孕期尼古丁暴露所致子代成骨细胞 BMP－4/Smad 信号通路的变化

王军建　刘　鑫　刘方娜　姚满叶　邓　宇

摘　要　目的　探究大鼠孕期尼古丁暴露对子代成骨细胞(OB)BMP－4/Smad 信号通路的影响。**方法**　将妊娠期大鼠分为对照组与实验组,对照组受孕第 9 天皮下注射 2mg/(kg·d)生理盐水,实验组在受孕后第 9 天于皮下注射 2mg/(kg·d)尼古丁,新生 3 天乳鼠处死后收集颅骨,采用钙钴法对 OB 碱性磷酸酶进行染色,反转录聚合酶链反应法(RT－PCR)测定 OB 细胞中骨形态发生蛋白 4 (BMP－4)、Smad1、Smad5、Smad8、Runt 相关转录因子 2(Runx－2)、成骨相关转录因子(Osterix)、Smads 泛素化调节因子 1(Smurf1)表达,免疫印迹法(Western blot)检测 OB 中 BMP－4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx－2、Osterix、Smurf1 蛋白表达。**结果**　ALP 染色显示 OB 细胞胞体较大,细胞核染色呈蓝紫色,细胞质呈淡紫色,对照组 ALP 细胞阳性率为 42.69% ±5.16%,高于实验组(18.67% ±3.19%),差异有统计学意义($P<0.05$)。RT－PCR 结果显示实验组 BMP－4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx－2、Osterix mRNA 表达量均低于对照组,Smurf1mRNA 表达量高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 法检测结果显示,实验组乳鼠 OB 中 BMP－4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx－2、Osterix 蛋白表达量均低于对照组,Smurf1 蛋白表达量高于对照组。蛋白条带灰度扫描结果显示,实验组乳鼠 OB 中 BMP－4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx－2、Osterix 蛋白相对灰度值均低于实验组,Smurf1 蛋白相对灰度值高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　大鼠孕期尼古丁暴露对 OB 具有一定的抑制作用,可能与上调 Smurf1 表达、抑制 BMP－4/Smad 信号通路和下调转录因子 Runx－2、Osterix 有关。

关键词　尼古丁暴露　子代乳鼠　成骨细胞　BMP－4/Smad 信号通路

中图分类号　R726.8　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2018.11.013

Changes of Osteoblast BMP－4/Smad Signaling Pathway Caused by Nicotine Exposure in Pregnancy. *Wang Junjian, Liu Xin, Liu Fangna, et al. Department of Orthopedics, Zhengzhou Children's Hospital, Henan 450018, China*

Abstract　Objective　To explore the influence of nicotine exposure in pregnancy on osteoblast (OB) BMP－4/Smad signaling pathway. **Methods**　Pregnant rats were divided into control group and experimental group, and the control group were injected with 2mg/(kg·d) salines ubcutaneously at 9th day in pregnancy, and the experimental group were injected with 2mg/(kg·d) nicotine. The skull was collected after offspring suckling mice killed at 3rd day. OB alkaline phosphatase was stained by using calcium cobalt method, and bone morphogenetic protein 4 (BMP－4), Smad1, Smad5, Smad8, Runt related transcription factor 2 (Runx－2), osteogenic associated transcription factor (Osterix) and Smads ubiquitination regulator 1(Smurf1) expression in OB cells were detected by using reverse transcription polymerase chain reaction method (RT－PCR). BMP－4, Smad1, Smad5, Smad8, Runx－2, Osterix, Smurf1 protein expression in OB cells were tested by using Western blot. **Results**　ALP staining showed that OB cells bodies were larger, the nuclei stained blue and purple, and cytoplasm was pale purple. The positive rate of ALP cells in the control group 42.69% ±5.16%, higher than that of (19.67% ±3.19%) in the experimental group, with statistically significant difference ($P<0.05$). The results of RT－PCR showed that BMP－4, Smad1, Smad5, Smad8, Runx－2, Osterix and mRNA expression levels in the experimental group were lower than those in the control group. The expression of Smurf1mRNA was higher than that of the control group, with statistically significant difference ($P<0.05$). The results of Western blot showed that BMP－4, Smad1, Smad5, Smad8, Runx－2 and Osterix expression in OB of the observation group were lower than those in the control group. The expression of Smurf1 protein was higher than that in the control group. The results expression levels of protein stripe gray scale scanning showed that the relative gray values of BMP－4, Smad1, Smad5, Smad8, Runx－2, OB and Osterix in the observation group were lower than those in the observation group, the relative gray value of Smurf1 protein was higher than that of the control group, with statistically significant difference ($P<0.05$). **Conclusion**　Nicotine exposure in pregnancy

