doi:10.11659/jjssx.02E023123

·基础研究·

萝卜硫素促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的分子机制研究

张 铮[1,2],韩佳雯[2],彭龙龙[1],聂 涛[1],邹三明[1],张宇博[1]（1.武汉科技大学附属孝感医院骨关节与运动医学科,湖北 孝感 432100;2.武汉科技大学医学院,湖北 武汉 430065）

［摘 要］ **目的** 探讨萝卜硫素(Sul)促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)向成骨细胞分化的分子机制。**方法** 将BMSCs分为对照组(不做任何处理)、诱导组(诱导成骨分化)、诱导+Sul组(诱导成骨分化并加入40 μmol/L Sul);分别向BMSCs转染腺病毒-shRNA-Mock、-shRNA-TET1、-shRNA-TET2、-shRNA-TET3,作为shRNA-Mock组、shRNA-TET1组、shRNA-TET2组、shRNA-TET3组;BMSCs于含成骨分化诱导培养液及添加40 μmol/L Sul的细胞培养液中培养,然后转染腺病毒-shRNA-TET1、-shRNA-TET2、-shRNA-TET3、-shRNA-Mock,作为诱导+Sul+shRNA-TET1组、诱导+Sul+shRNA-TET2组、诱导+Sul+shRNA-TET3组、诱导+Sul+shRNA-Mock组。qPCR法和Western blot法测定BMSCs向成骨细胞分化后Runx2 mRNA和蛋白的表达水平。染色质免疫共沉淀(ChIP)实验测定BMSCs向成骨细胞分化后,与Histone H3结合的Runx2启动子区DNA含量。HpaⅡ酶和MspⅠ酶消化联合qPCR法测定BMSCs向成骨细胞分化后Runx2启动子区的甲基化水平。茜素红染色测定BMSCs向成骨细胞分化的程度。**结果** 与诱导组相比,诱导+Sul组Runx2 mRNA和蛋白表达水平明显上升($P<0.05$),与Histone H3结合的Runx2启动子区DNA含量增高($P<0.05$),Runx2启动子区的甲基化水平降低($P<0.05$),茜素红染色评分升高($P<0.05$)。与诱导+Sul组相比,诱导+Sul+shRNA-TET1组细胞内与Histone H3结合的Runx2启动子区DNA含量降低($P<0.05$),Runx2启动子区的甲基化水平升高($P<0.05$),茜素红染色评分明显降低($P<0.05$);而诱导+Sul+shRNA-TET2组、诱导+Sul+shRNA-TET3组及诱导+Sul+shRNA-Mock组则无明显变化($P>0.05$)。**结论** Sul能够通过TET1促进Runx2启动子区DNA去甲基化,促进BMSCs向成骨细胞分化。

［关键词］骨髓间充质干细胞;成骨分化;萝卜硫素;Runx2;表观遗传学;DNA甲基化

［中图分类号］R394.2 ［文献标志码］A ［收稿日期］2023-02-23

［基金项目］湖北省卫生健康委员会科研项目(WJ2021M044)

［通信作者］张宇博,E-mail:1049756476@qq.com

[9] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. doi: 10.3322/caac.21492.

[10] Bade BC, Dela Cruz CS. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention[J]. Clin Chest Med, 2020, 41(1): 1-24. doi: 10.1016/j.ccm.2019.10.001.

[11] Li MY, Liu LZ, Dong M. Progress on pivotal role and application of exosome in lung cancer carcinogenesis, diagnosis, therapy and prognosis[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 22. doi: 10.1186/s12943-021-01312-y.

[12] Chen L, Nan A, Zhang N, et al. Circular RNA 100146 functions as an oncogene through direct binding to miR-361-3p and miR-615-5p in non-small cell lung cancer[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 13. doi: 10.1186/s12943-019-0943-0.

[13] Li P, Chen H, Chen S, et al. Circular RNA 0000096 affects cell growth and migration in gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2017, 116(5): 626-633. doi: 10.1038/bjc.2016.451.

[14] Wang J, Zhao X, Wang Y, et al. circRNA-002178 act as a ceRNA to promote PDL1/PD1 expression in lung adenocarcinoma[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(1): 32. doi: 10.1038/s41419-020-2230-9.

[15] Liang Y, Wang H, Chen B, et al. circDCUN1D4 suppresses tumor metastasis and glycolysis in lung adenocarcinoma by stabilizing TXNIP expression[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 23: 355-368. doi: 10.1016/j.omtn.2020.11.012.

