

orexin-1 受体抑制剂通过 Wnt 通路促进骨髓间充质干细胞的成骨分化

张丽媛^{1*} 纳青青¹ 吴天秀¹ 李近² 吴敬开² 刘钰瑜²

1. 广东医科大学解剖学教研室, 广东 湛江 524023

2. 广东医科大学药理学教研室, 广东 湛江 524023

中图分类号: R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 05-0606-06

摘要: 目的 研究 Wnt/ β -catenin 信号通路对 orexin-1 受体抑制剂介导大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化的影响。方法 (1)分离提取 SD 大鼠股骨、胫骨的 BMSCs,用流式细胞仪进行细胞表型鉴定;(2)实验分组:对照组、 10^{-5} mol/L、 10^{-6} mol/L 质量浓度的 orexin-1 受体抑制剂溶液,于成骨诱导第 5 天免疫印迹法和实时荧光定量 PCR 法观察 Wnt/ β -catenin 信号通路关键靶点蛋白 Dickkopf-1、Gsk3 β 、 β -catenin 以及基因 Gsk3 β 、 β -catenin mRNA 表达,以观察 Wnt 信号通路对 orexin-1 受体抑制剂诱导大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响。结果 10^{-5} mol/L、 10^{-6} mol/L 的 orexin-1 受体抑制剂处理 BMSCs 5 天后, Dickkopf-1、 β -catenin 和 GSK3 β 蛋白表达升高, β -catenin 和 GSK3 β mRNA 表达升高。结论 orexin-1 受体抑制剂促进大鼠骨髓基质干细胞向成骨细胞方向分化的作用可能与调控 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

关键词: 骨髓间充质干细胞; Wnt/ β -catenin 信号通路;成骨分化

In vitro study on the effect of Wnt signaling pathway on orexin-1 receptor inhibitor induced osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells

ZHANG Liyuan^{1*}, NA Qingqing¹, WU Tianxiu¹, LI Jin², WU Jingkai², LIU Yuyu²

1. Department of Anatomy, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

2. Department of Pharmacy, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

Corresponding author: ZHANG Liyuan, Email: zmdjzly@126.com

Abstract: **Objective** To observe the effect of Wnt/intracellular beta chain protein (β -catenin) signaling pathway on orexin-1 receptor inhibitor induced osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in rats. **Methods** (1) Isolated the bone marrow mesenchymal stem cells from one-month SD rats by whole bone marrow culture method and identified the cell surface antigen by flow cytometry. (2) Experimental groups: control group, and 10^{-5} mol/L or 10^{-6} mol/L orexin-1 receptor inhibitor solution groups. At day 5 the mRNA expression of Gsk3 β and β -catenin were detected by real-time quantitative PCR. The protein expression of Dickkopf1, Gsk3 β and β -catenin were detected by Western blot. **Results** Orexin-1 receptor inhibitor up-regulated Gsk3 β and β -catenin mRNA expression at concentrations of 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L for 5 days. Orexin-1 receptor inhibitor up-regulated Dickkopf1, Gsk3 β and β -catenin protein expression at concentrations of 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L for 5 days ($P < 0.05$). **Conclusion** The effect of orexin-1 receptor inhibitor on osteogenic differentiation of MSCs maybe closely related to the regulation of Wnt/catenin signaling pathway.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Wnt/ β -catenin signaling pathways; Osteogenic differentiation

Orexins 是神经细胞用来进行相互通讯的一种蛋白,自 15 多年前德克萨斯大学西南医学中心的研

究人员发现 Orexins 以来,它们被证实调控了许多的行为,包括觉醒、食欲、报偿、能量消耗和失眠^[1]。目前对其研究,最为熟知的就是 Orexin 缺陷可引起发作性睡病——自发性日间嗜睡。因此,orexin 拮抗剂有望治疗失眠症,其中默沙东制药公司的 suvorexant 已经 2014 年 8 月被 FDA 批准上市。

基金项目: 2014 年广东医学院科研基金(2XJ1401P);2015 年湛江市非资助科技攻关计划项目(2015B01083);2015 年湛江市资助科技攻关计划(2015A01030)

