基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001038

ZHX3基因沉默对 BMSCs 中 BMP2/smad 通路的影响

李艳芹[1],张苗苗[2],闵鹤鸣[3],王　艳[4],秦书俭[2],袁　静[4]

（锦州医科大学 1. 生命科学研究院;2. 解剖学教研室;3. 细胞生物学教研室;4. 附属第一医院神经内科,锦州　121000）

【摘　要】目的:探讨转录抑制因子——锌指蛋白和同源框 3(zinc fingers and homeoboxes 3,ZHX3)基因沉默对骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells,BMSCs)中 BMP2/smad 通路相关因子骨形成蛋白 2(bone morphogenetic protein 2,BMP2)、磷酸化 smad1(phospho-smad1(或 pho-smad1))表达的影响。**方法**:构建 ZHX3 低表达慢病毒载体转染大鼠 BMSCs,同时设阴性对照空载病毒转染 BMSCs 及空白对照不做任何处理的 BMSCs。采用荧光显微镜下测定细胞转染率、免疫印迹技术鉴定转染效果、免疫细胞化学和免疫印迹技术定性定量检测 ZHX3 沉默时 BMP2、pho-smad1 和 smad4 的表达情况。细胞经成骨诱导液处理后进行碱性磷酸酶和茜素红染色检测各组细胞成骨能力。**结果**:①复苏培养的细胞具有 BMSCs 形态。②转染后,ZHX3 低表达组和空载体对照组均表达绿色荧光,转染率分别为(93.18±4.41)%和(92.56±4.35)%,空白对照组不表达荧光,未见转染阳性细胞(F=1 123.464,P<0.05)。③免疫细胞化学及免疫印迹结果显示,BMP2、pho-smad1、smad4 于 3 组细胞内均可见阳性表达,但 ZHX3 低表达组的 BMP2、pho-smad1 水平(0.383 0±0.006 3,0.329 1±0.025 8)明显高于空白对照组(0.306 2±0.011 6,0.209 0±0.017 0)和空载体对照组(0.291 2±0.022 2,0.180 0±0.018 7),P<0.05;而 ZHX3 低表达组 smad4 的表达(0.107 4±0.004 3)显著低于空白对照组(0.380 1±0.023 6)和空载体对照组(0.353 7±0.016 7),P<0.05。④空白对照组、空载体对照组、ZHX3 低表达组均可见碱性磷酸酶阳性表达的细胞及矿化结节,但后者数量均小于前两者。**结论**:ZHX3 基因低表达可延迟 BMSCs 体外成骨能力,可能通过调控 BMP2/smad 通路中的 smad4 来发挥作用。

【关键词】锌指蛋白和同源框 3;基因沉默;骨髓间充质干细胞;骨形成蛋白;smad

【中图分类号】R392.12　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-09-18

Influence of silencing ZHX3 on BMP2/smad pathway in BMSCs

Li Yanqin[1], Zhang Miaomiao[2], Min Heming[3], Wang Yan[4], Qin Shujian[2], Yuan Jing[4]

(1. College of Life Sciences; 2. Teaching and Research Section of Anatomy; 3. Teaching and Research Section of Cell Biology; 4. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Jinzhou Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of silencing zinc fingers and homeoboxes 3 (ZHX3) on expressions of bone morphogenetic proteins 2(BMP2), phospho-smad1(or pho-smad1) in BMP2/smad pathway in bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs). ***Methods***: ZHX3 low expression vector was constructed to transfect the rat BMSCs. At the same time, BMSCs transfected with no-load virus was taken as negative control group and BMSCs without any treatment as blank control group. Fluorescence microscope was used to determinate cell transfection rate. Immunocytochemistry method was used to identify the success of the transfection. Immunocytochemistry and Western blot were used to detect the protein expressions of BMP2, phospho-smad1, smad4 when silencing ZHX3 gene. Osteogenesis ability of cell after inducement of osteogenesis solution was detected by alkaline phosphatase and alizarin red staining. ***Results***: ①Cells expressing BMSCs phenotype could be obtained by recovery culturing. ②After transfection, transfection rate of the ZHX3 low expression group and negative control group was (93.18±4.41)% and (92.56±4.35)% respectively, but no transfection cell was observed in blank control group(F=1 123.464, P<0.05). ③According to the results of immunocytochemistry and Western blot, positive expressions of BMP2, pho-smad1, smad4 were observed in three groups, but their expressions were higher in ZHX3 low expression group(0.383 0±0.006 3, 0.329 1±0.025 8) than in blank control group(0.306 2±0.011 6, 0.209 0±0.017 0) group and negative control group(0.291 2±0.022 2, 0.180 0±0.018 7, P<0.05). Expression of smad4 was lower in ZHX3 low expression group(0.107 4±0.004 3) than in blank control group(0.380 1±0.023 6) and negative control group(0.353 7±0.016 7, P<0.05). ④Positive expression of nalkaline phosphatase was observed in cells in all groups, however, its quantity was higher in blank control group and negative control group than in ZHX3 low expression group. ***Conclusion***: ZHX3 gene silencing may delay BMSCs in vitro osteogenesis, which may through the regulation of smad4 in BMP/smad pathway.

