

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.05.001

• 基础研究 •

Bmi1 过表达通过促进增殖、抑制凋亡纠正活性维生素 D 缺乏引起的骨量降低 *

刘轶宁¹ 孙海建³ 崔敏² 周佳雯¹ 苗登顺^{1Δ}

(1 南京医科大学人体解剖与组织胚胎学系 骨与干细胞研究中心 江苏 南京 211166;

2 南京医科大学基础医学国家级实验教学示范中心 江苏 南京 211166; 3 天津医科大学朱宪彝纪念医院 天津 300134)

摘要 目的:探索 B 淋巴瘤 Mo-MLV 插入区 1 (B cell-specific MLV integration site-1, Bmi-1) 过表达能否通过促进增殖、抑制凋亡改善 1,25-二羟基维生素 D (1,25-dihydroxy vitamin d, 1,25(OH)₂D) 缺乏引起的小鼠骨质疏松。 **方法:**取 8 月龄 Bmi-1^{Tg}、Bmi1^{Tg} 1α (OH)ase^{-/-} 与 1α (OH)ase^{-/-} 小鼠以及同窝野生型 (wild type, WT) 小鼠椎骨组织, 通过流式细胞术及 TUNEL 染色检测间充质干细胞周期变化及凋亡水平, 通过 PCNA 染色及免疫组织化学染色检测小鼠椎骨组织中 Bcl-2、Caspase-3 等指标的变化, 通过 Western blot 检测小鼠椎骨中 Caspase-3、CDK4、CDK6、OPN、OCN 等蛋白表达量的差异, 通过 ALP 染色检查成骨细胞骨形成水平。 **结果:**在骨髓间充质干细胞中过表达 Bmi1 可以通过促进增殖、抑制凋亡、增加成骨细胞骨形成来纠正 1α (OH)ase^{-/-} 小鼠的骨量降低。 **结论:**Bmi1 是 1,25(OH)₂D 的关键下游靶点, 在防止 1,25(OH)₂D 缺乏引起的骨丢失方面起着至关重要的作用。

关键词:骨髓间充质干细胞; 抑制凋亡; 促进增殖; 骨质疏松症

中图分类号:R-33; R681; Q565 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)05-801-07

Overexpression of Bmi1 Corrects Bone Loss Caused by Active Vitamin D Deficiency by Promoting Proliferation and Inhibiting Apoptosis*

LIU Yi-ning¹, SUN Hai-jian³, CUI Min², ZHOU Jia-wen¹, MIAO Deng-shun^{1Δ}

(1 Department of anatomy, Histology and Embryology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China;

2 National Experimental Teaching Demonstration Center of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China; 3 Zhu Xianyi Memorial Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin, 300134, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether overexpression of B cell-specific MLV integration site-1 (Bmi-1) can improve the phenotype of osteoporosis caused by 1,25(OH)₂D (1,25-dihydroxy vitamin d) deficiency in mice by promoting proliferation and inhibiting apoptosis. **Methods:** Vertebral tissues of 8-month-old Bmi-1^{Tg}, Bmi1^{Tg} 1α (OH)ase^{-/-} and 1α (OH)ase^{-/-} mice and homogenous Wild type (WT) mice were taken, and the cycle and apoptosis levels of mesenchymal stem cells were detected by flow cytometry and TUNEL staining. The changes of Bcl-2, Caspase-3 and other indexes in mouse vertebral tissues were detected by PCNA staining and immunohistochemical staining. Western blot was used to detect the protein expression levels of Caspase-3, CDK4, CDK6, OPN and OCN in mouse vertebrae, and ALP staining was used to check the level of osteoblast bone formation. **Results:** Overexpression of Bmi1 in bone marrow mesenchymal stem cells can correct the bone phenotype of 1α (OH)ase^{-/-} mice by promoting proliferation, inhibiting apoptosis and increasing osteoblast bone formation. **Conclusions:** Bmi1 is a key downstream target of 1,25 (OH)₂D and plays a critical role in preventing bone loss caused by 1,25 (OH)₂D deficiency.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cell; Inhibition of apoptosis; Promote proliferation; Osteoporosis

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R681; Q565 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)05-801-07

前言

骨质疏松症是以骨密度降低、骨微结构破坏、易发骨折为

特征的一种常见的全身性退行性骨病^[1]。非遗传因素包括年龄、性别、不良生活习惯、激素水平的改变、衰老和氧化应激增加等^[2-4]。骨质疏松症可导致骨折、疼痛、生活质量下降,严重时

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81730066)

作者简介:刘轶宁(1996-),女,硕士研究生,主要研究方向:骨与干细胞,E-mail: 543278211@qq.com

Δ 通讯作者:苗登顺,男,博士生导师,教授,主要研究方向:衰老,骨与干细胞,肿瘤,E-mail: miaojnmu@sina.com

(收稿日期:2021-09-27 接受日期:2021-10-23)

危及生命,并给家庭和社会带来沉重的经济负担。在美国,估计每年发生 200 万例骨质疏松性骨折,导致超过 50 万人住院,超过 80 万次急诊室就诊,超过 260 万名医生就诊^[5,6]。因此,防治骨质疏松症刻不容缓。

1,25-二羟基维生素 D₃[1,25(OH)₂D]是维持骨骼健康的重要因素^[7,9]。维生素 D 除少量在肠道吸收,皮肤合成是主要来源。维生素 D 在肝脏 25-羟化酶的作用下转化为 25-羟基维生素 D₃[25(OH)₂D],然后在肾脏 1- α -羟化酶(由 Cyp27b1 编码)作用下转化为 25-羟基维生素 D₃[25(OH)₂D]^[9,10],通过与维生素 D 受体(Vitamin D receptor, VDR)结合发挥生物学作用^[11]。维生素 D 最重要的功能之一是维持骨钙和磷酸盐平衡,缺乏 VD 可导致较低的矿物密度。因此,VD 常被用于预防或治疗佝偻病、骨软化症、骨质疏松症和儿童骨折^[12]。维生素 D 对骨骼的正常矿化是必不可少的^[13]。维生素 D 参与成骨细胞和破骨细胞的骨生长和骨重建^[14],当其缺乏到一定阈值之后会加速骨转换、骨丢失和骨质疏松性骨折^[15],因此,研究维生素 D 对于治疗骨质疏松症是十分必要的。

