文章编号:1000-5404(2012)10-0907-05

论著

EphB6在小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化中的初步研究

李松涛[1],刘 涌[1],宋 磊[1],董世武[2],邸 宁[1],李殿威[1],徐 源[1],周 强[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院骨科,全军矫形外科中心[1],基础医学部人体解剖学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨EphB6在小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSC)成骨分化中的作用及其可能机制。**方法** 将BMSC通过双相接种法接种于脱钙骨基质,分为4组:成骨诱导5、14 d(A、B组),普通培养5、14 d(C、D组),茜素红染色检测钙结节,定量检测各组碱性磷酸酶活性,Runx2、Osterix和EphB6的mRNA表达,采用游离态配体ephrinB1-Fc激活EphB6并重复检测上述指标。**结果** ALP活性、Runx2和Osterix在A、B组增高,且B组检测到最高的ALP活性[(7.32±2.02)金氏单位/100 ml]、Runx2(3.442 6±0.258 5)倍和Osterix(2.482 3±0.329 2)倍。EphB6的表达水平在A、B组降低,且在B组最低(0.754 3±0.023 5)倍。以ephrinB1-Fc激活EphB6后,茜素红染色显示钙结节明显减少,ALP活性显著下降($P<0.05$),在高浓度配体作用后ALP活性[(12.20±1.30)金氏单位/100 ml]较低浓度配体[(15.40±1.03)金氏单位/100 ml]有进一步下降($P=0.008$)。配体作用后,BMSC成骨分化中Runx2和Osterix的表达显著下降。**结论** EphB6通过调控Runx2和Osterix抑制BMSC成骨分化。

[关键词] ephrin receptor;骨髓间充质干细胞;成骨分化;组织工程
[中图法分类号] R322.71;R329.26;R341 [文献标志码] A

Effect of EphB6 on osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Li Songtao[1], Liu Yong[1], Song Lei[1], Dong Shiwu[2], Di Ning[1], Li Dianwei[1], Xu Yuan[1], Zhou Qiang[1] ([1]Department of Orthopedics, Southwest Hospital, [2]Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of EphB6 on osteogenic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** The BMSCs seeded on decalcified bone matrix by biphasic seeding were divided into an osteogenic differentiation 5-day group (group A), an osteogenic differentiation 14-day group (group B), a non-induced 5-day group (group C) and a non-induced 14-day group (group D). Alizarin red staining was performed to detect calcium nodules. The activity of alkaline phosphatase (ALP) and mRNA expression of Runx2, Osterix and EphB6 were determined by ALP kit and quantitative real-time PCR, respectively. The indicators above were examined again after the BMSCs were treated with soluble ephrinB1-Fc to activate EphB6 in all the groups. **Results** ALP activity and mRNA expression of Runx2 and Osterix increased in group A and group B, and ALP activity (7.32±2.02 King's unit/100 ml) and mRNA expression of Runx2 (3.442 6±0.258 5) and Osterix (2.482 3±0.329 2) reached the peak levels in group B. EphB6 mRNA expression was downregulated in group A and group B, and reached the bottom level in group B (0.754 3±0.023 5). After the treatment of soluble ephrinB1-Fc for EphB6 activation, a significant reduction of calcium nodules was observed and ALP activity significantly decreased ($P<0.05$). High-dose ephrinB1-Fc showed stronger ALP activity decrease effects than low-dose ephrinB1-Fc (12.20±1.30 *vs* 15.40±1.03 King's unit/100 ml, $P=0.008$). Similarly, the mRNA expression of Runx2 and Osterix was downregulated under ephrinB1-Fc treatment in a dose-dependent manner. **Conclusion** EphB6 inhibits the osteogenic differentiation of BMSCs *via* mRNA expression regulation of Runx2 and Osterix.

