

· 论著 ·

Smad4 促进成骨分化的机制研究

刘俊银 冯玮 涂小林*

重庆医科大学生命科学研究院,重庆 400016

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 05-0600-07

摘要: **目的** 探讨 Smad4 基因促进成骨分化的作用机制。**方法** 采用条件性基因敲除技术 Cre/loxp, 制备骨细胞特异性敲除 Smad4 小鼠 (Smad4^{ost}cko), 小鼠胚胎骨骼透明染色分析胚胎期小鼠长骨生长状况;待小鼠成长至 1 月龄, X-ray 检测突变小鼠与对照组小鼠的骨密度差异;静态骨组织形态学分析检测突变鼠及对照鼠的骨量变化、成骨细胞数量变化等差异;实时荧光定量 PCR 检测 Smad4 突变鼠成骨细胞相关因子 Runx2、ALP、OSX 及 OCN; qPCR 检测突变鼠破骨吸收标志基因 RANKL、OPG, 并计算 RANKL/OPG 比率。**结果** Smad4 基因敲除小鼠在胚胎期未出现骨生长异常。X 线结果显示, 1 月龄时, 与对照组小鼠相比, Smad4 突变鼠的骨密度降低 ($P < 0.05$), 静态骨组织形态学分析表明突变鼠松质骨减少, 皮质骨变薄, 骨小梁数量减少 ($P < 0.05$); Smad4 突变鼠成骨细胞标志基因表达量显著降低, 成骨细胞的数量明显减少 ($P < 0.05$); RANKL 作为破骨吸收标志物表达上调、作为其拮抗剂的 OPG 表达量下调, RANKL/OPG 比率增高 ($P < 0.05$)。**结论** Smad4 基因通过促进成骨分化维持骨稳态。

关键词: 骨细胞; Smad4; 成骨分化; 骨稳态

Mechanism of the stimulation of osteoblast differentiation by Smad4

LIU Junyin, FENG Wei, TU Xiaolin*

Life Science Institute, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

* Corresponding author: TU Xiaolin, Email: xiaolint@hotmail.com

Abstract: **Objective** To determine the mechanism of promoting osteogenic differentiation by osteocyte-specific gene Smad4. **Methods** Conditional gene knockout technique Cre/loxp was used to produce osteocytic Smad4 specific knockout mice (Smad4^{ost}cko). Embryonic mouse skeletal growth was shown by whole mount skeletal staining of new pups. The bone mineral density was detected in one-month-old mice with radiography. Changes in bone mass, trabecular number, and osteoblast number were analyzed by static bone histomorphology. The osteoblastic makers ALP, Runx2, OSX, OCN, and osteoclastic markers RANKL, OPG were detected by qPCR. The RANKL/OPG ratio was calculated. **Results** Smad4^{ost}cko mice displayed no gross skeletal abnormalities at birth. X-ray radiography showed reduced bone mineral density, bone mass, and osteoblast number compared with controls ($P < 0.05$). Similarly, the expression of osteoblastic differentiation marker genes were decreased. The expression of RANKL increased while OPG decreased. The ratio of RANKL/OPG increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** The Smad4 gene in the osteocytes regulates bone homeostasis by promoting osteoblastic differentiation and possibly by down-regulation of osteoclastic differentiation.

Key words: osteocyte; Smad4; osteoblastic differentiation; bone homeostasis

骨质疏松作为一种常见骨病,是以骨量丢失、骨微环境的破坏以及骨脆性增加从而导致易发性骨折为主要特征的全身性骨病^[1-2]。其发病原因主要是由于骨形成与骨吸收之间失衡,从而导致成骨分化减少,破骨吸收增加^[3]。目前,双膦酸盐类药物被

用来治疗骨质疏松,但此类药物会引发骨坏死(主要为颌骨坏死)、慢性骨髓炎等一系列局部感染症状^[4-6]。

以往的传统观念认为骨细胞是人体内终末分化的静止期细胞,不具有体内外大量增殖和向其他类型分化的生物学活性,但最近的研究发现骨细胞通过某种信号通路,可参与成骨细胞和破骨细胞在生物活性上的调控^[7-8]。近期有学者发现,在骨细胞

基金项目: 国家自然科学基金(8167090813)

* 通信作者: 涂小林, Email: xiaolint@hotmail.com

中特异性激活 Wnt- β -catenin 信号,成骨分化增加,破骨吸收增加,骨生长速度加快,并且骨细胞可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路反向调控骨髓间充质细胞成骨分化^[9-11]。这一发现也证实了发育终端的骨细胞不仅可以反向调控骨形成和骨吸收过程,而且对于维持骨细胞稳态有重要意义。

