

· 论 著 ·

Wnt/ β -catenin 通路在 FSH β 增强 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的作用研究

成亚琳¹ 赵怡心² 张任飞¹ 刘宏^{2*}

1. 绵阳市第三人民医院/四川省精神卫生中心, 四川 绵阳 621000

2. 重庆医科大学附属第一医院生殖健康与不孕症中心, 重庆 400016

中图分类号: R322. 54; R322. 71; R329. 2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 12-1773-06

摘要: 目的 探讨 Wnt/ β -catenin 通路在促卵泡激素 β 亚基 (follicle-stimulating hormone β -subunit, FSH β) 增强骨形成蛋白 9 (bone morphogenetic protein 9, BMP9) 诱导间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 成骨分化的作用。方法 C3H10T1/2 细胞为研究对象, 通过碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色方法检测 Ad-GFP 对照组、Ad-FSH β 实验组、Ad-BMP9 实验组、Ad-BMP9+Ad-FSH β 实验组或 Ad-BMP9+Ad-FSH β +XAV-939 实验组等各研究组 ALP 表达; 茜素红 S 染色 (alizarin red s, ARS) 方法检测各研究组钙盐小节沉积; 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 技术检测各研究组 cyclin D1 转录。结果 单独的 Ad-FSH β 实验组骨形成早、晚期标志物 (ALP 和钙盐小结) 与 Ad-GFP 对照组相比无显著差异; 单独的 Ad-BMP9 实验组中, 两者的表达均高于 Ad-GFP 对照组; Ad-FSH β 与 Ad-BMP9 联合实验组的表达量较 Ad-BMP9 实验组显著增加。检测各研究组 Wnt/ β -catenin 通路的靶基因 cyclin D1 的转录, 与 Ad-GFP 对照组相比, Ad-FSH β 实验组的表达无显著变化, Ad-BMP9 实验组的表达水平显著升高 ($P < 0.01$), Ad-FSH β 与 Ad-BMP9 联合实验组 cyclin D1 mRNA 表达量显著高于 Ad-BMP9 实验组 ($P < 0.01$)。Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 XAV-939 处理后, Ad-BMP9 与 XAV-939 联合实验组 cyclin D1 mRNA 的水平较 Ad-BMP9 实验组下降 ($P < 0.01$), Ad-FSH β 、Ad-BMP9 与 XAV-939 三者联合实验组水平也较 Ad-FSH β 与 Ad-BMP9 联合实验组下降 ($P < 0.05$)。ALP 的表达呈现出与 cyclin D1 转录相似的变化趋势。结论 Wnt/ β -catenin 通路可能在促卵泡激素 β 亚基增强骨形成蛋白 9 诱导 MSCs 成骨分化中起重要作用。

关键词: C3H10T1/2 细胞; 骨形成蛋白 9; 促卵泡激素 β 亚基; Wnt 信号; XAV-939

The study of the Wnt/ β -catenin on FSH β enhanced BMP9-induced mesenchymal stem cells osteogenesis

CHENG Yalin¹, ZHAO Yixin², ZHANG Renfei¹, LIU Hong^{2*}

1. Department of Clinical Laboratory, Mianyang Municipal Third People's Hospital/ Sichuan Provincial Mental Health Center, Mianyang 621000, China

2. Department of Reproduction Health and Infertility, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

* Corresponding author: LIU Hong, Email: 3367009927@qq.com

Abstract: Objective To investigate the influence of Wnt/ β -catenin pathway on follicle-stimulating hormone β -subunit (FSH β) enhanced bone morphogenetic protein 9 (BMP9) induced mesenchymal stem cells (MSCs) osteogenesis. **Methods** C3H10T1/2 cells were the research objects, Alkaline phosphatase (ALP) chromogenic reaction tested the ALP expression in each group, contained: Ad-GFP control group, Ad-FSH β experimental group, Ad-BMP9 experimental group and Ad-BMP9 + Ad-FSH β experimental group. Alizarin Res S (ARS) staining detected the calcium salt nodules in all groups. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technology explored the cyclin D1 transcription in each group. **Results** There were no significant differences in the early and late markers expression of bone formation (ALP and calcium salt deposition) in Ad-FSH β group and Ad-GFP control group; in the Ad-BMP9 alone, the expression of both markers were higher than the Ad-GFP control group; in the Ad-FSH β and the Ad-BMP9 combine group, the expression of both markers increased significantly compared with the Ad-BMP9 group. Detected the transcription of Wnt/ β -catenin pathway target gene cyclin D1, compared with Ad-GFP control

