

1,25(OH)₂D₃ 对人骨肉瘤 MG63 细胞基质 GLA 蛋白及 Wnt 信号通路的影响

杨雅^{1*} 谢菲飞² 张洁¹ 符刘晨¹ 符晓玲³ 赖晓阳¹

1. 南昌大学第二附属医院内分泌代谢科, 江西 南昌 330006

2. 赣州市立医院内分泌代谢科, 江西 赣州 341000

3. 南昌大学第二附属医院骨科, 江西 南昌 330006

中图分类号: R335 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 01-0035-08

摘要: **目的** 观察 1,25(OH)₂D₃ 对人骨肉瘤 MG63 细胞株 Wnt 信号通路及 MGP 表达的影响, 探讨其在骨质疏松发病中可能的新机制。 **方法** 分别使用 10⁻⁸ mol/L 1,25(OH)₂D₃、200 ng/ml Wnt 信号通路阻断剂 DKK-1、10⁻⁸ mol/L 1,25(OH)₂D₃ + 200 ng/ml DKK-1 干预人骨肉瘤细胞 MG63 细胞株 48 h, 使用实时荧光定量 RT-PCR 及 western-blot 技术测定 Wnt/β-catenin 信号通路中相关因子 β-catenin、Runx2、LRP5 及 MGP 基因及蛋白表达的影响。 **结果** (1) 10⁻⁸ mol/L 1,25(OH)₂D₃ 上调 MG63 细胞中 Wnt/β-catenin 信号通路中相关因子 β-catenin、Runx2、LRP5 及 MGP 的基因表达及蛋白的表达, 其中上调基因分别是对照组的 2.73 倍、3.72 倍、1.53 倍、2.31 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 上调蛋白表达分别是对照组的 1.13 倍、1.17 倍、1.14 倍、1.21 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 (2) DKK1 下调 β-catenin、LRP5、Runx2、MGP 的基因及蛋白表达, 其中下调基因表达分别是对照组的 0.34 倍、0.52 倍、0.42 倍、0.78 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。下调蛋白表达分别是对照组的 0.93 倍、0.92 倍、0.87 倍、0.86 倍, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 1,25(OH)₂D₃ 有可能通过 Wnt/β-catenin 信号通路影响 MGP 的表达。

关键词: 维生素 D; 基质 Gla 蛋白; 骨肉瘤细胞; Wnt/β-catenin 信号通路; 骨质疏松

The effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on matrix Gla protein and Wnt/β-catenin signaling pathways in human osteosarcoma MG63 cells line

YANG Ya^{1*}, XIE Feifei², ZHANG Jie¹, FU Liuchen¹, FU Xiaoling³, LAI Xiaoyang¹

1. Department of Endocrinology and Metabolism, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006

2. Department of Endocrinology and Metabolism, Ganzhou Municipal Hospital, Ganzhou 341000

3. Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: YANG Ya, Email: y_y6757@aliyun.com

Abstract: **Objective** To observe the effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on Wnt/β-catenin signaling pathways and on the expression of MGP in human osteosarcoma cells line (MG63) in vitro, and to investigate the potential role of vitamin D in postmenopausal osteoporosis. **Methods** Human osteosarcoma MG63 cells were treated with the following drug intervention respectively: 10⁻⁸ mol/L 1,25(OH)₂D₃, 200 ng/ml DKK-1, or 10⁻⁸ mol/L 1,25(OH)₂D₃ + 200 ng/ml DKK-1 for 48 hours, then total RNA and protein were extracted and examined by Real-Time quantitative RT-PCR and Western blot to measure the mRNA and protein expression of β-catenin, Runx2, LRP5, MGP in MG63 cells. **Results** 10⁻⁸ mol/L 1,25(OH)₂D₃ significantly up-regulated the expression of classic Wnt/β-catenin signaling pathway associated proteins such as β-catenin, Runx2, LRP5 and MGP. The mRNA expression increased by 2.73-fold, 3.72-fold, 1.53-fold and 2.31-fold, respectively, compared with the control group, and the protein expression increased by 1.13-fold, 1.17-fold, 1.14-fold and 1.21-fold, respectively, compared with the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). However, DKK1 down-regulated the expression of β-catenin, LRP5, Runx2 and MGP. The mRNA expression decreased by 0.34-fold, 0.52-fold, 0.42-fold and 0.78-fold, respectively, and the

基金项目: 国家自然科学基金(81460171); 江西省自然科学基金(20142BAB205016)

* 通讯作者: 杨雅, Email: y_y6757@aliyun.com

protein expression decreased by 0.93-fold, 0.92-fold, 0.87-fold and 0.86-fold, respectively, compared with the control group and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The classic Wnt/ β -catenin signaling pathway may play an important part in postmenopausal osteoporosis. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ may regulated the expression of MGP through the classic Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: Vitamin D; Matrix gla protein; Human osteosarcoma cells; Wnt/ β -catenin signaling pathway; Osteoporosis

