

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.05.004

· 基础研究 ·

巨噬细胞介导的炎性微环境对牙周膜细胞增殖和成骨分化的影响

郑秀梅¹, 黄文霞²

1. 厦门医学院附属口腔医院种植科, 福建 厦门(361001); 2. 厦门医学院附属口腔医院牙周科, 福建 厦门(361001)

【摘要】 目的 研究巨噬细胞介导的炎性微环境对牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLCs)增殖和成骨分化的影响。方法 通过1 μg/mL脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)激活RAW264.7巨噬细胞得到含炎性因子的条件培养基模拟体内炎性微环境,原代分离培养PDLcs,分别在条件培养基(LPS-CM组),普通培养基(Ctrl组)下培养PDLcs,MTT法检测PDLcs的增殖情况;加入成骨诱导剂共培养3 d、7 d,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒检测ALP活性,Real-time PCR检测Runt相关基因2(runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、I型胶原(collagen I, COL-I)mRNA的表达,Western Blot检测RUNX2、OCN、COL-I蛋白表达水平;成骨诱导14 d茜素红染色观察钙化结节。分析比较2组PDLcs增殖和成骨分化的差异。结果 MTT法检测,LPS-CM组PDLcs的OD值低于Ctrl组($P < 0.05$);相同时间点LPS-CM组的RUNX2、OCN、COL-I基因的mRNA表达均低于Ctrl组($P < 0.05$),蛋白表达,除了OCN 3 d两组比较无统计学意义($t = 2.75, P = 0.056$)外,其余显示相应的RUNX2、OCN、COL-I的蛋白表达量LPS-CM组低于Ctrl组($P < 0.05$);ALP活性检测,LPS-CM组ALP活性高于Ctrl组,分别是3 d时1.58倍($t = 5.91, P = 0.030$);7 d时为1.29倍($t = 6.01, P = 0.046$);14 d钙化结节LPS-CM组少于Ctrl组,差异有统计学意义($t = 8.63, P = 0.048$)。结论 巨噬细胞介导的炎性微环境抑制PDLcs的增殖与成骨分化。

【关键词】 巨噬细胞; 脂多糖; 牙周膜细胞; 炎性微环境; 成骨分化; 碱性磷酸酶; 骨钙素; I型胶原蛋白

【中图分类号】 R781.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)05-0297-07

【引用著录格式】 郑秀梅,黄文霞.巨噬细胞介导的炎性微环境对牙周膜细胞增殖和成骨分化的影响[J].口腔疾病防治,2018,26(5):297-303.

Effects of inflammatory microenvironment mediated by macrophage on the proliferation and osteogenic differentiation of periodontal ligament cells ZHENG Xiumei¹, HUANG Wenxia². 1. Department of Implantology, Stomatologic Hospital of Xiamen Medical college, Xiamen 361001, China; 2. Department of Periodontology, Stomatologic Hospital of Xiamen Medical College, Xiamen 361001, China

Corresponding author: HUANG Wenxia, Email: 1043200243@qq.com, Tel: 0086-592-2678591

【Abstract】 Objective The present study investigated the effects of the inflammatory microenvironment mediated by macrophages on the proliferation and osteogenic differentiation of periodontal ligament cells (PDLcs). **Methods** Conditioned medium containing inflammatory factors was collected following macrophage activation with 1 μg/mL lipopolysaccharide (LPS). PDLcs were isolated from healthy teeth and cultured in conditioned medium (LPS-CM group) or normal medium (control group), and the proliferation of PDLcs was detected using the MTT assay. The cells were cocultured with an osteogenic inducer for 3 d and 7 d, and the alkaline phosphatase (ALP) activity of PDLcs was detected us-

【收稿日期】 2017-09-03; **【修回日期】** 2017-10-01

【基金项目】 厦门市医学院附属口腔医院院内课题项目基金

【作者简介】 郑秀梅,副主任医师,硕士, Email: zhengxiumei369@163.com

【通信作者】 黄文霞,主任医师,学士, Email: 1043200243@qq.com

ing an ALP kit. The mRNA expression levels of runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteocalcin (OCN), and collagen I (COL-I) were detected using real-time PCR, and the protein levels of RUNX2, OCN, and COL-I were detected using Western blotting. Mineralization nodules were observed using Alizarin red staining after osteoinduction for 14 d.

Results The OD value of PDLs in the LPS-CM group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). The mRNA levels of RUNX2, OCN, and COL-I in the LPS-CM group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). In addition to the OCN 3 d group ($t = 2.75$, $P = 0.056$), the protein expression of RUNX2, OCN, and COL-I in the LPS-CM group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). However, the ALP activity of the LPS-CM group was higher than that of the control group, which was 1.58-fold greater ($t = 5.91$, $P = 0.030$) at 3 d and 1.29-fold greater ($t = 6.01$, $P = 0.046$) at 7 d. The number of calcified nodules in the LPS-CM group was significantly less than that in the control group ($t = 8.63$, $P = 0.048$). **Conclusion** The inflammatory microenvironment mediated by macrophages may inhibit the proliferation and osteogenic differentiation of PDLs.

