

· 论 著 ·

雌激素受体 α 介导小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化

刘德宝¹ 张复文¹ 任振华^{2*}

1. 安徽医科大学第一附属医院骨科, 安徽 合肥 230022

2. 安徽医学大学人体解剖学教研室, 安徽 合肥 230032

中图分类号: R392.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 03-0228-07

摘要: **目的** 通过研究 17 β -雌二醇干预小鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)体外成骨分化,揭示雌激素预防和治疗绝经后骨质疏松症(PMO)的机制。**方法** 贴壁法分离培养小鼠的 MSCs,并通过流式细胞仪鉴定其细胞表面标志物,同时体外诱导分化,鉴定 MSCs 多向分化潜能;免疫荧光、RT-PCR 和 Western Blot 检测 MSCs 表达雌激素受体 α 和 β (ER α 和 ER β);在雌激素干预 MSCs 成骨诱导分化过程中,添加 $10^{-11} \sim 10^{-7}$ M 的 17 β 雌二醇和/或 ER 拮抗剂 ICI182,780 和 ER α 选择性拮抗剂 MPP,采用冯·科萨染色和定量钙离子测定方法,检测矿化结节数量及钙离子浓度。**结果** 体外培养的小鼠 MSCs 表达 ER α 和 ER β 。与对照组相比,17 β 雌二醇干预能显著增加矿化结节数量增加及钙离子浓度,ER 拮抗剂 ICI182,780 和 ER α 选择拮抗剂 MPP 能逆转 17 β 雌二醇的成骨诱导效应。**结论** 17 β 雌二醇主要通过 ER α 能提高 MSCs 体外成骨诱导分化,可能是雌激素替代治疗 PMO 的实验依据。

关键词: 骨髓间充质干细胞;雌激素;成骨细胞;分化

Osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells mediated by estrogen α receptor

LIU Debao¹, ZHANG Fuwen¹, REN Zhenhua²

1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

2. Department of Human Anatomy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Corresponding author:REN Zhenhua, Email: renzhenhua1973@163.com

Abstract: **Objective** To illustrate the mechanism of estrogen in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis (PMO) through the intervention of 17 β -estradiol in the osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro. **Methods** Mouse MSCs were cultured using adhesion method. The biomarkers on the cell membrane were identified using flow cytometry. After the induced differentiation in vitro, the multi-directional differentiation potential of MSCs was also identified. The expression of estrogen receptor α and β (ER α and ER β) was detected using immunofluorescence, RT-PCR, and Western blotting. During the intervention of estrogen in the osteogenic differentiation of MSCs, 10^{-11} - 10^{-7} M 17 β -estradiol, ER antagonist, ICI182 and 780, and the specific antagonist of ER α , MPP, were added. The number of mineralized nodules and the concentration of calcium were detected using Von Kossa staining and the quantitative detection of calcium. **Results** The expression of ER α and ER β was observed in mouse MSCs cultured in vitro. Compared with that in control group, the number of mineralized nodules and the concentration of calcium increased significantly after the intervention of 17 β -estradiol, while the osteogenic induction effect of 17 β -estradiol could be reversed by ER antagonist, ICI182 and 780, and the specific antagonist of ER α , MPP. **Conclusion** 17 β -estradiol can improve the induction of osteogenic differentiation of MSCs in vitro mainly depending on ER α . This study may provide experimental basis for the estrogen replacement therapy in the treatment of PMO.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Estrogen; Osteoblast; Differentiation

引言

基金项目: 安徽省自然科学基金(1308085MH119)

* 通讯作者: 任振华, Email: renzhenhua1973@163.com

随着我国人口老龄,绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)的发病率逐年

增加。雌激素缺乏是绝经后骨质疏松症的原因,女性自然绝经或卵巢切除后,体内激素平衡失调,均可导致成骨细胞与破骨细胞保持的骨的动态平衡失调,导致骨质丢失速度明显加快、单位体积骨量减少、骨强度降低和骨脆性增加^[1]。目前对绝经后骨质疏松症尚无有效的治疗措施,预防骨质疏松症的发生是目前老年医学领域研究的一个重要课题,雌激素替代疗法预防和治疗 PMO^[2],在临床应用中已取得较好的疗效,但作用机理尚未明确。