* 通信作者: 刘宏, Email: 3367009927@qq.com

group, there was no significant difference with Ad-FSH experimental group, the level in the Ad-BMP9 experimental group was increased significantly ($P < 0.01$), and the cyclin D1 mRNA expression level in the Ad-FSH and the Ad-BMP9 combined the experimental group was more higher than Ad-BMP9 alone ($P < 0.01$). After treatment with Wnt/ β -catenin pathway inhibitor XAV-939, the level of cyclin D1 mRNA in the Ad-BMP9 and the XAV-939 combined group was decreased than the Ad-BMP9 group ($P < 0.01$), and the level of Ad-FSH β , Ad-BMP9 and XAV-939 combined experimental group was also lower than that of Ad-FSH β and Ad-BMP9 combined experimental group ($P < 0.05$). The change trend of ALP was similar with cyclin D1 transcription.

Conclusion Wnt/ β -catenin pathway may play an crucial role in follicle-stimulating hormone β -subunit enhanced bone morphogenetic protein 9 induced mesenchymal stem cells osteogenesis.

Key words: C3H10T1/2 cells; BMP9; FSH β ; Wnt signaling; XAV-939

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 的高发生率、严重并发症成为困扰人们的公共卫生难题,其骨吸收超过骨形成,骨密度降低,骨组织结构完整性被破坏,骨骼变得脆弱,易于发生骨折^[1]。长期以来,人们认为 PMOP 的发生与绝经后雌激素水平降低有关^[2],但随着研究^[3]进展,也有人认为围绝经期显著升高的促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 是引起 PMOP 的重要原因之一。

FSH 是来源于腺垂体的促性腺激素^[4],由特异性的 β 亚基通过非共价键连接非特异性的 α 亚基^[5-7]组成二聚体,与卵巢或睾丸中的 FSH 受体 (follicle-stimulating hormone receptor, FSHR) 结合^[8]调节性腺发育^[4],其分泌受下丘脑、卵巢或睾丸等的调节。长久以来,人们对 FSH 生理作用的认识局限于生殖系统,但随着研究方法的多样化,人们也开始关注其对生殖系统以外的影响^[9]。

研究表明,FSHR 广泛分布于多种组织。胰腺^[10]、前列腺^[11]、胎盘^[12]等均有 FSH 和 FSHR 存在,血糖^[10]、血脂^[13]调节、肿瘤转移^[14]、血管形成^[12]等也有其参与。骨骼系统中,破骨细胞及其前体、成骨细胞前体^[15]以及软骨细胞^[16]上均检测到 FSHR 表达。在破骨细胞及其前体上,FSH 与 $G_{i\alpha}$ 偶联的 FSHR 结合,促进破骨细胞形成,使骨吸收增加,因而认为绝经期升高的 FSH 是引起 PMOP 的原因之一^[15]。Tourkova 等^[17]通过研究 FSH 对间充质干细胞的影响,发现 FSH 可以增加 MSCs 的增值,但对成骨分化并无显著影响,甚至随着时间延长会减少骨形成。此外,也有研究表明,FSH β 能增强 BMP/Smad 通路^[18]和 Notch 通路^[19]协同 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化。那么,作为五大发育信号之一的 Wnt 通路是否也参与了 FSH 增强 BMP9 诱导的成骨分化呢?

Wnt 信号庞大而复杂,最经典的是 Wnt/ β -catenin 信号^[20]。Wnt 配体与受体结合后,抑制

APC-Axin-GSK3 β 复合物的功能,胞质内 β -catenin 磷酸化水平降低,非磷酸化水平显著升高,转移至核内与 TCF/LEF 形成复合物,激活下游靶基因: cyclin D1、c-Myc、c-Jun、DPAGT1 等的转录^[21],调节细胞增殖和存活^[22]。Wnt 通路与多种信号网络存在联系,可通过 β -catenin 与 Runx2 相互作用,参与 BMP9 对 MSCs 的成骨调节^[23]。因此,本课题在前期研究^[18, 19]的基础上探讨了 Wnt/ β -catenin 信号对 FSH β 协同 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化的影响。

