

·基础研究·

BMP-2/Smads 信号通路促进骨代谢失衡大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化

张伟丽¹ 罗敏² 彭江³ 赵斌⁴

【摘要】 目的 本研究旨在探讨 BMP-2/Smads 信号通路对骨代谢失衡大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs)成骨分化的影响。方法 切除雌性SD大鼠双侧卵巢,建立大鼠骨代谢失衡模型,即骨质疏松(osteoporosis, OP)模型。通过成骨诱导鉴定 rBMSCs 的成骨分化。采用脂肪诱导和流式细胞术(FCM)检测脂肪分化和 rBMSC 表面标志物的表达。将 rBMSCs 分为空白组、NC 组(转染大鼠 rBMSCs 的阴性对照质粒)、SI-BMP2 组(转染大鼠 rBMSCs 具有低表达 BMP-2 质粒)和 OE-BMP2 组(转染大鼠 rBMSCs 具有高表达 BMP-2 质粒)。Western blot 和定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)检测关键因子和成骨相关因子的表达水平。茜素红染色观察钙化结节的形成。碱性磷酸酶染色测定 ALP 活性。结果 OP 组大鼠体重增加,骨密度下降(均 $P < 0.01$)。OP 大鼠 rBMSCs 具有成骨分化和成脂分化能力,CD44(91.3±2.9%)和 CD105(94.8±2.1%)高表达。与空白组相比,OE-BMP2 组 BMP-2 和 SMAD1 水平升高,钙化结节和 ALP 阳性染色面积增加(均 $P < 0.05$)。OE-BMP2 组 RUNX2、OC、OPN 表达水平均高于空白组(均 $P < 0.05$)。SI-BMP2 组的结果与 OE-BMP2 组相反。结论 BMP-2 激活的 BMP 信号通路可促进骨代谢失衡大鼠 rBMSCs 的成骨分化。

【关键词】 BMP 信号通路; 骨髓间充质干细胞; 骨质疏松; 成骨分化

The BMP-2/Smads signaling pathway promote the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in rat with bone metabolism imbalance Zhang Weili¹, Luo Min², Peng Jiang³, Zhao Bin⁴. ¹Inpatient and Medical Record Management Division of 3rd Medical Center, Chinese PLA General Hospital, 69 Yong ding Road, Hai dian District, Beijing 100039, China; ²Urology Department of 3rd Medical Center, Chinese PLA General Hospital, 69 Yong ding Road, Hai dian District, Beijing 100039, China; ³Institute of Orthopaedics, Chinese PLA General Hospital, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China; ⁴Orthopaedic Department of 3rd Medical Center, Chinese PLA General Hospital, 69 Yong ding Road, Hai dian District, Beijing 100039, China

Corresponding author: Zhao Bin, Email: zhao7202bin@163.com

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to investigate the effect of BMP-2/Smads signaling pathway on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) in rat with bone metabolism imbalance. **Methods** Ovaries of female SD rats were excised and OP model was established. The osteogenic differentiation of rBMSCs was identified by osteogenic induction. Fat induction and flow cytometry (FCM) were used to detect fat differentiation and the expression of rBMSC surface markers. rBMSCs were divided into blank group, negative control (NC) group (transfected with NC BMP-2 plasmid), SI-BMP2 group (transfected with low expressing BMP-2 plasmid) and OE-BMP2 group (transfected with high expressing BMP-2 plasmid). Western blot and quantitative real-time PCR were used to detect the expression of key factors and osteogenic related factors. The formation of calcified nodules was observed by alizarin red staining. ALP activity was determined by alkaline phosphatase staining. **Results** In OP group, the weight and bone mineral density of rats increased ($P < 0.01$). rBMSCs of OP rats have the ability of osteogenic differentiation and lipogenic differentiation. CD44 (91.3±2.9%) and CD105 (94.8±2.1%) are highly ex-

pressed. Compared with the blank group, the level of BMP-2 and Smad1 in OE-BMP2 group increased, and the area of calcified nodule and ALP positive staining increased ($P<0.05$). The expression level of Runx2, OC and OPN in OE-BMP2 group was higher than that in blank group ($P<0.05$). The results of SI-BMP2 group were opposite to those of OE-BMP2 group. **Conclusion** The BMP signaling pathway activated by BMP-2 can promote the osteogenic differentiation of rBMSCs in OP rats.

