

文章编号:1004-7220(2019)02-0200-07

骨化三醇通过 PI3K/AKT 促进 BMP9 诱导的 间充质干细胞成骨分化作用

陈晓婷, 姜天缘, 夏超, 胡燕, 周妍, 高艳虹

(上海交通大学医学院附属新华医院 老年医学科, 上海 200092)

摘要:目的 研究骨化三醇(calcitriol)对骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)成骨分化作用的影响。方法 实验分为4组:对照组、calcitriol组、BMP9组、calcitriol联合BMP9组。通过PNPP法检测各组碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性;通过RT-PCR和Western blotting方法检测成骨分化标记物骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)表达变化,同时检测AKT和 β -catenin磷酸化水平以及和ALP活性水平;茜素红染色检测矿化结节形成。此外,用原子力显微镜测试MSCs成骨分化过程中细胞形态及细胞弹性模量改变。结果 calcitriol单独作用对MSCs成骨分化过程无明显作用,但是calcitriol可以增强BMP9诱导MSCs的ALP、OCN、OPN表达和矿化结节形成。同时,calcitriol和BMP9作用均不影响细胞弹性模量数值。BMP9和calcitriol联合作用可以增强AKT和 β -catenin磷酸化水平,而PI3K抑制剂应用以后可以抑制这种磷酸化变化,并抑制联合作用后的ALP活性。calcitriol作用以后不影响BMP9诱导的BMP/Smad信号通路。结论 calcitriol通过激活PI3K/AKT信号通路从而协同BMP9促进MSCs成骨分化。研究不同调控因子对MSCs成骨分化的作用及机制对于骨质疏松等疾病的治疗和骨组织工程的发展有一定意义。

关键词:骨化三醇;骨形态发生蛋白;间充质干细胞;成骨分化

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.02.014

Calcitriol Promotes BMP9 Induced Mesenchymal Stem Cells Osteogenesis Through PI3K/AKT Signaling Pathway

CHEN Xiaoting, JIANG Tianyuan, XIA Chao, HU Yan, ZHOU Yan, GAO Yanhong

(Department of Geriatrics, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of calcitriol on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by bone morphogenetic protein 9 (BMP9). **Methods** The experiment was divided into four groups: control group, calcitriol group, BMP9 group and BMP9+calcitriol group. Quantitative PNPP method was used to detect alkaline phosphatase (ALP) activity. RT-PCR and Western blotting method analyzed expression of osteocalcin (OCN) and osteopontin (OPN). Alizarin red staining assessed the formation of mineralized nodules. In addition, the changes of cell morphology and elastic modulus during osteogenic differentiation were studied by atomic force microscope. **Results** Compared with control group, calcitriol alone had no significant effect on the osteogenic differentiation of MSCs, but calcitriol could enhanced expression of osteogenic markers and formation

收稿日期:2018-05-14; 修回日期:2018-07-01

基金项目:国家自然科学基金项目(81101360),上海市科委自然科学基金项目(16ZR1422000),教育部归国留学人员启动基金(20134701),上海交通大学医工交叉基金(YG2015MS67)

通信作者:高艳虹,教授,E-mail:gaoyanhong@xinhumed.com.cn

of mineralized nodules induced by BMP9. However, neither calcitriol nor BMP9 could affect elastic modulus of cells. The combined treatment of BMP9 and calcitriol could enhance phosphorylation of AKT and β -catenin which were both important for osteogenesis. The pretreated PI3K inhibitor could inhibit phosphorylation of AKT and β -catenin as well as ALP activity in BMP9+calcitriol group. In addition, calcitriol did not affect the BMP/Smad signaling pathway induced by BMP9. **Conclusions** Calcitriol synergies with BMP9 could promote MSCs osteogenesis by activating the PI3K/AKT signaling pathway. The study about effects and mechanisms of different regulatory factors on osteogenic differentiation of MSCs is of great significance for the treatment of osteoporosis and the development of bone tissue engineering.

