

· 论 著 ·

阿托伐他汀钙对成骨前体细胞(3T3-E1)增殖与分化的影响及其与内质网应激的联系

王青 罗欢* 徐丽丽 王宾 刘焕娜 杨乃龙*

青岛大学医学院附属医院内分泌科, 山东 青岛 266003

中图分类号: R589.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 07-0910-05

摘要: **目的** 观察不同浓度阿托伐他汀钙对成骨前体细胞(3T3-E1 细胞)增殖与分化影响,分析该过程与内质网应激相关基因 Bip、PERK、Eif2a 表达的关系。**方法** 3T3-E1 细胞培养至对数期,加入含不同浓度阿托伐他汀钙 0 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 培养液继续培养细胞,24 h 后利用 CCK-8 比色法检测细胞增殖能力,碱性磷酸酶测定试剂盒测定 ALP 活力,实时定量 PCR 技术检测内质网应激标志基因 Bip、PERK、Eif2a 表达水平。**结果** 镜下观察 3T3-E1 细胞呈梭形或多角形等形态,生长状态良好。②与对照组相比,不同浓度的阿托伐他汀钙作用于细胞 24 h 后,均可促进 3T3-E1 细胞增殖并增加 ALP 活性($P < 0.05$),其中以 10^{-6} mol/L 阿托伐他汀钙浓度增殖最明显。③实时定量 PCR 结果显示,阿托伐他汀钙组 Bip、PERK、Eif2a 表达均高于对照组($P < 0.05$)。**结论** 阿托伐他汀钙可促进 3T3-E1 细胞增殖,促进细胞 ALP 活性增加,提高内质网应激标志基因表达,提示阿托伐他汀促进增殖的作用可能与内质网应激通路相关,为骨质疏松的临床治疗及药物研发提供新的思路。

关键词: 阿托伐他汀钙;成骨前体细胞;细胞增殖;内质网应激

Effect of atorvastatin on proliferation and differentiation of osteoblast cells (3T3-E1) and its relationship with endoplasmic reticulum stress

WANG Qing, LUO Huan, XU Lili, WANG Bin, LIUHuan-na, YANG Nailong*

Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China

* Corresponding author; YANG Nailong, E-mail: nailongy@163.com; LUO Huan, E-mail: 105683722@qq.com

Abstract: **Objective** To observe the proliferation and differentiation of atorvastatin calcium with different concentrations on the 3T3-E1 cells and to analyze the relationship between this process and the expression of endoplasmic reticulum stress related genes, Bip, PERK, and Eif2a. **Methods** The osteoblast cells were cultured to the logarithmic phase, and then the cells were continued to be cultured with different concentrations of atopal calcium in 0 , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L. After 24 hours, the cell proliferation ability was detected by CCK-8 colorimetric method, the activity of ALP was measured by alkaline phosphatase assay, and the expression level of symbolic endoplasmic reticulum genes were detected by the real time quantitative PCR technique. **Results** Under microscope, cells were spindle or polygonal. ② Compared with the control group, atorvastatin calcium could promote cell proliferation and increase the activity of ALP ($P < 0.05$), and proliferation was most obvious in 10^{-6} mol/L. ③ Real time quantitative PCR showed that the expressions of Bip, PERK and Eif2a in atorvastatin calcium group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Atorvastatin can promote the proliferation of 3T3-E1 cells and increase the activity of ALP cells. The fact which atorvastatin can promote the proliferation may be related to the endoplasmic reticulum stress pathway, which provides a new method for the clinical treatment and drug development of osteoporosis.

Key words: Atorvastatin calcium; Osteoblast cells(3T3-E1 cells); Cell proliferation; Endoplasmic reticulum stress

他汀类药物(statins)在临床上多用于高脂血症及心脑血管疾病的治疗,此前有研究表明,他汀类药物能促进骨形态发生蛋白 2(BMP-2)的表达,修复

骨微细结构,对骨代谢有一定影响^[1]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是指当机体处于缺血缺氧、氧化应激、功能蛋白基因突变、钙离子失衡、脂质合成紊乱等情况下,内质网失去正常的生理功能,通过一系列信号转导通路引起细胞内的保护