BMP 与 TGF- β 通路的共同转导分子 Smad4 与 Smad 家族中的其他 Smads 同源性不高,因为 Smad 家族多以磷酸化的形式起作用,但 Smad4 能够和其他的 Smad 分子相结合,并以三聚体的形式共同完成 TGF- β 与 BMP 的信号转导^[12]。FDA 已经批准 BMP2、BMP7 用于临床脊柱融合术、颅面部缺损、骨折不愈合的治疗,其机制主要以促进软骨内成骨的方式促进骨形成^[13-14]。另外,成骨细胞激活 TGF- β 信号通路能调节中晚期成骨分化及钙盐沉积,但对骨发育、成骨特性的早期研究少有文献报道^[15]。本研究选择 BMP、TGF- β 信号通路的共同介导分子 Smad4,在骨细胞中特异性敲除 Smad4 基因,研究其对小鼠骨量变化的调控机制,为骨再生和骨形成以及为研发抗骨质疏松的新型药物提供不同的思路及方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验小鼠:清洁级(SPF, C57BL/6),合格证号:SCXK(渝)2017-0001。骨细胞 Smad4 特异性纯合子敲除小鼠(Smad4^{fl} CKO,本文中均简称为CKO)是通过骨细胞特异性工具鼠 DMP1-8Kb-Cre 与 Smad4 第8外显子被 loxP 序列修饰的小鼠两步杂交产生,获得后代为 Smad4^{fl}(对照组,本文统一简称为 Ctrl),Cre⁺;Smad4^{fl}(突变组,本文统一书写为 Cko)^[16-17]。骨细胞特异性表达 Cre 转基因小鼠,即 DMP1-8 kb-Cre,由美国印第安纳大学 Teresita Bellido 教授赠予;Smad4 小鼠购于 Jax 实验室(美国)。实验过程中对小鼠操作符合重庆医科大学动物实验中心伦理学标准。

1.1.2 实验材料及仪器:Trizol 试剂(Invitrogen,美国);SYBR、逆转录试剂盒(TAKARA,日本);qPCR 引物(上海生工生物工程公司,金斯瑞生物公司);TRAP 染色试剂盒(Sigama,美国);实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad CFX connect,美国);核酸蛋白测量 ND-1000(Nanophotometer,美国);静态骨组织分析软件(Osteo Measure,美国);X 线骨密度仪(Kubtec,美国)。

1.2 基因型鉴定

出生后采集新生鼠耳组织,56℃过夜消化,提取 DNA,设计 Cre 和 Smad4 引物,PCR 反应分别扩增 Cre 及 Smad4。扩增程序为 95℃ 4 min,58℃ 1 min,72℃ 1 min,循环次数 39,延伸温度 72℃。PCR 反应结束后进行 1.5% 水平凝胶电泳,并在紫外光下采集图像信息。

1.3 小鼠胚胎全身骨骼透明染色

取出生第一天的新生小鼠,基因型鉴定后,取对照组、突变组同窝小鼠各 5 只固定于 10% 甲醛溶液 1 周后,流水冲洗,去除动物内脏,95% 乙醇脱色、硬化,2% 氢氧化钾透明后入 0.001% 茜素红-氢氧化钾染色 24 h,将染好的胚胎标本依次放入 50%、70%、80% 甘油各 48 h 后入 100% 甘油储藏。

1.4 骨密度分析

取 1 月龄 Smad4 基因敲除小鼠,同窝对照组小鼠每组各 10 只,采用 4.5% (vol/vol) 异氟烷混合空气 1.0 mmHg 行吸入性麻醉,深度麻醉后,使用 Kubtec 骨密度仪(45 kV, 500 μ A)扫描小鼠全身骨骼,采集图像信息。将小鼠图像放大 150% 倍后,截取胫骨、股骨两侧生长板之间的骨干端,腰椎 L1~6 计算骨密度大小。福尔马林固定后的股骨、胫骨、L1~6 采用 41 kV, 500 μ A 采集图像信息。

1.5 石蜡组织切片、HE 染色

收集 1 月龄小鼠股骨置于 3.7% 的福尔马林溶液固定 24 h。突变鼠和对照鼠每组各 5 只,PBS 冲洗两次,70% 乙醇 4℃ 条件保存。流水冲洗股骨表面,14% EDTA 脱钙,针刺股骨无阻力感后,表明脱钙完成。使用梯度的酒精脱水后利用 100% 二甲苯使其透明,透明后的骨组织分别浸入软蜡、硬蜡,再进行包埋。等待冷却凝固后,切片(厚度为 5 μ m)。组织切片染色前,二甲苯先行脱蜡,梯度酒精脱蜡,最后入蒸馏水。HE 染色:苏木精 3 min、流水冲洗 1 min、盐酸酒精分化数秒、伊红 4 min。