骨质疏松是一种骨吸收与形成失衡,骨量减少,骨的微结构破坏,骨强度减退而脆性增加的退化性疾病,发病率随着年龄的增长而增加。维生素 D 与骨质疏松发病有密切联系。维生素 D 通过促进肠道和肾脏对钙和磷酸盐的吸收,这为骨基质的正常矿化提供了充足的矿物质。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)可以促进小肠上磷酸盐的吸收,特别是磷酸盐含量低时,能增加 II 型钠依赖性磷酸转运蛋白的表达^[1]。此外, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 通过作用于成熟的成骨细胞/骨细胞上其同源受体增加 LRP5 活性促进骨形成,两者联合起来直接增加骨小梁量和皮质骨厚度^[2],而流行病学研究资料表明维生素 D 和骨密度密切相关。Li 等^[3]对 25 个研究进行 Meta 分析,总共 4075 名中国女性,发现中国绝经后女性的 VDR BsmI 和 Apal 多态性和骨密度有明显联系。Wang 等^[4]纳入 3243 名绝经后亚洲女性进行 Meta 分析发现 VDR FokI 多态性与骨密度有关联,并可以和其他遗传标志物一起用于识别骨质疏松的高危人群。另外,维生素 D 可协同雌激素的作用^[5],调节成骨细胞样细胞的雌激素受体表达和雌激素介导的信号通路^[6-7],还可通过维生素 D 受体介导上调雌激素的合成^[8]。

基质 Gla 蛋白(marix gla protein, MGP)是 14Kda 的 N-末端 γ -羧基化蛋白家族的成员,最初从牛骨骼中分离的维生素 K 依赖性循环蛋白,富含赖氨酸、谷氨酸残基,有 84 个氨基酸,其中包含了 5 个 γ -羧基化的谷氨酸残基和一个双硫键^[9-10]。Cancela 等^[11]使用 MGP cDNA 探针克隆人类 MGP 基因,长 3.9Kb,有 4 个外显子,3 个长的内含子序列分隔的一种多功能细胞分化调控因子。在骨骼中 MGP 主要参与骨钙化调节。MGP 基因敲除小鼠出现身材矮小,低骨量,骨质疏松、骨折^[12]。日本、韩国等国家关于老年绝经后女性的研究发现 MGP 基因的多态性与女性绝经后骨质疏松症有密切联系^[13]。以上结果均提示 MGP 可能在骨质疏松中有重要的作用。许多与成骨分化相关的蛋白或因子可调节体内 MGP 的表达。

笔者前期研究已证实 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 促进原代

SD 大鼠颅骨成骨细胞及人骨肉瘤细胞 MGP 的表达^[14],但具体机制仍不清楚。许多研究已经证实了 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对 Wnt/ β -catenin 信号传导通路有促进作用。在成骨细胞、人成骨样 TE-85 骨肉瘤细胞上,VDR 可以通过增加 β -catenin 转录而调节 Wnt 信号通路,明显增强骨的合成代谢^[10]但其具体机制仍不清楚。故本研究探讨 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 是否通过 Wnt 信号通路调节 MGP 的表达来影响骨形成,为维生素 D 在骨质疏松的防治机制提出新理论奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人成骨肉瘤 MG63 细胞株购自美国培养保存中心(ATCC 号:CRL1427);活性维生素 D,美国 Sigma 公司;DMEM 培养基、I 型胶原酶(collagenase type I),美国 Solarbio 公司;0.25% 胰酶—ED'FA、胎牛血清,美国 Gibco 公司;25 em2 细胞培养瓶、细胞培养板,美国 Corning 公司;一次性滤器,美国 Millipor 公司;RNAstore 样本保存液、DP408 RNase-free 水,天根生化科技有限公司;DP408-02 RNAiso Plus (D9108S)、PrimeScript® RT reagent kit (Perfect Real Time, DRR037S)、Premix Ex TaqII (Perfect Real Time DRR039A)及 PCR 配套试剂,宝生物工程(大连)有限公司,DKK-1 美国 PeproTech 公司;MGP、 β -catenin、Runx2、LRP5、GAPDH 引物,上海 Invitrogen 公司;Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time),美国 Invitrogen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养:取 10 代人成骨肉瘤细胞 MG63 细胞株复苏,于含 5% 的 CO_2 、37℃ 培养箱中培养,培养液为含有 10% FBS 的无酚红 MEM 培养液。细胞达汇片后按 5×10^5 细胞/瓶接种于 25 cm^2 培养瓶,细胞培养液每 2 天换一次。

1.2.2 干预实验:药物干预:MG63 细胞体积达到 90% 左右时,改用含 0.1% BSA 的无血清 MEM 培养液培养 2d,(1)空白对照组:1% BSA + 无酚红 MEM 培养;(2) 10^{-8}M 的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 组;(3)200 ng/ml

DKK-1 组; $(4) 10^{-8} \text{ M } 1, 25 (\text{OH})_2 \text{D}_3 + 200 \text{ ng/ml}$ DKK-1 组干预 48 h。

1.2.3 荧光定量 PCR:按 Trizol 操作步骤提取总 RNA。逆转录合成 cDNA:按照试剂盒 (PrimeScript RT reagent kit, TaKaRa) 要求操作,取 9ulRNA 样本做逆转录反应,反应体系 20 ul,反应条件:37 ℃ 15 min 85 ℃ 5 s,1 个循环,结束。荧光定量 PCR 反应:管家基因 GAPDH 作为内参基因,引物均由上海 Invitrogen 公司设计合成,引物序列见表 1。优化反应体系,PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 3 s,进入循环,

