

# XCT-790 对沉默 DKK1、Sost 腺病毒载体转染 MG63 细胞中 OPG、CTGF、FGF2、TNF $\alpha$ 的影响研究

李钊政<sup>1</sup> 万雷<sup>2\*</sup> 乔荣勤<sup>2</sup> 彭鹏豪<sup>1</sup> 肖本浩<sup>1</sup> 刘少津<sup>1</sup>

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学附属骨伤科医院骨科, 广东 广州 510240

中图分类号: R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017)07-0841-05

**摘要:** 目的 研究 ERR $\alpha$  抑制剂(XCT-790)对沉默 Wnt 信号通路抑制因子 Dickkopf1 (DKK1)、骨硬化蛋白 Sclerostin (Sost) 重组腺病毒载体转染 MG63 细胞中 OPG、CTGF、FGF2、TNF $\alpha$  的影响。方法 本实验将培养好的 MG63 细胞分为空白对照组、沉默 DKK1 组、沉默 Sost 组、沉默(DKK1 + Sost)组、XCT-790 处理空载腺病毒组、XCT-790 处理沉默 DKK1 组、XCT-790 处理沉默 Sost 组、XCT-790 处理沉默(DKK1 + Sost)组,根据组别不同分别用包装好的沉默 DKK1、Sost 腺病毒载体转染 MG63 细胞,应用 Western blot 检测 MG63 细胞中 OPG、CTGF、FGF2、TNF $\alpha$  蛋白的表达量。结果 (1)与空白对照组对比,沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 可以提高 OPG、CTGF、FGF2 表达量( $P < 0.05$ ),降低 TNF $\alpha$  表达量( $P < 0.05$ );XCT-790 干预 MG63 细胞可降低 OPG、CTGF、FGF2 表达量( $P < 0.05$ ),增加 TNF $\alpha$  表达量( $P < 0.05$ );(2)与沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 组比较,XCT-790 处理沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 组可降低因沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 而增加 OPG、CTGF、FGF2 的表达量的作用( $P < 0.05$ ),增加因沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 而降低 TNF $\alpha$  的表达量( $P < 0.05$ )。结论 XCT-790 可以降低 MG63 细胞中 OPG、CTGF、FGF2 表达量,升高 TNF $\alpha$  表达量;还可以调节因沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 而改变的 MG63 细胞中 OPG、CTGF、FGF2 及 TNF $\alpha$  的表达量。

**关键词:** XCT-790; Dickkopf1; Sost; MG63 细胞

## Effect of XCT-790 on OPG, CTGF, FGF2, TNF $\alpha$ in silencing DKK1 and sost adenovirus vector-transfected MG63 cell

LI Zhaozheng<sup>1</sup>, WAN Lei<sup>2\*</sup>, QIAO Rongqin<sup>2</sup>, PENG Penghao<sup>1</sup>, XIAO Benhao<sup>1</sup>, LIU Shaojin<sup>1</sup>

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405

2. The Affiliated Orthopedics and Trauma Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510240, China

Corresponding author: WAN Lei, Email: wanlei802@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of ERR $\alpha$  inhibitor (XCT-790) on silencing Dickkopf1 (DKK1), sclerostin (Sost) recombinant adenovirus vector, and the related proteins OPG, CTGF, FGF2, and TNF $\alpha$  in the transfection MG63 cells. **Methods** MG63 cells were divided into control group, silence DKK1 group, silence Sost group, silence (DKK1 + Sost) group, XCT-790 dispose no-load adenovirus group, XCT-790 dispose silence DKK1 group, XCT-790 dispose silence Sost group, and XCT-790 dispose silence (DKK1 + Sost) group. The silencing DKK1 or Sost recombinant adenovirus vector was transfected to MG63 cells, respectively. The expression levels of related proteins OPG, CTGF, FGF2, and TNF $\alpha$  were detected with Western blotting in MG63 cells. **Results** (1) Compared with control group, the expression levels of OPG, CTGF, FGF2 increased in silence DKK1, Sost, and DKK1 + Sost group ( $P < 0.05$ ), while the expression level of TNF $\alpha$  decreased ( $P < 0.05$ ). The expression levels of OPG, CTGF, and FGF2 decreased ( $P < 0.05$ ), while TNF $\alpha$  increased ( $P < 0.05$ ), when XCT-790 intervened MG63 cells. (2) Compared with silence DKK1, Sost, and DKK1 + Sost group, the increased expression levels of OPG, CTGF, FGF2 were impaired ( $P < 0.05$ ) and the decreased expression level of TNF $\alpha$  increased ( $P < 0.05$ ) in XCT-790 dispose silence