* 通讯作者: 杨乃龙, E-mail: nailongy@163.com; 罗欢, E-mail: 105683722@qq.com

性应答反应,是细胞的适应性调节过程^[21]。近几年研究表明,内质网应激信号通路可能参与骨质疏松症的发生,从不同途径影响骨代谢平衡,但其具体机制仍未明确,与骨质疏松的关系需要进一步研究。本实验拟研究阿托伐他汀钙对 3T3-E1 细胞增殖及分化的影响,进一步探讨该过程与内质网应激通路相关基因表达的关系,为骨质疏松的临床治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

3T3-E1 细胞(由中科院上海细胞库提供); α -DMEM、胰蛋白酶、胎牛血清、双抗

(美国 Hyclone 公司);TRIZOL(美国 Gibco 公司);Cell Counting Kit-8 细胞增殖/毒性检测

试剂盒、碱性磷酸酶染色试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司);反转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒(北京天根生化科技公司);引物(上海生物工程技术服务有限公司);阿托伐他汀钙(辉瑞制药有限公司,商品名:立普妥)。

1.2 实验方法

1.2.1 3T3-E1 细胞的培养:将 -80℃ 冰箱冻存的细胞立即投入 37~40℃ 水浴箱,水中晃动直至冻存液全部融化。细胞悬液移入离心管内,加培养液 5 mL 并吹打混匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,细胞沉淀里加 10% FBS 的 α -DMEM 5 mL,轻轻混合均匀后接种于培养瓶内,放置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱,每两天换液一次,当细胞汇合至 80% 左右时传代进行实验。

1.2.2 CCK-8 比色法测定阿托伐他汀钙对细胞增殖的影响:细胞悬液以 1×10^5 /mL 密度接种到 96 孔无菌细胞培养板,每孔 100 μ L,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,待细胞贴壁生长后,加入含不同浓度阿托伐他汀钙 0 mol/L(对照组)、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 的培养液继续培养细胞,每组设置 5 个复孔,作用 24 h 分别于每孔加 10 μ L CCK-8 试剂,37℃、5% CO₂ 培养箱继续孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值(OD 值)。

1.2.3 碱性磷酸酶活性检测:成骨细胞悬液以 1×10^5 /mL 密度接种到 96 孔无菌细胞培养板,测定孔加入 0 mol/L(对照组)、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 阿托伐他汀钙处理 24 h 后的上清液 5 μ L,测定孔均设置 2 个复孔。按碱性磷酸酶试剂盒步骤加入同比例的缓冲液和基质液,充分混合均匀,37℃ 水溶 15 min,

加入 150 μ L 显色剂,轻轻振摇孔板混匀,于波长 520 nm 处测定各孔吸光度(OD 值)。

1.2.4 RT-PCR 法检测成骨细胞 Bip、PERK、Eif2a 基因的相对表达水平:向细胞中加入终浓度 10^{-6} mol/L 阿托伐他汀钙干预细胞 24 h,用 Trizol 法提取细胞样本中总 RNA。RNA 定量后按照试剂盒说明反转录成第一链 cDNA,进行 PCR 反应。PCR 反应体系:总体积 20 μ L,包括:2 * SuperReal PreMix Plus10 μ L,上游、下游引物各 0.6 μ L,Cdna 2 μ L,50 * ROX Reference Dye0.4 μ L,RNase-Free ddH₂O 6.4 μ L 补足至 20 μ L。PCR 反应条件:95℃ 15 min,95℃ 10 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环。基因引物及序列见表 1,应用熔解度曲线法鉴定产物的片段大小与特异性,根据扩增产物的 Ct 值与相对标准曲线得出各标本所含基因的模板量,mRNA 的相对表达量以公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

表 1 基因序列及其引物

Table 1 The sequence of gene primers

基因		位置序列(5'→3')	碎片大小
Bip	Upstream	GCCAACTGTAACAATCAA	165 bp
	Downstream	GCTGTCACTCGGAGAATA	
PERK	Upstream	TGCCAGACTGAAAGTAAA	197 bp
	Downstream	ATCCTCTTGATAGCGTAA	
Eif2a	Upstream	ACGGTCACCCAGTCTGCT	85 bp
	Downstream	GCTGCTCTATGGCTTTCA	
β -actin	Upstream	CCTTCGGTGTTCCTACCC	130 bp
	Downstream	CCCAAGATGCCCTTCAGT	

1.3 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件进行统计分析,实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3T3-E1 细胞形态学观察

