

人 BMSCs 自噬水平和成骨分化能力比较

徐丽丽 胥方元 万永鲜*

西南医科大学附属医院, 四川 泸州 646000

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 11-1446-06

摘要: **目的** 比较老年骨质疏松 (osteoporosis, OP) 和健康成年人椎体中骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 自噬水平和成骨分化能力。**方法** 取从 2 组手术患者椎体中培养的 BMSCs 细胞, Western blot 检测自噬相关基因 LC3 和 P62 蛋白表达。转染含 LC3-GFP 质粒的腺病毒后, 激光共聚焦下观察代表自噬体的绿色荧光斑点数。细胞经成骨诱导分化培养基刺激后, 碱性磷酸酶染色比较早期成骨指标, 茜素红染色比较晚期成骨指标钙盐沉积的影响。荧光定量 PCR (q-PCR) 检测骨形成相关基因 1 (collagen type I, COL I)、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 以及 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2)。**结果** Western blot 结果显示 OP 组 BMSCs 的 LC3-II/I 表达明显降低, 而 P62 表达明显增高 ($P < 0.05$); 激光共聚焦观察进一步证实 OP 组中绿色荧光斑点数显著下降, 说明细胞内自噬体数目减少 ($P < 0.05$)。两组 BMSCs 经成骨诱导后, 茜素红和碱性磷酸酶染色发现 OP 组阳性程度明显弱于正常对照组, 而 q-PCR 结果显示成骨分化的一些关键指标 COL I、OCN、OPN 和 RUNX2 在 OP 组中均显著下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 骨质疏松的 BMSCs 中自噬水平较正常细胞低, 且成骨分化能力更弱。

关键词: 自噬相关蛋白质类; 骨质疏松; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

Comparison of autophagic level and osteogenic capability in human BMSCs

XU Lili, XU Fangyuan, WAN Yongxian*

The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

* Corresponding author: WAN Yongxian, Email: wyx200308@163.com

Abstract: **Objective** To compare the autophagic level and osteogenic capability of human vertebral bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) from senile osteoporosis (OP) and young non-OP patients. **Methods** BMSCs was obtained from vertebrae of these two groups of patients and cultured. Western blot was used to detect the expression of autophagy associated proteins, LC3 and P62. The adenovirus containing LC3-GFP fusion protein was used to transfect BMSCs, and autophagy was evaluated by analyzing the number of green fluorescent puncta of autophagosomes under laser confocal microscopy. After stimulation of osteogenic differentiation medium, alkaline phosphatase staining was used to detect the early stage of osteoblast differentiation and alizarin red staining was used to detect the late stage of osteoblast differentiation. Fluorogenic quantitative PCR (q-PCR) was used to detect osteogenic genes, including collagen type I (COL I), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) and Runt-related transcription factor 2 (RUNX2). **Results** Western blot analysis showed that the protein expression ratio of LC3 II/I significantly decreased ($P < 0.05$), on the contrary, the protein expression of P62 significantly increased ($P < 0.05$). In addition, after adenovirus transfection with LC3-GFP, the laser confocal microscopy observation showed a significant decline of green LC3 puncta that represented the number of autophagosome in BMSCs from OP group ($P < 0.05$). Furthermore, after osteogenic induction, the optical microscope observation showed that the positive degree of alkaline phosphatase and alizarin red staining was obviously weaker than those in the young control group. The q-PCR result further indicated that osteogenic genes, including COL I, OCN, OPN and RUNX2 all significantly decreased in BMSCs from OP group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Our study showed that there were low autophagic level and osteogenic capability in the osteoporotic BMSCs.

Key words: autophagy-related proteins; osteoporosis; bone marrow mesenchymal stem cell; osteogenic differentiation

基金项目: 四川省科技厅支撑计划资助项目 (2014SZ0235); 四川省卫生计生委项目 (16PJ550)

* 通信作者: 万永鲜, Email: wyx200308@163.com

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 主要存在于骨骼系统松质骨中, 是一种具有多向分化能力的早期前体细胞, 在适当