* 通讯作者: 张丽媛,Email: zmdjzly@126.com

近年来,越来越多的证据显示,神经肽,比如 neuromedin U (NMU) 和神经肽 Y (NPY), 可以通过中枢和局部功能调节骨骼内稳态^[2], 然而, 神经肽 orexin 是否也能调节骨量还是未知的。在对 orexins 生理功能的研究过程中, 德克萨斯大学西南医学中心的研究人员和日本的同事们一起, 发现缺失 orexins 的小鼠骨骼非常的薄且脆, 很容易折断^[3]。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种存在于骨髓内来源广泛、易于扩增、具有多种分化潜能的非造血干细胞, 在不同条件下分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、胆道上皮细胞等多种细胞^[4-5]。MSCs 成骨分化能力下降是骨质疏松症发生的重要原因, Wnt 通路是调控骨髓间充质干细胞分化的重要通路。目前国内关于 orexin-1 系统与骨代谢的报道较少, 因此本研究通过探讨 Wnt 通路对 orexin-1 受体抑制促进大鼠 BMSCs 成骨分化的影响, 为开发新的治疗骨质疏松症的药物提供新的观点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

由广东医学院试验动物中心 SPF 级动物室提供 1 月龄大鼠 10 只, 雌雄各半, 体重 $70 \pm 10\text{g}$ (广东省动物质量合格证: scxk (粤) 2004-2008; 实验动物环境设施合格证: 2008B012)。实验过程动物处理符合医学伦理学标准。

1.1.2 药物和试剂

DMEM 低糖培养液: Gibco 公司; 胎牛血清: Hyclone 公司; 0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA) Sigma 公司; 美国 Gibco 公司; BCA 蛋白定量试剂盒: Beyotime; Dickkopf-1 Abcam; 噻唑蓝 (MTT): 美国 SIGMA 公司; orexin-1 受体抑制剂 (SB408124): 英国 TOCRIS 公司, 批次: S154501; wnt3a 购自 R&D 公司; 逆转录试剂盒: Takara 公司; PCR 试剂盒: Takara 公司。

1.1.3 仪器

BOXUN 超净工作台: 上海博讯实业有限公司医疗设备; 2424-2 型二氧化碳恒温培养箱: 美工 SHELLAB 公司; XD-101 倒置相差显微镜: 江南光电股份有限公司; TMQ-R-3250 自动台式灭菌器: 山东新华医疗器械股份有限公司; 流式细胞仪 FASC Aria: 美国 BD 公司; 超纯水系统: 美国 Millipore 公司; 定量光度仪: 德国 eppendorf 公司; 定时定量 PCR

仪: 瑞士罗氏公司; 电泳仪: BIO-RAD。

1.2 方法

1.2.1 细胞收集

采用传代贴壁法分离纯化大鼠骨髓基质干细胞, 具体步骤: 1 月龄 SPF 级 SD 大鼠 6 只, 雌雄各半, 颈部脱臼后, 浸泡于 75% 酒精 10 min, 无菌分离大鼠两侧的股骨, 75% 酒精浸泡, 无菌 PBS 中浸泡, DMEM (L) 中浸泡, 去除软组织, 用 8 mL 不完全 DMEM (L) 培养基冲洗骨髓腔, 收集冲洗出的细胞液吹打混匀, 1000 rpm 离心 10 min 后, 弃上清液, 沉淀用含 10% FBS 的 DMEM (L) 培养液重悬, 以 $1 \times 10^7/\text{cm}^2$ 密度接种到 25cm^2 培养瓶中, 置于 37°C , 5% CO_2 饱和湿度的培养箱内静置培养, 48 h 后首次全量换液去除悬浮细胞, 此为原代细胞 P_0 , 以后每 2~3d 全量换液一次。

1.2.2 大鼠骨髓基质干细胞鉴定

1.2.2.1 大鼠骨髓基质干细胞的形态学观察: 采用倒置相差显微镜逐日观察细胞的生长情况及一般形态特征。

1.2.2.2 流式细胞术对细胞表面标志物的鉴定: 取生长状态良好的 BMSCs P_3 细胞, 胰酶消化后 1000 rpm, 10 min 离心后弃去上清, 加 PBS 液 1000 rpm, 10 min 重悬三次, 制成单细胞悬液, 用 PBS 稀释相应抗体。实验分 4 组: 对照组、CD90-PE 组、CD29-FITC 组、CD45-PE-CY5 组、CD90-PE + CD29-FITC + CD45-PE-CY5 组, 每组分别加入相应单克隆抗体, 30 分钟避光孵育后洗涤, 免疫荧光法流式细胞仪检测表面抗原。