[16] 冯 涛,肖向茜,盛 望. miRNA在肺癌及肺癌耐药中的作用机制及治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(1): 61-65. doi: 10.3969/j.issn.1006-2084.2018.01.012.

[17] Cui M, Qu F, Wang L, et al. MiR-18a-5p facilitates progression of hepatocellular carcinoma by targeting CPEB3[J]. Technol Cancer Res Treat, 2021, 20: 15330338211043976. doi: 10.1177/15330338211043976.

[18] Guo Y, Shi W, Fang R. miR-18a-5p promotes melanoma cell proliferation and inhibits apoptosis and autophagy by targeting EPHA7 signaling[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(1): 79. doi: 10.3892/mmr.2020.11717.

[19] Gao S, Zhu D, Zhu J, et al. miR-18a-5p targets FBP1 to promote proliferation, migration, and invasion of liver cancer cells and inhibit cell apoptosis[J]. Comput Math Methods Med, 2021, 2021: 3334065. doi: 10.1155/2021/3334065.

[20] Zhang J, Wang J, Xing H, et al. Down-regulation of FBP1 by ZEB1-mediated repression confers to growth and invasion in lung cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2016, 411(1/2): 331-340. doi: 10.1007/s11010-015-2595-8.

[21] Zhang Y, Lv C, Dong Y, et al. Aspirin-targeted PD-L1 in lung cancer growth inhibition[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(6): 1587-1593. doi: 10.1111/1759-7714.13433.

（编辑:龙小芬）

Molecular mechanism of sulforaphane promoting the differentiation of bone marrow stem cells into osteoblasts

ZHANG Zheng[1,2], HAN Jia-wen[2], PENG Long-long[1], NIE Tao[1], ZOU San-ming[1], ZHANG Yu-bo[1] (1.Department of Bone Joint and Sports Medicine, Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Xiaogan Hubei 432100, China; 2.School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430065, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of sulforaphane (Sul) promoting bone marrow stem cells (BMSCs) differentiating into osteoblasts. **Methods** BMSCs were divided into the control group (without any treatment), induction group (induction of osteogenic differentiation), and induction+Sul group (induction of osteogenic differentiation with the addition of 40 μmol/L of Sul). The adenovirus-shRNA-Mock, -shRNA-TET1, -shRNA-TET2, and -shRNA-TET3 were transfected into BMSCs as the shRNA-Mock group, shRNA-TET1 group, shRNA-TET2 group, and shRNA-TET3 group. BMSCs were cultured in cell culture medium containing osteogenic differentiation induction medium and 40 μmol/L of Sul, and then transfected with adenovirus-shRNA-TET1, -shRNA-TET2, -shRNA-TET3, and -shRNA-Mock as the induction+Sul+shRNA-TET1 group, induction+Sul+shRNA-TET2 group, induction+Sul+shRNA-TET3 group, and induction +Sul+shRNA-Mock group. The mRNA and protein expression levels of Runx2 after BMSCs differentiated into osteoblasts were determined by qPCR and Western blot. The DNA content of Runx2 promoter region bound to Histone H3 after BMSCs differentiated into osteoblasts was determined by chromatin immunocoprecipitation (ChIP). The methylation level of Runx2 promoter region of BMSCs differentiated into osteoblasts was determined by Hpa Ⅱ enzyme and Msp Ⅰ enzyme digestion combined with qPCR. The degree of BMSCs differentiated into osteoblasts was determined by alizarin red staining. **Results** Compared with the induction group, the mRNA and protein expression levels of Runx2 in the induction+Sul group were significantly increased (P<0.05); the content of DNA in the Runx2 promoter region bound to Histone H3 was increased (P<0.05), the methylation level of Runx2 promoter region was reduced (P<0.05), and the alizarin red staining score was elevated (P<0.05). Compared with the induction+Sul group, the content of DNA in the Runx2 promoter region bound to Histone H3 in the induction+Sul+shRNA-TET1 group was decreased (P<0.05), the methylation level of Runx2 promoter region was increased (P<0.05), and the alizarin red staining score was decreased (P<0.05). While there was no significant change among the induction+Sul+shRNA-TET2 group, induction+Sul+shRNA-TET3 group, induction+Sul+shRNA-Mock group (P>0.05). **Conclusion** Sul can promote the differentiation of BMSCs into osteoblasts through promoting DNA demethylation of Runx2 promoter region by TET1.

