

人骨髓间充质干细胞成骨分化早期相关的长链非编码 RNA 的初步研究

胡伟涛, 赵建江, 孙翔, 贾搏, 韩久松, 邱小玲, 褚洪星, 郑相淮
(南方医科大学附属口腔医院//广东省口腔医院 口腔颌面外科, 广东 广州 510280)

摘要:【目的】筛选与人骨髓间充质干细胞(hMSC)成骨分化早期相关的长链非编码 RNA(lncRNA),分析其对于 hMSC 成骨分化早期的影响。【方法】将成骨诱导分化 7 d 前后的 hMSC 作为研究对象,利用 Agilent lncRNA 芯片技术筛选出成骨诱导分化前后表达量具有 2 倍差异的 lncRNA,选取其中 1 条表达量差异较大的 lncRNA 利用 UCSC Genome Browser 分析此 lncRNA 邻近蛋白编码基因。【结果】hMSC 经过成骨分化诱导 7 d 后具有明显成骨细胞特征;Agilent lncRNA 芯片技术筛选结果表明,hMSC 成骨分化诱导 7 d 后表达上调的 lncRNA 有 923 条,表达下调的有 993 条;选择表达上调中表达量差异较大的 1 条 lncRNA ENST00000585537.1,UCSC Genome Browser 生物信息学分析显示其与 MAPK 蛋白相关。【结论】hMSC 成骨分化诱导 7 d 后 lncRNA 表达发生改变,部分表达差异较大的 lncRNA 可能通过与相关蛋白编码基因联系影响 hMSC 的早期成骨分化功能。

关键词:人骨髓间充质干细胞;成骨分化早期;长链非编码 RNA;生物信息学分析

中图分类号:R68 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2016)03-0384-06

Preliminary Study of Long Non-coding RNA Involved in Early Phase Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

HU Wei-tao, ZHAO Jian-jiang, SUN Xiang, JIA Bo, HAN Jiu-song, QIU Xiao-ling, CHU Hong-xing,
ZHENG Xiang-huai.

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China)

Corresponding to: ZHAO Jian-jiang; E-mail: zjj2521@sina.com

Abstract: 【Objective】To screen the related long non-coding RNA (lncRNA) expression profile changes in the early stage osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSC), to analyze the affection between the changes and the early stage osteogenic differentiation of hMSC. 【Method】hMSC with before and after 7days of osteogenic differentiation were taken as research subjects, the Agilent lncRNA chip technology was used to screen the lncRNA which has two fold differences in expression before and after the osteogenic differentiation. One of a quite different lncRNA in expression was selected, and UCSC Genome Browser, which is the nearby lncRNA protein-coding gene, was used for the following discussion. 【Results】After 7days of osteogenic differentiation, hMSC had exhibited in having a mild osteoblast-like characteristic; the results of the Agilent RNA microarray screening showed that there were 923 lncRNA upregulated and 993 lncRNA downregulated after 7days of hMSC osteogenic differentiation; UCSC Genome Browser bioinformatics analysis showed that ENST00000585537 is associated with MAPK protein. 【Conclusion】The expression of lncRNA is altered after 7days of hMSC osteogenic differentiation, part of the lncRNA which have large differential expression through the contact with related protein coding genes affect the early osteogenic differentiation function of hMSC.

Key words: hMSC; early stage of osteogenic differentiation; lncrna; bioinformatics analysis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(3):384-389]

收稿日期:2016-01-26

基金项目:广东省科技计划项目(2013B021800153);广州市科技惠民专项项目(2014Y2-00109);广东省自然科学基金(2015A030313787)

作者简介:胡伟涛,硕士,医师,E-mail:505926610@qq.com;赵建江,通信作者,主任医师,博士生导师,E-mail:zjj2521@sina.com

