

破骨细胞分化过程中的信号通路及信号因子的研究进展

王链链 郭晓英*

中国医科大学临床医学七年制,沈阳 110001

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 06-0742-07

摘要: 破骨细胞(osteoclast, OC)来源于骨髓,在生长发育过程中,起着骨吸收的重要功能,其增多或减少会引起骨质疏松或骨质硬化等相关的骨代谢性疾病。本文将从 OC 分化过程中所涉及的信号通路(NF- κ B、Src-PI3K-Akt、MAPK、CN/NFAT、IDO/Tryptophan 通路等)及相关信号因子(PU 1、Lhx2、TNF- α 、M-CSF、TGF- β 等)方面,对 OC 分化的信号通路及相关信号因子的研究进展进行简要综述,以期能为相关骨代谢性疾病的治疗提供新的思路。

关键词: 破骨细胞分化;信号通路;信号因子

Research advance in signal pathways and signal factors during the process of osteoclast differentiation

WANG Lianlian, GUO Xiaoying

Department of Seven-year Education, Clinical Medicine of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China

Corresponding author: GUO Xiaoying, Email: xyguo@mail.cmu.edu.cn

Abstract: The osteoclast is derived from bone marrow. During the growth and developmental process, it plays an important role in bone resorption. An increase or decrease of the osteoclast may cause osteoporosis or bone sclerosis, and other bone metabolic diseases. This review focuses on the advances in signal pathways (such as NF- κ B pathway, Src-PI3K-Akt pathway, MAPK pathway, CN/NFAT pathway, IDO/Tryptophan pathway, etc.) and signal factors (such as PU.1, Lhx2, TNF- α , M-CSF, TGF- β , etc.) during the process of osteoclast differentiation, in order to provide new ideas for the treatment of bone metabolic diseases.

Key words: Osteoclast differentiation; Signal pathway; Signal factors

破骨细胞是造血干细胞在单核细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和白细胞介素(interleukin, IL)等作用下,逐步发育、分化和融合形成的多核巨细胞^[1,2]。OC 与成骨细胞(osteoblast, OB)的相互协同的功能共同维持着机体的骨平衡。从造血干细胞分化为成熟的 OC 表型的过程是一个需要各种刺激因子、活化因子和转录因子等严密调控的过程,其所涉及到的各个信号通路也并不是独立的,而是相互交织的复杂的作用体系。

1 OC 的分化过程

具有骨吸收功能的成熟 OC 是从造血干细胞分

化而来的,一些早期因子的活化如 PU 1 和 MITF 使未分化的细胞转变为髓样前体细胞。这些髓样前体细胞随着 M-CSF 的表达并与其受体 c-fms 结合后,激活了 OC 前体细胞的增生和细胞骨架的重构,使其向单核细胞/巨噬细胞系发育,并诱导 RANK (receptor activator of NF- κ B,核因子 κ B 受体活化因子)的表达,形成了经典的 OC 前体。在一些重要的转录因子如 NF- κ B 和 NFATc1 的作用下,OC 前体活化并暴露于 RANKL (ligand of receptor activator of NF- κ B,核因子 κ B 受体活化因子配体),这对于正常的 OC 分化和后续的骨吸收能力是个首要刺激,然后经过多条信号通路和 OC 分化成熟因子的作用,分化发育融合形成成熟的 OC^[3] (见图 1)。

2 OC 分化过程中的信号通路

OC 分化信号通路已经在骨质疏松防治方面的

基金项目:辽宁省科学技术计划项目(2013225049)

* 通讯作者:郭晓英,Email:xyguo@mail.cmu.edu.cn.

