

文章编号:1004-7220(2014)01-0014-06

持续张应力大鼠骨髓基质干细胞 骨向分化影响的基因芯片分析

张 鹏^{1a,2}, 房 兵^{1a,2}, 俞创奇^{1b}, 代庆刚^{1a,2}, 欧阳宁娟^{1a,2}, 吴玉琼^{1a,2}, 杨 筱^{1a,2}, 江凌勇^{1a,2}

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 a. 口腔颌面科, b. 口腔外科, 上海 200011; 2. 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011)

摘要: **目的** 通过基因芯片技术研究持续张应力作用下大鼠骨髓基质干细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 成骨分化中基因表达差异。 **方法** 体外分离及培养大鼠 BMSCs, 使用 Flexercell 应力加载系统进行频率 1 Hz、幅度 10 % 持续张应力加载 6 h。检测持续张应力下大鼠 BMSCs 差异表达基因谱, 并通过 qRT-PCR 对部分芯片结果进行验证。 **结果** 加力组与对照组相比差异表达基因共有 1 244 条, 其中上调基因 793 条, 下调基因 451 条。基因本体论 (gene ontology, GO) 分类发现差异表达基因主要涉及多器官发育、细胞分化、细胞趋化、黏附等功能。Notch、Wnt、FGF 及 IGF 4 条通路可能参与力学诱导下 BMSCs 成骨分化过程。差异表达基因的 PCR 验证结果与芯片结果保持一致。 **结论** 张应力可诱导 BMSCs 骨向分化, 而基因芯片筛选出的差异表达基因可能是力学刺激诱导骨向分化的作用靶点。

关键词: 基因芯片; 骨髓基质干细胞; 张应力; 骨向分化

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Gene expression profile of continuous mechanical stress-induced osteoblastic differentiation of rat bone marrow stromal cells

ZHANG Peng^{1a,2}, FANG Bing^{1a,2}, YU Chuang-qi^{1b}, DAI Qing-gang^{1a,2}, OUYANG Ning-juan^{1a,2}, WU Yu-qiong^{1a,2}, YANG Xiao^{1a,2}, JIANG Ling-yong^{1a,2} (1. a. Department of Oral and Cranio-maxillofacial Science, b. Department of Oral Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China)

Abstract: Objective To evaluate differences in genes expression of rat bone marrow stromal cells (rBMSCs) under continuous mechanical strain by gene microarray technology. **Methods** rBMSCs were isolated and cultured *in vitro*. Continuous stresses with amplitude of 10% and frequency of 1 Hz were applied on rBMSCs for 6 hours by Flexercell mechanical loading system to investigate rBMSC gene expression profiles, and quantitative PCR was used to verify gene expression changes related to osteoblastic differentiation. **Results** Compared with the control group, 1 244 differentially expressed genes were found in mechanical loading group, among which 793 genes were up-regulated, while 451 genes were down-regulated. GO (gene ontology) analysis suggested that differentially expressed genes were mainly involved in multicellular organismal development, cell differentiation, chemotaxis, cell adhesion and so on. Four signaling pathways as Notch, Wnt, FGF and IGF might participate in the regulation of stress-induced osteoblastic differentiation. PCR validation results were consistent with the gene chip re-

收稿日期:2013-05-05; 修回日期:2013-05-31

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81371121, 11342005, 30901698, 10972142), 上海市自然科学基金项目(13ZR1423700), 上海交通大学“医工交叉基金”(YG2012MS40), 上海市科委基础研究重点项目(12JC1405700), 上海交通大学 SMC-晨星青年学者奖励计划优秀青年教师(B类计划), 上海市教委创新团队。

通信作者:江凌勇, 副主任医师, E-mail: jly117@sina.com。

sults. **Conclusions** Mechanical stress could induce osteoblastic differentiation of the BMSCs, while several differentially expressed genes screened by gene microarray may attribute to this process.

