

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.08.006

GATA6 促进骨髓间充质干细胞成骨分化 *

孟凡彪[#] 张树菊[#] 金美玲 钱民先 刘佐君[△]

(深圳大学医学院 广东 深圳 518060)

摘要 目的:阐明锌指蛋白 GATA6 (GATA Binding Protein 6, GATA6) 在骨髓间充质干细胞成骨分化作用。**方法:**利用基于慢病毒感染的方法建立高表达与敲低 GATA6 稳定的骨髓间充质干细胞系, 并利用成骨诱导液进行成骨诱导, 以茜素红 S 染色。用蛋白杂交方法检测 RUNX2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2) 蛋白表达量, 并利用免疫共沉淀的技术检测 GATA6 与 RUNX2 的相互作用。**结果:**数据表明 GATA6 高表达促进了骨髓间充质干细胞的成骨分化, 并上调 RUNX2 蛋白表达量。在敲低 GATA6 后, RUNX2 的表达量亦随之降低。免疫共沉淀检测进一步发现, GATA6 与 RUNX2 具有相互作用。另外, GATA6 在骨质疏松大鼠来源的骨髓间充质干细胞的表达量下降。**结论:**GATA6 促进骨髓间充质干细胞成骨分化, 为理解成骨作用机制提供了理论基础。**关键词:** GATA6; 骨髓间充质干细胞; RUNX2; 成骨分化

中图分类号: R-33; R331.2; Q291; R683 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)08-1431-04

GATA6 Promotes Osteogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells *

MENG Fan-biao[#], ZHANG Shu-ju[#], JIN Mei-ling, QIAN Min-xian, LIU Zuo-jun[△]

(Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong, 518060, China)

ABSTRACT Objective: The aim is to elucidate the role of zinc finger containing protein GATA6 in osteogenesis. **Methods:** GATA6 overexpressing and knock-down MSCs stable cell line were established and be induced for osteogenesis, which were detected by alizarin red S. The protein level of RUNX2 was detected by Western Blot, and the interaction of RUNX2 and GATA6 was examined by co-immunoprecipitation. **Results:** The data shows ectopic expression of GATA6 promotes the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and upregulates the expression of RUNX2. The protein level of RUNX2 decrease after knocking down GATA6. Furthermore, GATA6 interacts with RUNX2 revealed by co-immunoprecipitation experiment. In addition, the protein level of GATA6 decreases in OVX-MSCs compared to wild type MSCs. **Conclusions:** GATA6 promotes the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells, providing a new understanding of the mechanism of osteogenesis.

Key words: GATA6; Bone marrow mesenchymal stem cells; RUNX2; Osteogenesis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; Q291; R683 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)08-1431-04

前言

骨折与骨质疏松是常见疾病, 其病理基础与骨的新生具有密切关系。目前在骨折治疗中广泛应用自体骨或异体骨甚至人工骨替代材料^[1]。从生物学角度来讲, 骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分化而来的成骨细胞是组成骨的基本单位^[2]。MSCs 成骨分化的异常可导致多种骨相关疾病, 例如骨质疏松症与骨折后骨不连^[3]。作为成体干细胞, MSCs 不仅能够分化为成骨细胞, 而且可分化为成脂细胞与成软骨细胞^[4]。MSCs 的分化命运受到了多种因子与外界信号的精细调控, 然而 MSCs 成骨分化命运的机制尚不完全清楚。

RUNX2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2) 是调控成骨分化的关键基因, 其缺失将导致钙化骨单位减少与出生后致死^[5]。另外, RUNX2 须与其他多种因子协同作用以结合与激

活相应的骨分化相关基因, 包括 TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ), p300 (protein 300, p300), MOZ (monocytic leukemia zinc-finger protein, MOZ) 等^[6]。有文献报道 GATA6 参与了 MSCs 向平滑骨骼肌细胞分化, 并且 GATA6 与 RUNX2 为调控 MSCs 分化过程的信号网络中的重要因子, 然而两者之间的相互关系尚未见报道。GATA6 作为一种锌指蛋白结构基因, 对胚胎发育中内胚层器官的发育具有重要的作用^[7], 然而 GATA6 在 MSCs 成骨分化中的作用尚不明确。本研究拟从分子机制角度研究 GATA6 在 MSCs 成骨分化中的作用, 为提高 MSCs 成骨分化能力提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒购于杭州 Axygen 公司,

