

重组人胰岛素样生长因子 I 对大鼠成骨细胞增殖、凋亡及 I 型胶原蛋白合成的影响

徐萍 张克勤 刘超 刘翠萍 唐伟

摘要：目的 观察胰岛素样生长因子 I (IGF-I) 对体外培养的大鼠成骨细胞的增殖、凋亡及 I 型胶原蛋白合成的影响，探讨 IGF-I 对骨代谢影响的可能机制。方法 不同浓度 rhIGF-I 刺激体外培养的大鼠成骨细胞，采用噻唑蓝 (MTT) 法测定细胞增殖能力，肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 单独或与 rhIGF-I 共同刺激成骨细胞，流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率，rhIGF-I 刺激成骨细胞，免疫细胞化学结合计算机图像分析系统检测 I 型胶原蛋白的表达。结果 一定浓度 IGF-I 能明显增加成骨细胞数量 ($P < 0.05$)，在 0.1 ~ 100 ng/ml 这种作用与 IGF-I 的浓度呈正相关，TNF- α 在 0.1 ~ 100 ng/ml 浓度范围内呈剂量依赖性促进成骨细胞凋亡 ($P < 0.05$) 并使 S 期细胞减少 ($P < 0.05$)，而 IGF-I 能抑制 TNF- α 对成骨细胞的促凋亡作用 ($P < 0.05$)，经 IGF-I 的刺激，成骨细胞 I 型胶原蛋白的表达明显高于对照组 ($P < 0.05$)。结论 IGF-I 对大鼠成骨细胞有明显的促增殖作用，在 0.1 ~ 100 ng/ml 之间呈浓度依赖性，IGF-I 能抑制 TNF- α 诱导的大鼠成骨细胞凋亡，IGF-I 能促进大鼠成骨细胞 I 型胶原蛋白的合成。

关键词：胰岛素样生长因子 I；成骨细胞；增殖；凋亡；I 型胶原蛋白

Effect of recombinant human insulin-like growth factor (rhIGF-I) on the proliferation, apoptosis and type I collagen synthesis of cultured rat osteoblasts XU Ping, ZHANG Keqin, LIU Chao, et al. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract : **Objective** To investigate the effect of rhIGF-I on the proliferation, apoptosis and type I collagen synthesis of rat osteoblasts *in vitro*. **Methods** Rat calvaria cells were cultured in medium with or without IGF-I and TNF- α was added in the medium to increase apoptosis. Cell proliferation was assessed by MTT colorimetric assay, cell cycle and apoptosis were analysed by flow cytometry, type I collagen expression was determined by immunocytochemistry and computer image analysis system. **Results** The OD of formazan, which reflects the cell number, significantly increased in osteoblasts exposed to IGF-I at 10-100 ng/ml for 24 hrs and 0.1-100 ng/ml for 48 and 72 hrs compared with those exposed to vehicle medium ($P < 0.05-0.01$). TNF- α increased the cell apoptosis in a dose-dependent manner ($P < 0.001-0.05$), increased the number of cells in G₀/G₁ phase ($P < 0.05-0.01$) and decreased the number in S phase ($P < 0.05$). IGF-I inhibited the effect of TNF- α on apoptosis. The expression of type I collagen in IGF-I-treated cells was higher than that in vehicle-treated cells ($P < 0.05$). **Conclusions** IGF-I stimulates the cell proliferation of osteoblast, inhibits apoptosis induced by TNF- α and increases the synthesis of type I collagen *in vitro*. Thus IGF-I probably promotes bone formation *in vitro*.

