



## SOX5对大鼠成骨细胞增殖及核因子- $\kappa$ B信号通路的影响

冷冬月, 李旭峰, 方兴刚

引用本文:

冷冬月,李旭峰,方兴刚. SOX5对大鼠成骨细胞增殖及核因子- $\kappa$ B信号通路的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2024, 49(2): 146-151.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2024.02.002>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 醋酸钠林格液联合乌司他丁对失血性休克大鼠肝组织NF- $\kappa$ B p65蛋白表达及其细胞因子的影响

Effect of sodium acetate ringer's solution combined with ulinastatin on the expression of NF- $\kappa$ B p65 protein and cytokines in liver tissue of hemorrhagic shock rats

蚌埠医学院学报. 2018, 43(10): 1334-1338 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.10.016>

#### 醋酸钠林格液对失血性休克大鼠心肌炎性介质及NF- $\kappa$ B、MAPK信号通路的影响

Effect of sodium acetate Ringer's solution on inflammatory mediators and NF- $\kappa$ B, MAPK signaling pathway in myocardial tissue of hemorrhagic shock rats

蚌埠医学院学报. 2020, 45(3): 281-285 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.03.001>

#### 乌司他丁通过miR-146a调节TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路减轻失血性休克大鼠肾炎性损伤研究

Study on ulinastatin alleviating the nephritis injury in hemorrhagic shock rats by regulating the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway via miR-146a

蚌埠医学院学报. 2020, 45(3): 286-290,295 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.03.002>

#### TR3受体激动剂6-mercaptopurine对糖尿病ApoE-/-小鼠NF- $\kappa$ B p65/CylinD1通路影响及其与抗动脉硬化关系

Effect of TR3 receptor agonist 6-mercaptopurine on NF- $\kappa$ B p65/CylinD1 pathway in diabetic ApoE-/- mice, and its relationship with anti-arteriosclerosis

蚌埠医学院学报. 2019, 44(9): 1137-1142 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.09.001>

#### 木犀草素对小鼠体外培养前成骨细胞MC3 T3-E1增殖、分化、矿化和Wnt通路的影响

Effect of luteolin on the proliferation, differentiation, mineralization and Wnt pathway of MC3 T3-E1 osteoblasts in vitro

蚌埠医学院学报. 2017, 42(1): 44-47 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.01.012>

# SOX5 对大鼠成骨细胞增殖及核因子- $\kappa$ B 信号通路的影响

冷冬月<sup>1</sup>, 李旭峰<sup>2</sup>, 方兴刚<sup>1</sup>

(1. 湖北省十堰市太和医院 中西医结合科, 442000; 2. 湖北省十堰市人民医院 中医科, 442000)

**[摘要]** **目的:** 探究 Y-box 蛋白 5 (SOX5) 对大鼠成骨细胞 (OB) 增殖及核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路的影响。 **方法:** 取新生 24 h SPF 级 SD 乳鼠, 应用酶消化法分离大鼠颅骨 OB。形态学观察和 ALP 染色鉴定成骨细胞; 取生长良好的第 4 代 OB, 分为空白对照组、pcDNA3.1 组、pcDNA-SOX5 组、si-NC 组、siRNA-SOX5 组。转染 48 h 后 qRT-PCR 检测细胞中 SOX5 mRNA 的表达; MTT 法检测细胞增殖活力; ALP 活性检测试剂盒测量 ALP 活性; 茜素红染色观察钙结节的形成情况; Western blotting 检测 OB 分化及 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白 Runt 相关转录因子 2 (Runx2)、I 型胶原蛋白 (Collagen I)、NF- $\kappa$ B p65 及其磷酸化蛋白、 $\kappa$ B 抑制蛋白激酶  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达。 **结果:** 与空白对照组相比, pcDNA-SOX5 组大鼠 OB 中 SOX5 mRNA 水平、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$  蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), OB 增殖活力、ALP 活性、钙化结节数量和面积、Runx2、Collagen I、I $\kappa$ B $\alpha$  表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); siRNA-SOX5 组大鼠 OB 中 SOX5 mRNA 水平、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$  蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), OB 增殖活力、ALP 活性、钙化结节数量和面积、Runx2、Collagen I、I $\kappa$ B $\alpha$  表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。 **结论:** SOX5 具有调控 OB 增殖、分化的作用, 其作用机制可能与调控 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**[关键词]** 骨质疏松; Y-box 蛋白 5; 成骨细胞; 核因子- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R 681 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2024.02.002