【Key words】 Macrophage; Lipopolysaccharide; Periodontal ligament cells; Inflammatory microenvironment; Osteogenic differentiation; Alkaline phosphatase; Osteocalcin; Collagen I

牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLs)是牙周膜的主体细胞,具有自我更新和多向分化的能力^[1],其数量和活性是牙周组织再生的关键。众所周知牙周炎发展过程中细菌介导的免疫应答是牙周组织破坏迅速和再生修复困难的主要原因,而单核/巨噬细胞在机体促炎和抗炎的免疫平衡中起了控制开关的作用^[2],其与牙周组织吸收破坏的关系早已引起人们的重视^[3],但与牙周组织再生的关系鲜有报道。本文用脂多糖激活巨噬细胞,收集含巨噬细胞细胞因子的上清液模拟体内炎性微环境,检测其对PDLs增殖和成骨分化的影响,从免疫方面为牙周病的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要实验试剂和仪器

巨噬细胞 RAW264.7 (ATCC, 美国); α -MEM、DMEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶(Gibco, 美国); 噻唑盐[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] (Sigma, 美国); 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Thermo Fisher Scientific, 美国); SYBR Premix Ex Taq TM 试剂盒(Takara, 日本); 蛋白定量试剂盒(Thermo Scientific, 美国); 碱性磷酸酶活性试剂盒(Abcam, 美国); *E. coli* 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) (Sigma, 美国); 倒置相差显微镜及照相系统(Olympus, 日本); CO₂ 细胞培养孵箱(Sanyo, 日本); 实时荧光定量PCR仪(QuantStudio 7 Flex, 美国)。

1.2 细胞培养基和矿化诱导剂

DMEM 培养巨噬细胞, α -MEM 培养PDLs。所

用培养基均加入 100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素和 10% FBS。PDLs 矿化诱导剂为 1.8 mM β -甘油磷酸钠、50 μ g/mL 维生素 C、10 nM 地塞米松。

1.3 收集脂多糖条件培养基(LPS conditioned medium, LPS-CM)

将小鼠来源巨噬细胞 RAW264.7 按照 2×10^5 个/mL 接种于 T175 培养瓶,待细胞贴壁后用 1 μ g/mL 的 LPS 刺激 4 h,弃去瓶内培养基和未贴壁的细胞, PBS 清洗两遍,换用 15 mL 无 FBS 的 DMEM 培养基孵育 12 h 后收取瓶内培养基,在离心机中以 5 000 rpm 离心 10 min 后收取上清液即为本实验所用 LPS-CM,分装于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.4 检测巨噬细胞细胞因子 mRNA 表达

收集 LPS-CM 后,取部分贴壁的巨噬细胞用 Trizol 细胞裂解液消化,氯仿分离,异丙醇沉淀,75%乙醇清洗提取 RNA,测定 RNA 浓度,分别逆转录为 cDNA,采用 SYBR Green 试剂盒进行 Real-time PCR 检测巨噬细胞细胞因子 mRNA 的相对表达量,目的基因白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、精氨酸酶 1(arginase-1, Arg-1) 等及管家基因 β -actin 在不同的反应管中进行扩增,反应体系均为 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 20 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。根据标准曲线由软件自动计算得出 Ct 值后计算每种细胞因子 mRNA 相对表达量。验证该方法的重复

性和扩增效率,本实验重复3次。

IL-1 β 引物序列:上游5'-TGGAGAGTGTGGATC CCAAG-3';下游5'-GGTGCTGATGTACCAGTTGG-3'。IL-6引物序列:上游5'-ACGCGGAAGGTCCGATATGGT-3';下游5'-TGCCTGACTTTTCGCATTAGC-3'。TNF- α 引物序列:上游5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGG-3';下游5'-GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGC-3'。Arg-1引物序列:上游5'-GGAATCTGCATGGGCAACCTGTGT-3';下游5'-AGGGTCTACGTCTCGAAGCCA-3'。IL-10引物序列:上游5'-CAACATACTGCTAACCGACTC-3';下游5'-AATGCTCCTTGATTTCTGG-3'。TGF- β 1引物序列:上游5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTCA-3';下游5'-CGCTGAATCGAAAGCCCTGTA-3'。 β -actin引物序列:上游5'-AGGATTCCTATGTGGGCGAC-3';下游5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'。