【Key words】 BMP signaling pathway; Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteoporosis; Osteogenic differentiation

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种严重影响公众健康的疾病,其特点是骨量减少,是老年人骨折的最常见原因^[1]。OP通常没有表现出典型的症状,直到骨折发生。例如,在英国,每年大约有536 000个新的脆性骨折发生,其中有79 000个髌部骨折,66 000个临床诊断椎体骨折,69 000个前臂骨折,和322 000个其他骨折^[2]。为了维持骨完整性和功能的平衡,需要成骨细胞和破骨细胞的协同作用,前者负责骨的形成,后者负责骨的吸收^[3]。因此,研究成骨细胞活性失衡对OP的治疗具有重要价值,因为许多骨疾病反映成骨细胞和破骨细胞活性失衡,导致骨质量异常^[4]。

此外,骨微环境中的炎症刺激破骨细胞分化^[5],这可能表明炎症在骨质疏松症中的作用。除了炎症对骨质疏松症的影响外,巨噬细胞通过调节一系列调节分子的表达被认为参与了骨的生理学和病理学过程,包括BMP-2和转化生长因子 β (TGF- β)^[6]。TGF- β 和BMP信号通路在胚胎骨骼发育和出生后骨稳态中都发挥着重要作用^[7]。有趣的是,包括BMP-2在内的许多BMP被认为是骨折愈合的潜在成骨剂^[8]。

BMP在出生后骨形成和成骨过程中的作用是由成骨细胞系来完成。其重要功能活动涉及到诱导成骨的复杂调节,其中包括BMP、Wnt配体、激素、生长因子等信号或因子^[9]。例如,BMP受体的激活诱导成骨细胞分化,从而增加骨形成的潜能。然而,BMP在OP中对成骨细胞分化的影响还没有被很好的阐明。本研究应用OP大鼠模型,探讨BMP信号通路对OP大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow mesenchymal stem cells, rBMSCs)成骨分化的影响。

材料与方法

一、实验用动物

从实验动物中心(SLAC)购买大约24只Sprague Dawley(SD)没有生殖史的雌性大鼠。大鼠年龄为4~6 w,体重220~260 g。在进行任何实验

之前,所有大鼠均在动物室内喂养,并在18~28℃下维持7 d以适应环境。动物房的湿度控制在40~70%。空气洁净度为10万,每高倍视野下菌落总数不超过每箱12.2个。在噪声不大于60 db、光照时间为12 h的条件下饲养大鼠,给予大鼠自由饮水和自由进食的机会;调整消毒措施和通风。1 w后,随机选择12只大鼠建立OP模型,其余12只大鼠分为正常组。

二、OP模型的建立

12只大鼠接受3%戊巴比妥钠腹腔麻醉(Sigma,美国)。在腹部做了一个切口以暴露腹腔。然后,在止血和伤口缝合之前切除双侧卵巢。然后,将80×104 U青霉素(上海亚洲先锋,批号S100824)肌肉注射于每只大鼠体内,每日2次,共3天。然后,将大鼠饲养3个月,自由获取食物和自由活动。记录大鼠的一般信息,包括体重。采用micro-CT(SCANCO)测量模型组和正常组大鼠骨密度(bone mineral density, BMD),验证OP模型的建立。

三、间充质干细胞的分离纯化

OP大鼠因颈部脱臼而被安乐死。然后,在75%乙醇中浸泡5 min,在不消毒的条件下将下颌骨转移到预冷Hank's液中。为了将下颌骨和肌肉分开,切除下颌骨的肌肉,然后收集下颌骨中的骨髓。然后将细胞轻轻搅拌45 s,然后用200目网过滤。然后将穿过网的液体收集到10 mL EP管中,以1 000 r/min的速度离心10 min,以去除上清液。在细胞再悬浮并接种于密度为 3×10^4 /mL的培养瓶中后,进行常规细胞培养。培养基最初每隔24 h更换一次,然后每隔3 d更换一次。倒置显微镜下观察细胞生长。纯化原代大鼠骨髓间充质干细胞rBMSCs制备细胞悬液,将其转入96孔板中。对每孔中的单个细胞进行标记,3 d后更换培养基。当细胞密度达到50%时,将细胞悬液接种到六孔板上进行进一步培养。

四、rBMSCs成骨分化的鉴定

细胞培养24 h至完全贴壁,用成骨诱导培养基代替原培养基(美国Sigma公司生产的 10^{-8} mol/L地塞米松和10 mmol/L β -甘油磷酸钠全培养基)。培养

基每2~3 d更换一次。2~3 w后,取出载玻片,直到矿化结节暴露于茜素红染色。先用PBS清洗载玻片,然后用95%乙醇固定。约10 min后,将玻片用蒸馏水冲洗两次,用0.1%茜素红(pH=8.3, Sigma, 美国)浸泡37°C, 30 min。用玻片冲洗两次后,用显微镜观察rBMSCs成骨分化。

五、rBMSCs成脂分化的鉴定

细胞培养24 h至完全贴壁,用脂肪诱导培养基(10^{-6} mol/L地塞米松、10 mg/L胰岛素(Sigma, 美国)、0.5 mmol/L 3-异丁基-L-甲基黄嘌呤(IBMx, Sigma, 美国)和100 mmol/L 吡啶美辛)代替原培养基。培养基每2~3 d更换一次。2~3 w后,在形成油红O染色的脂滴后取出载玻片。先用PBS冲洗3次,除去多余的水分,然后用10%中性乙醇固定10 min,用油红O(Sigma, 美国)浸泡10 min,再用蒸馏水冲洗10 min,显微镜下观察rBMSCs的成脂分化。

