

Runx2 在白藜芦醇诱导的小鼠 BMSCs 中的表达及生物信息学分析

黄 燕¹⁾, 霍 静²⁾, 裴晋红¹⁾, 栗学清¹⁾, 汪军梅¹⁾, 宋丽华³⁾ *
(¹⁾长治医学院基础医学部生物化学教研室,山西 长治 046000;²⁾长治医学院基础医学部生物教研室,
山西 长治 046000;³⁾长治医学院药理学系,山西 长治 046000)

摘要 为探讨成骨分化的主要调节因子 Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)在白藜芦醇(resveratrol, RSVL)诱导小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs)向成骨细胞分化中的作用,以及以 Runx2 为研究起点,通过生物信息学分析方法以表明白藜芦醇诱导 BMSCs 向成骨分化的可能机制。本研究用不同浓度的 RSVL(10⁻⁹ mol/L -10⁻⁷ mol/L)作用小鼠骨髓间充质干细胞 8 d。实时逆转录-聚合酶链反应及 Western 印记法检测 Runx2 的 mRNA 和蛋白质表达水平。生物信息学方法分析及预测鼠 Runx2 蛋白的性质及特征。结果表明,与对照组相比,10⁻⁹ mol/L、10⁻⁸ mol/L、10⁻⁷ mol/L 白藜芦醇诱导 Runx2 的 mRNA 表达水平分别增加 6%(*P* > 0.05)、30%(*P* < 0.01)、49%(*P* < 0.01);与对照组相比,10⁻⁹ mol/L、10⁻⁸ mol/L、10⁻⁷ mol/L 白藜芦醇诱导 Runx2 蛋白表达水平分别增加 12%(*P* > 0.05)、72%(*P* < 0.01)、94%(*P* < 0.01)。由此可见,白藜芦醇可显著上调 BMSCs 中 Runx2 的 mRNA 和蛋白质表达水平(*P* < 0.01),且 10⁻⁷ mol/L 的白藜芦醇诱导作用最强。生物信息学预测得知,Runx2 属于碱性不稳定蛋白质;二级结构中无规卷曲占主导;存在 102 个潜在的磷酸化位点、97 个潜在 O-糖基化位点和 8 个 N-糖基化位点;Runx2 具有利于蛋白质间相互作用的结构特点;PI 启动子区潜在的转录因子结合位点共 28 处。疏松的结构特征、丰富的修饰位点及多种转录因子结合位点为探讨白藜芦醇诱导 BMSCs 的分子机制提供参考。

关键词 Runt 相关转录因子 2;白藜芦醇;骨髓间充质干细胞;成骨分化
中图分类号 Q71

Expression and Bioinformatics Analysis of Runx2 in Resveratrol-induced BMSCs in Mice

HUANG Yan¹⁾, HUO Jing²⁾, PEI Jin-Hong¹⁾, LI Xue-Qing¹⁾, WANG Jun-Mei¹⁾, SONG Li-Hua³⁾ *
(¹⁾Department of Biochemistry, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China;
²⁾Department of Biology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China;
³⁾Department of Pharmacology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China)

Abstract We aim to investigate the role of the main regulatory factor Runt-associated transcription factor 2 (Runx2) when bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are induced by resveratrol (RSVL) into osteoblastic cells. We take Runx2 as the starting point, and use bioinformatics analysis to elucidate the possible mechanism of RSVL inducing osteogenic differentiation of BMSCs. The mRNA and protein

收稿日期: 2019-04-26; 修回日期: 2019-07-08; 接受日期: 2019-07-18
山西省卫生和计划生育委员会科研课题(No.201602024); 长治医学院科技创新团队支持项目(No.CX201413)
* 通讯作者 Tel: 0355-3151450; E-mail: slh10282001@163.com
Received: April 26, 2019; Revised: July 8, 2019; Accepted: July 18, 2019
Supported by Shanxi Province Health and Family Planning Commission Research Topic (No.201602024); Changzhi Medical College Science and Technology Innovation Team (No.CX201413)
* Corresponding author Tel: 0355-3151450; E-mail: slh10282001@163.com