Key words : rhIGF-I; Osteoblast; Proliferation; Apoptosis; Type I collagen

IGF-I 是一种含有 70 个氨基酸残基与胰岛素有相似结构的多肽，它几乎存在于哺乳动物所有组织中，具有促进细胞增殖和分化的功能，成骨细胞含有丰富的 IGF-I，在骨代谢的调节中起着重要作用。骨质疏松症是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征

的，致使骨的脆性增加和易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病，其发病机制尚不清楚，Jehle 等^[1]对 45 名骨质疏松患者与 100 名健康者研究发现，与同性别同年龄的正常人相比，骨质疏松患者血清游离 IGF-I 下降了 73%，总 IGF-I 下降了 29%，其中发生过骨折的 13 名患者上述改变较未发生骨折的患者更为明显。神经性厌食相关性骨量减少和骨质疏松的发生可能与营养不良导致体内 IGF-I 缺乏有关，

作者单位：210029 南京，南京医科大学第一附属医院内分泌科

通讯作者：张克勤，Email: keqzhang@hotmail.com

使用 rhIGF-I 能明显增加神经性厌食症妇女的骨密度^[2]。这些研究提示 IGF-I 可能与骨质疏松症的发生有关联,但是,IGF-I 是否直接影响和如何影响骨代谢尚不清楚,本研究通过观察 IGF-I 对体外培养的大鼠成骨细胞增殖、凋亡与 I 型胶原蛋白合成的影响,探讨 IGF-I 对骨代谢影响的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

新生 SD 大鼠(出生后 36 h 内)由江苏省实验动物中心提供,rhIGF-I 购于罗氏公司,为 10 μ g 无菌冻干粉剂,按产品说明先溶于 0.1 ml 无菌的 0.1 mol/L 乙酸中,再用无血清 DMEM 稀释到 1000 ng/ml,以 0.2 ml 体积分装后 -20℃ 保存,使用时以无血清 DMEM 稀释到设定的浓度;DMEM 培养基购于 GIBCO 公司,胎牛血清(FBS)购于 Hyclone 公司,TNF- α 购于 Sigma 公司,兔抗大鼠 I 型胶原蛋白抗体购于 BIODSIGN 公司,生物素标记羊抗兔二抗试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司,DAB 购于 AMRESO 公司,胰蛋白酶、II 型胶原酶、MTT、DMSO 均购于 Sigma 公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 成骨细胞培养 采用酶消化法原代培养大鼠成骨细胞,参考文献^[3]并略作修改,简述如下:拉颈处死大鼠,于 75%乙醇中浸泡 3 min 后取头盖骨,在 Hanks 液中去除附着的软组织及骨膜后剪碎,0.1% II 型胶原酶(Hanks 液)37℃水浴分别消化 20 和 90 min,弃去第 1 次消化液,收集第 2 次消化液并离心(1000 r/min 5 min)细胞团经 Hanks 液洗涤 2 次后悬浮于含 10% FBS 的 DMEM 中,台盘蓝染色示活细胞比例为 82%~99%,细胞按 $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ 底面积植入培养瓶,在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后换培养基,以后隔天换液,待细胞达 80%~90%汇合时(大约 5 d)以 0.25%胰蛋白酶消化,吹打后得到的细胞经完全培养基洗涤 2 次后传入 96 孔培养板中待行细胞增殖试验,6 孔培养板中待行凋亡检测,24 孔板待行免疫细胞化学试验。

1.2.2 成骨细胞鉴定 采用钙-钴法碱性磷酸酶(ALP)染色进行成骨细胞鉴定,PBS 洗细胞 3 次,95%乙醇 5 min,蒸馏水洗 3 次,加入孵育液 37℃孵育 4~6 h,自来水冲洗,2%硝酸钴作用 3~5 min,蒸馏水洗 3 次,1%硫化铵反应 2 min,自来水冲洗,光镜下观察,阳性结果呈灰黑色。

1.2.3 细胞增殖能力测定 第 2 代成骨细胞以 $1 \times$

$10^5/\text{ml}$ 的密度分别植入 3 块 96 孔板中,每板接种 36 孔,每孔 100 μ l,用含 10% FBS 的 DMEM 培养 24 h 后换无血清 DMEM 再培养 24 h(此为清洗期),设立对照组($n=6$),仍使用无血清 DMEM 培养,试验组分别用含不同浓度 IGF-I(0.1、1.0、10、50、100 ng/ml)的无血清 DMEM 培养,每组 6 孔,在设定的培养时间(3 板分别为 24、48、72 h)结束前 4 h 每孔加入 MTT(5 mg/ml)20 μ l,继续培养 4 h,吸弃孔内培养液,加入 DMSO 150 μ l,振荡 10 min 使结晶物充分溶解,490 nm 波长测定 OD 值。