Keywords: bone marrow stem cells; osteoblasts differentiation; sulforaphane; Runx2; epigenetics; DNA methylation

成骨细胞的骨形成活性是维持骨骼健康最重要的合成代谢过程[1]。间充质干细胞向成骨细胞谱系的分化功能障碍及成骨细胞的活力受损将引起多种代谢性骨病,如骨质疏松症和骨关节炎等[2]。转录因子Runx2在间充质干细胞内的浓度高低将影响其向成骨细胞分化的方向[3]。研究显示,Runx2所在染色质结构和表达的变化受表观遗传学调控[4]。

DNA甲基化和去甲基化是重要的表观遗传学调控机制之一。其中CpG岛DNA甲基化是通过招募抑制基因转录的蛋白质因子或通过染色质高度凝集阻碍转录因子与DNA的结合来调节基因的表达。而DNA甲基胞嘧啶双加氧酶1(tet methylcytosine dioxygenase 1,TET1)可识别并与CpG岛结合,启动DNA去甲基化程序,从而维持基因组甲基化稳态,实现对表观遗传学的动态调控[5]。

研究显示,白藜芦醇、萝卜硫素(sulforaphane,Sul)和花青素等多种天然化合物能够改善骨骼健康指数[6],且已被证明能够增加成骨细胞的新骨形成,特别是Sul[7]。然而,关于Sul的骨保护作用机制尚不清楚。本研究拟通过体外实验探讨Sul促进骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells,BMSCs)向成骨分化是否通过表观遗传学调控机制实现,以期深入了解Sul的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

BMSCs购自武汉普诺赛生物技术有限公司。人重组骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2,BMP2;批号:023J5430)购自美国Sigma Aldrich公司。Protein A/G-agarose beads(批号:YD360327)、甲基化敏感限制性内切酶HpaⅡ酶(批号:2642215)、甲基化非敏感限制性内切酶MspⅠ酶(批号:2658767)购自美国Thermo Fisher公司。兔抗小鼠Runx2(批号:236639)、GAPDH(批号:824500)、TET1(批号:191698)、TET2(批号:213369)、TET3(批号:231785)、IgG(批号:172730)单抗,兔抗小鼠Histone H3多抗(批号:179101)购自美国Abcam公司。HRP标记山羊抗兔IgG二抗(批号:YH00010456)购自上海研卉生物。Bioruptor水浴超声仪购自美国Diagenode公司。

1.2 实验方法

1.2.1 诱导小鼠BMSCs向成骨细胞分化 诱导组:向6孔板中每孔加入0.1%无菌明胶1 mL,室温下

包被30 min。然后弃明胶,以5×10³/孔接种BMSCs,培养至细胞汇合度为60%~70%时,开始诱导向成骨分化。加入含300 ng/mL BMP2的完全DMEM培养液,每2 d换液1次,连续培养1周后,收集部分细胞进行下游染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)实验和甲基化敏感限制性内切酶相关指标的测定;其余细胞连续培养2周后进行茜素红染色、qPCR、Western blot实验。

1.2.2 细胞分组及处理方式 对照组:BMSCs不做任何处理,仅单纯维持培养;诱导组:诱导BMSCs成骨分化,连续培养1周;诱导+Sul组:成骨分化诱导培养液中加入40 μmol/L Sul,连续培养1周[7]。shRNA-Mock组、shRNA-TET1组、shRNA-TET2组、shRNA-TET3组:分别向BMSCs转染腺病毒-shRNA-Mock、-shRNA-TET1、-shRNA-TET2、-shRNA-TET3。使用腺病毒载体pADV-U6-shRNA-CMV-EGFP进行转染。shRNA-Mock(5′-3′):GACAGAGCATATGAGATACTA;shRNA-TET1(5′-3′):TTTCCTACTCTGTAGCTATGT;shRNA-TET2(5′-3′):GGAAAAAGCACTCTGAATGGT;shRNA-TET3(5′-3′):GGGCCGTGGGGACAAGGAGCG。转染48 h后,按照各组要求对细胞进行处理,随后进行下游指标的测定。诱导+Sul+shRNA-TET1组、诱导+Sul+shRNA-TET2组、诱导+Sul+shRNA-TET3组、诱导+Sul+shRNA-Mock组:BMSCs于含成骨分化诱导培养液+40 μmol/L Sul的细胞培养液中培养,分别转染腺病毒-shRNA-TET1、-shRNA-TET2、-shRNA-TET3、-shRNA-Mock,连续培养1周。