Key words: Gene microarray; Bone marrow stromal cells (BMSCs); Mechanical strain; Osteoblastic differentiation

正畸治疗的生物学基础在于机械刺激对局部骨组织形成和改建的调控作用。力学刺激是维持细胞生存和生长的重要细胞外刺激,在骨骼的发育、形成、改建中起重要的作用^[1]。作为目前骨组织工程中最常用的种子细胞之一,骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)具有很强的自我修复能力和多向分化潜能,在体外适当的条件下可以分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞等。BMSCs对周围生物力学环境十分敏感,在外力作用下其骨向分化特性会发生相应改变,是正畸局部骨改建过程中新骨形成的关键细胞行为^[2]。近年来,应力作用下 BMSCs 骨向分化的研究一直是生物力学领域研究的热点,其作为一种潜在的起始因子经过一系列级联反应指导体内骨形成和改建。本课题组前期研究证实,10%持续或间歇牵张应力均可促进 BMSCs 骨向分化,且 ERK- Runx2 信号通路在外界力学信号传导及启动 BMSCs 早期成骨分化过程中发挥重要作用^[3-7]。但 BMSCs 如何感知外界机械刺激并将其转变为生物信号的机制至今仍未完全阐明。本研究通过建立大鼠 BMSCs 体外应力加载细胞模型,利用基因芯片技术检测力学刺激后差异基因表达,为进一步研究机械力信号转导进而调控 BMSCs 成骨分化过程提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

2月龄健康 Sprague-Dawley (SD)大鼠3只,由上海市第九人民医院动物试验中心提供。DMEM高糖培养液(GIBCO,美国),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),Trizol reagent (Invitrogen,美国),dNTP、RT-PCR 试剂盒、Taq DAN 合成酶(Thermo,美国),引物设计及合成由宝生物工程大连有限公司完成,SYBR Premix Ex Taq(宝生物工程大连有限公司),CO₂细胞培养箱(Heraeus,德国),倒置相差显微镜(Olympus,日本),酶联免疫检测仪(Beckman Coulter,美国),iCycler 实时荧光定量 PCR 仪(BIO-

RAD,美国),细胞应力加载系统 FX-4000T™ Flexercell Tension Plus(Flexercell 公司,美国)。上海伯豪生物技术有限公司提供大鼠全基因组 Affymetrix rat 230 2.0 array 芯片。

1.2 大鼠 BMSCs 的取材与体外培养

采用全血贴壁培养的方法^[8]分离大鼠 BMSCs,计数并调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,使用完全培养液 DMEM(含 10% 胎牛血清,2 g/L NaHCO₃,100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素),置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中进行孵育。第 5 d 首次换液,弃去悬浮细胞,此后每 3 d 换液一次。待细胞生长达 80% 融合后用 0.25% 胰酶进行传代。此后每隔 3 d 换液一次,待细胞长成融合状态时进行常规传代,传代比例为 1:2—1:3。取第 3~5 代生长良好的细胞用于本试验研究。

1.3 细胞体外应力加载

本试验应用 FX-4000T™ 细胞应力加载系统。取生长良好的 BMSCs,常规胰酶消化后细胞计数,调整浓度 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于 6 孔弹性硅胶模培养板,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 24~48 h,至细胞达 70%~80% 融合时开始力学干预。本实验中对大鼠 BMSCs 施加频率 1 Hz、幅度 10% 的正弦波形刺激,持续时间为 6 h。

1.4 RNA 提取、纯化与逆转录

将张应力加载 6 h 组和对照组细胞分别用 Trizol 试剂一步法抽提总 RNA, QIAGEN RNeasy kit 对 RNA 进行进一步纯化。采用紫外吸收测定法检测 RNA 的浓度和纯度,分光光度计在 260 和 280 nm 处分别测定吸光度,测定 6 个样本的 A260/A280 值,并通过变性凝胶电泳进行质检。由 RNA 合成双链 DNA 并进行生物素标记。

