

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.07.001

Wnt3a 协同 BMP9 调控间充质干细胞成骨分化及机制研究

张 晓¹, 徐道晶², 林良波¹, 梁 熙¹, 黄 伟¹

(重庆医科大学 1. 附属第一医院骨科; 2. 临床检验诊断学重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨经典 Wnt 信号通路与骨形态发生蛋白 9 (Bone morphogenetic protein 9, BMP9) 诱导间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 成骨的相互影响及分子机制。**方法:**以小鼠骨髓来源 MSCs C3H10T1/2 为目的细胞, 用 Wnt3a 上调经典 Wnt 信号通路, 联合 BMP9 作用于细胞, 通过碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性测定、钙盐沉积实验、real time PCR、免疫细胞化学染色等方法观测 BMP9 与经典 Wnt 信号通路联合后对 MSCs 成骨分化的影响。**结果:**Wnt3a 明显促进了 BMP9 诱导的 ALP 活性的增加 [$F=264.962, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-BMP9}=7.19, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-Wnt3a}=16.36, P=0.000$], 同时也明显增加了成骨标志物骨钙蛋白 (Osteocalcin, OC) [$F=3\ 920.102, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-BMP9}=39.10, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-Wnt3a}=62.56, P=0.000$] 和骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) [$F=1\ 935.824, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-BMP9}=40.88, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-Wnt3a}=56.42, P=0.000$] 的表达以及 Runx2 的 mRNA 的表达 [$F=3\ 635.980, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-BMP9}=79.37, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-Wnt3a}=86.96, P=0.000$], 并且还促进了钙盐沉积。**结论:**Wnt3a 与 BMP9 相互协同诱导 MSCs 的骨向分化, 其中成骨转录因子 Runx2 可能作为二者的交汇点起了重要作用。

【关键词】骨形态发生蛋白 9; Wnt3a; 间充质干细胞; 骨向分化**【中国图书分类法分类号】**R329.2*8**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-12-13

Mechanism of osteogenic differentiation for mesenchymal stem cells induced by BMP9 and Wnt3a in vitro

ZHANG Xiao¹, XU Daojing², LIN Liangbo¹, LIANG Xi¹, HUANG Wei¹

(1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital;

2. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To analyze the molecular mechanism of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by canonical Wnt3a signal pathway and bone morphogenetic protein 9 (BMP9). **Methods:** C3H10T1/2 cells were infected by recombinant adenovirus expressing BMP9 and Wnt3a, and then alkaline phosphatase (ALP), the early osteogenic marker, was detected by quantitative assay. Osteogenic differentiation marker at later stage, calcium deposition was determined by Alizarin Red S staining. The protein levels of osteocalcin (OC) and osteopontin (OPN) were detected by immunocytochemical staining. The expression levels of OC, OPN and Runx2 were analyzed by real time PCR. **Results:** Wnt3a enhanced the ability of BMP9-induced ALP activity ($F=264.962, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-BMP9}=7.19, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-Wnt3a}=16.36, P=0.000$) and increased expressions of OC ($F=3\ 920.102, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-BMP9}=39.10, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-Wnt3a}=62.56, P=0.000$) and OPN ($F=1\ 935.824, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-BMP9}=40.88, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-Wnt3a}=56.42, P=0.000$), with increase of mineral calcium deposition in vitro. Furthermore, Wnt3a increased the mRNA level of Runx2 ($F=3\ 635.980, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-BMP9}=79.37, P=0.000; t_{(BMP9+Wnt3a)-Wnt3a}=86.96, P=0.000$). **Conclusion:** Wnt3a, possibly through Runx2, acts synergistically on BMP9 induced osteogenic differentiation of MSCs.

【Key words】bone morphogenetic protein 9; Wnt3a; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种具有自我更新能力和多向分化增殖潜能的细胞, 可向成骨细胞分化并最终形成骨组织, 是骨组织工程医学研究的热点^[1]。MSCs 骨向分化过程是

一系列基因程序表达、精细调控的结果, 受多种生长因子调控^[2-4], 而阐明调控 MSCs 骨向分化的分子信号网络, 以促使其骨向分化并维持这种特性, 对组织工程骨的成功构建至关重要。

骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic proteins, BMPs) 属于转化生长因子 β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族, 是一类多功能的分泌型酸性糖蛋白信号分子, 是目前公认最强的、且唯一能

