

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.04.004

Egr-1 通过上调 NDRG1 诱导骨髓间充质干细胞成骨分化

史素琴¹, 潘研¹, 岳新¹, 陈妍², 赵璐^{2△}

(1. 河南中医药大学第一附属医院内分泌科, 郑州 450000;

2. 河南中医药大学第三附属医院内分泌科, 郑州 450000)

[摘要] **目的** 探究早期生长因子 1(Egr-1)对骨髓间充质干细胞(BMSCs)增殖和成骨分化的影响。**方法** 采集成年男性骨髓组织,分离培养原代 BMSCs 并在显微镜下观察其形态,流式细胞术鉴定 BMSCs 表面标志物;pcDNA3.1/Egr-1 转染 BMSCs,MTT 检测 BMSCs 的增殖,茜素红钙染色试剂盒检测细胞基质内钙结节的形成,ALP 活性测定试剂盒检测细胞内 ALP 的活性,实时定量 qPCR 和 Western blot 分别检测细胞内 Egr-1、Runx2、NDRG1 mRNA 和蛋白表达;Egr-1 siRNA 转染 BMSCs,检测细胞内 ALP 活性、Egr-1、Runx2 和 NDRG1 mRNA 及蛋白表达。**结果** 离体培养的 BMSCs 高表达 CD90 和 CD29,而 CD34 和 CD45 呈阴性表达;pcDNA3.1/Egr-1 转染对 BMSCs 增殖无明显作用,却能促进细胞基质内钙结节的形成,上调 ALP 活性和 Egr-1、Runx2、NDRG1 的表达,而 Egr-1 siRNA 则作用相反。**结论** Egr-1 通过上调 NDRG1 诱导 BMSCs 的成骨分化。

[关键词] 骨质疏松;骨髓间充质干细胞;成骨细胞;早期生长因子 1;N-myc 下游调节基因 1

[中图分类号] R335

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)04-0442-04

Egr-1 induces osteogenic differentiation of BMSCs by promoting NDRG1

Shi Suqin¹, Pan Yan¹, Yue Xin¹, Chen Yan², Zhao Lu^{2△}

(1. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine,

Zhengzhou, Henan 450000, China; 2. Department of Endocrinology, the Third Affiliated

Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of early growth response gene-1 (Egr-1) on bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) proliferation and osteogenic differentiation, which is aimed at providing new molecular targets for the treatment of osteoporosis. **Methods** Bone marrow was collected from adult men and the BMSCs were cultured primarily and observed by microscope. Meanwhile, flow cytometry was used for BMSCs phenotypic identification; After transfection of pcDNA3.1/Egr-1 into BMSCs, the level of BMSCs proliferation was determined by MTT respectively on the 2 d, 4 d and 6 d; On the 7 d after transfection, the ALP activity assay was used for testing the ALP activity in BMSCs. And then, alizarin red S-calcium kit was used for measuring the calcified knots respectively on the 7 d, 14 d and 21 d; On the 21 d after transfection, real-time qPCR and Western blotting were used respectively for measuring the expression of mRNA and protein of Egr-1, Runx2 and NDRG1; Further, BMSCs were transfected with Egr-1 siRNA, and the content of calcium nodules, ALP activity, the expression of Egr-1, Runx2 and NDRG1 were detected as above methods. **Results** The cells cultured in vitro showed high level of CD90 and CD29 and very low level of CD34 and CD45, which is accorded with the characteristic of BMSCs. The pcDNA3.1/Egr-1 transfection for BMSCs had no effect on cells proliferation. However, the calcified knots, ALP activity and the expression of Egr-1, Runx2 and NDRG1 were increased after transfection of pcDNA3.1/Egr-1 for BMSCs. In addition, Egr-1 siRNA showed the opposite effect with pcDNA3.1/Egr-1 transfection for BMSCs. **Conclusion** Egr-1 induces osteogenic differentiation of BMSCs by promoting NDRG1 but has no effects on proliferation of BMSCs.

