

# Dlx2基因过表达与前成骨细胞系MC3T3-E1成骨分化过程中的细胞凋亡和周期调控\*\*\*\*★◆

孙昊, 王旭东, 代杰文, 卢境婷, 沈国芳

## Effects of *Dlx2* overexpression on cell cycle regulation and apoptosis of preosteoblast cells MC3T3-E1 during osteogenic differentiation process

Sun Hao, Wang Xu-dong, Dai Jie-wen, Lu Jing-ting, Shen Guo-fang

Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China

Sun Hao★, Master, Physician, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China  
sunhaohappy@yahoo.com.cn

Corresponding author: Wang Xu-dong, Associate professor, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China  
xudongwang70@hotmail.com

Supported by: Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. S30206\*; Research Fund of Science and Technology Commission of Shanghai City, No. 10JC1408700\*; the Natural Science Foundation of Shanghai, No. 10ZR1418000\*; Research Fund of Shanghai Municipal Health Bureau, No. 2009077\*; Combined Engineering and Medicine Project of Shanghai Jiao Tong University, No. YG2010MS55\*

Received: 2011-06-04  
Accepted: 2011-09-09

### Abstract

**BACKGROUND:** *Dlx2* plays an important role in the regulation of cranial neural crest cells migration and craniofacial skeleton development. However, the effects of *Dlx2* on apoptosis and cell cycle in osteoblast differentiation are not reported.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of *Dlx2* overexpression on cell cycle regulation and apoptosis in MC3T3-E1 preosteoblast cells differentiation.

**METHODS:** Anti-retroviral pMSCV-puro-*Dlx2* was transfected into MC3T3-E1 cells which were cultured in mineralization induced fluid. MC3T3-E1-*Dlx2* cell lines stably overexpressing *Dlx2* were constructed. Cell lines of *Dlx2* over-expression were determined by RT-PCR and western blot. Apoptosis was detected by flow cytometry after Annexin V/PI and PI/RNase staining and cell cycle changes were detected by flow cytometry after PI/RNase staining.

**RESULTS AND CONCLUSION:** MC3T3-E1-*Dlx2* cell lines was successfully constructed. Cell cycle was blocked in G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase ( $P < 0.05$ ) and apoptosis was up-regulated ( $P < 0.05$ ) in *Dlx2* overexpression cell model. *Dlx2* overexpression reduces cell proliferation and promotes cell differentiation to exercise functions.

Sun H, Wang XD, Dai JW, Lu JT, Shen GF. Effects of *Dlx2* overexpression on cell cycle regulation and apoptosis of preosteoblast cells MC3T3-E1 during osteogenic differentiation process. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(10): 1808-1812.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** *Dlx2* 基因在颅神经嵴细胞迁徙进入第一鳃弓过程和颅颌面骨骼发育中起重要作用, 但 *Dlx2* 基因对成骨细胞分化过程中细胞凋亡和细胞周期调控的影响尚未见报道。

**目的:** 观察 *Dlx2* 基因过表达对前成骨细胞系 MC3T3-E1 成骨分化过程中细胞凋亡和细胞周期调控的影响。

**方法:** 构建反转录病毒 pMSCV-puro-*Dlx2* 并转染矿化诱导液培养下的 MC3T3-E1 细胞, 构建稳定过表达 *Dlx2* 基因的细胞系 MC3T3-E1-*Dlx2*。RT-PCR 和 Western blot 验证 *Dlx2* 基因过表达细胞系的建立。Annexin V/PI 双染色后流式细胞分选检测细胞凋亡, PI/RNase 双染色后流式细胞分选检测细胞周期变化。

**结果与结论:** 实验成功构建稳定过表达 *Dlx2* 基因的细胞系 MC3T3-E1-*Dlx2*。发现 *Dlx2* 基因过表达促进细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ), 同时阻滞细胞周期于 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期 ( $P < 0.05$ ), 减低细胞增殖性, 促进细胞分化行使功能。