人骨髓间充质干细胞 (human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSC) 为来自人类骨髓的多能成体干细胞, 多向分化潜力及无移植排斥反应决定了其在组织工程再生领域具有重要的临床应用价值^[1]。成骨细胞在发育分化过程中, 特定基因严格按照特定的顺序激活与关闭, 控制着成骨分化的不同阶段^[2]。由于 hMSC 近年来在颌面部骨组织缺损修复中逐渐成为研究热点^[3], 而成骨分化的早期决定了未来细胞的发展^[4], 同时有报道指出, 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 与间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 的成骨分化存在一定的联系^[5]。因此, lncRNA 对 hMSC 早期的成骨分化具有一定的调控作用。为了确定两者的关系, 本研究进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

原代 hMSC (ScienCell, #7500)、间充质干细胞培养基、多聚赖氨酸、磷酸盐缓冲液 (PBS)、胰酶/EDTA 消化液、胰酶中和液、间充质干细胞成骨分化培养基及 2% 茜素红 S 染液 (ScienCell 公司, 美国); 碱性磷酸酶 (ALP) 染色试剂盒 (Sigma 公司, 美国); Trizol 液、反转录试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (Applied Biosystems 公司, 美国)。

1.2 hMSC 的培养

将购买的原代 hMSC 细胞冻存管迅速置于 37 °C 水浴中摇动融化。将细胞移至离心管, 加入 PBS 重悬, 离心取上清清洗细胞。按 5×10^3 个/cm² 密度将细胞接种于 75 cm² 培养瓶中。置于 37 °C、体积分数 5% 的 CO₂、饱和湿度孵箱中培养。次日更换培养基。此后每 3 d 更换 1 次培养基。待细胞达到 90% 汇合时, 应用胰酶/EDTA 消化液消化, 进行传代培养。

1.3 hMSC 的成骨诱导分化

取经过扩大培养的第 5 代 hMSC 按细胞密度为 2×10^5 个/cm² 接种于 6 孔板中, 于 37 °C、体积分数 5% 的 CO₂、饱和湿度孵箱中培养; 待细胞达到 80% 融合时, 更换为间充质干细胞成骨分化培养基, 此后每 3 d 更换 1 次培养基。

1.4 ALP 染色

取上述成骨诱导分化前的细胞 (记为 D0) 及

成骨诱导分化后 7 d 的细胞 (记为 D7) 进行 ALP 染色。弃培养基, PBS 清洗 2 遍, 加入 40 g/L 多聚甲醛溶液, 室温条件下固定 30 min 后吸掉液体, PBS 清洗 2 遍, 观察染色结果, 显微镜下观察染色结果, 拍照。

1.5 茜素红染色

取上述成骨诱导分化前的细胞及成骨诱导分化后 7d 的细胞进行茜素红染色。PBS 洗 2 遍, 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 30 min, PBS 洗 2 遍, 加入 1% 茜素红 S 染液, 室温条件下静置 30 min, PBS 清洗 2 遍, 观察染色结果, 显微镜下观察染色结果, 拍照。

1.6 qRT-PCR 检测成骨因子 (ALP、Runx2、OCN) 表达情况

于 NCBI 查看基因序列, 应用 Primer Premier 5.0 设计引物 (表 1)。将 D0 及 D7 组细胞样本用 PBS 洗 2 遍, Trizol 试剂抽提总 RNA, 根据 Invitrogen 公司的反转录试剂盒操作说明将 RNA 反转录为 cDNA。将得到的 cDNA 按照 Applied Biosystems 公司的说明书加入检测体系, 并由 7900 HT Fast RealTime PCR system 进行反应。内参使用人 GAPDH。实验单独重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析目的基因的表达。

表 1 qRT-PCR 检测成骨因子引物序列
Table 1 Sequences of primers in qRT-PCR

Primer	Sequence (5'-3')
ALP	F: CCTGTAGCCAGGCCCATTTG
	R: GGACCATTCCCACGTCTTCAC
Runx2	F: CACTGGCGCTGCAACAAGA
	R: CATTCCGGAGCTCAGCAGAATAA
OCN	F: CCCAGGCGCTACCTGTATCAA
	R: GGTCAGCCAACCTCGTCACAGTC

