

## 肿瘤坏死因子预处理促进骨髓间充质干细胞成骨分化潜能

杨 姣<sup>1</sup>, 夏 雷<sup>1</sup>, 汤 郁<sup>2</sup>, 陆 化<sup>3</sup>, 费小明<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>江苏大学附属医院血液科, <sup>2</sup>风湿科, 江苏 镇江 212001; <sup>3</sup>南京医科大学第一附属医院血液科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 观察肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  预处理骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)后, 对其核因子(nuclear factor, NF)- $\kappa$ B 通路以及成骨分化能力的影响。方法: 实验分为 BMMSCs 阴性对照组(A组)、TNF- $\alpha$  预刺激 1 d 组(B组)及 TNF- $\alpha$  预刺激 7 d 组(C组)。预刺激结束后, 采用 Western blot 方法检测各组 I $\kappa$ B $\alpha$  和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白水平的表达; 采用 RT-PCR 方法检测各组 BMMSCs 中分泌红细胞生成素和肝细胞受体 B4(erythropoietin-producing hepatocellular receptor B4, EPHB4)、胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)、骨保持素(osteoprotegerin, OPG)、白细胞介素(interleukin, IL)-7 及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1 mRNA 表达水平的变化; 加成骨诱导剂诱导后, 茜素红及碱性磷酸酶检测各组成骨分化能力。同时观察加用 NF- $\kappa$ B 抑制剂吡咯烷二硫氨基甲酸酯(pyrrrolidine dithiocarbamate, PDTC)对 TNF- $\alpha$  作用的影响。结果: 与 A 组相比, B 组和 C 组 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达水平降低( $P < 0.05$ ), p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达水平增高( $P < 0.05$ ); 与 A 组相比, B 组和 C 组的 EPHB4、IGF-1、OPG mRNA 表达水平上调( $P < 0.05$ ), IL-7 及 MMP-1 mRNA 表达水平下调( $P < 0.05$ ); 与 A 组相比, B 组和 C 组的成骨分化能力增强, 而加用 NF- $\kappa$ B 抑制剂后, B 组和 C 组的成骨分化能力减弱。结论: 体外实验表明, BMMSCs 经 TNF- $\alpha$  预处理后, 可以促使 BMMSCs 成骨分化活性, 并且多次刺激较单次刺激效果明显, 其促进成骨分化效果至少部分是通过 NF- $\kappa$ B 通路介导的。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞; 肿瘤坏死因子; 炎症; NF- $\kappa$ B; 成骨分化

**[中图分类号]** Q254

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)03-275-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140301

## Promotion of tumor necrosis factor- $\alpha$ on osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells

Yang Jiao<sup>1</sup>, Xia Lei<sup>1</sup>, Tang Yu<sup>2</sup>, Lu Hua<sup>3</sup>, Fei Xiaoming<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Hematology, <sup>2</sup>Department of Rheumatism, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001; <sup>3</sup>Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of continuous pulsed-tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) treatment on nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway and osteogenic potentials of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs). **Methods:** There were three groups in this study: Group A: negative control; Group B: BMMSCs treated by TNF- $\alpha$  once; Group C: BMMSCs continuously pulsed-treated by TNF- $\alpha$  for seven days. After the treatment, I $\kappa$ B $\alpha$  and phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ) were detected by Western blot. The mRNA expression of EPHB4, IGF-1, OPG, IL-7 and MMP-1 in BMMSCs were measured by Real-time PCR. Alizarin red staining and alkaline phosphatase (ALP) staining were employed for the measurement of osteogenic differentiation. This experiment also investigated the effect of the addition of NF- $\kappa$ B inhibitor (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) on TNF- $\alpha$  action. **Results:** Compared with group A, I $\kappa$ B $\alpha$  protein levels were lower, while phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ) were higher in both group B and C ( $P < 0.05$ ). Besides, the mRNA expression levels of EPHB4, IGF-1, OPG were up-regulated but IL-7 and MMP-1 down-regulated after TNF- $\alpha$  priming ( $P < 0.05$ ). The osteogenic potential of TNF- $\alpha$ -primed BMMSCs was enhanced and the pro-osteogenic differentiation effect of TNF- $\alpha$  was reversed in the presence of NF- $\kappa$ B pathway inhibitor PDTC. **Conclusion:** Our *in vitro* results indicated that continuously pulsed TNF- $\alpha$  treatment significantly enhances the osteogenic differentiation of BMMSCs and this effect may be mediated at least partially via NF- $\kappa$ B pathway.

