DOI:10.16016/j.2097-0927.202403078

Mage-D1 对敲除小鼠骨髓间充质干细胞的矿化调控作用

陆明洁,袁洪燕,徐 丹,彭雪莲,邹续强,谢 波,毛靖雯,温秀杰 646000 四川 泸州,西南医科大学附属口腔医院正畸科,口颌面修复重建和再生泸州市重点实验室,西南医科大学口腔医学研究所

[**摘要**] **目的** 探讨黑色素瘤相关抗原 D1(melanoma associated antigen D1,Mage-D1)对小鼠股骨骨量和对大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stromal cells,BMSCs)矿化能力的影响及潜在分子机制。**方法** 以雌性 Mage-D1 基因敲除杂合子小鼠和雄性野生型(wide type,WT)小鼠作为亲本小鼠,繁育 Mage-D1 基因敲除纯合子(Mage-D1 knock out, Mage-D1 KO)小鼠。PCR 和琼脂糖凝胶电泳鉴定雄性 Mage-D1 基因敲除纯合子小鼠和同窝雄性野生型小鼠,micro-CT 扫描用于分析小鼠股骨骨量,ELISA 和化学法用于检测小鼠血清钙离子、磷离子、降钙素和甲状旁腺素水平。原代培养 BMSCs 并进行流式细胞术鉴定,免疫荧光染色观察 Mage-D1 在 BMSCs 中的表达。构建 Mage-D1 沉默慢病毒感染 BMSCs,分为阴性对照组(sh-NC)和沉默组(sh-Mage-D1);细胞划痕实验检测 BMSCs 的迁移能力,流式细胞术和 CCK-8 检测 BMSCs 周期变化和增殖能力;矿化诱导后行碱性磷酸酶染色、茜素红染色;RT-qPCR 和 Western blot 检测 ALP、Runx2、Col1 表达水平;RT-qPCR 检测矿化相关基因 *p75NTR* 及 *MSX1* 以探讨潜在机制。**结果** 与野生型小鼠相比,Mage-D1 敲除纯合子小鼠股骨皮质骨厚度减小、皮质骨矿物含量降低、松质骨骨矿物含量降低、骨小梁数减少、松质骨骨表面密度降低、骨小梁分离度增大($P<0.05$);敲除 Mage-D1 后,小鼠血钙、血磷、降钙素和甲状旁腺素水平无明显变化。Mage-D1 表达于整个 BMSCs 内,在细胞核及胞核周围区域高表达。与 sh-NC 相比,sh-Mage-D1 组细胞增殖能力降低($P<0.01$),细胞迁移能力增强($P<0.01$);矿化诱导后,sh-Mage-D1 组 ALP、Runx2、Col1 基因($P<0.05$)和蛋白($P<0.01$)表达下降,碱性磷酸酶染色和茜素红染色更浅;sh-Mage-D1 组细胞中 *p75NTR*、*Msx*1 表达水平比 sh-NC 组低。**结论** *Mage-D*1 基因敲除可明显降低小鼠股骨骨量。Mage-D1 可促进 BMSCs 增殖、抑制其迁移,正向调控其体外矿化,p75NTR- Dlx1/Msx1 信号轴可能参与 Mage-D1 对骨代谢活动的调控。

[**关键词**] Mage-D1;骨髓间充质干细胞;基因敲除;矿化调控
[**中图法分类号**] R322.71; R329.24; R394.2 [**文献标志码**] A

Mineralization regulation of MAGE-D1 on bone marrowmesenchymal stem cells in knockout mice

LU Mingjie, YUAN Hongyan, XU Dan, PENG Xuelian, ZOU Xuqiang, XIE Bo, MAO Jingwen, WEN Xiujie Department of Orthodontics, Luzhou Key Laboratory of Oral&Maxillofacial Reconstruction and Regeneration, Institute of Stomatology, Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan Province, 646000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of melanoma associated antigen D1 (Mage-D1) on mouse femoral bone mass and mineralization ability of mouse bone marrow mesenchymal cells (BMSCs) and its potential molecular mechanism. **Methods** Female Mage-D1 gene knockout heterozygous mice and male wild-type (WT) mice were subjected as parent mice to breed Mage-D1 gene knockout homozygous (Mage-D1 KO) mice. PCR and agarose gel electrophoresis were used to identify male Mage-D1 knockout (Mage-D1

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81970906)
[**通信作者**] 温秀杰,E-mail: wenxiujie@tom.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

KO) mice and littermate male wild-type (WT) mice. Micro-CT scanning was performed to observe mouse femoral bone mass, and ELISA and chemical assay were employed to detect serum levels of calcium, phosphorus, calcitonin, and parathyroid hormone in mice. After primary cultured BMSCs were identified with flow cytometry, immunofluorescence staining was utilized to detect the expression of Mage-D1 in BMSCs. BMSCs were infected by Mage-D1 silencing lentivirus, and then the cells were divided into negative control group (sh-NC) and silencing group (sh-Mage-D1). Cell scratch assay was conducted to detect the migration ability of BMSCs, and flow cytometry and CCK-8 assay were conducted to detect the cycle change and proliferation ability of BMSCs. After mineralization induction, alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red staining were performed; RT-qPCR and Western blotting were used to measure the expression levels of ALP, Runx2 and Col1. RT-qPCR was used to detect mineralization-related genes p75NTR and Msx1. **Results** Compared with the WT mice, the femoral cortical bone thickness, cortical bone mineral content, cancellous bone mineral content, trabecular number, and cancellous bone surface density were decreased, and trabecular separation was increased in the Mage-D1 knockout homozygous mice ($P<0.05$). There were no significant changes in the serum levels of calcium, phosphorus, calcitonin and parathyroid hormone in mice after Mage-D1 knockout. Mage-D1 was expressed in the whole BMSCs and was highly expressed in the nucleus and perinuclear regions. Compared with the sh-NC BMSCs, the sh-Mage-D1 group had decreased proliferation ability ($P<0.01$), enhanced migration ability ($P<0.01$), and decreased expression of ALP, Runx2 and Col1 genes ($P<0.05$) and protein ($P<0.01$) after mineralization induction, milder ALP and alizarin red stain, and lower expression levels of p75NTR and Msx1. **Conclusion** Mage-D1 knockout can significantly reduce femur bone mass in mice. It can promote the proliferation and inhibit migration of BMSCs, and positively regulate their mineralization *in vitro*, and the p75NTR-Dlx1/Msx1 signaling axis may be involved in the regulation of bone metabolism by Mage-D1.

[**Key words**] Mage-D1; bone mesenchymal stromal cells; gene knockout; mineralization regulation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81970906). Corresponding author: WEN Xiujie, E-mail: wenxiujie@tom.com

骨重建是一个骨形成和骨吸收动态平衡的过程,当骨吸收大于骨形成时出现骨质疏松等疾病[1]。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stromal cells, BMSCs)具有强大的骨形成能力,是骨组织工程中最常用的干细胞之一,近年来备受关注。明确骨组织矿化过程中的分子生物学机制,对于推动骨组织工程的研究具有重要意义。

黑色素瘤相关抗原 D1(melanoma associated antigen D1, Mage-D1),又称 Dlxin-1 或 NRAGE,是由 Pold 等首次克隆并鉴定为Ⅱ型黑色素瘤相关抗原基因家族的新成员,它位于 X 性染色体上,由 13 个外显子构成,全长 6 601 bp。编码的蛋白由 3 个结构域构成,分别是 MHD2、MHD 和连接两者的 IRD[2]。Mage-D1 的功能广泛,可与多种核蛋白、细胞表面受体和转录因子发生相互作用,参与细胞分化、迁移、增殖、周期、凋亡和转录调控等[3-7]。近年来,有关 Mage-D1 对硬组织(包括骨骼和牙齿)发育与矿化影响的研究逐渐增多。敲除 *Mage-D1* 后,小鼠体内破骨细胞数量和表面积均有增加。同时,敲除 *Mage-D1* 可增强 RANKL/OPG 比值,促进成骨细胞介导的破骨细胞分化[8]。此外,敲除 *Mage-D1* 可诱导自噬相关基因的表达,并通过增加破骨细胞的活性和分化来加速牙周炎的进程[9]。研究表明 *Mage-D1* 可通过调控 NF-κB 信号通路,参与成牙本质细胞的分化[10]。

