0254-6124/2011/31(5)-627–08 *Chin. J. Space Sci.* 空间科学学报

Guo Feima, Dai Zhongquan, Wu Feng, Shang Peng, Li Yinghui. Bone-specific transcription factor Runx2 on the role of antagonistic bone loss in space. *Chin. J. Space Sci.*, 2011, **31**(5): 627-634

骨特异性转录因子 Runx2 对抗空间骨丢失效应的初步研究*

郭飞马[1,2] 戴钟铨[2] 吴 峰[2] 商 澎[1] 李莹辉[1,2]

1(西北工业大学生命学院 空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室 西安 710072)

2(中国航天员科研训练中心 航天医学基础与应用国家重点实验室 北京 100094)

摘 要 为了构建稳定过表达 Runx2 (骨特异性转录因子) 的 C2C12 (小鼠成肌细胞) 和 MG63 (前成骨细胞) 细胞株, 并用于研究 Runx2 在对抗空间骨丢失效应中的作用. 利用实时定量聚合酶链式反应鉴定 Runx2 下游基因 I 型胶原、碱性磷酸酶表达情况, 在二维回转器中培养稳定细胞株, 通过定量聚合酶链式反应, 观察在模拟失重效应下 Runx2 基因对其下游基因表达的影响. 结果表明, 通过筛选获得稳定转染的 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 细胞株, 经鉴定都能过表达 Runx2. 转染后的细胞 I 型胶原和碱性磷酸酶 mRNA 表达增高. 回转组与对照组相比, MG63, C2C12-Runx2, MG63-Runx2 细胞的 I 型胶原和碱性磷酸酶 mRNA 表达降低, 但在模拟失重效应下, 转染细胞中 I 型胶原和碱性磷酸酶的 mRNA 表达下降程度明显低于未转染细胞株. 所构建的 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 细胞株比较稳定, 并证实 Runx2 能部分对抗失重引起的成骨特异性分子的降低.

关键词 模拟失重, 小鼠成肌细胞, 核心结合因子, 前成骨细胞

中图法分类号 V 524

Bone-specific Transcription Factor Runx2 on the Role of Antagonistic Bone Loss in Space

GUO Feima[1,2] DAI Zhongquan[2] WU Feng[2] SHANG Peng[1] LI Yinghui[1,2]

1(*Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Faculty of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an* 710072)

2(*State Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application, China Astronaut Research and Training Center, Beijing* 100094)

Abstract To construct a stable expression of Runx2 in C2C12, MG63 cells, and primarily investigate the role of Runx2 against bone loss induced by spaceflight. Myoblast C2C12 and pre-osteoblast MG63 was transfected with Runx2 and selected overexpressing cell clone with G418. The stably transfected C2C12, MG63 cell lines with Runx2 were identified by westernblot and named C2C12-Runx2 and MG63-Runx2 respectively. The expression of genes regulated by Runx2 were determined using

* 国家自然科学基金项目 (30870589), 国家重点基础研究发展计划 (2011CB707704), 中国航天医学工程预先研究项目 (SJ200809), 国防基础预研项目 (A1620090025), 中国航天医学基础与应用国家重点实验室项目 (SMFA09A08) 共同资助

2011-03-16 收到原稿, 2011-06-28 收到修定稿

E-mail: yinghuidd@vip.sina.com, daizhq77@163.com

real-time quantitative PCR. The stable cell lines and untransfected cell lines were cultured in clinostat to simulate microgravity condition and detected the expression of Runx2 and its downstream genes by real-time quantitative PCR. C2C12-Runx2, MG63-Runx2 cell lines were gained which were over-expressing Runx2. The mRNA expression level of Alkaline Phosphatase (ALP) and Col1a1 increased in C2C12-Runx2 and MG63-Runx2 cells. The mRNA expression of ALP and Col1a1 decreased in the clinorotation group compared with the control group in MG63, C2C12-Runx2 and MG63-Runx2 cells. The decreased degree of ALP, Col1a1 mRNA expression in both transfected cell lines was lower than in untransfected cell lines under simulated microgravity condition. C2C12-Runx2, MG63-Runx2 cell lines were successfully constructed. The data from clinorotation and real-time quantitative PCR suggest that Runx2 can partly antagonize the decreased expression of osteogenic specific molecules induced by simulated microgravity.