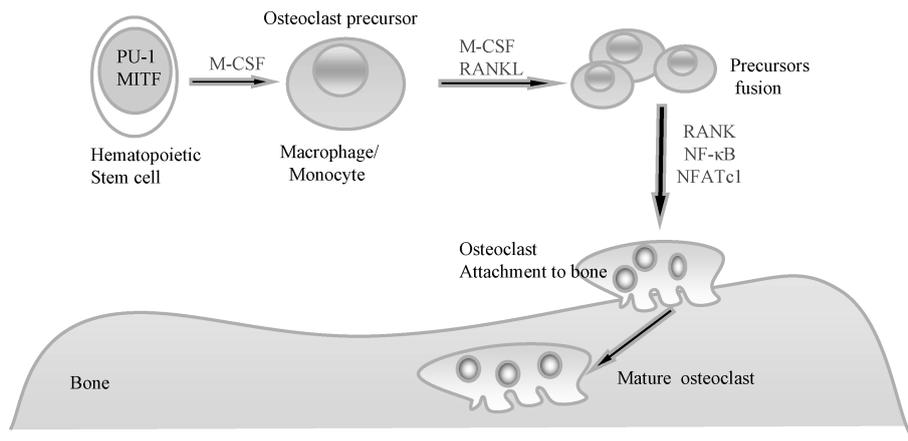


图1 破骨细胞分化及成熟的大致过程

Fig. 1 The process of the differentiation and maturation of osteoclasts

研究取得了较大的进展,部分调控靶点对骨质疏松症患者骨量的改善作用已进入临床试验,并取得了较为满意的成果。下面将着重介绍几条经典和最新的一些信号通路。

2.1 OPG/RANKL/RANK 信号通路

OPG/RANKL/RANK 通路的发现不仅更加完善地解释了破骨细胞分化、成熟、凋亡过程中的信号传导及其调控过程,同时也为骨代谢疾病的治疗提供了理论依据和全新的方向^[4]。RANK 是属于肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体家族,表达于 OC 前体、成熟 OC、树突状细胞等表面。RANKL 是 RANK 的相关配体,即属于 TNF 配体,可由 OB 及其前体、T 细胞、B 细胞和巨核细胞产生。而 OPG 是一种诱受体,通过高亲和力与 RANKL 结合,来抑制 RANKL 与 RANK 的相互作用,有效地抑制破骨细胞的分化与成熟,从而抑制骨的吸收。最新的实验表明 OPG 可以作为代谢综合征中心血管损伤和危险的生物标志^[5]。当 OB 前体在骨吸收过程中接收刺激信号会表达 RANKL, RANKL 与其在 OC 前体细胞表面表达的受体 RANK 结合后,通过与 TNF 受体连接因子(TRAF)家族成员的交互作用活化 NF-κB、c-Fos、MAPK、Src-P13K-Akt、NFATc1 等信号通路发挥作用。

TRAF (tumor-necrosis factor receptor associated factors, 肿瘤坏死因子受体相关因子)已发现的 6 个成员(TRAF1-6)与 RANK 不同的氨基酸位点结合,现已证实 TRAF6 是维持 OC 细胞骨架形成和骨吸收作用所必需的,其作用不能由 TRAF2 和 TRAF5 代替。RANK-TRAF6-TAB2 - TAK1 通路参与了 RANK 信号传导和 OC 分化与功能的调节^[6]。同

时,某些因子也通过 TRAF6 发挥作用,如 TNF 通过 TRAF6 促进 OC 生成,IL-1 通过 TRAF6 抑制 OC 凋亡。因此,TRAF6 在 RANKL 与 RANK 结合后细胞内的信号传导通路中起枢纽作用。

2.2 NF-κB 经典信号通路

NF-κB 是 NF-κB/Rel 家族的一种重要的转录因子,在静息细胞中以 p50/p65 两个亚单位的异源二聚体形式与 I-κB 结合共存于细胞浆中。当 TRAF6 通过 NIK(NF-κB 可诱导性激酶)和 IKK(NF-κB 激酶诱导剂)活化 NF-κB,使其与 I-κB 分离并迅速转位进入细胞核,与相应靶基因的启动子结合,通过启动或调控基因的转录来调节 OC 分化成熟或凋亡。有实验还表明 NF-κB 对于巨噬细胞的募集和成熟以及一些炎症因子(如 TNF-α, IL-1β, IL-6 和 MCP1)的产生发挥着重要作用,所以对于人造关节损伤患者的炎症,可以通过抑制 NF-κB 活性来减轻磨损颗粒诱导的假体周围骨溶解^[7]。NF-κB 除了可以调节 OC 的分化,还能通过促进的 β-连环蛋白(β-catenin)降解来抑制骨的形成,β-连环蛋白是 Wnt 信号(OB 形成过程中的一个信号通路)下游的一个中介^[8]。最近研究发现一种中链脂肪酸癸酸(capric acid)可以抑制 RANKL 诱导的 OC 分化,而这种抑制作用主要是通过抑制 NF-κB 和 ERK 的活化并且减少 NFATc1 的诱导来实现的^[9]。

2.3 c-src-PI3K-Akt 信号通路

有研究表明靶向阻断 c-src 的小鼠会有骨质硬化的表现^[10],体现了 c-src 在 OC 极化和活化过程中的重要作用。TRAF6 使 c-src 激活,c-src 反过来刺激磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidyl inositol 3-kinase, PI3K),激活的 PI3K 使 Akt 活化,Akt 又通过下游效

