

基因沉默组织型转谷氨酰胺酶抑制 SaOS-2 细胞成骨分化

余慧镭, 殷晓雪*, 陈仲强, 冷慧杰, 宋纯理, 刘忠军

(北京大学第三医院骨科, 北京 100191)

【摘要】 **目的** 研究组织型转谷氨酰胺酶(tissue transglutaminase, TG2)是否参与人 SaOS-2 细胞系成骨分化过程。**方法** 使用携带短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)的慢病毒转染 SaOS-2 细胞以敲减 TG2 表达,以 SaOS-2 细胞及转染了含阴性对照 shRNA 病毒的 SaOS-2 作为对照组,分别进行体外成骨诱导培养,并进行以下检测:诱导 14 d 后各组矿化情况(茜素红染色);诱导 4、7 d 后碱性磷酸酶活性及 I 型胶原、骨钙素、骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)的 mRNA 表达,并与诱导前的表达水平相比较。**结果** SaOS-2 细胞组及转染阴性对照 shRNA 组在体外成骨诱导过程中 I 型胶原、骨钙素、BMP-2 的 mRNA 表达和 ALP 活性逐渐增加,14 d 时形成明显矿化结节,而 TG2 敲减后的 SaOS-2 细胞在诱导 14 d 时矿化水平显著低于对照组,诱导 7 d 时 ALP 活性及 I 型胶原、骨钙素、BMP-2 的 mRNA 表达水平显著低于对照组。**结论** 组织型转谷氨酰胺酶参与 SaOS-2 细胞体外成骨分化及矿化。

【关键词】 组织型转谷氨酰胺酶;SaOS-2 细胞;成骨分化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)05-0448-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.05.002

Knockdown of tissue transglutaminase in SaOS-2 cell line inhibits its osteoblastic differentiation and mineralization

YU Hui-lei, YIN Xiao-xue*, CHEN Zhong-qiang, LENG Hui-jie,
SONG Chun-li, LIU Zhong-jun

(Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate whether TG2 plays an important role in the osteoblast differentiation and mineralization. **Methods** TG2 mRNA of SaOS-2 cells was knocked down using a lentivirus stably expressing short-hairpin (sh) RNA targeting TG2. Then the cells were cultured in osteo-inductive medium for 14 d to measure mineralization and for 7 d to measure the levels of osteoblastic differentiation markers including ALP activity and mRNA of collagen I, osteocalcin (OCN) and BMP-2. The wild-type SaOS-2 cells and scrambled shRNA-transduced SaOS-2 cells served as the controls. **Results** The controls displayed an increasing trend of the level of ALP activity and mRNA of collagen I, osteocalcin and BMP-2, and notable mineralization at 14 d. When TG2 was knocked down, ALP activity, mRNA of collagen I, osteocalcin and BMP-2 at 7d, and mineralization at 14 d were all significantly lower in comparison with the corresponding values in the controls. **Conclusion** TG2 is involved in the differentiation and mineralization of osteoblasts in vitro.

【Key words】 Tissue transglutaminase; SaOS-2 cell line; Osteoblastic differentiation

Corresponding author: YIN Xiao-xue. E-mail: luckyemail2008@sina.com

转谷氨酰胺酶是一组催化转酰胺反应的酶,由 9 个成员组成,其中组织型转谷氨酰胺酶(tissue

transglutaminase, TG2)分布广泛,功能多样,近年来研究表明它可能在矿化与骨化过程中发挥重要作用

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:81101334)。

【作者简介】 余慧镭(1992 -),男,硕士,主要从事成骨细胞方面的研究, E-mail: yuhuileixs@126.com

【通讯作者】 殷晓雪(1972 -),女,博士,副研究员,主要从事成骨细胞及细胞外基质研究。 E-mail: luckyemail2008@sina.com

用^[1]。TG2 在肥大软骨细胞、成骨细胞、骨细胞和成牙质细胞中均有表达^[2-3],与软骨细胞分化和基质矿化相关^[4],参与软骨细胞向肥大前阶段的转化^[5]。源于软骨细胞的 TGs 能促进前成骨细胞的矿化,而 TG 活性抑制剂能抑制体内外的成骨细胞分化及矿化^[6-7]。目前已经在矿化组织基质中发现多种 TG2 蛋白交联活性的底物如 I 型胶原 (collagen I, Col I)、纤连蛋白、骨桥蛋白等,它们可在 TG2 催化作用下进行蛋白交联反应,形成稳定的胶原网络,促进细胞外基质的形成与矿化^[8]。另外, TG2 在一些成骨相关的病理过程中起重要作用,比如血管钙化和胸椎黄韧带骨化^[9-10]。在血管钙化发病过程中, TG2 能诱导血管平滑肌细胞发生成骨细胞样转化^[11],提示 TG2 具有促成骨的作用。