基金项目: 国家自然科学基金(81302991, 81673786); 广东省自然科学基金(S2013040016828, 2014A030310127); 广东省科技计划项目(2013B021800058); 广州中医药大学青年英才项目(QNYC20120119); 2014 广东省“优青计划”项目(yq2014041)

\* 通讯作者: 万雷, Email: wanlei802@163.com

DKK1, Sost, and DKK1 + Sost groups. **Conclusion** XCT-790 decreases the expression levels of OPG, CTGF, and FGF2, increases the expression level of TNF $\alpha$ . It also regulates the changed expression levels of OPG, CTGF, FGF2, and TNF $\alpha$  in silencing DKK1, Sost, and DKK1 + Sost MG63 cells.

**Key words:** XCT-790; Dickkopf1; Sost; MG63 cell

骨质疏松症是困扰老年人身体健康的一大疾病,亦是世界性前沿研究难题。Wnt 信号通路是与骨代谢相关的一个重要胞内信号传导通路, DKK1 和 Sost 是 Wnt 信号通路的负调控因子,在骨形成过程中起重要作用,被视为骨相关疾病如骨质疏松、骨修复的治疗靶点<sup>[1]</sup>。近年来,有研究表明雌激素受体相关受体  $\alpha$  (estrogen receptor-related receptor alpha, ERR $\alpha$ ) 与骨代谢的调节密切相关<sup>[2]</sup>。Auld 等<sup>[3]</sup>发现, ERR $\alpha$  通过抑制 Wnt 信号靶基因表达来调控成骨细胞分化,当成骨细胞中 ERR $\alpha$  基因沉默后,可促进 Wnt 通路转导。而 XCT-790 是 ERR $\alpha$  的特异性抑制剂<sup>[4]</sup>,可以显著降低成骨细胞的增殖能力和矿化能力<sup>[5]</sup>。本实验采用沉默 DKK1、Sost 腺病毒载体转染 MG63 细胞,并用 ERR $\alpha$  抑制剂 (XCT-790) 干预转染的 MG63 细胞,应用 Western blot 检测 MG63 细胞中骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、成纤维生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) 蛋白的表达量,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

人成骨肉瘤细胞 (MG63) 由中国科学院上海细胞所细胞库提供, DMEM 培养基、胎牛血清、Pen/Strep 和 Opti-MEM 培养基均购自美国 Gibco 公司; ERR $\alpha$  抑制剂 (XCT-790) 购自于 Sigma 公司; 逆转录试剂盒、Lipofectamine 2000, TRIzol Reagent、Taq DNA 聚合酶、荧光定量 PCR 试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收/纯化试剂盒购自北京天根生物有限公司; DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京鼎国生物有限公司; BJ5183 感受态细胞购自上海杰美基因公司; T4DNA 连接酶、Kpn I、Xho I、Pme I、Pac I 限制性内切酶购自美国 NEB 公司; 抗 Wnt 信号通路抑制因子 DKK1 抗体购自美国 CST 公司; 抗骨硬化蛋白 (Sost) 抗体购自美国 Abcam 公司; 抗结缔组织生长因子 (CTGF) 抗体、抗碱性成纤维细胞生长因子 (FGF2) 抗体购自美国 Santa 公司; 抗人成骨细胞内骨保护素 (OPG) 抗体、抗肿瘤坏死