1.7 lncRNA 芯片筛选

将 D0 及 D7 组细胞样本用 Trizol 试剂抽提总 RNA, 总 RNA 质量检测合格后, 进行体外扩增和荧光标记, 标记过程采用晶芯生物芯片通用标记试剂盒 (CapitalBio)。将标记后的产物于 45 °C 与 Agilent 公司 4×180 K 人 lncRNA V3.0 芯片 (包含 37581 条人 lncRNA 特异探针及 34235 条人 mRNA 探针) 杂交过夜。使用博奥 Slide Washer8 芯片洗干仪进行清洗后, 使用 Agilent 芯片扫描仪对

清洗后的芯片进行扫描,得到杂交图片。使用 Agilent Feature Extraction (v10.7)软件对杂交图片进行分析并提取数据。然后使用 Agilent CeneSpring 软件对数据进行归一化和差异分析(差异倍数不低于 2 倍)。

1.8 生物信息学分析

选取芯片筛选结果中表达差异较大的 1 条 lncRNA,利用 UCSC Genome Browser 分析 lncRNA 附近 300 kb 区域蛋白编码基因。

1.9 统计学方法

所有实验中每组 3 个样本,每个实验单独重复 3 次。应用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 t 检验的统计方法,若 $P < 0.05$,则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 hMSC 的培养及成骨分化诱导培养

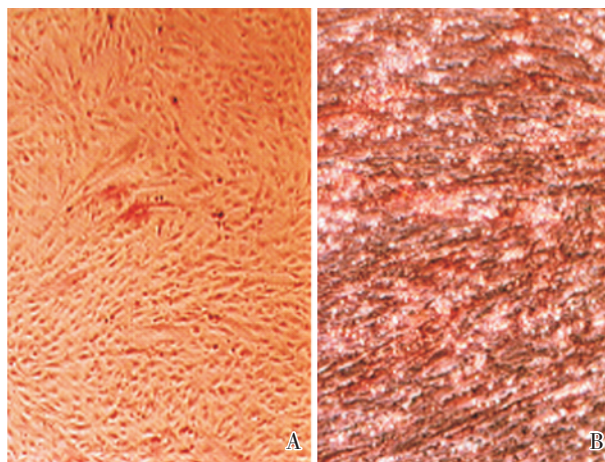
将原代 hMSC 复苏后接种于 75 cm² 培养瓶中,记为第 1 代。细胞大部分贴壁,呈梭形,形态均一生长状态良好,呈现间充质干细胞形态。为了探讨 hMSC 成骨分化早期的情况,将经过扩大培养的第 5 代 hMSC 进行成骨分化诱导 7 d,显微镜示细胞形态变为短多角形,增殖速率下降,可见少量棕色结节。

2.2 ALP 染色鉴定 hMSC 成骨分化诱导 7 d 结果

取经过扩大培养的第 5 代 hMSC 常规消化并接种于 6 孔板后,同样进行常规成骨分化诱导 7 d。ALP 染色结果显示,诱导 7 d 后 hMSC 细胞表面附着深蓝色染料(图 1B);而未诱导细胞几乎不附着染料(图 1A);D7 组与 D0 组相比,D7 组具有明显的 ALP 染色阳性情况。ALP 染色结果表明,hMSC 经过 7 d 成骨分化诱导后能够呈现出一定的成骨分化能力。