levels of Runx2 were detected by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blotting with different concentrations of RSVL (10^{-9} mol/L- 10^{-7} mol/L) for 8 days. Bioinformatics was used to analyze and predict the properties and characteristics of mouse Runx2 protein. As a result, compared with the control group, the mRNA level of Runx2 induced by 10^{-9} mol/L, 10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L RSVL increased by 6% ($P > 0.05$), 30% ($P < 0.01$) and 49% ($P < 0.01$), respectively. Compared with the control group, the level of Runx2 proteins by 10^{-9} mol/L, 10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L RSVL increased by 12% ($P > 0.05$), 72% ($P < 0.01$), and 94% ($P < 0.01$). In summary, RSVL could significantly up-regulate the mRNA expression and protein levels of Runx2 in BMSCs ($P < 0.01$), and the induction of RSVL by 10^{-7} mol/L was the most significant. Bioinformatics prediction analysis shows that Runx2 is an alkaline unstable protein; random crimping is dominant in secondary structures; There were 102 potential phosphorylation sites, 97 potential *O*-glycosylation sites and eight *N*-glycosylation sites; Runx2 has structural characteristics conducive to protein-protein interaction; There are 28 potential transcription factor binding sites in the P1 promoter region. The loose structural characteristics, abundant modification sites and multiple transcription factor binding sites provide a reference for exploring the molecular mechanism of RSVL-induced BMSCs.

Key words Runt-related transcription factor 2 (Runx2); resveratrol; bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMSCs); osteogenic differentiation

骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 作为组织工程中成骨细胞的重要来源,在骨缺损修复和再生领域有着良好的应用前景^[1]。白藜芦醇 (resveratrol, RSVL) 作为一种可食用的植物雌激素,具有哺乳动物雌激素样作用,广泛存在于虎杖、葡萄和花生等天然植物中^[2]。体内外研究表明,白藜芦醇不仅具有抗肿瘤、抗氧化、抗血小板聚集和抗炎作用,它还能减少去卵巢大鼠的骨量丢失^[3],但其分子机制尚不清楚。Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 是 BMSCs 向成骨分化的主要调节因子^[4,5]。Runx2 缺失鼠成骨细胞的分化完全被抑制,均不发生骨膜内成骨和软骨内成骨^[6-8]。本研究主要目的是探讨不同浓度白藜芦醇在促进 BMSCs 成骨分化中 Runx2 的表达,并通过生物信息学分析 Runx2 的结构与功能,为今后进一步研究白藜芦醇促进成骨分化的分子机制提供一定的线索和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Alpha minimum essential medium (α -MEM)、DMEM、青-链霉素溶液、SDS 购自 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA), 胎牛血清 (FBS) 购自 Invitrogen (CA, USA)。白藜芦醇 (无水乙醇溶解,采用 PBS 稀释为所需实验浓度,乙醇终浓度为 0.1%)、维生素 C、 β -磷酸甘油、蛋白酶 E、ALP 检测试剂盒购自 Sigma chemical Co. (St. Louise, MO,

USA)。BCA 蛋白质浓度试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司;RNA 提取试剂盒、PrimeScriptRT 试剂盒及 SYBRGreen 试剂盒均购自 TaKaRa 公司。

1.2 小鼠 BMSCs 原代培养

选 6~8 周昆明种雌性小鼠,颈椎脱臼无痛处死。无菌条件下,分离小鼠胫骨和股骨,剪去骨髓端,用含体积分数 15% FBS、100 kU/L 青霉素 G、100 mg/L 硫酸链霉素的 DMEM 冲洗骨髓腔。上下反复冲洗 3 次,得到骨髓细胞悬液。镜下计数,将细胞浓度调整为 1×10^{10} /L 后,种入 6 孔培养板,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。于第 5 d 第 1 次换液后贴壁生长的细胞即为 BMSCs。将 BMSCs 培养条件改为可诱导其向成骨分化的 α -MEM (含 10% FBS、 5×10^{-3} mol/L β -甘油磷酸、25 mg/L Vit C) 培养液 (并记为 0 d) 继续培养 8 d。

1.3 实验分组

对照组 (含 0.1% 乙醇); 经过预实验发现, 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L 白藜芦醇可促进 BMSCs 增殖,而 10^{-6} mol/L、 10^{-5} mol/L 浓度组对 BMSCs 的增殖有抑制作用,故选择 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L 和 10^{-7} mol/L 作为后续实验组浓度。以上分组细胞分别每 2 d 加 1 次药,每 4 d 换 1 次液。

