基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000942

Nrf2重组慢病毒对 C2C12 细胞增殖、凋亡和分化的影响

伍志盟，邓　莉，胡　勤，郭风劲

（重庆医科大学基础医学院细胞生物学及遗传学教研室、发育生物学与模式动物平台，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：研究 Nrf2 对 C2C12 细胞向成骨细胞分化过程增殖、凋亡和分化的影响。**方法**：分别构建和包装 Nrf2（nuclear factor erythroid 2 p45 related factor 2）过表达及靶向 Nrf2 和活性转录因子 4（activating transcription factor 4，ATF4）的 siRNA 重组慢病毒颗粒；在骨形态发生蛋白 2（bone morphogenetic protein 2，BMP2）诱导下，设立不同病毒感染组处理 C2C12 细胞，检测各处理组 C2C12 细胞的增殖、凋亡及成骨相关标志基因的表达。**结果**：FCM 结果显示，BMP2+Lv-Nrf2 组细胞凋亡率低于 BMP2+Lv-GFP 组（$P<0.05$），BMP2+Lv-siNrf2 组细胞凋亡率高于 BMP2+Lv-GFP 组（$P<0.05$），BMP2+ Lv-Nrf2+Lv-siATF4 组细胞凋亡率低于 BMP2+Lv-GFP 组（$P<0.05$）并同时低于 BMP2+Lv-siATF4 组（$P<0.05$）；蛋白免疫印迹检测结果与 FCM 凋亡结果一致；免疫细胞化学检测结果显示，实验组 BMP2+Lv-Nrf2 组中骨钙蛋白（osteocalcin，OCN）与碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）表达增高，而 BMP2+Lv-siNrf2 组中两种蛋白表达均降低（$P<0.05$），联合处理组 BMP2+ Lv-Nrf2+ Lv-siATF4 中两种蛋白表达低于对照组和 BMP2+ Lv-Nrf2 组（$P<0.05$）。**结论**：上述结果表明，在 BMP2 诱导 C2C12 细胞成骨分化过程中，Nrf2 可抑制 C2C12 细胞的凋亡，促进其向成骨分化，同时，可挽回因 ATF4 蛋白减少而产生的细胞凋亡，但对 C2C12 细胞的骨向分化没有影响。

【关键词】Nrf2；慢病毒；成骨分化；细胞凋亡

【中图分类号】R394.3　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-02-25

Effects of lentivirus Nrf2 on proliferation, differentiation, and apoptosis of C2C12 cells

Wu Zhimeng, Deng Li, Hu Qin, Guo Fengjin

(*Teaching and Research Section of Cell Biology and Genetics, Laboratory of Developmental Biology and Model Animals, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To study the effects of Nrf2 on proliferation, apoptosis and differentiation of C2C12 cells during osteoblastic differentiation. ***Methods***: The recombination lentivirus of nuclear factor erythroid 2 p45 related factor 2 (Nrf2) and its siRNA were constructed in order to investigate the function of gene Nrf2 on apoptosis during osteogenic differentiation of C2C12 cells. The plasmids pWPT-GFP-Nrf2, pWPT-GFP-siNRF2 and pWPT-GFP-siATF4 were co-transfected respectively with other two lentivirus packaging plasmids into 293T cells to produce Lv-Nrf2, Lv-siNrf2 and Lv-siATF4 virus particles. Different treatment groups of lentivirus were set under the induction of bone morphogenetic protein 2 (BMP2), the proliferation, apoptosis and expression of osteogenic-differentiation-related marker proteins were detected respectively. ***Results***: FCM analysis showed that the apoptosis rate in BMP2+Lv-Nrf2 group was lower than that in BMP2+Lv-GFP group; the apoptosis rate in BMP2+Lv-siNrf2 group was higher than that in BMP2+Lv-GFP group; the apoptosis rate in BMP2+Lv-Nrf2+Lv-siATF4 group was lower than that in BMP2+Lv-siATF4 group; the results of Western blotanalysis were consistent with those of FCM. Cell immunochemistry staining showed that the expression levels of osteocalcin and alkaline phosphatasewere higher in BMP2+Lv-Nrf2 group than in control group BMP2+Lv-GFP, lower in BMP2+Lv-siNrf2 groupthan in control group, lower in combined treatment group BMP2+Lv-Nrf2+Lv-siATF4 than in control group and single treatment group BMP2+Lv-Nrf2. ***Conclusion***: Under the induction of BMP2, gene Nrf2 could inhibit the apoptosis and promote the osteogenic differentiation of C2C12 cells. Additionally, gene Nrf2 could rescue the increased cell apoptosis level, but could not rescue the decreased osteogenic differentiation level both caused by ATF4 deficiency.

