

替诺福韦酯对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、凋亡及矿化的影响

陈宗锋¹ 赵汝岗² 张强^{2*} 成军³ 朱春晓¹ 王晶晶⁴ 刘琨¹

1. 泰山医学院研究生部, 泰安 271016

2. 首都医科大学附属北京地坛医院骨科, 北京 100015

3. 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所 新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015

4. 潍坊医学院, 潍坊 261042

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 05-0596-06

摘要: 目的 探讨富马酸替诺福韦酯 (Tenofovir disoproxil fumarate, TDF) 对体外培养小鼠胚胎前体成骨样细胞 MC3T3-E1 增殖、凋亡及矿化的影响。方法 体外培养 MC3T3-E1 细胞, 分为正常细胞对照组、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 对照组、TDF 处理组 (50 nM、500 nM、5000 nM、50000 nM、250000 nM、500000 nM), 干预 24 h、48 h。cell counting kit-8 (CCK8) 试剂盒检测细胞增殖抑制率, ANNEXIN V/7AAD 凋亡试剂盒检测细胞凋亡率, 茜红素染色检测钙结节形成。结果 TDF 对 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖和凋亡的影响受 TDF 浓度和干扰时间的影响, 即低浓度对增殖和凋亡无影响, 高浓度抑制增殖并促进凋亡, 并随干扰时间增加, 增殖抑制率和促凋亡率增大, 并抑制 MC3T3-E1 成骨细胞钙结节形成; 结论 在血药浓度 (约 500 nM) 时, TDF 对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖和凋亡无影响, 但抑制钙结节形成, 进而影响成骨, 可能是导致 TDF 相关性骨量减少和骨质疏松的因素之一。

关键词: 富马酸替诺福韦酯; 成骨细胞; 增殖; 凋亡; 矿化

The effect of tenofovir disoproxil fumarate on the proliferation, apoptosis, and mineralization of mouse osteoblast MC3T3E1 cells

CHEN Zongfeng¹, ZHAO Rugang², ZHANG Qiang², CHENG Jun³, ZHU Chunxiao¹, LIU Kun¹, WANG Jingjing⁴

1. Department of Postgraduate, Taishan Medical University, Taian 271016

2. Department of Orthopedics, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015

3. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015

4. Weifang Medical College, Weifang 261042, China

Corresponding author: ZHANG Qiang, Email: zhangqwte@sina.com

Abstract: Objective To investigate the effect of tenofovir disoproxil fumarate (TDF) on proliferation, apoptosis, and mineralization of mouse MC3T3-E1 cells. **Methods** MC3T3-E1 cells were cultured in vitro. The cells were divided into normal control group, DMSO control group, and TDF treatment groups (50 nM, 500 nM, 5000 nM, 50000 nM, 250000 nM, or 500000 nM, respectively). After 24 and 48 hours, the growth inhibitory rate and apoptosis rate were examined using CCK8 kit and ANNEXIN V/7AAD kit, respectively. Calcium nodule was examined using Alizarin red staining. **Results** The effect of TDF on the proliferation, apoptosis, and mineralization of MC3T3-E1 cells were dose and time-dependent. Low dose of TDF was not effective on the proliferation and apoptosis, but high dose of TDF inhibited the proliferation, promoted apoptosis, and inhibited calcium nodule formation. **Conclusion** TDF at blood concentration of 500nM is not effective on the proliferation and apoptosis of MC3T3-E1 cells, but it inhibits mineralization, resulting in TDF-related bone loss and osteoporosis.