1.4 细胞内碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定

各处理组细胞培养至第 8 d 时, PBS 洗涤细胞 2 次, 0.004% 蛋白酶 E (含 1.25×10^{-3} mol/L EDTA) 消化并收集细胞。细胞内碱性磷酸酶活性测定底物为 9×10^{-2} mol/L pNPP, 37 °C 反应 30 min, 400 nm 处测定吸光度。同时用 BCA 法测定细胞中蛋白质含量。

1.5 Real-time quantitative PCR 法检测 *Runx2* 基因 mRNA 表达水平

使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。使用 PrimeScriptRT 试剂盒合成 cDNA, 并使用 SYBRGreen 试剂盒 (TaKaRa, Otsu, Japan) 进行实时荧光定量 PCR。所有样品均在八联管 (Axygen, CA, USA) 中进行, 每组 3 个重复。实时 PCR 扩增条件如下: 95℃ 30 s; 95℃ (变性), 5 s、60℃ (退火/伸长) 30 s, 共 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法, 对 *Runx2* 的 mRNA 表达量进行定量。引物序列如下: *Runx2*-F: ATAGCAAAGGCCCTCACTAA, *Runx2*-R: AACTG GCTCTTCTGCTGATT; β -*actin*-F: AGACCTCTATG CCAACACAG, β -*actin*-R: ACTCATCGTACTCCTG CTTG。

1.6 Western 印迹法检测 *Runx2* 蛋白表达水平

用冰冷的 PBS 洗涤各处理组细胞 2 次。加入含有 PMSF 蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液对细胞进行裂解。BCA 法测定细胞裂解液总蛋白质浓度。SDS-PAGE 上样实验组和对照组的细胞裂解液, 每个胶孔上样 20 μ g, 每个样品重复 3 次, 电泳完毕半干法转移到 PVDF 膜上, 封闭液封闭。然后用 *Runx2* 一抗 (1 : 3 000 稀释; AB23981; Abcam, Cambridge, UK) 孵育 3 h。用 PBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。加酶标二抗室温下孵育 1.5 h, PBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。使用增强的化学发光系统曝光显色。收集的条带用 image J 1.37 V 软件量化。

1.7 生物信息学方法分析 *Runx2* 的结构与功能

小鼠 *Runx2* 蛋白序列信息来自 NCBI 的 GenBank 数据库, 获得 632 个氨基酸的序列信息进行后续的结构与功能分析, 从 GenBank 中获得的小鼠 *Runx2* 启动子区序列 NG_052665.1 用于分析 *Runx2* 启动子区潜在的转录因子结合位点。采用 Expert Protein Analysis System 数据库的 ProtParam Tool 工具, 分析 *Runx2* 蛋白的理化性质; 通过 SOPMA 工具分析 *Runx2* 的二级结构; NetPhos 3.1 在线预测软件对 *Runx2* 蛋白质磷酸化位点进行预测; NetNglyc 1.0 Server 在线软件预测 *Runx2* 蛋白质 N-糖基化位点; 通过 STRING 数据库, 构建 *Runx2* 的蛋白质间相互作用网络图; 经 Alibaba2.1 程序搜索 TRANSFAC 数据库, 分析 *Runx2* 启动子区潜在的转录因子结合位点。

1.8 统计学方法

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本均数间的比较用

t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 采用 SPSS 19.0 对所有数据进行分析处理。

2 结果

2.1 白藜芦醇诱导碱性磷酸酶活性增强

为了解不同浓度白藜芦醇诱导 BMSCs 向成骨分化的效应, 以不同浓度的白藜芦醇进行 8 d 处理, 检测 BMSCs 细胞中每单位蛋白质的碱性磷酸酶活性。结果 Fig.1 显示, 与对照组相比, 10^{-9} mol/L 白藜芦醇组 ALP 活性无显著变化 (1.99 ± 0.12 vs. 1.97 ± 0.35 , $P > 0.05$), 10^{-8} mol/L 白藜芦醇组 ALP 活性显著增加 (2.38 ± 0.44 vs. 1.97 ± 0.35 , $P < 0.01$), 10^{-7} mol/L 白藜芦醇组 ALP 活性显著增加 (2.68 ± 0.36 vs. 1.97 ± 0.35 , $P < 0.01$)。结果提示, 白藜芦醇呈浓度依赖性 (10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L) 促进 BMSCs 向成骨细胞分化, ALP 活性逐渐增强。