**关键词:** 成骨细胞分化; *Dlx2* 基因; 稳定过表达; 细胞凋亡; 细胞周期

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.10.022

孙昊, 王旭东, 代杰文, 卢境婷, 沈国芳. *Dlx2* 基因过表达与前成骨细胞系 MC3T3-E1 成骨分化过程中的细胞凋亡和周期调控[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(10):1808-1812. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

颌面部骨骼如上、下颌骨, 腭骨, 蝶骨等由第一鳃弓始基发育而来<sup>[1]</sup>。而同源盒基因大家族下属的 *Dlx* 基因则被认为是第一鳃弓发育调控的主要候选基因<sup>[2]</sup>, 主要调控颅神经嵴细胞(外胚间充质细胞的一种)向第一鳃弓位置的正确迁徙。细胞的正确迁徙过程需要有序的细胞凋亡和细胞增殖与分化作用的相互协调。但 *Dlx2* 基因对成骨细胞分化过程中细胞凋亡和细胞周期调控的影响尚未见报道。

实验拟通过反转录病毒转染的方法建立稳定过表达 *Dlx2* 基因的成骨细胞模型, 进而观

察 *Dlx2* 基因对细胞周期和凋亡等生物学行为的影响, 推测其在胚胎发育过程中的调控作用。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外对照实验。

**时间及地点:** 实验于2010-10/2011-03在上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔生物医学实验室完成。

**材料:** 小鼠颅顶前骨细胞系亚克隆 14 (MC3T3-E1 Subclone 14) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(源传代细胞系购自 ATCC)。

## 主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
$\alpha$ -MEM 培养液	Gibco 公司, 美国
对硝基苯酚磷酸钠(PNPP)	Sigma 公司, 美国
RIPA	碧云天
反转录反应试剂盒 Prime Script™ RT Reagent Kit	Takara 公司, 日本
鼠抗人 <i>Dlx2</i> 单克隆抗体 (ab54673)	abcam 公司, 美国
PI/RNase Staining Buffer, FITC Annexin V/PI Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen 公司, 美国
FACS Calibur 流式细胞仪	BD 公司, 美国

## 实验方法:

pMSCV-puro-*Dlx2* 反转录病毒质粒的构建:

*Xho* I / *Eco*R I 分别双酶切 pCAGGS/*Dlx2* 和 pMSCV-puro, 割胶回收目的片段。4 °C 过夜连接 pMSCV-puro 骨架片段与 *Dlx2* 片段, 取 15  $\mu$ L 连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取单克隆摇菌并小量提取质粒, 测序鉴定。

**病毒包装:** 293T 细胞密度达到 90% 时进行转染。制备反转录病毒包装系统中 3 种质粒 DNA 溶液: VSV-G (10  $\mu$ g)、GAG-pol (15  $\mu$ g)、pMSCV (15  $\mu$ g)。转染后 4~6 h, 将 T75 瓶中的培养基弃去, 加入含体积分数为 10% 胎牛血清  $\alpha$ -MEM 10 mL, 即开始收集病毒。PBS 重悬病毒沉淀, 置于 4 °C 冰箱保存。

**MC3T3-E1 细胞感染及筛选:** 以相对细胞数 100:1 的病毒颗粒感染靶细胞; 细胞在完全培养基的情况下生长 48 h 后, 加入 3 mg/L 嘌呤霉素进行筛选, 保证对照细胞株, 即不感染病毒的细胞株在 3 d 内, 完全被嘌呤霉素杀死。病毒感染的细胞株在嘌呤霉素存在的情况下缓慢生长, 待融合后进行细胞的传代和冻存。

**反转录 PCR 和 Western blot 检测转染后 *Dlx2* 基因的表达:** 转染 pMSCV-puro-*Dlx2* 质粒的细胞为实验组, 转染空质粒 pMSCV-puro 的细胞为对照组, 未做任何处理的 MC3T3 细胞为空白组。嘌呤霉素筛选后 72 h, 待细胞完全融合, 提取总 RNA, 按反转录试剂盒提供实验步骤, 合成 cDNA。 *Dlx2* 基因引物及内参基因 *Gapdh* 引物见表 1。