应器 AFX/FOX04 来抑制 OC 凋亡,调节 OC 骨架重置和细胞移动,从而促进其存活。对于 Akt2 敲除和加入 PI3K/Akt 通路抑制剂的细胞来说,结果骨钙素 (osteocalcin, OCN) 表达降低 ($P < 0.05$),说明这一通路在 OC 活化和极化的过程中发挥着重要的作用^[11]。2011 年 Ferron^[12] 等的实验证明 Inpp4b 因子通过拮抗 PI3K 路径在骨的生理活动中起着不可小觑的作用。Moon^[13] 等在 2012 年又用实验证明了活化的 Akt 诱导 OC 分化是通过活化 GSK3 β /NFATc1 级联信号实现的,而 PI3K 家族的另一个成员——PI3K γ ,在研究中发现可以降低 OC 的生成,成为骨质疏松治疗的一个新的靶点^[14]。

2.4 MAPK (mitogen activated protein kinases, 促分裂原活化蛋白激酶) 通路

MAPK 通路通过三级酶促级联放大反应传递信号,即 MAPK 激酶的激酶 (MAPKKK, 又称 MEKK) — MAPK 激酶 (MAPKK, 又称 MKK) — MAPK。主要通过激活调控 c-fos 和 NFAT 等 OC 形成中的重要下游调控分子,最终刺激 OC 分化。该通路包括 ERK MAPK、JNK MAPK 以及 p38 MAPK 三条路径。

2.4.1 ERK (细胞外信号调节激酶) MAPK 通路:

RANKL 与 RANK 结合诱导受体 Tyr 激酶活化,其 SH2 结构域募集受体结合蛋白 2 (Grb2),该蛋白与鸟嘌呤核苷酸交换因子 (Sos) 形成复合物, Sos 一边与受体结合,一边移位至胞浆并与 Ras 相互作用,促进 Ras 与 GTP 结合,引起 Ras-GTP 的瞬间形成和膜上 Raf 激酶的活化,然后是 MAPKK 和 ERK1/ERK2 的顺序活化, ERK 易位进入核内,在核内活化转录因子 Elk 与 c-fos 基因启动子中的顺序调控元件——血清反应元件 (SRE) 结合,调节 c-fos 基因的转录,从而将成熟的巨噬细胞转变成前体 OC。最近有研究发现 ERK 通路完全可以作为炎症引起的骨溶解的靶向治疗端点^[15]。

2.4.2 JNK MAPK 通路: Rho 家族通过受体酪氨酸激酶介导生发中心激酶 (germinal center kinase, GCK/NIK) 的活化,而后依次激活 MAPKK 类 MEKK1/2/3/4, 和 MAPKK 类的 MEK4/7, 最终活化的 JNK,使其从胞浆移位至细胞核,活化的 JNK 能诱导 AP-1 (主要由 Jun 与 Fos 两大类蛋白组成) 活化,启动 MMPs 和碱性磷酸酶等基因的编码,从而刺激 OC 前体的分化、生存、融合及活化成熟的 OC^[16]。

2.4.3 p38 (38KD 的酪氨酸磷酸化蛋白激酶) MAPK 通路: OC 前体上 RANKL 与 RANK 结合后,促进 MEK6 的磷酸化,进而激活 p38 MAPK,活化的

p38 从胞浆移位到细胞核,磷酸化转录因子 MITF 等,最终促进 OC 分化。抑制 p38 MAPK 信号途径可以抑制 OC 分化和局部骨吸收^[17]。一些有关骨髓瘤的研究显示骨髓瘤导致的骨损害是由 P38 触发和调节的,但是对骨质的损害是由骨髓瘤细胞和其周围的骨髓细胞的相互作用维持的,而这种作用与 p38 上调细胞因子也有关,提示我们对于骨髓瘤引起的骨质损害可以从 P38 通路着手^[18]。最近的一个实验证明抑制 p38 蛋白介导的途径可以加强唑来膦酸 (zoledronic acid, ZA) 提高卵巢切除小鼠的骨密度的效果,这个结果提示我们可以把这个通路作为一个潜在的治疗靶点^[19]。