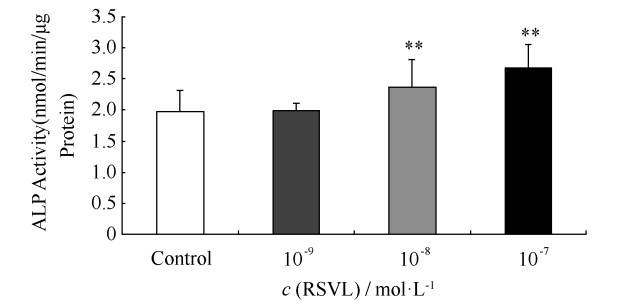


Fig.1 Cell Differentiation was assessed by the ALP activity Cellular differentiation was assessed based on the ALP activity after treatment with different concentrations of RSVL for 8 days ($n = 6$). ** $P < 0.01$ vs. control group

2.2 白藜芦醇诱导下 BMSCs 中 *Runx2* 基因表达水平升高

为了检测不同浓度白藜芦醇诱导条件下, BMSCs 中 *Runx2* 基因表达水平, 采取白藜芦醇干预 BMSCs 8 d 后收集细胞样品, 提取 RNA。以 β -肌动蛋白为内参, 用 Real-time quantitative PCR 检测 *Runx2* 的 mRNA 相对含量。如 Fig.2 所示, 与对照组相比, 10^{-9} mol/L 白藜芦醇组 *Runx2* 的 mRNA 表达水平增加 6%, 差异不显著, $P > 0.05$ 。 10^{-8} mol/L 白藜芦醇组 *Runx2* 的 mRNA 表达水平增加 30%, 差异显著, $P < 0.01$ 。 10^{-7} mol/L 白藜芦醇组 *Runx2* 的 mRNA 表达水平增加 49%, 差异显著, $P < 0.01$ 。上述结果提示, 随着白藜芦醇浓度的递增 (10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L), *Runx2* 的 mRNA 表达水平逐步增加。其中, 10^{-7} mol/L 的诱导分化组中的

基因表达量最高($P < 0.01$)。

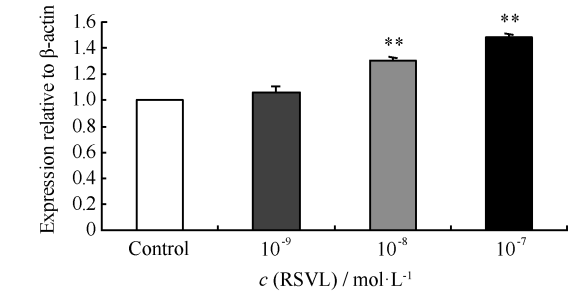


Fig.2 Runx2 gene expression was detected in BMSCs by RT-qPCR BMSCs were subjected to 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L and 10^{-7} mol/L RSVL for eight days. Expression of Runx2 mRNA was quantified using RT-qPCR. The data are presented as mean \pm standard deviation ($n=3$); ** $P < 0.01$ vs. control group

2.3 白藜芦醇诱导下 BMSCs 中 Runx2 蛋白表达水平升高

为了检测不同浓度白藜芦醇诱导条件下, BMSCs 中 Runx2 蛋白的表达水平,采取白藜芦醇干预 BMSCs 8 d 后提取总蛋白质。以 β -肌动蛋白为内参,用 Western 印记法检测 Runx2 蛋白的表达量。结果如 Fig.3 所示,与对照组相比, 10^{-9} mol/L 白藜芦醇组 Runx2 蛋白表达水平增加 12%,差异

(A)

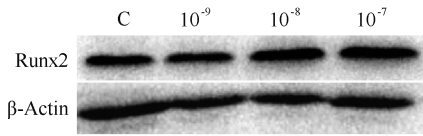


Fig.3 Runx2 protein level was detected in BMSCs by Western blotting Total proteins of BMSCs with different concentrations of RSVL for 8 days were extracted, and the protein levels of Runx2 was detected by Western blotting (A). Corresponding densitometric analysis of Runx2 (B). The data are presented as mean \pm standard deviation ($n=3$); ** $P < 0.01$ vs. control group

不显著, $P > 0.05$ 。 10^{-8} mol/L 白藜芦醇组 Runx2 蛋白表达水平增加 72%,差异显著, $P < 0.01$ 。 10^{-7} mol/L 白藜芦醇组 Runx2 蛋白表达水平增加 94%,差异显著, $P < 0.01$ 。上述结果提示,随着白藜芦醇浓度的递增(10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L),Runx2 蛋白的表达水平显著增加,其中 10^{-7} mol/L 白藜芦醇诱导分化组中的蛋白质表达量最高($P < 0.01$)。