条件刺激下可以分化为骨细胞^[1]。基于间充质干细胞的成骨分化能力,因此来源于各种组织的间充质干细胞被视为骨组织工程的重要种子细胞来源。由于 BMSCs 取材简单,组织来源较为丰富,逐渐成为骨缺损、骨软化病、骨质疏松症(osteoporosis, OP)等疾病干细胞治疗的重要种子细胞^[2]。自噬是生物体内一种保守的生命现象,基本的生理学意义在于清除受损的细胞器或蛋白,将其代谢产物重新供能,从而维持细胞内环境的稳态^[3]。近年来,自噬在细胞和器官分化和发育过程中的作用备受关注,例如自噬缺乏导致小脑和大脑皮质广泛的神经细胞凋亡和退行性改变^[4];而对于心肌细胞,自噬缺乏容易导致心肌肥厚、心功能不全等^[5];自噬同样在造血细胞分化成熟过程中扮演着重要角色,抑制自噬可能导致造血干细胞分化成熟障碍,表现为贫血和白细胞减少^[6]。在自噬对成骨分化影响方面,国内李军等^[7]利用自噬激动剂雷帕霉素促进 BMSCs 自噬活性后,其向成骨分化的潜力减弱。但国外研究报道葡萄膜球菌脂磷壁酸可以通过激活自噬来促进小鼠间充质干细胞的成骨分化^[8]。

综上所述,自噬对于间充质干细胞成骨分化的影响并不明确,本实验研究拟通过比较实验组骨质疏松与正常对照组 BMSCs 的成骨分化能力和自噬水平,初步探讨自噬对人 BMSCs 成骨分化的影响,为下一步选择成骨分化靶点,促进骨形成提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验仪器

超净工作台(苏州净化设备厂,中国),细胞培养箱(Thermo,美国),离心机(Beckman-Coulter,美国),倒置显微镜(Nikon,日本),超声细胞破碎仪(Philips,荷兰),凝胶成像仪(Bio-Rad,美国),激光共聚焦荧光显微镜(Hitachi,日本),核酸蛋白测定仪(Thermo Fisher,美国),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国)。

1.2 实验试剂

α -MEM 培养基(Gibco,美国),胎牛血清(Gibco,美国),PBS 缓冲液(Hyclon,美国),0.25% 胰蛋白酶(索莱宝,中国),成骨诱导培养基(赛业生物,中国),RIPA 细胞裂解液(碧云天,中国),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天,中国),蛋白 Marker(碧云天,中国),SDS-PAGE 配胶试剂盒(碧云天,中国),TBST 缓冲液(索莱宝,中国),PVDF 膜(Millipore,美国),ECL

发光显影液(Millipore,美国),LC3 小鼠抗人单克隆抗体(Sigma,美国),P62 小鼠抗人单克隆抗体(Abcam,英国), β -actin 兔抗人单克隆抗体(碧云天,中国),山羊抗小鼠 IgG 二抗(碧云天,中国),山羊抗兔 Ig 二抗(碧云天,中国),4% 多聚甲醛固定液(碧云天,中国),茜素红染色试剂盒(Thermo Fisher,美国),碱性磷酸酶染色试剂盒(碧云天,中国),LC3-GFP 慢病毒(汉恒,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 BMSCs 分离培养:10 例椎体松质骨来源于 2015 年 6 月至 2016 年 6 月在我院接收椎体次全切减压植骨内固定术的患者。所有患者在术前均签署了知情同意书,该研究经过了本院伦理委员会的批准。根据年龄分为两组,A 组为老年骨质疏松组:共 5 例,年龄 60~75 岁,平均(69.4 ± 7.2)岁,术前骨密度检测 T 值 < -2.5 ,诊断为骨质疏松症,未有过抗骨质疏松治疗史;B 组为年轻对照组,共 5 例,年龄 26~35 岁,平均(30.2 ± 5.4)岁,既往体健,非病理性骨折。

小心分离术中摘取的椎体中央松质骨,用含 1% 双抗的 PBS 反复冲洗、离心 3 次;用眼科剪将松质骨剪成泥样,移植入 10 cm 培养皿中,每一份松质骨的体积约为 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$,每块组织间的距离不超过 5 mm,37 °C 细胞培养箱中孵育 2 h;沿培养皿壁小心加入 5 mL 含 10% FBS 的 α -MEM 培养基,避免松质骨团块漂浮,继续置于 37 °C 细胞培养箱中培养;3~4 d 再添加 5 mL 完全培养基,继续培养观察;7 d 左右通过倒置显微镜可以观察到纺锤样的单层贴壁细胞,即为人 BMSCs,细胞集落边缘细胞间最先相互融合,当细胞融合至 80% 以上后行胰酶消化传代培养;取第 1~3 代细胞进行后续实验。

