

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.04.004

纳米形貌诱导干细胞成骨分化的相关信号通路*

刘 玄 侯汶青 付 洪 谢博文 李古兵 郭泰林[△]

(西南交通大学医学院 四川 成都 610031)

摘要 目的:探究纳米形貌诱导间充质干细胞(MSC)分化中的作用以及相关分子机制。**方法:**利用阳极氧化法制备二氧化钛纳米管形貌,使用 qRT-PCR 技术, RNA-seq 技术,分析接种在纳米形貌表面的间充质干细胞的基因表达情况。并筛选对成骨相关的信号通路中的成员,观察他们基因上调或下调情况。**结果:**在钛金属表面构建出了纳米形貌,利用实时定量 PCR 确定了成骨相关的基因:碱性磷酸酶(ALP),骨桥蛋白(OPN)和骨钙素(OCN)相比没有纳米形貌的钛片上培养的细胞均发生上调。通过对这些基因相关的成骨信号通路进行转录组数据分析(筛选基因 $P<0.05$),发现在 BMP2 信号通路中的相关蛋白基因表达没有太大变化,同时 Notch 以及 Wnt 非经典信号通路中相关蛋白基因发生较为明显变化。**结论:**通过分析间充质干细胞成骨分化相关基因,以及转录组数据分析表明在纳米形貌诱导 BMSC 分化过程中,相对于平坦的表面,纳米形貌启动了 Notch 以及非经典的 Wnt 信号通路,因此表现出更加优良的促成骨分化的效果。

关键词:骨髓间充质干细胞;纳米形貌;信号通路

中图分类号:R-33;R331.2;R318 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)04-619-05

Nano-topography Induce Signaling Pathways Involved in Stem Cell Osteoblastic Differentiation*

LIU Xuan, HOU Wen-qing, FU Hong, XIE Bo-wen, LI Gu-bing, GUO Tai-lin[△]

(College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role and molecular mechanism of nano-topography induced MSC osteoblastic differentiation. **Methods:** The nanotopography of the titanium surface was prepared by anodization. qRT-PCR been used analyzed osteoblastic related gene expression. RNA sequencing obtained transcriptome data and screened the results ($P<0.05$). Changes of gene expression in the osteoblastic -related signaling pathway were observed. **Results:** Nano-topography was constructed on the surface of titanium. Osteoblastic-related genes (alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN) and osteocalcin (OCN)) were up-regulated (vs. cells on flat Ti) by real-time quantitative PCR. By analyzing the RNA sequencing data of these gene-related osteoblastic signaling pathways, it was found that the related protein genes in Notch and Wnt non-canonical signaling pathways changed significantly. **Conclusion:** By analyzing the genes related to osteoblastic differentiation of BMSC and RNA sequencing data, it is shown that in the process of Nano-topography-induced BMSC differentiation, Nano-topography up-regulated Notch and non-canonical Wnt signaling pathways compare with the flat surface. Therefore, it exhibits a more excellent effect of promoting bone differentiation.

Key words: BMSC; Nano-topography; Signaling Pathways

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; R318 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)04-619-05

前言

在骨科植入物表面构建纳米形貌是目前常用的材料改性手段,纳米形貌表面有助于提高材料的生物相容性^[1],诱导细胞在材料表面的成骨方向分化。目前,已经鉴定出与成骨相关的信号通路如 BMP2^[2], Wnt^[3], Notch^[4]等,然而,对于纳米形貌启动了哪些信号通路,以及相关信号通路如何响应纳米形貌刺激的分子生物学机制尚不清楚。然而细胞内部的信号通路响应纳