【Key words】Nrf2; lentivirus; osteogenic differentiation; cell apoptosis

作者介绍：伍志盟，Email：wuzm112009@126.com，研究方向：遗传学。

通信作者：郭风劲，Email:guo.fengjin@gmail.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：No81371928；No81171697）；教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目（编号：NCET-12-1090）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1001.030.html（2016-05-13）

转录因子 NF-E2 相关因子 Nrf2 属于碱性亮氨酸拉链蛋白家族(basic leucine zipper protein family)[1]，Nrf2 与细胞的抗氧化应激反应密切相关，当细胞受到活性氧损害或其它化学物质浸染时，将激活一系列的细胞自我保护性基因的表达。研究发现，Nrf2 在肝脏、肾脏、消化道和肺等一系列组织器官的细胞中都有一定表达[2]，Nrf2 具有调节编码抗氧化蛋白以及Ⅱ相解毒酶表达的作用[3]，在正常的细胞生理状态下，Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Keap1)结合而被锚定在细胞质内[4-5]。活性氧或亲核剂的激活下，Keap1 构象改变而使 Nrf2 脱离进入细胞核，并结合抗氧化反应元件(antioxidant responses elements，ARE)，从而调节相关解毒酶和抗氧化蛋白的表达，启动细胞的自我保护机能[3,6-7]。

研究发现，Nrf2 通路的抗氧化作用同样存在于成骨及软骨细胞中，而 Nrf2 信号通路在骨发育代谢中也具有的重要作用。沉默 Nrf2 基因能显著促进破骨细胞的分化和骨吸收能力[9]，在成骨细胞中则会导致 RANKL 分泌的增加[10]。Nrf2 的缺失在破骨前体细胞和成骨祖细胞中，会导致胞内活性氧(reactive oxygen species，ROS)水平的升高和大量抗氧化酶体和谷胱甘肽表达量的下降[9-10]。ATF4 调节大量基因的转录活性，其中就包括成骨细胞分化的标志蛋白：骨钙蛋白(osteocalcin，OCN)[11]。ATF4 在维持成熟成骨细胞功能上有不可或缺的作用，如合成并分泌骨胶原蛋白[12-13]。这说明 ATF4 在成骨细胞的最终分化和骨形成中具有至关重要的作用。

本实验成功构建了人 Nrf2 基因重组慢病毒 Lv-Nrf2 和靶向 Nrf2 基因的 siRNA 重组慢病毒 Lv-siNrf2 及靶向 ATF4 基因的 siRNA 重组慢病毒 Lv-siATF4，并探讨 BMP2 诱导 C2C12 细胞骨向分化过程中，Nrf2 基因和 ATF4 基因对 C2C12 细胞增殖、凋亡及成骨分化的影响，为进一步研究人 Nrf2 基因的生物学功能奠定基础，也为探讨 Nrf2 和 ATF4 基因在成骨细胞分化过程中的相互关系及分子机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞

慢病毒表达载体 pWPT-GFP-V5、慢病毒包装辅助载体 pMD2G 和 pSPAX2(第二军医大学何志颖教授惠赠)用以构建和包装过表达慢病毒颗粒；改造后的慢病毒表达载体 pWPTN-GFP-V5 含有 U6 及 H1 双向启动子(上海生物工程有限公司)，用以构建和包装 siRNA 慢病毒颗粒；大肠埃希菌 DH5α、pcDNA3.1(-)-Nrf2、人胚肾细胞 HEK-293T 和成肌 C2C12 细胞系均由本实验室保存。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Mlu*Ⅰ、*Taq* 聚合酶(大连宝生物公司)；T4DNA 连接酶(Promega 公司)；质粒小量提取试剂盒和 DNA 胶回收纯化试剂盒(Omega 公司)；DMEM 高糖细胞培养基(Hyclone 公司)；胎牛血清(德国 PAN 生物公司)；Nrf2、ATF4、OCN 及 ALP 抗体(Santa Cruz 公司)；Cleaved-Caspase3、Caspase 12 抗体(Abcam 公司)；HRP 标记的抗兔和抗鼠 IgG 二抗(北京中杉金桥生物公司)；鼠抗 β-actin 单克隆抗体(天津三箭生物技术有限公司)；脂质体 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen 公司)；BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 ECL 电化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究所)；免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物公司)。

1.3 重组慢病毒载体的构建

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 中人 Nrf2 的 CDS 区的基因序列，设计并合成 Nrf2 的扩增引物，上游引物：cgcggatccATGATGGTCTTGGTG；下游引物：cgacgcgtGTTTTTCTTAACATCTGG(分别为 *Bam*HⅠ、*Mlu*Ⅰ酶切位点)，以真核表达载体 pcDNA3.1(-)-Nrf2 为模板扩增 Nrf2 基因，扩增片段大小为 1 987 bp。应用美国 Oligo ENGINE 公司提供的干扰 RNA 在线设计软件，选取抑制率评分最高的靶向 Nrf2 siRNA 序列并添加上酶切位点(正义链序列：5'-aATAAGACAGTGACCCACGTtttt-3'，反义链序列：5'-aACGTGGGGCACTGTCTAATtttt-3')，同理设计并合成 ATF4 siRNA 序列正义链序列：5'-aGGAGCAAAACAAGACAGCAtttt-3'，反义链序列：5'-aTGCTGTCTTGTTTTGCTCCtttt-3')将以上序列送至上海英俊生物技术有限公司合成，并将合成的靶向 Nrf2 及 ATF4 的 siRNA 序列经退火形成双链 DNA 片段(从 95 ℃开始每 5 ℃递减，直至温度降至 5℃，每个温度梯度持续 5 min)。

