

脱氢表雄酮对离体大鼠成骨细胞代谢和一些细胞因子的影响

孙宜萍 李蔚 朱国英 王莉华

中图分类号: R965 R361.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)02-0073-07

摘要:目的 研究脱氢表雄酮(DHEA)促进成骨细胞(OB)增殖的作用和机制。方法 体外分离培养大鼠 OB,取传一代细胞,分别给予 10^{-5} 、 10^{-7} 、 10^{-9} mmol/L DHEA 培养 72 h,以 10^{-8} mmol/L 雌二醇(estradiol, E_2)为阳性对照,另设空白对照组。以细胞形态学和碱性磷酸酶(ALP)染色鉴定。应用光镜、四唑盐(MTT)法检测细胞的生长和增殖。茜素红染色观察成骨细胞矿化结节形成功能,同时双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定不同浓度 DHEA 培养液中对 VEGF、OPG、TGF- β_1 、IL-1 β 和 GM-CSF 浓度的影响。结果 不同浓度 DHEA 组 OB 增殖能力均有上升,其中以 10^{-7} mmol/L DHEA 组最显著($P < 0.01$),其作用和 E_2 相似($P > 0.05$)。不同浓度 DHEA 组 ALP 的活性均升高,亦以 10^{-7} mmol/L DHEA 组最显著($P < 0.01$), 10^{-7} 、 10^{-9} mmol/L DHEA 的作用和 E_2 和相似($P > 0.05$)。 10^{-9} mmol/L DHEA 组单位细胞数的 ALP 活性高于空白对照组($P < 0.05$)。不同浓度 DHEA 组矿化面积及矿化面积比均有显著增加($P < 0.01$),其作用和 E_2 相似。在低浓度 DHEA 组的培养中对 OPG、TGF- β_1 、VEGF 的反应呈上升趋势与对照组有显著差别与 OB 增殖能力呈正相关。在高浓度 DHEA 组的培养中对 IL-1 β 、GM-CSF 的反应呈下降趋势与对照组有显著差别与 OB 增殖能力呈负相关。结论 DHEA 能够促进大鼠 OB 生长和增殖,其作用可能与刺激 OPG、TGF- β 、VEGF 抑制 IL-1 β 、GM-CSF 途径有关。

关键词: 硫酸脱氢表雄酮; 成骨细胞; 细胞因子

The effects of dehydroepiandrosterone on metabolism of rat osteoblasts and cytokine *in vitro* SUN Yiping, LI Wei, ZHU Guoying, et al. Department of Gerontology, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects and mechanisms of dehydroepiandrosterone (DHEA) on osteoblast proliferation *in vitro*. **Methods** Rat osteoblasts (OB) were separated and cultured *in vitro*. First generation of OBs cultured for 72 hours in a variety concentration of DHEA (10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} mmol/L) were set up as the experiment group, while those exposed to 10^{-8} mmol/L of estradiol (E_2) culture were regarded as positive controls group. The blank control group was set up as well. The biological characteristics of OBs were analyzed by phase-contrast microscopy and alkaline phosphatase (ALP) histochemistry. Light microscope and MTT were used to observe the growth and proliferation of osteoblasts. The formation of mineralized nodus was examined by Alizarin Bordeaux stain. The concentrations of IL-1 β , OPG, TGF- β_1 , GM-CSF and VEGF in DHEA culture solution were also measured by double antibody sandwich ABC-ELISA simultaneously. **Results** Proliferation rate of OBs was increased in experiment group compared with that in the blank control group. The most significant increase was found in the group of 10^{-7} mmol/L DHEA culture ($P < 0.01$) which was similar to the E_2 culture group ($P > 0.05$). ALP activity in experiment group was higher than that in blank control group, with most significant increase in the group of 10^{-7} mmol/L DHEA culture ($P < 0.01$). No significant differences of ALP activity were seen between E_2 culture group and DHEA group with concentration of 10^{-7} and 10^{-9} mmol/L ($P > 0.05$). ALP activity

基金项目: 上海市科委课题(034119946)

作者单位: 200233 上海,交通大学附属第六人民医院老年科(孙宜萍、李蔚);上海复旦大学放射医学研究所(朱国英、王莉华)

