抗体 (Abcam 公司), HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记山羊抗兔 IgG (Jackson 公司), 抗低密度脂蛋白受体相关蛋白 - 5 (low density

lipoprotein receptor - related protein - 5, Lrp - 5) 抗体、抗结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 抗体、抗成纤维细胞生长因子 - 2 (fibroblast growth factor - 2, FGF - 2) 抗体 (Santa 公司), 蛋白酶抑制剂/磷酸化抑制剂、ECL 发光液 (Merck 公司), 蛋白 Marker (Fermentasa 公司)。

1.2 实验仪器 DHP - 9052 细胞培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司), SW - CJ - 1FD 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司), H1650 - W/H1650W 高速低温离心机 (湘仪集团), TC - S 普通 PCR (杭州博日科技有限公司), Mini - PROTEAN Tetra 电泳仪、Mini Trans - Blot 蛋白转印仪、ChemiDoc MP 凝胶成像系统、电泳、转膜设备 (Bio - rad), NaNoDrop - 2000 微量核酸定量仪、ABI7500 荧光定量 PCR、酶标仪 (Thermo 公司), IX73 倒置荧光显微镜 (OLYMPUS 公司)。

2 方法

2.1 MG63 细胞培养及总 RNA 提取 将 MG63 细胞以 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 T75 培养瓶, 加入适量 DMEM 高糖培养基 (含 10% 胎牛血清) 和 1% Pen/Strep, 在 5% CO₂ 细胞培养箱内培养。待长至 80% 左右融合, 消化、收集细胞, 以 1:3 比例进行传代。弃培养瓶内旧培养基, 以预冷 PBS 洗涤细胞 3 次, 吸尽液体, 加入 1 mL TRIzol, 提取细胞总 RNA。

2.2 目的基因沉默重组腺病毒载体构建 根据前期研究结果^[6], 选择 Dickkopf - 1 引物、Sclerostin 引物及空载体基因 Scr 引物 (表 1), 将合成的寡聚核苷酸链分别重悬于双蒸水至浓度为 100 pM, 然后将此溶液加入到含有 Forward Primer 1 μL 、Reverse Primer 1 μL 、10 \times 退火 Buffer 3 μL 的 RNase free PCR 管中变性、退火。在 RNase free PCR 管中加入 pAd - GFP - shRNA 质粒 2 μg 、10 \times NEB buffer 2 2 μL 、Age I 1 μL 、EcoR I 1 μL , 并加双蒸水至 20 μL , 轻轻混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$

孵育 4 h,电泳并胶回收线性化的 pAd - GFP - shRNA 质粒,将回收的线性化 pAd - GFP - shRNA 1 μ L 与退火后的寡核苷酸 2 μ L 加入到 10 \times NEB T4 DNA ligase buffer 2 μ L、T4 DNA ligase 1 μ L 的溶液中,再加双蒸

水至 20 μ L,在 16 $^{\circ}$ C 与线性腺病毒载体反应连接。连接产物在 LB 液体培养基(不含抗生素)中转化到感受态的 DH5 α 细胞,用质粒小提试剂盒提取转化到 DH5 α 细胞重组质粒,对提取的重组质粒进行测序鉴定。

表 1 Dickkopf - 1、Sclerostin 及 Scr 引物碱基序列

基因名称	引物序列
Dickkopf - 1	Primer F CCGGCGGGAATAAGTACCAGACCATCTCGAGATGGTCTGGTACTTATTCCTGTTTTTG
	Primer R AATTCAAAAACGGAATAAGTACCAGACCATCTCGAGATGGTCTGGTACTTATTCCTG
Sclerostin	Primer F CCGGCCACAACCACTCGGAGCTCAACTCGAGTTGAGCTCCGACTGGTTGTGGTTTTTG
	Primer R AATTCAAAAACCAACAACCACTCGGAGCTCAACTCGAGTTGAGCTCCGACTGGTTGTGG
Scr	Primer F CCGGCCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGGTTTTTG
	Primer R AATTCAAAAACCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG

2.3 病毒包装 将 HEK 293A 细胞以每孔 1×10^6 个接种于 6 孔板,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养,待细胞生长至 95% 融合后,再加入转染复合物转染。转染复合物制备方法:2 μ g 线性 DNA 和 60 μ L Lipofectamine 2000 分别与 250 μ L Opi - MEM I 培养基混匀,室温静置 5 min 后将二者混合,混匀后静置 20 min。转染 48 h 后,接种于培养皿中培养到 80% 细胞出现显微镜可见的细胞病变效应后,在 4 $^{\circ}$ C、3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min(离心半径 8.5 cm),所得上清即为初次病毒液。再以初次病毒液为基础在 HEK 293A 细胞中扩增腺病毒。

2.4 MG63 细胞分组及转染 将 MG63 细胞(每孔 2×10^5 个)分为 Scr 组、Dickkopf - 1 组、Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组。将测序正确的 shRNA 及 Scr 腺病毒克隆,扩大培养后提取无内毒素质粒,以无内毒素的沉默 Dickkopf - 1、沉默 Sclerostin、Scr 腺病毒分别转染 Dickkopf - 1 组、Sclerostin 组、Scr 组,以无内毒素的沉默 Dickkopf - 1 和沉默 Sclerostin 共同转染 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 4 ~ 6 h。

2.5 骨代谢调节相关蛋白表达量检测 MG63 细胞转染重组腺病毒 48 h 后,弃旧培养基,消化收集细胞,在 4 $^{\circ}$ C 以 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min(离心半径 8.5 cm),提取细胞总蛋白,将蛋白上样、电泳、转膜,于室温下脱色摇床上用 5% 脱脂牛奶(0.5% TBST 配)封闭 1 h;稀释一抗(TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶,磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5% BSA),4 $^{\circ}$ C 过夜后用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次,每次 5 min;将二抗用 TBST 稀释 3000 倍,室温下孵育 30 min 后用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次,每次 5 min。将膜

蛋白放入暗匣中曝光,用显影、定影试剂进行显影和定影,然后将胶片扫描存档,用 Image J 软件处理系统分析目标带的光密度值,进行图像分析。检测的骨代谢调节相关蛋白包括 OPG、Lrp - 5、BMP - 2、FGF - 2、Runx - 2、CTGF、OPN、TNF - α 。

2.6 数据统计分析 采用 SPSS 20.0 软件,4 组细胞 OPG、Lrp - 5、BMP - 2、FGF - 2、Runx - 2、CTGF、OPN、TNF - α 表达量的组间整体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD - t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结 果

Dickkopf - 1 组的 OPG 表达量与 Scr 组、Sclerostin 组比较,组间差异均无统计学意义($P = 0.050$, $P = 0.196$); Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 OPG 表达量均高于 Scr 组($P = 0.010$, $P = 0.000$); Dickkopf - 1 组和 Sclerostin 组的 OPG 表达量均低于 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$, $P = 0.000$)。Dickkopf - 1 组、Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 Lrp - 5 表达量均高于 Scr 组($P = 0.012$, $P = 0.010$, $P = 0.000$); Dickkopf - 1 组的 Lrp - 5 表达量与 Sclerostin 组比较,差异无统计学意义($P = 0.119$); Dickkopf - 1 组和 Sclerostin 组的 Lrp - 5 表达量均低于 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$, $P = 0.000$)。Dickkopf - 1 组的 BMP - 2 表达量与 Scr 组比较,差异无统计学意义($P = 0.185$); Dickkopf - 1 组的 BMP - 2 表达量低于 Sclerostin 组($P = 0.037$); Dickkopf - 1 组和 Sclerostin 组的 BMP - 2 表达量均低于 Dickkopf - 1 + Sclerostin 组($P = 0.000$, $P = 0.000$)。Dickkopf - 1 组、Sclerostin 组、Dickkopf - 1 + Sclerostin 组的 FGF - 2 表达量均高于 Scr 组($P = 0.010$, $P = 0.000$, $P = 0.000$); Dickkopf - 1 组的