1.5 分离培养PDLCs

收集临床上13~18岁身体健康的正畸志愿者,原代分离培养牙周膜细胞,传至第三代为本实验所用。

1.6 MTT法检测PDLCs的增殖

收集PDLCs接种于96孔平底板,调整细胞密度至 1×10^4 个/孔,LPS-CM组为 α -MEM与LPS-CM按1:1调配的培养基(提示炎性微环境),Ctrl组为常规培养基,37℃、5% CO₂孵育。检测时每孔加入10 μ L MTT溶液(0.5 g/L),继续培养4 h后吸去孔内培养基,每孔加入100 μ L二甲基亚砜(DMSO),每组设5个复孔,置摇床上低速振荡10 min,酶联免疫测定仪检测波长490 nm的光密度(optical density, OD)值。连续检测6 d。

1.7 矿化诱导PDLCs及检测成骨分化指标

将PDLCs以 1×10^5 个/mL接种于6孔板,按上述分LPS-CM组和Ctrl组,加入矿化诱导剂。诱导培养3 d、7 d后取细胞按ALP assay试剂盒的使用说明检测ALP活性;取3 d、7 d细胞提取RNA,Real-time PCR检测Runt相关基因2(runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、I型胶原(collagen I, COL-I) mRNA的表达量,操作流程同上。

RUNX2引物序列:上游5'-TCCAACCCACGAATGCACTAC-3';下游5'-GTAGTGAGTGTGGCGGACT-3'。OCN引物序列:上游5'-ACGCGGAAGTCCGATATGGT-3';下游5'-TGCCTGACTTTTCGCATTAGC-3'。COL-I引物序列:上游5'-

GGACACAATGGATTGCAAGG-3';下游5'-TAACCACTGCTCCACTCTGG-3'。GAPDH引物序列:上游5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3';下游5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'。

取3 d、7 d细胞,Western Blot检测蛋白表达水平,用RIPA裂解细胞后提取细胞总蛋白,用蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,每个样本取50 μ g蛋白,经SDS-PAGE电泳后,将凝胶中的蛋白转至PVDF膜上后在blockingbuffer中封闭1 h。然后分别滴加RUNX2、OCN、Col-I、GAPDH一抗(稀释比均为1:1 000),4℃孵育过夜,TBST洗膜,滴加1:3 000稀释的辣根过氧化酶标记的二抗,37℃孵育2 h;再用TBST洗膜后,用ECL系统进行化学发光显色;最后用Image J软件对各条带的灰度值进行分析,并统计各蛋白的相对表达量。诱导培养14 d后用4%多聚甲醛固定细胞20 min,PBS清洗后,用2%茜素红染色15 min,倒置显微镜下拍照观察钙化结节量,后加入氯化十六烷基三甲基铵室温下30 min后吸取上清液,酶联免疫测定仪检测波长562 nm的OD值,检测2组钙化量差异。