95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 34 s,40 个循环。每次实验均设置复孔,重复 2 次。Ct 值代表每个样本 2 次重复的平均 Ct 值。比较目的基因与 GAPDH 基因的扩增效率的斜率有无显著性差异,如果没有,以 GAPDH 基因作为内参照,利用 Ct 值,应用比较阈值法,即 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, $(2^{-\Delta\Delta\text{Ct}})$ 所得结果即表示目的基因相对于对照组的倍数,公式为 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{CtMGP} - \text{CtGAPDH})_{\text{实验组}} - (\text{CtMGP} - \text{CtGAPDH})_{\text{对照组}}$ 。如果有显著性差异,按 Rasmussen 计算出相对表达差异。

表 1 各基因的引物序列及产物的长度
Table 1 Sequence of the primer of gene

基因 Gene	引物序列(5'-3') Sequence of primer	产物长度 Production length
MGP	正向 (forward): AGCGCCGAGGGACCAAATGA 反向 (reverse): AGGGGTGCAGCCAGACAAGAGA	160bp
β -catenin	正向 (forward): TTTGCGTGAGCAGGGTGCCA 反向 (reverse): TTGCTGCTGTGTCCACCCA	100bp
LRP5	正向 (forward): AGTTTCCAAGGGAGCCGTG 反向 (reverse): GATGCGGTGCTCTCTGACT	185bp
Runx2	正向 (forward): CACAAGTGCGGTGCAAACTT 反向 (reverse): GACTCTGTGGTCTCGGTGG	104bp
GAHDH	正向 (forward): CAGGGGTGCTTTAACTCTGGT 反向 (reverse): GATTTTGGAGGGATCTCGCT	199bp

1.2.4 Western-blot 杂交:按照蛋白抽提试剂盒操作要求抽提总细胞蛋白,测蛋白浓度,取 60 μg 细胞总蛋白于 SDS-PAGE 胶中电泳,电湿转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶封闭 2h,敷育一抗过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗敷育 2 h,化学发光增强试剂自显影,洗片显带,杂交信号用 Imagemaster VDS 成像分析系统行吸光度检测。

1.3 统计学处理

所有结果均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较用单因素方差分析,采用 SPSS17.0 统计软件处理实验数据。

2 结果

2.1 1,25(OH)₂D₃ 对 MG63 细胞 MGP 蛋白表达的影响

Western-blot 结果显示 (如图 1):使用 1,25 (OH)₂D₃ 10^{-8} mol/l 、DKK1 200 ng/ml 时,MGP 蛋白的表达分别是对照组的 1.21 倍、0.86 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 1,25 (OH)₂D₃ 相比,与 DKK1 联用时 MGP 蛋白的表达下降 0.87 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 1,25(OH)₂D₃ 对 MG63 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路中相关蛋白表达的影响

2.2.1 1,25 (OH)₂D₃ 及 DKK-1 对 MG63 细胞 β -catenin 蛋白表达的影响:1,25 (OH)₂D₃ 作用于 MG63 细胞以后,能明显提高 β -catenin 的表达,是对照组的 1.13 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。DKK-1 200 ng/ml 作用于细胞以后,能明显下调 β -catenin 的表达 0.87 倍。DKK-1 与 1,25 (OH)₂D₃ 联用 β -catenin 蛋白的表达下调 0.93 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2.2 1,25 (OH)₂D₃ 对 MG63 细胞 LRP5 蛋白表达的影响:1,25 (OH)₂D₃ 作用于 MG63 细胞以后,能明显提高 LRP5 的表达,分别是对照组的 1.14 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3。DKK-1 200 ng/ml 作用于细胞以后,能明显下调 LRP5 的表达 0.87 倍。DKK-1 与 1,25 (OH)₂D₃ 联合用于 LRP5 蛋白的表达下调 0.92 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 1,25(OH)₂D₃ 及 DKK-1 对 MG63 细胞 Runx2 蛋白表达的影响

1,25(OH)₂D₃ 作用于 MG63 细胞以后,能明显

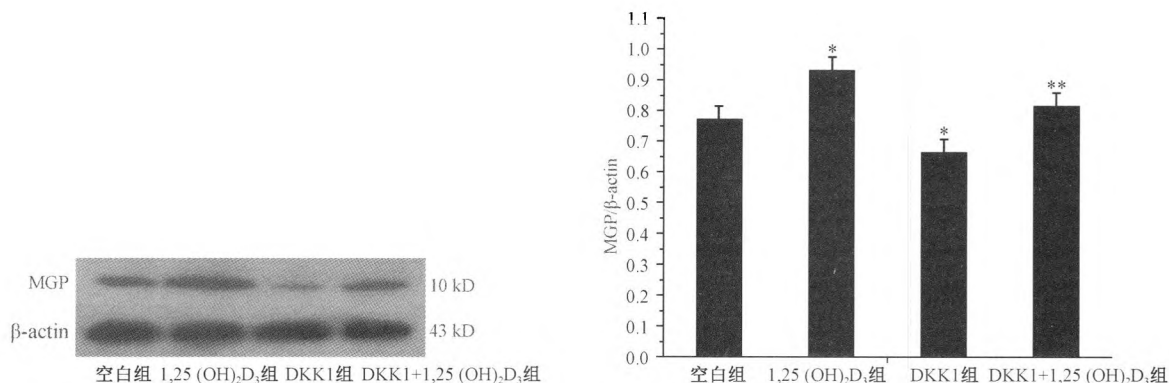


图1 western-blot 检测 1,25(OH)₂D₃ 及 DKK-1 对 MG63 细胞 MGP 蛋白表达的影响 (* $P < 0.05$ 与对照组相比, ** $P < 0.05$ 与 1,25(OH)₂D₃ 组相比)