为了研究 1,25(OH)₂D 的在体功能,我们通过敲除 1 α (OH)ase 基因建立了 1,25(OH)₂D 缺乏 1 α (OH)ase^{-/-}的小鼠模型。在前期的研究中我们观察到,与同窝野生型(Wild type, WT)小鼠相比,1 α (OH)ase^{-/-}小鼠中骨量降低和骨微结构变化与 B 淋巴瘤 Mo-MLV 插入区 1 (B cell-specific MLV integration site-1, Bmi-1)表达下降有关,但其具体机制尚不清楚^[16]。凋亡是由内外环境激发所致细胞自身主动、有序的死亡方式。而细胞凋亡与骨质疏松症之间有着密切的联系。最近有研究表明,成人骨量的维持不仅受破骨细胞和成骨细胞数量变化的控制,还通过调节细胞凋亡改变它们各自的寿命^[17,18],那骨髓间充质干细胞过表达 Bmi1 能否通过抑制凋亡、促进增殖纠正 1,25(OH)₂D 缺乏引起的骨量降低呢?我们将 Bmi-1^{tg}、Bmi1^{tg} 1 α (OH)ase^{-/-}与 1 α (OH)ase^{-/-}同 WT 小鼠 8 月龄的骨表型进行比较。比较同窝四种基因型小鼠增殖、凋亡水平的表达变化,以进一步验证骨髓间充质干细胞中的过表达 Bmi1 是否可通过促进增殖、抑制凋亡从而改善由 1,25(OH)₂D 缺失引起的小鼠骨量降低。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 实验用 8 月龄 BmiTg 小鼠、1 α (OH)ase^{-/-}小鼠、Bmi1^{tg}1 α (OH)ase^{-/-}小鼠及同窝野生型对照小鼠各 6 只,雌雄不限,21 日龄断奶。每笼 5 只雄性小鼠被分开饲养。所有受试动物均饲喂含钙 1.0%、磷 0.67%、维生素 D 2.2 IU/g 的普通饲料(#1010013;江苏省协同医学生物工程有限公司,南京)。所有实验程序均经动物实验伦理委员会预审,并遵循南京医科大学小鼠实验指南(编号:IACUC-1802007)。

1.1.2 试剂 兔抗 Bcl-2 单克隆抗体(Abcam 公司,英国);兔抗 Caspase-3 单克隆抗体(Abcam 公司,英国);兔抗 Cdk4 单克隆抗体(Abcam 公司,英国);兔抗 Cdk6 单克隆抗体(Abcam 公司,英国);兔抗 Osteopontin 单克隆抗体(Abcam 公司,英国);兔抗 Osteocalcin 多克隆抗体(Abcam 公司,英国);羊抗兔 IgG (武汉博士德公司), β -actin(Bio-world Technology, 美国);羊抗兔 IgG-HRP(KPL 公司,美国);Elite ABC Kit(Vector 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物基因型的鉴定 1 α (OH)ase 小鼠基因型引物序列:

正向引物:5'-GAAGTCCCTCCTGACACAGAAACCT-3';

负向引物:5'-CTCATAGAGTGTCCAGGAGAGCGTA-3';

Neo- 正向引物:5'-ACAACAGACAATCGGCTGCTC-3';

Neo- 负向引物:5'-GAAGTCCCTCCTGACACAGAAACCT-3';

Bmi1 敲除小鼠基因型引物序列:

正向引物:5'-CAGTTAGGCAGTATGTAGTTTTC-3';

负向引物:5'-GTTGTGGTGGAGTGTAAGAGTGT-3';

Neo- 正向引物:5'-AAGATGTTGGCGACCTCGTATTGG-3';

Neo- 负向引物:5'-GCAAGACCTGCCTGAAACCGAACT-3';

间充质干细胞过表达 Bmi1 小鼠基因型引物序列:

正向引物:5'-GGCTCTCTCCTTAGCTTCCC-3';

负向引物:5'-CCTTATGTTTCAGGAGTGGTCTG-3'。

所有基因型引物均由上海 Genray 公司合成。

1.2.2 取材 将同窝 8 月龄雄性 WT、1 α (OH)ase^{-/-}、Bmi1^{tg}和 1 α (OH)ase^{-/-}Bmi1^{tg}小鼠用 2%水合氯醛麻醉后,进行眼球取血,2-3 小时后离心,将获得的血清保存于 -80 °C 冰箱中;取椎骨,其中颈椎冻存于 -80 °C 冰箱,腰椎固定后进行组织切片染色。

1.2.3 骨组织脱钙 将固定的腰椎组织依次在以下溶液中浸泡:(1)5%甘油-PBS 12 小时(5 毫升甘油溶于 100 毫升 PBS 缓冲液);(2)10%甘油-PBS 12 小时(10 毫升甘油溶于 100 毫升 PBS 缓冲液);(3)15%甘油-PBS 12 小时(15 毫升甘油溶于 100 毫升 PBS 缓冲液);(4)置于室温脱钙液中 2 周,并每隔一天更换一次脱钙液(脱钙液配方:EDTA145 克,150 毫升丙三醇,氢氧化钠 125 克,将 pH 调整为 7.3,定容至 1000 毫升);(5)7.5 毫升甘油及 15 克蔗糖溶于 100 毫升 PBS 缓冲液(12 小时);(6)15 克蔗糖溶于 100 毫升 PBS 缓冲液(12 小时);(7)PBS 缓冲液。

1.2.4 包埋切片 75%ETOH(6-8 小时)--80%ETOH(40 分钟)--90%ETOH(40 分钟)--95%ETOH(40 分钟)--95%ETOH(40 分钟)--100%ETOH(40 分钟)--100%ETOH(40 分钟)--二甲苯。ETOH(25 分钟)--二甲苯(25 分钟)--二甲苯·石蜡(40 分钟)--石蜡 I(40 分钟)--石蜡 II(40 分钟)--腰椎包埋(背侧面朝上),切片(5 μ m)。