1.8 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巨噬细胞形态观察

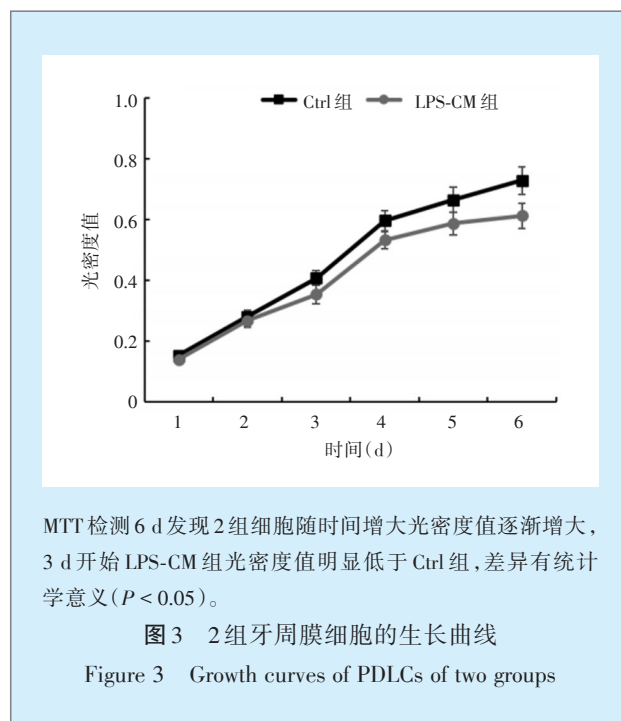
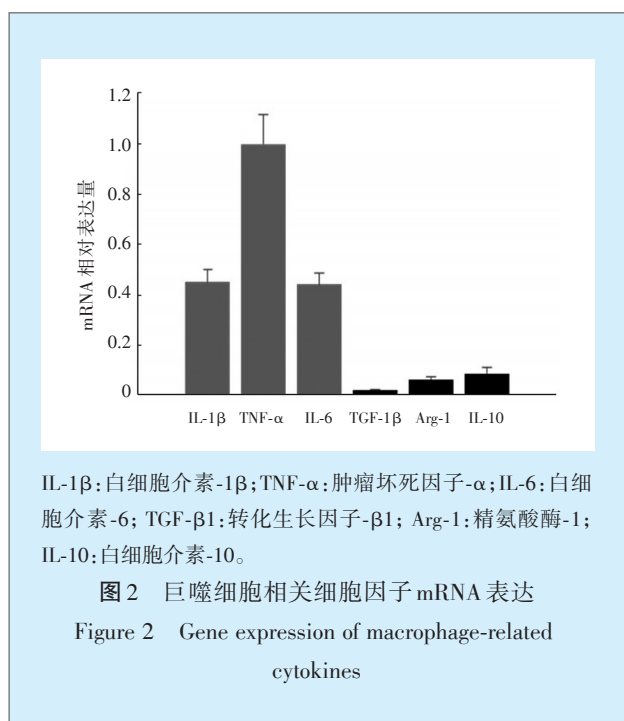
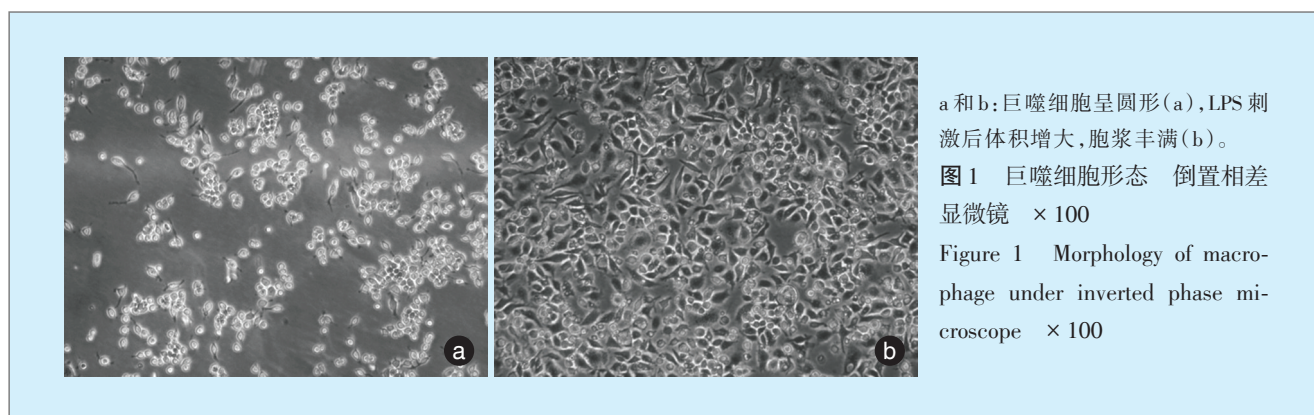
倒置相差显微镜下观察细胞,实验所用巨噬细胞呈圆形(图1a),LPS刺激后体积增大,胞浆丰富(图1b)。

2.2 LPS刺激后巨噬细胞相关细胞因子mRNA的表达

图2所示Real-time PCR结果显示经LPS刺激4 h后巨噬细胞表达大量的促炎性因子,如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6,而免疫调节和促组织修复的细胞因子如IL-10、TGF- β 1、Arg-1表达量少。

2.3 PDLCs增殖的检测

连续检测6 d发现2组细胞随时间增加OD值逐渐增大,总体趋势LPS-CM组低于Ctrl组,前2 d差异无统计学意义($P > 0.05$),3 d时Ctrl组 0.428 ± 0.024 高于LPS-CM组 0.354 ± 0.031 ($t = 4.88, P = 0.015$),差异有统计学意义,之后3 d(4 d、5 d、6 d)的数据统计结果 P 值分别为0.012、0.015、0.002(图3),差异均有统计学意义。



2.4 PDLCs 成骨分化检测

ALP 活性检测结果如图 4 所示, LPS-CM 组 ALP 活性高于 Ctrl 组, 分别是 3 d 时 1.58 倍 ($t = 5.91, P = 0.03$); 7 d 时为 1.29 倍 ($t = 6.01, P = 0.046$), 2 个时段比较差异有统计学意义。

Real-time PCR 检测结果如图 5 所示, 同一组 RUNX2、OCN、COL-I mRNA 的表达量均是 7 d 高于 3 d, 与 Ctrl 组相比, 相同时段 LPS-CM 组成骨相关蛋白 RUNX2、OCN、COL-I 的 mRNA 相对表达量均明显低于 Ctrl 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

