

锌指结构 Osterix 对骨骼发育影响的研究进展

姜宇¹ 牛鹏飞² 徐又佳^{2*}

1. 无锡市第二人民医院骨科, 无锡 214002

2. 苏州大学附属第二医院骨科, 苏州 215000

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 03-0381-06

摘要: 间充质细胞在骨化形成骨的过程中, 其原基会分泌一些 Hedgehog, Wnt 和 FGF 家族和 TGF- β 的转录因子用于调控和起始早期骨骼相关基因的表达, 研究这些早期调控因子对于研究期成骨代谢十分重要, 锌指结构 Osterix 基因作为重要的成骨细胞特异性转录因子越来越被人们重视, 研究其基因的作用及其相关的机制, 利于我们进一步了解成骨代谢和成骨相关性疾病; 本文围绕 Osterix 的发现和功能, Osterix 对小鼠中骨骼发育和成骨细胞的影响, Osterix 对人类中骨骼的发育影响的研究以及 Osterix 的突变与人类骨骼疾病的关系方面进行阐述。目前相关 Osterix 的综述多集中关注于其对成骨细胞功能的调控。本文主要集中于对于 Osterix 在动物和人体骨骼发育的影响的相关报道, 进而进一步了解 Osterix 与人类骨骼疾病的相关的关系。本综述旨在拓展了 Osterix 作为成骨细胞重要调控因子对于在体的动物和人类骨骼发育的认识。

关键词: Osterix; 骨骼发育; 成骨代谢; 基因功能

Research of Zinc finger structure Osterix on bone development

JIANG Yu¹, NIU Pengfei², XU Youjia²

1. Department of Orthopedics, the Second People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214002, China

2. Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, China

Corresponding author: XU Youjia, Email: xuyoujia@medmail.com

Abstract: Mesenchymal cells in the process of bone ossification formation, its primordium secrete some Hedgehog, Wnt and FGF family and TGF- β transcription factor is used to control and starting early skeletal related gene expression, studying the regulatory factors for the study period of osteogenesis metabolism is very important. The zinc finger structure Osterix gene as a marker of osteoblast been appreciated, studying its genes and their related mechanisms, for us to understand the distribution of metabolic disorders and diseases. The osteogenesis correlation need further to be understood; around the Osterix found and function, Osterix effect on mice skeletal development and for osteoblast differentiation, The Osterix study of human on the effect of the development of bone and Osterix mutation and elaborates the relationship of human bone disease. At present, a lot of related Osterix review focus on the regulation of osteoblast function. This article is mainly about Osterix reports in animal and human body skeleton development, and then further understand Osterix relationship associated with human bone disease. This review aims to expand the Osterix as osteoblasts important regulatory factors in the body of animal and human bone development.

Key words: Osterix; Bone development; Osteogenesis metabolism; Gene function

骨骼的发育分为内骨骼发育和外骨骼发育, 外骨骼发育发生在节肢动物、软体动物和一些昆虫中, 它们的骨骼是一层保护内部器官的壳。脊椎动物的发育属于内骨骼发育。间充质细胞接受到分子信号传递的模式信息迁移至特定的骨化位置, 随后间充

质细胞在骨化位置紧密浓缩形成骨软骨的原基, 而这一现象被称为骨骼的形态发生, 它决定了骨骼的类型及其发育的时空顺序。原基会分泌一些 Hedgehog, Wnt 和 FGF 家族和 TGF- β 亚家族的多肽及 Pax, Hox, homeodomain-containing, bHLH, Forkhead 家族的转录因子, 用于调控和起始早期骨骼相关基因的表达^[1-3]。所以最初的脊椎动物外骨骼的发育受多种分子信号的调控^[4, 5]。这些经浓缩的骨软骨的原基一部分分离为表达高水平的 Sox9a

基金项目: 国家自然科学基金(81273090)江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(KYLX_1264)

* 通讯作者: 徐又佳, Email: xuyoujia@medmail.com

的软骨细胞,另一部分分离为表达高水平 Runx2 和低水平 Colla1 及 Akp 的前体成骨细胞^[6]。这些也表明无论是软骨细胞还是成骨细胞都起源共同的前体^[7]。所有的脊椎动物都具有两种硬骨成骨方式:一种是膜内骨化,即间充质细胞直接分化为成骨细胞并生成骨骼,这种方式常见于颅骨的形成;另外一种被称为软骨内骨化,间充质细胞首先分化为软骨细胞,软骨细胞分泌并形成软骨模板,随后软骨模板被含有成骨细胞和破骨细胞的骨骼取代^[8]。