尽管多项研究表明 *Mage-D1* 参与矿化相关活动,但是关于 *Mage-D1* 调控骨代谢活动的直接证据仍然缺乏。因此,本研究旨在通过体内和体外实验阐明 *Mage-D1* 基因敲除对小鼠股骨骨量以及大鼠骨髓间充质干细胞矿化能力的影响。这将为支持 *Mage-D1* 具有正向调控矿化能力的观点提供更全面的理论支持和更充分的实验依据,也为其在骨组织工程中的发展前景提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

自赛业生物科技有限公司购买 6~8 周龄、背景为 C57BL/6 的雌性 Mage-D1 基因敲除杂合子小鼠和雄性野生型(wide type, WT)小鼠,作为亲本小鼠繁育 *Mage-D1* 基因敲除纯合子(Mage-D1 knock out, Mage-D1 KO)小鼠,饲养于西南医科大学实验动物中心无特

定病原体(SPF)级动物房。3 周龄 SD 大鼠购买自西南医科大学实验动物中心。本实验获得西南医科大学动物伦理委员会批准(201903-187)。

1.2 主要试剂

α-MEM 培养基(普诺赛,中国),胎牛血清(Gibco,美国),鬼笔环肽、BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒(碧云天,中国),大鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化试剂盒、茜素红染色液 (OriCell,中国),地塞米松、β 甘油磷酸钠五水合物、维生素 C(Solarbio, 中国),CCK-8 试剂盒(Apexbio,美国),CD29、CD34、CD44、CD45、CD90 抗体、ALP 抗体、鼠二抗(Santa Crus,美国),Mage-D1 抗体(Antibodies,英国),β-actin 抗体(华安,中国),Runx2 抗体(Abcam,美国),Col1 抗体(Proteintech,中国),山羊抗鼠 IgG-FITC(Bioworld,美国)、山羊抗兔 IgG-FITC(Bioworld,美国),山羊抗兔二抗(Affinity,美国),细胞周期试剂盒、RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(赛默飞,美国),TB Green™ Premix Ex *Taq*™ Ⅱ(TaKaRa,日本),沉默慢病毒(吉凯基因,中国),钙含量检测试剂盒、血清磷含量检测试剂盒、小鼠降钙素试剂盒、小鼠甲状旁腺素试剂盒(睿信,中国)。

1.3 方法

1.3.1 Mage-D1 敲除小鼠的鉴定 剪取 10~15 日龄小鼠鼠尾,提取鼠尾 DNA 后进行 PCR 扩增,PCR 反应体系包括 DNA、正引物、反引物、2×*Taq* 预混液和 ddH_2O,取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳并使用凝胶成像系统显影、采集图像。提取 15 日龄同窝雄性 Mage-D1 KO 小鼠和野生型小鼠股骨 RNA,实时荧光定量 PCR 检测股骨 *Mage-D*1 基因表达量。引物序列参见表 1。

表 1 小鼠引物序列

基因	引物序列(5′-3′)
*Mage-D*1(敲除型)	正向:CCGAATCCTATTTCCCGACCTTG
	反向:ATGTATTTTGCATGCCACTCTCAG
*Mage-D*1(野生型)	正向:CCGAATCCTATTTCCCGACCTTG
	反向:GTTTCTGAGCCATAGCTCTCGT
*Mage-D*1	正向:TTACGACCCTCACCTAATCT
	反向:TTCTTCTCCAGGACAAAGC
GAPDH	正向:TTCTTCTCCAGGACAAAGC
	反向:TTCTTCTCCAGGACAAAGC

1.3.2 *Mage-D*1 敲除小鼠血清指标检测 内眦取血法提取 10 月龄同窝雄性 Mage-D1 KO 小鼠和野生型小鼠血液,4 ℃过夜,离心取上清,根据钙离子、磷离子、降钙素、甲状旁腺素的检测试剂盒实验方法操作,酶标仪检测 660 nm 处光密度值,根据公式计算小鼠血清中相应指标的含量。

表 2 大鼠引物序列

基因	引物序列(5′-3′)
*Mage-D*1	正向:CAACAACCAGCCTAAGACAGC
	反向:CACCGTCAGTTTCAGAGATACC
ALP	正向:CATCGCCTATCAGCTAATGCACA
	反向:ATGAGGTCCAGGCCATCCAG
*Runx*2	正向:CATGGCCGGGAATGATGAG
	反向:TGTGAAGACCGTTATGGTCAAAGTG
*Col*1	正向:CTGGCAAGAACGGAGATGATG
	反向:ATCCAAACCACTGAAACCTCTG
P75NTR	正向:GGTTCCTCCAGAGCAAGACC
	反向:AGCAGCCAAGATGGAGCAAT
*MSX*1	正向:CCTACGCAAGCACAAGACCA
	反向:CGCTCGGCAATAGACAGGTA
GAPDH	正向:GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG
	反向:ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA

1.3.3 Mage-D1 敲除小鼠股骨 CT 扫描 过量二氧化碳处死 10 月龄同窝雄性 Mage-D1 KO 小鼠和野生型小鼠后分离股骨,4%多聚甲醛固定后,应用 Micro-CT 对小鼠股骨进行扫描重建,用 Hiscan Analyzer software 选择感兴趣区域(ROI)进行数据分析。ROI:股骨远端生长板下 4 mm 开始,长 2 mm 的皮质骨;股骨远端生长板下 1.5 mm 开始,长 2 mm 的松质骨。

1.3.4 提取 BMSCs 细胞 过量 CO_2 处死 3 周龄 SD 大鼠后在无菌状态下取出股骨和胫骨,剔除软组织。剪去股骨和胫骨的两端后,用完全培养基冲洗骨髓腔至骨头发白,收集骨髓液,离心后加入含 10%血清的培养基,接种至培养皿中,放置于细胞培养箱中进行培养。

1.3.5 流式检测 BMSCs 细胞表面抗原表达 生长情况良好的 P3 细胞消化离心后,加入 4%多聚甲醛 4 ℃固定 30 min,PBS 清洗后弃上清,加入含 3%FBS 的 PBS 混匀,细胞计数后置成 5×10^5 个/mL 的混悬液。分组后分别加入 CD29、CD34、CD44、CD45、CD90 抗体 4 ℃过夜。加入对应种属荧光二抗避光孵育 2 h,离心后 PBS 稍洗,加入含 3%FBS 的 PBS 重悬后用流式细胞仪检测 BMSCs 细胞表面抗原的表达。

1.3.6 细胞成脂诱导 将 BMSCs 置于 6 孔板中培养,待细胞密度至 85%左右时,培养基换为成脂诱导培养基,当诱导至镜下可看到脂滴时,弃除培养基,4%多聚甲醛固定 30 min,加入油红 O 染液染色 30 min,PBS 洗涤后进行采集图像。

1.3.7 碱性磷酸酶染色及茜素红染色 BMSCs 接种至 6 孔板,待细胞密度为 85%左右时,更换为矿化诱

导培养基(含 10 nmol/L 地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠,50 μg/mL 维生素 C,10% FBS,1%双抗的 α-MEM 培养基),每 3 d 换液,分别在 7 d 及 21 d 时弃除培养基用4%多聚甲醛固定细胞后,用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒及茜素红染液染色,观察、采集图像。

1.3.8 鬼笔环肽染色 BMSCs 细胞骨架 按照 2×10^4 个/cm^2 的密度将细胞铺于提前放好细胞爬片的 6 孔板中,并设置 2 个复孔。当细胞密度达到 50%时,弃培养基,用 PBS 轻柔冲洗后加入细胞固定液处理 15 min,用配置好的 0.5%的 Triton 破膜液处理 5 min,加入鬼笔环肽工作液避光孵育 30 min,PBS 清洗后加入含 DAPI 的封片液进行封片,使用显微镜进行图像的观察图采集。

1.3.9 细胞免疫荧光 将细胞铺于提前放好细胞爬片的 6 孔板中,待细胞密度至 60%时,弃培养基,4%多聚甲醛固定 15 min,用 0.5%的 Triton 破膜液处理 10 min,加入封闭液封闭 30 min,吸干封闭液后滴加 Mage-D1 抗体(1∶500),4 ℃过夜。次日常温复温 1 h,加入二抗山羊抗兔 IgG-FITC(1∶500)避光孵育 1 h,PBS 稍洗后加入含 DAPI 的封片液进行封片,采用荧光显微镜进行图像的采集。