【Key words】zinc fingers and homeoboxes 3; gene silencing; mesenchymal stem cells; bone morphogenetic proteins; smad

作者介绍:李艳芹,Email:1057494699@qq.com,
研究方向:骨缺损修复机制研究。

通信作者:袁　静,Email:yuanjing69916@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31170930、81202783)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161027.1051.020.html (2016-10-27)

骨缺损是临床常见疾病，通常采用自体骨移植进行治疗，而植骨材料不足，常给临床工作带来困扰。为解决此问题，研究者们着重于组织工程骨的研究[1]。支架材料、诱导因子和干细胞（种子细胞）是骨组织工程的三大要素，其中种子细胞是该研究的核心内容。种子细胞诱导分化为成骨细胞关键可能取决于早期调控的转录因子。锌指蛋白和同源框 3（zinc fingers and homeoboxes 3，ZHX3）是 2003 年新克隆的转录抑制因子，是 ZHX 蛋白家族成员之一，含有 2 个锌指结构和 5 个同源结构域。ZHX3 蛋白可自身形成同源二聚体，也可与 ZHX1 形成异源二聚体[2]。研究显示，ZHX3 是成骨分化早期的标志物[3]，与晚期出现的标志物相比能够更早、更快地识别干细胞的成骨潜能。最近实验证明，ZHX3 基因过表达可提高骨髓间充质干细胞（bone marrow stem cells，BMSCs）体外成骨能力[4]。BMP2/smad 通路是 BMSCs 向成骨细胞诱导分化的主要信号通路之一[5]。ZHX3 作为成骨分化早期的标志物，是否通过调控上述通路发挥促进成骨分化作用，有待深入探讨。本课题选用ZHX3 基因沉默的 BMSCs，设立空白对照组和空载体转染细胞作为对照，采用免疫组化和免疫印迹检测 BMP2/smad 通路相关因子骨形成蛋白 2（bone morphogenetic protein 2，BMP2）、pho-smad1和 smad4 的表达情况，经成骨诱导之后检测细胞分化能力，进一步探讨 ZHX3 沉默时对 BMSCs 诱导分化为成骨样细胞的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

荧光显微镜（德国 ZEISS）；低温超速离心机（Sigma 公司）；ZHX3 低表达慢病毒及阴性对照病毒（上海吉凯基因有限公司）；0.25% Trypsin-0.04% EDTA（广州赛业公司）；BMP2、pho-smad1、smad4 抗体（Abcam 公司）；TRITC 标记的荧光二抗（北京中杉公司）；SD 大鼠 BMSCs 及干细胞培养基、Ori-CellTM 间质干细胞成骨诱导培养基试剂盒、茜素红试剂（广州赛业公司）；碱性磷酸酶钙钴法染色试剂盒（凯基生物）。

1.2 实验方法

1.2.1 SD 大鼠 BMSCs 的复苏培养与传代 冻存的骨髓间质干细胞经迅速复温后，按 2.0×10^4~4.0×10^4 个活细胞/cm^2 的密度接种到培养瓶中，加入足量的完全培养基，置于 37 ℃、5%CO_2、80%相对湿度的培养箱中培养。次日换液，之后每 2 d 换液。当细胞达 80%~90%的汇合度，胰酶消化和传代。相差显微镜观察细胞形态及生长情况。

1.2.2 一般状态观察及 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide，MTT]检测 细胞按 0.5×10^4 个/mL 接种于 24 孔培养板，每天每组细胞各选取 3 孔，连续测 7 d，酶标仪 490 nm 波长上测定吸光值，计算平均值及标准差，绘制生长曲线。