## Effects of SOX5 on rat osteoblast proliferation and NF- $\kappa$ B signaling pathway

LENG Dongyue<sup>1</sup>, LI Xufeng<sup>2</sup>, FANG Xinggang<sup>1</sup>

(1. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Taihe Hospital, Shiyan Hubei 442000;

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Shiyan People's Hospital, Shiyan Hubei 442000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects of Y-box protein 5 (SOX5) on rat osteoblasts (OB) proliferation and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. **Methods:** The newborn 24 h SPF grade SD suckling rats were taken, and the OB of the rat skull was separated by enzyme digestion method. Morphological observation and ALP staining were used to identify osteoblasts. The fourth generation OBs with good growth were divided into blank control group, pcDNA3.1 group, pcDNA-SOX5 group, si-NC group, and siRNA-SOX5 group. After 48 h of transfection, qRT-PCR was used to detect the expression of SOX5 mRNA in the cells; MTT method was used to detect cell proliferation viability; ALP activity detection kit was used to measure ALP activity; alizarin red staining was used to observe the formation of calcium nodules; Western blotting was used to detect OB differentiation and the expression of NF- $\kappa$ B signaling pathway-related proteins [Runt-related transcription factor 2 (Runx2), type I collagen (collagen I), nuclear factor  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) and its phosphorylated protein,  $\kappa$ B inhibits protein kinase  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )]. **Results:** Compared with the blank control group, the SOX5 mRNA level, p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65, and TNF- $\alpha$  proteins expression in the OB of rats in the pcDNA-SOX5 group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the OB proliferation activity, ALP activity, the number and area of calcified nodules, Runx2, collagen I, and I $\kappa$ B $\alpha$  expression were significantly reduced ( $P < 0.05$ ); the SOX5 mRNA level, p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65, and TNF- $\alpha$  proteins expression in the OB of rats in the siRNA-SOX5 group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), the OB proliferation activity, ALP activity, the number and area of calcified nodules, Runx2, collagen I, and I $\kappa$ B $\alpha$  expression were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** SOX5 can regulate the proliferation and differentiation of OB, and its mechanism may be related to the regulation of NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**[Key words]** osteoporosis; Y-box protein 5; osteoblasts; nuclear factor- $\kappa$ B

骨质疏松症 (OP) 是一种骨代谢疾病, 其特征在于骨量下降, 伴随着骨组织和微结构的恶化以及骨

矿物质密度的下降<sup>[1]</sup>。在 OP 中, 骨形成与吸收之间的不平衡最终导致了骨的变性和易骨折<sup>[2]</sup>。成

骨细胞(osteoblasts, OB)是一类特殊的具有成骨潜能的细胞,在骨重建及骨稳态维持中都发挥着重要的作用<sup>[3]</sup>; OB 活性下降是 OP 的主要原因<sup>[4]</sup>。Y-box蛋白 5(SOX5)是 SOX 家族 SoxD 组的成员,编码控制细胞命运的各种转录因子并在许多谱系中进行分化,包括神经元、软骨细胞和 B 细胞<sup>[5-7]</sup>。研究<sup>[8-9]</sup>表明 SOX5 与类风湿关节炎和软骨形成密切相关,是治疗绝经后 OP 的有希望的分子靶标。已经在卵巢切除小鼠的骨髓细胞中发现了差异表达的 SOX5;且与绝经前健康女性的骨髓样本相比,绝经后 OP 病人骨髓中 SOX5 的 mRNA 和蛋白表达水平显著上调;SOX5 过表达可抑制人间充质干细胞的成骨分化<sup>[10]</sup>。而 SOX5 对 OB 增殖的分子功能及作用机制尚不明确;因此,本研究以大鼠 OB 为对象,探讨 SOX5 对 OB 增殖的影响及其潜在的作用机制,为 OP 的治疗及药物开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