然而研究表明另外一种 TG 家族成员 FXIIIa 在骨和软骨细胞中也有表达并参与骨的矿化^[12],其功能可能与 TG2 有重叠或代偿。为了进一步明确 TG2 在成骨分化和矿化过程中的作用,本课题使用基因沉默技术,特异性敲减成骨细胞系 SaOS-2 中 TG2 mRNA 的表达,观察是否会对细胞体外成骨分化产生影响。

1 材料与方法

1.1 细胞与培养

SaOS-2 细胞由 David R. Eyre 教授 (University of Washington Medical Center, Seattle, WA, USA) 馈

赠,使用含 10% 胎牛血清 (Gibco) 的 DMEM 高糖培养液 (Hyclone) 培养于 5% CO₂, 37℃ 培养箱中,每 2 d 更换培养液。进行成骨诱导分化实验时,在细胞密度约为 80% 时将培养液更换为成骨诱导培养液,配方为 DMEM 高糖培养液中加入 10% 胎牛血清、10⁻⁸ mol/L 地塞米松、50 ng/mL 抗坏血酸 (Sigma) 以及 10 mmol/L β-甘油磷酸钠 (Sigma)。

1.2 慢病毒转染

携带敲减 TG2 的 shRNA 的慢病毒 (sc-37514-v) 购于 Santa Cruz 公司,用不影响基因表达的阴性对照慢病毒 (sc-108080) 作为对照。在 12 孔板上以 1 × 10⁴/孔接种 SaOS-2 细胞,24 h 后细胞密度达到约 50% 时,在各孔中分别加入相应病毒。6 d 后,使用含嘌呤霉素的培养液筛选转染成功的细胞。在筛选 10 d 后检测 TG2 敲减效率。

1.3 半定量 RT-PCR

细胞以 5 × 10⁴/皿接种培养于 60 mm 培养皿,到达干预时间时使用 Trizol 法提取 RNA,取 5 μg 总 RNA 使用 Goscript 逆转录试剂盒 (Promega) 进行逆转录。然后通过半定量 RT-PCR 检测 TG2、Col I、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 的 mRNA 表达,以 β-肌动蛋白 (β-actin) 作为内参。引物使用 Primer Premier 软件设计并由奥科公司合成。引物序列及反应条件见表 1。

表 1 半定量 RT-PCR 使用引物列表

Tab. 1 The details of primers in the semi-quantitative RT-PCR

基因 Genes	引物序列(5'至3') Primer sequence(5' to 3')	退火温度/℃ Annealing temperature	循环数 Cycle number
TG2	F: GGGGTGAGAGAGGAAAGACC R: TGCAGTCTAGGGAGCTGGAT	58	35
BMP-2	F: GGAAGAACTACCAGAAACGA R: CATTCTGATTCACCAACCTG	58	35
Col I	F: CCCAGCCACCTCAAGAGAAG R: TCCTTGGGTTCTTGCTGAT	60	35
OCN	F: GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG R: CTGGAGAGGAGCAGAACTGG	62	35
β-actin	F: AGCGAGCATCCCCAAAGTT R: GGGCACGAAGGTCATCATT	59	28

1.4 蛋白质印迹

细胞以 5 × 10⁴/皿接种培养于 60 mm 培养皿,到达干预时间时使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,制备用于蛋白印迹检测的蛋白样品。取 30 μg 蛋白上样,在 10% SDS-PAGE 凝胶中电泳,然后转移至硝酸纤维素膜,于含

5% 牛血清白蛋白的封闭缓冲液中室温封闭 2 h 后孵育 TG2 一抗 (Santa Cruz) 4℃ 过夜,然后孵育二抗常温 30 min,于红外荧光扫描仪上进行条带显像。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参。对条件使用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.5 碱性磷酸酶活性检测

细胞以 1×10^4 /孔接种于 12 孔板,到达干预时间时使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,以 BCA 法测定蛋白浓度。使用 LabAssay™ ALP 试剂盒(Wako)测定蛋白样品的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性。

