

# SFRP5 抑制 BMP9 诱导人脐带间充质干细胞成骨分化的实验研究<sup>\*</sup>

郑妍 姚欢 杨珂<sup>\*\*</sup>

(重庆医科大学附属儿童儿科研究所 儿童发育疾病研究教育部重点实验室 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地  
儿科学重庆市重点实验室 重庆市干细胞治疗工程技术研究中心 重庆 400014)

**摘要** 目的:探讨脂肪因子分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-related protein 5, SFRP5)对骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导人脐带间充质干细胞(human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)成骨分化的影响。方法:将人脐带间充质干细胞根据不同的处理因素分为4组:对照组、BMP9组、BMP9+SFRP5组和SFRP5组;分别在3天、5天和7天进行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性读数,7天进行ALP染色,21天进行茜素红染色检测钙盐沉积及油红O染色;收集不同组的细胞用于裸鼠皮下注射成骨模型的建立,4周后取出离体骨进行Micro-CT扫描和分析,获取的标本进行HE、Masson染色,Alcian blue染色及油红O染色检测。Western blot检测成骨分化相关蛋白Runx2和OPN的表达。结果:BMP9组的ALP活性读数和染色结果和茜素红染色结果均较对照组增加,而BMP9+SFRP5组则较BMP9组降低;BMP9处理后出现少量脂滴,而BMP9+SFRP5组脂滴明显增加,SFRP5组脂滴最多;裸鼠皮下注射成骨模型的观察结果显示,对照组和SFRP5组没有形成肉眼可见的皮下包块,BMP9组和BMP9+SFRP5组能生成异位骨;4周后观测大体标本以及进行MicroCT检测,发现BMP9+SFRP5组的骨密度值小于BMP9组( $P<0.05$ )。HE、Masson染色,Alcian blue染色结果显示,BMP9组的骨分化程度大于BMP9+SFRP5,油红O染色结果示BMP9+SFRP5组有较多的成脂分化;SFRP5能抑制BMP9诱导的Runx2、OPN的蛋白质表达。结论:SFRP5抑制BMP9诱导的人脐带间充质干细胞成骨分化。

**关键词** 间充质干细胞 分泌型卷曲相关蛋白5 骨形态发生蛋白9

**中图分类号** R394.2 R68

脂肪因子是一类由脂肪细胞分泌的细胞因子或激素,脂肪组织可以通过分泌多种脂肪因子参与骨代谢,影响间充质干细胞的成骨分化<sup>[1-2]</sup>。衰老和肥胖引起的骨髓腔内脂肪细胞的增加,会减弱间充质干细胞在局部的成骨分化能力<sup>[3]</sup>。SFRP5属于分泌卷曲相关蛋白家族中的一员,是一类新发现的脂肪因子。SFRP5的表达与脂肪细胞分化及肥胖相关,其在前体脂肪细

胞分化成熟过程中被强烈诱导表达,肥胖时在脂肪细胞中的表达也增加<sup>[4]</sup>。最近研究发现,骨髓中SFRP5的表达水平与骨形成标志密切相关,可能抑制骨的形成<sup>[5]</sup>。

人脐带间充质干细胞是成体干细胞的一种,其良好的成骨分化能力在骨组织损伤修复中具有广泛的应用前景<sup>[6]</sup>。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)在器官发育、干细胞增殖和多向分化过程中起着重要的作用,其中BMP9诱导MSCs成骨分化能力明显强于其他家族成员,可以促进小鼠间充质干细胞和人脐带间充质细胞的成骨分化<sup>[7-8]</sup>,具有潜在临床

收稿日期:2018-01-19 修回日期:2018-03-18

<sup>\*</sup> 重庆市科委自然科学基金(cstc2017jcyjAX1071, cstc2014jcyjA10090)