六、细胞分组与细胞转染

将来自第三代的OP大鼠rBMSCs分为空白组、阴性对照(NC)组(转染大鼠rBMSCs的阴性对照质粒、genefarma、上海)、SI-BMP2组(转染大鼠rBMSCs具有低表达BMP-2质粒; genefarma, 上海); OE-BMP2组(转染大鼠rBMSCs具有高表达BMP-2质粒; genefarma, 上海)。上述四组细胞在收集细胞前用成骨诱导培养基培养14 d,以作进一步实验。

七、实时定量荧光聚合酶链反应

采用三唑法(Invitrogen)从各组细胞中提取总RNA。采用紫外分光光度法和甲醛凝胶电泳法对RNA进行鉴定。用AMV逆转录酶将RNA(1 μ g)反转录成cDNA。PCR引物由Invitrogen设计和合成(表1)。PCR条件为:94°C预变性5 min, 94°C变性40 s, 60°C退火40 s, 72°C延长1 min,最后在72°C下延长10 min。PCR产物在sepharose凝胶上电泳,并使用光学监视器3软件(BioRad)进行分析。放大曲线最低点的阈值沿上升曲线手动设定。阈值循环(Ct)使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析。实验组和正常对照组的基因表达率分别为:实验组和正常对照组。实验进行了三次以获得平均值,GAPDH作为对照。

八、Western blot分析

用BCA试剂盒(武汉博士德)从各组细胞中提取蛋白质,鉴定蛋白质浓度。将加载缓冲液加入蛋白质中,在95°C下煮沸10 min,然后在每个孔中加入30 μ g加载缓冲液,用10%聚丙烯酰胺凝胶(武汉博斯特)分离蛋白质。电泳电压从80~120 V,蛋白

在100 mV下转移到膜上45~70 min,膜转移到聚偏氟乙烯(PVDF),然后在室温下用5%BSA封闭1 h,以 β -actin为对照。加入BMP-2、Smad1、p-Smad1、Runx2、骨钙素(OC)和骨桥蛋白(OPN)(1:1000, Abcam, 美国)的一级抗体和 β -肌动蛋白(1:3000, Abcam, 美国)的一级抗体,并在4°C下孵育过夜。用TBST清洗膜三次,每次5 min。在室温下与次级山羊抗鼠抗体(Jackson, America)孵育。然后,将膜清洗三次,每次5 min。用化学发光试剂显色。用Bio-Rad凝胶Dol-EZ成像仪(美国加利福尼亚Bio-Rad凝胶DOC-EZ成像仪)进行颜色观察。利用ImageJ软件对目标波段的灰度值进行分析。实验进行了三次以获得平均值。

九、碱性磷酸酶染色

成骨诱导后7 d按以下程序进行碱性磷酸酶染色。首先用乙醇固定细胞15 min,然后用PBS洗涤3次,加入ALP染色液(Beyotime Biotechnology),然后在黑暗中孵育30 min,直到获得一定程度的染色。取下染色液,用蒸馏水冲洗细胞两次。细胞干燥后,用ImageJ软件对ALP染色进行半定量分析。

十、细胞内矿化结节的染色

成骨诱导14 d后丢弃培养基。然后,将细胞洗涤两次,用10%中性福尔马林缓冲液固定。30 min后,取下福尔马林,用PBS清洗细胞两次,然后用1 mL 0.1%茜素红在每个孔中染色3~5 min。染色完成后,取下染色液,在PBS中清洗两次后观察细胞并拍照。每孔细胞用含10%乙酸溶液与无水乙醇8:2比例的提取缓冲液1 mL孵育30 min,无光照。用微板阅读器测量490 nm处的吸光度。然后根据吸光度半定量细胞矿化。

十一、统计分析

采用SPSS 21.0(IBM, 美国)统计软件进行分析。计量资料采用Kolmogorov-Smirnov检验是否符合正态分布,符合正态分布的大鼠体重与骨密度数据进行t检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用最小显著性差异(least significant difference, LSD)分析两组间的差异,用单因素方差分析多组间的比较。检验水准 α 值取双侧0.05。

结 果

一、OP大鼠概况

OP大鼠造模后1~2 h恢复正常,4 h后开始饮

水和进食。5 d后,大鼠恢复正常活动,伤口愈合,腹部无感染和缺损。3 w后,OP组大鼠体重增加,头发灰白,较正常组轻,体重轻度增加,毛发光泽,活动正常。3个月后,模型组大鼠的体重比正常组大($P<0.01$)(图1)。造模3个月后比较模型组和正常组大鼠BMD。结果表明,与正常组 $[(448.5\pm 21.6)\text{mgHA/cm}]$ 相比(图2),OP大鼠BMD $[(176.4\pm 13.8)\text{mgHA/cm}]$ 明显降低($P<0.01$),说明OP大鼠模型建立成功。