Key words Simulated bone loss, C2C12, Runx2, MG63

1 引言

中长期空间飞行导致的骨丢失是影响航天员身体健康及工作效率的重要因素. 在空间失重条件下, 航天员骨矿物质呈进行性、持续性的丢失以致出现不同程度的骨强度下降. 而长期处于失重状态可引起骨量丢失、骨质脱钙、承重骨骼肌萎缩、负钙平衡; 骨丢失还可增加心血管组织或软组织钙化、泌尿系统结石等; 即使航天员返回地面, 骨丢失仍将延续一段时间, 其骨密度在短期内无法达到飞行前水平. 因此, 在长期载人航天飞行中空间骨丢失对机体的影响成为研究热点. 研究表明, 成骨细胞活性和分化成熟能力下降是造成空间骨丢失的主要原因 [1].

Runx2 是启动和调控成骨细胞分化的关键转录因子, 又称核心结合因子 1 (Cbfa1), 属于 Runt 结构域基因家族, 其对骨组织的形成及重建起着重要作用. 体内外实验表明, Runx2 是骨髓间充质干细胞向成骨向分化所必需的. Enomoto 等发现 Runx2 缺陷 Runx2 (–/–) 小鼠的膜内和软骨内骨化均不能发生, 颅骨细胞在体内外也不能分化为成骨细胞 [2]. 而 Kojima 等发现过量表达的 Runx2 能促进体内外的骨祖细胞向成骨细胞转化 [3]. 同时 Gersbach 等发现外源性 Runx2 能诱导成肌细胞向成骨细胞转变 [4]. 由此可见, Runx2 在成骨细胞的形成和分化中起着至关重要的作用. 它主要与成骨细胞特异性顺式元件 (OSE) 结合, 进而调节骨钙素 (OCN)、骨桥素 (OPN)、骨涎蛋白 (BSP)、I 型胶原基因 (CoI1a1) 以及碱性磷酸酶 (ALP) 的转录和表达, 同时研究也证实 Runx2 能促进 CoIla1, OPN, BSP, OCN 及纤维连接蛋白等骨细胞外基质蛋白的合成 [5−7], 说明 Runx2 调节成骨细胞分化后还可控制其下游基因的功能. 另外, Runx2 是力信号传导的重要分子. 在模拟失重效应实验中, 模拟失重效应能抑制多条细胞内信号通路进而调节 Runx2 的表达和活性, 影响成骨细胞的分化成熟 [8−9], 说明 Runx2 是成骨细胞应答重力变化的重要分子. 因此, 其有可能成为对抗空间骨丢失的重要靶点.

为了深入了解 Runx2 在空间骨丢失中的作用及过表达的对抗效果, 进而寻找到有效对抗空间骨丢失的措施, 将 Runx2 基因稳定转染到几乎不表达 Runx2 的小鼠成肌细胞 C2C12 和处于分化未成熟的前成骨细胞 MG63 中 [10], 建立 Runx2 过表达细胞模型, 在回转器中培养 Runx2 过表达细胞株, 通过定量聚合酶链式反应 (PCR) 检测受 Runx2 调控的基因表达变化情况, 观察 Runx2 过表达对空间骨丢失效应的影响及其对抗作用. 为进一步证实 Runx2 是应答重力变化的主要分子及相关机理研究提供科学依据.

2 材料与方法

2.1 材料

C2C12 和 MG63 (航天医学基础与应用国家重点实验室保存), Runx2 (清华大学常智杰教授提供), p6OSE2-Luc 质粒 (航天医学基础与应用国家重点实验室构建), FBS, DMEM, Gibco (胰蛋白酶, 美国),

Lipofectamine^{TM}2000 (Invitrogen, 美国), SYBR Premix Ex Taq 酶 (TaKaRa, 日本), 质粒提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 中国), G418 (Sigma, 美国), 兔抗 Runx2 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司), 羊抗兔 IgG、化学发光 (ECL) 底物 (Santa Cruz 公司).

2.2 Runx2 稳定转染和筛选

利用高纯度质粒大量提取试剂盒抽提 Runx2 真核表达质粒, 利用紫外分光光度计测定质粒的 OD_{260}/OD_{280} 及质粒的浓度. 在六孔板中接种 1～ 3×10^5 个细胞, 培养至细胞达到 80%～90% 的满度. 按 Lipofectamine 2000 转染试剂盒操作步骤, 将 Runx2 转染到 C2C12 和 MG63 细胞中. 细胞转染 48～72 h 后, 以含 800 ng/mL 的 G418 选择性 DMEM 培养基传代, 每 2～3 天更换选择性培养基, 持续 3～4 周, 得到阳性克隆. 选择几个细胞克隆团, 通过局部胰酶消化, 用 极限稀释法筛选单细胞克隆. 经过蛋白表达鉴定后扩大培养, 获得的细胞株命名为 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2.