1.2.3 慢病毒转染 BMSCs 及鉴定 根据课题组前期实验结果[4]，采用最佳感染复数 50 μl 的浓度进行转染。转染 24 h 后，去含病毒的上清液，换成对应的细胞完全培养液培养。96 h 后，荧光倒置显微镜下观察细胞的转染效果，计算转染率（转染率=荧光表达绿色荧光蛋白细胞/细胞总数×100%）[6]。慢病毒转染之后 Western blot 检测 ZHX3 蛋白的表达情况，以鉴定是否转染成功。

1.2.4 实验分组 实验分为 3 组：A. 空白对照组（不作任何处理的 BMSCs）；B. 空载体对照组（采用空载体进行转染的 BMSCs）；C. ZHX3 低表达组（采用 ZHX3 低表达慢病毒进行转染的 BMSCs）。转染后观察细胞状态，24 h 后更换新鲜培养基。

1.2.5 免疫荧光法检测 BMP2、pho-smad1 和 smad4 蛋白表达 当病毒转染细胞达 80%~90%汇合度，胰酶消化，细胞按 4×10^4 个/孔接种到已放入盖玻片的 6 孔培养板。24 h 细胞贴壁后，取出爬片做免疫荧光检测 BMP2、pho-smad1 和 smad4 的表达情况。细胞经 4%多聚甲醛室温固定后，用过氧化氢甲醇液处理以灭活内源性过氧化氢酶，0.5%Triton X-100 破膜后，5%BSA 室温封闭。一抗孵育 4 ℃过夜，TRITC 标记的二抗工作液孵育 37 ℃、30 min，Hoechest33258 染液复染细胞核。荧光显微镜下观察 BMP2、pho-smad1 和 smad4 的表达情况。

1.2.6 免疫印迹法检测 BMP2、pho-smad1 和 smad4 蛋白表达 收集各组细胞，加入 PMSF 的裂解液冰上裂解 30 min，取上清液采用 BCA 法测定蛋白含量，并制样，-20 ℃冰箱保存。灌胶与上样、电泳、转膜后加入一抗 4 ℃孵育过夜，二抗室温孵育 1 h，电化学发光法显色；扫描电泳条带，用凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。采用 β-肌动蛋白（β-actin）作为内参照。根据目标条带与对应内参照条带（β-actin）吸光度的比值表示待测蛋白含量。

1.2.7 BMSCs 的诱导分化 第 3 代大鼠 BMSCs 以 2×10^4 个/cm^2 的细胞密度接种在事先包被 0.1%明胶的 6 孔板中。当细胞融合度达 60%~70%时，将孔内完全培养基吸走，向 6 孔板中加入 2 mL 成骨诱导分化培养基，继续培养。

1.2.8 茜素红染色 BMSCs 成骨诱导 21 d 后，将 3 组细胞经 4%多聚甲醛固定，30 min 后经 PBS 冲洗 3 次，用 0.1%茜素红染液染色，37 ℃孵育 30 min，PBS 洗 3 次，显微镜下观察染色情况并计数低倍视野下矿化结节数量。

1.2.9 碱性磷酸酶染色 BMSCs 成骨诱导 21 d 后，3 组细胞经中性甲醛固定，后按试剂说明书进行操作。镜下观察碱性磷酸酶阳性者为细胞质有黄色或棕色颗粒，有些出现咖啡色颗粒，其强度可以用 Kaplow 评级标准评分。其 0~4 级分别为：0 级，细胞质中没有染色颗粒；1 级，细胞质黄色或棕色，偶见颗粒；2 级，细胞质黄色或棕色，中等量颗粒；3 级，细胞质呈显著黄色或棕色，有较多颗粒；4 级，细胞质充满黄色或棕色颗粒，或者有较粗大的颗粒[7]。

1.3 统计学处理

在 SPSS 17.0 统计软件上完成，计量资料采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。多组间差异的比较采用单因素方差分析，其组间两两比较采用 LSD-t 检验和 Tamhane 检验，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 BMSCs 的培养

复苏并传代后的细胞生长更加迅速，细胞形态逐渐单一，以长梭形为主，细胞形态、大小均一，呈成纤维细胞样形态，极性较好，立体感一般。

2.2 一般状态观察及 MTT 检测

3 组 BMSCs 细胞传代培养后形态及密度变化十分均匀，1 d 处于潜伏期，空白对照组 2 d 后进入对数增殖期，6~7 d 后进入平台期。空载体对照组和 ZHX3 低表达组传代后 3 d 进入对数增殖期，时间集中在 3~5 d，6 d 后进入平台期。