二、OP大鼠 rBMSCs 的观察

倒置显微镜下观察显示,原代 rBMSCs 呈梭形或三角形生长,实质细胞呈圆形,不贴壁。原代 rBMSCs 培养 12~15 d 能够实现细胞融合,5~8 d 后观察到 P3 细胞(图3、4)。

三、OP 大鼠红细胞 CD105 和 CD44 的表达

流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测 OP 大鼠红细胞 CD105 和 CD44 的表达, P3 细胞 CD44

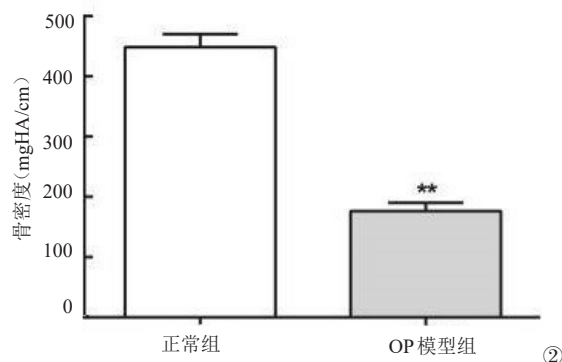
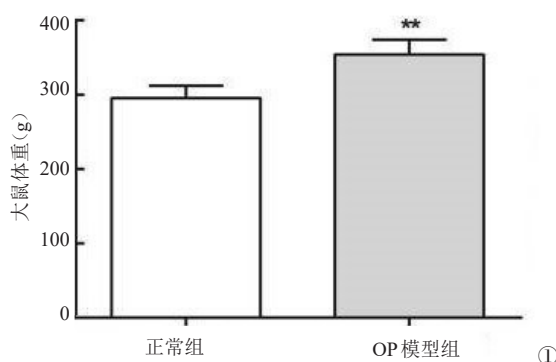
($91.3\pm 2.9\%$)和 CD105 ($94.8\pm 2.1\%$), CD34 ($3.5\pm 1.2\%$)和 CD45 ($5.2\pm 1.4\%$)。结果与 rBMSCs 的表型特征一致(图5~8)。

四、成骨和成脂分化的鉴定

茜素红染色显示成骨诱导 21 d 后,大多数红色矿化结节出现,每个结节的中心部分呈棕黑色,提示钙结节的形成(图9)。成脂诱导后 7 d,细胞突触收缩,胞质中出现了淡黄色透明的脂滴,这些脂滴首先出现在细胞边缘(图10)。随着时间的推移,脂滴的数量增加,开始合并成一个大的脂滴。大约 14 d 后,油红 O 染色显示红色和圆形脂质滴,排列在细胞质中的念珠状席(图11)。

