

雷洛昔芬对大鼠成骨细胞分泌细胞因子的影响

毕崇萍 张绍芬 朱汉民

摘要:目的 初步探讨雷洛昔芬对成骨细胞自分泌和旁分泌的作用机制。方法 采用新生大鼠颅骨来源酶消化法体外培养成骨细胞,在培养液中加入不同浓度雷洛昔芬(0 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L),在共同条件下培养。应用酶联免疫法(ELISA)测定细胞培养上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。结果 雷洛昔芬(10^{-8} mol/L 组和 10^{-7} mol/L 组)的 IL-1 β 、IL-6 值低于对照组,雷洛昔芬各组 TNF- α 值均高于对照组,3项测试指标在 $0 \sim 24$ h 和 $24 \sim 48$ h 组间比较无显著性差异。结论 适当浓度下雷洛昔芬(10^{-8} M、 10^{-7} M)抑制大鼠成骨细胞分泌 IL-1 β 和 IL-6,雷洛昔芬能够通过调节成骨细胞的自分泌及旁分泌影响破骨细胞的功能。雷洛昔芬促进大鼠成骨细胞分泌 TNF- α ,雷洛昔芬在体内对 TNF- α 分泌与调节的作用待进一步研究。

关键词: 雷洛昔芬;成骨细胞;骨形成;细胞因子

Effects of Raloxifene on cytokine secretion in osteoblasts in rats BI Chongping, ZHANG Shaofen, ZHU Hanmin. Department of Gynecology, the Obstetric and Gynecological Hospital of Medical Center of Fudan University, Shanghai 200011, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanisms of the role of raloxifene on osteoblastic autocrine and paracrine.

Methods Osteoblasts were isolated from the calvaria of neonatal rats through trypsin and collagenase digestion. Different concentrations of raloxifene (0 , 10^{-8} M, 10^{-7} M and 10^{-6} mol/L) were added into the culture medium.

The levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the cultures media of rat osteoblasts were measured by ELISA. **Results** The concentration of IL-1 β and IL-6 in the groups with raloxifene, at 10^{-8} M and 10^{-7} M, were lower than those of the control, and the concentration of TNF- α in all raloxifene groups were higher than that of the control except for the raloxifene groups, at 10^{-6} M, in the $0 \sim 24$ hours. No significant difference was shown between the $0 \sim 24$ hours and $24 \sim 48$ hours' production of cytokines among any raloxifene group with the control group.

Conclusions Certain concentrations of raloxifene (10^{-8} M, 10^{-7} M) could inhibit IL-1 β and IL-6 secretion in rat osteoblasts and was able to affect the function of osteoclasts through modulating the autocrine and paracrine function of osteoblasts. Raloxifene can increase TNF- α production in rat osteoblasts *in vitro*, however, more study is pending on its mechanism.

Key words: Raloxifene; Osteoblasts; Cytokines

绝经后骨质疏松症患者进行雌激素替代疗法 (estrogen replacement therapy, or ERT),骨量减少得到明显抑制,骨折发生率明显降低。但随着美国妇女健康启动计划(the Women's Health Initiative, or WHI)等多项大规模试验数据的公布,浸润性乳房癌、冠心病、卒中和肺栓塞发病率增加^[1],使医生及患者对

ERT有所顾虑。选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulators, or SERM)因其具有雌激素激动或拮抗双重作用的功能,引起人们的关注。其中尤以新一代SERM雷洛昔芬(raloxifene, or RLX)成为防治绝经后骨质疏松的较为理想的药物。

雷洛昔芬是一个非甾体苯并噻吩化合物(分子式 $C_{28}H_{27}NO_4 \cdot SHCL$),对骨和心血管系统具有类雌激素作用,对子宫内膜和乳腺增生有抗雌激素作用。因此雷洛昔芬被认为是专为绝经后妇女设计疗效显著的防治骨质疏松性骨折的药物。雷洛昔芬多重预

作者单位:200011 复旦大学附属妇产科医院妇科(毕崇萍,张绍芬);上海华东医院/上海老年医学研究所(朱汉民)

通讯作者:毕崇萍,Email: bichongping@hotmail.com

后评价临床研究(Multiple Outcomes Of Raloxifene Evaluation , or MORE)显示^[2] ,腰椎骨折的危险性降低了 30% ~ 50% ;与 ERT 相比 ,其不增加子宫内膜的厚度 ,不引起阴道出血 ,可显著降低浸润性乳腺癌的危险性(72%) ,且对血脂代谢有良好的作用。虽然雷洛昔芬已经较广泛应用在骨质疏松症的治疗 ,但此种化合物调节骨代谢机制目前仍不甚了解。