作者介绍: 张 晓 (1987-), 男, 硕士,

研究方向: 干细胞成骨。

通讯作者: 黄 伟, 男, 教授, Email: huangwei68@263.net。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 31070875)。

够诱导异位成骨的细胞因子^[5,6]。BMPs 与细胞表面的 BMP 受体 BMPR I 和 BMPR II 结合,激活下游的 R-Smad(Smad1/5/8),与 Co-Smad(Smad4)结合成复合体转位入核内与相应的转录因子结合调控靶基因的表达而调控细胞分化^[7]。BMPs 信号通路对于诱导 MSCs 骨向分化起了至关重要的作用,但是它并不是诱导 MSCs 骨向分化的唯一的信号通路,它与多种信号通路存在着复杂的“串话”,譬如,经典 Wnt 信号通路。

Wnt 信号通路作为参与胚胎及器官发育的主要信号转导途径之一^[8,9],包括经典 Wnt/ β -catenin 信号通路和非经典信号通路。其中经典 Wnt/ β -catenin 信号通路过程主要是:Wnts 蛋白与受体 Frizzled 结合后,在低密度脂蛋白受体相关蛋白的辅助下,激活胞质内的散乱蛋白(Dishevelled, Dvl/Dsh),进而使糖原合成激酶-3 β (Glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)磷酸化抑制其对胞浆内 β -catenin 的降解。胞浆内积聚的 β -catenin 最终转位入细胞核内,与核转录因子,如淋巴样增强因子-1(Lymphoid enhancer factor-1, LEF-1)或 T 细胞转录因子(T-cell transcription factor, TCF)共同作用调控目的基因的表达而调控细胞分化增殖^[10]。有研究证实,经典 Wnt 信号通路与骨骼生长发育和 MSCs 增殖、骨向分化密切相关。Li 等^[11]和 Kang 等^[12]均经实验证实,经典 Wnt 信号通路能够促进 MSCs 向成骨细胞分化。因此,作为调控干细胞骨向分化的两大信号系统,它们之间的串话以及这种串话的分子机制成为本实验探讨的重点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠骨髓来源 MSCs C3H10T1/2 细胞,结肠癌细胞 HCT116,表达 BMP9 的腺病毒 AdBMP9,表达 Wnt3a 的腺病毒 AdWnt3a,及表达绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)的对照病毒均为重庆医科大学临床检验诊断学重点实验室提供。

1.1.2 试剂 DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司,优质胎牛血清 FBS 购自 Gibco 公司。茜素红 S(Alizarin Red S)、维生

素 C、 β -磷酸甘油购自 Sigma 公司。RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,Real-time PCR 试剂盒、dNTP、RNA 酶抑制剂和随机引物购自 Takara 公司,M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司。碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)定量检测试剂盒购自 BD 公司,其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 Wnt3a 条件培养基的制备 HCT116 细胞培养于 100 mm 的细胞培养皿中,细胞长至 70%~80%,加入适量的 AdWnt3a,6~8 h 后换无血清的 DMEM 高糖培养基,分别于 24、48 h 收集上清加入 10% 的 FBS 即为所需条件培养基,1 周之内用完。

1.2.2 ALP 活性检测 将 C3H10T1/2 细胞接种于 24 孔板中,细胞密度 30%左右,细胞贴壁后分别用 AdGFP、AdBMP9、Wnt3a 条件培养基、AdBMP9+Wnt3a 条件培养基处理,即分为上述 4 组,7 d 后按试剂盒说明进行 ALP 活性测定,并用 BCA 法测定细胞内的总蛋白量,校正 ALP 的活性结果。

1.2.3 钙盐沉积实验 将 C3H10T1/2 细胞接种于 24 孔板中,密度 30%,细胞贴壁后分别用 AdGFP、AdBMP9、Wnt3a 条件培养基、AdBMP9+Wnt3a 条件培养基处理,培养 9 d 进行茜素红 S 染色:弃去孔内培养基,用 PBS 洗涤 3 次,洗净,每孔加入 0.05% 的戊二醛 200 μ l 固定 10 min,弃去戊二醛,用去离子水洗涤 3 遍,洗净,每孔加入 0.04% 的茜素红 S 250 μ l,显微镜下观察,出现红色沉淀即将染液弃去,镜下观察成像。