Key words: Tenofovir disoproxil fumarate; Osteoblast; Apoptosis; Proliferation; Mineralization

*通讯作者: 张强, Email: zhangqwte@sina.com

富马酸替诺福韦酯 (Tenofovir Disoproxil Fumarate, TDF), 分子量为 635.5149, 有效成分为替

诺福韦 (tenofovir), 是一种核苷类逆转录酶抑制剂, 自 2001 年美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA, USA) 批准应用, 目前广泛应用于人类免疫缺陷病毒 (HIV, human immunodeficiency virus) 感染、慢性乙肝等抗病毒治疗。核苷类逆转录酶抑制剂作用于 RNA 逆转录酶, 阻止核糖核酸病毒的遗传物质 RNA 逆转录成 cDNA, 进而阻止病毒复制。

替诺福韦在临床上取得良好效果, 伴随而来的是其各种副作用的发生, 例如骨量降低、骨质疏松症^[1]、低磷酸盐血症性软骨病^[2]、范可尼综合征^[3,4]。已经证实, 经过抗逆转录病毒治疗 (antiretroviral therapy, ART) 后, 含 TDF 治疗方案比其他核苷类逆转录酶抑制剂的骨质丢失率高 1%~2%^[5-9]。目前, 为减少 TDF 相关性骨质丢失的并发症, 相关替代药物 (如马拉韦罗, Maraviroc, MVC^[10], 辉瑞公司生产的一种新的抗艾药) 也在研发中。已报道, 另一个并发症是肾毒性, 应用 TDF 的患者肾毒性高达 22-53%, 包括近端小管功能不全、范可尼综合征、肾衰^[11,12]。近端肾小管功能异常导致尿磷酸盐丢失或者肾 1, α -二羟维生素 D₃ 丢失, 伴随骨软化已报道, 在含 TDF 治疗组达 1.6%~22%^[13]。

正常骨代谢处于动态平衡, 是以成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收为基础。来源于间充质干细胞的成骨细胞, 在人体内合成胶原蛋白和糖蛋白形成类骨质^[14]。成骨细胞功能变化, 可以导致骨丢失, 或者骨量减少, 或者骨质疏松症。

基于临床中观察到的替诺福韦酯相关性骨质丢失, 我们旨在探索替诺福韦酯相关性骨质丢失的可能机制。在本研究中, 我们探索替诺福韦酯是否能影响成骨细胞的生物学特征及矿化形成, 进一步影响成骨细胞的功能和骨形成。为此我们选择成骨细胞前体细胞, 暴露于含不同浓度的培养基中, 收集细胞, 检测细胞增殖、凋亡及矿化的变化。已经有研究显示替诺福韦酯可以导致成骨细胞基因表达紊乱, 这些基因涉及到成骨细胞功能, 进而导致骨密度降低^[15]。我们的研究第一次探索了 TDF 对 MC3T3-E1 细胞凋亡及矿化的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞株以及主要试剂和仪器

小鼠胚胎前体成骨样细胞 MC3TC-E1 (购于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,

Chinese academy of medical sciences, institute of basic medical basic medical cell resource center), 富马酸替诺福韦二吡呋酯药物 (Tenofovir Disoproxil Fumarate, 正大天晴公司提供, 批号: 1505041102, 含量: 99.5%, 水分: 0.3%), MEM- α 培养基 (Gibco 公司), 新生胎牛血清 (Gibco 公司), CCK8 试剂 (Dojindo, CK04)、Vitamin C (SIGMA 公司)、 β -甘油磷酸钠 (SIGMA 公司)、100 $\times$ 青-链霉素溶液 (吉诺生物医药技术有限公司)、DMSO (美国 AMRESCO 公司)、PBS (Gibco 公司, 4.775 g/500 ml)、酶标仪 (BIO-RAD Model 680 型)、超低温保存箱 (SANYO)、流式细胞仪 (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter)、CO₂ 温箱 (SANYO)、低速离心机 (法国捷安公司), 以及实验室其他常用设备。

配制浓度为 0.5 mmol/ml 的 TDF 母液: 称取 0.318 g TDF, 溶于 1 ml DMSO, 充分振荡混匀, -20 $^{\circ}$ C 储存储备用。按照实验所需浓度, 用普通培养基稀释到相应浓度。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养、传代、冻存: 将新鲜购置 MC3T3-E1 细胞, 置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养, 普通培养液含 90% MEM- α 基础培养基、10% 的胎牛血清、100 μ g/ml 双抗 (青霉素-链霉素)。诱导培养液在普通培养液基础上含 10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/L Vitamin C。每 2~3 天换液 1 次, 细胞密度长至 80%~90% 传代, 并冻存部分第一、二、三代以备用。