通讯作者: 孙宜萍, Email: sunyipings@medmail.com.cn

of unitary cell population was higher in the group of 10^{-9} mmol/L DHEA culture than that in blank control group ($P < 0.05$). Furthermore, similar to that of E_2 culture group ($P > 0.05$) increases of area and area ratio of mineralized nodules were found in various concentration of DHEA group ($P < 0.01$). Additionally, in lower DHEA concentration groups, the concentrations of OPG, TGF- β_1 and VEGF were increased and were positively correlated with osteoblast proliferation. In contrast, the concentration of IL-1 β , GM-CSF were decreased in higher concentration of DHEA and were negatively correlated with osteoblast proliferation. **Conclusions** DHEA could promote the growth and proliferation of rat OB, and it might act as the stimulator of OPG, TGF- β_1 and VEGF pathway, meanwhile the inhibitor of IL-1 β , GM-CSF pathway.

Key words: Dehydroepiandrosterone (DHEA); Osteoblast; Cytokine

脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)和雌激素一样都能促进成骨细胞(OB)的增殖及骨矿化物质在骨内沉积,抑制成骨细胞的凋亡和抑制破骨细胞(OC)的吸收^[1]。近年来研究发现一些细胞因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、骨保护素(OPG)、转化生长因子(TGF- β_1)、白介素(IL-1 β)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等通过作用于 OB 或 OC 而参与骨代谢。雌激素对上述细胞因子的作用已有报道^[2],但 DHEA 对这些细胞因子产生影响目前研究较少,本实验是在离体培养 OB 的基础上,检测 DHEA 对 OB 增殖效应及对以上细胞因子的影响,探讨 DHEA 对 OB 增殖的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

1 d 龄 SD 新生大鼠(复旦大学放射医学研究所动物房,合格证 34),雌雄不拘。

1.2 实验材料

MEM 培养基干粉:GIBCO BRL U.S.A;胎牛血清:GIBCO BRL U.S.A;胶原酶 II:Sigma 公司;胰蛋白酶:华美生物工程公司;脱氢表雄酮(DHEA):美国 Sigma 公司产品,配成浓度为 1×10^{-5} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-9} mmol/L;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒:Sigma 公司;大鼠 VEGF、OPG、TGF- β_1 、IL-1 β 、GM-CSF 定量 Elasa 试剂盒由美国 A&R 公司提供,西康生物科技有限公司分装。

1.3 大鼠成骨细胞分离培养与鉴定

1.3.1 成骨细胞分离培养(机械分离加酶消化法): 出生 24 h 内的 SD 大鼠 10 只,取颅盖骨,去骨膜, PBS 反复冲洗后将骨组织剪碎,0.25% 胰蛋白酶 5 mL 37℃ 预消化。弃消化液,将骨片移入含 0.1% II 型胶原酶消化,离心弃上清,加入适量培养液,制成细胞悬液混匀,以 $1.2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 25 cm^2 培养瓶,置 5% CO_2 , 37℃ 条件下培养至细胞汇合后,

0.25% 胰蛋白酶消化, $1.2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 分瓶接种于 25 cm^2 培养瓶,继续培养,汇合后用于测定 OB 的增殖及功能等。

1.3.2 成骨细胞鉴定(碱性磷酸酶染色:偶氮偶联法) 底物、显色剂与缓冲液按 1:1:50 比例混合配制孵育液,接种在玻片上的细胞培养 1 w, 2.5% 戊二醛 4℃ 固定 7 min, 蒸馏水冲洗,浸入孵育液, 37℃ 条件下孵育 60 min, 蒸馏水冲洗, 晾干, 中性树胶封片, 光镜观察、摄片。

1.3.3 矿化结节染色(茜素红法) 汇合后的成骨细胞经含抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠矿化诱导液培养,形成不透光的矿化结节,茜素红染色鉴定。光镜下观察。以红染,边界清晰,周围有明显细胞堆积,短径大于 100(20) μm 的标准,低倍镜下计数每个视野下的矿化结节数。

1.3.4 大鼠各细胞因子定量测定(ELISA 法) 大鼠成骨细胞 1.25×10^3 cell/mL $\times 200 \mu\text{L}$ /孔接种于 48 孔细胞培养板分为各浓度组培养 24、48、72 h 后,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。在 492 nm 处测各标本中各细胞因子浓度 OD 值。