1.2.3 qPCR 向6孔板每孔细胞中加入1 mL TRIzol裂解液裂解细胞。使用RNA Easy Fast动物组织/细胞总RNA提取试剂盒提取总RNA。使用Fast-King cDNA第一链合成试剂盒(去基因组)进行反转录合成cDNA。使用Fast Fire快速荧光定量PCR预混试剂(SYBRGreen)进行qPCR扩增。qPCR特异性引物为Runx2 F-Primer(5′-3′)为CGCCTCACAAACAACCACAG,Runx2 R-Primer(5′-3′)为TCACTGTGCTGAAGAGGCTG;GAPDH F-Primer(5′-3′)为CCTGCGGTAGAGCGGCCG,GAPDH R-Primer(5′-3′)为CTCCACCCATCGAGGCAGGA。qPCR扩增条件:95 ℃ 10 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,循环40次。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法对靶基因进行相对定量。

1.2.4 Western blot 向6孔板每孔细胞中加入含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA裂解液裂解细胞。采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度。每个样本取10 μg进行SDS-PAGE凝胶电泳。采用半干转印法(4 ℃,100 mA恒流,转印2 h)将凝胶中的蛋白转印至PVDF膜上。使用含有5% BSA的TBS-T缓冲液,在室温下封闭PVDF膜1 h。向膜上滴加一抗工作液,在4 ℃下使其与膜共同孵育过夜。次日,向膜上滴加二抗工作液,在室温下使其与膜共同孵育1 h。Runx2抗体(1∶1 500稀释)、TET1抗体(1∶2 000稀释)、TET2抗体(1∶1 000稀释)、TET3抗体(1∶1 000稀释)、GAPDH抗体(1∶1 500稀释)、HRP标记山羊抗兔IgG二抗(1∶6 000稀释)。然后滴加ECL化学发光底物,对目的条带进行显影。使用Image J v1.8.0软件分析并定量条带灰度值。

1.2.5 ChIP实验 细胞于室温培养,使用含1%甲醛的PBS孵育10 min进行交联反应。然后加入10×甘氨酸溶液(1.25 mol/L)终止。交联后的细胞重悬于5倍体积的细胞裂解缓冲液中,并使用均质机均质化处理。收集细胞提取物,以3 000 r/min离心5 min,重悬沉淀于500 μL超声缓冲液中,在Bioruptor水浴超声仪高功率下超声处理5 min×3次,获得200~500 bp DNA片段。于4 ℃以12 500 r/min离心15 min,收集上清液,为交联染色质提取物。

免疫沉淀(immunoprecipitation,IP):取25 μg交联染色质提取物,加入2 μg IgG和50 μL Protein A/G-agarose beads,于4 ℃共同孵育1 h。然后4 000 r/min离心5 min,收集染色质,而上清液则于4 ℃与兔抗小鼠Histone H3特异性抗体或IgG(Isotype control)孵育过夜,为免疫沉淀复合物。随后,添加Protein A/G-agarose beads,并于4 ℃孵育1 h以复苏免疫沉淀复合物。然后加入洗脱缓冲液,于65 ℃孵育15 min。以12 500 r/min离心5 min,收集上清液。采用苯酚-氯仿抽提和乙醇沉淀,从样品中回收DNA。通过qPCR法相对定量免疫沉淀的Runx2启动子区(-118~+59,片段大小178 bp)DNA的水平,并计算"标准化处理后的富集度"。相对定量免疫沉淀的靶基因DNA水平计算方法:以IP开始时加入的交联染色质提取物的含量作为分母(25 μg)(Input)进行百分比(%)计算。标准化处理后的富集度计算方法:以未经任何实验处理的对照组细胞ChIP实验获得的DNA定量数据对实验组DNA定量数据进行标准化处理。Runx2启动子区qPCR特异性引物序列:Runx2-F Primer(5′-3′)为CCAGCTCATTATTGTAGTATT,Runx2-R Primer(5′-3′)为GCTACGAATCTCTAATCTTAA。

1.2.6 甲基化敏感限制性内切酶分析Runx2启动子区的甲基化状态 提取各组细胞基因组DNA。将每管基因组DNA分成2份,每份5 μg,分别加入20 U的HpaⅡ酶或MspⅠ酶,在37 ℃恒温水浴中消化2 h。消化结束后,每个样本取200 ng DNA,对Runx2启动子