2.5 CN/NFAT (Calcineurin, 钙调磷酸酶/nuclear factor of activated T cells, 活化 T 细胞核因子) 通路

CN/NFAT 是 OC 内与 RANK 相关的又一信号转导通路。我们已经知道不同转录因子的活化都依赖 Ca^{2+} 信号, NFAT 的活化就是依赖于持续低浓度的 Ca^{2+} ^[20], 而且 Ca^{2+} 振动可以降低转录因子活化时的 Ca^{2+} 阈值^[21,22], 近来有实验证明 OAA 可以抑制 Ca^{2+} 振动和 NFAT 的表达而不影响 MAPK 途径,从实验的结果看,被 OAA 处理的小鼠能明显降低脂多糖诱导的骨腐蚀^[23]。当 Src 蛋白激活 IP3, 后者引起钙库释放提高细胞浆内 Ca^{2+} 水平, NFAT 是一种 Ca^{2+} 调节性转录因子,包括 NFAT1-4, 被 CN 活化后,快速易位进入细胞核启动基因的转录。其中 NFATc1 通过控制 OC 相关基因在调节 OC 分化进程中扮演着主要角色,而 c-fos 是诱导 NFATc1 活化的重要因子^[24]。在 OC 分化的最后阶段, NFATc1 扮演着最末梢的转录因子来调节 OC 相关基因的表达如 TRAP, OSCAR, DC-STAMP, 组织蛋白酶 K 和 c-scr^[25]。最近的一个研究表明了 Akt-NFATc1 信号轴在 OC 分化过程中的重要性,抑制 Akt 的磷酸化会降低 RANKL 诱导的 NFATc1 的活化从而抑制 OC 的分化^[26]。

2.6 IDO/Tryptophan (indoleamine 2,3-dioxygenase, 吲哚胺-2,3-二加氧酶/色氨酸) 通路

CD80/86 是表达在抗原呈递细胞上的一对分子,参与了 T 细胞的共刺激,作为 OC 参与的骨吸收过程的负调节因子。实验证明, CD80/86 缺乏的小鼠会由于 OC 分化的增加而导致骨质疏松。CD80/86 与细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4) 结合后诱导 OC 前体上 IDO, 其降解色氨酸并促进 OC 凋亡,从而负性调节骨吸收。实验中发现 IDO/Tryptophan

通路并不是独立的而是依赖于 NF- κ B^[27]。

3 OC 分化过程中重要的信号因子

除了上述几条经典的信号通路,近些年的研究主要集中在调节 OC 分化通路的相关信号因子,并取得了很大的研究进展,为骨代谢性疾病的靶向治疗提供了很多的思路。

3.1 PU.1

PU.1 是 ETS 家族的一个转录因子,对于髓系和淋巴细胞系的发育起着非常重要的作用^[28]。在 OC 分化的不同过程中都有 PU.1 的表达,而且其表达量随着 OC 的分化可以达到 3 倍以上。实验证明,PU.1 基因敲除的小鼠会缺乏造血干细胞系向巨噬细胞/单核细胞的分化,由于缺乏 OC 的形成而导致骨质疏松^[29]。PU.1 的另一个重要的作用是在早期造血干细胞向巨噬细胞/单核细胞系分化的过程中,PU.1 还可以刺激 M-CSF 的表达。

3.2 Lhx2

Lhx2 功能非常多,但是最近有研究发现其在 OC 分化中也发挥着重要的作用。Lhx2 在 OC 前体上表达明显,但是在 RANKL 介导的 OC 分化过程中表达就降低了。实验发现当 Lhx2 蛋白与 c-fos 相互作用后,会减弱 c-fos 的 DNA 结合能力,因此也就抑制了 NFATc1 的活化。对于 Lhx2 基因敲除的小鼠会有骨质疏松的表现,这与体内 OC 大量形成有关。所以 Lhx2 在 OC 的形成中起着负调节因子的作用,可以成为一些骨代谢性疾病的新的治疗手段的新靶点^[30]。

3.3 TNF- α

TNF- α 为 TNF 家族重要成员之一,可以由正常的 OC 合成,刺激 OB 产生 GM-CSF、IL-6 等因子,诱使 OC 前体分化为 OC,但是此过程必须有 IL-1 的参与,实验证明 IL-1 的拮抗剂(IL-1Ra)可以阻断 TNF- α 的诱导作用。TNF- α 通过与 TNFR-1 结合发挥其生理学作用,当与 TNFR-1 结合后,启动 OC 或者 OC 前体细胞产生 NF- κ B、JNK、p38、ERK、Akt 等信号传导途径促进 OC 的活化和存活,促进其分化形成成熟的 OC^[31]。现在有人发现 TNF- α 在骨平衡建立中的矛盾的作用,即在三个体外鼠模型中,低浓度的 TNF- α 会通过上调 Runx2、Osx、OCN 和 ALP 的水平来增加 OB 的分化^[32,33]。

