

·论著·

补肾健脾活血方干预过表达 DKK1 骨细胞对细胞活性及 BMP2 的影响

王凡¹ 黄宏兴^{2*} 王吉利¹ 万雷² 黄红¹ 柴爽¹

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学附属骨伤科医院骨科, 广东 广州 510240

中图分类号: R256.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 06-0711-05

摘要: 目的 用补肾健脾活血方干预过表达的 DKK1 腺病毒转染的成骨细胞, 通过观察细胞的活性及 BMP2 的表达, 研究补肾健脾活血方治疗骨质疏松的分子生物学机制。方法 将培养细胞分成 NC 对照组, Ad-DKK1 组两组。NC 对照组由空载腺病毒转染; Ad-DKK-1 组由包装过表达的 DKK1 腺病毒转染。每组分别用含药血清和空白血清干预。采用 CKK-8 检测细胞增殖, 蛋白印记法检测 BMP2 的表达。结果 各组细胞活性变化: 空白血清和含药血清干预均能提高细胞活性。与空白血清分别干预的两组比较, 含药血清分别干预后的两组, 在 24 h, 48 h, 72 h 的细胞活性的增加倍数都较多; 在采用蛋白印记法检测后, BMP2 在含药血清分别干预的两组的相对表达量较空白血清分别干预的两组的相对表达量高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), 在 NC 对照组中含药血清干预与空白血清干预无明显差异。结论 补肾健脾活血方含药血清可以提高细胞活性, 提高 BMP2 的相对表达量, 有利于成骨细胞的矿化, 尤其在过表达 DKK1 干预后。补肾健脾活血方可能通过调控 DKK1 进而影响成骨细胞的代谢。

关键词: 中医中药; 骨质疏松症; DKK1; BMP2; 补肾健脾活血方

The effects of bushen jianpi huoxue recipe on cell activity and BMP2 expression in DKK1 over-expressed osteoblasts

WANG Fan¹, HUANG Hongxing^{2*}, WANG Jili¹, WAN Lei², HUANG Hong¹, CHAI Shuang¹

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China

2. The Affiliated Orthopedics and Trauma Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510240, China

Corresponding author: HUANG Hongxing, Email: gzhhx@126.com

Abstract: **Objective** To study the molecular biological mechanism of Bushen Jianpi Huoxue Recipe in the treatment of osteoporosis by observing its effects on cell activity and BMP2 expression in DKK1 over-expressed osteoblasts. **Methods** Cultured cells were divided into two groups: NC group and Ad-DKK1 group. NC control group was transfected with empty adenovirus, and Ad-DKK-1 group was transfected with DKK1 adenovirus. Each group was treated with medicated serum and blank serum. CKK-8 was used to detect the proliferation of cells and the expression of BMP2 was detected by western blot. **Results** The changes of cell activity in each group: both blank serum and serum containing drug could improve the activity of cells. Compared with the two groups treated by blank serum, the two groups treated by medicated serum had greater multiple increase in cell activity at 24 h, 48 h and 72 h. Using western blot, compared with the two groups treated by blank serum, the two groups treated by medicated serum had relatively greater BMP2 expression ($P < 0.01$, $P < 0.01$), but in the control group the serum and blank serum intervention had no significant difference. **Conclusion** The serum containing Bushen Jianpi Huoxue Recipe can improve the activity of cells and increase the relative expression of BMP2, which is beneficial to the mineralization of osteoblasts, especially in the over expression of DKK1. Bushen Jianpi Huoxue Recipe may affect the metabolism of osteoblasts through regulating DKK1.

Key words: Traditional chinese medicine; Osteoporosis; DKK1; BMP2; Bushen jianpi huoxue recipe

基金项目: 国家自然科学基金课题(81302991); 国家自然科学基金课题(81674004); 广东省自然科学基金课题(S2013040016828)

* 通讯作者: 黄宏兴, Email: gzhhx@126.com

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征, 导致骨脆性增加和易于骨折的全身性骨代谢疾病。其中最近研究发现

Wnt 信号系统在成骨细胞的发育和分化过程中扮演重要角色,它是目前骨骼系统相关疾病发病机制和骨代谢研究的新热点,其中 DKK1 (Dickkopf1, DKK1) 是 Wnt 信号通路的抑制因子,DKK1 调控 Wnt 信号通路在骨质疏松症的发病中也扮演着重要的角色。