1.5 芯片杂交、洗涤、染色与扫描

应用大鼠全基因组芯片 Affymetrix rat 230 2.0 array。6 个 RNA 样品均采用单色标记,标记后利用等量的探针进行杂交,杂交方法采用 45 °C、60 r/min 杂交 16 h,随后选择相应的洗涤程序对芯

片进行洗涤。芯片结果采用 Agilent 扫描仪进行扫描,软件读取数据,最后采用 Genespring 进行标准化处理分析。

以上 1.4-1.5 节步骤均由上海伯豪生物技术有限公司完成。

1.6 基因芯片结果验证

芯片检测的表达基因经基因本体论 (gene ontology, GO) 分类,分析找出与 BMSCs 成骨分化相关的基因,并通过实时荧光定量 PCR 对基因芯片结果进行验证。引物序列见表 1。

表 1 目的基因的 PCR 引物序列

Tab.1 PCR primers for target genes

基因名称	引物序列(5'-3')
Notch1	上游 GGACCTCATCAACTCACACG
	下游 TTCTTCAGGAGCACAACTGC
Psen2	上游 GGAGAACGAGGACGACTG
	下游 TAGAAACGCACGGACTTG
Ihh	上游 AAAGCTGACCCCTTTAGCCTA
	下游 TTCGGAGTTTCTTGATCTTCC
Ptch1	上游 GATTCCTGGTTCCTCTGC
	下游 TTGGTCCGTGTTTCTCG
Foxo1	上游 TATTGACGCCCTGGACTGTG
	下游 TGGACTGCTCCTCAGTTCCT

按前述方法提纯的 mRNA 样本分别于紫外分光光度计 260 和 280 nm 处读取吸光值 OD, OD260/OD280 比值在 1.8 ~ 2.0 方可使用。按 RT-PCR 试剂盒说明进行逆转录及实时荧光定量 PCR 反应。PCR 扩增条件如下:首先 95 °C 预变性 5 min, 然后 95 °C、10 s, 60 °C、20 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参,其余各基因的产物分别与其相应 β -actin 产物作比较,所得比值为差异基因 mRNA 的相对水平。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件对实验数据进行统计学分析。结果以均数 \pm 标准差表示,采用单因素方差分析进行组间差异比较, $P < 0.05$ 为有差异有统计学意义。所有检测操作均重复 3 ~ 4 次。

2 结果

2.1 基因芯片 RNA 样本质检结果

2 组样本共抽提 6 组总 RNA, 经过紫外吸收测

定法检测 A260/A280 比值均在 1.8 ~ 2.0, 样品进行变性琼脂糖凝胶电泳, 18 S、28 S 条带清晰可见 (见图 1), 提示样品 RNA 纯度较高, RNA 无明显降解, 符合基因芯片杂交要求。

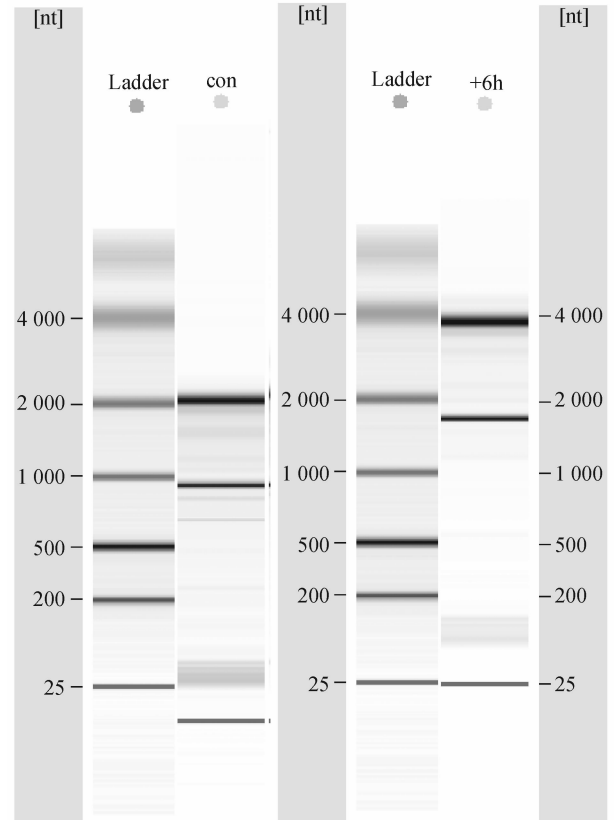


图 1 样本总 RNA 凝胶电泳图

Fig.1 Electropherogram of total RNA of samples from control and mechanical loading group

