

基因与细胞治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000076

转化生长因子- β 1 促进骨形态发生蛋白 9 诱导
间充质干细胞成骨分化李锐冬¹, 邓忠良¹, 王攀², 孔瑜³, 汪洋¹, 尹良军¹, 陈亮¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院骨科, 重庆 400010; 2. 重庆市急救医疗中心创伤外科, 重庆 400014;

3. 重庆市传染病医疗救治中心急诊科, 重庆 400036)

【摘要】目的:探讨转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)在骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)成骨分化过程中的作用。**方法:**应用鼠 MSC C3H10T1/2, 以重组腺病毒法将 BMP9 导入, 施加 TGF- β 1 处理, 建立 BMP9 联合 TGF- β 1 诱导 MSC 成骨分化模型。改良 SEAP 化学发光法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性;茜素红 S 染色进行钙盐沉积检测;实时荧光定量 PCR 检测成骨相关基因 I a2 型胶原(collagen I a2, COL I a2)、骨桥素(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OCN)的 mRNA 转录表达水平, 免疫细胞化学法检测细胞内 OPN、OCN 表达变化。荧光素酶报告基因法检测信号通路的 Smad 水平。**结果:**TGF- β 1 与 BMP9 联合处理较 BMP9 单独处理能更早更多地提高 ALP 活性和引起钙盐沉积($F_{\text{处理}}=18\ 782.10, P=0.000$), 持续处理达 17 d 后不再显示明显差异, TGF- β 1 单独处理与对照组间无明显差异($F=1.03, P=0.318$)。TGF- β 1 与 BMP9 联合处理较 BMP9 单独处理可使 COL I a2、OPN、OCN mRNA 转录水平明显增高(COL I a2 的 $F_{\text{处理}}=250.30, P=0.000$; OPN 的 $F_{\text{处理}}=795.64, P=0.000$; OCN 的 $F_{\text{处理}}=206.55, P=0.000$), COL I a2 增高发生较早和显著($F=250.30, P=0.000$);细胞内 OPN、OCN 蛋白阳性表达显著增强。TGF- β 1 联合 BMP9 处理能刺激信号通路相应的 Smad 荧光素酶报告活性($\chi^2=32.84, P=0.000$)。**结论:**在 BMP9 诱导 MSC 成骨分化中, 联合应用 TGF- β 1 具有促进成骨作用, BMP9 与 TGF- β 1 在成骨分化中可能存在互补效应。

【关键词】骨形成蛋白 9; 转化因子 β 1; 间充质干细胞; 分化; 成骨

【中图分类号】R68

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-04

Promotion of bone morphogenetic protein 9-induced mesenchymal stem cell
osteogenesis by transforming growth factor- β 1Li Ruidong¹, Deng Zhongliang¹, Wang Pan², Kong Yu³, Wang Yang¹, Yin Liangjun¹, Chen Liang¹

(1. Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Traumatology, Chongqing Emergency Medical Center;

3. Department of Emergency, Chongqing Infectious Disease Medical Center)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on bone morphogenetic protein 9 (BMP9)-induced mesenchymal stem cells (MSCs) osteogenic differentiation. **Methods:** C3H10T1/2 cell line infected with BMP9 adenovirus and added with TGF- β 1 protein was used to create the osteogenic model. The modified SEAP chemoluminescence assay was used for alkaline phosphatase (ALP) activity. Alizarin red staining was used for mineralization. Real-time PCR and immunocytochemistry were used for bone markers collagen type I a2 (COL I a2), osteopontin (OPN) and osteocalcin (OCN). Luciferase reporter assay was used for detecting the Smad expression. **Results:** BMP9 combined with TGF- β 1 induced more ALP activities and mineralization ($F=18\ 782.10, P=0.000$) than single BMP9. However, there was no difference between single TGF- β 1 group and single GFP group after treating consecutively for 17 d ($F=1.03, P=0.318$). mRNA expression of OPN, OCN and COL I a2 was increased in BMP9 combined with TGF- β 1 group than in single BMP9 group ($F_{\text{COL I a2}}=250.30, P=0.000; F_{\text{OPN}}=795.64, P=0.000; F_{\text{OCN}}=206.55, P=0.000$). BMP9 combined with TGF- β 1 increased COL I a2 more significantly at earlier stage ($F=250.30, P=0.000$) and increased the protein expression of OPN and OCN in vitro. BMP9 combined with TGF- β 1 stimulated the activity of luciferase reporter of related Smads ($\chi^2=32.84, P=0.000$). **Conclu-**