1.2.3 免疫印迹方法检测 orexin-1 受体抑制剂对 Wnt 通路主要靶点蛋白的影响

取 BMSCs P_3 细胞消化后, $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 种于 6 孔板, 次日加药, 分组: Control、 $50\mu\text{g}/\text{L}$ Wnt3a、 $1 \times 10^{-5}\text{mol}/\text{L}$ orexin-1 受体抑制剂、 $1 \times 10^{-6}\text{mol}/\text{L}$ orexin-1 受体抑制剂。待测定时间消化细胞, 用 PBS 洗 2 遍, 加入蛋白裂解液, 冰上静置 15 至 20 min, 每 3 min 涡旋振荡混匀一次, 4°C 离心机 13200 rpm, 15 min, 吸取上清液, 放于 -20°C 备用。吸取每孔 10 μL 的样品加入 96 孔板, 每孔 PBS 10 μL , 每孔 100 μL 染液, 室温静置 120 min, 用酶标仪在 570 nm 下检测吸光值。蛋白上样样品制备蛋白样品和 $5 \times$ 上样缓冲液按 4:1 量配比, 将蛋白放置煮沸的水中 10 min 后, 取出备用。将制胶装置组装完成后用超纯水检漏, 将配好的分离胶注入装好的制胶板间, 30 min 后待分离胶凝固后, 加入配制好的浓缩胶, 同时

将齿梳装好,待浓缩胶凝固后,拔出齿梳,每孔加入 25 μL 的蛋白上样样品。用 80 V 电泳 3 min 后,改用 120 V 待样品跑至分离胶与浓缩胶交界处改用 100 V, 100 min, 当 Maker 分层后,电泳至 Maker 分离至分离胶底部,停止电泳。将胶从板上剥离后,切除浓缩胶,保留分离胶,并放置进已准备好的三文治结构的盒子中,纤维布、滤纸、胶、PVDF 膜、滤纸、纤维布,排尽气泡后,装好装置用 100V 转膜,90 min 后停止转膜。取出 PVDF 膜后,用含封闭液浸泡 PVDF 膜,室温摇床 1 小时后,封闭完成。取出 PVDF 后,加入封闭液稀释一抗(1:200),用塑料膜封口后,放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱摇床过夜。取出加入一抗过夜的 PVDF 膜,放于摇床上一小时复温后,用 TBST 洗 PVDF 膜 3 次,每次 5 min 后,加入含封闭液稀释二抗(1:5 000),放置于塑料封口膜中摇床摇 1 h。用 TBST 洗 PVDF 膜 5 次每次 5 min,浸泡于 TBST 中。PVDF 膜浸泡发光液中,放入盒子用底片曝光,洗片机显影定影后取出底片。

1.2.4 orexin-1 受体抑制剂对 Wnt 通路靶点相关基因表达的影响

取 BMSCsP₃ 细胞消化, $3 \times 10^5/\text{cm}^2$ 种于 6 孔板,次日加药。分组: Control、50 $\mu\text{g}/\text{L}$ Wnt3a、 1×10^{-5} mol/L Orexin-1 受体抑制剂、 1×10^{-6} mol/L orexin-1 受体抑制剂。每 3 天更换新鲜的培养液和药物,放进孵箱继续培养。用药物处理 BMSCs 5 天后,弃去培养液和药物,用 PBS 润洗 3 次弃去 PBS 后,将 Trizol 加入板内,裂解细胞后,收集液体。每 1 mL 的 Trizol 加入 200 μL 的氯仿,剧烈混匀 15 s,室温下静置 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 rpm 离心 15 min, 取上层上清液,加入等体积异丙醇,静置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 rpm 离心 10 min, 弃去上清,加入 75% DEPC 水配制的乙醇,混匀后 7000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 弃去乙醇溶液,室温下风干 10 min, 加入适量 DEPC 水溶解 RNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。2 μL RNA 样品加入适量的稀释液,混匀后转入比色杯。用稀释液调零,将样本管放入定量光度仪,在 260 nm 处读取 OD 值。OD 值 $\times$ 倍数,即得 RNA 浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$),在 280nm 处测 OD 值,计算 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ($1.7 < \text{比值} < 2.1$ 的样本用于 PCR 反应)。