1.2.2 细胞增殖情况检测: CCK8 比色法。96 孔板接种细胞, 每孔 100 μ L, 每孔细胞数 4800 个细胞。铺板 24 小时后, 观察细胞是否贴壁, 贴壁后, 更换含不同浓度 TDF (50 nM、500 nM、5000 nM、50000 nM、250000 nM、500000 nM) 的普通培养液。共分 8 组, 即空白对照组、不同浓度 TDF 处理组、DMSO 处理组。分别干预 1 d、3 d、5 d、7 d 后, 用 PBS 洗一遍, 加入 CCK8 (5 mg/mL), 每孔 20 μ L, 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 1.5 h, 570 nm 波长酶标仪测定各孔吸光度值 (OD 值)。

1.2.3 细胞凋亡检测: 6 孔板中接种细胞, 每孔 2 ml, 每孔细胞数 1.5×10^5 个。24h 细胞贴壁后, 更换含不同浓度 TDF (50 nM、500 nM、5000 nM、50000 nM、250000 nM、500000 nM) 的诱导培养液, 分别于 24 h、48 h 后, 胰酶消化收集细胞, PBS、cell staining buffer 各洗一遍, 100 μ L cell staining buffer 重悬细胞, Annexin V 2 μ L/样, 室温染色 15 min, 上机检测前

7AAD 染色, 2ul/样, 流式细胞仪检测 TDF 对细胞凋亡的影响。

1.2.4 细胞钙化程度检测: 茜红素染色法。6 孔板接种细胞, 每孔 2 ml, 每孔细胞数 1.5×10^5 个, 培养 24 h 后待细胞贴壁, 更换含不同浓度 TDF (50 nM、500 nM、50000 nM) 的诱导培养基, 每 2 天换液。于第 14 天以 70% 乙醇固定细胞 1 h, 以双蒸水洗 3 次后, 茜红素溶液染色 30 min。染色后以双蒸水洗 3 遍后, 观察并拍照。

1.3 统计学处理

实验所得数据用均数 $\pm$ 标准差表示。SPSS13.0 统计软件分析数据, 进行单因素方差分析, 各实验组间比较采用 Student-Newman-Keuls (SNK) 检测, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P > 0.05$ 表示无统计学差异。

2 结果

2.1 TDF 对 MC3T3-E1 增殖的影响

本研究结果显示, 与 DMSO 对照组相比, TDF 干扰 24 h 时, 50 nM、500 nM、5000 nM 浓度对 MC3T3-E1 细胞增殖无抑制 ($P > 0.05$), 而 48 h 时, 50 nM、500 nM 对 MC3T3-E1 细胞增殖无抑制 ($P > 0.05$), 余各浓度的 TDF 均抑制 MC3T3-E1 细胞增殖。结果表明, 不同浓度的 TDF 对 MC3T3-E1 细胞增殖抑制差异较大, 而在临床血药浓度 (约 500 nM) 下对 MC3T3-E1 细胞增殖无抑制 ($P > 0.05$)。

2.2 TDF 对 MC3T3-E1 细胞凋亡率的影响

本实验结果显示, 与 DMSO 对照组相比, TDF 浓度为 250000 nM 和 500000 nM 时, 干扰 48 h, MC3T3-E1 细胞凋亡率明显增加。而在血药浓度 (约 500 nM), TDF 对 MC3T3-E1 细胞凋亡无影响。

2.6 TDF 抑制成骨细胞钙结节形成

钙沉积, 用来评估体外细胞外基质矿化的生理过程。矿化对于骨形成过程非常重要。为了探究 TDF 对骨矿化过程的作用, 我们用茜红素染色分析诱导培养基中钙结节的形成。MC3T3-E1 细胞分别用含 TDF (0 nM、50 nM、500 nM、50000 nM)、DMSO (0.1%) 的诱导培养基和非诱导培养基处理 14 d。NC 组培养基: 不含 β -甘油磷酸钠和维生素 C。结果如图 4 所示, 500 nM 和 50000 nM TDF 处理组矿化结节明显减少, 同时对照组 (含 0.1% DMSO) 和正常组 (除 5% 胎牛血清和 0.5% 双抗的培养基外, 不含 DMSO 和 TDF) 钙结节较多, 而非诱导培养基培养 14 d 后 (NC 组) 无钙结节的形成。表明 TDF 能

