DOI:10.16016/j.1000-5404.201504139

DLL1 在骨形态形成蛋白 9 诱导骨髓间充质干细胞成骨分化中的作用

廉 静[1],杨伦韵[1],曹俊杰[1],罗进勇[1],何百成[2],唐 敏[1] (400016 重庆,重庆医科大学:检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室[1],生物化学与药理学重点实验室[2])

[**摘要**] **目的** 探讨 Notch 配体 Delta-like1(DLL1)在骨形态形成蛋白 9(bone morphogenetic proteins 9, BMP9)诱导的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)成骨分化中的作用及机制。**方法** 利用 DLL1 重组腺病毒上调永生化小鼠胚胎成纤维细胞(immortalized mouse embryonic fibroblasts, iMEF)中 DLL1 mRNA 的表达,分别采用细胞化学染色、活性测定对早期成骨指标碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)和晚期成骨指标钙盐沉积的影响;其次裸鼠皮下异位成骨实验进一步了解 DLL1 的体内成骨作用;最后用 qRT-PCR、Western blot 和荧光素酶检测 DLL1 对 BMP9 经典信号通路中Ⅰ型受体、Smad1/5/8 磷酸化和 Smad 结合元件(smad-binding element,SBE)转录活性影响。**结果** 与对照组相比,DLL1 在体外能明显促进 BMP9 诱导的 MSCs 早期成骨指标 ALP 活性和晚期成骨指标钙盐沉积的生成;同时也能明显促进 BMP9 诱导的 MSCs 裸鼠皮下异位成骨作用;BMP9 信号通路中 ALK2 表达明显增加,而对 ALK1 则没有影响;Smad1/5/8 蛋白量没有明显变化,而 p-Smad1/5/8 蛋白及 SBE 活性明显增加($P<0.05$)。**结论** DLL1 可以促进 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化,可能通过影响 BMP9 信号通路来实现其促成骨作用。

[**关键词**] 间充质干细胞;Delta-like1;骨形态发生蛋白 9;Notch 信号通路
[**中图法分类号**] R322.71; R329.21; R329.28 [**文献标志码**] A

Delta-like 1 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by BMP9

Lian Jing[1], Yang Lunyun[1], Cao Junjie[1], Luo Jinyong[1], He Baicheng[2], Tang Min[1] ([1]Key Laboratory of Medical Diagnostics of Ministry of Education, [2]Key Laboratory of Biochemistry and Pharmacy, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objectives** To determine the role of Notch ligand, Delta-like 1 (DLL1) in bone morphogenetic proteins 9 (BMP9)-mediated osteogenesis in mesenchymal stem cells (MSCs) and investigate its possible mechanisms. **Methods** Recombinant adenoviruses were used to over-express DLL1 in immortalized mouse embryonic fibroblasts (iMEF). Cytochemical staining was used to evaluate the early-stage osteogenetic index, alkaline phosphatase (ALP) and the late-stage osteoblastic indicator, calcium deposits. Ectopic bone formation assay was conducted in nude mice, then HE staining and micro-CT scanning were employed to analyze osteogenetic status so as to determine the role of DLL1 in the process. qRT-PCR, Western blotting and luciferase reporter assay were conducted to detect the expression levels of BMP receptors, p-Smad1/5/8, and activity of Smad-binding element (SBE). **Results** Compared with control group, DLL1 *in vitro* treatment obviously enhanced the osteogenic indicators ALP and calcium deposits, and *in vivo* promoted ectopic bone formation in nude mice. ALK2 in BMP signal pathway was significantly elevated, but no change was seen in the level of ALK1. There were also no obvious changes in the total protein levels of Smad1/5/8,

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10004);重庆市教委科学技术研究项目(KJ130305)
[**通信作者**] 唐 敏,电话:(023)68485223,E-mail:catom@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151124.0853.017.html(2015-11-24)

but those of phosphorylated Smad1/5/8 were increased. SBE activity was also enhanced ($P < 0.05$). **Conclusion** DLL1 enhances BMP-induced osteogenesis in MSCs both *in vitro* and *in vivo*, and it might exert the effect through BMP-Smad pathway.