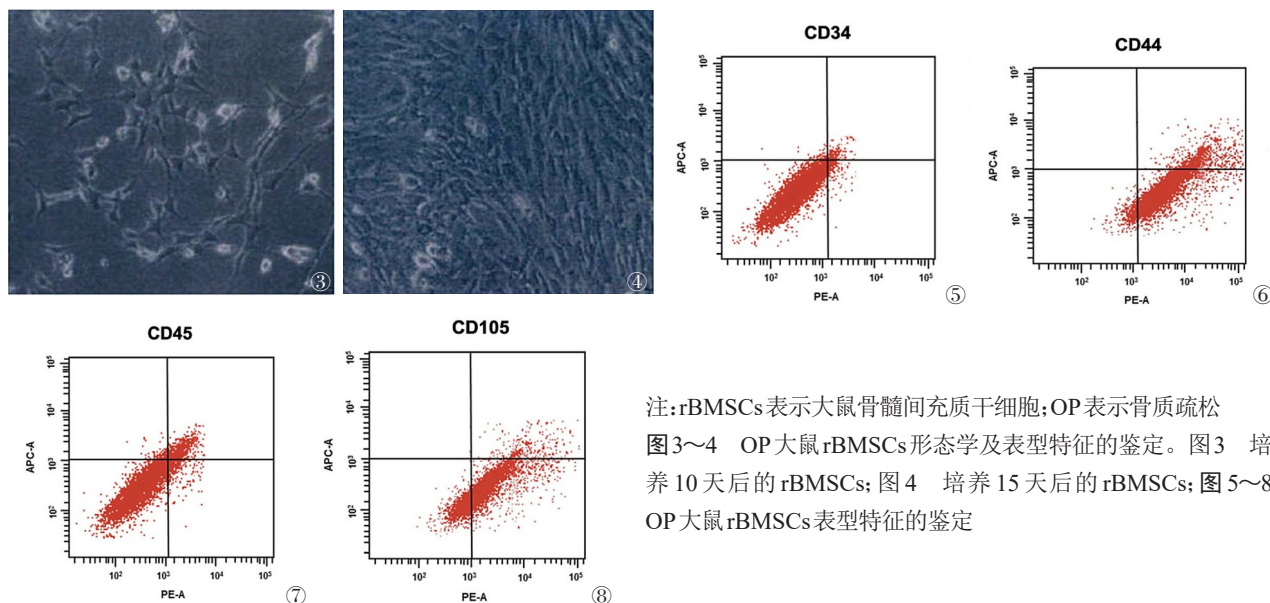
五、OP 大鼠 rBMSCs 中 BMP-2 和 Smad1 的表达

qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,与空白组相比,SI-BMP2 组的 BMP-2 和 SMAD1 mRNA 和蛋白表达降低, SMAD1 磷酸化降低(均 $P<0.05$),提示



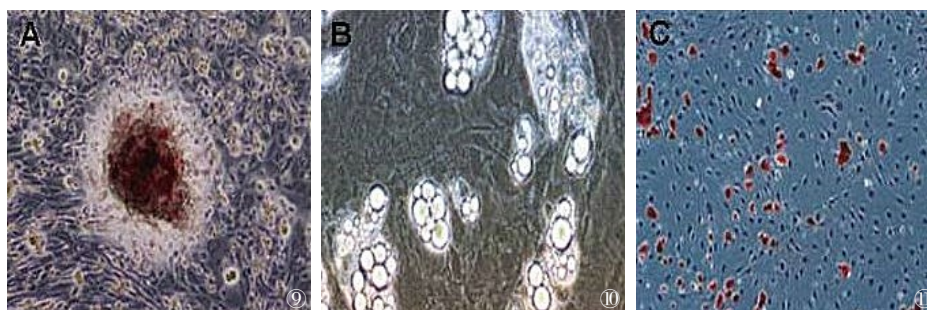
注:“**”表示与正常对照组比较, $P<0.01$; OP 为骨质疏松

图1~2 OP模型组与正常组大鼠体重及骨密度的比较。图1 OP模型组和正常组大鼠体重;图2 OP模型组和正常组大鼠骨密度



注:rBMSCs表示大鼠骨髓间充质干细胞;OP表示骨质疏松

图3~4 OP大鼠 rBMSCs 形态学及表型特征的鉴定。图3 培养 10 天后的 rBMSCs; 图4 培养 15 天后的 rBMSCs; 图5~8 OP 大鼠 rBMSCs 表型特征的鉴定



注:OP表示骨质疏松;rBMSCs表示大鼠骨髓间充质干细胞

图9~11 OP大鼠rBMSCs成骨和成脂分化的鉴定。图9 成骨诱导21 d后茜素红染色;图10 光镜观察7 d后成脂;图11 成脂诱导14 d后油红O染色

siRNA 干扰 BMP-2 可抑制 BMP 信号通路的激活。相反,OE-BMP2 组的 BMP-2 和 SMAD1 的 mRNA 和蛋白表达水平高于空白组 ($P < 0.05$),提示 BMP-2 的过度表达可激活 BMP 信号通路。NC 组与空白组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 12~14)。

六、BMP-2 表达对茜素红染色的影响

茜素红染色显示,成骨诱导 14 d 后,各组可见不同大小的阳性红结节。与空白组比较,OE-BMP2 组钙化结节数目和大小均增加,而 Si-BMP2 组的钙化结节数目和大小均降低 (均 $P < 0.05$)。结果表明,BMP-2 能促进大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,对照组与空白组之间钙化结节数目和大小的比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 15~18,23)。

七、各组 ALP 染色

与空白组相比,OE-BMP2 组 rBMSCs 中 ALP 阳

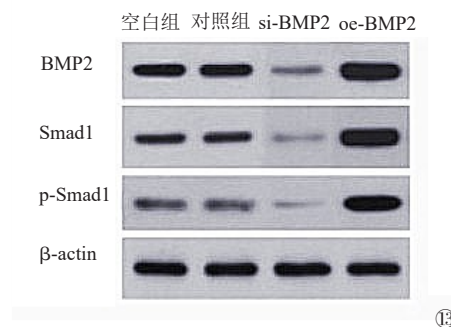
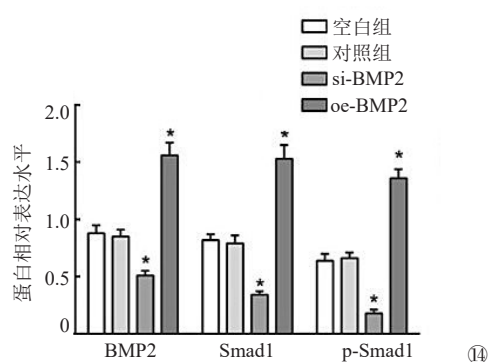
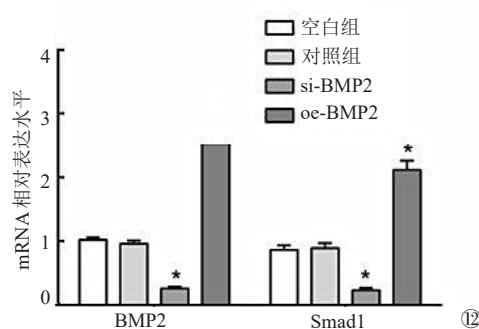
性染色面积较大 ($P < 0.05$),而 Si-BMP2 组 RBMSCs 中 ALP 阳性染色面积减少 ($P < 0.05$)。NC 组与空白组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 19~22,24)。