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81502817)

作者单位:450018　郑州儿童医院骨科(王军建、刘鑫、刘方娜、姚满叶);430071　武汉大学中南医院骨科(邓宇)

通讯作者:姚满叶,主任医师,电子信箱:wangjunjian19844@sina.com

has a definite inhibitory effect on OB in rats, and it may be associated with BMP－4/Smad signaling pathways inhibition and down－regulation of transcription factors Runx－2, up regulation of Smurf1

Key words　Nicotine exposure; Offspring suckling mice; Osteoblast; BMP－4/Smad signaling pathways

吸烟或长期处于尼古丁环境中容易导致骨质疏松等病症发生，调查显示超过一半的女性在公共场所、家庭、工作场所中常接触尼古丁[1]。孕期则会使胎儿血液中尼古丁含量过高，导致早产、流产、新生儿猝死，出生后记忆、学习等方面存在缺陷，青春期身高低于同龄者[2]。最新研究显示成年后骨质疏松以及骨量丢失与胚胎发育存在一定的关系[3]。关于尼古丁对骨代谢的影响报道较多[4]，但对于孕期尼古丁暴露对骨发育机制的研究目前较少，本研究从成骨细胞分化的角度探究孕期长期暴露尼古丁对成骨细胞（osteoblast，OB）骨形态发生蛋白4（bone morphogenetic protein，BMP－4）/Smad信号通路的影响。

材料与方法

1. 实验材料：清洁级SD健康雌性与雄性大鼠由笔者医院动物实验中心提供，平均体重为233.46±46.28g，实验动物许可证号为：SYXK（京）2014－0023，本研究经动物伦理委员会批准同意，批号为IACUC－04（20140819）。每天18:00～20:00时将雌雄大鼠进行按照1:1比例进行合笼，清晨对雌性大鼠阴道涂片检测到精子者为受孕，挑选受孕后的雌鼠40只随机分为两组，即对照组与实验组，每组20只，实验组在受孕后第9天于皮下注射2mg/（kg·d）尼古丁，早晚各1次，每次注射量为1mg/kg，直至自然分娩[5]。对照组大鼠在相同时间内注射2mg/（kg·d）生理盐水，给药时间和给药部位均相同，期间饮食情况相同。

2. 试剂与仪器：尼古丁注射液购自于北京世桥生物制药有限公司；蛋白凝胶成像仪、荧光定量PCR仪购自于美国Bio－red公司，CO_2培养箱、显微镜购自于Nilkon公司。DMEM培养基购自于Hyclone公司，胎牛血清购自于美国Gibco公司，胰蛋白酶购自于美国Amresco公司，BCA蛋白浓度测定试剂购自于美国Bio－red公司，兔抗鼠BMP－4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx－2、Osterix单克隆抗体均购自于CST公司，Smurf1、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔单克隆抗体购自于美国R&D公司；ALP活性检测试剂盒、RNA提取和反转录试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司，2×SYBR Mix购自于宝生物工程（大连）有限公司。

3. 子代乳鼠处理：将新生3天子代乳鼠拉颈处死，浸泡在75%乙醇溶液进行脱水、消毒处理，在超净台中进行操作，PBS溶液清洗乳鼠，剪开颈部，收集颅骨，置放于PBS溶液中，剥离颅骨结缔组织，采用PBS溶液清洗骨片，加入0.25%胰酶溶液37℃处理10min，加入含10%胎牛血清的DMEM培养基离心终止消化，离心后收集沉淀加入PBS溶液清洗，将骨片剪碎成1mm×1mm碎片，加入0.1%Ⅱ型胶原酶37℃温育1h，加入含10%胎牛血清的DMEM终止消化，离心后收集沉淀加入PBS溶液清洗再次离心后沉淀为OB，加入15%胎牛血清的DMEM进行细胞培养，放置于37℃ 5% CO_2，培养箱中进行原代培养，当细胞贴壁生长数达到80%，进行传代培养。

