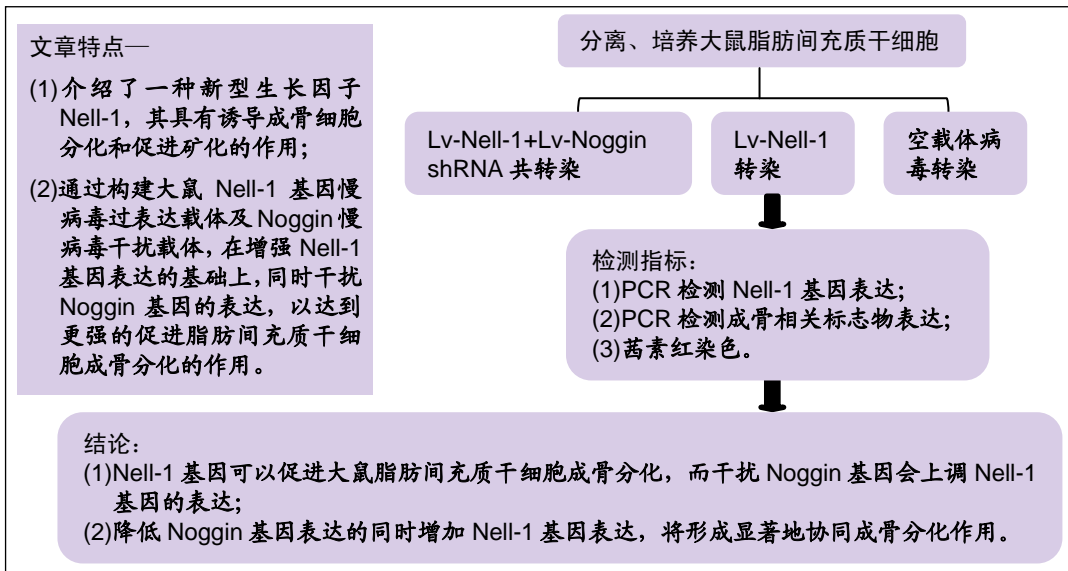


成骨诱导因子Nell-1及Noggin短发卡RNA联合转染脂肪间充质干细胞的促成骨分化能力

刘浩¹, 刘军¹, 芮永军¹, 汤峰林², 陆淼², 丁涛² (¹无锡市第九人民医院骨科, 江苏省无锡市 214000; ²南京医科大学附属无锡人民医院骨科, 江苏省无锡市 214000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2116 ORCID: 0000-0002-4601-8391(丁涛)

文章快速阅读:



刘浩, 男, 1990年生, 硕士, 主治医师, 主要从事骨组织工程学研究。

通讯作者: 丁涛, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 南京医科大学附属无锡人民医院, 江苏省无锡市 214000

文献标识码:A
投稿日期: 2019-11-25
送审日期: 2019-11-29
采用日期: 2020-01-02
在线日期: 2020-04-20



文题释义:

Nell-1: 是一种新近发现的促成骨诱导因子, 在成骨分化和骨再生中起重要作用。研究表明, Nell-1 甚至比经典的骨形态发生蛋白 2、骨形态发生蛋白 7 具有更强的成骨效应。

shRNA: 即短发卡 RNA(short hairpin RNA), 应用于 RNA 干扰, 其含有一段紧密发卡环的 RNA 序列, 将其转染进入细胞, 可以干扰靶基因表达。

摘要

背景: Nell-1 在诱导成骨分化和新骨形成中的作用已有报道, 但试图通过双基因联合转染起协同成骨作用的研究很少。

目的: 体外环境下抑制细胞中 Noggin 基因的同时上调 Nell-1 基因, 观察其对脂肪间充质干细胞成骨分化能力的影响。

方法: 取健康成年大鼠脂肪组织获取脂肪间充质干细胞。将细胞分为 3 组, 对照组转染空载体病毒 Lv-EGFP(增强型绿色荧光蛋白), Nell-1 组单纯转染 Lv-Nell-1, Nell-1+Noggin shRNA 组同时转染 Lv-Nell-1 和 Lv-Noggin shRNA。转染后 3, 7, 14 d, 应用实时荧光定量 PCR 检测 Nell-1 及成骨相关标志物(Col- I、ALP、OCN) 的表达, 转染后 14 d 行茜素红染色。