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81501206, 81601215); 深圳市科技研发基金项目(JCYJ20150525092941002)

作者简介: 孟凡彪(1986-), 博士后, 主要研究方向: 干细胞生物, E-mail: mfanbiao@hotmail.com, 电话: 18622834173

张树菊(1987-), 博士后, 主要研究方向: 干细胞与生物节律调控, E-mail: zhangshuju@szu.edu.cn

[#] 为共同第一作者

[△] 通讯作者: 刘佐君(1982-), 博士后, 主要研究方向: 干细胞生物学, E-mail: liu-zuo-jun@163.com

(收稿日期: 2017-07-23 接受日期: 2017-08-18)

低糖 DMEM 细胞培养液、0.25 %胰蛋白酶与 opti-MEM 培养液购于美国 Gibco 公司,脂质体 2000(Lipofectamine™ 3 000)试剂、RIPA 缓冲液、shRNA(short hairpin RNA, RNA)、引物等购于美国 Invitrogen 公司。考马斯亮蓝染色液、茜素红 S 染料、地塞米松、甘油磷酸钠与维生素 C 等购于美国 sigma 公司。RUNX2 抗体购于美国 CST 公司、GATA6、Erk1/2 与 GAPDH 抗体购于美国 Santa cruz 公司。考马斯亮蓝染色液购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 参考之前文献报道的方法^[8],应用慢病毒感染方法研究 GATA6 具体的生物学功能,主要分组如下:空载体组,对照空载体病毒感染组 (Vector);GATA6 过表达组,GATA6 过表达病毒感染组(GATA6);无义 RNA 组,对照无序短发夹 RNA 病毒感染组 (scramble);GATA6 敲低组,GATA6 特异短发夹 RNA 病毒感染组 (GATA6-sh)。其中空载体组与 GATA6 过表达组比较以研究 GATA6 过表达的生物学意义,无义 RNA 组与 GATA6 敲低组比较以研究敲低 GATA6 表达水平后的生物学意义。

1.2.2 慢病毒细胞感染与稳定细胞株构建 参考之前文献报道的方法进行慢病毒感染与稳定细胞构建^[9]。利用 PCR 方法将大鼠 GATA 的基因序列或 GATA6 shRNA 构建到载体 plenti6-V5 中以用于慢病毒包装。将质粒 pCMV-VSVG 2.8 μ g, pMDLg-RRE 5.28 μ g, pRSV-REV 4 μ g, pLenti6-GATA6 8 μ g 与 PEI 混匀并室温放置 15 min 后,加入到 70 %融合的 293T 的培养皿中。在 6 h 后换成新鲜培养液,48 h 后收集培养液上清即为病毒粗提液。根据病毒滴度,将相应的病毒粗提液加入铺有 MSCs 细胞的 6 孔板中,并在 24 h 后换液。换液 2-3 天后,用 blasticidin (10 μ g/mL)筛选 2 周以得到稳定表达的细胞株并进行 WB (western blot, WB) 检测验证。GATA6 shRNA 序列: GATA6-sh-1: 5'-TGCGAATTCAAACACAGGAAA-3'; GATA6-sh-2: 5'-TGGAATTCAAACACAGGAAAC-3'; Scramble-sh: 5'-A CT TGCCATACATGACTCT-3'。

1.2.3 蛋白印迹 融合后的细胞消化下来并用 RIPA 缓冲液

裂解,使用考马斯亮蓝对蛋白染色定量。总量 20 μ g 蛋白样品在 10 % SDS-PAGE 胶以电压 120 V 运行 1 h 左右,之后将蛋白转移到 PVDF 膜上 (100 V, 100 min)。以 5 %的脱脂牛奶封闭 1 h,再以相应的抗体室温孵育 1 h。以 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min。加入相应的 HRP 耦联的二抗室温孵育 1 h,以 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min。最后加入 ECL 发光液显色。

1.2.4 成骨分化诱导 将大鼠骨髓来源的 MSCs 以 1×10^5 每孔的密度接种到 6 孔板中,并在低糖 DMEM 细胞培养液培养 2~3 天。将细胞培养液换成成骨诱导液,包括 100 n mol/L 地塞米松、10 m mol/L 甘油磷酸钠与 0.05 m mol/L 维生素 C。每周更换 2 次培养液。

1.2.5 茜素红 S 染色 诱导后融合的 MSCs 用 PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;70 %的酒精固定 10 min;PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;加入 2 %茜素红 S 染色 20 min,蒸馏水冲洗 2 次,封片。在倒置显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学分析

