

· 论著 ·

仙茅苷对成骨细胞增殖分化和炎症因子表达的影响及机制分析

朱芳兵¹ 章英良¹ 侯桥¹ 张冶金¹ 严世贵^{2*}

1.浙江中医药大学附属江南医院/杭州萧山中医院骨科,浙江 杭州 311200

2.浙江大学医学院附属第二医院骨科,浙江 杭州 310009

中图分类号: R-332;R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 05-0642-07

摘要: **目的** 仙茅苷(curculigoside, CCG)能有效防治去卵巢大鼠的骨量丢失,但其分子机制尚不清楚,因此,研究 CCG 在地塞米松(dexamethasone, DEX)诱导下对成骨细胞增殖分化和炎症因子释放的影响,并探讨其相关机制。**方法** 将大鼠颅骨成骨细胞与 DEX 共同孵育 24~72 h,同时采用不同浓度的 CCG 对其干预,采用细胞计数试剂盒检测成骨细胞增殖情况,流式细胞术检测成骨细胞线粒体膜电位(mitochondria membrane potential, MMP)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、重组人胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)等细胞因子的表达。采用蛋白质印迹法检测骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、 β -连环蛋白(β -catenin)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activators of NF- κ B ligand, RANKL)和核因子 κ B 受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)的蛋白表达。**结果** 地塞米松 1 μ mol/L 处理成骨细胞后,成骨细胞增殖明显低于未处理组,25~100 μ g/mL CCG 预处理可明显逆转 DEX 对成骨细胞的杀伤作用。25~100 μ g/mL 的 CCG 预处理可提高 DEX 诱导下成骨细胞的 MMP 水平,降低 ROS 的生成。此外,CCG 明显逆转 DEX 对碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、OPG、BMP-2、 β -catenin、IGF-1 和 M-CSF 水平的抑制作用以及对 RANKL 和 RANK 等分化指标的促进作用。CCG 还能抑制 DEX 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2 等炎症细胞因子的释放。**结论** 这些结果为进一步研究 CCG 的成骨细胞保护机制提供了新的思路,通过诱导细胞增殖和分化,减少炎症反应,提示 CCG 可用于防治骨质疏松症。

关键词: 仙茅苷;成骨细胞;骨质疏松;增殖;细胞因子

Analysis of the effect of curculigoside on proliferation and differentiation of osteoblasts and the expression of inflammatory cytokines and its mechanism

ZHU Fangbing¹, ZHANG Yingliang¹, HOU Qiao¹, ZHANG Zhijin¹, YAN Shigui^{2*}

1.Department of Orthopedics, Jiangnan Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University/Xiaoshan Traditional Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 311200

2.Department of Orthopedic Surgery, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China

* Corresponding author: YAN Shigui, Email: zrjwsj@zju.edu.cn

Abstract: Objective Curculigoside (CCG) is reported to prevent bone loss in ovariectomized rats. However, the underlying molecular mechanisms are largely unknown. Therefore, we investigated the effects of CCG on the proliferation and differentiation of osteoblasts and discussed the related mechanisms. **Methods** Osteoblasts were incubated with dexamethasone (DEX) in the absence or presence of different concentrations of CCG for 24-72 h. Cell proliferation was evaluated with Cell Counting Kit-8 assay. Mitochondria membrane potential (MMP) and reactive oxygen species (ROS) were assessed with flow cytometry. We assessed expression of cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, IGF-1 and M-CSF with enzyme-linked immunosorbent assays.

基金项目: 杭州市科技局计划项目(20130733Q43);杭州市萧山区社会发展重大科技攻关项目(2012432,2013304)

* 通信作者: 严世贵, Email: zrjwsj@zju.edu.cn

Relative protein expression of BMP-2, β -catenin, RANKL, OPG and RANK was measured using Western blotting. **Results** The proliferation of osteoblasts decreased significantly after treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ of dexamethasone (DEX), compared with untreated osteoblasts. The cytotoxic effect of DEX was reversed remarkably after pretreatment with 25-100 $\mu\text{g/mL}$ of CCG. Pretreatment with 25-100 $\mu\text{g/mL}$ of CCG increased MMP level and decreased ROS production in osteoblasts induced by DEX. In addition, DEX-induced inhibition of differentiation markers such as alkaline phosphatase (ALP), OPG, BMP-2, β -catenin, IGF-1 and M-CSF level, and promotion of differentiation markers such as RANKL and RANK was significantly reversed in the presence of CCG. CCG also reversed DEX-induced production of pro-inflammatory cytokines. **Conclusion** These result provide new insights into the osteoblast-protective mechanisms of CCG through inducing proliferation and differentiation and reducing the inflammatory responses, indicating that CCG may be developed as an agent for the prevention and treatment of osteoporosis.