区进行qPCR扩增。通过1%琼脂糖凝胶电泳,检测qPCR扩增后的片段大小和相对浓度。

1.2.7 茜素红染色 使用4%多聚甲醛于4 ℃固定细胞培养物30 min后,向细胞样品中加入0.2%茜素红染色液,室温染色5 min。PBS洗涤2次,去除多余染色液。光学显微镜下镜检、拍照。使用Image Pro Plus 6.0软件对各组进行细胞茜素红染色红光像素值分析,计算相对定量。

1.3 统计学方法

使用GraphPad Prism v8软件进行统计学分析和制图。计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间差异分析采用t检验;多组间差异分析采用单因素方差分析,多组间两两比较采用事后*Bonferroni*检验。P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Sul上调BMSCs内成骨细胞分化关键转录因子Runx2的表达

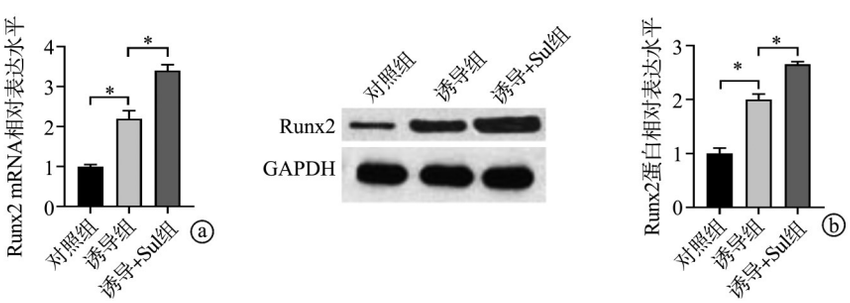
qPCR和Western blot结果显示,与对照组相比,诱导组Runx2 mRNA和蛋白表达水平明显上升(P<0.05);与诱导组相比,诱导+Sul组Runx2 mRNA和蛋白表达水平明显上升(P<0.05),见图1。

2.2 BMSCs向成骨细胞分化后Runx2启动子区去甲基化水平

ChIP实验结果显示,使用抗IgG抗体,所有分组下拉的Runx2 DNA含量在Input的总DNA中所占相对百分比差异无统计学意义(P>0.05);而使用抗Histone H3抗体,与诱导组相比,诱导+Sul组上述指标明显升高(P<0.05),见图2a。经HpaⅡ酶消化后,与诱导组相比,诱导+Sul组Runx2启动子区DNA含量明显降低(P<0.05);经MspⅠ酶消化后,对照组、诱导组和诱导+Sul组Runx2启动子区DNA均被完全消化,见图2b。

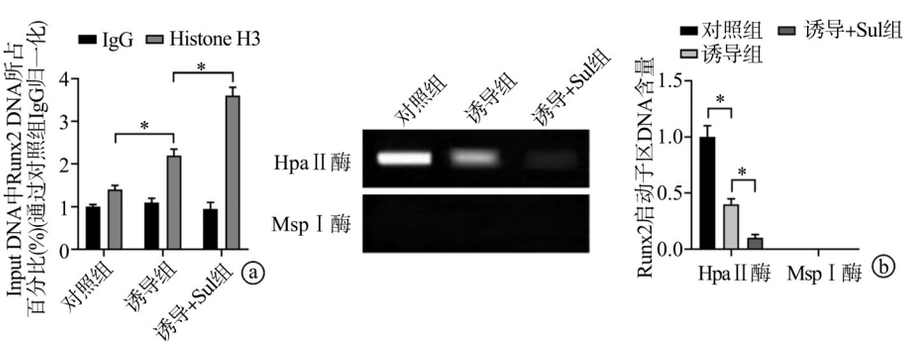
2.3 Sul通过TET1上调Runx2 DNA去甲基化

Western blot结果显示,与shRNA-Mock组相比,shRNA-TET组TET1、TET2和TET3蛋白表达水平降低(P<0.05),见图3a。ChIP实验结果显示,使用抗Histone H3抗体进行免疫共沉淀后,与对照组相比,诱导+Sul组下拉的Runx2 DNA含量在Input中所占相对百分比明显升高(P<0.05);与诱导+Sul组相比,仅诱导+Sul+shRNA-TET1组上述指标明显降低(P<0.05),见图3b。经HpaⅡ酶消化后,与对照组相比,诱导+Sul组Runx2启动子区DNA含量降低(P<0.05);与诱导+Sul组相比,诱导+Sul+shRNA-TET1组上述指标升高(P<0.05);经MspⅠ酶消化后,所有分组Runx2启动子区DNA均被完全消化,见图3c、d。