2.3 茜素红染色鉴定 hMSC 成骨分化诱导 7 d 结果

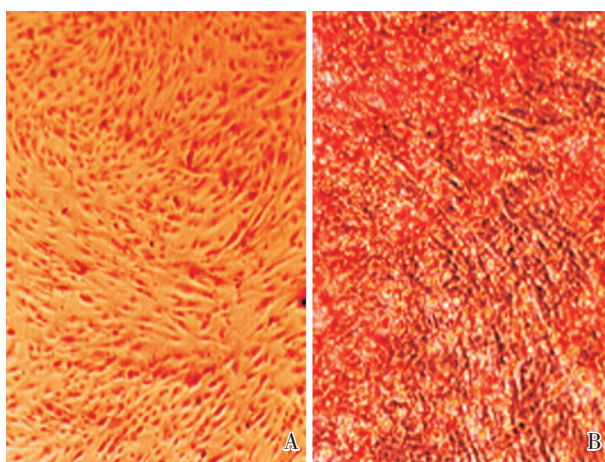
同样是第 5 代 hMSC 进行常规成骨分化诱导 7 d 后行茜素红染色,结果显示,hMSC 诱导 7 d 后细胞表面可见钙结节沉积(图 2B);而未诱导的细胞未见钙结节(图 2A);D7 组与 D0 组相比,D7 组具有明显的茜素红染色阳性情况。茜素红染色结果表明,hMSC 经短期成骨分化诱导呈现早期成骨分化状况。



A: D0 group (without osteogenic induction); B: D7 group (7 d osteogenic induction). $\times 40$

图 1 ALP 染色鉴定 hMSC 成骨分化诱导 7 d 结果

Fig.1 ALP staining determines osteogenic differentiation of hMSC after 7 d osteogenic induction



A: D0 group (without osteogenic induction); B: D7 group (7 d osteogenic induction); $\times 40$

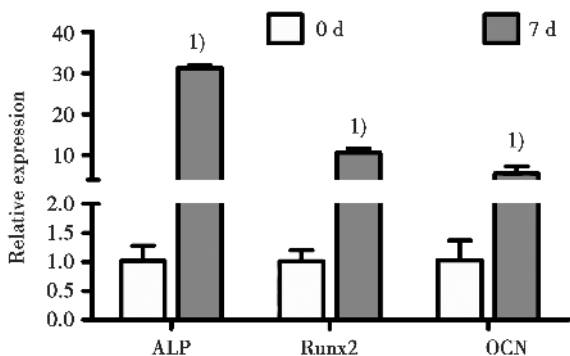
图 2 茜素红染色鉴定 hMSC 成骨分化诱导 7 d 结果

Fig.2 Alizarin Red S staining determines osteogenic differentiation of hMSC after 7 d osteogenic induction

2.4 qRT-PCR 鉴定 hMSC 成骨分化诱导 7 d 结果

按照上述方法,第 5 代 hMSC 进行成骨分化诱导 7 d 后提取总 RNA,2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分析结果显示成骨分化相关因子表达量,ALP:D0 为 1.02 ± 0.26 ,D7 为 31.27 ± 0.63 , $P < 0.001$;Runx2 为 D0: 1.01 ± 0.19 ,D7 为 10.64 ± 1.04 , $P < 0.001$;OCN 为 D0: 1.03 ± 0.34 ,D7 为 5.57 ± 1.78 , $P < 0.001$ 。数据表明 hMSC 诱导 7 d 后成骨分化相关因子 ALP、Runx2 及 OCN 的表达量都呈上升趋势,差异有统计学意

义($P < 0.05$; 图 3)。



1) $P < 0.001$. ALP: D0:1.02 ± 0.26, D7:31.27 ± 0.63, P ; Runx2: D0:1.01 ± 0.19, D7:10.64 ± 1.04; OCN: D0:1.03 ± 0.34, D7:5.57 ± 1.78

图 3 qRT-PCR 鉴定 hMSC 成骨分化诱导 7 d 结果

Fig.3 qRT-PCR determines osteogenic differentiation of hMSC after 7 d osteogenic induction