[**Key words**] mesenchymal stem cells; Delta-like 1; bone morphogenetic proteins 9; Notch signaling pathway

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10004) and the Project of Science and Technology Research of Chongqing Municipal Commission of Education (KJ130305). Corresponding author: Tang Min, Tel: 86-23-68485223, E-mail: catom@126.com

间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)是分布在骨髓、血液、脂肪、肌肉和真皮中的成体干细胞,近年来,因其具有高度自我更新能力[1]、多向分化潜能和取材方便等优点而成为骨折等骨科疾病细胞治疗和组织工程的理想种子细胞[2]。MSCs 自我更新和定向分化的能力受到多种生长因子和信号通路情况的影响,而探究这些信号通路的作用机制对于 MSCs 在组织工程和再生医学中的应用将起到重要作用。骨形态形成蛋白(bone morphogenetic proteins,BMPs)是转化生长因子β(transforming growth factor β,TGFβ)超家族的成员之一,具有多种生物学功能。骨形态形成蛋白9(BMP9)在体外可以诱导 MSCs 向成骨分化,是目前已经分离并鉴定的20余种 BMPs 中诱导 MSCs 成骨分化能力最强的因子[3-4],具有潜在临床应用前景,但其诱导 MSCs 成骨分化的相关分子机制仍不清楚。

研究证实 Notch 信号在骨重建过程中发挥重要作用[5]。课题组前期研究结果显示,Notch 信号通路抑制剂 DAPT 能抑制 BMP9 诱导的 MSCs 早晚期成骨分化;细胞接触激活 Notch 时,Notch 信号通路5个配体[Delta-like1(DLL 1)、DLL 3、DLL 4、Jagged 1 和 Jagged 2]中,DLL1 表达显著升高[6]。研究报道 DLL1-Notch 信号通路的异常与多种疾病均存在着密切的关系[7-8],而 DLL1 在 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化过程中作用及机制研究甚少。因此,本研究拟采用重组腺病毒上调 DLL1,探讨 DLL1 在 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株及腺病毒 永生化小鼠胚胎成纤维细胞(immortalized mouse embryonic fibroblasts,iMEF),骨髓间充质干细胞 C3H10、C2C12,过表达 DLL1 腺病毒(AdDLL1),过表达红色荧光蛋白腺病毒(AdRFP),过表达 BMP9 腺病毒(AdBMP9),过表达绿色荧光蛋白腺病毒载体(AdGFP)均由芝加哥大学何通川惠赠,并由本实验室保存;人结肠癌细胞株 HCT116 由重庆医科大学分子实验室保存。

1.1.2 主要试剂 DMEM 高糖培养基(HyClone 公司),胎牛血清(Gibco 公司),小牛血清(HyClone 公司),磷酸盐粉(中杉金桥公司),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)染色试剂(Sigma 公司),维生素 C(美国 Sigma),β-磷酸甘油(美国 Sigma),茜素红 S(美国 Sigma),RT-PCR(TaKaRa 公司),Real-time PCR 试剂盒(TaKaRa 公司),引物(Invitrogen 公司),Western 及 IP 细胞裂解液(碧云天公司),牛血清粉 BSA(Sigma 公司),p-Smad1/5/8 抗体(CST 公司),Smad1/5/8 抗体和 β-actin 单抗隆抗体(Santa Cruz 公司),羊抗鼠、羊抗兔抗体(中杉金桥公司),Smad 结合元件(Smad-binding element,SBE)荧光素酶质粒由重庆医科大学分子实验室保存,荧光素酶检测试剂(Promega 公司)。实验动物选用6~8周龄的健康雄性免疫缺陷 BALB/c 裸鼠,体质量20~30 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,喂养于严格消毒的无菌层流动物房内,环境温度维持在25 ℃,空气湿度为50%,饲料和水经消毒后自由进食。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 iMEF、C3H10 和 C2C12 细胞用含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素(P/S)的 DMEM 培养基培养,HCT116 细胞用含10%小牛血清、1%青霉素/链霉素(P/S)的 DMEM 培养基培养,置于37 ℃、5% CO_2 培养箱中,待细胞贴壁融合至50%左右时,用0.25%胰蛋白酶消化进行传代培养。