引物由上海生工公司合成。反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 32 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。反应结束后, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。 *Dlx2* 蛋白表达的验证用 Western blot 进行。 RIPA (碧云天) 细胞裂解液提取总蛋白后, DAB 法

测定蛋白浓度, 调整各孔上样量一致。行 SDS-PAGE, 转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 4 °C 一抗孵育过夜。 *Dlx2* 蛋白的一抗 (ab54673) 滴度为 1:500, 内参  $\beta$ -actin 抗体滴度为 1:4 000。二抗 (1:3 000) 孵育 1 h。加入显色剂后常规曝光, 冲洗胶片。

表 1 *Dlx2* 基因引物及内参基因 *Gapdh* 引物序列  
Table 1 Primer sequence of *Dlx2* gene and *Gapdh* gene

Primer	Primer sequence	Primer length (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>Dlx2</i>	5'-CAT GGG CTC CTA CCA GTA CCA C-3'	172	58
	5'-TCG GAT TTC AGG CTC AAG GTC-3'		
	5'-GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG-3'		
<i>Gapdh</i>	5'-CTC GCT CCT GGA AGA TGG TG-3'	233	57

**流式细胞仪检测细胞周期:** 转染 pMSCV-puro-*Dlx2* 质粒的细胞为实验组, 转染空质粒 pMSCV-puro 的细胞为对照组。稳定转染后的细胞以  $1.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  浓度接种至 6 孔板, 更换培养液为  $\alpha$ -MEM 成骨诱导培养液。37 °C、体积分数为 5%  $\text{CO}_2$  条件培养。24, 48, 72 h 提取细胞, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 预冷的体积分数为 70% 乙醇固定, 4 °C 过夜。低速离心机 1 000 r/min  $\times$  5 min, 吸弃上清, 加入预冷 PBS 1 mL 重悬, 再低速离心机 1 000 r/min  $\times$  5 min, 吸弃上清。每 EP 管内加入 PI/RNase 染剂 300  $\mu$ L, 轻轻吹打, 避光反应 15 min 后, 移入流式管内, 上流式细胞仪检测, 重复 3 次。

**流式细胞仪检测细胞凋亡:** 转染 pMSCV-puro-*Dlx2* 质粒的细胞为实验组, 转染空质粒 pMSCV-puro 的细胞为对照组。稳定转染后的细胞以  $1.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  浓度接种至 6 孔板, 更换培养液为  $\alpha$ -MEM 成骨诱导培养液。37 °C、体积分数为 5%  $\text{CO}_2$  条件培养。24, 48, 72 h 提取细胞, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 加入 100  $\mu$ L  $1 \times$  buffer 重悬。每 EP 管内加入 5  $\mu$ L Annexin V 和 5  $\mu$ L PI 染剂, 室温下避光反应 15 min。每 EP 管内加入 300  $\mu$ L  $1 \times$  buffer, 1 h 内移入流式管, 上流式细胞仪检测, 重复 3 次。

**主要观察指标:** ① 反转录病毒转染后 *Dlx2* 基因的 mRNA 及蛋白表达水平。② *Dlx2* 基因过表达对细胞周期及细胞凋亡的影响。

**统计学分析:** 第一、三作者采用 SAS 6.04 软件完成统计处理, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验,

上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面外科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市 200011

孙昊★, 男, 1984 年生, 山东省菏泽市人, 汉族, 2011 年上海交通大学医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事颌面畸形的基础和临床研究工作。 sunhaohappy@yahoo.com.cn

通讯作者: 王旭东, 副教授, 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面外科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市 200011 xudongwang70@hotmail.com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2012)10-01808-05

收稿日期: 2011-06-04  
修回日期: 2011-09-09  
(20110604002/WL · G)

$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 稳定转染后 *Dlx2* 表达水平的验证** 体外细胞转染后经嘌呤霉素筛选, 72 h 后反转录 PCR 凝胶电泳检测结果实验组有 *Dlx2* mRNA 的表达, 而对照组和空白组未见明显表达, 见图 1。