结果与结论: ①转染后 3 d, 对照组 Nell-1 mRNA 相对表达量与 Nell-1 组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。与 Nell-1+Noggin shRNA 组比较, 对照组和 Nell-1 组 Nell-1 mRNA 表达量偏低, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。转染后 7, 14 d, Nell-1+Noggin shRNA 组 Nell-1 mRNA 相对表达量仍高于对照组和 Nell-1 组, 且 Nell-1 组高于对照组, 两两比较差异均有显著性意义($P < 0.05$); ②转染后 3, 7, 14 d, Nell-1+Noggin shRNA 组各成骨基因 mRNA 相对表达量均显著高于对照组和 Nell-1 组, 且 Nell-1 组高于对照组, 组间比较差异有显著性意义($P < 0.05$); ③转染后 14 d, Nell-1+Noggin shRNA 组呈现较多细胞聚集形成的结节, Nell-1 组钙结节数量少于 Nell-1+Noggin shRNA 组, 对照组未见明显被染色的钙结节; ④实验结果表明, Nell-1 基因可以促进大鼠脂肪间充质干细胞成骨分化, 而干扰 Noggin 基因会上调 Nell-1 基因的表达, 形成显著的协同成骨分化作用。

关键词:

Nell-1; Noggin; 共转染; 脂肪间充质干细胞; 成骨分化

中图分类号: R459.9; R394.2; R318

基金资助:

南京医科大学科技发展基金重点项目(2016NJMUZD069), 项目负责人: 丁涛

Liu Hao, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Wuxi 9th People's Hospital, Wuxi 214000, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Ding Tao, MD, Chief physician, Master's supervisor, Department of Orthopedics, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214000, Jiangsu Province, China

Co-transfection by *Nell-1* and *Noggin*-shRNA promotes osteoblast differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells

Liu Hao¹, Liu Jun¹, Rui Yongjun¹, Tang Fenglin², Lu Miao², Ding Tao² (¹Department of Orthopedics, Wuxi 9th People's Hospital, Wuxi 214000, Jiangsu Province, China; ²Department of Orthopedics, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214000, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: *Nell-1* can induce osteogenic differentiation and accelerate bone regeneration. However, little is reported about co-transfection by *Nell-1* and *Noggin*-shRNA.

OBJECTIVE: To observe the effects of simultaneously down-regulating *Noggin* and up-regulating *Nel*-like molecule-1(*Nell-1*) on osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells (ADSCs) *in vitro*.

METHODS: ADSCs were isolated and cultured *in vitro* from adipose tissue of healthy rats, and divided into three groups. ADSCs in control group were transfected with lentiviral (Lv)-enhanced green fluorescent protein. In *Nell-1* group, the cells were transfected with Lv-*Nell-1*. And in co-transfection group, the cells were co-transfected with Lv-*Nell-1* and Lv-*Noggin* shRNA. At 3, 7 and 14 days after transfection, *Nell-1* and osteogenesis-related genes (collagen type I, alkaline phosphatase and osteocalcin) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. At 14 days after transfection, ADSCs were detected by alizarin red staining.

RESULTS AND CONCLUSION: At 3 days after transfection, there was no significant difference in the *Nell-1* mRNA expression between the control and *Nell-1* groups ($P > 0.05$); and the *Nell-1* mRNA expression in the control and *Nell-1* groups was significantly lower than that in the co-transfection group ($P < 0.05$). At 7 and 14 days after transfection, the *Nell-1* mRNA expression was still lower in the control and *Nell-1* groups than in the co-transfection group, and moreover, the expression level in the *Nell-1* group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). At 3, 7, and 14 days after transfection, the levels of collagen type I, alkaline phosphatase and osteocalcin mRNA in the co-transfection group were significantly higher than those in the control and *Nell-1* groups, and these expression levels were also significantly higher in the *Nell*-group than in the control group ($P < 0.05$). At 14 days after transfection, there were more calcium nodules in the co-transfection group than in the *Nell-1* group, while no calcium nodules were observed in the control group. The overall results indicate that *Nell-1* can enhance the differentiation of ADSCs into osteoblasts, and interference with *Noggin* gene can upregulate the expression of *Nell-1*, thereby triggering a synergistic effect on osteogenic differentiation.

