

异黄酮类药 Genistein 对原代培养大鼠成骨细胞增殖、分化、钙含量及矿化功能的影响

李大为 秦林林

【摘要】 目的 了解异黄酮类药 Genistein 对体外培养成骨细胞的作用。**方法** 应用 MTT 法、对硝基苯磷酸盐法、原子吸收分光光度法及茜素红染色方法观察 Genistein 对体外培养成骨细胞的增殖、ALP 表达、基质钙含量及矿化结节形成的影响。**结果** Genistein 具有刺激成骨细胞增殖,提高 ALP 活性,细胞基质钙含量及矿化结节形成的数量的作用。**结论** Genistein 具有刺激体外培养成骨细胞增殖、分化成熟及促进矿化的作用。

【关键词】 Genistein; 细胞培养; 成骨细胞

Effects of Genistein on proliferation, differentiation, content of matrix calcium and mineralization of cultured osteoblasts in vitro Li Dawei, QIN Linlin. Department of Clinical Laboratory, Tongren Hospital, Beijing 100730, China

【Abstract】 Objective To study the effects of Genistein kind of substance from isoflavon on cultured osteoblasts in vitro. **Methods** MTT, PNPP, atomic absorptiometry and ARS were used to observe the proliferation, activity of ALP, contents of matrix calcium and the number of mineral nodes of osteoblasts cultured in vitro. **Results** It was found that Genistein had the effects on stimulating the proliferation, ALP activity, increasing the contents of matrix calcium and the number of mineral nodes of cultured osteoblasts. **Conclusion** Genistein has the effects on stimulating the proliferation, differentiation, maturation and mineralization of cultured osteoblasts in vitro.

【Key words】 Genistein; Cultured cell; Osteoblast

植物雌激素是指一大类在结构和功能上与雌二醇相类似的物质,包括 lignan、异黄酮、库玛斯坦。Genistein 是一种重要的异黄酮类物质。我们以增殖、分化、基质钙含量及矿化功能为指标,观察 Genistein 对体外培养成骨细胞的影响,旨在为骨质疏松症防治药物研究提供一定的依据。

材料和方法

1. 动物:出生 24 h SD 大鼠,SPF 级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SCXK11-00-0008。

2. 主要试剂:Genistein, MTT, DMSO, 维生素 C, SIGMA 公司产品;MEM 培养基,胰蛋白酶,Ⅱ型胶原酶, GIBCO 公司产品;标准胎牛血清, Hyclone 公司产品;β 甘油磷酸钠, Fluka AG 产品;对硝基苯磷酸二钠, 购自中国医药公司北京采购站;对硝基酚, 购自北京理工大学科技开发公司;茜素红, 购自北京化学

试剂公司;其余试剂均为分析纯级。

3. 成骨细胞的原代培养^[1]:取新生(出生 24 h 以内)大鼠,用温水、肥皂清洗 3 遍,去除体表杂物。将大鼠放入 75% 酒精中消毒,将大鼠断颈处死,无菌取头盖骨,剔除粘附的结缔组织和血管,将头盖骨切碎,经 0.25% 胰蛋白酶消化 15 min,每 3 min 振荡 1 次,弃去消化液。以 0.1% Ⅱ型胶原酶在 37℃ 消化 60 min,每 5 min 振荡 1 次,消化液离心 1000 rpm, 8 min;收集细胞,接种于含 15% 胎牛血清的 MEM 培养液的培养瓶中,培养瓶置 37℃ 培养箱,24 h 换液。

4. 培养细胞的鉴定

(1)成骨细胞的形态观察。

(2)成骨细胞的碱性磷酸酶染色^[2]。

采用改良的 Gomori 氏钙钴法,取培养皿中长满成骨细胞的盖玻片,经 95% 酒精固定 10 min,蒸馏水冲洗 3 次。将盖玻片放入孵育液中 37℃, 5 h。滴加 20 g/L (2%) 硝酸钴 5 min,流水冲净。滴加 1% 硫化胺 5 min,流水冲净,复染。孵育液配方:2% 巴比妥钠, 5 ml; 3% β-甘油磷酸钠, 5 ml; 2% 无水氯化钙, 10

ml; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 ml; 蒸馏水, 2.5 ml; 调至 pH9.4。对照: 免去底物, 以蒸馏水代替 3% β -甘油磷酸钠。