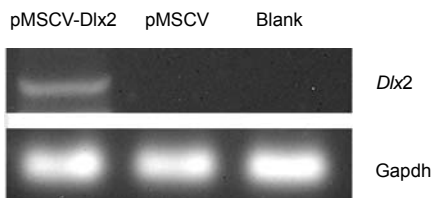


Figure 1 Transcription expression of *Dlx2* detected by RT-PCR  
图 1 反转录 PCR 验证 *Dlx2* 基因的转录水平表达

Western Blot 结果显示实验组出现  $M_r$  33 000 左右的目的条带, 而对照组和空白组未出现, 见图 2。结果表明 *Dlx2* 被成功转染至细胞内后, 能够进行有效表达。

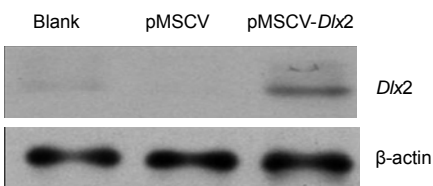


Figure 2 Protein expression of *Dlx2* detected by Western blot method  
图 2 Western blot 验证 *Dlx2* 基因的蛋白水平表达

**2.2 细胞周期流式分选** *Dlx2* 过表达后细胞各周期所占比例见表 2。

表 2 *Dlx2* 过表达后细胞各周期所占比例  
Table 2 Proportion of cell cycles after *Dlx2* overexpression ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Cell cycle	Experimental group	Control group
G <sub>1</sub>		
24 h	84.52±6.34	68.92±4.18
48 h	79.17±6.08	67.34±6.07
72 h	83.06±6.34	72.83±7.72
S		
24 h	10.46±2.21	20.83±3.44
48 h	13.41±4.49	20.47±3.11
72 h	7.94±3.54	16.53±4.28
G <sub>2</sub> /M		
24 h	5.09±2.64	10.66±3.96
48 h	5.09±2.64	6.48±2.73
72 h	9.04±2.28	11.25±3.07

统计学分析显示, 除成骨诱导 72 h 时, 实验组与对照组在 G<sub>2</sub>/M 期细胞比率无显著性差异外, 其余各时间点各周期比率差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。总体趋势

可以概括为: *Dlx2* 过表达增高 G<sub>1</sub> 期比例, 降低 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例, 即细胞周期受阻, 细胞增殖减低, 细胞分化能力增加, 见图 3。

**2.3 细胞凋亡流式分选** Annexin V/PI 双染色后的流式细胞分选能够正确区分死亡细胞和凋亡细胞, 左上象限 Annexin V(-)/PI(+) 代表死亡细胞; 左下象限 Annexin V(-)/PI(-) 代表活细胞; 右上象限 Annexin V(+)/PI(+) 代表晚期凋亡细胞; 右下象限 Annexin V(+)/PI(-) 代表早期凋亡细胞, 见图 4。

实验中将早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞合并为总体凋亡细胞进行观察, 其中成骨诱导后 24 h, 对照组凋亡细胞比率为 (3.07±0.88)%, 实验组为 (8.52±2.37)%。成骨诱导后 48 h, 对照组凋亡细胞比率为 (4.49±1.26)%, 实验组为 (15.64±2.80)%。成骨诱导后 72 h, 对照组凋亡细胞比率为 (5.83±1.09)%, 实验组为 (18.25±3.54)%。统计学分析显示, 实验组与对照组在各时间点的凋亡细胞比率差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。总体趋势可以概括为: *Dlx2* 基因过表达促进细胞凋亡。