2.4 Runx2 的结构与功能分析

2.4.1 Runx2 的理化性质 通过 ExPASy 网站中的 ProtParam 工具分析得出 Runx2 蛋白的分子式为 $C_{3035}H_{4693}N_{875}O_{949}S_{25}$,组成中丝氨酸含量最高,占到整个序列的 13.3%。Runx2 的哺乳动物网织红细胞半衰期为 30 h,不稳定系数是 66.15,归类为不稳定的蛋白质。Runx2 蛋白的理论等电点为 9.32,理论上属于碱性蛋白质。

2.4.2 Runx2 蛋白的空间结构分析 通过 SOPMA 分析 DMP1 的二级结构获得,多肽链中 α -螺旋结构占 19.94%,无规卷曲占 59.49%,延伸链占 16.77%, β -转角占 3.80%,无规卷曲占主导,结构比较松散,见 Fig.4;登录 SWISS-MODEL 网站预测该蛋白质的三级结构,见 Fig.5。

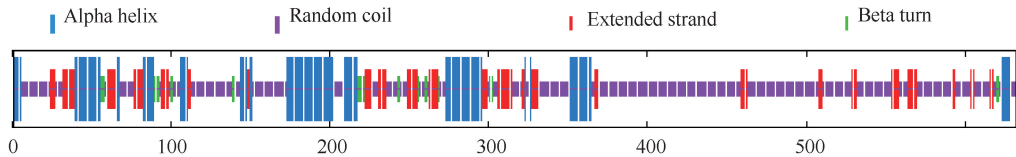
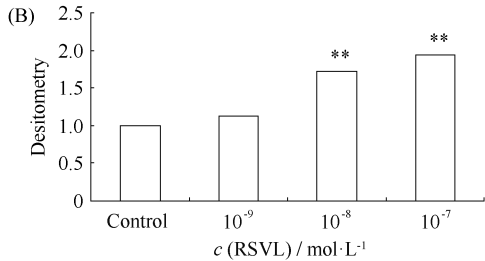


Fig.4 Secondary structure prediction of Runx2 The α -helix structure accounted for 19.94%, random coil 59.49%, extended strand 16.77%, β -turn 3.80%

2.4.3 Runx2 蛋白磷酸化位点预测 NetPhos 3.1 在线预测软件对 Runx2 蛋白的磷酸化位点进行预测,见 Fig. 6。结果显示,Runx2 含有 102 个潜在磷

酸化位点,其中丝氨酸磷酸化位点最多,有 68 个;苏氨酸磷酸化位点 30 个;酪氨酸磷酸化位点 5 个。其中,除酪氨酸外的 97 个潜在磷酸化位点同时也是

O-糖基化位点,见 Fig.6。



Fig.5 Prediction of tertiary structures of the Runx2 protein This spatial structure can show the arrangement and relative spatial position of different secondary structure forms (α -helix, random coil, extended strand and β -turn) in space

2.4.4 Runx2 蛋白的 *N*-糖基化位点预测分析

NetNglyc 1.0 Server 在线软件预测 Runx2 蛋白质 *N*-糖基化位点,见 Fig.7。结果显示,Runx2 蛋白的序

列中存在 7 个潜在 *N*-糖基化位点,其中 3 处糖基化修饰的分值超过了阈值。

2.4.5 Runx2 蛋白的相互作用网络 通过 STRING 数据库预测 Runx2 的相互作用蛋白质,构建蛋白质相互作用网络(见 Fig.8)。其成分主要有:核结合因子亚单位 β (Cbfb)、胶原蛋白 α -1(I) 链(Col1a1)、骨钙素-2 (Bglap2)、视网膜母细胞瘤相关蛋白(Rb1)、转录因子 Sp7、骨钙素 (Bglap)、转录因子 Sox9、骨形态发生蛋白 2 (Bmp2)、骨桥蛋白-1 (Spp1)、肿瘤坏死因子配体超家族成员 11 (Tnfsf11)。Runx2 蛋白与这 10 种蛋白质的相关系数分别为: 0.981、0.981、0.979、0.965、0.962、0.960、0.954、0.944、0.930 和 0.910。