米形貌的分子机制是十分复杂的,而且参与的成员众多,单独研究某些基因的表达情况任务量巨大而且难以统一,数据之间的可比性较差。现代的转录组测序分析利用高通量的手段,能够一次性将众多基因表达情况反映出来,高效而可靠^[5],不仅能够反映基因的上调或下调情况,更能反映出他总体的转录水平。本文首先利用实时定量 PCR(qRT-PCR)技术确认成骨相关的基因:碱性磷酸酶(ALP),骨桥蛋白(OPN)和骨钙素(OCN)表达情况,这些基因都是间充质干细胞朝着成骨分化的特征基

* 基金项目:中国国家重点研究发展计划项目(2016YFB0700803);学生研究培训项目(201810613078);

四川省科技厅基金项目(2018SZYF0012)

作者简介:刘玄(1992-),硕士研究生,主要研究方向:从事组织修复与再生医学方向的研究,

E-mail: liuxuanedu2011@126.com, 电话: 18236906933

[△] 通讯作者:郭泰林,教授,主要研究方向:组织修复与再生医学方向的研究, E-mail: tlguo@home.swjtu.edu.cn

(收稿日期:2019-05-23 接受日期:2019-06-18)

因^[6],然后利用转录组数据筛选与之相关的信号通路(BMP2, Wnt, Notch等),分析哪些通路在影响着细胞成骨分化。本文在现有文献的基础上^[7-9],研究在 BMP2, Notch, Wnt 等信号通路中相关蛋白基因表达情况,探求纳米形貌表面细胞成骨分化的机制。为材料表面改性的方向提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

钛片购自陕西宝鸡市宏亚达有色金属材料有限公司;骨髓间充质干细胞(BMSC)取自 Sprague Dawley 大鼠骨髓,大鼠由成都达硕生物科技有限公司提供;胎牛血清以及 α -MEM 培养基购自美国 Hyclone 公司;EDTA、PS(青霉素+链霉素)、胰酶、TRIZOL 购自美国 Invitrogen;逆转录试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司,IQ SYBR Green Supermix 试剂盒购自美国 Bio-rad 公司;线性可编程直流电源购自深圳市金壤电子科技有限公司;扫描电子显微镜购自韩国 COXEM 公司;Real-time PCR 仪购自美国 bio-rad 公司;细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 方法

1.2.1 材料制备 通过阳极氧化在商业纯 Ti 片(1 mm 厚, 99%)上制备 TiO₂ 纳米管^[10]。将 Ti 片在 HF(4wt%)和 HNO₃(40wt%)的混合物中处理 5 分钟,用去离子水冲洗。然后,将其浸入 HF(0.4wt%)和 H₃PO₄(12.8wt%)的混合物中;施加 20V 的电压(阴极:石墨棒)60 分钟以获得不同直径的纳米管。得到的样品缩写为 NS20,对照组为酸洗之后的平坦钛片缩写为 Flat。

在阳极氧化之后,用去离子水冲洗,在 70℃ 下干燥,并在 450℃ 下热处理 6 小时,目的是将阳极氧化的无定形 TiO₂ 纳米管转变为结晶相。通过电子显微镜研究样品表面形态。

1.2.2 细胞培养 BMSCs 从 Sprague Dawley 大鼠分离并保存在 α -MEM 培养基中,补充 10% 胎牛血清,100 单位/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素。将 BMSC 接种在培养板上并孵育(5% CO₂, 37℃)5 天。在第 5 天更换培养基,然后每 3 天更换一次。当达到 80-90% 汇合时,以 1:2 比例进行传代,并收集第 3-7 代的细胞使用。

1.2.3 qRT-PCR 通过 qRT-PCR 研究四种特征性成骨细胞基因(表 1)的表达。将 BMSC 接种在样品(2 $\times$ 10⁴ 个细胞/样品)上,在 α -MEM 中培养,并在 2 天后收集。用 TRIZOL 提取总 RNA 并在 RNase 抑制剂存在下使用随机六聚体逆转录得到 cDNA。用 CFX96 Real-Time 和 IQ SYBR Green Supermix 试剂盒(Bio-rad)扩增 cDNA(10 μ L)。引物显示在 Table 1 中。使用比较 Ct(2^{- Δ CT})方法,相对于 GAPDH(内部参照)表达转录物的表达水平。数据重复三次。