作者介绍: 李锐冬, Email: stab_li@hotmail.com,

研究方向: 骨组织工程、骨再生与骨重建。

通信作者: 邓忠良, Email: deng7856@gmail.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000076.html>

sions: TGF- β 1 promotes BMP9-induced osteogenic differentiation in MSCs. TGF- β 1 and BMP9 might have synergistic effects.

【Key words】 bone morphogenetic protein 9; transforming growth factor- β 1; mesenchymal stem cells; differentiation; osteogenesis

合理应用细胞因子诱导间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)成骨分化是骨组织工程进行骨再生、骨重建的基础。骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)是近年研究发现成骨诱导能力最强的细胞因子之一^[1]。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是细胞和组织中最丰富的 TGF- β s 成员,是骨组织细胞的重要生长调节因子。与 BMPs 不同,TGF- β s 只能诱导定型骨祖细胞增殖分化,对未定型骨祖细胞无诱导作用^[2]。

本研究以重组腺病毒法进行 BMP9 定向诱导鼠 MSC C3H10T1/2 成骨分化^[3],施加 TGF- β 1 处理,观察 TGF- β 1 对 BMP9 诱导成骨分化中 I 型胶原、非胶原骨基质蛋白与矿化过程形成的影响,以及信号通路的中介分子 Smad 的相应变化,探讨 TGF- β 1 对 BMP9 诱导成骨分化的作用及其特点,为联合应用细胞因子诱导成骨的进一步工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

BMP9、TGF- β 1 重组腺病毒和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)空载腺病毒、荧光素报告基因质粒 p12xSBE-Luc 和 pBGLuc-Smad 由美国芝加哥大学骨与分子肿瘤研究中心构建提供;人胚肾 HEK293、鼠 MSC 株 C3H10T1/2、人结肠癌 HCT116 细胞株均购自美国模式菌种保藏中心(ATCC);DMEM 高糖培养基、MEM/EBSS 培养基购自美国 Hyclone 公司;BME 培养基、优质新生胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 细胞常规复苏、接种和传代培养。所用培养基含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 硫酸链霉素。

实验分组设计:(1)BMP 单独处理组(缩写为 BMP 组):向 C3H10T1/2 添加适量预先制备的 BMP9 腺病毒(感染效率 30%),8 h 后换 BME 培养基;(2)TGF- β 1 单独处理组(缩写为 TGF 组):向 C3H10T1/2 添加适量预先制备的 TGF- β 1 上清

液和 BME 培养基;(3)BMP9 与 TGF- β 1 蛋白联合处理组(缩写为 B+T 组):向 C3H10T1/2 添加适量预先制备的 BMP9 腺病毒(感染效率 30%),8 h 后弃去液体,添加预先制备的 TGF- β 1 条件培养上清液和 BME 培养基;(4)GFP 组(对照组)(缩写为 GFP 组):向 C3H10T1/2 添加适量预先制备的 GFP 腺病毒(感染效率 30%),8 h 后换 BME 培养基。实验是在相同实验环境下重复进行了 3 次实验,每次实验每种处理组均重复了 3 次,总共各分组样本量为 9 次。

1.2.2 条件培养基制备及应用 接种人结肠癌细胞 HCT116 至培养皿,待细胞贴壁细胞融合度达 80%后,加入适量 TGF- β 1 腺病毒(感染效率 70%),感染 3~5 h 更换为 BME 常规培养基,48 h 后收取上清液^[4];ELISA 双抗体夹心法检测 TGF- β 1 蛋白浓度,调整使用浓度为 5 ng/ml。

1.2.3 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测 按 3×10^4 个/孔接种 C3H10T1/2 细胞至 24 孔板,分组处理后培养至第 1、5、9 天,弃去培养基。细胞裂解 5 min 13 000 r/min 离心 3 min 取上清加入 20 μ l ALP 底物缓冲液混匀,室温避光 30 min,采用化学发光法检测。用 BCA 法检测细胞内总蛋白含量,校正 ALP 活性。