2.3 慢病毒转染 BMSCs 及鉴定

荧光显微镜下空载体对照组和 ZHX3 低表达组均观察到带有较强绿色荧光的 BMSCs，提示转染效率高；而空白对照组则未见特异性的荧光影像（图 1）；病毒转染率显示：与空白对照组[(0.00 ± 0.00)%]比较，空载体对照组[(92.56 ± 4.35)%]和 ZHX3 低表达组转染率[(93.18±4.41)%]明显增高（$P<0.05$）；而空载体对照组与 ZHX3 低表达组之间差异无统计学意义，见表 1。

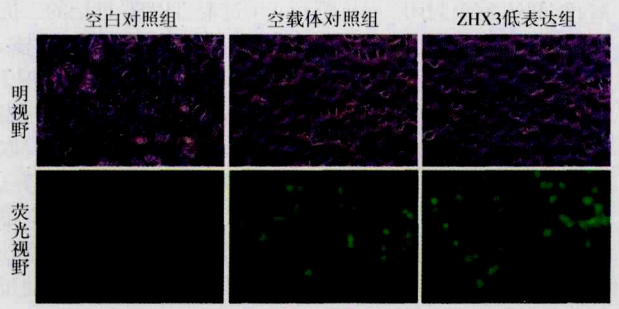


图 1 各组细胞病毒转染情况

Fig.1 Virus transfection in each group

表 1 各组细胞病毒转染率、茜素红矿化结节及碱性磷酸酶评分比较（n=5，$\bar{x} \pm s$）

Tab.1 Comparison of virus transfection rate, alizarin red mineralized nodules, and alkaline phosphatase score in three groups（n=5，$\bar{x} \pm s$）

组别	病毒转染率（%）	茜素红矿化结节（个）	碱性磷酸酶评分
空白对照组	0.00 ± 0.00[b]	56.20 ± 3.03	4.00 ± 0.00
空载体对照组	92.56 ± 4.35[a]	57.80 ± 3.96	3.80 ± 0.45
ZHX3低表达组	93.18 ± 4.41[a]	33.20 ± 2.59[ab]	2.80 ± 0.45[ab]
F 值	1 123.464	89.930	15.500
P 值	0.000	0.000	0.000

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与空载体对照组比较，$P<0.05$

免疫印迹结果显示，3 组均可见 ZHX3 阳性表达条带，但 ZHX3 低表达组的表达条带明显弱于空白对照组和空载体对照组（图 2）。

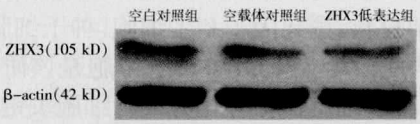


图 2 Western blot 检测各组细胞 ZHX3 蛋白表达情况

Fig.2 Expression of ZHX3 protein

ZHX3 的免疫印迹结果显示，空白对照组和空载体对照组中 ZHX3 的表达没有明显差异，但均明显高于 ZHX3 低表达组（$P<0.05$），提示 ZHX3 低表达组的 BMSCs 转染成功，见表2。

2.4 免疫荧光检测 BMP2、phos-smad1 和 smad4 表达情况

荧光显微镜下可见，BMP2 的阳性表达主要定位于细胞质，pho-smad1 阳性表达定位于细胞质和细胞核，3 组细胞均可见阳性表达细胞，但 ZHX3 低表达组的荧光强度与其他 2 组相比可见更为明亮的荧光（图 3、图 4）。smad4 的阳性表达主要定位于细胞质和细胞核，3 组细胞均可见阳性表达细胞，但 ZHX3 低表达组的荧光强度显著低于其他 2 组（图 5）。