[Key words] osteoporosis; bone marrow mesenchymal stem cells; osteoblast; early growth response gene-1; N-myc downstream regulated gene 1

原发性骨质疏松症常见于中老年人和绝经后妇女,主要表现为骨量减少、骨组织微结构的改变等。成骨细胞功能和数量的退化对骨质疏松症的发生发展有重要作用^[1],而骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)经定向诱导可分化为成骨细胞,成为防治骨质疏松症的重要手段^[2-3]。

N-myc 下游调节基因(N-myc downstream regulated gene, NDRG)是一个与细胞分化相关的基因,能转录调控多种蛋白的表达,也对骨肉瘤等多种肿瘤细胞的生长和分化有调控作用^[4]。之前有研究发现,NDRG2 能通过上调成骨标志基因

(runt-related transcription factor 2, Runx2)和碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)活性促进 BMSCs 成骨分化,而 NDRG1 与 NDRG2 在结构和功能上具有相似性^[5]。最近的一项研究证明,NDRG1 在腰椎到骶椎体节过渡区域特化过程中起一定作用^[6]。而且,NDRG1 可被早期生长因子 1(early growth response gene-1, Egr-1)上调。Egr-1 又是重要的核转录因子,能通过介导细胞内信号级联反应的偶联过程调控诸多下游长期反应基因的表达,进而调控细胞的纤维化和分化^[7]。也有研究发现,Egr-1 介导了小鼠软骨细胞的凋亡过程^[8],但

它对 BMSCs 的增殖和分化作用尚未见报道。本文检测了 Egr-1 对 BMSCs 增殖、成骨分化及 NDRG1 表达的影响,旨在为骨质疏松症的治疗寻找新的分子靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象来自 2014 年 3 月至 2015 年 1 月在河南中医药大学第一附属医院择期手术的 4 例脊柱侧弯 16~20 岁的男性自愿手术患者。术中收集 4 例骨髓组织,每例约 8 mL。本研究经河南中医药大学第一附属医院伦理学委员会批准。所有患者均被告知风险,经患者知情同意后签署书面同意书。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的分离与培养 在收集的骨髓组织中加入 10 mL DMEM(Invitrogen, USA) 培养基后摇匀,离心,去上清。加细胞重悬液重悬洗涤后加 4 mL D-Hanks(Invitrogen) 溶液和 4 mL 细胞分离液(0.56 : 0.44),离心后收集单核细胞层,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基洗涤。将 BMSCs 接种到 25 mL 培养瓶中($5 \times 10^5 / \text{cm}^2$),于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养,3 d 后换液,以后每 2 天换液 1 次。待细胞融合达 70%~80%后,用 2.5 g/L 胰酶消化,以 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 将细胞传代培养。倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.2.2 流式细胞术鉴定 BMSCs 在生长状态良好的 BMSCs 中加入胰酶消化液,离心。然后分别加入购自英国 Abcam 公司的 PE-CD34、FITC-CD29、FITC-CD45 和 FITC-CD90 抗体,4 °C 孵育 30 min。PBS 冲洗后在流式细胞仪上检测。

1.2.3 细胞转染 构建正义 Egr-1 质粒并合成,经感受态转化,质粒提取试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 提取后转染到空载体 pcDNA3.1 中,命名为 pcDNA3.1/Egr-1。待细胞融合达 80%后,分别配置 pcDNA3.1、pcDNA3.1/Egr-1、siRNA、Egr-1 siRNA 与脂质体复合物,用 Lipofectamine 2000 转染 BMSCs 细胞。转染的 BMSCs 细胞在荧光显微镜下观察到点状绿光则表明转染成功。本实验转染用的 Egr-1 siRNA 引物序列均由广州锐博生物科技有限公司设计并合成。

1.2.4 噻唑蓝(MTT)法检测 BMSCs 细胞增殖 BMSCs 经胰酶消化后,以 1×10^4 个/cm² 接种于 96 孔板。经 pcDNA3.1/Egr-1 转染后分别培养 2、4、6 d,加入 20 μL MTT,37 °C 孵育 4 h。吸弃孔内 MTT,加二甲亚砜后避光振荡 10 min,酶标仪测定各孔 490 nm,吸光度(A)_{490 nm} 值。

1.2.5 茜素红钙结节染色 BMSCs 如 1.2.4 接种后,pcDNA3.1/Egr-1 转染细胞并用成骨培养基培养,各组细胞于转染第 7、14、21 天分别按照茜素红钙结节染色试剂盒(上海杰美基因医药有限公司)对样本进行固定、染色和澄清,倒置显微镜下观察。