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81202358); 镇江市社会发展项目(SH2010030, SH2011021)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: feixiaomingujs@gmail.com

[Key words] bone-marrow mesenchymal stem cells; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; inflammation; NF- $\kappa$ B; osteogenic differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(03): 275-280]

人骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 可以较便捷地从骨髓中分离、扩增, 并且在不同条件下诱导分化成多种类型的细胞如成骨细胞、软骨细胞、肌细胞、脂肪细胞等<sup>[1]</sup>。对于成骨分化能力, BMMSCs 被认为是骨再生和骨修复中最有前途的细胞类型<sup>[2]</sup>。一系列的研究表明, 在各种缺陷动物模型中 BMMSCs 可以促进骨再生<sup>[3-4]</sup>。

作为一种普遍存在的转录因子, 核因子(nuclear factor, NF)- $\kappa$ B 是多条信号通路的汇聚点。NF- $\kappa$ B 信号转导途径主要有以下两条: 经典途径和非经典途径, 后者也可以称为选择性途径<sup>[5-6]</sup>。虽然肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  对间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 成骨分化能力的影响已有报道, 例如 Cho 等<sup>[7]</sup>研究表明 TNF- $\alpha$  刺激 NF- $\kappa$ B 通路活化促进脂肪 MSCs 的成骨分化能力; Hess 等<sup>[8]</sup>报道 TNF- $\alpha$  激活 NF- $\kappa$ B 通路促进骨 MSCs 成骨活性; 另有研究表明 TNF 和 IL-17 可以激活 IKK/NF- $\kappa$ B 信号通路, 从而抑制鼠 BMMSCs 的成骨分化<sup>[2]</sup>。但这些研究或是在成骨诱导过程中 TNF- $\alpha$  对 MSCs 成骨分化的影响, 或是单次 TNF- $\alpha$  刺激后对 MSCs 成骨的影响。但多种病理情况下, 炎症刺激往往是长期或多次的。针对目前这一研究现状, 本研究比较多次 TNF- $\alpha$  刺激后, 对 BMMSCs 成骨分化的影响, 以及 NF- $\kappa$ B 通路在这一过程中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

细胞培养皿(直径 10 cm)和 6 孔板(Corning 公司, 美国); 低糖 DMEM 培养液、胎牛血清(FBS)与胰酶(Gibco 公司, 美国); 人淋巴细胞分离液(Ficoll, 天津灏洋生物制品科技有限责任公司); 地塞米松、 $\beta$ -甘油磷酸钠、维生素 C 和茜素红粉剂(Sigma 公司, 美国); 碱性磷酸酶显色试剂盒(上海太阳生物技术公司); TNF- $\alpha$ (Peprotech 公司, 美国); I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$  抗体(Cell Signaling Technology 公司, 美国); 抗氧化剂吡咯烷二硫氨基甲酸酯 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)(Sigma 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 BMMSCs 的分离和培养

骨髓均来自江苏大学附属医院缺铁性贫血患

者, 所有患者获得知情同意, 所有协议均按照道德标准并获得伦理委员会批准。分离方法参照本实验室建立的方法<sup>[9]</sup>, 用肝素抗凝缺铁性贫血患者来源的骨髓, 人淋巴细胞分离液 Ficoll 分离骨髓单个核细胞, 按  $2 \times 10^6$  个/ml 密度接种于含 10%FBS 的低糖 DMEM 中。24 h 后细胞贴壁换液, 以后每 3~4 d 换液, 待细胞融合至 80%~90%, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按  $2 \times 10^4$  个/ml 传代培养, 收集第 3~5 代用于实验。