1.6 静态骨组织形态学分析

使用 OsteoMeasure 高分辨率数字视频系统进行组织形态学分析,分析在股骨干骨皮质骨和股骨远端 600 μ m 区域的松质骨和皮质骨中进行从生长板下方 200 μ m 开始,根据成骨细胞、骨细胞分布特征及形态特点计数成骨细胞数量。股骨远端的皮质骨被定义为骨膜表面与源自生长板的内皮层表面之间的骨骼,所使用的术语和单位是美国骨与矿物研究学会组织形态学命名委员会推荐的术语和单位^[18]。

1.7 实时荧光定量 PCR

采用骨粉碎仪粉碎法提取骨细胞 RNA, 用无菌 PBS 冲洗骨髓腔, 液氮迅速冻干, 按 100 mg 骨量加入 1 mL trizol 后使用骨粉碎仪粉碎, 每隔 12 s 置于冰中冷却降温。逆转录获得 cDNA, 按照设计引物序列(表 1)及 PCR 试剂盒配置 PCR 反应体系。检测成骨细胞标志物 Runx2、ALP、OSX、OCN, 破骨吸收特异性标志物 RANKL、OPG, 并得出 RANKL/

OPG 比率。扩增条件: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 循环 40 次; 65 °C ~ 95 °C 每次上升 0.5 °C 绘制溶解曲线。以 CHOB 表达作为参照, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.8 统计学分析

采用 IBM® SPSS® Statistics 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组组间差异比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha < 0.05$ 。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of the primers

Genes	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
CS-Cre	AGGGATCGCGAGGCGTTTTC	GTTTCTTTTCGGATCCGCC
Smad4 flox	AAGAGCCACAGGTCAAGCAG	GGGCAGCGTAGCATATAAGA
CHOB	CAGAATGGTAGGAAGGTCACG	CGAATGCTGTAATGGCGTATC
ALP	ACACCAATGTAGCCAAGAATGTCA	GATTCCGGCAGCGGTTACT
RANKL	CATCACGTTAAGCAACCG	ACCGAAGCGTTGGACA
OPG	ACGGACAGCTGGCACACCAG	CTCACACACTCGGTTGTGGG
Runx2	CCGTGGCCTTCAAGTTGT	TTCATAACAGCGGAGGCATT
OSX	CCCTTCTCAAGCACCAATGC	AAGGCTGGCTAGTCATTTCATA
OCN	CACCGCGCCTGAGTCTGA	GCCCGAGTCTCTTACTACCTTA

2 结果

2.1 特异性骨细胞敲除 Smad4 基因小鼠后基因型鉴定

小鼠剪尾 56 °C 过夜消化后, 对 DMP1-Cre、Smad4 分别进行常规 PCR 反应, 如图 1 所示。本实验中选择 Dmp1-Cre⁺、Smad4^{f/f} (Smad4^{fl} Cko) 小鼠为实验小鼠, 仅带 loxp 位点修饰的 Smad4 (Smad4^{f/f}) 为对照小鼠。

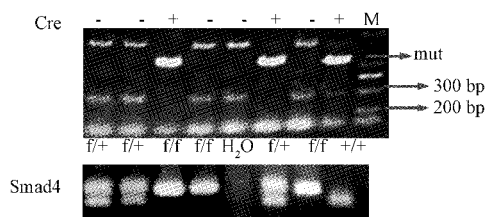


图 1 骨细胞特异性敲除 Smad4 小鼠的基因型鉴定

Fig.1 Genotyping of the mice specific knockout Smad4

2.2 Smad4 特异性敲除小鼠表型变化

在围产期, 突变型小鼠与对照组小鼠相比, 小鼠胚胎表型正常(图 2A), 胚胎重量差异无统计学意义(图 2B)。在胚胎期 E 18.5 d 时胚胎小鼠全身骨骼茜素红染色结果显示与对照小鼠相比, 突变小鼠未见长骨明显畸形(图 2B)

2.3 骨细胞 Smad4 基因特异性敲除小鼠骨表型变化

出生约 14 d, 突变小鼠与对照组小鼠出现形体差异, 突变小鼠与对照鼠相比, 生长发育缓慢, 高蛋白喂食后, 生长迟缓的现象不能够被改善(图 3A)。收集小鼠股骨、胫骨、椎骨, 测量结果显示骨长度均降低(图 3A)。X 线结果显示, 突变小鼠全身骨密度均降低, 出现严重的骨骼矿化不良。定量分析显示, 胫骨降低 40%, 股骨降低 36%, 椎骨降低 20% (图 3B)。