1.3.10 Mage-D1 沉默慢病毒的转染 根据 Mage-D1 的 NCBI 号(Gene ID:84469)委托上海吉凯基因科技有限公司构建 Mage-D1 沉默慢病毒。通过预实验确定最佳 MOI 为 50,加入 HiTransG P 感染增强液提高感染效率,嘌呤霉素最佳浓度 2 μg/mL。将慢病毒包被空载病毒和 Mage-D1 沉默病毒转染至 BMSCs 细胞中,加入病毒约 48 h 后按照最佳嘌呤霉素浓度筛选 2 d,去除转染失败的细胞。

1.3.11 RT-qPCR 实验 分离小鼠股骨,将骨组织剪碎,加入液氮研磨至粉末状,加入 Trizol,静置后离心,吸取上清,加入氯仿,混匀静置后离心吸取水相,加入异丙醇,混匀静置后,离心去上清,酒精洗涤 RNA,干燥后重悬,获得小鼠股骨 RNA;去除细胞原培养基,PBS 洗涤后加入 Trizol,后续同上。测量 RNA 的浓度后进行逆转录实验,用逆转录所得的 cDNA 进行定量 PCR 实验,反应体系包括 cDNA、正反引物、无酶水、SYBR Premix。反应后用 CT 值和 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 的方法进行计算。引物序列见表 1、2。

1.3.12 Western blot 实验 提取细胞总蛋白,BCA 检测蛋白浓度后进行蛋白变性处理。根据蛋白浓度,每个泳道加入 50 μg 的蛋白,60 V 电泳 30 min 后 120 V 电泳 90 min。电泳停止后进行湿转,300 mA 转 1 h,快速封闭液封闭 30 min,一抗(Mage-D1 1∶1 000,ALP 1∶100,Runx2 1∶500,Col1 1∶5 000,β-actin 1∶10 000)孵育并 4 ℃过夜。次日孵育二抗,通过化学发光系统显影、采集图像。

1.3.13 细胞周期检测 将细胞铺于 6 孔板中,待细胞密度至 85%时,消化洗涤细胞,加入预冷 70%乙醇,4 ℃过夜固定,PBS 清洗细胞 2 次后弃上清,加入细胞周期工作液,使细胞密度为 1×10^6 个/mL,室温避光孵育 30 min,上机检测。

1.3.14 CCK8 检测细胞增殖 将细胞铺至 96 孔板中并设置副孔,次日,按照 CCK-8:完全培养基为 1∶100 的比例配制检测液,并加入 96 孔板中,37 ℃避光孵育 2 h 后在 450 nm 处测得光密度,连续检测 7 d 后制作生长曲线图。

1.3.15 细胞迁移 将细胞铺于 6 孔板中,待细胞长满后,用枪头在底部划直线,使用无血清无双抗的培养基培养细胞,在划线后的 0、12、24 h 用倒置显微镜采集图像,使用 Image J 分析 0、12、24 h 划痕面积,细胞移动的面积与初始划痕面积之比为迁移率,即迁移率=(0 h 划痕面积−12 h/24 h 划痕面积)/0 h 划痕面积×100%。

1.4 统计学分析

实验数据用 IBM SPSS 23.0 进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 进行统计描述。服从正态且方差齐的两组计量资料比较采用 t 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

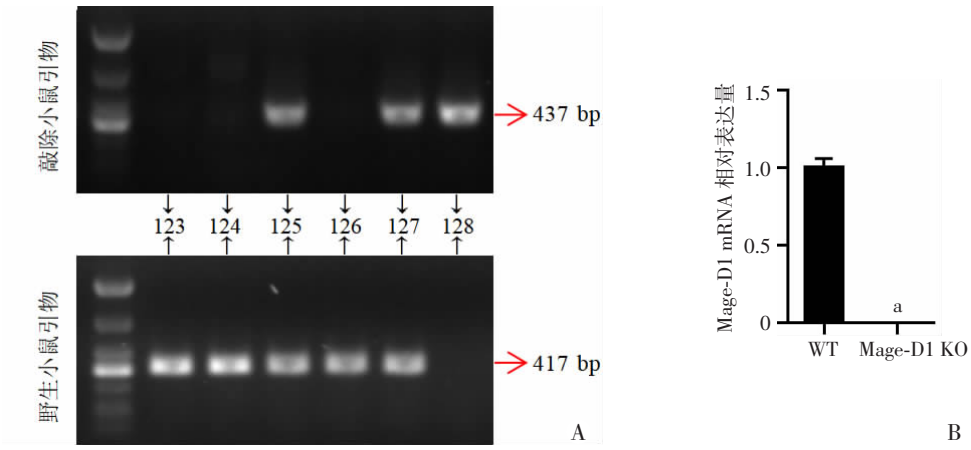
2.1 *Mage-D1* 基因敲除小鼠的鉴定

为了鉴定子代小鼠基因型,提取 10~15 日龄小鼠鼠尾 DNA,PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳。鉴定结果显示:只有 1 条 437 bp 扩增条带的为 *Mage-D1* 基因敲除纯合子小鼠,只有 1 条 417 bp 扩增条带的为野生型小鼠,同时有 1 条 417 bp 扩增条带和 1 条 437 bp 扩增条带的为 *Mage-D1* 基因敲除杂合子小鼠(图 1A)。提取 15 日龄同窝雄性 *Mage-D1* 敲除鼠和野生型小鼠的股骨 RNA 进行 RT-qPCR 检测,结果显示 *Mage-D1* 基因敲除小鼠股骨中 *Mage-D1* 表达显著降低($P<0.01$,图 1B)。

2.2 *Mage-D1* 敲除小鼠股骨的 Micro-CT 检测

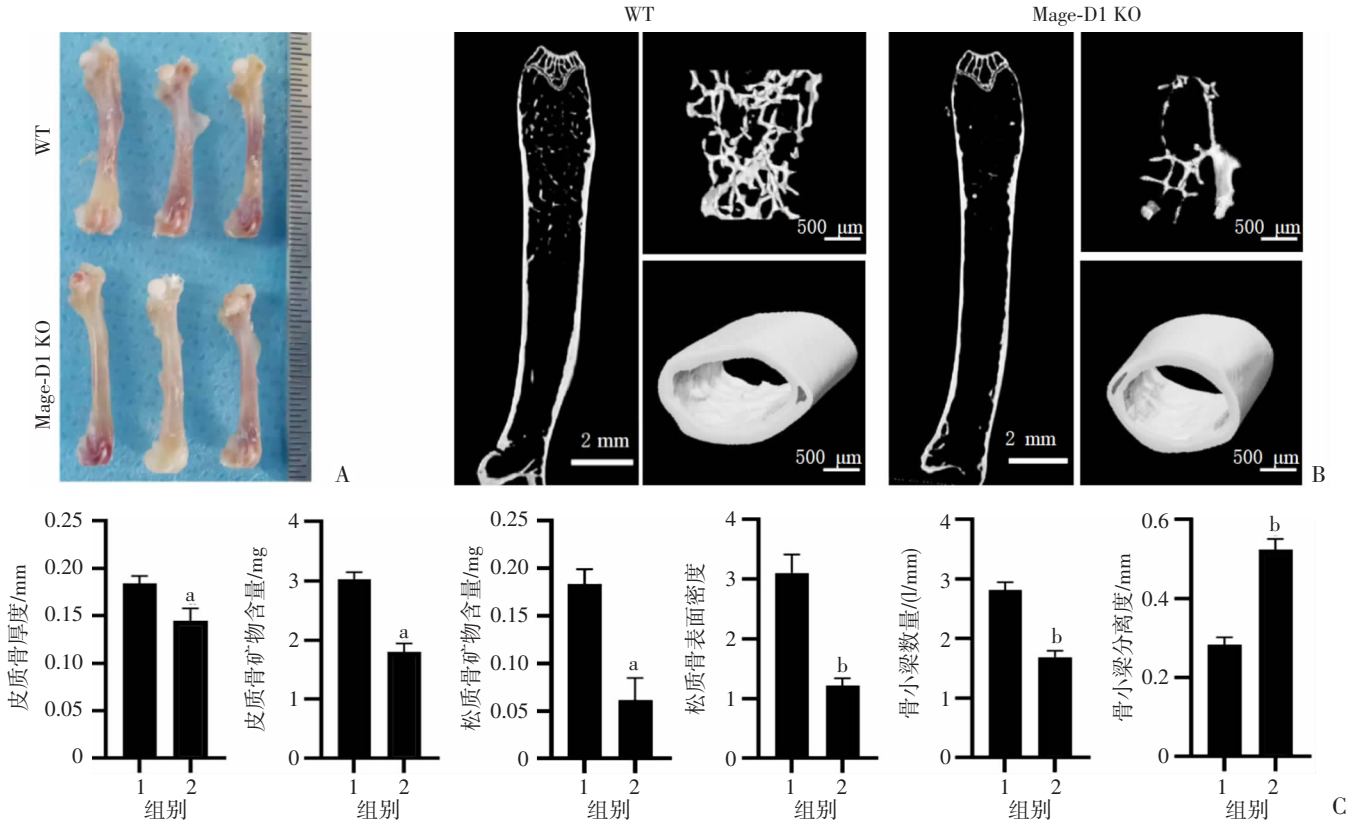
解剖 10 月龄 *Mage-D1* 敲除鼠和同窝野生型小鼠股骨,目视观察下发现不同窝小鼠股骨大小略有差异,但同窝 *Mage-D1* 敲除小鼠和野生型小鼠的股骨大小