3.4 M-CSF

在 PTH、TNF- α 、IL-1 上升和 M-CSF 的一种自分泌机制来调节其受体等的的作用下,OB、基质细胞和

T 淋巴细胞会大量表达 M-CSF^[34]。M-CSF 和其在 OC 前体细胞上的 c-fms 受体结合后,可以通过一系列信号通路促进细胞增生和存活。C-fms 是一种酪氨酸激酶受体,在 M-CSF 的活化作用下,酪氨酸残基会磷酸化,磷酸化后的酪氨酸残基就会发挥结合位点的作用。除了可以刺激细胞增生,M-CSF 还具有抑制 OC 凋亡和增强其对 RANKL 的敏感性的作用。M-CSF 通过 MAPK 路径诱导小眼相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)的磷酸化,而抗凋亡的 Bcl-2 是 MITF 的目的转录因子(anti-apoptotic B cell leukemia/lymphoma associated gene 2, Bcl-2)。OC 前体细胞主要是被 RANKL 活化的,而 M-CSF 在促进细胞增生的同时可以诱导的 RANK 的表达,增强了其对 RANKL 的敏感性。

3.5 TGF- β

TGF- β 贮存于细胞外基质中,在增进癌症发展和癌症诱导的骨代谢中起着关键作用^[35]。研究表明,低浓度的 TGF- β 通过提高 M-CSF 的表达和 RANKL/OPG 的比例,促进 OC 分化,相反在高浓度的 TGF- β 下,其抑制 M-CSF 和 RANKL 的表达,而提高了 OPG 的表达,OC 分化受到抑制^[36]。最新研究表明, TGF- β 可以通过 Smad3 和 TRAF6 这两个信号分子调节 RANKL 引起的破骨细胞形成^[37]。

3.6 其他

还有一些因子在 OC 分化过程中起到了不可小觑的调节作用(见图 2),如 1,25-二羟维生素 D₃ (1,25-(OH)₂D₃) 是 OC 形成所必须的激素,通过促进 M-CSF、IL-1、IL-6 和 RANKL 等因子的合成来间接调节 OC 形成与分化。甲状旁腺激素(PTH)主要作用于 OB,参与 Wnt 信号通路,通过抑制 Wnt 的拮抗剂来调节 OC 分化与活化^[38]。前列腺素 E₂ (PGE₂) 对 OC 分化有双向作用,低浓度诱导 OC 分化,高浓度抑制分离的 OC。有研究发现在雌激素缺乏的破骨细胞生成过程中 TRPV5 的表达明显降低,说明在雌激素抑制破骨细胞分化的过程中 TRPV5 起到了非常重要的作用^[39]。IL-34 最近被确认为在 OC 分化中的一个新的调节因子,现有的研究表明 TNF- α 通过 OB 上的 NF- κ B 的活化来诱导 IL-34 的表达,而且 TNF- α 诱导 IL-34 具有剂量依赖性和时间依赖性^[40]。2014 年 Jan C. A. Boeyens 等人通过小鼠模型实验表明不饱和脂肪酸中的 DHA 和 AA 对 OC 的形成有抑制作用,且两者的作用效果并不一致,提示我们在饮食中合理的摄入这些不饱和脂

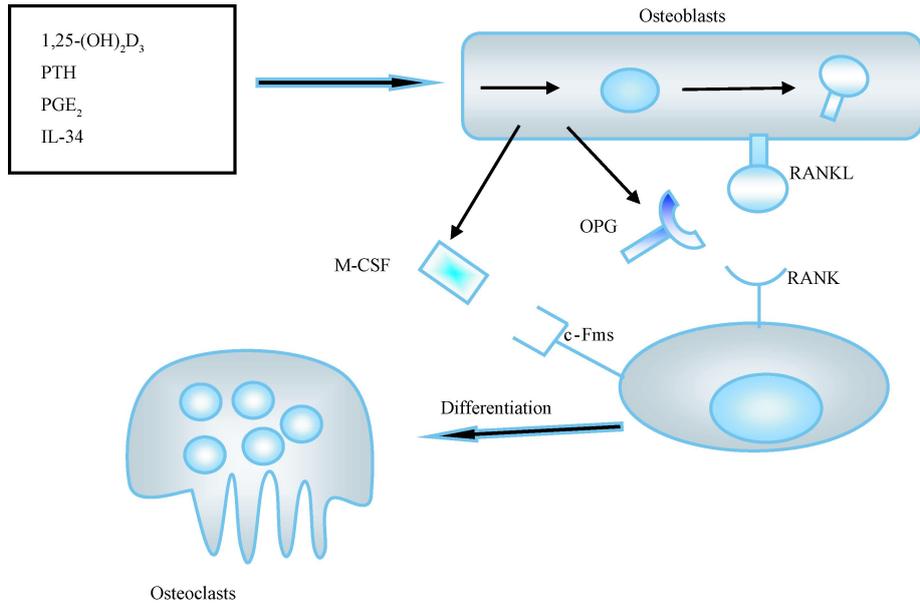


图2 其他一些因子在破骨细胞分化过程中的重要作用

Fig. 2 The important roles of other signal factors in the differentiation of osteoclasts