八、各组成骨相关基因的表达

空白组 RUNX2、骨钙素 OC、骨桥蛋白 OPN 表达与 NC 组差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。Si-BMP2 组 RUNX2、OC 和 OPN 表达降低,而 OE-BMP2 组与空白组相比,RUNX2、OC、OPN 表达升高 (均 $P < 0.05$)。这些结果表明 BMP 信号通路的激活可以上调成骨相关基因 Runx2、OC 和 OPN 的表达,从而促进成骨 (图 25~27)。

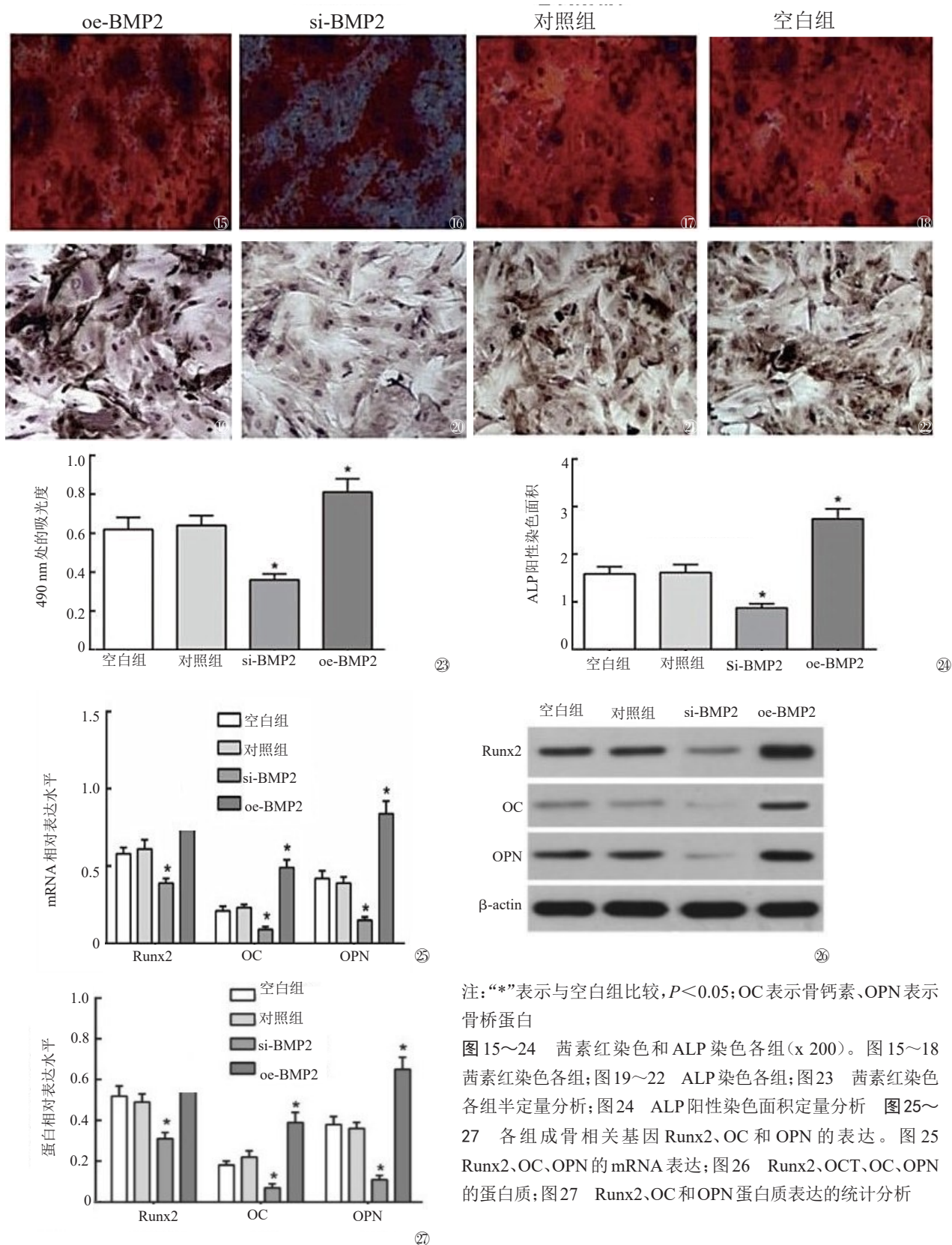
讨 论

OP 及其主要的健康后果,即脆弱性骨折,更多



注:“*”表示与空白组比较, $P < 0.05$

图 12~14 各组 BMP 相关蛋白表达的比
较。图 12 BMP 相关蛋白 mRNA 表达;图 13
BMP 相关蛋白的蛋白表达;图 14 BMP 相
关蛋白表达的统计分析



