

敲低细丝蛋白 B 对小鼠颅顶成骨前体细胞增殖、迁移及凋亡的影响

王茜^{1,2}, 俞丽¹, 贾麒麟², 黄金勇², 刘泽彪³, 张俊², 加依达尔·地力木拉提², 谢增如², 马海蓉¹<https://doi.org/10.12307/2024.516>

投稿日期: 2023-08-28

采用日期: 2023-10-30

修回日期: 2023-11-14

在线日期: 2023-11-30

中图分类号:

R496; R318; R446

文章编号:

2095-4344(2024)32-05177-05

文献标识码: A

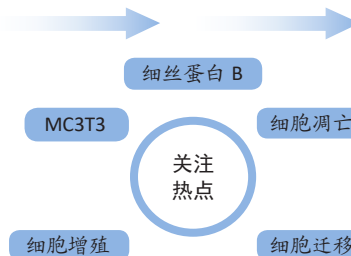
文章快速阅读: 细丝蛋白 B 对 MC3T3-E1 细胞增殖、迁移及凋亡的影响

研究起点

- 成骨细胞
- 骨质疏松症
- 骨质疏松
- 骨密度
- 破骨细胞
- 信号通路

研究来源

- MC3T3
- 成骨细胞
- 骨密度
- 骨质疏松
- 破骨细胞
- 细丝蛋白 B



研究分支

- 骨重建
- 骨质疏松
- 细胞增殖
- 细胞迁移
- 细胞凋亡
- 骨骼发育
- 骨骼疾病

文题释义:

细丝蛋白B(Filamin B, FLNB): 为二聚体肌动蛋白结合蛋白家族的成员, 是一种重要的细胞骨架蛋白, 可将肌动蛋白细胞骨架细丝交联成动态结构, 为细胞运动和信号传递提供了重要的支架。

肌动蛋白: 是一种中等大小的蛋白质, 375个氨基酸残基组成, 由高度保守的基因编码。肌动蛋白至少表达成6种异构形式, 分为 α 、 β 、 γ 三种类型。根据等电点的不同可将高等动物细胞内的肌动蛋白分为3类, α 分布于各种肌肉细胞中, β 和 γ 分布于肌细胞和非肌细胞中。

摘要

背景: 细丝蛋白B(FLNB)能将肌动蛋白细胞骨架交联成动态结构, 对细胞的定向移动至关重要, 可调控软骨细胞的增殖、分化及凋亡的发生。然而, 细丝蛋白B对成骨细胞增殖、迁移及凋亡的影响尚未报道。

目的: 探究细丝蛋白B对MC3T3-E1细胞的增殖、迁移及凋亡的影响。

方法: 构建敲低细丝蛋白B表达的腺病毒载体(sh-FLNB1、sh-FLNB2、sh-FLNB3), 感染小鼠颅顶成骨前体细胞(MC3T3-E1), 嘌呤霉素药筛, 通过Western Blot以及RT-PCR技术检测敲低效率, 选取敲低细丝蛋白B效率最佳的MC3T3-E1细胞株作为稳转细胞株。将细胞分为Blank组、mc3t3组、sh-NC组(空载体)、sh-FLNB组(sh-FLNB慢病毒), Blank组为 α -MEM完全培养基无细胞; mc3t3组为单纯 α -MEM完全培养基培养; sh-NC组、sh-FLNB组为含有嘌呤霉素2.5 μ g/mL的 α -MEM完全培养基培养。培养3 d采用CCK-8法和划痕实验检测MC3T3-E1细胞增殖和迁移能力; 流式细胞仪检测细胞凋亡情况; RT-PCR进一步验证细胞凋亡相关基因的表达。

结果与结论: ①Western Blot及RT-PCR结果显示, sh-FLNB3组细丝蛋白B敲低效率最佳, 差异有显著性意义($P < 0.0001$), 以此作为后续实验稳转细胞株; ②CCK-8数据显示, 敲低细丝蛋白B后MC3T3增殖能力显著减弱($P < 0.05$); ③划痕实验显示, 敲低细丝蛋白B后MC3T3的迁移能力明显下降; ④流式细胞仪及RT-PCR显示, 敲低细丝蛋白B后, MC3T3-E1细胞凋亡率增加, 促凋亡因子Bax表达显著上升, 抑凋亡因子Bcl-2表达下降($P < 0.05$); ⑤结果说明, 细丝蛋白B敲低可降低MC3T3-E1细胞的增殖能力, 细胞迁移能力下降, 并增加细胞凋亡的发生。

关键词: 细丝蛋白B; MC3T3-E1细胞; 增殖; 迁移; 凋亡

Effects of filament B knockdown on proliferation, migration and apoptosis of mouse MC3T3-E1 cells

