

- 药苷的含量[J].安徽医药, 2014, 18(12): 2258-2260.
- [8] 黄卫娟, 何秀云, 刘杰, 等. HPLC法测定八珍丸(浓缩丸)中芍药苷的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(15): 2126-2127.
- [9] 徐冲, 刘霞, 范智琴, 等. 高效液相色谱法测定补肾养血颗粒中二苯乙烯苷含量[J]. 中国药业, 2017, 26(9): 20-22.
- [10] 胡翔. 参芪首乌颗粒质量标准研究[J]. 安徽医药, 2018, 22(5): 819-821.
- [11] 尹思泳, 陈钟扬, 梁华伦, 等. HPLC法测定乙肝宁颗粒中二苯乙烯苷含量[J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(15): 11-12.
- [12] 黄燕, 沈小苹, 潘旭东. 艾可胶囊的澄清工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 58-61.
- [13] 王柏强, 刘福, 何效平, 等. 杜仲叶水提液除杂工艺的优化[J]. 中成药, 2016, 38(6): 1418-1421.
- [14] 王勇, 邹韵, 李永辉. 正交试验优选裸花紫珠水提液的壳聚糖絮凝澄清工艺[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(1): 7-9.
- [15] 张玉婷, 高家荣, 刘健, 等. 正交试验法优选五味温通除痹胶囊水提工艺[J]. 安徽医药, 2014, 18(10): 1833-1836.
- [16] 胡俊杰, 肖伊, 吕秋霞, 等. 活血消癥片水提液的澄清工艺研究[J]. 中成药, 2012, 34(10): 2037-2040.
- [17] 彭颖, 雷昌, 唐颖楠, 等. 壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺对党参水提液的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(12): 81-84.
- (收稿日期: 2018-12-07, 修回日期: 2019-01-16)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.12.007

◇ 药学研究 ◇

CRISPR/Cas 9 介导的基质 Gla 蛋白基因敲除对破骨细胞分化的影响

赵俐婷¹, 王乃宁², 贺芳¹, 张燕¹作者单位:¹西安交通大学第一附属医院转化医学中心, 陕西 西安 710061;²西安交通大学生命学院, 陕西 西安 710061

通信作者: 张燕, 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为骨稳态调控机制, E-mail: zhangyan1114@xjtu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(81670806, 81972133, 81300716); 中央高校基本科研业务费(xzy01201909);

陕西省自然科学基金基础研究计划(2017JM8015)

摘要:目的 利用 CRISPR/Cas 9 基因编辑技术, 构建基质 Gla 蛋白(MGP)基因敲除的 RAW264.7 巨噬细胞系, 明确 MGP 基因在破骨细胞分化过程中的作用。方法 利用在线软件分析并筛选出 3 个针对 MGP 基因外显子区的单链向导 RNA(gRNA), 人工合成 gRNA 寡核苷酸序列, 并将其插入线性化的 LentiCRISPRv2 质粒中, 构建成 LentiCRISPRv2-MGP-gRNA 重组质粒。将重组质粒与 psPAX2、VSVG 包装质粒一同转染 293-T 细胞, 包装并收集重组慢病毒, 将其感染 RAW264.7 细胞。经嘌呤霉素筛选得到稳定 RAW264.7 细胞系, 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(qPCR)、蛋白质印迹法(Western Blot)验证 MGP mRNA 及蛋白表达水平。qPCR 检测破骨细胞分化标志分子的表达情况。结果 成功构建了 LentiCRISPRv2-MGP-gRNA 重组质粒, 成功包装了含有 MGP-gRNA 的重组慢病毒, 筛选得到了稳定低表达 MGP 的 RAW264.7 细胞系。qPCR 及蛋白质印迹法检测显示, 其 MGP mRNA、蛋白表达显著性下调($P < 0.05$)。qPCR 结果显示, 最具有代表性的 LentiCRISPRv2-MGP-gRNA1 细胞破骨标志分子 Itgb3 (2.29 ± 0.17)、Acp5 (2.86 ± 0.15)、Ctsk (2.07 ± 0.13) 的 mRNA 水平均显著上调($P < 0.05$)。结论 利用 CRISPR/Cas 9 基因编辑技术成功构建了 MGP 基因敲除的 RAW264.7 细胞系, 敲除 MGP 后 RAW264.7 细胞破骨分化能力增强。