2.4 石蜡组织切片 HE 染色及骨组织形态学分析

骨组织形态学定量分析发现 Smad4^{fl} Cko 小鼠松质骨骨量减少近 50%, 皮质骨骨体积减少、变薄(图 4A)。松质骨与皮质骨的成骨细胞数量均减少, 且与对照小鼠相比, 发现成骨细胞表面积变小(图 4B)。

2.5 成骨细胞分化测定

研究结果显示, Runx2、ALP、OSX 与对照组相比表达量降低, OCN 表达量降低。此结果证明了在骨细胞特异性敲除 Smad4 后, 骨矿化减少, 可能是由于成骨细胞分泌活性降低。并且成骨细胞全部生命过程参与骨细胞 Smad4 对于骨稳态的调控。详见图 5。

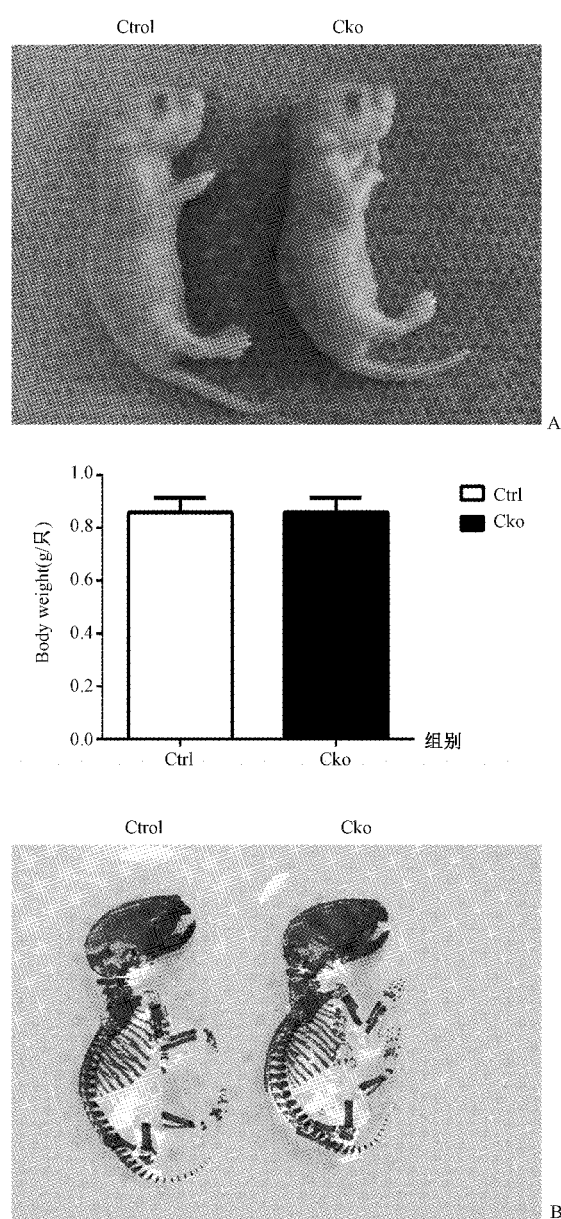


图2 A:对照组(左)与突变组(右)出生第一天时总体形态及胚胎重量统计;B:对照组(左)与突变组(右)小鼠胚胎全身骨骼染色

Fig. 2 A: Total embryo morphology and embryo weight, control (left), mutant (right); B: Whole mount skeletal staining of new pups, control (left), mutant (right).

2.6 破骨细胞标志物实时荧光定量PCR检测突变鼠破骨吸收特异性基因

研究结果显示,Smad4基因突变组RANKL表达量升高,OPG表达量降低,RANKL/OPG比率升高,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。详见图6。

