

RUNX2/LAPTM5在小鼠颅骨前成骨细胞矿化诱导中的表达

邢磊¹, 耿远明², 李文昊³, 林丽佳³, 徐平平³

¹广州医科大学附属口腔医院种植科//广州市口腔再生医学基础与应用研究重点实验室, 广东 广州 510182;

²南方医科大学珠江医院口腔科, 广东 广州 510282; ³南方医科大学口腔医院, 广东 广州 510280

摘要:目的 探讨RUNX2/LAPTM5在矿化诱导过程中的表达与成骨及溶酶体的相关性。方法 矿化诱导MC3T3-E1, 对照组不做处理, 茜素红染色检测矿化情况, 碱性磷酸酶染色检测成骨分化情况。RT-qPCR及Western blot检测分化0-5 d RUNX2及LAPTM5的基因及蛋白表达。过表达与干扰RUNX2/LAPTM5的表达后, Western blot检测RUNX2、LAPTM5的表达。过表达与干扰LAPTM5的表达后, Western blot检测成骨相关基因碱性磷酸酶、骨钙素的表达。结果 倒置显微镜下观察, 茜素红染色矿化结节计数随时间变化逐渐增多, 矿化结节的大小也逐渐变大; 碱性磷酸酶染色蓝紫色颗粒计数随时间逐渐增加。RT-qPCR及Western blot结果显示RUNX2及LAPTM5的表达, 其在成骨矿化过程中呈上升趋势($P<0.001$)。过表达与干扰RUNX2影响LAPTM5表达($P<0.05$); 过表达与干扰LAPTM5对RUNX2的影响不显著。过表达与干扰LAPTM5影响了成骨的表达($P<0.01$)。结论 RUNX2/LAPTM5可能参与了成骨细胞分化调节, RUNX2可能参与LAPTM5的表达调控。RUNX2/LAPTM5可能在溶酶体参与成骨矿化的过程中起到桥梁作用。

关键词: RUNX2; LAPTM5; 成骨; 溶酶体

Expression of RUNX2/LAPTM5 in MC3T3-E1 osteoblastic cells with induced mineralization

XING Lei¹, GENG Yuanming², LI Wenhao³, LIN Lijia³, XU Pingping³

¹Department of Oral Implantology, Affiliated Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Key Laboratory of Basic and Applied Research in Oral Regenerative Medicine, Guangzhou 510182, China; ²Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; ³Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Abstract: Objective To investigate the association of the expressions of RUNX2/LAPTM5 with osteogenesis and lysosomes in osteoblastic cells during mineralization induction. **Methods** MC3T3-E1 cells cultured in osteogenic induction medium was examined for mineralization and osteogenic differentiation using Alizarin red staining and alkaline phosphatase (ALP) staining, respectively. RT-qPCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expressions of Runx2 and LAPTM5 in the cells during osteogenic induction for 5 days. The effects of overexpression and interference of RUNX2/LAPTM5 on the expressions of ALP and osteocalcin (OCN) in the cells were examined with Western blotting. **Results** MC3T3-E1 cells cultured in osteogenic induction medium showed an increased number of mineralized nodules over time, and the size of the mineralized nodules increased as the culture time extended; the number of purple-blue granules stained by ALP also increased gradually with time. RT-qPCR and Western blotting showed that the expressions of RUNX2 and LAPTM5 in the cells increased progressively during osteogenic mineralization ($P<0.001$). Overexpression and interference of RUNX2 obviously affected LAPTM5 expression in the cells ($P<0.05$); modulation of LAPTM5 expression did not significantly affect RUNX2 expression but caused significant changes in ALP and OCN expressions ($P<0.01$). **Conclusion** RUNX2/LAPTM5 may participate in the regulation of osteoblast differentiation, and RUNX2 may be involved in the regulation of LAPTM5 expression. RUNX2/LAPTM5 may play a mediating role in the process of osteogenic mineralization involving lysosomes.