出生 24 h 的 SPF 级 SD 乳鼠 10 只,雌雄不限,质量(10 ± 3)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证为 SCXK(京)2019-0009。饲养温度(20 ± 2)℃,相对湿度为 45% ~ 60%。胎牛血清、胰蛋白酶、RPMI 1640 培养基均购自美国 GIBCO 公司;TRIzol RNA 分离试剂及 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒均购买于日本 TaKaRa 公司;Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 转染试剂盒购自美国 Thermo 公司;pcDNA-SOX5 和 pcDNA3.1 载体、siRNA-SOX5 和其阴性对照(si-NC)以及 PCR 引物序列由上海 GenePharma 公司设计合成;氯化十六烷基吡啶鎓(美国 Sigma-Aldrich,货号:C9002);碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒(P0321S)、MTT 试剂盒(C0009S)购自碧云天生物科技公司;茜素红染色试剂(北京索莱宝科技有限公司,货号:G8550);兔抗大鼠 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)(ab236639)、I 型胶原蛋白(Collagen I)(ab270993)、核因子-κB p65(nuclear factor kappa-B p65, NF-κB p65)(ab16502)、p-NF-κB p65(ab76302)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)(ab205587)、KB 抑制蛋白激酶 α(KB inhibits protein kinase α, IκBα)(ab109300)、山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(ab205718)、β-actin(ab8227)均购自英国 abcam 公司。

细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);ABI Prism<sup>®</sup> 7300 型荧光定量 PCR 系统(美

国);倒置荧光显微镜(IX73,购自日本 Olympus 公司);iMark680 多功能酶标仪、蛋白转膜装置购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 成骨细胞的分离、鉴定

应用酶消化法分离大鼠颅骨成骨细胞<sup>[11]</sup>。取新生 24 h 内 SD 乳鼠,处死后,乙醇浸泡 5 min,在无菌条件下,取出头盖骨,PBS 冲洗后切成 1 mm<sup>3</sup> 的骨颗粒,37℃水浴中用 0.1% 的胶原酶以 1:10 的比例将骨颗粒消化分离 20 min,然后再次用胶原酶分离约 1 h。将分离获得的悬浮液以 1 200 r/min 离心,去上清液,用 PBS 漂洗 3 次,并加入含有 15% 胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 U/mL)的培养液。在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 下孵育,1 周换液 2 次,待细胞融合约 80% 时传代,换用成骨诱导培养基(基础培养基 + 50 μg/mL 维生素 C + 10 mmol/L β-甘油磷酸钠 + 10 nmol/L 地塞米松)。取第 3 代细胞通过 ALP 染色和形态观察行成骨细胞鉴定,取生长良好的第 4 代细胞用于实验。

鉴定成骨细胞:

(1)形态学观察:在倒置相差显微镜下观察原代和继代培养成骨细胞的生长和形态变化,并在随机选择的视野中拍照。(2)ALP 染色:将第 3 代的成骨细胞培养 7 d,并参照 ALP 染色试剂盒的说明进行 ALP 染色。去除成骨细胞的培养基,PBS 清洗细胞 2 ~ 3 次,并用 4% 多聚甲醛固定 10 min。清洗后加入 300 μL 显色液,避光于 37℃的培养箱中孵育 2 h,显微镜下观察。

### 1.3 分组及转染

取生长良好的第 4 代成骨细胞,按每孔 2 × 10<sup>6</sup> 个接种于 24 孔板,分成 5 个处理组:(1)空白对照组,不进行任何转染;(2)pcDNA3.1 组,用 Lipofectamine 2000 按照说明书将 100 nmol/L pcDNA3.1 转染至成骨细胞;(3)pcDNA-SOX5 组,用 Lipofectamine 2000 按照说明书将 100 nmol/L pcDNA-SOX5 转染至成骨细胞;(4)si-NC 组,将 si-NC 转染至成骨细胞;(5)siRNA-SOX5 组,将 siRNA-SOX5 转染至成骨细胞。转染 48 h 后收获细胞以进行后续实验。

### 1.4 qRT-PCR 检测细胞中 SOX5 mRNA 的表达

使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,使用分光光度计测量总 RNA 的浓度。按照试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,进行 PCR 扩增(见表 1)。反应体系(20 μL):cDNA(200 ng/μL) 2 μL,SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (2 ×) 10 μL,上下游引物各 0.4 μL,ddH<sub>2</sub>O 7.2 μL。循环条件:94℃持续

10 min,然后在 94 °C 持续 10 s,60 °C 持续 20 s 和 72 °C 持续 1 min 进行 40 个循环。用  $\beta$ -actin 作为对照,相对 SOX5 mRNA 的表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列
SOX5	F:5'-CAG CCA GAG TTA GCA CAA TAG G-3' R:5'-CTG TTG TTC CCG TCG GAG TT-3'
$\beta$ -actin	F:5'-TTG CGT TAC ACC CTT TCT TG-3' R:5'-TGT CAC CTT CAC CGT TCC A-3'