1.3 统计学处理

所有计量资料都以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS11.7 软件进行单因素方差分析,对数据行方差齐性检验,组间比较用 Bonferroni 法(方差齐时)和 Tamhane's T2(方差不齐时)。 $P < 0.05$ 认为组间差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 大鼠骨髓基质干细胞形态

刚分离的 BMSCs,呈球形,悬浮于培养液中,与骨髓中的其他杂细胞相混,不能很好被辨认。培养 24 h 后细胞开始贴壁,呈圆形发亮,48 h 后首次全量换液,显微镜观察可见小部分贴壁展开细胞,呈不规则生长,细胞形态为短条状或圆形,出现一些团簇集落。4 到 5 天后贴壁细胞数量增多,并逐渐长出伪足,呈梭形、三角形或扁平形,先形成不同大小分散小集落,胞浆丰富,胞核大且清晰。7 到 9 天后,细胞达到融合生长,集落间融合,细胞形态较均一,细胞呈梭形,此时进行首次传代。胰酶消化时,细胞逐渐收缩,把吹打下来的细胞重新种回培养瓶中,细胞重新贴壁展开,经过 2~3 次传代换液后,细胞形态基本均一,呈均匀有序的长梭形。见图 1。

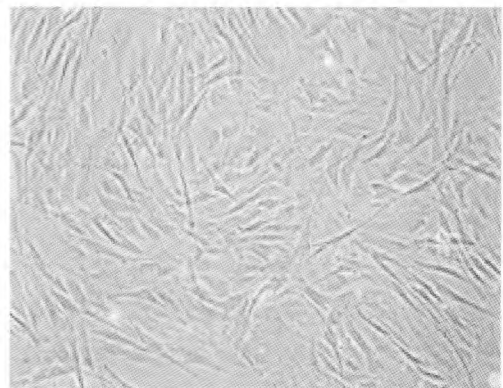


图 1 传四代大鼠骨髓基质干细胞培养 3d 时的细胞形态($\times 100$ 倍)

Fig. 1 Micrographs of the fourth passage BMSCs at 3d($\times 100$)

2.2 流式细胞术鉴定大鼠骨髓基质干细胞表面抗原

收集 BMSCsP₃ 进行 CD29-PE, CD90-FITC, CD45-FITC 荧光染色,流式细胞检测结果如图 2 所示:从第三代开始, BMSCs 表面抗原 CD29 表达阳性,阳性细胞率 $> 99\%$ (图 2K、N、Q); CD90 表达阳性,阳性细胞率 $> 99\%$ (图 2L、O、Q), CD45 表达阴性,阳性细胞率为 3.4% (图 2M、P、Q); 共表达 CD29⁺ 和 CD90⁺、CD45⁻ 细胞率为 96.5% (图 2Q), 由此可以说明经过传代, BMSCs 纯度 $> 96\%$ 。提示运用传代贴壁法体外无菌分离传代纯化可以获得纯度较高的骨髓基质干细胞。