关键词: 基因敲除技术; 骨钙素; 破骨细胞; 转染; CRISPR/Cas 9; RAW264.7 细胞(小鼠单核巨噬细胞白血病细胞)

The effect of CRISPR/Cas 9-mediated MGP knockout on osteoclast differentiation

ZHAO Liting¹, WANG Naining², HE Fang¹, ZHANG Yan¹

Author Affiliations: ¹Center for Translational Medicine, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; ²School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Abstract: Objective To construct matrix Gla protein (MGP) knockout RAW264.7 cell line by CRISPR/Cas 9 technology and to make clear the role of MGP in osteoclast differentiation. **Methods** Three single-stranded guide RNAs (gRNAs) targeting MGP gene exons were screened using the online tool before synthesized gRNAs were inserted into the linear LentiCRISPRv2 plasmid respectively, and the LentiCRISPRv2-MGP-gRNA recombinant plasmids were constructed. Then the recombinant plasmids, together

with psPAX2 and VSVG packaging plasmids, were transfected into 293-T cells. The lentivirus was packaged, collected and recombined to infect RAW264.7 cells. Stable RAW264.7 cell lines were screened by puromycin. The mRNA and protein levels of MGP were detected by real-time fluorescent quantitative polynucleotide chain reaction (qPCR) and Western Blot. The markers of osteoclast differentiation were examined by qPCR. **Results** LentiCRISPRv2-MGP-gRNA plasmids were successfully constructed, and the recombinant lentivirus were successfully packaged. Stable MGP-deficient RAW264.7 cells were screened. qPCR and Western Blot results revealed that the expressions of MGP mRNA and protein were significantly down-regulated ($P < 0.05$). qPCR results showed that the mRNA levels of the most representative osteoclastic markers *Itgb3* (2.29 ± 0.17), *Acp5* (2.86 ± 0.15), *Ctsk* (2.07 ± 0.13) in LentiCRISPRv2-MGP-gRNA1 were significantly up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** The stable MGP knockout RAW264.7 cell line were successfully constructed by CRISPR/Cas 9 technology. Osteoclast differentiation of RAW264.7 cells was accelerated after MGP knockout.

Key words: Gene knockout techniques; Osteocalcin; Osteoclasts; Transfection; CRISPR/Cas 9; RAW264.7 cells (Leukemia cells in mouse mononuclear macrophage)

CRISPR/Cas 9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-Associated Proteins) 系统是从原核生物中发现的一种防御外源性遗传物质入侵的自身免疫机制^[1-2], 能够识别自身和外源入侵 DNA 片段。它具有简单、方便、高效等特点^[3-4], 这种新型基因组靶向修饰技术已被广泛应用^[5-8]。通过人工设计 tracrRNA/cRNA 复合体, 形成单链向导 RNA (guide RNA, gRNA), 使 Cas 9 蛋白对特定的 DNA 序列进行靶向切割^[4]。随后 DNA 通过非同源性末端接合或同源性重组, 对断裂的 DNA 进行修复, 发生替换、移码或缺失突变, 达到基因敲除的目的^[9-11]。