### 1.5 MTT 法检测细胞增殖活力

转染 48 h 后将成骨细胞以  $2 \times 10^3$  细胞/孔的浓度接种到 96 孔板中,继续培养 24 h,然后每孔中加入 20  $\mu$ L 的 MTT 溶液 (5 mg/mL),于培养箱中孵育 4 h,吸去上层清液后加入 150  $\mu$ L 的 DMSO,490 nm 波长处测定各孔吸光度值 (OD),计算细胞增殖率。细胞增殖率 = (实验组 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白孔 OD 值)  $\times$  100%。

### 1.6 ALP 活性测定

ALP 是成骨细胞分化的早期标志。将转染的成骨细胞用成骨培养基培养 7 d。然后,除去 OM 培养基,并使用 0.1% TritonX-100 裂解细胞获得细胞裂解液,然后 12 000 g 离心 10 min,取上清液为样品。使用 ALP 活性检测试剂盒测量上清液中 ALP 活性。于 405 nm 处测定各组 OD 值,使用对硝基苯酚绘制标准曲线;另用 BCA 法测定每个样品的总蛋白浓度。并将每个样品的 ALP 活性标准化为相应的总蛋白含量。

### 1.7 茜素红染色

采用茜素红染色观察钙结节的形成数量,评估成骨细胞的矿化能力。成骨细胞按 1.3 方法进行分组处理,转染后将细胞培养 2 周,弃去培养液,细胞用 PBS 洗涤 2 次,并在室温下用 4% 多聚甲醛固定 30 min。弃去多聚甲醛,PBS 洗涤后在 37 °C 下用 0.1% 茜素红染液染色 1 h。倒置光学显微镜下观察图像并拍照,并使用 Image-Pro Plus 6.0 软件统计钙化结节染色阳性区域的面积和数量。

### 1.8 Western blotting 检测成骨细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白的表达

使用 RIPA 裂解液提取细胞中蛋白质。使用 BCA 试剂盒对蛋白质浓度进行定量。取等量蛋白质样品上样 (每泳道 30  $\mu$ g),10% SDS-PAGE 分离

蛋白质,并通过半干转移将其转移到 PVDF 膜上。将膜用 5% 脱脂牛奶封闭,并在 4 °C 下与一抗 (Runx2、Collagen I、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\beta$ -actin,1:1 000) 孵育过夜。第 2 天,将膜与偶联辣根过氧化物酶的二抗孵育 (1:2 000) 2 h,然后使用化学发光试剂盒 (ECL) 进行显色。以  $\beta$ -actin 为内参,分析结果。

### 1.9 统计学方法

以上所有实验均重复 3 次。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),Tukey 的事后检验用于单因素方差分析后的成对比较。

## 2 结果

### 2.1 成骨细胞原代培养和鉴定

原代培养第 3 天,倒置相差显微镜下见成骨细胞从碎骨块周围爬出,呈放射状贴壁生长,形态不规则,呈多边形或三角形,有较多突起,单核卵圆形,1~2 个核仁,胞质丰富清晰,ALP 染色呈阳性,蓝黑色颗粒沉积在细胞质及细胞核 ALP 活性部位 (见图 1)。

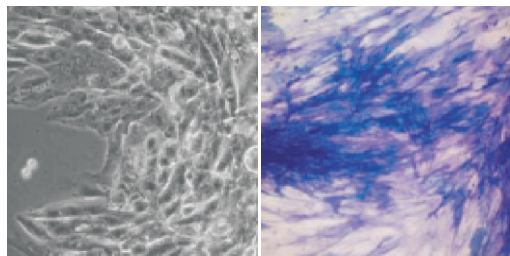


图 1 成骨细胞原代培养和鉴定

### 2.2 各组成骨细胞中 SOX5 mRNA 的表达

与空白对照组相比,pcDNA-SOX5 组大鼠 OB 中 SOX5 mRNA 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ),siRNA-SOX5 组大鼠 OB 中 SOX5 mRNA 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ) (见表 2)。

表 2 各组大鼠 OB 中 SOX5 mRNA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s; n_i = 3$ )