Key words: *Nell-1*; *Noggin*; co-transfection; adipose derived mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

Funding: the Major Project of Scientific Development Foundation of Nanjing Medical University, No. 2016NJMUZD069 (to DT)

0 引言 Introduction

临床上由于创伤、肿瘤或者骨感染导致的大段骨缺损越发常见,这也一直是困扰着骨科医师的难题之一^[1-3]。近年来,分子生物学及干细胞研究的不断深入,一系列成果有望从实验室走向临床,其中基因强化组织工程法修复大段骨缺损也是研究热点之一,成为目前实现临床转化很有前景的一种治疗手段^[4]。*Nell-1*(*Nel*-like molecule-1)是新近发现的一种具有促成骨作用的细胞因子^[5],其在新生儿颅骨早闭中扮演了重要的角色^[6-7]。有相关实验报道,*Nell-1*可以促进骨折愈合、牵张成骨及脊柱融合。*Nell-1*相对于骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)具有更强的促成骨分化能力,形成的新骨有更高的密度及强度。众所周知,在新骨形成过程中经典的骨形态发生蛋白信号通路发挥了巨大作用,而*Noggin*可以拮抗骨形态发生蛋白信号。*Noggin*在体内广泛表达,其起作用的方式主要是通过与骨形态发生蛋白特异性结合,从而导致骨形态发生蛋白和受体结合受阻,活性受到抑制,影响成骨^[8-9]。既往实验已经证明,*Noggin*可以抑制成骨细胞分化及其功能^[10-12]。作者猜想,既然*Nell-1*和骨形态发生蛋白一样,过表达能够促进骨再生,Wnt/ β -catenin信号通路是否有可能也参与了这一过程?*Noggin*是否同样可以抑制*Nell-1*的活性?据此该实验试图双管齐下,上调*Nell-1*并抑制*Noggin*的表达,理论上可以最大程度地强化干细胞的成骨分化能力,并为以后探索新的细胞因子组合提供实验基础。如果实验结果理想,将来还可以制备一种具有转化价值的生物制品,为临床修复大段骨缺损带来新的希望。故作者从正反2个方面着手,分别构建可以在脂肪间充质干细胞(adipose derived

stem cells, ADSCs)中高表达的*Nell-1*慢病毒载体及*Noggin*干扰载体,包装成重组慢病毒。将双基因重组慢病毒转染大鼠脂肪间充质干细胞,测定转染后成骨相关基因的表达,为基因强化组织工程法治疗大段骨缺损奠定实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察对照研究。

1.2 时间及地点 实验于2017年1月至2019年12月在南京医科大学附属无锡人民医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物及细胞株 健康成年雄性SD大鼠,体质量275 g左右,由南京医科大学实验动物中心提供。293FT细胞株由南京医科大学附属无锡人民医院中心实验室冻存。

1.3.2 实验试剂 I型胶原酶、茜素红、抗坏血酸、胰岛素、地塞米松(美国Sigma公司);慢病毒表达质粒(北京英茂盛业生物科技有限公司);*Nell-1*单克隆抗体、*Noggin*多克隆抗体、 β -actin(美国Santa Cruz公司);SYBR Green PCR Master Mix(苏州木芮生物科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 分离、培养、鉴定大鼠脂肪间充质干细胞 将SD大鼠颈处死后,取腹股沟脂肪组织,用PBS清洗后去除小血管及浅筋膜等结缔组织。将组织剪碎,转移至5 mL离心管,加入5倍于组织体积的0.1% I型胶原酶,放入37 °C的恒温振荡箱中消化1.0-1.5 h,加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM等体积中和,终止消化;1 500 r/min离心10 min,弃上清,沉淀物用含体积分数为10%胎牛血清的

DMEM重悬, 细胞计数, 按 2×10^5 /瓶的密度种植于 35 cm^2 培养瓶内, 置于培养箱中培养。采用流式细胞技术分析原代细胞表面抗原CD34、CD44、CD29、CD45、CD90、CD105的表达。