抑制 MC3T3-E1 钙结节的形成。

表 1 不同浓度富马酸替诺福韦酯作用下体外培养小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s$) (%) ($n = 3$)

Table 1 The growth inhibition rate of MC3T3-E1 at different concentrations of TDF ($\bar{x} \pm s$, %, $n = 3$)

浓度 (nM)	24h	48h
0	0	0
DMSO	$1.06 \pm 0.87^*$	$1.59 \pm 0.45^\circ$
50	$2.01 \pm 1.06^*$	$2.45 \pm 0.68^\circ$
500	$4.49 \pm 3.88^*$	$4.75 \pm 2.64^\circ$
5000	$10.12 \pm 3.40^{\Delta*}$	$21.38 \pm 7.19^{\Delta\circ}$
50000	$20.17 \pm 14.17^{\Delta*}$	$34.10 \pm 14.83^{\Delta\circ}$
250000	$47.05 \pm 11.85^{\Delta*}$	$85.58 \pm 5.04^{\Delta\circ}$
500000	$53.85 \pm 9.86^{\Delta*}$	$86.37 \pm 3.07^{\Delta\circ}$

注: $^\Delta$ 在相同浓度下, 不同时间点两组间抑制率有统计学意义 ($P < 0.05$); * TDF 干扰 24 h 后, 高浓度 TDF (50000 nM、250000 nM、500000 nM) 与 DMSO 对照组相比, 抑制率有统计学意义 ($P < 0.05$), 低浓度 (0 nM、50 nM、500 nM、5000 nM) 和 DMSO 对照组相比无统计学意义 (P 值分别为 0.868、0.881、0.591、0.167); $^\circ$ TDF 干扰 48 h 后, 空白组 (0 nM)、TDF 处理组 (50 nM、500 nM) 和 DMSO 对照组相比无统计学意义 (P 值分别为 0.096、0.207、0.381), 余各组与 DMSO 对照组相比, 均有统计学意义 ($P < 0.05$); $^\Delta$ At the same concentration, the rates have statistical significance between the two groups of different times (24 h and 48 h); * At 24 h, the rates of high concentration groups (50000 nM, 250000 nM, 500000 nM) are statistically significant ($P < 0.05$), compared with the DMSO control group; the rates of low concentration groups (50 nM, 500 nM, 5000 nM) and DMSO group do not have significance (P value are 0.868, 0.881, 0.591, 0.167), compared with DMSO control group; $^\circ$ At 48 h, the rates of treatment groups (0 nM, 50 nM, 500 nM), have no statistical significance (P value are 0.096, 0.207, 0.381), compared with DMSO control group; the rates of the other groups have statistical significance, compared with DMSO control group

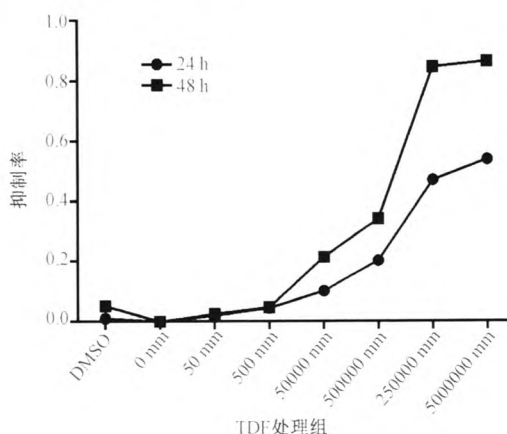


图 1 不同浓度 TDF 不同处理时间对 MC3T3-E1 细胞增殖抑制率

Fig. 1 The growth inhibition rate of MC3T3-E1 cells at different concentrations of TDF on 24 h and 48 h.