1.2.4 钙盐沉积实验 培养基中加入终浓度为 50 μ g/ml 的维生素 C 和 10 mmol/L 的 β -磷酸甘油,接种 C3H10T1/2 细胞于 24 孔板,按实验设计分组施加处理,连续培养至第 5、9、13、17 天后进行茜素红 S 染色:弃去培养基上清并以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)清洗,戊二醛固定后经 ddH₂O 清洗,加入 0.4% 茜素红 S,光镜下观察监测,待出现红色物质堆积时(约 5 min),弃去染液,ddH₂O 终止反应和洗涤,显微镜下观察并成像。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测成骨相关基因 mRNA 转录表达 常规接种培养 C3H10T1/2 细胞于 T-25 细胞培养瓶,细胞融合度 50%,维持 TGF- β 1 浓度并分组处理,培养至第 1、5、9、13 天进行检测。采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,测定浓度和纯度,按逆转录试剂盒说明书取 2 μ g 总 RNA 行逆转录反应。实时荧光定量 PCR 检测成骨相关基因 I a2 型胶原(Collagen I a2, COL I a2)、骨桥素(osteopontin, OPN)和骨钙素(osteocalcin, OCN)的转录表达,以 β -actin 基因作为内参照。反应体系为 SYB Green 10 μ l、ddH₂O 8 μ l、上下游引物分别 0.5 μ l、cDNA 1 μ l 共 20 μ l,循环次数 42 次。各样本在扩增效率一致的情况下用比较 CT 法($\Delta\Delta$ CT)测定平均相对含量。相对表达量= $2^{-\Delta\Delta$ CT}= $2^{-(\Delta$ CT 处理- Δ 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。所用引物序列如表 1。

表 1 COL I a2、OPN、OCN 和 β -actin 的 qPCR 引物

Tab.1 Primers of real-time PCR of COL I a2, OPN, OCN and β -actin

基因	正向引物	反向引物
COL I a2	AGCGAAGAACTCATACAGCCG	TGCCCCGTCTCTCATCCA
OPN	CTTTCACTCCAATCGTCCCTAC	CTGCCCTTTCCGTTGTGTC
OCN	GGACCATCTTTCTGCTCACTCTG	ACCTTATTGCCCTCCTGCTT
β -actin	CTGAGAGGGAAATCGTGCCT	CCACAGGATTCCATACCCAAGA

1.2.6 免疫细胞化学 C3H10T1/2 细胞常规接种, 分组处理, 换液维持 TGF- β 1 处理浓度, 连续培养共 9 d。于第 5 天和第 9 天分别进行 OPN 和 OCN 蛋白表达检测; 采用超敏二步法按试剂盒操作说明进行免疫细胞化学染色。OPN 单克隆抗体工作浓度 1:1 000, OCN 多克隆抗体工作浓度 1:500, 设立 PBS 缓冲液作为阴性空白对照, DAB 显色, 苏木精复染, 光镜观察。

1.2.7 荧光素酶报告基因实验检测信号通路的 Smad 水平 将对数生长期 C3H10T1/2 细胞按 1.2×10^5 个/瓶接种于 T-25 培养瓶中, 以 Invitrogen 的 Lipofectamine 2000 脂质体将带有 BMP 受体对应 Smad(BMP R-Smad)的荧光素报告基因质粒 p12xSBE-Luc 或者 TGF- β 受体对应的 Smad(TGF- β R-Smad)的荧光素报告基因质粒 pBGLuc-Smad 按要求处理, 对细胞进行转染。转染后 16 h, 将细胞以胰酶消化、重悬接种于 24 孔细胞培养板中, 加入培养基并施加 AdBMP9 和(或)AdR-TGF- β 1 处理。48 h 后弃去培养基, PBS 洗涤, 裂解细胞。按 Promega 荧光素试剂盒说明, 将上清液与荧光素酶底物充分混合, 比色分析法检测。