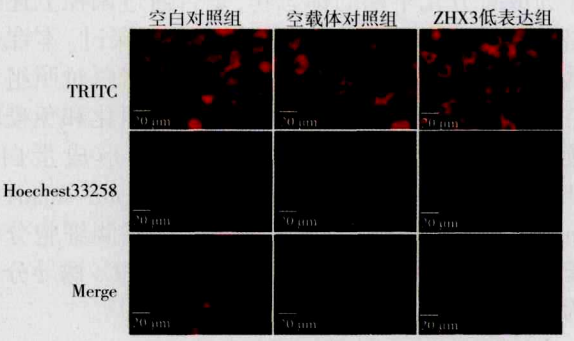


图 3 各组细胞 BMP2 表达

Fig.3 Expression of BMP2 in each group

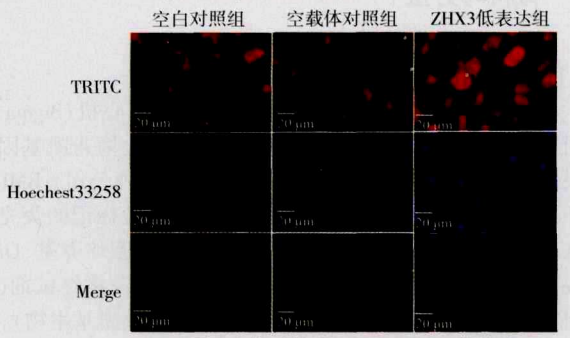


图 4 各组细胞 pho-smad1 表达

Fig.4 Expression of pho-smad1 in each group

表 2 各组细胞 ZHX3，BMP2，pho-smad1 和 smad4 的相对表达强度（n= 3，$\bar{x} \pm s$）

Tab.2 Expression of ZHX3, BMP2, pho-smad1, and smad4 in three groups（n= 3，$\bar{x} \pm s$）

组别	ZHX3	BMP2	pho-smad1	smad4
空白对照组	0.164 4 ± 0.028 4	0.306 2 ± 0.011 6	0.209 0 ± 0.017 0	0.380 1 ± 0.023 6
空载体对照组	0.152 4 ± 0.016 8	0.291 2 ± 0.022 2	0.180 0 ± 0.018 7	0.353 7 ± 0.016 7
ZHX3低表达组	0.101 0 ± 0.002 2[ab]	0.383 0 ± 0.006 3[ab]	0.329 1 ± 0.025 8[ab]	0.107 4 ± 0.004 3[ab]
F 值	9.343	32.659	43.172	238.483
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：a，与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与空载体对照组比较，$P<0.01$

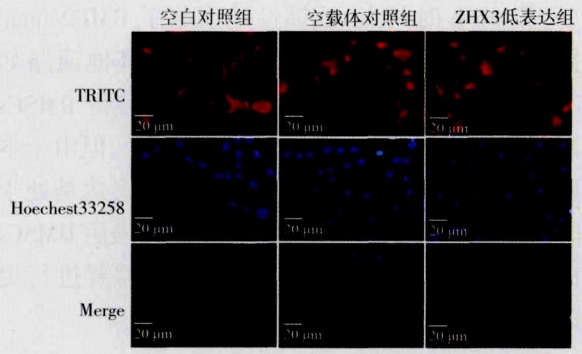


图 5 各组细胞 smad4 表达

Fig.5 Expression of smad4 in each group

2.5 免疫印迹检测 BMP2、pho-smad1 和 smad4 蛋白表达

由图 6 免疫印迹结果可见：BMP2 于空白对照组和空载体对照组可见明显的表达条带，而 ZHX3 低表达组的表达条带更为明显；pho-smad1 于空白对照组和空载体对照组可见微弱的表达条带，而 ZHX3 低表达组可见明显的表达条带；smad4 于空白对照组和空载体对照组可见明显的表达条带，而 ZHX3 低表达组仅见微弱的表达条带。

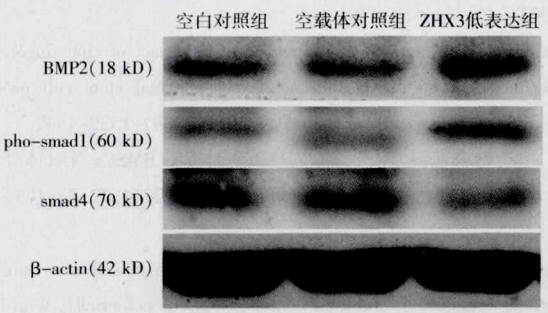


图 6 3 组细胞 BMP2、pho-smad1 和 smad4 的表达

Fig.6 Expression of BMP2, pho-smad1, and smad4 in three groups

由表 2 可见，空白对照组和空载体对照组中 BMP2 的表达没有统计学差异，但均明显低于 ZHX3 低表达组；pho-smad1 也呈现同样的表达趋势；空白对照组和空载体对照组中 smad4 的表达没有统计学差异，但均明显高于 ZHX3 低表达组（$P<0.05$）。