脂肪间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	大鼠腹股沟脂肪组织
原代培养方法:	I型胶原酶消化法
基础培养基:	DMEM培养基
添加材料:	含体积分数10%胎牛血清, 100 U/mL青霉素, 100 mg/L链霉素
原代培养时间:	原代细胞培养24 h后开始换液, 之后三四天换液1次
细胞传代:	培养5-8 d后细胞生长融合至80%-90%时, 开始传代。用含0.1 mmol/L EDTA-Na的2.5 g/L胰酶室温消化5 min, 用适量小牛血清终止消化反应, 用吸管轻轻吹打, 转入离心管中以1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 按1:3传代, 第3代细胞用于实验
细胞鉴定:	采用流式细胞技术鉴定
伦理学批准:	实验方案经无锡市人民医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为KT2017027

1.4.2 构建*Nell-1*表达载体 收集脂肪间充质干细胞, 抽提RNA, 进行体外反转录获得cDNA, 结合引物进行PCR扩增, 得到产物片段1 800 bp; 用*Xba* I/*Eco*R I酶切, 将*Nell-1*连接到质粒相应位点。酶切鉴定图谱见图1。

1.4.3 构建*Noggin* shRNA干扰载体 根据目的基因*Noggin*的序列, 合成1对shRNA寡核苷酸序列, 经退火使其变为双链。*Age* I/*Eco*R I双酶切后, 将*Noggin* shRNA连接到质粒的*Age* I/*Eco*R I位点, 连接转化后测序鉴定。序列见图2。

1.4.4 病毒包装 将慢病毒包装辅助质粒与构建的*Nell-1*、*Noggin* shRNA表达质粒共转染293FT细胞, 转染后48 h及72 h收集培养上清进行浓缩, 将上清离心后过滤, 包装出携带*Nell-1*以及*Noggin* shRNA的重组慢病毒(Lv-*Nell-1*、Lv-*Noggin* shRNA)。

1.4.5 基因转染 实验分为3组, 分别为对照组(Lv-EGFP转染脂肪间充质干细胞)、*Nell-1*组(Lv-*Nell-1*转染脂肪间充质干细胞)和*Nell-1*+*Noggin* shRNA组(Lv-*Nell-1*+Lv-*Noggin* shRNA转染脂肪间充质干细胞)。取生长状态良好的第3代脂肪间充质干细胞, 铺于6孔板上(3×10^5 /孔), 37°C 培养过夜, 吸去细胞原培养基, 加入1/2体积的慢病毒液, 8字混匀, 4-6 h后更换新鲜培养液, 两三天后观察荧光表达及细胞生长情况。转染前将病毒在冰上缓慢融化, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液稀释。

1.5 主要观察指标

1.5.1 *Nell-1*及成骨相关基因表达 转染后3, 7, 14 d收集各组细胞, 抽提RNA, 反转录为cDNA, 设计各基因相应引物。以GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算*Nell-1*及成骨相关标志物Col- I、ALP、OCN mRNA相对表达量, *Nell-1*的相对表达量间接反映了*Noggin*基因沉默的效率。

引物: GAPDH, 上游5'-ACT TTG TCA AGC TCA TTT

CC-3', 下游, 5'-TGC AGC GAA CTT TAT TGA TG-3'; *Nell-1*, 上游5'-CTG TGT GGC TCC TAA CAA GTG TG-3', 下游, 5'-GGA TTC TGG CAA TCA CAA GCT GCT-3'; Col- I, 上游5'-TGA ACG TGG TGT ACA AGG TC-3', 下游5'-CCA TCT TTA CCA GGA GAA CCA T-3'; ALP, 上游5'-CCC CAT GTG ATG GCG TAT-3', 下游5'-CGG TAG GGA GAG CAC AGC-3'; OCN, 上游5'-CCA AGC AGG AGG GCA ATA-3', 下游5'-TCG TCA CAA GCA GGG TCA-3'。

1.5.2 钙结节观察 转染后14 d, 各组细胞经PBS清洗后, 体积分数为95%乙醇固定, 0.1%茜素红染液染色, 再予以ddH₂O清洗, 显微镜下观察钙结节发生情况。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行分析。所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 基因转染效率 转染后2 d, 荧光倒置显微镜下观察到3组细胞荧光阳性比例均达到90%以上; 倒置相差显微镜下观察到3组细胞均生长状态良好, 表明慢病毒载体转染效率高, 对细胞生长未见不利影响, 见图3。