1.3.2 重组慢病毒载体的构建 用限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Mlu*Ⅰ双酶切慢病毒载体 pWPT-GFP-V5 以装载 Nrf2 目的基因；改造后的 pWPTN-GFP-V5 为 H1 及 U6 双向启动子系统(图谱见图 1A)，因此，直接利用 *Sif*Ⅰ酶处理慢病毒载体 pWPTN-GFP-V5，再插入相应 siRNA 片段；利用 T4-DNA 连接酶，将上述酶切后慢病毒载体分别与 Nrf2 目的基因，靶向 Nrf2 和靶向 ATF4 的 siRNA 片段连接，逐一构建慢病毒骨架载体 pWPT-GFP-Nrf2、pWPTN-GFP-siNrf2、pWPTN-GFP-siATF4。将连接产物分别转入 DH5α 感受态菌中，37 ℃ 摇床过夜，提取质粒 DNA 逐一进行酶切鉴定和测序鉴定。

1.4 慢病毒重组体的包装和靶细胞感染

在 6 cm 的培养皿中接种对数增殖期的 293T 细胞，次日将慢病毒空载 pWPT-GFP-V5，重组慢病毒载体 pWPT-GFP-Nrf2，pWPTN-GFP-siNrf2 和 pWPTN-GFP-siATF4 分别与辅助包装质粒 pMD2G、pSPAX2 混合，按照 Lipofectamine™2000 脂质体说明书分别将 3 种质粒充分混合并共转染进入 293T 细胞中，三质粒 pWPT-GFP、pMD2G 和 pSPAX2 各加入12.5、5 和 10 μg[14]。6 h 后换新鲜的细胞培养液，48 h 后收集培养液上清，0.45 μm 滤器过滤后-80 ℃保存[15]。

1.5 病毒滴度的检测

在 24 孔板中以约 4×10^4 个/mL 的密度接种 293T 细胞，按照孔稀释法倍比稀释浓缩的病毒上清，各取 500 μL 置于 24 孔板各孔细胞中，细胞在 37 ℃、CO_2 体积分数 5%的培养箱中培养过夜，次日更换 DMEM 完全培养液继续培养，48 h

后荧光显微镜下观察绿色荧光数。1 个发绿色荧光的细胞为 1 个表达单位(expression forming units,efu),根据下面公式计算病毒滴度(efu/mL)和感染复数(MOI)[16]:病毒滴度=发绿色荧光的细胞数×病毒稀释倍数/0.1,MOI=病毒滴度 × 加入病毒体积/感染的细胞数。

1.6 FCM 检测重组慢病毒对 C2C12 细胞周期和凋亡的影响

1.6.1 成骨诱导及病毒处理 取对数期增殖的 C2C12 细胞接种于 6 cm 细胞盘,待细胞汇合至 70%时加入 100 ng/mL的 BMP2 蛋白和重组慢病毒,分组如下:NC 组(空白对照组),BMP2 组,BMP2+Lv-GFP 组,BMP2+Lv-Nrf2 组,BMP2+Lv-siNrf2 组,BMP2+Lv-siATF4 组,BMP2+Lv-Nrf2+Lv-siATF4 组。每个实验设置 2 个复孔,重复 3 次(以下检测皆按此方法处理细胞并分组)。在病毒处理第 5 天,收集各组细胞。

1.6.2 细胞周期检测 用 1 mL 的 70%乙醇固定各处理组细胞 24 h,并加入等体积的染料 PI,4 ℃放置 30 min 后尼龙膜过滤,FCM 测定各组细胞周期情况。该检测由重庆医科大学流式细胞监测中心完成。

1.6.3 细胞凋亡的检测 收集各组细胞用 PBS 洗涤 3 次,加入等体积 PBS,应用 FCM Annixin PE 法检测细胞凋亡。该检测由重庆医科大学流式细胞监测中心完成。

1.7 蛋白质免疫印迹检测

各组细胞分别经预冷的 PBS 冲洗 3 次后,加入 RIPA 蛋白裂解液,收集至新的离心管中置于冰上充分裂解,离心后取上清加入 6 × SDS 上样缓冲液,BCA 试剂盒测定蛋白质浓度,取 30 ng/孔蛋白至 12% SDS-PAGE,电泳分离后 120 V,1 h 转膜,封闭后加入稀释的 β-actin 鼠抗抗体及目的抗体;次日 TBST 洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温反应 1 h;TBST 洗膜,电化学发光试剂反应,并于暗室中曝光。

1.8 免疫细胞化学检测

将灭菌处理过的 1 cm × 1 cm 盖玻片置于 6 cm 细胞盘底,再铺上 C2C12 细胞,之后的病毒处理及分组与 1.6.1 一致。病毒处理第 5 天,取出各组的细胞爬片,迅速置于 4 %多聚甲醛中固定 20 min,蒸馏水浸泡 5 min,使用免疫组化试剂盒配合 OCN 及 ALP 抗体,对各组细胞爬片进行免疫组织化学染色[17-18]。苏木素复染,自来水冲洗后自然晾干,中性树胶封片。