1.2.4 Real-time PCR 将 C3H10T1/2 细胞接种于 T-75 培养瓶中,密度 30%,贴壁后分别加入适量 AdBMP9、Wnt3a 条件培养基、AdGFP、AdBMP9+Wnt3a 条件培养基处理,于第 9 天按照 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,逆转录成 cDNA,Real-time PCR 检测成骨标志基因骨钙蛋白(Osteocalcin, OC)、骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)以及转录因子 Runx2 的 mRNA 的表达, β -actin 作为内参。数据分析采用比较 CT 法($\Delta\Delta CT$),相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta CT}=2^{-(\Delta CT_{处理}-\Delta CT_{对照})}=2^{-[(CT_{处理}-CT_{内参})-(CT_{对照}-CT_{内参})]}$,数据取 3 次重复的平均值。所用引物见表 1。

1.2.5 免疫细胞化学染色 将 C3H10T1/2 接种于 24 孔板中,密度 30%,细胞贴壁后用 AdGFP、AdBMP9、Wnt3a 条件培养基、AdBMP9+Wnt3a 条件培养基处理细胞,于 9 d 按照试剂盒说明用免疫细胞化学检测 OC、OPN 的表达。

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 17.0 软件包处理。所有数据均为计量资料,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间经方差齐性分析为齐性,采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准定为 $\alpha=0.05$ 。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Tab.1 Sequence of primers for Real-time PCR

基因	上游引物	下游引物
OC	5'-TCTGACAAAGCCTTCATGTCC-3'	5'-AAATAGTGATACCGTAGATGCC-3'
OPN	5'-ACACTTTCCTCAATCGTCC-3'	5'-TGCCCTTTCGGTTGTTGTC-3'
Runx2	5'-GGTGAAACTCTTGCCCTCGTC-3'	5'-AGTCCCAACTTCCTGTGCT-3'
β -actin	5'-CCTGAGGCTCTTTCCAGCC-3'	5'-TAGAGGCTTTACGGATGTC-3'

2 结果

2.1 Wnt3a 促进 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞的早期成骨分化

ALP 是成骨分化的早期标志。不同因素处理细胞 7 d 进行 ALP 活性的检测,结果显示 BMP9、Wnt3a、BMP9+Wnt3a 组与 GFP 组相比能分别诱导 C3H10T1/2 的 ALP 活性升高 ($F=264.962, P=0.000; t_{\text{BMP9}}=19.32, P=0.000; t_{\text{Wnt3a}}=10.22, P=0.000; t_{\text{Wnt3a+BMP9}}=25.57, P=0.000$),而 BMP9+Wnt3a 组与 BMP9、Wnt3a 单独处理组相比,ALP 的活性也明显增加 [$F=264.962, P=0.000; t_{(\text{BMP9+Wnt3a})-\text{BMP9}}=7.19, P=0.000; t_{(\text{BMP9+Wnt3a})-\text{Wnt3a}}=16.36, P=0.000$]。表明 Wnt3a 能促进 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞的早期成骨分化,从而使早期成骨指标 ALP 的活性增加。结果见表 2。

2.2 Wnt3a 促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞晚期成骨分化

钙盐沉积是细胞成骨分化的较晚期的检测指标,不同因素处理细胞 9 d 后通过茜素红 S 染色发现:与 Wnt3a、BMP9 单独处理组相比,BMP9+Wnt3a 组的钙盐结节明显增加。提示 Wnt3a 促进 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞的晚期成骨分化。结果见图 1。

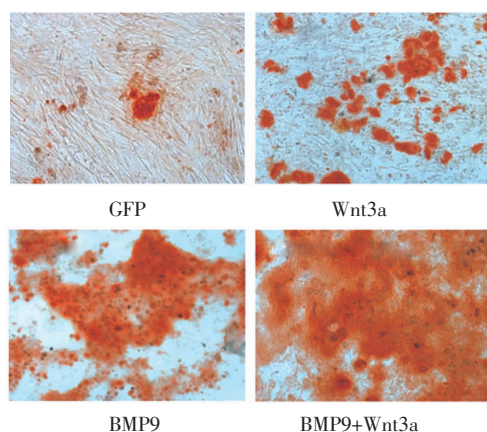


图 1 不同因素处理 C3H10T1/2 细胞后茜素红 S 染色 (100 ×)

Fig.1 Effect of different factors on osteogenic differentiation marker at later stage, mineral calcium deposition in C3H10T1/2 cells by Alizarin Red S staining (100 ×)