1.2.4 转录组测序及数据分析 在纳米形貌和平坦钛片表面培养细胞 2 天,大于 10⁶ 个细胞,标记为 R1, R2),溶解于 TRI-ZOL 处理液中,液氮冻存。细胞样品冷冻邮寄,由北京百泰克公司完成样品测序及前期数据处理工作。

1.3 统计分析

通过 t 检验 (Prism 6.0, Graphpad, San Diego, CA, USA) 进行两组之间的比较。P 值 < 0.05 被认为具有统计学意义。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	GGACCAGGTTGTCTCCTGTG	CATTGAGAGCAATGCCAGCC
Runt-related transcription factor (Runx2)	CATGGCCGGGAATGATGAG	TGTGAAGACCGTTATGGTCAAAGTG
Alkaline phosphatase (ALP)	TACTCGGACAATGAGATGCGCC	TTGTGCATTAGCTGATAGGCGA
Osteocalcin (OCN)	CCGTTTAGGGCATGTGTTGC	TTTCGAGGCAGAGAGAGGGA
Osteopontin (OPN)	TGGTGAGAGGAAGCAAGCAG	GCTGAAGCGCTTATCTTGGC

2 结果

2.1 材料表面形貌

如 Fig. 1 所示:平坦的钛(Flat)以及阳极氧化后的钛表面都具有酸处理后留下的腐蚀坑,同时阳极氧化后,钛表面分布有孔径为 80 nm 左右,壁厚为 20 nm 左右的二氧化钛纳米管阵列。与文献报道一致,可以确定钛金属表面的纳米形貌构建成功。

2.2 成骨基因表达

通过 qRT-PCR 发现(Fig. 2)相对于平坦的钛片,在具有纳米形貌的钛片表面,ALP, Runx2, OPN 以及 OCN 四种基因均出现表达量上调的现象,差距具有统计学意义。

2.3 转录组数据分析

通过转录组数据的深入分析,我们探究了 BMP2, Notch, Wnt 三条信号通路中相关蛋白的基因表达情况,他们各自的表

达情况如下。其中表现出显著差异的是 Notch 及 Wnt 信号通路中的部分蛋白。同时我们注意到 BMP2 信号通路中, BMP2 的受体 BMPR2 以及目的 Runx2 存在小幅上调。其他基因小幅下调。而在 Notch 以及 Wnt 信号通路中,相关蛋白基因普遍上调。同时从基因表达水平上看,表达量最高的是 Notch 信号通路中的 Fzd 受体。相对而言, BMP2 信号通路中的成员表达量较低。

3 讨论

钛金属是常用的骨科植入物^[11],它具有良好的力学性能,不易腐蚀,因而广泛的应用于骨修复中。但同时,钛具有生物惰性,不利于 BMSC 在表面成骨,随着医用技术的发展,我们对钛金属植入材料提出更高的要求。其中在钛金属表面构建纳米形貌,成了常用的改善钛植入物生物相容性的手段^[12],研究证明表面具有纳米形貌的钛植入材料,具有改善成骨特性,加速