Key words: calcitriol; bone morphogenetic protein; mesenchymal stem cells; osteogenesis

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是一类具有良好的成骨分化诱导能力的生长因子。BMPs 属于转化生长因子(transforming growth factor β , TGF- β) 家族,许多研究已证明, BMP2、BMP4、BMP6、BMP7 和 BMP9 具有促进成骨分化的作用^[1]。另外, BMPs 在骨组织工程中已被广泛应用于治疗各种骨代谢相关疾病。BMP9 在 BMPs 中具有最强的诱导成骨分化作用,它作用于 C3H10T1/2 细胞和 C2C12 细胞后能更快、更强地诱导矿化结节形成和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)等成骨分化标记物表达^[2-3]。此外, BMP9 促进成骨分化的作用不能完全被 BMP 经典抑制剂 noggin 抑制,表明 BMP9 不仅是通过调控 BMP/Smad 信号通路,还能通过调控其他信号通路来促进间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)成骨分化^[3]。也有研究发现,一些因子(激素、生长因子、细胞因子)和信号通路能够促进 BMP 诱导的成骨作用。维生素 D(vitamin D, VitD)是一种类固醇激素,参与体内钙磷调节,从而有助于维持骨密度、预防骨质疏松症。VitD 的生物活性代谢产物——骨化三醇(calcitriol)同 VitD 一样,也能结合并激活 VitD 受体(vitamin D receptor, VDR)。研究表明, VitD 可调节多种来源的细胞内成骨分化标记物的表达,从而促进成骨细胞介导的骨形成功能,然而 VitD 对干细胞成骨分化无显著促进作用。另外, VitD 与 BMP 信号通路之间可能存在交互作用^[4-5]。Song 等^[6]研究表明, BMP2 和维生素 D 协同作用可以上调脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)内 ALP 和骨钙素(osteocalcin, OCN)表达,但是尚未进一步研究其机制,故 BMP 9 和维生素 D 之间的相互作用及机制值得

进一步研究。本文采用 BMP9 和 calcitriol 单独或者同时作用于 C3H10T1/2 细胞,并检测 ALP、OCN、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)等成骨分化标记物表达和矿化结节形成,以初步探索 BMP9 和 calcitriol 之间的相互作用,并进一步研究两者之间可能存在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

小鼠胚胎来源的间充质干细胞 C3H10T1/2 细胞株,购自上海生命科学院。

1.2 实验试剂

1.2.1 试剂 Calcitriol (Sigma 公司,美国)、AdBMP9(重庆医科大学,重庆)、AdGFP(重庆医科大学,重庆)、二甲基亚砷(DMSO)(Sigma 公司,美国)、ALP 活性检测试剂盒(碧云天公司,上海)、BCA 试剂盒(碧云天公司,上海)、ALP 染色剂盒(碧云天公司,上海)、逆转录试剂盒(Takara 公司,日本)、茜素红(Sigma 公司,美国)、Premix ExTaq 试剂盒(Takara 公司,日本)、琼脂糖(Invitrogen 公司,美国)、LY294002(Selleck 公司,美国)、戊二醛(Sigma 公司,美国)、osteopontin 抗体(ab91655, Abcam 公司,英国)、osteocalcin 抗体(sc30045, Santa Cruz Biotechnology 公司,美国)、phospho-AKT Ser473(sc135651, Santa Cruz Biotechnology 公司,美国)、AKT(sc8312, Santa Cruz Biotechnology 公司,美国)、GAPDH(sc47724, Santa Cruz Biotechnology 公司,美国)、phospho- β -catenin Ser552(9566 s, Cell Signaling 公司,美国)、 β -catenin(#8480 s, Cell Signaling 公司,美国)、ECL 发光液(Millipore 公司,美国)。

1.2.2 Calcitriol 溶液配制 5 mg calcitriol 溶解于 1.2 mL DMSO 中配制成 10 mmol/L 储存液,避光储存于-80 ℃。

1.3 实验仪器

细胞培养箱(Thermo 公司,美国)、安全柜(上净公司,上海)、酶标(Bio-Tek 公司,美国)、倒置相差显微镜(Olympus 公司,日本)、化学发光仪(Bio-Rad 公司,美国)、电泳仪和转膜仪(天能公司,上海)、PCR 逆转录仪(ABI 公司,美国)、原子力显微镜(Thermomicroscopes 公司,美国)