2.5 lncRNA 芯片筛选结果

第 5 代 hMSC 进行成骨分化诱导 7 d 后进行 lncRNA 芯片筛选。成骨分化诱导 7 d 后表达上调超过 2 倍的 lncRNA 有 923 条, 下调超过 2 倍的有 993 条; 上调超过 4 倍的 lncRNA 有 225 条, 下调超过 4 倍的有 120 条; 上调超过 8 倍的 lncRNA 有 60 条, 下调超过 8 倍的有 17 条。表 2 为筛选结果中表达差异较大的部分 lncRNA。

表 2 lncRNA 芯片筛选表达差异较大结果

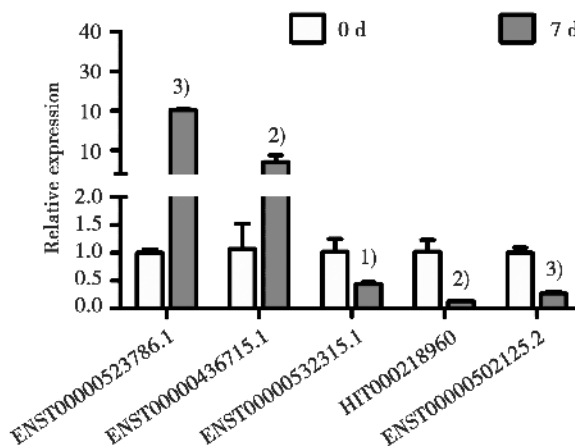
Table 2 Results of lncRNA microarray

Up regulated lncRNA	D7/D0	Down regulated lncRNA	D7/D0
ENST00000443364.1	39.38	ENST00000473756.1	-29.07
TCONS_00020125	36.10	ENST00000474798.1	-21.80
ENST00000436715.1	35.18	TCONS_00026558	-18.96
ENST00000390168.4	30.87	XR_108665.1	-17.94
ENST00000414790.1	30.83	ENST00000584911.1	-16.73
HIT000332651	30.69	ENST00000454699.1	-15.32
ENST00000507217.1	29.95	ENST00000582120.1	-14.36
ENST00000585537.1	24.52	ENST00000432414.1	-13.73
XR_242466.1	24.26	uc001jgx.1	-13.36
ENST00000418923.1	21.62	ENST00000449012.1	-12.13

2.6 qRT-PCR 验证芯片筛选结果

随即选取 5 个差异表达 lncRNA, 其中 2 个上调 (ENST00000523786.1 和 ENST00000436715.1), 3 个下调 (ENST00000532315.1, HIT000218960 和

ENST00000502125.2)。qRT-PCR 结果显示 D7 组与 D0 组相比, ENST00000523786.1 和 ENST00000436715.1 表达明显上调, ENST00000532315.1, HIT000218960 和 ENST00000502125.2 表达明显下调 (图 4), 其中, ENST00000523786.1: 0 d 为 1.000 ± 0.060 , 7 d 为 20.090 ± 0.270 , $P < 0.001$; ENST00000436715.1: 0 d 为 1.070 ± 0.450 , 7 d 为 6.950 ± 1.760 , $P = 0.005$; ENST00000532315.1: 0 d 为 1.020 ± 0.230 , 7 d 为 0.440 ± 0.030 , $P = 0.012$; HIT000218960: 0 d 为 1.020 ± 0.210 , 7 d 为 0.130 ± 0.010 , $P = 0.002$; ENST00000502125.2: 0 d 为 1.000 ± 0.090 , 7 d 为 0.270 ± 0.030 , $P < 0.001$ 。qRT-PCR 验证结果与芯片检测结果一致。



1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$ vs 0 d

图 4 qRT-PCR 验证芯片筛选结果

Fig.4 qRT-PCR verifies results of Agilent RNA microarray screening

2.7 生物信息学分析

选取 hMSC 成骨分化诱导 7 d 后表达上调较大的 lncRNA ENST00000585537.1, 利用 UCSC Genome Browser 分析可得, lncRNA ENST00000585537.1 位于人类第 17 号染色体上, 在其附近 300 kb 区域内存在 1 个蛋白编码基因 MAP2K6 (图 5)。