FGF-2 表达量低于 Sclerostin 组和 Dickkopf-1 + Sclerostin 组 ($P = 0.000, P = 0.000$); Sclerostin 组的 FGF-2 表达量低于 Dickkopf-1 + Sclerostin 组 ($P = 0.000$)。Dickkopf-1 组、Sclerostin 组、Dickkopf-1 + Sclerostin 组的 Runx-2 表达量均高于 Scr 组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); Dickkopf-1 组的 Runx-2 表达量低于 Sclerostin 组和 Dickkopf-1 + Sclerostin 组 ($P = 0.000, P = 0.000$); Sclerostin 组的 Runx-2 表达量低于 Dickkopf-1 + Sclerostin 组 ($P = 0.000$)。Dickkopf-1 组、Sclerostin 组、Dickkopf-1 + Sclerostin 组的 CTGF 表达量均高于 Scr 组 ($P = 0.010, P = 0.000, P = 0.010$); Dickkopf-1 组的 CTGF 表达量与 Sclerostin 组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.080$); Dickkopf-1 组和 Sclerostin 组的 CTGF 表达量均低于 Dickkopf-1 + Sclerostin 组 ($P = 0.000, P = 0.004$)。Dickkopf-1 组、Sclerostin 组、Dickkopf-1 + Sclerostin 组的 OPN 表达量均高于 Scr 组 ($P = 0.002, P = 0.000, P = 0.000$); Dickkopf-1 组和 Dickkopf-1 + Sclerostin 组的 OPN 表达量与 Sclerostin 组比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.050, P = 0.170$); Dickkopf-1 组的 OPN 表达量低于 Dickkopf-1 + Sclerostin 组 ($P = 0.000$)。Dickkopf-1 组、Sclerostin 组、Dickkopf-1 + Sclerostin 组的 TNF- α 表达量均低于 Scr 组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); Dickkopf-1 组的 TNF- α 表达量高于 Sclerostin 组和 Dickkopf-1 + Sclerostin 组 ($P = 0.000, P = 0.000$); Sclerostin 组和 Dickkopf-1 + Sclerostin 组的 TNF- α