分组	SOX5 mRNA
空白对照组	1.00 $\pm$ 0.00
pcDNA3.1 组	1.02 $\pm$ 0.01
pcDNA-SOX5 组	4.65 $\pm$ 0.37*
si-NC 组	1.01 $\pm$ 0.01
siRNA-SOX5 组	0.41 $\pm$ 0.05*
<i>F</i>	315.94
<i>P</i>	< 0.01
<i>MS</i> 组内	0.028

*q* 检验:与空白对照组比较 \*  $P < 0.05$

### 2.3 各组成骨细胞增殖活力

与空白对照组相比,pcDNA-SOX5 组大鼠 OB

增殖活力显著降低 ( $P < 0.05$ ), siRNA-SOX5 组大鼠 OB 增殖活力明显升高 ( $P < 0.05$ ) (见表 3)。

表 3 各组大鼠 OB 增殖活力比较 ( $\bar{x} \pm s; n_i = 3$ )

分组	增殖率/%
空白对照组	100.00 ± 0.00
pcDNA3.1 组	102.13 ± 10.01
pcDNA-SOX5 组	64.75 ± 6.16 *
si-NC 组	104.06 ± 9.31
siRNA-SOX5 组	137.31 ± 7.42 *
<i>F</i>	144.83
<i>P</i>	< 0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	55.976

*q* 检验:与空白对照组比较 \*  $P < 0.05$

## 2.4 各组成骨细胞 ALP 活性

与空白对照组相比, pcDNA-SOX5 组大鼠 OB 中 ALP 活性显著降低 ( $P < 0.05$ ), siRNA-SOX5 组大鼠 OB 中 ALP 活性明显升高 ( $P < 0.05$ ) (见表 4)。

表 4 各组大鼠 OB 中 ALP 活性比较 ( $\bar{x} \pm s; n_i = 3$ )

分组	ALP 活性
空白对照组	1.00 ± 0.00
pcDNA3.1 组	1.03 ± 0.08
pcDNA-SOX5 组	0.75 ± 0.05 *
si-NC 组	1.02 ± 0.06
siRNA-SOX5 组	1.54 ± 0.09 *
<i>F</i>	60.49
<i>P</i>	< 0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	0.004

*q* 检验:与空白对照组比较 \*  $P < 0.05$

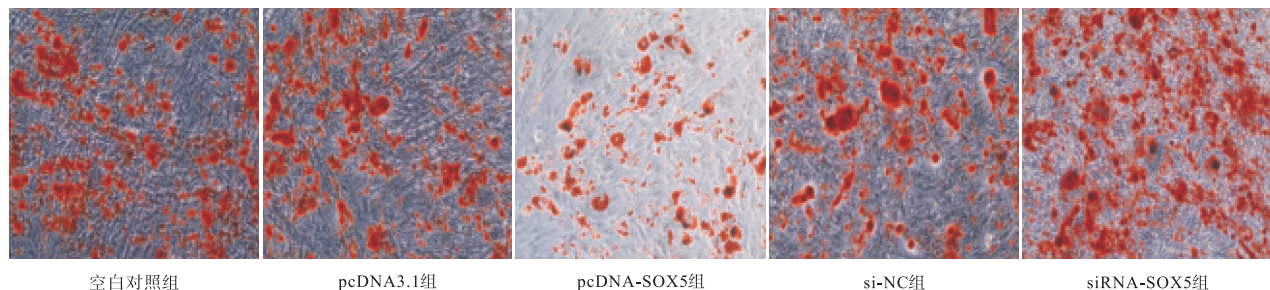


图 2 各组大鼠 OB 茜素红染色结果

OB 的增殖通常通过测量细胞总蛋白、ALP 活性和 Collagen I 分泌来评估。ALP 是 OB 分泌的一组膜结合糖蛋白,是 OB 早期分化的特异性标志,ALP 活性的高低,能较客观地反映 OB 分化成熟的程度<sup>[13]</sup>。Runx2、Collagen I 是 OB 相关的蛋白,在成骨分化活动中起重要的促进作用<sup>[4]</sup>,在增殖阶段,OB 分泌 Collagen I 以帮助矿化并减少骨质流失。OB 分化成熟后多层重叠生长形成结节样结构,并不