因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 抗体购自美国 abcam 公司; 蛋白 Marker 购自美国 Fermentasa 公司; 蛋白酶抑制剂/磷酸化抑制剂、ECL 发光液购自德国 Merck 公司; RIPA 细胞裂解液、Triton 100、EGTA、MTT 购自美国 Sigma 公司; Calcium Orange<sup>TM</sup> Indicators 购自美国 Molecular Probes 公司。细胞培养箱 (DHP-9052, 中国上海一恒)、超净工作台 (SWCJ-1FD, 中国江苏苏净)、高速低温离心机 (H1650-W/H1650W, 中国湘仪)、普通 PCR 仪 (TC-S, 中国博日)、荧光定量 PCR 仪 (ABI7500, 美国 Thermo)、倒置荧光显微镜 (IX73, 美国 OLYMPUS)。电泳仪 (Mini-PROTEAN Tetra, 美国 Bio-Rad)、蛋白转印仪 (Mini Trans-Blot, 美国 Bio-Rad)、凝胶成像系统 (ChemiDoc MP, 美国 Bio-Rad)、微量核酸定量仪 (Nanodrop-2000, 美国 Thermo)。

### 1.2 方法

**1.2.1 MG63 细胞培养:** 收集对数期 MG63 细胞, 制成细胞悬液, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  cells/mL。6 孔板中每孔加入 2 mL 细胞悬液, 置于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养。培养 24 h 后, 用沉默重组腺病毒颗粒转染 MG63 细胞 (MOI = 50)。

**1.2.2 目的基因沉默重组腺病毒载体的构建<sup>[6]</sup>:** 在 NCBI 数据库查询参考核苷酸序列 DKK1 (801bp)、Sost (642bp), 采用 Primer 5.0 设计 PCR 引物, 设计出特异性针对 DKK1、Sost 的序列和无关对照序列 (Scr), 并在两端分别加入 Age I、EcoR I 酶切位点。将连接产物转化到感受态的 DH5 $\alpha$  细胞, 用质粒小提试剂盒提取转化到 DH5 $\alpha$  细胞重组质粒, 对提取的重组质粒进行测序鉴定, 提取测序正确的腺病毒, 经培养提取无内毒素质粒, 再经过筛选及病毒包装, 成功构建沉默 DKK1、Sost 腺病毒载体。

**1.2.3 XCT-790 处理沉默 DKK1、Sost 腺病毒载体转染的 MG63 细胞:** 100  $\mu$ M XCT-790 溶于 838  $\mu$ L DMSO 中配制成储存液。临用时, 以 XCT-790 储存液: 含 10% FBS DMEM 高糖培养基 = 1:1 000 的比例稀释 XCT-790, 即配制成含 100  $\mu$ M XCT-790 的 DMEM 高糖培养基 (DMSO 终浓度为 0.1%), 分别处理空载腺病毒组和 DKK1、Sost 沉默腺病毒载体转染组, 培养 24 h。

**1.2.4 细胞总蛋白的提取及浓度测定:** 消化收集细

胞,1000 rpm 离心 5 min,尽可能弃尽上清。预冷 PBS 洗涤细胞沉淀两次,向细胞沉淀中加入 20 μL RIPA(含有 0.2 μL PMSF)裂解液,置于冰上裂解细胞 30 min,期间用枪头吹打使细胞充分裂解。在 4 °C,12 000 rpm 离心 30 min,小心转移上清到新的预冷的 EP 管中,-20 °C 保存备用。900 μL Bradford 加入 1 μL 待测蛋白和 99 μL 0.9% 生理盐水,混匀后在 595 nm 处检测吸光度,根据标准品做出的标准曲线上计算出各样本蛋白浓度。