软骨细胞分化为硬骨分为两个阶段,首先沉积在细胞外基质上的软骨细胞开始增殖,但是在绝大多数情况下,这些增殖的软骨细胞因变得过度肥大而最终凋亡,然后存在于软骨细胞周围的一些间充质细胞和血管及破骨细胞迁移到这些过度肥大的软骨细胞所在的位置,接着在硬骨特异性的基质上分化为成骨细胞,从而代替已经退化的软骨细胞基质。对于软骨细胞分化的这两个阶段,Sox 家族的三个转录因子 Sox9, L-Sox5 和 Sox6 是必不可少的,它们调控了软骨细胞系的分化方向^[9, 10]。非常有趣的是属于膜内骨化的成骨细胞的分化跟属于软骨内骨化的成骨细胞的分化是同步的,这也暗示了两种骨化方式具有时序控制的同步性。

为了研究骨骼发育的各个过程,一些涉及分化过程中的细胞系被创立,例如分化中的成肌细胞系^[11],脂肪细胞系^[12]及软骨细胞系,通过这些细胞系来研究骨骼发育发现不同的转录因子调控着不同的分化过程。如转录因子 Runx2/Cbfa1 是一种属于 Runt 家族的多肽,它在多功能间充质细胞分化为前体成骨细胞的过程中扮演了必不可少的角色。在 Runx2/Cbfa1 突变的小鼠中,分别属于软骨内骨化和膜内骨化的成骨细胞的分化停止了^[13, 14]。此外在属于软骨内骨化中过度肥大的软骨细胞的分化过程中,Runx2/Cbfa1 也起着正向调控的角色^[15-17]。另外一种多肽 Indian hedgehog (Ihh) 是分泌蛋白 Hedgehog 家族中的一员,对于软骨内成骨是十分必要的,但是对于膜内成骨并没有多大的作用^[18]。当然在过程中,除了 Runx2/Cbfa1, 锌指结构 Osterix 基因作为重要的成骨细胞特异性转录因子越来越被人们重视。

1 转录因子 Osterix 的发现及基因的功能

在 2002 年, Nakashima 等人通过差别杂交的方法在 C2C12 细胞中首次克隆了 Osterix 的 cDNA^[19], BMP2 通过诱导一些成骨细胞相关基因的表达来引

起 C2C12 细胞分化为成骨细胞。作者分析了 Osterix 的 cDNA 的分子特性发现: Osterix 的 N 端包含一个富含脯氨酸的激活域,氨基酸序列为 1-289, C 端包含三个 C2H2 型锌指结构型的 DNA 绑定区域。在 Osterix 的细胞转染实验中发现: Osterix 的 1-172 的氨基酸序列对于其的转录激活作用是不可或缺的。在小鼠的胚胎发育过程中, Osterix 于 13.5 天的胚胎中在头骨及长骨的软骨膜周围开始表达,并于 15.5 天的胚胎中在所有的骨原件中高表达, Osterix 也在过度肥大的软骨细胞及其前体中表达,但是表达水平较低^[19]。

在 Osterix 突变的小鼠胚胎中,尽管 Runx2 的表达是正常的,但成骨细胞的标记基因并不表达或者是低表达,如 Colla1 它在野生型小鼠的间充质细胞是高表达的,但是在 Osterix 突变体中表达显著减少,而包括 Osteonectin, Osteopontin 和 Bonesialo protein 等其它的成骨细胞标记基因的表达几乎检测不到,本应在 15.5 天胚胎的成骨细胞中正常表达的 Osteocalcin 基因,在 Osterix 突变体中也检测不到。在 Osterix 突变的胚胎和长骨中, Runx2 的在软骨成骨的区域及膜内成骨的区域正常表达,但是在 Runx2 突变的小鼠胚胎中, Osterix 明显不表达,这些都表明 Runx2 是调节 Osterix 表达的上游基因。同时也显示出 Osterix 通过激活成骨细胞中基因的表达来引起 Runx2 调控的成骨细胞前体分化为成骨细胞^[19]。

