

· 论著 ·

贝尼地平对小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化体外研究

马忠平 黄健* 张志峰 杨云 叶楠

内蒙古医科大学第二附属医院关节外科, 呼和浩特 010030

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 04-0423-05

摘要: **目的** 在体外环境下探讨贝尼地平对小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响。**方法** C57/BL6 小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)在成骨诱导培养基条件下经过 1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的贝尼地平(BD)处理, 1天和14天后采用CCK8法检测细胞增殖情况, 以及14天后采用碱性磷酸酶(ALP)染色检测ALP表达量, 蛋白免疫印迹(Western Blotting)法检测成骨特征蛋白骨钙素(OCN)和核心结合蛋白因子2(Runx2)以及WNT/ β -catenin信号通路关键蛋白 β -链蛋白(β -catenin)和低密度脂蛋白相关蛋白5(LRP5)蛋白的表达。**结果** 在本次研究中, 贝尼地平浓度在1~100 $\mu\text{mol/L}$ 对细胞没有毒性作用($P > 0.05$); 所有浓度的贝尼地平处理组(1~100 $\mu\text{mol/L}$)中ALP表达量均增加($P < 0.05$), 并出现浓度依赖性, 随着贝尼地平浓度的增加促进BMSCs表达ALP能力相应增强($P < 0.05$); 贝尼地平促进所有处理组(1~100 $\mu\text{mol/L}$)中Runx2的表达($P < 0.05$), 并出现浓度依赖性, 在贝尼地平浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时促进作用最强($P < 0.05$); OCN的表达随着贝尼地平浓度的增加而相应增加($P < 0.05$), 在贝尼地平浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大($P < 0.05$); 贝尼地平促进 β -catenin表达($P < 0.05$), 出现随贝尼地平浓度增加而表达增强, 促进作用在贝尼地平浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大($P < 0.05$); 而LRP5的表达在贝尼地平的作用下得到加强($P < 0.05$)并出现浓度依赖性, 在贝尼地平浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大($P < 0.05$)。**结论** 贝尼地平在体外能通过上调WNT/ β -catenin信号通路活性促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化, 这对高血压合并骨质疏松患者而言是一个良好的治疗药物。

关键词: 贝尼地平; 成骨; 骨髓间充质干细胞; 抗骨质疏松; 钙通道阻滞剂

Effect of benidipine on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells in vitro

MA Zhongping, HUANG Jian*, ZHANG Zhifeng, YANG Yun, YE Nan

Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China

Corresponding author: HUANG Jian, Email: huangjian70316@126.com

Abstract: Objective To investigate the effect of benidipine of osteoblast differentiation by mouse bone marrow stromal cells in vitro. **Methods** Under osteogenic conditions, bone marrow stromal cells (BMSCs) from C57/BL6 mice were cultured for 2 weeks. The cultures were added with 0, 1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$ of benidipine. Cell proliferation was examined with CCK8 assays on 24 hours and 2 weeks. Protein expressions of alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN), runt-related transcription factor 2 (Runx2), β -catenin, and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) were evaluated on 14 days. **Results** In our study, benidipine at concentrations of 1-100 μM did not significantly affect cell growth after treatment ($P < 0.05$). The expression of ALP increased in cultures with benidipine (1-100 $\mu\text{mol/L}$) in a dose dependent manner ($P < 0.05$). Runx2 was also up-regulated with benidipine (1-100 $\mu\text{mol/L}$) treatment ($P < 0.05$) in a dose dependent manner, and the peak of Runx2 expression was found at 100 $\mu\text{mol/L}$ treatment ($P < 0.05$). The expression of OCN, β -catenin, and LRP5 increased in cultures with benidipine (1-100 $\mu\text{mol/L}$) in a dose dependent manner ($P < 0.05$), and the peak of the expression was found at 100 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). **Conclusion** Benidipine promotes BMSCs differentiation into osteoblasts through up regulation of WNT/ β -catenin signal pathway. Therefore, it might be a suitable candidate for the treatment of patients with osteoporosis and hypertension.