PMOP 引起的健康问题受到广泛关注,有人期待以绝经期显著升高的 FSH 为契机,寻找防治新方向。本课题使用从 C3H 小鼠胚胎中分离建立的具有多向分化潜能的间充质干细胞株 C3H10T1/2 为研究对象,以重组腺病毒为 GFP、FSH β 和 BMP9 载体,将 FSH β 与有较强成骨作用的 BMP9 相结合,探讨 FSH β 对 BMP9 诱导 MSCs 成骨的影响,为绝经后骨松的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 研究材料

本研究使用的 293T 人胚肾细胞和 C3H10T1/2 细胞均从 ATCC (American type culture collection) 公司采购^[19]。ALP 显色试剂盒从 Beyotime Biotechnology 公司采购。ARS 染料从重庆赛米克生物科技有限公司采购。细胞总 RNA 快速抽提试剂盒 (Trizol) 为美国英杰 (Invitrogen) 公司生产。反转录试剂盒和 qPCR 检测试剂盒从宝生物工程 (大连) 有限公司采购。XAV-939 购买于 MedChemExpress 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 本研究中所有细胞均在含 90 % 高糖、10 % 热灭活胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 和 1 % 链霉素 (100 μ g/mL)、青霉素 (100 U/mL) 的 DMEM 培养基中培养,置 5 % CO_2 、37 $^{\circ}C$ 细胞培养箱。

1.2.2 重组腺病毒 GFP、BMP9 和 FSH β 的构建与扩增:本研究使用的目标重组腺病毒 GFP、BMP9 和 FSH β (Ad-GFP、Ad-BMP9 和 Ad-FSH β) 均使用 AdEasy 系统^[24]构建,表达绿色荧光,293T 细胞扩增后冻存于-80℃。

1.2.3 目标腺病毒滴度测定及药物浓度测定:本研究设计为四组:Ad-GFP 组(对照组)、Ad-BMP9 组、Ad-FSH β 组和 Ad-BMP9+Ad-FSH β 组(后三组为实验组)。将 C3H10T1/2 细胞消化、离心、重悬后以适当密度接种于 24 孔板^[19],待细胞贴壁后,取适量重组腺病毒原液按倍比稀释法感染细胞,24 h 后荧光显微镜下观察细胞内各种腺病毒绿色荧光表达量,结合 ALP 显色结果选择重组腺病毒感染浓度进行

研究。此外,将不同浓度的 XAV-939 加入 Ad-BMP9 +Ad-FSH β 实验组,根据 ALP 染色结果选择药物浓度。每组实验重复次数: $n=3$ 。

1.2.4 ALP 染色:将细胞接种于 24 孔板,根据测定的腺病毒或药物浓度处理细胞,7 d 后按 ALP 显色试剂盒操作说明对细胞进行固定、清洗、染色、照相并记录。每组实验重复次数: $n=3$ 。

1.2.5 目的基因检测:将细胞接种于 24 孔板,重组腺病毒或药物处理细胞,5 d 后根据 TRIzol、反转录试剂盒和 qPCR 检测试剂盒使用说明提取细胞总 RNA、合成 cDNA 并检测目的基因表达。每组实验重复次数: $n=3$ 。目的基因前、后引物序见表 1。

表 1 目的基因引物序列
Table 1 Gene primers sequences

基因	前引物(5'→3')	后引物(5'→3')
CHOB	CAGAATGGTAGGAAGGTCACG	CGAATGCTGTAATGGCGTATC
cyclin D1	GTGCGTGCAGAAGGAGATTGT	CTCACAGACCTCCAGCATCCA

1.2.6 ARS 染色:将细胞接种到 24 孔板,重组腺病毒感染细胞后第 3 天用含 10 mmol/L β -磷酸甘油和 50 ng/mL 维生素 C 的钙盐诱导培养基替代 DMEM 培养基,第 28 天移弃培养基后经多聚甲醛(4%)固定、茜素红 S 染色后显微镜下采集图像信息。每组实验重复次数: $n=3$ 。

1.3 统计分析

本课题数据分析采用 SPSS 22.0 软件,以 $\bar{x} \pm s$ 表示平均值 $\pm$ 标准差。采用 Student's *t*-test 检验比较组间差异,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,当 $P<0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 FSH β 对 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化中碱性磷酸酶和钙盐小结的影响