1.2.5 免疫组织化学染色 椎骨组织切片经柠檬酸盐煮沸抗原修复,PBS 洗涤(5 min/次 $\times$ 3 次),3%H₂O₂-PBS 孵育 30 分钟,PBS 洗涤(5 min/次 $\times$ 3 次),0.5%的 BSA-PBS 孵育 120 分钟,0.5%的 BSA-PBS 稀释一抗(1:200),覆盖组织,4 °C 过夜。室温放置 30-60 分钟,PBS 洗涤(5 min/次 $\times$ 3 次),加入酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物孵育 60-120 分钟,PBS 洗涤(5 min/次 $\times$ 3 次),显色(GK8005,基因科技(上海)股份有限公司)。苏木素染色 3 分钟,在 1%盐酸酒精溶液中抽提 2 次,流水冲洗三分钟,梯度浓度酒精和二甲苯各 2 分钟,封片。

1.2.6 免疫蛋白印记实验 取绿豆大小的椎体,将脊髓去除,加入蛋白裂解液(RIPA),检测蛋白浓度,根据浓度计算成最终上样液中每 10 微升含有 20 微克蛋白,将蛋白在 100 °C 条件下煮 10 分钟,冷却保存。电泳(70 V-30 分钟;110 V-90 分钟),恒流 280 mA 转膜 120 分钟。用含 0.5%牛血清白蛋白的封闭液进行封闭 60 分钟。按照 1:2000 的比例用 0.5%牛血清白蛋白

稀释一抗,4℃放置过夜。第二天室温条件下置于摇床上30分钟,PBST洗涤(5 min/次×3次),加入对应的二抗进行孵育。1-2小时后,PBST洗涤(5 min/次×3次),曝光显影。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 取同窝8月龄Bmi1^{+/+}小鼠、1 α (OH)ase^{-/-}小鼠、Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}小鼠及野生型对照小鼠取骨髓间充质干细胞(包括细胞培养上清液,注意使用不含EDTA的胰酶消化细胞),吹打混匀成细胞悬液,转移至标记好的流式管中,低速离心5 min。弃去上清,加入预冷的PBS清洗2次,小心吸尽细胞沉淀上残留的PBS(可用纸吸尽),涡旋振荡30 s,使细胞成均匀悬浮液。每管加入200微升含钙离子的结合缓冲液,再加入5微升Annexin V-FITC荧光探针和5微升的碘化丙啶(PI),轻轻振荡混匀,避光孵育15 min。最后加入400微升结合缓冲液,涡旋振荡混匀后,上流式细胞仪利用FL1和FL3双通道波长检测。

1.3 统计学方法

所有实验和分析使用GraphPad Prism软件6.0,测得的数据显示为平均值±标准差(SD),并且通过Student t检验或双向ANOVA进行比较。*P*值<0.05被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 间充质干细胞过表达Bmi1通过抑制凋亡矫正1,25(OH)₂D缺乏引起的骨质疏松

为了明确间充质干细胞过表达Bmi1通过抑制凋亡矫正1,25(OH)₂D缺乏引起的骨质疏松,我们给予同窝的WT、Bmi1^{+/+}、1 α (OH)ase^{-/-}和Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}的雄性小鼠正常饮食饲养至8月龄,应用流式细胞术检测骨髓间充质干细胞的凋亡情况,见图1。结果显示:与WT小鼠相比,Bmi1^{+/+}小鼠的细胞凋亡率显著降低;1 α (OH)ase^{-/-}小鼠的细胞凋亡率显著升高。与1 α (OH)ase^{-/-}小鼠相比,Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}小鼠的细胞凋亡率显著降低;通过TUNEL染色我们发现:与WT小鼠相比,1 α (OH)ase^{-/-}小鼠TUNEL阳性细胞数显著增多。与1 α (OH)ase^{-/-}小鼠相比,Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}小鼠TUNEL阳性细胞数显著减少,见图2。

利用Western Blot、免疫组织化学染色比较分析了四种基因型小鼠椎骨组织中凋亡水平的差异,结果显示:与WT小鼠相比,1 α (OH)ase^{-/-}小鼠的椎骨组织中凋亡相关蛋白Caspase-3蛋白表达水平和阳性骨细胞百分率均明显增加,Bcl-2阳性骨细胞百分率明显降低;与1 α (OH)ase^{-/-}小鼠相比,Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}小鼠椎骨组织中凋亡相关蛋白Caspase-3蛋白表达水平和阳性骨细胞百分率均明显降低,Bcl-2蛋白表达水平和阳性骨细胞百分率均明显升高,见图3。应用流式细胞术检测骨髓间充质干细胞的周期情况,结果显示:与WT组相比,1 α (OH)ase^{-/-}组细胞G0/G1期比例明显升高,差异有统计学意义(*t*=3.821, *P*<0.05);与1 α (OH)ase^{-/-}组相比,Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}组细胞S期比例明显下降,差异有统计学意义(*t*=3.019, *P*<0.05),见图4A。利用Western Blot比较分析了上述四种基因型小鼠椎骨组织细胞周期相关蛋白表达的差异,结果显示:与WT小鼠相比,1 α (OH)ase^{-/-}小鼠的椎骨组织中周期相关蛋白CDK4、CDK6蛋白表达水平均明显降低;与1 α (OH)ase^{-/-}小鼠相比,Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}小鼠骨髓细胞椎骨组织中周期相关蛋白CDK4、

CDK6、蛋白表达水平均明显增加,见图4B-D。

上述结果表明,间充质干细胞过表达Bmi1能够通过抑制细胞凋亡矫正1,25(OH)₂D缺乏引起的骨质疏松。

2.2 间充质干细胞过表达Bmi1通过促进增殖矫正1,25(OH)₂D缺乏引起的骨质疏松

为了明确间充质干细胞过表达Bmi1能否通过促进增殖矫正1,25(OH)₂D缺乏引起的骨质疏松,我们给予同窝WT、Bmi1^{+/+}、1 α (OH)ase^{-/-}和Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}的雄性小鼠正常饮食饲养至8月龄,利用免疫组织化学染色比较分析了上述四种基因型小鼠的骨骼表型差异。结果显示:增殖相关指标PCNA阳性骨细胞百分率在1 α (OH)ase^{-/-}小鼠较WT小鼠明显降低,而在Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}小鼠中较1 α (OH)ase^{-/-}小鼠明显上调,见图5。以上结果表明,间充质干细胞过表达Bmi1通过促进增殖矫正1,25(OH)₂D缺乏引起的骨质疏松。