Wang Xi^{1,2}, Yu Li¹, Jia Qiyu², Huang Jinyong², Liu Zebiao³, Zhang Jun², Jiayidaer·Dilimulati², Xie Zengru², Ma Hairong¹

¹Research Institute of Clinical Medicine, ²Department of Orthopaedic Trauma, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ³Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Wang Xi, Master candidate, Research Institute of Clinical Medicine, Department of Orthopaedic Trauma, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; Department of Orthopaedic Trauma, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Ma Hairong, MD, Researcher, Research Institute of Clinical Medicine, Department of Orthopaedic Trauma, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Co-corresponding author: Xie Zengru, Master, Chief physician, Department of Orthopaedic Trauma, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

新疆医科大学第一附属医院, ¹临床医学研究院, ²创伤骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054; ³华北理工大学附属医院骨科, 河北省唐山市 063000

第一作者: 王茜, 女, 1998年生, 河北省柏乡县人, 汉族, 新疆医科大学第一附属医院创伤骨科在读硕士, 主要从事细胞实验研究。

通讯作者: 马海蓉, 博士, 研究员, 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

共同通讯作者: 谢增如, 硕士, 主任医师, 新疆医科大学第一附属医院创伤骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

<https://orcid.org/0009-0006-3349-4125>(王茜)

基金资助: 国家自然科学基金项目(82060411), 项目负责人: 马海蓉; 国家自然科学基金项目(82260409), 项目负责人: 谢增如; 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目(2021D01D21), 项目负责人: 马海蓉; 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目(2021D01D19), 项目负责人: 谢增如; 自治区研究生创新项目(XJ2023G166), 项目负责人: 王茜

引用本文: 王茜, 俞丽, 贾麒麟, 黄金勇, 刘泽彪, 张俊, 加依达尔·地力木拉提, 谢增如, 马海蓉. 敲低细丝蛋白 B 对小鼠颅顶成骨前体细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(32):5177-5181.



Abstract

BACKGROUND: Filamin B (FLNB) can crosslink the actin cytoskeleton into a dynamic structure that is essential for the directional movement of cells. It can regulate the proliferation, differentiation and apoptosis of chondrocytes. However, the effect of FLNB on osteoblast proliferation, migration and apoptosis has not been reported.

OBJECTIVE: To investigate the effect of FLNB on the proliferation, migration and apoptosis of MC3T3-E1 cells.

METHODS: The adenoviral vectors for knockdown of FLNB expression (sh-FLNB1, sh-FLNB2, sh-FLNB3) were constructed and infected with MC3T3-E1 cells. After screened by puromycin drug, the efficiency of FLNB knockdown was detected by western blot and RT-PCR. The MC3T3-E1 cell line with the best efficiency of FLNB knockdown was selected as the stable transient cell line of MC3T3-E1 for subsequent experiments. The cells were divided into blank group, mc3t3 group, sh-NC group (empty vector), and sh-FLNB group (sh-FLNB lentivirus). The blank group was cultured in cell-free α -MEM complete medium; the mc3t3 group was cultured in α -MEM complete medium alone; and the sh-NC and sh-FLNB groups were cultured with α -MEM medium containing 2.5 μ g/mL puromycin. After 3 days of culture, cell counting kit-8 assay and cell scratch assay were used to detect the proliferation and migration ability of MC3T3-E1; flow cytometry was used to detect cell apoptosis; and RT-PCR was used to detect the expression of apoptosis-related genes.

RESULTS AND CONCLUSION: Western blot and RT-PCR results showed that the efficiency of FLNB knockdown was the best in the sh-FLNB3 ($P < 0.0001$), which was used as a stable cell line for subsequent experiments. Cell counting kit-8 data showed that the proliferative ability of MC3T3 cells was significantly weakened after knockdown of FLNB ($P < 0.05$). Cell scratch assay results showed that the migration ability of MC3T3 cells was significantly decreased after knockdown of FLNB. Flow cytometry and RT-PCR results showed that the apoptotic rate of MC3T3-E1 cells increased after knockdown of FLNB, the expression of pro-apoptotic factor Bax increased significantly, and the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 decreased significantly ($P < 0.05$). To conclude, knockdown of FLNB can reduce the proliferation ability of MC3T3-E1 cells, decrease the migration ability of the cells, and increase cell apoptosis.

Key words: Filamin B; MC3T3-E1; proliferation; migration; apoptosis

Funding: the National Natural Science Foundation of China, Nos. 82060411 (to MHR) and 82260409 (to XZR); Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Nos. 2021D01D21 (to MHR) and 2021D01D19 (to XZR); Graduate Students' Innovative Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. XJ2023G166 (WX)

How to cite this article: WANG X, YU L, JIA QY, HUANG JY, LIU ZB, ZHANG J, DILIMULATI J, XIE ZR, MA HR. Effects of filament B knockdown on proliferation, migration and apoptosis of mouse MC3T3-E1 cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(32):5177-5181.