祖国医学认为骨质疏松症属于“骨痹”的范畴,中医主要病机是肾虚、血瘀,治以补肾、健脾、活血法为主,本研究应用补肾健脾活血方观察对成骨细胞 MG63 的影响,我们采用重组过表达腺病毒 DKK1 方法构建成骨细胞模型,抑制成骨细胞的增殖和骨相关蛋白的表达,观察补肾健脾活血方干预 MG63 细胞对细胞增殖和骨形态发生蛋白 2 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2) 的表达。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:健康雌性 6 月龄 SPF 级 SD 大鼠 16 只,体重 240 g ~ 260 g,均购自南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2011-0015】,分笼饲养,适应性喂养 1 周后制备含药血清;补肾健脾活血方(淫阳藿 10 g、熟地黄 10 g、肉苁蓉 10 g、大枣 10 g、当归 10 g、丹参 10 g、菟丝子 10 g、补骨脂 10 g、黄芪 10 g、白芍 10 g) 购置于广州中医药大学附属骨伤科医院,并在本院制剂室制成水煮液(1.43 g 生药/mL)。

1.1.2 仪器和试剂:人成骨肉瘤细胞(MG63)由中国科学院上海细胞所细胞库提供,DMEM 高糖培养基、FBS、胰酶(美国 Gibco 公司),CCK8(中国同仁化学公司),BCA 蛋白定量试剂盒(中国弗德生物公司),EGTA、Triton(美国 Sigma 公司),脱脂奶粉(美国 BD 公司),抗 BMP2 抗体(美国 Abcam 公司),PVDF 膜(美国 Millipore 公司),细胞培养箱、离心机(美国 Thermo Fisher 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),超净操作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.2 制备含药血清

将 16 只 6 月龄雌性 SD 大鼠随机分成生理盐水组、中剂量组(4.8 g/kg),每组 8 只。灌胃给药,每天 2 次,间隔 5 h,连续灌胃 3 d,最后一次灌胃后 2 h 腹主动脉取血,3 000 r/min 离心获取血清,灭活,过滤除菌,置 -20 °C 保存备用。

1.3 MG63 细胞培养

人骨肉瘤细胞 MG63 培养于含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基(含 1% Pen/Strep),置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。每日使用倒置显微镜观察

细胞 1 次,隔 2 ~ 4 天换培养液 1 次。培养瓶中的细胞生长到 80% ~ 95% 融合时进行细胞传代或收集细胞铺板培养。弃去旧培养液,加入 0.25% 胰酶消化液 2 mL,细胞变圆、上浮后,加入 4 mL 培养液终止消化,再转移至无菌离心管中,1 000 r/min 离心 4 min,弃上清液,以 1:4 ~ 1:6 比例转移至新的无菌培养瓶中培养。

1.4 重组腺病毒感染 MG63 细胞

MG63 细胞培养 24 h 后分为空载病毒组(NC 对照组)、过表达 DKK1(Ad-DKK1)组,分别用空载腺病毒和重组腺病毒 Ad-DKK1 感染各组 MG63 细胞,感染复数(MOI)为 50。重组腺病毒感染 48 h 后,分别消化收集细胞,采用 qPCR、Western Blot 检测 DKK1、Sost 在 MG63 细胞中的表达,其具体方法参考前期研究基础^[1]。

1.5 CCK8 检测含药血清对 MG63 增殖活性的影响

0.25% 胰酶消化对数生长期细胞,1 000 rpm 离心 5 min 收集细胞深沉,分别用含 10% 不同浓度的含药血清(0、2.4、4.8、9.6 g/mL) DMEM 高糖培养基重新悬浮细胞,调整细胞浓度 5.0 ~ 6.0 × 10⁴ Cells/mL,接种 96 孔板,每孔加 100 μL 的细胞悬液约 5 000 ~ 6 000 个细胞,在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育,分别 0、24、48、72 h 后;弃去原培养基,加入 100 μL 含 10% CCK-8 的培养基置于 37 °C 培养箱中孵育 1.5 ~ 2.5 h,酶标仪 450 nm 处检测各孔的吸光度(A)值。

将培养细胞分成 NC 对照组,Ad-DKK1 组。NC 对照组空载腺病毒转染;Ad-DKK1 组由包装过表达 DKK1 腺病毒转染。每组分别用含药血清和空白血清干预。