表 2 不同浓度富马酸替诺福韦酯对小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$) (%) ($n=4$)

Table 2 The apoptotic rate of MC3T3-E1 at different concentrations of TDF ($\bar{x} \pm s$, %, $n=4$)

浓度 (nM)	24 h	48 h
0	11.58 ± 5.08 [▲]	8.88 ± 3.95 [△]
DMSO	12.86 ± 2.53 [▲]	7.98 ± 2.31 [△]
50	13.72 ± 5.88 [▲]	8.33 ± 4.13 [△]
500	12.25 ± 5.63 [▲]	10.97 ± 7.15 [△]
5000	14.73 ± 4.26 [▲]	11.82 ± 6.21 [△]
50000	18.21 ± 6.98 [▲]	16.83 ± 8.59 [△]
250000	15.05 ± 14.21 ^{▲●}	35.94 ± 8.82 ^{△●}
500000	9.57 ± 2.42 ^{▲●}	48.00 ± 20.85 ^{△●}

注:●相同 TDF 浓度 (250000 nm/L、500000 nm/L), 不同时间点, 两者之间有统计学意义 ($P < 0.05$), 其余各组间无统计学意义 ($P > 0.05$);[▲]TDF 干扰 24 h 后, 不同浓度 TDF 对成骨细胞凋亡率各组间均无统计学意义;[△]TDF 干扰 48 h 后, TDF 浓度 (500000 nmol/L、250000 nmol/L) 处理组与对照组 (DMSO 处理组) 相比有统计学意义 ($P < 0.05$), 其余各组间均无统计学意义 ($P > 0.05$);[●] At different points and same TDF concentration (250000nm/L or 500000nm/L), the apoptosis rates between groups are significant ($P < 0.05$);[▲] after 24 h TDF treated, the apoptosis rates between groups have no significance;[△] after 48 h TDF treated, the apoptosis rates of 50000nm group and 250000nmol/L group have significance ($P < 0.05$), compared with DMSO group.

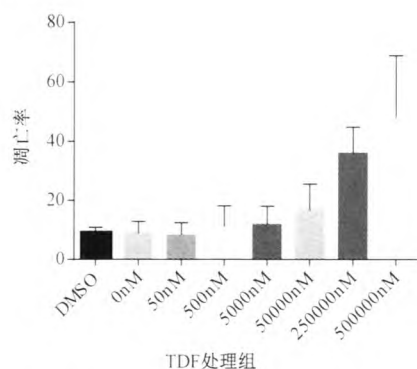


图 2 不同浓度 TDF 对细胞凋亡的影响。

Fig. 2 The effect of different concentrations of TDF on cell apoptosis

3 讨论

本研究旨在探索 TDF 对成骨细胞增殖、凋亡、钙结节形成的影响。我们选择 MC3T3-E1 作为体外模型, 探索 TDF 对 MC3T3-E1 成骨细胞的影响。

HIV 感染者中, 骨量减少及骨质疏松较普遍, 原因是多方面的。包括 HIV 病毒活动, 药物毒性, 还有宿主因素。其中药物毒性发挥重要作用, 尤其是 TDF。尽管很多临床文献报道骨代谢与 TDF 的关系, 但是涉及的病理机制并未完全阐明。