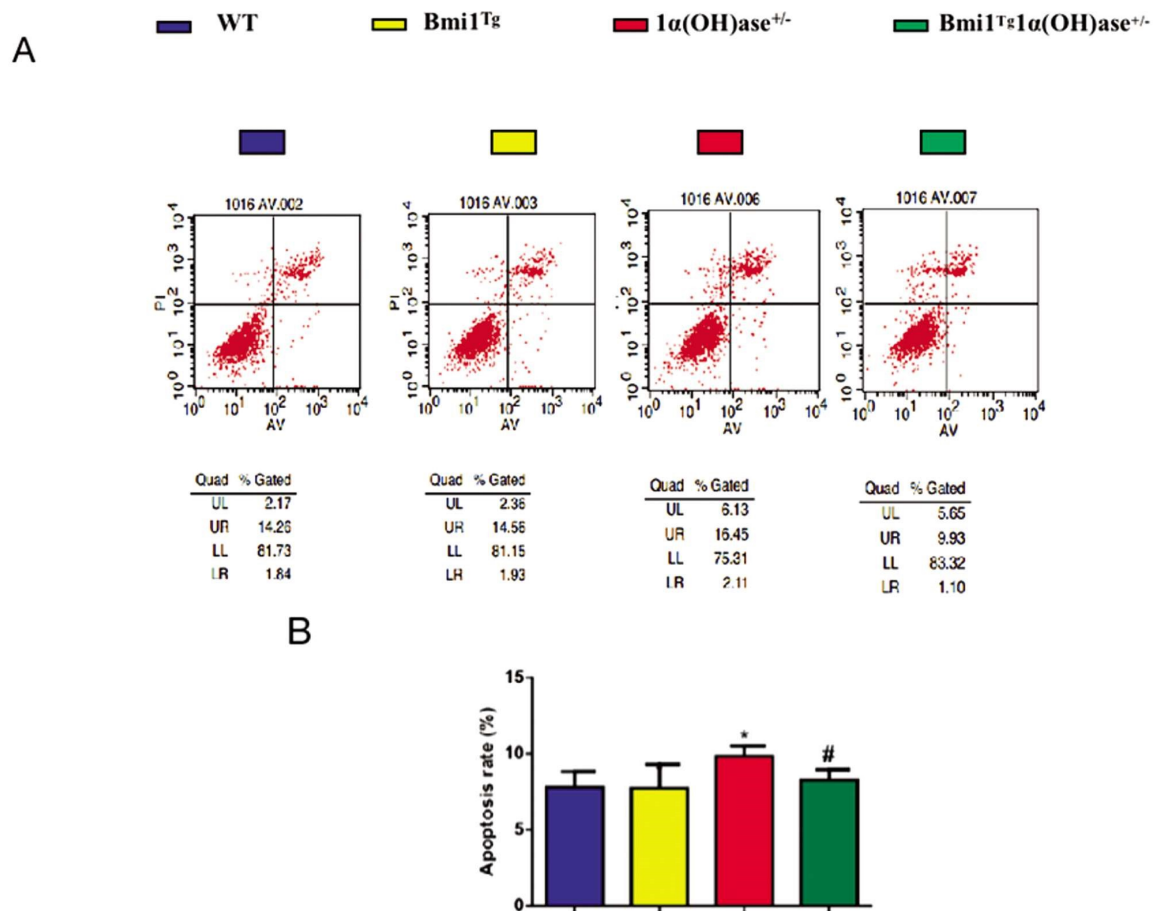
2.3 间充质干细胞过表达Bmi1通过促进成骨细胞骨形成矫正1,25(OH)₂D缺乏引起的骨质疏松

为了明确间充质干细胞过表达Bmi1能否通过促进成骨细胞骨形成矫正1,25(OH)₂D缺乏引起的骨质疏松,我们给予同窝WT、Bmi1^{+/+}、1 α (OH)ase^{-/-}和Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}雄性小鼠正常饮食饲养至8月龄,利用Western Blot实验比较分析了上述四种基因型小鼠椎骨组织中成骨相关指标的差异,结果显示:1 α (OH)ase^{-/-}小鼠椎骨组织中OPN、OCN表达水平与WT小鼠相比显著降低;Bmi1^{+/+}1 α (OH)ase^{-/-}小鼠椎骨组织中OPN、OCN表达水平与1 α (OH)ase^{-/-}小鼠相比显著升高,见图6。这些结果表明,间充质干细胞过表达Bmi1能够矫正1,25(OH)₂D₃缺乏引起的成骨细胞骨形成降低。(A)椎骨组织中凋亡相关蛋白OPN、OCN的Western Blot结果;(B)OPN蛋白表达量统计图;(C)OCN蛋白表达量统计图;与WT小鼠比***P*<0.01,****P*<0.001,*****P*<0.0001;与同窝1 α (OH)ase^{-/-}小鼠相比####*P*<0.0001,(*n*=6)。

3 讨论

几个世纪以来,骨骼一直被认为是运动的代名词,保护重要器官,并提供现成的钙和磷储备^[19]。骨是一个动态组织,自身不断重塑。这种重建是由两种细胞完成的:侵蚀骨骼中空洞的破骨细胞群和合成新骨基质的成骨细胞群。骨细胞的局部改变会影响破骨细胞和成骨细胞,大多数骨骼的代谢紊乱是由于破骨细胞骨吸收和成骨细胞骨形成不平衡所致^[20],从而导致骨质疏松^[21]。有研究表明,骨量的维持不仅受破骨细胞和成骨细胞的影响,而且还通过调节凋亡来改变它们各自的寿命。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡的形式,它能有序有效地清除受损细胞^[21]。细胞增殖是生物体的重要生命特征,细胞以分裂的方式进行增殖,用来补充体内衰老或死亡的细胞。可见,细胞增殖是生物体生长、发育、繁殖和遗传的基础。