基质 Gla 蛋白 (matrix Gla protein, MGP), 是最初从牛骨骼中分离出的分子量为 14 kD 的维生素 K 依赖性循环蛋白^[12]。MGP 广泛存在于骨^[13]、软骨^[14]、牙质^[15]等组织中, 是调节骨形成和软组织钙化的重要基质蛋白^[16]。MGP 基因敲除小鼠出生后由于大动脉硬化破裂于 6~8 周内死亡^[17-18]。MGP 基因敲除小鼠还表现为软骨内骨化缺陷, 尤其是生长板软骨, 导致体型短小、骨量减少, 提示 MGP 对成骨细胞分化有一定作用^[19]。但迄今为止, 尚未见到 MGP 对破骨细胞分化产生作用的报道。本研究于 2018 年 5 月至 2019 年 1 月利用 CRISPR/Cas 9 技术构建了 MGP 基因敲除的 RAW264.7 巨噬细胞系, 为研究 MGP 在破骨细胞的功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 RAW264.7 细胞系 (购于中国科学院细胞库) 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 α -MEM 培养基进行培养, 293-T 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基进行培养, 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳, 每隔 2 d 传代 1 次。

1.1.2 试剂 质粒提取试剂盒购于北京 TIANGEN 公司 (批号 Q5517)、DNA 纯化试剂盒购于北京

TIANGEN 公司 (批号 R6308)、限制性内切酶 BsmBI 购于美国 NEB 公司 (批号 201805028)、T4 连接酶购于西安海宁生物有限公司 (批号 AH70102A)、 α -MEM 培养基、DMEM 培养基购于美国 Hyclone 公司、FBS 购于美国 GIBCO 公司 (批号 42F9081K-2023-1)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 购于美国 Pepro Tech 公司 (批号 AF-315-03)、核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 购于美国 Pepro Tech 公司 (批号 315-11C)、Lipofectamine2000 转染试剂购于美国 Thermo Fisher 公司 (批号 11668027)。

1.2 方法

1.2.1 gRNA 设计和寡核苷酸链合成 利用 MIT 在线软件设计针对小鼠 MGP 基因的 gRNA, 在靶序列正义链的 5' 端添加 $\neg$ CACCG, 反义链的 5' 端添加 AAAC, 3' 端添加 C。

1.2.2 gRNA 表达载体构建 使用 BsmBI 限制性内切酶线性化质粒 LentiCRISPRv2, 酶切体系为: BsmBI 1 μL , LentiCRISPRv2 5 μg , 10 $\times$ buffer 5 μL , 补水至 50 μL , 55 $^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜。1% 琼脂糖凝胶电泳对酶切质粒进行分离, 利用 DNA 纯化试剂盒回收需要的片段。gRNA 寡核苷酸单链退火形成双链, 退火反应体系为: gRNA Up (100 μM) 1 μL , gRNA Down (100 μM) 1 μL , 10 $\times$ Buffer 1 μL , 补水至 10 μL 。95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min 后自然冷却至室温。将退火产物与线性化 LentiCRISPRv2 质粒连接, 连接反应体系为: 线性化 LentiCRISPRv2 质粒 200 ng, 稀释 10 倍的退火产物 2 μL , 10 $\times$ Buffer 1 μL , T4 连接酶 1 μL , 补水至 10 μL , 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h。将连接产物转化至感受态细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑取阳性克隆, 摇菌, 次日送公司测序鉴定。将含有正确序列的菌液保种, 提取质粒备用。

1.2.3 包装重组慢病毒 293-T 细胞接种于 6 孔板中, 次日当达到 70% 密度时, 利用 Lipofectamine2000

转染试剂,分别将 800 ng LentiCRISPRv2-MGP-gRNA1,2,3,ctrl 与 600 ng psPAX2 质粒、200 ng VS-VG 质粒一同转染入 293-T 细胞中。8 h 后换新鲜培养基。再过 24 h 后收集病毒上清备用。

1.2.4 感染 RAW264.7 细胞及筛选稳定细胞株 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中,次日当达到 50% 密度时,加入含有 50% 病毒、8 $\mu\text{g/mL}$ 聚凝胺(polybrene)的新鲜培养基进行感染。24 h 后换含有 1 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的新鲜培养基进行筛选(感染成功的 RAW264.7 细胞具有嘌呤霉素抗性),3 d 后收取细胞扩大培养。