a:qPCR;b:Western blot *:P<0.05

图1 BMSCs内成骨细胞分化关键转录因子Runx2表达水平

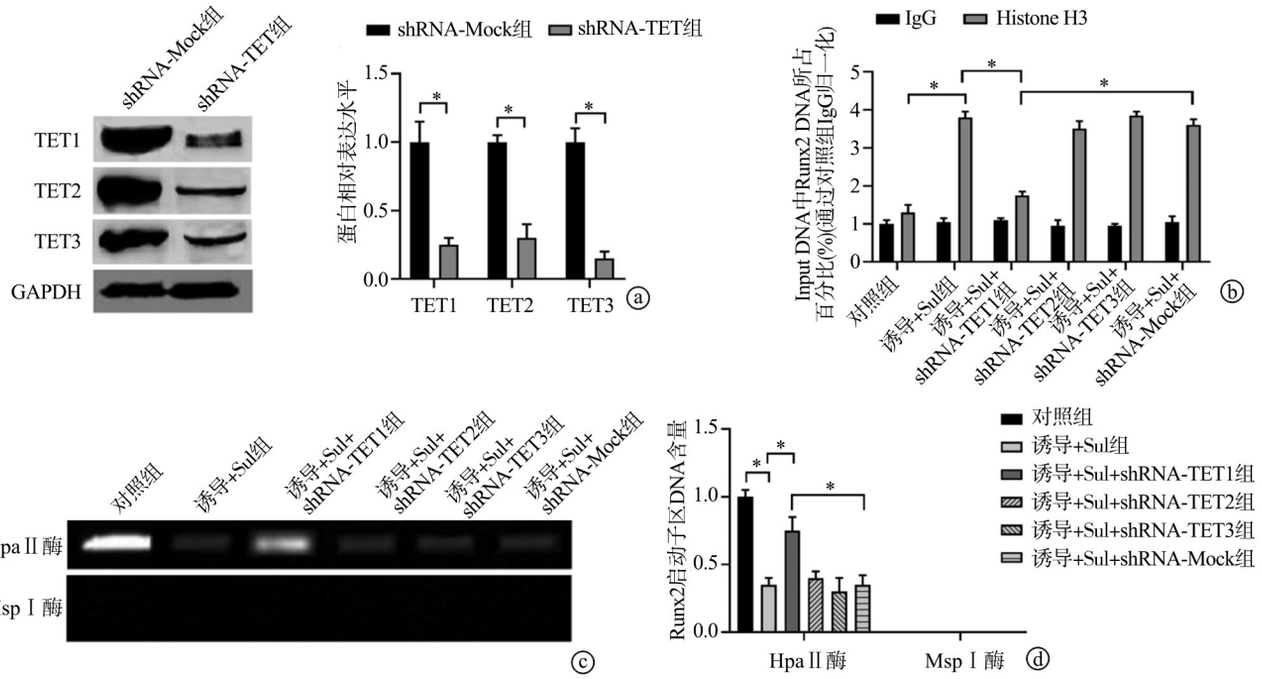


a:ChIP实验分析BMSCs向成骨细胞分化后与IgG或Histone H3结合的Runx2 DNA含量变化;b:HpaⅡ酶和MspⅠ酶分析细胞中Runx2启动子区的甲基化状态 *:P<0.05