资助项目

<sup>\*\*</sup>通讯作者,电子信箱:361885986@qq.com

应用前景。骨髓内的脂肪能够通过旁分泌作用抑制 BMP 信号通路,从而抑制间充质干细胞的成骨分化<sup>[9]</sup>,但具体作用的因子并不清楚。

因此,本研究探讨 SFRP5 是否可以调节 BMP9 诱导的间充质干细胞的成骨过程,有助于深入了解 BMP9 促进间充质干细胞的成骨过程,为有效利用干细胞移植治疗骨组织疾病提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞及病毒 hUC-MSCs 来源于重庆市干细胞治疗工程技术研究中心,重组腺病毒由美国芝加哥大学分子肿瘤研究室惠赠,包括过表达 BMP9 (AdBMP9)、过表达红色荧光蛋白 (AdRFP)、过表达绿色荧光蛋白 (AdGFP) 和过表达 SFRP5 (AdSFRP5)。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司;茜素红 S、油红 O 等均购自 Sigma 公司;ALP 化学发光检测试剂盒和 ALP 染色试剂盒购自 BD 公司;Alcian Blue 染色试剂盒、Masson Trichrome 染色试剂盒购自北京雷根生物技术有限公司。裸鼠购于重庆医科大学,饲养于重庆医科大学儿童医院动物实验中心,雌性,4~6 周龄。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞分组 将 hUC-MSCs 以 50% 的密度接种于 24 孔板,待细胞贴壁后按分组加入腺病毒:对照组 (AdRFP + AdGFP)、BMP9 组 (AdRFP + AdBMP9)、BMP9 + SFRP5 组 (AdBMP9 + AdSFRP5)、SFRP5 组 (AdGFP + AdSFRP5),感染 24h 后,荧光显微镜检测 GFP 或 RFP 的表达情况以观察每组病毒的感染率。

1.2.2 碱性磷酸酶活性的检测 各组细胞分组处理后第 3 天、第 5 天、第 7 天,分别检测各组碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性,吸去培养基, PBS 轻洗后,每孔加 100  $\mu$ l 细胞裂解液,静置 5min 后离心,取上清 5  $\mu$ l 加至 EP 管,再加入 LUPO buffer 15  $\mu$ l 和 ALP 底物 5  $\mu$ l,混合均匀后,室温下避光静置 30min,于光吸收酶标仪检测并记录。采用 BCA 法检测细胞内总蛋白质含量,校正结果。

1.2.3 ALP 染色 各组细胞分组处理后第 7 天,进行 ALP 染色,吸去培养基, PBS 轻洗 3 遍后,4% 多聚甲醛固定约 1min,配制染液,染液由 aphanthol AS-MX 和去离子水加少量的 Fast blue RR salt 组成,混匀使其成淡黄色, PBS 轻洗后,加入混合染液 250  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 避光静置 30min;

PBS 洗涤,在显微镜下观察,阳性染色呈蓝紫色。

1.2.4 油红 O 染色 各组细胞分组处理后第 21 天,将油红 O 储存液与 ddH<sub>2</sub>O 按 3:2 将两者混合均匀,滤纸滤过两遍后待用,吸弃培养基后 PBS 轻洗,4% 多聚甲醛固定后,再用 PBS 轻洗 2~3 遍,每孔加入足量油红 O 工作液直至完全浸没细胞,室温静置 30min, PBS 洗涤,显微镜下观察,阳性染色呈红色脂滴。

1.2.5 茜素红 S 染色检测钙盐沉积 各组细胞分组处理后第 21 天,吸弃培养基, PBS 轻洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定;弃去甲醛, PBS 洗涤 3 遍,每孔加入足量的 2% 的茜素红 S,37 $^{\circ}$ C 静置 30min, PBS 洗涤。在显微镜下观察,红色沉淀为阳性。

1.2.6 蛋白质提取及 Western blot 检测 用冰 PBS 洗涤细胞 3 次,将残余液体吸净,加入 200  $\mu$ l 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 5min;用细胞刮将细胞全部刮下,移入 1.5ml EP 管中;低温离心机 5 000r/min 离心 20min,小心取上清液至另一个 EP 管中,并加入 50  $\mu$ l 的 5  $\times$  蛋白质上样缓冲液,最后 100 $^{\circ}$ C 沸水浴 10min,分装后置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。配制浓缩胶和分离胶,100V 恒压电压下 SDS-PAGE,210mA 恒流电流转膜,分别加一抗兔抗小鼠 OPN (1:1 000)、兔抗小鼠 Runx2 (1:1 000) 和兔抗小鼠 GAPDH (1:1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后加入二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (1:1 000) 孵育、洗膜,化学法发光底物进行显影。