#### 1.2.2 实验分组

A 组: 对照组; B 组: 单次处理组, 给予 TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) 处理 BMMSCs 24 h; C 组: 给予 TNF- $\alpha$  [20 ng/(ml·d)] 预处理 BMMSCs 7 d。

#### 1.2.3 蛋白印迹法

将细胞裂解, 分别收集各组细胞的蛋白, 用 12% 的凝胶电泳分离蛋白, 然后转膜至 PVDF 膜上, 用 5% 的牛奶封闭 2 h, 一抗(I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、GAPDH) 孵育过夜, 洗膜后二抗孵育 1 h, 再洗膜, 曝光。

#### 1.2.4 BMMSCs 的成骨诱导

成骨诱导液组成: 10%FBS 的低糖 DMEM, 地塞米松  $1 \times 10^{-8}$  mol/L, 维生素 C 50  $\mu$ g/ml,  $\beta$ -甘油磷酸钠 10 mmol/L。将 A、B、C 组处理后的 BMMSCs 细胞经 0.25% 胰酶消化、离心计数, 按照  $1 \times 10^4$  个/孔密度种到 6 孔板中, 次日将培养液换成成骨诱导液, 以后每 3~4 d 换液, 诱导 14 d 后碱性磷酸酶染色, 诱导 21 d 后茜素红染色。

#### 1.2.5 碱性磷酸酶染色

固定液固定, 加入基质液, 水洗、待干后镜检, 详见试剂盒步骤。

#### 1.2.6 茜素红染色

固定液固定, 水洗后加入茜素红染液, 水洗、待干后镜检, 具体方法参照文献<sup>[2]</sup>。

#### 1.2.7 实时定量 RT-PCR

引物设计: 参照 GenBank 提供的分泌红细胞生成素和肝细胞受体 B4(erythropoietin-producing hepatocellular receptor B4, EPHB4)、胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)、骨保持素(osteoprotegerin, OPG)、白细胞介素(interleukin, IL)-7 及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1 的完整序列, 用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计, 并经 GenBank Blast 进行同源比对后, 由上海

生物工程技术公司合成(表 1)。

总 RNA 的提取:按 TRIzol 试剂操作说明提取收集 BMMSCs 的总 RNA,核酸蛋白仪测定浓度及纯度,所有用于 RT-PCR 的 RNA 样本  $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$  均在 1.8~2.0 之间。cDNA 合成:按逆转录试剂盒说明书操作,65℃反应 5 min,42℃放置 1 h。

Real-time PCR 反应:采用 20  $\mu\text{l}$  反应体系,包

括 2 $\times$ SYBR Premix Ex Tap 10  $\mu\text{l}$ ,cDNA 0.8  $\mu\text{l}$ ,上下游引物各 0.4  $\mu\text{l}$ ,ROX Reference Dye II (50 $\times$ )0.4  $\mu\text{l}$ ,灭菌去离子水 8  $\mu\text{l}$ 。PCR 循环参数为:95℃预变性 30 s,95℃ 30 s,61℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环,72℃后检测荧光。样本重复测定 3 次。RT-PCR 扩增后的 Ct 值分别代入标准曲线方程计算  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像仪观察结果。

表 1 PCR 检测基因的引物序列  
Table 1 The primer sequences of PCR

基因名称	引物序列(5'→3')	扩增长度(bp)	退火温度(℃)
EPHB4	Forward TCCTTCCTGCGCCTAAAC	324	60
	Reverse CATCACAATCCCGTAACTCC		60
IGF-1	Forward AACACCCACCCTACATACAC	235	60
	Reverse CACAAACATTGACGTTCCA		60
OPG	Forward TTGCCCTGACCACTACTACA	245	60
	Reverse TTGCACCACTCCAAATCC		60
IL-7	Forward CAACACAGACTCGGCAACTCC	253	60
	Reverse TCGATGCTGACCATTAGAACACTC		60
MMP-1	Forward TCTCTGAGGGTCAAGCAGACA	199	63
	Reverse TGAGCTGCAACACGATGTAAG		63
GAPDH	Forward TCAACGGATTTGGTTCGTATTG	136	60
	Reverse TGGGTGGAATCATATTGGAAC		60