Fig.1 The effect of 1,25(OH)₂D₃ and DKK-1 on the expression of MGP protein in MG63 cells, detected by western-blot (* $P < 0.05$ compared with the control group, ** $P < 0.05$ compared with the 1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁸ mol/l group)

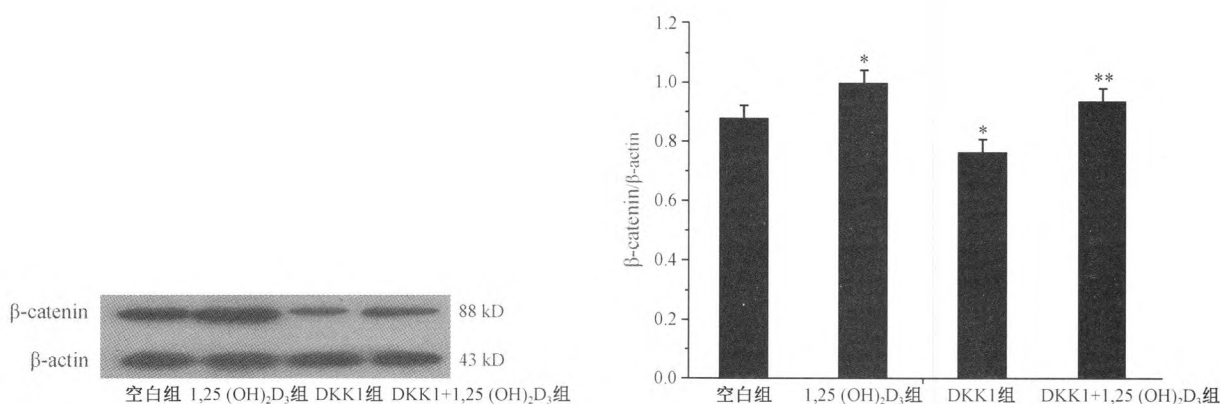


图2 Western-blot 检测 1,25(OH)₂D₃ 及 DKK-1 对 MG63 细胞 β-catenin 表达的影响(与对照组相比 * $P < 0.05$, 与 1,25(OH)₂D₃ 组相比 ** $P < 0.05$)

Fig.2 The effect of 1,25(OH)₂D₃ and DKK-1 on the expression of β-catenin protein in MG63 cells, detected by western-blot(Compared with the control group * $P < 0.05$, compared with the 1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁸ mol/l group ** $P < 0.05$)

提高 Runx2 的表达,是对照组的 1.17 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。DKK-1 200 ng/ml 作用于细胞以后,能明显下调 Runx2 的表达 0.86 倍。DKK-1 与 1,25(OH)₂D₃ 联用 Runx2 蛋白的表达下调 0.87 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 1,25(OH)₂D₃ 对人骨肉瘤 MG63 细胞 Wnt/β-catenin 信号通路中相关基因及 MGP 基因表达的影响

1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁸ mol/L 作用于 MG63 细胞以后,能明显提高 β-catenin、Runx2、LRP5、MGP 基因的表达,分别是对照组的 2.73 倍、3.72 倍、1.53 倍、2.31 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图 5 所示。DKK-1 200 ng/ml 作用于细胞以后,能明显下

调 β-catenin、Runx2、LRP5、MGP 基因表达,分别是对照组的 0.34 倍、0.52 倍、0.42 倍、0.78 倍,表达有显著差异($P < 0.05$)。DKK-1 与 1,25(OH)₂D₃ 联用与单独使用 1,25(OH)₂D₃ 相比,β-catenin、Runx2、LRP5、MGP 的表达下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

维生素 D 是一种惟一由相应的维生素 D 原经阳光照射由皮肤合成的脂溶性维生素。维生素 D 对维持骨健康和骨骼功能方面有着重要的作用。成骨细胞上维生素 D 受体的过表达可影响成骨细胞的生长和分化,从而刺激骨细胞的骨形成和矿化,促