4. OB细胞鉴定：将培养至第3代的OB放置盖玻片滴加含有β－甘油磷酸钠的培养基进行培养，待细胞生长覆盖载玻片后置于显微镜下对细胞形态进行鉴定。

5. 碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）染色率检测：OB细胞经过培养后用PBS溶液进行清洗，消化离心后保留细胞沉淀，加入培养基重悬细胞，接种于放置载玻片的6孔细胞培养板中，随后采用钙钴法进行染色，具体操作：常规制备石蜡切片，脱蜡后加入ALP孵育液，37℃孵育2h，蒸馏水冲洗2min，加入硝酸钴溶液37℃孵育5min，蒸馏水洗5min，加入1%的硫化铵中2min，切片放入硫化工作液，孵育2min，蒸馏水冲洗10min，采用不同浓度乙醇进行脱水处理，每次1min，置于二甲苯中进行透明处理3次，每次1min，最后在载玻片上加入中性树脂进行封片。将切片置于显微镜下，选取具有代表性的10个视野进行阳细胞计数；染色率（%）＝细胞染色数/细胞总数×100%。

6. RT－PCR法测定OB细胞中BMP－4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx－2、Osterix、Smurf1表达：采用RNA提取试剂盒对培养后的OB总RNA进行提取，采用反转录试剂盒（Thermo Fisher Scientific公司）对所提取RNA进行反转录为cDNA，BMP－4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx－2、Osterix、Smurf1以及内参GAPDH引物由广州Invitrogen公司合成，序列见表1。

反应体系:10×cDNA 模板 1μl,上下游引物各 0.5μl,H_2O 8μl, 2×SYBR Mix 10μl。按照反应程序 95℃ 3min,94℃ 10s、60℃ 20s,72℃ 2min,30 个循环,72℃ 10min。利用 CFX manager 3.0 软件进行 Cq 值分析,以 GAPDH 作为内参基因按照 $2^{-\Delta\Delta Cq}$算法进行基因相对定量表达分析。

表 1 RT-PCR 引物序列

检测指标/内参	方向	引物序列(5′→3′)
Smad1	正向	TGGTTCCAAGCAGAAGGAAG
	反向	TTCCTGATTCCTTCCACCAG
Smad5	正向	TTCCTGATTCCTTCCACCAG
	反向	TATGCTGGGCATGATCTGAG
Smad8	正向	GACACGTGTTTCCGCAGTC
	反向	GGGGTCTGTGAAGCCATCTA
BMP4	正向	GTTCAAGATTGGCTCCCAAG
	反向	CTTCCCGGTCTCAGGTATCA
Runx-2	正向	GCACTATCCAGCCACCTTCA
	反向	CTTCCATCAGCGTCAACA
Osterix	正向	GAGACTCAACAGCCCTGGG
	反向	GGGTGGGTAGTCATTGGCAT
Smurf1	正向	GGAATTCCATATGGACACTT
	反向	CCGCTCGAGGTTATAGTCCT
GAPDH	正向	GTCATCCATGACAACTTTGG
	反向	GAGCTTGACAAAGTGGTCGT

7. Western blot 法检测 OB 中 Smad1、Smad5、Smad8、BMP-4、Runx-2、Osterix、Smurf1 蛋白表达:在培养后的 OB 中加入蛋白裂解液在冰上进行 30min 裂解反应,置于离心机中 1200r/min 离心 10min 收集上清液,利用 BCA 法测定提取蛋白浓度,随后制备 8% 分离胶、12.5% 浓缩胶,蛋白上样量统一为 30μg,起始电压设置为 80V,样品进入分离胶后,电压调整为 120V,反应结束后将蛋白凝胶转移至 PVDF 膜上,在冰上保持 4℃,电压设置为 100V,进行 1h 转膜反应,加入 TBST 溶液进行清洗后,加入 5% 脱脂牛奶 37℃进行进行封闭 1h,将 PVDF 膜进行清洗,每次 10min。加入一抗稀释液(Smad1、Smad5、Smad8、BMP-4、Smurf1 抗体),4℃震荡过夜,加入 PBST 溶液清洗 3 次,每次 10min,加入二抗稀释液,室温下孵育 2h,PBST 清洗后用凝胶成像仪对蛋白表达结果进行分析。