### 1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 5 统计软件处理,计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较用 Kruskal-Wallis 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BMMSCs 体外培养的形态学观察

本研究中 8 例缺铁性贫血患者的 BMMSCs 均能在体外生长、传代,细胞贴壁生长,呈梭形,大小较均一,第 1~5 代细胞形态无明显差异。A、B、C 组 BMMSCs 均贴壁生长,以梭形为主。培养过程中各组间细胞形态无明显差别。

### 2.2 TNF- $\alpha$ 在 NF- $\kappa$ B 通路上的作用

与 A 组相比,B、C 两组 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白水平明显升高,而 B、C 两组之间无明显差异。结果提示 TNF- $\alpha$  刺激可以诱导 BMMSCs 的 NF- $\kappa$ B 通路活化,但 TNF- $\alpha$  作用的时间长短对 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白水平没有明显影响(图 1)。

### 2.3 TNF- $\alpha$ 对 BMMSCs 成骨活性的影响

TNF- $\alpha$  不同处理的 A、B、C 3 组 BMMSCs,茜素红和碱性磷酸酶染色提示:与 A 组相比,B、C 两组的成骨活性呈上升趋势,并且随 TNF- $\alpha$  刺激时间的

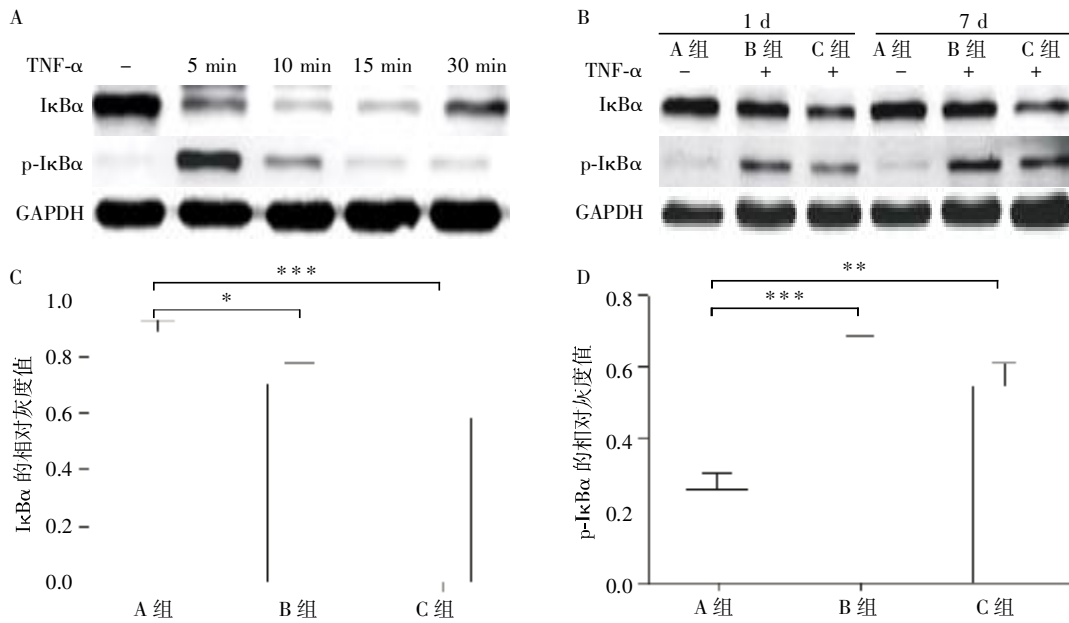
延长,BMMSCs 的成骨分化潜能增强。在 TNF- $\alpha$  预处理过程中,用 NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC 后,B、C 两组的成骨活性有所下降。这提示 TNF- $\alpha$  通过 NF- $\kappa$ B 通路促进 BMMSCs 成骨活性(图 2)。