1,25(OH)₂D在维持矿物质和骨骼平衡方面起着关键作用,缺乏1,25(OH)₂D会破坏骨骼的稳态。流行病学研究表明,维生素D缺乏是一个全球性的健康问题^[22],可增加骨质疏松、跌倒和骨折的风险^[23,24],而长期补充维生素D和钙能有效预防这些结果^[25]。先前已有实验证明老年1 α (OH)ase^{-/-}小鼠血清中1,25(OH)₂D水平显著降低,表现为骨质疏松表型,1 α (OH)ase^{-/-}小鼠



A: 流式细胞术检测 8 月龄 WT、Bmi1^{Tg}、1 α (OH)ase^{+/-} 和 Bmi1^{Tg}1 α (OH)ase^{+/-} 小鼠骨髓间充质干细胞凋亡图片; B: 凋亡百分率统计图。

与 WT 小鼠比 * P <0.1; 与 Bmi1^{Tg} 小鼠相比 # P <0.1, (n=6)。

图 1 流式细胞术检测间充质干细胞过表达 Bmi1 对 1,25(OH)₂D 缺乏引起的凋亡水平的影响

Fig.1 Flow cytometry showed that Bmi1 overexpression of mesenchymal stem cells could correct the increased apoptosis induced by 1,25(OH)₂D deficiency

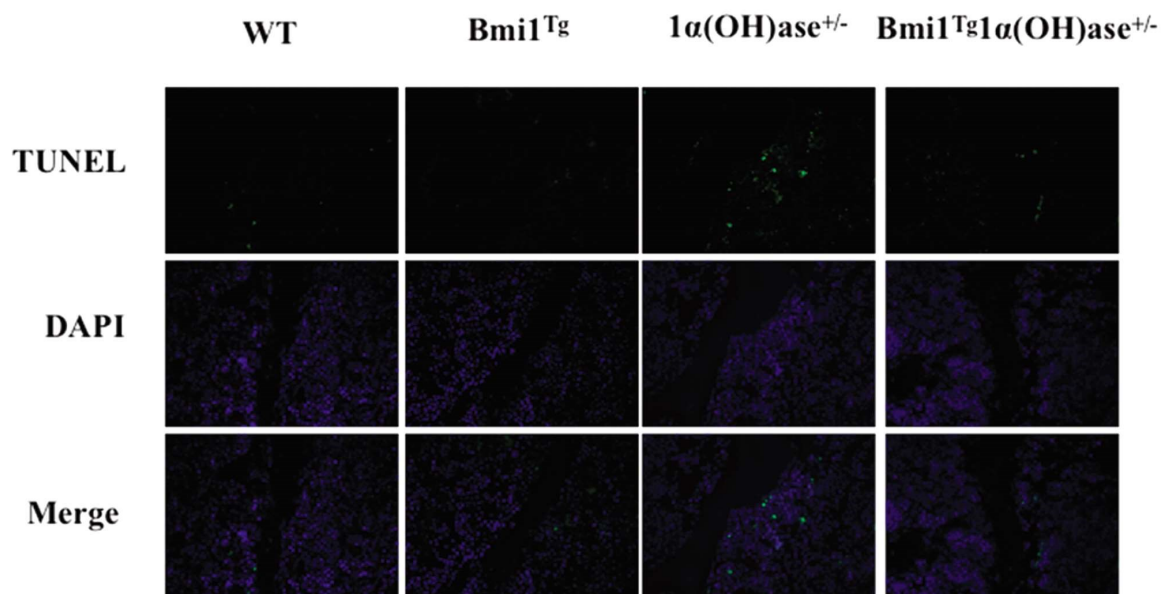
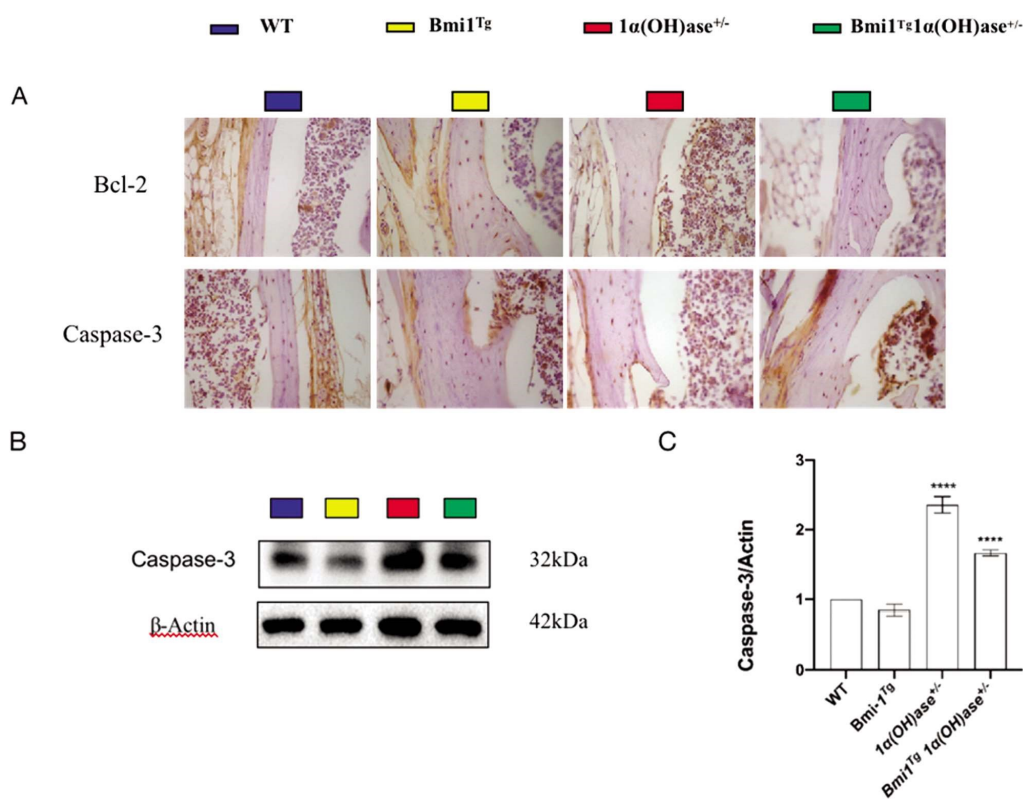