表达量比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.125$)。见图 1、表 2。

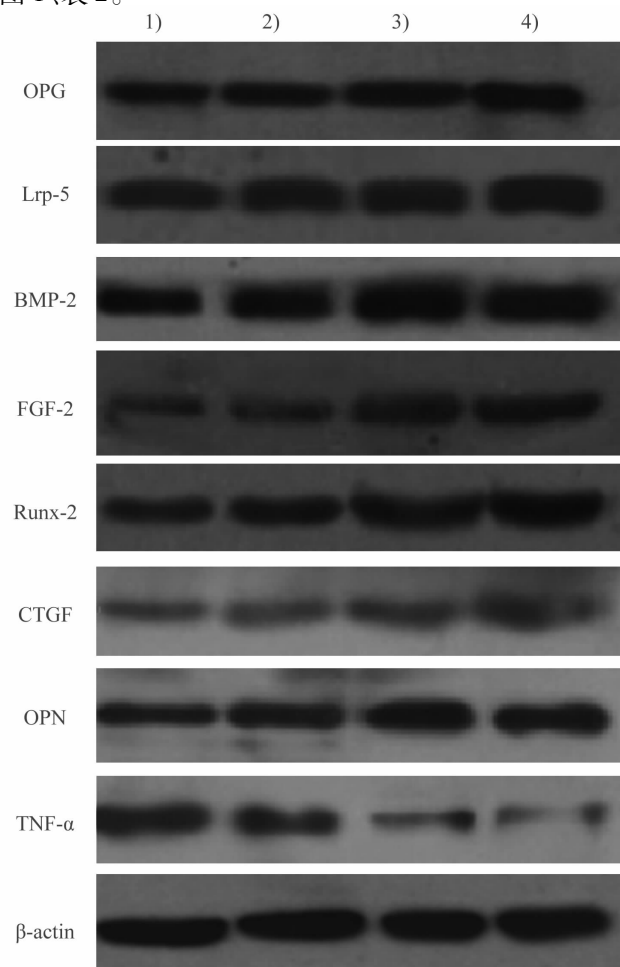


图 1 4 组 MG63 细胞骨代谢调节相关蛋白 Western Blot 法电泳结果

1) Scr 组 2) Dickkopf-1 组 3) Sclerostin 组 4) Dickkopf-1 + Sclerostin 组

表 2 4 组 MG63 细胞骨代谢调节相关蛋白表达情况检测结果 $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	样本量 (个)	OPG	Lrp-5	BMP-2	FGF-2	Runx-2	CTGF	OPN	TNF- α
Scr 组	3	0.76 \pm 0.05	0.89 \pm 0.04	0.74 \pm 0.03	0.37 \pm 0.01	0.818 \pm 0.026	0.91 \pm 0.03	0.67 \pm 0.01	1.21 \pm 0.04
Dickkopf-1 组	3	0.90 \pm 0.02	0.98 \pm 0.02	0.77 \pm 0.01	0.50 \pm 0.01	1.081 \pm 0.008	1.08 \pm 0.02	0.75 \pm 0.01	0.90 \pm 0.05
Sclerostin 组	3	0.96 \pm 0.01	1.04 \pm 0.00	0.83 \pm 0.00	0.71 \pm 0.02	1.421 \pm 0.016	1.19 \pm 0.05	0.98 \pm 0.01	0.41 \pm 0.02
Dickkopf-1 + Sclerostin 组	3	1.38 \pm 0.00	1.23 \pm 0.03	1.06 \pm 0.04	1.00 \pm 0.04	1.604 \pm 0.030	1.32 \pm 0.01	1.03 \pm 0.03	0.35 \pm 0.02
F 值		100.746	51.108	67.186	270.889	685.513	59.144	175.804	277.400
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

4 讨论

Dickkopf-1 和 Sclerostin 可通过 Wnt 信号通路促进间充质干细胞向成骨细胞分化及成骨细胞增殖、成熟^[7-8]。腺病毒载体可容纳高达 37 kb 的 DNA 片段, 多次复制不会改变外源基因, 而且致病性低, 并能迅速转染处于分裂期或静止期的细胞^[9]。

OPG 可促进破骨细胞凋亡, 抑制破骨细胞生成和活化, 促进骨形成^[10], 敲除 OPG 基因的小鼠可发生高转换型骨质疏松^[11]。Lrp-5 存在于成骨细胞表面, 可通过降低 Tph1 表达, 抑制 5-羟色胺的生成, 促进骨细胞增殖^[12]。BMP-2 参与骨和软组织的生长发育及其重建过程。对 BMP-2 基因缺乏小鼠的骨祖细

胞监测表明,其在扩增、分化为成熟的成骨细胞过程中表现出了严重缺陷^[13]。FGF-2 对于骨基质蛋白均有着较强的增殖和表达效应,而且能够矿化人成骨细胞^[14],与 Runx-2 共同调节骨和软骨的代谢^[15-16]。TNF- α 能促进骨髓来源的巨噬细胞的破骨前体细胞数量,并向破骨细胞分化,而且能增强破骨细胞介导的骨吸收,并通过 IGF-1、Ox 以及 Runx-2 的抑制作用,抑制成骨细胞分化^[17-18]。CTGF 能刺激或抑制成骨细胞分化^[19]。OPN 对破骨细胞和成骨细胞均有作用,影响骨基质的矿化、吸收、骨重塑过程,介导骨组织细胞与骨基质间的连接^[20]。