1.2.4 细胞凋亡的测定 对数生长期的成骨细胞以 $4 \times 10^4/\text{ml}$ 的密度接种于 6 孔板,每孔 3 ml,用含 10% FBS 的 DMEM 培养 24 h 后换无血清 DMEM 再培养 24 h,开始加药刺激,设立对照组(复孔),仍使用无血清 DMEM 培养,TNF- α 组,分别用含不同浓度 TNF- α (0.1、1.0、10、50、100 ng/ml)的无血清 DMEM 培养(每个浓度做复孔);TNF- α + IGF-I 组(复孔),培养基为含有 TNF- α 100 ng/ml 和 IGF-I 50 ng/ml 的无血清 DMEM,3 组细胞培养 72 h 后,0.25%的胰酶消化离心,PBS 清洗,70%预冷酒精悬浮固定细胞,4℃过夜,送南京医科大学流式细胞仪室进行检验,流式细胞仪购于美国 BD 公司,型号为 FACSVantage SE,碘化啉显色,Cell Quest 软件分析。

1.2.5 I 型胶原蛋白表达的测定 第 2 代成骨细胞以 $4 \times 10^4/\text{ml}$ 的密度植入事先置有盖玻片(盖玻片经多聚赖氨酸处理)的 24 孔板中,每孔 1 ml,用含 10% FBS 的 DMEM 培养 24 h 后换无血清 DMEM 再培养 24 h,设立对照组($n=6$),仍使用无血清 DMEM 培养,试验组($n=6$)的培养液为含 50 ng/ml IGF-I 的无血清 DMEM 培养 48 h 后,爬有细胞的盖玻片经 PBS 清洗,95%的酒精固定,H₂O₂ 去除内源性过氧化物酶,山羊血清封闭,加一抗 4℃过夜,加二抗作用,DAB 显色,苏木素复染细胞核,中性树胶封片,以 PBS 作为空白对照,兔 IgG 作为阴性对照。光镜下观察,棕黄色为阳性细胞,LEICAQ 5501W 图像分析系统进行图像分析。

1.3 统计学处理

全部资料采用 stata 7.0 统计软件进行分析,所有数据以均数加减标准差表示,采用单因素方差分析进行数据处理,并且根据 MTT 结果的散点图趋势,进行曲线拟合。

2 结果

2.1 成骨细胞 ALP 染色

表 1 IGF-I 对成骨细胞增殖的影响($n = 6 \bar{x} \pm s$)

时间(h)	0 ng/ml	0.1 ng/ml	1.0 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml
24	0.197 ± 0.0032	0.205 ± 0.0092	0.207 ± 0.0141	0.227 ± 0.0097 [*]	0.236 ± 0.0112 [*]	0.237 ± 0.0191 [#]
48	0.190 ± 0.0156	0.216 ± 0.0087 [#]	0.219 ± 0.0144 [△]	0.243 ± 0.0083 [△]	0.301 ± 0.0124 [△]	0.339 ± 0.0196 [△]
72	0.231 ± 0.0166	0.255 ± 0.0061 [*]	0.266 ± 0.0180 [#]	0.281 ± 0.0170 [△]	0.335 ± 0.0136 [△]	0.373 ± 0.0241 [△]

注:各组与对照组(IGF-I 浓度 0 ng/ml)比较 * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, △ $P < 0.001$