0 引言 Introduction

骨质疏松症是一种全身性骨退行性疾病，骨量的逐渐丧失和骨力学性能的显著退化是其最明显的两大特征，最终导致脆性增加和骨折的发生。随着人口老龄化日趋严重，骨质疏松症已成为中国面临的重要公共健康问题^[1-2]。然而，目前治疗骨质疏松症的药物存在治疗效果欠佳、不良反应明显、无法改善成骨细胞增殖分化、难以逆转骨质疏松症进程等诸多问题^[3-4]。Romosozumab，目前针对骨质疏松常用的临床治疗药物，是一种具有双重功能的单克隆抗硬化素抗体^[5]，其生物功能是基于结合和抑制硬化蛋白的形成，从而产生增加骨形成和减少骨吸收的疗效。然而，一项 RCT 研究显示，使用 Romosozumab 可导致骨关节炎、癌症和心血管事件等不良事件的发生^[6]，所以对于骨质疏松的治疗目前仍然具有挑战性。

细丝蛋白 B(Filamin B, FLNB) 是二聚体肌动蛋白结合蛋白家族的成员，是一种重要的细胞骨架蛋白。FLNB 参与多种关键生物学过程，例如细胞增殖、分化和迁移等^[7]。临床病例报道显示，FLNB 突变可导致脊椎-腕关节融合征、青少年特发性脊柱侧弯以及胎儿期拉森综合征等多种遗传性骨骼疾病的发生^[8-10]。近期一项针对中国南方女性的研究发现，FLNB 与骨质疏松的发生密切相关，其可能是调节骨密度的易感基因^[11]。此外，在一项对 767 名女性、1 085 名英国女性双胞胎和 1 315 名澳大利亚女性的研究中^[12]，发现携带 FLNB 突变的患者其低创伤脆性骨折的发生率增加，这表明 FLNB 突变改变了女性的骨骼结构。WILSON 等^[12]通过单核苷酸多态性分析发现，FLNB 与股骨颈和脊柱的骨密度之间有显著相关性。以上多项临床数据显示 FLNB 在骨骼系统发育过程中的重要性。骨密度是骨质疏松症的重要诊断标准之一，而 FLNB 又可调控骨密度的变化，说明 FLNB 在骨稳态过程发挥着重要调控功能。因此，深入探究 FLNB 在成骨细胞发育过程中的作用，对于深入了解骨质疏松的发病机制以及探索新

型骨质疏松治疗靶点，挽救因骨质疏松症所致的骨质流失，具有重大的临床意义和经济社会效益。

目前，FLNB 在骨代谢过程中调控成骨细胞的具体作用机制尚不清楚。此次研究以小鼠颅顶成骨前体细胞(MC3T3-E1)为研究对象，建立敲低 FLNB 的 MC3T3-E1 细胞稳转细胞系，探究 FLNB 对 MC3T3-E1 细胞的增殖及凋亡的影响，为深入了解 FLNB 在 MC3T3-E1 细胞中的作用机制以及在骨代谢过程中的生物调控功能奠定基础。期望为骨质疏松的治疗提供新的见解，寻找新的治疗靶点，挽救因骨质疏松所致的骨质流失。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验。两组间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 10 月至 2023 年 6 月在新疆医科大学第一附属医院科技楼完成。

1.3 材料

1.3.1 实验材料 小鼠颅顶成骨前体细胞 MC3T3-E1 购自普诺赛(武汉, 中国); 敲低 FLNB 腺病毒载体、促感剂 Polybrene(广州源井生物公司, 中国)。

1.3.2 主要实验试剂 α -MEM 培养基、胎牛血清(Gibco, 美国); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA(Biological Industries, 以色列); 青霉素-链霉素双抗溶液、嘌呤霉素(Biosharp, 中国); CCK-8 试剂盒(Bioss, 中国); PE 偶联 Annexin-V 凋亡检测试剂盒(Biosciences, 美国); 总 RNA 提取试剂盒(成都福际, 中国); PCR 引物(生工, 中国); TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(TaKaRa, 日本); FLNB 抗体、GAPDH 抗体(Proteintech, 中国); 高效 RIPA 裂解液(Solarbio, 中国)。