1.2.7 裸鼠皮下异位成骨模型 将人脐带间充质干细胞以 50% 的细胞密度接种至 100mm<sup>2</sup> 培养皿中,待细胞贴壁后根据分组用腺感染细胞,感染合适后 2 天收集细胞,离心后加入 PBS 重悬细胞并计数,调整浓度至 5  $\times$  10<sup>7</sup> 个/ml,于裸鼠背部皮下注射点,每 3~5 天观察裸鼠状态及皮下成骨包块生长情况,4 周左右后处死,分离皮下包块并用 10% 的福尔马林固定,进行 MicroCT 扫描和三维重建。

1.2.8 成骨包块的组织化学染色 将分组后的标本进行脱钙处理 3~5 天,每日换液 1 次, PBS 浸泡 2h,将脱钙后的标本一部分进行脱水包埋,以 5  $\mu$ m 厚度切取并制成切片,按操作说明分别作 HE、Masson Trichrome 染色和 Alcian Blue 染色并观察。另一部分进行冰冻切片,以 10  $\mu$ m 厚度切取并制成切片,按操作进行油红 O 染色并观察。

### 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, $P < 0.05$  为差异有显著。

2 结 果

2.1 SFRP5 抑制 BMP9 诱导的 hUC-MSCs 的早期成骨分化

各组细胞处理第 3 天、第 5 天、第 7 天进行 ALP 活

性测定,BMP9 组较对照组 ALP 活性读数明显上升;与 BMP9 组相比,SFRP5 组和 BMP9 组 ALP 的活性受到抑制( $P < 0.05$ ),而 SFRP5 组 ALP 活性较对照组没有明显变化。7 天后进行 ALP 染色,SFRP5 + BMP9 组的染色比 BMP9 组明显降低,而对照组和 SFRP5 组未见明显染色(图 1)。