Key words: curculigoside; osteoblasts; osteoporosis; proliferation; cytokines

骨质疏松症以骨量减少、骨组织微结构破坏、骨脆性增加和易于骨折为特征的代谢性骨病,骨质疏松患者一旦发生骨折,严重影响老年人的生活质量和寿命^[1]。成骨细胞和破骨细胞在骨骼的发育和骨代谢过程中发挥重要作用,成骨细胞骨形成减少和破骨细胞骨吸收增加,导致骨量丢失及骨质疏松。

仙茅苷作为中草药仙茅中的主要生物活性成分,研究发现其能促进成骨细胞增殖和成骨细胞碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 的活性、减少破骨细胞数、降低抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 的活性和骨吸收作用^[2],可用于骨质疏松的治疗^[3]。但是仙茅苷 (curculigoside, CCG) 在模拟骨质疏松体外成骨细胞培养环境中能否抑制炎症因子释放以及正向调控 RANKL/RANK/OPG 系统,目前仍然不清楚。

本文通过地塞米松 (dexamethasone, DEX) 构建骨质疏松体外成骨细胞培养体系,系统研究了 CCG 对 DEX 诱导的大鼠颅骨成骨细胞增值分化、氧化损伤、炎症细胞因子释放以及 RANKL/RANK/OPG 系统蛋白表达的影响,以期 CCG 发挥防治骨质疏松作用进一步提供理论证据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

必需培养基 (DMEM) 和胎牛血清 (FBS) 购于 Gibco 公司; I 型胶原酶购于 HyClone 公司; Rhodamine-123 (Rho-123) 染料和 DEX 购于 Sigma 公司; ALP 活性检测试剂盒和酶联免疫吸附法试剂盒从南京建城生物工程研究所购买; OPG、 β -catenin、BMP-2 和 GAPDH 抗体购于 Abcam 公司; 购于美国 Santa Cruz 的 RANKL 和 RANKL 抗体进行 Western 印迹分析。

1.2 成骨细胞的分离和培养

将新生 (3 d) Sprague-Dawley 大鼠的颅骨通过

顺序酶消化分离成骨细胞。将颅盖骨切碎并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下在含有 0.4% I 型胶原酶的酶溶液中振荡孵育 20 min, 然后用 0.4% I 型胶原酶孵育 90 min, 再用 10% FBS 停止消化。将细胞分别在含有 10% FBS 和抗生素 (100 mg/mL 青霉素 G 和 100 IU/mL 链霉素) 的 DMEM 中培养。达到 80%~90% 汇合后, 将细胞从每个培养瓶中取出并合并在一起。

1.3 细胞分组与处理

收集细胞并随机分为 5 组: 对照组 (未处理组)、DEX 处理组和 CCG 处理组 (25、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$)。DEX 处理组, 将细胞与含有 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 的培养基一起孵育。在 CCG 组中, 细胞与不同浓度的 CCG 预温育 24 h, 然后与 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 一起孵育。

1.4 细胞增殖测定

通过细胞计数试剂盒-8 (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan) 测定评估细胞增殖。将细胞以 5×10^4 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养 12 h。在指定的时间点除去培养上清液, 用 PBS 洗涤细胞, 然后向每个孔中加入 100 μL 与 CCK-8 溶液混合的新鲜培养基。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后, 除去含有 CCK-8 溶液的培养基。使用分光光度计酶标仪 (Bio-Tek, Winchester, USA) 测量 450 nm 处的吸光度。

1.5 线粒体膜电位

用四甲基罗丹明甲酯 (tetramethyl rhodamine methyl ester, TMRM) 染料检测线粒体膜电位 (mitochondria membrane potential, MMP)。在 6 孔板上培养细胞 (1×10^6 个细胞/孔)。用不同浓度的 CCG (25、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$) 处理 24 h 后, 用 PBS 洗涤细胞, 用 TMRM (10 nmol/L) 孵育, 然后进行流式细胞术。