1.3 统计学分析

使用 SAS 8.0 软件进行统计学分析。数据成正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 偏态分布用中位数 $\pm$ 四分位间距 ($M \pm Q$) 描述。重复测量设计数据采用重复测量方差分析; 完全随机设计多组比较, 数据不满足参数检验条件, 采用非参数的 Kruskal-Wallis 秩和检验, 进一步两两比较采用 Bonferroni 的 Wilcoxon 秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 TGF- β 1 促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化早期 ALP 表达

图 1 所示: 虚线表示同等水平的 ALP 相对表达量在 3 个时间点坐标所处的位置, 重复测量方差分析表明: 4 处理组间、3 时间点间、处理与时间交互作用均存在统计学意义 ($F_{\text{处理}}=18\ 782.10, P=0.000; F_{\text{时间}}=26\ 593.00, P=0.000; F_{\text{处理与时间}}=9\ 468.75, P=0.000$)。TGF 组对 ALP 影响很低, 与 GFP 组无显著差异 (3 个时间点分别为 $F=0.00, P=0.998; F=0.30, P=0.588; F=1.03, P=0.318$), 即未见能使 C3H10T1/2 细胞发生早期定向成骨的分化, 故在之后的实验结果里省略 TGF 组的结果描述。BMP 组 ALP 活性增高, 而 B+T 组比 BMP 组能更早、更多的提高 ALP 活性, 从第 3 天即出现明显表达, 第 5 天有明显差异 ($F=4\ 396.92, P=0.000$), 第 9 天 ALP 活性已达到高峰 ($F=30\ 569.60, P=0.000$)。

2.2 TGF- β 1 促进 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨晚期钙盐沉积

第 5、9、13、17 天通过茜素红 S 染色发现: B+T 组从第 5 天就有少量的红色矿化钙结节产生 (图中黑色箭头所示), 而

BMP 组从第 13 天开始才具有成形的钙结节, TGF 组与 GFP 组未见明显差异。值得注意的是, 当到达第 17 天钙盐表达高峰期后, B+T 组与 BMP 组未见明显差异, 见图 2。

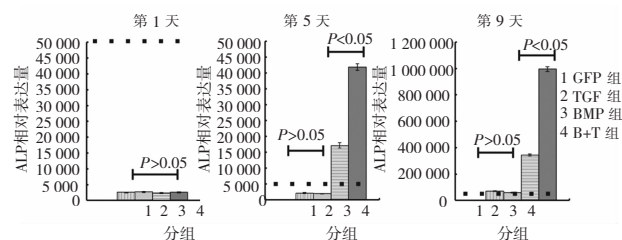


图 1 在 BMP9 和 TGF- β 1 诱导下 ALP 的活性变化

Fig.1 Changes in alkaline phosphatase activity under the inducement of BMP9 and TGF- β 1

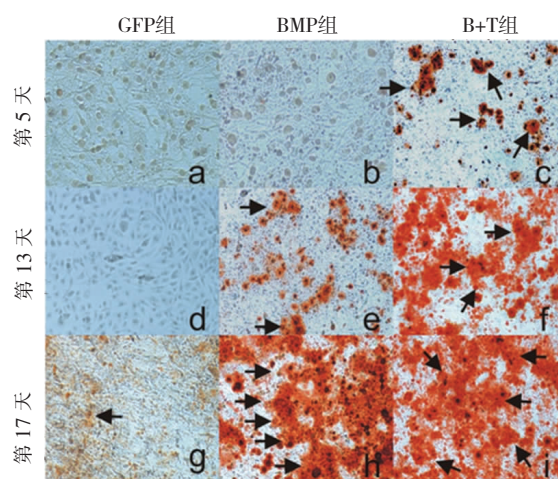


图 2 在 BMP9 和 TGF- β 1 联合诱导下钙盐沉积变化情况 (200 $\times$)

Fig.2 Mineralization under the inducement of BMP9 and TGF- β 1 (200 $\times$)