[**Key words**] ephrin receptor, bone marrow-derived mesenchymal stem cell, osteogenic differentiation, tissue engineering

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02Z4E3) and the National Natural Science Foundation of China (81027005). Corresponding author: Zhou Qiang, Tel: 86-23-68765283, E-mail: zqtlh@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02Z4E3);国家自然科学基金(81027005)
[通信作者] 周 强,电话:(023)68765283, E-mail: zqtlh@yahoo.com.cn

Ephrin receptor(Eph)和配体 ephrin 都是细胞膜表面的膜结合型蛋白[1]。配体 ephrin 与受体 Eph 结合后,各自的胞内区同时发生磷酸化,启动双向信号传导[2]。对 ephrin-Eph 信号系统的研究主要集中在神经系统[3]、肿瘤发生[4]和内皮细胞[5]。近年研究发现这一信号系统在骨骼发育[6-7]、成骨分化[8-10]上也有重要作用。骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSC)在成骨分化中显著表达 ephrinA5/B1/B2 和 EphA2/B2/B4/B6[8]。目前已有研究证实 ephrinB2 和 EphB4[9]、ephrinB1[10]在成骨分化中的作用和机制,但对于 ephrin-Ehp 信号系统中的其他分子在 BMSC 成骨分化的作用尚不清楚,EphB6 就是其中之一,它一度被认为不能启动胞内信号传递[11-12]。然而,利用成纤维细胞和人胚肾细胞的研究表明,EphB6 在结合配体 ephrinB1 后发生了酪氨酸磷酸化并启动了胞内传递信号[13]。在 BMSC 成骨分化的过程中,EphB6 是否也参与了其调控,在其中发挥什么作用? 为此,本研究观察 BMSC 成骨分化中 EphB6 的表达变化,并初步观测 EphB6 与配体结合后对成骨分化的影响。

1 材料与方法

1.1 BMSC 的分离与培养

BMSC 取自 36 只 4 周的 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠(第三军医大学实验动物中心提供)。脱颈处死小鼠,在 75% 酒精中浸泡 5 min,取下股骨和胫骨。将股骨和胫骨从骨干中间剪断,用充满培养液(DMEM/F12 + 15% 胎牛血清)的 20 号注射器冲洗骨髓腔,收集冲洗下的细胞悬液,1 500 转/min 离心 5 min,弃上清,用培养液重悬细胞。以 3% 醋酸溶液破坏红细胞后,计数有核细胞,按有核细胞 $3\times10^5/cm^2$ 接种在 25 cm^2 培养瓶中,放入 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。待细胞生长达到 80% 融合,以 0.25% 胰酶消化后传代。细胞培养至第 3 代用于各实验。

1.2 制备组织工程骨

采用双相接种法将 BMSC 接种于牛脱钙骨基质[14]。支架材料为西南医院重庆组织工程中心提供的牛脱钙骨基质(decalcified bone matrix, DBM),制成 10 mm × 10 mm × 1 mm 大小,并在使用前以 PBS 和培养液分别浸泡 24 h。将第 3 代 BMSC 消化后以培养液制成 1.25×10^7/ml 的细胞悬液。取 0.8 ml 细胞悬液与 0.2 ml 鼠尾胶原(5 mg/ml,杭州生友生物科技)混匀,制成细胞-凝胶悬液,然后在每块 DBM 上滴加 200 μl,37 ℃、5% CO_2 孵箱中静置 10 min。待细胞-凝胶悬液凝固后,DBM 组织工程组织智能化仿生培育装置[15]中培养。

1.3 成骨诱导液的配制

以化学方法诱导组织工程骨中的 BMSC 成骨分化,即在含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中添加 10^{-7} mol/L 地塞米松、10 mmol/Lβ-磷酸甘油、50 μmol/L 维生素 C 配置成成骨诱导培养液。

1.4 实验分组

1.4.1 成骨诱导 BMSC 接种于 DBM 支架后设置成骨诱导 5、14 d 及无诱导培养 5、14 d 4 个实验组,分别为 A、B、C、D 组,各组 4 个标本。A、B 组以成骨诱导培养液培养,C、D 组以普通培养液培养。检测 4 组碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,并做 Real-time PCR。A、B 组同时做 PCR 和凝胶电泳。

1.4.2 配体 ephrin 结合 EphB6 的实验 A、B、C、D 组分别添加 1 μg/ml(低浓度)和 5 μg/ml(高浓度)的 ephrinB1-Fc、相同浓度的小鼠 IgG1,不添加试剂的各组作为空白对照。ephrinB1-Fc(Sigma 公司,美国)混入细胞-凝胶悬液,并在培养液中保持相同的配体浓度,每 3 天换液。另以相同浓度的小鼠 IgG1(Sigma 公司,美国)作用于各组作为 Fc 段的特异性对照[16],使用方法同 ephrinB1-Fc。各组做 Real-time PCR,B、D 组检测 ALP 活性。