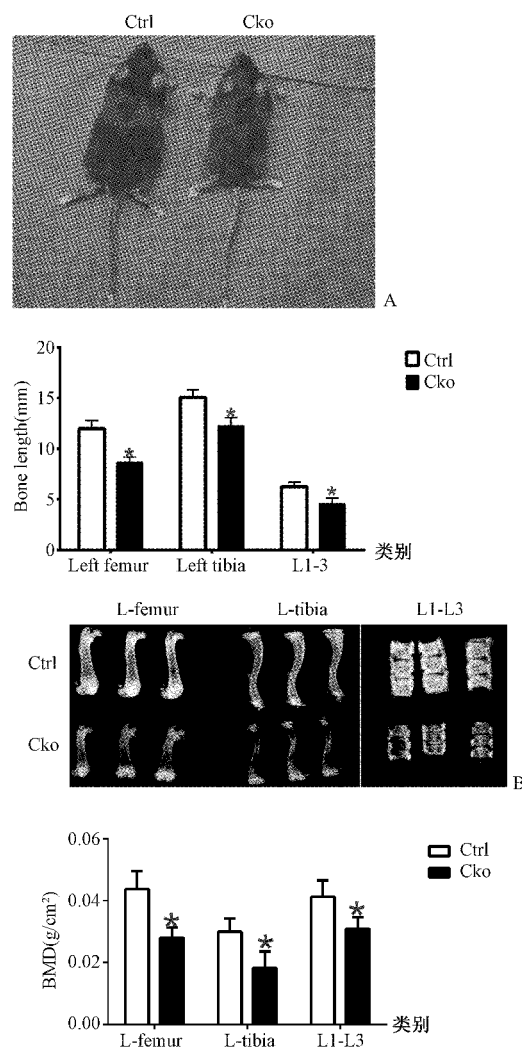


图3 A:对照组(左)与突变组(右)1月龄时总体形态及股骨、胫骨、椎骨长度测量分析结果;B:野生型(左)与Smad4^{fl}cko(右)1月龄时小鼠X光影像及骨密度分析结果

Fig.3 A: Morphology of mice at one month and analysis of the length of the femur, tibia, and vertebrae; B: BMD of the femur, tibia, and vertebrae at one month.

注: * $P < 0.05$, $n = 10$

3 讨论

BMP信号通路在维持骨量及骨稳态具有重要作用,虽有学者发现,在破骨细胞中敲除Smad4,骨量大大增加^[19],这证明破骨细胞中Smad4基因抑制骨形成。但仍然对于BMP信号通路下游的级联Smad分子对于骨量的调控功能研究较少。有学者