Key words: Benidipine; Osteogenesis; BMSCs; Anti-osteoporosis; Calcium Channel Blocker

国内外众多研究报道, 高血压与成骨异常存在

着密切的联系^[1], 高血压患者的骨丢失明显加重, 而钙从骨质中流失也相应加速, 此外高血压引起的继发性骨质疏松近年来成为科学研究的热点问题

*通讯作者: 黄健, Email: huangjian70316@126.com

题^[2-3],为现代骨代谢研究提供了重要线索。贝尼地平(benidipine, BD)作为临床上常用降血压药物,其作用机制主要是抑制血管平滑肌上的L型电压依赖性钙通道蛋白开放,以此阻断钙离子在血管平滑肌细胞中的聚集,从而舒张血管平滑肌并降低血压^[4],但该药物在骨代谢中的研究报道甚少。本研究旨在通过体外实验观察贝尼地平在骨代谢中的具体作用,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

取原代 BMSCs 所用的雌性 4 周大 C57/BL6 小鼠,体重 10~15 g,购至内蒙古农业大学实验动物中心;主要实验仪器与试剂:(1)主要仪器:倒置光学显微镜(Nikon, TE2000-U), (2)主要试剂:一抗 Runx2(CST 公司),一抗 OCN(CST 公司),一抗 GAPDH(CST 公司),一抗 β -catenin(CST 公司),一抗 LRP5(CST 公司),ALP 染色试剂盒(碧云天生物试剂公司),Caspase-8 比色测定工具包(凯基生物公司),贝尼地平(Sigma 公司), α -MEM(Hyclone 公司),胎牛血清(Gibco 公司)。

1.2 BMSCs 的提取与培养

小鼠寰枢椎脱臼处死后 75% 酒精浸泡消毒 5 分钟,在超净台中用眼科剪和眼科镊剥开小鼠皮肤,从髌白关节处取下小鼠双下肢,PBS 清洗掉粘连毛发,剥离附属肌肉等软组织整理出股骨,浸泡于 α -MEM 基础培养基中,用一套新的灭菌眼科剪和眼科镊剪开股骨双侧骨端暴露骨髓腔,用 1 ml 注射器吸取 10% FBS 的完全培养基冲出骨髓,反复并两端交换冲洗,待骨头发白后将含有骨髓的完全培养基转移至干净的 15 ml 离心管,800 r/min 低速离心 5 分钟,骨髓重悬后转移至 10 cm 培养皿中 5% 的 CO_2 下 37℃ 培养,培养基 3 天更换 1 次。

1.3 细胞实验的分组与处理

取第 3 代生长良好的小鼠 BMSCs 按 1×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板,待细胞融合率达到 90% 以上时,将细胞分为 2 组,对照组:成骨诱导培养基培养;贝尼地平处理组:成骨诱导培养基条件下分别以 1、10 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 贝尼地平培养。成骨诱导培养基各成分比例为 100 nmol/L 的地塞米松,50 $\mu\text{g/ml}$ 的维生素 C 磷酸酯,10 mM/L 的 β -甘油磷酸钠。药物连续处理 14 天,3 天更换 1 次培养基,37℃,5% CO_2 条件下培养。

1.4 CCK8 检测贝尼地平对 BMSCs 的细胞毒性

第 3 代 BMSCs 种于 96 孔板中,细胞的种植密度为 1×10^5 个/孔,培养 2 天后对细胞进行加药处理,加入贝尼地平浓度分别为 0.1、1、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$,加药处理 1 天和 14 天,使用 Caspase-8 比色测定工具包(CCK8)进行药物细胞毒性检测。每孔加入 10 μL 的 CCK8 溶液和 90 μL 的 α -MEM 基础培养基,使用酶标仪测量各孔吸光度(optical density, OD),CCK8 溶液吸收波长为 450 nm。

1.5 ALP 染色实验

第 3 代 BMSCs 种于 6 孔板中,细胞成骨诱导并加入贝尼地平(1~100 $\mu\text{mol/L}$)处理 14 天后,对细胞行 ALP 染色。具体步骤为:洗去细胞培养基,使用无菌 PBS 轻柔冲洗 2 次,每孔加入 2 ml 的 4% 多聚甲醛室温固定 20 分钟;PBS 冲洗 3 次,每次 3 分钟,洗掉多余多聚甲醛;按照使用说明书配制 ALP 染液,现配现用,配好 ALP 染液避光保存;每孔细胞加入 ALP 染液 1 ml 避光 37℃ 孵育半小时;PBS 冲洗 3 遍,每遍 3 分钟,终止染色。光镜下拍照,Image-Pro Plus software(IPP,美国)软件计数阳性细胞数。