1.6 Western blot 检测 BMP2

过表达 DKK1 转染 MG63 细胞 72~96 h 后,消化收集细胞提取蛋白,4 °C 的 PBS 溶液冲洗细胞 4 次。投放适量 RIPA(使用前根据 100:1 的比例在 RIPA 中加的 PMSF 蛋白裂解液)到细胞培养板、细胞培养瓶内 4 min。用细胞刮刀将细胞及试剂刮下,收集到 1.5 mL 离心管中;冰浴 30 min,期间用移液器反复吹打,确保细胞完全裂解;12 000 g 离心 5 min,收集上清,即为总蛋白溶液。采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,将 60 μg 蛋白的溶液体积设成上样量,于蛋白标本内添加一定量的 5 × 蛋白上样缓冲液,置于 100 °C 调节下变性 300 s,进行 Western blot 检测时采用 SDS-30% 丙烯酰胺凝胶使蛋白分离后,以 75 V 电压电泳 15 min,见溴酚蓝蛋白样品在浓缩胶中跑压成一条直线且标

记 marker 肉眼可见条带分开后转为 120 V 电压继续电泳 40 分钟,而后 PVDF 膜在 5% 的脱脂牛奶(0.5% TBST),封闭 60 min;一抗于 4 ℃ 抚育过夜,TBST 于室温条件洗 3 次后加二抗于室温下孵育 0.5 h,再用 TBST 于室温条件下洗 3 次,取相同量的 A 和 B 试剂,于暗室显影,并用胶片进行扫描后保存,采用 Image J 软件对条带进行灰度分析。

1.7 统计学分析

所有实验数据采用 SPSS20.0 统计软件进行统计学分析,结果均以均数 ± 标准差表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 含药血清对人成骨细胞 MG63 细胞增殖的

影响

血清干预过表达 DKK1 MG63 成骨细胞时,细胞活性在 24 h,48 h,72 h 细胞活性都增加。含药血清干预 NC 对照组和含药血清干预 Ad-DKK1 组的细胞活性分别大于空白血清干预 NC 对照组和空白血清干预 Ad-DKK1 组。在 24 h,48 h,72 h NC 对照组含药血清比空白血清的细胞活性分别提高 1.116 倍、1.223 倍、1.165 倍;在 24 h,48 h,72 h Ad-DKK1 含药血清比空白血清的细胞活性分别提高 1.100 倍、1.391 倍、1.298 倍。在 24 h 时,含药血清干预 NC 对照组的细胞活性高于 Ad-DKK1 组,但是在 48 h,72 h 含药血清对 Ad-DKK1 细胞活性作用稍强于 NC 对照组,分别高了 0.168 倍和 0.133 倍,在 48 小时时含药血清对 Ad-DKK1 的细胞活性作用较其他三个时间点强($\bar{x} \pm s, n = 6$),见表 1,图 1。

表 1 细胞活性
Table 1 Cell activity

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
NC 对照组 + 空白血清	0.261 ± 0.012	0.458 ± 0.019	0.529 ± 0.029	0.638 ± 0.011
NC 对照组 + 含药血清	0.260 ± 0.013	0.511 ± 0.019 **	0.647 ± 0.018 **	0.743 ± 0.012 **
Ad-DKK1 组 + 空白血清	0.259 ± 0.017	0.289 ± 0.018	0.345 ± 0.012	0.429 ± 0.014
Ad-DKK1 组 + 含药血清	0.259 ± 0.019	0.318 ± 0.016 **	0.480 ± 0.015 **	0.557 ± 0.013 **

注:与 NC 对照组空白血清比较, ** $P < 0.01$;在 Ad-DKK-1 组空白血清比较, ** $P < 0.01$

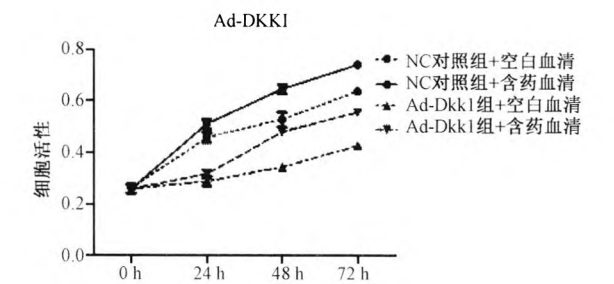


图 1 细胞活性
Fig. 1 Cell activity

2.2 补肾健脾含药血清对 BMP2 的影响

如图 2。NC 对照组含药血清与 NC 对照组空白血清相比 BMP2 活性升高 ($P = 0.000$), 相比提高 1.402 倍; Ad-DKK1 含药血清与空白血清相比 BMP2 活性升高 ($P = 0.000$), 相比提高 1.669 倍;补肾健脾活血方含药血清对 Ad-DKK1 组的 BMP2 的表达影响最明显, 与 NC 对照含药血清的 BMP2 无明显差异 ($P = 0.363$), 补肾健脾活血方可以提高 BMP2, ($\bar{x} \pm s, n = 3$), 见表 2。