临床研究已经表明 TDF 与骨代谢密切相关。在含 TDF 抗病毒治疗方案的患者中, 将 TDF 转换成阿巴卡韦 (abacavir, ABC), 48 周时, 环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX)、胶原蛋白 I 型 (Collagen type I)、I 型前胶原氨基端肽 (Procollagen I N-terminal Peptide, P1NP) 等血清三种骨标志物的含量有意义地降低, 表明骨代谢减弱^[16], 骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 无变化, 遗憾的是此研究中核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator activator nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 在样本中未能检测到, OPG/RANKL/RANK 信号系统对调节骨代谢平衡起重要作用。持续应用包含齐多夫定 (zidovudine, AZT)/拉米夫定 (lamivudine, 3TC) 的 ART 治疗方案, 直接转换成 TDF/恩曲他滨 (emtricitabine, FTC) 方案时, 骨代谢增加、骨密度 (bone mineral density, BMD) 降低, 表明影响体内骨代谢^[17]。相同的研究指出, 低骨密度的接受抑制病毒治疗的 HIV 感染患者, 从 TDF 换成雷特格韦 (raltegravir), 48 周时, 髌骨和脊柱 BMD 升高, 骨代谢标志物 (氨基末端肽、骨钙素 (bone gla protein, BGP)、骨碱性磷酸酶 (bone specific alkaline phosphatase, BSAP)) 降低^[18]。ABC/3TC 和 TDF/FTC 联合依非韦伦 (efavirenz, EFV), 最低限度, 影响肾小球滤过率, 96 周时, TDF/FTC 组, 肾小管功能障碍 (视黄醇结合蛋白 (retinol binding protein, RBP)/肌酐比值、微球蛋白 (β -2 microglobulin, B2M)/肌酐比值) 和骨代谢标志物水平 (P1NP、CTX、BGP、BSAP) 都增加较大, 髌骨骨密度降低更多^[19]。

由 TDF 引起的肾磷和钙丢失可能与代偿性骨重吸收有关, 并改变了再生骨的矿化。此外, 由于 HIV 本身引起的炎症性细胞因子的活化, 也可引起骨密度降低^[20]。

本实验结果显示, TDF 对 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖和凋亡的影响受 TDF 浓度和干扰时间的影响, 即低浓度对增殖和凋亡无影响, 高浓度抑制增殖并促进凋亡, 并随干扰时间增加, 增殖抑制率和促凋亡率增大; TDF 抑制钙结节形成, 进而影响成骨。在血药浓度 (约 500 nM) 时, TDF 不影响 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖和凋亡, 但长时间应用 (TDF 干扰 14 天), 钙结节形成明显受到抑制。

综上所述, 我们的研究证实, 在体外, 血药浓度 (约 500 nM) TDF 对 MC3T3-E1 前成骨细胞的增殖、凋亡等生物学特性无影响, 但抑制成骨细胞矿化, 进