数据分析采用 graphpad 统计软件,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,各组间的数据比较采用 t 检验, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GATA6 促进 MSCs 成骨分化

通过慢病毒感染的方法在大鼠 MSCs 中建立过表达 GATA6 稳定细胞系与 GATA6 敲低稳定细胞系。WB 方法检测表明 GATA6 过表达组细胞系中高表达 GATA6 (图 1B),而 GATA6 敲低组细胞系中 GATA6 表达量是下降的。(图 1D)。分别用成骨诱导液对 GATA6 过表达组 MSCs 与空载体组诱导向成骨分化,利用特异性染料茜素红 S 染色以观察成骨分化量。结果显示 GATA6 过表达组具有更高的染色强度 (图 1A),另一方面,GATA6 敲低组染色量显著低于无义 RNA 组 (图 1C),表明 GATA6 促进 MSCs 成骨分化。

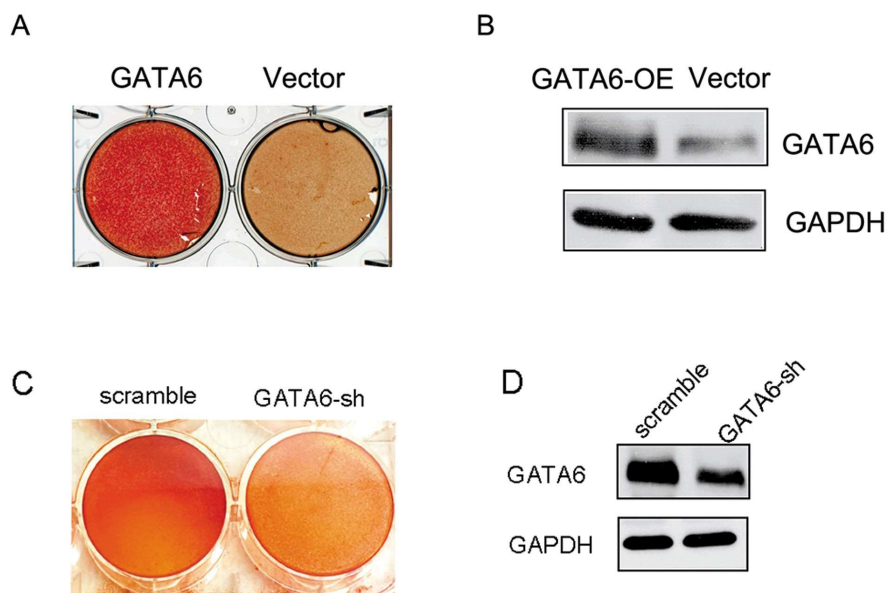


图 1 高表达 GATA6 促进 MSCs 成骨分化

Fig. 1 Ectopic expression of GATA6 promotes osteogenesis of MSCs

2.2 GATA6 调节 RUNX2 表达

为了从机制上明确 GATA6 促进分化的机制,我们检测了成骨分化相关的基因的表达。RUNX2 是调控 MSCs 成骨分化的关键基因。利用高表达 GATA6 细胞系,发现高表达 GATA6 后上调了 RUNX2 蛋白的表达量,而对 Erk (extracellular sig-

nal-regulated kinases, Erk) 的表达量无明显的影响(图 2A)。进一步地,在稳定 GATA6-shRNA 细胞系 GATA6 蛋白水平下调,同时发现 RUNX2 的蛋白水平亦显著下降。这些结果表明, GATA6 调节 RUNX2 的表达量变化(图 2B)。