5. 成骨细胞增殖率测定^[3]

将细胞消化计数, 调节细胞浓度为 1×10^4 个/ml, 于 96 孔板每孔加 0.2 ml, 待细胞贴壁后, 换含药培养基, 使各组分别为对照组, Genistein 1×10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-6} M 组, 培养 72 h。用 PBS 配 MTT 药液 5 mg/ml, 于培养结束前 4 h, 每孔加 MTT $20 \mu\text{l}$, 4 h 后, 将培养基吸出, 加入 200 μl DMSO。于 37℃ 温育 2 h, 测 590 nm 波长的吸光值。

6. 碱性磷酸酶活性测定^[4]

将培养的细胞消化计数, 将细胞浓度调至 2.5×10^4 个/ml, 按每孔 0.5 ml 分别加入 48 孔细胞培养板, 待细胞贴壁后, 将培养液吸出, 换入含药培养基, 使各组分别为对照组, Genistein 1×10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-6} M 组。培养 48 或 72 h 后, 将培养板中培养基吸出, 用 PBS 0.5ml/孔洗 3 遍, 加入 Triton-X100 $100 \mu\text{l}$, 冻、溶三遍后, 取细胞液 50 μl , 加入 50 μl PNPP。标准组加入对硝基酚 0, 10, 20, 30, 40, 50 μl , 用 PNPP 补足至 100 μl , 放于 37℃ 培养箱中, 15 min, 用 0.2N NaOH 50 μl 终止反应, 用酶标仪于 405 nm 波长检测 OD 值。

7. 细胞基质钙含量测定^[5]

将细胞消化计数, 取 12 孔板, 每孔加入细胞数 5×10^4 个, 培养基 2 ml。待细胞贴壁后, 吸出培养基, 换入含药培养基, 使各组分别为对照组, Genistein 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 隔天换液。培养 18d 后将培养基吸出, PBS 洗两次, 用 0.2N NaOH 1 ml 溶解细胞及间质, 于 422.7 nm 波长, 在原子吸收分光光度仪上测定每孔总 Ca^{2+} 含量。

8. 茜素红染色显示矿化结节^[6]

将细胞消化计数, 按每孔 1×10^5 个将细胞加入 6 孔板, 培养基 3 ml。待细胞贴壁后, 吸出培养基, 换入含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 维生素 C, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠的培养基。使各组分别为对照组, Genistein 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M 组, 隔天换液。培养 18 d 后将培养基吸出, 用 PBS 洗板 3 次, 95% 乙醇固定 10 min, 0.1% 茜素红溶液染色 30 min, 蒸馏水洗, 镜下计数矿化结节数。

9. 统计学分析

用 SPSS 9.0 软件对实验数据进行分析, 实验结果以平均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验。

结 果

1. 成骨细胞的形态观察

在倒置相差显微镜下观察, 成骨细胞呈三角形、多角形和纺锤形, 胞浆丰富的向外伸展, 伸出几个突起与邻近的细胞伸出的突起相联。胞核大而清晰, 呈圆形或卵圆形, 含 1~2 个核仁。

2. 成骨细胞的碱性磷酸酶染色

细胞胞浆内有棕黑色沉淀并掩盖于细胞核上, 染色呈强阳性。对照组阴性。

3. 成骨细胞增殖率测定

实验结果表明, Genistein 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M 作用于细胞 72 h, 与对照组相比可增加吸光值, 其中 1×10^{-5} M 组增加有显著性, *P* 值小于 0.005。Genistein 1×10^{-6} M 可降低吸光值, 但差异无显著性 (表 1)。

表 1 成骨细胞增殖率测定结果 (*n* = 8) (72 h)