1.2.6 ALP 活性检测 转染诱导分化 7 d 后,ALP 活性测定试剂盒(南京建成公司)检测各组细胞内 ALP 活性,酶标仪上测定各孔 A_{520 nm} 值。

1.2.7 实时定量 PCR TRIzol 法提取细胞内总 RNA,在核酸定量仪上测得浓度,ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 试剂盒(K1621, Fermentas)用于总 RNA 的反转录,荧光定量试剂盒(K0241, Fermentas)检测 Egr-1 Runx2 和 NDRG1 的表达。各基因引物见表 1。反应条件为:95 °C 10 min,95 °C 15

s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 个循环。

表 1 基因引物

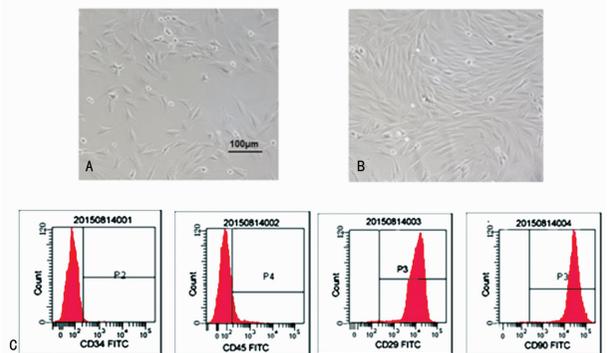
基因		引物序列(5'-3')
Egr-1	正向	GCTCCGGACCTGAAGGC
	反向	CGTACGCGTTGAACTCGGCG
Runx2	正向	AGATGGGACTGTGGTTACTG
	反向	GTAGTACTTGGGGAGGATT
NDRG1	正向	ATGTACCCCTCCATGGATCAGCT
	反向	CCCGCAACCTGCACCTGTTCAT

1.2.8 Western blot RIPA 裂解细胞,用总蛋白提取试剂盒(Millipore, USA)提取细胞蛋白质,测定浓度。吸取 50 μg 蛋白上样于 10% 聚丙烯酰胺凝胶孔,80 V 恒压电泳,然后恒流转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。用含脱脂奶粉的 Tris 缓冲液于室温封闭 1 h,分别加入 Runx2、NDRG1 一抗(Abcam, UK)4 °C 过夜。经 TBST 洗膜、FITC 标记的二抗(Abcam, UK)室温孵育 1 h。蛋白质发光试剂盒(Millipore, USA)化学发光显影后用凝胶成像分析系统分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件对数据进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较应采用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析(one way ANOVA)。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的鉴定 接种 BMSCs 后于显微镜下观察,发现 2 d 后细胞贴壁,呈集落样生长,细胞形态清晰可见,呈多突、梭形,部分伸出伪足呈短棒状(图 1A)。7 d 后 BMSCs 围绕集落中心迅速生长和增殖,此时的细胞相对形态均一,排列紧密,细胞胞体略大,多呈长梭形,集落周围能观察到许多放射状或漩涡状的贴壁细胞(图 1B)。通过流式细胞仪检测 BMSCs 表面标志物 CD29、CD34、CD45、CD90 的表达(图 1C),结果发现实验培养的细胞高表达 CD90 和 CD29,其阳性率值分别为 99.2% 和 99.5%,极少表达 CD34 和 CD45,阳性率值分别为 0.2% 和 0.8%,这些结果符合 BMSCs 表型特征。



A: 接种第 2 天; B: 接种第 10 天; C: BMSCs 表面标志物 CD29、CD34、CD45、CD90 的表达。

图 1 BMSCs 形态及表型鉴定

2.2 Egr-1 对 BMSCs 增殖无明显作用 为了探究 Egr-1 对 BMSCs 增殖的作用,笔者采用 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1/Egr-1 分别转染 BMSCs。表 2 是转染后细胞分别培养 2、4、6 d 的