2 Osterix 对小鼠中骨骼的发育及成骨细胞影响的研究

在 Osterix 突变的小鼠胚胎中,虽然没有形成硬骨,但是软骨细胞的分化及软骨的形成都没有受到影响,在 Runx2 正常表达而 Osterix 没有表达的成骨细胞中,软骨特异性表达的基因 Sox9 和 Col2a1 都是正常表达的,且这些细胞获得了分化为软骨细胞的命运^[19]。这些结果让我们推测:在前体成骨细胞中 Osterix 可能抑制了软骨细胞的分化。这些推测的依据是: Runx2 在早期形成软骨前体的间充质细胞中开始表达,这个时候 Sox9 高表达,随着 Osterix 开始表达, Runx2 表达的细胞离开成骨细胞的前体,这个时候 Sox9 的表达下调,这些结果都暗示着 Sox9 和 Osterix 的表达是相互排斥的。当表达 Runx2/Osterix 的细胞完全分化为成熟的具有功能性的成骨细胞后, Sox9 就不再表达。先于 Osterix 表达的 Runx2 表达的前体存在于软骨形成细胞系中,最后

也并没有分化为成骨细胞的前体。Kaback 对 Osterix 时空性表达的研究显示: Osterix 表达量的增加跟成骨细胞分化的起始是同时发生的^[20],而在形成软骨及软骨内成骨后, Osterix 的 mRNA 水平仍然很高。所以这些研究暗示 Osterix 有两种功能:一是抑制软骨细胞形成。二是促进成骨细胞分化(图 1)^[6]。

同时 Osterix 对成年小鼠骨形成及相关成骨细胞基因的表达也是必不可少的。Zhou^[20]的研究证明:在成年小鼠中通过 LoxP/inducible Cre 使 Osterix 失活,导致了多种骨骼缺陷的表型,如新的骨骼无法形成、在生长板下非正常的软骨积累以及骨细胞成熟和功能的缺陷等,同时除了成骨细胞基因发生下调以外,一些骨细胞特异性的 marker 基因如 Sost, Dkk1, Dmp1, Phe 等都发生了下调。这些结果表明: Osterix 在骨基质代替软骨基质的重吸收中扮演了重要角色^[21]。Osterix 的这种新作用在 Nishimura 的研究中进一步被说明, Nishimura 发现:在软骨内成骨的过程中, Osterix 在生长板的过度肥大软骨细胞中直接激活了 MMP-13 的表达,从而影响软骨基质的钙化过程,同时还发现在小鼠中无论 Osterix 被条件性的敲除还是全部敲除,都不会使 MMP-13 不表达,也不会阻止过度肥大的软骨细胞骨化^[22]。在胚胎发育阶段运用 2.3kbColl1a1-Cre 特异性的使成骨细胞中的 Osterix 失活,但是在出生的小鼠中并没有观察到明显的骨骼缺陷,当这些突变的小鼠存活到 8 周或者更大时发现:这些突变小鼠不仅骨小梁及腰椎的骨量减少,同时骨小梁的厚度及数量也在减少,这些表型非常类似于人类中骨量减少的骨骼缺陷表型^[23]。当我们用同样的方法在成年小鼠中使 Osterix 失活时发现:成年小鼠的骨骼展现出的表型为成骨细胞基因的表达减少、分化和功能性的成骨细胞减少及少量的骨质疏松^[24]。对不同时间段 Osterix 失活对骨骼发育影响的研究表明:在成年小鼠中, Osterix 作为一个合成代谢调节器支持了成年小鼠的骨稳态并扮演了不可或缺的作用。

Osterix 失活的小鼠骨骼的发育被抑制了,但是在用 2.3kb Coll1a1 启动子构建的 Osterix 过表达的转基因小鼠中发现骨量减少、成骨细胞基因尤其是 Osteonectin 表达减少。并且在这种转基因小鼠中,成骨细胞不再分化从而造成了大量未成熟成骨细胞的积累。这些结果表明:在成年小鼠中,适当剂量的 Osterix 对于成骨细胞的分化及骨形成是必不可少的(图 1)^[25]。