1.6 矿化检测

细胞以 5×10^4 /皿接种培养于 60 mm 培养皿,到达干预时间时弃去皿中培养液并用 PBS 清洗两遍,使用 4% 中性甲醛 4℃ 下固定 20 min,随后使用 pH 4.2 的 1% 茜素红溶液室温下染色 30 min,洗去浮色后分别在大体及镜下观察并采图。

1.7 转谷氨酰胺酶活性检测

细胞以 1×10^4 /孔接种于 12 孔板,到达干预时间时使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白样品进行转谷氨酰胺酶活性检测,具体检测方法在前文中有详细介绍^[13]。

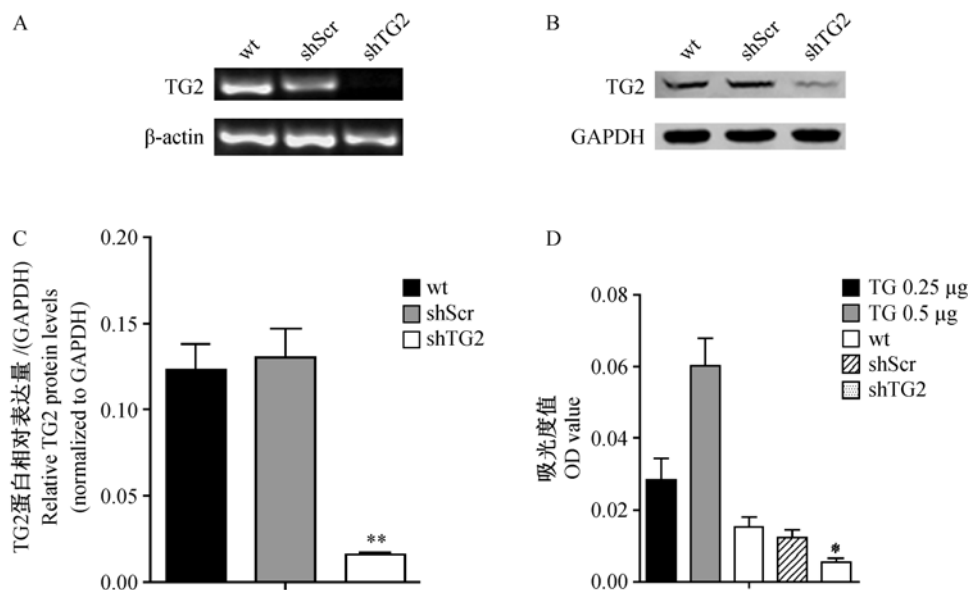
1.8 数据分析

数据分析使用 SPSS 14.0 进行统计分析,各组数据均采用均值 \pm 标准差表示。组间资料分析采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TG2 shRNA 抑制了 SaOS-2 细胞中 TG2 的表达和 TG 酶活性

为了解转染 TG2 shRNA 的 SaOS-2 细胞(shTG2)中 TG2 表达敲减的效率,我们以转染 scrambled shRNA 的 SaOS-2 细胞(shScr)和野生型 SaOS-2 细胞(wide-type, wt)作为对照,在 mRNA 及蛋白水平检测 TG2 的表达水平以及 TG 酶活性,结果表明与 wt 组相比,shTG2 组 TG2 的 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低(图 1a,1b),蛋白表达定量分析显示 TG2 蛋白表达降低约 85%(图 1c),TG 活性相对于对照组降低 60%(图 1d),shScr 组与 wt 组无明显差异。



注:细胞接种于 12 孔板,分别用携带 TG2 shRNA 和 scrambled shRNA 的慢病毒转染, A. 半定量 RT-PCR 检测 shTG2, shScr 和 wt SaOS-2 中 TG2 的 mRNA 表达; B. 蛋白印迹检测 shTG2, shScr 和 wt SaOS-2 中 TG2 的蛋白表达; C. 三组细胞中 TG2 蛋白表达的半定量数据统计分析,数据均来源于 3 次重复实验, ** $P < 0.01$ vs wt; D. shTG2, shScr, wt, 0.25 μ g TG 标准品和 0.5 μ g TG 标准品的 TG 活性检测,数据均来源于 6 次重复实验, * $P < 0.05$ vs wt。