1.4 PCR 引物

RT-PCT 分析中的引物序列如表 1 所示。

表 1 PCR 引物

Tab.1 Primers for PCR

名称	正义链(5'-3')	反义链(5'-3')
OPN	GCTTGGCTTATGGACTGAGG	GGCTTTGGAAGCTTGCTTGAC
OCN	CTCTGTCTCTCTGACCTGACAG	GGAGCTGCTGTGACATCCATAC
GAPDH	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	CTCGCTCTGGAAGATGGTG

1.5 实验方法

1.5.1 实验分组 在 37 ℃、5% CO₂ 条件下,采用细胞完全培养基(含有 45% 高糖 DMEM 和 5% 胎牛血清)培养 C3H10T1/2 细胞,当显微镜下观察细胞汇合度达到 80% 时进行传代。然后分组如下:① 对照组,AdGFP + DMSO 处理;② calcitriol 组,不同浓度 calcitriol 处理(1000、100、10 nmol/L) + AdGFP;③ BMP9 组,AdBMP9 + DMSO 处理;④ BMP9 + calcitriol 组,AdBMP9 和不同浓度的 calcitriol 同时处理。

1.5.2 ALP 活性定量检测及染色 ALP 活性测定:按照实验分组对细胞分别处理 7 d 后,用 ALP 活性检测试剂盒进行测定,所得结果用 BCA 试剂盒测定的细胞总蛋白水平标化。ALP 染色:细胞被处理 7 d 后经 4% 多聚甲醛固定并用 PBS 冲洗后,按照 ALP 染色剂盒说明配制 BCIP/NBT 染色工作液进行显色。

1.5.3 矿化结节染色 细胞按照分组进行处理,于 6 孔板中培养 21 d 后,用 4% 多聚甲醛固定并用 PBS 进行冲洗,继而用 2% 茜素红染液在 37 ℃ 孵育 1 h。之后弃去染液,PBS 冲洗干净,并显微镜下观察红色钙化结节。用 Image-Pro Plus 软件定量分析。

1.5.4 RNA 提取及 RT-PCR 测定 细胞按照分组进行处理 7 d 后,按照说明进行 RNA 抽提和逆转录。之后按照 Premix ExTaq 试剂盒说明进行 RT-PCR 反应,反应条件如下:95 ℃ × 5 min;后续 20 个循环(98 ℃ × 10 s,62 ℃ × 30 s,72 ℃ × 60 s);4 ℃ 保存。将扩增得到的产物进行琼脂糖凝胶电泳:每孔 5 μL,使用 1 × TBE 电泳液进行电泳,电压 300 V,电泳 30 min。

1.5.5 Western Blotting 检测 细胞培养于 6 孔板,在按照分组处理 72 h 后,每孔加入 RIPA 200 μL 裂解细胞,并进行总蛋白提取。经煮沸变性后,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳并转膜。封闭之后,用相应的 1 抗 4 ℃ 孵育过夜,之后二抗室温孵育 1 h 并进行显色。

1.5.6 样品制备及原子力显微镜成像 细胞培养于 6 孔板,在按照分组处理 72 h 后,将各组细胞消化后滴于干净的载玻片上,使其自然铺展平。继而,用 2.5% 戊二醛固定 2 h。PBS 冲洗 3 次后,室温自然干燥。将制备好的样品置于原子力显微镜扫描台上、扫描样品区域并测定细胞弹性模量。

1.5.6 统计学分析 上述实验均重复 3 次,并用 SPSS 23 软件分析所得实验数据。数据结果均以均值 ± 标准差表示。采用单因素方差分析对各组数据进行比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 calcitriol 处理对 BMP 9 诱导的 ALP 活性和染色的影响