骨质疏松症的发生与成骨细胞与破骨细胞关系密不可分,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为成骨细胞的前体细胞,其在骨骼发育与重建的过程中起重要作用。MSCs 作为一种成体干细胞,具有自我更新、高度增殖以及在特定条件下能够多向分化的特性。有研究发现, MSCs 成骨分化的失调会导致骨质疏松^[3]。绝经后 MSCs 增殖及分化功能均有减退,成骨细胞与破骨细胞分化的数量与方向发生改变,可能是导致骨质疏松症的重要原因^[4]。目前已证实, MSCs 表达雌激素受体(estrogen receptor, ER),但并不清楚雌激素如何调节 MSCs 的成骨分化。因此,在本研究中,通过雌激素及其拮抗剂干预小鼠 MSCs 成骨分化过程,明确雌激素及其受体在 MSCs 成骨分化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:健康雌性 4 周龄 C57 小鼠 6 只,购自安徽医科大学实验动物中心,并取得安徽医科大学实验动物伦理委员会的批准。

1.1.2 实验试剂:17 β -雌二醇和 ER α 选择性拮抗剂 MPP 购自 Sigma-Aldrich 公司, ER 拮抗剂 ICI 182,780 购自 Tocris Bioscience 公司。细胞培养试剂:DMEM、MSC-Qualified FBS、0.25% Trysin-EDTA、GlutaMAX、青链霉素等购自 Invitrogen 公司;Ficoll-PaqueTM Plus 单核细胞分离液购自 StemCell 公司。流式细胞仪检测试剂:FITC-CD106、PE-CD73、FITC-CD90、PerCP-CD14、PE-CD34、PerCP-CD45 和 APC-CD19 购自 Pharmingen 公司;FITC-CD105 购自 Serotec 公司;PE-STRO-1 购自 Santa Cruz 公司。MSCs 分化试剂购自 Lonza Walkersville 公司。兔抗 ER α 和山羊抗 ER β 购自 Santa Cruz 公司。PCR 检测试剂:逆转录酶 SS II 和 Trizol 购自 Invitrogen 公司;rTaq 酶购自 TaKaRa 公司;引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 MSCs 培养:利用贴壁法分离、纯化细胞 MSCs。无菌条件下获取小鼠股骨骨髓,加入 DPBS 稀释,贴壁缓慢加入离心管内盛有等体积的 Ficoll 分离液上,2500 r/min 离心 20 min,小心吸取中间层细胞置于另一离心管中, PBS 洗涤 2 次, 5×10^5 /ml 单核细胞种植在 DMEM 低糖培养基, 包含 10% FBS、1% 青链霉素和 1% GlutaMAX, 5% CO₂, 37 °C 孵箱培养, 24 h 后更换培养基, 80% 长满后 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 MSCs 鉴定:流式细胞仪检测 MSCs 表面标志。贴壁培养的 MSCs 被消化收集, PBS 洗涤 2 次, 重悬在包含 1% BSA 的 PBS, 分别加入 PE 或 FITC 标记的单抗 CD14、CD19、CD34、CD45、CD73、CD90、CD105、CD106 和 Stro-1 荧光抗体, 4°C 避光孵育 30 min。流式细胞仪检测, Win MDI 2.9 软件分析结果。

MSCs 体外诱导分化成为脂肪、骨和软骨细胞^[5]。按照 Lonza Walkersville 公司 MSCs 分化试剂操作步骤(<http://www.lonza.com>), 对于成脂肪分化, MSCs 以 2.1×10^4 细胞/cm² 密度种植, 细胞达到 100% 融合后, 加入诱导/维持培养基, 培养 3 个循环, 每个循环 5~6 天, 之后继续在维持培养基中培养 5~7 天。福尔马林固定, 油红 O 染色。对于成软骨分化, 2.5×10^5 个 MSCs 以 $150 \times g$ 离心, 形成小的细胞团, 15 ml 离心管内, 成软骨完全诱导培养基包含 10 ng/ml TGF- β 3, 诱导培养 28 天。细胞团石蜡包埋, 5 μ m 切片, 甲苯胺蓝染色。对于成骨分化, MSCs 以 3.1×10^3 细胞/cm² 密度种植, 24 h 后更换成骨诱导培养基, 每 3 天换液, 连续培养 21 天, 冯·科萨染色观察。

1.2.3 雌激素受体检测:体外贴壁培养的 MSCs 固定后, 采用免疫荧光染色, 一抗为兔抗 ER α 和山羊抗 ER β 。根据一抗的动物来源, 选用相应的罗丹明结合的 IgG 进行免疫双标记, 荧光显微镜观察脑片, SPOT 拍片并进行处理。

RT-PCR 检测 MSCs 中 ER α 和 ER β 的 mRNA 的表达。采用 TRIzol 法提取 MSCs 总 RNA, 采用 Oligo(dT) 反转录成 cDNA。再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。ER α 的引物序列为:上游 5'-TCC TAA CTT GCT CCT GGA CAG G-3', 下游 5'-CAG GAG CAG GTC ATA GAG GGG-3', 片段长度 408bp; ER β 的引物序列为:上游 5'-AGA GAA TTC GTC CAG CCA CGA ATC AG-3', 下游 5'-AGA AAG CTT CAT