1.2.5 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(qPCR) 检测 MGP 基因敲除效率 提取细胞总 RNA,取 1 μg 进行反转录,cDNA 稀释 10 倍后使用 TaKaRa 实时荧光定量试剂盒,进行 qPCR,反应体系为:2 $\times$ mix 10 μL 、正/反向引物(10 μM) 0.5 μL 、cDNA 模板 5 μL ,补水至 20 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s,40 个循环。使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因为内参,2 $^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行数据分析。

1.2.6 蛋白质印迹法(Western Blot)检测 MGP 基因敲除效率 收集细胞,用 RIPA 细胞裂解液提取蛋白,BCA 法进行蛋白定量。取 20 μg 蛋白进行凝胶电泳,转膜后用脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗(1:1 000)孵育 1 h,随后曝光分析灰度值。

1.2.7 qPCR 检测破骨细胞分化标志分子的表达情况 对不同细胞克隆用破骨细胞诱导液(含有 30 ng/mL M-CSF、100 ng/mL RANKL 的 10%FBS α -MEM 完全培养基)进行诱导分化培养,每 2 天换液 1 次,5 d 后待细胞出现明显的破骨细胞形态特征(多核、巨大),收集细胞,提取总 RNA,具体操作见 1.2.5 所述,检测破骨分化标志分子 Itgb3、Acp5、Ctsk 的 mRNA 水平。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LentiCRISPRv2-MGP-gRNA 重组质粒的构建与鉴定 根据小鼠 MGP 基因序列,利用网站评分选择 3 种 gRNA,合成的序列如下。gRNA1:5'-CACCGTTGCCACGGCCAGCGCAGCC-3',5'-AAACGGCTGCGCTGGCCGTGGCAAC-3';gRNA2:5'-CACCGAAAGAGGTACTGGAACCTCGA-3',5'-AAACTCGAGTTCCAGTACCTCTTTC-3';gRNA3:5'-CACCGGCTGTGTGAGCGCTACGCCA-3',5'-AAACTGGCGTAGCGCTCACACAGCC-3';对照序列:5'-CACCGCGCTTCCGCGGCCCCGTTCAA-3',5'-AAACTTGAACGGGCCGCGGAAGCGC-3'。将上述寡核苷酸退火后与 LentiCRISPRv2 质粒连接,构建成 LentiCRISPRv2-MGP-gRNA 重组质粒,测序鉴定结果如图 1 所示,表明重组质粒构建成功。