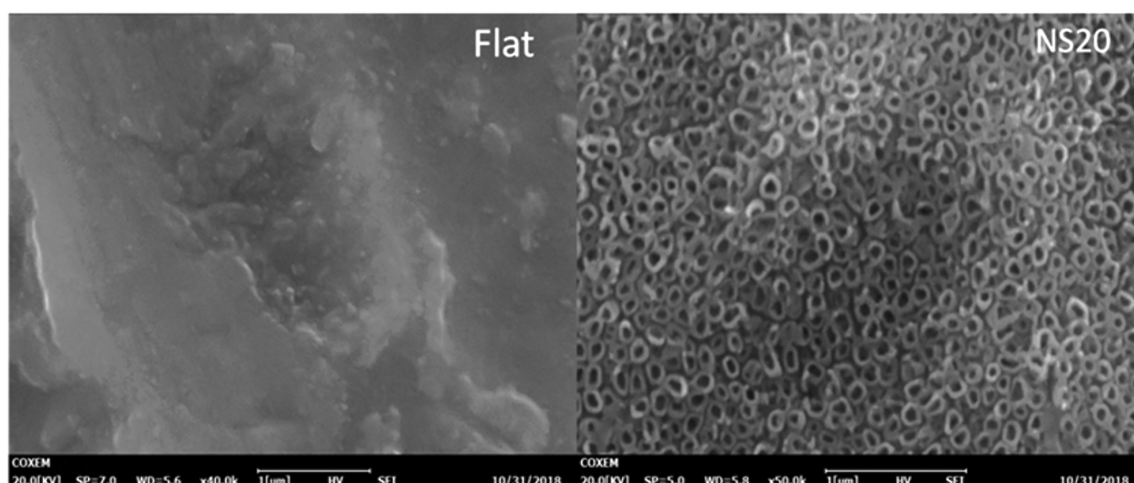


图1 平坦的钛片(Flat)与具有纳米管阵列的钛片(NS20)的纳米级形貌对比

Fig.1 The flat titanium sheet (Flat) is compared to the nanoscale topography of a titanium sheet (NS20) with a nanotube array