经钙-钴法 ALP 染色,光镜下 90% 以上细胞染色阳性,呈灰黑色(图 1)。

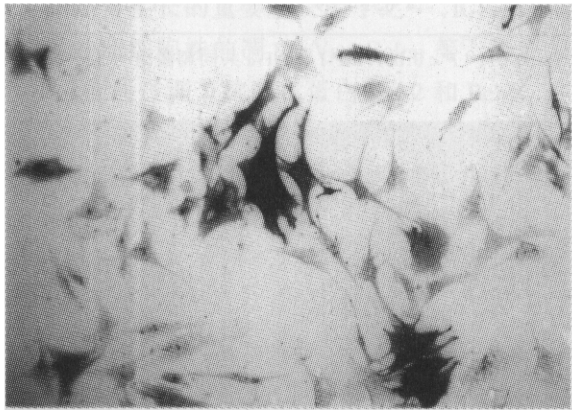


图 1 大鼠成骨细胞碱性磷酸酶染色(×200)

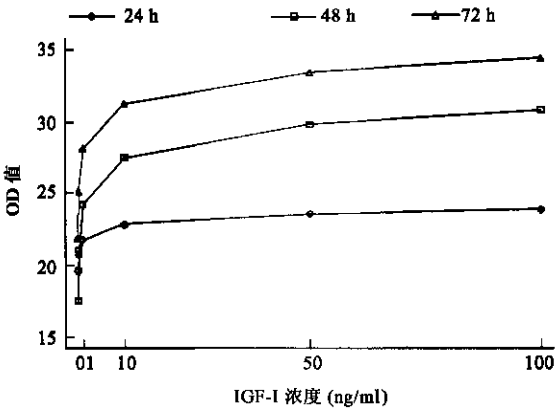


图 2 IGF-I 对成骨细胞增殖的影响

2.2 成骨细胞增殖能力测定结果

3 个刺激时间均显示 IGF-I 浓度在 0 ~ 100 ng/ml 之间,随着 IGF-I 浓度的递增,细胞的 OD 值呈现上升的趋势,其中刺激时间为 24 h 的细胞,IGF-I 浓度 10、50、100 ng/ml 三组与对照组有显著性差异($P < 0.05$),再对各浓度试验组之间两两比较,IGF-I 浓度 10 ng/ml 分别与 50 ng/ml 和 100 ng/ml 组间比较也有显著性差异($P < 0.05$),而 50 ng/ml 与 100 ng/ml 两组之间差异无显著性;刺激时间为 48 h 的细胞,所有 5 个浓度的试验组与对照组比较都有显著性差异

($P < 0.05$),进一步分析显示,除 0.1 与 1 ng/ml 之间的差异没有显著性其余均有显著性($P < 0.05$);刺激时间为 72 h 的细胞,所有 5 个浓度的试验组与对照组比较都有显著性差异($P < 0.05$),再对各浓度试验组之间两两比较,除 0.1 与 1、1 与 10 ng/ml 之间的差异没有显著性,其余均有显著性($P < 0.05$)。根据本资料的散点图趋势,认为可拟合指数曲线模型,三个指数曲线方程分别为 24 h : $\hat{y} = 0.2173976 + 0.0103678' \log_{10}(x + 0.01)$ ($P < 0.05$, $R^2 = 0.9871$); 48 h : $\hat{y} = 0.2416892 + 0.0331555' \log_{10}(x + 0.01)$ ($P < 0.05$, $R^2 = 0.8306$); 72 h : $\hat{y} = 0.2810705 + 0.0312716' \log_{10}(x + 0.01)$ ($P < 0.05$, $R^2 = 0.8424$)。根据拟合优度和回归图判断,三条指数曲线拟合的效果是满意的,见表 1、图 2。

2.3 成骨细胞凋亡及细胞周期的测定结果

流式细胞仪检测显示成骨细胞凋亡率随 TNF- α 浓度的增高而增加,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$),提示 TNF- α 有明显的诱导成骨细胞凋亡的作用。各浓度组随着 TNF- α 浓度的递增 S 期的细胞比例逐渐减少,当 TNF- α 浓度为 10、50 和 100 ng/ml 时与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$),各浓度组 G₀-G₁ 期细胞比例与对照组相比虽然没有显著性差异($P > 0.05$),但均高于对照组,而 G₂-M 期变化不明显,提示 TNF- α 可阻滞成骨细胞由 G₀-G₁ 期进入 S 期,抑制细胞增殖。在加入 IGF-I 后细胞的凋亡率明显减低($P < 0.05$),S 期细胞比例明显增加($P < 0.05$),提示 IGF-I 有明显的抑制细胞凋亡、促进细胞增殖的作用(表 2)。