2.2 差异基因检测结果

大鼠全基因组芯片结果显示, BMSCs 加力组与对照组相比差异表达的基因共有 1 244 条, 其中上调基因 793 条, 下调基因 451 条。经过 GO 分类发现差异表达基因涉及到多种功能类型。以 $P < 0.01$ 、假阳性率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 作为筛选显著性差异表达的标准, 得到张应力加载组功能基因表达谱 (见图 2)。图中列出排列在前 20 位的功能分类, 主要包括多器官发育、细胞分化、细胞迁移、免疫及炎症反应等。因本文研究目的在于检测力学刺激下 BMSCs 成骨分化过程的差异基因表达, 故针对细胞分化功能中涉及的差异基因进行统计 (见表 2)。

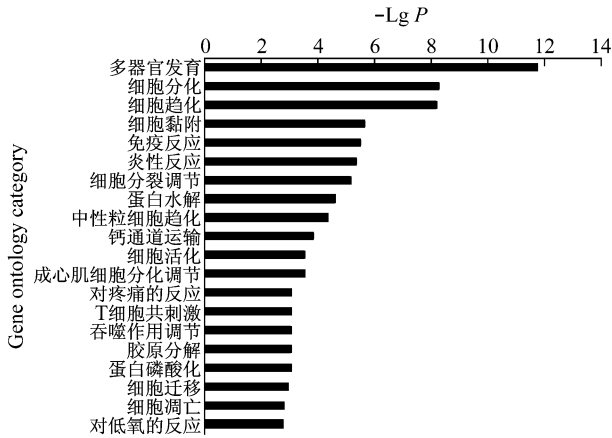


图2 力学加载组 GO 分类表达谱

Fig.2 Expression profile of GO terms in mechanical loading group

表2 力学加载组差异基因表达谱

Tab.2 Differentially expressed genes of GO term in mechanical loading group

序列号	基因名称	变化倍数
NM_133511	Adcyap1rl	0.445 476 057
NM_199115	Angptl4	0.155 108 752
NM_022259	Cd24	0.367 463 587
NM_012846	Fgf1	3.190 983 835
NM_138914	Fnbp1	2.135 715 385
NM_198768	Igsf10	0.364 917 691
NM_013122	Igfbp2	0.380 239 285
NM_019147	Jag1	3.079 101 659
NM_031322	Lrp4	2.167 713 361
NM_001191547	Mapk7	2.756 126 297
NM_012862	Mgp	0.492 478 62
NM_176079	Myod1	0.015 453 723
NM_031085	Prkch	0.346 475 297
NM_012873	Prm2	0.437 683 681
NM_019211	Rasgrp1	0.114 601 656
NM_001100700	Sfrp2	0.090 943 983
NM_134390	Tmem176b	0.406 207 28
NM_057149	Tnfsf11	0.073 111 548
NM_053555	Vamp5	0.321 193 544
NM_001077671	Zc3h12a	0.424 425 252

2.3 qRT-PCR 验证差异基因表达

回顾以往文献并结合芯片检测结果,从细胞分

化功能涉及的差异表达基因挑选出以下几个进行 qRT-PCR 验证: Jag1 (Jagged1)、Sfrp2 (Secreted Frizzled-related protein 2, 分泌型卷曲相关蛋白 2)、Fgf1 (fibroblast growth factor 1, 成纤维细胞生长因子 1)、Igfbp2 (insulin-like growth factor binding protein 2, 胰岛素样生长因子结合蛋白 2)。qRT-PCR 检测结果显示, 4 个相关分子 mRNA 水平变化与芯片结果保持一致(见图 3)。