ALP 是一种糖蛋白,在骨组织中被认为是骨形成的早期生物学标志物^[25]。另外,在 MSCs 向骨细胞分化的进程中,成骨细胞是一个重要的中间分化形态,其重要的生物学特征是分泌细胞外基质(类骨质),导致磷酸钙沉积,即矿化,茜素红 S 染色后呈橘红色。因此,钙盐小结被认为是其重要的晚期标志物之一。将测定滴度的目标腺病毒按实验设计感染 C3H10T1/2 细胞,分别于 7 d 和 28 d 后检测 ALP 和钙盐小结的表达。研究结果如图 1 A 所示,较 Ad-GFP 对照组,Ad-FSH β 实验组 ALP 的显色无

明显差异,Ad-BMP9 实验组明显加深,提示 FSH β 对 MSCs 向成骨细胞的分化无显著影响,BMP9 则有较强的成骨诱导功能;而 Ad-BMP9 与 Ad-FSH β 联合实验组 ALP 显色较 Ad-BMP9 实验组进一步加深,钙盐小结染色结果也呈现相似的显色趋势(图 1B),提示 FSH β 表达增强了 BMP9 诱导下 MSCs 成骨方向分化的能力。

2.2 FSH β 对 BMP9 诱导的 MSCs 中 cyclin D1 mRNA 表达的影响

本课题前期研究发现经典的 BMP/Smad 信号^[18]和 Notch 信号^[19]可能参与了 FSH β 协同 BMP9 诱导 MSCs 成骨,因而,本研究探讨了经典的 Wnt/ β -catenin 信号是否也在其中发挥作用。检测 Wnt/ β -catenin 通路下游基因转录,在 Ad-FSH β 实验组, cyclin D1 mRNA 的表达量与 Ad-GFP 对照组相比无显著性差异, Ad-BMP9 实验组的表达量明显升高($P<0.01$),提示单独用 FSH 处理 MSCs 不会引起 Wnt/ β -catenin 信号的增强,而 BMP9 则可诱导经典的 Wnt 信号传递;此外,联合使用 Ad-BMP9 和 Ad-FSH β 处理 MSCs, cyclin D1 的转录较 Ad-BMP9 实验组显著增加($P<0.01$),提示 FSH β 增强了 BMP9 诱导的 cyclin D1 的转录(图 2),亦即 FSH β 增强了 BMP9 诱导的 Wnt/ β -catenin 信号传递。

2.3 XAV-939 降低了 FSH β 增强 BMP9 诱导的 MSCs 中 cyclin D1 转录和 ALP 表达

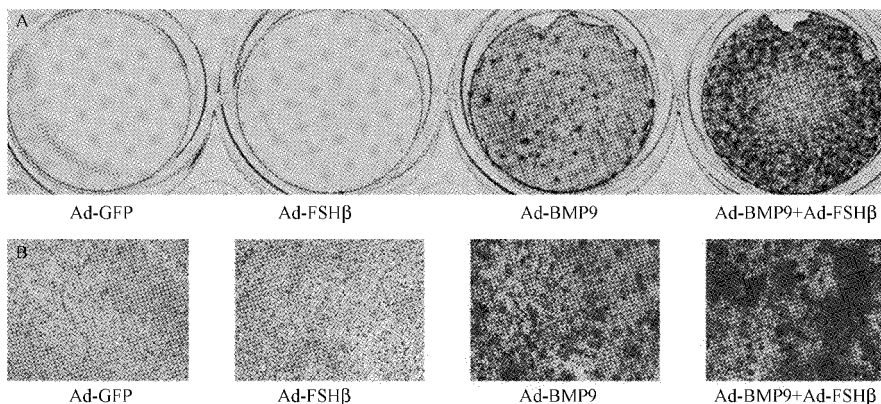


图1 FSH β 对BMP9诱导的MSCs成骨分化中ALP和钙盐小结的影响

A:ALP显色结果显示各组ALP表达情况(7 d);B:ARS染色后光学显微镜下各组钙盐小结沉积情况(28 d,100 $\times$)。

Fig.1 The influences of FSH on ALP and calcium salt nodules of MSCs osteogenesis differentiation induced by BMP9

A:ALP chromogenic reaction showed the ALP expression in all groups (7 days); B:ARS staining results showed the calcium salt nodules deposition in each group with optical microscope detection (28 days, 100 $\times$).