用 AdGFP 或 AdBMP9 感染 C3H10T1/2 细胞 24 h 后,荧光显微镜观察到 AdGFP 和 AdBMP9 具有良好的感染能力[见图 1(a)]。在作用 7 d 后,单用 calcitriol 对 ALP 活性无明显影响,但 100 nmol/L 的 calcitriol 对 BMP9 诱导的 ALP 活性有明显的促进作用,而 10 nmol/L 和 1 μmol/L calcitriol 对 BMP9 诱导的 ALP 的影响较小[见图 1(b)]。ALP 染色如图 1(c) 所示,100 nmol/L calcitriol 能够加深 BMP9 诱导的 ALP 染色,与 ALP 活性结果一致。

2.2 calcitriol 对 BMP9 诱导的成骨分化标记物 OCN 和 OPN 的影响

C3H10T1/2 细胞经 calcitriol、BMP9、BMP9 + calcitriol 处理 7 d 后,用 RT-PCR 方法和 Western

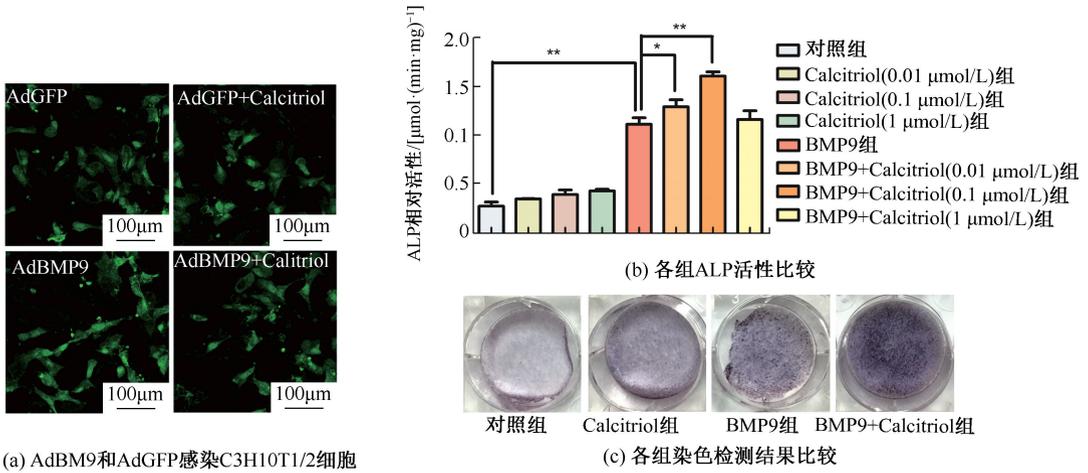


图1 calcitriol对BMP9诱导的ALP活性和染色的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.1 Effects of calcitriol on BMP9 induced ALP activity and staining (a) Infection of C3H10T1/2 cells with AdBMP9 and AdGFP, (b) Comparison of ALP activity in each group, (c) Comparison of ALP staining in each group

blotting方法分析OCN和OPN的表达量变化情况。各组OPN和OPN mRNA的表达均有变化,其中BMP9组和BMP9+calcitriol组表达明显较高;而BMP9+calcitriol组比单独BMP9组更高(以GAPDH作为参考)。各组灰度值比较结果表明,与BMP9组相比,100 nmol/L处理的calcitriol可增强

BMP9诱导的OCN和OPN表达,而calcitriol单独作用对OCN和OPN mRNA表达量无显著作用(与对照组相比)。处理9 d后,提取细胞总蛋白,Western blotting检测OCN和OPN蛋白水平变化,BMP9+calcitriol组表达明显高于BMP9组,与mRNA变化相似(见图2)。