MTT 检测结果,与对照组相比,pcDNA3.1 和 pcDNA3.1/Egr-1 转染对 BMSCs 的增殖过程无明显作用($P>0.05$)。

表 2 Egr-1 对人 BMSCs 增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	OD 值(490 nm)		
		2 d	4 d	6 d
对照组	4	0.234 ± 0.022	0.515 ± 0.048	0.862 ± 0.034
pcDNA3.1 组	4	0.251 ± 0.027	0.508 ± 0.044	0.884 ± 0.056
pcDNA3.1/Egr-1 组	4	0.272 ± 0.036	0.547 ± 0.053	0.915 ± 0.061

2.3 Egr-1 促进钙结节的形成 为了探究 Egr-1 能否诱导 BMSCs 向成骨细胞分化,分别于 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1/Egr-1 转染 BMSCs 后第 7、14、21 天用茜素红钙结节染色试剂盒对细胞基质内钙结节染色。结果显示,pcDNA3.1/Egr-1 组细胞基质内钙结节的数量和密度在转染后 7、14、21 d 逐渐增加,且明显高于对照组和 pcDNA3.1 组($P<0.05$);pcDNA3.1 组细胞基质内钙结节的数量和密度与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。

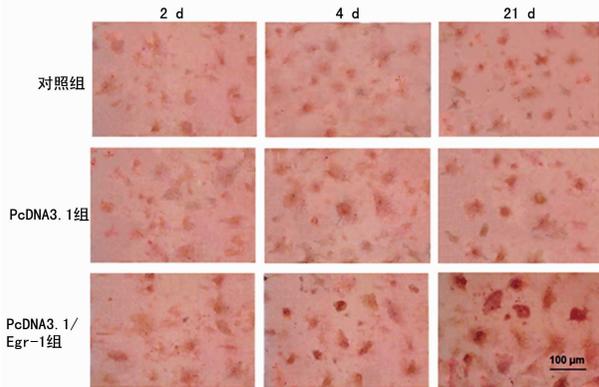
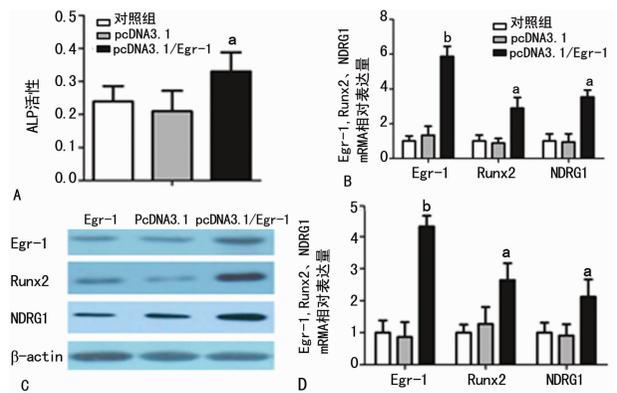


图 2 Egr-1 促进人 BMSCs 的钙结节形成($\times 100$)

2.4 Egr-1 促进 BMSCs 内 ALP 活性及 Egr-1、Runx2、NDRG1 表达 为了探讨 Egr-1 是否通过 NDRG1 促进 BMSCs 向成骨细胞分化,笔者检测了 pcDNA3.1/Egr-1 转染后第 7 天细胞内 ALP 活性和第 21 天细胞内 Runx2、NDRG1 的表达。结果表明,pcDNA3.1/Egr-1 组细胞内 ALP 活性(图 3A)明显高于对照组和 pcDNA3.1 组($P<0.05$);Egr-1 mRNA(图 3B)和蛋白(图 3C)的表达在 pcDNA3.1/Egr-1 组明显高于对照组和 pcDNA3.1 组($P<0.01$);Runx2 和 NDRG1 mRNA(图 3B)和蛋白(图 3C)的表达在 pcDNA3.1/Egr-1 组也都明显高于对照组和 pcDNA3.1 组($P<0.05$)。