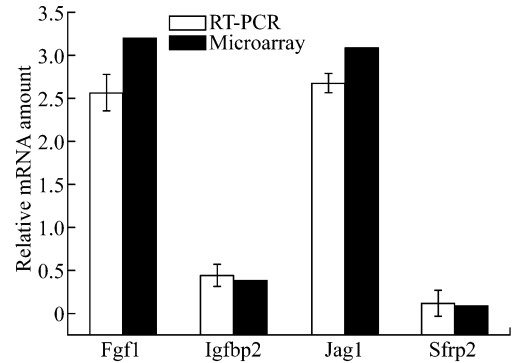


图3 部分差异基因 RT-PCR 与芯片结果比较

Fig.3 Comparison of RT-PCR and microarray results for 4 differentially expressed genes

3 讨论

基因芯片技术是将大量探针分子与标记的样品分子进行杂交,通过检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取样品分子的数量和序列信息。由于基因芯片具有高通量、简便、多参数及平行化的优点,能大规模检测不同样品的基因表达差异,至今已在生物学和医学领域得到广泛的应用。其已成为基因表达谱的分析、新基因发现、基因突变、多态性分析及监测基因组整体转录表达情况等方面的高效分析手段之一。GO 分类是较常见的芯片数据基因功能分类,主要包括分子功能,生物学过程及细胞组分。该分类可显示导致样本性状差异的最重要的功能差别,其所属基因即为进一步验证的重要目标基因。

BMSCs 是一种具有很强增殖能力和多向分化潜能的间充质干细胞,多种因素均可以定向诱导其向成骨细胞分化^[9-11]。大量研究已证实,机械刺激对 BMSCs 成骨分化起着重要调控作用^[12-14]。BMSCs 受到机械刺激后,只有将其转变成相应化学信号传入胞内,才能引起一系列下游反应,从而指导骨

形成和改建过程。本课题组前期已证实张应力作用可诱导 BMSCs 成骨分化,且 ERK-Runx2 可能参与该过程的调控。但由于力学信号通路调控的复杂性,目前对于触发 BMSCs 骨向分化确切机制的研究还不够完善。故本实验试图通过高通量基因芯片技术,分析持续张应力加载前后 BMSCs 基因表达谱,寻找差异表达基因,为进一步研究机械力信号转导进而调控 MSCs 成骨分化过程提供新靶点。

检测结果共有 1 244 条差异表达基因,其中上调基因 793 条,下调基因 451 条。经过 GO 分类中生物学过程分类可发现,其中差异基因主要涉及的生物学过程按照富集度由高到低包括多器官发育、细胞分化、细胞趋化、黏附、免疫及炎症反应等。本研究重点关注力学刺激下成骨分化过程,而成骨分化属于细胞分化过程的一类。因此,本文主要从涉及细胞分化功能的差异基因入手,结合以往相关研究结果,从中寻找力学刺激的可能靶点。回顾以往文献,发现细胞分化功能里的差异基因 Sfrp2、Fgf1、Igfbp2、Jag1 分别所在的 Wnt、FGF、IGF 及 Notch 信号通路均已被证实参与成骨分化过程。