1.6 活性氧检测

用流式细胞术检测活性氧 (reactive oxygen

species, ROS)。按照 5×10^4 个细胞/孔在 6 孔板中培养细胞,以不同浓度的 CCG (25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 12 h 后,用 PBS 洗涤细胞,再用 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DCFH-DA 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 20 min。用流式细胞仪测定 ROS 荧光强度,激发波长 480 nm,发射波长 525 nm。

1.7 ALP 活性测定

ALP 是骨细胞分化的明确标志。按照制造商的方案使用 ALP 测定试剂盒检测 ALP 活性。在 520 nm 处测定样品和标准样品的吸光度。

1.8 酶联免疫吸附测定

使用市售鼠特异性夹心酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒按照制造商的方案测定成骨细胞分泌的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2、IGF-1 和 M-CSF 水平。

1.9 蛋白质提取和蛋白质印迹 (Western blot)

在加 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 苯基甲基磺酰氟 (PMSF) 的 RIPA 缓冲液 (Beyotime) 中,收集细胞并在冰上溶解 30 min。等量的细胞裂解物用 SDS-PAGE 电泳,用适当的原代和辣根过氧化物酶结合的次级抗体进行 Western blot 分析。BMP-2 (1:1000)、 β -catenin (1:1000)、RANKL (1:500)、RANK (1:1000)、OPG (1:1000) 和 GAPDH (1:1000) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育。

1.10 统计学分析

通过 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) 分析并通过 t 检验评估不同组之间的差异,至少 3 次独立重复的实验数据采用平均值 $\pm$ 标准差表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCG 保护成骨细胞免受 DEX 诱导的细胞损伤

DEX (0.01 ~ 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 以剂量和时间依赖性的方式显著降低细胞增殖,1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DEX 处理后细胞增殖降低至对照组的 35.7% (图 1 A)。但研究发现,CCG 以 25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量预处理 24 h 显著保护成骨细胞免受 DEX 诱导的细胞损伤,并与剂量正相关 (图 1 B)。

2.2 CCG 提高 DEX 抑制的成骨细胞分化

如图 2A 所示,DEX 诱导的成骨细胞的 ALP 活性略有下降。用 CCG 以 25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量预处理成骨细胞 24 h 显著增强 ALP 的活性 (图 2B)。如图 3 所示,用 DEX (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理刺激了 RANKL 和 RANK 的表达,并且抑制了 OPG、BMP-2、 β -catenin、IGF-1 和 M-CSF 的表达。然而,剂量为 25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CCG 显著下调 DEX 刺激的 RANKL 和 RANK 表达,但是增加成骨细胞中 OPG、BMP-2、 β -catenin、IGF-1 和 M-CSF 的表达。

2.3 CCG 抑制 DEX 诱导的线粒体凋亡途径

MMP 的缺失与线粒体凋亡途径有关。如图 4A 所示,DEX (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理成骨细胞可引起 MMP 中度去极化。然而,CCG 处理 24 h 后,呈剂量依赖性提高 MMP 水平。另一方面,活性氧的生成也与线粒体有关。如图 4B 所示,DEX (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理成骨细胞后,细胞内活性氧积累明显增加。而 CCG 处理 24 h 后,剂量依赖性地显著降低 ROS 的积累。

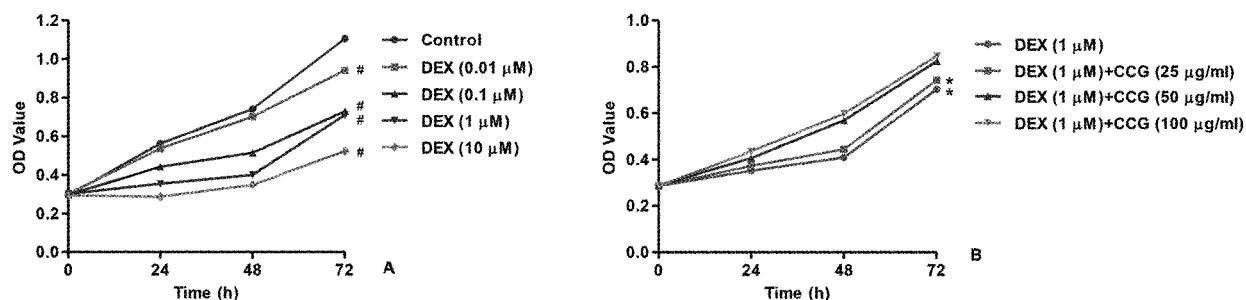


图1 CCG对DEX诱导的成骨细胞损伤的保护作用 A:DEX对细胞增殖的剂量依赖性作用。1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DEX显著降低孵育72 h后的细胞增殖;B:CCG预处理(25、50和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24 h)抑制DEX诱导的细胞损伤。与对照相比, $^{\#}P < 0.05$;与DEX组相比, $^{*}P < 0.05$ 。DEX:地塞米松(下同)。