1.5 Real-time PCR 检测

根据文献[8],BMSC 在成骨分化中显著表达 ephrinA5/B1/B2 和 EphA2/B2/B4/B6,故本研究检测此 7 个基因在上述各实验组中的表达变化,同时检测 Runx2 和 Osterix 作为成骨分化指标。以 0.1% 胰酶 + 0.1% Ⅰ型胶原酶在 37 ℃孵育组织工程骨 1 h,200 目滤网过滤后,1 500 r/min 离心 5 min,收集细胞。按照试剂盒(北京天根)说明书提取 RNA 并检验质量后制备 cDNA。加入各待检基因的引物(上海生工,表 1)和荧光标志物 SYBRGreen(TOYOBO),做 Real-time PCR 检测(PCR System 7 500, Applied Biosystems)。A、B 组做 PCR 和凝胶电泳,与第 3 代 BMSC 对照。

表 1 待检基因的引物序列

基因		引物序列	产物长度
β-actin	上游	5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′	159 bp
	下游	5′-GAAGGGGGGAGATGATGAC-3′	
ephrin-A5	上游	5′-TCGCCTCCACCACCAACAC-3′	215 bp
	下游	5′-GCGATGCCAAACCAGAGACA-3′	
ephrin-B1	上游	5′-CTGCCCCCTCCTCATCCCTTC-3′	184 bp
	下游	5′-CTCCCCCACTCCCCTGAACTACT-3′	
ephrin-B2	上游	5′-AGCCCCCCAAATTGATGTG-3′	286 bp
	下游	5′-GGCAGGGATGGGGTAGGAG-3′	
Eph-A2	上游	5′-CTCCGCGTTGGGGTCACTC-3′	193 bp
	下游	5′-CAGCAGGGGGACCGATGTAG-3′	
Eph-B2	上游	5′-TCGCCTGCCTCGGTTCTC-3′	196 bp
	下游	5′-CCCACCCAATCCCCTTTTC-3′	
Eph-B4	上游	5′-CCCGCTAGCCTCAAAATCGTG-3′	150 bp
	下游	5′-CGCTGCAAAACTTTCCTCGTATC-3′	
Eph-B6	上游	5′-TGCCCCCCTGGACTACATCTAC 3′	185 bp
	下游	5′-GCCCCCTTCAGCCTGGAGAGTA-3′	
Runx2	上游	5′-GGGGGGATAGATTGGGGTGG-3′	106 bp
	下游	5′-GGAACAGAGAGCGAGGGGGTATA-3′	
Osterix	上游	5′-CCCCTCGCTCTCTCCTATTGC-3′	184 bp
	下游	5′-CAGGGGCAGAGAAGAAAAAGTTG-3′	

表 2　各基因的 Real-time PCR 检测结果

组别	Runx2	Osterix	ephrinA6	ephrinB1	ephrinB2	EphA2	EphB2	EphB4	EphB6
A 组	2.850 1	1.536 8	0.763 1	1.259 9	0.621 1	0.818 7	0.990 8	0.957 0	0.804 9
B 组	3.233 2	2.663 6	0.841 7	1.234 0	0.891 3	1.045 0	1.038 4	1.023 6	0.727 0
C 组	1.025 0	1.265 3	1.149 2	1.062 0	1.138 7	0.992 4	1.054 7	0.975 9	1.079 2
D 组	1.584 8	1.155 6	1.086 4	1.007 4	1.035 7	1.249 7	1.100 4	0.982 3	1.007 0

1.6　碱性磷酸酶活性检测

ALP 活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。标本剪碎后以超声破碎细胞,2 000 r/min 离心 15 min 收集上清。在 96 孔板中加入 50 μl 上清液,按试剂盒说明依次加入各试剂,读取 520 nm 处吸光度并计算 ALP 活性。

1.7　茜素红染色

茜素红染色试剂盒购自南京建成生物工程研究所。按试剂盒说明完成染色后,于显微镜下观察。

1.8　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 18.0 统计软件,多组数据间比较行单因素方差分析。