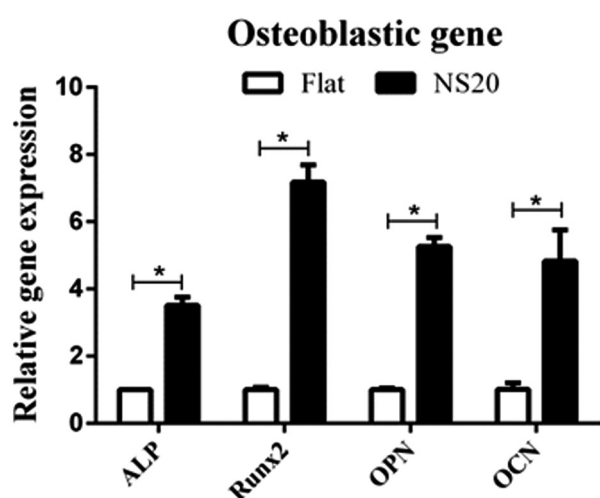
图2 成骨相关基因 qRT-PCR 结果。* $P < 0.05$

Fig.2 The results of osteoblastic related gene qRT-PCR. * $P < 0.05$

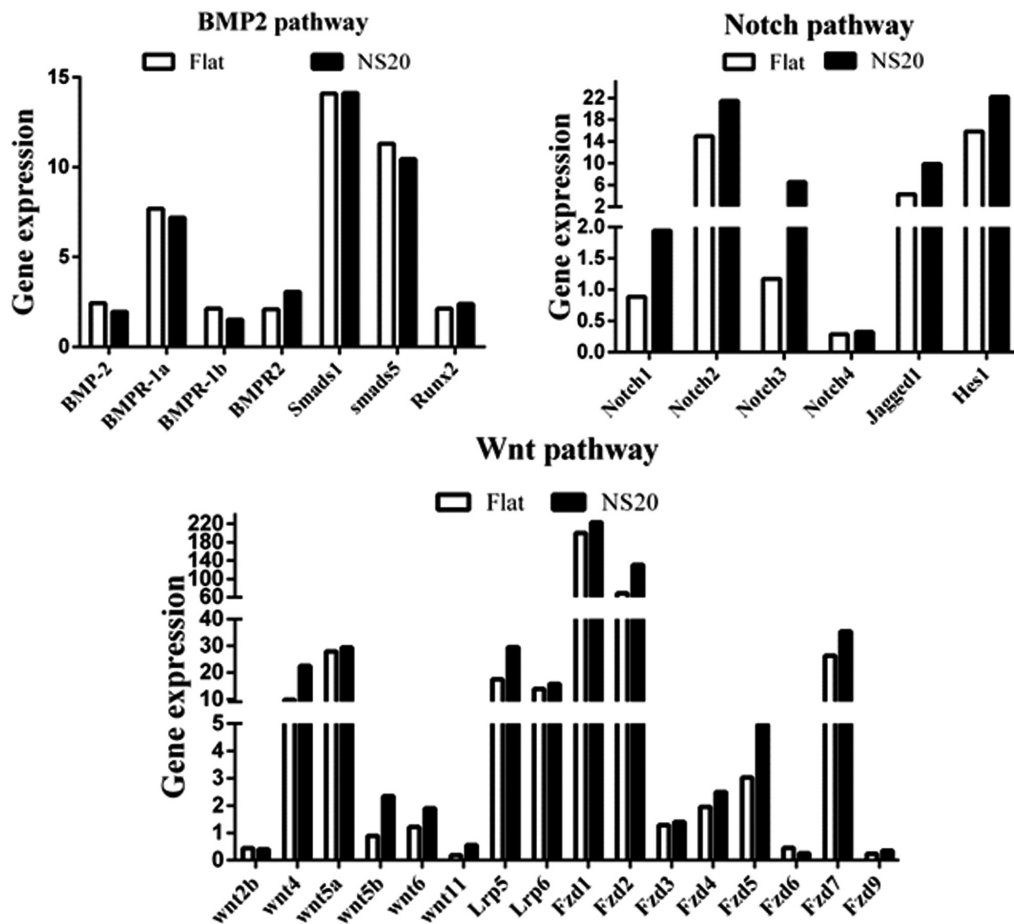
骨整合和减少愈合时间的优良性能^[13]。在本文中,我们成功在钛金属表面制备了二氧化钛纳米管阵列(图1)孔径在80 nm左右,在钛表面形成规则的纳米形貌,以此作为研究纳米形貌促进 BMSC 成骨分化的基底材料。研究发现:在纳米形貌的刺激下,细胞中成骨相关的四种特征蛋白基因表达上调(图2),这与之前的文献报道相一致^[10]。接下来,为了确定哪些信号通路主导了纳米形貌诱导的成骨分化,我们对可能影响这四种基因的信号通路进行文献调研^[4,7,9,14],发现了参与间充质干细胞成骨分化的相关信号通路,其中 BMP2, Notch 以及 Wnt 信号通路被认为广泛地参与了 BMSC 的成骨分化调节,为了进一步确认纳米形貌特征引起的 BMSC 成骨分化是否与这三条信号通路有关。我们利用转录组数据分析(筛选 $P < 0.05$ 的基因),着重调查了 BMP2, Notch 以及 Wnt 信号通路中的主要成员基因表达情况,观察他们在平坦的钛片(Flat)和具有纳米形貌的钛片(NS20)表面上调或下调状况。以此判断相应的信号通路是否被纳米形貌所调控。另外,对信号通路内部成员表达情况的研究有助于进一步了解纳米形貌诱导 BMSC 成骨分化的分子机制,为材料表面改性提供理论依据。