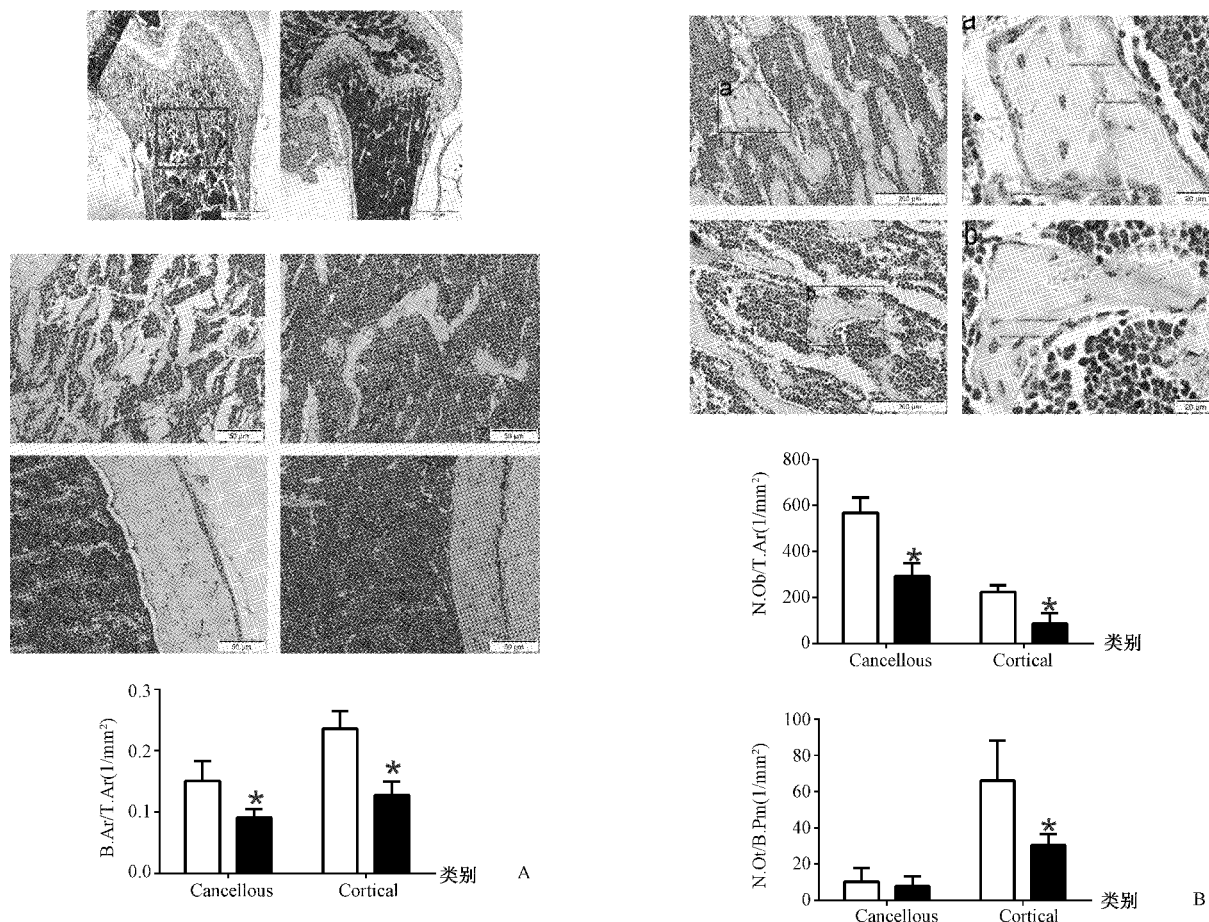


图4 A:石蜡组织切片 HE 染色,松质骨及皮质骨骨形态图(倒置荧光显微镜×40)及放大图(倒置荧光显微镜×100);松质骨、皮质骨总体骨量分析;B:突变小鼠与对照小鼠成骨细胞放大示意图(倒置荧光显微镜×400),突变小鼠与对照小鼠松质骨、皮质骨中成骨细胞、骨细胞定量分析,矩形框为成骨细胞,骨细胞计数区域图,箭头所示为成骨细胞

Fig.4 A: HE staining of the bone tissue on paraffin sections (inverted fluorescence microscope ×40) and analysis of total bone mass in the cancellous bone and cortical bone (inverted fluorescence microscope ×100); B: Microscopy images showing osteoblasts, and quantitative analysis of osteoblasts and osteocytes in cancellous bone and cortical bone (inverted fluorescence microscope ×400). B.Ar/T.Ar, Bone area/Tissue area; N.ob/T.Ar, Osteoblast number/Tissue area; N.ot/B.Pm, Osteocyte number/bone perimeter.

注: * $P < 0.05$, $n = 5$

报道 Smad4 基因体细胞突变小鼠表现出胚胎致死性^[20],从而就不能研究 Smad4 在骨中的作用。本实验采用的 Cre/loxP 系统做到了不影响胚胎的正常发育,且保留 Smad4 在骨发育中的作用。Smad4 敲除后,在胚胎期未观察到小鼠长骨骨骼的生长异常,这说明骨细胞 Smad4 基因不影响小鼠胚胎发育及胚胎长骨正常发育。

本研究首次发现,与在破骨细胞敲除 Smad4 基因不同。骨细胞中敲除 Smad4,骨量降低,这证明 Smad4 是能够促进骨形成的,Smad4 在机体中存在的部位不同,所介导的生物功能也不相同,这为骨的再生修复提供了新的研究方向。骨细胞 Smad4 基因特异性敲除后,成骨细胞所介导的成骨分化降低,成骨细胞早期标志物 Runx2、ALP、OSX 及晚期标志

物 OCN 均升高。这证明骨细胞 Smad4 对于骨量的调控,涉及成骨细胞分化的整个过程。这从另一方面也提示,若调控 Smad4 促进形成的骨量,可以调节骨祖细胞、前成骨细胞、成熟成骨细胞的各个分泌过程。

骨细胞 Smad4 基因突变鼠中,破骨细胞介导的骨吸收增高,RANKL 表达量增高、OPG 表达量下调,RANKL/OPG 比率增高。说明 Smad4 对于骨稳态的调控是通过骨形成与骨吸收二者的共同介导,导致骨量减少。X 线结果显示,突变小鼠全身骨密度均降低,出现严重的骨骼矿化不良。定量分析显示,胫骨降低 40%,股骨降低 36%,椎骨降低 20%。说明骨细胞 Smad4 基因在促骨形成方面功能强大,而且骨细胞 Smad4 基因对于骨稳态也有调控作用。