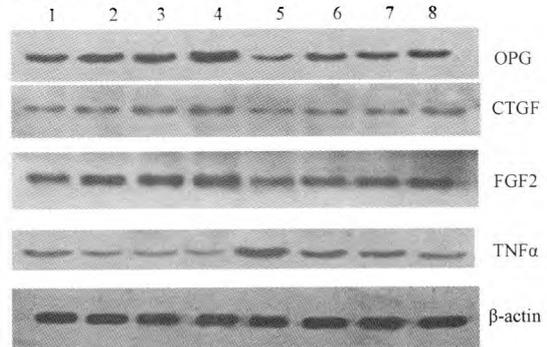
**1.2.5 OPG、CTGF、FGF2、TNFα 蛋白的检测:**MG63 细胞转染重组腺病毒 48 h 后,分为空白对照组、沉默 DKK1 组、沉默 Sost 组、沉默 DKK1、Sost 组、XCT-790 处理空载腺病毒组、XCT-790 处理沉默 DKK1 组、XCT-790 处理沉默 Sost 组、XCT-790 处理沉默 DKK1、Sost 组 8 组,弃旧培养基,消化收集细胞,提取细胞总蛋白,并测定蛋白浓度,上样、电泳、转膜、免疫反应,化学发光显色后进行图像分析。

**1.3 统计学处理**

实验数据采用 SPSS 18.0 统计学软件进行处理,运用 One-Way ANOVA 及 LSD 检验,数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组的 MG63 细胞中 (OPG、CTGF、FGF2、TNFα) 蛋白灰度分析 (图 1)**



**图 1** 各组 MG63 细胞中 (OPG、CTGF、FGF2、TNFα) 灰度分析情况 (凝胶电泳法)

**Fig. 1** Analysis of gray area of OPG, CTGF, FGF2, and TNFα in each MG63 cell group (The gel electrophoresis)  
注:1:空白对照组,2:沉默 DKK1 组,3:沉默 Sost 组,4:沉默 (DKK1 + Sost) 组,5:XCT-790 处理空载腺病毒组,6:XCT-790 处理沉默 DKK1 组,7:XCT-790 处理沉默 Sost 组,8:XCT-790 处理沉默 (DKK1 + Sost) 组。

**2.2 各组 MG63 细胞中 (OPG、CTGF、FGF2、TNFα) 蛋白表达情况 (表 1)**

**表 1** 各组 MG63 细胞中 (OPG、CTGF、FGF2、TNFα) 蛋白表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )  
**Table 1** Expression of OPG, CTGF, FGF2, TNFα in each MG63 cell group ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                         | n | OPG                      | CTGF                     | FGF2                     | TNFα                     |
|----------------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白对照组                      | 3 | 1.00 ± 0.01              | 1.00 ± 0.07              | 1.00 ± 0.03              | 1.00 ± 0.02              |
| 沉默 DKK1 组                  | 3 | 1.43 ± 0.03*             | 1.26 ± 0.05*             | 1.32 ± 0.03*             | 0.87 ± 0.04*             |
| 沉默 Sost 组                  | 3 | 1.44 ± 0.02*             | 1.68 ± 0.07*             | 1.49 ± 0.12*             | 0.72 ± 0.04*             |
| 沉默 (DKK1、Sost) 组           | 3 | 1.88 ± 0.02*             | 1.99 ± 0.07*             | 1.74 ± 0.02*             | 0.47 ± 0.00*             |
| XCT-790 处理空载腺病毒组           | 3 | 0.67 ± 0.01*             | 0.57 ± 0.04*             | 0.77 ± 0.01*             | 1.93 ± 0.00*             |
| XCT-790 处理沉默 DKK1 组        | 3 | 0.92 ± 0.03#             | 0.82 ± 0.05#             | 0.96 ± 0.04#             | 1.22 ± 0.06#             |
| XCT-790 处理沉默 Sost 组        | 3 | 1.05 ± 0.01 <sup>Δ</sup> | 1.14 ± 0.07 <sup>Δ</sup> | 1.11 ± 0.02 <sup>Δ</sup> | 1.00 ± 0.02 <sup>Δ</sup> |
| XCT-790 处理沉默 (DKK1、Sost) 组 | 3 | 1.3 ± 0.03 <sup>▲</sup>  | 1.62 ± 0.06 <sup>▲</sup> | 1.56 ± 0.03 <sup>▲</sup> | 0.95 ± 0.03 <sup>▲</sup> |