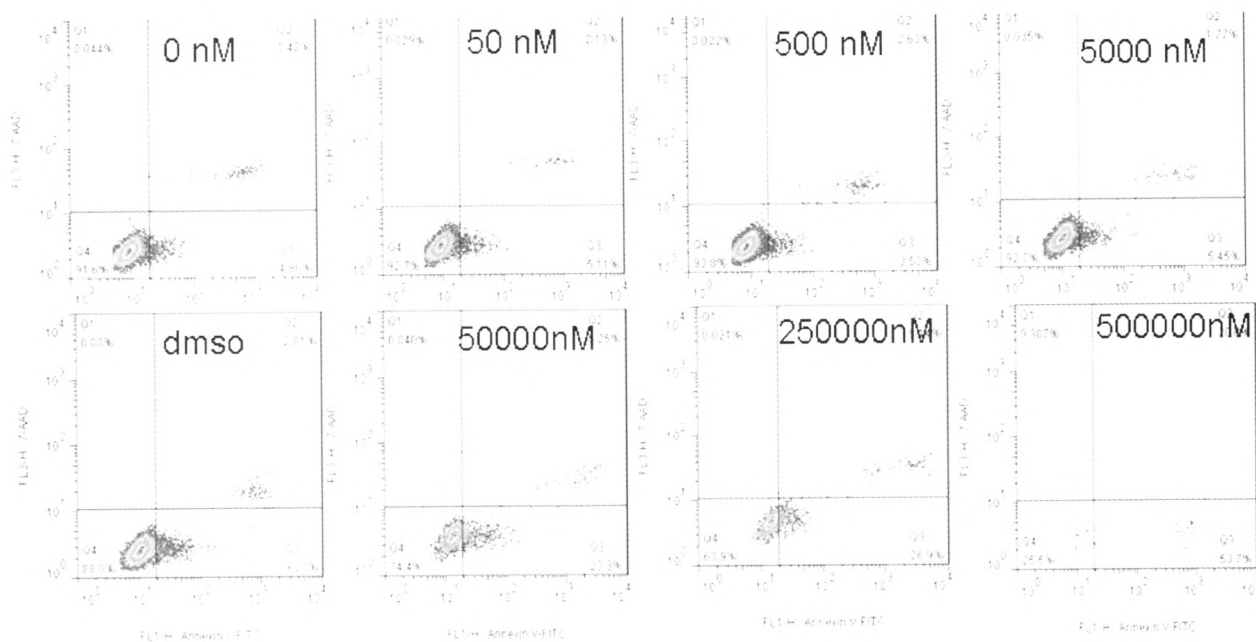


图 3 流式细胞计数检测不同浓度 TDF 对 MC3T3-E1 凋亡的影响

Fig. 3 The effect of different concentrations of TDF on cell apoptosis detected by flow cytometry

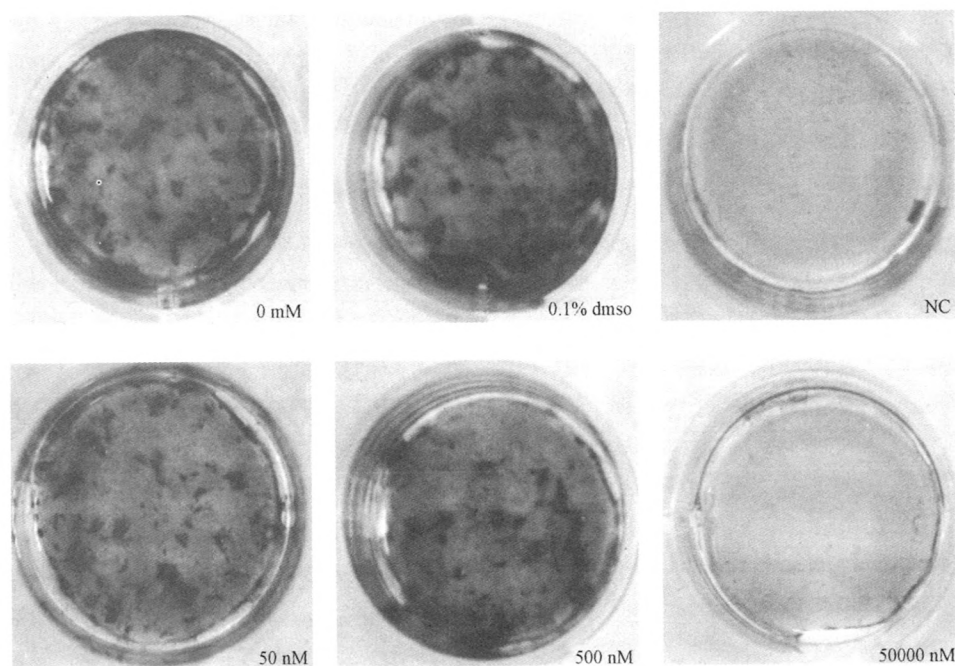


图 4 TDF 对 MC3T3-E1 细胞矿化的影响

Fig. 4 The effect of TDF on the mineralization of MC3T3-E1 cells

而影响骨形成。HIV 患者骨病的病理机制是复杂的,也可能是 HIV 病毒本身和应用抗病毒药物两者之间复杂的相互作用所导致。未来的我们的研究将更加深入地探索,HIV 病毒本身对骨代谢的作用,以及暴露于 HIV 和 TDF 两者时骨代谢的变化,来充分地阐明艾滋病骨病的关键驱动因素。

【参 考 文 献】

- [1] Gallant JE, Staszewski S, Pozniak AL, et al. Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: a 3-year randomized trial [J]. JAMA, 2004, 292:191-201.
- [2] Mateo L, Holgado S, Marinosa ML, et al. Hypophosphatemic osteomalacia induced by tenofovir in HIV-infected patients [J].