2.4 成骨细胞 I 型胶原蛋白表达的测定结果

大鼠成骨细胞经 50 ng/ml IGF-I 刺激 48 h 后,I 型胶原蛋白的表达明显增加(图 3)。对照组与试验组各随机取片 3 张,每张玻片随机取 10 个视野,经 LEICAQ 5501W 病理分析软件分析显示,0 ng/ml 组为 97.39 ± 5.311 ,50 ng/ml 组为 85.49 ± 3.261 ,试验组 I 型胶原蛋白平均灰度较对照组降低 12.2%($P < 0.001$)。

表 2 IGF-I 对成骨细胞凋亡的影响

组别 TNF-α(ng/ml)	G ₀ -G ₁ 期细胞	G ₂ -M 期细胞	S 期细胞	凋亡细胞
0	83.53 ± 2.6	8.88 ± 1.86	7.6 ± 0.75	0.71 ± 0.02
0.1	87.09 ± 2.45	5.35 ± 0.65	7.56 ± 1.8	1.61 ± 0.16*
1.0	87.81 ± 3.73	5.39 ± 1.83	6.81 ± 0.11	3.61 ± 0.47*
10	88.11 ± 3.83	8.19 ± 1.3	4.72 ± 0.5*	4.28 ± 0.18 [#]
50	88.25 ± 2.44	8.13 ± 2.1	3.62 ± 0.71*	4.72 ± 0.21 [#]
100	88.23 ± 3.56	9.49 ± 1.32	2.28 ± 0.59*	8.4 ± 0.23 [△]
TNF-α + IGF-I(ng/ml) 100 + 50	85.27 ± 1.88	10.11 ± 0.092	4.62 ± 1.79 [☆]	1.41 ± 0.16 [☆]

注 不同浓度 TNF-α 各组与对照组(TNF-α 浓度 0 ng/ml)比较 * P < 0.05 ,[#] P < 0.01 ,[△] P < 0.001 ;IGF-I + TNF-α 共同刺激组与 TNF-α 100 ng/ml 单独刺激组比较 [☆] P < 0.05