1.6 Western blotting 检测 Runx2、OCN、GAPDH、 β -catenin 和 LRP5 的表达水平

对细胞成骨诱导并加入贝尼地平(1~100 $\mu\text{mol/L}$)处理 14 天后,在冰上用蛋白裂解缓冲液裂解细胞,收集蛋白,样品金属浴 96℃ 处理 10 分钟,10 000 r/min 高速离心 1 分钟,取上清,-20℃ 长期储存备用。每条泳道上样 30 μg 蛋白,用体积分数(V/V)为 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 60 分钟,将凝胶中蛋白电泳转移至硝酸纤维素膜上,脱脂奶粉常温封闭 1 小时后分别加入一抗(1:2000)冰箱 4℃ 过夜孵育,室温 TBST 溶液清洗 3 遍,每遍 5 分钟,二抗(1:3000)常温孵育 1 小时,增强化学发光(ECL)发光试剂显色摄像。条带用 Image J 软件分析,测定灰度值。目的条带与对应的 GAPDH 条带灰度比值为统计结果。

1.7 统计学方法

实验数据在 SPSS 20.0 统计软件中运用单因素方差分析。首先行方差齐性检验,若结果方差齐,则组间多重比较采用 LSD 法;若结果方差不齐组间多重比较采用 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义,定量数据均采用均数 \pm 方差表示。

2 结果

2.1 BD 对 BMSCs 的细胞毒性影响

加药处理 1 天(图 1)和 14 天(图 2)后,对细胞

行 CCK8 检测,结果提示 BD 浓度在 1 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞均不会出现毒性作用 ($P > 0.05$),各实验

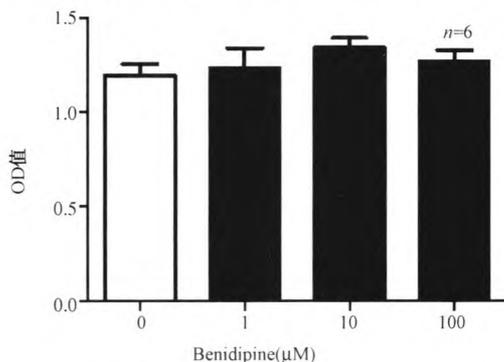


图1 各浓度贝尼地平处理 BMSC 24 小时后所得 CCK8 吸光度 (OD)

Fig. 1 The optical density of CCK8 with different doses of benidipine for 24h (OD).

组 (1 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) CCK8 结果和对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1, 2, 表 1)。

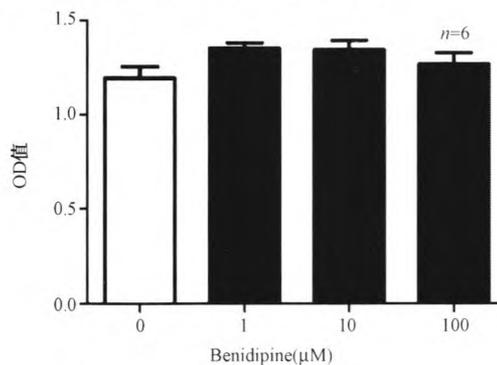


图2 不同浓度贝尼地平处理 BMSC 14 天后所得 CCK8 吸光度 (OD)

Fig. 2 The optical density of CCK8 with different doses of benidipine for 2 weeks (OD).

表 1 不同浓度贝尼地平处理下 CCK8、ALP 染色以及蛋白免疫印迹定量结果 ($n = 6$)

Table 1 The results of CCK8, ALP staining and Western blotting with different doses of benidipine ($n = 6$).

组别	24 小时 CCK8 吸光度	14 天 CCK8 吸光度	ALP 阳性 细胞数	Runx2 灰度值	OCN 灰度值	β -catenin 灰度值	LRP5 灰度值
对照组	1.195500 \pm 0.189542	1.193000 \pm 0.188625	88.931830 \pm 13.840930	1.054064 \pm 0.171973	1.094875 \pm 0.091589	1.014758 \pm 0.053150	0.990622 \pm 0.044007
1 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.233300 \pm 0.339353	1.225200 \pm 0.309850	120.267100 \pm 24.901330	1.634447 \pm 0.160929	1.667254 \pm 0.082215	2.090139 \pm 0.135957	1.611732 \pm 0.091871
10 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.346800 \pm 0.156797	1.351400 \pm 0.097437	133.637300 \pm 20.985230	2.116751 \pm 0.234830	1.984705 \pm 0.167000	3.444125 \pm 0.455516	1.864968 \pm 0.096020
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.268800 \pm 0.197948	1.345200 \pm 0.156238	174.438700 \pm 15.343160	2.924276 \pm 0.165972	2.586582 \pm 0.227470	4.381943 \pm 0.408126	2.474474 \pm 0.158240