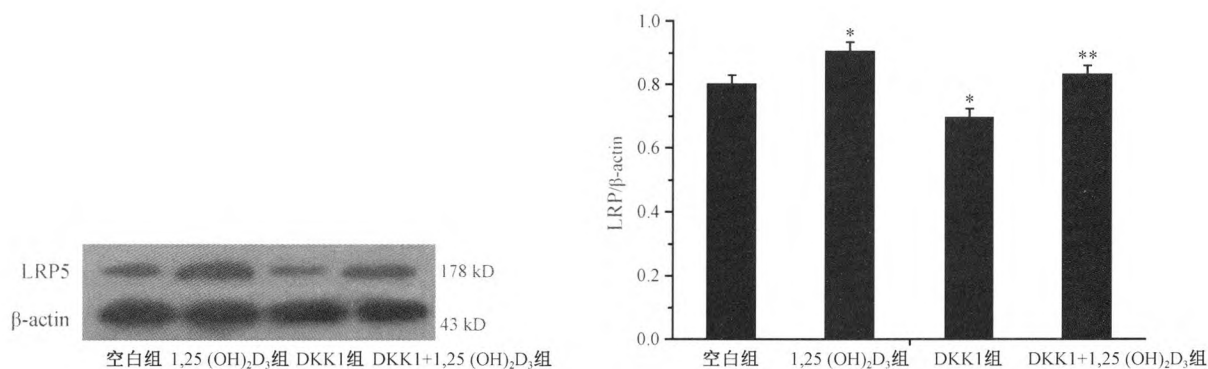


图 3 Western-blot 检测 1,25(OH)₂D₃ 及 DKK-1 对 MG63 细胞 LRP5 表达的影响 (与对照组相比 * $P < 0.05$, 与 1,25(OH)₂D₃ 组相比 ** $P < 0.05$)

Fig.3 The effect of 1,25(OH)₂D₃ and DKK-1 on the expression of LRP5 protein in MG63 cells, detected by western-blot (Compared with the control group * $P < 0.05$, compared with the 1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁸ mol/l group ** $P < 0.05$)

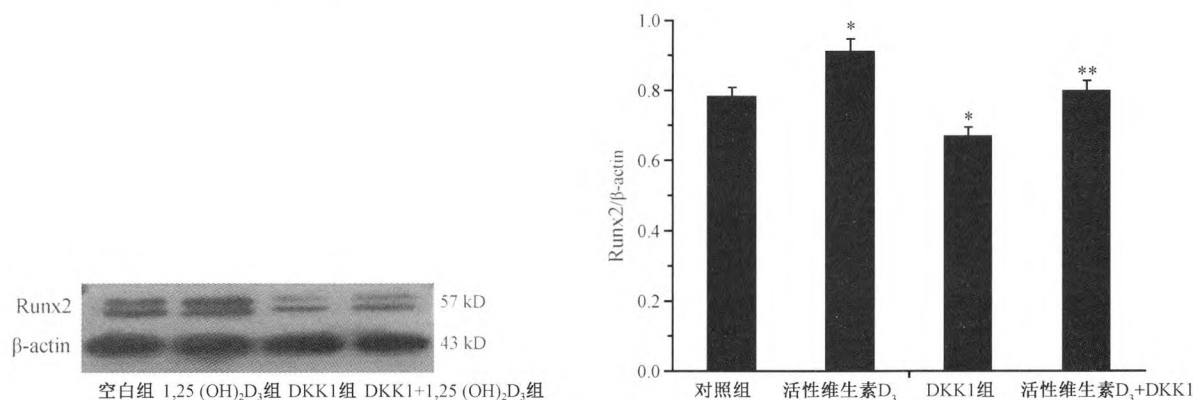


图 4 Western-blot 检测 1,25(OH)₂D₃ 及 DKK-1 对 MG63 细胞 Runx2 蛋白表达的影响 (与对照组相比 * $P < 0.05$, 与 1,25(OH)₂D₃ 组相比 ** $P < 0.05$)

Fig.4 The effect of 1,25(OH)₂D₃ and DKK-1 on the expression of Runx2 protein in MG63 cells, detected by western-blot (Compared with the control group * $P < 0.05$, compared with the 1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁸ mol/l group ** $P < 0.05$)

进入间充质干细胞和基质细胞成骨分化^[15]。体内活性维生素 D 抑制骨吸收可能存在两种机制:一是体内长期活性维生素 D 可能影响钙的内分泌系统,它以一种复杂的方式抑制成骨细胞上 RANKL 表达。二是活性维生素 D 可能降低成骨细胞上 RANKL 的活性或诱导成骨细胞的细胞结构变化^[15]。Lisse 等^[16]研究发现 mi RNA 在维生素 D 对成骨细胞分化和功能的微调效应中起关键作用。近来还发现维生素 D 受体基因多态性与绝经后骨质疏松的发展有关。随着研究的深入,笔者推测维生素 D 对骨代谢可能存在新的机制。

MGP 是血管和软骨组织钙化的抑制剂。在血管钙化病变中发现 MGP 调节成骨细胞和软骨细胞的分化^[17]。近年的研究证实 MGP 与绝经后骨质疏

松症有着千丝万缕的联系。笔者的前期动物实验发现使用雌激素干预去卵巢 SD 大鼠后大鼠腰椎血清、尿液 MGP 水平升高,骨密度也增加,由此提示骨密度的增加可能与血清 MGP 水平的增加有关,两者之间有密切联系^[18]。PTH、维生素 K、雌激素等治疗骨质疏松症的药物能调节 MGP 的表达^[14]。Tuñón-Le Poultel 等再次证实了男性 MGP 基因变异可能预测骨量丢失进展的高风险^[19]。以上临床研究均提示 MGP 与骨密度存在密切联系。本研究中使用 10⁻⁸ M 1,25(OH)₂D₃ 干预骨肉瘤 MG63 48h 后,与对照组相比 MGP 蛋白及基因的表达增加。前期研究也显示 1,25(OH)₂D₃ 呈剂量依赖性增加原代 SD 大鼠颅骨成骨细胞 MGP mRNA 的表达^[14]。James 等^[20]通过放射免疫法及 Northern blot 技术检