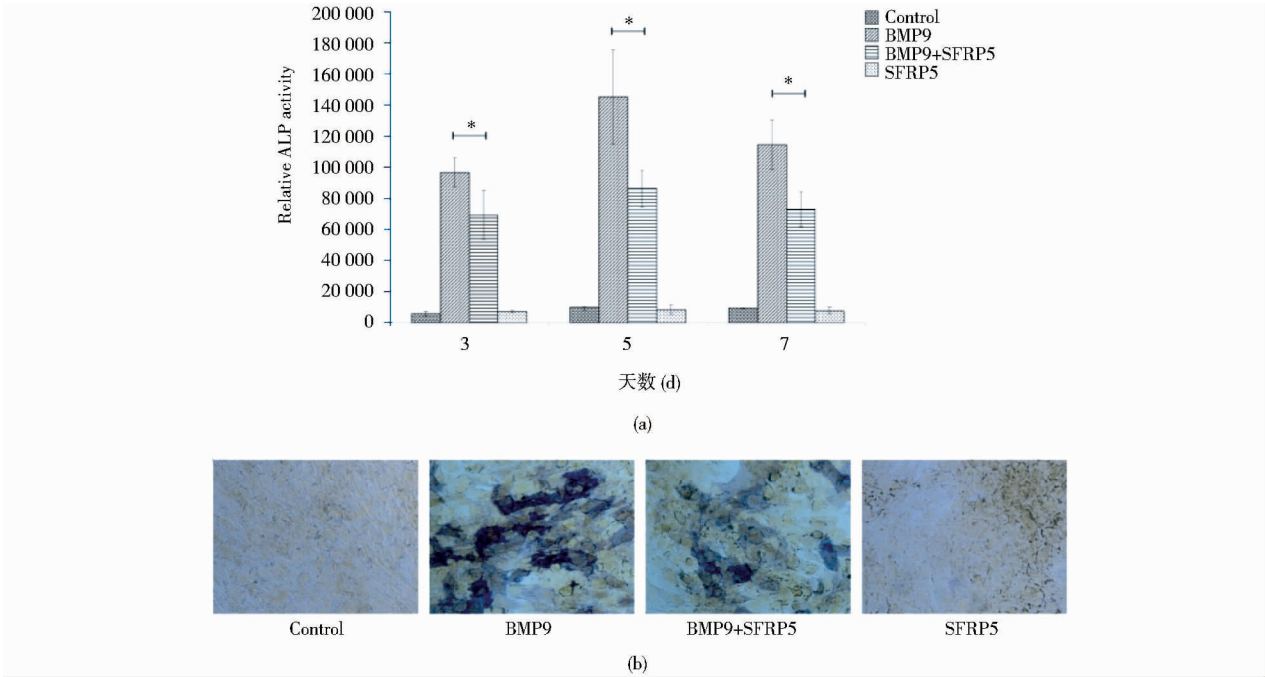


图 1 SFRP5 对 BMP9 诱导的 hUC-MSCs 细胞的成骨分化早期指标 ALP 活性的影响

Fig.1 SFRP5 inhibited ALP activity induced by BMP9 in hUC-MSCs

(a) SFRP5 inhibited BMP9 induced ALP activity in hUC-MSCs which were determined by ALP quantification assay (\*  $P < 0.05$ ) (b) SFRP5 inhibited BMP9 induced ALP activity in hUC-MSCs which were determined by ALP staining assay (200 ×)

2.2 SFRP5 抑制 BMP9 诱导的 hUC-MSCs 的晚期成骨分化

茜素红 S 染色形成的红色钙盐沉积是常见的晚期

成骨的指标,各组处理后培养至 21 天进行茜素红 S 染色处理, BMP9 + SFRP5 组与 BMP9 组相对比钙盐结节明显降低,而对照组和 SFRP5 组未见明显染色(图 2)。

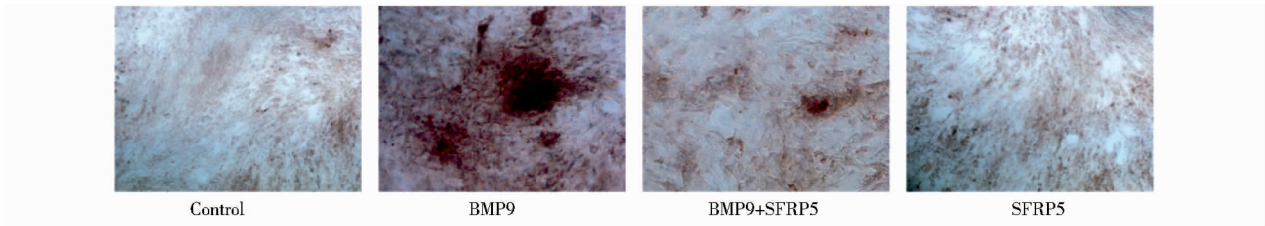


图 2 SFRP5 对 BMP9 诱导的 hUC-MSCs 细胞的成骨分化晚期指标茜素红 S 染色的影响 (200 ×)

Fig.2 SFRP5 inhibited alizarin red S staining induced by BMP9 in hUC-MSCs

SFRP5 inhibited BMP9 induced calcium deposition in hUC-MSCs which were determined by alizarin red S staining (200 ×)

### 2.3 SFRP5 对 BMP9 诱导的 hUC-MSCs 成脂分化的影响

将处理后各组细胞培养至 21 天进行油红 O 染色,结果显示 BMP9 处理后出现少量脂滴,而 BMP9 + SFRP5 组脂滴明显增加,SFRP5 组脂滴最多(图 3)。

### 2.4 SFRP5 对 BMP9 诱导的 hUC-MSCs 体内骨组织形成

按照分组处理细胞并裸鼠皮下注射,21 天后观察,对照组和 SFRP5 组裸鼠背部皮下基本无法发现包块,而 BMP9 组和 BMP9 + SFRP5 组细胞注射组的皮下逐渐形成肉眼可见包块。将皮下分离得到异位骨组织经 MicroCT 扫描和图像三维重建分析,BMP9 组较 BMP9 + SFRP5 组形成的异位骨骨量明显增加,BMP9 组骨密度为  $(452.37 \pm 10.69) \text{ mg/cm}^3$ ,显著高于 BMP9 + SFRP5 组  $(413.89 \pm 7.79) \text{ mg/cm}^3$  ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