本试验通过观察雷洛昔芬对成骨细胞分泌细胞因子的调节作用 ,并进一步观察不同剂量及作用时间对其分泌细胞因子的影响 ;初步探讨雷洛昔芬通过对成骨细胞自分泌及旁分泌的作用影响破骨细胞功能的机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

雷洛昔芬 原料(美国礼来公司提供) ;大鼠 IL-1 β 试剂盒(Pierce Biotechnology , Inc. USA) ;大鼠 IL-6、TNF- α 试剂盒(BioSource International ,Inc. USA) ; MEM 培养基(GIBICO 美国) ;小牛血清(NCS ,GIBICO 美国) ;II 型胶原酶(collagenase II SIGMA 美国) ;胰蛋白酶(trypsin 进口分装) ;CO₂ 培养箱(Heraeus 5060 德国) ,倒置相差显微镜(Nikon TS 100 日本) ,酶标测试仪(ELX-800 美国) ,恒温离心机(Heraeus 德国) ,光学显微镜(Nikon E 600 日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 成骨细胞培养(新生大鼠酶消化法) :新生 SD 大鼠(24 h 以内) 10 个 , 70% 酒精中浸泡 10 min ;去头顶皮肤 ,切下头盖骨 ,将头盖骨置于 PBS/D-Hanks 液内 ;剔除黏附的骨膜、血管等结缔组织 ,用 PBS/D-Hanks 液清洗 2 次后将洗净的头盖骨剪成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 小片 ;将骨片移入 5 ml 0.25% 胰蛋白酶溶液弃消化液 ;将骨片移入另一含 0.1% II 型胶原酶溶液中 , 37 $^{\circ}$ C 震荡消化分离细胞 60 min \times 2 次 ;合并 2 次消化液 ,将含细胞的消化液在 1000 r/min 下离心 10 min ,吸去上清液 ,沉淀的细胞团块用培养液制成细胞悬液。计数后接种于培养瓶 ,置 5% 二氧化碳培养箱中 37 $^{\circ}$ C 下培养。24 h 左右换液 1 次清除未贴壁细胞 ,以后 2 ~ 3 d 换液 1 次。待汇合时用胰蛋白酶消化传代 ,按 3 \times 10³ /孔分组接种于培养板。

1.2.2 实验分组 :本实验采用第二继代细胞 ,接种 24 h 后用不同培养液(对照组仅加培养液 ,其他组加入不同浓度含药培养液) 分组培养。(1) 对照组 0 mol/L (2) 雷洛昔芬 10⁻⁸ mol/L (3) 雷洛昔芬 10⁻⁷

mol/L (4) 雷洛昔芬 10⁻⁶ mol/L ,分别留取第 24 h , 48 h 的细胞培养上清液 2 ml 置低温冰箱备用。留取样品放置于低温干燥冰箱 ,使样本浓缩至 1 ml。

1.2.3 观察指标 细胞因子测定采用酶联免疫吸附法 ,步骤按试剂盒上说明书操作 ,质控品数在质控范围 结果可信。

1.2.4 统计学处理 数据采用 SPSS 10.0 统计软件 ,以均数加减标准差表示 ,采用方差检验 ,组间比较采用 *t* 检验 ,*P* < 0.05 定义为统计学结果差别有显著性。

2 结果

2.1 白介素-1 β (IL-1 β)测定结果

0 ~ 24h 结果中雷洛昔芬组(10⁻⁸、10⁻⁷ mol/L) IL-1 β 值低于对照组 ,其中 10⁻⁸ mol/L 组有显著性差异 , *P* < 0.05 ;雷洛昔芬 10⁻⁶ mol/L 组值高于对照组 ,有显著性差异 , *P* < 0.05。24 ~ 48 h 雷洛昔芬组(10⁻⁸、10⁻⁷ mol/L) IL-1 β 值低于对照组 ,其中 10⁻⁷ mol/L 组有显著性差异 , *P* < 0.05 ;雷洛昔芬 10⁻⁶ mol/L 组值高于对照组 ,有显著性差异。0 ~ 24 h 与 24 ~ 48 h 值比较 ,组间无显著性差异(见表 1)。