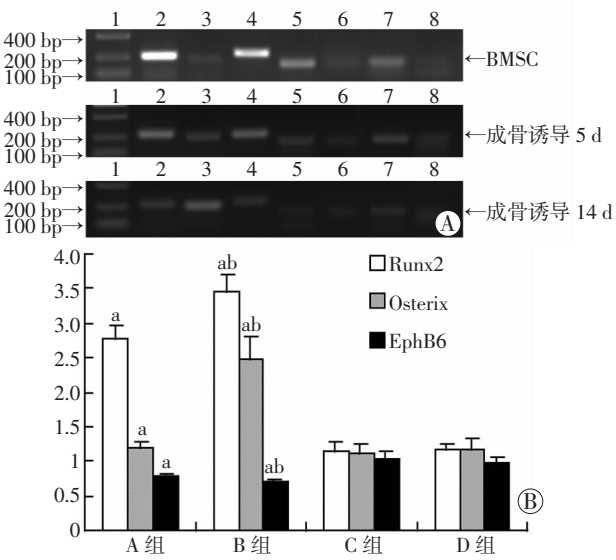
2　结果

2.1　成骨分化中 ALP 活性变化和 EphB6 的表达

根据 Real-time PCR 的结果(表 2),Runx2 在 B 组表达最多,其次是 A 组,C、D 组表达最低。Osterix 的表达趋势与 Runx2 一致。EphrinB1 在各实验组中表达上调,ephrinA5/B2 和 EphA2/B6 则表现为不同程度的下调,EphB2/B4 没有明显的变化。与凝胶电泳中表现的变化一致(图 1A)。为进一步明确成骨分化中 EphB6 的表达,按照相同分组($n=4$)进一步检测 ALP 活性(图 1B),EphB6、Runx2 和 Osterix 的 mRNA 表达(图 1C)。A 组和 B 组的 ALP 活性均较 C 组(3.81 ±0.77)金氏单位/100 ml、D 组(2.97 ±0.96)金氏单位/100 ml 升高($P<0.01$),且 B 组(22.65 ±1.97)金氏单位/100 ml 较 A 组(7.32 ±2.02)金氏单位/100 ml 的 ALP 活性更高($P<0.01$)。C 组和 D 组比较,Runx2($P=0.697$)、Osterix($P=0.732$)、EphB6($P=0.263$)的表达没有差异,均为接近空白对照的水平。除 A 组的 Osterix(1.187 5 ±0.082 8)倍与 C 组[(1.119 6 ±0.132 1)倍,$P=0.636$]和 D 组[(1.168 5 ±0.152 7)倍,$P=0.894$]没有显著差异外,A、B 组的各项检测数据与 C、D 组均有显著差异($P<0.01$)。B 组的 Runx2 和 Osterix 较 A 组上调(均为 $P<0.01$),而 EphB6 的表达较 A 组减少($P=0.013$)。