## 3 讨论

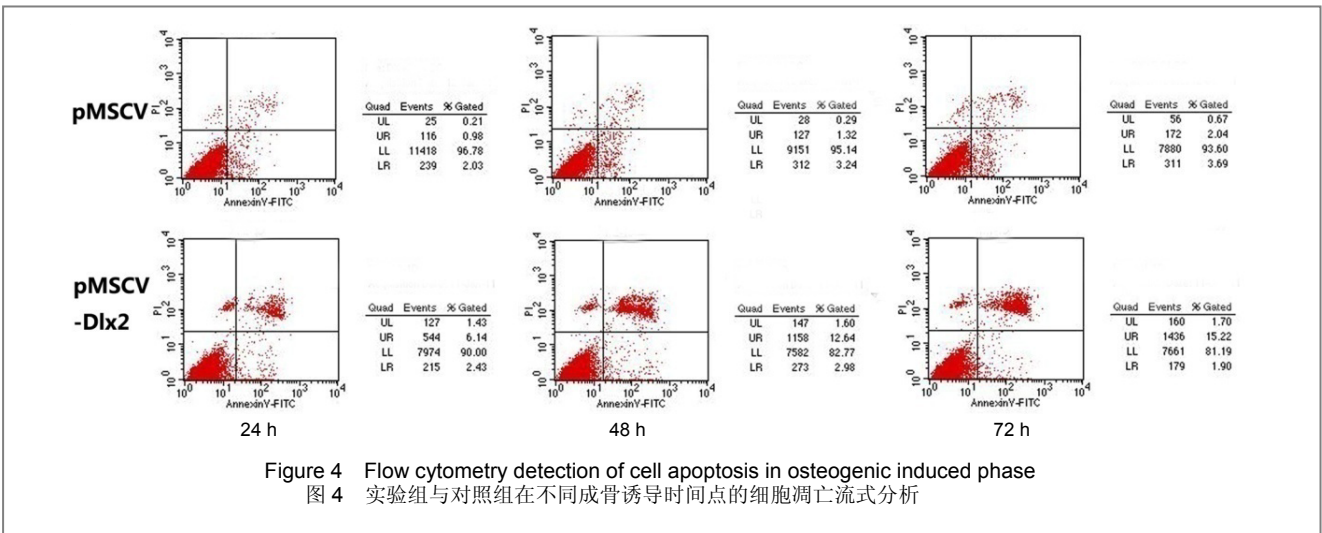
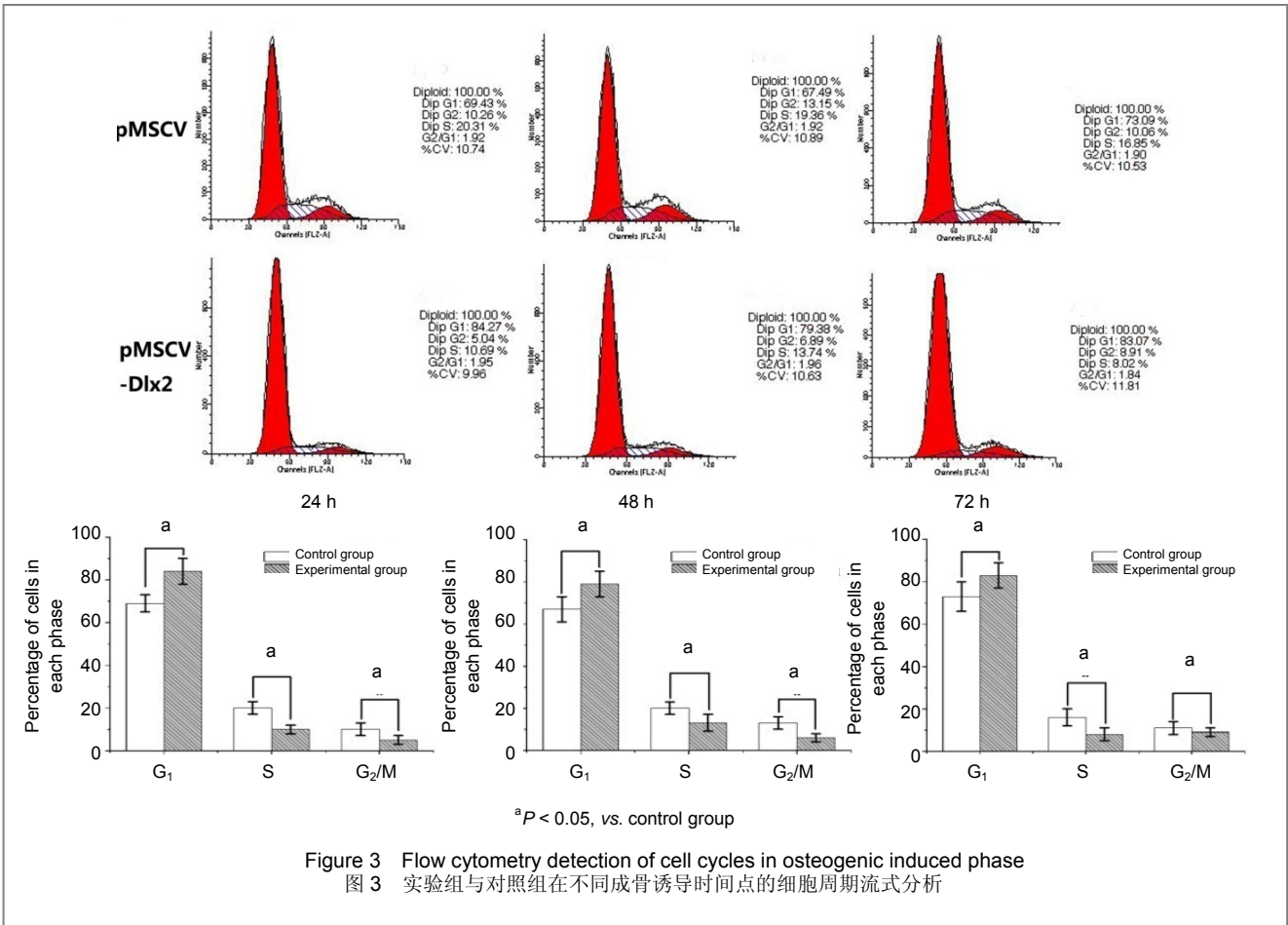
细胞的基本生物学行为包括迁徙、增殖、分化、凋亡。增殖与分化相互制约, 增殖为分化创造条件, 提供足够细胞数量, 而分化则是细胞行使功能的形式。凋亡在发育中的作用则更为突出, 细胞的程序性死亡确立了发育初期的器官形态。实验利用流式细胞分选技术, 探索 *Dlx2* 基因过表达对成骨诱导条件下 MC3T3-E1 细胞凋亡和细胞周期的影响, 为全面地理解 *Dlx2* 基因在颅颌面发育中的作用奠定基础。