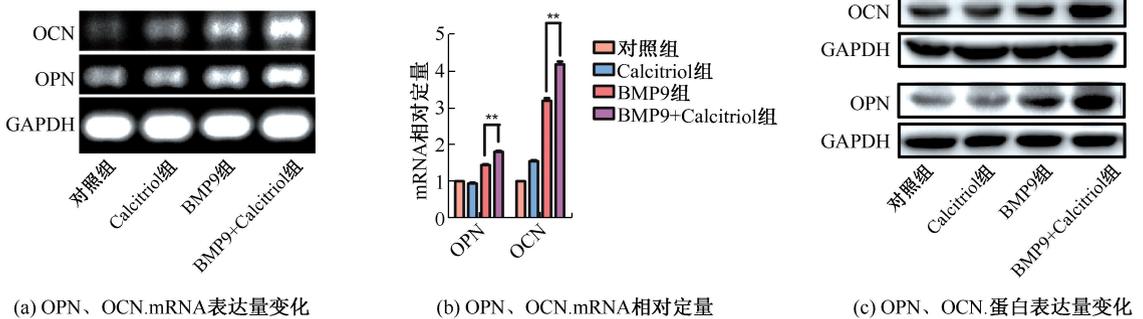


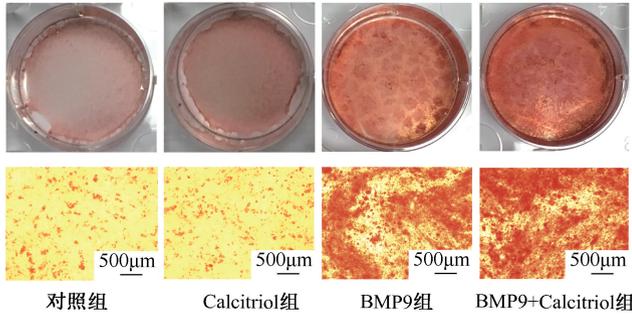
图2 calcitriol对BMP9诱导的OPN和OCN表达的影响(** $P < 0.01$)

Fig.2 Effects of calcitriol on BMP9 induced OPN and OCN expression (a) Changes of OPN and OCN mRNA expression, (b) Relative quantification of mRNA expression of OPN and OCN, (c) Changes of OPN and OCN protein expression

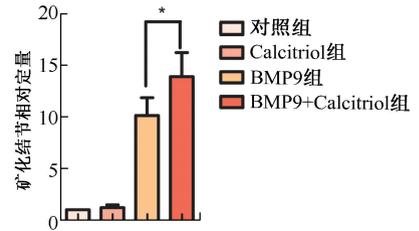
2.3 calcitriol对BMP9诱导的矿化结节形成的影响

矿化结节形成是MSC体外成骨分化的重要表现,矿化过程有多种成骨分化标记物参与,如I型胶原、OPN和OPN。对细胞处理21 d后,BMP9组和BMP9+calcitriol组可观察到明显的红色矿化结节形成,两组矿化率明显高于单纯calcitriol组和对照

组;而且,与单独BMP9处理组相比,BMP9+calcitriol组在显微镜下可见更多的矿化结节形成(50×)。定量分析结果表明,虽然calcitriol单独作用并不能明显促进MSCs矿化结节的形成,但是100 nmol/L的calcitriol能增强BMP9促进MSCs形成矿化结节的能力(见图3)。



(a) 茜素红染色检测矿化结节形成



(b) 定量分析矿化结节

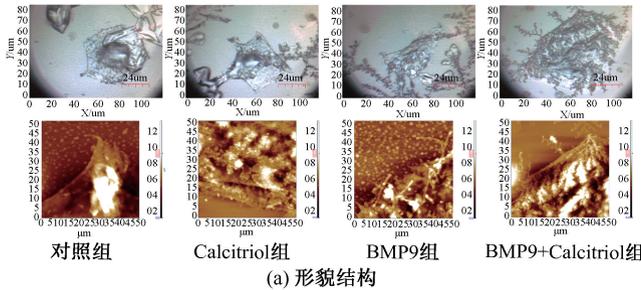
图3 calcitriol对BMP9诱导的矿化结节形成的影响 (* $P < 0.05$)

Fig.3 Effect of calcitriol on the formation of mineralized nodules induced by BMP9 (a) Detection of mineralized nodules by alizarin red staining, (b) Quantitative analysis of mineralized nodules

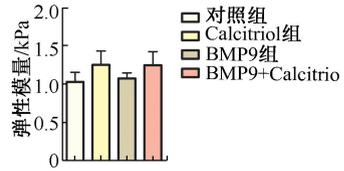
2.4 原子力显微镜测定细胞形貌和弹性模量

BMP9组和BMP9+calcitriol组细胞膜表面稍粗糙;BMP9+calcitriol组细胞体积稍增大,其他3组之间细胞体积改变不明显[见图4(a)]。弹性模量能够