图 2 TUNEL 染色检测间充质干细胞过表达 Bmi1 对 1,25(OH)₂D 缺乏引起的凋亡增加的影响

Fig. 2 TUNEL staining was used to detect the effect of Bmi1 overexpression on apoptosis induced by 1,25(OH)₂D deficiency in mesenchymal stem cells

可以用作 1,25(OH)₂D 缺乏症的动物模型^[8]。因此,为了研究 1,25(OH)₂D 缺乏症在骨质疏松症发病机理中的作用,我们利用

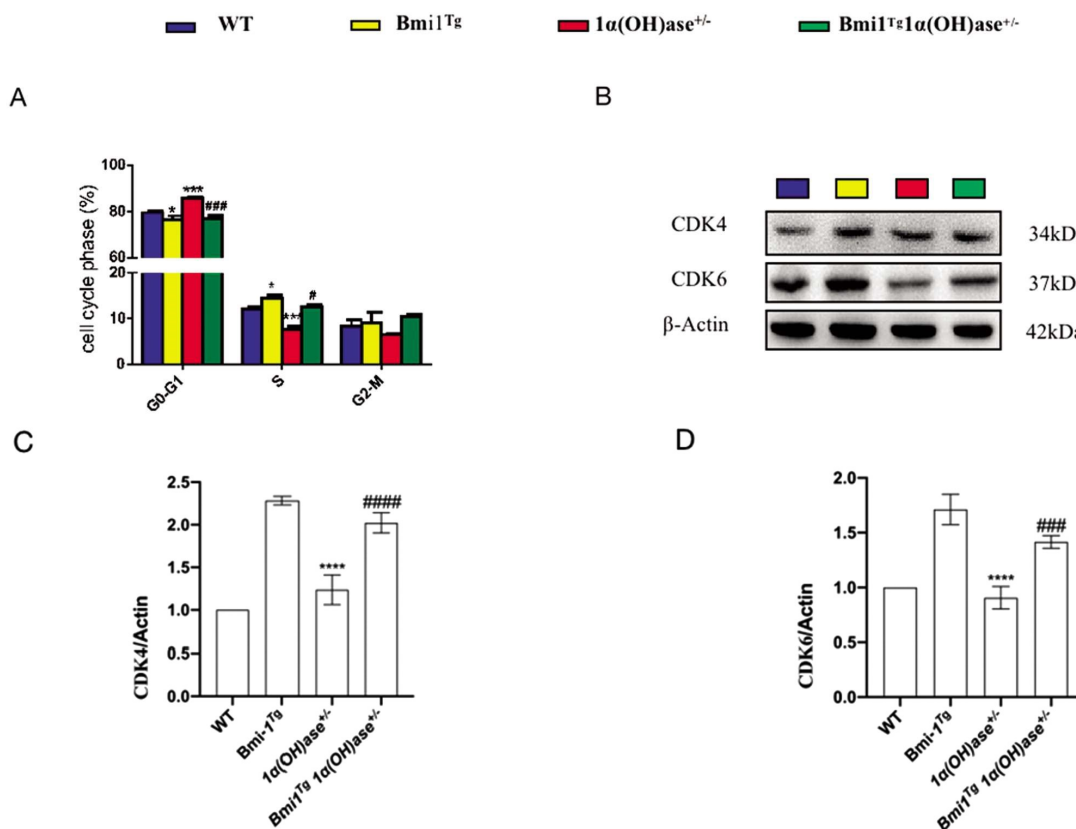
1 α (OH)ase^{+/-} 小鼠作为 1,25(OH)₂D 缺乏的小鼠模型。Bmi1 基因缺失后,小鼠氧化应激水平升高,导致骨质疏松、男性不育、女



(A)椎骨组织切片 Bcl-2、Caspase-3 免疫组织化学染色显微图像;(B)椎骨组织中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Caspase-3 的 Western Blot 结果;
(C)Caspase-3 蛋白表达量统计图;与 WT 小鼠比 **** $P < 0.0001$; (n=6)。

图 3 椎骨组织中凋亡相关蛋白和阳性骨细胞表达水平

Fig. 3 Expression levels of apoptosis-related proteins and positive osteocytes in vertebrae tissue



(A)流式细胞术检测细胞周期;(B)椎骨组织中凋亡相关蛋白 CDK4 和 CDK6 的 Western Blot 结果;(C)CDK4 蛋白表达量统计图;(D)CDK6 蛋白表达量统计图;与 WT 小鼠比 ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$;与同窝 1α(OH)ase^{+/-} 小鼠相比 ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ (n=6)。

图 4 间充质干细胞过表达 Bmi1 对 1,25(OH)₂D 缺乏引起的周期变化的影响

Fig.4 Effect of Bmi1 overexpression on 1,25(OH)₂D deficiency induced cycle changes in mesenchymal stem cells

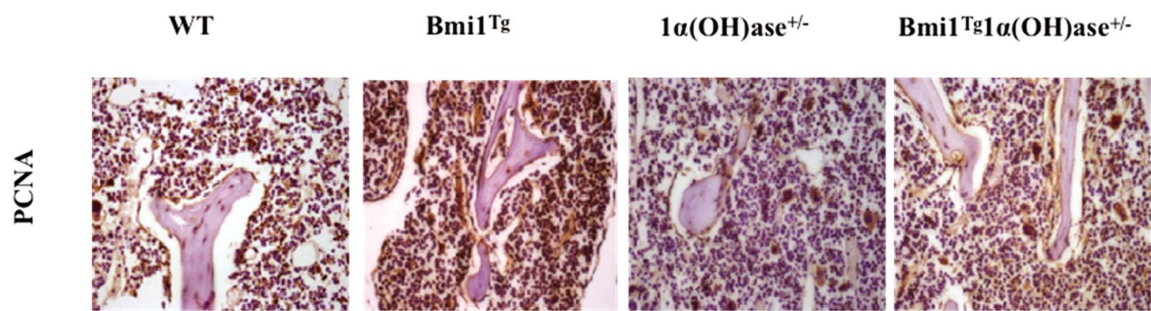


图 5 间充质干细胞过表达 Bmi1 矫正 1,25(OH)₂D 缺乏引起的增殖能力降低

Fig.5 Bmi1 overexpression of mesenchymal stem cells corrects reduced proliferation induced by 1,25(OH)₂D deficiency