经典 Wnt 信号通路在骨髓基质干细胞分化至骨细胞的全过程中发挥重要作用,其可促进 BMSCs 的更新,促进成骨分化,抑制成脂和成软骨向分化^[15-16]。近几年的证据表明,Wnt 信号通路参与了骨组织对外界力学刺激的适应性反应^[17]。作为 Wnt 通路抑制性配体的 Sfrp2 在张应力组表达水平为对照组的 0.09 倍。Sfrp2 是一种分泌的膜蛋白,可直接与 Wnt 蛋白结合抑制 Wnt 信号通路^[18]。其表达受到抑制后 Wnt 通路可被活化从而参与到张应力对 BMSC 的分化调控中。成纤维细胞生长因子家族(fibroblast growth factors, FGFs)在骨骼的生长发育中起重要的作用。胚胎期敲除 FGF2 的小鼠出生后表现为骨密度及成骨细胞增殖活性的减低^[19]。重组 FGF1 治疗可增加成骨细胞数量,促进小鼠颅骨的骨化过程^[20]。芯片结果显示,FGF1 水平在加力组升高倍数为 3.19,其可能与相应 FGF 受体结合后正向调控 BMSC 向成骨细胞的分化有关。大量实验均证实,胰岛素样生长因子家族(insulin-like growth factor, IGFs)与骨代谢密切相关^[21-23]。Igfbp2 是 IGF 的结合蛋白,可促进破骨细胞的增殖及功能的行使^[24]。张应力组 Igfbp2 显著下调,从而抑制了破骨细胞功能,反向增强了成骨向的转化。目前对

于 Notch 信号转导通路在间质干细胞前体向成骨细胞分化中的作用仍然有争议。Engin 等^[25]研究表明,NICD 的表达置于在 2.3 kb 胶原 I 型启动子控制之下的转基因小鼠由于成骨细胞未成熟或功能紊乱导致骨量增加及生长迟缓。Ugarte 等^[26]发现,NICD 及 Jag1 在 hBMSC 过表达均可诱导 BMSC 向成骨细胞的分化,同时抑制其成脂向分化。芯片结果中作为 Notch 通路主要配体之一的 Jag1 在应力组明显上调,提示 Notch 信号通路可能被早期激活,参与调控体外力学诱导下的 BMSC 成骨分化过程。

以往大量文献表明,上述 4 条信号通路均参与经典成骨分化过程,并在其中发挥不同的调控作用,但关于其在力学诱导骨向分化中的作用却少有报道。qRT-PCR 结果显示,以上 4 个分子 mRNA 变化趋势与芯片结果保持一致。以上证据提示,4 条通路不仅在经典骨向分化中发挥调控作用,还可能参与了应力介导下的 BMSCs 向成骨细胞的分化过程,其中差异表达基因可能成为力学刺激的作用靶点。除外上述验证的 4 个差异基因,细胞分化功能分类内其他差异变化显著的分子也可能作为靶点调控外界力学信号的转导,如 Mapk7 上调 2.75 倍,Lrp4 上调 2.16 倍,Rasgrp1 下调 0.11 倍。这些都为后续对于机制的深入研究提供了新的切入点。

综上所述,持续张应力可诱导大鼠 BMSCs 成骨分化,而芯片结果里差异表达基因所在的多条信号通路可能在上述过程中发挥重要作用。在以后的研究中,可以从筛选出的差异表达基因入手,在上游信号通路中选择感兴趣的分子作为研究靶点,验证其在力学刺激诱导下骨向分化中的调控作用,试图更为全面深入了解力学信号在骨组织细胞中的传导机制。

参考文献:

- [1] Weyts FA, Bosmans B, Niesing R, *et al*. Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation [J]. *Calcif Tissue Int*, 2003, 72 (4): 505-512.
- [2] 江凌勇, 赵志河, 王军, 等. 张应力对成骨分化骨髓间充质干细胞 ODF mRNA 表达的影响[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(6): 428-432.
Jiang LY, Zhao ZH, Wang J, *et al*. Effects of mechanical tensile stress on the expression of ODF mRNA in osteoblasts differentiated from rBMSCs in vitro [J]. *J Med Bio-*