1.2.2 条件培养基制备 将 HCT116 细胞培养在培养皿中,待细胞生长融合至50%左右后,加入 Ad-BMP9 或 AdGFP,感染率控制在50%左右,5 h 后用无血清、无抗生素的 DMEM 培养基换液,分别于换液后24 h 和48 h 后各收集条件培养基1次,1 000 r/min 低温离心5 min 后放置于4 ℃备用。

1.2.3 Real-time PCR 细胞处理3 d 后,TRIzol 提取总 RNA,逆转录为 cDNA,以 GAPDH 作为内参,按照 Real-time PCR 相关试剂盒操作说明,检测相关基因。引物由 Invitrogen 公司合成,引物信息见表1。反应体系为10 μL,反应程序:预变性94 ℃ 2 min;92 ℃ 20 s;68 ℃ 30 s;72 ℃ 20 s,延伸末尾采集荧光,40个循环;于65~99 ℃熔解曲线荧光采集。数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析。

表 1　引物序列及其产物长度

引物	引物序列	产物长度(bp)
DLL1	上游 5′-CCGGCTGAAGCTACAGAAAC-3′ 下游 5′-AGCCCCAATGATGCTAACAG-3′	121
ALK1	上游 5′-ACCTGGGACTGGCTGTGA-3′ 下游 5′-GCAGTCTGTGCGGATGTG-3′	125
ALK2	上游 5′-GTGGCTCCGGTCTTCCTT-3′ 下游 5′-AGCGACATTTTCGCCTTG-3′	125
GAPDH	上游 5′-GGCTGCCCAGAACATCAT-3′ 下游 5′-ATGATGTTCTGGGCAGCC-3′	180

1.2.4　ALP 染色　　将 iMEF 接种于 24 孔板中,待细胞生长融合至 30% 左右,加入 AdRFP 或 AdDLL1 6 h 后换液,待荧光出现后(约 36 h),加入适当量的 BMP9 条件培养基,继续诱导培养 7 d 后进行 ALP 染色。ALP 染色方法:弃去培养基,用去离子水清洗细胞 3 次,再用 4% 甲醛固定细胞 1 min,用去离子水漂洗 1 次,每孔加入 250 μL ALP 染色液,避光放置 20 min 后,显微镜下观察并成像保存。

1.2.5　钙盐沉积实验　　将 iMEF 细胞接种至 24 孔板中,待细胞生长融合至 30% 左右,加入 AdRFP 或 AdDLL1 6 h 后换液,待荧光出现后(约 36 h),加入适当量的 BMP9 条件培养基和钙盐培养基(含维生素 C 及 β-磷酸甘油),继续培养 14 d 后进行茜素红 S 染色。茜素红 S 染色方法:弃去培养基,用 PBS 连续洗涤 3 次(动作要轻),每孔加入 0.05% 戊二醛固定细胞 10 min 后,弃去戊二醛并用去离子水洗涤 3 次,继而用 0.04% 茜素红 S 染色约 30 min,待有红色堆积物时,弃去染液并用去离子水终止反应,并清洗 1 遍,显微镜观察并成像保存。

1.2.6　动物实验和组织化学染色　　将 iMEF 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素(P/S)的 DMEM 培养基培养,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中,待细胞贴壁融 30% 左右时,加入 AdDLL1 或 AdBMP9,感染率在 50% 左右,8 h 后换液,用 0.25% 胰蛋白酶消化,低温离心机 1 000 r/min 离心 3 min,去上清,用 100 μL PBS 重悬细胞沉淀,注射入裸鼠皮下,约 2.5×10^6 个细胞。4 周后处死小鼠获取皮下包块,甲醛固定,进行 microCT 扫描和 HE 染色。

1.2.7　蛋白质提取及 Western blot 检测　　分别培养 iMEF、C3H10 和 C2C12 细胞,待细胞生长融合至 30% 左右时,加入 AdRFP 或 AdDLL1 6 h 后换液,待荧光出现后(约36 h),加入适当量的 BMP9 条件培养基,诱导培养 1 h 后进行蛋白质提取。蛋白质提取方法:用冰 PBS 洗涤细胞 3 次,将残余液体吸净,加入 200 μL 含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解液,置于冰上裂解 5 min;用细胞刮浆细胞全部刮下,移入 1.5 mL EP 管中;低温离心机 5 000 r/min 离心 20 min,小心取上清液至另 1 个 EP 管中,并加入 50 μL 的 5×蛋白上样缓冲液,最后 100 ℃沸水浴 10 min,分装后置于 −20 ℃保存备用。Western blot:配制浓缩胶和分离胶,100 V 恒压电压下 SDS-PAGE 凝胶电泳,210 mA 恒流电流转膜,依次加一抗和二抗孵育、洗膜,化学法发光底物进行显影。