2.6 茜素红染色

由图 7 可见，BMSCs 成骨诱导 21 d 后经茜素红染色，于空白对照组和空载体组可观察到较多的矿化结节（染成红色），而 ZHX3 低表达组仅见到少量的矿化结节。由表 1 统计结果可得，空白对照组和空载体对照组之间的矿化结节数量无统计学差异，但均明显高于 ZHX3 低表达组。



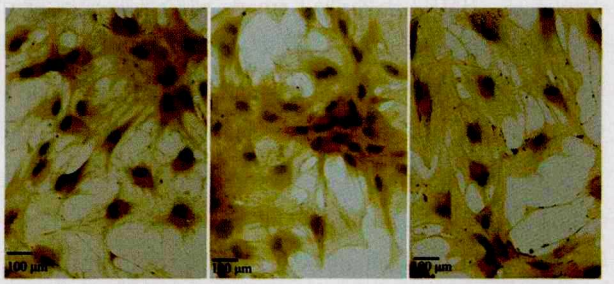
A. 空白对照组 B. 空载体对照组 C. ZHX3 低表达组

图 7 各组茜素红染色结果

Fig.7 Alizarin red staining results

2.7 碱性磷酸酶染色

由图 8 可见，碱性磷酸酶染色结果显示空白对照组和空载体对照组细胞质均呈现棕黄色并有较多阳性表达颗粒，为磷酸盐沉淀。ZHX3 低表达组细胞质可见较少的棕色颗粒；由表 1 统计结果可知，空白对照组和空载体对照组之间的碱性磷酸酶染色无统计学差异，但均明显高于 ZHX3 低表达组。



A. 空白对照组 B. 空载体对照组 C. ZHX3 低表达组

图 8 成骨诱导 21d 后的 BMSCs 碱性磷酸酶染色结果

Fig.8 Alkaline phosphatase staining results after 21d of osteogenic induction

3 讨 论

研究显示，种子细胞诱导分化为成骨细胞的关键可能取决于早期调控的转录因子[2]。ZHX3 作为 2003 年新克隆的转录抑制因子，是成骨分化早期的标志物。研究者认为：ZHX3 可能是比 Osterix 和 RUNX2 更为早期的成骨因子，ZHX3 作为成骨分化早期的标志物，与晚期出现的标志物相比能够更早、更快地识别干细胞的成骨潜能。但是对于 ZHX3 在种子细胞成骨分化过程中的作用机制目前仍未见报道。本研究通过 ZHX3 转染 BMSCs 后，检测细胞内成骨调控基因的表达水平，从而探讨 ZHX3 成骨诱导过程中所受到的调控机制。Suehiro 等[3]采用 siRNA 技术敲减 ZHX3 基因（敲减率为 50%，敲减后抑制水平仅能维持 4 d），将其转染至 BMSCs 内，诱导 6~21 d 的成骨能力均明显减弱和延迟，此研究结果提示 ZHX3 在成骨分化过程中起着至关重要的作用，可能是 BMSCs 从未分化阶段向成骨分化过程的转换开关[3]。本实验通过采用碱性磷酸酶染色和茜素红染色，发现 ZHX3 低表达组的 BMSCs 碱性磷酸酶和矿化结节的表达均显著减弱，碱性磷酸酶和矿化结节均为成骨样细胞功能成熟的标志性指标，本实验结果也再次验证了 ZHX3 低表达可导致 BMSCs 的成骨样分化能力减弱或延迟。ZHX3 作为成骨分化早期的标志物，与晚期出现的标志物

（Osterix、RUNX2）相比能够更早、更快地识别干细胞的成骨潜能。

BMP2 是 BMP 家族中成骨活性较强的一员，在成骨细胞分化过程中起着十分关键的作用[6]，可促进成骨细胞标志基因 OPN[7]、RUNX2[8]、BSP、ALP[9]等的表达。BMP2 主要通过 smads 通路来调控成骨分化，smads 蛋白是 BMP 通路中一类重要的胞内信号分子，负责传递 BMPs 信号的 smad 家族成员是 smad1/5/8，smad1 是 R-smads 的一个重要细胞因子[10]。研究发现，BMP2 通过激活其Ⅰ型受体，然后磷酸化 smad1，进而与 smad5 和 smad8 结合。但活化的 R-smad 必须与 Co -smads（smad4）结合形成低聚杂合物，然后移位至细胞核，才能发挥调节转录的作用[11]。