肪酸对于维持骨的质量和减少过度溶骨等疾病的发生^[41]。

4 小结

参与 OC 分化成熟的各种信号通路在 OC 分化过程中不是独立存在,而是彼此紧密协调成一个和谐作用体系来影响 OC 的分化,它们之间存在着各种偶联机制。最基本的是基质细胞-OB-OC 形成的一种相互依赖的偶联系统,其作为一个机整体来调节整个骨代谢平衡系统。然后是各种信号因子与 RANKL-RANK-OPG 系统相互偶联,绝大部分信号因子都是经由 OB 介导而作用于 OC,通过调节 RANKL/RANK/OPG 的基因表达,实现对 OC 的调节作用。最后是 RANKL 和 M-CSF 在 OC 分化中起的协同作用,无论是从原始的造血祖细胞通过增殖、分化到 OC 前体,还是从 OC 前体分化到具有 TRAP 阳性的单核细胞、一直到融合形成具有骨吸收功能的多核的成熟 OC,在这一系列进化过程中,都需要 RANKL 和 M-CSF 同时参与调控。

诸多信号因子在 OC 分化过程中都起着不可替代的作用,这也为临床的靶向治疗提供的基础和方向,而且目前越来越多的研究发现许多因素对 OC 的分化的影响,也为骨质疾病的预防提供了参考。值得一提的是 RANKL/RANK 系统对于骨的作用已经非常明确,但有研究显示其对于免疫系统和肿瘤的治疗也有着不可忽视的作用,可以作为未来临床

治疗的一个靶点,但这些机制尚需要更多的实验来证明。

【参考文献】

- [1] Xing L, Xiu Y, Boyce BF. Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. *World J Orthop*, 2012,3(12):212-222.
- [2] Boyce BF. Advances in osteoclast biology reveal potential new drug targets and new roles for osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 2013,28(4):711-722.
- [3] Joseph L, Sottnik, Evan T. Keller. Understanding and targeting osteoclastic activity in prostate cancer bone metastases. *Curr Mol Med*, 2013; 13(4): 626-639.
- [4] Trouvin AP, Goeb V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging*, 2010,5: 345-354.
- [5] De Ciriza CP, Moreno M, Restituto P, et al. Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clin Biochem*. 2014, pii: S0009-9120(14)00661-4. [Epub ahead of print].
- [6] Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, 1994,266(5184):443-448.
- [7] Lin TH, Tamaki Y, Pajarinen J, et al. Chronic inflammation in biomaterial-induced periprosthetic osteolysis: NF- κ B as atherapeutic target. *Acta Biomater*, 2014,10:1-10.
- [8] Chang J, Liu F, Lee M, et al. NF- κ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting b-catenin degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