1.2.8　SBE 荧光素酶活性检测　　分别培养 iMEF、C3H10 和 C2C12 细胞,待细胞融合至 30% 左右时,用脂质体 2000 将 SBE 质粒转染入细胞内。转染过程:将 3 μg 的质粒与 15 μL 的脂质体加入至 250 μL 的无血清、无抗生素培养基中,15 min 后加入到含有 2.5 mL 无血清、无抗生素培养基的细胞中,转染 6 h 后换液。放置细胞于培养箱 37 ℃,5% CO_2 培养过夜后,将转染后的细胞接种于 24 孔板,待细胞贴壁后加入 AdDLL1 或 AdBMP9,感染率在 50% 左右,8 h 后换液,继续培养 36 h 后裂解细胞,1 000 r/min 离心 15 min,取上清 50 μL 与 20 μL 底物反应,检测 SBE 荧光素酶活性。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　AdDLL1 上调 iMEF 细胞中 DLL1 的 mRNA 表达

用 AdDLL1 或 AdRFP 感染 iMEF 细胞 36 h 后,荧光显微镜观察结果显示,病毒感染效率为 30% 左右(图 1);培养 3 d 后,qRT-PCR 检测 DLL1 的 mRNA 表达变化,结果显示:iMEF 细胞内源性 DLL1 表达量很少;AdDLL1 处理组与对照组相比,DLL1 表达量显著增加($P<0.05$)。

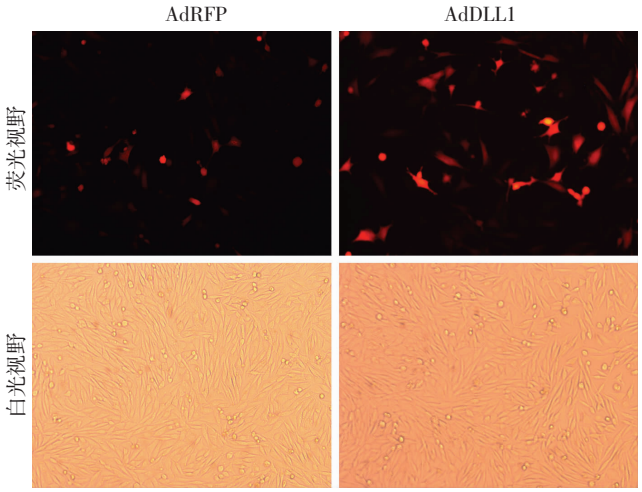
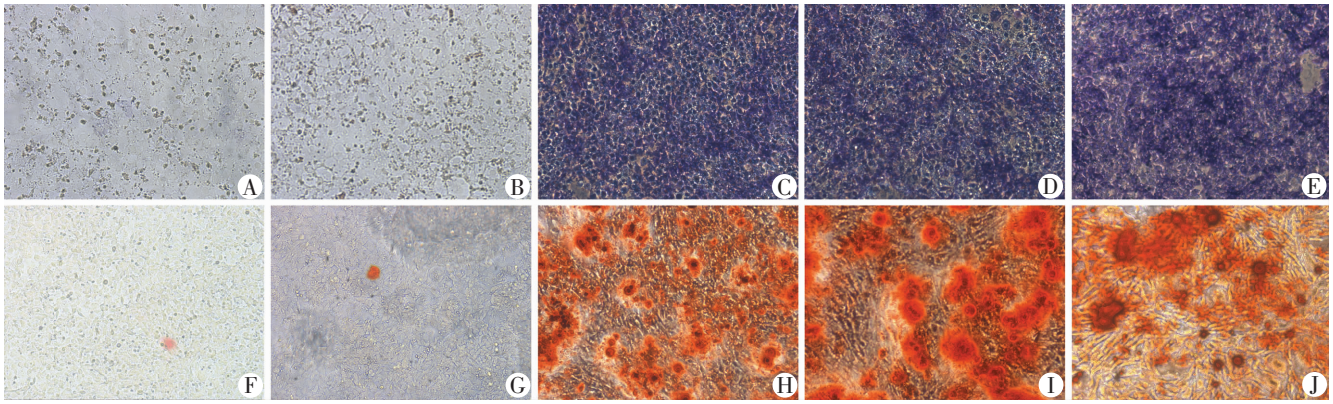