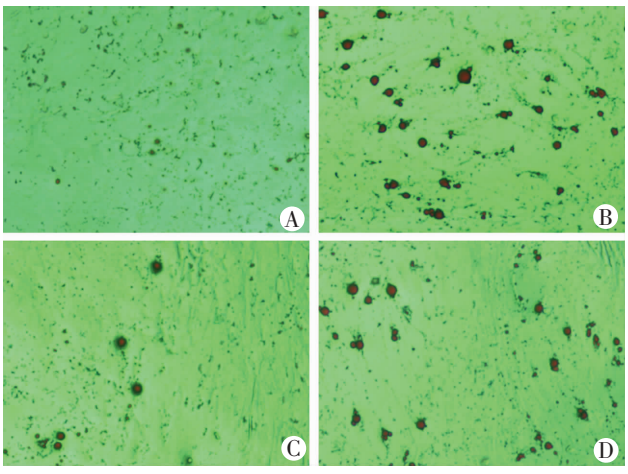
2.2　ephrinB1-Fc 作用后 EphB6 和成骨分化指标的表达变化

茜素红染色显示,未诱导的 BMSC 没有钙结节生成(图 2A),B 组在成骨诱导 14 d 后有大量钙结节生成(图 2B),5 μg/ml 的 ephrinB1-Fc 作用后钙结节明显减少(图 2C),而 5 μg/ml 小鼠 IgG1 作用后钙结节的量(图 2D)与 B 组成骨诱导 14 d 后没有明显变化。考虑到 ALP 在成骨分化后期才有明显变化,在 ephrinB1 结合 EphB6 的实验中仅检测 B 组和 D 组(图 3)。各组特异性对照和空白对照组的 ALP 活性没有显著差异($P>0.05$)。ephrinB1-Fc 作用后,与特异性和空白对照比较,ALP 活性显著下降($P<0.05$)。ALP 活性在高浓度配体作用后[(12.20 ± 1.30)金氏单位/100 ml]较低浓度配体作用后[(15.40 ± 1.03)金氏单位/100 ml]有进一步下降。



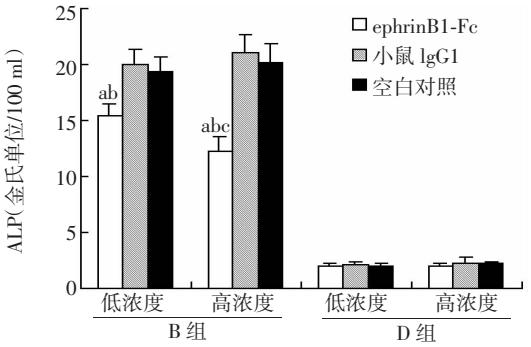
A:PCR 后凝胶电泳结果;1: 标准; 2: ephrinA5; 3: ephrinB1; 4: ephrinB2; 5: EphA2; 6: EphB4; 7: EphB6; 8: EphB2; B:半定量分析结果;a:$P<0.05$,与 C、D 组比较;b:$P<0.05$,与 A 组比较

图 1　BMSC 成骨分化中 EphB6、Runx2 和 Osterix 表达水平的变化



A:未诱导的 BMSC;B:B 组,成骨诱导 14 d;C:5 μg/ml ephrinB1-Fc 作用;D:5 μg/ml 小鼠 IgG1 作用

图 2　BMSC 经不同实验条件培养后茜素红染色观察　(×40)



a:$P<0.05$,与小鼠 IgG1 比较; b:$P<0.05$,与 D 组比较; c:$P<0.05$,与 B 组低浓度比较

图 3 ephrinB1-Fc 作用后 ALP 活性检测

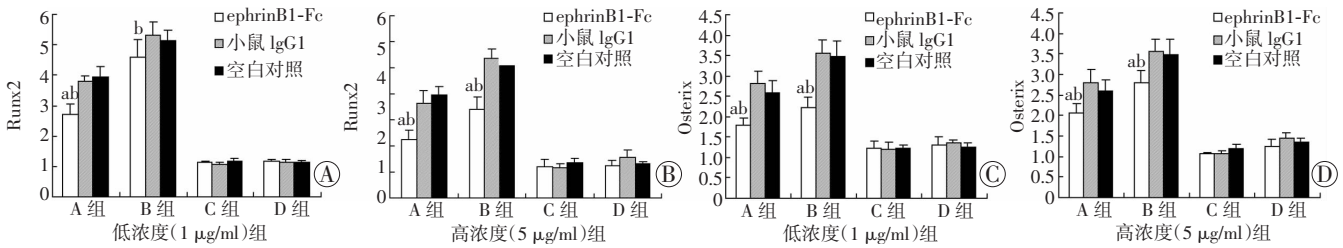
B 组接受低浓度 ephrinB1-Fc 作用后 Runx2[(4.581 6 ± 0.584 8)倍]较特异性对照[(5.300 2 ± 0.461 2)倍]下调,但没有显著差异($P=0.102$)。在各个浓度处理后的 A 组和高浓度处理后的 B 组 Runx2 均较特异性对照和空白对照显著下调($P<0.05$,图 4A、B)。高浓度 ephrinB1-Fc 作用后,B 组的 Runx2(3.411 1 ± 0.477 2)倍较低浓度时进一步下调($P=0.021$)。C 组和 D 组的 Runx2 在各个处理因素下没有显著的变化,各个处理因素间没有显著差异($P>0.05$)。Osterix 的表达情况与 Runx2 相似(图 4C、D)。