CAG CAC CTC CAT CC-3', 片段长度 467bp; 以 β -actin 作为的内源性参照, 引物序列为: 上游 5'-TGG CAC CAC ACC TTC TAC AA-3', 下游 5'-TCA CGC ACG ATT TCC CTC TC-3'。梯度 PCR 扩增, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 退火 50 ~ 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环。PCR 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后用 UVP 凝胶成像系统拍摄分析。

Western Blot 检测 MSCs 中 ER α 和 ER β 蛋白表达。RIPA 裂解液抽提全细胞蛋白溶液, BCA 法蛋白定量后按照每孔 50 μ g 的上样量进行 SDS-PAGE 电泳, 将电泳分离后的蛋白转移至硝酸纤维素薄膜上, 5% 脱脂奶粉溶液 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 兔抗 ER α 和山羊抗 ER β 抗体 1:400 稀释后与膜 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 后 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 后进行 HRP 标记的二抗孵育, 条件为 1:200 稀释, 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min。TBST 洗 3 次后, 用 ECL 超敏发光液进行发光曝光。

1.2.4 雌激素干预 MSCs 成骨分化: MSCs 成骨诱导分化过程同前, 雌激素干预各组每次换液时添加 10^{-11} ~ 10^{-7} M 的 17 β 雌二醇, 雌激素拮抗组加入 10^{-6} M 的 ER 拮抗剂 ICI 182,780 或 10^{-6} M 的 ER α 选择性拮抗剂 MPP。

不同浓度雌激素及其拮抗剂干预 MSCs 成骨分

化, 细胞诱导成骨分化 21 天时, 吸弃培养液, 用无菌 PBS 清洗后, 95% 乙醇固定 30 min, 双蒸水洗 3 次, 冯科萨染色, 在低倍镜视野下进行矿化结节计数, 每孔细胞随机计数 10 个视野的矿化结节。

定量分析 MSCs 成骨分化, 各干预组成骨诱导分化 21 天后, 双蒸水洗 3 次, 加入 400 μ l 的 1N 盐酸, 充分消化, 裂解产物过夜, 甲酚酞络合剂 (o-cresolphthalein complexone) 显色, 分光光度计 560 nm 定量检测。各组数值与对照组比较, 以百分比显示^[6]。

1.2.5 数据统计分析: 实验数据以均数 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD), 各组之间的差异用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 MSCs 培养

倒置相差显微镜下, 初接种的细胞呈圆球状分散悬浮于培养液中, 2 ~ 3 d 后出现长梭形细胞, 少部分细胞呈纺锤形或多角形, 大小长短不一 (图 1A), 大致 4d 后长梭形细胞逐渐增多 (图 1B), 之后长梭形细胞排列生长, 出现增殖克隆 (图 1C)。10d 左右培养后细胞 80% 融合 (图 1D), 胰酶消化传代, 体外培养扩增。

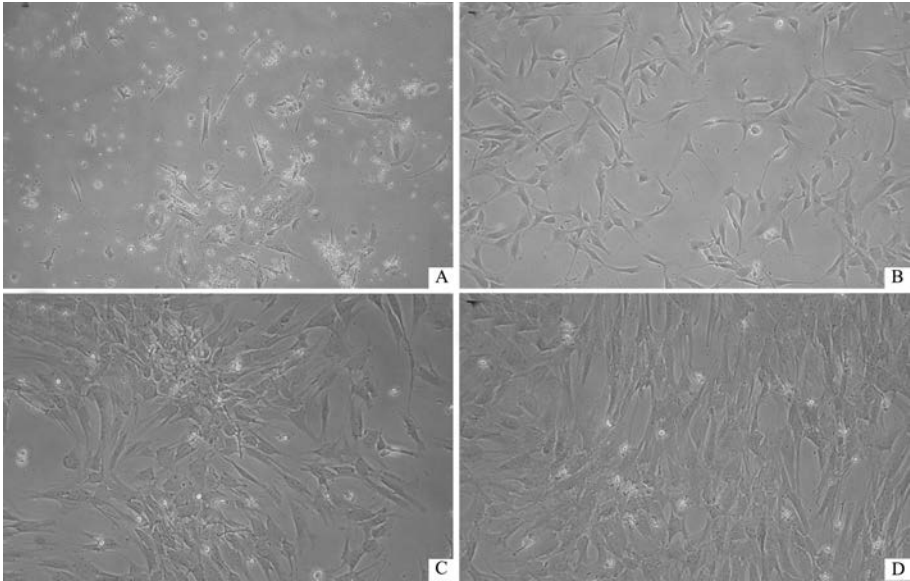


图 1 小鼠骨髓间充质干细胞原代培养

原代培养 2 ~ 3 天后出现梭形细胞 (A), 之后长梭形细胞逐渐增多 (B), 大约 5 ~ 6 天后出现增殖克隆 (C), 当细胞达到 80% 左右汇合 (D), 传代培养。A 和 B 放大倍数 100 $\times$; C 和 D 放大倍数 200 $\times$ 。