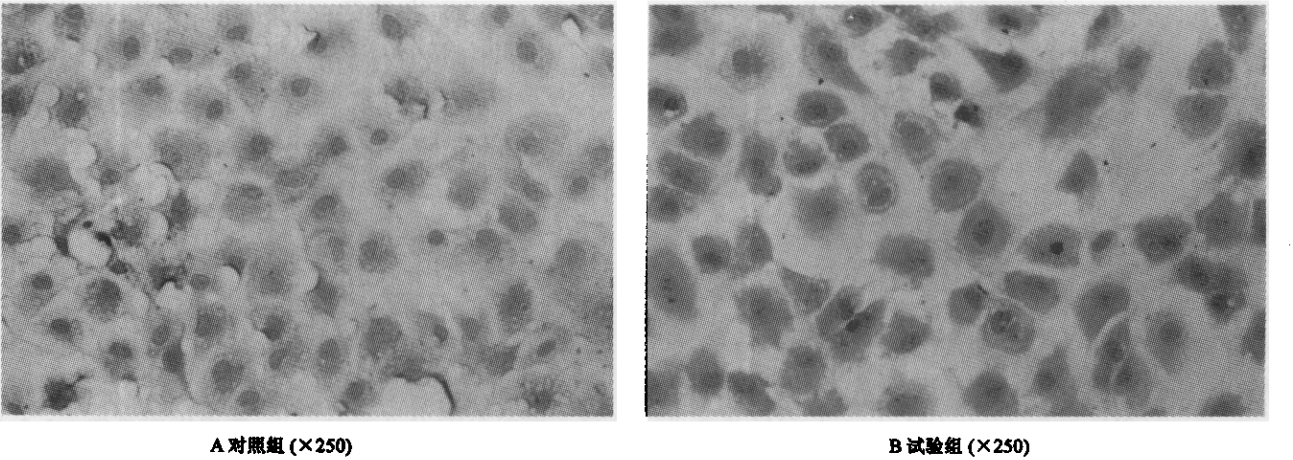


图 3 大鼠成骨细胞 I 型胶原细胞免疫化学

3 讨论

成骨细胞是骨的形成、骨骼发育与生长的重要细胞 ,它能向其周围产生胶原纤维和基质 ,并且有促进基质钙化的功能。本研究的结果显示 IGF-I 能明显增加培养的大鼠成骨细胞数量 ,在 IGF-I 的浓度为 0.1 ~ 100 ng/ml 之间 ,作用时间为 24、48 和 72 h 呈浓度依赖性 ,并且作用时间在 48 h 和 72 h ,浓度在 1 ~ 100 ng/ml 之间这种作用更为显著。IGF-I 增加培养的大鼠成骨细胞数量既可能是由于促进增殖作用 ,也可能由于抑制凋亡作用 ,或两者兼有所致 ;为了进一步探讨 IGF-I 对成骨细胞增殖的影响 ,我们采用流式细胞仪技术对成骨细胞的凋亡进行测定 ,首先使用无血清的培养基培养成骨细胞观察在饥饿状态下成骨细胞的凋亡情况 ,结果显示经饥饿 72 h 后成骨细胞的凋亡率仅为 0.72% ,Jilka 等^[4]报导成骨细胞在体内的凋亡率仅为 0% ~ 0.6% ,说明在没有凋亡诱导剂的作用下成骨细胞在体内和体外

均不容易发生凋亡 ,在 TNF-α 作用后凋亡率才有所上升 ,因此 MTT 显示试验组成骨细胞数量的增加可能与 IGF-I 对成骨细胞的促增殖作用有关 ,D'avis 等^[5]研究发现 rhIGF-I 能增加各年龄人成骨细胞样细胞脱氧胸腺嘧啶核苷的合成 ,促进细胞的增殖。当然 ,IGF-I 对成骨细胞促增殖作用的具体机制尚有待进一步研究。

细胞凋亡是一个主动的、程序化的细胞固有的死亡过程 ,细胞凋亡受细胞内特定基因及多种因子的调控 ,TNF-α 是一种具有杀伤肿瘤细胞功能的细胞因子 ,大量研究表明 TNF-α 与细胞凋亡之间的关系异常密切 ,认为 TNF-α 的抗肿瘤机制中 ,诱导肿瘤细胞凋亡是其中一种重要的途径。实验证明 TNF-α 也能诱导成骨细胞凋亡^[6,7] ,本研究使用不同浓度的 TNF-α 刺激成骨细胞 ,结果显示 TNF-α 对成骨细胞的促凋亡作用呈浓度依赖性 ,并且 TNF-α 使成骨细胞阻滞在 G₀-G₁ 期 ,抑制成骨细胞的增殖 ,而用 IGF-I 与 TNF-α 共同刺激成骨细胞发现凋亡率明显减低