### 2.4 TNF- $\alpha$ 刺激 BMMSCs 后相关基因 mRNA 水平的表达

TNF- $\alpha$  不同处理的 A、B、C 3 组 BMMSCs,Real-time PCR 方法检测各组 BMMSCs 中 EPHB4、IGF-1、OPG、IL-7 及 MMP-1 mRNA 表达水平的变化。与 A 组相比,B 组和 C 组的 EPHB4、IGF-1、OPG mRNA 表达水平逐渐上调,IL-7 及 MMP-1 mRNA 表达水平逐渐下调,其中除 EPHB4 和 IL-7 B 组与 C 组比较没有统计学意义( $P > 0.05$ ),其他基因各组比较均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 3)。

## 3 讨论

研究报道,TNF- $\alpha$  是抑制成骨分化因子,其可以增强骨吸收,抑制骨形成,从而导致骨破坏<sup>[10-11]</sup>。然而 TNF- $\alpha$  在 MSCs 成骨分化中的作用仍存在争议。Li 等<sup>[12]</sup> 研究表明 TNF- $\alpha$  通过抑制 PDZ 综合功能域转录共活化因子的表达抑制 MSCs 的成骨分化;Tsukahara 等<sup>[13]</sup> 报道在成骨诱导液及骨形态发生蛋



A: TNF-α(20 ng/ml)不同时间(0、5、10、15、30 min)分别刺激 BMMSCs, 蛋白印迹法检测 BMMSCs 中 IκBα 和 p-IκBα 的表达; B: 为了检测 TNF-α 短期(1 d)和持续(7 d)对 BMMSCs 作用后对 NF-κB 通路的影响, TNF-α 刺激 BMMSCs 5 min 后, 蛋白印迹法检测 BMMSCs 中 IκBα 和 p-IκBα 的表达; C 和 D 表示 B 中 IκBα 和 p-IκBα 的相对灰度值, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, n = 5。

图 1 TNF-α 诱导 NF-κB 通路的激活

Figure 1 TNF-α induced the activation of NF-κB pathway

白(bone morphogenetic protein, BMP)-2 的双重诱导下, TSG-6(TNF-α 基因 6)降低 MSCs 的成骨潜能。可是也有研究表明, TNF-α 通过激活 NF-κB 通路促进 MSCs 成骨分化。另外, 已证实通过 NF-κB 通路, TNF-α 可以增强 MSCs 中 BMP-2 的表达<sup>[7-8]</sup>。TNF-α 增强成骨作用的机制可能与增强碱性磷酸酶的活性有关, TNF-α 作用后碱性磷酸酶阳性细胞比例显著增加<sup>[14]</sup>。

然而, 上述研究均是在 MSCs 成骨诱导过程加入 TNF-α。在生理或病理情况下, 各种炎症反应是间歇的。针对这种间歇的炎症条件, 上述实验不能完全模拟实际情况。本研究则在体外模拟这一间歇的炎症过程。在用 TNF-α 预处理 BMMSCs 后, 观察其预刺激后对 BMMSCs 成骨分化潜能的影响。结果提示: TNF-α 单次预处理组 BMMSCs 的钙结节增加不明显, TNF-α 持续预处理组 BMMSCs 的成骨活性明显增强。此外, 与 MSCs 成骨相关的基因 EPHB4<sup>[15]</sup>、IGF-1<sup>[16]</sup>、OPG<sup>[17]</sup>表达上调, 而成骨负相关因子 IL-7<sup>[18]</sup>及 MMP-1<sup>[19-20]</sup>表达下调, 也是 TNF-α 多次预处理组较明显。对于 TNF-α 预处理后的 BMMSCs 成骨潜能增强的机制, 可能是 TNF-α 触发了 BMMSCs 中 BMP-2 自分泌环, 诱导 BMP-2 的表达, 而 BMP-2 是早期促进骨愈合的一个重要的因子, 广泛应用于骨组织的再生<sup>[21-22]</sup>。本研究数据表明 TNF-α 预处理