复苏培养 24 h 后细胞呈现贴壁生长,胞质丰富,生长状态良好,形态近似为梭形、多角形等。如图 1。

2.2 阿托伐他汀钙对 3T3-E1 细胞增殖和 ALP 活性的影响

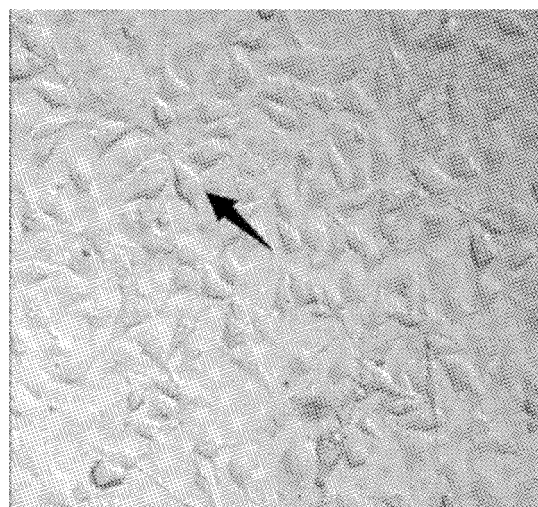
不同浓度的阿托伐他汀钙(0 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L)作用于细胞 24 h 后,与对照组比较,各组的 3T3-E1 细胞 OD 值及 ALP 活性均增加,且以高浓度组的阿托伐他汀钙(10^{-6} mol/L)增加最明显($P < 0.05$),对照组与实验组、实验各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同浓度阿托伐他汀钙对 3T3-E1 细胞增殖和 ALP 活性的影响

Table 2 Effects of atorvastatin calcium with different concentrations on proliferation and ALP activity of 3T3-E1 cells

项目	对照组	实验组		
		1	2	3
阿托伐他汀钙浓度(mol/L)	0	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
3T3-E1 细胞(OD 值)	0.4930 ± 0.0343	$0.5487 \pm 0.0314^*$	$0.6057 \pm 0.0366^{***}$	$0.6563 \pm 0.0483^{***}$
ALP 活性(金氏单位/g)	1.844 ± 0.795	$4.317 \pm 0.605^{**}$	$6.065 \pm 0.776^{***}$	$9.036 \pm 1.182^{***}$

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 实验组间比较, $P < 0.05$

图 1 3T3-E1 细胞形态观察($\times 100$)

注:箭头(↖)所指为典型的梭形成骨前体细胞(3T3-E1 细胞)

Fig. 1 Morphology of 3T3-E1 cell($\times 100$)

2.3 阿托伐他汀钙对 3T3-E1 细胞 Bip、PERK、Eif2a 基因表达的影响

选取对细胞增殖及分化能力作用最佳的 10^{-6} mol/L 的阿托伐他汀钙干预 3T3-E1 细胞 24 h, RT-PCR 结果显示, 3T3-E1 细胞 Bip、PERK、eIF2 α 基因 mRNA 表达均高于对照组($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 阿托伐他汀钙(10^{-6} mol/L)对 3T3-E1 细胞 Bip、PERK、Eif2a 基因表达的影响

Table 3 Effect of atorvastatin calcium (10^{-6} mol/L) on the expression of Bip, PERK and Eif2a genes in 3T3-E1 cells

项目	Bip	PERK	Eif2a
0(mol/L)	1	1	1
10^{-6} (mol/L)	$2.716 \pm 0.013^*$	$3.284 \pm 0.009^*$	$1.967 \pm 0.017^*$

注:与对照组(0 mol/L)相比, * $P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以低骨量、骨组织微结构破坏为特征,引起骨质脆性增加和易于发生骨折的全身性代谢性疾病。目前中国 60 岁以上人口 > 2.1 亿, 65 岁以上人口 > 1.4 亿, 已居全球