1.3.3 主要实验仪器 CO₂ 恒温细胞培养箱、多功能酶标仪(Thermo, 美国); 倒置相差显微镜(Zeiss, 德国); 流式细胞仪(BD, 美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 构建敲低 FLNB 的 MC3T3-E1 细胞模型 取培养生长状态良好的 MC3T3 细胞, 以 1×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板, 每孔加入 2 mL 完全培养基。24 h 后, 加入 1 mL 含有 5 $\mu\text{g/mL}$ Polybrene(促感染剂)的完全培养基以及 20 μL 的 FLNB 腺病毒(sh-FLNB1、sh-FLNB2、sh-FLNB3), 病毒滴度为 1×10^8 (TU/mL), 设 sh-NC 为空载体。加入病毒 24 h 后移除原有培养基, 更换新鲜的完全培养基; 48–72 h 后于荧光显微镜下观察绿色荧光的表达。若镜下有大量绿色荧光细胞时, 更换含有嘌呤霉素 5 $\mu\text{g/mL}$ 的完全培养基, 筛选 7 d。再更换为含有嘌呤霉素 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的完全培养基培养细胞。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 实验 待转染的细胞生长至一定密度时, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 反转录条件: 25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min、85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。PCR 的循环条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s 预变性; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环, 以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算靶基因的表达水平, 标准化为内参基因 GAPDH, 实验重复 3 次, 引物序列信息见表 1。

表 1 | 引物序列信息

Table 1 | Primer sequence information

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
细丝蛋白 B	FORWARD 5'-AGG TTG AAT GGT GCG AAA GGG AAG-3'	112
	REVERSE 5'-TGA AGC GAA CGG CAT ACT TAT CTG G-3'	
GAPDH	FORWARD 5'-GGC AAA TTC AAC GGC ACA GTC AAG-3'	81
	REVERSE 5'-TCG CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG-3'	
BAX	FORWARD 5'-GAA GCT GAG CGA GTG TCT CC-3'	229
	REVERSE 5'-GAT CAG CTC GGG CAC TTT AG-3'	
BCL-2	FORWARD 5'-AGC CTG AGA GCA ACC CAA TG-3'	157
	REVERSE 5'-CGA CGA GAG AAG TCA TCC CC-3'	

1.4.3 Western blot 实验 实验分为为空载体组 (sh-NC) 及 sh-FLNB1、sh-FLNB2、sh-FLNB3 组。sh-NC 组加入空载体慢病毒, sh-FLNB1、sh-FLNB2、sh-FLNB3 组分别加入 sh-FLNB1 慢病毒、sh-FLNB2 慢病毒, sh-FLNB3 慢病毒。用含有 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的完全培养基培养细胞。待转染的细胞状态良好且生长至一定密度时, 提取细胞总蛋白。用含有新鲜蛋白酶抑制剂 PMSF(1 mmol/L) 的 RIPA 缓冲液制备细胞裂解物。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。等量蛋白在 10% 聚丙烯酰胺凝胶中运行, 转移到 PVDF 膜上, 室温下用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h, 用相应兔抗鼠一抗 FLNB(1 : 1000)4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜, TBST 洗涤, 室温下山羊抗兔二抗 (Proteintech, 1 : 5000) 孵育 1 h。采用 ECL 化学发光法显影。采用 ImageJ 软件对各条带灰度值进行定量测定, 实验重复 3 次。

1.4.4 CCK-8 实验 将 Blank 组、mc3t3 组、sh-NC 组、sh-FLNB 组按照 5×10^3 个 / 孔细胞密度接种于 96 孔板, 每孔加入 200 μL 完全培养基, 每组 5 个复孔, 置于培养箱中培养。Blank 组为仅含 α -MEM 完全培养基无细胞; mc3t3 组为单纯 α -MEM 完全培养基培养的细胞; sh-NC 组、sh-FLNB 组为含有嘌呤霉素 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 α -MEM 完全培养基培养的细胞。待培养至 1, 2, 3 d, 分别取出 96 孔板, 预热普通恒温培养箱, 注入 CCK-8 溶液 (10 μL / 孔), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 2 h, 酶标仪 A_{450}

测定吸光度, 求得各组平均吸光度值, 并以此为纵坐标, 绘制吸光度值在不同时间改变的柱状图, 实验重复 3 次。

1.4.5 细胞迁移实验 完全培养基制备 mc3t3 组、sh-NC 组、sh-FLNB 组细胞悬液, 以 1×10^5 个 / 孔细胞密度接种于 6 孔板, 并添加 α -MEM 完全培养基 1.5 mL, 12 h 后弃培养基, 取 100 μL 枪头于每孔做 3 条平行横行划痕, 居中划痕位于孔中央, PBS 清洗。mc3t3 组加入 α -MEM 完全培养基培养, sh-NC 组、sh-FLNB 组加入含有嘌呤霉素 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 α -MEM 完全培养基, 每组 2 个复孔。分别于 0, 24, 48 h 后镜下拍照, 拍照时每条划痕应包括 5 个以上不同视野, 对细胞迁移程度进行记录分析, 实验重复 3 次。