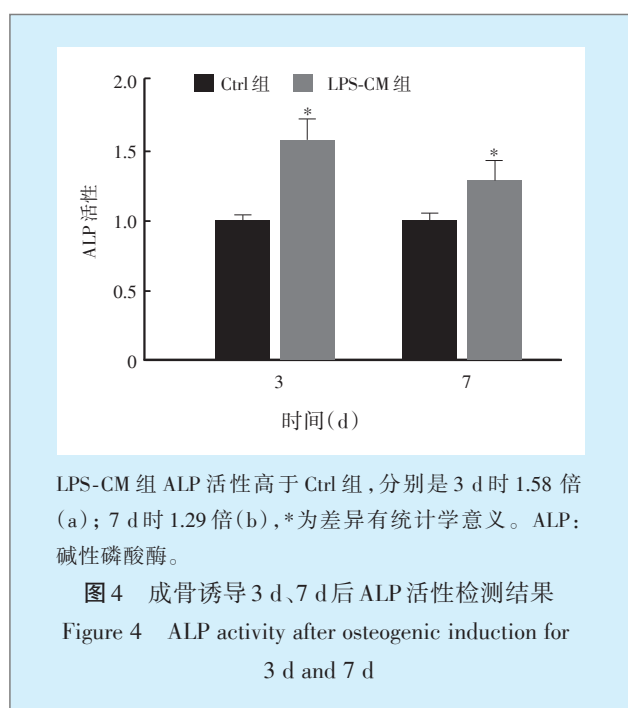
Western Blot 检测结果与相应的 mRNA 表达趋势基本一致, 除了 OCN 3 d 组时 ($t = 2.75, P = 0.056$) 外, 其余显示相应的 RUNX2、OCN、COL-I 的蛋白表达量 LPS-CM 组低于 Ctrl 组 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义 (图 6)。成骨诱导 14 d 茜素红染色及

钙盐半定量检测对比 Ctrl 组与 LPS-CM 组比较, 钙化结节 LPS-CM 组少于 Ctrl 组 ($t = 8.63, P = 0.048$), 差异有统计学意义 (图 7)。

3 讨论

3.1 体内炎性微环境的模拟

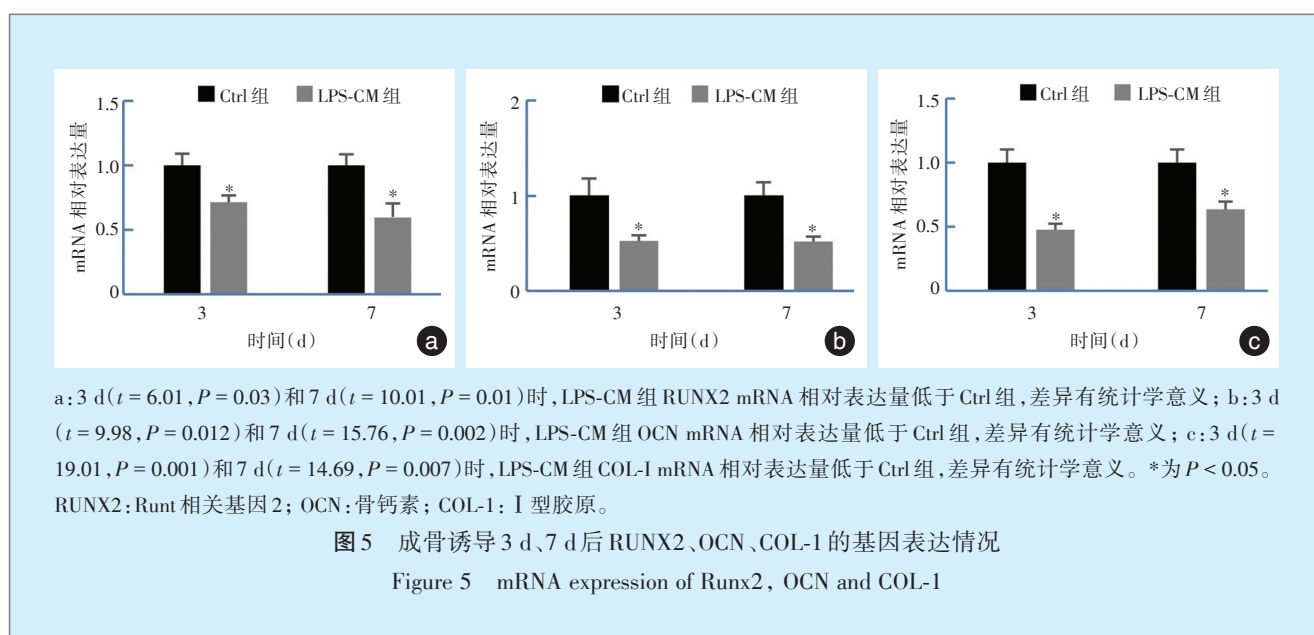
炎性微环境是一个涉及多种炎性因子 (如 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10)、生长因子、胞外基质、转录活化因子及多种细胞 (如单核/巨噬细胞、成纤维细胞) 共同作用的复杂的液体环境。单核/巨噬细胞作为免疫系统的重要成员调节体内的炎性微环境, Mosser 等^[4]按功能将活化的巨噬细胞分为两类, 一是 M1 型巨噬细胞, 分泌大量的炎性因子, 在致炎和促炎过程中引发组织的继发性损伤, 对炎症过程的扩大与恶化起了极其重要的作