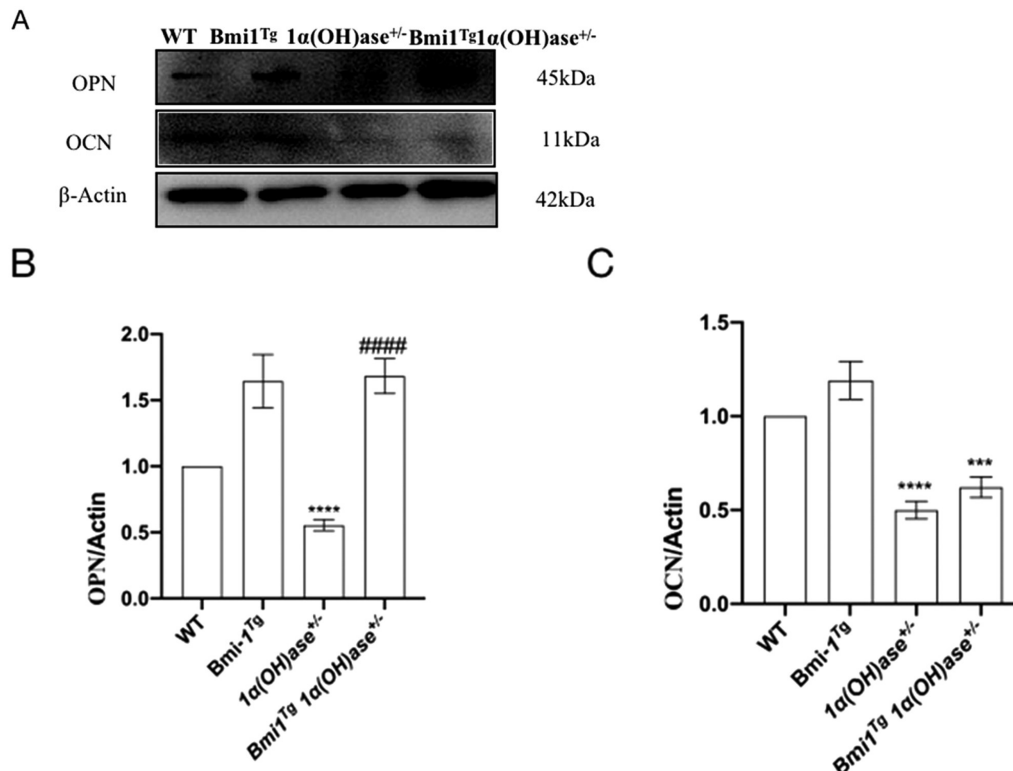


图 6 间充质干细胞过表达 Bmi1 矫正 1,25(OH)₂D 缺乏引起的成骨细胞骨形成降低

Fig. 6 Bmi1 overexpression of mesenchymal stem cells corrects reduced osteoblast bone formation caused by 1,25(OH)₂D deficiency

性不育等早衰表现^[27-31]。我们以前报道过 Bmi1 缺失引起的骨质疏松症是由骨髓 MSCs 增殖受损和 p16Ink4a/p19Arf 信号通路激活引起的^[33]。本实验室构建了骨髓间充质干细胞中过表达 Bmi1 的转基因小鼠,证明了骨髓间充质干细胞中过表达 Bmi1 可以促进骨髓间充质干细胞的成骨作用,加速骨生长,增加骨量^[26]。既往研究表明,Bmi1 过表达可以挽救 1,25(OH)₂D 缺失小鼠的相关表型^[8],但对于 1,25(OH)₂D 缺失小鼠的骨增殖、凋亡对骨质疏松表型的影响尚不明确。因此本实验中,我们用骨髓间充质干细胞过表达 Bmi1 基因的 1α(OH)ase^{+/-} 小鼠(Bmi1^{Tg}1α(OH)ase^{+/-})模型与同窝 Bmi1^{Tg}、1α(OH)ase^{+/-} 及 WT 小鼠对比,探索骨髓间充质干细胞过表达 Bmi1 通过抑制骨组织的凋亡,促进细胞增殖从而发挥矫正 1,25(OH)₂D 缺乏引起的骨质疏松的作用。我们发现在骨髓间充质干细胞中过表达 Bmi1 基因能够矫正 8 月龄 1α(OH)ase^{+/-} 小鼠的增殖、凋亡等异常,从而矫正 1,25(OH)₂D₃ 缺乏引起的骨质疏松表型。

我们的结果表明,骨髓间充质干细胞中 Bmi1 的过表达通

过抑制细胞凋亡促进细胞增殖及成骨细胞骨形成来纠正 1,25(OH)₂D 缺乏症引起的骨丢失。但是,骨髓间充质干细胞过表达 Bmi1 抑制细胞凋亡促进骨细胞增殖的作用机制还需要进一步研究。尽管 Bmi1 过表达似乎可以使 1,25(OH)₂D 缺乏症的影响恢复正常,但 Bmi1 过表达引起的变化程度各不相同,一些显著的病例中,在 WT 和 1α(OH)ase^{+/-} 小鼠中,表明 Bmi1 过表达可能具有一些独立于维生素 D 状态的骨骼影响。