- Clin Rheumatol, 2014, DOI 10.1007/s10067-014-2627-x.
- [3] Labarga P, Barreiro P, Martin-Carbonero L, et al. Kidney tubular abnormalities in the absence of impaired glomerular function in HIV patients treated with tenofovir. *AIDS*, 2009, 23 (6):689-696.
- [4] Kinai E, Hanabusa H. Progressive renal tubular dysfunction associated with long-term use of tenofovir DF [J]. *AIDS Res Hum Retrovir*, 2009, 25(4):387-394.
- [5] McComsey GA, Kitch D, Daar E, et al. Bone mineral density and fractures in antiretroviral-naïve persons randomized to receive abacavir lamivudine or tenofovir disoproxil fumarate-emtricitabine along with efavirenz or atazanavir-ritonavir: AIDS Clinical Trials Group A5224s, a substudy of ACTG A5202 [J]. *J Infect Dis*, 2011, 203:1791-801.
- [6] Stellbrink HJ, Orkin C, Arribas JR, et al. Comparison of changes in bone density and turnover with abacavir-lamivudine versus tenofovir-emtricitabine in HIV-infected adults: 48-week results from the ASSERT study [J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 51: 963-72.
- [7] Gallant JE, Staszewski S, Pozniak AL, et al. 903 Study Group. Efficacy and safety of tenofovir DF vs. stavudine in combination therapy in antiretroviral-treatment naïve patients: a 3-year randomized trial [J]. *JAMA*, 2004, 292:191-201.
- [8] Moyle GJ, Stellbrink HJ, Compston J, et al. 96-week results of abacavir/lamivudine versus tenofovir/emtricitabine, plus efavirenz, in antiretroviral-naïve, HIV-1-infected adults: ASSERT study [J]. *Antivir Ther*, 2013, 18:905-13.
- [9] Huang JS, Hughes MD, Riddler SA, et al. Bone mineral density effects of randomized regimen and nucleoside reverse transcriptase inhibitor selection from ACTG A5142 [J]. *J Infect Dis*, 2011, 203:1791-801.
- [10] Taiwo BO, Chan ES, Fichtenbaum CJ, et al. Less Bone Loss With Maraviroc- Versus Tenofovir-Containing Antiretroviral Therapy in the AIDS Clinical Trials Group A5303 Study [J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 61(7):1179-88.
- [11] Hall AM. Update on tenofovir toxicity in the kidney [J]. *Pediatr Nephrol*, 2013, 28(7):1011-1123.
- [12] Woodward CL, Hall AM, Williams IG, et al. Tenofovir-associated renal and bone toxicity [J]. *HIV Med*, 2009, 10 (8):482-487.
- [13] Wanner DP, Tyndall A, Walker UA. Tenofovir-induced osteomalacia [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2009, 27:1001-1003.
- [14] Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, et al. Aquadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse [J]. *Bone Miner. Res*, 1999, 14: 700-709.
- [15] Grigsby IF, Pham L, Mansky LM, et al. Tenofovir treatment of primary osteoblasts alters gene expression profiles: implications for bone mineral density loss [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(1):48-53.
- [16] Negro E, Diez-Perez, Bonjoch A, et al. Switching from tenofovir to abacavir in HIV-1-infected patients with low bone mineral density: changes in bone turnover markers and circulating sclerostin levels [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(7), 2104-2107.
- [17] Cotter AG, Vroenenraets SM, Brady JJ, et al. Impact of Switching From Zidovudine to Tenofovir Disoproxil Fumarate on Bone Mineral Density and Markers of Bone Metabolism in Virologically Suppressed HIV-1 Infected Patients; A Substudy of the PREPARE Study [J]. *J Clin Endocrin Metab*, 2013, 98(4): 1659-66.
- [18] Bloch M, Tong WW, Hoy J, et al. Switch from tenofovir to raltegravir increases low bone mineral density and decreases markers of bone turnover over 48 weeks [J]. *HIV Med*, 2014, 15(6): 373-380.
- [19] Moyle GJ, Stellbrink HJ, Compston J, et al. 96-Week results of abacavir/lamivudine versus tenofovir/emtricitabine, plus efavirenz, in antiretroviral-naïve, HIV-1-infected adults: ASSERT study [J]. *Antivir Ther*, 2013, 18(7): 905-913.
- [20] Brown TT, Qaqish RB. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review [J]. *AIDS*, 2006, 20(17):2165-2174.

(收稿日期: 2015-11-16)