2.3 瞬时转染 p6OSE2-Luc 质粒

在 24 孔板中接种 C2C12-Runx2, MG63-Runx2 细胞, 加 1 mL 细胞培养基. 培养至细胞达到 80%～90% 的满度, 按 Lipofectamine2000 转染试剂盒操作步骤, 在 24 孔板中每孔加入 p6OSE2-Luc 质粒 1 μg, 内参照 pRL-TK 质粒 0.1 μg, Lipofectamine 2000 4 μL, Opti-MEM 250 μL, DMEM 500 μL 培养基混匀. 置细胞培养箱中 6 h, 换液. 继续培养 24 h 后, 倒掉培养液, 将细胞用 1 × PLB 细胞裂解液进行蛋白裂解, 随后进行荧光素酶活性测定.

2.4 回转模拟失重效应

C2C12-Runx2, MG63-Runx2, MG63 细胞接种于常规的细胞培养瓶, 24 h 后, 向各培养瓶中灌满预热 (37°C) 的 DMEM 培养基, 排除气泡, 塞紧瓶塞, 并随机分为回转培养组和静置对照组. 回转组培养瓶以特制夹具固定于 MG-3 型回转器 (中国科学院生物物理研究所研制), 转速 30 r/min; 对照组与回转器在同一 37°C 培养箱中静置培养 48 h. Trizol 裂解细胞, 用于总 RNA 提取, 实时定量 PCR 分析.

2.5 蛋白提取与 Westernblot 印迹杂交

细胞培养或回转处理后, 倒掉培养基, 用 PBS 洗涤 1～2 次, 每瓶加入 500 μL 细胞裂解液, 收集细胞裂解液, 4°C 涡旋 30 min, 4°C 离心 12000 转 10 min, 取上清. 采用 BCA 法测定蛋白质浓度. 电泳前加上样缓冲液, 100°C 水浴 10 min, 20 μg 总蛋白进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白分离后, 电泳转至 PVDF 膜, 室温下用 5% 的牛奶封闭 2 h, 4°C 一抗孵育 (兔抗 Runx2 1:500) 过夜, TBST 洗膜 5 min 6 次, 二抗 (山羊抗兔 1:5000) 室温孵育 1 h. TBST 洗膜 5 min 6 次, 采用化学发光法 (ECL) 显影, 暗室压片.

2.6 细胞 RNA 提取以及实时定量 PCR 分析

I 型胶原、碱性磷酸酶及 GAPDH 基因的全序列从 NCBI 数据库检索, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, GAPDH 为内参照. 所用引物序列列于表 1. 参照 TRIzol 试剂盒说明书提取对照组和回转组细胞总 RNA, 经分光光度计进行 A_{260} 及 A_{280} 定量. 在 10 μL 反转录体系中, 加入 500 ng RNA 进行反转录, 37°C 30 min, 85°C 15 s 灭活反转录酶后得到总 cDNA. 在 25 μL QPCR 体系中, 加入 100 ng cDNA 进行 QPCR 扩增, 首先 94°C 30 s 变性, 15 s 退火, 退火温度列于表 1, 终末延伸 72°C 30 s, 共进行 40 个循环.

表 1 ALP, CoI1A, GAPDH 引物序列

Table 1 ALP, CoI1A, GAPDH primers sequence

名称		序列	T_m/(°C)	产物长度
ALP	Sense	5′ATCTTTGGTCTGGCCCCCATG	60	287bp
	Antisense	5′ATGCAGGCTGCATACGCCAT		
Col1a1	Sense	5′CACCTCAGGAGAAGGCTCAC	58	132bp
	Antisense	5′ATGTTCTCGATCTGCTGGCT		
GAPDH (人)	Sense	5′ACCTGACCTGCCGTCTAGAA	58	247bp
	Antisense	5′TCCACCACCCTGTTGCTGTA		
GAPDH (小鼠)	Sense	5′ACTCCACTCACGGCAAATTCA	58	110bp
	Antisense	5′GGCCTCACCCCATTTGATG		

2.7 荧光素酶活性测定

细胞用 PBS 清洗 3 次, 24 孔板中加入 150 μL 1 × PLB 细胞裂解液, 12 孔板中加入 300 μl 1× PLB 细胞裂解液, 室温放置 15 min 后, 吹打细胞, 收集细裂解液. 向荧光测定板中加入细胞裂解液 20 μL, 在化学发光仪上测定萤火虫荧光素酶活性, 读数为 M1; 然后再测定内参照质粒 pRL-TK 中海肾荧光素酶活性, 读数为 M2. M1 和 M2 为被检测质粒的相对荧光素酶活性.