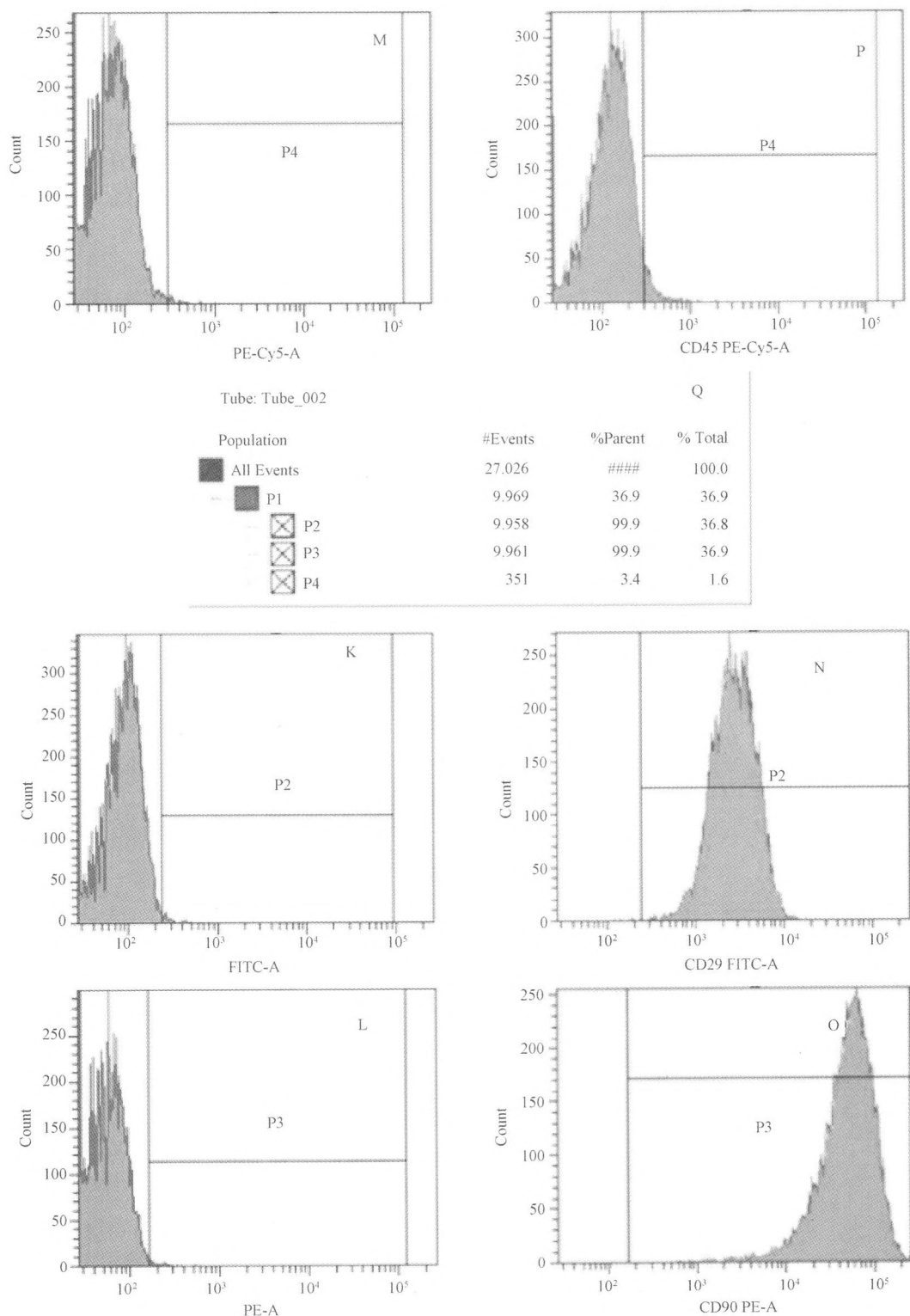


图 2 流式细胞术检测第 3 代 BMSCs 表面抗原 CD29、vCD45 和 CD90 表达
Fig.2 Surface antigen expression of CD29, CD45 and CD90 in BMSCsP₃
detected by Flow cytometry

2.3 orexin-1 受体抑制剂对 Wnt 通路主要靶点蛋白 Dickkopf-1、Gsk3β、β-catenin 的影响

由图 3 和表 1 所示,BMSCs 经 Wnt3a 和 orexin-1 受体抑制剂处理后的 Dickkopf-1、β-catenin 和

GSK3 β 表达都升高,其中 1×10^{-5} mol/Lorexin-1 受体抑制剂组 Dickkopf-1 的表达比 1×10^{-6} mol/L orexin-1 受体抑制剂组的高;而 GSK-3 β 、 β -actin 的表达比 1×10^{-6} mol/Lorexin-1 受体抑制剂组的低,两组 β -catenin 的表达无明显差别。

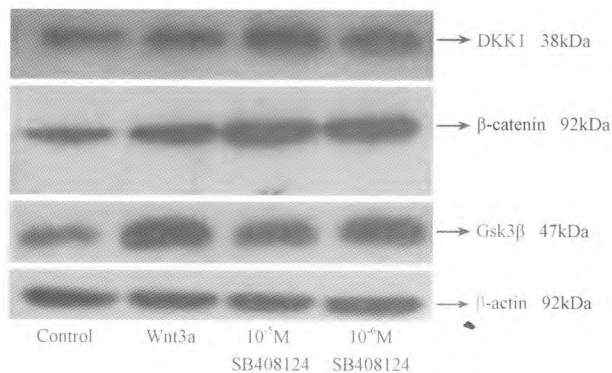


图 3 免疫印迹曝光后 X 光片扫描图

Fig. 3 Scanned image on X-rays after exposure of Western blot

表 1 orexin-1 受体抑制剂对大鼠骨髓基质干细胞 Wnt 通路靶点蛋白影响

Table 1 Effects of orexin-1 receptor inhibitor on target protein of Wnt signaling pathways in BMSCs