## 2.5 各组成骨细胞钙结节形成情况

倒置显微镜下观察可见细胞呈多层重叠生长,各组细胞间均可见橘红色钙化结节;与空白对照组相比,pcDNA-SOX5 组大鼠 OB 钙化结节数量和面积显著降低 ( $P < 0.05$ ),siRNA-SOX5 组大鼠 OB 钙化结节数量和面积明显增加 ( $P < 0.05$ ) (见图 2、表 5)。

## 2.6 各组成骨细胞分化及 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白的表达

与空白对照组相比, pcDNA-SOX5 组大鼠 OB 中 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$  蛋白表达显著升高,Runx2、Collagen I、I $\kappa$ B $\alpha$  表达显著降低 ( $P < 0.05$ ),siRNA-SOX5 组大鼠 OB 中 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$  蛋白表达明显降低,Runx2、Collagen I、I $\kappa$ B $\alpha$  表达明显增加 ( $P < 0.05$ ) (见图 3、表 6)。

## 3 讨论

OB 是骨形成的主要功能单位,负责骨骼重塑过程中骨骼基质的合成、分泌和矿化。OB 在维持骨量和减少骨质流失中起关键作用。刺激 OB 增殖并促进其分化成熟是调节骨代谢、促进新骨形成、修复骨缺损的重要方法<sup>[12]</sup>。MTT 法是检测细胞增殖的指标,可以反映生活细胞的代谢水平。本研究采用 MTT 法检测 SOX5 对 OB 增殖活性的影响,结果显示 SOX5 mRNA 过表达后,对体外培养的 OB 增殖有明显的抑制作用,而采用 siRNA 技术干扰 SOX5 的表达后,OB 增殖率明显增加;表明沉默 SOX5 具有促进 OB 增殖的作用。

断分泌基质和矿物质,形成矿化结节。茜素红染色可以评估成骨分化晚期细胞外基质矿化情况钙化结节的形成情况<sup>[14]</sup>。本实验中,将转染的 OB 用成骨培养基培养 7 d 后,通过 ALP 活性检测了 SOX5 对 OB 分化的影响,结果显示 SOX5 过表达后,ALP 活性值较低,OB 钙化结节数量和面积降低,且 Runx2、Collagen I 表达减少,分析可能与细胞增殖、分化受到抑制有关;而 SOX5 mRNA 表达下调时,ALP 活

性、细胞钙化程度及 Runx2、Collagen I 表达增加。分析沉默 SOX5 促进成骨细胞 ALP 活性的原因可能是:(1)与促进细胞增殖有关,OB 数量的增加,分泌的 ALP 也随之增加;(2)上调 ALP mRNA 表达水平,促进 ALP 的分泌,调节 OB 的分化。

表 5 各组大鼠 OB 钙化结节形成情况( $\bar{x} \pm s; n_i = 3$ )

分组	钙化结节数量	钙化结节面积/mm <sup>2</sup>
空白对照组	898.62 ± 51.43	60.54 ± 5.71
pcDNA3.1 组	901.05 ± 72.61	61.12 ± 5.63
pcDNA-SOX5 组	616.47 ± 60.54 *	33.28 ± 4.17 *
si-NC 组	895.09 ± 58.30	62.35 ± 4.24
siRNA-SOX5 组	1 174.81 ± 73.42 *	89.76 ± 6.79 *
<i>F</i>	28.70	41.08
<i>P</i>	<0.01	<0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	4 074.347	29.154

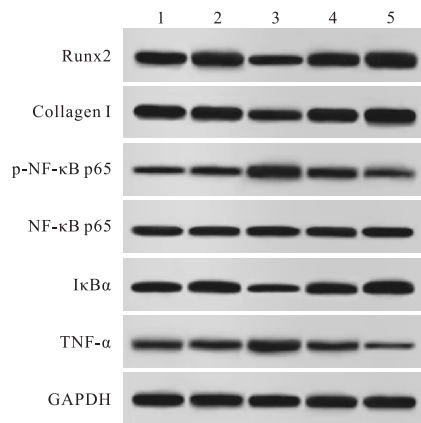
*q* 检验:与空白对照组比较 \* *P* < 0.05

表 6 各组大鼠 OB 分化及 NF-κB 信号通路相关蛋白的表达( $\bar{x} \pm s; n_i = 3$ )