注：“*”表示与空白组比较， $P < 0.05$ ；OC表示骨钙素、OPN表示骨桥蛋白

图15~24 茜素红染色和ALP染色各组(x 200)。图15~18 茜素红染色各组；图19~22 ALP染色各组；图23 茜素红染色各组半定量分析；图24 ALP阳性染色面积定量分析 图25~27 各组成骨相关基因Runx2、OC和OPN的表达。图25 Runx2、OC、OPN的mRNA表达；图26 Runx2、OCT、OC、OPN的蛋白质；图27 Runx2、OC和OPN蛋白质表达的统计分析

表现为疼痛，有“沉默的癌症”之称，是一个巨大且不断升级的全球问题^[1]。人们已经努力克服这一障碍，并提出遗传因素是导致这一疾病发病的主要原因

素^[10]。了解OP的遗传因素对于疾病预防^[11]和寻找新的治疗方法具有重要价值。结果表明，OP大鼠骨密度低于健康大鼠，说明OP大鼠骨强度较弱，部分

解释了OP在骨折中的作用。

进一步的FCM实验发现,OP大鼠rBMSCs中CD44和CD105高表达,CD34和CD45不表达,CD44抗原是一种细胞表面糖蛋白,主要参与多种细胞活动中的细胞间相互作用和细胞粘附迁移,包括淋巴细胞活化、再循环和归巢、造血和肿瘤转移^[12]。数据表明,CD44的高表达在恶性转化(malignant transformation)和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程的启动中起着至关重要的作用^[13]。CD44还与其他配体相互作用,如成体心肌细胞和破骨细胞中的骨桥蛋白和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)^[14]。CD105也被称为ENG、END、FLJ41744、HHT1、ORW和ORW1,主要参与血管生成,使其成为肿瘤生长和存活以及癌细胞向体内其他部位转移的重要蛋白^[15]。rBMSCs中CD44和CD105的检测提示OP大鼠存在骨脆弱和骨损伤。在以前的一篇文章中,成骨/内皮标记物的RT-PCR揭示了骨折愈合早期移植的人多能干细胞(human multipotent adipose-derived stem cells, hMADS)的成骨和血管可塑性,其中间充质细胞表面标记物如CD44和CD105在人多能干细胞中阳性表达^[16]。在同一研究中,发现BMP-2或血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的存在激活了hMADS细胞在体外的增殖和迁移。

BMP信号通路在rBMSCs成骨分化中的作用研究表明,BMP-2的低表达可以抑制BMP信号通路的激活,而BMP信号通路的激活可以促进骨质疏松大鼠rBMSCs的成骨分化。骨质疏松引起骨折的特点是骨痂形成和骨愈合缓慢,其中骨愈合的细胞来源是间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),它们分化为成骨细胞,这些成骨细胞被骨诱导细胞因子(如BMP-2)募集^[17-18]。转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β)/BMP信号转导参与了绝大多数细胞骨化过程^[8]。早期研究表明,BMP-2可以通过调节Smad信号通路在成骨细胞分化中发挥关键作用^[19]。R-Smads(Smads 1/5/8)是BMP受体的主要传感器,它的激活涉及通过与各种转录因子相互作用下的一个向细胞核中转移的过程^[20]。具体地说,Smads 1/5/8与Smad4的复合物被产生以后,它被转移到细胞核中以激活Cbfa1/Runx2的转录,从而调节骨代谢^[21-22];这解释了我们研究中对Runx-2表达的观察。Runx2和TGF- β /BMP激活的smad之间的平衡对于骨生成至关重要^[8]。由于OP

是一个涉及多种因素、基因和细胞因子的复杂条件,BMP与OP大鼠rBMSCs成骨分化的确切关系还需要更多的深入研究^[23]。总之,本研究的这些结果可能揭示了BMP信号通路在OP中调控成骨细胞分化的可能机制,其中与Smad信号通路的协同作用是非常重要的。

OP是一种常见的危害公共健康的疾病,其特点是骨折和骨形成减少。跌倒是老年髋部骨折的主要原因,80岁以上的老年骨折称为生命中最后一次骨折,需要采用积极治疗理念,例如有通过生物支架材料来促进骨再生^[24-26]。而我们的研究发现,在骨重建失衡的情况下,BMP-2的高表达可促进BMP信号通路的激活,进而促进rBMSCs成骨分化。据此可以为研发治疗骨质疏松的药物提供基础。