BMMSCs 后, 在促进其成骨活性的同时, 也激活了 NF-κB 通路; 用 PDTC 阻断 NF-κB 通路后, 发现 TNF-α 预处理组的成骨能力均有一定程度降低, 说明 NF-κB 通路至少部分参与了 TNF-α 诱导 BMMSCs 的成骨分化。

然而, 也有关于 TNF-α 在 BMMSCs 中负性调节成骨活性的报道。Lu 等<sup>[23]</sup>报道 TNF-α 直接阻断 BMP-2 下游 Smad1/5 信号通路。这提示 TNF-α 影响 Smad1/5 信号通路是通过其他机制, 而不是 BMP-2 的表达水平来调节成骨活性的。例如 TNF-α 可抑制 BMP-2 受体的表达, 从而阻断 BMP-2 与 Smad1/5 信号通路的联系。这也部分解释了 TNF-α 对骨形成的双重影响。TNF-α 对于 MSCs 中的成骨作用是把双刃剑: 一方面, 对于成骨分化有直接的抑制作用; 另一方面, TNF-α 可以激活一些旁路途径来诱导 MSCs 的成骨分化。本研究提示, 在 BMMSCs 接受强成骨诱导前, 给予一定剂量的 TNF-α 可以促进其成骨潜能。这与其通过旁路作用促进 MSCs 成骨分化的报道相一致<sup>[24]</sup>。

综上所述, 本研究提示骨髓中的炎症因子如 TNF-α 的预刺激, 可以加强 BMMSCs 成骨潜能, NF-κB 信号通路在这一过程中起着重要作用。然而在 BMMSCs 成骨分化过程中, 炎症因子刺激可能对成骨不利。