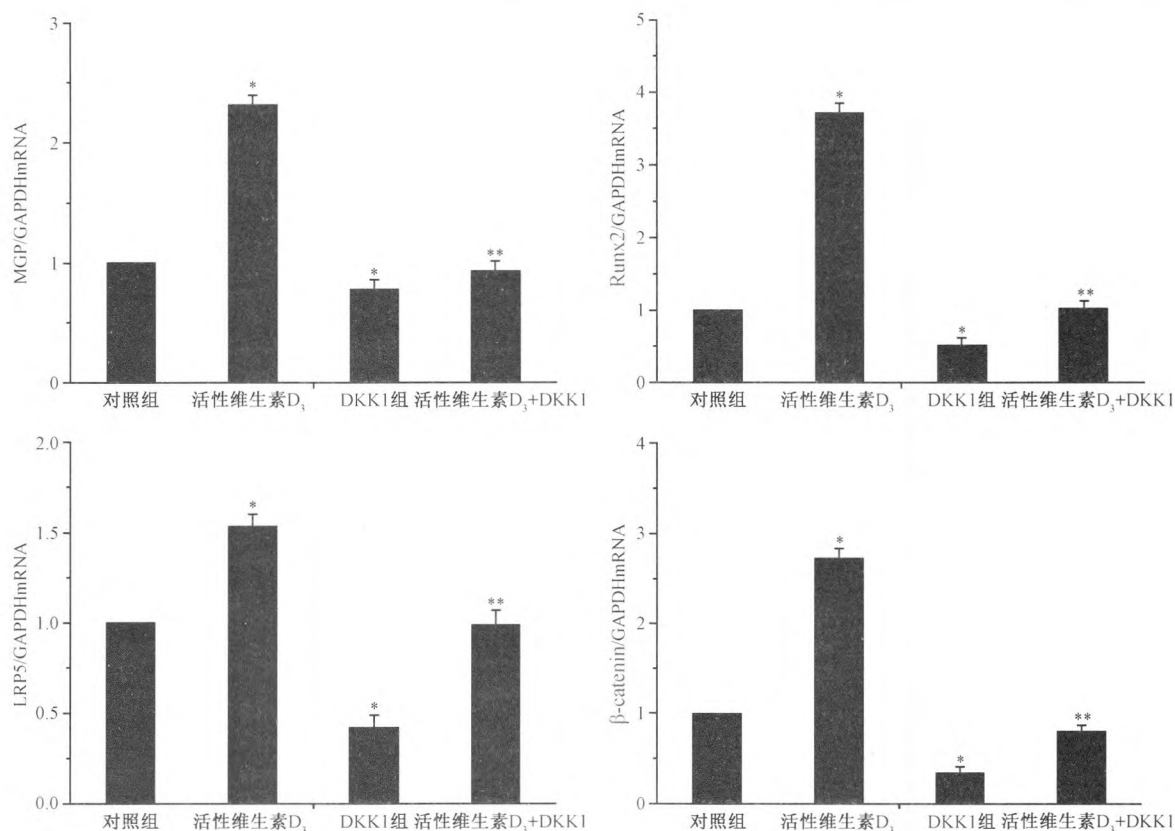


图5 实时荧光定量PCR检测1,25(OH)₂D₃及DKK-1对MG63细胞β-catenin、Runx2、LRP5及MGP基因表达的影响(与对照组相比* $P < 0.05$,与1,25(OH)₂D₃组相比** $P < 0.05$)

Fig.5 The effect of 1,25(OH)₂D₃ and DKK-1 on the expression of β-catenin, Runx2, LRP5 and MGP mRNA in MG63 cells, detected by real time RT-PCR (Compared with the control group* $P < 0.05$, compared with the 1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁸ mol/l group** $P < 0.05$)

测证实1,25(OH)₂D₃能呈浓度和时间依赖性刺激骨肉瘤细胞株UMR106-01、ROS 25/1、ROS 25/4的MGP mRNA表达,经1,25(OH)₂D₃干预后MGP表达增加6~15倍。以上研究结果均与本研究一致,1,25(OH)₂D₃可上调MGP的表达。原代成骨细胞及本研究的细胞株体外实验结果共同证实了维生素D对可调节MGP的表达,但1,25(OH)₂D₃具体通过何种途径调节MGP的表达尚不清楚。

Wnt/β-catenin信号通路对骨代谢有非常密切的联系^[21-22]。Wnt信号通路可间接调节破骨细胞功能及抑制分化并促进成骨细胞分化,维持正常骨密度和骨矿物沉积。β-catenin、LRP5等相关因子的丢失可能是骨质疏松发生的重要原因。近年研究发现Wnt/β-catenin信号通路与绝经后骨质疏松症相关。1,25(OH)₂D₃可以增加Wnt/β-catenin信号通路中相关因子β-catenin、LRP5、Runx2的表达。本研究中使用10⁻⁸ M 1,25(OH)₂D₃干预骨肉瘤MG63细