Runx2 是成骨分化中的关键蛋白^[7],调控着碱性磷酸酶(ALP),骨桥蛋白(OPN)和骨钙素(OCN)等成骨关键因子的表

达^[15]。Runx2 在成骨细胞、肥大软骨细胞以及骨膜/软骨膜中的间充质干细胞中都以高水平表达。纯合的 Runx2- 突变小鼠表现出成骨细胞分化完全停滞,导致严重的成骨缺陷^[16]。Runx2 表达上调,是骨形成过程中早期最具有代表性的标志基因^[17]。在实时定量 PCR 实验中(图2),发现 Runx2 表达量上调。证明了纳米形貌在成骨方面的优良特性。BMP2 通路是调控 Runx2 的重要信号通路之一,在过去的研究中 BMP2 被认为是间充质干细胞成骨分化的重要调控途径。BMP2 与受体 BMPR1/2 结合,激活下游的 Smads 蛋白家族,Smads 家族成员可以上调 Runx2 的基因表达水平。我们从转录组数据中筛选到 BMP2, BMPR1a, BMPR1b, BMPR2, Smads1, Smads5 以及 Runx2 (图3)的基因表达水平。同实时定量 PCR 数据相似,转录组数据中 Runx2 同样表达出了上调。信号通路中的其他成员在纳米形貌诱导下,并没有表现出明显的倾向性,只有 BMPR2 出现较为显著的上调。Runx2 的上调,显示 BMP2 信号通路在纳米形貌诱导 BMSC 成骨的过程中起正向作用,这可能与 BMP2 的受体 BMPR2 上调有关。

Notch 信号通路促进大段骨中的内皮细胞增殖以及血管生成^[18,19],对骨形成过程中的能量供应意义重大,是促进成骨分化的重要通路之一,两种严重的骨骼疾病:肋骨发育不全以及 Alagille 综合征都是由于 Notch 信号通路基因变异造成的。Jagged1 是 Notch 家族的重要配体^[20],Hes1 是 Notch 的下游基因,能够与 Runx2 相互作用^[21],并增强后者作为转录激活因子的活性。结果显示,Notch 信号通路中的相关蛋白基因均有不同程度的上调现象(图3),其中 Notch1, Notch3 上调明显。这些结果表明 Notch 信号通路在纳米形貌诱导成骨过程中起到重要的促进作用。

Wnt 是一种细胞外因子,根据该蛋白转导信号的方式,Wnt 信号通路分为经典信号通路和非经典信号通路两种,经典信号通路主要通过 Lrp5/6 以及 Fzds 受体结合^[22],促进 β -catenin 在胞质内的积累(抑制降解)进而入核激活 LEF / TCF 转录因子,启动靶基因转录(BMP4 等)^[23]。研究证明抑制 Wnt 信号通路会降低软骨细胞增殖和分化^[24],促进软骨细胞凋亡^[25],同时使次级骨化中心形成缓慢,从而影响骨骼生长^[9,26],同时还发现经典 Wnt 信号能够诱导 ALP 活性,促进前体成骨细胞生长,以及早

图3 转录组数据中 BMP2, Wnt, Notch 信号通路中基因表达情况(所选基因 $P < 0.05$)Fig.3 Gene expression in BMP2, Wnt, Notch signaling pathways in transcriptome data (selected gene $P < 0.05$)

期成骨细胞分化^[27]。非经典信号通路主要通过 Fzd 结合后,可激活异源三聚体 G 蛋白,提高细胞内钙水平,从而激活非经典 Wnt 通路的 Wnt/Ca²⁺ 途径^[28],促进 Ca²⁺ 进入细胞内部, Ca²⁺ 对于骨钙素(OCN)等物质的合成具有重要意义,同时 Ca²⁺ 增加有利于细胞矿化的发生^[29]。我们筛选出了经典信号通路中的 Wnt2b^[30]以及非经典信号通路中的 Wnt4^[31], Wnt5a^[32], Wnt5b^[33], Wnt6^[34]以及 Wnt11^[35],结果显示(Fig.3),在纳米形貌诱导 BMSC 成骨的过程中非经典的 Wnt 信号通路相关的基因表达量增加明显。Lrp 以及 Fzd 受体均有小幅上升。同时我们注意到作为非经典通路的重要受体 Fzd1/2 的基因表达量都极高(图 3),这些现象共同证明了非经典的 Wnt 信号通路在纳米形貌诱导的 BMSC 成骨分化中起重要作用。