2.2 PCR检测结果

2.2.1 *Nell-1*基因表达 转染后3 d, 对照组*Nell-1* mRNA相对表达量与*Nell-1*组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。与*Nell-1*+*Noggin* shRNA组比较, 对照组和*Nell-1*组*Nell-1* mRNA表达量偏低, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。转染后7, 14 d, *Nell-1*+*Noggin* shRNA组*Nell-1* mRNA相对表达量仍高于对照组和*Nell-1*组, 且*Nell-1*组高于对照组, 两两比较差异均有显著性意义($P < 0.05$), 见图4。

2.2.2 成骨相关标志物表达 转染后3, 7, 14 d, *Nell-1*+*Noggin* shRNA组各成骨基因mRNA相对表达量均显著高于对照组和*Nell-1*组, 组间比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 转染后第7, 14天, *Nell-1*组高于对照组, 两组间比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图4。

2.3 钙结节能量 转染后14 d茜素红染色结果显示, *Nell-1*+*Noggin* shRNA组呈现较多细胞聚集形成的结节, *Nell-1*组钙结节能量数量少于*Nell-1*+*Noggin* shRNA组, 对照组未见明显被染色的钙结节, 见图5。

3 讨论 Discussion

近年来, 由于创伤、肿瘤甚至骨髓炎等原因引起的大段骨缺损在临床上越来越常见, 大面积骨缺损的修复始终是创伤骨科医师面临的难题, 也是患者致残的主要原因之一^[13-14]。治疗骨缺损最常用的方法是自体骨移植及同种异体骨移植, 但往往因为供区骨量不足、机体排斥反应等并发症使得临床疗效不佳。目前, 基因强化组织工程的发展日新月异, 在解决大段骨缺损修复这方面具有巨大潜力^[15-18]。该实验选择的脂肪间充质干细胞是由Zuk等首次提出, 具有取材方便、生长增殖能力强且具有多向分化潜能等优点^[19-20]。实验成功分离、培养了脂肪间充质干细胞并

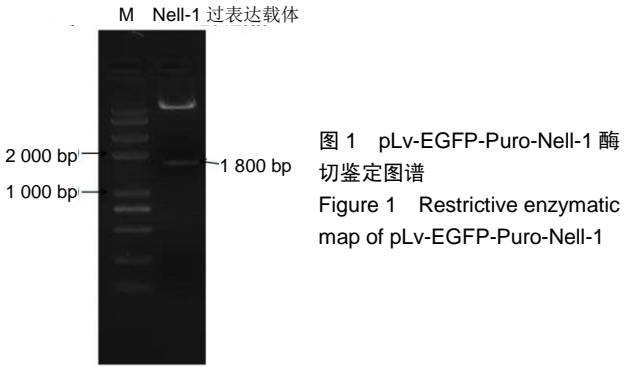
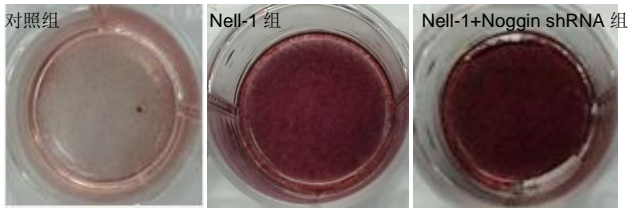


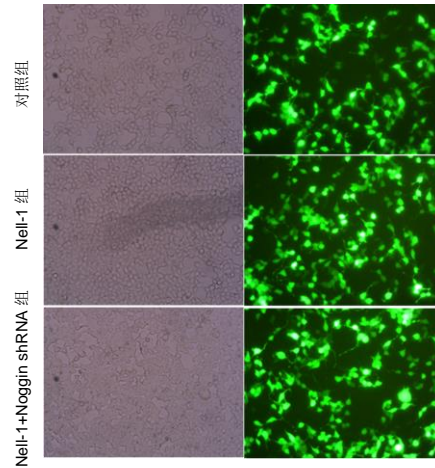
图1 pLv-EGFP-Puro-Nell-1 酶切鉴定图谱
Figure 1 Restrictive enzymatic map of pLv-EGFP-Puro-Nell-1