胞48h后,与对照组相比Wnt/β-catenin信号通路中β-catenin、LRP5、Runx2蛋白及基因的表达都增加了,由此提示1,25(OH)₂D₃可上调骨肉瘤MG63细胞中Wnt/β-catenin信号通路中相关因子的表达。本研究结果与Royan等^[27]结果一致,不仅发现1,25(OH)₂D₃可促进Wnt/β-catenin信号通路中相关因子的表达,而且还发现在促进β-catenin、Runx2表达的同时,也上调了MGP的表达。1,25(OH)₂D₃可通过促进Wnt/β-catenin信号通路的核心β-catenin与T细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)整合而上调Runx2,促进间充质前体细胞的成骨细胞分化,并可通过Wnt刺激成骨细胞释放OPG,降低RANKL的表达,因此也降低破骨细胞生成和破骨细胞的激活、促进破骨细胞的凋亡从而促进骨的合成代谢、抑制骨的吸收^[23-25],这可能是维生素D维持骨量和骨骼强度的机制之一,维生素D有可能通过影响Wnt/β-catenin信号通路调节MGP的表达。

近来生化和遗传研究认为, DKK1 作为 Dickkopf 家族中的一员, 是一种天然的可溶性 Wnt 信号通路抑制剂, 直接或间接通过与受体复合物的 LRP5/6 竞争性结合抑制 Wnt 信号通路, 破坏成骨细胞分化。DKK1 作为 β -catenin/TCF 途径的下游目标, 参与了 Wnt 信号通路的负反馈^[26]。DKK1 缺失的人和鼠可导致骨形成的增加^[27]。转基因大鼠过度表达 Wnt 蛋白拮抗因子 DKK1 可出现成骨细胞数目的急剧下降, 也降低了骨钙素的表达^[28]。为进一步证实笔者的推论, 使用 DKK1 从另一方面验证 Wnt/ β -catenin 信号通路是否对 MGP 存在影响。DKK1 组与对照组相比, 抑制 β -catenin、Runx2、LRP5 表达的同时也下调了 MGP 的表达, 由此提示 Wnt/ β -catenin 信号通路受到 DKK1 抑制时, MGP 的表达也下调, MGP 的表达可能受到了 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。Alfieri 等^[29]使用成骨细胞培养基和 Wnt 拮抗剂 sFRP3 共同培养主动脉瓣膜间质细胞后可减弱对 MGP 的诱导表达, 主动脉瓣膜间质细胞 Wnt 信号通路的增加可导致骨膜蛋白和 MGP 的表达。Fazenda 等^[30]在体内、外实验都证实了 MGP 是 Runx2 的主要靶基因, 外源性 Runx2 过表达可上调 MGP 转录和表达。本研究结果与之前研究结果均提示 Wnt/ β -catenin 可影响 MGP 的表达, 但具体机制有待进一步证实。

由此可见, 维生素 D 可同时促进 Wnt/ β -catenin 信号通路中相关因子及 MGP 的表达, 而 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 DKK1 则抑制信号通路同时下调 MGP 的表达, 推测维生素 D 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节 MGP 的表达, 这可能为维生素 D 对于防治骨质疏松症机制研究提供了新方向, 但深入的机制仍需有待进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Kido S, Kaneko I, Tatsumi S, et al. Vitamin D and type II sodium-dependent phosphate cotransporters. *Contrib Nephrol*, 2013, 180: 86-97.
- [2] Goltzman D. Inferences from genetically modified mouse models on the skeletal actions of vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 148: 219-224.
- [3] Li Y, Xi B, Li K, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese women. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 5709-5717.
- [4] Wang D, Liu R, Zhu H, et al. Vitamin D receptor FokI polymorphism is associated with low bone mineral density in postmenopausal women: a meta-analysis focused on populations in Asian countries. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013, 169(2): 380-386.
- [5] Schnatz PF, Marakovits KA, O'Sullivan DM, et al. Response to an adequate dietary intake of vitamin D3 modulates the effect of estrogen therapy on bone density. *J Womens Health (Larchmt)*, 2012, 21(8): 858-864.
- [6] Swami S, Krishnan AV, Peng L, et al. Transrepression of the estrogen receptor promoter by calcitriol in human breast cancer cells via two negative vitamin D response elements. *Endocr Relat Cancer*, 2013, 20(4): 565-577.
- [7] Colin EM, Uitterlinden AG, Meurs JB, et al. Interaction between vitamin D receptor genotype and estrogen receptor alpha genotype influences vertebral fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(8): 3777-3784.
- [8] Nashold FE, Spach KM, Spanier JA, et al. Estrogen controls vitamin D3-mediated resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling vitamin D3 metabolism and receptor expression. *J Immunol*, 2009, 183(6): 3672-3681.
- [9] Haussler MR, Haussler CA, Whitfield GK, et al. The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the "Fountain of Youth" to mediate healthful aging. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(1-2): 88-97.
- [10] Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int*, 2013, 92(2): 77-98.
- [11] Cancela L, Hsieh CL, Francke U, et al. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix gla protein gene. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(25): 15040-15048.
- [12] Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 1997, 386(6620): 78-81.
- [13] Tsukamoto K, Orimo H, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the human matrix Gla protein locus in elderly women. *J Bone Miner Metab*, 2000, 18(1): 27-30.
- [14] 赖晓阳, 方向南, 陈雪英, 等. 四种骨质疏松治疗药物对原代 SD 大鼠成骨细胞 MGP 表达的影响. *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28(12): 956-961.
- [15] Lai XY, Fang XN, Chen XY, et al. Effects of four different anti-osteoporosis agents on the expression of matrix gla protein in primary osteoblasts of SD rat. *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2012, 28(12): 956-961. (in Chinese)
- [16] Gardiner EM, Baldock PA, Thomas GP, et al. Increased formation and decreased resorption of bone in mice with elevated vitamin D receptor in mature cells of the osteoblastic lineage. *FASEB J*, 2000, 14(13): 1908-1916.
- [17] Lisse TS, Chun RF, Rieger S. Vitamin D activation of functionally distinct regulatory miRNAs in primary human osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(6): 1478-1488.
- [18] Yao Y, Bennett BJ, Wang X, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res*, 2010, 107(4): 485-494.