材料纳米形貌诱导的间充质干细胞成骨分化是极其复杂的过程,除了本文介绍的 BMP2, Notch 以及 Wnt 等与骨形成之间相关的信号通路之外,免疫、新陈代谢中的因素也被认为参与了间充质干细胞的成骨分化过程。这些信号通路之间也同样存在广泛的联系,例如 Wnt 参与调控了 BMP2 的下游 Smads^[27,36]; Notch 信号通路调控了免疫过程中巨噬细胞的极化过程等等,这些机制都需要我们进一步的探索。

综上所述,在纳米形貌诱导 BMSC 分化过程中,相对于平坦的表面,纳米形貌启动了 Notch 以及非经典的 Wnt 信号通路,因此表现出更加优良的促成骨分化的效果。为材料表面改性提供了以及相关的表征方式提供了理论支撑。然而,纳米形

貌如何上调 Notch 以及 Wnt 非经典信号通路,以及他们之间如何相互影响的作用机制尚需进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Xu RG, Hu XC, Yu XL, et al. Micro-/nano-topography of selective laser melting titanium enhances adhesion and proliferation and regulates adhesion-related gene expressions of human gingival fibroblasts and human gingival epithelial cells [J]. *Int J Nanomed*, 2018, 13: 5045-5057
- [2] Malik Z, Alexiou M, Hallgrímsson B, et al. Bone Morphogenetic Protein 2 Coordinates Early Tooth Mineralization [J]. *J Dent Res*, 2018, 97(7): 835-843
- [3] Le Dour C, Macquart C, Sera F, et al. Decreased WNT/beta-catenin signalling contributes to the pathogenesis of dilated cardiomyopathy caused by mutations in the lamin a/C gene[J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(2): 333-343
- [4] Bagheri L, Pellati A, Rizzo P, et al. Notch pathway is active during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells induced by pulsed electromagnetic fields[J]. *J Tissue Eng Regen M*, 2018, 12(2): 304-315
- [5] Liu YZ, Maney P, Puri J, et al. RNA-sequencing study of peripheral blood monocytes in chronic periodontitis [J]. *Gene*, 2016, 581(2): 152-160
- [6] Pan H, Xie Y, Zhang Z, et al. YAP-mediated mechanotransduction regulates osteogenic and adipogenic differentiation of BMSCs on hierarchical structure [J]. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 2017,