Keywords: RUNX2; LAPTM5; osteogenesis; lysosomes

LAPTM5 (lysosomal protein transmembrane 5) 参与调节胞吞胞吐作用, 是溶酶体中的重要蛋白^[1-4]。它介导细胞蛋白的吸收和降解^[5, 6], 并通过与泛素连接酶 Nedd4 结合后, 参与到溶酶体的蛋白质运输^[7, 8]。

Runt 相关的转录因子 2 (RUNX2) 是成骨过程中最关键的主转录因子之一^[9-12], 可以调节成骨细胞的分化^[13, 14]。本课题组的前期研究证明, RUNX2 可以反式激活 LAPTM5^[15]。

溶酶体是细胞内降解的必需细胞器, 它与含有胶原蛋白的囊泡被共定位到一起, 在抗坏血酸 (AA) 诱导的成骨细胞分化过程中, 抑制其扩散可以减轻细胞的成骨分化程度^[16]。但该过程的内在分子机制尚不清楚。

牙齿矿化过程中, 磷酸钙晶体由细胞的外囊泡 (EV) 转运, 在纤维状细胞外基质 (ECM) 中逐渐沉积, 溶酶体蛋白 Lamp1 和 Lamp2a 在矿化细胞的 EV 中高表达, 提示溶酶体可能在细胞矿化过程中发挥作用^[17]。

LAPTM5 是否也在细胞矿化过程中发挥作用? RUNX2 是否通过 LAPTM5 使溶酶体加速 EV 的产生, 从而将胞内的磷酸钙盐排出从而完成矿化, 促进成骨分化, 这些问题尚未见研究。本研究采用茜素红染色、碱性磷酸酶染色、RT-qPCR 以及 Western blot 等方法分析 RUNX2 如何通过调控 LAPTM5 的表达影响成骨分化。

收稿日期: 2021-03-14

基金项目: 国家自然科学基金 (81271187); 广东省科技计划项目 (2017A020215050)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81271187).

作者简介: 邢磊, 在读硕士研究生, E-mail: 565461452@qq.com

通信作者: 徐平平, 博士生导师, 医学博士, 主任医师, E-mail: gdsqyqykj@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠颅骨前成骨细胞亚克隆 14 (MC3T3-E1 Subclone 14), 小鼠 MC3T3-E1 细胞成骨诱导分化培养基, 改良型 MEM 培养基 (α -MEM), 胎牛血清 (FBS), 青霉素链霉素, 磷酸盐缓冲液 PBS, 胰酶, 曲拉通 Triton X-100, BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶 (ALP) 显色, 茜素红钙染色试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司), 逆转录试剂盒 (Takara), CO₂ 恒温孵育箱 (Sanyo), 核酸蛋白定量检测仪以及高速离心机 (Eppendorf), 实时荧光定量 PCR 系统 (Applied Biosystem)。载体 Laptm5-over、Laptm-sh、RUNX2-over、RUNX2-sh (广州市双全生物科技有限公司)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞接种于含 1% 抗生素和 10% 胎牛血清 (完全培养基) 的 α -MEM 培养瓶中, 每 2 d 更换 1 次培养液。当细胞达到 90% 融合时, 即可传代。

1.2.2 成骨分化诱导培养 取生长状态良好的第 3 代 MC3T3-E1 以每孔 1×10^5 细胞接种于 6 孔培养板, 待细胞贴壁后更换为含不同剂量 Cyagen 细胞成骨诱导分化培养基, 每 2 d 换液 1 次。分为对照组 (基础培养基)、成骨诱导剂组 (基础培养基 + 100 nmol/L 地塞米松 + 10 mmol/L β -甘油磷酸钠 + 50 mg/抗坏血酸)

1.2.3 茜素红染色分析 将细胞 (1×10^5 细胞/mL) 接种在 6 cm 培养皿中并矿化诱导 0、7、14、21 d。除去培养基后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。在室温下, 使用 0.05% 戊二醛的水溶液固定细胞 30 min, 并用 PBS 洗涤 3 次。在室温下, 用茜素红 S 溶液 (0.4%; 北京阳光生物科技有限公司) 对细胞染色 5 min。用 PBS 洗涤后, 用光学显微镜 ($\times 200$; olympus) 捕获细胞图像。

1.2.4 碱性磷酸酶染色分析 将细胞 (1×10^5 细胞/mL) 接种在 6 cm 培养皿中, 并矿化诱导 0、3、7、14 d。除去培养基后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。在室温下, 使用 0.05% 戊二醛的 H₂O 溶液固定细胞 10 min, 并用 PBS 洗涤 3 次。用 BCIP/NBT 法对细胞进行碱性磷酸酶染色, 弃去培养板里的培养液, PBS 洗涤细胞表面, 向每孔内加入固定液固定 2 min 后, 加入染色液在室温下避光孵育 30 min, PBS 清洗 2 min, 观察并拍照, 肉眼可见蓝紫色颗粒沉淀即代表成骨细胞发生分化。