2.3 Wnt3a 促进了 BMP9 诱导的成骨相关基因 OC、OPN 的表达

C3H10T1/2 细胞用相应的处理因素处理后应用 real time PCR 检测第 9 天的 OC、OPN 的 mRNA 的表达。结果发现:

BMP9+Wnt3a 组与 BMP9、Wnt3a 单独处理组相比,成骨标志基因 OC 的 mRNA 的表达明显增加 [$F=3\ 920.102, P=0.000; t_{(\text{BMP9+Wnt3a})-\text{BMP9}}=39.10, P=0.000; t_{(\text{BMP9+Wnt3a})-\text{Wnt3a}}=62.56, P=0.000$],同时 OPN 的表达也明显增加 [$F=1\ 935.824, P=0.000; t_{(\text{BMP9+Wnt3a})-\text{BMP9}}=40.88, P=0.000; t_{(\text{BMP9+Wnt3a})-\text{Wnt3a}}=56.42, P=0.000$]。结果见表 2。

2.4 Wnt3a 促进了 BMP9 诱导的 OC、OPN 蛋白的表达

OC、OPN 作为成骨分化的中期标志,可以用来检测干细胞成骨情况。免疫细胞化学染色结果显示 BMP9+Wnt3a 联合组 OC、OPN 的表达明显高于 BMP9、Wnt3a 单独处理组。结果如图 2。

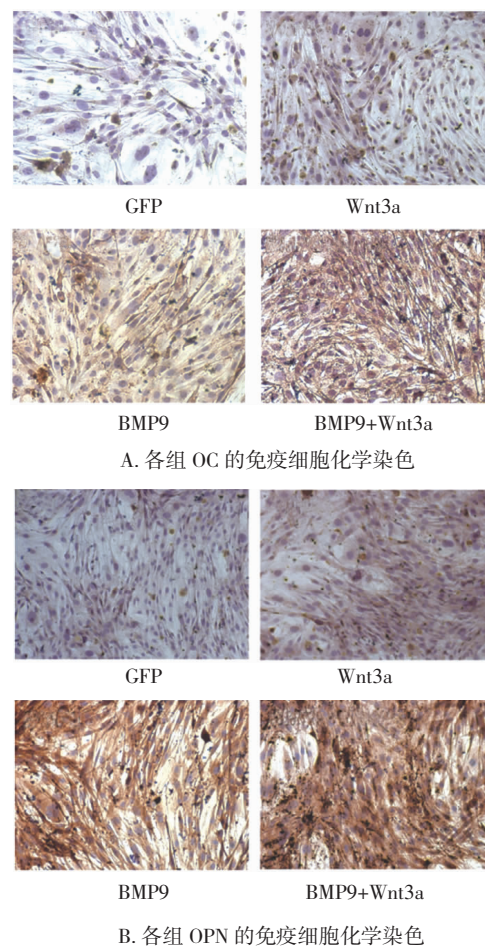


图 2 不同因素处理 C3H10T1/2 细胞后的免疫细胞化学染色 (150 ×)

Fig.2 Effect of different factors on expressions of OC, OPN in C3H10T1/2 cells by immunocytochemistry (150 ×)

表 2 不同因素处理 C3H10T1/2 细胞后 ALP、OC、OPN 和 Runx2 表达的检测

Tab.2 Effect of different factors on expressions of OC, OPN, Runx2 and ALP activity of C3H10T1/2 cells

分组	ALP活性	OC	OPN	Runx2
GFP	15 180 ± 2 421	1.00	1.00	1.00
Wnt3a	115 030 ± 3 565*	1.680 ± 0.026	1.770 ± 0.042	1.310 ± 0.066
BMP9	204 670 ± 4 064*	2.290 ± 0.036	2.170 ± 0.040	1.830 ± 0.035
BMP9+Wnt3a	274 920 ± 4 761*▲	3.310 ± 0.031▲	3.230 ± 0.045▲	7.220 ± 0.097▲

注:*,与空白组相比差异有统计学意义;▲,与 Wnt3a、BMP9 组相比,差异有统计学意义

2.5 Wnt3a 促进了 BMP9 诱导的转录因子 Runx2 的表达

Runx2 是 BMP 信号通路的重要转录因子,是 BMP 诱导干细胞成骨分化的关键控制基因。通过对第 2 天的 Runx2 的 mRNA 表达的检测发现:BMP9+Wnt3a 组 Runx2 的 mRNA 的表达明显高于 BMP9、Wnt3a 单独处理组 [$F=3\ 635.980$, $P=0.000$; $t_{(\text{BMP9+Wnt3a})-\text{BMP9}}=79.37$, $P=0.000$; $t_{(\text{BMP9+Wnt3a})-\text{Wnt3a}}=86.96$, $P=0.000$]。结果见表 2。