组别	OD ₅₉₀
对照组	0.6625 $\pm$ 0.07382
Genistein 1×10^{-5} M	0.7863 $\pm$ 0.05780 *
5×10^{-6} M	0.7262 $\pm$ 0.10600
1×10^{-6} M	0.6175 $\pm$ 0.03694

注: 与对照组相比 * *P* < 0.005

4. 碱性磷酸酶活性测定

实验结果表明 Genistein 1×10^{-6} ~ 1×10^{-5} M 作用于细胞 48 h, 可使碱性磷酸酶活性增加, 差异显著 (*P* < 0.05 ~ 0.005) (表 2); Genistein 1×10^{-6} ~ 1×10^{-5} M 作用于细胞 72 h, 可使碱性磷酸酶活性增加, 其中 5×10^{-6} M 组差异显著 (*P* < 0.005), 而 1×10^{-6} M 组和 1×10^{-5} M 组与对照组相比无统计学差异 (表 3)。

表 2 培养 48 h 细胞碱性磷酸酶测定 (*n* = 6)

组别	OD ₄₀₅
对照组	0.55050 $\pm$ 0.15489
Genistein 1×10^{-5} M	0.06717 $\pm$ 0.27532 * *
5×10^{-6} M	0.94850 $\pm$ 0.36276 *
1×10^{-6} M	0.94600 $\pm$ 0.33068 *

注: 与对照组相比 * *P* < 0.05, * * *P* < 0.005

5. 细胞基质钙含量测定

实验结果表明 Genistein 1×10^{-6} M ~ 1×10^{-5} M 处理细胞 18 d, 可增加细胞基质钙含量, 其中 1×10^{-5} M 组和 5×10^{-6} M 组与对照组相比差异显著, *P*

值分别小于 0.05 和 0.01(表 4)。

表 3 培养 72 h 细胞碱性磷酸酶测定 ($n = 6$)

组别	OD ₄₀₅
对照组	0.81867 ± 0.07829
Genistein 1×10^{-5} M	0.84383 ± 0.12281
5×10^{-6} M	0.96917 ± 0.04258 *
1×10^{-6} M	0.89617 ± 0.14459

注:与对照组相比 * $P < 0.005$

表 4 成骨细胞基质钙含量测定 ($n = 4$)

组别	基质钙含量(μg/ml)
对照组	0.60000 ± 0.10494
Genistein 1×10^{-5} M	0.81625 ± 0.09571 *
5×10^{-6} M	0.83175 ± 0.06579 **
1×10^{-6} M	0.61550 ± 0.03092

注:与对照组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$

6. 茜素红染色显示矿化结节

实验结果表明,经过 18 d 的培养,成骨细胞形成圆形矿化结节,橘红色,边界清晰。Genistein 1×10^{-6} M ~ 1×10^{-5} M 组形成矿化结节数高于对照组,其中 1×10^{-6} M 组和 5×10^{-6} M 组与对照组相比差异显著, P 值分别小于 0.005 和 0.02(表 5)。

表 5 成骨细胞矿化结节形成情况比较 ($n = 3$)

组别	矿化结节数
对照组	74.7 ± 9.2
Genistein 1×10^{-5} M	80.0 ± 13.0
5×10^{-6} M	150.0 ± 33.0 *
1×10^{-6} M	170.7 ± 23.8 **

注:与对照组相比 * $P < 0.02$, ** $P < 0.005$

讨 论

骨质疏松症已成为人类老年时生活质量下降和寿命缩短的主要原因之一,因而对有效防治骨质疏松症的药物研究是近年来十分重视的课题。骨质疏松症的发生与成骨细胞和破骨细胞的功能失偶联有关,因而在细胞水平上观察药物对骨细胞功能的调整作用是评论骨质疏松症防治药物药效的方法之一。传统的治疗绝经后骨质疏松的方法强调使用抑制骨吸收的药物如雌激素^[7]、降钙素^[8,9]和双磷酸盐等^[10]。虽然减少绝经后骨量丢失最有效的方法是雌激素替代治疗,但它伴有潜在的诱发子宫内膜癌和子宫出血等副作用^[11],因而寻找一种天然物质来减少绝经后妇女骨量丢失,减少对药物治疗的依赖是十分必要的。不同地理区域的人群骨质疏松症的