体现物质的力学性能、反应物质的硬度。在BMP9单独或者与calcitriol联合作用后,MSCs弹性模量并未发生明显变化,提示在成骨分化过程中,MSCs的形变能力和细胞膜硬度并未发生改变[见图4(b)]。



(a) 形貌结构



(b) 弹性模量

图4 各组细胞形貌结构及弹性模量改变

Fig.4 Changes of morphology and elastic modulus in each group (a) Morphological images, (b) Elastic modulus

2.5 PI3K/AKT 通路激活介导 calcitriol 增强 BMP9 诱导的成骨分化作用

C3H10T1/2 细胞处理 72 h 后,与 BMP 9 组相比,BMP9+calcitriol 组 β -catenin Ser552 位点磷酸化和 AKT Ser 473 位点磷酸化显著增强,4 组总蛋白水平基本一致[见图 4(a)]。采用 PI3K 抑制剂 LY294002 预处理 C3H10T1/2 细胞,20 μ mol/L LY294002 抑制了 AKT 和 β -catenin 的磷酸化。同时,LY294002 也能抑制 BMP9 和 calcitriol 共同作用后诱导的 ALP 活性增强[见图 5(a)、(b)]。然而,在 BMP9 组和 BMP9 + calcitriol 组之间转录因子 Smad1/5/8 磷酸化水平没有明显变化[见图 5(d)]。结果表明,calcitriol 可能通过 PI3K/AKT 通路增强 BMP9 诱导成骨,而不是通过激活 BMP/

Smad 信号通路。

3 讨论与结论

尽管 calcitriol 或 BMP9 单独作用在体外、内被广泛研究,但仍不确定 calcitriol 和 BMP9 是否在 MSCs 成骨分化过程中有相互作用以及可能的机制。本研究的结果将有助于拓展对成骨分化的调控和 VitD 与 BMP 信号通路之间的相互作用的理解。

细胞分化阶段和物种是影响 VitD 作用的重要因素^[7]。总体而言,VitD 能促进成骨细胞形成矿化结节和 ALP 阳性基质囊泡 (ALP-positive matrix vesicles, MVs) 的作用^[10]。此外,许多研究表明, VitD 对人和大鼠来源的成骨细胞分化和矿化过程

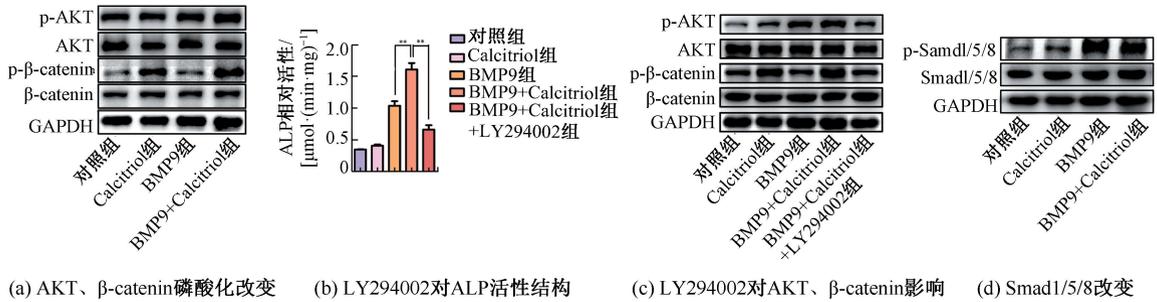


图5 PI3K/AKT 信号通路在 calcitriol 和 BMP9 同时刺激后诱导的成骨分化中的作用

Fig.5 The role of PI3K/AKT signaling pathway in osteogenic differentiation induced by calcitriol and BMP9 cotreatment (a) Changes of AKT and β-catenin phosphorylation, (b) Effects of LY294002 on ALP activity, (c) Effects of LY294002 on Akt and β-catenin, (d) Changes of Smad1/5/8