Fig. 2 Primary culture of mouse MSCs

Spindle cells can be observed after 2 or 3-day primary culture (A), then the long spindle-shaped cells increased (B), and the clones of proliferation appeared (C) after 5-6 days. When the cells reached 80% confluence (D) at the 10th-12nd day in the primary culture, passaging was performed. A and B, $\times 100$; C and D, $\times 200$.

2.2 MSCs 表面标志及分化潜能

流式细胞仪结果显示, MSCs 表达高水平的 CD73 和 CD105, 部分表达 CD90、CD106 和 Stro-1, 不表达 CD14、CD19、CD34 和 CD45 (图 2A)。为检测 MSCs 的分化潜能, 各年龄组第 4 代 MSCs 被分别分化成脂肪、骨和软骨细胞 (图 2B)。

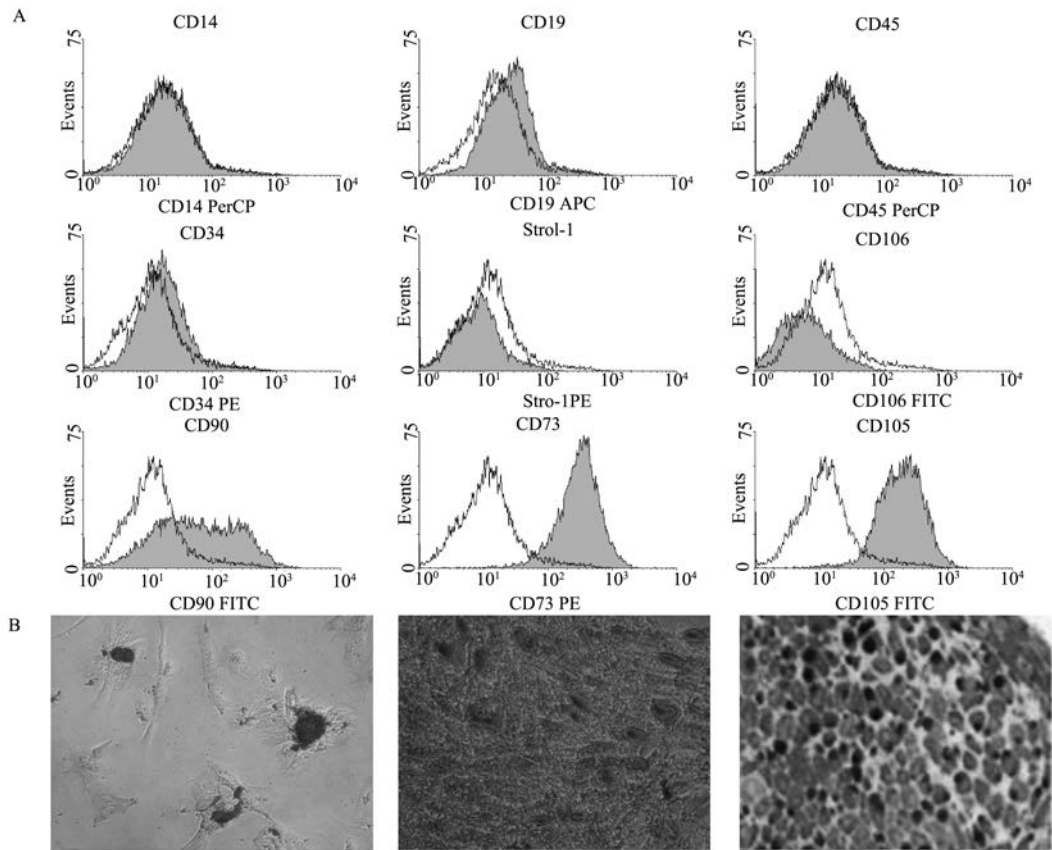


图2 小鼠 MSCs 鉴定
流式细胞仪检测 MSCs 细胞表面抗原 (A), 结果显示 MSCs 表达 CD73 和 CD105, 不表达 CD14、CD19、CD34 和 CD45。MSCs 体外诱导分化成为骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞 (B)。B 放大倍数 100 ×。

Fig. 2 Identification of mouse MSCs
Cell surface markers of mouse MSCs were identified using flow cytometry (A), showing the expression of CD73 and CD105, but without CD14, CD19, CD34, and CD45. Mouse MSCs were differentiated into osteocytes (B, left), adipocytes (B, middle), and chondrocytes (C, right). B, ×100.