牙齿形成与骨骼发育的过程十分相似,首先牙齿的间充质细胞分化为成牙质细胞,在牙质形成过程中,成牙质细胞会产生并分泌胶原的或是非胶原的基质蛋白。Dsp(Dentin sialo phospho)蛋白是非胶原的牙质基质蛋白中主要的成分之一,它对于牙质形成十分必要。小鼠的遗传学和生物化学研究表明: Runx2 和 Osterix 在牙齿的形成过程中有着重要的作用,并且会单独激活一些跟成牙质细胞分化相关的特别基因^[26-28]。Chen^[29]的研究表明: Dsp 的表达跟 Osterix 呈正相关关系,而不是 Runx2。在 16 天的小鼠胚胎中, Dsp 表达很少,而在牙槽骨的成骨细胞、成牙质细胞、amyloblasts 和牙髓细胞中 Runx2 和 Osterix 表达很多。在 18 天的胚胎成牙质细胞中 Runx2 的表达显著减少,而在牙髓细胞和成牙质细胞中 Osterix 的表达依然很高,并且 Dsp 也开始高表达,这说明 Osterix 激活晚期一些 marker 基因对于成牙质细胞前体到成牙质细胞的成熟及分化是必须的, Osterix 在牙齿发育中的位置相当于在骨发育中的位置,而 Osterix 和 Dsp 在牙齿发育的后期也可以被检测到,而当我们强制性地小鼠的成牙质细胞类似细胞中表达 Osterix 也可以刺激 Dsp 的表达,这说明 Dsp 可能是 Osterix 直接激活的目标基因^[26]。越来越多关于 Osterix 在骨骼发育和牙齿发育中的功能的研究在展开, Cao^[29]第一个使用小鼠模型阐明了 Osterix 在细胞牙骨质形成中的作用,细胞牙骨质是一种可以支持牙齿发育的矿化组织。在用 3.6kbColl1a1 启动子来驱动 Osterix 过表达的转基因小鼠中发现:过表达 Osterix 可以增加牙骨质的形成,而在小鼠胚胎中用 Coll1a1-Cre 敲除 Osterix 或者在成年小鼠中用 CMV-Cre ERT2 敲除 Osterix 都会引起牙骨质形成的减少及 Dmp1 表达的减少。这些结果进一步说明 Osterix 在牙齿形成过程中起着重要的作用^[29]。

3 Osterix 对人类中骨骼的发育影响的研究

Osterix 作为一个典型的成骨细胞 marker 基因,对骨骼发育必不可少,同时它还是一个合成代谢分子,因此利用 Osterix 来修复骨折及骨创伤无疑是一个不错的选择。在骨折愈合中骨修复是一个非常复杂的过程,它涉及到多种分子的时空表达及这些分子在新骨形成过程中的相互作用,而现在通过这些分子对骨再生进行基因治疗已经开始被关注^[30]。关于骨创伤到骨愈合调控的研究已经证明: Osterix 在骨折处再生的骨细胞中是高表达的。将表达

Osterix 的 BMSc 移植到手术切开的大鼠头骨处发现:比较移植了单纯的 BMSc 的手术切开的大鼠头骨,表达 Osterix 的 BMSc 可以加快大鼠头骨的愈合,同时也引起了一些骨骼发育特异性基因的表达^[31]。通过加速移植的骨整合,表达 Osterix 的 BMSc 移植到裸鼠中也可以引起骨骼形成^[32, 33]。Kaback^[20]等的研究表明:在骨折的小鼠中,骨折处的愈伤组织和

软骨在骨折后的第 7 天开始形成,持续到第 10 天并伴随着 Sox9 的 mRNA 水平的增加,但是 Osterix 只在愈伤组织的非层板骨的成骨细胞中表达,而在骨密质、过度肥大的软骨细胞及血管中并没有表达。骨折后 14 天, Osterix 主要在围绕在愈合处的成骨细胞中表达, Sox9 的表达开始减少,这个时候愈伤组织处的软骨重塑为硬骨^[20]。