图注：大体观察 *Nell-1*+*Noggin* shRNA 组呈现较多细胞聚集形成的结节，*Nell-1* 组钙结节数量少于 *Nell-1*+*Noggin* shRNA 组，对照组未见明显被染色的钙结节

图5 转染后 14 d 各组脂肪间充质干细胞茜素红染色

Figure 5 Alizarin red staining of adipose derived mesenchymal stem cells at 14 days after transfection



图注：荧光倒置显微镜下观察到 3 组细胞荧光阳性比例均达到 90% 以上

图3 转染后 48 h 各组脂肪间充质干细胞荧光显微镜明场(左列)及荧光(右列)下形态观察($\times 200$)

Figure 3 Morphological characteristics of adipose derived mesenchymal stem cells under light field (left) and fluorescence (right) microscopes at 48 hours after transfection ($\times 200$)

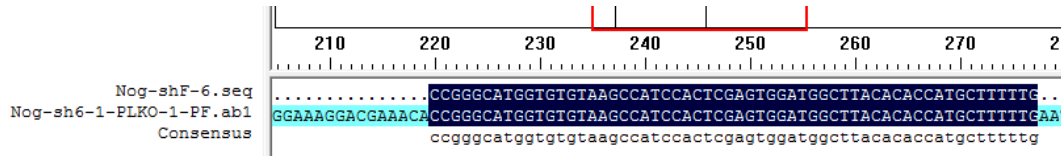
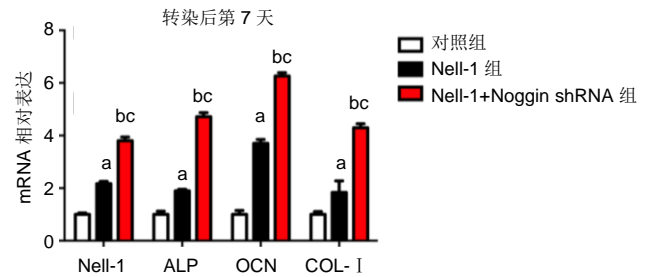
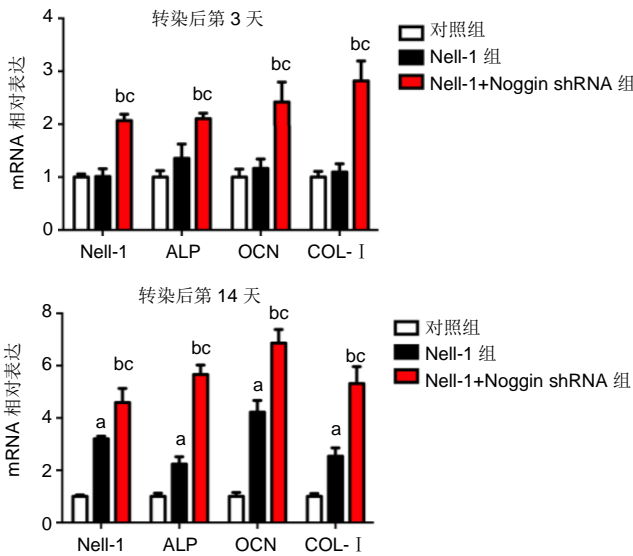


图2 *Noggin* shRNA 测序结果

Figure 2 Sequencing result of *Noggin* shRNA



图注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与 *Nell-1* 组比较，^c $P < 0.01$

图4 转染后第 3, 7, 14 天各组脂肪间充质干细胞 *Nell-1* 及成骨相关基因的表达

Figure 4 Expression of *Nell-1* and osteogenesis-related genes in adipose derived mesenchymal stem cells at 3, 7, and 14 days after transfection