3 结果与分析

3.1 稳定转染 Runx2 基因细胞株的筛选和鉴定

Runx2 质粒在转染 C2C12 和 MG63 细胞后, 用 G418 筛选 3∼4 周, 再经极限稀释法筛选, 获得了几个克隆细胞株. C2C12-Runx2, MG63-Runx2, MG63, C2C12 细胞培养 72 h 后, 利用 westernblot 检测 Runx2 的过表达情况. 如图 1 所示, C2C12-Runx2 细胞表达 Runx2 基因, 而 C2C12 细胞用 westernblot 表达没有检测到 Runx2 蛋白表达; MG63-Runx2 细胞的 Runx2 基因表达明显高于未转染的 MG63 细胞, 说明 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 的稳定表达株构建成功.

3.2 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 稳定株的功能验证

当 p6OSE2-Luc 质粒转染入细胞之后, Runx2 能与 6OSE2 结合, 激活下游报告基因表达并定量反映 Runx2 活性 [11], 利用它瞬时转染 C2C12, MG63, C2C12-Runx2, MG63-Runx2 细胞, 24 h 后测定荧光素酶活性. 因 C2C12 细胞基本不表达 Runx2 基因, 所以它的荧光素酶活性是细胞本底值. 结果显示 C2C12-Runx2 细胞的相对荧光素酶活性是 C2C12 细胞的 4 倍, MG63-Runx2 细胞的相对荧光素酶活性是 MG63 细胞的 2.5 倍 (见图 2). 说明稳定转染的 Runx2 基因能正常表达并能调控报告基因 Luc 的表达.

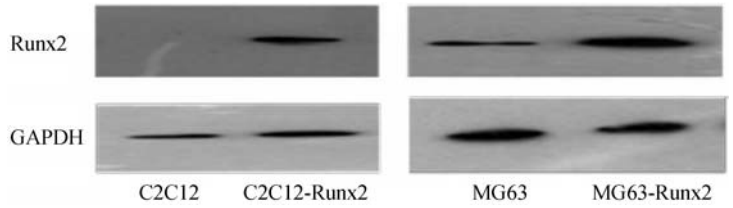

图 1 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 稳定株的蛋白免疫印迹鉴定结果

Fig. 1 Identification results of C2C12-Runx2 and MG63-Runx2 stable strains by westernblot

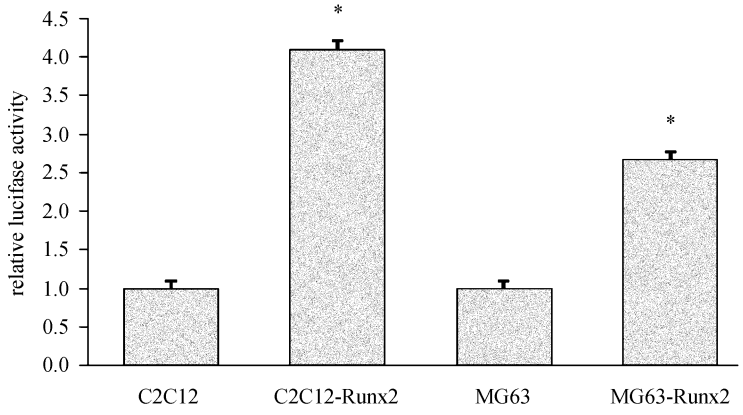

图 2 C2C12, C2C12-Runx2, MG63, MG63-Runx2 细胞对质粒 p6OSE-Luc 应答的荧光素酶活性 ($n = 3$, * 表示 $P < 0.05$)

Fig. 2 Luciferase activity of C2C12, C2C12-Runx2, MG63, MG63-Runx2 response to p6OSE-Luc plasmid ($n = 3$, * indicates $P < 0.05$)