1.3.2 Western blot 检测:取 A 组和 B 组的原代细胞,常规提取细胞总蛋白,行 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 和 P62,实验步骤简述如下:(1)取 A 组和 B 组原代细胞加入 RIPA 裂解液,冰上常规反应 30 min 后,超声细胞震碎仪处理 1 min,4 °C,12 000 g 高速离心 5 min 后取上清即为提取的总蛋白;(2)采用 BCA 法常规检测蛋白浓度,短期内使用的蛋白以 1:4 混合 $5 \times \text{SDS}$ 蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min 后放置于 -20 °C 保存;(3)采用 SDS-PAGE 配胶试剂盒,根据目标蛋白分子量大小,配置相应的凝胶浓度;(4)上样,每孔以相同蛋白量 50 μg 恒压(100 V)跑胶 1~2 h,待溴酚蓝进入分离胶底部后电泳结束;(5)采用湿转法将胶上的蛋白转移至

PVDF 膜上,转膜条件 250 mA 恒流转 30 min ~ 1 h; (6) 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h, 加入对应合适浓度的一抗, 4 °C 孵育过夜; (7) 复温半小时后, TBST 缓冲液洗涤 5 min/次 × 3 次, 加入对应合适浓度二抗, 37 °C 孵育 1 h; (8) TBST 缓冲液洗涤 5 min/次 × 3 次, 加入 ECL 显影液曝光, 拍照。 (9) 条带灰度值采用 Quantity one 软件分析。

1.3.3 LC3-GFP 腺病毒转染:自噬检测的金标准为电镜观察,但由于电镜观察耗时较长,且只能捕捉一个时间横断面的细胞状态,不利于监测细胞自噬状态。因此,本实验采用携带 LC3-GFP 绿色荧光基团的腺病毒转染 BMSCs, 观察自噬的动态过程, 实验原理如下:自噬没有被激活时, LC3-GFP 融合蛋白弥散在胞浆中;自噬形成时,其转位聚集至自噬体膜上,在激光共聚焦荧光显微镜下即可观察到一个个明亮的绿色荧光蛋白,理论上一个绿色荧光斑点即代表一个自噬体,可以通过计数斑点的数量来评价自噬活性的高低。腺病毒转染步骤简述如下: (1) 以 1×10^5 /孔细胞密度将原代 BMSCs 种植于共聚焦培养皿中,加入完全培养基,细胞培养箱孵育过夜; (2) 加入 1/2 体积含有病毒的培养基,以感染复数 30 转染日的细胞,每孔加入病毒悬液 2 h 后换液; (3) 转染 24 h 后,现在普通荧光显微镜下初步观察转染效率,是否可以看到绿色荧光。一般在转染后 36 ~ 48 h 可以观察到明显的荧光颗粒,这时用 Dapi 染核后在激光共聚焦显微镜下观察、计数绿色荧光斑点; (4) 随机选取 3 个不同视野,计数绿色斑点,然后行统计学分析。

1.3.4 成骨诱导培养: (1) 成骨诱导分化培养基配置。①使用前将血清置于 2 °C ~ 8 °C 环境中解冻过夜至血清完全溶解,轻晃试剂瓶以确保血清充分混匀;②配置前 30 min,室温静置溶解抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、双抗和谷氨酰胺,轻轻上下颠倒充分混匀;③使用前 10 min,室温静置溶剂地塞米松;④用 70% 乙醇擦拭各个试剂瓶开口外壁消毒,静置待酒精充分挥发。将抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、成人 BMSC 专用胎牛血清、双抗和谷氨酰胺全部加入成人 BMSC 成骨诱导分化培养基中,最后加入地塞米松;⑤轻晃配置好的完全培养基,充分混匀。 (2) 成骨诱导培养实验步骤。①取 1 ~ 3 代 BMSCs 按照 5×10^4 /孔细胞密度种植于事先包被 0.1% 明胶的六孔板,每孔加入 2 mL 完全培养基;②将细胞置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中进行培养;③当细胞融合度达到 60% ~ 70% 时,小心将孔内的完全培养基移