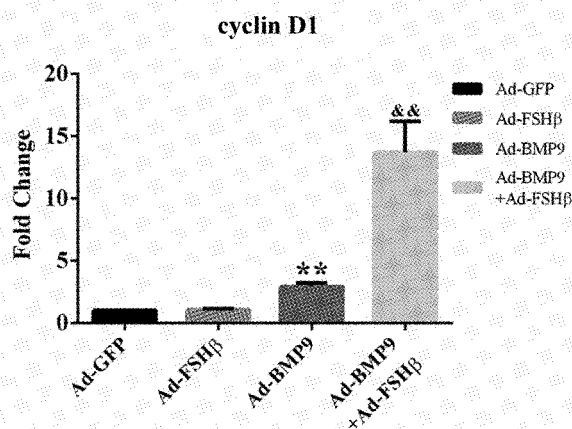


图2 qPCR技术检测各组cyclin D1的转录水平(5 d, $n=3$, Student's t -test)

注:与Ad-GFP组比较, ** $P<0.01$; 与Ad-BMP9组比较, && $P<0.01$ 。

Fig.2 qPCR technology assayed the transcription levels of cyclin D1 in each group(5 days, $n=3$, Student's t -test)

本研究使用Wnt信号抑制剂XAV-939进一步验证笔者的猜想。XAV-939可结合ADP-核糖基化酶催化域稳定Axin,降低 β -catenin稳定性,因此在该通路中起阻滞剂功能。首先,本研究检测了XAV-939处理后各研究组中Wnt/ β -catenin下游基因的转录。和预期一样(图3),XAV-939处理后,降低了细胞中BMP9诱导的cyclin D1的转录水平($P<0.01$),也降低了Ad-BMP9与XAV-939联合实验组中cyclin D1的转录水平($P<0.05$),提示XAV-939降低了FSH β 增强BMP9诱导的Wnt/ β -catenin信号转导。另外,显色实验显示各研究组中ALP的表

达和cyclin D1转录有相似的变化,提示XAV-939抑制了FSH β 协同BMP9诱导成骨的作用。

3 讨论

PMOP的高发生率已引起各国的重视,其病因、发病机制、诊治方法、预防策略等都是广泛关注的问题。随着组织工程学的发展,具有成骨分化潜能的MSCs有望在PMOP的防治中发挥作用,但由于其多向分化特性,其在成骨中的实际应用受到限制。

研究发现,FSH除调节生殖系统外,对骨骼系统也存在影响。FSH对骨形成负调控,FSH β 亚基的多克隆抗体不仅阻断FSH对破骨细胞的作用,还能刺激骨形成,增加成骨细胞数量^[26]。但利用转基因技术在雌鼠高表达FSH^[27]却能增加胫骨和椎体小梁骨体积;另外,不同的FSHR基因型(AA rs 6166和GG rs 6166)对骨代谢也可产生不同影响^[28]。由此,FSH对骨骼系统影响复杂。PMOP表现为骨丢失超过骨形成,而破骨细胞前体和成骨细胞前体上均有FSHR存在,那么是否有因子能与之协作后逆转FSH的破骨能力,向成骨方向发展,成为笔者的研究目标。

很多因子都与FSH存在联系,BMPs家族即是其中之一。BMP7能增加人卵巢颗粒细胞FSHR表达,调节卵泡成熟^[29];在未分化的颗粒细胞里,BMP2却能诱导Smad1/5/8磷酸化阻断FSH诱导的FSHR表达,从而抑制FSH应答^[30]。BMP9被证实有较强诱导成骨分化的作用^[31],本课题推测FSH也能调节BMP9诱导MSCs向成骨细胞分化。