Fig.1 Protective effects of CCG on DEX-induced cell injury in osteoblasts. A: Dose-dependent effect of DEX on cell proliferation. DEX at 1 μM significantly reduced cell proliferation after 72 h of incubation; B: Pretreatment with CCG (25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24 h) alleviated DEX-induced cell injury. The data were presented as the mean $\pm$ SD ($n = 3$); $^{\#}P < 0.05$ vs. control without any treatment group, $^{*}P < 0.05$ vs. the DEX only group.

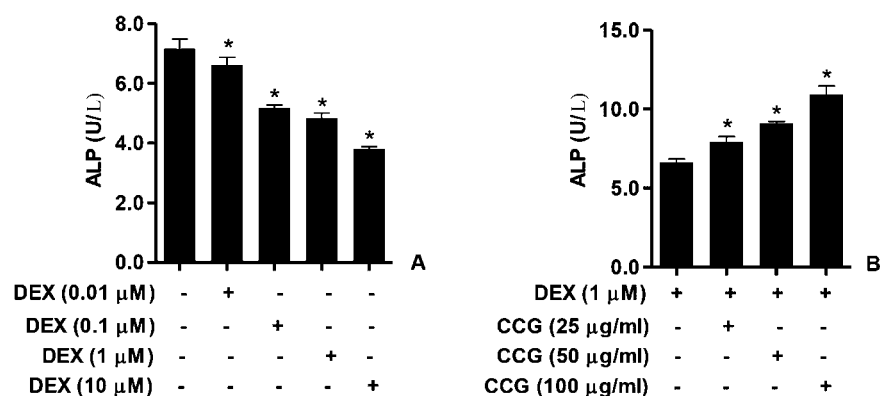


图2 在 DEX 条件下 CCG 改变 ALP 的活性 A:用含有 0、0.01、0.1、1 或 10 $\mu\text{mol/L}$ DEX 的培养基处理细胞,ALP 活性降低;B:细胞用 25、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 CCG 预处理 24 h,然后与另外的 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 一起温育。与对照相比,[#] $P<0.05$;与 DEX 组相比,^{*} $P<0.05$ 。

Fig.2 The activity of ALP is altered by CCG under DEX condition. A: The cells were treated with medium containing 0, 0.01, 0.1, 1 or 10 μM of DEX and the activity of ALP was decreased; B: The cells were pretreated with 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of CCG for 24 h, and then incubated with an additional 1 μM of DEX. The data were presented as the mean $\pm$ SD ($n=3$); [#] $P<0.05$ vs. control without any treatment group, ^{*} $P<0.05$ vs. the DEX only group.