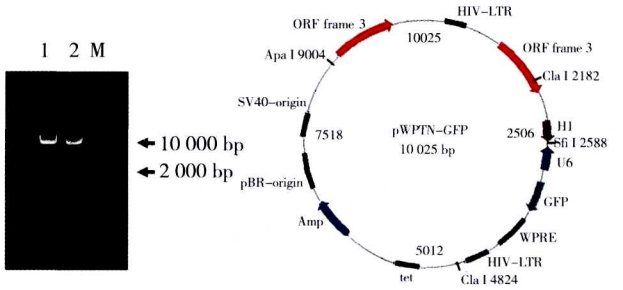
1.9 统计学方法

应用 SPSS 18.0 软件对实验的结果数据进行统计学分析,计量数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间样本的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 法。检验水准 α=0.05。

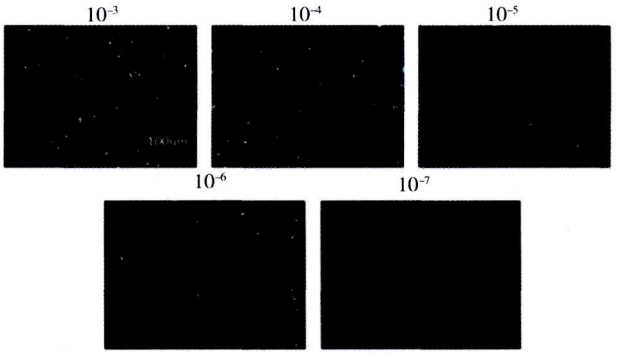
2 结 果

2.1 重组慢病毒的构建与检测

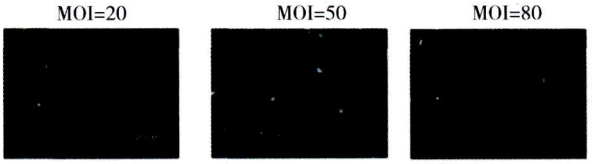
为了证明重组慢病毒载体构建的准确性,对重组后载体 pWPT-GFP-Nrf2 进行 *Bam*H Ⅰ 和 *Mlu* Ⅰ 双酶切鉴定,酶切产物为 1 900 bp 左右,pWPT-GFP-Nrf2 的测序结果也说明载体构建正确。经倍比稀释法测定慢病毒(以 Lv-Nrf2 为例)的滴度约为 1×10^8 efu/mL,相同方法测定 Lv-siNrf2、LV-siATF4 的滴度并将终滴度稀释为 1×10^8 efu/mL。检测重组慢病毒对目的细胞的感染效率,以 Lv-Nrf2 为例,分别按照感染复数(the multiplicity of infection,MOI)为 20、50、80 的梯度感染 C2C12 细胞,48h 后荧光显微镜下观察荧光(图 1B),结果显示 MOI=50 时,绿色荧光最强。在蛋白质免疫印迹实验中,结果显示 Lv-Nrf2、Lv-siNrf2 和 Lv-siATF4 感染 C2C12 细胞 48 h 后 Nrf2 及 ATF4 蛋白的表达水平如图 1D 和 E。



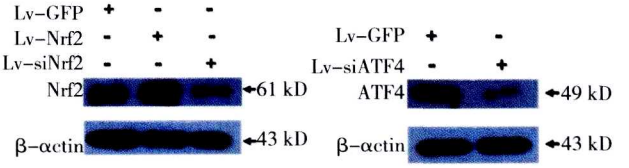
A. *Bam*H Ⅰ 和 *Mlu* Ⅰ 双切 pWPT-GFP-Nrf2 质粒后,示琼脂糖凝胶电泳图及改造后的 pWPTN-GFP-V5 质粒图谱



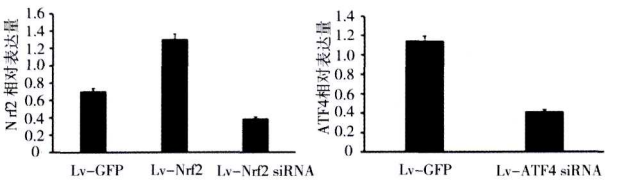
B. 倍比稀释法检测 Lv-Nrf2 的滴度(标尺示 100 μm)



C. Lv-Nrf2 对 C2C12 细胞的最佳感染复数检测(标尺示 50 μm)



D. 在分别用 Lv-Nrf2,Lv-siNrf2 和 Lv-siATF4 病毒感染 C2C12 细胞后,蛋白免疫印迹检测 Nrf2 及 ATF4 蛋白的表达情况



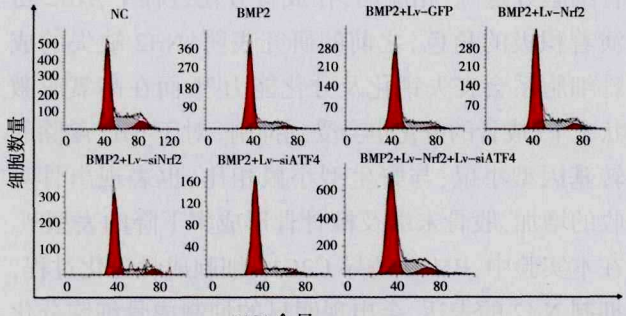
E. 蛋白免疫印迹表达水平的柱状图分析

图 1 慢病毒的构建与检测

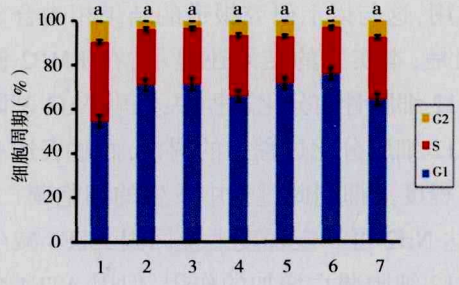
Fig.1 Construction and determination of lentivirus