图 1　荧光显微镜观察 AdDLL1 上调 iMEF 细胞中 DLL1 的表达　(×100)



A、F:对照组;B、G:DLL1 组;C、H:BMP9 组;D、I:BMP9 + DLL1 组;E、J:BMP9 + RFP 组;A ~ E:早期成骨分化指标 ALP 染色;F ~ J:晚期成骨分化指标钙盐-茜素红 S 染色

图 2 DLL1 对 BMP9 诱导的 iMEF 细胞成骨分化的影响 (×100)

2.2 DLL1 促进 BMP9 诱导的 iMEF 细胞早晚期成骨分化

采用 AdDLL1/AdRFP 感染 iMEF 细胞,BMP9 条件培养基诱导成骨分化,分别在第 7 天和第 14 天采用 ALP 染色和茜素红 S 染色检测成骨早期指标 ALP 及成骨晚期指标钙盐沉积。结果显示,单独 DLL1 对 ALP 活性及钙盐沉积没有影响,但能显著上调 BMP9 诱导 iMEF 细胞的 ALP 活性和钙盐的沉积(图 2)。这表明 DLL1 能够促进 BMP9 诱导的 iMEF 细胞早晚期成骨分化。

2.3 DLL1 促进 BMP9 诱导的 iMEF 细胞在裸鼠皮下异位成骨

分别用 AdDLL1 或 AdBMP9 处理 iMEF 细胞后,1 d 后收集细胞注射入裸鼠皮下,4 周后皮下包块形成,剥离皮下包块。肉眼观察包块体积,发现与 BMP9 组比较,BMP9 + DLL1 组异位成骨包块体积明显增大(图 3);包块切片 HE 染色结果显示,BMP9 + DLL1 组骨小梁数目增多(图 4);用 microCT 检测骨体积和骨密度,结果显示 BMP9 + DLL1 组的骨体积及骨密度明显高于 BMP9 组(图 5)。体内实验表明,DLL1 明显增强 BMP9 诱导的 iMEF 细胞在裸鼠皮下异位成骨。

2.4 DLL1 对 BMP9 信号通路Ⅰ型受体的影响

在明确 DLL1 在体内外皆有促进 MSCs 成骨作用后,为了进一步探讨 DLL1 促进 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化的机制,首先采用 qRT-PCR 检测 DLL1 对 BMP9 信号通路Ⅰ型受体 ALK1、ALK2 mRNA 表达水平的影响。结果显示,单独的 DLL1 对 iMEF 细胞中 ALK1 和 ALK2 mRNA 的表达没有影响;在 BMP9 存在的情况下,DLL1 能明显促进 ALK2 mRNA 的表达,但对 ALK1 的 mRNA 表达没有影响($P<0.05$,图 6)。

2.5 DLL1 增加 BMP9 经典信号通路中 Smad1/5/8 的磷酸化水平

为了探究 DLL1 对 BMP 信号通路中 Smad1/5/8 的影响,采用 Western blot 检测 AdDLL1 等处理后的 iMEF、C3H10 和 C2C12 细胞中的 Smad1/5/8 及磷酸化水平。结果显示,与对照组相比,BMP9 + DLL1 组能明显上调 p-Smad1/5/8 的水平,但对 Samd1/5/8 蛋白量没有影响(图 7)。