相近(图 2A)。通过 Micro-CT 扫描小鼠整段股骨,并进行三维重建后发现 *Mage-D1* 敲除小鼠的骨小梁数较同窝野生型小鼠少,骨皮质厚度也较同窝野生型小鼠薄(图 2B)。对 ROI 进行分析后发现,与野生型小鼠相比,*Mage-D1* 敲除鼠股骨的皮质骨厚度减小、皮质骨矿物含量降低,松质骨矿物含量降低,松质骨骨表面密度降低,骨小梁数减少,骨小梁分离度增大($P<0.05$,图 2C)。



A:小鼠基因型的 PCR 鉴定结果;小鼠编号 128 为 *Mage-D1* 基因敲除纯合子,125、127 为 *Mage-D1* 基因敲除杂合子,123、124、126 为野生型小鼠;B:RT-PCR 检测小鼠骨组织中 *Mage-D1* 的表达;a:$P<0.01$,与野生型小鼠比较

图 1　*Mage-D1* 敲除小鼠的基因型鉴定及敲除效率验证　($n=3,\bar{x}\pm s$)



1:WT 组,2:Mage-D1 KO 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 WT 组比较

A:形态学观察小鼠股骨;B:小鼠股骨三维重建代表性图像;C:小鼠股骨 Micro-CT 数据分析

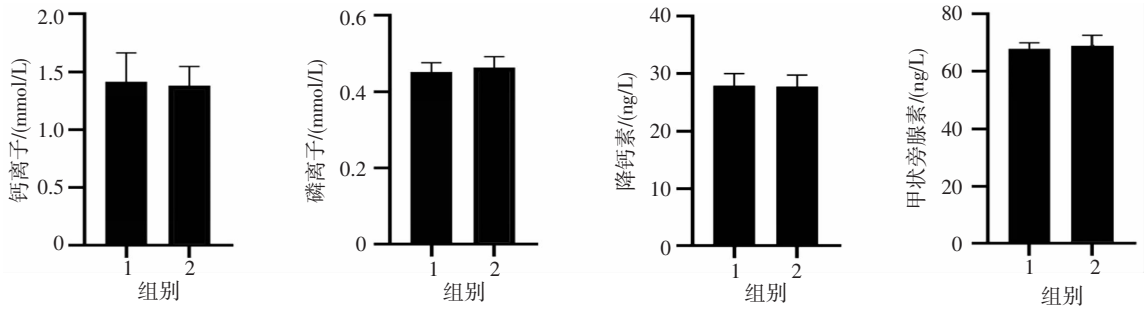
图 2　10 月龄 Mage-D1 敲除小鼠及同窝野生型小鼠股骨 Micro-CT 扫描检测($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.3 Mage-D1 敲除小鼠的血清指标检测

通过化学法和 ELISA 对 10 月龄同窝雄性 Mage-D1 敲除小鼠和野生型小鼠的内眦血进行血清学指标检测,结果显示 Mage-D1 敲除小鼠的血钙、血磷、降钙素和甲状旁腺素均与同窝野生型小鼠组无明显差异(图 3)。

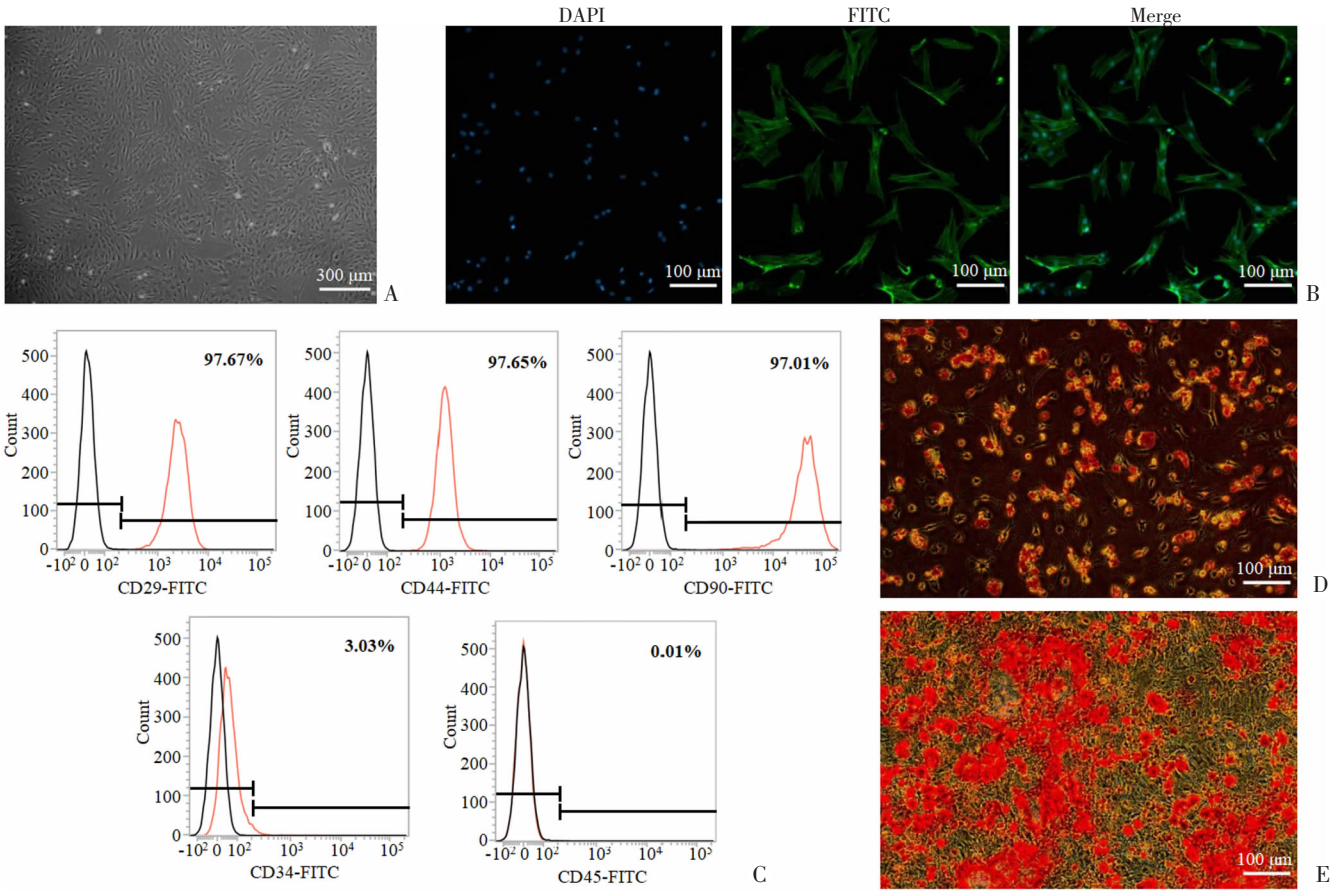
2.4 大鼠 BMSCs 的培养及鉴定

本实验通过全骨髓培养法培养大鼠骨髓间充质干细胞,光学显微镜下可见细胞呈梭形,纤维样,排列成网状、旋涡状(图 4A)。鬼笔环肽染色细胞骨架进一步表明细胞呈长梭形,具有成纤维细胞样形态(图 4B)。流式细胞术检测 BMSCs 细胞表面抗原显示:BMSCs 高表达干细胞表面标志物 CD29(97.67%)、CD44(97.65%)、CD90(99.01%),低表达造血干细胞表面标志物 CD34(3.03%)、CD45(0.01%)(图 4C)。成脂诱导 BMSCs 14 d 后油红 O 染色可在光学显微镜下观察到脂滴(图 4D),矿化诱导 BMSCs 21d 后茜素红染色可在光学显微镜下观察到钙结节生成(图 4E)。