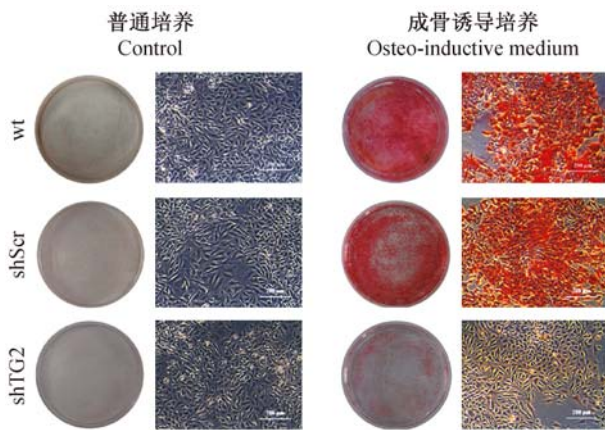
图 1 SaOS-2 细胞 TG2 敲减效率

Note. Cells were seeded in 12-well plate and infections of TG2 shRNA lentiviral particles and scrambled shRNA lentiviral particles were performed as described under "Methods and Materials". A. Semiquantitative RT-PCR analysis on TG2 mRNA expression in shTG2, shScr and wild-type(wt) SaOS-2 cells. B. Western blotting analysis on TG2 expression in shTG2, shScr and wt SaOS-2 cells. C. Statistical analysis of TG2 protein expression. Data were combined from 3 duplicate experiments and reported as means \pm SD. ** $P < 0.01$ vs wt(Dunnett test). D. TG activity analysis for shTG2, shScr, wt, 0.25 μ g TG and 0.5 μ g TG. Data were combined from 6 duplicate experiments and are reported as means \pm SD. * $P < 0.05$ vs wt(Dunnett test).

Fig. 1 Efficiency of TG2 knocking down in SaOS-2 cells by TG2 shRNA

2.2 TG2 敲减抑制了 SaOS-2 细胞体外矿化

基质矿化是成骨分化的重要特征之一,为了探究 TG2 在 SaOS-2 细胞体外矿化中的作用,我们将 shTG2、shScr 和 wt 三组细胞分别培养于成骨诱导液及普通培养液,14 d 后进行茜素红染色,在大体像及镜下观察,三组细胞在普通培养 14 d 后均为阴性染色,成骨诱导培养 14 d 后 wt 及 shScr 出现阳性染色,而 shTG2 染色明显较弱(图 2)。



注:茜素红染色检测 shTG2, shScr 和 wt SaOS-2 在普通培养液或成骨诱导培养液中培养 14 d 后基质矿化,观察大体图及镜下图($\times 100$),红色代表阳性染色,从三次重复实验中选取代表图像。(标尺 = 200 μm)

图 2 TG2 敲减抑制 SaOS-2 细胞矿化

Note. ShTG2, shScr and wt SaOS-2 cells were cultured in osteo-inductive medium or general medium for 14 days and the mineralization of the cultured cells was assessed using alizarin red staining. The bright red region represents positively stained region. All of the cultures were taken photos in both general view and microscopic view ($\times 100$), representative images from three separate experiments. Scale bar = 200 μm .

Fig. 2 TG2 knockdown suppressed the mineral deposition in SaOS-2 cells

2.3 TG2 敲减抑制 SaOS-2 细胞体外成骨分化

Col I、OCN 及 ALP 参与成骨分化过程,并对胞外基质矿化有重要作用。在之前的研究中我们发现 SaOS-2 细胞以较低的水平表达 Col I、OCN 的 mRNA 并具有一定的 ALP 活性,而在诱导 7 d 后这些成骨指标水平显著提高^[13]。本研究中结果显示 shTG2 组细胞在诱导培养 7 d 后 ALP 活性虽较诱导前升高,但显著低于相同处理的 shScr 和 wt 组(图 3a), Col I 和 OCN 的 mRNA 表达也在诱导培养 7 d 后显著低于 shScr 和 wt 组(图 3b,3c),这表明 TG2 敲减抑制了成骨性分化。BMP-2 是一种成骨分化因子并且参与细胞成骨分化的过程,与对照组相比,shTG2