参 考 文 献

- 1 Engstrom A, Michaelsson K, Vahter M, et al. Associations between dietary cadmium exposure and bone mineral density and risk of osteoporosis and fracture among women [J]. Bone, 2012, 50: 1372-8.
- 2 Compston J, Cooper A, Cooper C, et al. UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis [J]. Arch Osteoporos, 2017, 12: 43.
- 3 Chen G, Deng C, Li YP, et al. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8: 272-88.
- 4 He L, Lee J, Jang JH, et al. Osteoporosis regulation by salubrinal through eIF2alpha mediated differentiation of osteoclast and osteoblast [J]. Cell Signal, 2013, 25: 552-60.
- 5 Matzelle MM, Gallant MA, Condon KW, et al. Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the Wnt signaling pathway [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64: 1540-50.
- 6 Chen Z, Wu C, Gu W, et al. Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by beta-tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signaling pathway [J]. Biomaterials, 2014, 35: 1507-18.
- 7 Wu M, Chen G, Li YP, et al. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development and bone formation, homeostasis and disease [J]. Bone Res, 2016, 4: 16009.
- 8 Razzouk S, Sarkis R. BMP-2: biological challenges to its clinical use [J]. N Y State Dent J, 2012, 78:37-9.
- 9 Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis [J]. Nat Rev Endocrinol, 2012, 8: 212-27.
- 10 Xu H, Gong C, He L, et al. Purinergic P2X7 receptor functional genetic polymorphisms are associated with the susceptibility to osteoporosis in Chinese postmenopausal women [J]. Purinergic Signal, 2017, 13: 339-46.
- 11 Sobieszczanska M, Jonkisz J, Tabin M, et al. Osteoporosis: genetic determinants and relationship with cardiovascular disease[J]. Adv Clin Exp Med, 2013, 22: 119-24.
- 12 Paradiso B, Bianchini E, Cifelli P, et al. A new case of syringocystadenocarcinoma papilliferum: a rare pathology for a wideranging comprehension [J]. Case Rep Med, 2014, 2014: 453874.

- 13 Geng S, Guo Y, Wang Q, et al. Cancer stem-like cells enriched with CD29 and CD44 markers exhibit molecular characteristics with epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma [J]. Arch Dermatol Res, 2013, 305: 35-47.
- 14 Dalal S, Zha Q, Daniels CR, et al. Osteopontin stimulates apoptosis in adult cardiac myocytes via the involvement of CD44 receptors, mitochondrial death pathway, and endoplasmic reticulum stress [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 306: H1182-91.
- 15 Tadbir AA, Pardis S, Ashkavandi ZJ, Najvani AD, Ashraf MJ, Taheri A, et al. Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13: 5155-9.
- 16 Shoji T, Ii M, Mifune Y, et al. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis [J]. Lab Invest, 2010, 90: 637-49.
- 17 Prall WC, Haasters F, Heggebo J, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 440: 617-22.
- 18 Pajarinen J, Lin T, Gibon E, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing [J]. Biomaterials, 2019, 196: 80-89.
- 19 Wang L, Zhang X, Guo Y, et al. Involvement of BMPs/ Smad signaling pathway in mechanical response in osteoblasts [J]. Cell Physiol Biochem, 2010, 26: 1093-102.
- 20 Agas D, Sabbieti MG, Marchetti L, et al. FGF-2 enhances Runx-2/ Smads nuclear localization in BMP-2 canonical signaling in osteoblasts [J]. J Cell Physiol, 2013, 228: 2149-58.
- 21 Liang W, Lin M, Li X, et al. Icaritin promotes bone formation via the BMP-2/Smad4 signal transduction pathway in the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line [J]. Int J Mol Med, 2012, 30: 889-95.
- 22 Xie L, Liu N, Xiao Y, et al. In Vitro and In Vivo Osteogenesis Induced by Icaritin and Bone Morphogenetic Protein-2: A Dynamic Observation [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 1058.
- 23 Cui Q, Xing JH, Yu M, et al. Mmu-miR-185 depletion promotes osteogenic differentiation and suppresses bone loss in osteoporosis through the Bgn-mediated BMP/Smad pathway [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3): 172.
- 24 中国工程院院士、中华医学会骨科学分会主任委员、中国医师协会会长张英泽. 总结经验, 更新理念, 坚定走老年骨科创新之路 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2020, 6(1): 1-2.
- 25 王治乾, 付明明, 尹英超, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情期间老年患者骨折流行病学特点分析 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2020, 6(1): 3-9.
- 24 邬波, 柳柳, 马旭, 等. 3D打印胶原/羟基磷灰石支架对骨髓间充质干细胞成骨分化的作用研究 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2020, 6(3): 123-127.

(收稿日期: 2020-03-21)

(本文编辑: 吕红芝)

张伟丽, 罗敏, 彭江, 等. BMP-2/Smads 信号通路促进骨代谢失衡大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2021, 7(2): 65-72.