3.3 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 细胞的基因表达鉴定

C2C12-Runx2, MG63-Runx2, MG63, C2C12 细胞培养 72 h 后, 利用 QPCR 检测 ALP, CoI1a1 的表达. 因为 C2C12 细胞基本不表达 Runx2, 因此扩增的 C_t 值明显高于 MG63 细胞. ΔC_t 表示目的基因 C_t 值与内参的 C_t 值之差, 可以相对显示目的基因的表达水平. C2C12 细胞的 ALP ΔC_t 平均值为 3.35, 而 MG63 细胞的 ALP ΔC_t 平均值仅为 1. C2C12-Runx2 细胞 ALP 基因的表达是 C2C12 细胞的 4 倍, MG63-Runx2 细胞 ALP 基因的表达是 MG63 细胞的 3 倍, 如图 3(a) 所示. C2C12-Runx2 细胞 CoI1a1 基因的表达是 C2C12 细胞的 5 倍, MG63-Runx2 细胞 CoI1a1 基因的表达是 MG63 细胞的 1.5 倍, 如图 3(b) 所示. 结果证实, 在 C2C12 细胞中需要增加扩增的循环数才能得到极低的 ALP 和 CoI1a1 的表达, 而 C2C12-Runx2 细胞能够表达 Runx2 基因并成功促进下游的 ALP 和 CoI1a1 基因表达; 而在 MG63-Runx2 中, 过表达的 Runx2 能够促进下游基因表达, 说明过表达的 Runx2 基因在这两种细胞中都能发挥作用.

3.4 模拟失重对 Runx2 表达的影响

C2C12-Runx2, MG63-Runx2, MG63 细胞回转培养 48 h, 实时定量 PCR 检测结果表明, 与对照组细胞相比, 回转后 MG63 细胞的 Runx2 表达明显减少. 如图 4(a) 所示, 回转后 MG63 细胞 Runx2 表达比对照低 40%. 如图 4(b) 所示, 回转后 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 细胞的 Runx2 表达有减少趋势, 但

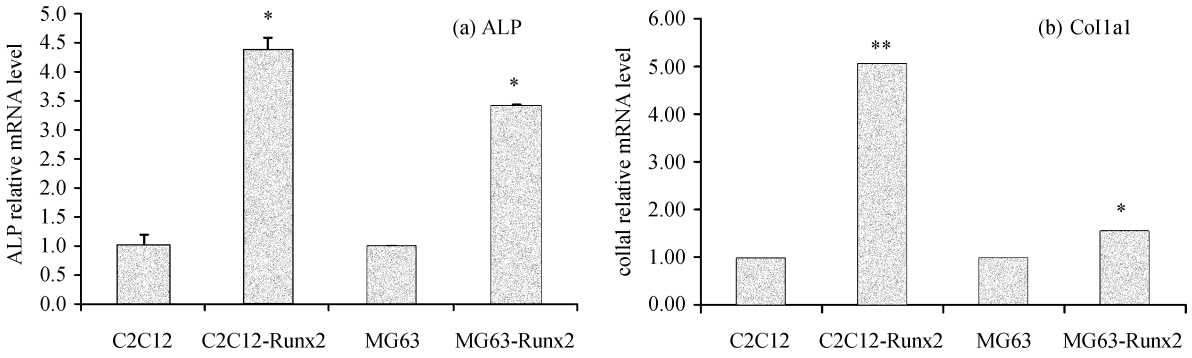

图 3 C2C12, C2C12-Runx2, MG63, MG63-Runx2 细胞中 ALP, CoI1a1 的 mRNA 表达
($n = 3$, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$)

Fig. 3 mRNA expression of ALP, CoI1a1 in C2C12, C2C12-Runx2, MG63, MG63-Runx2 cells
($n = 3$, * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$)

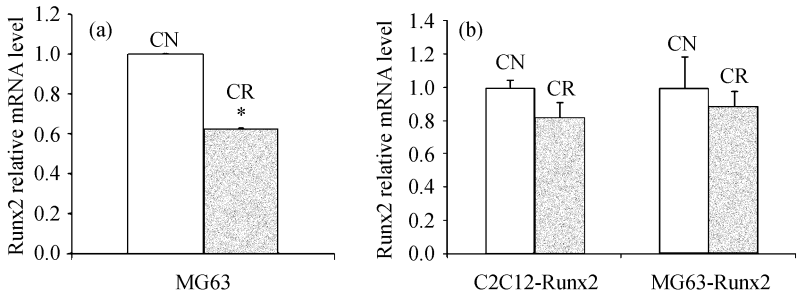

图 4 C2C12-Runx2, MG63, MG63-Runx2 细胞 Runx2 的 mRNA 表达. (a) MG63 细胞 Runx2 的 mRNA 表达. (b) C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 细胞的 Runx2 的 mRNA 表达 ($n = 3$, * 表示 $P < 0.05$)

Fig. 4 mRNA expression of Runx2 in C2C12-Runx2, MG63, MG63-Runx2 cells. (a) mRNA expression of Runx2 in MG63. (b) mRNA expression of Runx2 inC2C12-Runx2, MG63-Runx2 ($n = 3$, * indicates $P < 0.05$)