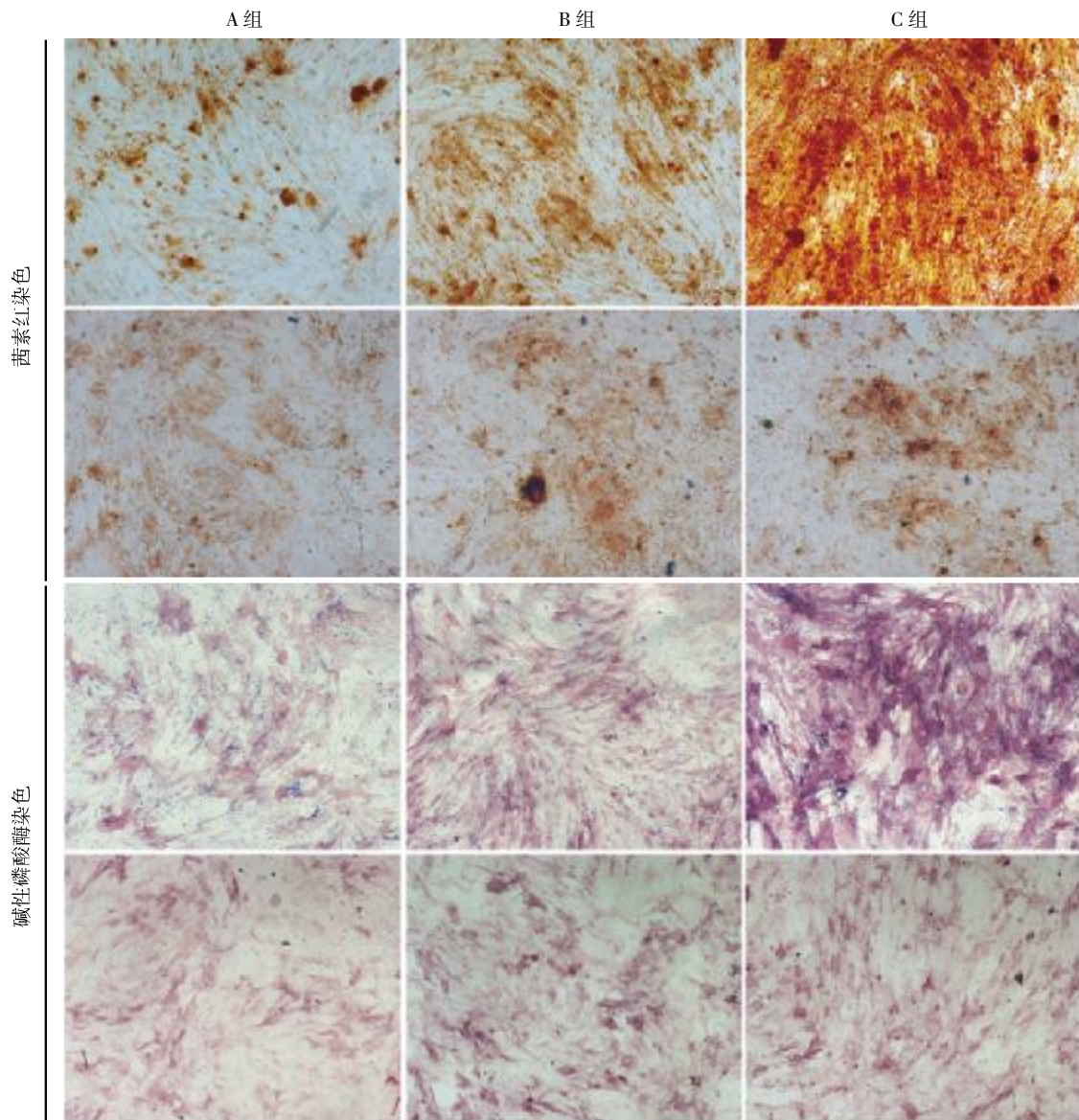
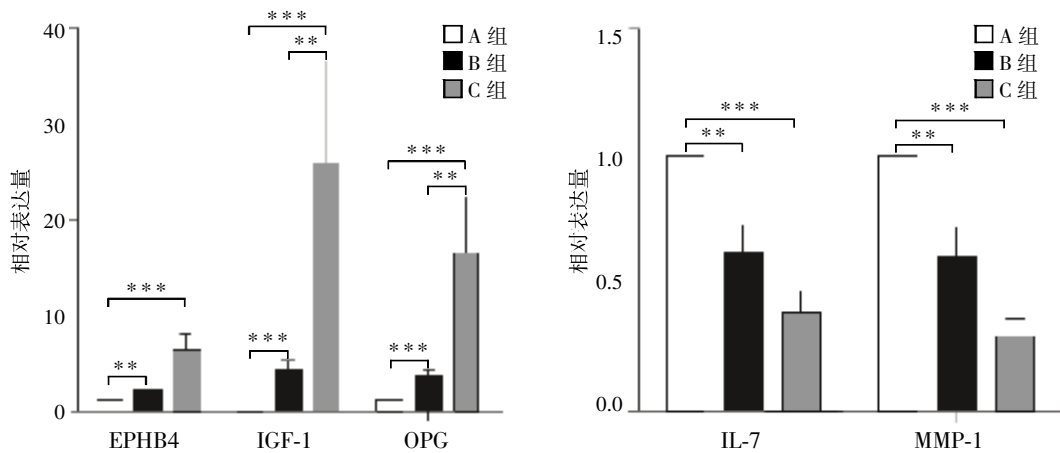


图 2 TNF- $\alpha$  诱导后的 BMMSCs 成骨分化能力( $\times 100$ )

Figure 2 The osteogenic differentiation of TNF- $\alpha$ -stimulated BMMSCs ( $\times 100$ )



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ 。

图 3 RT-PCR 法检测 TNF- $\alpha$  处理后的 BMMSCs 中 EPHB4、IGF-1、OPG、IL-7 及 MMP-1 mRNA 的表达

Figure 3 Real-time PCR assays of EPHB4, IGF-1, OPG, IL-7 and MMP-1 in BMMSCs of three groups