分组	Runx2	Collagen I	p-NF-κB p65/NF-κB p65	IκBα	TNF-α
空白对照组	0.98 ± 0.10	1.12 ± 0.11	0.49 ± 0.04	0.89 ± 0.08	0.32 ± 0.02
pcDNA3.1 组	1.01 ± 0.09	1.10 ± 0.10 *	0.51 ± 0.05	0.91 ± 0.07	0.31 ± 0.03
pcDNA-SOX5 组	0.66 ± 0.07 *	0.74 ± 0.07 *	1.28 ± 0.11 *	0.40 ± 0.05 *	0.87 ± 0.06 *
si-NC 组	0.99 ± 0.06	1.08 ± 0.09	0.52 ± 0.07	0.88 ± 0.04	0.34 ± 0.04
siRNA-SOX5 组	1.25 ± 0.08 *	1.31 ± 0.12 *	0.33 ± 0.04 *	1.22 ± 0.06 *	0.16 ± 0.03 *
<i>F</i>	20.03	12.88	92.27	68.09	150.30
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	0.007	0.010	0.005	0.004	0.001

*q* 检验:与空白对照组比较 \* *P* < 0.05

NF-κB 控制主要骨骼细胞类型(破骨细胞<sup>[15]</sup>、成骨细胞<sup>[16]</sup>和软骨细胞<sup>[17]</sup>)的分化或活性。生理和病理性骨重塑的刺激都会影响 NF-κB 信号转导<sup>[18]</sup>;NF-κB 的启动子活性主要是由核移位和 NF-κB 磷酸化引起<sup>[19]</sup>。在静息细胞中,NF-κB 以 NF-κB/IκBα 复合物的形式存在于细胞质;在病理条件下,刺激激活核因子抑制剂 IκB 激酶(IκB kinases, IKKs),该激酶通过靶向将 IκBα 蛋白降解,释放 NF-κB 并允许其核移位和 DNA 结合,促进 TNF-α、IL-1β 等炎症因子的表达,减少骨细胞形成,使 OB 增殖、分化能力降低。研究发现 NF-κB 的激活下调 OB 分化<sup>[20]</sup>;抑制 IκBα 的降解,稳定 NF-κB/IκBα 复合物,可抑制 NF-κB 的活化,减少炎症因子的释放<sup>[21-22]</sup>。HUANG 等<sup>[23]</sup>发现在人牙槽骨 OB 分化中,三七皂苷 R1 可通过抑制 NF-κB 通路,逆转 TNF-α 诱导的钙结节和 ALP 活性的降低。杨青坡等<sup>[24]</sup>发现姜黄素能降低骨组织中 NF-κB 表达,明显改善 OP 大鼠骨密度。在本研究中,我们通过



1: 空白对照组; 2: pcDNA3.1组; 3: pcDNA-SOX5组; 4: si-NC组; 5: siRNA-SOX5组。

图3 各组大鼠OB分化及NF-κB信号通路相关蛋白表达

pcDNA3.1 质粒转染构建 SOX5 过表达 OB,发现大鼠 OB 中磷酸化 NF-κB p65、TNF-α 蛋白表达升高,IκBα 表达降低,说明 NF-κB 信号通路被激活;而沉默 SOX5 的表达后,IκBα 表达增加,磷酸化 NF-κB p65、TNF-α 表达降低,提示 NF-κB 信号通路被抑制。

综上所述,沉默 SOX5 具有促进 OB 增殖的作用,并可调节 OB 的分化,其作用机制可能与抑制 NF-κB 信号通路的激活有关,过表达 SOX5 则发挥相反作用。但本研究尚存在一定不足,未对 NF-κB 信号通路进行干扰从反面进行验证;此外,由于体内环境的巨大差异,在体内沉默 SOX5 是否发挥相同的作用,有待进一步研究。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] MENG YC, LIN T, JIANG H, *et al.* miR-122 exerts inhibitory effects on osteoblast proliferation/differentiation in osteoporosis by activating the PCP4-Mediated JNK pathway[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20:345.
- [2] 杨青, 聂子淮, 滕斌, 等. 基于 FRAX 风险评估的分层管理在