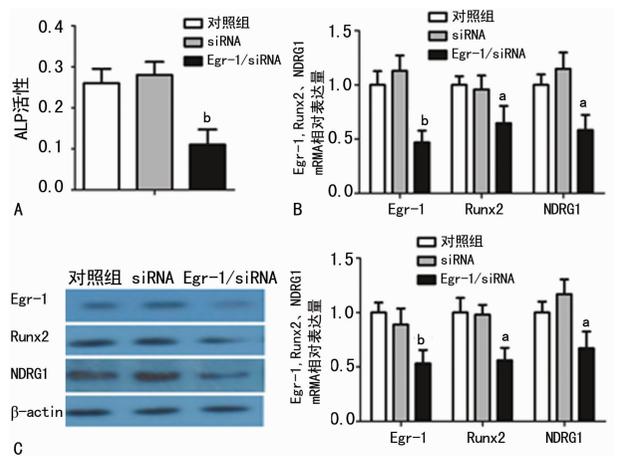
2.5 Egr-1 siRNA 转染抑制 BMSCs 向成骨细胞的分化 为了进一步探讨 Egr-1 在 BMSCs 成骨细胞分化中的作用,笔者接下来采用 Egr-1 siRNA 转染 BMSCs,于第 7 天检测细胞内 ALP 活性,第 21 天检测细胞内 Runx2、NDRG1 的表达。结果发现,Egr-1 siRNA 转染组细胞内 ALP 活性(图 4A)明显低于对照组和 siRNA 组($P<0.01$);Egr-1 mRNA(图 4B)和蛋白(图 4C)的表达在 Egr-1 siRNA 组明显低于对照组和 siRNA 组($P<0.01$);Runx2 和 NDRG1 mRNA(图 4B)和蛋白(图 4C)的表达在 Egr-1 siRNA 组也都低于对照组和 siRNA 组(均 $P<0.05$)。表明 Egr-1 通过上调 NDRG1 的表达来诱导 BMSCs

向成骨细胞分化。



A: ALP 活性分析图; B: Egr-1、Runx2、NDRG1 mRNA 表达分析图; C: Western blot 图; D: Western blot 分析图。^a: $P<0.05$, ^b: $P<0.01$,与对照组比较。

图 3 pcDNA3.1/Egr-1 转染促进 BMSCs 中 ALP 活性及 Runx2 和 NDRG1 的表达



A: ALP 活性分析图; B: Egr-1、Runx2、NDRG1 mRNA 表达分析图; C: Egr-1、Runx2、NDRG1 蛋白表达及分析图。^a: $P<0.05$, ^b: $P<0.01$,与对照组比较。

图 4 Egr-1 siRNA 转染抑制 BMSCs 中 ALP 活性及 Runx2 和 NDRG1 的表达

3 讨论

BMSCs 的数量和功能一直是维持骨骼正常生理机能的关键因素,当机体发生骨质疏松时,骨髓中 BMSCs 的成骨能力降低。因此,BMSCs 向成骨细胞分化相关的研究是近年来骨质疏松症关注的焦点。NDRG1 是一个在体内广泛表达的细胞质蛋白,之前关于 NDRG1 的研究大都集中在对癌细胞分化,包括肝癌、食管癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌和前列腺癌等^[9-10]。近年来,King 等^[11]发现 NDRG1 能促进髓鞘细胞的形成和分化。在 NDRG1 基因敲除鼠中,NDRG1 具有调控腰椎和胸椎过渡区域椎体同源转换的作用^[6]。甚至有人认为 NDRG1 参与了骨肉瘤中成骨细胞的分化,可作为成骨分化的候选标志基因^[12]。又考虑到 NDRG2 能通过上调 Runx2 表达和 ALP 活性促进 BMSCs 成骨分化,不难发现 NDRG1 能促进成骨细胞的形成。本研究结果也发现在 ALP 活性和 Runx2 表达越高、钙结节形成越多的 BMSCs 中,即骨化程度越高的细胞内,NDRG1 表达也越高,进一步证实 NDRG1 与成骨细胞

的形成相关。

Egr-1 是即刻早期反应基因家族的成员之一,在细胞的生长分化过程中能检测到其活性表达,对多种类型细胞的增殖分化都有调控作用。Egr-1 基因的表达不仅能促进肾小管上皮细胞转分化和肾间质纤维化的发生发展^[13],也能通过上调转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β , TGF- β 1)诱导肺泡上皮细胞向肌成纤维细胞分化^[14]。在骨关节炎患者的软骨组织中,Egr-1 的表达比健康人要低,而且 Egr-1 能促进软骨细胞的增殖和分化过程^[15]。反之,在大骨节病患者的软骨组织中,其表层细胞内 Egr-1 的表达也明显高于健康人^[16]。与此同时,TGF- β 已被报道能诱导 BMSCs 向成骨细胞分化,而 Egr-1 又是 TGF- β 的上游基因,这也进一步间接暗示 Egr-1 或许参与了 BMSCs 成骨分化。本研究的结果与之前研究的结论相一致,发现 Egr-1 能促进 BMSCs 基质中钙结节的形成及 ALP 活性,进而促进 BMSCs 向成骨细胞分化。另外,由于 NDRG1 作为 Egr-1 的下游靶点之一,又在 BMSCs 成骨分化过程中高表达,因此,笔者认为 Egr-1 通过上调 NDRG1 的表达诱导 BMSCs 向成骨细胞分化。