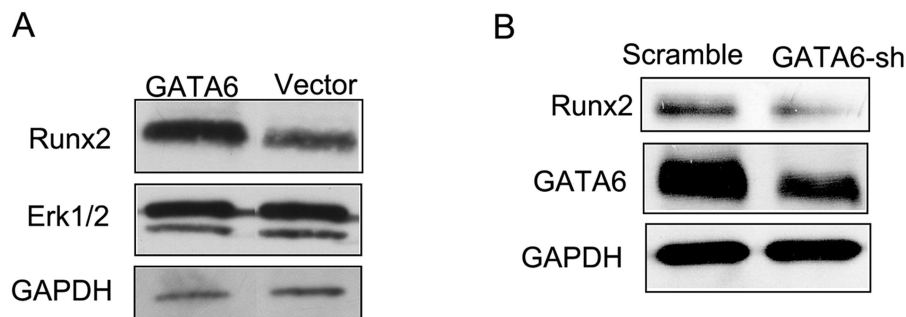


图 2 WB 检测 RUNX2、GATA6 与 Erk1/2 表达变化

Fig.2 WB detection of the expression of RUNX2, GATA6 and Erk1/2

2.3 GATA6 与 RUNX2 相互作用

作为关键的调节蛋白, RUNX2 通过与多因子的协同作用调控多种成骨相关基因。因而我们利用 CoIP (co-immunoprecipitation, CoIP) 的方法继续探讨 GATA6 在成骨分化过程中是否与 RUNX2 相互作用。作为阳性对照,在起始的蛋白样品中与 RUNX2 的免疫沉淀物中检测到了 RUNX2 的表达。另外,在 GATA6 的免疫沉淀物中检测到了 RUNX2, 表明 GATA6 与 RUNX2 具有相互作用。作为阴性对照, IgG 的免疫沉淀物中并没有检测到 RUNX2 (图 3)。

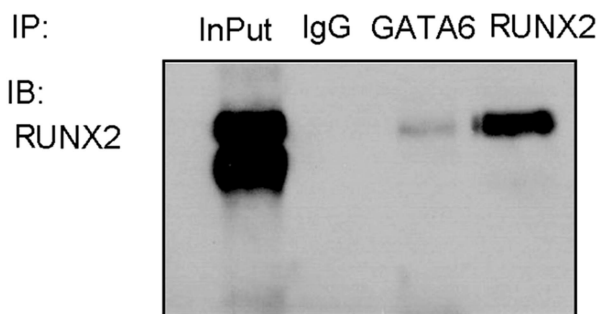


图 3 CoIP 检测 GATA6 与 RUNX2 相互作用

Fig.3 CoIP detection of the interaction of GATA6 and RUNX2

2.4 GATA6 在骨质疏松模型大鼠中表达

上述结果表明 GATA6 对成骨分化的重要作用。那么骨质疏松是否伴随着 GATA6 的下降呢? 我们采用卵巢切除(OVX)的大鼠模拟人类骨质疏松症^[10]。分别从野生型大鼠骨与卵巢切除(OVX)的大鼠骨髓中原代分离培养 MSCs, 以特异抗体检测 GATA6 表达量差异。结果表明与野生型 MSCs 相比, OVX 大鼠来源的 MSCs 中 GATA6 的表达量降低(图 4)。

3 讨论

骨的形成是来源于骨髓间充质干细胞分化而来的成骨细胞。成骨分化受多种信号途径的调节, 包括胞外信号 PTH (parathyroid hormone, PTH), BMP/TGF β (transforming growth

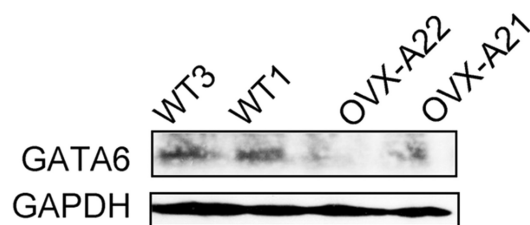


图 4 GATA6 在 OVX-MSCs 中表达量

Fig. 4 The expression of GATA6 in OVX-MSCs

factor- β , TGF β), FGF (Fibroblast growth factors, FGF), Hedgehog, Notch, Wnt (Wingless and Int1, Wnt) 等信号途径以及转录激活因子如 TAZ, p300, MOZ 等, 其中 RUNX2 是处于多种信号途径调节的关键位置^[11]。RUNX2 是骨发育过程中关键分子, 缺失后导致颅骨锁骨发育不全综合征^[12]。在成骨分化中, Runx2 分子调节一系列的成骨相关基因, 包括 Osteocalcin (OC), TGF- β receptor-1 (TGF β R1), 人维生素 D 受体 (hVDR), 雌激素受体 α , 胶原酶 3, prolactin, collagen, osteopontin (OPN), bone sialo protein (BSP), 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP), osteoprotegerin (OPG), RANKL, C/EBP 等^[13]。另一方面, RUNX2 亦受细胞内多种信号通路与因子的调控。例如 TGF β 信号通路可促进成骨细胞增殖与早期成骨细胞的分化, 却抑制终端细胞分化。机制研究表明 TGF β 信号下游效应因子 Smad3 与 RUNX2 相互作用, 并抑制 RUNX2 在多种成骨相关基因启动子上游 OSE2 序列的转录活性^[12]。FGF 生长因子信号途径激活 Erk 磷酸酶^[14], Erk 磷酸化 RUNX2, 进而激活成骨分化特异性的基因的表达^[15]。然而 GATA6 高表达对 Erk 的表达并无显著影响, 表明 GATA6 至少并非通过 Erk 途径影响 RUNX2 的表达。我们发现 GATA6 可调节 RUNX2 的表达量, 表明 GATA6 处于 RUNX2 的上游, 进一步我们发现了 GATA6 与 RUNX2 具有相互作用, 提示 GATA6 可能处于 RUNX2 的调控网络之中。很多体内与体外的研究表明过表达 RUNX2 诱导 MSCs 分化为成骨细胞, 并且激活一些成骨相关基因的表达。进一步的研究表明 RUNX2 在成骨诱导的早期高表达, 在分化