本实验通过 BMSCs 慢病毒转染，建立 ZHX3 低表达模型，进一步观察 ZHX3 低表达时对成骨诱导通路中 BMP2 和 phos-smad1 的调控作用。免疫荧光、免疫印迹实验结果显示，当 ZHX3 基因沉默 24 h 时，BMP2 和 phos-smad1 的表达强度呈增强趋势，明显高于未经处理的 BMSCs，由此本研究推测当 ZHX3 基因含量表达显著下降时，作为其下游因子，可能反馈地引起 BMP2/smad 通路的活化，使 BMP2 表达上调，进而促进 smad1 的活化，进一步对其下游因子产生反馈性地调节。此外，本研究中还检测了 smad4 的表达水平，发现 smad4 的表达水平与BMP2、phos-smad1 不完全一致，当 ZHX3 低表达时 smad4 的表达水平明显降低，这与 ZHX3 的表达水平是一致的。之所以出现这样的结果，推测可能与前期实验所检测的 TGF-β1 及其下游因子 smad2 和 smad3 的变化趋势有关。前期实验发现 ZHX3 低表达时 TGF-β1 及其下游因子 smad2 和 smad3 的表达水平降低。TGF-β1 是通过活化 smad2 和 smad3，进而与 smad4 结合后，移入细胞核内发挥调节转录作用的。而本研究中的 ZHX3 沉默后所致的 smad4 表达水平降低，可能是 BMP2 通路和 TGF-β 通路共用此因子所致的竞争作用所致。

碱性磷酸酶及茜素红染色结果显示，于成骨诱导后 ZHX3 基因低表达组的碱性磷酸酶表达明显减弱，钙化结节数量明显减少，提示 ZHX3 沉默后成骨能力减弱，但 BMP2 与 smad1 的表达水平与这一结果不一致，推测可能是由于 ZHX3 的持续低表达（转染 96 h 时间点）反馈性地引起了 BMP2/smad 通路中 phos-smad1 的活化，但是由于其他通路如 TGF-β1 通路中的因子的低表达水平，使得 BMSCs 的成骨能力依然处于降低或减弱的水平。但由于本实验仅选择了单一的时间点，而基因的表达是处于动态的不断的变化过程的，对于 ZHX3 转染后 BMSCs 内的成骨相关因子的动态变化过程还需要进行更加深入的研究和探讨。

参 考 文 献

[1] Kang JM, Kang SW, La WG, et al. Enhancement of in vivo bone regeneration efficacy of osteogenically undifferentiated human cord blood mesenchymal stem cells[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 93(2): 666-672.

[2] Kawata H, Yamada K, Shou Z, et al. The mouse zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) family: ZHX2 forms a heterodimer with ZHX3[J]. Gene, 2003, 24(323): 133-140.

[3] Suehiro F, Nishimura M, Kawamoto T, et al. Impact of zinc fingers and homeoboxes 3 on the regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation[J]. Stem Cells Dev, 2011, 20(9): 1539-1547.

[4] 李 季，秦书俭，包翠芬，等. ZHX3 基因转染 BMSCs 及对体外成骨能力的实验研究[J]. 中国临床解剖学杂志，2014，32(2)：174-178.

[5] Pipino C, Pandolfi A. Osteogenic differentiation of amniotic fluid mesenchymal stromal cells and their bone regeneration potential[J]. World J Stem Cells, 2015, 7(4): 681-690

[6] Ohata Y, Ozono K. Bone and Stem Cells. The mechanism of osteogenic differentiation from mesenchymal stem cell[J]. Clin Calcium, 2014, 24(4): 501-508.

[7] Chatakun P, Núñez-Toldrà R, Díaz López EJ, et al. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(1): 113-142.

[8] 张铭杰，张庆文，何 伟，等. 成人骨髓间充质干细胞体外培养、鉴定与成骨诱导[J]. 中国组织工程研究，2013，17(45)：7947-7953.

[9] Hu Y, Tang XX, He HY. Gene expression during induced differentiation of sheep bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts[J]. Genet Mol Res, 2013, 12(4): 6527-6534.

[10] James AW. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation[J]. Scientifica, 2013, 2013(1): 684736.

[11] Katagiri T. BMP signaling and bone formation[J]. Clin Calcium, 2012, 22(11): 1677-1683.

（责任编辑：冉明会）