8. 统计学方法:应用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 大鼠 OB 细胞鉴定:倒置显微镜观察初代细胞在培养第 4~5 天呈簇状生长,随着培养时间的延长细胞逐渐聚集形成纤维状,细胞呈梭形,紧密相邻(图 1A)。细胞培养至第 3 代时,细胞迅速贴壁均匀生长恢复至长梭形,细胞形态较单一(图 1B)。

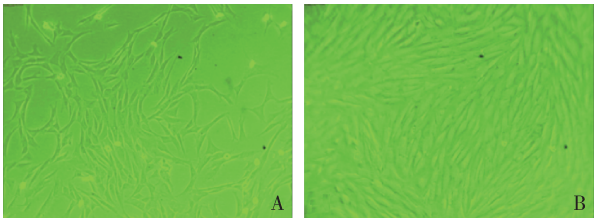


图 1　乳鼠 OB 细胞形态(ALP 染色,×100)
A. 原代乳鼠 OB 细胞;B. 第 3 代乳鼠 OB 细胞

2. 各组乳鼠 OB 细胞 ALP 染色率检测:ALP 染色显示 OB 细胞胞体较大,细胞核染色呈蓝紫色,细胞质呈淡紫色,对照组 ALP 细胞染色率(42.69±5.16)%高于实验组(18.67±3.19)%,差异有统计学意义($P<0.05$),详见图 2。

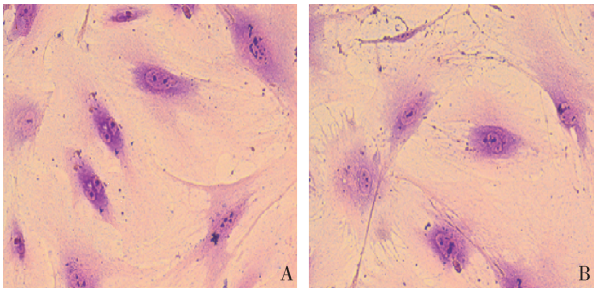
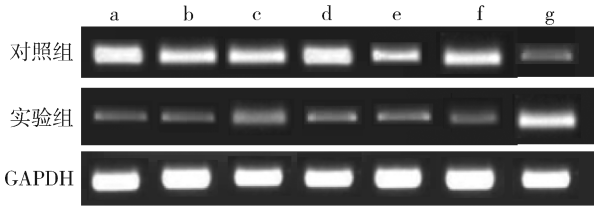


图 2　OB 细胞 ALP 染色(×400)
A. 对照组;B. 实验组

3. OB 细胞中 BMP-4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx-2、Osterix、Smurf1 表达:RT-PCR 结果显示实验组 BMP-4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx-2、Osterix mRNA 表达量均低于对照组,Smurf1 mRNA 高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),详见图 3。

4. 各组乳鼠 OB 中 BMP-4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx-2、Osterix、Smurf1 蛋白表达:Western blot 法检测结果显示,实验组乳鼠 OB 中 Smad1、Smad5、Smad8、BMP-4、Runx-2、Osterix 蛋白表达量均低于对照组,Smurf1 蛋白表达量高于对照组。蛋白条带灰度扫描结果显示,实验组乳鼠 OB 中 BMP-4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx-2、Osterix 蛋白相对灰度值均低于实验组,Smurf1 蛋白相对灰度值高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),详见图 4,表 2。