为成熟的成骨细胞后表达下降。低表达的 RUNX2 对维持成熟的成骨细胞具有重要的作用。因而,在 MSCs 分化过程中 RUNX2 的作用是时间与浓度依赖^[16]。对于 GATA6 如何响应早期的信号以及对 RUNX2 的影响尚须进一步的研究。

在本研究中,我们揭示了 GATA6 在大鼠 MSCs 成骨分化中的作用。在 MSCs 中高表达 GATA6 促进大鼠 MSCs 体外诱导的成骨分化,并且 RUNX2 的蛋白表达量增加。在哺乳动物中,GATA6 包含保守的锌指结构域结合保守的 DNA 序列 (G/A) GATA (A/T) 以及转录激活结构域^[17]。文献研究表明 GATA6 通过与多种因子协同调节胚胎发育,如肺表皮发育中的 TTF-1 因子^[18]、胰腺分化中的 Nkx2.2 因子^[19]以及骨骼肌发育中的 Nkx3.2 因子^[20]。GATA6 在 MSCs 分化中的作用研究较少,利用基因芯片组学分析 GATA6 作为转录因子在 MSCs 中高表达,在分化后的成骨细胞、脂肪细胞与软骨细胞表达量降低。进一步的发现 GATA6 促进 MSCs 的增值,而对成骨与成脂分化无明显作用^[21]。该研究应用碱性磷酸酶的含量检测成骨分化能力,而在本研究我们利用经典的钙沉积茜素红 S 染色检测成骨分化。碱性磷酸酶含量在诱导分化的早期升高并随后降低^[22],而钙沉积是骨分化成熟的标记物。在本研究中,我们在体外细胞水平证实了 GATA6 促进成骨的作用,同时在机制研究上我们研究发现 GATA 与 RUNX2 具有相互作用,因而 RUNX2 可能在 GATA6 介导的成骨分化中具有协同作用。进一步,我们发现 RUNX2 的表达受 GATA6 调节。因而我们的研究结果提供了一个可能的模型:即 GATA6 通过正反馈机制调控 RUNX2 的表达,而 RUNX2 表达与 GATA6 共同介导成骨分化。尽管如此,GATA6 与 RUNX2 确切关联仍需进一步的研究。

骨质疏松是老年人中常见病,表明为骨密度和骨质量下降与骨微结构破坏,易导致骨折^[23,24]。在骨质疏松病人中,MSCs 更倾向于成脂肪分化而不是成骨分化。移植 MSCs 可延缓衰老引起的骨质疏松症状^[25],使用外界处理手段如低水平的激光治疗刺激骨质疏松的 MSCs,可有效的提高骨质量^[26]。然而其内在机制尚不清楚。进一步研究报道,在衰老导致的骨质疏松中组蛋白去甲基化酶 KDM4B 与 KDM6B 降低^[27]。KDM4B 与 KDM6B 通过去甲基化 H3K9me3 和 H3K27me3 促进 MSCs 的成骨分化。在卵巢切除与衰老的小鼠的骨髓中,H3K9me3 和 H3K27me3 阳性的 MSCs 含量显著增加,成骨能力减弱而成脂能力显著活化。大鼠的卵巢切除手术 3 个月后骨质疏松,该模型被广泛用于模拟人类骨质疏松症^[28]。