2.3 TGF- β 1 促使 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨相关基因转录水平增加

重复测量设计的 3 处理组、4 时间点、处理与时间交互作用均存在统计学意义 (其中 COL I a2 的 $F_{\text{处理}}=250.30, P=0.000; F_{\text{时间}}=5.75, P=0.012; F_{\text{处理与时间}}=7.10, P=0.002$ 。OPN 的 $F_{\text{处理}}=795.64, P=0.000; F_{\text{时间}}=375.97, P=0.000; F_{\text{处理与时间}}=177.83, P=0.000$ 。OCN 的 $F_{\text{处理}}=206.55, P=0.000; F_{\text{时间}}=335.17, P=0.000; F_{\text{处理与时间}}=127.01, P=0.000$)。B+T 组较 BMP 组的成骨相关基因转录水平有明显增高, 以 COL I a2 增高变化出现较早和明显 (分别为第 1 天的 $F=55.70, P=0.000$; 第 5 天的 $F=240.40, P=0.000$; 第 9 天的 $F=73.25, P=0.000$; 第 13 天的 $F=26.83, P=0.002$); 成骨中晚期指标 OPN 和 OCN 相继分别于第 5、9 天表达显著增高 (OPN 的 $F=71.72, P=0.000$; OCN 的 $F=78.80, P=0.000$)。见图 3。

2.4 TGF- β 1 促使 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨相关蛋白表达增加

免疫细胞化学技术分别检测细胞内第 5 天 OPN 蛋白和

第 9 天 OCN 蛋白表达,结果显示:GFP 组呈阴性表达,B+T 组和 BMP 组均出现阳性反应,胞质内呈现棕褐色颗粒均匀分布(图中白色箭头标识)。B+T 组阳性反应强于 BMP 组,阳性表达细胞广泛存在、分布密集、染色更深,见图 4。

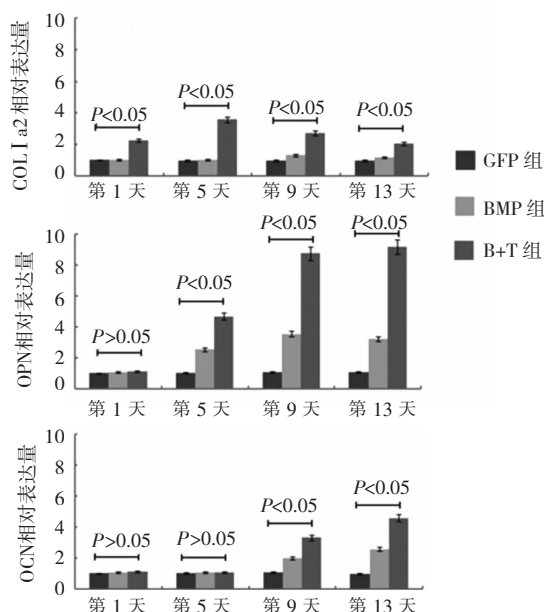


图 3 在 BMP9 和 TGF- β 1 诱导下成骨相关基因 mRNA 水平表达情况

Fig.3 mRNA expression of osteogenic markers under the inducement of BMP9 and TGF- β 1

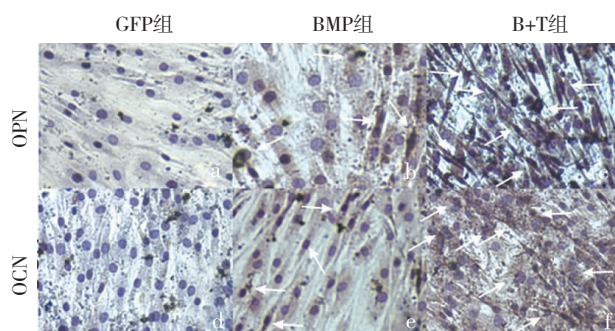


图 4 在 BMP9 和 TGF- β 1 诱导下成骨相关蛋白表达情况 (200 $\times$)

Fig.4 Immunocytochemical staining under the inducement of BMP9 and TGF- β 1 (200 $\times$)

2.5 TGF- β 1 联合 BMP9 处理刺激信号通路相应的 Smad 荧光素报告活性

完全随机设计的 B+T 组处理、以及 BMP9、TGF- β 1 单独处理均表现能刺激相应的 Smad 荧光素报告活性;亦可见 BMP9、TGF- β 1 单独处理能微弱地刺激对方不同的 Smad 荧光素报告活性($\chi^2=32.84, P=0.000$);B+T 组处理较 BMP9 单独处理明显降低了 BMP R-Smad 荧光报告活性($T=45, P=0.003$), B+T 组处理较 TGF- β 1 单独处理使 TGF- β R-Smad 荧光素报告活性亦有降低($T=45, P=0.003$)。见图 5。