发生率是不同的,亚洲妇女骨质疏松的发生率低于西方妇女^[12,13],日本妇女髌骨骨折的发生率低于白人妇女^[13]。导致这种现象的原因推测与亚洲国家大量豆制品的消费有关。豆制品中含有异黄酮。为一类重要的植物雌激素。植物雌激素的雌激素样作用也许是影响骨质疏松发生率和骨折风险的因素之一。因此本研究着重讨论异黄酮类物质 Genistein 对骨代谢指标的影响。

本实验结果 Genistein 1×10^{-5} M 作用于细胞 72 h,可显著提高成骨细胞增殖率, $P < 0.005$ 。目前国际上关于异黄酮类物质对成骨细胞的作用研究较少,还没有异黄酮对成骨细胞增殖作用的西文报道,国内只有一篇童安莉等^[14]的 Genistein 对原代培养大鼠成骨细胞增殖率影响的研究文章与本文研究结果相反,认为 Genistein 抑制成骨细胞增殖。造成实验结论的差异的原因可能是以下几个方面:①药物剂量的差异。童的实验所用药物剂量分别是 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-4} M,且只有 5×10^{-5} M 和 1×10^{-4} M 的 Genistein 抑制成骨细胞增殖率的作用与对照组相比存在统计学差异,而文献报道很少使用上述的高浓度。②药物作用时间不同。童的实验作用时间为 24h,而本实验药物作用时间为 72 h。童认为 Genistein 通过抑制成骨 c-fos 的表达来抑制成骨细胞的增殖。c-fos 为快速早期基因,在刺激因子作用下,具有在转录水平快速激活的特点。其蛋白质产物在刺激后 1~2 h 表达达到高峰。众所周知,刺激细胞增殖的信息传递途径很复杂,对成骨细胞增殖的调控具体来说即是对细胞周期的调控。目前已知与增殖激活有关的基因有 c-myc、c-fos、c-jun,与细胞周期有关的基因有组蛋白、细胞周期素基因。而 c-myc 与 H₄ 组蛋白基因的表达式 c-fos 晚许多, c-myc mRNA 常在 1 天后表达达到高峰, H₄ 组蛋白基因表达伴随细胞内 DNA 合成,与增殖密切相关^[15]。本实验作用时间为 72 h,是否会在头 24 h 内抑制 c-fos 表达,而在余下的 48 h 内又启动了其它的信息传递机制尚待进一步研究。③Genistein 是否存在双向作用机制,既在较高浓度时抑制成骨细胞增殖,而在较低浓度时促进成骨细胞增殖尚待进一步研究证实。

在细胞增殖晚期,与细胞周期和细胞增殖有关的基因表达下降,而编码细胞外基质成熟的蛋白的基因开始表达。在分化早期主要是碱性磷酸酶表达,因此碱性磷酸酶被认为是细胞外基质成熟的早

期标志, ALP mRNA 表达此时可增加 10 倍以上。本实验结果 Genistein $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ M 处理细胞 48 h 可显著提高成骨细胞 ALP 活性; 上述浓度的药物作用于细胞 72 h 均可提高细胞 ALP 活性, 其中 1×10^{-6} M 组和 5×10^{-6} M 组与对照组相比存在统计学差异。这与 Yamaguchi 和 Gao 报道近似^[16,17]。