在本研究中,我们亦报道了 GATA6 的表达量在骨折疏松的大鼠来源的 MSCs 中表达量下降。GATA6 表达量下降导致成骨减少,可能是导致骨质疏松的原因之一。然而 GATA6 在调节骨质疏松的具体作用尚需进一步的研究。

综上所述,骨髓 MSCs 的成骨分化对骨折愈合以及衰老引起的骨质疏松具有重要的作用,亦近年来重要的研究方向。我们的结果揭示了 GATA6 在成骨与骨质疏松中的作用,这不仅增强我们对成骨机制的认识,而且为治疗骨质疏松与促进骨折后愈合提供了新的靶点,有助于指导后续的临床应用。

参考文献(References)

- [1] Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, et al. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures[J]. *Int J Implant Dent*, 2017, 3(1): 23
- [2] Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit [J]. *BoneKEy reports*, 2014, 3(1): 1-10
- [3] Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(1): 45-54
- [4] Bara JJ, Richards RG, Alini M, et al. Concise review: Bone marrow derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(7): 1713-1723
- [5] Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Differentiation*, 2016, 92(1-2): 41-51
- [6] Garg P, Mazur MM, Buck AC, et al. Prospective Review of Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteoblasts [J]. *Orthopaedic Surgery*, 2017, 9(1): 13-19
- [7] Pihlajoki M, Färkkilä A, Soini T, et al. GATA factors in endocrine neoplasia[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 421(1): 2-17
- [8] Meng F, Xu L, Huang S, et al. Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (Sm51) promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by regulating Runx2 [J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 366(1): 155-162
- [9] Meng F, Rui Y, Xu L, et al. Aqp1 enhances migration of bone marrow mesenchymal stem cells through regulation of FAK and β -catenin[J]. *Stem cells and development*, 2013, 23(1): 66-75
- [10] Liu Y, Rui Y, Cheng TY, et al. Effects of Sclerostin Antibody on the Healing of Femoral Fractures in Ovariectomised Rats [J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 98(3): 263-274
- [11] Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. Runx2: A master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts[J]. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 2005, 75(3): 213-225
- [12] Bruderer M, Richards RG, Alini M, et al. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis[J]. *Eur Cell Mater*, 2014, 28: 269-286
- [13] Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, et al. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 78: 202-208
- [14] Michailovici I, Eigler T, Tzahor E. Craniofacial Muscle Development [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2015, 115(1): 3-30
- [15] Ge C, Xiao G, Jiang D, et al. Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(47): 32533-32543
- [16] Komori T. Roles of Runx2 in Skeletal Development [J]. *Adv. Exp. Med. Biol*, 2017, 962: 83-93
- [17] Aronson BE, Stapleton KA, Krasinski SD. Role of GATA factors in development, differentiation, and homeostasis of the small intestinal epithelium [J]. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2014, 306(6): G474-G490 (下转第 1406 页)