2.2 BD 对 BMSCs 的 ALP 表达影响

细胞处理 14 天后,行 ALP 染色,光镜下拍照用 IPP 软件计阳性细胞数。对照组: 88.931830 \pm 13.840930, 1 $\mu\text{mol/L}$ 组: 120.267100 \pm 24.901330, 10 $\mu\text{mol/L}$ 组: 133.637300 \pm 20.985230, 100 $\mu\text{mol/L}$ 组: 174.438700 \pm 15.343160, 各组组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3, 表 1), 随着 BD 浓度的增加, ALP 阳性细胞数相应明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 BD 对 BMSCs 的 Runx2 和 OCN 表达影响

细胞处理 14 天后行蛋白免疫印迹检测 Runx2 表达量, 对照组: 1.054064 \pm 0.171973, 1 $\mu\text{mol/L}$ 组: 1.634447 \pm 0.160929, 10 $\mu\text{mol/L}$ 组: 2.116751 \pm 0.234830, 100 $\mu\text{mol/L}$ 组: 2.924276 \pm 0.165972, 各组组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4, 表 1), 随着 BD 浓度的增加, Runx2 表达相应明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。同样, 对细胞

行蛋白免疫印迹检测 OCN 表达量, 对照组: 1.094875 \pm 0.091589, 1 $\mu\text{mol/L}$ 组: 1.667254 \pm 0.082215, 10 $\mu\text{mol/L}$ 组: 1.984705 \pm 0.167000, 100 $\mu\text{mol/L}$ 组: 2.586582 \pm 0.227470, 各组组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4, 表 1), 随着 BD 浓度的增加, OCN 表达也相应明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 BD 对 WNT/ β -catenin 信号通路影响

细胞处理 14 天后行蛋白免疫印迹检测 β -catenin 表达量, 对照组: 1.014551 \pm 0.053150, 1 $\mu\text{mol/L}$ 组: 2.090139 \pm 0.135957, 10 $\mu\text{mol/L}$ 组: 3.444125 \pm 0.455516, 100 $\mu\text{mol/L}$ 组: 4.381943 \pm 0.408126, 各组组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5, 表 1), 随着 BD 浓度的增加, β -catenin 表达相应明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。同样, 对细胞行蛋白免疫印迹检测 LRP5 表达量, 对照组: 0.990622 \pm 0.044007, 1 $\mu\text{mol/L}$ 组: 1.611732

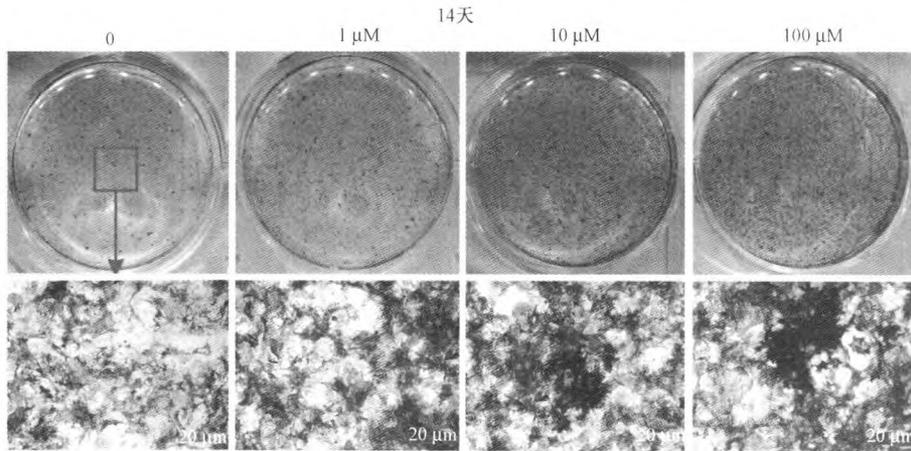


图3 不同浓度贝尼地平处理下 ALP 染色结果(100 ×)

Fig. 3 The staining of ALP with different doses of benidipine (100 ×).