Group	β -actin	Dickkopf-1	GSK3 β	β -catenin
Control	145.005	116.324	54.202	128.830
Wnt3a	131.298	143.488	149.159	153.596
1×10^{-5} mol/L SB408124	126.495	217.421	81.992	196.924
1×10^{-6} mol/L SB408124	134.616	148.554	101.869	192.771

2.4 orexin-1 受体抑制剂对 Wnt 通路相关基因表达的影响

如表 2 所示,与 Control 组对比,Wnt3a 上调 β -catenin mRNA 和 GSK3 β mRNA 的表达 ($P < 0.05$);与 Control 组对比,orexin-1 受体抑制剂也上调了 β -catenin mRNA 和 GSK3 β mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。

表 2 orexin-1 受体抑制剂对大鼠骨髓基质干细胞基因的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of orexin-1 receptor inhibitor on the target gene of BMSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	GSK3 β	β -catenin
Control	1.368 $\pm$ 0.145	1.171 $\pm$ 0.243
Wnt3a	4.991 $\pm$ 0.368 [▲]	3.788 $\pm$ 0.435 [▲]
1×10^{-5} mol/L SB408124	4.859 $\pm$ 0.727 [▲]	5.350 $\pm$ 0.262 [▲]
1×10^{-6} mol/L SB408124	3.633 $\pm$ 0.036 [▲]	4.404 $\pm$ 0.852 [▲]

注:与对照组相比[▲] $P < 0.05$

Note:[▲] $P < 0.05$ vs control

3 讨论

Wnt 蛋白是一组由半胱氨酸残基组成的分泌型糖脂蛋白,作为调控细胞生长、发育和分化的重要信号途径,一直是医学研究的热点。Wnt 信号通路主要由 19 种分泌蛋白组成,一般认为 Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt3a、Wnt8、Wnt8b 是经典 Wnt 蛋白,而 Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6t、Wnt7a、Wnt11 是非经典蛋白^[6],这些蛋白和相应的膜受体发生结合可激发一系列的继发反应,能和 7 次跨膜大分子(发卷样蛋白)特异性识别,在低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和 6(LRP5/6)协同下共同作用^[7]。在 Wnt/ β -catenin 信号通路中,主要调控成骨分化的靶点有 DKKs、sFRPs、GSK3 β 、WIF、Sclerostin 等,最终由于 β -catenin 表达增多而促进骨形成。当 Wnt 与 frizzled 受体以及其共受体,还有低密度脂蛋白相关蛋白 LRP 5/6 受体结合,继而与 Axin、Frat-1 形成复合体,抑制糖原合成激酶 3(GSK3)的活性, β -catenin 的分解被抑制,在胞质内蓄积的 β -catenin 进而转移入细胞核,然后与核内转录协同因子 T 细胞因子(TCF)/淋巴增强因子(LEF)相互作用,从而介导 Wnt 引起的基因转录的改变,影响细胞的分裂、分化和成熟^[8]。

骨髓基质干细胞是成骨细胞的前体细胞,广泛存在于骨髓及松质骨中,在骨代谢中起重要作用。同时作为一种多潜能干细胞,主要表现出自我增殖和多向分化潜能,可以向成骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、软骨细胞等方向分化,即具有可塑性。此外,骨髓基质干细胞向成骨细胞方向分化与向脂肪细胞方向分化之间存在着此消彼长的关系。有研究发现,骨质疏松症患者其骨髓中的松质骨骨量与脂肪细胞呈反比,骨量的减少总是相伴骨髓腔内脂肪细胞的增多,而通过靶向调控 BMSCs 分化方向的相关因素能调控 BMSCs 的分化方向,从而增加成骨细胞的数目和活性。目前诱导 BMSCs 成骨分化有机械因素如刚度矩阵^[9-10],还有化学刺激如 β -磷酸甘油、地塞米松和抗坏血酸。BMSCs 来源广泛,易于分离培养,已被认为是理想的工程种子细胞,越来越受到学者们的青睐,BMSCs 替代疗法以及定向调控 BMSCs 分化方向的方法成为治疗骨质疏松等骨丢失相关疾病的新途径。