## [参考文献]

- [1] Kim JM, Cho HH, Lee SY, et al. Role of IRAK1 on TNF-induced proliferation and NF- $\kappa$ B activation in human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(1):49-60
- [2] Chang J, Liu F, Lee M, et al. NF- $\kappa$ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting  $\beta$ -catenin degradation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(23):9469-9474
- [3] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11):2896-2902
- [4] Bianco P, Cao X, Frenette PS, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine [J]. *Nat Med*, 2013, 19(1):35-42
- [5] Clemons NK, Collard TJ, Southern SL, et al. BAG-1 is up-regulated in colorectal tumour progression and promotes colorectal tumour cell survival through increased NF- $\kappa$ B activity [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(4):849-857
- [6] Ragaa M, McFadden G. NF $\kappa$ B inhibitors Strategies from poxviruses [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(19):3125-3132
- [7] Cho HH, Shin KK, Kim YJ, et al. NF- $\kappa$ B activation stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue by increasing TAZ expression [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(1):168-177
- [8] Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, et al. TNF- $\alpha$  promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Bone*, 2009, 45(2):367-376
- [9] Fei XM, Wu YJ, Chang Z, et al. Co-culture of cord blood CD34(+) cells with human BM mesenchymal stromal cells enhances short-term engraftment of cord blood cells in NOD/SCID mice [J]. *Cytotherapy*, 2007, 9(4):338-347
- [10] Abbas S, Zhang YH, Clohisy JC, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor [J]. *Cytokine*, 2003, 22(1-2):33-41
- [11] Lee HL, Yi T, Woo KM, et al. Msx2 mediates the inhibitory action of TNF- $\alpha$  on osteoblast differentiation [J]. *Exp Mol Med*, 2010, 42(6):437-445
- [12] Li Y, Li A, Strait K, et al. Endogenous TNF- $\alpha$  lowers maximum peak bone mass and inhibits osteoblastic Smad activation through NF- $\kappa$ B [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(5):646-655
- [13] Tsukahara S, Ikeda R, Goto S, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated gene-6 inhibits osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells induced by osteogenic differentiation medium and BMP-2 [J]. *Biochem J*, 2006, 398(3):595-603
- [14] Feng X, Feng G, Xing J, et al. TNF- $\alpha$  triggers osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via the NF- $\kappa$ B signalling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(12):1267-1275
- [15] 王欢, 李皎, 朱彦, 等. 骨髓间充质干细胞与骨髓瘤细胞共培养时 EphB4/ephrinB2 表达异常 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2012, 32(2):177-182
- [16] Xue P, Wu X, Zhou L, et al. IGF1 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow by increasing TAZ expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 33(2):226-231
- [17] Ming LG, Ge BF, Wang MG, et al. Comparison between 8-prenylnarigenin and narigenin concerning their activities on promotion of rat bonemarrow stromal cells' osteogenic differentiation *in vitro* [J]. *Cell Prolif*, 2012, 45(6):508-515
- [18] Giuliani N, Mangoni M, Rizzoli V. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in multiple myeloma: identification of potential therapeutic targets [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(8):879-886
- [19] 李俊霞, 李皎, 王欢, 等. 骨髓瘤细胞可诱导骨髓间充质干细胞的基因表达谱发生暂时和(或)长期性改变 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2013, 33(1):25-31
- [20] Hayami T, Kapila YL, Kapila S. Divergent upstream osteogenic events contribute to the differential modulation of MG63 cell osteoblast differentiation by MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) [J]. *Matrix Biol*, 2011, 30(4):281-289
- [21] Nauth A, Ristiniemi J, McKee MD, et al. Bone morphogenetic proteins in open fractures: past, present, and future [J]. *Injury*, 2009, 40(Suppl 3):S27-S31
- [22] Wang Q, Huang C, Xue M, et al. Expression of endogenous BMP-2 in periosteal progenitor cells is essential for bone healing [J]. *Bone*, 2011, 48(3):524-532
- [23] Lu Z, Wang G, Dunstan CR, et al. Activation and promotion of adipose stem cells by tumor necrosis factor- $\alpha$  preconditioning for bone regeneration [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(8):1737-1744
- [24] Lu Z, Wang G, Dunstan CR, et al. Short-term exposure to tumor necrosis factor- $\alpha$  enables human osteoblasts to direct adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into osteogenic differentiation [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(13):2420-2429