3 讨 论

在骨组织工程学的研究中,干细胞向成骨细胞的诱导分化是组织工程构建的重要环节。BMP 信号通路在诱导 MSCs 骨向分化过程中发挥了重要的作用,除了 BMP2、6、7 外 BMP9 也已经证实有很强的成骨活性,能诱导 C3H10T1/2 细胞的成骨分化^[13,14]。Wnt 信号通路是胚胎及器官发育的重要信号转导途径,其中有研究证实了经典 Wnt/ β -catenin 信号通路能促进干细胞向成骨细胞分化^[11,12]。本实验应用 AdBMP9 和 AdWnt3a 感染 C3H10T1/2 细胞上调 BMP、Wnt/ β -catenin 信号通路,结果同样证实了 BMP9 和经典 Wnt/ β -catenin 信号通路能促进 C3H10T1/2 细胞向成骨分化。

研究证实 BMP 信号通路和经典 Wnt/ β -catenin 信号通路都能促进 MSCs 成骨分化^[11-13,15],所以二者之间的相互影响是本实验的研究重点。通过本实验的研究发现应用 AdBMP9 和 AdWnt3a 联合刺激 C3H10T1/2 细胞后,Wnt3a 增强了 BMP9 诱导的早期成骨标志 ALP 的活性。Rawadi 等^[16]研究发现 BMP2 通过 Wnt 信号通路调控了 ALP 的表达,这与本实验的研究结果相一致。ALP 作为成骨的早期标志,不能有力的证明干细胞是否持续向成骨晚期分化。因此本实验进一步检测了中晚期成骨标志 OC、OPN 和钙盐沉积。结果发现,Wnt3a 同样增强了 BMP9 诱导的 OC、OPN 的表达和钙盐沉积。Mbalaviele 等^[17]发现 β -catenin 和 BMP2 间存在协同作用,可以显著地上调 OC 基因的表达,加速基质矿化和小鼠颅骨处的新骨形成。另有研究证实,Wnt/ β -catenin 信号通路增加了干细胞对成骨诱导因子如 BMP2 的敏感性,增强了其促进成骨矿化和新骨形成的能力^[18]。以上这些研究都与本实验的结果相一致。但是也有学者研究发现,Wnt3a 抑制了 MSCs 的成骨分化^[19,20],并且 Liu 等^[21]发现 BMP2 通过 Smad 1 和 Dvl 的相互影响抑制了 β -catenin 的活性从而抑

制了 Wnt3a 诱导的成骨前体细胞的增殖和分化。但是本实验的结果支持了 Wnt3a 增强了 BMP9 诱导的干细胞的成骨分化。而笔者认为造成这种差异的原因可能有以下几个方面:选取的实验细胞的差异;以及研究者所选择的检测作用位点和检测时间的差异造成了研究结果的差异甚至得出截然相反的结论。但是,通过本实验结果我们证实 BMP 信号通路与经典 Wnt/ β -catenin 信号通路存在协同作用,并且这种作用的分子机制还需要进一步阐明。

为了进一步研究 BMP 信号通路和经典 Wnt/ β -catenin 信号通路相互作用的机制,本实验检测了 Runx2 这一核转录因子的表达。Runx2 是介导成骨分化的重要的转录因子,是 BMP 信号通路的下游靶目标,在 BMP 诱导干细胞成骨分化过程中起了重要的作用^[22]。有实验已经证实 BMP2 在诱导成骨分化的过程中上调了 Runx2 的表达^[23]。并且有研究发现经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路在刺激成骨的过程中可能也上调了 Runx2 的表达^[24]。在本实验中 BMP9 与 Wnt3a 联合应用刺激 C3H10T1/2 成骨分化,通过 Real-time PCR 对 Runx2 的 mRNA 的检测发现二者联合应用后 Runx2 的表达高于 BMP9 和 Wnt3a 单独处理组。因此,推测 Runx2 在 BMP9 与 Wnt3a 协同刺激 C3H10T1/2 骨向分化过程中作为一个交汇点起了至关重要的作用。然而,这种交汇作用可能不是单独的转录因子或信号分子起作用,有实验证实 Runx2 能够与 Wnt 信号通路的转录因子 Lef1/TCF4 形成复合体调控下游靶基因的表达^[25]。因此 BMP 与经典 Wnt/ β -catenin 信号通路相互作用机制很复杂,这种复杂的分子机制还需要进一步实验阐明。