2.2 FCM 检测各重组慢病毒处理组对 C2C12 细胞周期的影响

BMP2 组，BMP2+Lv-GFP 组，BMP2+Lv-Nrf2 组，BMP2+Lv-siNrf2 组，BMP2+Lv-siATF4 组和 BMP2+Lv-Nrf2+Lv-siATF4 组 6 组处理组组之间细胞周期 S 期差异无统计学意义，但 NC 组与 BMP2 单处理组相比 S 期明显上升（$P<0.05$）（图 2）。



A. FCM 检测细胞周期的分布



1：NC；2：BMP2；3：BMP2+ LV-GFP；4：BMP2+Lv-Nrf2；
5：BMP2+Lv-siNrf；6：BMP2+ Lv-siATF4；
7：BMP2+Lv-Nrf2+ Lv-siATF4；
a：$P<0.05$，NC 组与 BMP2 单处理组比较

B. 各处理组细胞周期分布的柱状图分析（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

图 2 FCM 检测在 BMP2 处理下各重组慢病毒组中 C2C12 细胞周期的分布

Fig.2 FCM analysis of cell cycle in C2C12 cells infected by LV-ATF4 with BMP2 treatment

2.3 FCM 检测各重组慢病毒处理组对 C2C12 细胞凋亡的影响

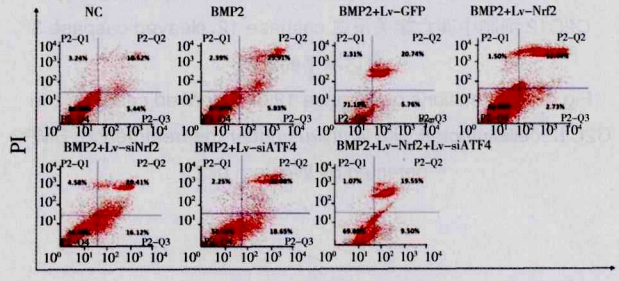
FCM 凋亡结果显示，BMP2 组凋亡率明显高于 NC 组（$P<0.05$）；BMP2+Lv-Nrf2 组凋亡率明显低于阴性病毒对照组 BMP2+Lv-GFP（$P<0.05$）；BMP2+Lv-siNrf2 组凋亡率明显高于病毒对照组 BMP2+Lv-GFP（$P<0.05$）；BMP2+Lv-Nrf2+ Lv-siATF4 组凋亡率明显低于病毒处理组 BMP2+Lv-siATF4（$P<0.05$）（图 3）。

2.4 Western blot 检测各慢病毒处理组中凋亡相关蛋白的表达

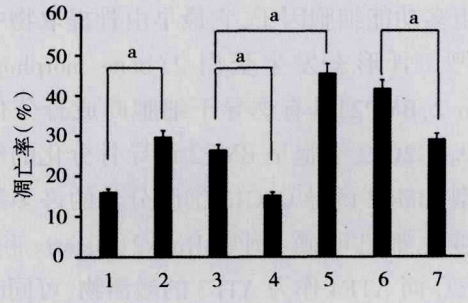
为进一步说明各处理组细胞的凋亡水平，课题组对各组细胞中凋亡蛋白 cleaved caspase-3 和 caspase-12 的表达水平进行检测。蛋白质免疫印迹结果显示，在 C2C12 细胞分化过程中，与对照 NC 组相比，BMP2 处理组和病毒对照组 BMP2+Lv-GFP 凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 和 caspase-12 表达均增加；与对照组相比，实验组 BMP2+Lv-Nrf2cleaved caspase-3 和 caspase-12 表达明显降低（$P<0.05$）；BMP2+Lv-siNrf2 组 cleaved caspase-3 和 caspase-12 表达明显增加（$P<0.05$）；联合处理组 BMP2+Lv-Nrf2+Lv-siATF4 组 cleaved caspase-3 和 caspase-12 表达明显降低于单病毒处理组 BMP2+Lv-siATF4（$P<0.05$）。见图 4。

2.5 免疫细胞化学检测各慢病毒处理组对 C2C12 细胞成骨分化的影响

免疫细胞化学检测结果显示，在 C2C12 细胞分化过程中，与对照组 NC 相比，BMP2 处理组和病毒对照组 BMP2+Lv-GFP，骨钙蛋白（OCN）及碱性磷酸酶（ALP）明显增加（$P<0.05$）；与各对照组相比，实验组 BMP2+Lv-Nrf2 中 OCN 和 ALP 表达增加（$P<0.05$）；而 BMP2+Lv-siNrf2 组中 OCN 和 ALP 表达降低（$P<0.05$）；联合处理组 BMP2+Lv-Nrf2+Lv-siATF4 中 OCN 和 ALP 表达明显低于单病毒处理组 BMP2+Lv-Nrf2（$P<0.05$）。见图 5。