1.4 观察指标

1.4.1 成骨细胞增殖能力(MTT 法) 成骨细胞 1.25×10^3 cell/mL $\times 200 \mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔细胞培养板,培养 24 h 后,分为空白对照组、雌激素(estradiol, E_2) 10^{-8} mmol/L 组、DHEA 10^{-5} 、 10^{-7} 和 10^{-9} mmol/L 5 组。培养 72 h,弃上清液,每孔加无血清 MEM 培养液 100 μL , MTT(二甲基噻唑二苯基四唑溴盐) 10 μL , 37℃ 孵育 4 h,加入 20% 的 SDS(十二烷基硫酸钠) 150 μL , 37℃ 温育 2 h,酶标仪 570 nm 波长检测吸光度值。

1.4.2 成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性(PNPP 法): 以上 5 组,培养 72 h,弃上清液, PBS 冲洗,每孔加 PNPP 底物 150 μL , 37℃ 孵育 30 min,加入 0.2 mol/L 的 NaOH 50 μL 终止反应,酶标仪 405 nm 波长检测

吸光度值(OD),样品 OD 值表示 ALP 活性。以 ALP 的 OD 值/MTT 的 OD 值比值表示单位细胞数 ALP 活性。

1.4.3 成骨细胞矿化结节形成功能(茜素红染色):成骨细胞 2.5×10^3 cell/mL $\times 2$ mL/孔接种于 24 孔细胞培养板,分为以上 5 组。培养至完全汇合后换成含 10% 矿化诱导液的培养液继续培养,每 2 d 换液 1 次,继续培养 3 w,吸弃培养液,PBS 洗涤 2 次,95% 酒精固定,弃酒精,PBS 洗涤 2 次,加入 0.2% 茜素红染液染色,光镜下观察。以红染,边界清晰,周围有明显细胞堆积,短径大于 $20 \mu\text{m}$ 的标准,低倍镜下计算每个视野的矿化面积和矿化面积比。每组计算 20 个视野。

1.4.4 大鼠各细胞因子 (ELISA 法):测定大鼠 OB 各标本中各细胞因子浓度 OD 植。

1.5 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行连续变量分析及相关性分析。

2 结果

2.1 成骨细胞形态学分析

显微镜下,原代细胞培养第 2 d,见成骨细胞贴壁展开呈多种形态。培养 3~5 d,细胞体积增大,见较多细胞分裂相;胞浆丰富,伸出多个伪足,细胞半融合。培养 1 w 左右,细胞融合成铺路石状。OB 的鉴定:ALP 染色成阳性,可见胞质内蓝紫色阳性颗粒,核不着色,位于细胞一侧,可见 1~2 个核仁。以胞浆呈明显蓝紫色颗粒为阳性细胞,无着色或和背景一致为阴性细胞。原代培养的细胞纯率超过 90%,符

合本研究的要求,见图 1。

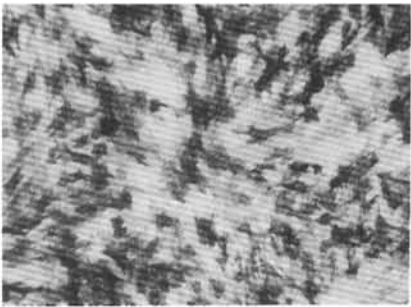


图 1 成骨细胞碱性磷酸酶染色 ($\times 100$ 倍)

2.2 不同浓度 DHEA 对成骨细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活性、增殖能力的影响 (见表 1)

和对照组相比 10^{-5} mmol/L DHEA 组 ALP 活性和成骨细胞增殖能力差异无显著性 ($P > 0.05$), 10^{-7} mmol/L DHEA 组 ALP 活性和成骨细胞增殖能力最高 ($P < 0.01$)。 10^{-7} 或 10^{-9} mmol/L DHEA 组和 E_2 组相比 ALP 活性相仿 ($P > 0.05$)。单位细胞数 ALP 活性 E_2 组、 10^{-7} mmol/L、 10^{-9} mmol/L DHEA 组均有升高,以 10^{-9} mmol/L DHEA 组升高最显著 ($P < 0.05$) 优于 E_2 组, 10^{-5} mmol/L DHEA 组差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.3 不同浓度 DHEA 对成骨细胞矿化结节形成功能的影响 (见表 2)

10^{-5} 、 10^{-7} 及 10^{-9} mmol/L DHEA 组与对照组相比对矿化结节计数无差异 ($P > 0.05$),而矿化面积及矿化面积比却显著增加 ($P < 0.01$),与 E_2 组相仿。各组矿化结节照片见图 2~4 ($\times 100$ 倍)。