3 讨论

hMSC 是一种在体内或体外特定诱导条件下可分化为骨、软骨、脂肪、肌肉、内皮等多种组织的多能成体干细胞^[6], 同时因其可源于自体、无移植排斥反应、更新能力强、低温冷冻保存后或连续传代培养仍然保持多向分化潜能^[7], 在组织修复、骨



图 5 生物信息学分析

Fig.5 The UCSC Genome Browser combined with microarray results

组织工程中凸显出重要的作用^[8],可作为广泛运用于骨组织再生工程的理想种子细胞。根据目前的研究,hMSC成骨分化受多种因素调控,其中包括生长因子(TGF- β 等)、转录因子(Runx2、NF- κ B等)细胞因子(IL-6、IFN- γ 等)、机制通路(Wnt/ β -catenin signaling、BMP signaling)以及 microRNA 等等^[7]。以上机制的研究已经有了显著的进展。近期有学者发现,lncRNA与hMSC的成骨分化具有一定的联系,尤其与人类的成骨分化过程密切相关^[9]。

lncRNA是一类转录长度大于200 nt的非编码RNA。他们不参与蛋白的编码,但是形成复杂的空间结构,在转录水平或转录后水平对特定基因进行调控与修饰^[10]。Bergmann等^[11]报道,lncRNA通过影响多能标志物转录因子从而调控胚胎干细胞的分化过程。Ponting等^[12]发现,MSC成骨分化的发生与发展由lncRNA调控相关成骨基因的转录或转录后修饰来实现。目前,由于lncRNA的研究时间短,关于其在MSC成骨分化方面的研究报道较少,且主要是局限于单个lncRNA的研究,此领域具有很大的研究空间。

本研究首先将hMSC进行成骨分化诱导7 d,ALP染色与茜素红染色结果均表明,hMSC成骨分化诱导7 d后成骨能力增强。同时结合qRT-PCR分析可知ALP在成骨分化诱导7 d表达明显上调,而ALP在成骨细胞分化早期阶段发挥作用,其

也是儿童在生理期骨骼发育期重要的指标,这表明了7 d的成骨分化诱导促进了hMSC早期的成骨分化。碱性磷酸酶(ALP)为成骨细胞分化早期的一个重要指标,其基因位于染色体1P36.1上,在骨骼及牙齿发育中起着重要的调控作用。茜素红初始应用在矿物的鉴定当中,而目前在细胞体外培养中应用较多,其表示成骨系细胞中钙结节沉积的数量,也能够对成骨系细胞分泌矿化基质的早期阶段进行衡量^[13]。即经过7 d的成骨分化诱导,hMSC表现出明显的成骨系细胞特征。不仅如此,有相关报道表明,lncRNA在小鼠胚胎发育早期具有一定的功能性调控作用^[14],同时lncRNA为特定基因转录的调控者,能够在环境影响中较迅速的发生响应与变化,在基因调控至蛋白表达过程中为首要部分。综上,本研究旨在hMSC成骨分化诱导早期,结合公认的成骨分化衡量指标,研究响应的lncRNA种类。

接着我们采用人类lncRNA表达谱芯片技术探索hMSC在成骨分化7 d过程中lncRNA表达的改变。结果表明,hMSC成骨分化诱导7 d后表达上调的lncRNA有923条,表达下调的有993条。上述结果说明了在hMSC中lncRNA与hMSC早期成骨分化具有相关关系,而具体的调控机制有待进一步探讨。这些发生差异表达的lncRNA可能与hMSC早期成骨分化相关。而且有研究已经发现lncRNA可以通过调控邻近蛋白编码基因的