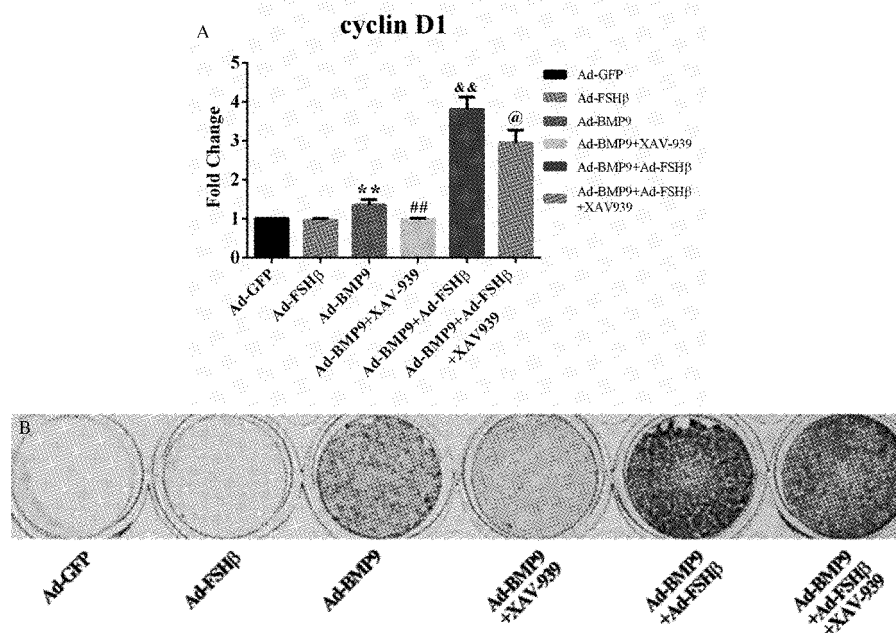


图3 XAV-939(1 μmol/L)处理后各组中 cyclin D1 mRNA 和 ALP 的表达检测

A: qPCR 检测各组中 cyclin D1 的转录(5 d, $n=3$, Student's *t*-test)。与 Ad-GFP 组相比, ** $P<0.01$;与 Ad-BMP9 组相比, ## $P<0.01$;与 Ad-BMP9 组相比, && $P<0.01$;与 AdBMP9+Ad-FSHβ 组相比, @ $P<0.05$;B: ALP 显色实验检测各组 ALP 的表达(7 d)。

Fig.3 The expressions detection of cyclin D1 mRNA and ALP in all groups with XAV-939 (1 μmol/L) treatment

研究以 C3H10T1/2 为间充质干细胞代表,用重组腺病毒携带 BMP9 和 FSHβ 基因体外表达验证笔者的猜想。研究结果显示,FSH 能增强 BMP9 成骨诱导效应,表现为 BMP9 与 FSHβ 共同实验组 ALP、钙盐小结表达比 BMP9 实验组更高,这与本课题前期研究相符^[18-19]。另外,前期研究也证实 BMP/Smad 信号^[18] 和 Notch 信号^[19] 参与了此过程。因此,本研究接下来检测了 Wnt/β-catenin 通路的变化。利用 qPCR 技术检测到 FSHβ 增加了 BMP9 诱导的 cyclin D1 的转录水平,而单独的 FSH 作用对其并无影响,在使用通路抑制剂 XAV-939 的情况下该作用受到部分抑制,表现为 BMP9、FSHβ 与 XAV-939 共同实验组 cyclin D1 的转录表达水平降低,这种改变在 ALP 检测中也得到相似的变化趋势,因此反向验证当两种因子共同作用也增加了 Wnt/β-catenin 的传递。

因此,本研究结果提示 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化可受到 FSHβ 亚基的增强,Wnt/β-catenin 通路可能参与其中。然而,其中涉及的具体作用机制仍需进一步深入研究。另外,结合本课题的早期研究,三种信号通路以外是否还有其他的信号参与,以及三者之间是否有相互联系都是本课题接下来的研究内容,以期对绝经后骨病的防治提供合理的依据。

致谢:感谢重庆医科大学生命科学院骨发育与再生平台为本研究提供的技术支持与帮助。

【参 考 文 献】

- [1] Lavaill M, Trichilo S, Scheiner S, et al. Study of the combined effects of PTH treatment and mechanical loading in postmenopausal osteoporosis using a new mechanistic PK-PD model[J]. Biomechanics and Modeling In Mechanobiology, 2020, 19: 1765-1780.
- [2] Li L, Wang Z. Ovarian aging and osteoporosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1086: 199-215.
- [3] Sowers MR, Finkelstein JS, Ettinger B, et al. The association of endogenous hormone concentrations and bone mineral density measures in pre- and perimenopausal women of four ethnic groups: SWAN[J]. Osteoporos Int, 2003, 14: 44-52.
- [4] Conforti A, Vaiarelli A, Cimadomo D, et al. Pharmacogenetics of FSH action in the female[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 398.
- [5] Ling N, Ying SY, Ueno N, et al. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin[J]. Nature, 1986, 321: 779-782.
- [6] Laine AL, Laclie C, Furlong J, et al. A bovine-specific FSH enzyme immunoassay and its application to study the role of FSH in ovarian follicle development during the postnatal period[J]. Animal, 2018: 1-10.
- [7] Das N, Kumar TR. Molecular regulation of follicle-stimulating hormone synthesis, secretion and action[J]. J Mol Endocrinol,