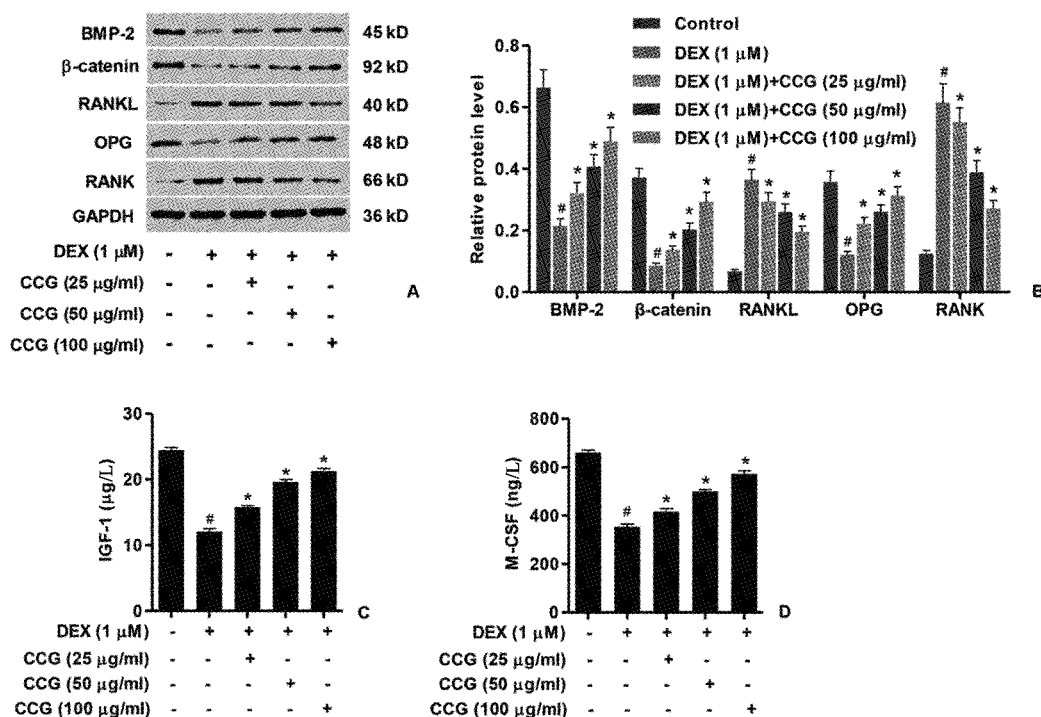


图3 CCG 对成骨细胞分化相关标志物表达的影响 A、B:5 个处理组中 BMP-2、β-catenin、RANKL、OPG 和 RANK 表达谱的蛋白质印迹(左)和定量分析(右);C、D:ELISA 分析 5 组中的 IGF-1 和 M-CSF 蛋白质表达。与对照相比,[#] $P<0.05$;与 DEX 组相比,^{*} $P<0.05$ 。

Fig.3 The effects of CCG on the expression of osteoblastic differentiation associated markers. A, B: Western blotting (left) and quantification (right) of BMP-2, b-catenin, RANKL, OPG and RANK expression profiles in five treatment groups; C, D: ELISA analyzed IGF-1 and M-CSF protein expression in five treatment groups. The data were presented as the mean $\pm$ SD ($n=3$); [#] $P<0.05$ vs. control without any treatment group, ^{*} $P<0.05$ vs. the DEX only group.