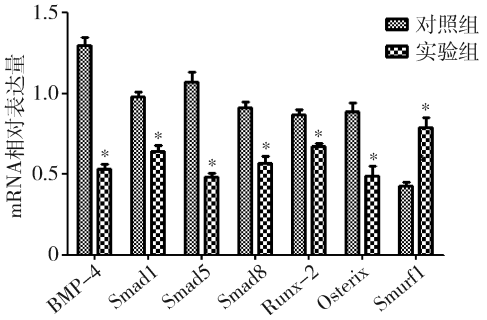


图 3　OB 细胞中 BMP－4、Smad1、Smad5、Smad8、Runx－2、Osterix、Smurf1 mRNA 表达

a. BMP－4；b. Smad1；c. Smad5；d. Smad8；e. Runx－2；f. Osterix；g. Smurf1；与对照组比较，* $P<0.05$

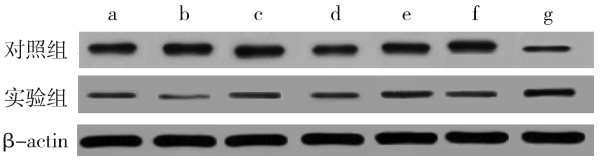


图 4　OB 中 Smad1、Smad5、Smad8、BMP－4、Runx－2、Osterix、Smurf1 蛋白表达

a. BMP－4；b. Smad1；c. Smad5；d. Smad8；e. Runx－2；f. Osterix；g. Smurf1

讨　　论

机体内骨含量保持稳定主要依靠骨重建，成骨细胞是骨形成中重要的功能细胞，在骨基质形成、分泌、矿化中发挥重要作用。尼古丁是烟草的主要成分，胚胎发育时期或儿童期长期接触尼古丁会导致器官功能、组织、基因表达发生变化，对于少年时期到成年甚至整个生命过程造成严重的威胁[6]。有较多研究显示胚胎早期骨发育缺陷与后期骨病存在密切的相关性，因此探究孕期尼古丁暴露对于子代成骨的影响十分重要[7,8]。

表 2　OB 中 Smad1、Smad5、Smad8、BMP－4 等蛋白扫描灰度值（$\bar{x}\pm s$，$n=20$）

组别	BMP－4	Smad1	Smad5	Smad8	Runx－2	Osterix	Smurf1
对照组	0.86±0.37	0.92±0.26	0.95±0.34	0.84±0.22	0.93±0.36	0.94±0.38	0.34±0.07
实验组	0.34±0.18	0.21±0.13	0.32±0.17	0.26±0.15	0.37±0.19	0.24±0.13	0.79±0.13
t	5.652	10.923	7.412	9.741	6.152	7.795	13.630
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

目前检测成骨细胞的方式主要有 ALP 染色法、Ⅰ型胶原以及钙结节观察法，对细胞成骨分化能够进行充分的鉴定，且操作简便，是评价骨代谢的重要方式[9~11]。本研究经过传代培养显示细胞具有成骨细胞的形态以及特征，表明所培养的细胞为 OB 细胞，且具有一定的成骨能力。但本研究中 ALP 染色显示在实验组中 OB 细胞 ALP 阳性表达率明显低于对照组，表明孕期长期摄入尼古丁对成骨细胞的分化具有一定的抑制性作用，相关研究显示 ALP 是成骨分化的重要标志性酶，主要出现在骨钙化前，这一结论支持本研究观点[12]。

较多研究均已证实 BMP 是诱导 OB 细胞成骨分化的一类细胞因子，在胚胎发育中发挥重要的促进作用，在成骨细胞增殖、分化中起着关键性作用，BMPs 与细胞膜受体结合后激活蛋白激酶，使 Smad1、Smad5、Smad8 在细胞核内与 Smad4 形成复合物后与 DNA 蛋白结合激活下游相应靶基因发生转录[13~15]。BMP－4 在胚胎时期骨骼发育中十分重要，能够促进骨髓间充值干细胞分化以及软骨生长，体内以及体外研究也显示 BMP－4 能够诱导软骨与骨的形成[16]。Smad 蛋白是细胞内信号转导中介蛋白，核外细胞因子经过 Smad 将信号传入细胞核内激活各类转录因子，促进细胞定向分化。体外研究显示 BMP－4/Smads 信号通路在成骨各个阶段如成骨细胞分化中起着重要的调控作用[17,18]。动物研究显示 BMP－4/Smads 信号缺失后成骨细胞功能以及骨骼发育均存在一定的缺陷，增强 BMP－4/Smads 信号后能够增强成骨细胞相关特异基因的表达[19]。最新国外研究显示 BMP－4/Smads 信号通路障碍能够抑制骨形成以及骨量减少[20]。本研究通过不同检测方式结果显示，实验组 BMP－4、Smad1、Smad5、Smad8 基因与蛋白表达量明显低于对照组，表明孕期长期接触尼古丁对于子代 BMP－4/Smads 信号通路具有一定的抑制作用。