- mech, 2010, 25(6): 428-432.
- [3] Wu Y, Zhang X, Zhang P, *et al.* Intermittent traction stretch promotes the osteoblastic differentiation of bone mesenchymal stem cells by the ERK1/2-activated Cbfa1 pathway [J]. *Connect Tissue Res*, 2012, 53 (6): 451-459.
- [4] Zhang P, Wu Y, Jiang Z, *et al.* Osteogenic response of mesenchymal stem cells to continuous mechanical strain is dependent on ERK1/2-Runx2 signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29 (6): 1083-1089.
- [5] Zhang P, Wu Y, Dai Q, *et al.* p38-MAPK signaling pathway is not involved in osteogenic differentiation during early response of mesenchymal stem cells to continuous mechanical strain [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 378 (1-2): 19-28.
- [6] 吴玉琼, 房兵, 江凌勇. 间歇牵拉应变对大鼠骨髓间充质干细胞增殖与成骨分化的影响 [J]. *医用生物力学*, 2011, 26 (6): 574-579.
Wu YQ, Fang B, Jiang LY. Effect of intermittent tensile strain on proliferation and osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(6): 574 -579.
- [7] 张鹏, 江凌勇, 吴玉琼, 等. 持续张应力对骨髓基质干细胞增殖及骨向分化的影响 [J]. *医用生物力学*, 2012, 27 (2): 239-244.
Zhang P, Jiang LY, Wu YQ, *et al.* Effect of continuous strain on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(2): 239-244.
- [8] Friedenstein AJ, Latzinik NV, Gorskaya YuF, *et al.* Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells [J]. *Bone Miner*, 1992, 18 (3): 199-213.
- [9] Gugala Z, Davis AR, Fouletier-Dilling CM, *et al.* Adenovirus BMP2-induced osteogenesis in combination with collagen carriers [J]. *Biomaterials*, 2007, 28 (30): 4469-4479.
- [10] Porter RM, Huckle WR, and Goldstein A S. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90 (1): 13-22.
- [11] Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, *et al.* Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1 α and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (11): 10331-10337.
- [12] Rath B, Nam J, Knobloch T J, *et al.* Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts [J]. *J Biomech*, 2008, 41 (5): 1095-1103.
- [13] Sun X, McLamore E, Kishore V, *et al.* Mechanical stretch induced calcium efflux from bone matrix stimulates osteoblasts [J]. *Bone*, 2012, 50 (3): 581-591.
- [14] van Griensven M, Diederichs S, Roeker S, *et al.* Mechanical strain using 2D and 3D bioreactors induces osteogenesis: Implications for bone tissue engineering [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009, 112: 95-123.
- [15] Dong Y F, Soung do Y, Schwarz E M, *et al.* Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 208 (1): 77-86.
- [16] Zhou H, Mak W, Zheng Y, *et al.* Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (4): 1936-1945.
- [17] Sawakami K, Robling AG, Ai M, *et al.* The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (33): 23698-23711.
- [18] Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116 (Pt 13): 2627-2634.
- [19] Yu K, Xu J, Liu Z, *et al.* Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth [J]. *Development*, 2003, 130 (13): 3063-3074.
- [20] Liu YH, Tang Z, Kundu R K, *et al.* Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: A possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans [J]. *Dev Biol*, 1999, 205 (2): 260-274.
- [21] Bonapace G, Concolino D, Formicola S, *et al.* A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency [J]. *J Med Genet*, 2003, 40 (12): 913-917.
- [22] Raile K, Klammt J, Schneider A, *et al.* Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor i receptor (IGF1R) mutation: Implications for a gene dosage effect of the human IGF1R [J]. *J Clin Endocr Metab*, 2006, 91 (6): 2264-2271.
- [23] Salminen H, Saaf M, Ringertz H, *et al.* The role of IGF-I and IGFBP-1 status and secondary hyperparathyroidism in relation to osteoporosis in elderly Swedish women [J]. *Osteoporos Int*, 2008, 19 (2): 201-209.
- [24] DeMambro V E, Maile L, Wai C, *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein-2 is required for osteoclast differentiation [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27 (2): 390-400.
- [25] Engin F, Yao Z, Yang T, *et al.* Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis [J]. *Nat Med*, 2008, 14 (3): 299-305.
- [26] Ugarte F, Ryser M, Thieme S, *et al.* Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37 (7): 867-875.