颌面部骨骼主要由第一鳃弓始基发育而来<sup>[1]</sup>。而同源盒基因大家族下属的 *Dlx* 基因则被认为是第一鳃弓发育调控的主要候选基因<sup>[2]</sup>, 调控外胚间充质细胞的正确迁徙。*Dlx2* 基因在小鼠胚胎发育第 9.5~10.5 天的第一鳃弓近中区域即上颌突部位有明显高表达, 实验胚胎学研究证实这一时期对第一鳃弓始基的分化和发育非常重要, 决定了后续颌面部骨骼结构的发育和表型<sup>[3]</sup>。

Qiu 等<sup>[4-5]</sup>通过基因敲除技术创建了 *Dlx2*<sup>-/-</sup> 等位基因敲除小鼠模型。*Dlx2*<sup>-/-</sup> 纯合子小鼠出生后即死亡, 第一鳃弓上颌突起源的骨骼结构均被累及, 如基蝶骨、蝶骨大翼、翼板的形态异常和腭裂, 提示 *Dlx2* 基因在颅神经嵴细胞向第一鳃弓迁徙和颌面部骨骼发育中起重要作用。

McKeown 等<sup>[6]</sup>通过电穿孔技术在鸡胚第 1.25 天将含小鼠 *Dlx2* 基因转染质粒导入鸡胚的颅部神经嵴部位后继续孵育, 发现 *Dlx2* 过表达诱发了钙黏蛋白和神经细胞黏附因子 (neural cell adhesion molecule, NCAM) 的高表达, 引起神经嵴细胞黏附性增加, 出现细胞的异