1.2.5 逆转录定量 PCR (RT-qPCR) 将细胞 (1×10^5 细胞/mL) 接种于 6 孔板中, 在完全培养基中培养至 90% 融合, 24 h 后向实验组加入矿化诱导液, 然后分别矿化诱导 1、2、3、4、5 d, 对照组不做处理。采用 Trizol 试剂盒在各组细胞中提取总 RNA, 并根据 Takara 公司的逆转录试剂盒说明书, 进行逆转录反应以合成各组 cDNA。再以各组的 cDNA 为模板, GAPDH 为内参, 采用 Takara 荧光定量 PCR 试剂盒检测各组细胞 RUNX2、LAPTM5

的表达水平。本实验所用 PCR 引物序列均由广州市双全生物科技有限公司设计合成 (表 1)。实验重复 3 次。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer Sequences

Gene	Primer Sequences
RUNX2	Forward: 5'-GCCGGGAATGATGAGA ACTA-3' Reverse: 5'-GGTGAAACTCTTGCTCCTGTC-3'
LAPTM5	Forward: 5'-CGTACCTCAGGATGGCTGAC-3' Reverse: 5'-CAAGCTTCAAGTACGCTGGC-3'
GAPDH	Forward: 5'-CATCCCAGAGCTGAACC-3' Reverse: 5'-CTGGTCCTCAGTGTAGCC-3'

1.2.6 Western blot 取生长状态良好的第 3 代 MC3T3-E1 成骨细胞接种于 6 cm 培养皿中, 在完全 α -MEM 中培养至 90% 融合, 实验组加入矿化诱导液, 分别诱导 1、2、3、4、5 d, 对照组加入完全 α -MEM 培养液, 每组 3 个复孔。按 PMSF:RIPA=1:100 比例配置裂解液裂解各组细胞, 收集, 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 转离心取上清液, BCA 蛋白测定试剂盒测定各样品蛋白浓度后蛋白变性。采用 SDS-PAGE 完成蛋白质电泳分离蛋白, 用湿法转膜转印至 PVDF 膜上, 在室温下封闭 1 h, 加一抗 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 用 TBST 洗膜, 加二抗室温孵育 1 h, 再次 TBST 洗膜, 用 ECL 发光试剂显色, 转至暗室中压片, 洗片, 晾干, 用扫描仪扫描图像, 计算机中进行灰度分析, 以检测各组细胞 RUNX2、LAPTM5、ALP、骨钙素 (OCN) 表达水平。

1.2.7 细胞转染 将 MC3T3-E1 传代于 6 孔板上, 细胞融合达到 50%~70% 开始转染 siRNAs, 转染前更换为无双抗的完全培养基, 用 PBS 液分别将 Laptm5-over、Laptm-sh、RUNX2-over、RUNX2-sh (表 2) 稀释, 再分别按 MOI 为 10、100、200 进行转染, 以未进行病毒转染 (NC) 的细胞 (MOI=0) 作为空白对照组, 各设 2 个复孔。转染后每天观察细胞形态, 于转染后 72 h 后在倒置荧光显微镜下观察到绿色荧光, 即转染成功。

1.3 统计学方法

定量资料以均数 \pm 标准差表示。采用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 茜素红染色结果。

各组细胞矿化钙结节形成情况和细胞矿化活性成骨诱导第 21 天除对照组无矿化结节出现外, 其余各组均可见桔红色矿化结节; 与对照组比较, 矿化诱导组钙结节数量明显增多、着色面积明显增大且着色程度明显增强。7、14 和 21 d 组与对照组比较, 各时间点组细胞矿化活性均明显升高 (图 1), 随时间推移, 矿化的表达一直处于上升趋势。

表2 慢病毒载体信息

Tab.2 Lentiviral vector information

Carrier information	Carrier name			
	Objective sequence	Carrier	Helper plasmid	Virus type
Laptm5-over	NM_010686.4	pCDH-CMV-EF1-copGFP-T2A-Puro	PMD2G、PSPAX2	Lentivirus
Laptm-sh	AAGTGCCACCTATCTC AACTTCAA	pLKO.1-U6-EF1a-copGFP-T2A-puro	PMD2G、PSPAX2	Lentivirus
RUNX2-over	NM_001146038.2	pCDH-CMV-EF1-copGFP-T2A-Puro	PMD2G、PSPAX2	Lentivirus
RUNX2-sh	CAGCACTCCATATCTCT ACTA	pLKO.1-U6-EF1a-copGFP-T2A-puro	PMD2G、PSPAX2	Lentivirus