1:WT 组,2:Mage-D1 KO 组

图 3 10 月龄 Mage-D1 敲除小鼠及同窝野生型小鼠血清指标检测($n=4$, $\bar{x}\pm s$)



A:P3 代 BMSCs;B:BMSCs 细胞骨架的鬼笔环肽染色;C:流式细胞术检测 BMSCs 表面抗原;D:BMSCs 成脂诱导;E:BMSCs 矿化诱导

图 4 BMSCs 的培养与鉴定

2.5 Mage-D1 在 BMSCs 内的表达

细胞免疫荧光检测 BMSCs 内 Mage-D1 的表达。可在荧光显微镜下观察到 Mage-D1 表达于整个细胞内,在细胞核及胞核周围区域高表达(图 5)。

2.6 BMSCs 内 Mage-D1 沉默效率

BMSCs 转染慢病毒后,使用嘌呤霉素筛选 2 d 以去除未转染细胞,提取 RNA 和蛋白,并通过 RT-qPCR 及 Western blot 检测转染效率。将 sh-NC 组作为对照组,sh-Mage-D1 组作为实验组,结果显示,Mage-D1 的基因($P<0.01$,图 6A)和蛋白($P<0.01$,图 6B、C)表达明显下降。

2.7 Mage-D1 对 BMSCs 细胞增殖、周期和迁移的影响

采用 CCK-8 法分别在 0~7 d 时检测 sh-NC 组和 sh-Mage-D1 组的光密度值,以光密度值的变化反映细胞增殖情况:从第 1 天起,sh-Mage-D1 组细胞的增殖能力较 sh-NC 组明显降低($P<0.01$,图 7A)。流式细胞术检测 sh-NC 组和 sh-Mage-D1 组细胞周期,沉默 Mage-D1 后,细胞的 G1 期增加、S 期降低、G2 期增加($P<0.01$,图 7B)。采用划痕实验分别在 12、24 h 时检测 sh-NC 组和 sh-Mage-D1 组细胞的迁移能力,实验结果显示在 12 h 和 24 h 时,sh-Mage-D1 组细胞迁移速度均明显快于 sh-NC 组($P<0.01$,图 7C、D)。

2.8 Mage-D1 对 BMSCs 矿化能力的影响

矿化诱导 7 d 后提取 sh-NC 组和 sh-Mage-D1 组细胞的 RNA 和蛋白,分别进行 RT-qPCR 和 Western blot 检测。结果显示与 sh-NC 组相比,sh-Mage-D1 组中矿化相关因子 *ALP*、*Runx*2 和 *Col*1 基因的表达均明显降低($P<0.05$,图 8A),蛋白表达也显著降低($P<0.01$,图 8B、C)。此外,矿化诱导 7d 后进行碱性磷酸酶染色(图 8D),染色结果显示,与 sh-NC 组相比,sh-Mage-D1 组碱性磷酸活性降低。在矿化诱导 21d 后进行茜素红染色(图 8E),结果显示 sh-Mage-D1 组钙结节较 sh-NC 组减少。

2.9 Mage-D1 调控矿化的潜在机制

细胞膜跨膜受体 p75 神经营养因子受体(p75 neurotrophin receptor,p75NTR)和转录因子 Dlx/Msx 对牙齿及骨组织的生物矿化至关重要。沉默 Mage-D1 后,提取 sh-NC 组和 sh-Mage-D1 组细胞的 RNA,进行 RT-qPCR 检测。结果显示与 sh-NC 组相比,sh-Mage-D1 组中 p75NTR 和 Msx1 表达均降低($P<0.05$,图 9)。

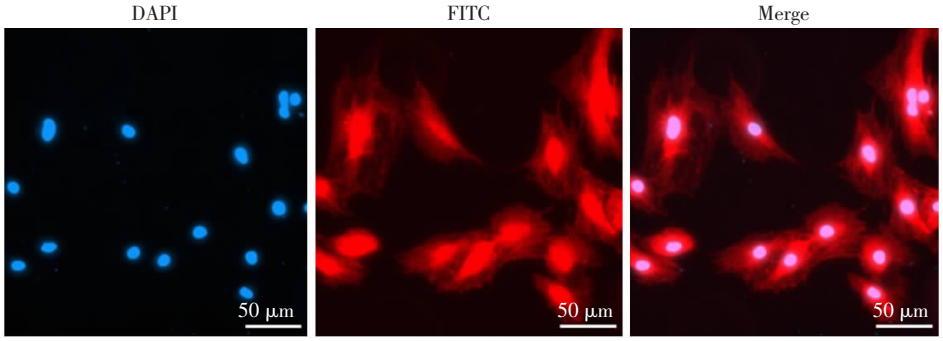
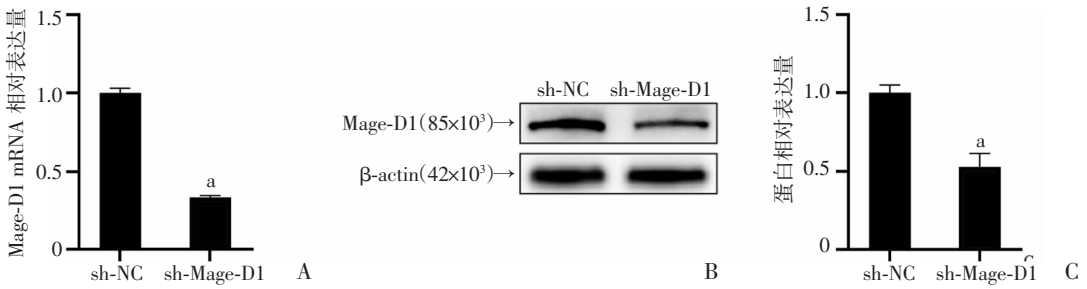