表 1 雷洛昔芬各组 IL-1 β 测定结果(pg/ml)

组别	例数	0 ~ 24 h (pg/ml)	24 ~ 48 h (pg/ml)
对照组	4	4.24 \pm 0.902	4.342 \pm 0.423
RAI(10 ⁻⁸ M)	4	2.535 \pm 0.653 *	3.835 \pm 0.377
RAI(10 ⁻⁷ M)	4	3.255 \pm 0.952	2.63 \pm 0.440 *
RAI(10 ⁻⁶ M)	4	5.952 \pm 0.703 *	5.92 \pm 0.704 *

注 :与对照组比较 , * *P* < 0.05

2.2 白介素-6(IL-6)测定结果

0 ~ 24h 结果显示 ,雷洛昔芬组 IL-6 值低于对照组 ,其中 10⁻⁷ mol/L 组有显著性差异 , *P* < 0.05 ; 24 ~ 48 h 雷洛昔芬组各剂量组 IL-6 低于对照组 ,与对照组无差异 ; 0 ~ 24 h 与 24 ~ 48 h 值比较无显著性差异(见表 2)。

表 2 雷洛昔芬各组 IL-6 测定结果

组别	例数	0 ~ 24 h (pg/ml)	24 ~ 48 h (pg/ml)
对照组	4	2.013 \pm 0.274	2.588 \pm 0.283
RAI(10 ⁻⁸ M)	4	1.920 \pm 0.256	2.155 \pm 0.859
RAI(10 ⁻⁷ M)	4	1.310 \pm 0.169 *	1.807 \pm 0.697
RAI(10 ⁻⁶ M)	4	1.826 \pm 0.153	2.34 \pm 0.204

注 :与对照组比较 , * *P* < 0.05

2.3 肿瘤坏死因子(TNF- α)测定结果

0 ~ 24 h 中各组 TNF- α (10⁻⁸、10⁻⁷ mol/L) 值高于与对照组 ,有显著性差异 , *P* < 0.05。24 ~ 48 h 中各组 TNF- α 与对照组比较均有显著性差异 , *P* < 0.05。24 ~ 48 h TNF- α 值较 0 ~ 24 h 有升高趋势 ,但无显著

性差异(见表3)。

表3 雷洛昔芬各组 TNF- α 测定结果

组别 (n = 4)	例数	0 ~ 24 h (pg/ml)	24 ~ 48 h (pg/ml)
对照组	4	10.210 \pm 0.553	13.860 \pm 2.202
RAI(10 ⁻⁸ M)	4	12.710 \pm 1.626*	18.89 \pm 3.547*
RAI(10 ⁻⁷ M)	4	14.59 \pm 0.086*	18.730 \pm 0.230*
RAI(10 ⁻⁶ M)	4	9.945 \pm 0.289	19.95 \pm 1.527*

注:与对照组比较, * P < 0.05

3 讨论

选择性雌激素受体调节剂(SERM)是一类化合物,其结构多样,与雌激素受体(Estrogen receptor, ER)显示具有高度结合力,选择性地作用于不同组织的雌激素受体,在不同靶组织可以表现为雌激素激动剂和(或)拮抗剂的作用。由于不同SERM结构上的特点,对各种受体的亲和力可有所差异,从而在组织中发挥不同的生物效应。雷洛昔芬被称为第二代SERM,并且是第一个被批准用于预防和治疗绝经后骨质疏松症的SERM类药物。

近年来,骨代谢中雌激素、雷洛昔芬与细胞因子的关系,特别是其中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- β (tumor necrosis factor- β , or TNF- β)间关系的研究,成为该领域的重要内容。这些细胞因子均可单独刺激破骨细胞的发育。然而,它们的作用需依赖基质细胞或成骨细胞的存在方能表现出来。这一现象提示上述细胞因子可能通过刺激基质细胞或成骨细胞产生其他细胞因子而间接地诱导破骨细胞形成,即通过自分泌(autocrine)及旁分泌(paracrine)的方式^[3]。IL-1、TNF和IL-6是以细胞因子网络的形式发挥效应,并表现出协同放大的作用^[3,4]。IL-1和TNF可刺激IL-6的产生^[5];IL-1和TNF所介导的应答过程部分可由IL-6替代。目前,已经证实在骨微环境中产生大量的免疫及造血因子,这些复杂的、作用相互重叠的因子影响骨的形成与吸收。骨代谢中雌激素、雷洛昔芬与细胞因子的关系,特别是IL-1、IL-6、TNF- β 间关系的研究,成为该领域的重要内容。