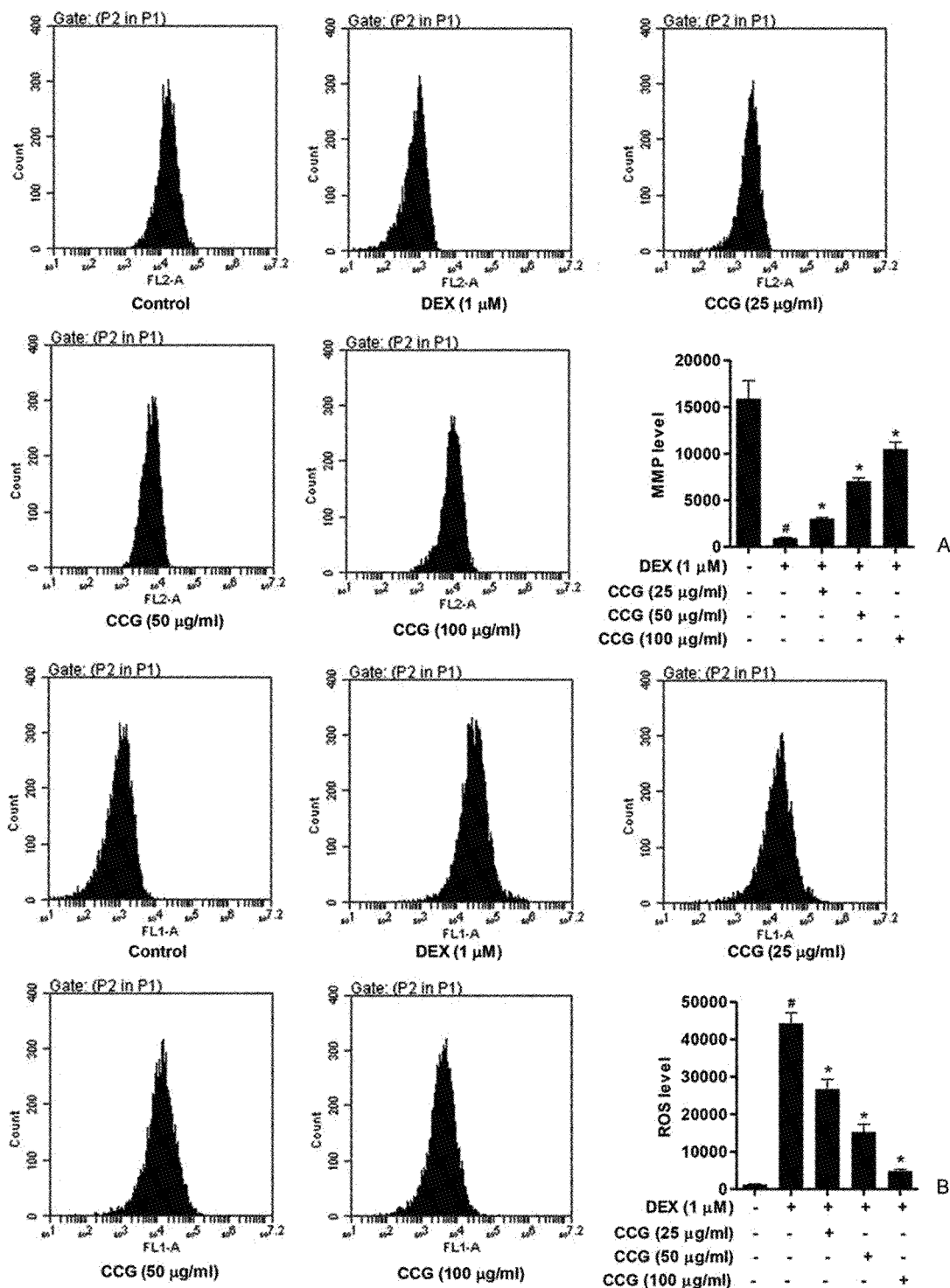


图4 CCG对DEX诱导成骨细胞MMP和ROS的影响 A:DEX诱导的成骨细胞分别予以25、50和100μg/mL的CCG预处理24 h,然后用TMRM孵育,流式细胞仪分析;B:将DEX诱导的成骨细胞分别予以25、50和100μg/mL的CCG预处理24 h,用荧光探针DCFH-DA测定ROS的生成水平。与对照相比,[#] $P<0.05$;与DEX组相比,^{*} $P<0.05$ 。

Fig.4 The effects of CCG on MMP and ROS in DEX-induced osteoblasts. A: DEX-induced osteoblasts were pretreated with CCG for 24 h at 25, 50 and 100 μg/mL respectively, then incubated with TMRM and analyzed by flow cytometry; B: DEX-induced osteoblasts were pretreated with CCG for 24 h at 25, 50 and 100 μg/mL respectively, and fluorescence probe DCFH-DA was used to determine the levels of ROS production. The data were presented as the mean±SD ($n=3$); [#] $P<0.05$ vs. control without any treatment group, ^{*} $P<0.05$ vs. the DEX only group.

2.4 CCG 对 DEX 诱导的成骨细胞中促炎细胞因子表达的影响

如图 5 所示,DEX(1 $\mu\text{mol/L}$)治疗可增加 TNF-

α 、IL-1 β 、IL-6 和 COX-2 的表达。与 DEX 治疗组相比,CCG 以剂量依赖性的降低炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 COX-2 的表达。