- 2013,110: 9469-9474.
- [9] Hyun-Ju Kim, Hye-Jin Yoon, Shin-Yoon Kim, et al. A medium-chain fatty acid, capric acid, inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation via the suppression of NF- κ B signaling and blocks cytoskeletal organization and survival in mature osteoclasts. *Mol Cells*,2014,37(8): 598-604.
- [10] Ke K, Sul OJ, Choi EK, et al. Reactive oxygen species induce the association of SHP-1 with c-Src and the oxidation of both to enhance osteoclast survival. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014,307(1):E61-70.
- [11] Chen LL, Huang M, Tan JY, et al. PI3K/AKT pathway involvement in the osteogenic effects of osteoclast culture supernatants on preosteoblast cells. *Tissue Eng Part A*,2013,19(19-20):2226-2632.
- [12] Ouyang Z, Zhai Z, Li H, et al. Hypericin suppresses osteoclast formation and wear particle-induced osteolysis via modulating ERK signalling pathway. *Biochem Pharmacol*,2014,90(3):276-287.
- [13] Moon JB, Kim JH, Kim K, et al. Akt induces osteoclast differentiation through regulating the GSK3 β /NFATc1 signaling cascade. *J Immunol*,2012,188:163-169.
- [14] Kang H, Chang W, Hurley M, et al. Important roles of PI3K γ in osteoclastogenesis and bone homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*,2010,107(29):12901-12906.
- [15] Ferron M, Boudiffa M, Arsenault M, et al. Inositol polyphosphate 4-phosphatase B as a regulator of bone mass in mice and humans. *Cell Metab*,2011,14(4):466-477.
- [16] Chapurlat RD, Palermo L, Ramsay P, et al. Risk of fracture among Women who lose bone density during treatment with alendronate. *The Fracture Intervention Trial. Osteoporosis Int*, 2005,16(7):842-848.
- [17] Choi SW, Park KI, Yeon JT, et al. Anti-osteoclastogenic activity of matairesinol via suppression of p38/ERK-NFATc1 signaling axis. *BMC Complement Altern Med*,2014,14:35.
- [18] Jin He, Zhiqiang Liu, Yuhuan Zheng, et al. p38 MAPK in myeloma cells regulates osteoclast and osteoblast activity and induces bone destruction. *Cancer Res*, 2012, 72(24): 6393-6402.
- [19] Ta-Wei Tai, Fong-Chin Su, Ching-Yu Chen, et al. Activation of p38 MAPK-regulated Bcl-xL signaling increase survival zoledronic acid-induced apoptosis in osteoclast precursors.
- [20] Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, et al. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*,1997,386(6627):855-858.
- [21] Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*,1998, 392(6679):933-936.
- [22] Tomida T, Hirose K, Takizawa A, et al. NFAT functions as a working memory of Ca²⁺ signals in decoding Ca²⁺ oscillation. *EMBO J*,2003,22(15):3825-3832.
- [23] Kim JY, Cheon YH, Oh HM, et al. Oleanolic acid acetate inhibits osteoclast differentiation by down regulating PLC γ 2-Ca(2+)-NFATc1 signaling, and suppresses bone loss in mice. *Bone*, 2014,60:104-111.
- [24] Miyamoto T. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *Keio J Med*,2011, 60(4): 101-105.
- [25] Kim K, Lee SH, Ha Kim J, et al. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *Mol Endocrinol*, 2008,22(1):176-185.
- [26] Moon JB, Kim JH, Kim K, et al. Akt induces osteoclast differentiation through regulating the GSK3 β /NFATc1 signaling cascade. *J Immunol*,2012,188(1):163-169.
- [27] Bozec A, Zaiss MM, Kagwiria R, et al. T cell costimulation molecules CD80/86 inhibit osteoclast differentiation by inducing the IDO/tryptophan pathway. *Sci Transl Med*,2014,6(235): 235-260.
- [28] Scott EW, Simon MC, Anastasi J, et al. Requirement of transcription factor PU. 1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*,1994,265(5178):1573-1577.
- [29] Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, et al. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU. 1. *Nature*, 1997,386(6620):81-84.
- [30] Kim JH, Youn BU, Kim K, et al. Lhx2 regulates bone remodeling in mice by modulating RANKL signaling in osteoclasts. *Cell Death Differ. Cell Death Differ*,2014,21(10): 1613-1621.
- [31] Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclast. *Gene*, 2005,350(1):1-13.
- [32] Huang H, Zhao N, Xu X, et al. Dose-specific effects of tumor necrosis factor alpha on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*,2011,44(5):420-427.
- [33] Glass GE, Chan JK, Freidin A, et al. TNF- α promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*,2011,108(4):1585-1590.
- [34] Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis-current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2008,8:204-216.
- [35] Shahrzad Rafiei, Svetlana V Komarova. Molecular Signaling Pathways Mediating Osteoclastogenesis Induced by Prostate Cancer Cells. *BMC Cancer*,2013,13:605.
- [36] Subramaniam M, Hawse JR, Bruinsma ES, et al. TGF- β inducible early gene-1 directly binds to and represses the OPG promoter in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*,2010, 392(1):72-76.
- [37] Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, et al. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF-beta through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J Bone Miner Res*,2011, 26(7): 1447-1456.
- [38] Bellido T, Ali AA, Gubrij I, et al. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology*, 2005,146(11):4577-4583.

- [39] Chen F, Ouyang Y, Ye T, et al. Estrogen inhibits RANKL-induced osteoclastic differentiation by increasing the expression of TRPV5 channel. *J Cell Biochem*, 2014, 115(4): 651-658.
- [40] Yu Y, Yang D, Qiu L, et al. Tumor necrosis factor- α induces interleukin-34 expression through nuclear factor- κ B activation in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Mol Med Rep*, 2014, 10(3): 1371-1376.
- [41] Boeyens JC, Deepak V, Chua WH, et al. Effects of ω 3- and ω 6- polyunsaturated fatty acids on RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells: a comparative in vitro study. *Nutrients*, 2014, 6(7): 2584-2601.