注:与空白对照组比较,\*  $P < 0.05$ ;与沉默 DKK1 组比较,#  $P < 0.05$ ;与沉默 Sost 组比较,<sup>Δ</sup>  $P < 0.05$ ;与沉默 (DKK1 + Sost) 组比较,<sup>▲</sup>  $P < 0.05$ 。

图 1、表 1 结果显示:(1)与空白对照组对比,沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 可以提高 OPG、CTGF、FGF2 表达量 ( $P < 0.05$ ),降低 TNFα 表达量,组间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );XCT-790 干预 MG63 细胞可降低 OPG、CTGF、FGF2 表达量 ( $P < 0.05$ ),增加 TNFα 表达量,组间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。(2)与沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 组相比较,XCT-790 处理沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 组可降低因沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 而增加的 OPG、CTGF、FGF2 表达量,增加因沉

默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 而降低的 TNFα 表达量,组间比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**3 讨论**

近年来,国内外不少研究表明 Wnt/β-catenin 信号通路在骨代谢过程中具有重要意义,是研究骨质疏松症治疗的新热点。其组成主要包括细胞外因子 (Wnt)、跨膜受体 (frizzled)、胞质蛋白 (β-catenin) 及核内转录因子等一系列蛋白。Wnt 信号刺激成骨细胞增殖,促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,促

进转录因子 Osterix1 (Osx1) 向成骨细胞表达<sup>[7]</sup>。DKK1 和 Sost 蛋白为 Wnt 信号通路的细胞外拮抗剂,与骨形成的调控密切相关。DKK1 直接与低密度脂蛋白受体相关蛋白 (low density lipoprotein receptor related protein, LRP) 受体结合,或者与其跨膜受体 Kremen (Kremen-1、Kremen-2) 结合后再与 LRP5/6 结合形成三聚体,诱导快速的细胞内吞,减少细胞膜上的 LRP5/6,由此阻断了 Wnt 信号向胞内的传递,使骨形成减少<sup>[8]</sup>。Sost 能竞争性结合 Wnt 信号通路中的共受体 LRP5 来抑制该信号通路,从而引起骨形成障碍<sup>[9]</sup>。雌激素受体相关受体  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) 是最早发现的一种孤儿核受体,是核受体超家族中的一员。有研究表明,ERR $\alpha$  表达于成骨细胞分化的所有阶段,用反义寡核苷酸阻断 ERR $\alpha$  降低了大鼠 RC 细胞增殖期的细胞数目,之后又抑制了骨结节形成<sup>[10]</sup>。然而,Delhon 等<sup>[11]</sup>发现,ERR $\alpha$  敲除小鼠股骨松质骨骨体积和密度增加,体外培养成骨细胞和骨髓间充质干细胞沉默 ERR $\alpha$  后发现细胞增殖与骨向分化能力增强。OPG 属分泌型糖蛋白,是一种可溶性肿瘤坏死因子受体,在体内以单体和同源二聚体两种形式存在。其主要功能是抑制破骨细胞的分化,抑制成熟破骨细胞的骨吸收活性并诱导其凋亡。在体外,1~40 ng/mL (ED<sub>50</sub> = 4~6 ng) 的 OPG 可抑制破骨细胞生成,在超过 11 d 的细胞培养时间中,有效作用时间范围是第 5~11 d<sup>[12]</sup>。CTGF 是一种新发现可刺激成纤维细胞增殖和胶原沉积生长因子,亦是高度保守 CCN (CTGF、Cef10/cyr61 和 Nov 缩写) 多肽家族中成员。有研究表明,CTGF 可抑制成骨细胞核因子 Kappa B 配体受体 (RANKL) 的表达,提示 CTGF 可通过抑制成骨细胞 RANKL 的表达,可能具有间接抑制成熟破骨细胞活化的作用<sup>[13]</sup>。FGF2 是膜内成骨和软骨化成骨的主要调节因子,在成骨细胞中,FGF2 激活多种信号通路包括胞外信号调节激酶 (ERK) 途径和蛋白激酶 C (PKC) 途径,进而影响成骨细胞的转录,被认为是成骨样细胞的靶基因<sup>[14]</sup>。TNF $\alpha$  是 17kDa 的细胞因子,可由破骨细胞样细胞及成骨细胞合成,是十分重要的破骨细胞激活因子,亦是一种强有力的骨吸收诱导剂,可使破骨细胞活性增强。有报道表明,基质内所含的破骨和成骨类细胞以及髓腔间充质类细胞均可以通过自分泌或者旁分泌方式获得细胞因子,并参与机体骨代谢调节<sup>[15-16]</sup>。由此可知,OPG、CTGF、FGF2、TNF $\alpha$  蛋白的表达量与成骨细胞的增殖分化关系密切。