A. FCM 检测各处理组 C2C12 细胞凋亡率图

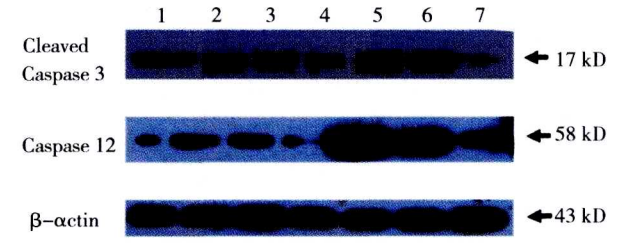


1：NC；2：BMP2；3：BMP2+ LV-GFP；4：BMP2+Lv-Nrf2；
5：BMP2+Lv-siNrf2；6：BMP2+ Lv-siATF4；
7：BMP2+Lv-Nrf2+ Lv-siATF4
a：$P<0.05$

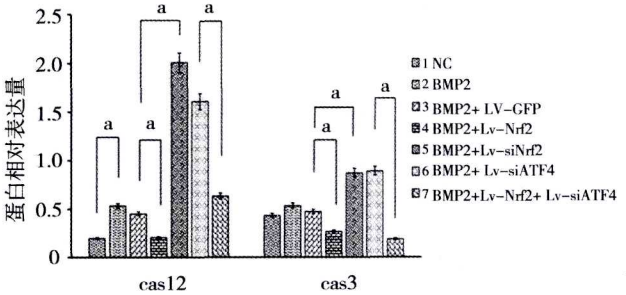
B. 细胞凋亡率柱状图分析（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

图 3 FCM 检测各组 C2C12 细胞凋亡率

Fig.3 FCM analysis on apoptosis rate of each group of C2C12 cells



A. 蛋白免疫印迹检测各处理组 C2C12 细胞中 caspase 12 及剪切 caspase 3 的表达



B. 各蛋白与相应 actin 表达水平对比值的柱状图分析（$\bar{x} \pm s$，n=3）

图 4 蛋白质免疫印迹法检测 BMP2 诱导下各病毒处理组对 C2C12 细胞中凋亡相关蛋白 caspase 12，cleaved caspase 3 表达水平的影响

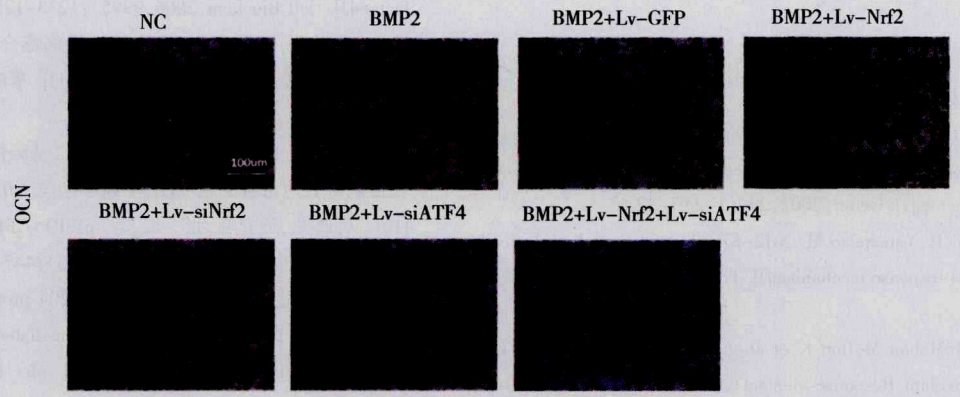
Fig.4 Expressions of caspase 12 and cleaved caspase 3 in C2C12 cells infected with lentivirus under the treatment of BMP2 detected by Western blot

3 讨 论

骨形态发生蛋白是转化生长因子 β 超家族中的一组多功能细胞因子，它最早由骨提取物中纯化获得[19]。骨形态发生蛋白 2（bone morphogenetic protein 2，BMP2）具有诱导干细胞向成骨分化的能力[20-21]。C2C12 细胞是 BMP2 诱导骨分化的经典细胞模型，BMP2 诱导 C2C12 细胞分化的许多细胞因子的变化都已明确，例如 Runx2，Osterix 和 ATF4 等[8,26-27]。而 ATF4 作为 ATF3 的激活物，可同时激活成骨相关基因，并诱导促凋亡因子 CCAAT/增强因子结合蛋白同源蛋白（C/EBP homologous protein，CHOP）的表达，而 CHOP 对于骨发育过程中的合成代谢及响应骨形成蛋白来说，又是至关重要的[22]。因此，ATF4 对成骨发育过程来说是必需的一种转录因子，本实验的结果亦表明，在 BMP2 的诱导下，ATF4 扮演了一个促进 C2C12 细胞向成骨分化的角色。