然而,总体而言,我们的研究证明 Bmi1 是 1,25(OH)₂D₃ 的重要生物调控因子,证明 1,25(OH)₂D₃ 可通过 Bmi1 基因的转录表达促进成骨细胞成骨,从而起到抗骨丢失的作用。本研究为 1,25(OH)₂D₃ 及其下游关键效应分子在预防和治疗骨质疏松症的临床应用提供了新的理论和实验基础。

参考文献 (References)

- [1] García-Gómez MC, Vilahur G. Osteoporosis and vascular calcification: A shared scenario [J]. Clin Invest Arterioscler, 2020, 32 (1): 33-42

- [2] Bijelic R, Milicevic S, Balaban J. Risk Factors for Osteoporosis in Postmenopausal Women[J]. *Med Arch*, 2017, 71(1): 25-28
- [3] Corrado A, Cici D, Rotondo C, et al. Molecular Basis of Bone Aging [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3679
- [4] Lee YF, Liu S, Liu NC, et al. Premature aging with impaired oxidative stress defense in mice lacking TR4 [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 301(1): E91-8
- [5] Cunningham TD, Martin BC, DeShields SC, et al. The impact of osteoporotic fractures compared with other health conditions in older adults living in Virginia, United States [J]. *Osteoporos Int*, 2016, 27(10): 2979-2988
- [6] Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(3): 465-475
- [7] Charoengnam N, Shirvani A, Holick MF. Vitamin D for skeletal and non-skeletal health: What we should know[J]. *J Clin Orthop Trauma*, 2019, 10(6): 1082-1093
- [8] Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, et al. Skeletal and Extraskelatal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions [J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(4): 1109-1151
- [9] 王立敏, 刘淘真, 朱路, 等. 老年原发性骨质疏松症患者血清 25-羟维生素 D 水平检测及与骨代谢指标的相关性分析[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 21(19): 3749-3752
- [10] Goltzman D. Functions of vitamin D in bone[J]. *Histochem Cell Biol*, 2018, 149(4): 305-312
- [11] Roizen JD, Long C, Casella A, et al. Obesity Decreases Hepatic 25-Hydroxylase Activity Causing Low Serum 25-Hydroxyvitamin D [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(6): 1068-1073
- [12] Glorieux FH, St-Arnaud R. Molecular cloning of (25-OH D)-1 α -hydroxylase: an approach to the understanding of vitamin D pseudo-deficiency[J]. *Recent Prog Horm Res*, 1998, 53: 341-349
- [13] Glowka E, Stasiak J, Lulek J. Drug Delivery Systems for Vitamin D Supplementation and Therapy[J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(7): 347
- [14] Haussler MR, Livingston S, Sabir ZL, et al. Vitamin D Receptor Mediates a Myriad of Biological Actions Dependent on Its 1,25-Dihydroxyvitamin D Ligand: Distinct Regulatory Themes Revealed by Induction of Klotho and Fibroblast Growth Factor-23 [J]. *JBM R Plus*, 2020, 5(1): e10432
- [15] Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, et al. Skeletal and Extraskelatal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions[J]. *Endocr Rev*, 2019, 40: 1109-1151
- [16] Hewison M. An update on vitamin D and human immunity [J]. *Clin Endocrinol*, 2012, 76(3): 315-325
- [17] Gong A, Chen J, Wu J, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D deficiency accelerates alveolar bone loss independent of aging and extracellular calcium and phosphorus[J]. *J Periodontol*, 2018, 89(8): 983-994
- [18] Chotiyanwong P, McCloskey EV. Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis and options for treatment[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(8): 437-447
- [19] Schepper JD, Collins F, Rios-Arce ND, et al. Involvement of the Gut Microbiota and Barrier Function in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis[J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(4): 801-820
- [20] Green BN, Johnson CD. Interprofessional collaboration in research, education, and clinical practice: working together for a better future [J]. *J Chiropr Educ*, 2015, 29(1): 1-10
- [21] Yang L, Fan L, Wang K, et al. Analysis of Molecular Mechanism of Erxian Decoction in Treating Osteoporosis Based on Formula Optimization Model[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6641838
- [22] Lee MD, Lin CH, Lei WT, et al. Does Vitamin D Deficiency Affect the Immunogenic Responses to Influenza Vaccination? A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Nutrients*, 2018, 10(4): 409
- [23] Palacios C, Gonzalez L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 144 Pt A: 138-145
- [24] Chang SW, Lee HC. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans[J]. *Pediatr Neonatol*, 2019, 60(3): 237-244
- [25] Aspray TJ, Hill TR. Osteoporosis and the Ageing Skeleton [J]. *Sub-cell Biochem*, 2019, 91: 453-476
- [26] Kuchuk NO, van Schoor NM, Pluijm SM, et al. Vitamin D status, parathyroid function, bone turnover, and BMD in postmenopausal women with osteoporosis: global perspective [J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(4): 693-701
- [27] Chen G, Zhang Y, Yu S, et al. Bmi1 Overexpression in Mesenchymal Stem Cells Exerts Antiaging and Antiosteoporosis Effects by Inactivating p16/p19 Signaling and Inhibiting Oxidative Stress [J]. *Stem Cells*, 2019, 37: 1200-1211
- [28] Lv X, Yu Z, Xie C, et al. Bmi-1 plays a critical role in the protection from acute tubular necrosis by mobilizing renal stem/progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 742-749
- [29] Sun W, Qiao W, Zhou B, et al. Overexpression of Sirt1 in mesenchymal stem cells protects against bone loss in mice by FOXO3a deacetylation and oxidative stress inhibition[J]. *Metabolism*, 2018, 88: 61-71
- [30] Dai X, Zhang Q, Yu Z, et al. Bmi1 Deficient Mice Exhibit Male Infertility[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14: 358-368
- [31] Zhang K, Xu J, Ding Y, et al. BMI1 promotes spermatogonia proliferation through epigenetic repression of Ptpm [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 583: 169-177
- [32] Lane NE, Yao W, Balooch M, et al. Glucocorticoid-treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogen-deficient mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(3): 466-476
- [33] Zhang HW, Ding J, Jin JL, et al. Defects in mesenchymal stem cell self-renewal and cell fate determination lead to an osteopenic phenotype in Bmi-1 null mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(3): 640-652