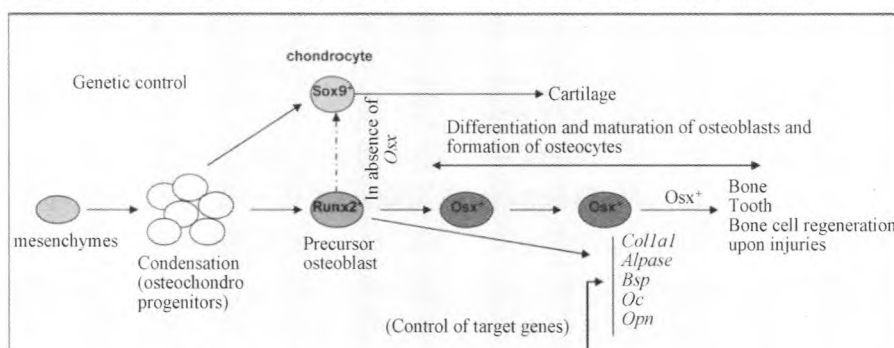


图 1 Osx/Osterix 在成骨细胞分化中是不可或缺的^[6]间充质细胞经过沉积后一部分分化为成骨细胞的前体,在 RUNX2 的作用下分化为成骨细胞,而 OSTERIX 在成骨细胞的成熟及再分化过程中起到了重要的作用,另一部分沉积的间充质细胞分化为软骨细胞,在 SOX9 的作用下分化为软骨

Fig. 1 Osx/Osterix is indispensable in the osteoblast differentiation of ectomesenchymal cells after deposition^[6] part of the differentiation of osteoblast precursors, under the action of RUNX2 differentiate into osteoblasts, and Osterix again in osteoblast maturation and differentiation and played an important role in the process of ectomesenchymal cells of another part of the sedimentary differentiation into cartilage cells, under the action of SOX9 differentiate into cartilage

为了研究在正常的骨形成及骨愈合过程中初始骨化位点上成骨细胞前体迁移的机制,将含有 Osterix-CreERt 和 Colla1-ERt 的两种转基因小鼠系与含有 Rosa26R-LacZ reporter 的小鼠杂交,得到了可以追踪成骨细胞迁移的转基因小鼠^[34, 35]。通过注射四羟基三苯氧胺到这些转基因小鼠中,激活了 Cre 重组酶的表达,随后引起了 LacZ 的表达^[35]。在这个研究中,作者报道了两种存在于软骨膜上的成骨细胞系:一种表达 Osterix 的成骨细胞前体,另一种表达 Colla1 的分化了的成骨细胞。实验结果表明:表达的 Osterix/LacZ 的成骨细胞前体很少存在于皮质中,在骨小梁里存在很多,而表达 Colla1/LacZ 的细胞在皮质中存在很多且用于皮质骨的形成,在骨小梁中却很少。同时研究还发现:成骨细胞前体是跟血管一起进入初级骨化中心的,而这是因为 Osterix 表达的前体成骨细胞跟血管的内皮细胞是密切相关的。为了更好的研究 Osterix 在骨折后愈合中的功能及机制, Osterix-Cre; GFP 转基因小鼠被构建,发现表达 Osterix-GFP 的细胞主要存在于皮质骨的薄骨膜层,在骨折后,这些细胞和血管一同定位到了愈合区域的骨愈伤组织处,可以作为一种新

型的治疗骨折的药物^[36]。

4 OSTERIX 的突变与人类骨骼疾病的关系

通过运用 GWAS, SNP 和 linkage mapping 等用来鉴定跟人类疾病相关基因的方法进行基因分析发现,骨质疏松症和成骨不全症这两种骨骼异常的疾病都跟一些诱导基因的突变相关,例如 I 型胶原蛋白相关基因的突变导致了低骨量和低骨密度的表型,这使动物容易遭受多种骨折。Lapunzina^[37]等在一患有成骨不全症的埃及小孩上鉴定了 Osterix 的纯合突变体,该突变体是由于一个单核苷酸发生缺失(1052delA),造成了移码突变从而导致 Osterix 锌指结构的缺失。成骨不全症患者表现为重复骨折、轻微的骨质疏松及延迟出牙等症状(图 2A, B, C)。该病人可能是由于 Osterix 的缺失改变了 Osterix 的下游基因主要是骨发育相关的基因的表达如 type1 collagen。全基因组关联研究进一步揭示了一系列跟骨密度及骨质疏松症相关的基因。在几个 GWAS 推断的位点上发现: Osterix 是唯一一个在骨密度增大的女性儿童期肥胖症中表达并含有遗传变异的位点,在 Osterix 基因区域中用 SNPs 的方法进

一步发现:关于 Osterix 在成年腰椎和骨密度的遗传变异位点有极大的关联性^[38, 39]。这些遗传学、临床医学及流行病学的研究表明了 Osterix 对于成年整体骨骼的健康具有极大的意义,这也说明无论是研究骨骼异常的病人还是研究 Osterix 突变与骨骼疾病的关系,构建 Osterix 突变体的动物模型都是十分必要的。