目前,雌激素对骨的直接作用,特别是通过各种细胞因子等局部因素的作用及其作用机制已经受到重视。雌激素对骨代谢的作用主要表现为抑制骨吸收。雌激素能抑制破骨细胞的活性,其机制可通过直接或间接的方式发挥作用。直接作用:抑制破骨细胞的骨吸收活性并呈剂量依赖关系。间接作用指雌激素通过对成骨细胞的作用,影响成骨细胞介导

的破骨细胞活性而发挥作用。成骨细胞能分泌调节因子,促进无活性的破骨细胞转变为活性的细胞。自然或手术绝经后雌激素缺乏会引起IL-1、IL-6、TNF分泌增多,而ERT后上述细胞因子的水平会下降^[8-10]。IL-1、IL-6、TNF是雌激素作用于骨的几种主要细胞因子。这几种细胞因子对于破骨细胞的生成起着重要作用。其中,IL-1和TNF是已知最有效的骨吸收刺激因子,它们对破骨细胞及其前体细胞发挥着极其相似的作用,且对破骨细胞形成而言IL-1和TNF是必需的“上游”因子,即诱导其他调节因子如IL-6。IL-6作为一种多功能细胞因子,在细胞因子介导的破骨性骨吸收中起到中心调控的作用。

IL-1由单核-巨噬细胞分泌,也可来自成骨细胞、肿瘤细胞等其他细胞,有IL-1 α 、IL-1 β 两种类型,两种类型IL-1抗原性不同,但靶细胞受体和生物活性相似,都是强烈的破骨性吸收因子,促使破骨细胞前体细胞分化成熟,其中IL-1 β 曾被称为破骨细胞的活化因子^[10]。IL-1可自分泌、旁分泌发挥作用,IL-1诱发的生物效应多通过其他激素或细胞因子的介导而产生,它可以刺激靶细胞产生IL-6,IL-1作用于骨组织对骨吸收有明显影响。有研究认为IL-1这些作用是间接进行的。IL-1首先与成骨细胞或基质细胞发挥作用,一方面成骨细胞产生细胞因子使成熟的破骨细胞活化,另一方面成骨细胞分泌IL-6、CSF促进破骨细胞的前体细胞分化成熟,IL-1间接作用于上述两个环节促进骨质吸收。IL-1受体缺失的去卵巢小鼠不发生骨丢失,也证实了IL-1在骨吸收中起重要作用^[12,13]。

在实验中,雷洛昔芬在10⁻⁸M、10⁻⁷M浓度下抑制成骨细胞IL-1 β 分泌,与雌激素在体外成骨细胞培养中影响分泌IL-1 β 的作用相似^[11,14]。但实验中在10⁻⁶M浓度下实验结果雷洛昔芬对IL-1 β 分泌有促进作用,与Cheung等^[14]报道不一致,其文章中雷洛昔芬在10⁻⁶M浓度下对成人成骨细胞分泌IL-1 β 有抑制作用。有学者曾经解释在体外培养中某些不同结果的产生可能是由于实验中所采用成骨细胞来源、培养方法、细胞接种密度不同^[15],本实验采用的是新生大鼠来源,而Cheung等采用的是成人成骨细胞,因其细胞的成熟度和生长速度不一致可能导致不同结果。另外,较高浓度也可能是产生相反作用的原因之一,在整个实验中,10⁻⁶M浓度下雷洛昔芬与另外两个浓度下的作用有显著性差异。