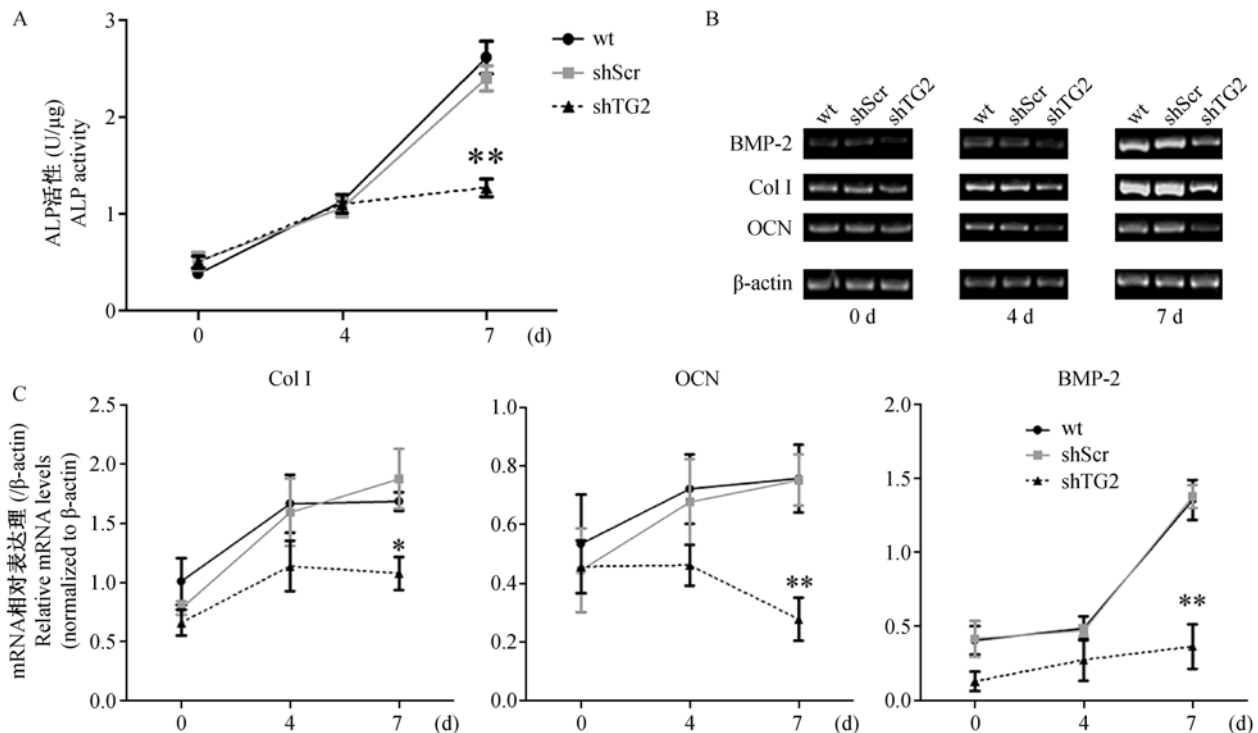
组细胞在诱导前及诱导 4 d 时 BMP-2 轻度降低,而在 7 d 时显著降低(图 3b,3c),表明 BMP-2 可能参与 TG2 对成骨分化的调节。

3 讨论

SaOS-2 细胞是一种成熟的用于研究人成骨分化的体外实验模型,它在培养于成骨诱导培养液时会进行成骨分化及矿化,表现为 Col I、OCN、ALP 活性等成骨指标水平增高及形成矿化基质^[14]。在之前的研究中我们发现,SaOS-2 细胞在诱导培养 7 d 后,TG2 的表达和 TG 活性都显著增加,而且 SaOS-2 细胞的成骨分化过程会被 TG 活性抑制剂所阻滞^[13],以小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 为模型的实验也得到了类似结果^[6],但是 TG2 是否在成骨分化中起作用仍不明确,由于 TG 家族的其他成员也能发挥出 TG 活性,所以在 SaOS-2 细胞的成骨分化过程中起作用的 TG 活性有可能是由其他成员提供。另外,TG2(-/-)小鼠并没有表现出异常的骨骼表型,提示 TG2 在骨骼系统的发育中可能并不重要^[15]。然而,近期研究表明基因敲除实验的结果可能会受代偿网络的影响^[16],所以 TG2 敲除小鼠的正常骨骼表型可能是由于 FXIIIa、TGF- β 或其他因子的代偿作用。由于转录水平的敲减不会引起这种代偿作用^[16],那么本研究使用 shRNA 敲减 TG2 可能会为认识 TG2 在成骨中的作用提供进一步的证据,以阐明 TG2 是否参与 SaOS-2 细胞成骨分化及矿化。SaOS-2 细胞在使用 shRNA 敲减 TG2 后,TG2 的蛋白表达降低了约 85%,TG 活性降低 60%,这表明 TG2 敲减模型成功建立并且 TG2 是 SaOS-2 细胞中 TG 酶活性的重要来源。