表达来发挥作用。因此,我们根据表达量的差异,选取筛选结果中表达上调较大的一条 lncRNA: lncRNA ENST00000585537.1, 通过 UCSC Genome Browser 方法分析发现其附近 300 kb 区域内存在 1 个蛋白编码基因即 MAP2K6。大量的研究表明, MAP2K6 为 MAPK 家族中的一员,而 MAPK 家族通过 ERK 通路、JNK 通路及 P38 通路促进成骨细胞的分化^[15],其中, P38 通路在成骨细胞分化早期调节 ALP 的表达^[16]。综上结果我们提出假设, lncRNA ENST00000585537.1 可能通过调节 MAP2K6 表达来调控 hMSC 的早期成骨分化,但具体的调控机制尚需进一步研究验证。

本研究为探讨 lncRNA 参与 MSC 多能性维持与分化提供成骨方面的实验依据,而且发现 lncRNA ENST00000585537.1 在 hMSC 成骨分化的早期可能具有促进作用,为寻找促进 hMSC 成骨分化的更优途径与更快捷的手段提供了理论基础,同时为颌面部骨组织缺损修复提供新的临床依据。

参考文献

- [1] TULI R, TULI S, NANDI S, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone [J]. *Stem Cells*, 2003, 21 (6): 681-693.
- [2] 左长清,汪宗桂,钟月春,等.重组人 BMP-2 诱导 C3H10T1/2 间质干细胞定向成骨分化早期基因表达谱分析 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(9): 25-28.
ZUO CQ, WANG ZG, ZHONG YC. Recombinant human BMP -2 induced C3H10T1 / 2 mesenchymal stem cell directional osteogenic differentiation of early gene into expression spectrum analysis [J]. *China Herald Med*, 2014, 11(9): 25-28.
- [3] KINOSHITA Y, MAEDA H. Recent developments of functional scaffolds for craniomaxillofacial bone tissue engineering applications [J]. *Sci World J*, 2013, 2013: 863157.
- [4] KOMORI T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112 (3): 750-755.
- [5] ZUO C, WANG Z, LU H, et al. Expression profiling of lncRNAs in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells undergoing early osteoblast differentiation [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8 (2): 463-467.
- [6] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284 (5411): 143-147.
- [7] FAKHRY M, HAMADE E, BADRAN B, et al. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts [J]. *World J Stem Cells*, 2013, 5 (4): 136-148.
- [8] WANG X, WANG Y, GOU W, et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review [J]. *Int Orthop*, 2013, 37 (12): 2491-2498.
- [9] ZHUANG W, GE X, YANG S. upregulation of lncrna meg3 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients by targeting BMP4 transcription [J]. *Stem Cells*, 2015, 33 (6): 1985-1997.
- [10] MORAN VA, PERERA RJ, KHALIL AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40 (14): 6391-6400.
- [11] BERGMANN JH, LI J, ECKERSLEY-MASLIN MA, et al. Regulation of the ESC transcriptome by nuclear long noncoding RNAs [J]. *Genome Res*, 2015, 25 (9): 1336-1346.
- [12] PONTING CP, OLIVER PL, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2009, 136 (4): 629-641.
- [13] PAUL, H, REGINATO, AJ, SCHUMACHER, HR. Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid [J]. *Arthritis Rheum*, 1983, 26 (2): 191-200.
- [14] 余长威.长非编码 RNA Gtl2 在小鼠胚胎发育早期的表达调控及功能研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.
YU CW. Expression regulation and function research of long non coding Gtl2 RNA in mouse embryonic development [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014.
- [15] 曲爱娜,周慧芳. MAPK 信号转导途径及与在成骨细胞中作用的研究进展 [J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2013, 22(6): 567-570
QU AN, ZHOU HF. Research progress on signal transduction pathways of MAPK and its role in osteoblast [J]. *J Log Univ CAPF (Med Sci)*, 2013, 22 (6): 567-570.
- [16] YANG B, LIN X, YANG C. Sambucus williamsii hance promotes MC3T3 -E1 cells proliferation and differentiation via BMP -2/SMAD/P38/JNK/RUNX2 signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(11): 1692-1699.