- 社区老年骨质疏松症病人中的应用研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(2): 254.
- [3] CHOTIYARNWONG P, MCCLOSKEY EV. Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis and options for treatment [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(8): 437.
- [4] HUANG M, LI X, ZHOU C, *et al.* Noncoding RNA miR-205-5p mediates osteoporosis pathogenesis and osteoblast differentiation by regulating RUNX2 [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(10): 4196.
- [5] ZAWERTON A, MIGNOT C, SIGAFOOS A, *et al.* Widening of the genetic and clinical spectrum of lamb-shaffer syndrome, a neurodevelopmental disorder due to SOX5 haploinsufficiency[J]. *Genet Med*, 2020, 22(3): 524.
- [6] LIU F, LIU X, YANG Y, *et al.* NEAT1/miR-193a-3p/SOX5 axis regulates cartilage matrix degradation in human osteoarthritis[J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(4): 947.
- [7] EDWARDS SK, DESAI A, LIU Y, *et al.* Expression and function of a novel isoform of Sox5 in malignant B cells[J]. *Leuk Res*, 2014, 38(3): 393.
- [8] 吴琴, 石雨濛, 骆爱姝, 等. 转录因子 SOX5 在类风湿关节炎病人中的表达及意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2019, 23(1): 46.
- [9] 张磊, 宁玉辉, 李国顺, 等. 敲低 SOX5 对骨关节炎软骨细胞生物学功能的影响[J]. *中国骨与关节杂志*, 2017, 6(12): 932.
- [10] XU L, ZHENG L, WANG Z, *et al.* TNF- $\alpha$ -induced SOX5 upregulation is involved in the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells through KLF4 signal pathway[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(6): 575.
- [11] 艾力麦尔旦·艾尼瓦尔, 王玲, 古丽, 等. 转化生长因子  $\beta$ 3 对成骨细胞增殖和成骨能力的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(17): 2664.
- [12] RAMENZONI LL, BÖSCH A, PROKSCH S, *et al.* Effect of high glucose levels and lipopolysaccharides-induced inflammation on osteoblast mineralization over sandblasted/ acid-etched titanium surface[J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2020, 22(2): 213.
- [13] VIMALRAJ S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization[J]. *Gene*, 2020, 754: 144855.
- [14] FAN Q, LI Y, SUN Q, *et al.* miR-532-3p inhibits osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells by downregulating ETS1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525(2): 498.
- [15] TAKAKURA N, MATSUDA M, KHAN M, *et al.* A novel inhibitor of NF- $\kappa$ B-inducing kinase prevents bone loss by inhibiting osteoclastic bone resorption in ovariectomized mice [J]. *Bone*, 2020, 135: 115316.
- [16] MISHRA R, SEHRING I, CEDERLUND M, *et al.* NF- $\kappa$ B signaling negatively regulates osteoblast dedifferentiation during zebrafish bone regeneration[J]. *Dev Cell*, 2020, 52(2): 167.
- [17] SUN PF, KONG WK, LIU L, *et al.* Osteopontin accelerates chondrocyte proliferation in osteoarthritis rats through the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(6): 2836.
- [18] 邓海林, 陆铭羚, 唐哲明, 等. 成骨细胞经 NF- $\kappa$ B 通路介导风湿性关节炎的相关机制研究[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2020, 35(7): 779.
- [19] 侯道荣, 刘振, 崔斯童, 等. 丹参酮 II-A 通过调控 TLR4/I $\kappa$ B $\alpha$ /NF $\kappa$ B 信号通路抑制 LPS 诱导的细胞炎症[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(2): 210.
- [20] XU W, LU Y, YUE J, *et al.* Occlusal trauma inhibits osteoblast differentiation and bone formation through IKK-NF- $\kappa$ B signaling [J]. *J Periodontol*, 2020, 91(5): 683.
- [21] VENUGOPAL M, NAMBIAR J, NAIR BG. Anacardic acid-mediated regulation of osteoblast differentiation involves mitigation of inflammasome activation pathways [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(2): 819.
- [22] SUEISHI T, AKASAKI Y, GOTO N, *et al.* GRK5 inhibition attenuates cartilage degradation via decreased NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(4): 620.
- [23] HUANG L, LI Q. Notoginsenoside R1 promotes differentiation of human alveolar osteoblasts in inflammatory microenvironment through inhibiting NF- $\kappa$ B pathway and activating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 4754.
- [24] 杨青坡, 穆合塔尔·买买提热夏提, 王法正, 等. 姜黄素联合有氧运动对骨质疏松大鼠骨密度、氧化应激能力及骨组织 NF- $\kappa$ B 的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(1): 55.

(本文编辑 刘梦楠)