图2 BMSCs向成骨细胞分化后Runx2启动子区甲基化水平

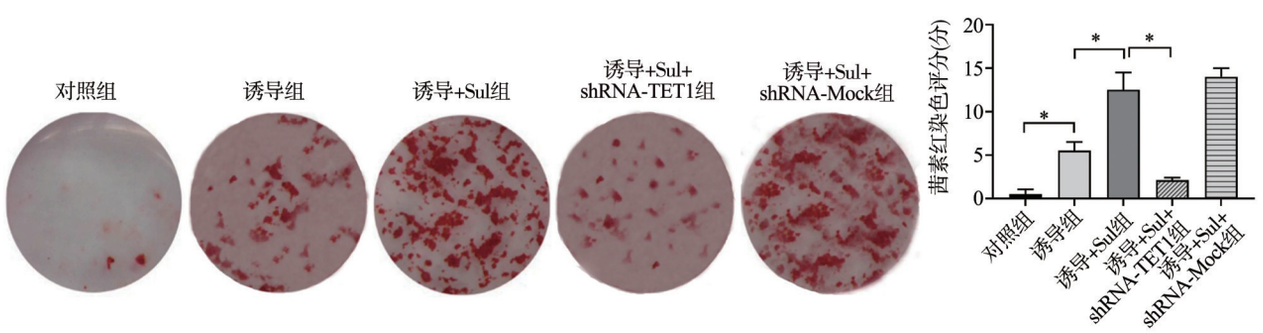
2.4 敲低TET1抑制Sul促进BMSCs向成骨细胞分化

茜素红染色结果显示，与诱导组相比，诱导+Sul组茜素红染色评分明显上升（$P<0.05$）；与诱导+Sul组相比，诱导+Sul+shRNA-TET1组茜素红染色评分明显降低（$P<0.05$），而诱导+Sul+shRNA-Mock组茜素红染色评分无明显变化（$P>0.05$），见图4。



a：Western blot检测各组TET1、TET2和TET3蛋白表达水平；b：ChIP实验分析BMSCs向成骨细胞分化后与IgG或Histone H3结合的Runx2 DNA含量变化；c、d：HpaⅡ酶和MspⅠ酶分析细胞中Runx2启动子区的甲基化状态 *：$P<0.05$

图3 TET1、TET2、TET3对Sul促进Runx2 DNA去甲基化的影响



a：BMSCs茜素红染色图（×200）；b：染色强度评分统计图 *：$P<0.05$

图4 BMSCs向成骨细胞分化的水平测定

3 讨论

Sul在癌症领域已被广泛研究，是一种安全、无毒、副作用小，且具有抗癌和抗氧化活性的天然化合物。核因子E2-相关因子2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）是一种响应氧化应激而被激活的关键转录因子。研究显示，Sul能通过激活Nrf2，上调一系列细胞保护基因的表达，促进细胞凋亡，阻滞细胞周期和血管生成，发挥抗癌作用[8]。本研究发现，Sul上调BMSCs内成骨细胞分化关键转录因子Runx2的表达。Runx2是骨形成和成骨细胞分化所必需的特异性转录因子，通过直接调控hedgehog基因产物、成纤维细胞生长因子、Wnt等信号通路来促进成骨祖细胞的增殖，并诱导其向成骨细胞谱系转化[9]。在BMSCs向成骨细胞分化过程中，Runx2甲基化水平降低[10]。而本研究结果显示，BMSCs向成骨细胞分化后Runx2启动子区去甲基化水平升高，Sul则增强了这一过程。这说明了Sul促进BMSCs向成骨细胞的分化。

DNA甲基化是重要的表观遗传学调控机制之一，在调节基因表达中起着关键作用。DNA甲基化是基因活性或功能的一种可遗传变化，不改变DNA序列。CpG岛DNA甲基化可抑制基因的表达。DNA去甲基

化的机制相当复杂,分为主动去甲基化和被动去甲基化。主动的DNA去甲基化是指通过酶促作用从5mC中去除或修饰甲基的过程[5]。TET1是一种5-甲基胞嘧啶羟化酶,属于人α-酮戊二酸加氧酶中的TET蛋白家族。TET1识别并结合CpG岛等DNA区域,启动DNA去甲基化程序,在维持基因组甲基化动态变化和稳态中发挥关键作用[5]。其异常表达和/或功能失调与肿瘤的发生发展、衰老相关慢性疾病等多种病理生理过程密切相关[11]。既往研究显示,TET1参与多种骨相关疾病的表观遗传学调控。在骨癌慢性疼痛的病理机制中,骨癌组织TET1表达上调,并通过启动子区去甲基化促进瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员TRPV4的表达而介导大鼠骨癌痛感,敲低TET1/TRPV4轴可降低骨癌模型大鼠的痛感评分[12]。TET1基因拷贝数损失引起的DNA去甲基化修饰能力受损参与骨肉瘤的发生发展[13]。而且TET1还在干细胞干性的自我维持中发挥关键作用[14]。TET1和DNA甲基转移酶3A/B在胞内具有互相拮抗和协同作用,共同维持人类胚胎干细胞基因调控区甲基化水平稳态和正常的基因表达调控功能[15]。因此,TET1对于干细胞功能的维持至关重要。本研究结果显示,Sul提高Runx2的去甲基化水平是通过TET1实现的。