了,提示 IGF-I 对 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡有明显的抑制作用。以往研究发现 TNF- α 在体外有抑制骨形成和促进骨吸收的作用, TNF- α 能抑制成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)的活性和 I 型胶原蛋白的合成,并且 TNF- α 可诱发骨母细胞产生一种破骨细胞活化因子,促进破骨细胞的骨吸收。本实验显示 TNF- α 对骨形成的抑制作用可能与其促使成骨细胞凋亡有关联, IGF-I 抑制了 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡间接的显示了其促进骨形成的作用。IGF-I 是维持体内许多组织正常生长的重要生长因子之一, IGF-I 还能抑制许多肿瘤细胞株的凋亡, Van Golen 等^[9] 研究发现 IGF-I 可能通过调节抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-X_L 在体内的水平来抑制神经母细胞瘤细胞的凋亡, Hill 等^[6] 实验发现 IGF-I 能促进体外培养的小鼠成骨细胞的增殖,并能抑制其凋亡。Farley 等^[7] 研究发现 IGF-I 在体外实验中呈剂量和时间依赖性抑制 TNF- α 诱导的人骨肉瘤细胞和成骨细胞凋亡同时伴有 ALP 活性的改变,认为 IGF-I 抑制凋亡的作用可能与成骨细胞合成 ALP 的能力有关,或者 ALP 活性的改变是成骨细胞凋亡而导致的结果,目前尚未清楚。

我们又通过细胞免疫化学的方法观察 IGF-I 对大鼠成骨细胞 I 型胶原蛋白合成的影响,结果发现经过 IGF-I 的刺激后成骨细胞 I 型胶原蛋白的合成明显增加($P < 0.001$)。I 型胶原蛋白是成骨细胞分泌的一种基质蛋白,是骨胶原的重要组成部分,经矿化后为骨骼提供支架。很早就有学者通过³H-脯氨酸掺入法测定体外培养的大鼠成骨细胞胶原合成的能力^[10],证明 IGF-I 使培养基中 I 型胶原蛋白的降解减少, IGF-I 对大鼠成骨细胞这种作用与其促增殖作用无关,因为在使用 DNA 合成抑制剂羟基脲时这种作用仍然存在, Thomas 等^[11] 使用 IGF-I 刺激体外培养的人骨髓基质细胞(hMSC, 能诱导分化为成骨细胞) 发现 IGF-I 能促进分化的 hMSC 和成熟的成骨细胞 I 型胶原的基因表达,在基因水平证实了 IGF-I 促进骨基质的合成,本研究通过细胞免疫化学的方法在蛋白质水平证实了 IGF-I 明显增加 I 型胶原蛋白的合成,促进了骨形成。但是 IGF-I 对 I 型胶原蛋白合成的促进作用除了上调其基因表达,可能还存

在其他机制,有待进一步研究。

综上所述,本研究通过体外细胞培养实验显示 rhIGF-I 促进成骨细胞的增殖、抑制 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡,促进成骨细胞 I 型胶原蛋白的合成,提示 IGF-I 有可能促进骨的形成。

【 参 考 文 献 】

- [1] Jehle P, Schulten K, Schulz W, et al. Serum levels of insulin-like growth factor(IGF)-I and IGF binding protein(IGFBP)-1 to -6 and their relationship to bone metabolism in osteoporosis patients. *Eur J Intern Med* 2003, 14: 32-38.
- [2] Grinspoon S, Thomas L, Miller K, et al. Effects of recombinant human IGF-I and oral contraceptive administration on bone density in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87: 2883-2891.
- [3] Mesheehy PMJ, Chambers TJ. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology*, 1986, 118: 824-828.
- [4] Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, et al. Osteoblast programmed cell death(apoptosis) : modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998, 13: 793-802.
- [5] D'avis PY, Frazier CR, Shapiro JR, et al. Age-related changes in effects of insulin-like growth factor I on human osteoblast-like cells. *Biochem J* 1997, 15: 753-760.
- [6] Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology*, 1997, 138: 3849-3858.
- [7] Farley JR, Stilt-Coffing B. Apoptosis may determine the release of skeletal alkaline phosphatase activity from human osteoblast-line cells. *Calcif Tissue Int* 2001, 68: 43-52.
- [8] Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *J Lab Clin Med* 1999, 134: 222-231.
- [9] Van Golen CM, Feldman EL. Insulin-like growth factor I is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 2000, 182: 24-32.
- [10] McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology* 1989, 124: 301-309.
- [11] Thomas T, Gori F, Spelsberg TC, et al. Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors : effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes. *Endocrinology* 1999, 140: 5036-5044.

(收稿日期: 2005-03-19)