1.4.6 流式鉴定细胞凋亡 mc3t3 组加入 α -MEM 完全培养基培养, sh-NC 组、sh-FLNB 组加入含有 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的 α -MEM 完全培养基, 以 1×10^5 个 / 孔细胞密度接种于 6 孔板。培养 24 h, 收集细胞沉淀, PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 500 μL 1xBinding Buffer 工作液和 5 μL AnnexinV-PE、5 μL AnnexinV-7AAD, 混匀后上机检测^[13], 实验重复 3 次。

1.5 主要观察指标 敲低 FLNB 对 MC3T3-E1 细胞增殖能力、迁移能力及凋亡的影响。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 25.0 统计学软件对结果数据进行分析, 计量数据符合正态分布方差齐, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 时, 认为差异有显著性意义。文章统计学方法已通过新疆医科大学医学院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 成功构建敲低 FLNB 的 MC3T3-E1 细胞株

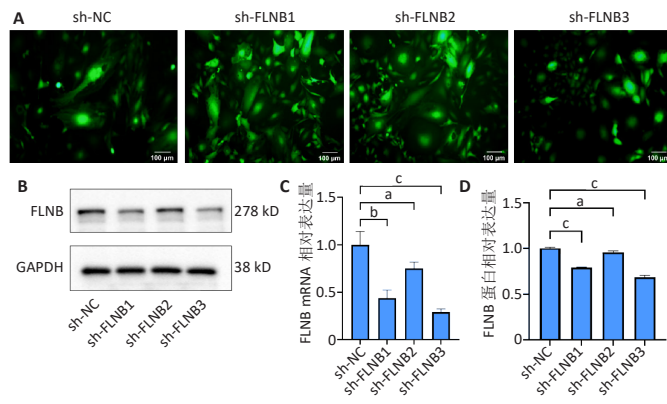
2.1.1 荧光显微镜观察 经转染 48 h 后, 于荧光显微镜下观察每组绿色荧光表达情况 (图 1A), 结果显示所有组别均有绿色荧光表达。

2.1.2 Western Blot 和 RT-PCR 检测 结果显示, 相较于 sh-FLNB1 和 sh-FLNB2 组, sh-FLNB3 组 FLNB 的 mRNA 和蛋白的表达显著下调 ($P < 0.0001$, 图 1B–D), 说明 sh-FLNB3 的病毒序列的敲低效果最好, 因此将 sh-FLNB3 作为后期实验的稳定敲低 FLNB 的 MC3T3-E1 细胞株 (注: 后面将 sh-FLNB3 组标注为 sh-FLNB 组)。

2.2 敲低 FLNB 对 MC3T3-E1 细胞增殖能力的影响 经 CCK-8 法测定 sh-NC 组、sh-FLNB 组细胞 1, 2, 3 d 的 A 值。结果显示: sh-NC 组细胞随着时间的增加, 增殖能力逐渐上升; 而相较于 sh-NC 组, sh-FLNB 组细胞随着时间的延长, 增殖能力逐渐下降 ($P < 0.05$), 见图 2。结果表明, 敲低 FLNB 减弱了 MC3T3-E1 细胞的增殖能力。

2.3 敲低 FLNB 对 MC3T3-E1 细胞迁移能力的影响 mc3t3 组和 sh-NC 组细胞在 24 h 时开始表现出明显迁移趋势, 而相较于 mc3t3 组和 sh-NC 组, sh-FLNB 组细胞在 24 h 时的迁移速度明显减弱, 尚未表现出明显迁移变化; 48 h 后, mc3t3 组和 sh-NC 组的划痕基本靠拢, sh-FLNB 组的划痕仍存在较大

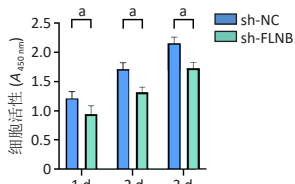
间隙。图3结果提示，敲低 FLNB 可以明显降低 MC3T3-E1 细胞迁移能力。



图注：图A为转染慢病毒的绿色荧光表达；B、D分别为敲低 FLNB 的 Western Blot 结果及定量分析；C为敲低 FLNB 的 RT-PCR 结果的定量分析。与 sh-NC 组比较，^a $P < 0.05$ ；^b $P < 0.001$ ；^c $P < 0.0001$ 。