进行细胞来源鉴定。骨诱导因子是指一种能够促进间充质干细胞生长、增殖、成骨分化和基质合成的一种蛋白质或多肽。*Nell-1*就是新近发现的一种骨诱导因子，引起了学者的广泛关注^[21-23]。动物实验已经证明*Nell-1*可以修复颅骨及颌骨缺损甚至促进脊椎椎间融合。实验结果显示，*Nell-1*组成骨相关标志物的表达量高于对照组，也初步验证了*Nell-1*能够促进大鼠脂肪间充质干细胞诱导成骨分化。*Noggin*是与骨形态发生蛋白最具有亲和力的拮抗剂，通过阻挡骨形态发生蛋白与其受体结合，从而抑制骨形成的过程^[24-26]。作者猜想，*Nell-1*作为新发现的成骨诱导因子，是

否与骨形态发生蛋白存在共同的信号通路？*Noggin*是否对其同样具有拮抗作用？该实验通过构建慢病毒干扰载体 *Lv-Noggin* shRNA 来下调 *Noggin* 基因的表达，并且联合 *Nell-1* 基因过表达的方式，结果发现 *Nell-1*+*Noggin* shRNA 组 *Nell-1* mRNA 相对表达量明显上升。但该实验设计仍有不足之处：没有设立单纯下调 *Noggin* 的实验组，使得对照结果的说服力欠佳^[27-28]。接下来将进一步完善实验设计，并行 Western blot 检测 *Nell-1* 蛋白的表达及碱性磷酸酶组织化学染色^[29-31]，增加实验结论的可靠性。既往研究中大多数学者采用单纯转染 1 种骨诱导因子的方式，而该实验中

联合转染2种基因, 可以产生协同诱导成骨作用。另外没有选择2种正向基因简单叠加, 而是从正、反2个方向同时干预, 初步实验结果令人满意。作者认为: 基因强化组织工程法治疗大段骨缺损具有走出实验室应用于临床的巨大潜力, 值得进一步深入研究。

作者贡献: 实验设计为通讯作者, 实验实施为第一、四、五作者, 资料收集及实验评估为第一、二、三作者及通讯作者。

经费支持: 该文章接受了“南京医科大学科技发展基金重点项目(2016NJMUZD069)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经无锡市人民医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 KT2017027。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过南京医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] KARALASHVILI L, KAKABADZE A, UHRYN M, et al. Bone grafts for reconstruction of bone defects (Review). *Georgian Med News*. 2018; (282):44-49.

[2] LOCKER PH, ARTHUR J, EDMISTON T, et al. Management of Bone Defects in Orthopedic Trauma. *Bull Hosp Jt Dis* (2013). 2018;76(1): 278-284.

[3] ORYAN A, ALIDADI S. Reconstruction of radial bone defect in rat by calcium silicate biomaterials. *Life Sci*. 2018;201:45-53.

[4] JAMES AW, ZARA JN, ZHANG X, et al. Perivascular stem cells: a prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(6):510-519.

[5] ASKARINAM A, JAMES AW, ZARA JN, et al. Human perivascular stem cells show enhanced osteogenesis and vasculogenesis with *Nel-like molecule 1* protein. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(11-12): 1386-1397.

[6] HUANG X, CEN X, ZHANG B, et al. The roles of *circRFWD2* and *circINO80* during *NELL-1*-induced osteogenesis. *J Cell Mol Med*. 2019;23(12):8432-8441.

[7] JAMES AW, PANG S, ASKARINAM A, et al. Additive effects of sonic hedgehog and *Nell-1* signaling in osteogenic versus adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2012;21(12):2170-2178.

[8] ALSHAIBI HF, AHMED F, BUCKLE C, et al. The BMP antagonist *Noggin* is produced by osteoblasts in response to the presence of prostate cancer cells. *Biotechnol Appl Biochem*. 2018;65(3):407-418.

[9] ANASTASILAKIS AD, POLYZOS SA, MAKRAS P, et al. Circulating *noggin* levels following treatment with *denosumab* or *teriparatide* in postmenopausal women with low bone mass. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2019;19(3):253-257.

[10] BLÁZQUEZ-MEDELA AM, JUMABAY M, RAJBHANDARI P, et al. *Noggin* depletion in adipocytes promotes obesity in mice. *Mol Metab*. 2019;25:50-63.

[11] JANI P, ZHANG H, BENSON MD, et al. *Noggin* inhibition of mouse dentinogenesis. *J Oral Biosci*. 2019 Dec 17. doi: 10.1016/j.job.2019.11.001. [Epub ahead of print]

[12] GHADAKZADEH S, HAMDY RC, TABRIZIAN M. Efficient in vitro delivery of *Noggin* siRNA enhances osteoblastogenesis. *Heliyon*. 2017;3(11):e00450.