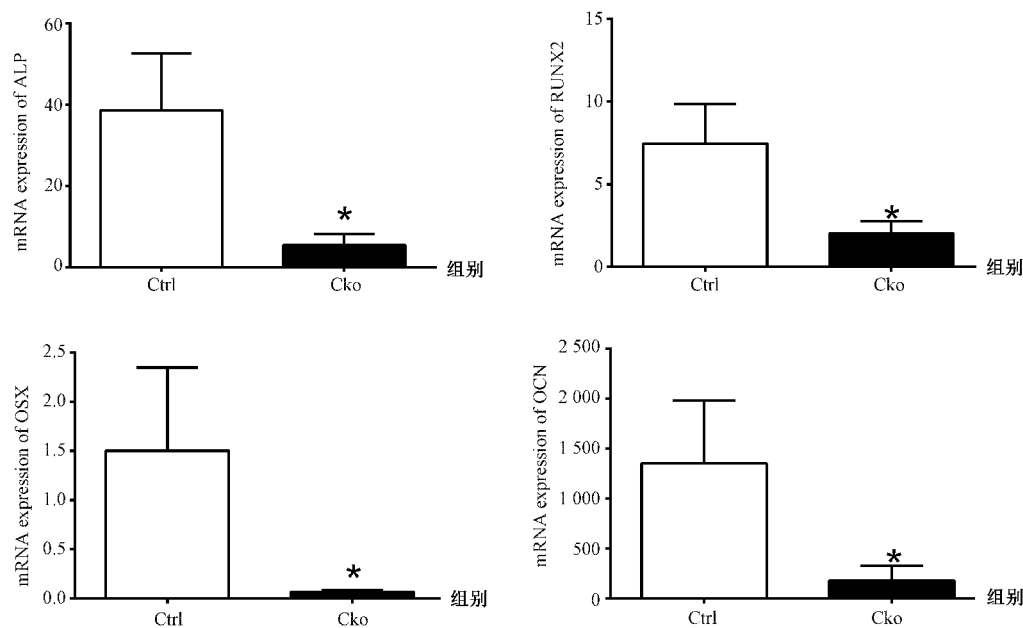


图 5 成骨细胞早期标志基因 Runx2、ALP、OSX 以及晚期成骨标志物 OCN (* $P < 0.05$, $n = 6$)

Fig.5 Osteoblast early marker genes Runx2, ALP, OSX, and late osteoblast markers OCN (* $P < 0.05$, $n = 6$).

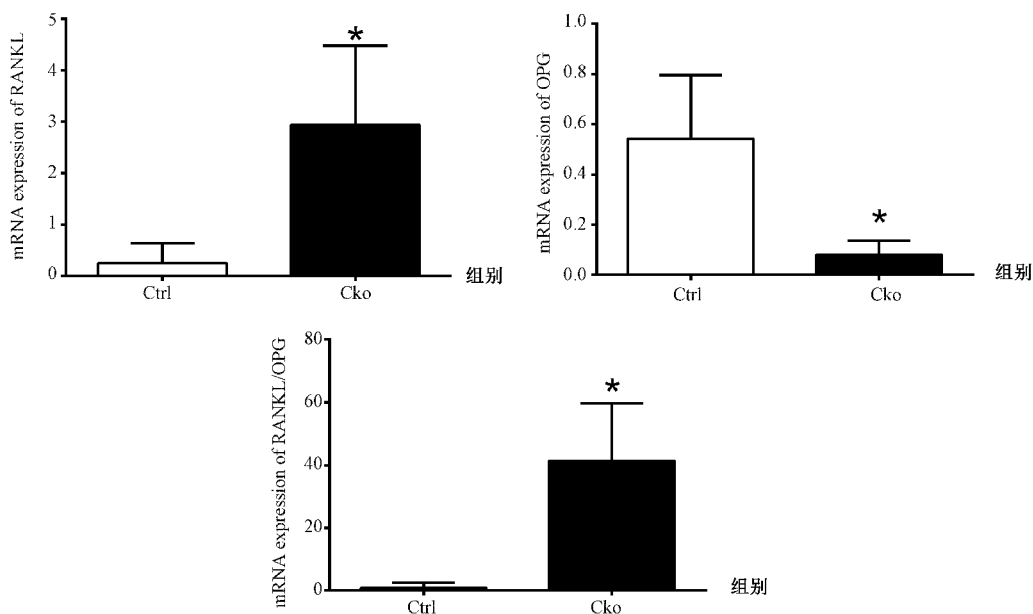


图 6 突变鼠股骨破骨吸收标志基因表达 (* $P < 0.05$, $n = 6$)

Fig.6 Osteoclasts marker gene expression (* $P < 0.05$, $n = 6$)

综上,本研究首次发现骨细胞 Smad4 基因可以促进骨形成,维持骨稳态。确定了以骨细胞作为靶细胞,调节其基因表达,可为骨的修复重建提供新的研究思路。

【参 考 文 献】

- [1] Cauley JA. Screening for osteoporosis [J]. JAMA, 2018, 319 (24): 2483-2485.

- [2] Chen Y, Guo Y, Zhang X, et al. Bone susceptibility mapping with MRI is an alternative and reliable biomarker of osteoporosis in postmenopausal women [J]. Eur Radiol, 2018, 28 (12): 5027-5034.
- [3] Iqbal J, Yuen T, Kim SM, et al. Opening windows for bone remodeling through a SLIT [J]. J Clin Invest, 2018, 128 (4): 1255-1257.