(收稿日期:2014-08-11,修回日期:2014-09-26)

(上接第736页)

- [13] Pierschbacher MD, Dedhar S, Ruoslahti E, et al. An adhesion variant of the MG-63 osteosarcoma cell line displays an osteoblast-like phenotype. *Ciba Found Symp*, 1988, 136: 131-141.
- [14] Saldana L, Bensiamar F, Bore A, et al. In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta Biomater*, 2011, 7(12): 4210-4221.
- [15] Li Y, Backesjo CM, Haldosen LA, et al. Species difference exists in the effects of 1 α , 25(OH)₂D₃ and its analogue 2-methylene-19-nor-(20S)-1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (2MD) on osteoblastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, 112(1-3): 110-116.
- [16] Franceschi RT, Romano PR, Park KY. Regulation of type I collagen synthesis by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ in human osteosarcoma cells. *J Biol Chem*, 1988, 263(35): 18938-18945.
- [17] Wang X, Wang X, Tan Y, et al. Synthesis and evaluation of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites for bone grafting. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 89(4): 1079-1087.
- [18] Noda M. Transcriptional regulation of osteocalcin production by transforming growth factor- β in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 1989, 124(2): 612-617.
- [19] Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, et al. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*, 1992, 7(6): 683-692.
- [20] Hong D, Chen HX, Yu HQ, et al. Morphological and proteomic analysis of early stage of osteoblast differentiation in osteoblastic progenitor cells. *Exp Cell Res*, 2010, 316(14): 2291-2300.
- [21] Asai T, Suzuki H, Kitayama M, et al. The Long-term Effects of Red Light-emitting Diode Irradiation on the Proliferation and Differentiation of Osteoblast-like MC3T3-E1 Cells. *Kobe J Med Sci*, 2014, 60(1): E12-E18.
- [22] Yohay DA, Zhang J, Thraill KM, et al. Role of serum in the developmental expression of alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Physiol*, 1994, 158(3): 467-475.
- [23] Grigoriadis AE, Petkovich PM, Ber R, et al. Subclone heterogeneity in a clonally-derived osteoblast-like cell line. *Bone*, 1985, 6(4): 249-256.
- [24] Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res*, 1987, 47(18): 4961-4966.
- [25] Demais V, Audrain C, Mabilieu G, et al. Diversity of bone matrix adhesion proteins modulates osteoblast attachment and organization of actin cytoskeleton. *Morphologie*, 2014, 98(321): 53-64.
- [26] Yu L, van der Valk M, Cao J, et al. Sclerostin expression is induced by BMPs in human Saos-2 osteosarcoma cells but not via direct effects on the sclerostin gene promoter or ECR5 element. *Bone*, 2011, 49(6): 1131-1140.
- [27] Keeting PE, Scott RE, Colvard DS, et al. Development and characterization of a rapidly proliferating, well-differentiated cell line derived from normal adult human osteoblast-like cells transfected with SV40 large T antigen. *J Bone Miner Res*, 1992, 7(2): 127-136.
- [28] Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, et al. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(2): 178-186.
- [29] Rochet N, Dubouset J, Mazeau C, et al. Establishment, characterisation and partial cytokine expression profile of a new human osteosarcoma cell line (CAL 72). *Int J Cancer*, 1999, 82(2): 282-285.
- [30] Martin TJ, Ingleton PM, Underwood JC, et al. Parathyroid hormone-responsive adenylate cyclase in induced transplantable osteogenic rat sarcoma. *Nature*, 1976, 260(5550): 436-438.
- [31] Forrest SM, Ng KW, Findlay DM, et al. Characterization of an osteoblast-like clonal cell line which responds to both parathyroid hormone and calcitonin. *Calcif Tissue Int*, 1985, 37(1): 51-56.
- [32] Hamedifar H, Salamat F, Saffarian M, et al. A Novel Approach for High Level Expression of Soluble Recombinant Human Parathyroid Hormone (rhPTH 1-34) in Escherichia coli. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2013, 5(3): 193-201.
- [33] Ng KW, Gummer PR, Michelangeli VP, et al. Regulation of alkaline phosphatase expression in a neonatal rat clonal calvarial cell strain by retinoic acid. *J Bone Miner Res*, 1988, 3(1): 53-61.
- [34] Ng KW, Hudson PJ, Power BE, et al. Retinoic acid and tumour necrosis factor- α act in concert to control the level of alkaline phosphatase mRNA. *J Mol Endocrinol*, 1989, 3(1): 57-64.
- [35] Jat P S, Sharp P A. Large T antigens of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J Virol*, 1986, 59(3): 746-750.
- [36] Yamashita T, Asano K, Takahashi N, et al. Cloning of an osteoblastic cell line involved in the formation of osteoclast-like cells. *J Cell Physiol*, 1990, 145(3): 587-595.
- [37] Jahn K, Richards RG, Archer CW, et al. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *Eur Cell Mater*, 2010, 20: 149-161.

(收稿日期:2014-07-18,修回日期:2014-09-12)