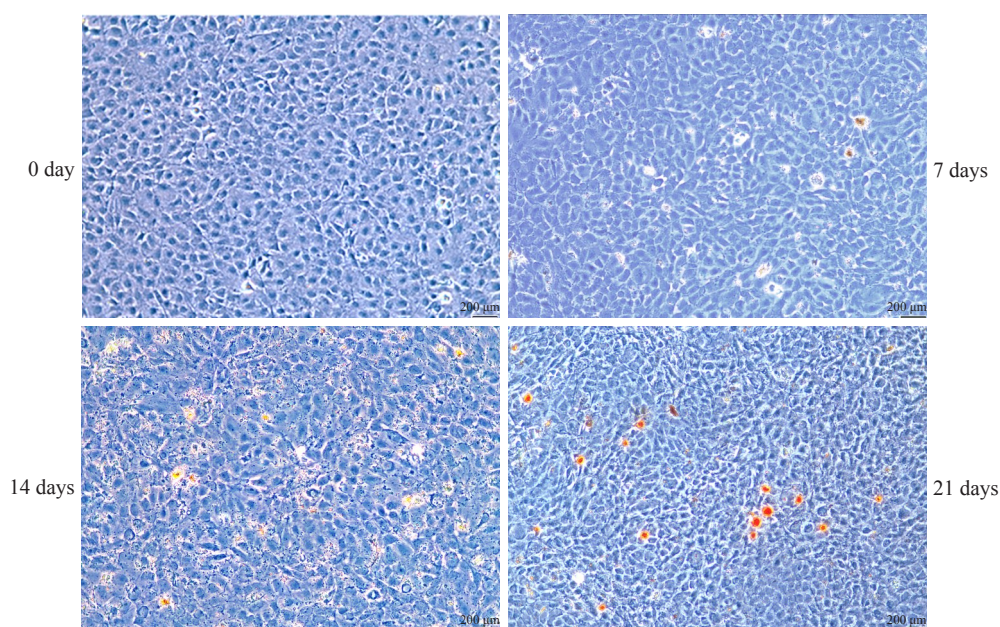


图1 矿化诱导0、7、14、21 d后,茜素红染色检测成骨矿化

Fig.1 Mineralization of the cells detected by Alizarin red staining at 0, 7, 14 and 21 days of osteogenic induction (Original magnification: ×50).

2.2 碱性磷酸酶染色

除对照组出现较微弱的蓝紫色颗粒之外,其余各组均有明显变化,且各时间点诱导组细胞中蓝紫色颗粒明显多于未诱导对照组。诱导第3、7、14天,与对照组比较,各时间点组细胞矿化活性均明显升高(图2),ALP活性具有时间依赖性,随着时间推移,呈上升趋势。

2.3 逆转录定量PCR(RT-qPCR)

成骨诱导第1、2、3、4、5天,与对照组比较,矿化诱导组细胞中RUNX2/LAPTM5的mRNA表达水平明显升高($P < 0.001$,图3A、B)。RUNX2/LAPTM5在成骨细胞矿化诱导过程中,整体随时间呈上升表达趋势,与成骨细胞的表达呈正相关趋势。

2.4 Western blot

成骨诱导第1、2、3、4、5天,与对照组比较,矿化诱导组细胞中RUNX2/LAPTM5的mRNA表达水平升高($P < 0.001$,图4)中,整体随时间呈上升表达趋势。

2.5 过表达及干扰RUNX2/LAPTM5

在分别过表达及干扰RUNX2/LAPTM5后,Western blot检测RUNX2/LAPTM5的蛋白表达,结果如下:

转染over-RUNX2组:RUNX2过表达后,LAPTM5较NC组表达上升($P = 0.004$,图5B);转染sh-RUNX2组;RUNX2干扰后,LAPTM5较NC组表达降低($P = 0.03$ 图5B)。转染over-LAPTM5:LAPTM5过表达后,RUNX2较NC组表达变化不明显(图5C);转染sh-LAPTM5组:LAPTM5干扰后,RUNX2较NC组表达变化不明显(图5C)。

2.6 过表达及干扰LAPTM5,检测成骨的表达

在过表达及干扰LAPTM5后,Western blot检测ALP、OCN的蛋白表达,结果如下:

转染over-LAPTM5:LAPTM5过表达后,ALP、OCN较NC组表达变化表达上升($P < 0.001$, $P = 0.005$,图6);转染sh-LAPTM5组:LAPTM5干扰后,ALP、OCN较NC组表达变化下降($P < 0.001$, $P < 0.001$,图6)。