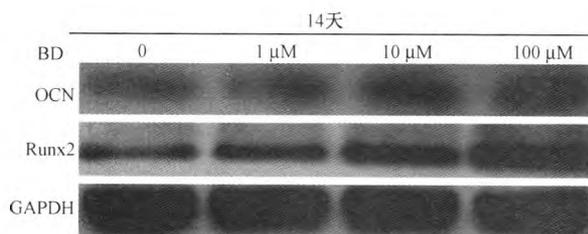


图4 不同浓度贝尼地平处理下 Runx2 和 OCN 蛋白免疫印迹结果

Fig. 4 The Western blotting result of Runx2 and OCN with different doses of benidipine

± 0.091871 , $10 \mu\text{mol/L}$ 组: 1.864968 ± 0.096020 , $100 \mu\text{mol/L}$ 组: 2.474474 ± 0.158239 , 各组组间比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5, 表 1), 随着 BD 浓度的增加, LRP5 表达也相应明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

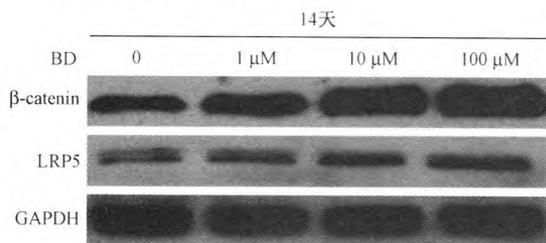


图5 不同浓度贝尼地平处理下 β-catenin 和 LRP5 蛋白免疫印迹结果

Fig. 5 The Western blotting result of β-catenin and LRP5 with different doses of benidipine.

3 讨论

随着我国人口老龄化程度加剧, 人们心血管问题越发突出, 高血压病的发病率以及患者数呈逐年

上涨趋势, 给社会、家庭和个人带来沉重经济负担^[5-6]。此外, 国外临床证据提示体内长期高血压状态和骨代谢异常存在着密切联系^[7], 这为我们提供了一个解决高血压病和骨代谢异常疾病的良好思路, 能否在降血压药物中找到一种良好的缓解骨质疏松症的药物是本次研究的主要目的。贝尼地平作为 L 型钙离子通道阻滞剂, 通过调控细胞内的钙通道进而调节血管平滑肌的收缩, 但贝尼地平在其他靶细胞的具体作用目前研究不多。骨髓间充质干细胞作为成骨细胞的祖细胞, 调控着体内成骨发育的关键过程, 但贝尼地平对骨髓间充质干细胞的具体作用目前尚不清楚, 明确贝尼地平对骨髓间充质干细胞在成骨分化过程中的影响, 对临床上如何干预骨折愈合、抗骨丢失有重要意义。

本实验采用体外诱导原代骨髓基质干细胞诱导分化为成骨细胞技术来探讨贝尼地平对成骨分化的影响, 骨髓基质干细胞作为骨代谢中重要的祖细胞, 是成骨细胞、脂肪细胞等共同的来源细胞, 地位重要^[8]。本研究首先通过酶标仪法检测贝尼地平对骨髓基质干细胞的毒性作用, 在实验设置的贝尼地平浓度范围内 ($1 \sim 100 \mu\text{mol/L}$) 未发现骨髓间充质干细胞出现毒性反应 ($P > 0.05$), 这为下一步的实验研究提供了重要参考。此外, 碱性磷酸酶作为成骨细胞的标志性蛋白, 在成骨细胞鉴定、成骨功能实现等过程中作用巨大。在成骨诱导条件下加药培养 14 天后的中期成骨阶段, 笔者发现在实验组中各浓度 ($1 \sim 100 \mu\text{mol/L}$) 的碱性磷酸酶表达和对照组相比都是明显增加的 ($P < 0.05$), 此外, 在实验组 ($1 \sim 100 \mu\text{mol/L}$) 的组内比较中发现, 随着贝尼地平的浓度增大, 碱性磷酸酶的表达和阳性细胞数呈浓度依

赖性增加($P < 0.05$),提示贝尼地平对成骨细胞中碱性磷酸酶的表达具有明显促进作用。另外,为进一步探讨贝尼地平对成骨分化的分子生物学影响,笔者对处理14天后的细胞行蛋白免疫印迹检测,探究成骨分化过程中关键转录因子Runx2^[9]和重要成骨调控蛋白OCN表达量,本研究发现贝尼地平通过促进成骨细胞中关键转录因子Runx2的表达进而促进成骨细胞分化进程,在各实验组(1~100 $\mu\text{mol/L}$)中,OCN的表达均高于对照组($P < 0.05$),并呈现浓度依赖性($P < 0.05$),从成骨调控蛋白角度印证了贝尼地平对成骨分化的作用。另外,成骨过程中关键转录因子Runx2表达在贝尼地平的作用下明显增加,在实验组中(1~100 $\mu\text{mol/L}$)Runx2表达量明显高于对照组($P < 0.05$),随着贝尼地平浓度增加,Runx2表达明显增加的($P < 0.05$),从核转录因子水平发现贝尼地平促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化。Wang BX等人^[10]在成骨细胞株MC3T3-E1中发现贝尼地平促进ALP、Runx2和OCN表达。骨髓间充质干细胞作为成骨细胞的上游细胞,其成骨能力改变对骨代谢的影响更为巨大,本研究则从干细胞层面发现贝尼地平对成骨作用的影响。