2.3 MSCs 表达雌激素受体

免疫荧光结果显示, MSCs 表达 ER α 和 ER β (图 3A 和 3B), ER α 和 ER β 定位于细胞核, 小部分定位于细胞质内 (图 3A 和 3B)。RT-PCR 和 Western Blot 结果进一步证实, MSCs 表达 ER α 和 ER β (图 3C 和 3D)。

2.4 雌激素干预 MSCs 成骨分化

对不同浓度 17β 雌二醇干预 MSCs 体外成骨诱导分化, 冯·科萨染色结果显示, 与对照组比较 (图 4A), 雌激素干预组矿化结节数量增加 (图 4B 和 4C)。定量分析结果也显示, 雌激素干预组钙离子浓度高于对照组 (图 4D), 矿化结节数量及钙离子浓度随 17β 雌二醇浓度增加而增多, 在雌激素生理

浓度 (10⁻⁹ M) 最高 (图 4C 和 4D)。
为了进一步确认雌激素诱导 MSCs 成骨分化, MSCs 诱导成骨分化过程中添加 ER 拮抗剂 ICI182,780 和 ER α 选择性拮抗剂 MPP。结果显示, 雌激素干预组钙离子浓度高于对照组 (图 4D), 添加 ER 拮抗剂 ICI182,780 后, 其钙离子浓度与对照组基本一致 (图 5), 提示雌激素是通过其受体干预 MSCs 成骨分化。而添加 ERα 选择性拮抗剂 MPP 后, 其钙离子浓度部分恢复 (图 5), 提示雌激素是通过其受体 α 干预 MSCs 成骨分化。

3 讨论

骨髓间充质干细胞 (MSCs) 是一种异质的成体

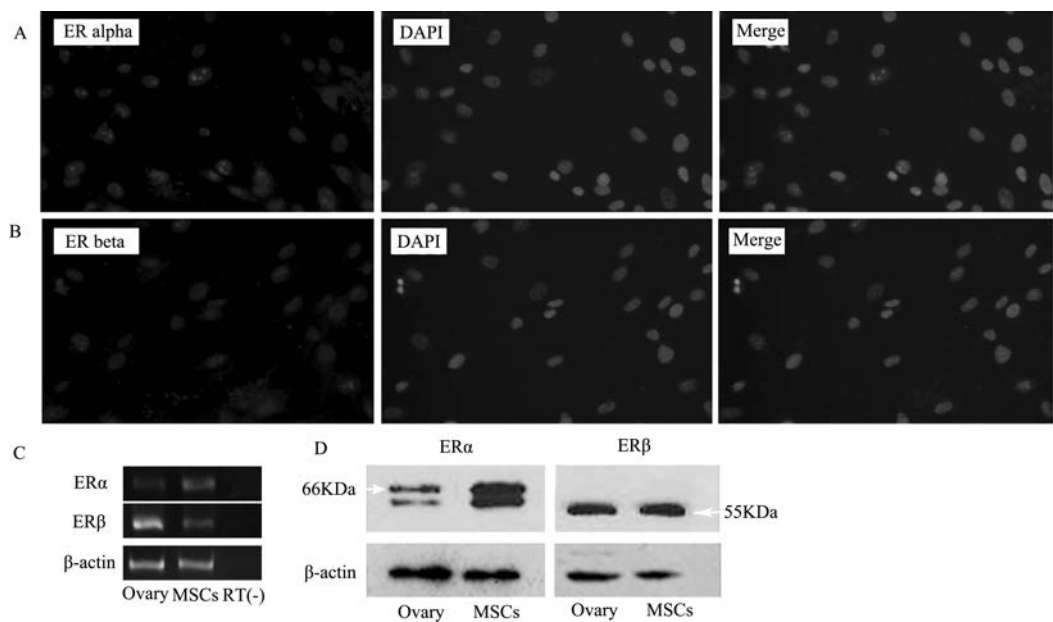


图3 小鼠 MSCs 表达 ER α 和 ER β

免疫荧光结果显示,小鼠 MSCs 表达 ER α 和 ER β(A 和 B),放大倍数 100 ×。RT-PCR 和(C)和 Western Blot(D)结果也显示 MSCs 表达 ER α 和 ER β 的 mRNA 和蛋白。小鼠卵巢组织作为阳性对照。

Fig. 3 Expression of ER α and ER β in mouse MSCs

The expression of ER α and ER β in mouse MSCs can be observed using immunofluorescence (A and B, ×100). The results of RT-PCR (C) and Western blotting (D) also showed the mRNA and protein expression of ER α and ER β in MSCs, respectively. Mouse ovary tissues were used as a positive control.