表 1 各组成骨细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活性、增殖能力比较

项目	空白对照组	10^{-8} mmol/L E_2 组	DHEA		
			10^{-5} mmol/L 组	10^{-7} mmol/L 组	10^{-9} mmol/L 组
细胞增殖能力	0.4 ± 0.03	$0.40 \pm 0.02^{**}$	$0.4 \pm 0.03^*$	$0.5 \pm 0.07^{**}$	$0.4 \pm 0.05^*$
ALP 活性	0.6 ± 0.06	$0.7 \pm 0.07^{**}$	0.6 ± 0.04	$0.7 \pm 0.04^{**}$	$0.6 \pm 0.06^*$
单位细胞数 ALP 活性	1.5 ± 0.16	1.5 ± 0.14	1.4 ± 0.14	1.6 ± 0.25	$1.7 \pm 0.15^*$

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 2 各组成骨细胞矿化结节计数、矿化面积和矿化面积比

项目	空白对照组	10^{-8} mmol/L E_2 组	DHEA		
			10^{-5} mmol/L 组	10^{-7} mmol/L 组	10^{-9} mmol/L 组
矿化面积(μm^2)	88510.9 $\pm$ 45592.90	139013.1 $\pm$ 59779.71**	131903.9 $\pm$ 28786.67**	144943.1 $\pm$ 49633.27**	146065.4 $\pm$ 42141.35**
矿化面积比	6.5 $\pm$ 3.35	10.2 $\pm$ 4.39**	9.7 $\pm$ 2.12**	10.7 $\pm$ 3.65**	10.75 $\pm$ 3.10**

注:与空白对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

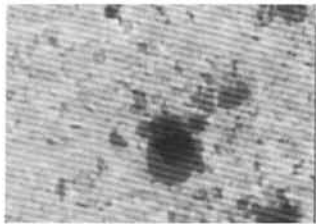


图 2 对照组矿化结节

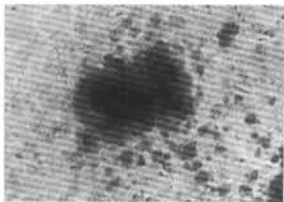


图 3 E₂ 组矿化结节

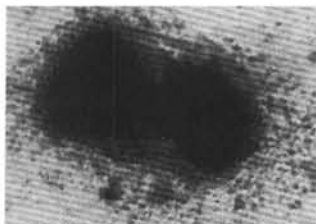


图 4 10⁻⁷ mmol/L DHEA 组矿化结节

2.4 不同浓度 DHEA 对各细胞因子的影响

大鼠 OB 接种培养于各浓度组 24、48、72 h 后，发现不同浓度 DHEA 对各种细胞的表达与对照组比较均差异有显著性 ($P < 0.01$)。低浓度 10⁻⁹ mmol/L 组在各时间点对 VEGF、OPG、TGF-β₁ 的反应均呈上升趋势，在 72 h 时最活跃。VEGF 与成骨细胞 ALP

呈正相关， $ALP = 0.583 + 0.00025VEGF, r^2 = 0.90, P = 0.004$ ；与 WSP 呈正相关， $WSP = 0.38 + 0.000218VEGF, r^2 = 0.92, P = 0.003$ 。OPG 与成骨细胞 ALP 呈正相关， $ALP = 0.50 + 0.0031OPG, r^2 = 0.87, P = 0.006$ ；与 WSP 呈线性正相关， $WSP = 0.31 + 0.0046OPG, r^2 = 0.89, P = 0.001$ 。TGF-β₁ 与成骨细胞 ALP 呈正相关， $ALP = 0.459 + 0.0035TGF-β_1, r^2 = 0.96, P = 0.001$ ；与 WSP 呈正相关， $WSP = 0.272 + 0.0035 TGF-β_1, r^2 = 0.97, P = 0.000$ 见表 3、图 5。在高浓度 10⁻⁵ mmol/L 组对 IL-1β、GM-CSF 的反应在 48 h 间点均呈下降趋势。IL-1β 在与成骨细胞 ALP 呈负相关， $ALP = 0.80 - 0.01IL-1β, r^2 = 0.95, P = 0.04$ ；与 WSP 呈负相关， $WSP = 0.56 - 0.01IL-1β, r^2 = 0.85, P = 0.015$ 。GM-CSF 与成骨细胞 ALP 呈负相关 $ALP = 0.75 - 0.01GM-CSF, r^2 = 0.95, P = 0.001$ ；与 WSP 呈负相关， $WSP = 0.53 - 0.01GM-CSF, r^2 = 0.83, P = 0.01$ 见表 4、图 5。