- 2018, 60: R131-R155.
- [8] Ghinea N. Vascular endothelial FSH receptor, a target of interest for cancer therapy[J]. *Endocrinology*, 2018, 159: 3268-3274.
 - [9] Lizneva D, Rahimova A, Kim SM, et al. FSH beyond fertility [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 136.
 - [10] Chu C, Xu B, Huang W. A study on expression of FSH and its effects on the secretion of insulin and glucagon in rat pancreas [J]. *Tissue Cell*, 2010, 42: 370-375.
 - [11] Hurkadi KS, Shah MG, Pardanani DS, et al. De novo biosynthesis of FSH like peptide by the human prostate[J]. *Life Sci*, 1990, 47: 391-400.
 - [12] Stilley JA, Christensen DE, Dahlem KB, et al. FSH receptor (FSHR) expression in human extragonadal reproductive tissues and the developing placenta, and the impact of its deletion on pregnancy in mice[J]. *Biol Reprod*, 2014, 91: 74.
 - [13] Song Y, Wang ES, Xing LL, et al. Follicle-stimulating hormone induces postmenopausal dyslipidemia through inhibiting hepatic cholesterol metabolism [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101: 254-263.
 - [14] Yang Y, Zhang J, Zhu Y, et al. Follicle-stimulating hormone induced epithelial-mesenchymal transition of epithelial ovarian cancer cells through follicle-stimulating hormone receptor PI3K/Akt-Snail signaling pathway[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2014, 24: 1564-1574.
 - [15] Sun L, Peng Y, Sharrow AC, et al. FSH directly regulates bone mass[J]. *Cell*, 2006, 125: 247-260.
 - [16] Kong D, Guan Q, Li G, et al. Expression of FSHR in chondrocytes and the effect of FSH on chondrocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495: 587-593.
 - [17] Tourkova IL, Witt MR, Li L, et al. Follicle stimulating hormone receptor in mesenchymal stem cells integrates effects of glycoprotein reproductive hormones [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1335: 100-109.
 - [18] Su XY, Zou X, Chen QZ, et al. Follicle-stimulating hormone beta-subunit potentiates bone morphogenetic protein 9-induced osteogenic differentiation in mouse embryonic fibroblasts[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118: 1792-1802.
 - [19] 成亚琳, 曾继涛, 黄敏, 等. FSH β 在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化中的作用研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25 (6): 775-782.
 - [20] Nusse R, Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. *Cell*, 2017, 169: 985-999.
 - [21] Sengupta PK, Bouchie MP, Kukuruzinska MA. N-glycosylation gene DPAGT1 is a target of the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 31164-31173.
 - [22] Mohammed MK, Shao C, Wang J, et al. Wnt/beta-catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance[J]. *Genes Dis*, 2016, 3: 11-40.
 - [23] Tang N, Song WX, Luo J, et al. BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/beta-catenin signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13: 2448-2464.
 - [24] Luo J, Deng ZL, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1236-1247.
 - [25] Jo S, Han J, Lee YL, et al. Regulation of osteoblasts by alkaline phosphatase in ankylosing spondylitis [J]. *Int J Rheum Dis*, 2019, 22: 252-261.
 - [26] Zhu LL, Blair H, Cao J, et al. Blocking antibody to the beta-subunit of FSH prevents bone loss by inhibiting bone resorption and stimulating bone synthesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109: 14574-14579.
 - [27] Allan CM, Kalak R, Dunstan CR, et al. Follicle-stimulating hormone increases bone mass in female mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107: 22629-22634.
 - [28] Rendina D, Gianfrancesco F, De Filippo G, et al. FSHR gene polymorphisms influence bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women [J]. *European Journal of Endocrinology*, 2010, 163: 165-172.
 - [29] Shi J, Yoshino O, Osuga Y, et al. Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells [J]. *Fertility and Sterility*, 2010, 93: 1273-1279.
 - [30] Haugen MJ, Johnson AL. Bone morphogenetic protein 2 inhibits FSH responsiveness in hen granulosa cells [J]. *Reproduction*, 2010, 140: 551-558.
 - [31] Kang Q, Sun MH, Cheng H, et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery [J]. *Gene Ther*, 2004, 11: 1312-1320.

(收稿日期: 2020-03-25; 修回日期: 2020-05-01)