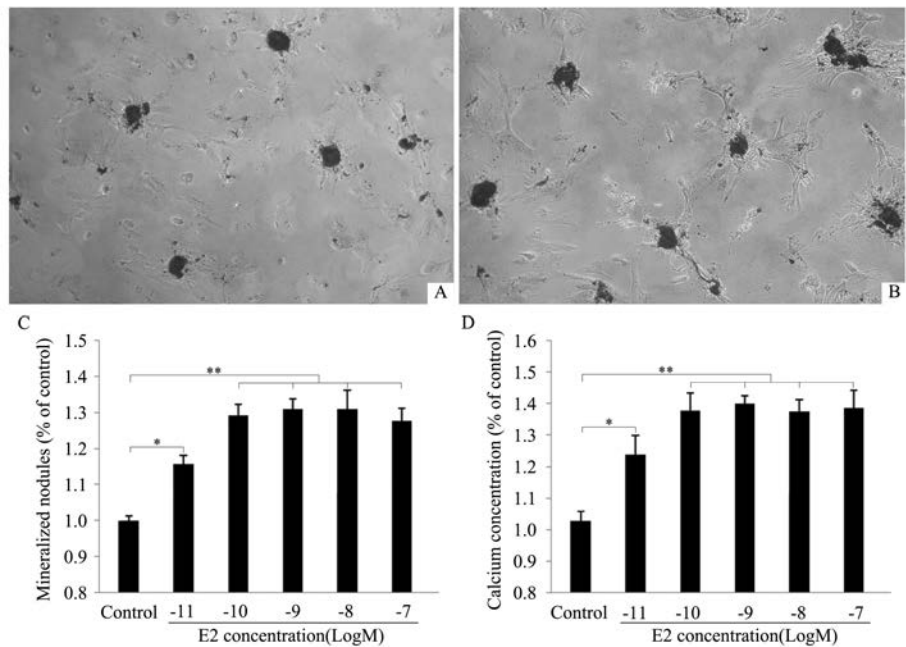


图4 17 β 雌二醇干预小鼠成骨分化

冯·科萨染色结果显示,与对照组比较(A),雌激素干预组矿化结节数量增加(B)。A 和 B 放大倍数 100 ×。定量分析结果显示,雌激素干预组矿化结节数量(C)和钙离子浓度(D)高于对照组。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

Fig. 4 The intervention of 17 β-estradiol on osteogenic differentiation of mouse MSCs .

According to the result of Von Kossa staining, the number of mineralized nodules in 17 β-estradiol intervention groups (B) was increased compared with that in the control groups (A). The result of quantitative detection also showed that the number of mineralized nodules (C) and the concentration of calcium (D) in 17 β-estradiol intervention groups were higher than those in control groups. A and B, ×100. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

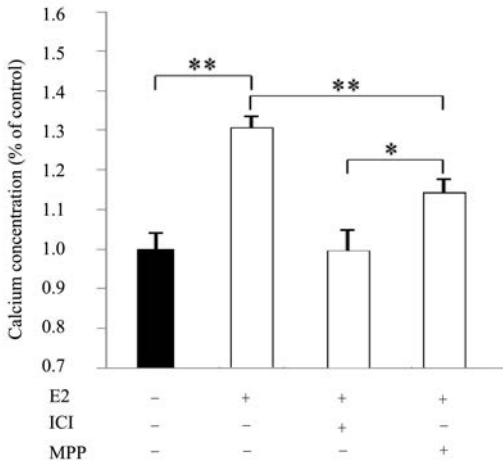


图 5 17 β 雌二醇通过其受体 α 干预小鼠 MSCs 成骨分化

钙离子定量分析结果显示,雌激素主要通过其受体 α 干预 MSCs 成骨分化。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

Fig. 5 The intervention of 17 β -estradiol on osteogenic differentiation through ER α

The result of the quantitative detection of calcium showed that estrogen could intervene the osteogenic differentiation of MSCs mainly through ER α (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

干细胞,广泛应用于细胞治疗和组织工程研究,已成为近年来关注的热点^[7]。MSCs 在骨代谢方面发挥重要的作用, MSCs 在在体外可诱导分化成为成骨细胞,也可分化为破骨支持细胞,在骨转换时对破骨细胞发出信号,从而调节骨代谢^[8-9]。骨改建是成骨与破骨维持动态平衡的过程, MSCs 增殖能力和分化特性改变,影响成骨分化,骨形成和骨吸收之间的动态平衡。老年或绝经后,体内雌激素水平下降, MSCs 表现为数量减少、成骨分化活性降低、骨向分化与脂向分化失衡。随着年龄的增长, MSCs 中骨祖细胞数量下降,成骨分化能力减弱^[10-11],可能是导致骨质疏松症的重要原因。另一方面, MSCs 骨向分化与脂向分化间存在一种相互制约关系^[12]。研究发现卵巢去势等造成的骨质疏松都存在骨量减少与骨髓脂肪组织增多共存的现象^[13]。提示 MSCs 成骨与成脂分化比例失衡可能是造成骨质疏松的另一个重要病理机制。