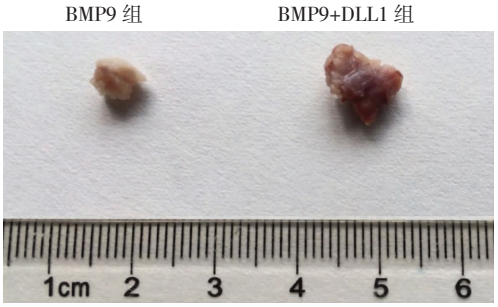
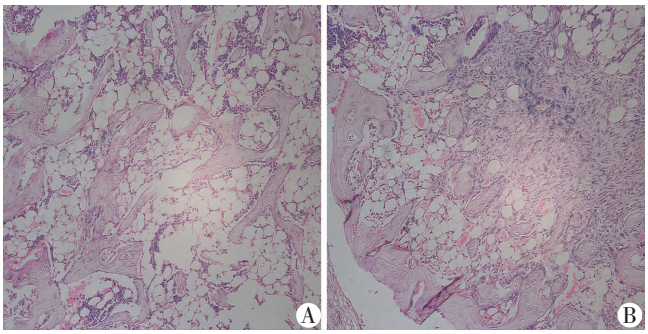


图 3 DLL1 对 BMP9 诱导的裸鼠异位成骨体积的影响



A:BMP9 组;B:BMP9 + DLL1 组

图 4 DLL1 对 BMP9 诱导的裸鼠异位成骨中骨小梁数量的影响 (HE ×40)

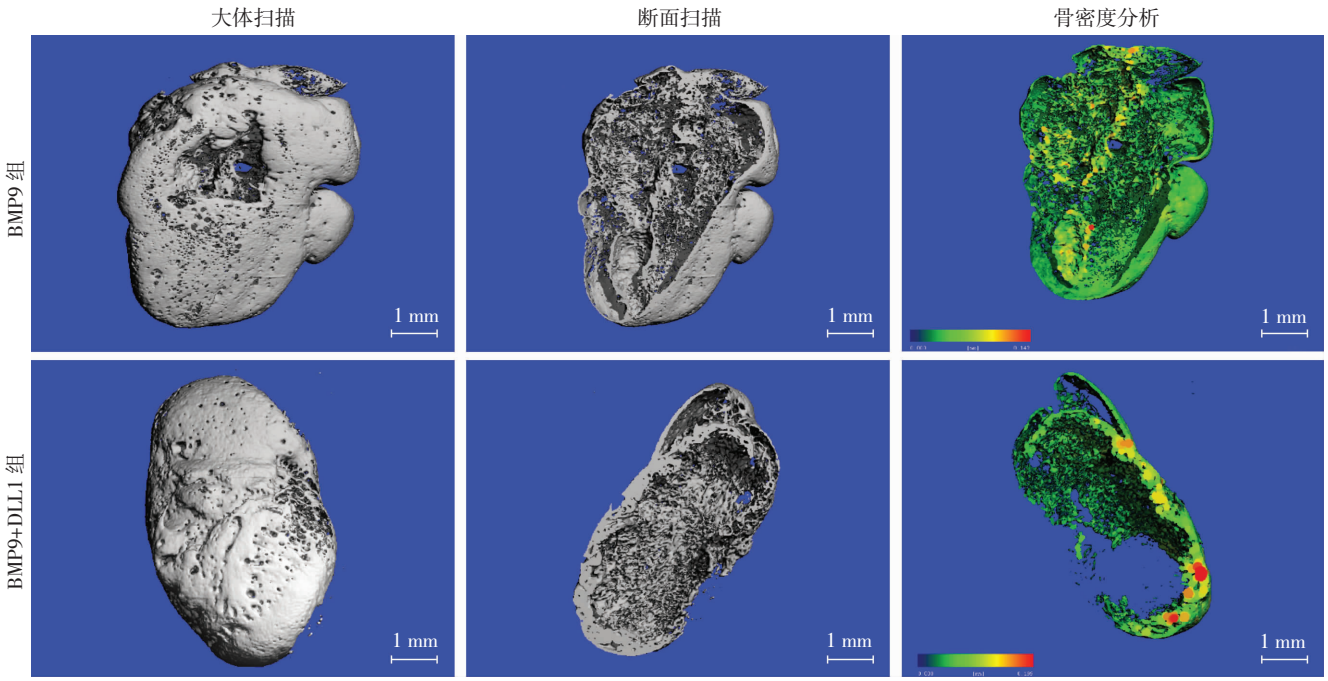
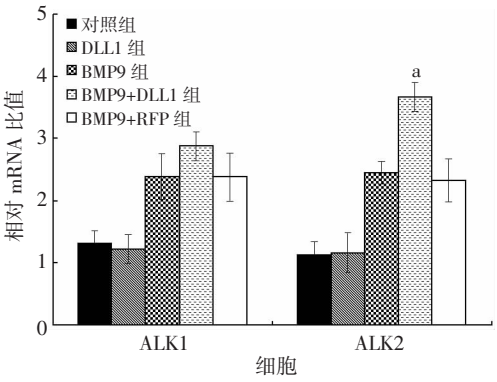
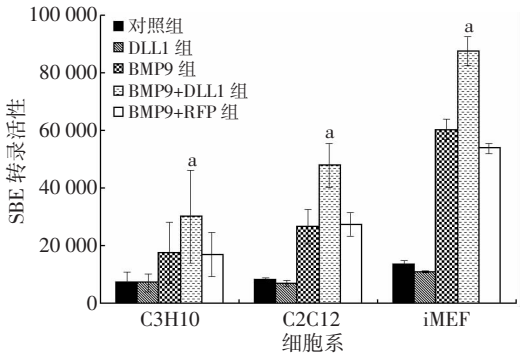