本实验研究证实 BMP 信号通路和经典 Wnt/ β -catenin 信号通路在 MSCs 骨向分化过程中起了协同作用。并且,Runx2 作为一个交汇点可能起了至关重要的作用。因此,下一步需要深入研究二者发挥协同作用的分子机制及是否存在其他的交汇点。

参 考 文 献

- [1] Pittenger M F, Mzckay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] Marie P J, Fromigulé O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Regen Med, 2006, 1(4): 539-548.

- [3] Deng Z L, Sharff K A, Tang N, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development[J]. Front Biosci, 2008, 1(13): 2001–2021.
- [4] Karsenty G, Wagner E F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development[J]. Dev Cell, 2002, 2(4): 389–406.
- [5] Gautschi O P, Frey S P, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications[J]. ANZ J Surg, 2007, 77(8): 626–631.
- [6] Ripamonti U. Soluble osteogenic molecular signals and the induction of bone formation[J]. Biomaterials, 2006, 27(6): 807–822.
- [7] Maeda S, Hayashi M, Komiya S, et al. Endogenous TGF- β signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells[J]. EMBO, 2004, 23(3): 552–563.
- [8] Glass D A, Karsenty G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone[J]. Endocrinology, 2007, 148(6): 2630–2634.
- [9] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998, 14: 59–88.
- [10] Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway[J]. J Cell Sci, 2002, 115(21): 3977–3978.
- [11] Li H X, Luo X, Liu R X, et al. Roles of Wnt/beta-catenin signaling in adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2008, 291(1–2): 116–124.
- [12] Kang S, Bennett C N, Gerin I, et al. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma[J]. J Biol Chem, 2007, 282(19): 14515–14524.
- [13] Luu H H, Song W X, Luo X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 2007, 25(5): 665–677.
- [14] Luther G, Wagner E R, Zhu G, et al. BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: molecular mechanism and therapeutic potential[J]. Curr Gene Ther, 2011, 11(3): 229–240.
- [15] Ling L, Nurcombe V, Cool S M. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells[J]. Gene, 2009, 433(1–2): 1–7.
- [16] Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, et al. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop[J]. J Bone Miner Res, 2003, 18(10): 1842–1853.
- [17] Mbalaviele G, Sheikh S, Stains J P, et al. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation[J]. J Cell Biochem, 2005, 94(2): 403–418.
- [18] Chen Y, Whetstone H C, Youn A, et al. β -catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation[J]. J Biol Chem, 2007, 282(1): 526–533.
- [19] Boland G M, Perkins G, Hall D J, et al. Wnt3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2004, 93(6): 1210–1230.
- [20] Li J, Khavandgar Z, Lin S H, et al. Lithium chloride attenuates BMP-2 signaling and inhibits osteogenic differentiation through a novel WNT/GSK3 β independent mechanism[J]. Bone, 2011, 48(2): 321–331.
- [21] Liu Z, Tang Y, Qiu T, et al. A dishevelled-1/Smad1 interaction couples WNT and bone morphogenetic protein signaling pathways in uncommitted bone marrow stromal cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(25): 17156–17163.
- [22] Kim H N, Min W K, Jeong J H, et al. Combination of Runx2 and BMP2 increases conversion of human ligamentum flavum cells into osteoblastic cells[J]. BMB reports, 2011, 44(7): 446–451.
- [23] Lee K S, Kim H J, Li Q L, et al. Runx2 is a common Target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(23): 8783–8792.
- [24] Gaur T, Lengner C J, Hovhannisyan H, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression[J]. J Biol Chem, 2005, 280(39): 33132–33140.
- [25] Xiao G, Jiang D, Ge C, et al. Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression[J]. J Biol Chem, 2005, 280(35): 30689–30696.

(责任编辑: 关蕴良)

《重庆医科大学学报》

欢迎赐稿、订阅

网址: cyxb.alljournals.ac.cn

邮发代号: 78–132