许多研究证实,雌激素缺乏是公认的绝经后骨质疏松症 (PMO) 发生的关键因素,有研究显示大于 50 岁的女性因骨质疏松导致骨折的风险增加 20%^[14]。绝经后女性卵巢功能减弱,雌激素水平下降,引起骨骼中钙结合能力下降,破骨细胞的骨吸收作用增强,骨质丢失速度加快,引起骨量减少、骨脆

性增强,进而导致骨质疏松。雌激素缺乏可以通过核因子活化因子受体及其配体 (RANKL/ RANK) 途径刺激破骨前体细胞向破骨细胞的转化^[15]。雌激素缺乏还能直接导致破骨细胞和成骨细胞中凋亡相关因子配体 (FasL) 表达下降,使破骨细胞凋亡下降^[16]。另外,雌激素水平低下,导致 IL-6 产生增加,而 IL-6 可刺激破骨细胞大量形成并增强其骨吸收作用,以致骨质大量流失。有研究显示,绝经后妇女 MSCs 诱导 RANKL 表达的作用增强^[17]。有研究显示,雌激素通过其受体 α 、 β 介导调节骨代谢,现已发现成骨细胞和破骨细胞表达 ER^[18]。ER α 的基因多态性与 PMO 的发生及严重程度密切相关。

雌激素能促进 MSCs 的成骨分化。有研究报道 17 β 雌二醇能调节 MSCs 骨钙含量的增加和 ALP 的表达,对 MSCs 成骨细胞分化有促进或支持作用^[19]。17 β 雌二醇能显著增加 ER α mRNA 及其蛋白质的表达,增强 ALP 活性;降低 ER β mRNA 及其蛋白质的表达和细胞的凋亡率^[20],同时雌二醇上调如 ALP、I 型胶原、BMP-2、TGF- β 1 等成骨分化基因 mRNA 的表达。本实验发现,体外诱导培养的小鼠 MSCs 成骨分化过程中,添加 17 β 雌二醇能显著增加矿化结节数量增加及钙离子浓度。进一步研究发现,体外培养的小鼠 MSCs 表达 ER α 和 ER β , 17 β 雌二醇干预 MSCs 诱导成骨分化过程中,添加 ER 拮抗剂 ICI82,780 和 ER α 选择性拮抗剂 MPP,结果发现雌激素的诱导效应能被其受体拮抗剂逆转,提示雌激素是通过其受体干预 MSCs 成骨分化。而 ER α 选择性拮抗剂 MPP 能部分逆转雌激素的成骨诱导效应,提示雌激素主要通过其受体 α 干预 MSCs 的成骨分化。

尽管雌激素替代疗法预防和治疗 PMO 已取得较好的效果,但作用机理尚未明确。由于体内环境的复杂,雌激素体内应用的效应可能受其他因素的制约,有待于从分子和细胞学水平进一步研究。本实验结果显示雌激素通过其受体 ER α 促进 MSCs 体外的成骨诱导分化,为雌激素替代疗法预防和治疗 PMO 提供理论和实验依据。

【 参 考 文 献 】

[1] Salari Sharif P, Abdollahi M, Larijani B. Current, new and future treatments of osteoporosis. Rheumatol Int. 2011, 31(3): 289-300.
[2] Mansell JP. Bone phenotypes in response to gonadotropin misexpression: the role for gonadotropins in postmenopausal osteoporosis. Int J Gen Med. 2009, 1: 51-7.