表 3 10⁻⁹ mmol/L DHEA 组 VEGF、OPG、TGF-β₁ 细胞因子的变化

项目	组别	24 h	48 h	72 h
VEGF	空白对照组	194.0 ± 0.00	307.3 ± 0.00	115.1 ± 0.00
	DHEA 组	197.9 ± 5.63	56.8 ± 1.17*	545.5 ± 21.94*
OPG	空白对照组	202.2 ± 0.00	163.8 ± 0.00	137.72 ± 0.00
	DHEA 组	142.6 ± 5.14	152.7 ± 9.08*	285.63 ± 1.03*
TGF-β ₁	空白对照组	64.6 ± 0.00	56.9 ± 0.00	52.8 ± 0.00
	DHEA 组	42.8 ± 10.19	46.6 ± 4.87*	74.8 ± 5.49*

注：与空白对照组比较* $P < 0.01$

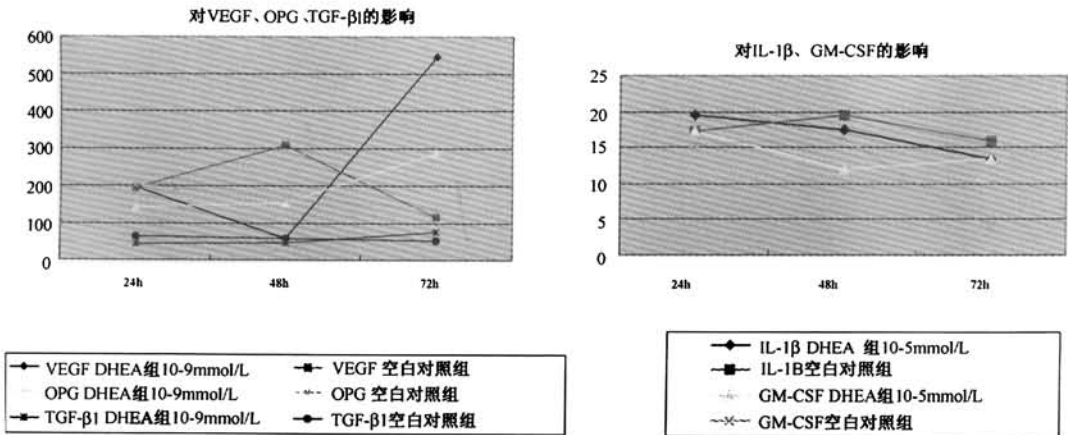


图 5 对各细胞因子的最佳影响

表 4 10⁻⁵ mmol/L DHEA 组 IL-1β、GM-CSF 细胞因子的变化

项目	组别	24 h	48 h	72 h
IL-1β	空白对照组	17.3 ± 1.45	19.5 ± 2.59	17.9 ± 1.89
	DHEA 组	19.5 ± 0.77	17.4 ± 1.72*	13.4 ± 1.32*
GM-CSF	空白对照组	15.5 ± 0.00	16.2 ± 0.00	3.9 ± 0.00
	DHEA 组	17.2 ± 3.84	12.1 ± 2.45*	13.4 ± 2.92*