本实验研究中采用沉默 DKK1、Sost 腺病毒载体转染 MG63 细胞,并使用 XCT-790 干预,进一步研究不同组别 MG63 细胞中 OPG、CTGF、FGF2、TNF $\alpha$  蛋白在不同干预情况下的表达量。实验结果表明,沉默 DKK1、Sost、DKK1 + Sost 可以提高在 MG63 细胞中 OPG、CTGF、FGF2 蛋白的表达量,降低 TNF $\alpha$  蛋白的表达量,尤以 DKK1、Sost 二者同时沉默时影响最大,其作用机制可能是 DKK1、Sost 沉默后,Wnt 信号通路被激活,刺激成骨细胞 MG63 增殖活化,促进成骨细胞形成,引起 OPG、CTGF、FGF2、TNF $\alpha$  蛋白的变化。而使用 XCT-790 干预后,XCT-790 可通过抑制 ERR $\alpha$  的表达和竞争 Wnt 信号通路的靶基因,从而降低 Wnt 信号通路的活性,影响成骨细胞 MG63 的形成和增殖,引起 OPG、CTGF、FGF2、TNF $\alpha$  蛋白的变化,这与杨冰等<sup>[5]</sup>的研究结果一致。本实验结果支持 ERR $\alpha$  促进成骨细胞分化与增殖,其抑制剂 XCT-790 能降低成骨细胞活性的假说。而 ERR $\alpha$  与 Wnt 信号通路之间是竞争拮抗关系,抑或是协同关系,本实验结果证实二者有协同作用。Delhon 等<sup>[11]</sup>认为 ERR $\alpha$  抑制成骨细胞分化与增殖,杨冰等<sup>[5]</sup>研究表明 ERR $\alpha$  促进成骨细胞分化与增殖,ERR $\alpha$  在成骨细胞中的研究结果不一致的原因可能有 3 个方面:①动物成骨细胞与人成骨细胞非同一种属,故而实验结果存在分歧,本实验为人成骨细胞实验;②ERR $\alpha$  抑制剂 XCT-790 干预的时间不一致;③实验条件和环境等方面不一致。

此外,本实验中 XCT-790 是通过影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路还是独立发挥作用,ERR $\alpha$  与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路之间的具体联系如何,仍需要进一步的研究和探讨。