用,主要有TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等;二是M2型巨噬细胞,分泌的细胞因子抑制炎症,可以产生胶原,促进创伤愈合和组织修复,主要有IL-10、TGF- β 1、Arg-1等。

健康人血液中单核/巨噬细胞约(17.1 \pm 3.2)%表达M2型细胞因子,几乎不表达M1型细胞因子。而肥胖、高血糖人群体内可能出现巨噬细胞活性改变^[5],表达较多的促炎性M1型细胞因子,可高达(92.3 \pm 1.7)%,M2型细胞因子的表达量低,约占(2.0 \pm 1.5)%。

课题组在预实验中发现LPS持续刺激巨噬细胞4 h、12 h后分泌大量的M1型促炎细胞因子,微量的免疫调节和促组织修复的M2型细胞因子,故用此模拟体内巨噬细胞介导的炎症微环境^[6],不同于加入定量的炎症因子,而是多炎症因子组合在一起共同作用。



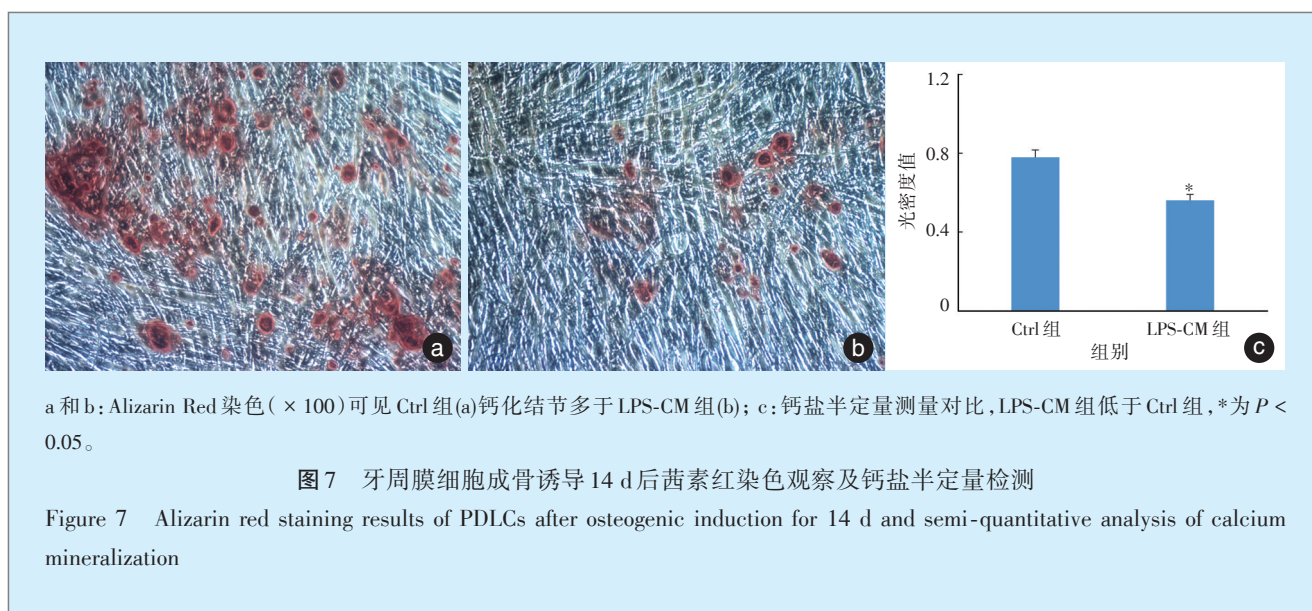
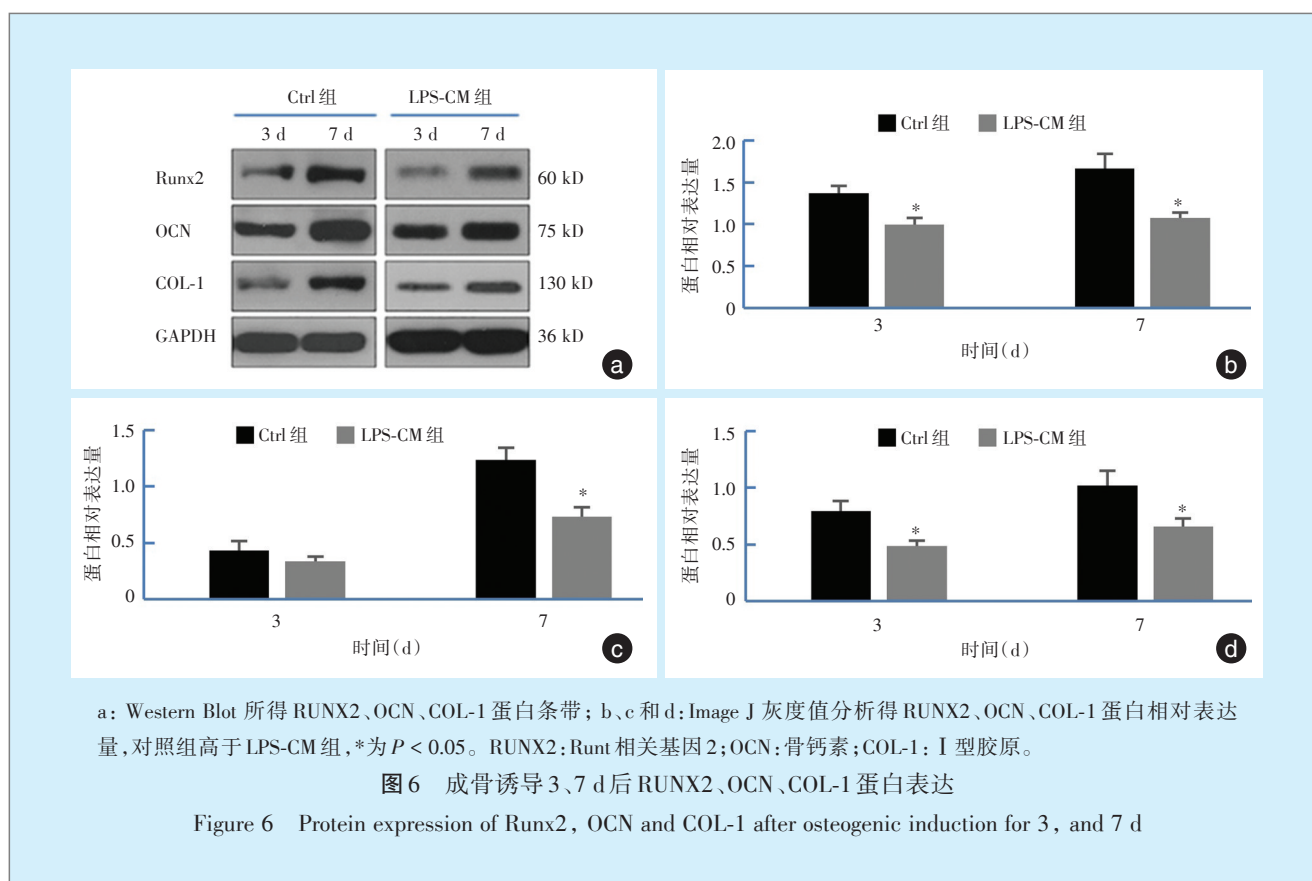
3.2 炎症微环境对细胞增殖的影响