老年人口绝对数最高^[3]。他汀类药物属于 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(MG-CoA)还原酶抑制剂,可以减少肝内胆固醇的生物合成,降低血清胆固醇浓度,是临床最常用的调脂药物之一^[4]。数年前 Mundy 等^[5]最早发现他汀类药物可激活成骨细胞,诱导骨形态发生蛋白 2(BMP-2)基因表达,刺激骨形成。动物研究表明,他汀类药物能够介导碱性磷酸酶活性的增强,以及促进骨形态发生蛋白-2、血管上皮生长因子和骨钙素在成骨细胞中的表达,促进来自小鼠颅盖骨的 3T3-E1 细胞的成骨细胞分化和矿化^[6]。他汀类药物的合成代谢作用,类似于饮食所赋予的具有抗破骨细胞活性和骨保护活性的类异戊二烯,具有 HMG CoA 还原酶抑制活性的生育三烯酚,它们能够促进成骨细胞生成,抑制破骨细胞分化并诱导破骨细胞凋亡,这些作用提示他汀类药物作为 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂,可能与骨代谢有关^[7]。Meier^[8]、Wang 等^[9]多项回顾性分析与调查结果显示,他汀类药物能恢复骨骼细微结构,增加骨密度、降低骨折风险。Meta 分析结果亦有显示,他汀类药物能够提高糖尿病合并骨质疏松患者的腰椎、Ward 三角区、GBP 骨密度,但对股骨颈、大转子、及粗隆的骨密度提高不明显。对于糖尿病合并骨质疏松症的患者,虽然他汀类药物在实际临床工作中应用的整体疗效不是很理想,但此为今后的关于他汀类药物作为一种调脂药物是否能够应用于骨质疏松领域提供了参考^[10]。他汀类药物可谓是一种具有潜力的促进骨形成药物。

内质网是真核细胞重要的膜性细胞器,主要负责蛋白的合成、修饰与加工、调节细胞内外钙离子稳态。各种应激能够破坏内质网的内环境稳态,引起内质网内非折叠蛋白与错误折叠的蛋白过度蓄积,由此引发未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)^[11,12], UPR 的出现可能提示内质网应激的发生。UPR 是由内质网分子伴侣 GRP78/BIP (glucose-regulated protein78/immunoglobulin binding protein, GRP78/BiP)与 PERK、IRE-1、ATF6 3 个感受蛋白介导,生理状态下,GRP78/BiP 与

PERK、ATF6、IRE-1 感受蛋白结合,处在无活性状态。当内质网应激发生时,未折叠蛋白于内质网内堆积,导致 GRP78/BiP 从上述 3 种感受蛋白上解离,进而结合未折叠蛋白,解离后的感受蛋白被活化,并启动 UPR,减少未折叠或错误折叠蛋白在内质网中的堆积,最终恢复内质网的正常生理功能^[13,14]。

PERK 是内质网膜上的 I 型跨膜蛋白,与 GRP78/BiP 解离后可以促进位于内质网外侧的真核细胞蛋白质翻译起始复合体 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α) 磷酸化,磷酸化之后的 eIF2 α 能抑制大多数 mRNA 的翻译,并减少蛋白质的合成,进而减轻内质网的加工负荷,利于恢复内质网稳态^[15]。Zhang 等^[16,17] 利用可阻止 PERK 下游的 eIF2 α 去磷酸化的化合物 Salubrinal 进行体外实验,揭示了由 Salubrinal 作用后增加的 eIF2 α 磷酸化降低了小鼠骨髓细胞中破骨细胞分化,通过 PERK-eIF2 α -ATF4 信号通路增强成骨细胞分化,首次报道了通过增加 eIF2 α 磷酸化发挥抗骨质疏松活性。Hamamura 等^[18] 研究表明,内质网应激通过调节 ATF4/CHOP 信号通路进而增强成骨细胞的生长与分化能力。这些实验研究发现,骨质疏松症的发生与骨骼发育可能和内质网应激相关,推测内质网应激可能成为骨骼疾病的治疗靶点^[19,20]。

本试验通过体外给予不同浓度的阿托伐他汀钙干预培养 3T3-E1 细胞,24 h 后观察到阿托伐他汀钙可促进细胞增殖、增加细胞 ALP 活性,在 10^{-6} mol/L 作用最显著。以终浓度 10^{-6} mol/L 阿托伐他汀钙干预细胞,RT-PCR 法观察 Bip、PERK、Eif2a 基因表达均相对增加。

综上所述,该体外实验所选择的药物浓度及作用时间下,利于成骨细胞增殖,可促进内质网应激信号通路的标志性基因 Bip、PERK、Eif2a 的表达,推测阿托伐他汀钙发挥骨保护作用的机制可能与 Bip-PERK-Eif2a 等信号通路有关,但内质网应激作为有效靶点参与骨质疏松的机制尚需进一步证实。日前多数研究局限于体外细胞实验,人体实验缺少循证医学证据,缺乏多中心、大样本、前瞻性的规范性研究,且他汀类药物主要通过肝肾代谢,如何提高他汀类药物对靶组织的作用以促进药物吸收、发挥促骨形成作用还有待研究^[21]。

【参 考 文 献】

[1] Tan J, Yang N, Fu X, et al. Single-dose local simvastatin

injection improves implant fixation via increased angiogenesis and bone formation in an ovariectomized rat model [J]. Med Sci Monit, 2015, 21(7): 1428-1439.