- [4] Stewart KL, Radford SE. Amyloid plaques beyond A β : a survey of the diverse modulators amyloid aggregation[J]. *Biophys Rev*, 2017, 9(4): 405-419
- [5] Tamano H, Takeda A. Is interaction of amyloid β -peptides with metals involved in cognitive activity?[J]. *Metallomics*, 2015, 7(8): 1205-1212
- [6] Huy PD, Vuong QV, La Penna G, et al. Impact of Cu (II) Binding on Structures and Dynamics of A β 42 Monomer and Dimer: Molecular Dynamics Study[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2016, 7(10): 1348-1363
- [7] Lin CJ, Huang HC, Jiang ZF. Cu (II) interaction with amyloid-beta peptide: a review of neuroactive mechanisms in AD brains [J]. *Brain Res Bull*, 2010, 82(5-6): 235-142
- [8] Tougu V, Tiiman A, Palumaa P. Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid- peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity[J]. *Metallomics*, 2011, 3(3): 250-261
- [9] Mayes J, Tinker-Mill C, Kolosov O, et al. β -amyloid fibrils in Alzheimer disease are not inert when bound to copper ions but can degrade hydrogen peroxide and generate reactive oxygen species[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(17): 12052-12062
- [10] Chassaing S, Collin F, Dorlet P, et al. Copper and heme-mediated A β toxicity: redox chemistry, A β oxidations and anti-ROS compounds[J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(22): 2573-2595
- [11] Yu F, Gong P, Hu Z, et al. Cu (II) enhances the effect of Alzheimer's amyloid- β peptide on microglial activation [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 122
- [12] Sharma AK, Pavlova ST, Kim J, et al. The effect of Cu $^{2+}$ and Zn $^{2+}$ on the A β 42 peptide aggregation and cellular toxicity [J]. *Metallomics*, 2013, 5(11): 1529-1536
- [13] Atwood CS, Moir RD, Huang X, et al. Dramatic aggregation of Alzheimer A by Cu (II) is induced by conditions representing physiological acidosis[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(21): 12817-12826
- [14] Goch W, Bal W. Numerical Simulations Reveal Randomness of Cu (II) Induced A β Peptide Dimerization under Conditions Present in Glutamatergic Synapses[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170749
- [15] Chen WT, Liao YH, Yu HM, et al. Distinct effects of Zn $^{2+}$, Cu $^{2+}$, Fe $^{3+}$, and Al $^{3+}$ on amyloid-beta stability, oligomerization, and aggregation: amyloid-beta destabilization promotes annular protofibril formation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(11): 9646-9656
- [16] Cheignon C, Jones M, Atrián-Blasco E, et al. Identification of key structural features of the elusive Cu-A β complex that generates ROS in Alzheimer's disease[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(7): 5107-5118
- [17] Bolognin S, Zatta P, Lorenzetto E, et al. β -Amyloid-aluminum complex alters cytoskeletal stability and increases ROS production in cortical neurons[J]. *Neurochem Int*, 2013, 62(5): 566-574
- [18] Sharma AK, Singh V, Gera R, et al. Zinc Oxide Nanoparticle Induces Microglial Death by NADPH-Oxidase-Independent Reactive Oxygen Species as well as Energy Depletion [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(8): 6273-6286
- [19] Wong HS, Dighe PA, Mezera V, et al. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(41): 16804-16809
- [20] Hu Z, Yu F, Gong P, et al. Subneurotoxic copper (II)-induced NF- κ B-dependent microglial activation is associated with mitochondrial ROS [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 276 (2): 95-103
- [21] Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(4): 1105-1121
- [22] Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases[J]. *Exp Neurobiol*, 2015, 24(4): 325-340
- [23] Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease [J]. *FEBS Lett*, 2017, Dec 27. [Epub ahead of print]

(上接第 1434 页)

- [18] Keijzer R, van Tuyl M, Meijers C, et al. The transcription factor GATA6 is essential for branching morphogenesis and epithelial cell differentiation during fetal pulmonary development[J]. *Development*, 2001, 128(4): 503-511
- [19] Shi Z-D, Lee K, Yang D-p, et al. Genome Editing in hPSCs Reveals GATA6 Haploinsufficiency and a Genetic Interaction with GATA4 in Human Pancreatic Development [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20 (5): 675-688
- [20] Nishida W, Nakamura M, Mori S, et al. A Triad of Serum Response Factor and the GATA and NK Families Governs the Transcription of Smooth and Cardiac Muscle Genes [J]. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(9): 7308-7317
- [21] Kubo H, Shimizu M, Taya Y, et al. Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry[J]. *Genes Cells*, 2009, 14(3): 407-424
- [22] Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche [J]. *Eur Cell Mater*, 2012, 23: 13-27
- [23] Sozen T, Ozisik L, Basaran NC. An overview and management of osteoporosis[J]. *Eur J Rheumatol*, 2017, 4(1): 46-56
- [24] Hill TR, Aspray TJ. The role of vitamin D in maintaining bone health in older people[J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2017, 9(4): 89-95
- [25] Kiernan J, Hu S, Grynbas MD, et al. Systemic Mesenchymal Stromal Cell Transplantation Prevents Functional Bone Loss in a Mouse Model of Age Related Osteoporosis [J]. *Stem cells translational medicine*, 2016, 5(5): 683-693
- [26] Bayat M, Jalalifiroozkouhi A. Presenting a Method to Improve Bone Quality Through Stimulation of Osteoporotic Mesenchymal Stem Cells by Low-Level Laser Therapy[J]. *Photomed Laser Surg*, 2017
- [27] Mohanakrishnan V, Ramachandran A, Rajendran K, et al. Regulation of Runx2 by Histone Deacetylases in Bone [J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2016, 17(4): 343-351
- [28] Chow SK, Leung KS, Qin J, et al. Mechanical stimulation enhanced estrogen receptor expression and callus formation in diaphyseal long bone fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic rats [J]. *Osteoporos Int*, 2016, 27(10): 2989-3000