由此看来,Egr-1 能促进 BMSCs 向成骨细胞方向分化,这将有助于骨的形成,也为临床治疗骨质疏松提供新的理论依据。但是,BMSCs 增殖和分化的机制较为复杂,可能有多种信号分子参与,Egr-1 在该过程中也可能存在更多潜在的作用靶点。而且,Egr-1 究竟能否用于骨质疏松的治疗,这都需要进一步构建相关的动物模型,并结合细胞水平的实验来加以评价。

参考文献

- [1] Pernow Y, Granberg B, Sääf M, et al. Osteoblast dysfunction in male idiopathic osteoporosis [J]. *Calcif Tissue Int*, 2006, 78(2): 90-97.
- [2] Sun J, Zhang T, Zhang P, et al. Overexpression of the PLAP-1 gene inhibits the differentiation of BMSCs into osteoblast-like cells[J]. *J Mol Histol*, 2014, 45(5): 599-608.
- [3] Jia M, Nie Y, Cao DP, et al. Potential antiosteoporotic agents from plants: a comprehensive review[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012(8): 277-293.
- [4] Hua Y, Jia X, Sun M, et al. Plasma membrane proteomic analysis of human osteosarcoma and osteoblastic cells: revealing NDRG1 as a marker for osteosarcoma[J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(5): 1013-1021.
- [5] 杲丽. NDRG2 调节骨髓间充质干细胞成骨成脂分化机制的研究[D]. 上海: 第四军医大学, 2013.
- [6] 陈慧慧, 朱煌, 郭熙志. N drg1 基因缺失对腰椎到骶椎结构转换的影响[J]. *国际骨科学杂志*, 2015, 36(3): 202-206.
- [7] Marie-Justine G, Benjamin C, Geoffroy N, et al. Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(8): 3564-3576.
- [8] 叶志强, 张荣凯, 陈郁鲜, 等. Egr-1 介导了 IL-1 β 诱导的小鼠软骨细胞凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 8(28): 1482-1487.
- [9] Li D, Mei H, Pu J, et al. Intelectin 1 suppresses the growth, invasion and metastasis of neuroblastoma cells through up-regulation of N-myc downstream regulated gene 2 [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1): 1-15.
- [10] Han LL, Hou L, Zhou MJ, et al. Aberrant NDRG1 methylation associated with its decreased expression and clinicopathological significance in breast cancer[J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20(196): 52.
- [11] King RHM, David C, Sash L, et al. NdrG1 in development and maintenance of the myelin sheath[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 42(3): 368-380.
- [12] Matsugaki T, Zenmyo M, Hiraoka K, et al. Role of NDRG1/Cap43 in osteogenic differentiation[J]. *Bone*, 2009, 44(2): 321.
- [13] 翟英, 孙世仁, 杜锐, 等. 早期生长反应因子 1 过表达促进肾小管上皮细胞转分化[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2009, 18(6): 537-541.
- [14] Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, et al. Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis[J]. *J Exp Med*, 2004, 200(3): 377-389.
- [15] Wang FL, Connor JR, Dodds RA, et al. Differential expression of Egr-1 in osteoarthritic compared to normal adult human articular cartilage[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8(3): 161-169.
- [16] 武世勋, 郭雄, 张峰, 等. 大骨节病与骨关节病软组织死亡相关因子表达的比较 [J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(12): 1-7.

(收稿日期: 2016-09-29 修回日期: 2016-10-17)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的临床研究论文(主体是以人为研究对象),作者应说明其遵循的程序是否符合伦理委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准,并提供(上传)该委员会的批准文件复印件及受试对象或其亲属的知情同意书复印件。

《重庆医学》编辑部