表 2 BMP2 蛋白检测结果
Table 2 Results of BMP2 protein test

	NC 对照组	Ad-DKK1 组
空白血清	0.737 ± 0.015	0.613 ± 0.012
含药血清	1.033 ± 0.006 **	1.023 ± 0.006 **
P	0.000	0.000

注:在 NC 对照组, 与含药血清干预相比, ** $P < 0.01$; 在 Ad-DKK-1 组, 与含药血清干预相比, ** $P < 0.01$

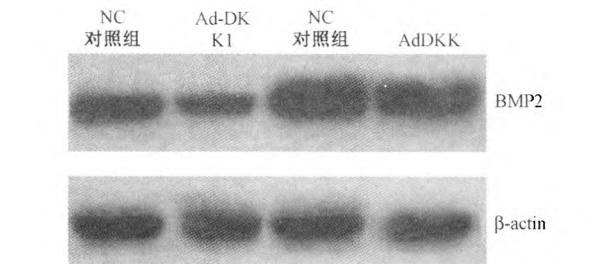


图 2 BMP2 蛋白检测结果
Fig. 2 Results of BMP2 protein test

3 讨论

目前治疗骨质疏松的药物主要是通过抑制破骨

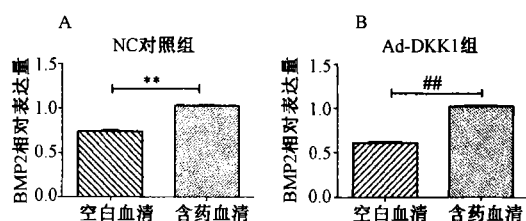


图3 BMP2 蛋白检测结果

Fig. 3 Results of BMP2 protein test

注:在 NC 对照组,与含药血清干预相比,** $P < 0.01$;在

Ad-DKK-1 组,与含药血清干预相比,** $P < 0.01$

Note:In the NC group, compared with medicated serum,

** $P < 0.01$; in the Ad-DKK-1 group, compared with

medicated serum, ** $P < 0.01$

细胞的骨吸收,治疗骨质疏松症。中医治疗骨质疏松症取得了良好的效果,但是其具体的作用机制有待进一步的研究。

骨质疏松症从中医辨证属于肾虚、脾虚、血瘀,治以补肾健脾活血。本研究选用淫阳藿、熟地黄、肉苁蓉、大枣、当归、丹参、菟丝子、补骨脂、黄芪、白芍。本方以补骨脂补肾壮骨为君药;配以熟地、淫羊藿、白芍补肾滋阴益精为臣药,此乃“壮水之源,以制阳光”之意;同时配以黄芪补中益气,当归、丹参活血通络,共为佐药,此既可培补后天生化之源以充肾精,又可达到补中寓通、补而不滞的目的。其中单味药物的研究也发现单体对成骨细胞的增殖起到促进的作用,淫羊藿总黄酮含药血清可以刺激成骨细胞增殖活性并显著提高碱性磷酸酶活性、矿化结节数和 I-型胶原表达,促进其分化成熟^[2]。

人类 DKK1 基因位于 10 号染色体 10q11 上,由 266 个氨基酸组成,其相对分子质量在 29k 左右。DKK1 和 Wnt 蛋白竞争性与膜受体结合,DKK1 与 LRP5/6 结合后,下调胞浆 β -catenin 水平,进而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制转录因子表达的表,使成骨细胞数量减少、活性降低^[3]。Wnt 信号通路促进前成骨细胞向成骨细胞分化,但是 DKK1 抑制这一过程^[4]。DKK1^{+/-}小鼠由于严重的发育异常,出生后不久死亡,但是 DKK1^{+/-}小鼠只有骨形成和骨质量增加,而没有代偿性骨吸收的改变^[5]。在小鼠去卵巢骨质疏松模型中,应用 DKK1 抗体可显著增加成骨细胞数量和血清骨钙素水平^[5]表达。