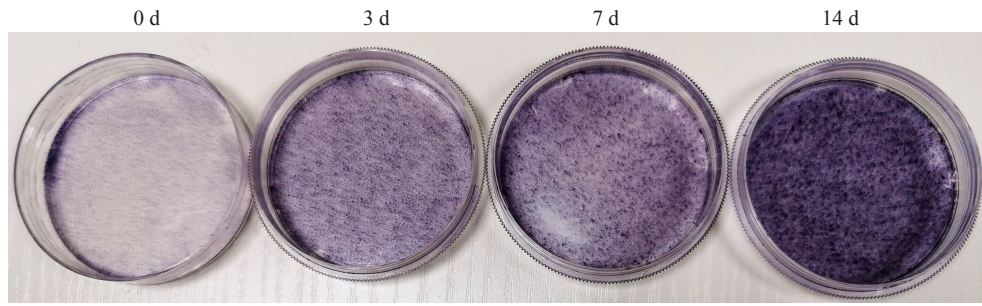


图2 矿化诱导0、3、7、14 d后,碱性磷酸酶染色检测成骨分化

Fig.2 Osteogenic differentiation of the cells detected by alkaline phosphatase staining at 0, 3, 7 and 14 days after induction.

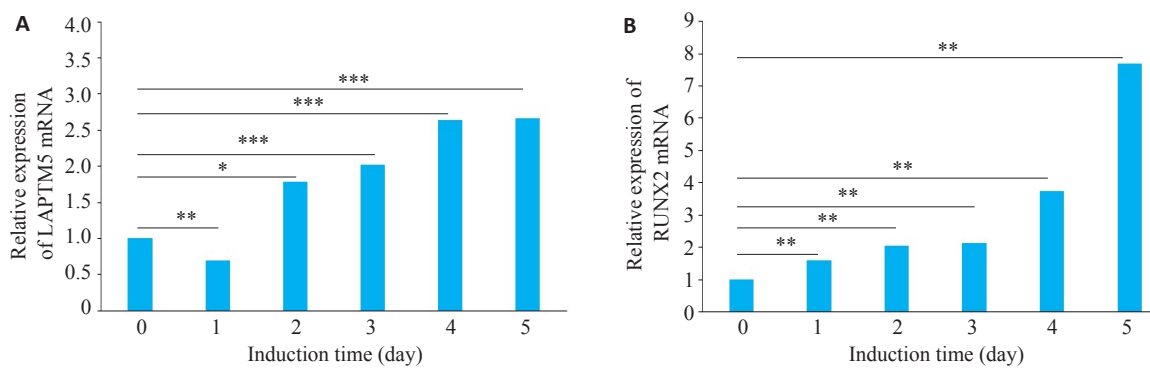


图3 矿化诱导0-5 d后,RT-qPCR 检测RUNX2/LAPTm5的转录水平

Fig.3 Transcriptional levels of Runx2 (A) and LAPTm5 (B) detected by RT-qPCR in MC3T3-E1 cells in the course of osteogenic induction for 5 days. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