TG2 敲减后,SaOS-2 细胞矿化能力显著降低,说明 TG2 在其矿化中起重要作用。成骨诱导后 SaOS-2 细胞中 Col I、OCN 的表达以及 ALP 活性的升高也被 TG2 所抑制,说明 TG2 表达的减少抑制了 SaOS-2 细胞的成骨分化。

TG 活性参与矿化组织发育过程已经得到共识^[4],并且其机制已经进行了一些研究。I 型胶原-纤连蛋白交联产物是成骨分化过程中胞外基质形成所不可缺少的^[17],而 TG 活性在 I 型胶原-纤连蛋白交联产物的组装及成熟过程中起重要作用^[6]。本实验中发现 TG2 敲减后 TG 活性显著降低,Col I 表达减少,细胞外基质矿化明显受抑,所以 TG2 可能通过 TG 活性参与调节成骨性分化。另外有研究表



注: shTG2, shScr 和 wt SaOS-2 分别在成骨诱导液中培养 0、4、7 d。A. 碱性磷酸酶活性检测, 数据均来自于 6 次重复实验, * $P < 0.05$ vs wt; B. 半定量 RT-PCR 检测 Col I、OCN 和 BMP-2 的 mRNA 表达; C. Col I、OCN 和 BMP-2 的 mRNA 表达的灰度值统计分析, 数据均来自于 3 次重复实验, * $P < 0.05$ vs wt, ** $P < 0.01$ vs wt。

图 3 TG2 敲减抑制 SaOS-2 细胞成骨分化

Note. Cells were cultured in osteo-inductive medium for 0, 4 and 7 days. A. Alkaline phosphatase activity was measured as described in "Methods and Materials". Data were combined from 6 duplicate experiments and reported as means \pm SD. ** $P < 0.01$ vs wt (Dunnett test). B. Semiquantitative RT-PCR analysis of BMP-2, Col I and OCN mRNA expression in the shTG2, shScr and wt cells. C. Statistical analysis of BMP-2, Col I and OCN mRNA expression. Data were collected from 3 duplicate experiments and reported as means \pm SD. * $P < 0.05$ vs wt cells (Dunnett test), ** $P < 0.01$ vs wt cells (Dunnett test).

Fig. 3 TG2 knockdown suppressed the osteoblastic differentiation of SaOS-2 cells

明, TG2 对胶原的修饰能促进人成骨细胞的黏附、增殖、分化及矿化^[18], 这也为 TG2 通过蛋白交联活性参与人成骨分化过程提供了更多的证据。

BMP-2 是 TGF- β 家庭的成员并且通过多种信号通路包括 MAPK、Wnt 等参与骨骼发育和骨折修复^[19], 本实验中我们发现 SaOS-2 细胞分化过程中 BMP-2 表达的增加被 TG2 敲减所抑制, 那么 BMP-2 的表达降低可能参与了 TG2 敲减对成骨分化的抑制。总之, 我们的结果直接证明了 TG2 在 SaOS-2 细胞的矿化和成骨性分化中起重要作用, 并且其机制可能包括调节细胞外基质组装和 BMP-2 的表达。

TG2 和 FXIIIa 是 TG 家族中表达于骨、软骨和牙齿等矿化组织的成员^[1, 20], 近期有研究表明在小鼠 MC3T3-E1 细胞成骨分化中起主要作用的是 FXIIIa 而不是 TG2。然而我们在之前的实验中发现 TG2 的表达水平在 SaOS-2 细胞成骨分化过程中逐

渐增加^[13], 本实验中我们发现特异性沉默 TG2 能抑制 SaOS-2 细胞的成骨性分化和矿化, 所以 TG2 在 SaOS-2 细胞成骨分化中起重要作用。我们的结果与上述研究的差别可能是由于两种细胞的不同或者细胞种属的不同。本研究确定了 TG2 与 SaOS-2 细胞体外成骨分化和矿化之间的关系, 在 TG2 基因沉默后, SaOS-2 细胞的成骨分化和矿化部分受抑, 说明 TG2 是人成骨分化过程中所必需的因子。另外, TG2 对人成骨细胞的调节作用可能与胞外基质的装配和 BMP-2 的表达有关。我们的研究为认识 TG2 在人成骨分化和矿化中的作用提供了进一步的证据。

参 考 文 献

- [1] Numinskaya MV, Belkin AM. Cellular functions of tissue transglutaminase. In: Jeon Kw Ed. Int Rev Cell Mol Biol, 2012, 294: 1-97.