### 2.5 SFRP5 抑制 BMP9 诱导的 hUC-MSCs 体内成骨分化

HE 染色显示 BMP9 组较 BMP9 + SFRP5 组出现较多的成熟骨基质及骨小梁,连接成网状或梁状。Alcian blue 和 Masson trichrome 染色显示,BMP9 组可见大量成熟骨基质及骨小梁,染色呈较深的蓝绿色,也可见大量含丰富透明质酸的未成熟骨基质、未成熟骨小梁及软骨样细胞,呈较浅的蓝绿色,较 BMP9 + SFRP5 组丰富。油红 O 染色显示 BMP9 组可见骨小梁形成的网状结构中有红色脂滴形成,BMP9 + SFRP5 组可见大量脂滴形成,较 BMP9 组增多,骨小梁及骨基质较 BMP9 组减少(图 5)。

### 2.6 SFRP5 抑制 BMP9 诱导的 hUC-MSCs 成骨相关蛋白的表达

Western blot 检测 Runx2、OPN 成骨相关蛋白水平。结果显示,与对照组相比,BMP9 能明显上调 Runx2、OPN 的蛋白质水平,SFRP5 能抑制 BMP9 诱导的 Runx2、OPN 的蛋白质表达(图 6)。

## 3 讨论

人脐带间充质干细胞具有良好的自我更新和多向分化潜能,随着其在再生医学中应用和研究的深入,在骨组织工程人工骨的种子细胞来源问题上提供了新的可行性途径。骨形成发生蛋白(BMPs)是 TGF- $\beta$  超家族中的成员,在骨的形成和发展及分化中起着至关重要的作用。BMP9 被认为是诱导 MSCs 分化最具潜力的因子,在临床前实验发现,相对于其他 BMP 家族成员,

BMP9 重组蛋白的有效使用剂量最低,并减少非特异性矿化结节形成<sup>[7]</sup>。我们采用腺病毒载体介导 BMP9 对 hUC-MSCs 进行体内和体外成骨诱导分化,21 天后可见明显的钙盐沉积,裸鼠皮下成骨结果也显示明显的皮下包块,组织学检测显示 BMP9 诱导生成的异位骨中形成部分成熟的骨基质和骨小梁。

脂肪组织一直被简单的认为只是能量的储存器官,现在认为,脂肪细胞可以作为一种内分泌器官产生一些分泌性的蛋白质。这些脂肪因子可以通过影响成骨细胞的形成而影响骨的自稳性<sup>[3]</sup>。移植入体内异位成骨种子细胞的存活、增殖、分化的功能主要依靠周边体液分泌提供营养,脐带间充质干细胞移植在骨修复过程中也受骨局部微环境的影响。一些研究显示,增加骨髓脂肪细胞可以改变骨髓内间充质干细胞的分化能力,使其倾向于向脂肪细胞分化。骨髓的脂肪细胞可以通过旁分泌作用抑制间充质干细胞向成骨细胞分化,这是通过抑制 BMP 信号通路发挥作用的,然而旁分泌的具体因子并不清楚<sup>[9]</sup>。SFRP5 是由脂肪组织分泌的一种脂肪因子,在高脂喂养的小鼠脂肪组织中,SFRP5 的表达量明显上调,其 mRNA 水平在脂肪细胞的分化过程中也逐渐升高<sup>[10]</sup>。本实验通过体内和体外实验发现 SFRP5 能够抑制 BMP9 的诱导人脐带间充质干细胞的成骨过程,提示脂肪因子 SFRP5 调节的信号通路与 BMP9 调控成骨分化过程的信号通路可能存在一定的联系。