[13] NAUTH A, SCHEMITSCH E, NORRIS B, et al. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *J Orthop Trauma*. 2018;32 Suppl 1:S7-S11.

[14] ORYAN A, ALIDADI S, BIGHAM-SADEGH A, et al. Healing potentials of polymethylmethacrylate bone cement combined with platelet gel in the critical-sized radial bone defect of rats. *PLoS One*. 2018;13(4): e0194751.

[15] BETZ VM, KOCHANNEK S, RAMMELT S, et al. Recent advances in gene-enhanced bone tissue engineering. *J Gene Med*. 2018;20(6): e3018.

[16] GOONOO N, JEETAH R, BHAW-LUXIMON A, et al. Polydioxanone-based bio-materials for tissue engineering and drug/gene delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015; 97(Pt B):371-391.

[17] LAM GC, SEFTON MV. Harnessing gene and drug delivery for vascularizing engineered tissue platforms. *Drug Discov Today*. 2016;21(9):1532-1539.

[18] STEFANI I, ASNAGHI MA, COOPER-WHITE JJ, et al. A double chamber rotating bioreactor for enhanced tubular tissue generation from human mesenchymal stem cells: a promising tool for vascular tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(1):e42-e52.

[19] BACAKOVA L, ZARUBOVA J, TRAVNICKOVA M, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv*. 2018;36(4): 1111-1126.

[20] NADERI N, COMBELLACK EJ, GRIFFIN M, et al. The regenerative role of adipose-derived stem cells (ADSC) in plastic and reconstructive surgery. *Int Wound J*. 2017;14(1):112-124.

[21] JAMES AW, SHEN J, TSUEI R, et al. *NELL-1* induces *Sca-1+* mesenchymal progenitor cell expansion in models of bone maintenance and repair. *JCI Insight*. 2017;2(12): 92573.

[22] JAMES AW, SHEN J, ZHANG X, et al. *NELL-1* in the treatment of osteoporotic bone loss. *Nat Commun*. 2015;6:7362.

[23] PAKVASA M, ALVERDY A, MOSTAFA S, et al. Neural EGF-like protein 1 (*NELL-1*): Signaling crosstalk in mesenchymal stem cells and applications in regenerative medicine. *Genes Dis*. 2017;4(3):127-137.

[24] POLYZOS SA, KOUNTOURAS J, ANASTASILAKIS AD, et al. *Noggin* levels in nonalcoholic fatty liver disease: the effect of vitamin E treatment. *Hormones (Athens)*. 2018;17(4):573-579.

[25] RAMASAMY SK, KUSUMBE AP, WANG L, et al. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature*. 2014;507(7492):376-380.

[26] SHIN JA, KIM YA, KIM HW, et al. Iron released from reactive microglia by *noggin* improves myelin repair in the ischemic brain. *Neuropharmacology*. 2018;133:202-215.

[27] VOSKARIDOU E, NTANASIS-STATHOPOULOS I, CHRISTOULAS D, et al. *Denosumab* effects on serum levels of the bone morphogenetic proteins antagonist *noggin* in patients with transfusion-dependent thalassemia and osteoporosis. *Hematology*. 2019;24(1):318-324.

[28] YUREKLI BS, KOCABAS GU, AKSIT M, et al. The low levels of bone morphogenetic protein-4 and its antagonist *noggin* in type 2 diabetes. *Hormones (Athens)*. 2018;17(2):247-253.

[29] MA X, DU C, SHANG M, et al. VS2 quantum dot label-free fluorescent probe for sensitive and selective detection of ALP. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(5):1417-1426.

[30] PARK CS, HA TH, KIM M, et al. Fast and sensitive near-infrared fluorescent probes for ALP detection and 3d printed calcium phosphate scaffold imaging in vivo. *Biosens Bioelectron*. 2018;105: 151-158.

[31] UM S, LEE JH, SEO BM. TGF- β 2 downregulates osteogenesis under inflammatory conditions in dental follicle stem cells. *Int J Oral Sci*. 2018; 10(3):29.