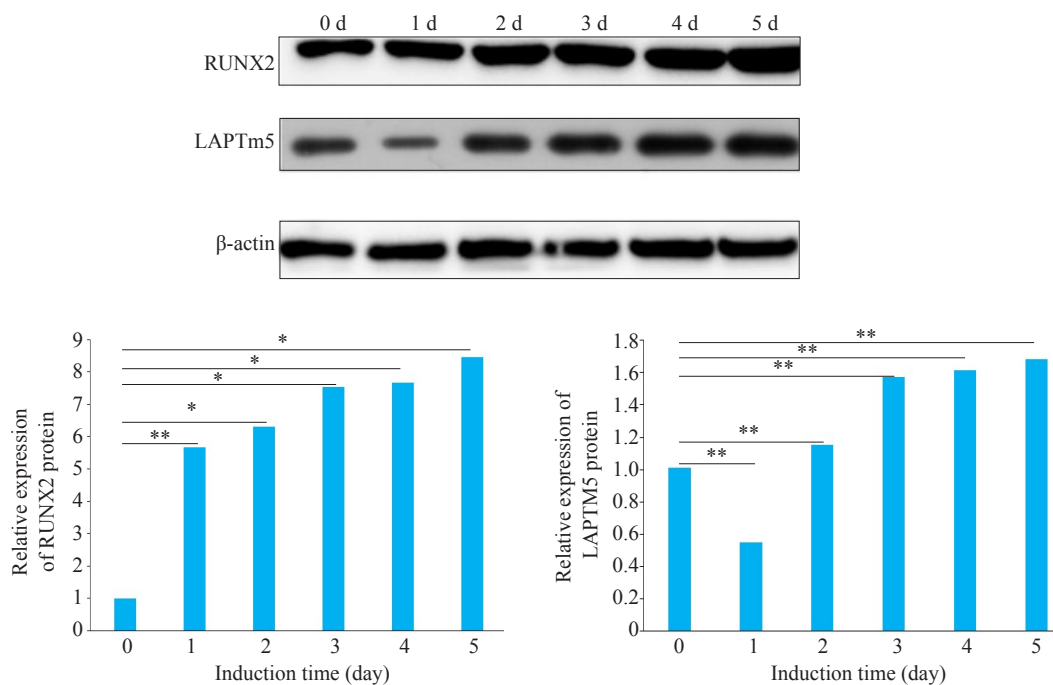


图4 矿化诱导0-5 d后,RUNX2、LAPTm5的蛋白表达

Fig.4 Western blotting for detecting Runx2 and LAPTm5 protein expressions in MC3T3-E1 cells during osteogenic induction for 5 days. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

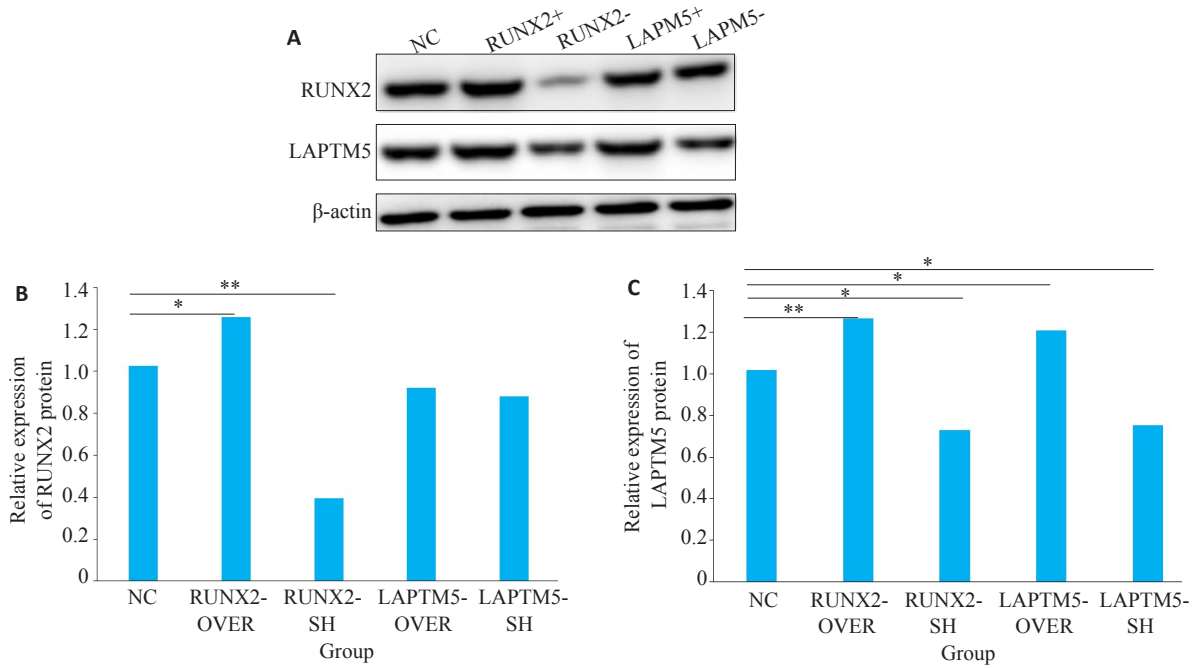


图5 RUNX2/LAPT5过表达和干扰对RUNX2及LAPT5表达的影响
Fig.5 Effects of RUNX2/LAPT5 overexpression and interference on RUNX2 and LAPT5 expression. A, B, C: Protein expression levels after overexpression and interference of RUNX2 and LAPT5. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