MSCs 具有同时向成骨细胞和成脂细胞分化的能力,成骨和成脂分化的平衡是骨代谢及维持骨健康重要的因素之一。Wnt 信号在 BMSCs 向成骨分化的过程中起着重要作用,在维持成骨细胞和脂肪细胞分化的平衡中扮演关键角色<sup>[11]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径影响 BMSCs 的增殖、迁移,并调控其分化方向。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是通过调控特定类型细胞转录因子的相对水平促进成骨细胞形成、减少成脂分化而被激活的。SFRP 家族成员可与受体竞争结合 Wnt 蛋白或者直接与 Wnt 蛋白结合,从而阻断 Wnt 信号转导<sup>[12]</sup>。敲除小鼠体内 SFRP1 后,发现其骨小梁体积和骨量显著增加,成骨细胞及软骨细胞凋亡下降,骨髓向成骨细胞分化增加。本实验发现 SFRP5 能促进脐带间充质干细胞的成脂分化,因此 SFRP5 破坏了成骨和成脂的平衡,从而抑制 BMP9 的成骨分化,这一过程可能与 SFRP5 抑制 Wnt 经典通路有关。

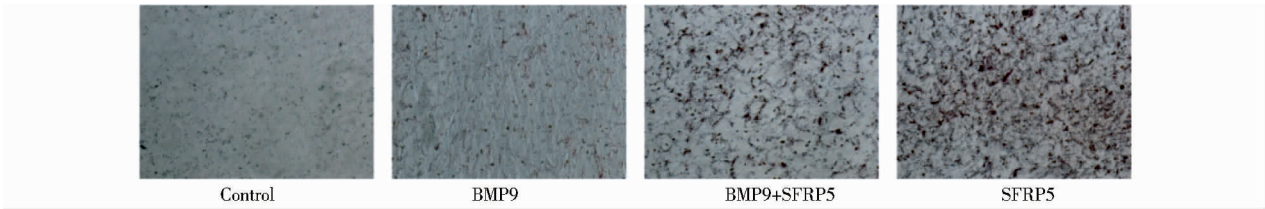


图3 SFRP5对BMP9诱导的hUC-MSCs细胞的油红O染色(200×)

Fig.3 SFRP5 promoted adipogenesis induced by BMP9 in hUC-MSCs

SFRP5 promoted BMP9 induced adipogenesis in hUC-MSCs which were determined by Oil red staining(200×)

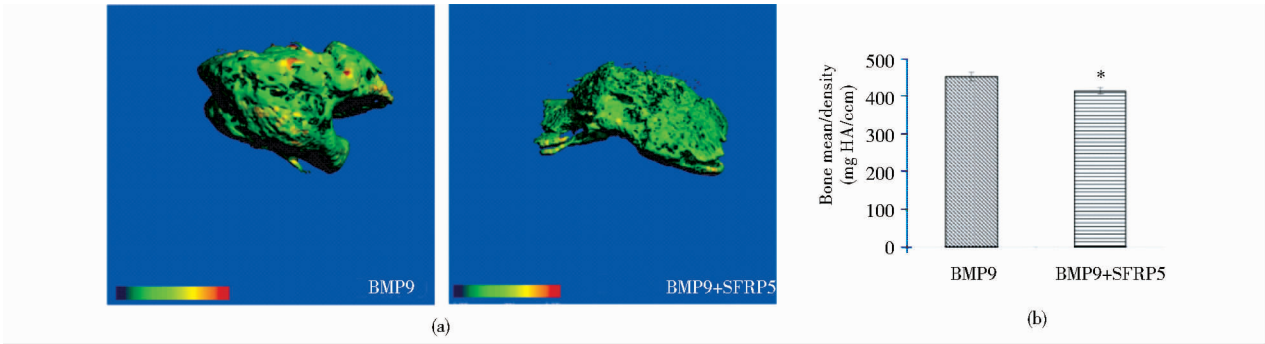


图4 SFRP5对BMP9诱导的hUC-MSCs细胞的裸鼠异位成骨MicroCT扫描、重建及分析

Fig.4 MicroCT scanning and analysis of bone mass formed by subcutaneously injection of hUC-MSCs

(a) Ectopic bone formed in subcutaneous tissue (b) Statistical analysis of bone mineral density averages