图 5 microCT 扫描观察 DLL1 对 BMP9 诱导的裸鼠异位成骨中骨密度的影响 （颜色从绿到红代表骨密度越来越大）



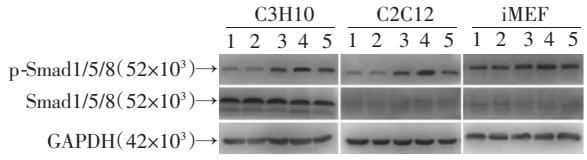
a:$P<0.05$,与 BMP9 + RFP 组比较

图 6 DLL1 对 BMP9 Ⅰ型受体 mRNA 表达的影响



a:$P<0.05$,与 BMP9 + RFP 组比较

图 8 DLL1 对 BMP9 信号通路 SBE 转录活性的影响



1:对照组;2:DLL1 组;3:BMP9 组;4:BMP9 + DLL1 组;5:BMP9 + RFP 组

图 7 DLL1 对 BMP9 信号通路 Smad 影响

2.6 DLL1 对 BMP9 经典信号通路转录活性的影响

采用荧光素酶实验检测 AdDLL1 等处理后 iMEF、C3H10 和 C2C12 细胞核内 SBE 的转录活性。结果显示,与对照组相比,BMP9 + DLL1 组能够增加 BMP9 诱导的 SBE 荧光素酶活性($P<0.05$,图 8)。这提示激活 DLL1 信号通路后可促进 BMP9 信号通路的核内转录水平。

3 讨论

MSCs 存在于骨髓、脐带血等组织中,具有多向分化潜能[9],在相应的诱导条件下可向不同组织如成骨、成脂等方向分化。BMPs 是 MSCs 成骨分化中重要的诱导因子[10-12]。BMPs-Smad 经典信号通路主要为 BMPs 与其受体结合,使 Smad1/5/8 磷酸化,p-Smad1/5/8 与 Smad 4 结合形成复合物转移至细胞核内,与下游靶基因启动子元件结合,调控下游靶基因的转录[13]。

Notch 信号广泛存在于多种脊椎与非脊椎动物体内,具有高度的保守性,是细胞与细胞之间直接作用的主要信号通路之一,其与多种肿瘤的发生、发展密切相关[14]。哺乳动物有 4 种 Notch 受体(Notch1 ~ 4)和 5 种Notch 配体(Jagged 1、Jagged 2、DLL 1、DLL 3 和 DLL 4),均属于单次跨膜蛋白,相邻细胞间通过配受