#### 【参 考 文 献】

- [1] Ke HZ, Richards WG, Li X, et al. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases. *Endocrine Reviews*, 2012, 33(5):747-783.
- [2] Villena JA, Kralli A. ERR $\alpha$ : a metabolic function for the oldest orphan. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2008, 19(8):269-276.
- [3] Auld KL, Berasi SP, Liu Y, et al. Estrogen-related receptor  $\alpha$  regulates osteoblast differentiation via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2012, 48(2):177-91.
- [4] Lanvin O, Bianco S, Kersual N, et al. Potentiation of ICI182,780 (Fulvestrant)-induced estrogen receptor- $\alpha$  degradation by the estrogen receptor-related receptor- $\alpha$  inverse agonist XCT790. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(39):28328-28334.
- [5] 杨冰,谭彤燕,梁笃,等. 雌激素相关受体  $\alpha$  特异性抑制剂

- XCT-790 对成骨细胞株 MG-63 增殖分化的影响. 广州中医药大学学报, 2011, 28(1):43-45.
- Yang B, Tan TY, Liang D, et al. Effect of estrogen-related receptor-alpha specific antagonist XCT-790 on proliferation and differentiation of osteoblast-like cell line MG-63. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, 2011, 28(1):43-45. (in Chinese)
- [ 6 ] 万雷, 黄宏兴, 黄红, 等. 沉默 DKK1、Sost 重组腺病毒载体的构建及其对 MG63 细胞增殖、ALP 活性和钙离子浓度影响研究. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(11):1361-1369.
- Wan L, Huang HX, Huang H, et al. Construction of DKK1 and Sost recombinant adenovirus silencing vector and their effect on MG63 cell viability, ALP activity and Ca<sup>2+</sup> concentration. *Chin J Osteoporos*, 2016, 22(11):1361-1369. (in Chinese)
- [ 7 ] Han X, Yang K, Yang J, et al. Distinct roles for hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development*, 2006, 133(16):3231-3244.
- [ 8 ] Mikheev AM, Mikheeva SA, Rostomily R, et al. Dickkopf-1 activates cell death in MDA-MB435 melanoma cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2007, 352(3):675-680.
- [ 9 ] Yochum GS, Sherrick CM, Macpartlin M, et al. A beta-catenin/TCF-coordinated chromatin loop at MYC integrates 5' and 3' Wnt responsive enhancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(1):145-150.
- [ 10 ] Bonnelye E, Merdad LV, Aubin J. The orphan nuclear estrogen receptor-related receptor alpha (ERRalpha) is expressed throughout osteoblast differentiation and regulates bone formation in vitro. *Journal of Cell Biology*, 2001, 153(5):971-984.
- [ 11 ] Delhon I, Gutzwiller S, Morvan F, et al. Absence of estrogen receptor-related- $\alpha$  increases osteoblastic differentiation and cancellous bone mineral density. *Endocrinology*, 2009, 150(10):4463-4472.
- [ 12 ] Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1997, 234(1):137-142.
- [ 13 ] 隋国良, 彭依群, 何玉玲, 等. 重组人结缔组织生长因子对成人成骨细胞骨保护素/RANKL 表达的影响. *中华内分泌代谢杂志*, 2010, 26(10):881-884.
- Sui GL, Peng YQ, He YL, et al. The effects of recombinant human connective tissue growth factor on the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and the mechanisms involved in human osteoblasts. *Chin J Endocrinol Metab*, 2010, 26(10):881-884. (in Chinese)
- [ 14 ] Xiao G, Jiang D, Thomas P, et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(6):4453-4459.
- [ 15 ] Salamanna F, Pagani S, Maglio M, et al. Estrogen-deficient osteoporosis enhances the recruitment and activity of osteoclasts by breast cancer cells. *Histology & Histopathology*, 2015, 31(1):11651.
- [ 16 ] Bailey RL, Looker AC, Lu Z, et al. B-vitamin status and bone mineral density and risk of lumbar osteoporosis in older females in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2015, 102(3):687-694.

(收稿日期: 2017-01-10; 修回日期: 2017-02-26)