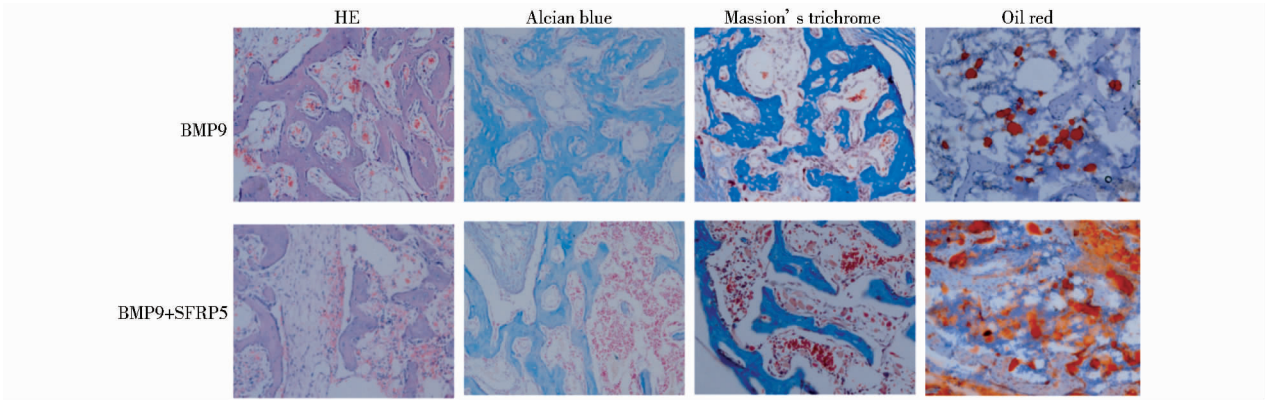


图5 SFRP5对BMP9诱导的hUC-MSCs裸鼠异位成骨组织的染色

Fig.5 Histochemical staining of the bone mass formed by subcutaneously injection of primary hUC-MSCs

BMPs是TGF- $\beta$ 超家族中的成员,在骨的形成和发展及分化中起着至关重要的作用。BMPs-Smad经典信号通路主要为BMPs和受体结合,使Smad1/5/8磷酸化,p-Smad1/5/8与Smad4结合形成复合物转移至细胞核,与下游靶基因启动子元件结合,调控下游靶基因的转录<sup>[13-14]</sup>。研究发现,SFRP也参与BMP信号通路的调节。SFRP2能够通过抑制间充质干细胞中Smad1/5/8的磷酸化水平,而抑制间充质干细胞的成骨分

化<sup>[15]</sup>。Runx2是BMP诱导MSCs向成骨分化过程中重要的转录因子,本实验发现SFRP5能抑制BMP9所介导的Runx2表达的增加,可能是SFRP5抑制BMP9成骨作用的重要因素之一。

综上,该研究初步证实了SFRP5可以抑制BMP9诱导的人脐带间充质干细胞向成骨分化的能力。SFRP5促进MSCs的成脂分化,通过调节成骨与成脂的平衡,抑制BMP9诱导成骨分化过程中相关信号分子和



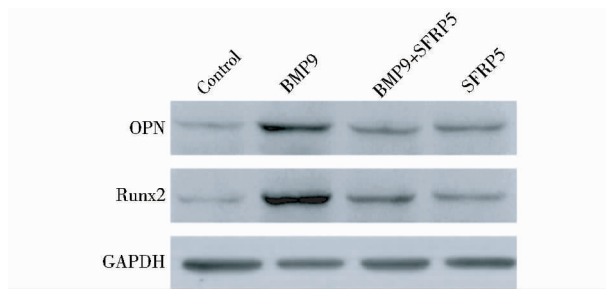


图6 SFRP5对BMP9诱导的成骨相关蛋白的影响

Fig.6 Western-blot of the bone mass formed by subcutaneously injection of primary UC-MSCs