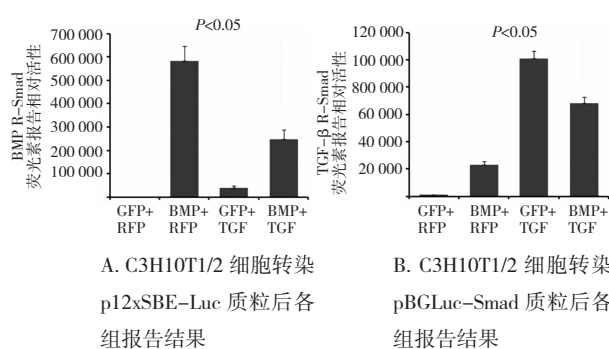


图 5 TGF- β 1 对 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化过程 Smad 信号水平的影响

Fig.5 Effect of TGF- β 1 on Smad signaling level of BMP9-induced C3H10T1/2 cells

3 讨论

MSC 应用于治疗骨科疾病如骨缺损、骨不连具备极大潜能^[5]。为了提高成骨效率,需要添加诱导因素以促进 MSC 分裂增殖并定向分化为确定性骨祖细胞。骨形成蛋白家族 BMPs 具有早期定向诱导 MSC 分化为确定性骨祖细胞的重要特点。BMP9 是近几年发现的成骨诱导潜力最强的、效果较理想的 BMP 家族成员^[3],为促进成骨干细胞增殖分化、骨再生和制作高效成骨植骨材料提供了重要支持^[6]。BMPs 主要通过经典的 BMP R-Smad 1、5、8 信号转导途径传递信号,并发挥诱导成骨等生物学效应^[7]。

BMP9 虽然可有效促进骨再生,但其成骨及骨再生效果仍然存在缺陷,主要如形成骨痂时间偏长或早期骨痂强度较差等,原因可能与 BMP9 这类 BMPs 因子促进骨胶原合成和成骨增殖分化能力有限有关^[8]。TGF- β 1 在骨祖细胞的成骨分化和骨改建过程中发挥重要作用。尽管 TGF- β s 和 BMPs 同属于 TGF- β 超家族成员,但 TGF- β s 对应 R-Smads 为 Smad2 和 Smad3。TGF- β 1 能促进产生 I 型胶原和非胶原骨基质蛋白,形成类骨质,促进骨组织的矿化,因而可增加骨组织的柔韧性和坚硬度。由此可以看出,TGF- β 和 BMP 在成骨中可能存在互补,TGF- β 1 的成骨效应恰好弥补了 BMPs 成骨的不足之处^[9]。

小鼠胚胎来源的 MSC C3H10T1/2 是最具有代表性的 MSC 实验株^[10]。本研究选用该细胞株进行 BMP9 腺病毒感染定向诱导成骨分化,通过条件培养基法获得含活性良好的 TGF- β 1 蛋白的上清液,ELISA 法检测调整使用浓度,施加处理,建立 BMP9

联合 TGF- β 1 诱导成骨分化体外模型。首先检测经典成骨指标 ALP 和钙盐沉积。ALP 作为成骨早期指标,表达高峰位于成骨诱导 5~7 d;钙盐沉积是细胞成骨分化晚期指标,通常在成骨诱导分化第 10 天以后开始表达,在 17~20 d 达到高峰^[11]。实验结果显示,TGF- β 1 联合 BMP9 比单独 BMP9 处理能更早更多地提高 ALP 活性和引起钙盐沉积,持续处理达到 C3H10T1/2 细胞的钙盐沉积高峰期后不再显示差异,说明在 BMP9 诱导细胞进入成骨方向基础上,TGF- β 1 有促进成骨分化作用。单独 TGF- β 1 不能使 C3H10T1/2 细胞发生早期定向成骨诱导分化,对未进入成骨方向的 MSC 没有促进成骨作用。