3 讨论

近年研究发现 ephrinB 和 EphB 参与控制骨的发育、成骨分化。利用 PTH/PTHrP 促小鼠 BMSC 成骨分化,发现 ephrinB2 有显著增加。阻断 ephrinB2 与其受体 EphB4 的交互作用可以抑制细胞的钙沉积作用[8]。Zhao 等[9]采用成骨细胞-破骨细胞共培养系统,发现用 ephrinB2 激活 EphB4 可促进成骨细胞分化和成骨表达。临床研究证实,ephrinB1 的变异会导致颅骨和面部发育畸形(craniofrontonasal 综合征)[17]。但目前的研究仅涉及了 ephrin-Ehp 家族中的 ephrinB1、ephrinB2、EphB4 等少数几个分子,还不清楚该家族中的其他分子对 BMSC 成骨分化是否有影响。了解 ephrin-Eph 在骨骼生理活动尤其是 BMSC 成骨分化中的作用,有助于成骨分化、骨骼发育、骨代谢研究。

Runx2[18]和 Osterix[19]是成骨分化中重要的转录因子,其表达表示 BMSC 进入了成骨分化阶段[20]。ALP 是 BMSC 成骨分化后期的重要标志物。本研究中,我们初步检测了对 BMSC 成骨分化中表达出现变化的 ephrin-Eph 分子,发现 EphB6 的表达水平有与 Runx2 和 Osterix 呈负相关的趋势。在后继实验中进一步证实,按照"无诱导培养"、"成骨诱导 5d"、"成骨诱导 14d"的顺序,ALP 活性逐渐增高,Runx2 和 Osterix 表达逐渐上调,而 EphB6 的 mRNA 表达量逐渐下调,提示随成骨分化进展,EphB6 的表达水平降低(问题 17:已发表? 请标引文献)。为进一步了解 EphB6 和成骨分化之间是否有确切联系,我们使用 ephrinB1 与 EphB6 结合,同时观测 ALP 活性、钙结节和成骨分化相关基因是否受到影响。天然状态下,ephrinB1 锚定在细胞膜表面,没有游离态,因此需要与抗体 IgG 的 Fc 段结合形成游离态的嵌合体。实验结果表明,ephrinB1-Fc 使 ALP 活性降低,Runx2 和 Osterix 下调,且高浓度时这一抑制作用更加显著。同时,小鼠 IgG1 的特异性对照实验表明 ephrinB1-Fc 嵌合体激活 EphB6 的作用来自于 ephrinB1 与 EphB6 的特异性结合,而不是 Fc 段的作用。茜素红染色也表明,ephrinB1-Fc 作用后,钙结节较单纯成骨诱导减少,而小鼠 IgG1 不会抑制钙结节生成。主动上调 EphB6 的同时 ALP 活性、钙沉积和成骨分化相关基因即受到抑制,进一步说明了 EphB6 可能参与到成骨分化的调控中。

理论上说,事物发展过程中正性促进因素和负性抑制因素应该同时存在。既往研究多关注成骨分化的正性调控因子,如骨形态发生蛋白[21]、成纤维细胞生长因子[22]。本研究初步说明了 EphB6 表达与 BMSC 成骨分化呈负相关,有助于进一步理解 BMSC 成骨分化



A 组:成骨诱导 5 d;B 组:成骨诱导 14 d;C 组:无诱导培养 5 d;D 组:无诱导培养 14 d;a:$P<0.05$,与小鼠 IgG1 比较;b:$P<0.05$,与 D 组比较

图 4 ephrinB1-Fc 作用后 Runx2(A,B)、Osterix(C,D)的表达

的信号转导和调控机制,并为骨骼发育、骨代谢、成骨分化的研究提供了一个新的线索。

EphB6 和其他 EphB 亚家族成员一样,有高度保守的胞浆区序列。但在 EphB6 的磷酸酶结构域上有几个关键位点发生了变异,包括 ATP 结合位点上的一个关键赖氨酸残基的改变,这使得 EphB6 并不表现出明显的磷酸化激酶活性[11-12]。Freywald 等[13]的研究表明,在成纤维细胞和人胚肾细胞中,EphB6 结合 ephrinB1 后与 EphB1 形成异分子二聚体,由 EphB1 通过转磷酸作用(transphosphorylation)来使 EphB6 发挥作用。本研究虽未检测 EphB6 在结合配体 ephrinB1 后的磷酸化水平,但观察到了成骨活性降低,并且在高浓度 ephrinB1 作用时,成骨活性降低更显著。EphB6 在 BMSC 上同样有可能通过类似的途径发生磷酸化,这需要在今后的研究中明确。

参考文献:

[1] Himanen J P, Nikolov D B. Eph receptors and ephrins[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(2): 130-134.