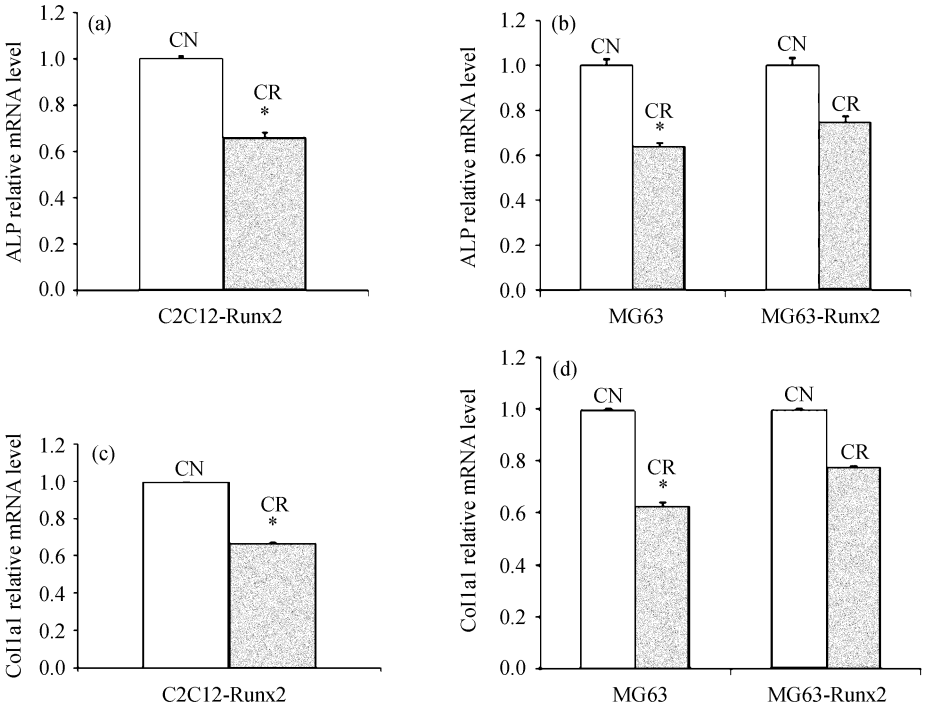

图 5 C2C12-Runx2, MG63, MG63-Runx2 细胞 ALP 和 CoI1a1 的 mRNA 表达. (a) (c) C2C12-Runx2 细胞 ALP 和 CoI1a1 的 mRNA 表达, (b) (d) MG63 和 MG63-Runx2 细胞的 ALP 及 CoI1a1 的 mRNA 表达. ($n = 3$, * 表示 $P < 0.05$)

Fig. 5 mRNA expression of ALP, Col1a1 in C2C12-Runx2, MG63, MG63-Runx2 cells under simulated microgravity condition. (a) (c) mRNA expression of ALP, CoI1a1 in C2C12-Runx2, (b) (d) mRNA expression of ALP, CoI1a1 in MG63, MG63-Runx2 ($n = 3$, * indicates $P < 0.05$)

变化不很明显. 以上结果表明, 回转能明显抑制 Runx2 表达, 而 Runx2 的过量表达能部分抵消回转效应.

3.5 Runx2 对抗模拟失重效应

C2C12-Runx2, MG63-Runx2, MG63 细胞回转培养 48 h, 实时定量 PCR 检测结果表明, 与对照组相比, 回转后 MG63, C2C12-Runx2, MG63-Runx2 细胞的 ALP 和 CoI1a1 表达明显减少. 回转后 C2C12-Runx2 细胞 ALP 和 CoI1a1 表达分别比对照组低 33%, 30%, 如图 5(a)(c) 所示. 回转后 MG63 细胞的 ALP 表达比对照组低 47%, 而 MG63-Runx2 细胞的 ALP 表达比对照组低 25%; 回转后 MG63 细胞的 CoI1a1 表达比对照组低 38%, 而 MG63-Runx2 细胞 CoI1a1 表达比对照组低 23%, 如图 5(b) (d) 所示. 结果显示, C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 回转后与对照组相比 ALP 和 CoI1a1 表达下降, 而且 MG63-Runx2 细胞下降程度低于 MG63 细胞. 以上结果表明, 回转能明显抑制 Runx2 下游基因的表达, 而 Runx2 的过量表达能部分抵消回转对 Runx2 下游基因表达的影响.