本研究的结果提示,抑制 MG63 细胞 Dickkopf-1 和 Sclerostin 表达,均能上调具有骨形成和双向调节作用的骨代谢调节相关蛋白表达水平、下调具有骨吸收作用的骨代谢调节相关蛋白表达水平,其中抑制 Sclerostin 表达对骨代谢调节相关蛋白表达水平的影响强于抑制 Dickkopf-1 表达,而且抑制 Dickkopf-1 和 Sclerostin 表达在调节骨代谢调节相关蛋白表达水平方面具有协同作用。

5 参考文献

- [1] Ke HZ, Richards WG, Li XD, et al. Sclerostin and dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases [J]. *Endocr Rev*, 2012, 33(5): 747-783.
- [2] Macdonald BT, Joiner DM, Oyserman SM, et al. Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice [J]. *Bone*, 2007, 41(3): 331-339.
- [3] Wang FS, Ko JY, Yeh DW, et al. Modulation of dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(4): 1793-1801.
- [4] Ellies DL, Viviano B, McCarthy J, et al. Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(11): 1738-1749.
- [5] Ryan ZC, Ketha H, McNulty MS, et al. Sclerostin alters serum vitamin D metabolite and fibroblast growth factor 23 concentrations and the urinary excretion of Calcium [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(15): 6199-6204.
- [6] 万雷, 黄宏兴, 黄红, 等. 过表达 DKK1, Sost 重组腺病毒载体的构建及其对 MG63 细胞和相关蛋白的影响研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2016, 33(4): 578-584.
- [7] Rodda SJ, Memahan AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors [J]. *Development*, 2006, 133(16): 3231-3244.
- [8] Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, et al. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop [J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(10): 1842-1853.
- [9] LEUNG D. Adenoviral vectors [J]. *Meducator*, 2012, 1(2): 6.
- [10] Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, et al. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases [J]. *Lab Invest*, 1999, 79(2): 83-94.
- [11] 许勇, 王铸钢, 杨桦, 等. 骨保护素 (OPG) 基因敲除小鼠发生高转换型骨质疏松和动脉钙化 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(003): 260-266.
- [12] Yadav VK, Ryu JH, Suda N, et al. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum [J]. *Cell*, 2008, 135(5): 825-837.
- [13] Zhao M, Ko SY, Liu JH, et al. Inhibition of microtubule assembly in osteoblasts stimulates bone morphogenetic protein 2 expression and bone formation through transcription factor Gli2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(5): 1291-1305.
- [14] Zoricic S, Maric I, Bobinac D, et al. Expression of bone morphogenetic proteins and cartilage-derived morphogenetic proteins during osteophyte formation in humans [J]. *J Anat*, 2003, 202(Pt 3): 269-277.
- [15] Mao B, Wu W, Davidson G, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling [J]. *Nature*, 2002, 417(6889): 664-667.
- [16] Mao B, Wu W, Li Y, et al. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins [J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 321-325.
- [17] Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, et al. TNF α promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF- κ B signaling pathway [J]. *Bone*, 2009, 45(2): 367-376.
- [18] Ding J, Ghali O, Lencel P, et al. TNF- α and IL-1 β inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells [J]. *Life Sci*, 2009, 84(15/16): 499-504.
- [19] 张丽, 姜丽燕, 张良岩, 等. CTGF 对破骨前体细胞 RAW264.7 增殖及碳酸酐酶 II 分化的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 202(2): 133-136.
- [20] 王增田, 王心, 杨静, 等. 骨桥蛋白影响破骨细胞, 成骨细胞参与骨重塑过程的研究进展 [J]. *武警后勤学院学报: 医学版*, 2014, 23(12): 1062.

(2016-07-14 收稿 2016-08-09 修回)