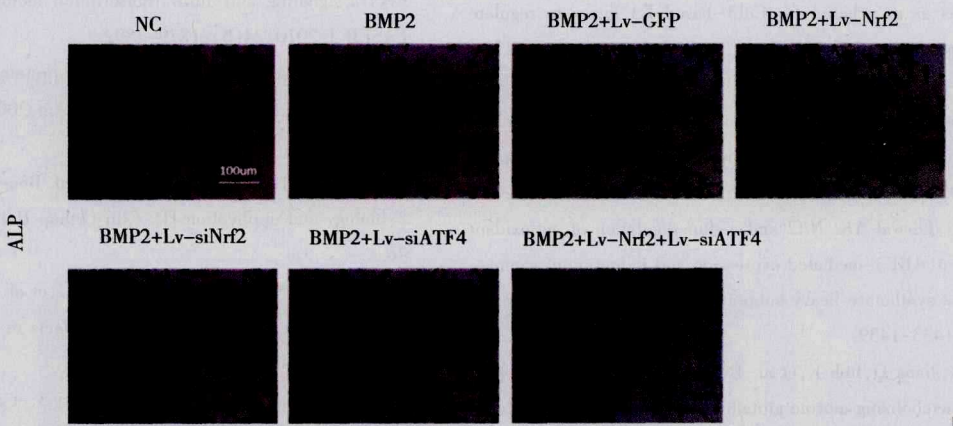
越来越多的研究表明，Nrf2 作为一种抗氧化应激因子，在骨发育代谢中具有重要作用。Nrf2 可以负调节破骨细胞的形成，过表达 Nrf2 或抑制 Keap1 的活性可降低 RANKL 的表达并较少破骨细胞的数量[23]，而在破骨细胞中抑制 Nrf2 的表达则会通过提高胞内活性氧水平而激活破骨细胞活性并增加破骨细胞数量[9]。相应的，在成骨分化过程中，Nrf2 扮演着积极的角色，之前的研究表明，Nrf2 缺失的成骨细胞系会丧失钙化及分化能力[10]；而在高氧应激状况下，成骨的分化也会受到抑制。对于 Nrf2 敲除的转基因型小鼠，与野生型小鼠相比，也表现出骨吸收的增加，股骨末端及椎骨骨形成率下降的表型[24]。在本实验中，BMP2 诱导 C2C12 细胞成骨分化过程，抑制 Nrf2 的表达，会出现明显的抑制成骨细胞分化的作用，而过表达 Nrf2 则对成骨细胞分化具有一定的促进作用，这与以上研究报道的结果相吻合。值得一提的是，本实验的结果还显示，在 BMP2 诱导分化 C2C12 细胞骨向分化过程中，沉默 Nrf2 基因会加剧 C2C12 细胞分化过程中的凋亡，而过表达 Nrf2 则可一定程度上抑制此过程中发生的细胞凋亡，并且，过表达 Nrf2 可一定程度上挽回因 ATF4 减少而促进 C2C12 细胞凋亡增加的作用，但因 ATF4 减少而导致的成骨细胞分化的降低却无法因Nrf2 的过表达而改变，这一结果提示，C2C12 细胞成骨分化过程中可能存在一定的氧化应激状态，Nrf2 在成骨细胞分化中可能提供抗氧化性的保护作用，并减少细胞的凋亡，而 ATF4 在此成骨细胞分化过程中的作用至关重要，ATF4 的减少会导致成骨分化受阻，这亦与文献报道的 ATF4 在成骨细胞分化及成骨发育中的作用相一致。

肌肉、骨骼相关疾病是全球长期残疾的最常见的原因，骨质疏松和肌肉功能丧失日益引起研究人员的广泛重视[25]。本研究成功构建了 Lv-Nrf2，Lv-siNrf2 及 Lv-siATF4 慢病毒颗粒，探讨了 Nrf2 在成骨细胞分化过程中对细胞增殖，凋亡及分化的影响，并初步分析了 Nrf2 和 ATF4 在此过程中的相互影响，结果表明，Nrf2 可以促进 BMP2 诱导的 C2C12 细胞骨向分化过程中的作用，并抑制细胞凋亡；同时，过表达 Nrf2 可挽回因 ATF4 蛋白减少而促进的细胞凋亡作用，却无法挽回因 ATF4 蛋白减少而导



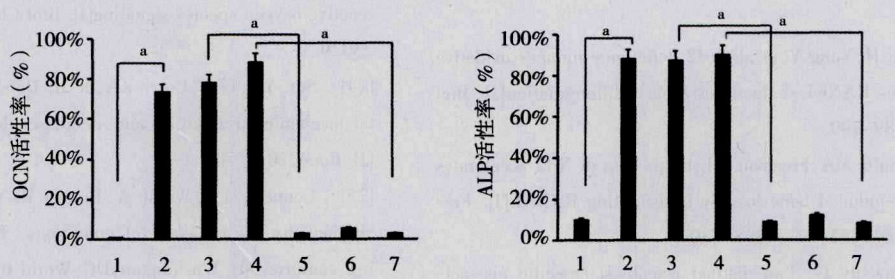
OCN的融合抗体染色示棕色，苏木素染细胞核示蓝色，标尺示 100 μm

A. 免疫细胞化学法检测各组 C2C12 细胞 OCN 蛋白的表达分布



ALP的融合抗体染色示棕色，苏木素染细胞核示蓝色，标尺示 100 μm

B. 免疫细胞化学法检测各组 C2C12 细胞 ALP 蛋白的表达分布



C. OCN 染色阳性细胞比例柱状图　　D. ALP 染色阳性细胞比例柱状图

1：NC；2：BMP2；3：BMP2+ LV-GFP；4: BMP2+Lv-Nrf2；5：BMP2+Lv-siNrf；6：BMP2+ Lv-siATF4；7：BMP2+Lv-Nrf2+ Lv-siATF4；