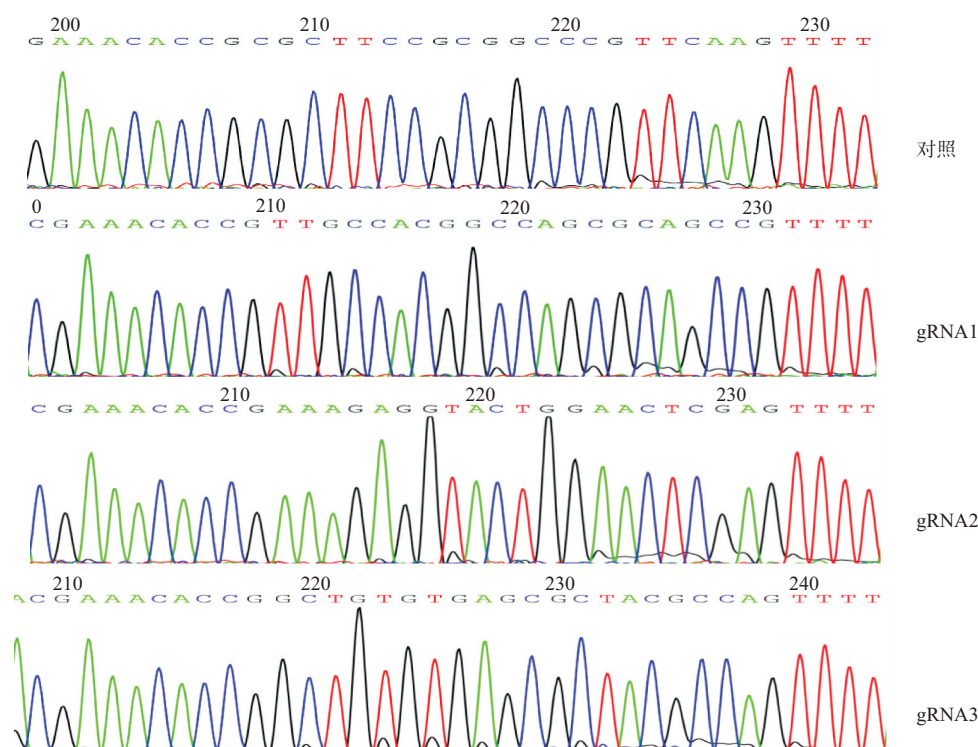


图1 LentiCRISPRv2-MGP-gRNA重组质粒测序鉴定结果

2.2 MGP基因敲除效果鉴定

2.2.1 MGP基因敲除效果qPCR鉴定 包装重组慢病毒并感染RAW264.7细胞,筛选后得到稳定MGP基因敲除细胞克隆,qPCR验证敲除效率。如图2所示,以ctrl组作为对照,LentiCRISPRv2-MGP-gRNA1细胞的MGP表达水平为对照细胞的 $(18 \pm 4)\%$,敲除了82%,其敲除效率最佳;LentiCRISPRv2-MGP-gRNA2细胞的MGP表达水平为对照细胞的 $(36 \pm 10)\%$,敲除效率为64%;LentiCRISPRv2-MGP-gRNA3细胞的MGP表达水平为对照细胞的 $(26 \pm 7)\%$,敲除效率为74%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

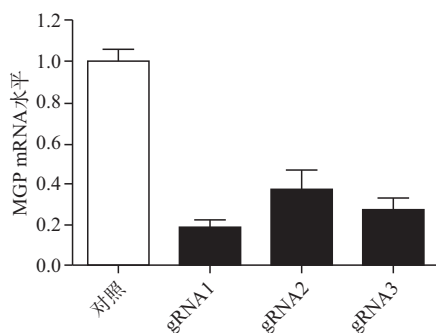


图2 不同RAW264.7细胞克隆MGP的mRNA水平

2.2.2 MGP基因敲除效果蛋白质印迹法鉴定 利用蛋白质印迹法检测MGP蛋白表达情况,验证不同gRNA敲除效果。如图3显示,以β-肌动蛋白(β-actin)为内参,与对照细胞(ctrl)相比,LentiCRISPRv2-MGP-gRNA1、2、3细胞克隆的MGP蛋白水平均明显降低,MGP基因表达被有效地人为干预。