骨形态发生蛋白属于转化生长因子 β 超家族,能够诱导人类间充质细胞分化骨、软骨等组织,在成骨细胞的生长分化以及胚胎发育过程中有重要作

用。其中 BMP2 的研究较为深入,可以促进成骨细胞的增殖和分化,可高效诱导成骨活性。BMP2 可以提高成骨细胞的活性,同时 ALP 活性与 BMP2 的浓度成正比,BMP2 可以促进成骨细胞增殖和分化作用^[6]。Zhang 等^[7]的研究发现,BMP2 可以通过调控 Wnt 信号转导通路配体、 β -catenin 磷酸化抑制剂及 LRP-5 的表达来促进 β -catenin 在成骨细胞中表达促进成骨细胞的分化。

前期研究已发现当过表达 DKK1 后,干预成骨细胞,其细胞活性和 BMP2 的表达都降低。在本实验研究发现当空白血清和含药血清分别干预 Ad-DKK1 时,含药血清提高细胞的活性更明显,与空白血清和含药血清分别干预 NC 对照组比较,含药血清干预 Ad-DKK1 后细胞活性升高的趋势更明显;当空白血清和含药血清分别干预 Ad-DKK1 时,含药血清提高细胞的 BMP2 的表达更明显,与空白血清和含药血清分别干预 NC 对照组比较,含药血清干预 Ad-DKK1 后细胞 BMP2 的表达趋势更明显;通过提高细胞的活性和提高 BMP2 的表达,有利于提高成骨细胞的活性,向骨细胞矿化,提高骨矿含量。

综上,本实验研究证实补肾健脾活血方可以提高细胞的活性,提高 BMP2 的蛋白表达,尤其是补肾健脾活血方含药血清干预过表达 DKK1 的成骨细胞模型,为补肾健脾活血方治疗骨质疏松症提供了新的实验依据。然而本实验中含药血清组和空白血清组都提高了细胞的活性和 BMP2 的表达,不能完全说明补肾健脾活血方是通过 Wnt 信号通路来影响成骨细胞的增殖,有待进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] 万雷,黄宏兴,黄红,等. 过表达 DKK1、Sost 重组腺病毒载体的构建及其对 MG63 细胞和相关蛋白的影响. 广州中医药大学学报,2016,(4):578-584.
WAN Lei, HUANG Hongxing, HUANG Hong, et al. Construction of DKK1, Sost Overexpressing Recombinant Adenovirus Vector and Effect of Overexpression on MG63 Cells and Related Proteins. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2016, (4): 578-584.
- [2] 宋敏,罗晓,李宁,等. 淫羊藿总黄酮含药血清对成骨细胞增殖、分化的影响. 中国中医骨伤科杂志,2010,(2):3-5.
SONG Min, LUO Xiao, LI Ning, et al. Influence of Serum Containing Epimedium Flavonoids on Proliferation and Differentiation of Osteoblasts. Chinese J Trad Med Traum & Orthop, 2010, (2): 3-5.

(下转第 718 页)

3 讨论

骨质疏松症临床上主要表现为腰背疼和病理性骨折,是一种以骨量降低和骨组织微结构破坏为特征、骨的脆性增加和易于骨折为特点的一种代谢性骨病^[5]。近年来,数个团队报道了肠道菌群失衡与骨质代谢的相关性^[6,7]。然而,迄今为止尚无报道揭示骨质疏松症患者肠道菌群的多样性信息。

目前人们对于样本中微生物菌群组成的了解主要依赖于传统培养、显微镜检以及细菌分离物的发酵和生化特点等方法。然而,来自患者粪便样本中绝大多数的肠道菌群不能经常规的分培养获得,导致菌群多样性基因资源难以被发现。16S rRNA基因作为是细菌鉴定的黄金标准(gold standard),被称为微生物系统分类研究中最有用和最常用的“分子钟”^[8]。在此研究中,我们对细菌16S rRNA基因中的V3、V4可变区进行基因扩增、测序。研究结果表明肠道菌群多样性分析能够有效地将骨质疏松组与对照组进行鉴别区分,且骨质疏松组肠道菌群在纲、目、科、属、种、OTUs层次的菌群种类要多于对照组。大多数菌群在两组人群中同时存在,少数菌群为骨质疏松组及对照组所特有,且对照组特异性菌群种类明显少于骨质疏松组特异性菌群。样本肠道菌群物种差异分析提示骨质疏松组与对照组在门、科、种等分类水平上的菌群存在差异,差异主要表现为骨质疏松组中的部分菌群含量要高于对照组。