I 型胶原与骨基质非胶原蛋白紧密结合、相互作用是骨组织形成、矿化发生的基础,检测 COL I α 2 和 OPN、OCN 基因转录水平及原位蛋白表达变化显示,TGF- β 1 与 BMP9 联合处理组较 BMP9 单独处理组 COL I α 2、OPN、OCN 均有明显增高,变化趋势与 ALP、钙盐沉积检测结果相一致。I 型胶原增高表现最为突出,成骨诱导过程的早期即可见变化出现;成骨中晚期阶段 OPN、OCN 表现增高,发生时间偏晚,其中 OCN 增高发生更迟缓。骨质的形成、骨盐沉积的多少、骨组织矿化程度与 I 型胶原生成量有密切联系^[12-13]。OPN、OCN 对羟基磷灰石有很高的亲和力,能特异地与骨羟基磷灰石结合^[14]。据此认为,TGF- β 1 可以促进 BMP9 诱导成骨中 I 型胶原和 OPN、OCN 的基因转录和蛋白表达进而调控成骨活动。

荧光素酶报告基因实验检测信号通路的 Smad 水平结果显示,TGF- β 1 联合 BMP9 处理诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化过程发生了 Smad 信号通路活性水平相应变化,TGF- β 1 联合 BMP9 处理可使 BMP R-Smad 转录表达降低。该结果提示控制 TGF- β 1 蛋白的最佳浓度是提高 BMP9 联合 TGF- β 1 诱导成骨质量的关键因素;由于单独 BMP9 或 TGF- β 1 均能较弱地刺激对方的 Smad 活化,提示 BMP9 和 TGF- β 1 可能存在共同的分子信号途径,需要进一步认识分析。

本研究证实,在 BMP9 诱导 C3H10T1/2 MSC 成骨分化中,适量的 TGF- β 1 应用具有促进作用,BMP9 与 TGF- β 1 在成骨中可能存在协同作用、互补效应,具有应用前景,其联合作用中的特点及机制有待深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Deng ZL, Sharff KA, Tang N, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 2001-2021.
- [2] Stavroulaki E, Kastrinaki MC, Pontikoglou C, et al. Mesenchymal stem cells contribute to the abnormal bone marrow microenvironment in patients with chronic idiopathic neutropenia by overproduction of transforming growth factor- β 1[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(8): 1309-1318.
- [3] Luu HH, Song WX, 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.
- [4] Braam SR, Denning C, Matsa E, et al. Feeder-free culture of human embryonic stem cells in conditioned medium for efficient genetic modification[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(9): 1435-1443.
- [5] Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, et al. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering[J]. *Painminerva Med*, 2009, 51(1): 25-41.
- [6] Kang Q, Song WX, Luo Q, et al. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(4): 545-559.
- [7] Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation[J]. *Gene*, 2005, 357(1): 1-8.
- [8] Kanayama M, Hashimoto T, Shigenobu K, et al. A prospective randomized study of posterolateral lumbar fusion using osteogenic protein-1(OP-1) versus local autograft with ceramic bone substitute; emphasis of surgical exploration and histologic assessment[J]. *Spine*, 2006, 31(10): 1067-1074.
- [9] Knippenberg M, Helder MN, Doulabi BZ, et al. Differential effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β 1 on gene expression of collagen-modifying enzymes in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(8): 2213-2225.
- [10] Zhao L, Li G, Chan KM, et al. Comparison of multipotent differentiation potentials of murine primary bone marrow stromal cells and mesenchymal stem cell line C3H10T1/2[J]. *Calcif Tissue Int*, 2009, 84(1): 56-64.
- [11] Chen L, Jiang W, Huang J, et al. Insulin-like growth factor 2(IGF-2) potentiates BMP-9-induced osteogenic differentiation and bone formation[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(11): 2447-2459.
- [12] Peng M, Chen S, Fang W, et al. Effects of leptin on the expression of α 1(1) collagen gene in human osteoblast-like MG63 cells[J]. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88(4): 683-686.
- [13] Couchourel D, Aubry I, Delalandre A, et al. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(5): 1438-1450.
- [14] Khoshniat S, Bourguine A, Julien M, et al. Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium[J]. *Bone*, 2011, 48(4): 894-902.

(责任编辑:关蕴良)