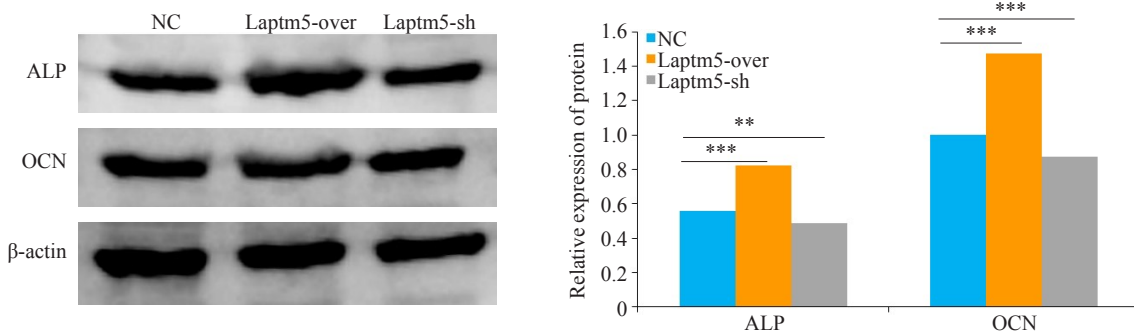


图6 LAPT5过表达和干扰对ALP、OCN表达的影响
Fig.6 Effects of LAPT5 overexpression and interference on ALP and OCN expression. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3 讨论

骨矿化过程中,磷酸钙晶体在细胞外基质的沉积由成骨细胞介导^[18,19],其沉积最可能通过基质囊泡(MVs)转运至细胞外^[20]。一些报道认为MVs仅由矿化相关的细胞分泌^[21,22]。在成骨矿化过程中,溶酶体水平增加并向细胞外围分散,含骨基质的囊泡的分泌与溶酶体部分相关^[23,24],溶酶体通过胞吐作用将含钙/磷酸盐晶体的囊泡分泌出细胞^[25]。成骨细胞内磷酸钙晶体与细胞内囊泡融合后^[26],这些囊泡移至细胞膜,并与细胞膜融合而分泌出矿物质颗粒^[17]。已知溶酶体通过胞吞胞吐途径转运细胞内外的物质^[28],参与细胞内运输代谢,细胞膜再循环等过程^[29,30]。实验发现抑制成骨细胞内的溶酶体的活性,成骨细胞外未发现基质沉积,提示溶酶体参与成骨细胞的矿化过程^[16]。由此我们推测磷酸钙晶体

是由溶酶体在细胞内经由内吞途径摄取并胞吐分泌到细胞外基质中沉积。

溶酶体进行内吞以及胞吐作用中有多种转运蛋白参与。我们前期研究发现LAPT5蛋白被RUNX2激活,本研究发现过表达与干扰RUNX2可以影响LAPT5的表达,而LAPT5的过表达与干扰对RUNX2的表达影响不明显,进一步证实RUNX2可以调控LAPT5的表达。敲低RUNX2的细胞中囊泡运输减少,但溶酶体的完整性并未受到破坏,提示RUNX2可能影响囊泡的运输过程。

本研究在成功构建小鼠MC3T3-E1细胞成骨诱导分化模型的基础上,分别通过干扰和过表达RUNX2,发现LAPT5蛋白表达量随之变化,并且Western Blot结果提示当RUNX2过表达时,LAPT5、ALP、OCN表达

上调,RUNX2抑制的结果相反。这证明了在成骨分化过程中,RUNX2通过激活LAPTM5蛋白的表达,增强溶酶体内吞以及胞吐的能力,将胞内生成的磷酸钙盐分泌到细胞外基质中,从而促进了细胞矿化。

综上所述,本研究首次发现了LAPTM5在MC3T3-E1矿化诱导中与成骨的相关性,并进一步验证了RUNX2对LAPTM5的调控关系,结果提示在成骨分化过程中存在的一个调控机制,即随着RUNX2的表达上调,激活了LAPTM5的表达,并且使分散到细胞四周的溶酶体内吞胞吐的能力增强,使得胞内产生的大量磷酸钙盐可以快速排出,维持细胞内的代谢正常运转,同时也使细胞矿化。

参考文献:

- [1] Nuytan M, Kawano T, Inazawa J, et al. Down-regulation of LAPTM5 in human cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 28320-8.
- [2] Adra CN, Zhu S, Ko JL, et al. LAPTM5: a novel lysosomal-associated multispansing membrane protein preferentially expressed in hematopoietic cells[J]. *Genomics*, 1996, 35(2): 328-37.
- [3] Cabrita MA, Hobman TC, Hogue DL, et al. Mouse transporter protein, a membrane protein that regulates cellular multidrug resistance, is localized to lysosomes[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(19): 4890-7.
- [4] Kawai Y, Ouchida R, Yamasaki S, et al. LAPTM5 promotes lysosomal degradation of intracellular CD3 ζ but not of cell surface CD3 ζ [J]. *Immunol Cell Biol*, 2014, 92(6): 527-34.
- [5] Colland F, Jacq X, Trouplin V, et al. Functional proteomics mapping of a human signaling pathway[J]. *Genome Res*, 2004, 14(7): 1324-32.
- [6] Jun DY, Kim H, Jang WY, et al. Ectopic overexpression of LAPTM5 results in lysosomal targeting and induces Mcl-1 down-regulation, Bak activation, and mitochondria-dependent apoptosis in human HeLa cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176544.
- [7] Glowacka WK, Alberts P, Ouchida R, et al. LAPTM5 protein is a positive regulator of proinflammatory signaling pathways in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(33): 27691-702.
- [8] Pak Y, Glowacka WK, Bruce MC, et al. Transport of LAPTM5 to lysosomes requires association with the ubiquitin ligase Nedd4, but not LAPTM5 ubiquitination[J]. *J Cell Biol*, 2006, 175(4): 631-45.
- [9] Chou LY, Chen CH, Chuang SC, et al. Discoidin domain receptor 1 regulates runx2 during osteogenesis of osteoblasts and promotes bone ossification via phosphorylation of p38[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7210-26.
- [10] Fu L, Peng S, Wu W, et al. LncRNA HOTAIRM1 promotes osteogenesis by controlling JNK/AP-1 signalling-mediated RUNX2 expression[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7517-24.
- [11] 章坤, 时哲敏, 任怡, 等. 长链非编码RNA Kcnq1ot1促进成骨细胞分化和抑制破骨细胞分化[J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41(1): 31-8.
- [12] 胡亚莉, 张洁, 符刘晨, 等. 人甲状腺旁腺激素(1-34)在人成骨肉瘤细胞中对基质Gla蛋白及Wnt/ β -catenin信号通路的调节作用[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(7): 984-9.
- [13] 谭咏梅, 侯晋, 杨小军, 等. 侵入细胞内的牙龈卟啉单胞菌影响人牙周膜细胞的增殖及成骨分化[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(4): 525-31.
- [14] Wang YH, Jiang J, Zhu Q, et al. Porphyromonas gingivalis lipids inhibit osteoblastic differentiation and function[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(9): 3726-35.
- [15] Geng YM, Liu CX, Lu WY, et al. LAPTM5 is transactivated by RUNX2 and involved in RANKL trafficking in osteoblastic cells[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(5): 4193-201.
- [16] Iwayama T, Okada T, Ueda T, et al. Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization[J]. *Sci Adv*, 2019, 5(7): eaax0672.
- [17] Chaudhary SC, Kuzynski M, Bottini M, et al. Phosphate induces formation of matrix vesicles during odontoblast-initiated mineralization *in vitro*[J]. *Matrix Biol*, 2016, 52/53/54: 284-300.
- [18] Reznikov N, Steele JAM, Fratzl P, et al. A materials science vision of extracellular matrix mineralization[J]. *Nat Rev Mater*, 2016, 1(8): 1-14.
- [19] Mahamid J, Addadi L, Weiner S. Crystallization pathways in bone[J]. *Cells Tissues Organs*, 2011, 194(2-4): 92-7.
- [20] Cui L, Houston DA, Farquharson C, et al. Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation[J]. *Bone*, 2016, 87: 147-58.
- [21] Golub EE, Schattschneider SC, Berthold P, et al. Induction of chondrocyte vesiculation *in vitro*[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258(1): 616-21.
- [22] Li Y, Wang J, Yue J, et al. High magnesium prevents matrix vesicle-mediated mineralization in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells via mitochondrial pathway and autophagy[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(2): 205-15.
- [23] Nabavi N, Urukova Y, Cardelli M, et al. Lysosome dispersion in osteoblasts accommodates enhanced collagen production during differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(28): 19678-90.
- [24] Zhao H, Ito Y, Chappel J, et al. Synaptotagmin VII regulates bone remodeling by modulating osteoclast and osteoblast secretion[J]. *Dev Cell*, 2008, 14(6): 914-25.
- [25] Rohde M, Mayer H. Exocytotic process as a novel model for mineralization by osteoblasts *in vitro* and *in vivo* determined by electron microscopic analysis[J]. *Calcif Tissue Int*, 2007, 80(5): 323-36.
- [26] Wei Y, Tang C, Zhang J, et al. Extracellular vesicles derived from the mid-to-late stage of osteoblast differentiation markedly enhance osteogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(1): 252-8.
- [27] Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(9): 623-35.
- [28] Stoka V, Turk B, Schendel SL, et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3149-57.
- [29] Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, et al. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(17): 12918-24.
- [30] Rijal G, Shin HI. Human tooth-derived biomaterial as a graft substitute for hard tissue regeneration[J]. *Regen Med*, 2017, 12(3): 263-73.

(编辑:余诗诗)