2.4.6 Runx2 基因启动子区潜在的转录因子结合位点 从 GenBank 中获得小鼠 *Runx2* 基因 P1 启动子区序列 NG_052665.1,经 Alibaba2.1 程序搜索 TRANSFAC 数据库,分析 *Runx2* 基因 P1 启动子区潜在的转录因子结合位点共 28 处,见 Table 1。

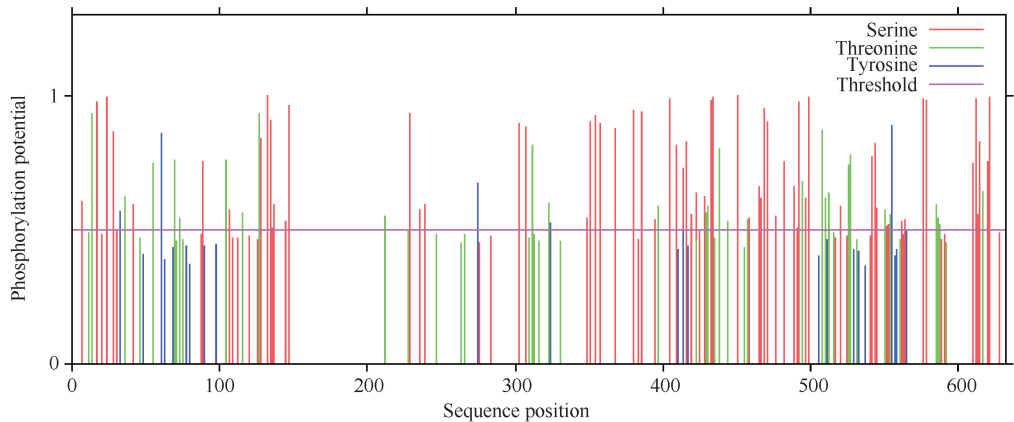


Fig.6 Prediction of phosphorylation sites of the Runx2 protein The results showed that Runx2 contained 102 potential phosphorylation sites, including 68 serine phosphorylation sites, 30 threonine phosphorylation sites and 5 tyrosine phosphorylation sites

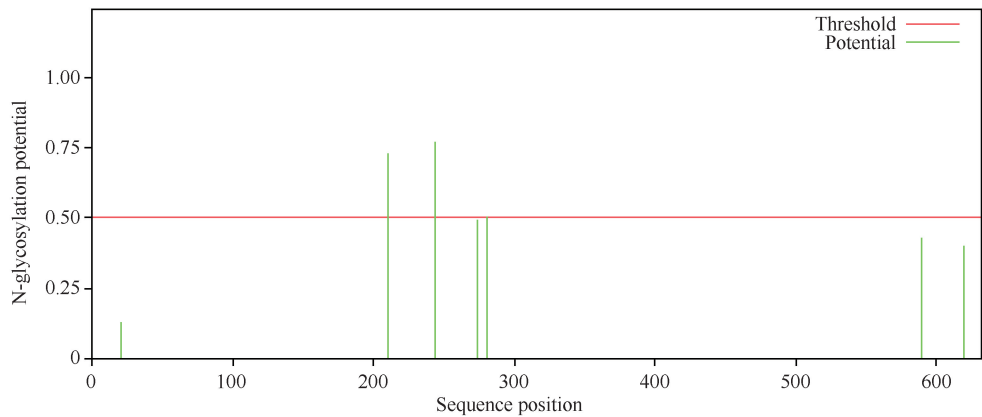


Fig.7 Prediction of *N*-glycosylation sites of Runx2 The results showed that there are 7 potential *N*-glycosylation sites in the Runx2 protein, among which the score of glycosylation modification at 3 sites exceeded the threshold

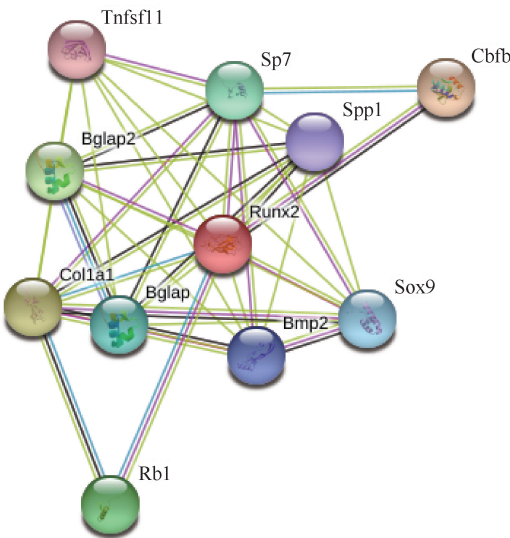


Fig.8 Protein-protein interaction networks for Runx2
The 10 proteins closely related to Runx2 were Cbfb, Col1a1, Bglap2, Rb1, Sp7, Bglap, Sox9, Bmp2, Spp1 and Tnfsf11