注：与空白对照组比较 *P < 0.01

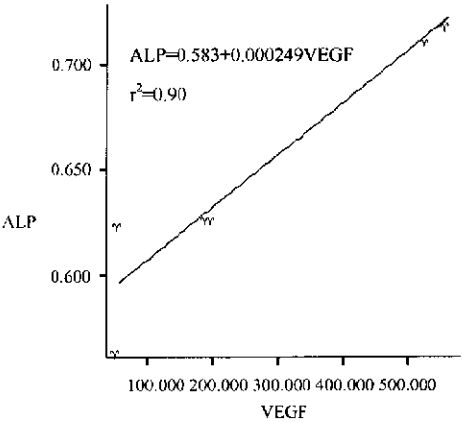


图 6 成骨细胞 ALP 与 VEGF 呈线性关系

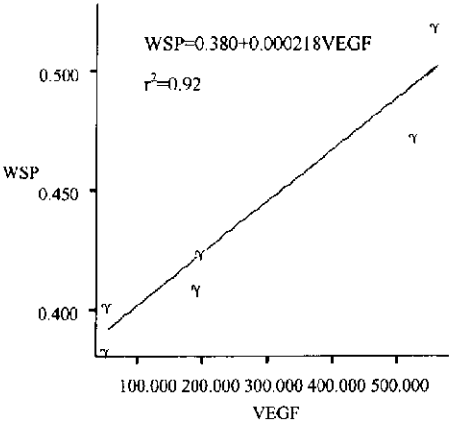


图 7 成骨细胞 WSP 与 VEGF 呈线性关系

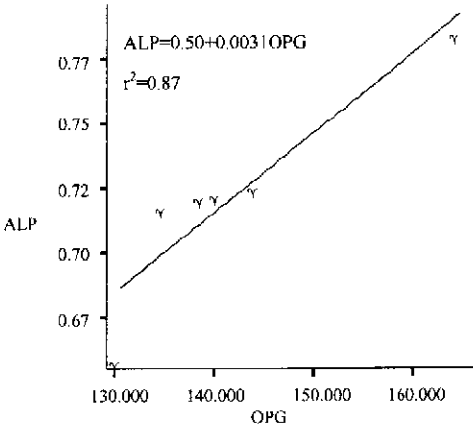


图 8 成骨细胞 ALP 与 OPG 呈线性关系

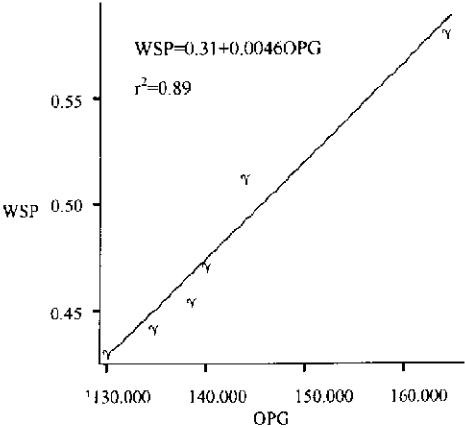


图 9 成骨细胞 WSP 与 OPG 呈线性关系

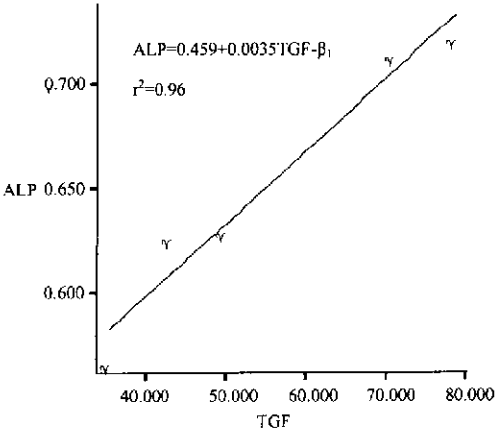


图 10 成骨细胞 ALP 与 TGF-β₁ 呈线性关系

3 讨论

一些“健康”妇女虽然绝经后立即进行激素替代治疗依旧发生骨质疏松。说明一些其他危险因素在起作用,例如:甲状旁腺激素,降钙素水平的改变,钙摄取的情况等。许多研究表明,细胞因子是介导骨质疏松的一个重要因素。这些细胞因子包括:IL-1β,白介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子-α(TNF-α),干扰素-γ(INF-γ),GM-CSF,白血病抑制因子(LIF)等。本