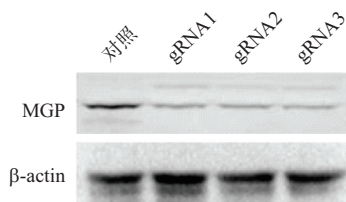


图3 不同RAW264.7细胞克隆MGP的蛋白水平

2.2.3 MGP基因敲除后对破骨细胞分化的影响 对不同细胞克隆用含30 ng/mL M-CSF、100 ng/mL RANKL的10%FBS α-MEM培养基进行诱导分化,

每2天换液1次,5 d后收集细胞,提取总RNA,反转录成cDNA,qPCR检测破骨细胞分化标志分子Itgb3、Acp5、Ctsk的mRNA水平。结果如图4所示,3种敲除MGP的不同细胞克隆经诱导分化后,与对照细胞(ctrl) [(1.10 ± 0.11) 、 (1.02 ± 0.09) 、 (1.12 ± 0.04)]相比,LentiCRISPRv2-MGP-gRNA1细胞的破骨标志分子Itgb3、Acp5、Ctsk mRNA水平分别为 (2.29 ± 0.17) 、 (2.86 ± 0.15) 、 (2.07 ± 0.13) ,均显著增加($P < 0.05$);LentiCRISPRv2-MGP-gRNA2、LentiCRISPRv2-MGP-gRNA3细胞的破骨标志分子的mRNA水平也均显著增高 [(1.79 ± 0.12) 、 (1.75 ± 0.17) 、 (1.69 ± 0.09)]; (1.62 ± 0.19) 、 (2.21 ± 0.13) 、 (1.91 ± 0.15) , $P < 0.05$]。以上结果提示敲除MGP后破骨细胞分化加速,表明MGP抑制破骨细胞分化。

3 讨论

CRISPR/Cas 9是一种在基因组水平上由RNA指导Cas 9蛋白选择性编辑目的基因的方法。由于操作简单、耗时少,应用日益广泛^[1-4]。在基因敲除、调控基因的表达水平、疾病的基因编辑治疗等方面发挥重要作用。相较于其他基因编辑技术,CRISPR中Cas 9蛋白具有不需要形成二聚体来发挥作用,可通过构建多个gRNA实现多重编辑并同时沉默任意数量的单个基因等优势。

本实验利用CRISPR/Cas 9技术,在gRNA介导下使含有核酸酶、解旋酶等生物活性的Cas 9酶对MGP基因外显子特定的DNA序列进行特异性切割,通过非同源性末端接合或同源性重组,在细胞DNA修复作用下,达到敲除基因的目的^[9-11]。本研究利用CRISPR/Cas 9技术将RAW264.7细胞中的MGP基因表达水平敲低82%,该稳定RAW264.7细胞系可用于进一步研究MGP功能。

MGP广泛存在于软骨、骨髓、动脉壁等组织中,是一种由84个氨基酸组成的维生素K依赖蛋白,调节骨形成和软组织钙化^[20]。在骨骼中MGP参与了骨钙化调节^[12]。有研究证实MGP是血管和软组织钙化的抑制剂,在血管钙化病变中MGP调节成骨

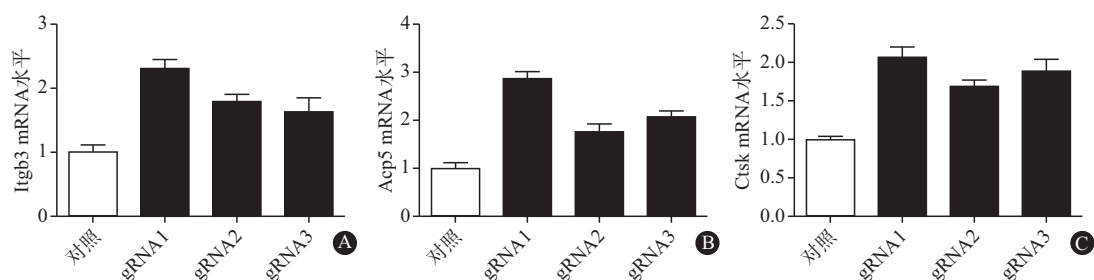


图4 不同RAW264.7细胞克隆破骨分化标志分子的mRNA水平:A为Itgb3,B为Acp5,C为Ctsk

细胞和软骨细胞的分化^[17-18]。MGP可抑制核因子- κ B(NF- κ B)活性,可能通过抑制RANKL促进成骨细胞分泌骨保护素OPG,促进成骨细胞存活^[19]。以上研究揭示了MGP在成骨细胞、软骨细胞中的作用,而MGP是否参与了破骨细胞分化成熟尚未见报道。

本实验通过CRISPR/Cas 9技术,建立了稳定低表达MGP的RAW264.7细胞系,利用蛋白质印迹法、qPCR对其MGP表达情况进行鉴定。相比于对照组,MGP基因的表达均明显降低。进一步对不同细胞克隆进行破骨诱导分化,并通过qPCR检测其破骨标志分子表达量,结果显示稳定低表达MGP的细胞克隆,其破骨标志分子的表达水平增高,证实MGP可抑制破骨细胞分化。但MGP参与破骨细胞分化的机制还有待深入研究,我们推测,MGP作为一种胞外基质蛋白,可能通过结合某些蛋白抑制破骨细胞分化。这需要更多的实验证据,将是我们近期工作的主要方向。