有积极作用,而对小鼠来源的细胞呈现抑制作用或无作用^[8-9]。因此,有研究者认为, VitD 调控人和小鼠来源的细胞内成骨分化相关基因表达的机制不同。另外,值得注意的是,虽然 VitD 单独作用于小鼠来源的成骨细胞时没有明显的作用,但是 VitD 与 Wnt 或 BMP2 联合应用时可促进 Wnt 和 BMP2 诱导的 ALP 活性^[10]。calcitriol 通过激活 VDR 发挥重要作用。研究表明,包括维甲酸、雌激素、维生素 D 和糖皮质激素在内的一些核受体的配体发挥的基因组和非基因组作用在多种生物过程中都能与 BMP 信号通路相互作用^[11-12]。本文研究结果与上述研究结果基本一致,即单用 calcitriol 对 C3H10T1/2 细胞没有显著作用,但是 calcitriol 能增强 BMP9 促进 MSCs 成骨分化的作用。此外,本文发现, calcitriol 在 10~1 000 nmol/L 之间能增强 BMP9 促进 MSCs 早期成骨分化,且 100 nmol/L 的 calcitriol 作用最强。近年研究表明,细胞骨架、细胞膜表面纳米结构的改变与细胞的活化程度、黏着能力、形变能力和迁移能力密切相关^[13]。成骨细胞主要来源于 MSCs,是骨组织内感受外力刺激的主要细胞之一^[14]。其中,成骨细胞的形变能力对细胞感受体内外力刺激至关重要^[15]。原子力显微镜分辨率高、对细胞影响小等特性可以用于观察细胞膜结构变化和测量弹性模量,以明确细胞形态和硬度或者形变能力变化。孙嘉伦^[16]通过测量成骨细胞弹性模量发现,外力刺激可以改变细胞骨架向力刺激方向铺展,并增加细胞弹性模量数值。本研究结果表明, MSCs 在成骨分化过程中,细胞弹性模量并未发生改变,提示 MSCs 自身的形变能力和细胞膜硬度

在成骨分化过程中并未发生改变,但对应力刺激的反应变化尚有待进一步研究。

为探讨 calcitriol 与 BMP 信号通路在 10 ~ 1 000 nmol/L 之间的作用机制,本文分析了 calcitriol 和 BMP9 协同作用在成骨分化调控中的机制。结果表明, BMP9 与 calcitriol 同时作用后,明显增强 β-catenin 磷酸化。转录因子 β-catenin 是经典 Wnt 信号通路中的关键分子, β-catenin 可与 BMP2 启动子结合从而调控其表达^[17]。另外, Wnt/β-catenin 信号通路在调节 BMP9 介导的 MSCs 成骨分化过程中也有重要促进作用,沉默 β-catenin 抑制 BMP9 介导的异位骨形成作用^[11]。最近,有报道表明, 1α, 25-二羟维生素 D3 可以激活通过 PI3K/Akt 信号通路促进转录因子 β-catenin 核转位^[11,18]。在多种细胞类型中, PI3K/Akt 信号级联反应对 β-catenin 活性有着积极的调节作用^[19]。柚皮素通过激活 AKT^[20]促进 β-catenin 的表达,增强 β-catenin Ser 552 位点的磷酸化水平。因此,进一步检测了 calcitriol 和 BMP9 处理细胞的 AKT 活性。结果发现, calcitriol 和 BMP9 联合作用能增强 AKT 磷酸化水平。同时, PI3K 抑制剂还能降低 calcitriol 和 BMP9 诱导的 AKT 磷酸化和 ALP 活性。

除了对 β-catenin 的影响外, PI3K/AKT 信号通路还被报道可以激活 BMP/Smad 信号通路,进一步促进 ALP、OCN 等成骨相关基因表达^[21]。然而,本研究发现, Smad 1/5/8 的磷酸化水平和总蛋白表达水平均未明显改变,这可能和不同的细胞、分化阶段和处理方式等有关。

综上所述, calcitriol 能促进 BMP9 诱导的 MSCs

成骨分化作用,通过 PI3K/AKT 信号通路促进 β -catenin磷酸化进而促进 MSCs 成骨分化是其机制之一。

参考文献:

- [1] LIAO J, WEI Q, ZOU Y, *et al.* Notch signaling augments BMP9-induced bone formation by promoting the osteogenesis-angiogenesis coupling process in mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(5): 1905-1923.
- [2] CHENG H, JIANG W, PHILLIPS FM, *et al.* Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs) [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85-a(8): 1544-1552.
- [3] 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(17): 1312-1320.
- [4] HEE CK, Nicoll SB. Endogenous bone morphogenetic proteins mediate 1 α , 25-dihydroxyvitamin D (3)-induced expression of osteoblast differentiation markers in human dermal fibroblasts [J]. *J Orthop Res*, 2009, 27(2): 162-168.
- [5] SANCHEZ CP, HE YZ. Bone growth during daily or intermittent calcitriol treatment during renal failure with advanced secondary hyperparathyroidism [J]. *Kidney Int*, 2007, 72(5): 582-591.
- [6] SONG I, KIM BS, KIM CS, *et al.* Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(1): 126-131.
- [7] DRIEL M, LEEUWEN JPTM. Vitamin D endocrinology of bone mineralization [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 453: 46-51.
- [8] WOECKEL VJ, ALVES RD, SWAGEMAKERS SM, *et al.* 1 α ,25-(OH)2D3 acts in the early phase of osteoblast differentiation to enhance mineralization via accelerated production of mature matrix vesicles [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 225(2): 593-600.
- [9] YAMAGUCHI M, WEITZMANN MN. High dose 1,25(OH)2D3 inhibits osteoblast mineralization *in vitro* [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(5): 934-938.
- [10] HONDA Y, DING X, MUSSANO F, *et al.* Guiding the osteogenic fate of mouse and human mesenchymal stem cells through feedback system control [J]. *Sci Rep*, 2013, doi: 10.1038/srep03420.
- [11] LIU Y, LIU Y, ZHANG R, *et al.* All-trans retinoic acid modulates bone morphogenetic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/beta-catenin signaling pathways [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 47: 47-56.
- [12] MATSUMOTO Y, OTSUKA F, TAKANO-NARAZAKI M, *et al.* Estrogen facilitates osteoblast differentiation by up-regulating bone morphogenetic protein-4 signaling [J]. *Steroids*, 2013, 78(5): 513-520.
- [13] 刘奋斗, 丁海. 骨生物力学特性在骨质疏松症中的改变 [J]. *医用生物力学*, 2017, 32(4): 388-392.
- LIU FD, DING H. The changes of bone biomechanical properties in osteoporosis [J]. *J Med Biomech*, 2017, 32(4): 388-392.
- [14] 张玲莉, 赵一龙, 雷乐, 等. 压应力对破骨细胞活化的影响 [J]. *医用生物力学*, 2018, 33(1): 55-61.
- ZHANG LL, ZHAO YL, LEI L, *et al.* Effects of compressive stress on osteoclast activation [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33(1): 55-61.
- [15] DVORAK JA. The application of atomic force microscopy to the study of living vertebrate cells in culture [J]. *Methods*, 2003, 29(1): 86-96.
- [16] 孙嘉伦. 成骨细胞在力学刺激下力学性质及细胞骨架的变化 [D]. 天津: 南开大学, 2009.
- [17] ZHANG R, OYAJOBIBO, HARRIS SE, *et al.* Wnt/beta-catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts [J]. *Bone*, 2013, 52(1): 145-56.
- [18] TANG N, SONG WX, LUO J, *et al.* BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/beta-catenin signaling [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8b): 2448-2464.
- [19] PERRY JM, HE XC, SUGIMURA R, *et al.* Cooperation between both Wnt/beta-catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(18): 1928-42.
- [20] WANG D, MA W, WANG F, *et al.* Stimulation of Wnt/beta-catenin signaling to improve bone development by naringin via interacting with AMPK and Akt [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4): 1563-1576.
- [21] FUJITA T, AZUMA Y, FUKUYAMA R, *et al.* Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling [J]. *J Cell Biol*, 2004, 166(1): 85-95.