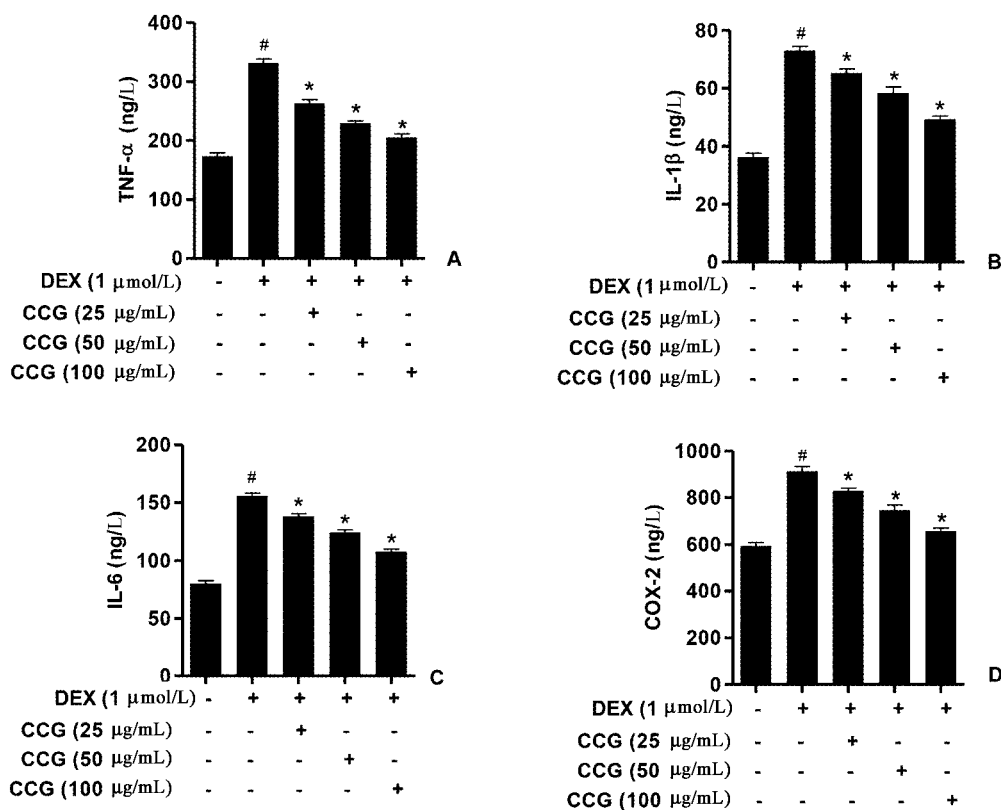


图 5 CCG 对促炎细胞因子表达的影响。在 5 组中 TNF- α (A)、IL-1 β (B)、IL-6 (C) 和 COX-2 (D) 蛋白表达的 ELISA 分析。与对照相比,[#] $P<0.05$;与 DEX 组相比,^{*} $P<0.05$

Fig.5 The effects of CCG on the expression of pro-inflammatory cytokines. ELISA analysis of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), and COX-2 (D) protein expression in five treatment groups. The data were presented as the mean $\pm$ SD ($n=3$); [#] $P<0.05$ vs. control without any treatment group, ^{*} $P<0.05$ vs. the DEX only group.

3 讨论

3.1 CCG 对氧化应激的影响

成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收在骨重塑过程中发挥关键作用,受多种因素的调控,包括雌激素、炎症和氧化应激^[4-5]。氧化应激被认为是导致各种退行性疾病(如动脉粥样硬化、骨质疏松症和癌症)的重要原因,这些患者中氧化应激相关标志物的水平显著增加^[6]。在细胞水平,氧化应激激活一系列的信号传导途径诱导细胞从增殖、分化到凋亡的广泛损伤^[7]。先前的研究表明,DEX 抑制骨髓来源的人间充质干细胞和 MC3T3-E1 细胞中成骨细胞的分化过程^[8]。本研究同样证实 DEX 明显抑制成骨细胞的分化,降低成骨细胞 ALP 活性。而 CCG 明显减少 ROS 产生,提高 MMP 水平,促进成骨细胞

增值和分化。类似的,也有文献报道发现,当 CCG 和过氧化氢同时处理成骨细胞时,CCG 明显抑制过氧化氢对成骨细胞的氧化损伤,促进成骨细胞分化,增强成骨细胞活性^[9]。这些结果表明 CCG 有效保护成骨细胞免受氧化应激损伤,促进成骨细胞增值分化和增强成骨活性,有望提高骨密度用以骨质疏松症治疗。

3.2 CCG 对 RANKL/OPG 系统的影响

成骨细胞不仅参与骨形成,还通过产生 RANKL 和 OPG 来调节破骨细胞的形成、分化和骨吸收活性^[10-11]。RANKL/RANK/OPG 系统不仅参与调节生理性骨重建,也与病理条件下多种骨病的发生密切相关。RANKL 主要由成骨细胞和骨髓基质细胞分泌,与破骨前体细胞或破骨细胞表面上的膜受体 RANK 结合后,引起一系列细胞生物学反应,促进破