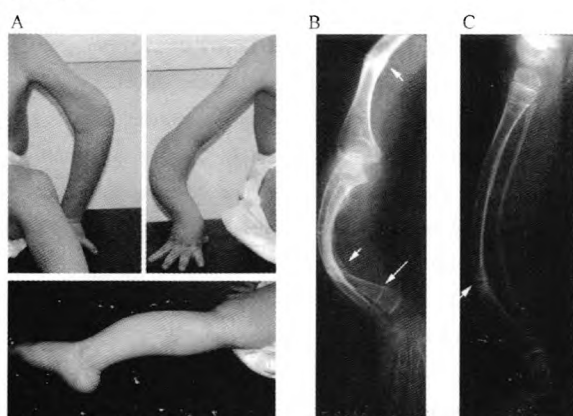


图 2 一名 8 岁的埃及小男孩由于 OSTERIX 突变导致了成骨不全症^[37]

A. 该男孩的临床表现为长骨和胫骨的弯曲(图上方是长骨,图下方是胫骨) B. 右上肢的 X 射线成像右上肢的下端弯曲,其肱骨、桡骨及尺骨表现为畸形及不规则,骨密度降低,小箭头所示为肱骨的 1/3 处有骨折后愈合的痕迹及桡骨和尺骨横向骨折的现象,长箭头所示为桡骨末端骨生长的横截线 C. 右下肢的 X 射线成像胫腓骨向前弯曲,箭头所示处为胫骨的 2/3 处有横向骨折的现象

Fig. 2 An eight-year-old boy in Egypt with OSTERIX mutation causing osteogenesis imperfecta^[37]

A. The clinical manifestations of the boy is long bone and tibial bending (below the figure above is long bone, figure is shin) B. right upper limb X-ray imaging right bottom bend of the upper extremity, the humerus, radius and ulna show the deformity and irregular, bone mineral density is reduced, small arrow as shown in the third part of the humerus with traces of fracture healing and the phenomenon of radius and ulna transverse fracture, indicated by the arrows of long radius bone growth at the end of the transverse line C. right lower limb X-ray imaging of tibiofibula bend forward, indicated by the arrows for two-thirds of the tibia in A transverse fracture phenomenon

现在反向遗传学的方法日新月异,如 ZFN^[40]、TALEN^[41]、CRISPR/cas9^[42]等对于研究和治疗这些骨骼疾病,构建一个 Osterix 完全突变并能够稳定遗传

的突变体十分必要。由于在小鼠中 Osterix 的突变会导致小鼠出生后死亡,因此在小鼠中大多关于 Osterix 的研究运用的方法都是条件性敲除或者运用细胞实验进行研究。然而细胞实验属于体外实验,跟体内的实际情况还是有很大的差别,而条件性敲除也只是研究了其在成年小鼠中的功能,关于其在整个发育过程的研究无法企及,因此运用小鼠来研究 Osterix 存在一定的局限性,所以关于治疗骨骼疾病存在着诸多不便。因此相关突变体的构建,以及围绕 Osterix 的相关的研究深入的进展,可以让我们更加清楚地了解到 Osterix 基因对成骨代谢的作用及影响机制。

【参 考 文 献】

- [1] Karsenty, G. . The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev*, 1999. 13(23): 3037-51.
- [2] DeLise, A. M. , L. Fischer, , R. S. Tuan. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. 8(5): 309-34.
- [3] Olsen, B. R. , A. M. Reginato, W. Wang, Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. 16: p. 191-220.
- [4] Tickle, C. Vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev*, 1995. 5(4): 478-84.
- [5] Johnson, R. L. , C. J. Tabin. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell*, 1997. 90(6): p. 979-90.
- [6] Sinha, K. M. , X. Zhou. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J Cell Biochem*, 2013. 114(5): 975-84.
- [7] Fang, J. , B. K. Hall. Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteal. *AnatEmbryol (Berl)*, 1997. 196(5): 349-62.
- [8] Renn, J. , C. Winkler. Osterix-mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation. *Dev Dyn*, 2009. 238(1): 241-8.
- [9] Bi, W. , Deng JM, Zhang Z, et al. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*, 1999. 22(1): 85-9.
- [10] Smits, P. Li P, Mandel J, et al. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*, 2001. 1(2): 277-90.
- [11] Black, B. L. , E. N. Olson, Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998. 14: 167-96.
- [12] Rosen, E. D. , B. M. Spiegelman, Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. 16: p. 145-71.
- [13] Komori, T. YagiH, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997. 89(5): 755-64.
- [14] Otto, F. , Thornell AP, Crompton T, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 1997. 89(5): 765-71.