Table 1 Potential DNA binding sites of transcription factors in the P1 promoter region of the Runx2 gene

Transcription factors	Potential binding sites	Binding sites sequences
C/EBPalpha	118-127	TTATTTTTTT
	188-197	TGAGCAAATA
	NF-1	CAATCCAAAA
		TCCCCTCCCCT
		CCCTTCCTCT
	896-905	TCCCTCCTCT
	925-934	CTACCCCTCC
AP-1	2018-2029	GTGGGTGGGGGC
	2019-2033	TGGGTGGGGGCACAG
	2977-2986	ACCCCTCCCA
	769-778	TGTGACTCAT
	Oct-2. 1	GCTGCTTTGC
		AGCCTGGGGA
	1230-1239	TATATAATGA
AP-2alphaA	1533-1542	AAGGTATATA
	2698-2707	AACAGAAACT
	1582-1591	TTTGCTAATT
	1693-1702	CCATCTTTGG
	1725-1734	ATGTCCTAAT
	2649-2658	TATCTCTTCT
	1740-1749	CAATATCTGT
GATA-1	3560-3569	CTTATTAGGA
	1787-1796	TGTCCTAATT
	2650-2659	ATTTGCATGT
	1950-1959	GTATTCAAAT
	2715-2724	ATTTGAATAA
	2738-2747	ATTTGAATTG
	3486-3495	ATTTGCATGT
MCM1	1950-1959	ATTTGCATGT
	1950-1959	ATTTGCATGT

3 讨论

骨形成是从 BMSCs 向成骨细胞和软骨细胞增殖分化,以及细胞外基质的成熟和矿化的复杂生长发育过程,是在多种分子的调节下完成。骨质疏松则是一种以骨量减少、骨密度降低、骨的微观结构破坏为特征的代谢性骨病,多见于老年人及绝经后女性^[9]。大量研究显示,雌激素水平下降可能是骨质疏松的重要发病机制^[10]。目前,对于雌激素缺乏诱发的骨质疏松症的防治多是通过激素替代疗法,但这又会增加患乳腺癌和心血管病的风险。因此,寻求安全有效的激素替代物成为研究方向。白藜芦醇除了具有抗氧化、调节血脂和抗肿瘤等多种生物活性外,还能在体外与雌激素竞争性结合雌激素受体,具有雌激素样作用,通过雌激素受体的激活,诱发骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) 的产生,从而促进骨形成^[11]。也有研究显示,白藜芦醇可以通过增加 β -联蛋白 (β -catenin) 的表达来阻止成骨细胞凋亡^[12]。但是,白藜芦醇诱导 BMSCs 向成骨分化的具体分子机制仍需进一步完善。

Runx 是一类调控间充质干细胞向成骨方向分化的特异性转录因子,包括 Runx1、Runx2 和 Runx3,它们参与骨形成,是骨骼生长和发育过程中重要的细胞因子。Runx1 与造血功能有关,Runx3 是胃上皮细胞主要的生长调节因子,Runx2 可在前成骨细胞、成骨细胞、前软骨细胞和前肥大软骨细胞中表达。Runx2 作为成骨特异性转录因子,在成骨分化及骨形成过程中发挥关键调控作用^[13]。同时,Runx2 也被认为是成骨分化调控网络的关键节点,参与组成该网络的各条信号通路都直接或间接作用于该节点,并最终调控其下游靶基因的表达,从而调节成骨分化及骨形成。本研究以 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L 的白藜芦醇处理 BMSCs 8 d,分别检测 Runx2 的 mRNA 及蛋白质表达水平。结果显示,随着浓度的增加,白藜芦醇的对成骨细胞的诱导效应逐渐增强。为探讨白藜芦醇诱导 BMSCs 中 Runx2 表达的可能分子机制,通过生物信息学手段分析 Runx2 的结构与功能。结果表明,通过对小鼠 Runx2 二级结构和三级结构的分析得到,其松散的结构特点易于受多种蛋白质因子的调控;磷酸化、糖基化位点的丰富,也进一步说明其具有多种修饰的可能;通过分析 Runx2 基因 P1 启动子区潜在的转录因子结合位点发现,该基因表达可能受到多种转录因子的调控;与 Runx2 存在相互作用的蛋白质