骨细胞的分化成熟及骨吸收活性。OPG 又称破骨细胞分化抑制因子,主要由成骨细胞和骨髓基质细胞分泌,OPG 作为 RANKL 的诱饵受体,可通过与 RANK 竞争性结合 RANKL,从而阻断骨吸收信号的传递,抑制破骨细胞分化成熟和成熟破骨细胞的骨吸收活性并诱导其凋亡。因此,RANKL/OPG 比例协调是调节局部骨代谢平衡的关键。研究发现,CCG 提高人羊水源性干细胞成骨分化过程中的碱性磷酸酶活性和钙沉积,提高 OPG 与 RANKL 的比值,上调 β -catenin 表达^[12]。本研究同样发现 CCG 提高 OPG 与 RANKL 的相对比值,提示 CCG 可能有效抑制破骨细胞的生成,但尚需要进一步研究证实。

3.3 CCG 对炎症因子释放的影响

各种炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 在调节破骨细胞以及骨质疏松发生发展中发挥重要的调控作用^[13-17]。在骨质疏松性骨折女性中,促破骨细胞生成性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达明显高于正常绝经后妇女^[18]。TNF- α 能促进已经与 RANKL 结合的破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞;也能直接激活成熟破骨细胞,抑制破骨细胞凋亡,增加成熟破骨细胞成活率^[18]。本文结果显示,CCG 减少了细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 COX-2 表达,提示 CCG 也可能通过抑制促炎性细胞因子表达抑制破骨细胞生成。

综上所述,CCG 保护成骨细胞免受 DEX 诱导的氧化应激损伤,促进成骨细胞增值分化和提高成骨活性,同时抑制促破骨细胞生成细胞因子表达及正向调控 OPG 与 RANKL 比值以抑制破骨细胞生成。这些结果为 CCG 影响骨代谢过程提供了新的见解,提示 CCG 可作为一种新的选择用于预防和治疗骨质疏松症。

【参 考 文 献】

- [1] Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: a still increasing prevalence[J]. Bone, 2006, 38(2 Suppl 1): S4-S9.
- [2] Zhao L, Liu S, Wang Y, et al. Effects of curculigoside on memory impairment and bone loss via anti-oxidative character in APP/PS1 mutated transgenic mice [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e133289.
- [3] Jiao L, Cao DP, Qin LP, et al. Antiosteoporotic activity of phenolic compounds from curculigo orchoides [J]. Phytomedicine, 2009, 16(9): 874-881.
- [4] Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(3): 234-250.
- [5] 孙振双, 耿元卿, 张丽君, 等. 氧化应激介导绝经后骨质疏松发病机制的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(8): 1063-1067.
- [6] Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, et al. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(9): 17643-17663.
- [7] Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival[J]. J Cell Physiol, 2002, 192(1): 1-15.
- [8] Li T, Li H, Li T, et al. MicroRNA expression profile of dexamethasone-induced human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation[J]. J Cell Biochem, 2014, 115(10): 1683-1691.
- [9] Wang Y, Zhao L, Wang Y, et al. Curculigoside isolated from curculigo orchoides prevents hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative damage in calvarial osteoblasts[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012, 44(5): 431-441.
- [10] 许丰, 袁凌青. 骨转换耦联机制新进展-骨髓局部因子的作用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2017, 33(2): 156-158.
- [11] Torre E. Molecular signaling mechanisms behind polyphenol-induced bone anabolism [J]. Phytochem Rev, 2017, 16(6): 1183-1226.
- [12] Liu M, Li Y, Yang ST. Curculigoside improves osteogenesis of human amniotic fluid-derived stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(2): 146-154.
- [13] Nagy V, Penninger JM. The RANKL-RANK Story [J]. Gerontology, 2015, 61(6): 534-542.
- [14] Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review) [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5): 3212-3218.
- [15] 杨明园, 李超, 李明. 细胞因子与绝经后骨质疏松症关系的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(6): 698-705.
- [16] 王链链, 郭晓英. 破骨细胞分化过程中的信号通路及信号因子的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(6): 742-748.
- [17] 张萌萌. 骨质疏松分子生物学的昨天与今天[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(6): 799-805.
- [18] Barbour KE, Lui LY, Ensrud KE, et al. Inflammatory markers and risk of hip fracture in older white women: the study of osteoporotic fractures [J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(9): 2057-2064.

(收稿日期: 2018-09-01; 修回日期: 2018-09-09)