[2] Edwards C M, Mundy G R. Eph receptors and ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis[J]. Int J Med Sci, 2008, 5(5): 263-272.

[3] Egea J, Klein R. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance[J]. Trends Cell Biol, 2007, 17(5): 230-238.

[4] Noren N K, Yang N Y, Silldorff M, *et al*. Ephrin-independent regulation of cell substrate adhesion by the EphB4 receptor[J]. Biochem J, 2009, 422(3): 433-442.

[5] Obi S, Yamamoto K, Shimizu N, *et al*. Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells[J]. J Appl Physiol, 2009, 106(1): 203-211.

[6] Davy A, Aubin J, Soriano P. Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development[J]. Genes Dev, 2004, 18(5): 572-583.

[7] Ting M C, Wu N L, Roybal P G, *et al*. EphA4 as an effector of Twist1 in the guidance of osteogenic precursor cells during calvarial bone growth and in craniosynostosis[J]. Development, 2009, 136(5): 855-864.

[8] Allan E H, Hausler K D, Wei T, *et al*. EphrinB2 regulation by PTH and PTHrP revealed by molecular profiling in differentiating osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(8): 1170-1181.

[9] Zhao C, Irie N, Takada Y, *et al*. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis[J]. Cell Metab, 2006, 4(2): 111-121.

[10] Xing W, Kim J, Wergedal J, *et al*. Ephrin B1 regulates bone marrow stromal cell differentiation and bone formation by influencing TAZ transactivation via complex formation with NHERF1[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(3): 711-721.

[11] Gurniak C B, Berg L J. A new member of the Eph family of receptors that lacks protein tyrosine kinase activity[J]. Oncogene, 1996, 13(4): 777-786.

[12] Matsuoka H, Iwata N, Ito M, *et al*. Expression of a kinase-defective Eph-like receptor in the normal human brain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 235(3): 487-492.

[13] Freywald A, Sharfe N, Roifman C M. The kinase-null EphB6 receptor undergoes transphosphorylation in a complex with EphB1[J]. J Biol Chem, 2002, 277(6): 3823-3828.

[14] 吕仁发, 周强, 许建中, 等. 双相接种法体外构建组织工程骨[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(16): 1656-1659.

[15] 周强, 刘涌, 吕仁发, 等. 组织工程组织的智能化仿生培育装置: 中国, 200910103183[P]. 2009-07-22.

[16] Freywald A, Sharfe N, Rashotte C, *et al*. The EphB6 receptor inhibits JNK activation in T lymphocytes and modulates T cell receptor-mediated responses[J]. J Biol Chem, 2003, 278(12): 10150-10156.

[17] Twigg S R, Kan R, Babbs C, *et al*. Mutations of ephrin-B1 (EFNB1), a marker of tissue boundary formation, cause craniofrontonasal syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(23): 8652-8657.

[18] Lian J B, Javed A, Zaidi S K, *et al*. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2004, 14(1/2): 1-41.

[19] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, *et al*. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. Cell, 2002, 108(1): 17-29.

[20] Lee J S, Lee J M, Im G I. Electroporation-mediated transfer of Runx2 and Osterix genes to enhance osteogenesis of adipose stem cells[J]. Biomaterials, 2011, 32(3): 760-768.

[21] Kang Q, Sun M H, 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.

[22] Xiao L, Sobue T, Esliger A, *et al*. Disruption of the Fgf2 gene activates the adipogenic and suppresses the osteogenic program in mesenchymal marrow stromal stem cells[J]. Bone, 2010, 47(2): 360-370.

(**收稿**:2012-02-12;**修回**:2012-02-29)

(编辑 龙 亮)