中,与 Runx2 已知功能相关的蛋白质有:Cbfb 通过促进 Cbfa1 与 DNA 的结合促进成骨分化^[14];Col1a1 为成骨早期标记蛋白质;Bglap2 除参与骨骼发育外,还是一种能量代谢调节激素^[15];Runx2、Sp7 与 wnt 信号通路在间充质干细胞向成骨细胞分化过程中具有重要作用^[16];Bglap 是成骨细胞分泌的一种非胶原蛋白,在细胞矿化阶段表达显著增加;Sox9 是软骨发育形成中的重要转录因子,对软骨的发育成熟等过程发挥重要的调节作用^[17];骨组织形成过程中,Bmp-2 通过自分泌或旁分泌作用,在细胞及细胞间质之间传导信息,调节成骨细胞的分化^[18];Spp1 被认为是成骨细胞分化成熟的标志^[19];Tnfsf11 参与的信号传导在破骨细胞形成中起重要作用^[20]。

综上所述,随着白藜芦醇浓度的递增(10⁻⁹ mol/L、10⁻⁸ mol/L、10⁻⁷ mol/L),诱导 BMSCs 中 Runx2 的 mRNA 及蛋白质表达水平也呈递增趋势,其分子机制的探讨可以从 Runx2 入手,通过 Runx2 蛋白的结构特征分析、建立 Runx2 蛋白的相互作用网络及其基因启动子区序列分析,找寻调控 Runx2 表达的上游蛋白质,为今后 KEGG 信号通路预测白藜芦醇诱导 BMSCs 的成骨分化机制并进行实验验证提供参考。

参考文献 (References)

[1] Wang J, Liu S, Li J, *et al.* Roles for miRNAs in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, **10**(1): 197

[2] Chen RS, Wu PL, Chiou RY. Peanut roots as a source of resveratrol[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, **50**(6): 1665-1667

[3] Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, *et al.* Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo), 2000, **46**(2): 78-83

[4] Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, *et al.* The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (26):

23934- 23941

[5] Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: of bone and stretch[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, **40**(9): 1659-1663

[6] Vimalraj S, Selvamurugan N. MicroRNAs: Synthesis, Gene Regulation and Osteoblast Differentiation [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2013, **15**: 7-18

[7] Kang JS, Alliston T, Delston R, *et al.* Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3[J]. *EMBO J*, 2005, **24**(14): 2543-2555

[8] Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation[J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**(24): 16502-16511

[9] Alexander IM. Pharmacotherapeutic management of osteoporosis and osteopenia[J]. *Nurse Pract*, 2009, **34**(6): 30-40

[10] Yamashita DS, Dodds RA. Cathepsin K and the design of inhibitors of cathepsin K [J]. *Curr Pharm Des*, 2000, **6** (1) : 1-24

[11] Zhao M, Ko SY, Garrett IR, *et al.* The polyphenol resveratrol promotes skeletal growth in mice through a sirtuin 1-bone morphogenic protein 2 longevity axis[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, **175**(21): 4183-4192

[12] Li P, Wang Y, Liu X, *et al.* Atypical antipsychotics induce human osteoblasts apoptosis via Wnt/β-catenin signaling [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2019, **20**(1): 10

[13] Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, *et al.* Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes[J]. *N Engl J Med*, 2002, **347**(24): 1916-1923

[14] Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, *et al.* Core-binding factor β interacts with Runx2 and is required for skeletal development[J]. *Nat Genet*, 2002, **32**(4): 633-638

[15] Raska O, Bernaskova K, Raska I Jr. Bone metabolism: a note on the significance of mouse models [J]. *Physiol Res*, 2009, **58** (4) : 459-471

[16] Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors [J]. *J Cell Biochem*, 2006, **95** (3) : 445-453

[17] Jiang X, Huang X, Jiang T, *et al.* The role of Sox9 in collagen hydrogen-mediated chondrogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. *Biomater Sci*, 2018, **6** (6) : 1556-1568

[18] Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblast into the osteoblast lineage[J]. *J Cell Biol*, 1994, **127**(6 Pt 1): 1755-1766

[19] Sodek J, Chen J, Nagata T, *et al.* Regulation of osteopontin expression in osteoblasts[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, **760**: 223-241

[20] Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, **473** (2) : 139-146