成骨分化的过程。

### 参考文献

- [ 1 ] Sadie-Van G H, Crowther N J, Hough F S, et al. The interrelationship between bone and fat: from cellular see-saw to endocrine reciprocity. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(13): 2331-2349.
- [ 2 ] Sheu Y, Cauley J A. The role of bone marrow and visceral fat on bone metabolism. *Curr Osteoporos Rep*, 2011, 9(2): 67-75.
- [ 3 ] Thomas H A, Antonio S, Antonia G, et al. Adipocyte accumulation in the bone marrow during obesity and aging impairs stem cell-based hematopoietic and bone regeneration. *Stem Cell*, 2017, 20(6): 771-784.
- [ 4 ] Hu W, Li L, Yang M, et al. Circulating SFRP5 is a signature of obesity-related. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(1): 290-298.
- [ 5 ] Chen H, He Y, Wu D, et al. Bone marrow SFRP5 level is negatively associated with bone formation markers. *Osteoporos Int*, 2017, 28(4): 1305-1311.
- [ 6 ] Li T, Xia M, Gao Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(9): 1293-1306.
- [ 7 ] 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. *Gene Ther*, 2004, 11(17): 1312-1320.
- [ 8 ] 李娅莎, 刘星, 毕杨, 等. BMP9 诱导人脐带间充质干细胞体内成骨分化的作用研究. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(5): 20-26.  
Li Y S, Liu X, Bi Y, et al. Effect of BMP9 on osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro* and *in vivo*. *China Biotechnology*, 2016, 36(5): 20-26.
- [ 9 ] Abdallah B M. Marrow adipocytes inhibit the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts via suppressing BMP-signaling. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 11.
- [ 10 ] Robert A K, Larissa N, Jessica H, et al. Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice. *PLoS Genet*, 2006, 2(5): e81.
- [ 11 ] Taipalesnmaki H, Abdalla B M, Aidahrnash A, et al. Wnt signaling mediates the crosstalk between bone marrow derived pre-adipocytic and pre-osteoblastic cell populations. *Exp Cell Res*, 2011, 317(6): 745-756.
- [ 12 ] Cruciat C M, Niehrs C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(3): a015081.
- [ 13 ] Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling crosstalk. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(3): 251-263.
- [ 14 ] Long L, Ormiston M L, Yang X, et al. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat Med*, 2015, 21(7): 777-785.
- [ 15 ] Alfaro M P, Vincent A, Saraswati S, et al. SFRP2 suppression of bone morphogenic protein (BMP) and Wnt signaling mediates mesenchymal stem cell (MSC) self-renewal promoting engraftment and myocardial repair. *J Biol Chem*, 2010, 285(46): 35645-35653.

## SFRP5 Inhibites Osteogenic Differentiation of Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Induced by BMP9

ZHENG Yan YAO Huan YANG Ke

(Department of Pediatric Research Institute, Children's Hospital of Chongqing Medical University,  
Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and  
Technology Cooperation Base of Child development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics,  
Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy, Chongqing 400014, China)

**Abstract** Objectives: To determine the role of SFRP5 in bone morphogenetic proteins 9 (BMP9)—mediated osteogenesis in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs). Methods: The hUC-MSCs are divided into control group, BMP9 group, BMP9 + SFRP5 group and SFRP5 group. Alkaline phosphatase (ALP) activity was carried out on 3, 5 and 7 days respectively; while ALP staining on 7 days. Aizarin red staining and oil red O staining were detected on 21 days. Different groups of cells were collected for subcutaneous injection in nude mice. After 4 weeks, the ectopic bone formation was analyzed by micro-CT scanning. The specimens were stained with H. E. staining, Masson staining, Alcian blue staining and oil red O staining. Osteogenesis differentiation related proteins expression of Runx2 and OPN were detected by Western blot. Results: Compared with control, the ALP activity and alizarin red staining were higher than BMP9 group; and BMP9 + SFRP5 group was lower than that of BMP9 group. A small quantity of lipid droplets was detected in BMP9 group; and lipid droplets increased significantly in BMP9 + SFRP5 group and SFRP5 group. Ectopic bone formation subcutaneously in nude mice was observed in BMP9 group and BMP9 + SFRP5 group. The bone density of BMP9 + SFRP5 group was lower than BMP9 group ( $P < 0.05$ ). The osteogenetic differentiation in BMP9 group was greater than that in BMP9 + SFRP5 group by H. E. staining, Masson staining and Alcian blue staining, and more adipogenesis in BMP9 + SFRP5 group by oil red O staining. SFRP5 inhibited the protein expression of Runx2 and OPN induced by BMP9. Conclusion: SFRP5 can inhibit the osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by BMP9.

**Key words** Mesenchymal stem cells Secreted frizzled-related protein 5 Bone morphogenetic protein 9