常聚集, 进而引起颅面结构的发育和形态异常。  
 细胞凋亡和周期调控都会影响颅神经嵴细胞的迁徙和分化功能, 而 *Dlx2* 基因对细胞凋亡和周期调控的作用目前尚未见报道。实验采用 AnnexinV/PI 和 PI/RNase 双染法, 流式细胞仪定性、定量地检测凋亡细胞和细胞周期变化。发现在 *Dlx2* 基因过表达细胞系 MC3T3-E1-Dlx2 中, 流式细胞分选显示 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期细胞比例增加 ( $P < 0.05$ ), S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例减少 ( $P < 0.05$ ), *Dlx2* 过表达阻滞 MC3T3-E1 细胞的有丝分裂, 促

进分化。同时发现, 早期凋亡和晚期凋亡均有明显增加 ( $P < 0.05$ ), *Dlx2* 过表达促进 MC3T3-E1 细胞凋亡。  
 成骨细胞分化成熟中的一个必然步骤就是细胞周期发生 G<sub>1</sub> 期阻滞, 细胞从 G<sub>1</sub> 期走向 G<sub>0</sub> 期, 此时细胞停止分裂走向分化。实验通过 PI/RNase 染色后的流式细胞分选发现, *Dlx2* 基因过表达将细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期, 细胞增殖能力降低, 而分化能力增强, MC3T3-E1 细胞向成骨方向分化, 行使功能。此结果与本课题前期研究生长曲线测定中的结论一致, 也从另一个方面验证了课

题前期研究中 *Dlx2* 基因过表达促进 MC3T3-E1 成骨分化的结论。

细胞周期调控因子包括正性调控因子和负性调控因子, 目前公认的正性调控因子为周期蛋白和周期蛋白依赖蛋白激酶<sup>[7]</sup>; 负性调控因子为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子和 p21<sup>waf1/cip1</sup> 等效应蛋白<sup>[8]</sup>。但目前尚未见有关 *Dlx2* 基因与细胞周期蛋白直接作用的文献报道。推测 *Dlx2* 基因对细胞周期的调控作用可能通过间接的信号通路来实现, 这一假说需要进一步的研究来证实。

细胞凋亡是胚胎过程中非常重要的阶段, 并与器官形成、移除有遗传缺陷的细胞防止畸胎形成等机制有关。多细胞生物体中器官的正常形成, 需要某些细胞发生预定的、严格程序控制下的死亡。例如高等哺乳类动物指间蹼的消失、颌融合及免疫系统的发育都需要细胞凋亡的参与。

在哺乳动物细胞当中, 凋亡的执行者是 Caspase 蛋白水解酶, 激活后的 Caspase 蛋白通过激活核酸内切酶, 引起细胞形态上的强烈改变, 染色体降解和凋亡小体形成, 介导了凋亡过程<sup>[9-10]</sup>。促凋亡基因与抗凋亡基因之间的相互作用决定了 Caspase 家族蛋白的级联激活过程, 凋亡相关因子的表达变化是决定细胞命运的关键<sup>[11]</sup>。

目前尚未见 *Dlx* 家族基因是凋亡调控因子的报道, 也未见有关于 *Dlx2* 基因与 Caspase 蛋白直接作用的文献报道。推测 *Dlx2* 基因对细胞周期的调控作用可能通过间接的信号通路来实现。但有报道在胚胎发育期, 同源盒基因具有时空共线性的作用特征, 即 Hox 基因按照 3'-5' 端的顺序在特定的空间位置依次表达/静默, 靠近 3' 端的基因具有促进细胞增殖和迁移的作用, 主要调控体轴近端的发育(如颈椎); 而靠近 5' 端的基因具有促进细胞分化和凋亡的作用, 主要调控体轴远端和神经外胚层末端的发育(如尾椎, 鳃弓远端, 芽肢)。*Dlx2* 基因定位于染色体 2q3 位点, 接近 Hox D 的 5' 端, 根据这一理论, 其作用应为控制鳃弓远端发育和促进细胞分化和凋亡, 符合实验中 *Dlx2* 基因过表达促进 MC3T3-E1 细胞分化和凋亡的结论。