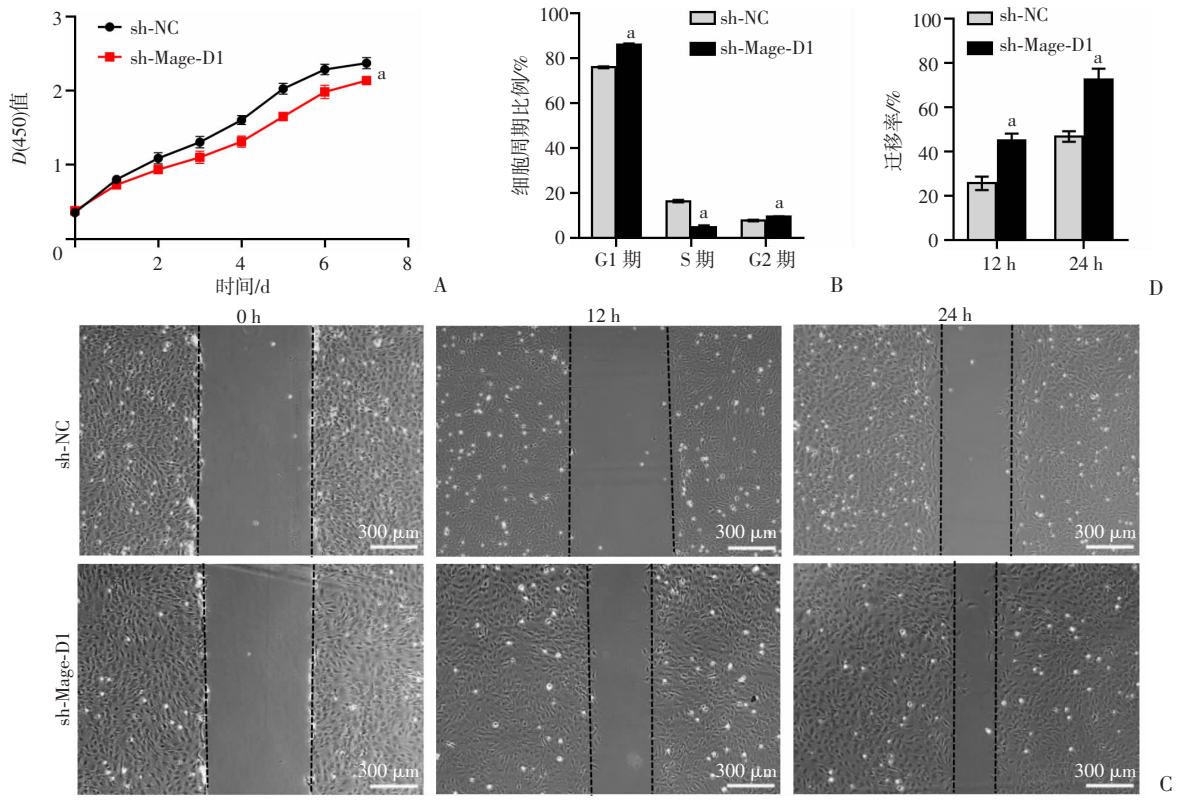
图 5 细胞免疫荧光染色观察 BMSCs 中 Mage-D1 的表达



a:$P<0.01$,与 sh-NC 组比较

A:RT-qPCR 检测 Mage-D1 的表达;B: Western blot 检测 Mage-D1 的蛋白表达;C: 蛋白表达半定量分析

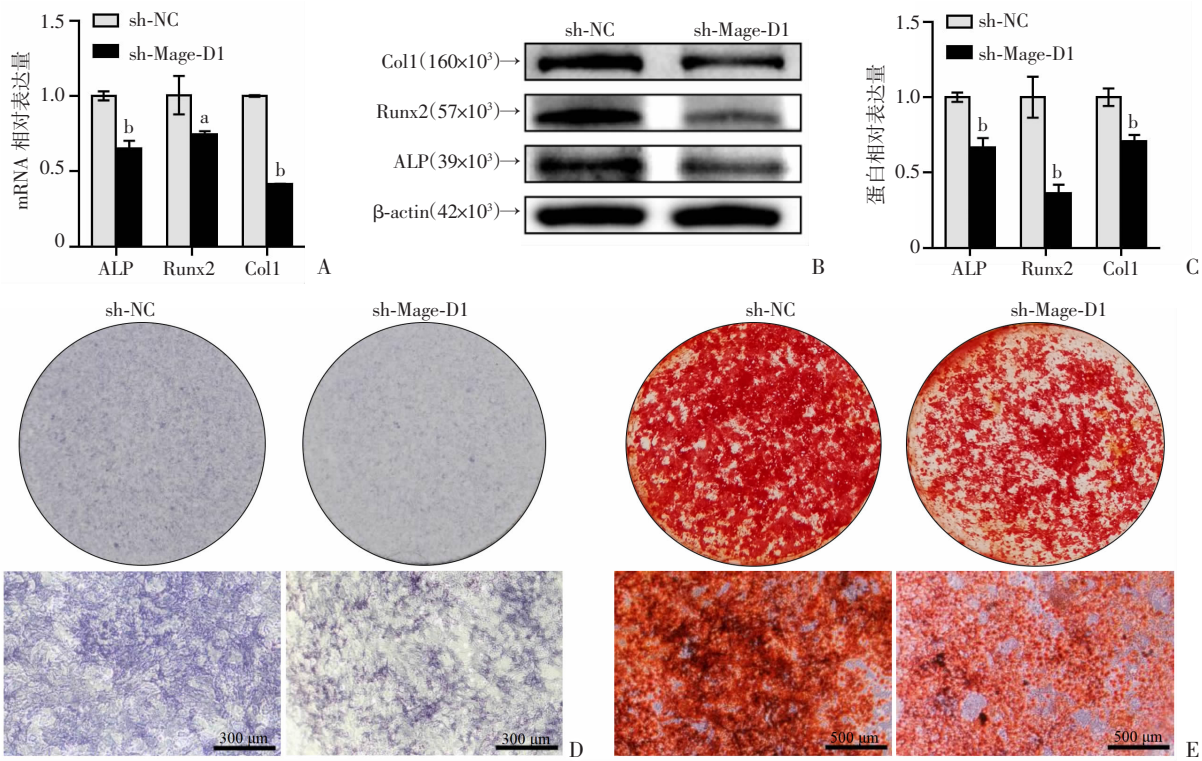
图 6 BMSCs 沉默 Mage-D1 后的慢病毒转染验证 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.01$,与 sh-NC 组比较

A:CCK-8 检测 BMSCs 增殖能力;B:细胞周期比例统计;C、D:细胞划痕实验检测 BMSCs 迁移率及迁移率统计

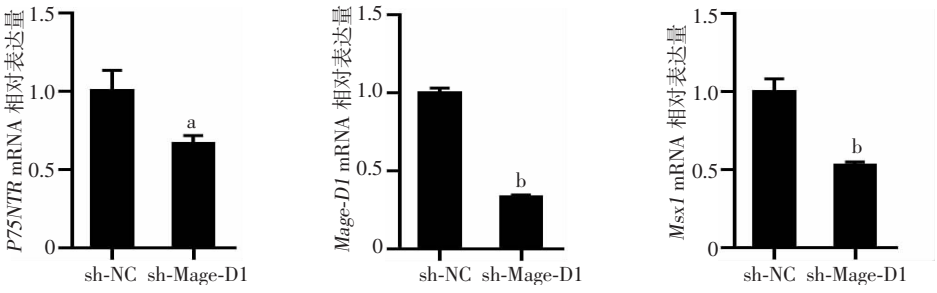
图 7 Mage-D1 对 BMSCs 细胞周期、增殖和迁移的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 sh-NC 组比较

A:RT-PCR 检测矿化相关基因表达;B:Western blot 检测矿化相关蛋白表达; C:蛋白表达半定量分析;D:碱性磷酸酶染色;E:茜素红染色

图 8 Mage-D1 对 BMSCs 矿化能力的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 sh-NC 组比较

A:RT-qPCR 检测 *P75NTR* 的表达;B: RT-qPCR 检测 *Mage-D*1 的表达;C: RT-qPCR 检测 *Msx*1 的表达

图 9 RT-qPCR 检测沉默 Mage-D1 后 BMSCs 中矿化相关基因的表达水平 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

3 讨论

Mage-D1 作为Ⅱ型黑色素瘤相关抗原基因家族的新成员,参与细胞的多种生物活动,如细胞分化、迁移、增殖、周期、凋亡和转录调控等[3-7],在多种组织中均有表达[11]。近年的研究表明,Mage-D1 与骨生物学密切相关,作为一种多功能接头蛋白,Mage-D1 被认为可与多种蛋白相互作用,从而积极参与骨代谢过程[12-13]。然而,关于 Mage-D1 对骨骼发育的体内研究证据仍然缺乏,因此本项目通过构建 *Mage-D*1 敲除小鼠,提供了 Mage-D1 影响骨骼发育的直接证据。在繁育小鼠的过程中发现所产生的纯合子子代小鼠性别限定为雄性,无法观察到雌性的纯合子小鼠。文献回顾发现,DOMBRET 等[14]也观察到同样现象,这可能是由雄性 *Mage-D*1 敲除小鼠性行为缺陷引起。在实验过程中首先对 *Mage-D*1 敲除小鼠的基因型进行了鉴定,并验证了敲除效率,结果表明构建的敲除小鼠确为 *Mage-D*1 敲除纯合子小鼠,且 Mage-D1 在股骨骨组织中的表达极低。*Mage-D*1 敲除小鼠的成功构建为后续实验奠定了基础。解剖 *Mage-D*1 敲除小鼠和同窝野生型小鼠股骨,对 *Mage-D*1 敲除小鼠和同窝野生型小鼠股骨大小进行了目视观察,发现不同窝小鼠之间股骨大小不同,而同窝 *Mage-D*1 敲除小鼠股骨与野生型小鼠股骨的大小无明显差异。随后,对 *Mage-D*1 敲除小鼠股骨骨量进行了探讨,Micro-CT 扫描结果表明敲除小鼠的皮质骨厚度及矿物含量、松质骨矿物含量及表面密度均明显降低,骨小梁数量减少,而骨小梁的分离度增加,提示 Mage-D1 可能参与了小鼠股骨发育矿化的调控,*Mage-D*1 敲除后降低了骨组织的骨量。既往研究显示 *Mage-D*1 敲除鼠股骨的骨密度显著降低,骨微结构恶化,存在骨缺失表型[8],与本实验结果一致。因此,Mage-D1 可能对小鼠股骨骨组织的发育矿化具有重要的促进作用。