Artigas 等[21] 和 Xu 等[22] 研究显示，OB 细胞中 Runx－2、Osterix 在 OB 分化中发挥重要作用，是 OB 细胞核内重要转录因子。动物研究证实 Runx－2 基因缺失后骨细胞无分化能力，Osterix 基因敲除后 OB 细胞丧失分化功能，骨形成受到阻碍[23,24]。体内外研究均显示 BMP－4/Smads 信号缺失能够抑制转录因子 Runx－2、Osterix 的表达[25~27]。本研究显示实

验组 Runx－2、Osterix 基因与蛋白表达量均低于对照组，说明 OB 细胞分化受到一定的抑制，可能是 BMP－4/Smads 信号通路障碍导致信号传输中断影响细胞核内 Runx－2、Osterix 的表达，进而影响 OB 细胞分化。Smurf1 属于 E3 泛素连接酶 HectA 区域成员，通过与 Smad1、Smad5、Runx2 等相互作用，使 BMP 信号通路蛋白降解，从而负性调控 BMP 信号通路[28]。动物研究显示，Smurf1 缺失小鼠生长正常，且由于 Smurf1 缺失引起 BMPs 活性增强，导致成骨细胞活性增强，从而表现出年龄依赖性的骨量增加，说明 Smurf1 缺失有利于成年小鼠的骨形成[29]。本研究显示实验组 Smurf1 表达高于对照组，说明 Smurf1 活性增强后可抑制 BMP－4/Smads 信号通路，进而抑制 OB 细胞分化，结合以上研究提示 Smurf1 可能负调控 BMP－4/Smads 信号通路，进而影响 OB 分化。

本研究还存在一定的不足，由于研究条件有限，对尼古丁注射液剂量并未进行深入研究，仅进行预实验观察，因此整个实验结果受限。总之，孕期尼古丁暴露对子代乳鼠 OB 细胞分化存在一定的抑制，可能与阻碍上调 Smurf1 表达、抑制 BMP－4/Smads 信号通路、转录因子 Runx－2、Osterix 的表达有关。

参考文献

1 平小红，王凤娇，裴玉梅，等. 室内环境空气中尼古丁含量测定[J]. 中国公共卫生，2014，30(6)：833－834

2 俞峰. 妊娠期尼古丁对胎儿和子代心律失常的影响[D]. 苏州：苏州大学，2010

3 宋淑军，张文颖，司少艳，等. 孕期 VD 缺乏以及对胎儿的影响[J]. 中国骨质疏松杂志，2013，19(9)：998－1002

4 杨阳，王亚薇，马信龙，等. 长期尼古丁摄入对大鼠骨内微结构及机体氧化应激状态影响的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志，2016，30(12)：1493－1497

5 上官杨帆，汪晖，谭杨，等. 孕期尼古丁暴露致子代宫内发育迟缓大鼠骨关节炎易感[J]. 华中科技大学学报：医学版，2015，44(6)：648－651

6 姚跃英，郑幼卿，王容美. 被动吸烟对儿童健康状况的影响[J]. 暨南大学学报：自然科学与医学版，2014，35(5)：490－493

7 Wang L, Mishina Y, Liu F. Osterix－Cre transgene causes craniofacial bone development defect[J]. Calcifi Tissue Int, 2015, 96(2): 129－131

8 宋翼升，张立将，周国亮，等. 云南白药对大鼠的胚胎－胎仔发育毒性的影响[J]. 中华中医药学刊，2014，7：1609－1611

9 宋红，黄华，王伟，等. 不同性别及年龄因素对原发性骨质疏松症骨代谢指标、血清骨保护素及骨密度影响的研究[J]. 中国骨质疏松杂志，2015，21(10)：1161－1164