IL-6主要由骨髓干细胞、单核-巨噬细胞和成骨细胞分泌,破骨细胞也可分泌少量IL-6。现在IL-6

已被普遍认为是骨重建过程中刺激骨吸收的关键因子。大量实验证实 IL-6 不仅可增加破骨细胞形成,还与成熟破骨细胞的骨吸收功能有关,是强烈的溶骨因子。与 IL-1 和 PTH 有协同作用。成骨细胞表面有 IL-6 受体。成骨细胞可在 IL-1、TNF 和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 刺激下产生 IL-6,IL-6 和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 协同刺激骨髓粒-巨细胞集落干细胞形成破骨细胞前体。IL-6 可被 E_2 抑制^[5],其对骨代谢的影响与 E_2 正好相反。多数学者认为成骨细胞产生的 IL-6 是以自分泌、旁分泌方法调节破骨细胞的形成和功能,同时进一步地调节 IL-6 的基因表达。妇女绝经后 E_2 下降,对 IL-6 的监控失调,IL-6 水平增高,活性增强,进而通过 IL-6 刺激破骨细胞前体细胞的形成和分化,激发破骨细胞的活性,促进骨吸收,最后导致骨质疏松。Nobuyuki 等^[16]的研究提示,IL-6 刺激破骨细胞形成并非通过破骨细胞上的 IL-6 受体,而是通过成骨细胞上的 IL-6 受体介导。大鼠成骨细胞可以自分泌 IL-6,近年来研究发现成骨细胞不仅与骨形成密切相关,而且在骨吸收过程中也起到至关重要的作用,直接或间接地参与了调节,在破骨细胞激活和破骨细胞吸收的激素调控方面居中心地位。

本实验中雷洛昔芬对成骨细胞分泌 IL-6 呈抑制作用,与其他学者^[15,16]的实验结果一致,而既往的雌激素作用下的体外培养也显示,雌激素可以抑制成骨细胞分泌 IL-6,进而影响破骨细胞的功能^[11,15,17,18],两种药物的相似作用提示雷洛昔芬可通过与雌激素相同的途径影响成骨细胞分泌 IL-6 的功能。

TNF 主要由单核巨噬细胞合成,也可由 T 细胞、自然杀伤细胞、软骨细胞,成骨细胞也可分泌。根据来源和结构不同分为 TNF α 和 TNF β ,其中 TNF α 与骨质疏松的关系更为密切。Roggia 等^[19]研究卵巢切除大鼠分泌 TNF 的 T 细胞增加,野生小鼠卵巢切除后骨质迅速丢失,而在 TNF- α 受体缺乏的小鼠则未出现类似骨质改变,故提示 TNF- α 在卵巢功能下降后骨质疏松发病中有不可忽视的作用。已有大量的实验结果证实 TNF- α 在体内及体外实验中均是骨吸收的刺激物,它可通过激活破骨细胞而发挥效能。目前认为,TNF- α 对破骨性骨吸收的作用是通过含 TNF- α 受体的成骨细胞介导的,成骨细胞既是 TNF- α 的效应细胞,又是 TNF- α 的产生细胞,可在 IL-1 等细胞因子的刺激下合成及释放 TNF- α 。由此说明 TNF- α 以旁分泌或自分泌的形式调节着成骨细胞和破骨细胞的功能。TNF- α 是强有力的骨吸收诱导剂,且

必须在成骨细胞存在时发挥作用,对骨代谢的影响通过调节破骨细胞的增殖、分化和成熟来介导的。

本实验中,我们意外地发现雷洛昔芬对成骨细胞分泌 TNF- α 有促进作用。而目前尚未见到雷洛昔芬对成骨细胞分泌 TNF- α 的实验观察报道,也未见雷洛昔芬在体内实验中对 TNF- α 分泌影响的报道。Qu Q 等^[11]研究显示雌激素对大鼠骨髓来源的成骨细胞分泌 TNF- α 无明显作用。在体内,成骨细胞不是主要分泌 TNF- α 的细胞,体内实验中绝经后血清中 TNF- α 水平升高主要是单核细胞的分泌作用。有文献报道,雌激素抑制单核细胞 TNF- α 基因的表达,不同受体(ER α 及 ER β)其效应是不一样的,雌激素与 ER β 的抑制效应远大于与 ER α 结合的效应^[20]。所以,我们推测在体外培养实验中雷洛昔芬对成骨细胞分泌 TNF- α 作用与 Qu Q 等报道的雌激素作用结果不同的原因,可能是由于存在着与雌激素不完全相同的受体作用机制。此外,雷洛昔芬在体内对 TNF- α 分泌的作用与影响尚不清楚,这有待今后的实验进一步了解与明确。

在本实验体外培养中随着浓度增高至 10^{-6} M 时,对成骨细胞的细胞因子分泌无调节作用,甚至有相反的作用出现。临床试验也表明如在 MORE 实验中 60 mg/d 和 120 mg/d 剂量对骨质疏松治疗效果相似,并非随着剂量增加疗效也同步增加,故提示我们采用适当的剂量才会达到最佳效果。我们推测过高浓度不但无益,甚至可能有相反的作用。