[2] Hamamura K, Yokota H. Suppression of osteoclastogenesis through phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α [J]. J Bone Miner Metab, 2013, 31(6): 618-628.

[3] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017) [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 10(5): 411-412.

Chinese Medical Association Osteoporosis and Bone Mineral Disease Branch. Diagnosis and treatment of primary osteoporosis guidelines(2017) [J]. Chinese Journal of Osteoporosis and Bone and Mineral Diseases, 2017, 10(5): 411-412.

[4] Bellosta S, Ferri N, Bernini F, et al. Non-lipid-related effects of statins [J]. Annals of Medicine, 2000, 32(3): 164-176.

[5] Mundy G, Harris A, Chen J, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins [J]. Science, 1999, 286(5446): 1946-1949.

[6] Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, et al. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2004, 92(3): 458-471.

[7] Mo H, Yeganehjoo H, Shah A, et al. Mevalonate-suppressive dietary isoprenoids for bone health [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(12): 1543-1551.

[8] Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures [J]. JAMA, 2000, 283(24): 3205-3210.

[9] Wang PS, Solomon DH, Mogun H, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients [J]. JAMA, 2000, 283(24): 3211-3216.

[10] 姚银辉, 陈慧慧, 鲁澄宇. 他汀类药物对糖尿病性骨质疏松患者骨钙素和骨密度影响的系统评价 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 3(03): 263-268.

Yao YH, Chen HH, Lu CY. The effect of statins on BCP and BMD of diabetic osteoporosis patients: A systematic review [J]. Chin J Osteoporos, 2012, 18(3): 263-268.

[11] Jager R, Bertrand MJ, Gorman AM, et al. The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress [J]. Biol Cell, 2012, 104(5): 259-270.

[12] McAlpine CS. The development and progression of atherosclerosis: evidence supporting a role for endoplasmic reticulum (ER) stress signaling [J]. Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets, 2013, 13(2): 158-164.

[13] Park SJ, Kim KJ, Kim WU, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in homocysteine-induced apoptosis of osteoblastic cells [J]. Bone Miner Metab, 2012, 30(4): 474-484.

[14] Yuan P, Dong L, Cheng Q, et al. Prototype foamy virus elicits complete autophagy involving the ER stress-related UPR pathway [J]. Retrovirology, 2017, 14(1): 16.

(下转第 970 页)