研究发现离体大鼠成骨细胞 DHEA 培养中产生 IL-1β、TGF-β₁、OPG、GM-CSF、和 VEGF 这些细胞因子与 OB 增殖密切相关。

在成年男性及女性中, DHEA 是最丰富的肾上

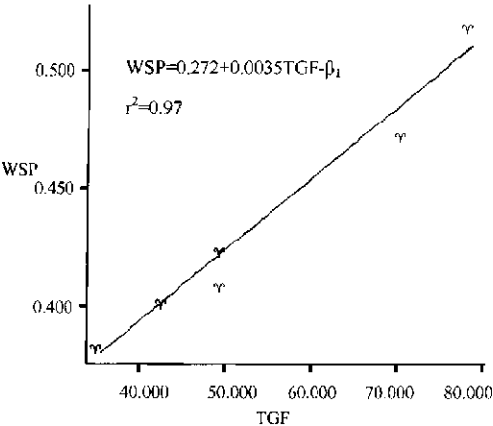


图 11 成骨细胞 WSP 与 TGF- β_1 呈线性关系

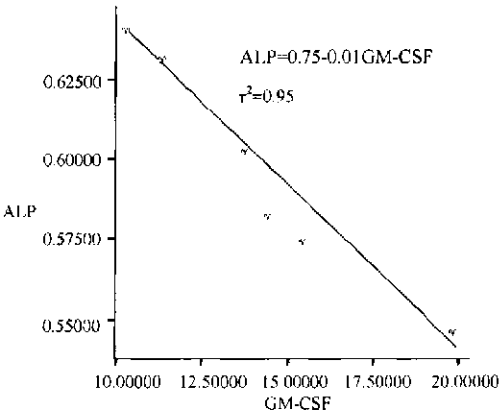


图 14 成骨细胞 ALP 与 GM-CSF 呈线性关系

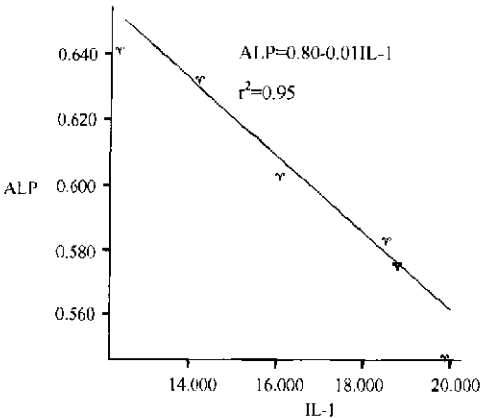


图 12 成骨细胞 ALP 与 IL-1 β 呈线性关系

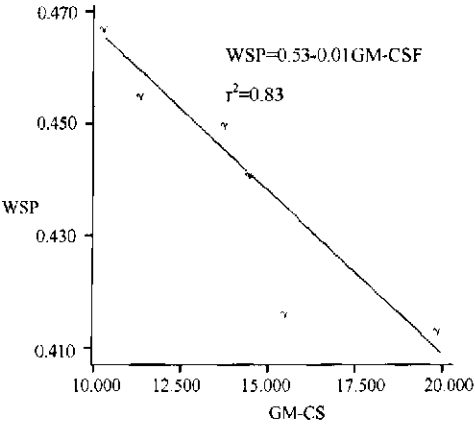


图 15 成骨细胞 WSP 与 GM-CSF 呈线性关系

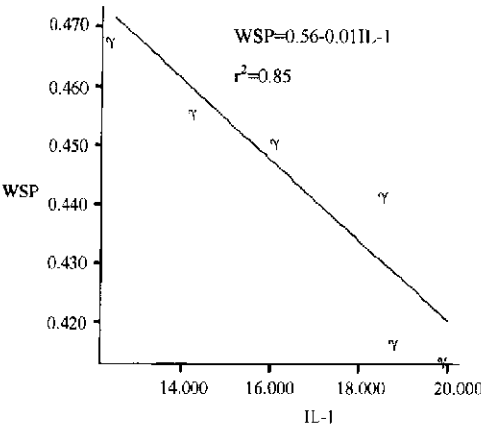


图 13 成骨细胞 WSP 与 IL-1 β 呈线性关系

腺甾体激素前体。由于原代培养的 OB 在体外实验中比人 OB 株更具有代表性^[3], 因此, 本研究采用原代培养的 OB 为研究对象, 同时选用小鼠头盖骨分离培养的 OB 进行实验。碱性磷酸酶染色鉴定了原

代分离培养的 OB, 纯率在 90% 以上, 符合本研究的要求。DHEA 对 OB 经 24 h 培养后, OB 代谢加快, 对糖原利用较多, 而使细胞活性增强。本试验结果显示, 低浓度(10^{-7} 和 10^{-9} mmol/L) DHEA 组 ALP 活性、OB 增殖、单位细胞 ALP 活性、OB 矿化结节形成功能均上升, 其作用和 E_2 组相仿; 而高浓度 10^{-5} mmol/L DHEA 对 ALP 活性无影响。DHEA 的正常生理浓度为 $0.001 \sim 0.03 \mu\text{mol/L}$, 这和本实验结果无论是对 OB 增殖还是对于 ALP 活性, 最佳浓度均是 10^{-7} mmol/L $\sim 10^{-9}$ mmol/L 相一致, 而高浓度水平 10^{-5} mmol/L 不利于 OB 增殖。