我们的体外实验以成骨细胞作为着眼点,观察了雷洛昔芬对成骨细胞的一系列作用。而在体内,对于骨形成和骨吸收有着极为复杂的调节机制,而且雷洛昔芬对破骨细胞也有着重要作用。我们实验通过观察雷洛昔芬对体外培养的成骨细胞的作用,为今后的进一步研究提供依据及参考。对雷洛昔芬有待于深入的实验研究,如能建立成骨细胞和破骨细胞的共同培养体系将是理想的实验条件,并需进行体内实验研究,而雌激素受体的研究将是解释 SERM 作用机制的钥匙。

【参 考 文 献】

- [1] Writing Group for the Women' Health Initiative Investigators. Risk and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. JAMA 2002, 288 321-333.
- [2] Ettubger B, Black DM, Mitlak BH, et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-years randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) investigators. JAMA,

- 1999 , 7 : 637-645.
- [3] Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone* , 1995 , 17 : 63-67.
- [4] Passeri N , Girasole G , Jilka RL , et al. Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. *Endocrinology* , 1993 , 133 : 822-828.
- [5] Ishimi Y , Miyaura C , Jin C , et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* , 1990 , 145 : 3297-3303.
- [6] Evans GL , Bryant Hu , Magee DE , et al. Raloxifene inhibition bone turnover and prevents further cancellous bone loss in adult ovariectomized rats with established osteopenia. *Endocrinology* , 1996 , 137 : 4139-4144.
- [7] Viereck V , Grundker C , Blaschke S , et al. Raloxifene concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits interleukin-6 production by human trabecular osteoblasts. *J Clinical endocrinology & metabolism* , 2003 , 88 : 4206-4213.
- [8] Hikiji H , Ishii S , Shindou H , et al. Absence of platelet-activating factor receptor protects mice from osteoporosis following ovariectomy. *J Clin Invest* , 2004 , 114 : 85-93.
- [9] Pacifici R , Rifas L , McCracken R , et al. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin-1 release. *Proc Natl Acad Sci* , 1989 , 86 : 2398-2402.
- [10] Pacifici R , Brown C , Rifas L , et al. TNF- α and GM-CSF secretion from human blood monocytes : Effect of menopause and estrogen replacement. *J Bone Miner Res* , 1990 , 5 : 145.
- [11] Qu Q , Harkonen PL , Monkkonen J , et al. Conditioned medium of estrogen-treated osteoblasts inhibits osteoclasts maturation and function *in vitro*. *Bone* , 1999 , 25 : 211-215.
- [12] Lorenzo JA , Naprta A , Rao Y , et al. Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. *Endocrinology* , 1998 , 139 : 3022-3025.
- [13] Sunyer T , Lewis J , Collin- Osdoby P , et al. Estrogen's bone-protective effects may involve differential IL-1 receptor regulation in human osteoclast-like cell. *J Clin Invest* , 1999 , 103 : 1409-1418.
- [14] Cheung J , Mak YT , Papaionannou S , et al. Interleukin-6 (IL-6) , receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin production by human osteoblastic cells : comparison of the effects of 17-beta oestradiol and raloxifene. *J-Endocrinol* , 2003 , 177 : 423-433.
- [15] Chen FP , Lee N , Wang KC , et al. Effect of estrogen and $1\alpha, 25$ (OH)₂-VitD₃ on the activity and growth of human primary osteoblast-like cells *in vitro*. *Fertility and sterility* , 2002 , 77 : 1038-1043.
- [16] Udagawa N , Takahashi N , Katagiri T , et al. Interleukin (IL-6) induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J-Exp-Med* , 1995 , 182 : 1461-1468.
- [17] Kassem M , Harris SA , Spelsberg TC , et al , Estrogen inhibits interleukin-6 production and gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptors. *J Bone Miner Res* , 1996 , 11 : 193-199.
- [18] Rickard DJ , Monroe DG , Ruesink TJ , et al. Phytoestrogen genistein acts an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. *J-Cell-Biochem* , 2003 , 89 : 633-646.
- [19] Roggia C , Gao YH , Cenci S , et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow : A key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci* , 2001 , 98 : 13960-13965.
- [20] An J , Tzagarakis FC , Scharschmidt TC , et al. Estrogen receptor- β Selective transcriptional activity and recruitment of corepressors by phytoestrogens. *J Biol Chem* , 2001 , 276 : 17808-17814.