既往关于Sul的表观遗传学调控活性的研究,主要专注于癌症领域。而本研究证实了Sul的另一个表观遗传学作用靶点——TET1。本研究敲低TET1后,Sul无法促进Runx2的转录及表达;且敲低TET1后,Sul处理的BMSCs定向成骨分化的茜素红染色评分明显降低,说明TET1的表达下调阻断了Sul促进BMSCs向成骨细胞的定向分化。这对于Sul促进成骨分化的分子机制研究是一项重要的发现,即Sul能够通过TET1上调Runx2的表观遗传学表达,达到促成骨分化的目的[15-16]。

本研究初步证实了Sul能够通过TET1促进Runx2启动子区DNA去甲基化,促进BMSCs向成骨细胞分化。但本研究尚未深入探索Sul与TET1的作用方式是直接还是间接?如果是直接的相互作用,那么又是Sul分子中的哪些基团与TET1结合?这将是我们下一步要重点关注和研究的领域。

[参考文献]

[1] Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast differentiation and signaling: established concepts and emerging topics[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6651. doi: 10.3390/ijms22136651.

[2] Marie PJ. Osteoblast dysfunctions in bone diseases: from cellular and molecular mechanisms to therapeutic strategies[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 72(7): 1347-1361. doi: 10.1007/s00018-014-1801-2.

[3] Komori T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation[J]. Histochem Cell Biol, 2018, 149(4): 313-323. doi: 10.1007/s00418-018-1640-6.

[4] Cakouros D, Gronthos S. Epigenetic regulators of mesenchymal stem/stromal cell lineage determination[J]. Curr Osteoporos Rep, 2020, 18(5): 597-605. doi: 10.1007/s11914-020-00616-0.

[5] Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond[J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(9): 517-534. doi: 10.1038/nrg.2017.33.

[6] Raut N, Wicks SM, Lawal TO, et al. Epigenetic regulation of bone remodeling by natural compounds[J]. Pharmacol Res, 2019, 147: 104350. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104350.

[7] Monteiro do Nascimento MH, Ambrosio FN, Ferraraz DC, et al. Sulforaphane-loaded hyaluronic acid-poloxamer hybrid hydrogel enhances cartilage protection in osteoarthritis models[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 128: 112345. doi: 10.1016/j.msec.2021.112345.

[8] Su X, Jiang X, Meng L, et al. Anticancer activity of sulforaphane: the epigenetic mechanisms and the Nrf2 signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 5438179. doi: 10.1155/2018/5438179.

[9] Komori T. Whole aspect of Runx2 functions in skeletal development[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5776. doi: 10.3390/ijms23105776.

[10] Wakitani S, Yokoi D, Hidaka Y, et al. The differentially DNA-methylated region responsible for expression of runt-related transcription factor 2[J]. J Vet Med Sci, 2017, 79(2): 230-237. doi: 10.1292/jvms.16-0321.

[11] Wu HX, Chen YX, Wang ZX, et al. Alteration in TET1 as potential biomarker for immune checkpoint blockade in multiple cancers[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 264. doi: 10.1186/s40425-019-0737-3.

[12] Xu ZH, Niu Z, Liu Y, et al. TET1-TRPV4 signaling contributes to bone cancer pain in rats[J]. Brain Sci, 2023, 13(4): 644. doi: 10.3390/brainsci13040644.

[13] Pires SF, de Barros JS, da Costa SS, et al. DNA methylation patterns suggest the involvement of DNMT3B and TET1 in osteosarcoma development[J]. Mol Genet Genomics, 2023, 298(3): 721-733. doi: 10.1007/s00438-023-02010-8.

[14] Wang C, Yu X, Ding S, et al. Induced hepatic stem cells maintain self-renewal through the high expression of Myc coregulated by TET1 and CTCF[J]. Cell Biosci, 2022, 12(1): 143. doi: 10.1186/s13578-022-00883-7.

[15] Chao L, Yang S, Li H, et al. Competitive binding of TET1 and DNMT3A/B cooperates the DNA methylation pattern in human embryonic stem cells[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2022, 1865(7): 194861. doi: 10.1016/j.bbagrm.2022.194861.

[16] 张 璇,田明硕,王 健,等. 萝卜硫素提取纯化及其抗癌功能研究进展[J]. 食品工业科技,2022,43(17):424-434. doi:10.13386/j.issn1002-0306.2021040167.

(编辑:刘 艺)