大鼠 OB 接种培养于 DHEA 各浓度组 24、48、72 h 后, 发现不同浓度对各种细胞因子的与对照组比较均差异有显著性。以接近生理浓度 10^{-9} mmol/L 浓度组对 VEGF、OPG、TGF- β_1 细胞因子的反应最活跃并与 OB 增殖能力均密切正相关。以高浓度 10^{-5} mmol/L 浓度组对 IL-1 β 、GM-CSF 细胞因子的抑制反

应明显与 OB 增殖能力均密切负相关。由此推测,在体外大鼠 DHEA 促进 OB 增殖能力可能通过刺激 VEGF、OPG、TGF- β_1 细胞因子的表达,抑制 IL-1 β 、GM-CSF 细胞因子有关。

在骨代谢的动态平衡中,决定个体骨代谢水平和调节骨代谢偶联的因素主要来源于细胞因子和旁分泌激素^[3]。实验中各细胞因子在体外大鼠 OB 中所起的作用不同可能与其分子机制有关。OB 能分泌 VEGF 可促进血管内皮细胞分泌 IGF-1、ET-1,从而刺激 OB 的生长^[4]。进一步的研究发现,OPG 是 RANKL (核因子 κ B-NF- κ B 受体激活子配体)的诱饵性受体,通过与 RANKL 竞争性结合 RANK(NF- κ B 受体激活子),从而抑制 OC 的分化和成熟,诱导 OC 凋亡。因此,OPG-RANKL-RANK 形成一个调节 OC 活化和骨重塑的网络^[5,6]。大量文献报道 TGF- β_1 是 OB 中含量较多的生长因子,在 OB 的细胞膜上有 TGF- β_1 的特异性受体,是一种具有生长抑制、刺激分子外基质形成和免疫抑制等功能的多肽化合物。TGF- β_1 通过上调成骨细胞 OPG 基因 mRNA 的表达促进 OB 并抑制 OC 前体细胞的增殖与分化。一定剂量的 TGF- β_1 使成骨与破骨形成新的平衡,骨形成大于骨吸收,使骨重建^[7,8]。IL-1 β 不论在体内或体外都具有明显的促进骨吸收的作用。IL-1 β 促进骨吸收的机制是其可诱导 OC 前体细胞分化为 OC,促进 OC 的分化^[9]。粒细胞克隆刺激因子(GM-CSF)可刺激 OC 前体生长及分化,可活化酪氨酸激酶受体,有利于 OC 的形成^[10]。高浓度水平 10^{-5} mmol/L 不利于 OB 增殖,可能与抑制 IL-1 β 、GM-CSF 有关。

总之,骨的形成是一个十分复杂的多因素过程,涉及多种生长因子。虽然本实验结果显示,在骨微环境中,DHEA 通过自分泌或旁分泌所产生的多种

“上游”激素和细胞因子(VEGF、OPG、TGF- β_1)等调节“下游”的 OC 分化因子(IL-1 β 、GM-CSF)等起作用,这为以后的动物实验和临床应用提供了必要的实验依据,但最终效果评测仍需要大量体内外实验验证。

【参考文献】

- [1] Williams MRI, Ling SH, Dawood T, et al. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs. JCEM, 2002,87:176-181.
- [2] Enserink M. The vanishing promises of hormone replacement. Science, 2002, 297:325-326.
- [3] 廖二元. 骨质疏松研究的现状与展望. 中华内分泌代谢杂志, 2002,28:87-89.
- [4] Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. J Cell Biochem, 2005, 195(4):827-839.
- [5] Langdahl BL, Carstens M, Stenkaer L, et al. Polymorphism in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. J Bone Miner Res, 2002,17(7):1245-1255.
- [6] Ohmori H, Mokita Y, Funamizu M, et al. Linkage and association analyses of OPG gene locus with human osteoporosis. J Hum Genet, 2002,47(8):400-406.
- [7] Rosen DM, Stempien SA, Thompson AY. Transforming growth factor- β modulates the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes *in vitro*. J Cell Physiol, 1996,134:337-346.
- [8] Chen RH, Moses HL, Masuoka EM, et al. Phosphorylation, dependent interaction of the cytoplasmic domain of the type and transforming growth factor- β receptors. J Biol Chem, 1995, 270:12235-12241.
- [9] Udagawa N. Mechanisms involved in bone resorption. Biogerontology, 2002, 3(1-2):79-83.
- [10] 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(4):177-184.

(收稿日期:2007-07-09)