(下转第 655 页)

- activities of daily living in older adults with and without osteoporosis, osteoarthritis and chronic back pain: a secondary analysis of population-based health survey data [J]. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2016, 17(1):139.
- [24] Qi H, Bao J, An G, et al. Association between the metabolome and bone mineral density in pre- and post-menopausal Chinese women using GC-MS [J]. *Molecular Biosystems*, 2016, 12(7): 2265-2275.
- [25] Wan X, Zhao Y, Burge R, et al. Actions of osteoporosis treatments on bone histomorphometric remodeling: a two-fold principal component analysis [J]. *Osteoporosis International*, 2013, 24(12):3011-3019.
- [26] Lahdenperä M, Mar KU, Lummaa V. Reproductive cessation and post-reproductive lifespan in Asian elephants and pre-industrial humans [J]. *Frontiers in Zoology*, 2014, 11(1):54.
- [27] Maciejewska K, Drzazga Z, Kaszuba M. Role of trace elements (Zn, Sr, Fe) in bone development: energy dispersive X-ray fluorescence study of rat bone and tooth tissue [J]. *Bio Factors*, 2014, 40(4):425-435.
- [28] Balogh E, Tolnai E, Nagy B, et al. Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin [J]. *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease*, 2016, 1862(9):1640-1649.
- [29] Okabe H, Suzuki T, Uehara E, et al. The bone marrow hematopoietic microenvironment is impaired in iron-overloaded mice [J]. *European Journal of Haematology*, 2014, 93(2): 118-128.
- [30] Thanakun S, Pomprasertsuk-Damrongsri S, Izumi Y. C-reactive protein levels and the association of carotid artery calcification with tooth loss [J]. *Oral Diseases*, 2017, 23(1):69-77.
- [31] 刘文华, 汤珊珊, 黄哲人, 等. 绝经后女性同型半胱氨酸、脂质水平、CRP、NLR 与骨质减少的关系 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2016, 43(1):103-106.
- (收稿日期: 2017-12-16; 修回日期: 2019-01-24)

(上接第 605 页)

- [4] Masi L, Simonini G, Piscitelli E, et al. Osteoprotegerin (OPG)/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potential modulating role for OPG/RANK-L in bone injury? [J]. *J Rheumatol*, 2004, 31(5):986-991.
- [5] Bernardi S, Di Girolamo M, Necozone S, et al. Antiresorptive drug-related osteonecrosis of the jaws, literature review and 5 years of experience [J]. *Musculoskelet Surg*. 2018 Jun 14. doi: 10.1007/s12306-018-0548-6.
- [6] Herlofson BB, Kjolte CK, Westgaard KL, et al. Osteonecrosis of the jaw in a patient with bone metastatic prostate cancer after long-term bisphosphonate treatment with severe deterioration following radium-223 [J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2018, 16(5): 328-331.
- [7] Bonewald LF. The amazing osteocyte [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(2):229-238.
- [8] Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling [J]. *Calcif Tissue Int*, 2014, 94(1): 25-34.
- [9] Tu X, Delgado-Calle J, Condon KW, et al. Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/beta-catenin signaling in bone [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(5):E478-486.
- [10] Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, et al. Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts [J]. *Nature*, 2014, 506(7487): 240-244.
- [11] 任磊, 代光明, 林泉, 等. 骨细胞 Wnt/ β -Catenin 通过 Notch 信号促进 BMSCs 成骨分化 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(5):600-605.
- [12] Razzouk S, Sarkis R. BMP-2: biological challenges to its clinical use [J]. *N Y State Dent J*, 2012, 78(5):37-39.
- [13] Kim HY, Lee JH, Lee HAR, et al. Sustained release of BMP-2 from porous particles with leaf-stacked structure for bone regeneration [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(25): 21091-21102.
- [14] Smoljanovic T, Caric D, Bojanic I. RE: Clinical applications of bone morphogenetic proteins: current evidence. Kanakaris, NK; Giannoudis, PV; *JSOA* 17(3):133-46, 2008 [J]. *J Surg Orthop Adv*, 2010, 19(2):135-137.
- [15] Asparuhova MB, Caballe-Serrano J, Buser D, et al. Bone-conditioned medium contributes to initiation and progression of osteogenesis by exhibiting synergistic TGF- β 1/BMP-2 activity [J]. *Int J Oral Sci*, 2018, 10(2):20.
- [16] Bivi N, Condon KW, Allen MR, et al. Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(2):374-389.
- [17] Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis [J]. *Calcif Tissue Int*, 1982, 34(3):311.
- [18] Dempster DW. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: 2012 update of the report of the ASBM Histomorphometry Nomenclature Committee [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(1):2-17.
- [19] Moon YJ, Yun CY, Choi H, et al. Smad4 controls bone homeostasis through regulation of osteoblast/osteocyte viability [J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48(9):e256.
- [20] Sirard C, de la Pompa JL, Elia A, et al. The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(1):107-119.
- (收稿日期: 2018-07-02; 修回日期: 2018-08-06)