图1 | 检测细丝蛋白 B(FLNB) 慢病毒转染效率

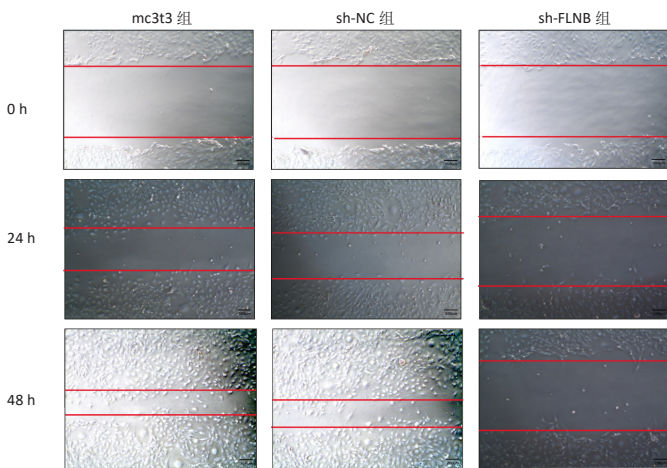
Figure 1 | The transfection efficiency of Filamin B lentivirus



图注：^a $P < 0.05$ 。

图2 | 敲低细丝蛋白 B(FLNB) 对小鼠颅顶成骨前体细胞 (MC3T3-E1) 增殖的影响

Figure 2 | Effect of Filamin B knockdown on proliferation of MC3T3-E1 cells

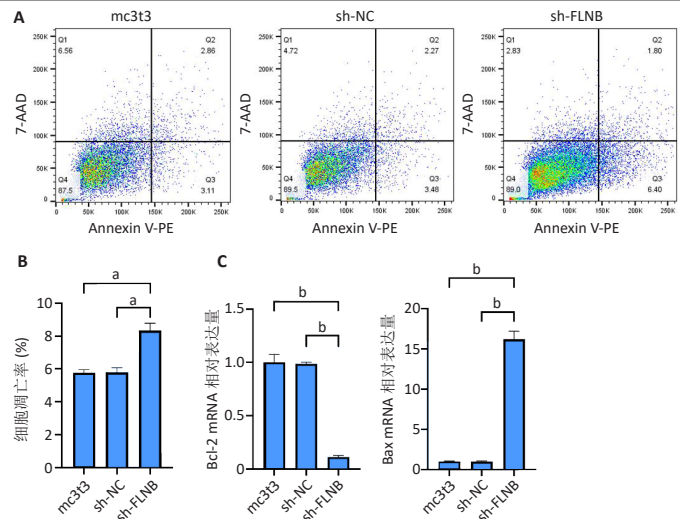


图注：相较于 mc3t3 组和 sh-NC 组，sh-FLNB 组细胞在 24 h 时的迁移速度明显减弱；48 h 后，mc3t3 组和 sh-NC 组的划痕基本靠拢，sh-FLNB 组仍存在较大间隙。

图3 | 敲低细丝蛋白 B(FLNB) 对小鼠颅顶成骨前体细胞 (MC3T3-E1) 迁徙的影响

Figure 3 | Effect of Filamin B knockdown on migration of MC3T3-E1 cells

2.4 敲低 FLNB 对 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响 流式结果显示，培养 24 h 后，mc3t3 组和 sh-NC 组细胞凋亡率相当，无显著性差异，sh-FLNB 组表现为细胞总凋亡率呈现上升趋势 ($P < 0.05$)。同样地，PCR 结果显示，相较于 mc3t3 组和 sh-NC 组，sh-FLNB 组随着 FLNB 的 mRNA 下调，促凋亡因子 Bax mRNA 表达显著增加，抑凋亡因子 Bcl-2 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.0001$)，见图4。



图注：图A流式 AnnexinV-PE/7-AAD 分析结果；图B为细胞凋亡率比较；图C为凋亡相关基因的 RT-PCR 检测结果。与 mc3t3 组相比，^a $P < 0.001$ ，^b $P < 0.0001$ 。

图4 | 敲低细丝蛋白 B(FLNB) 对小鼠颅顶成骨前体细胞 (MC3T3-E1) 凋亡的影响

Figure 4 | Effect of Filamin B knockdown on apoptosis of MC3T3-E1 cells

3 讨论 Discussion

FLNB 是一种细胞肌动蛋白结合蛋白 Filamin 家族的成员，通过交联肌动蛋白将细胞膜连接到细胞骨架并调节细胞内负责骨骼发育的信号通路来调节细胞骨架网络^[8]。FLNB 突变会导致多种骨骼疾病的发生。据病理研究显示，FLNB 突变可导致多种病理过程发生，如降低软骨细胞和成纤维细胞的运动性以及影响血管生成^[14-16]。大量研究表明，FLNB 对软骨细胞具有重要调控功能，其通过调控细胞分布以及与糖蛋白 Ib α 胞浆尾部、微丝蛋白的相互作用，从而调节细胞骨架网络^[17-20]。LU 等^[21]采用原位末端标记法，发现 FLNB 敲低小鼠的软骨细胞凋亡率增加。在 FLNB 基因缺陷小鼠中发现，软骨的骨骼发育不良，软骨内和膜内成骨延迟。以上结果表明，FLNB 在软骨细胞发育、增殖、分化以及凋亡过程中发挥着重要的调控作用。