- [2] Kaartinen MT, El-maadawy S, Rasanen NH, et al. Tissue transglutaminase and its substrates in bone [J]. *J Bone Mineral Res*, 2002, 17(12):2161–2173.
- [3] Kaartinen MT, Sun W, Kaipatur N, et al. Transglutaminase crosslinking of sibling proteins in teeth [J]. *J Dental Res*, 2005, 84(7):607–612.
- [4] Nurminskaya M, Kaartinen MT. Transglutaminases in mineralized tissues [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 1591–1606.
- [5] Nurminsky D, Shanmugasundaram S, Deasey S, et al. Transglutaminase 2 regulates early chondrogenesis and glycosaminoglycan synthesis [J]. *Mech Dev*, 2011, 128(3–4):234–245.
- [6] Al-jallad HF, Nakano Y, Chen JL, et al. Transglutaminase activity regulates osteoblast differentiation and matrix mineralization in mc3t3-e1 osteoblast cultures [J]. *Matrix Biol*, 2006, 25(3):135–148.
- [7] Deasey S, Grichenko O, Du S, et al. Characterization of the transglutaminase gene family in zebrafish and in vivo analysis of transglutaminase-dependent bone mineralization [J]. *Amino Acids*, 2012, 42(2–3):1065–1075.
- [8] Watanabe K, Tsunoda K, Itoh M, et al. Transglutaminase 2 and factor XIII catalyze distinct substrates in differentiating osteoblastic cell line: utility of highly reactive substrate peptides [J]. *Amino Acids*, 2013, 44(1):209–214.
- [9] Beazley KE, Deasey S, Lima F, et al. transglutaminase 2-mediated activation of beta-catenin signaling has a critical role in warfarin-induced vascular calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(1):123–u302.
- [10] Yin XX, Chen ZQ, Guo ZQ, et al. Tissue transglutaminase expression and activity in human ligamentum flavum cells derived from thoracic ossification of ligamentum flavum [J]. *Spine*, 2010, 35(20):e1018–e1024.
- [11] Johnson KA, Polewski M, Terkeltaub RA. Transglutaminase 2 is central to induction of the arterial calcification program by smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 2008, 102(5):529–537.
- [12] Al-jallad HF, Myneni VD, Piercy-kotb SA, et al. Plasma membrane factor XIIIa transglutaminase activity regulates osteoblast matrix secretion and deposition by affecting microtubule dynamics [J]. *Plos One*, 2011, 6(1): e1589.
- [13] Yin XX, Chen ZQ, Liu ZJ, et al. Tissue transglutaminase (tg2) activity regulates osteoblast differentiation and mineralization in the SAOS-2 cell line [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45(8): 693–700.
- [14] Prideaux M, Wijenayaka AR, Kumarasinghe DD, et al. SSOS2 osteosarcoma cells as an in vitro model for studying the transition of human osteoblasts to osteocytes [J]. *Calc Tissue Int*, 2014, 95(2):183–193.
- [15] Cordell PA, Newell LM, Standeven KF, et al. Normal bone deposition occurs in mice deficient in factor XIII-a and transglutaminase 2 [J]. *Matrix Biol*, 2015, 43: 85–96.
- [16] Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, et al. genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns [J]. *Nature*, 2015, 524(7564):230–233.
- [17] Marsh ME, Munne AM, Vogel JJ, et al. Mineralization of bone-like extracellular-matrix in the absence of functional osteoblasts [J]. *J Bone Mineral Res*, 1995, 10(11):1635–1643.
- [18] Fortunati D, Chau DY, Wang Z, et al. Cross-linking of collagen I by tissue transglutaminase provides a promising biomaterial for promoting bone healing [J]. *Amino Acids*, 2014, 46(7):1751–1761.
- [19] Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, et al. Tgf-beta/bmp signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation [J]. *Bone Res*, 2015, 3:15005.
- [20] Lismaa SE, Mearns BM, Lorand I, et al. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(3):991–1023.

[收稿日期] 2016-03-08