体结合从而激活下游靶基因[15]。近年来,Notch 在骨发育及重建中的作用受到重视[16],研究者对 Notch 与 BMPs、Wnt 等信号通路相互协调,调控 MSCs 成肌、成脂、成软骨和成骨分化等方面进行了研究,但其机制尚不清楚。本课题组采用 DAPT、dnNotch1 抑制 Notch 信号通路后,BMP9 诱导的 MSCs 成骨作用减弱,与 Tezuka 等[17]提出的观点相符合。DLL1 作为 Notch 信号通路中 5 个配体之一,含有 1 个短 C 端胞内片段、8 个表皮生长因子样拷贝和 1 个 Delta/Serrat/Lagged(DSL)结构域。我们前期研究发现,在 MSCs 成骨分化过程中,高细胞密度激活 Notch 后,配体中 DLL1 明显升高[6]。因此本研究采用重组腺病毒上调 DLL1 研究其在 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化中的作用及机制。

在验证 AdDLL1 能增加 MSCs 细胞内 DLL1 mRNA 表达的基础上,我们初步证实 DLL1 能促进 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化的作用,同时裸鼠皮下异位成骨实验进一步证实 DLL1 在体内具备同样的作用;不仅与我们前期研究结果一致[18],也与 Nobta 等[10]发现 DLL1 促进 BMP2 诱导的成骨分化的研究相呼应。同时,我们进一步探讨了 DLL1 对 BMP9 信号通路的影响,结果发现 DLL1 能促进 BMP Ⅰ型受体 ALK2 的表达,亦能上调 Smad1/5/8 磷酸化水平及 SBE 的转录活性。

综上所述,本研究证实 Notch 信号通路的配体 DLL1 在体内外都具有促进 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化的作用,且该效应可能通过影响 BMP9 信号通路的多个环节来实现。

参考文献:

[1] Stappenbeck T S, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair[J]. Science, 2009, 324(5935): 1666 - 1669. DOI: 10.1126/science.1172687

[2] Nelson F R, Brighton C T, Ryaby J, *et al*. Use of physical forces in bone healing[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2003, 11(5): 344 - 354.

[3] Kang Q, Song W X, Luo Q, *et al*. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(4): 545 - 559. DOI: 10.1126/science.1172687

[4] He T C. Distinct osteogenic activity of BMPs and their orthopaedic applications[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2005, 5(4): 363 - 366.

[5] Chiba S. Notch signaling in stem cell systems[J]. Stem Cells, 2006, 24(11): 2437 - 2447. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0661

[6] 刘强, 翁亚光, 徐道晶, 等. Notch 信号通路在骨形态发生蛋白 9 诱导的多潜能干细胞成骨分化中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(23): 2492 - 2496.

[7] Zhang J P, Li N, Bai W Z, *et al*. Notch ligand Delta-like 1 promotes the metastasis of melanoma by enhancing tumor adhesion[J]. Braz J Med Biol Res, 2014, 47(4): 299 - 306.

[8] Xu D, Hu J, De-Bruyne E, *et al*. Dll1/Notch activation contributes to bortezomib resistance by upregulating CYP1A1 in multiple myeloma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 428(4): 518 - 524. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.071

[9] Taichman R S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche[J]. Blood, 2005, 105(7): 2631 - 2639. DOI: 10.1182/blood-2004-06-2480

[10] Nobta M, Tsukazaki T, Shibata Y, *et al*. Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280(16): 15842 - 15848. DOI: 10.1074/jbc.M412891200

[11] Luther G, Wagner E R, Zhu G, *et al*. BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: molecular mechanism and therapeutic potential[J]. Curr Gene Ther, 2011, 11(3): 229 - 240.

[12] Tang N, Song W X, Luo J, *et al*. BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/β-catenin signalling[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(8B): 2448 - 2464.

[13] Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(3): 251 - 263.

[14] Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 756 - 767.

[15] Bray S J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(9): 678 - 689. DOI: 10.1038/nrm2009

[16] Ugarte F, Ryser M, Thieme S, *et al*. Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells[J]. Exp Hematol, 2009, 37(7): 867 - 875.e1. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.03.007

[17] Tezuka K, Yasuda M, Watanabe N, *et al*. Stimulation of osteblastic cell differentiation by Notch[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(2): 231 - 239. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.2.231

[18] 杨伦韵, 张晓艳, 廉静, 等. Notch1 在 BMP9 诱导 iMEF 细胞成骨分化中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(1): 39 - 45. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201407116.

(**收稿**:2015-04-24;**修回**:2015-07-11)

(编辑 邓强庭)