细胞增殖是组织再生修复的要素,LPS-CM组中PDLCS受炎症因子影响,增殖率显著低于Ctrl组,Lacey等^[7]对滑膜细胞增殖的研究中发现,TNF- α 、IL-1 β 通过调节NF- κ B信号通路,介导细胞产生各种细胞因子、黏附因子和生长因子,影响细胞周期,抑制细胞的增殖。Pacios等^[8]研究伴放线杆菌引起的牙周炎症糖尿病动物模型中发现,炎症因子通过促进细胞的凋亡增加骨损伤,所以炎症组的OD值在3 d时与对照组差异显著可能是增殖

受抑制且伴有凋亡,具体机制需进一步研究。

3.3 炎症微环境对成骨分化的影响

体外培养的PDLCS在矿化诱导液的作用下,可分化成骨,产生钙化结节,并且表达多种成骨相关蛋白^[9],证实了牙周膜细胞成骨分化潜能。实验检测PDLCS成骨分化早期RUNX2、OCN、COL-1、ALP 4个标记骨组织形成的经典指标,尤其RUNX2在骨形成过程及成骨细胞分化中起着控制作用,是骨形成的关键基因^[10]。实验结果显示除了OCN蛋白3 d的相对表达量外,炎症组RUNX2、



OCN、COL-I mRNA 和蛋白的表达均显著低于对照组, 提示成骨受到抑制。传统的 LPS 直接作用于牙周膜干细胞模拟炎性微环境^[11], 然后检测细胞成骨分化各指标, 结论也是成骨分化受抑制^[12-13], 与本实验结果基本一致。OCN 蛋白 3 d 的相对表达量无差异主要可能因为 OCN 在成骨中的表达