参考文献

- [1] DRIEHUIS E, CLEVERS H. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(3): G257-G265.
- [2] 余深翼, 赵金荣, 郑玲红, 等. 利用CRISPR/Cas 9技术构建大肠杆菌aroA基因的敲除系统及其初步应用 [J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(4): 762-770.
- [3] KOO T, KIM JS. Therapeutic applications of CRISPR RNA-guided genome editing [J]. *Briefings in Functional Genomics*, 2017, 16(1): 38-45.
- [4] GUPTA RM, MUSUNURU K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9 [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(10): 4154-4161.
- [5] MA Y, CHEN W, ZHANG X, et al. Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing in rats by inhibiting NHEJ and using Cas9 protein [J]. *RNA Biology*, 2016, 13(7): 605-612.
- [6] MA Y, ZHANG X, SHEN B, et al. Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9 [J]. *Cell Research*, 2014, 24(1): 122-125.
- [7] NIU Y, SHEN B, CUI Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos [J]. *Cell*, 2014, 156(4): 836-843.
- [8] ZHANG H, ZHANG J, WEI P, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(6): 797-807.
- [9] FARBOUD B, MEYER BJ. Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design [J]. *Genetics*, 2015, 199(4): 959-971.
- [10] JIANG F, DOUDNA JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms [J]. *Annual Review of Biophysics*, 2017, 46: 505-529.
- [11] ZHANG F, WEN Y, GUO X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges [J]. *Human Molecular Genetics*, 2014, 23(R1): R40-R46.
- [12] AHMAD S, JAN AT, BAIG MH, et al. Matrix Gla protein: An extracellular matrix protein regulates myostatin expression in the muscle developmental program [J]. *Life Sciences*, 2017, 172: 55-63.
- [13] HOUBEN E, NERADOVA A, SCHURGERS LJ, et al. The influence of phosphate, calcium and magnesium on matrix Gla-protein and vascular calcification: a systematic review [J]. *G Ital Nefrol*, 2016, 33(6): pii: gin/33.6.5. PMID: 28134400.
- [14] MYNENI VD, MEZEY E. Regulation of bone remodeling by vitamin K2 [J]. *Oral Diseases*, 2017, 23(8): 1021-1028.
- [15] MALHOTRA R, BURKE MF, MARTYN T, et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signal transduction prevents the medial vascular calcification associated with matrix Gla protein deficiency [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0117098. DOI: 10.1371/journal.pone.0117098.
- [16] YU JL, ADISETIYO H, LITTLE GH, et al. Initial characterization of osteoblast differentiation and loss of RUNX2 stability in the newly established SK11 human embryonic stem cell-derived cell line [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2015, 230(2): 237-241.
- [17] CAVACO S, VIEGAS CS, RAFAEL MS, et al. Gla-rich protein is involved in the cross-talk between calcification and inflammation in osteoarthritis [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(5): 1051-1065.
- [18] 梅艳洁, 陈逸青, 章秋. 绝经后骨质疏松症与动脉钙化相关性的研究进展 [J]. *安徽医药*, 2014, 18(4): 593-596.
- [19] KROSSØY C, ORNSRUD R, WARGELIUS A. Differential gene expression of BGP and MGP in trabecular and compact bone of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vertebrae [J]. *Journal of Anatomy*, 2009, 215(6): 663-672.
- [20] 常文静, 张蓓蓓, 蔡辉. 类风湿关节炎与心血管疾病风险 [J]. *安徽医药*, 2017, 21(4): 595-600.

(收稿日期: 2019-01-07, 修回日期: 2019-03-07)