FLNB 通过调节细胞骨架对软骨细胞实现调控作用，此外，细胞骨架网络对于成骨细胞发育也存在至关重要的作用。因为成骨前体细胞的迁徙和定向移位是骨重建过程中很重要的一个方面。由此，作者提出了 FLNB 对于成骨细胞增殖、迁移具有重要调控作用的假设。MC3T3-E1 细胞因具有能够通过有序发育逐渐获得成熟成骨细胞的功能特征，是目前研究成骨细胞系最常用的体外模型之一^[22-23]。此次研究在蛋白和基因层面的结果表明，构建了 FLNB 敲低的 MC3T3-E1 细胞稳定转染细胞株；CCK-8 法和划痕实验结果显示，FLNB 敲低的 MC3T3-E1 细胞同野生型 MC3T3-E1 细胞和空载体病毒的 MC3T3-E1 细胞相比，显示出细胞增殖能力下降、迁移速率显著降低，表明 FLNB 可以促进成骨细胞的增殖、迁移的发生。

FLNB 可通过调节细胞骨架网络的功能为细胞提供机械支持，并且可通过细胞质的运输途径帮助信号转导肌动蛋白网络进行快速组装和拆卸从而使细胞发生迁移运动^[24-25]。骨

重建包括两个阶段：骨吸收和骨形成，这两个阶段之间的平衡对于维持骨量和系统矿物质稳态至关重要^[26-27]。在骨重建过程中，首先经历的是骨吸收阶段，成骨细胞对骨细胞产生的信号或直接的内分泌激活信号作出反应，将破骨细胞前体募集到重塑部位^[28]。随后进入逆转期，其显著特征是几乎所有破骨细胞都消失，由成骨细胞完全取代破骨细胞^[29]。此次研究显示 FLNB 可以促进成骨细胞的增殖、迁移的发生，为以后开发干细胞疗法来加速骨重建的完成提供了新的见解。

此次研究在确定 FLNB 可调控 MC3T3-E1 细胞增殖及迁移的基础上，进一步探究了 FLNB 敲低对 MC3T3-E1 细胞凋亡的情况，结果表明敲低 FLNB 后，MC3T3-E1 细胞凋亡率显著增加，这意味着 FLNB 可能在 MC3T3-E1 细胞凋亡过程中扮演着重要角色。细胞凋亡是机体重要的自稳机制，它能主动清除不需要或异常的细胞，对胚胎发育、维持内环境稳态以及抵抗病原体等正常生理进程发挥重要的作用^[30]。骨质疏松症是一种常见的代谢性骨病，主要是由于破骨细胞的骨吸收和间充质系成骨细胞的骨形成之间的动态平衡失衡所致^[31]。程序性细胞死亡（如细胞凋亡、自噬、铁凋亡、热凋亡和坏死）是一种细胞死亡过程，涉及一系列基因表达事件，这些事件通过决定骨细胞的命运，在调节骨代谢方面发挥着重要的作用^[32]。此次研究结果显示，敲低 FLNB 后，MC3T3-E1 细胞凋亡发生增加；且 RT-PCR 显示，促凋亡蛋白 Bax 的表达显著增加，而抑凋亡蛋白 BCL-2 的表达显著降低。这表明过度下调 FLNB 可能通过调控 BCL-2 家族的基因导致凋亡途径激活，破坏细胞内环境的稳定，调控细胞程序性死亡，从而影响骨质整合。

此次研究仅验证 FLNB 对成骨细胞增殖、迁移、凋亡变化的影响，尚未涉及 FLNB 调控成骨细胞分化以及具体相关机制的研究，将在后续实验中进行更加深入的探索。

综上所述，此次研究发现 FLNB 可以调控成骨细胞的迁移、增殖以及凋亡的发生，为深入了解 FLNB 在骨骼发育过程的调控功能奠定基础，有望为将来针对骨质疏松症的干细胞疗法开发新的治疗靶点及 FLNB 所致遗传性骨骼疾病的治疗提供新的诊疗思路。