- 152: 344-353
- [7] Chen GQ, Deng CX, Li YP. TGF-beta and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(2): 272-288
- [8] Zanotti S, Canalis E. Notch Signaling and the Skeleton [J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(3): 223-253
- [9] Yu YL, Shen XK, Liu JJ, et al. Regulation of osteogenesis by micro/nano hierarchical titanium surfaces through a Rock-Wnt5a feedback loop[J]. *Colloid Surface B*, 2018, 170: 1-10
- [10] Oh S, Brammer KS, Li YSJ, et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(7): 2130-2135
- [11] Huang QL, Elkhoory TA, Liu XJ, et al. Effects of hierarchical micro/nano-topographies on the morphology, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells[J]. *Colloid Surface B*, 2016, 145: 37-45
- [12] Yin CC, Zhang YJ, Cai Q, et al. Effects of the micro-nano surface topography of titanium alloy on the biological responses of osteoblast [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(3): 757-769
- [13] Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, et al. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans [J]. *Clin Oral Implan Res*, 2011, 22(4): 349-356
- [14] Wang W, Zhao LZ, Ma QL, et al. The role of the Wnt/beta-catenin pathway in the effect of implant topography on MG63 differentiation [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(32): 7993-8002
- [15] Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, et al. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression[J]. *Oncogene*, 2004, 23(24): 4315-4329
- [16] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts[J]. *Cell*, 1997, 89(5): 755-764
- [17] Zhang X, Aubin JE, Inman RD. Molecular and cellular biology of new bone formation: insights into the ankylosis of ankylosing spondylitis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2003, 15(4): 387-393
- [18] Ramasamy S K, Kusumbe A P, Wang L, et al. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone [J]. *Nature*, 2014, 507(7492): 376-380
- [19] Tataro A, Castellan M, Di Biagio D, et al. Crosstalk between YAP/TAZ and Notch Signaling [J]. *Trends in cell biology*, 2018, 28(7): 560-573
- [20] Jaggy M, Zhang P, Greiner AM, et al. Hierarchical Micro-Nano Surface Topography Promotes Long-Term Maintenance of Undifferentiated Mouse Embryonic Stem Cells [J]. *Nano Lett*, 2015, 15(10): 7146-7154
- [21] Park HW, Kim YC, Yu B, et al. Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ [J]. *Cell*, 2015, 162(4): 780-794
- [22] Kim M, Kim S, Lee SH, et al. Merlin inhibits Wnt/beta-catenin signaling by blocking LRP6 phosphorylation[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(10): 1638-1647
- [23] Abagnale G, Sechi A, Steger M, et al. Surface Topography Guides Morphology and Spatial Patterning of Induced Pluripotent Stem Cell Colonies[J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 9(2): 654-666
- [24] Deng FH, Zhi FC. Yap triggers the wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes enterocyte self-renewal, regeneration and tumorigenesis after dss-induced injury [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(6): S923-S923
- [25] Fang YS, Que JW. Notum balances Wnt signaling during tracheal cartilage development[J]. *Dev Biol*, 2018, 437(2): 61-62
- [26] Shi JY, Zhang XM, Qiao SC, et al. Enhanced osteointegration of tantalum-modified titanium implants with micro/nano-topography [J]. *Rsc Adv*, 2017, 7(73): 46472-46479
- [27] Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, et al. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop[J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(10): 1842-1853
- [28] Lopez EW, Vue Z, Broaddus RR, et al. The ERM family member Merlin is required for endometrial gland morphogenesis[J]. *Dev Biol*, 2018, 442(2): 301-314
- [29] Polini A, Wang JL, Bai H, et al. Stable biofunctionalization of hydroxyapatite (HA) surfaces by HA-binding/osteogenic modular peptides for inducing osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Biomater Sci-Uk*, 2014, 2(12): 1779-1786
- [30] Grassi F, Tyagi AM, Calvert JW, et al. Hydrogen Sulfide Is a Novel Regulator of Bone Formation Implicated in the Bone Loss Induced by Estrogen Deficiency[J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31(5): 949-963
- [31] Ali RM, Al-Shorbagy MY, Helmy MW, et al. Role of Wnt4/beta-catenin, Ang II/TGF beta, ACE2, NF-kappa B, and IL-18 in attenuating renal ischemia/reperfusion-induced injury in rats treated with Vit D and pioglitazone[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 831: 68-76
- [32] Yu YL, Shen XK, Luo Z, et al. Osteogenesis potential of different titanium nanotubes in oxidative stress microenvironment[J]. *Biomaterials*, 2018, 167: 44-57
- [33] Zhang Y, Lin LJ, Jin Y, et al. Overexpression of WNT5B promotes COLO 205 cell migration and invasion through the JNK signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(1): 23-30
- [34] Goncalves C, Pojo M, Xavier-Magalhaes A, et al. Regulation of WNT6 by HOXA9 in glioblastoma: functional and clinical relevance [J]. *Eur J Cancer*, 2016, 61: S45-S46
- [35] Jang S, Cho HH, Park JS, et al. Non-canonical Wnt mediated neurogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 660: 68-73
- [36] Tfelt-Hansen J, MacLeod RJ, Chattopadhyay N, et al. Calcium-sensing receptor stimulates PTHrP release by pathways dependent on PKC, p38 MAPK, JNK, and ERK1/2 in H-500 cells[J]. *Am J Physiol-Endoc M*, 2003, 285(2): E329-E337