为进一步探讨贝尼地平对骨髓间充质干细胞成骨分化的信号通路机制,本研究对成骨诱导并加药培养14天后的细胞行蛋白免疫印迹检测,探究WNT/ β -catenin信号通路的关键蛋白 β -catenin和LRP5的表达水平。WNT/ β -catenin信号通路是成骨细胞分化和成熟的关键通路^[11],前人实验结果提示在 β -catenin参与情况下,骨髓间充质干细胞才具有向成骨细胞分化的能力^[12]。在本实验中,贝尼地平的加入能上调 β -catenin表达,和对照相比,实验组(1~100 $\mu\text{mol/L}$)的 β -catenin表达量均明显增加($P < 0.05$),实验组(1~100 $\mu\text{mol/L}$)内 β -catenin的表达随贝尼地平增加而增加($P < 0.05$);另外,作为WNT/ β -catenin信号通路中重要的通路活性调控蛋白,LRP5表达随着贝尼地平加入而明显上调($P < 0.05$),并呈现明显的浓度依赖性($P < 0.05$)。由以上结果我们不难看出, β -catenin和LRP5作为WNT/ β -catenin信号通路内关键正性调控蛋白,其表达量的上调提示WNT/ β -catenin信号通路强度明显增强,从信号通路方面阐述贝尼地平促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的机制。

贝尼地平作为临床上常用的心血管药物,其降血压特性已得到广泛运用,国外已有部分研究报道

贝尼地平对成骨细胞的促进作用^[10,13]。在此背景下,本研究以骨髓基质干细胞为研究切入点,从成骨细胞的祖细胞水平在体外环境下探讨贝尼地平对骨代谢的具体作用,并阐述了本过程的信号通路机制,为临床上贝尼地平的全新运用提供实验依据。

【参 考 文 献】

- [1] Grineler NM, Santoro NF. Menopause and exercise. *Menopause*, 2015, 22(12): 1351-1358.
- [2] Wang B, Bi M, Zhu Z, et al. Effects of the antihypertensive drug benidipine on osteoblast function. *Exp Ther Med*, 2014, 7(3): 649-653.
- [3] Nishiya Y, Sugimoto S. Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2001, 24(6): 628-633.
- [4] Portela GS, Cerci DX, Pedrotti G, et al. L-PRP diminishes bone matrix formation around autogenous bone grafts associated with changes in osteocalcin and PPAR-gamma immunoreexpression. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2014, 43(2): 261-268.
- [5] Musumeci M, Palermo A, D'Onofrio L, et al. Serum chitotriosidase in postmenopausal women with severe osteoporosis. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2016, 27(2): 711-716.
- [6] Shinkov AD, Borissova AM, Kovatcheva RD, et al. Age and menopausal status affect osteoprotegerin and osteocalcin levels in women differently, irrespective of thyroid function. *Clinical medicine insights Endocrinology and diabetes*, 2014, 7(1): 9-24.
- [7] Park J, Kim YM, Choi JH, et al. Turner syndrome with primary hyperparathyroidism. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism*, 2013, 18(2): 85-89.
- [8] Bhattarai T, Bhattacharya K, Chaudhuri P, et al. Correlation of common biochemical markers for bone turnover, serum calcium, and alkaline phosphatase in post-menopausal women. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 2014, 21(1): 58-61.
- [9] Morrison NA, Stephens AS, Osato M, et al. Polyalanine repeat polymorphism in RUNX2 is associated with site-specific fracture in post-menopausal females. *PloS one*, 2013, 8(9): 72740.
- [10] Wang J. Effects of the antihypertensive drug benidipine on osteoblast function in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2014, 7(3): 649-653.
- [11] Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 2003, 423(6937): 332-336.
- [12] Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis. *Calcified tissue international*, 2013, 93(2): 121-132.
- [13] Nishiya Y, Kosaka N, Uchii M, et al. A potent 1, 4-dihydropyridine L-type calcium channel blocker, benidipine, promotes osteoblast differentiation. *Calcified tissue international*, 2002, 70(1): 30-39.

(收稿日期: 2015-10-26)