- 用的差异蛋白分析. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, (33): 6411-6415.
- Xia Xiongzi, Fan Yueguang, Liu Wu, et al. Differential protein analysis of hormone intervening effect on osteoblast-like cells using kidney-tonifying method. Chinese Journal of Tissue Engineering Research and Clinical Rehabilitation, 2008, (33): 6411-6415.
- [16] 李勇, 何伟, 张庆文, 等. 激素性股骨头坏死基因多态性与中医证型的关联性研究. 新中医, 2012, 44(6): 87-89.
- Li Yong, He Wei, Zhang Qingwen, et al. Study on the association of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head with TCM syndromes. New Chinese Medicine, 2012, 44(6): 87-89.
- [17] 孙丙银, 赵宝祥, 韦标方. 激素性股骨头坏死中医证候与CYP1A2基因多态性的关联研究. 南京中医药大学学报, 2015, 31(3): 210-213.
- Sun Bingyin, Zhao Baoxiang, Wei Biaofang. Relationship between TCM Syndromes and CYP1A2 Gene Polymorphism in Steroid-induced Avascular Necrosis of Femoral Head. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2015, 31(3): 210-213.
- [18] 万蓉, 李莉, 孔祥英, 等. 不同治法方药对激素性股骨头坏死鸡股骨头 OPG, RANKL mRNA 表达的影响. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 149-153.
- Wan Rong, Li Li, Kong Xiangying, et al. Different treatment prescriptions on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head OPG, RANKL mRNA expression. Chinese Journal of Experimental Prescriptions, 2011, 17(8): 149-153.
- [19] 李鹏飞, 孙楠, 樊粤光, 等. 袁氏生脉成骨片对激素干预后大鼠成骨细胞的差异表达 miRNA 的实验研究. 中华中医药学刊, 2017, 35(1): 91-94, 260.
- Li Pengfei, Sun Nan, Fan Yueguang, et al. Experimental Study of Differential Expression of miRNA in Osteoblasts after Hormone Intervention by Yuan's Shengmai Chenggu Tablet in Rats. Chinese Archives of Traditional Medicine, 2017, 35(1): 91-94, 260.
- [20] 陈凯云, 于雪峰, 刘贞, 等. 基于代谢组学技术对中西药干预股骨头坏死后甘油三酯代谢分析. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4452-4455.
- Chen Kaiyun, Yu Xuefeng, Liu Zhen, et al. Triglyceride metabolism analysis after Chinese and western intervention to femoral head necrosis by hormone using the metabolomics technology. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 31(11): 4452-4455.
- [21] 刘军莲, 宋剑南, 雷燕, 等. 血脂异常及动脉粥样硬化不同痰瘀证候血浆蛋白差异表达谱的研究. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5): 482-487.
- Liu Junlian, Song Jiannan, Lei Yan, et al. Dyslipidemia and atherosclerosis phlegm and blood stasis syndrome Study on differential expression profiles of plasma proteins. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2010, 30(5): 482-487.
- [22] 于雪峰, 彭维霞, 陈凯云, 等. 基于代谢组学技术对骨蚀灵胶囊干预激素诱发股骨头坏死的机制探讨. 中华中医药杂志, 2014, 6: 1805-1808.
- Yu Xuefeng, Peng Weixia, Chen Kaiyun, et al. Metabonomic study on the mechanism of steroid-induced avascular necrosis of femoral head with Gushiling Capsule. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 6: 1805-1808.
- [23] 吉万波, 刘冠虹, 刘锦涛, 等. 股密葆方对大鼠激素性股骨头坏死脂质代谢影响的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 2016, 12: 1580-1584.
- Ji Wanbo, Liu Guanhong, Liu Jingtao, et al. Lipid metabolism research on Gumibao Recipe in treating Steroid-induced Necrosis of the Femoral Head in rats. Chinese Journal of Osteoporosis, 2016, 12: 1580-1584.
- [24] 吉万波, 刘冠虹, 刘锦涛, 等. 益气化痰补肾法对大鼠激素性股骨头坏死骨代谢的影响. 广州中医药大学学报, 2014, 2: 239-242, 321.
- Ji Wanbo, Liu Guanhong, Liu Jingtao, et al. Effect of the method of Yi Qi, Hua Yu and Bu Shen on Bone Metabolism in Steroid-induced Avascular Necrosis of Femoral Head in Rats. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2014, 2: 239-242, 321.
- (收稿日期: 2017-10-01; 修回日期: 2017-11-12)

(上接第 913 页)

- [15] Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development[J]. Developmental Cell, 2002, 2(4): 389-406.
- [16] Zhang P, McGrath B, Li S, et al. The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(11): 3864-3874.
- [17] He L, Lee J, Jang JH, et al. Osteoporosis regulation by salubrinal through eIF2α mediated differentiation of osteoclast and osteoblast[J]. Cellular Signalling, 2013, 25(2): 552-560.
- [18] Hamamura K, Yokota H. Stress to endoplasmic reticulum of mouse osteoblasts induces apoptosis and transcriptional activation for bone remodeling [J]. FEBS Lett, 2007, 581(9): 1769-1774.
- [19] Ariyasu D, Yoshida H, Hasegawa Y. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Endocrine Disorders[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 382.
- [20] Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development[J]. Developmental Cell, 2002, 2(4): 389-406.
- [21] 骆勇全, 成锋, 卢建华. 他汀类药物治疗骨质疏松症的研究进展[J]. 浙江临床医学, 2009, 11(6): 641-643.
- Luo YQ, Cheng F, Lu JH. Research progress of statins in the treatment of osteoporosis [J]. Zhejiang Journal of Clinical Medicine, 2009, 11(6): 641-643.
- (收稿日期: 2018-05-19; 修回日期: 2018-05-28)