- [18] 陈雪英,姜醒华,赖晓阳,等. 雌二醇对去卵巢大鼠基质 GLA 蛋白表达的影响. 中华妇产科杂志, 2012, 47(11): 833-838.
Chen XY, Jiang XH, Lai XY, et al. Effect of estrogen on the expression of matrix GLA protein in ovariectomized SD rats. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2012, 47(11): 833-838. (in Chinese)
- [19] Tuñón-Le Poutel D, Cannata-Andía JB, Román-García P, et al. Association of matrix Gla protein gene functional polymorphisms with loss of bone mineral density and progression of aortic calcification. Osteoporos Int, 2014, 25(4): 1237-1246.
- [20] James DF, Yoko Otawara, Paul AP. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the synthesis of matrix γ -carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells. J Biol Chem, 1987, 263(2): 911-916.
- [21] Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, et al. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. Gene, 2012, 492(1): 1-18.
- [22] Masala E, Valencia A, Buchi F, et al. Hypomethylation of Wnt antagonist gene promoters and activation of Wnt pathway in myelodysplastic marrow cells. Leuk Res, 2012, 36(10): 1290-1295.
- [23] Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyann H, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. J Biol Chem, 2005, 280(39): 33132-33140.
- [24] Glass DA, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. Dev Cell, 2005, 8(5): 751-764.
- [25] Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt signaling in bone metabolism. J Bone Miner Metab, 2009, 27(3): 265-271.
- [26] Niida A, Hiroko T, Kasai M, et al. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. Oncogene, 2004, 23(52): 8520-8626.
- [27] Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. J Bone Miner Res, 2006, 21(6): 934-945.
- [28] Yao GQ, Wu JJ, Troiano N, et al. Targeted overexpression of Dkk1 in osteoblasts reduces bone mass but does not impair the anabolic response to intermittent PTH treatment in mice. J Bone Miner Metab, 2011, 29(2): 141-148.
- [29] Alfieri CM, Cheek J, Chakraborty S, et al. Wnt signaling in heart valve development and osteogenic gene induction. Dev Biol, 2010, 338(2): 127-135.
- [30] Fazenda C, Simões B, Kelsh RN, et al. Dual transcriptional regulation by runx2 of matrix Gla protein in *Xenopus laevis*. Gene, 2010, 450(1-2): 94-102.

(收稿日期: 2016-07-12; 修回日期: 2016-09-12)

(上接第 30 页)

- [3] Mohsen Hanifeh, Romy M Heilmann, Satu Sankari, et al. S100A12 concentrations and myeloperoxidase activity in the intestinal mucosa of healthy dogs. BMC Vet Res, 2015, 11: 234-242.
- [4] Meral Gunaldia, Yildiz Okuturlarb, Asuman Gedikbasic, et al. Diagnostic importance of S100A9 and S100A12 in breast cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015, 76: 52-56.
- [5] Pietzsch Jens, Hoppmann Susan. Human S100A12: a novel key player in inflammation. Amino Acids, 2009, 36(3): 381-389.
- [6] Goyette J, Geczy C L. Inflammation-associated S100 proteins; new mechanisms that regulate function. Amino Acids, 2011, 41(4): 821-842.
- [7] Saito T, Hojo Y, Ogoyama Y, et al. S100A 12 as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery disease. Circ J, 2012, 76(11): 2647-2652.
- [8] Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. Bone, 2012, 51(2): 249-257.
- [9] Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2013, 59(2): 77-94.
- [10] Nordal HH, Brun JG, Hordvik M, et al. Calprotectin (S100A8/A9) and S100A12 are associated with measures of disease activity in a longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab. Scand J Rheumatol, 2016, 45(4): 274-281.
- [11] Heilmann RM, Cranford SM, Ambrus A, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of canine S100A12. Vet Clin Pathol, 2016, 45(11): 135-147.
- [12] Ingels Catherine, Derese Inge, Wouters Pieter J, et al. Soluble RAGE and the RAGE ligands HMGB1 and S100A12 in critical illness: impact of glycemic control with insulin and relation with clinical outcome. Shock, 2015, 43(2): 109-116.
- [13] Khorramdelazad Hossein, Bagheri Vahid, Hassanshahi Gholamhossein, et al. S100A12 and RAGE expression in human bladder transitional cell carcinoma: a role for the ligand/RAGE axis in tumor progression. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(7): 2725-2729.

(收稿日期: 2016-07-28; 修回日期: 2016-09-05)