然而,骨组织在不断经历着改建与重塑的过程,其主要组成成分是钙、磷酸盐以及多种激素,在体内也具有调节骨矿化的作用[15]。其中,降钙素和甲状旁腺素对血清钙浓度起着重要的调节作用,维持了血钙的稳态[16]。因此,为了明确 Mage-D1 对小鼠股骨矿化的实际意义,本实验进一步提取了两种基因型小鼠的血清进行检测,比较敲除小鼠和野生小鼠血钙、血磷、降钙素和甲状旁腺素的水平变化。结果表明血钙、血磷、降钙素及甲状旁腺素水平在两种基因型小鼠中均无显著差异,提示 Mage-D1 敲除后小鼠股骨骨量的减少并非是因其体内钙、磷变化引起的。骨重建是一个骨形成和骨吸收动态平衡的过程,*Mage-D*1 基因敲除可能通过抑制成骨能力减少骨的形成或促进破骨吸收导致小鼠股骨骨量减少。研究表明,Mage-D1 可诱导 β-catenin 的核转运并增强其 DNA 结合能力,从而调控经典成骨信号通路 wnt 通路[17],提示 Mage-D1 可能参与调控成骨从而促进成骨增加。此外,LIU 等[8]发现对 Mage-D1 敲除小鼠的单核/巨噬细胞进行体外诱导后,与对照组相比 TRAP 阳性破骨细胞的数量和面积显著增加。

骨髓间充质干细胞(BMSCs)作为一种骨髓来源的间充质干细胞,具有多向分化潜能,包括分化为成骨细胞、脂肪细胞、内皮细胞和软骨细胞[18],且在体外易于获取并扩大培养,因此被认为是用于骨组织工程的种子细胞[19]。与黑色素瘤抗原基因(Mage)家族其他蛋白质在正常成体组织中低表达的情况不同,Mage-D1 在正常组织中普遍表达[2],也广泛存在于外胚间充质干细胞、成骨细胞、神经元细胞及肿瘤细胞等细胞类型中[20-21]。然而,Mage-D1 在 BMSCs 中的表达情况尚不清楚,其对 BMSCs 增殖、迁移等生物学特性和矿化能力的影响也尚不明确。本实验通过免疫荧光染色观察到 Mage-D1 在 BMSCs 的胞核及周围区域高表达。而在前期实验中,通过慢病毒转染 BMSCs 过表达

Mage-D1,发现 Mage-D1 表达仅提高到原始水平的 1.2 倍,始终无法达到 2 倍的转染效率[22],无法建立 Mage-D1 过表达模型,这可能与 Mage-D1 在 BMSCs 中高表达有关。随后使用慢病毒转染的方法来探究 Mage-D1 沉默后对 BMSCs 增殖、迁移、细胞周期及矿化能力的影响。研究表明当目标基因表达减少到原始水平的 50%~75%时即为有效沉默[23],本实验 RT-qPCR 及 Western blot 结果显示慢病毒转染后 BMSCs 中 Mage-D1 的基因及蛋白表达水平均减少到原始水平的 50%左右,表明成功构建了 Mage-D1 沉默的细胞株。

骨发育中,骨髓间充质干细胞的增殖、迁移和矿化是一个互相关联、动态调控的过程,细胞增殖为基质合成和矿化奠定基础,迁移确保细胞能达到骨重建部位,而矿化最终完成骨组织的形成和功能恢复[24-26]。本实验探讨了 Mage-D1 沉默后对 BMSCs 增殖、周期和迁移能力的影响。采用 CCK-8 增殖试剂盒检测了细胞在第 0~7 天的生长情况,结果表明从第 1 天起,Mage-D1 沉默组细胞的增殖能力便明显受到抑制,这与 QI 等[27]学者在小鼠牙髓细胞中的实验结果一致,该研究还指出 Mage-D1 可能通过调控 NF-κB 信号通路参与调控小鼠牙髓细胞的增殖。由于细胞的增殖能力与其所处的细胞周期密切相关[28],本实验进一步检测了细胞周期情况,结果显示 Mage-D1 沉默后增加了处于 G1 期和 G2 期的 BMSCs 细胞数量,而处于 S 期的细胞数量减少,表明沉默 Mage-D1 后细胞主要停滞在了细胞分裂的间隙期,使得细胞的增殖分裂能力减弱。细胞划痕实验结果显示 Mage-D1 沉默组细胞迁移速度明显增快,表明 Mage-D1 负向调控 BMSCs 的迁移能力,与 Mage-D1 在 Hela 细胞、胰腺癌细胞等肿瘤细胞中表现出的迁移抑制作用相一致[29-30]。

本研究通过动物实验发现了 *Mage-D1* 敲除小鼠股骨骨量降低,从而确定了 Mage-D1 对骨量的重要意义,然而骨量多少是由骨形成和骨吸收共同决定[31]。为了进一步研究 Mage-D1 对骨形成中矿化的影响,本研究从细胞水平验证了 Mage-D1 对矿化的调控作用。通过转染慢病毒降低 BMSCs 中 Mage-D1 表达,然后检测 BMSCs 的矿化能力及矿化相关因子的表达水平,以此来评价 Mage-D1 在 BMSCs 矿化中的调控作用。ALP、Runx2、Col1 等都是矿化相关标志物,其中 Runx2 是一种矿化相关特异性转录因子,促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化[32];ALP 和 Col1 在成骨细胞诱导过程中表达增加[33]。因此,本研究检测了 ALP、Runx2、Col1 这 3 个矿化相关因子,实验结果显示,与对照组相比,沉默 Mage-D1 后 BMSCs 内 ALP、Runx2、Col1 的基因表达量和蛋白表达量均下调。同时碱性磷酸酶染色和茜素红染色结果显示,Mage-D1 沉默组碱性磷酸活性和钙结节形成能力减弱,这些结果说明 Mage-D1 正向调控 BMSCs 的矿化能力。这与以往研究发现相一致,敲低 Mage-D1 后来自颅骨的成骨细胞矿化诱导后钙结节减少[34],过表达 Mage-D1 后外胚间充质干细胞矿化能力升高,以及沉默 Mage-D1 后外胚间充质干细胞矿化能力下降[19]。然而,敲低 Mage-D1 后提高了小鼠牙髓细胞矿化能力[27]。这可能与 Mage-D1 与多种核蛋白、转录因子、细胞表面受体相互作用,对不同细胞具有不同调控机制有关。p75NTR 属低亲和力神经营养因子受体,可以上调 homeobox 基因家族成员 Dlx/Msx 并促进外胚间充质干细胞(ectomesenchymal stem cells,EMSCs)的成骨分化与矿化[35-36]。本课题组前期研究发现 Mage-D1 在 p75NTR-Dlx1/Msx1 信号轴传导过程中起重要作用[20,37],本研究针对 BMSCs 的检测结果,显示 Mage-D1 可正向调控 p75NTR 和 Msx1 表达,与以往研究结果一致,提示 Mage-D1 对骨代谢活动的调控可能通过 p75NTR- Dlx1/Msx1 信号轴起作用。

综上所述,Mage-D1 对小鼠股骨的骨量具有正向调控作用,并且 Mage-D1 对 BMSCs 的生物学特性和矿化能力也具有调控作用。具体表现在 Mage-D1 能够抑制 BMSCs 的迁移能力,增强其增殖能力,并促进 BMSCs 的矿化,提示 Mage-D1 可能是治疗骨发育不全、预防骨质疏松等临床疾病的重要分子靶点。

参考文献:

[1] GAO Y G, PATIL S, JIA J X. The development of molecular biology of osteoporosis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8182. DOI: 10.3390/ijms22158182.

[2] PÕLD M, ZHOU J, CHEN G L, *et al*. Identification of a new, unorthodox member of the *MAGE* gene family[J]. Genomics, 1999, 59(2): 161-167. DOI: 10.1006/geno.1999.5870.

[3] DU Q, ZHANG Y, TIAN X X, *et al*. MAGE-D1 inhibits proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells[J]. Oncol Rep, 2009, 22(3): 659-665. DOI: 10.3892/or_00000486.