10 张珠，尹美珍，易继凌，等. 氯原酸对成骨细胞 I 型胶原及骨钙蛋白基因表达的影响[J]. 武汉理工大学学报，2014，36，288(12)：49－53

11 陈宗锋，赵汝岗，张强，等. 替诺福韦酯对小鼠成骨细胞 MC3T3－E1 增殖、凋亡及矿化的影响[J]. 中国骨质疏松杂志，2016，22(5)：596－601

12 李丽婷，朱亦堃，郗光霞，等. PPARγ2 内源性配体 15d－PGJ2 对成骨细胞骨代谢相关基因表达的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志，2010，3(1)：28－33

13 Huo L, Liu K, Pei J, *et al*. Flouride promotes viability and differentiation of osteoblast－like Saos－2 cells Via BMP/Smads signaling pathway[J]. Biol Trace Element Res, 2013, 155(1): 142－149

14 Wong YL, Behringer RR, Kwan KM. Smad1/Smad5 signaling in limb ectoderm functions redundantly and is required for interdigital programmed cell death[J]. Dev Biol, 2012, 363(1): 247－257

15 阮文东，雪原，宗亚琪，等. pELNS—BMPs 与 pELNS—Wnt3a 联合构建表达对成骨细胞系成骨效能的作用研究[J]. 中华骨科杂志，2016，36(5)：283－291

16 李海太，申才良，宋旆文，等. BMP－4 对大鼠骨髓间充质干细胞与神经干细胞共培养转归影响的实验研究[J]. 安徽医科大学学报，2016，51(2)：205－209

17 Yang J, Xu T, Yuan X, *et al*. Single nucleotide polymorphisms in BMP/Smad4/Hamp are associated with outcome of patients receiving definitive radiation therapy for non－small cell lung cancer[J]. Int J Radiat Oncol Biol Physics, 2016, 96(2): 156－157

18 曹俊杰，李爱芳，卫亚琳，等. Notch 信号参与 BMP4 诱导的间充质干细胞成骨分化及其机制的初步探讨[J]. 中国生物工程杂志，2017，37(4)：48－55

19 Lee MH, Kwon TG, Park HS, et al. BMP－2－induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Rimx2[J]. Biochem Biophys Res Communi, 2003, 309(3): 689－694

20 Rodda SJ, Mc Mahon AR. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wntsignaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors[J]. Development, 2006, 133(16): 3231－3244

21 Artigas N, Urena C, Rodríguez－Carballo E, *et al*. Mitogen－activated protein kinase (MAPK)－regulated interactions between Osterix and Runx2 are critical for the transcriptional osteogenic program[J]. J Biol Chem, 2014, 289(39): 27105－27117

22 Xu J, Li Z, Hou Y, *et al*. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Am J Translat Res, 2015, 7(12): 2527

23 Wei J, Shimazu J, Makinistoglu MP, *et al*. Glucose uptake and runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation[J]. Cell, 2015, 161(7): 1576－1591

24 Sinha KM, Yasuda H, Zhou X, *et al*. Osterix and NO66 histone demethylase control the chromatin of osterix target genes during osteoblast differentiation[J]. J Bone Mineral Res, 2014, 29(4): 855－861

25 尹素娟，张荣华，朱晓峰，等. rhTGF－β－1 对 SD 大鼠 MSCs 骨向分化的影响及机制研究[J]. 中国病理生理杂志，2014，30(3)：460－466

26 於绍龙，刘丹平. 成骨因子 BMP－2/Smads/Runx2 信号转导通路[J]. 辽宁医学院学报，2014，35(5)：94－96

27 Jeong HM, Choi YH, Jeong HG, *et al*. Bromopropane compounds inhibit osteogenesis by ERK－dependent Runx2 inhibition in C2C12 cells[J]. Arch Pharm Res, 2014, 37(2): 276－283

28 Wei J, Ferron M, Clarke C J, *et al*. Bone－specific insulin resistance disrupts whole－body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation[J]. J Clin Invest, 2014, 124(4): 1－13

29 Yamashita M, Ying SX, Zhang GM, *et al*. Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation[J]. Cell, 2005, 121(1): 101－113

（收稿日期：2017－07－21）
（修回日期：2018－01－19）