4 讨论

骨骼失负荷引起的骨矿物质进行性、持续性丢失是中长期空间飞行中航天员面临的主要航天医学问题之一, 其发生的主要原因是成骨细胞分化功能降低, 进而造成骨形成减少. 模拟失重实验证明, 失重效应可能通过降低 Runx2 的活性来抑制成骨细胞分化 [12]. 本实验成功转染并筛选出两株过表达 Runx2 蛋白的细胞株, 由于 C2C12 细胞基本不表达 Runx2 基因, 在 C2C12 细胞中没能检测到 Runx2 蛋白的表达, 但是 C2C12-Runx2 细胞有明显的 Runx2 蛋白的表达; 在 MG63 细胞中, 转染的细胞 Runx2 的表达明显高于未转染的细胞. 这证明 Runx2 质粒能够

在 C2C12 和 MG63 细胞中正确表达. 筛选出来的细胞株经多次反复冻存、复苏和传代, Runx2 基因表达稳定.

Runx2 通过与成骨相关基因启动子区域内的 OSE 位点结合, 调节其下游基因表达. 实验中, 培养的 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 细胞转染 p6OSE2-Luc 质粒 24 h, 显著提高了由 6OSE2 启动子启动的 Luc 报告基因活性, 细胞荧光素酶活性明显增强. 表明 Runx2 能在转染的细胞中表达, 并能与 OSE 位点结合提高萤火虫荧光素酶的活性.

碱性磷酸酶和 I 型胶原都是成骨细胞分化表型的主要特征蛋白, 是 Runx2 下游的靶分子. 它们的表达水平可反映成骨细胞早期分化状态. I 型胶原是各种骨细胞粘附的主要细胞外基质, 它在调节成骨细胞增殖、分化等方面起到重要作用, 其表达贯穿整个成骨细胞增殖、分化过程 [13]. 实验中, C2C12-Runx2 细胞 CoI1a1 的表达是 C2C12 细胞的 5 倍, MG63-Runx2 细胞 CoI1a1 的表达是 MG63 细胞的 1.5 倍. ALP 表达量及活性可作为细胞成骨向分化程度的标志 [14]. MG63 细胞本身表达大量的 ALP, 而 C2C12 细胞本身表达极微量的 ALP, 但 Runx2 基因可诱导 ALP 的大量表达 [15]. 实验中, C2C12-Runx2 细胞 ALP 基因的表达是 C2C12 细胞的 4 倍, MG63-Runx2 细胞 ALP 基因的表达是 MG63 细胞的 3 倍. 以上结果表明转染的细胞不仅能过表达 Runx2 蛋白, 也能诱导其下游的 I 型胶原和 ALP 表达, 说明这里筛选的稳定株不仅能过表达 Runx2 蛋白, 也能实现 Runx2 蛋白的功能.

Runx2 转录因子是成骨细胞分化和骨形成过程中的控制基因, 在老鼠中敲除 Runx2 基因可导致成骨细胞的分化完全受抑制 [16], 提示 Runx2 在成骨细胞的分化和成熟过程中不但起着关键作用, 而且是必需基因. Runx2 和成骨分化特异基因 CoI1a1 和 ALP 的表达量在分子特征上反映细胞成骨向分化的情况 [17]. 本实验结果显示, 模拟失重条件下细胞的成骨分化特异性因子 Runx2 表达减少, 表明模拟失重效应能抑制小鼠前成骨细胞和成肌细胞的成骨向分化潜能. 而 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 细胞回转后 Runx2 表达下降不明显, 可能是外源性 Runx2 基因过表达抵消了失重效应引起的 Runx2 基因下降. 另外, 本实验发现, 回转后, 三组细胞的 ALP 和 CoI1a1 的表达都降低. 回转组与对照组相比, ALP 和 CoI1a1 的表达在 C2C12-Runx2 细胞中分别下降 33% 和 29%; 在 MG63 细胞中分别下降了 47% 和 38%; 而 MG63-Runx2 细胞下降了 25% 和 23%. 说明转染的 Runx2 基因能对抗由失重效应引起的 ALP 和 CoI1a1 的表达下降.

同时发现虽然回转后 MG63-Runx2 细胞与未转染的该细胞相比 ALP 和 CoI1a1 基因虽然表达升高, 但 MG63-Runx2 细胞的 ALP 和 CoI1a1 的表达水平仍低于 MG63 细胞的未回转组, 说明 Runx2 过表达只能部分对抗空间骨丢失效应, 失重还能通过其他途径影响成骨细胞特异性基因的表达. C2C12-Runx2 细胞回转后 Runx2 表达下降不明显, 但 ALP 和 CoI1a1 的表达有明显下降, 可能是失重不仅影响 Runx2 的表达, 也能影响它本身的活性或活性后修饰. 此外结果还显示, C2C12-Runx2 回转组与对照组相比 ALP 和 CoI1a1 表达下降程度高于 MG63-Runx2 细胞, 这是由于回转对内源性 Runx2 的反应与外源性不同引起的. 这些有待进一步研究.