阳性比例 =OCN（ALP）染色细胞数目/细胞总数目；a：$P<0.05$

图 5　细胞免疫化学法检测 BMP2 诱导下各组细胞成骨分化标志蛋白 OCN 及 ALP 的分布

Fig.5　Distribution levels of OCN and cleaved ALP in C2C12 cells infected with lentivirus under the treatment of BMP2 detected by immunochemistry staining

致的成骨细胞分化的降低。本研究为进一步探讨 Nrf2 及 ATF4 在成骨细胞分化过程中的生物学作用奠定基础，也为日后临床肌肉、骨骼相关疾病的治疗提供一定的实验参考价值。

参 考 文 献

[1] Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, et al. Integration and diversityof the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors[J]. Gene , 2002, 294(1-2):1-12.

[2] Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism[J]. Trends Mol Med 2004, 10(11): 549-557.

[3] Nioi P, McMahon M, Itoh K, et al. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant Response element(ARE) in the mouse NAD(P)H-quinone oxidoreductase1 gene:reassessment of The ARE consensus sequence[J]. Biochem J, 2003, 374(Pt2):337-348.

[4] Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(16):7130-7139.

[5] Hong F, Sekhar KR, Freeman ML, et al. Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation[J]. Biol Chem, 2005, 280(36):31768-31775.

[6] Jeyapaul J, Jaiswal AK. Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element(ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene[J]. Biochem Pharmacol 2000, 59(11):1433-1439.

[7] Jowsey IR, Jiang Q, Itoh K, et al. Expression of the aflatoxin B1-8,9-epoxide-metabolizing murine glutathione S-transferase A3 subunit is regulated by the Nrf2 transcription factor through an antioxidant response element[J]. Mol Pharmacol, 2003, 64(5):1018-1028.

[8] Katagiri. Bone mineral measurement of the calcaneus by single X-ray absorptiometry[J]. Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1994, 68(12): 1044-1055.

[9] Hyeon S, Lee H, Yang Y, et al. Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation[J]. Biol Med, 2013(65):789-799.

[10] Rana T, Schultz MA, Freeman ML, et al. Loss of Nrf2 accelerates ionizing radiation-induced bone loss by upregulating RANKL[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(12):2298-2307.

[11] Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene[J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(4):1858-1869.

[12] Yang X, Matsuda K, Bialek P, et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology;implication for Coffin-Lowry Syndrome[J]. Cell, 2004, 117(3):387-398.

[13] Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors[J]. Cell Biochem, 2006, 9995):1233-1239.

[14] 史晨辉，王维山，李长俊，等. 慢病毒介导 uPA-siRNA 重组表达载体的构建及促进兔软骨细胞增殖[J]. 基础医学与临床，2014，34(5):602-609.

[15] 许 朝，胡端敏，诸 琦. EEF1A2 基因慢病毒表达载体的构建及慢病毒表达系统的建立[J]. 生物学杂志，2013，30(2):18-22.

[16] 韩腾龙，王立峰，张 璟，等. pWPT-GFP 慢病毒载体的改构及鉴定[J]. 现代生物医学进展，2010，10(3):447-449.

[17] Luan Y, Yu XP, Yang N, et al. p204 protein overcomes the inhibition of core binding factor alpha-1-mediated osteogenic differentiation by Id helix-loop-helix proteins[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(5): 2113-2126.

[18] Feng JQ, Guo FJ, Jiang BC, et al. Granulin epithelin precursor:a bone morphogenic protein 2-inducible growth factor that activates Erk1/2 signaling and JunB transcription factor in chondrogenesis[J]. FASEB J, 2010, 24(6):1879-1892.

[19] Reddi AH. Bone morphogenetic proteins:from basic science to clinical applications[J]. Bone Joint Surg Am, 2001, 83-A Suppl 1(Pt 1): S1-S6.

[20] Riley EH, Lane JM, Urist MR, et al. Bone morphogenetic protein-2:biology and applications[J]. Clin Orthop Relat Res, 1996(324):39-46.

[21] Nilsson OS, Urist MR, Dawson EG, et al. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs[J]. Bone Joint Surg Br, 1986, 68(4):635-642.

[22] Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum[J]. Genes Develop, 2006, 18(24):3066-3077.

[23] Kanzaki H, Shinohara F, Kajiya M, et al. The Keap1/Nrf2 protein axis plays a role in osteoclast differentiation by regulating intracellular reactive oxygen species signaling[J]. Biol Chem, 2013, 288(32):23009-23020.

[24] Sun YX, Li L, Corry KA, et al. Deletion of Nrf2 reduces skeletal mechanical properties and decreases load-driven bone formation [J]. Bone, 2015(74):1-9.

[25] Connelly LB, Woolf A, Brooks P. Cost-effectiveness of interventions for musculoskeletal conditions. Disease control in developing countries[M]. Washington, DC:World Bank, 2006.

[26] Munz B, Hildt E, Springer ML, et al. RIP2, a checkpoint in myogenic differentiation[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(16):5879-5886.

[27] Eliazer S, Spencer J, Ye D, et al. Alteration of mesodermal cell differentiation by EWS/FLI-1, the oncogene implicated in Ewing's sarcoma[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(2):482-492.

（责任编辑：张辉洁）