[4] REDDY E M, CHETTIAR S T, KAUR N, *et al*. Dlxin-1, a MAGE family protein, induces accelerated neurite outgrowth and cell survival by enhanced and early activation of MEK and Akt signalling pathways in PC12 cells[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(14): 2220-2236. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.05.030.

[5] MOURI A, NODA Y, WATANABE K, *et al*. The roles of MAGE-D1 in the neuronal functions and pathology of the

central nervous system[J]. Rev Neurosci, 2013, 24(1): 61-70. DOI: 10.1515/revneuro-2012-0069.

[6] SASAKI A, MASUDA Y, IWAI K, *et al*. A RING finger protein Praja1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1[J]. J Biol Chem, 2002, 277(25): 22541-22546. DOI: 10.1074/jbc.M109728200.

[7] BERTRAND M J, KENCHAPPA R S, ANDRIEU D, *et al*. NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis *in vivo*[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(12): 1921-1929. DOI: 10.1038/cdd.2008.127.

[8] LIU M, XU L J, MA X, *et al*. MAGED1 is a negative regulator of bone remodeling in mice[J]. Am J Pathol, 2015, 185(10): 2653-2667. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.06.017.

[9] LIU H X, ZHANG X, YANG Q X, *et al*. Knockout of NRAGE promotes autophagy-related gene expression and the periodontitis process in mice[J]. Oral Dis, 2021, 27(3): 589-599. DOI: 10.1111/odi.13575.

[10] WU Q, LI J, SONG P P, *et al*. Knockdown of NRAGE induces odontogenic differentiation by activating NF-κB signaling in mouse odontoblast-like cells[J]. Connect Tissue Res, 2019, 60(2): 71-84. DOI: 10.1080/03008207.2018.1439484.

[11] MASUDA Y, SASAKI A, SHIBUYA H, *et al*. Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function[J]. J Biol Chem, 2001, 276(7): 5331-5338. DOI: 10.1074/jbc.M008590200.

[12] ICHIDA F, NISHIMURA R, HATA, *et al*. Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(32): 34015-34022. DOI: 10.1074/jbc.M403621200.

[13] MAEDA K, KOBAYASHI Y, UDAGAWA N, *et al*. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis[J]. Nat Med, 2012, 18(3): 405-412. DOI: 10.1038/nm.2653.

[14] DOMBRET C, NGUYEN T, SCHAKMAN O, *et al*. Loss of Maged1 results in obesity, deficits of social interactions, impaired sexual behavior and severe alteration of mature oxytocin production in the hypothalamus[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(21): 4703-4717. DOI: 10.1093/hmg/dds310.

[15] ARNOLD A, DENNISON E, KOVACS C S, *et al*. Hormonal regulation of biomineralization[J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(5): 261-275. DOI: 10.1038/s41574-021-00477-2.

[16] HSIAO C Y, CHEN T H, CHU T H, *et al*. Calcitonin induces bone formation by increasing expression of Wnt10b in osteoclasts in ovariectomy-induced osteoporotic rats[J]. Front Endocrinol, 2020, 11: 613. DOI: 10.3389/fendo.2020.00613.

[17] CHEN Y X, JIN L, XUE B, *et al*. NRAGE induces β-catenin/Arm O-GlcNAcylation and negatively regulates Wnt signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 487(2): 433-437. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.080.

[18] ABOU NADER Z, ESPÉLI M, BALABANIAN K, *et al*. Culture, expansion and differentiation of mouse bone-derived mesenchymal stromal cells[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2308: 35-46. DOI: 10.1007/978-1-0716-1425-9_3.

[19] LIN Z Y, HE H B, WANG M, *et al*. MicroRNA-130a controls bone marrow mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblastic and adipogenic fate[J]. Cell Prolif, 2019, 52(6): e12688. DOI: 10.1111/cpr.12688.

[20] LI M, YU X, LUO Y T, *et al*. Dynamic expression of Mage-D1 in rat dental germs and potential role in mineralization of ectomesenchymal stem cells[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 22615. DOI: 10.1038/s41598-022-27197-5.

[21] GORDEEVA O, GORDEEV A, KHAYDUKOV S. Expression dynamics of *Mage* family genes during self-renewal and differentiation of mouse pluripotent stem and teratocarcinoma cells[J]. Oncotarget, 2019, 10(35): 3248-3266. DOI: 10.18632/oncotarget.26933.

[22] YOUNG A T, MOORE R B, MURRAY A G, *et al*. Assessment of different transfection parameters in efficiency optimization[J]. Cell Transplant, 2004, 13(2): 179-185.

[23] MUNKÁCSY G, SZTUPINSZKI Z, HERMAN P, *et al*. Validation of RNAi silencing efficiency using gene array data shows 18.5% failure rate across 429 independent experiments[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2016, 5(9): e366. DOI: 10.1038/mtna.2016.66.

[24] OWENT A, ARONOW M, SHALHOUB V, *et al*. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix[J]. J Cell Physiol, 1990, 143(3): 420-430. DOI: 10.1002/jcp.1041430304.

[25] LEEM N, HWANG H S, OH S H, *et al*. Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression[J]. Exp Mol Med, 2018, 50(11): 1-16. DOI: 10.1038/s12276-018-0170-6.

[26] MIAO M M, ZHANG Y, WANG X P, *et al*. The miRNA-144-5p/IRS1/AKT axis regulates the migration, proliferation, and mineralization of osteoblasts: a mechanism of bone repair in diabetic osteoporosis[J]. Cell Biol Int, 2022, 46(12): 2220-2231. DOI: 10.1002/cbin.11913.

[27] QI S, WU Q, MA J, *et al*. Effects of neurotrophin receptor-mediated MAGE homology on proliferation and odontoblastic differentiation of mouse dental pulp cells[J]. Cell Prolif, 2015, 48(2): 221-230. DOI: 10.1111/cpr.12171.

[28] LIU L J, MICHOWSKI W, KOLODZIEJCZYK A, *et al*. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(9): 1060-1067. DOI: 10.1038/s41556-019-0384-4.

[29] SHEN W G, XUE Q Y, WU Y D, *et al*. Melanoma-associated antigen family protein-D1 regulation of tumor cell migration, adhesion to endothelium, and actin structures reorganization in response to hypoxic stress[J]. Cell Commun Adhes, 2007, 14(1): 21-31. DOI: 10.1080/15419060701224948.

[30] CHU C S, XUE B, TU C, *et al*. NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Lett, 2007, 250(2): 268-275. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.10.020.

[31] SALHOTRA A, SHAHH N, LEVI B, *et al*. Mechanisms of bone development and repair[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 696-711. DOI: 10.1038/s41580-020-00279-w.

[32] KOMORI T, YAGI H, NOMURA S, *et al*. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts[J]. Cell, 1997, 89(5): 755-764. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80258-5.

[33] MASCI M, WANG M, IMBERT L, *et al*. Bone mineral properties in growing Col1a2(+/G610C) mice, an animal model of osteogenesis imperfecta[J]. Bone, 2016, 87: 120-129. DOI: 10.1016/j.bone.2016.04.011.

[34] CALABRESE G, BENNETT B J, OROZCO L, *et al*. Systems genetic analysis of osteoblast-lineage cells[J]. PLoS Genet, 2012, 8(12): e1003150. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003150.

[35] YANG K, WANG Y Y, JU Y X, *et al*. p75 neurotrophin receptor regulates differential mineralization of rat ectomesenchymal stem cells[J]. Cell Prolif, 2017, 50(1): e12290. DOI: 10.1111/cpr.12290.

[36] ZHAO M Z, WANG Y Y, LI G, *et al*. The role and potential mechanism of p75NTR in mineralization via *in vivo* p75NTR knockout mice and *in vitro* ectomesenchymal stem cells[J]. Cell Prolif, 2020, 53(2): e12758. DOI: 10.1111/cpr.12758.

[37] 罗玉婷, 杨正艳, 李蒙, 等. Mage-D1 与活化后的 p75 神经营养因子受体结合可正向调节大鼠外胚间充质干细胞的矿化[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(10): 1547-1553. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2021.10.14.
LUO Y T, YANG Z Y, LI M, *et al*. Mage-D1 binding to activated p75NTR positively regulates mineralization of rat ectomesenchymal stem cells *in vitro*[J]. J South Med Univ, 2021, 41(10): 1547-1553. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2021.10.14.

(**收稿**:2024-03-18;**修回**:2024-05-26)
(编辑 张 维)