Thomas 等<sup>[12]</sup> 发现 *Dlx1*<sup>-/-</sup>/*2*<sup>-/-</sup> 双基因敲除小鼠除了完全性腭裂之外, 还出现上颌磨牙缺失, 上颌磨牙部位出现异位软骨, 但未给出合理解释。根据实验结论, *Dlx2* 基因过表达引起细胞凋亡, 推测本应高表达 *Dlx2* 的发育期颅神经嵴细胞, 因为 *Dlx2* 基因的敲除, 细胞凋亡减低, 本应正常进入程序性细胞死亡的上颌磨牙区颅神经嵴细胞继续发育为异位软骨。

综上所述, 本实验主要通过 Annexin V/PI 染色和 PI/RNase 染色后的流式细胞分选, 观察 *Dlx2* 基因过表达对细胞凋亡和细胞周期的影响, 发现 *Dlx2* 基因过表达促进细胞凋亡, 同时阻滞细胞周期于 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期, 减低细胞增殖性, 促进细胞成骨分化行使功能。此结论能够解释

部分 *Dlx2* 基因敲除小鼠表型缺陷, 同时与实验前期结论相符, 互相验证。

致谢: 感谢上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔医学研究所叶冬霞老师和口腔生物工程实验室张秀丽老师在实验技术上的指导和帮助。

#### 4 参考文献

- [1] Anderson SA, Marin O, Horn C, et al. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*. 2001;128(3):353-363.
- [2] Depew MJ, Lufkin T, Rubenstein JL. Specification of jaw subdivisions by *Dlx* genes. *Science*. 2002;298(5592):381-385.
- [3] Ferguson CA, Tucker AS, Sharpe PT. Temporospacial cell interactions regulating mandibular and maxillary arch patterning. *Development*. 2000;127(2):403-412.
- [4] Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, et al. Role of the *Dlx* homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of *Dlx-1*, *Dlx-2*, and *Dlx-1* and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol*. 1997;185(2):165-184.
- [5] Qiu M, Bulfone A, Martinez S, et al. Null mutation of *Dlx-2* results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. *Genes Dev*. 1995;9(20):2523-2538.
- [6] McKeown SJ, Newgreen DF, Farlie PG. *Dlx2* over-expression regulates cell adhesion and mesenchymal condensation in ectomesenchyme. *Dev Biol*. 2005;281(1):22-37.
- [7] Yam CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(8):1317-1326.
- [8] Fima E, Shtutman M, Libros P, et al. PKCeta enhances cell cycle progression, the expression of G1 cyclins and p21 in MCF-7 cells. *Oncogene*. 2001;20(46):6794-6804.
- [9] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-1316.
- [10] Chou KC, Tomasselli AG, Henrikson RL. Prediction of the tertiary structure of a caspase-9/inhibitor complex. *FEBS Lett*. 2000;470(3):249-256.
- [11] Chi MM, Schlein AL, Moley KH. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology*. 2000;141(12):4784-4792.
- [12] Thomas BL, Tucker AS, Qui M, et al. Role of *Dlx-1* and *Dlx-2* genes in patterning of the murine dentition. *Development*. 1997;124(23):4811-4818.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 上海市重点学科建设项目 (S30206); 上海市科学技术委员会(基础重点)项目 (10JC1408700); 上海市自然科学基金 (10ZR1418000); 上海市卫生局资助项目 (2009077); 上海交通大学医工(理)交叉研究基金 (YG2010MS55)。

**作者贡献:** 实验设计为通讯作者, 结果评估为通讯作者和第五作者, 实验实施和成文为第一、三、四作者, 通讯作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

**本文创新性:** 实验通过构建反转录病毒并转染细胞的方法建立稳定过表达 *Dlx2* 基因的成骨细胞模型, 进而利用 Annexin V/PI 染色和 PI/RNase 染色后流式细胞分选技术观察 *Dlx2* 基因对细胞周期和凋亡等生物学行为的影响, 发现 *Dlx2* 基因过表达促进细胞凋亡, 同时阻滞细胞周期于 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期, 减低细胞增殖性, 促进细胞成骨分化行使功能。