骨基质矿化的途径为成骨细胞合成并分泌骨的有机质, 主要为骨的 I 型胶原, 胶原纤维形成框架区间, 此为骨矿化提供了结构基础。机体吸收的钙离子和焦磷酸裂解的磷离子以 2:1 的比例合成羟基磷灰石(骨无机盐的主体)转运至骨胶原间隙区域内, 按一定的电位极性排列、沉积(骨胶原纤维间空隙的距离为 0.5 nm, 这与羟基磷灰石钙离子之间的距离相同), 磷灰石中的钙原子与胶原内骨钙素分子经 β 逆转的 α 单环结构的两个 Gla 残基形成化学键, 完成骨基质的矿化。促进骨矿化的主要细胞是成骨细胞^[18]。Bellows 等研究证实, 每个矿化结节均为 1 个具有形成结节的成骨细胞经过 2~3 周的增殖与分化而形成的^[19]。矿化结节的形成代表了成骨细胞分化成熟, 行使成骨功能的阶段, 是成骨功能的形态表现。

研究培养的成骨细胞基质钙的方法有很多, 如组织化学染色法^[20,21], 定量荧光光度法^[22]及原子吸收分光光度法^[6], 这些方法均可精确地反映组织钙含量的变化。本实验选用操作简单的原子吸收分光光度法测量细胞内和细胞间隙中的总钙。实验发现 Genistein 1×10^{-6} M ~ 1×10^{-5} M 作用于细胞 18 d, 与对照组相比可以增加钙含量, 其中 5×10^{-6} M 组和 1×10^{-5} M 组与对照组相比存在统计学差异。该结果与 Yamaguchi 和 Gao 的报道近似^[16,17]。在此基础上本人进一步通过茜素红染色法观察 Genistein 对细胞矿化结节的形成的影响。结果表明与对照组相比 Genistein $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ M 可以提高矿化结节数。其中 1×10^{-6} M 组和 5×10^{-6} M 组与对照组相比存在统计学差异。

能够促进骨的合成代谢的营养与药物因素对预防和治疗骨质疏松是十分重要的。Genistein 促进骨形成的作用仍需要通过进一步的动物实验与临床研究来证实。近来已有报道口服 Genistein 可促进老年雌性大鼠股骨干骺端和骨干的骨组织形成与矿化^[23]。植物性雌激素 Genistein 在防治雌激素缺乏导致的骨质疏松方面也许会发挥重要作用。

综上所述, 本实验采用细胞培养的方法, 初步证

明了异黄酮类物质 Genistein 具有促进成骨细胞增殖、分化、基质钙含量和基质矿化的作用, 相信随着今后研究工作的深入, 异黄酮类物质必将为骨质疏松症的防治提供新的选择。

参 考 文 献

- Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology*, 1989, 125: 825-33.
- 唐海涛, 唐海, 罗先正等. 骨质疏松对成骨细胞刺激作用的研究. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6(2): 60-3.
- 王洪复, 金蔚芳, 高建军. 骨质疏松防治药物的体外细胞药效评价. *中国骨质疏松杂志*, 1999, 5(2): 58-62.
- Lowry OH, Roberts NR, Wu M, et al. The quantitative histochemistry of brain. II. Enzyme measurements. *J Biol Chem*, 1954, 207: 19-37.
- Broess M, Riva A, Gerstenfeld LC. Inhibitory effects of $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on collagen type I, osteopontin and osteocalcin gene expression in chicken osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1995, 57: 440-51.
- A. G. E. 皮尔斯著, 马仲魁主译. 组织化学理论和实用分析技术. 中国医学科技出版社, 1990: 614.
- Centrella M, Canalis E. Local regulators of skeleton growth: a perspective. *Endocr Rev*, 1985, 6: 544-51.
- Canalis H, Mc Carthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest*, 1988, 81: 277-81.
- Rudman D, Kutner MH, Rogers CM, et al. Impaired growth hormone secretion in the adult population. *J Clin Invest*, 1981, 67: 1361-9.
- Bennet AE, Wahner HW, Riggs BL, et al. Insulin-like growth factors I and II: aging and bone density in women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984, 59: 701-4.
- Genant HK, Baylink DJ, Gallagher JC. Estrogens in the prevention of osteoporosis in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*, 1989, 161: 1842-6.
- Report of a WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Geneva, Switzerland: WHO Technical Report Series 843.
- Cooper C, Campion G, Melton L J III. Hip fractures in the elderly: A world-wide projection. *Osteoporosis Int*, 1992, 2: 285-9.
- 童安莉, 陈璐璐, 丁桂芝等. 酪氨酸激酶途径在成骨细胞增殖及 c-fos 表达中的作用. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6(3): 9-11.
- Owen TA, Aronow M, Shalkoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 1990, 143: 420.
- Yamaguchi M, Gao YH. Anabolic effect of genistein on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissue of elderly rats is inhibited by the anti-estrogen tamoxifen. *Res Exp Med*, 1997, 197: 101-7.