Wnt3a 是作用于经典 Wnt 信号通路诱导转录的 TCF/LEF 靶基因的 Wnt 蛋白之一,能激活 Wnt/ β -catenin,从而引起 Wnt 信号通路基因和蛋白的改变。

Wnt3a 和 GSK3 β 抑制物会抑制地塞米松作用的 hMSC 成骨分化。研究发现成骨诱导的早期加入 Wnt3a 干预可促进 MSCs 碱性磷酸酶表达,促进成骨分化,晚期则会抑制碱性磷酸酶表达抑制成骨分化^[11],推断当 MSCs 开始成骨分化时,经典 Wnt 信号通路促进干细胞向成骨方向分化,但在分化的终末又会抑制成骨细胞的最终分化成熟。本实验中 Wnt3a 组的 β -catenin mRNA 和 β -catenin 蛋白表达都比 Control 组高,与 Filali M 结果一致^[12]。

Dickkopf-1 与 GSK3 β 蛋白表达升高对 Wnt/ β -catenin 信号通路是起抑制作用的,本实验中 orexin-1 受体抑制剂对 Dickkopf-1 与 GSK3 β 蛋白表达的抑制作用,其意义有待进一步的研究。我们推测,orexin-1 受体抑制剂的作用可能是多靶点的,除了对 Dickkopf-1 与 GSK3 β 蛋白有作用外,还可能作用于 Wnt/ β -catenin 信号通路其他的靶点,综合的结果使 β -catenin 的表达升高。此外,由于非经典 Wnt 信号通路在 MSCs 成骨分化过程中可促进成骨分化,所以 orexin-1 受体抑制剂也可能通过激活非经典 Wnt 信号通路,使 β -catenin 的表达升高。

【参 考 文 献】

- [1] Sakurai T, Mieda M. Connectomics of orexin-producing neurons: interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal [J]. Trends Pharmacol Sci, 2011, 32(8): 451-462.
- [2] Rosen CJ. Bone remodeling, energy metabolism, and the molecular clock[J]. Cell Metab, 2008, 7(1): 7-10.
- [3] Wei W, Motoike T, Krzeszinski JY, et al. Orexin regulates bone remodeling via a dominant positive central action and a subordinate negative peripheral action [J]. Cell Metabolism, 2014, 19(4): 927-940.
- [4] 宋敏,刘涛,巩彦龙,等. 间充质干细胞与免疫细胞相互作用于骨折愈合的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(10): 1345-1349.
- [5] SONG M, LIU T, GONG YL, et al. Research progress on the interactions between mesenchymal stem cells and immune cells on fracture healing[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2016, 22(10): 1345-1349. (In Chinese)
- [6] 陈曾,徐展望,向亮,等. 脂肪因子 chemerin 与骨质疏松症的关系展望[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(2): 231-240.
- [7] CHEN Z, XU ZW, XIANG L, et al. The prespective of the relationship between chemerin and osteoporosis [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2015, 21(2): 231-240. (In Chinese).
- [8] Brantjes H, Barker N, van Es J, et al. TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling [J]. Biol Chem, 2002, 383(2): 255-261.
- [9] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt/ β -catenin and cadherin pathways[J]. Science, 2004, 303(5663): 1483-1487.
- [10] Andrade AC, Nilsson O, Barnes KM, et al. Wnt gene expression in the post-natal growth plate: regulation with chondrocyte differentiation[J]. Bone, 2007, 40(5): 1361-1369.
- [11] Maul TM, Chew DW, Nieponice A, et al. Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior: morphology, proliferation, and differentiation [J]. Biomech Model Mechanobiol, 2011, 10(6): 939-953.
- [12] Kuo SW, Lin HI, Ho JH, et al. Regulation of the fate of human mesenchymal stem cells by mechanical and stereo-topographical cues provided by silicon nanowires[J]. Biomaterials, 2012, 33(20): 5013-5022.
- [13] 毛元江. Wnt3a 蛋白调控大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的研究[D]. 华中科技大学骨外科, 2010: 1-31.
- [14] MAO YJ. Experimental study of Wnt3a regulating the osteogenesis of rat bone marrow [D]. Huazhong University of Science and Technology, 2010: 1-31. (In Chinese)
- [15] Filali M, Cheng N, Abbott D, et al. Wnt-3A/ β -catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter [J]. J Biol Chem, 2002, 277(36): 33398-33410.

(收稿日期: 2016-09-25, 修回日期: 2016-11-16)