综上,该研究以原发性骨质疏松症为研究对象,通过细菌16S rRNA扩增、测序、生物信息学分析,探讨了疾病状态下的肠道菌群多样性特征。然而,样本量小为该研究的一大不足,更大样本量的基础实验研究和临床研究有待进一步开展,为研究肠道菌群与骨质代谢之间的关系提供理论依据。

【参考文献】

- [1] 黄宏兴,吴青,李跃华,等. 肌肉、骨骼与骨质疏松专家共识. 中国骨质疏松杂志, 2016,22(10):1221-1229.
HUANG Hongxing, WU Qing, LI Yuehua, et al. Expert consensus on muscle, bone and osteoporosis. Chin J Osteoporos, 2016,22(10):1221-1229. (in Chinese)
- [2] 袁斯远,何芳,盛彤,等. 骨代谢与肠道菌群. 中国组织工程研究, 2015,19(42): 6838-6842.
Yuan Si-yuan, He Fang, Sheng Tong, et al. Bone metabolism and gut microbiota. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015,19(42): 6838-6842. (in Chinese)
- [3] Jung SP, Kang H. Assessment of microbial diversity bias associated with soil heterogeneity and sequencing resolution in pyrosequencing analyses. J Microbiol, 2014,52(7): 574-580.
- [4] Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, et al. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2007,73(5): 1576-85.
- [5] Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. Lancet, 2006, 367(9257): 2010-2018.
- [6] Sjögren K, Engdahl C, Henning P, et al. The gut microbiota regulates bone mass in mice. J Bone Miner Res, 2012,27(6): 1357-1367.
- [7] 于婧,夏永军,王光强,等. 益生菌及益生元调节骨代谢的研究进展. 工业微生物, 2016,46(3): 56-62.
YU Jing, XIA Yong-jun, WANG Guang-qiang, et al. Research advance in role of probiotics and prebiotics in regulation of bone metabolism. Industrial Microbiology, 2016,46(3): 56-62. (in Chinese)
- [8] 刘驰,李家宝,芮俊鹏,等. 16S rRNA基因在微生物生态学中的应用. 生态学报, 2015,35(9): 2769-2788.
LIU Chi, LI Jiabao, RUI Junpeng, et al. The applications of the 16S rRNA gene in microbial ecology: current situation and problems. ACTA ECOLOGICA SINICA, 2015,35(9): 2769-2788. (in Chinese)

(收稿日期: 2016-12-25;修回日期:2017-02-05)

(上接第714页)

- [3] Diarra D, Stolina M, Polaer K, et al. Dickkopf-1 is a masterregulator of joint remodeling. Nature medicine, 2007, 13(2):156-163.
- [4] Qiang YW, Barlogie B, Rudikoff S, et al. Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma. Bone, 2008, 42(4): 669-680
- [5] 赵薇,丁娟,芦晓红,等. 去卵巢大鼠骨质疏松症中 Sost 对 Wnt 信号通路的影响. 宁夏医学杂志, 2010, (12): 1102-1104.
ZHAO Wei, Ding Juan, Lu Xiaohong, et al. The role of sost in wnt signal pathway in ovariectomized osteoporosis rats. Ning xia Med

J,2010,(12):1102-1104.

- [6] 孙玮,张君,王乐秀,等. BMP-2 与 TNF- α 对成骨细胞增殖和分化作用的比较分析. 口腔医学, 2014,34(9): 651-654.
SUN Wei, ZHANG Jun, WANG Lexiu, et al. A comparative analysis of the effect of BMP-2 and TNF-alpha (TNF- α) on osteoblast proliferation and differentiation. Stomatology, 2014, 34(9): 651-654.
- [7] Zhang M, Yan Y, Lim YB, et al. BMP-2 modulates beta-catenin signaling through stimulation of Lrp5 expression and inhibition of beta-TrCP expression in osteoblasts. J Cell Biochem, 2009, 108(4): 896-905.

(收稿日期: 2017-03-23;修回日期:2017-03-23)