- [15] Inada, M., Yasui T, Nomura S, et al. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn*, 1999. 214 (4): 279-90.
- [16] Kim, I. S., Otto F, Zable B, et al., Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev*, 1999. 80(2): 159-70.
- [17] Ueta, C., Iwamoto M, Kanatani N, et al. Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol*, 2001. 153(1): 87-100.
- [18] St-Jacques, B., M. Hammerschmidt, A. P. McMahon, Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*, 1999. 13(16): 2072-86.
- [19] Nakashima, K., Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002. 108 (1): 17-29.
- [20] Kaback, L. A., Soung do Y, Naik A, et al. Osterix/Osterix regulates mesenchymal stem cell mediated endochondral ossification. *J Cell Physiol*, 2008. 214(1): p. 173-82.
- [21] Zhou, X., Zhang Z, Feng JQ, et al. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(29): 12919-24.
- [22] Nishimura, R., Wakabayashi M, Hata K, et al. Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J Biol Chem*, 2012. 287(40): 33179-90.
- [23] Baek, W. Y., Lee MA, Jung JW, et al. Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Miner Res*, 2009. 24(6): 1055-65.
- [24] Baek, W. Y., B. de Crombrughe, J. E. Kim, Postnatally induced inactivation of Osterix in osteoblasts results in the reduction of bone formation and maintenance. *Bone*, 2010. 46 (4): 920-8.
- [25] Yoshida, C. A., Komori H, Maruyama Z, et al., OSTERIX inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32364.
- [26] Chen, S., Gluhak-Heinrich J, Wang YH, et al. Runx2, osx, and dspp in tooth development. *J Dent Res*, 2009. 88(10): 904-9.
- [27] Hirata, A., T. Sugahara, H. Nakamura, Localization of runx2, osterix, and osteopontin in tooth root formation in rat molars. *J Histochem Cytochem*, 2009. 57(4): 397-403.
- [28] Zhao, C., Hosoya A, Kurita H, et al. Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation. *Arch Oral Biol*, 2007. 52(10): 945-53.
- [29] Cao, Z., Zhang H, Zhou X, et al. Genetic evidence for the vital function of Osterix in cementogenesis. *J Bone Miner Res*, 2012. 27(5): 1080-92.
- [30] Franceschi, R. T.. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. *J Dent Res*, 2005, 84(12): 1093-103.
- [31] Tu, Q., Valverde P, Li S, et al. Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone. *Tissue Eng*, 2007, 13(10): 2431-40.
- [32] Tu, Q., P. Valverde, J. Chen. Osterix enhances proliferation and osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 341(4): 1257-65.
- [33] Xu, B., Zhang J, Brewer E, et al. Osterix enhances BMSC-associated osseointegration of implants. *J Dent Res*, 2009. 88 (11): 1003-7.
- [34] Clarkin, C., B. R. Olsen. On bone-forming cells and blood vessels in bone development. *Cell Metab*, 2010. 12(4): 314-6.
- [35] Maes, C., Kobayashi T, Selig MK, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell*, 2010. 19 (2): 329-44.
- [36] Rennekamp, A. J., R. T. Peterson. 15 years of zebrafish chemical screening. *Curr Opin Chem Biol*, 2015. 24C: p. 58-70.
- [37] Lapunzina, P., Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 2010. 87(1): 110-4.
- [38] Timpson, N. J., Tobias JH, Richards JB, et al., Common variants in the region around Osterix are associated with bone mineral density and growth in childhood. *Hum Mol Genet*, 2009. 18(8): 1510-7.
- [39] Zhao, J., Bradfield JP, Lim, et al. BMD-associated variation at the Osterix locus is correlated with childhood obesity in females. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. 19(6): 1311-4.
- [40] Geurts, A. M., Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009. 325(5939): 433.
- [41] Huang, P., Xiao A, Zhou M, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011. 29 (8): 699-700.
- [42] Hwang, W. Y., Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013. 31(3): 227-9.

(收稿日期: 2015-07-19)