位于 RUNX2 的下游, 而蛋白表达的变化又晚于 mRNA 表达的变化, 故 3 d 未能体现差异。ALP 为骨矿化提供磷酸盐, ALP 活性与骨组织矿化呈正相关, 本实验的 ALP 活性检测结果 LPS-CM 组高于 Ctrl 组, 提示炎性上调矿化能力, 而没有胶原 COL-I 分泌情况下并不能完成骨组织再生。Ding 等^[14]也发

现在引入TNF- α 、IL-1 β 后,间充质干细胞成骨分化的COL-I表达减少,但ALP活性显著增强,并以此解释关节炎可同时出现骨质疏松和骨质硬化。而茜素红染色及钙盐半定量分析最终得出LPS-CM组钙化结节少于Ctrl组,故成骨分化还是明显受到抑制。炎性微环境对骨再生的影响十分复杂,可通过自身促成骨细胞因子,如骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)减少抑制骨再生^[15],近年来也研究发现TNF- α 、IL-1 β 可磷酸化GSK3 β 激酶,从而抑制经典Wnt/ β -catenin通路的表达,进而抑制间充质干细胞的成骨分化^[16-17],当然对于抑制牙周膜细胞成骨分化的具体机制还需进一步研究。本实验在巨噬细胞介导的炎性微环境下成骨诱导PDLCS,结果显示了牙周组织再生修复是受到抑制的。

炎症是骨组织工程的起始因子,正常且适度的炎性反应是机体的一种防御反应,但长期慢性炎性反应则对机体不利,牙周的再生修复与免疫微环境紧密相关,高炎症性单核/巨噬细胞造成更大牙周组织损害的同时进一步抑制再生修复。因此,通过免疫手段改善炎性微环境能够为牙周炎的再生治疗提供新的治疗策略。

参考文献

- [1] 刘娟,赵红宇,轩东英. 人牙周膜细胞群多向分化潜能的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2010, 28(2): 185-189.
- [2] Chang ZL. Recent development of the mononuclear phagocyte system: in memory of Metchnikoff and Ehrlich on the 100th Anniversary of the 1908 Nobel Prize in Physiology or Medicine[J]. Biol Cell, 2009, 101(12): 709-721.
- [3] Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease[J]. Periodontol 2000, 2014, 64(1): 57-80.
- [4] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(12): 958-969.
- [5] Prieur X, Mok CY, Velagapudi VR, et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice[J]. Diabetes, 2011, 60(3): 797-809.
- [6] Han SW, Chen ZT. Activation of macrophages by lipopolysaccharide for assessing the immunomodulatory property of biomaterials [J]. Termis, 2015, 5(1): 19-28.
- [7] Lacey D, Sampey A, Mitchell R, et al. Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor [J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(1): 103-109.
- [8] Pacios S, Andriankaja O, Kang J, et al. Bacterial infection increases periodontal bone loss in diabetic rats through enhanced apoptosis[J]. Am J Pathol, 2013, 183(6): 1928-1935.
- [9] 李颖,张文元,杨亚冬,等. 人牙周膜细胞在矿化液作用下的增殖、成骨分化与相关基因表达[J]. 口腔医学研究, 2014, 1(1): 48-51, 56.
- [10] Luca D, Carbonare L, Innamorati G, et al. Transcription factor RUNX2 and its application to bone tissue engineering[J]. Stem Cell Rev, 2012, 8(3): 891-897.
- [11] 杨俊,陈兴兴,方煌,等. LPS对人牙周膜细胞Toll样受体4及下游炎症因子表达的影响[J]. 临床口腔医学杂志, 2014, 30(11): 689-691.
- [12] Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, et al. Porphyromonas gingivalis LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells[J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(2): 167-175.
- [13] 袁萍,李淑慧,赵璐,等. 炎症微环境下人牙周膜干细胞的生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(6): 898-905.
- [14] Ding J, Ghali O, Lencel P, et al. TNF- α and IL-1 β inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells [J]. Life Sci, 2009, 84(15/16): 499-504.
- [15] Huang RL, Yuan Y, Zou GM, et al. LPS-stimulated inflammatory environment inhibits BMP-2-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between TLR4/MyD88/NF- κ B and BMP/Smad signaling[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(3): 277-289.
- [16] Liu N, Shi ST, Deng MJ, et al. High levels of beta-Catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway[J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(9): 2082-2095.
- [17] Kong X, Liu Y. GSK3 β is a checkpoint for TNF- α mediated impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironments[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(11): 5119-5129.

(编辑 张琳, 曾曙光)