本实验建立了 C2C12-Runx2 和 MG63-Runx2 细胞模型, 为进一步研究环境因素影响 Runx2 在成骨细胞分化进程中的作用提供了可靠的细胞模型. 利用这一细胞模型进行了模拟失重效应实验, 发现 Runx2 能部分对抗失重引起的骨特异性基因表达下降, 这进一步完善了中长期太空飞行中失重对航天员骨骼影响的理论.

参考文献

[1] Dai Z, Wang R, Ling S, *et al*. Simulated microgravity inhibits the proliferation and osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Cell prolif*., 2007, **40**(5):671-684

[2] Enomoto H, Furichi T, Zanma A, *et al*. Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro [J]. *J. Cell Sci*., 2004, **117**(Pt3):417-425

[3] Kojimah, Uemura T. Strong and rapid induction of osteoblast differentiation by CBFα1/Til-1 overexpression for bone regeneration [J]. *J. Biol. Chem*., 2005, **280**(4):2944-2953

[4] Gersbach C A, Byers B A, Pavlathg K, *et al*. RUNX2/CBFα1 stimulates transdifferentiation of primary skeletalmyoblasts into a mineralizing osteoblasticphenotype [J]. *Exp. Cell. Res*., 2004, **300**(2):406-417

[5] Komori T. Regulation of skeletal development by the RUNX family of transcription factors [J]. *J. Cell Biochem*., 2005, **95**(3):445-453

[6] Hofbauer L C, Kuhne C A, Vierck V. The OPG /RANKL/RANK system inmetabolic bone diseases [J]. *J. Muscul. Neur. Inter.*, 2004, **4**(3):268-275

[7] Inman C K, Shore P. The osteoblast transcription factor RUNX2 is expressed in mammary epithelial cells and mediates osteopontin expression [J]. *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**(49):684-689

[8] Makihira S, Kawahara Y, Yuge L, *et al.* Impact of the microgravity environment in a 3-dimensional clinostat on osteoblast-and osteoclast-like cells [J]. *Cell Biol. Int.*, 2008, **32**(9):1176-1181

[9] Pan Z, Yang J, Guo C, *et al.* Effects of hindlimb unloading on ex vivo growth and osteogenic/adipogenic potentials of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in rats [J]. *Stem. Cells Dev.*, 2008, **17**(4):795-804

[10] Xiangyang Jiao, Paul C. Billings, Michael P, *et al.* Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs) Modulate BMP2 Osteogenic Bioactivity in C2C12 Cells [J]. *J. Biol. Chem.*, 2007, **208**(2):1080-1086

[11] Byung Chul Jeong, Lee Yong Soo, Park Yun Yong, *et al.* The orphan nuclear receptor estrogen receptor-related receptor γ negatively regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and bone formation [J]. *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**(21):14 211-14 218

[12] Zheng Q, Huang G, Yang J, *et al.* Could the effect of modeled microgravity on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells be reversed by regulation of signaling pathways [J]. *J. Biol. Chem.*, 2007, **388**(7):755-763

[13] Kong W X, Zhu H, Li H, *et al.* Involvement of MAPK pathway in the osteoblastic differentiation of mouse mesenchymal stem cells [J]. *J. Exp. Hematol.*, 2010, **18**(4):981-985

[14] Cheng H, Jiang W, Phillips F M, *et al.* Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs) [J]. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2003, **85-A**(8):1544-1552

[15] Tran B N, Nguyen N D, Center J R, *et al.* Enhancement of absolute fracture risk prognosis with genetic marker: the collagen I alpha 1 gene [J]. *Calcif. Tissue Int.*, 2009, **85**(5):379-88

[16] Zhang X, Ting K, Bessette C M, *et al.* Nell-1, a key functional mediator of Runx2, partially rescues calvarial defects in Runx2(+/−) mice [J]. *J. Bone Miner Res.*, 2011, **26**(4):777-791

[17] Laflamme C, Curt S, Rouabhia M. Epidermal growth factor and bone morphogenetic proteins upregulate osteoblast proliferation and osteoblastic markers and inhibit bone noduleformation [J]. *Arch. Oral. Biol.*, 2010, **55**(9):689-701