- [9] Guo WF, Chen ww. Spleen deficiency syndrome and absorption of nutrients. *Xin zhongyi*, 2009, 38(8) : 8-10.
- [10] Zhang Y, Zhang B, Zhang ZG. Pathogenesis of Primary osteoporosis with Liver Spleen Kidney. *Zhongguo Zhongyi Jichu Yixue Zazhi*, 2012, 18(1) : 36-37.
- [11] Zhang DS, Cao W, Chen H. After the menopause osteoporosis 60 case Treated with Integrated Chinese and Western Medicine. *Zhongyi Yanjiu*, 2011, 24(3) : 34-36.
- [12] Deng WQ, Guo SF. Clinical Research on spleen-kidney qi deficiency syndrome osteoporosis Chinese and Western Medicine. *Zhongguo Baojian Yingyang*, 2012, 22(6) : 1636-1637.
- [13] Li Z. Clinical Research on After the menopause osteoporosis 60 case Treated with Integrated Chinese and Western Medicine. *Yatai Chuantong Yiyao*, 2012, 8(4) : 88-89.
- [14] Liao JQ. Clinical Biochemical indicators Research on After the menopause osteoporosis Treated with Integrated Chinese and Western Medicine. *Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi*, 2008, 24(1) : 54-56.
- [15] Ru SP. Analysis on osteoporosis 65 case Treated with Integrated Chinese and Western Medicine. *Zhongguo Shangcan Yixue*, 2011, 19(7) : 54-55.
- [16] Lu QY, Tang CQ, Wang LY. Middle-aged and old osteoporosis 118 case Treated with Integrated Chinese and Western Medicine. *Hebei Zhongyi*, 2011, 33(12) : 1822-1823.
- [17] Han HL. Osteoporosis 47 case Treated with Low frequency pulse magnetic therapy in combination with Electric acupuncture and nutrition. *Linchuang Yixue*, 2009, 29(10) : 116-117.
- [18] Xu YL, Jin JJ, Xu DY. Effects of Acupoint Sticking of Migudan on BGP and Hyp in the Patients of Primary Osteoporosis. *Zhongguo Zhongyiyao Xinxu Zazhi*, 2009, 14(6) : 17-19.
- [19] Ou YG, Wang DY, Xu XM. Clinical observation on acupuncture for treatment of osteoporosis. *Zhongguo Zhenjiu*, 2011, 31(1) : 23-25.

(收稿日期: 2013-03-12)

(上接第 233 页)

- [3] Mukherjee A, Rotwein P. Selective signaling by Akt1 controls osteoblast differentiation and osteoblast- mediated osteoclast development. *Mol Cell Biol*. 2012, 32(2) : 490-500.
- [4] Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, et al. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma / stem cells; the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*, 2004, 3(6) : 379-389.
- [5] Kim B S, Lee C C, Christensen J E, et al. Growth, differentiation, and biochemical signatures of rhesus monkey mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 185-198.
- [6] Hu J, Feng K, Liu X, Ma PX. Chondrogenic and osteogenic differentiations of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold with designed pore network. *Biomaterials*. 2009, 30(28) : 5061-7.
- [7] Agata H, Watanabe N, Ishii Y, et al. Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382: 353-358.
- [8] Kim RH, Mehrazarin S, Kang MK. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for oral and systemic diseases. *Dent Clin North Am*. 2012, 56(3) : 651-75.
- [9] Nicolaidou V, Wong MM, Redpath AN, et al. Monocytes Induce STAT3 Activation in Human Mesenchymal Stem Cells to Promote Osteoblast Formation. *PLoS One*. 2012, 7(7) : e39871.
- [10] Gurban CV, Mederle O. The OPG/RANKL system and zinc ions are promoters of bone remodeling by osteoblast proliferation in postmenopausal osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol*. 2011, 52(3 Suppl) : 1113-9.
- [11] Zinnuroglu M, Dincel AS, Kosova F, et al. Prospective evaluation of free radicals and antioxidant activity following 6-month risedronate treatment in patients with postmenopausal osteoporosis. *Rheumatol Int*. 2012, 32(4) : 875-80.
- [12] McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*. 2004, 6(4) : 483-95.
- [13] Moon YS, Smas CM, Lee K, et al. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol*. 2002, 22(15) : 5585-92.
- [14] Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet*, 2006, 367(9527) : 2010-2018.
- [15] Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(7) : 3540-3545.
- [16] Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 2007, 130(5) : 811-823.
- [17] Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, et al. Role of rank ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest*, 2003, 111(8) : 1120-1122.
- [18] Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, et al. Expression of estrogen receptor beta in rat bone. *Endocrinology*, 1997, 138: 4509-4512.
- [19] Leskela HV, Olkku A, Lehtonen S, et al. Estrogen receptor alpha genotype confers interindividual variability of response to estrogen and testosterone in mesenchymal-stem-cell-derived osteoblasts. *Bone*, 2006, 39: 1026-1034.
- [20] Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, et al. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem*, 2001, 81(S36) : 144-155.

(收稿日期: 2013-03-18)

雌激素受体 α 介导小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化

作者: [刘德宝](#), [张复文](#), [任振华](#), [LIU Debao](#), [ZHANG Fuwen](#), [REN Zhenhua](#)
作者单位: [刘德宝, 张复文, LIU Debao, ZHANG Fuwen\(安徽医科大学第一附属医院骨科, 安徽合肥, 230022\)](#), [任振华, REN Zhenhua\(安徽医学大学人体解剖学教研室, 安徽合肥, 230032\)](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2014(3)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201403002.aspx