(下转第 358 页)

细胞依赖的免疫反应都有重要的作用^[6]。RANK 介导的 NF- κ B 和 JNK 活化需要 RANK 胞内部分提供 TRAF(TNF receptor-associated factor)的结合位点。RANK 胞内域不同位点与相应的 TRAF 结合后有不同的信号传导途径。目前发现能与 RANK 结合的只有 TRAF₆、TRAF₂ 和 TRAF₃ 3 种, RANK C 末端的 547~581 位氨基酸残基之间是 TRAF₂ 和 TRAF₃ 的结合部位; TRAF₆ 的结合部位则在 RANK 胞内域的中部, 位于 336~454 位氨基酸残基之间^[19]。有的报道略有差异^[19]。

五、小结与展望

RANKL 及其受体 RANK 的发现, 明确了 OB、OC 之间的分子作用基础; RANKL 及其受体在免疫器官和免疫细胞发生中的作用以及对免疫细胞间相互作用的调节功能说明它在免疫系统也扮演了重要的角色。对其生物学功能的进一步研究对于理解骨质疏松症、伴骨质异常的一些疾病如类风湿性关节炎、Paget's 病、某些病毒性疾病如病毒性肝炎, HIV 病以及某些肿瘤如前列腺癌和乳腺癌的病理的过程有重要的作用, 进而为新一代药物的研究打下理论基础。

参 考 文 献

- 1 Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 7260-7264.
- 2 Suda T, Udagawa N, Nakamura I, et al. Modulation of osteoclast differentiation by local factor. *Bone*, 1995, 17(Suppl 2): 87S-91S.
- 3 Jimi E, Nakamura I, Amano I, et al. Osteoclast function is activated by osteoclastic cell through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology*, 1996, 137: 2187-2190.
- 4 Suda T, Tadashi N, Martin T. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev*, 1992, 13: 66-80.
- 5 Lacey D, Timms E, Tan H, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93: 165-176.
- 6 Wong B, Rho JJ, Arronet J et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates C-Jun N-terminal kinase in T cell. *J Biol Chem*, 1997, 272: 25190-25194.
- 7 Anderson D, Maraskovsky E, Billingsley W et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997, 390: 175-179.
- 8 Kong Y, Yoshida H, Sarosi L et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 1999, 397: 315-323.
- 9 Arron JR, Yongwon C. Bone versus immune system. *Nature*, 2000, 408: 535-536.
- 10 Simonet WS, Lacey D, Dunstan C, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
- 11 Yasuda H, Dhima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3597-3602.
- 12 Makashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factor and cytokines. *J Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275: 768-775.
- 13 Willard D, Chen W, Barrett G, et al. Expression, purification, and characterization of the human receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) extracellular domain. *Protein Expr Purif*, 2000, 20: 48-57.
- 14 Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, 392: 245-252.
- 15 Grouard G, Durand I, Filgueiral L, et al. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centers. *Nature*, 1996, 384: 364-367.
- 16 Burgess T, Yi X, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Biol Chem*, 1999, 274: 527-538.
- 17 Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K, et al. Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Bone Miner Metab* 2000; 18: 177-184.
- 18 Takeshita S, Kajik K, Kudo A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *Bone Miner Res*, 2000, 15: 1477-1488.
- 19 Hailing H, Lacey D, Dunstan C, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediated osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3540-3545.

(收稿日期: 2002-01-08)