作者贡献：所有作者均参与了实验过程，第一作者完成初稿，通讯作者审核。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4):317-318.
- [2] KHOSLA S, HOFBAUER LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(11):898-907.
- [3] TSAI JN, LEE H, DAVID NL, et al. Combination denosumab and high dose teriparatide for postmenopausal osteoporosis (DATA-HD): a randomised, controlled phase 4 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(10):767-775.
- [4] ENSRUD KE, CRANDALL CJ. Osteoporosis. *Ann Intern Med.* 2017;167(3):ITC17-ITC32.
- [5] COSMAN F, CRITTENDEN DB, ADACHI JD, et al. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2016;375(16):1532-1543.
- [6] KAVEH S, HOSSEINIFARD H, GHADIMI N, et al. Efficacy and safety of Romosozumab in treatment for low bone mineral density: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2020;39(11):3261-3276.
- [7] ZHOU AX, HARTWIG JH, AKYUREK LM. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol.* 2010;20(2):113-123.
- [8] STOSSEL TP, CONDEELIS J, COOLEY L, et al. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):138-145.
- [9] GORLIN JB, YAMIN R, EGAN S, et al. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol.* 1990;111(3):1089-1105.
- [10] 宋蕊, 张鑫悦, 周红辉, 等. FLNB 突变致胎儿期拉森综合征的遗传学研究 [J]. 解放军医学院学报, 2021, 42(5):560-564.
- [11] LI GH, KUNG AW, HUANG QY. Common variants in FLNB/CRTAP, not ARHGEF3 at 3p, are associated with osteoporosis in southern Chinese women. *Osteoporos Int.* 2010;21(6):1009-1020.
- [12] WILSON SG, JONES MR, MULLIN BH, et al. Common sequence variation in FLNB regulates bone structure in women in the general population and FLNB mRNA expression in osteoblasts in vitro. *J Bone Miner Res.* 2009;24(12):1989-1997.
- [13] 贾麒麟, 黄晓夏, 郭建, 等. 整合素靶向促进 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的增殖 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(30):4780-4786.
- [14] HU J, LU J, LIAN G, et al. Filamin B regulates chondrocyte proliferation and differentiation through Cdk1 signaling. *PLoS One.* 2014;9(2):e89352.
- [15] ZIEBA J, ZHANG W, CHONG JX, et al. A postnatal role for embryonic myosin revealed by MYH3 mutations that alter TGFβ signaling and cause autosomal dominant spondylaraportarsal synostosis. *Sci Rep.* 2017;7:41803.
- [16] SU YT, GAO C, LIU Y, et al. Monoubiquitination of filamin B regulates vascular endothelial growth factor-mediated trafficking of histone deacetylase 7. *Mol Cell Biol.* 2013;33(8):1546-1560.
- [17] FUKUSHIMA K, PARTHASARATHY P, WADE EM, et al. Intragenic Deletions in FLNB Are Part of the Mutational Spectrum Causing Spondylaraportarsal Synostosis Syndrome. *Genes (Basel).* 2021;12(4):528.
- [18] VAN DER FLIER A, KUIKMAN I, KRAMER D, et al. Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin [beta] subunits. *J Cell Biol.* 2002;156(2):361-376.
- [19] ZHANG W, HAN SW, MCKEEL DW, et al. Interaction of presenilins with the filamin family of actin-binding proteins. *J Neurosci.* 1998;18(3):914-922.
- [20] 王茜, 颜举, 黄金勇, 等. FilaminB 在骨骼系统中的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(4):606-610.
- [21] LU J, LIAN G, LENKINSKI R, et al. Filamin B mutations cause chondrocyte defects in skeletal development. *Hum Mol Genet.* 2007;16(14):1661-1675.
- [22] 黄金勇, 吐尔逊江·达地汗, 郑靖杰, 等. 鹰嘴豆芽异黄酮对小鼠成骨前体细胞 MC3T3-E1 增殖及分化的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(12):1723-1727, 1734.
- [23] JING WB, JI H, JIANG R, et al. Astragaloside positively regulated osteogenic differentiation of pre-osteoblast MC3T3-E1 through PI3K/Akt signaling pathway. *J Orthop Surg Res.* 2021;16(1):579.
- [24] VAN DER FLIER A, SONNENBERG A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1538(2-3):99-117.
- [25] AYSCOUGH KR. In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10(1):102-111.
- [26] SIDDIQUI JA, PARTRIDGE NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(3):233-245.
- [27] GEORGES S, RUIZ VELASCO C, TRICHET V, et al. Proteases and bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(1):29-41.
- [28] SALHOTRA A, SHAH HN, LEVI B, et al. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(11):696-711.
- [29] WEIVODA MM, BRADLEY EW. Macrophages and Bone Remodeling. *J Bone Miner Res.* 2023;38(3): 359-369.
- [30] XU X, LAI Y, HUA ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019;39(1):BSR20180992.
- [31] JIANG Y, ZHANG P, ZHANG X, et al. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis. *Cell Prolif.* 2021;54(1):e12956.
- [32] LI Z, LI D, CHEN R, et al. Cell death regulation: A new way for natural products to treat osteoporosis. *Pharmacol Res.* 2023;187:106635.

(责任编辑: LCH, WZH, ZN, WL)