弃,向六孔板中加入 2 mL OriCell™ 成人 BMSC 成骨诱导分化完全培养基;④每隔 3 d 换液一次,诱导 3 周后进行后续检测。

1.3.5 茜素红染色: (1) 成骨诱导分化 3 周后,摒弃成骨诱导培养基,用 PBS 缓冲液漂洗 2 次后,每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定液,室温静置 30 min; (2) 摒弃多聚甲醛溶液,用 PBS 漂洗 3 min/次 × 3 次后,每孔加入茜素红染色液,室温静置 3 ~ 5 min; (3) 摒弃茜素红染液,用 PBS 漂洗 3 min/次 × 3 次后,置于倒置光学显微镜下观察。

1.3.6 碱性磷酸酯酶染色: (1) 配置碱性磷酸酶染色工作液:参照试剂盒说明,将 sodium nitrite solution、frv-alkaline solution 按照 1:1 混合,轻轻颠倒混匀,静置 2 min。加入 45 份比例的双蒸水,再加入 1 份比例的 naphthol as-bi alkaline solution,充分混匀; (2) 成骨诱导分化 3 周后,摒弃成骨诱导培养基,用 PBS 缓冲液漂洗 2 次后,每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定液,室温静置 30 min; (3) 摒弃多聚甲醛溶液,用 PBS 漂洗 3 min/次 × 3 次后,每孔加入碱性磷酸酶染色液,室温静置 3 ~ 5 min; (4) 摒弃碱性磷酸酶染液,用 PBS 漂洗 3 min/次 × 3 次后,置于倒置光学显微镜下观察。

1.3.7 荧光定量 PCR 检测:成骨诱导分化 3 周后,提取细胞总 RNA,采用荧光定量 PCR 检测主要的成骨指标 I 型胶原 (collagen type I, Col I)、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、发育不全相关转录因子 2 (runt related transcription factor 2, RUNX2) 的 mRNA 表达差异。实验步骤简述如下: (1) 预冷 PBS 缓冲液于冰上 30 min,弃去培养基, PBS 漂洗 5 min/次 × 3 次,每孔加入 1 mL RNA 提取裂解液 (Trizol),冰上静置 15 min 后反复吹打细胞,使其充分裂解; (2) 将细胞裂解液移入 1.5 mL EP 管中,加入 200 μ L 氯仿,剧烈振荡,冰上静置 5 min 后高速离心, 12 000 g, 4 °C, 离心 5 min; (3) 取 200 ~ 400 μ L 上层水相,移到另一个 EP 管中,以 1:1 加入相同体积异丙醇,轻柔混匀,冰上静置 15 min 后高速离心, 12 000 g, 4 °C, 离心 15 min; (4) 移弃上清,可以看到小块絮状沉淀,即所提取的 RNA,用 500 μ L 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀; (5) 高速离心 12 000 g, 4 °C, 离心 5 min,自然风干 RNA 后加入 20 μ L DEPC 水溶解; (6) 用核酸蛋白测定仪测定 RNA 的浓度和纯度,可放置于 -20 °C 短期保存; (7) 采用逆转录试剂盒合成 cDNA;反应液配置完成后,加入 200 μ L PCR 反应管汇总,置于 PCR 仪中进行逆转

录反应,条件如下:37 ℃ 逆转录 15 min;85 ℃ 终止灭活逆转录酶 5 s;4 ℃ 终止逆转录反应;得到的 cDNA 样本可以置于 -20 ℃ 短期保存。(8) SYBR Green 荧光定量 PCR 检测目的基因表达。(9) 荧光定量 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法统计分析。

1.4 统计学分析

实验数据均以平均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 20.0 软件进行分析处理。两两比较采用 *t* 检验,两组以上比较采用单因素方差分析,其中两两比较采用 post hoc 检测。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 老年骨质疏松 BMSCs 自噬水平降低

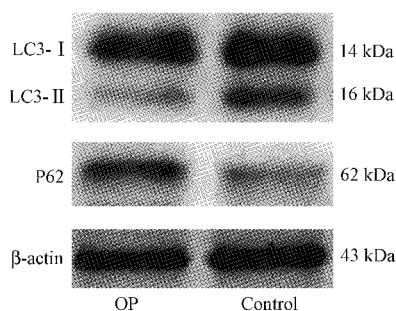


图 1 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 和 P62

Fig. 1 Western blot detection of autophagy related proteins LC3 and P62

由于 LC3 抗体对 LC3-II 有更高的亲和力,容易造成假阳性,因此为了更加客观地评判自噬水平的高低,本实验采用 LC3-GFP 融合蛋白转染来示踪自噬体形成。激光共聚焦显微镜下显示 A 组平均每个细胞中绿色荧光斑点数目明显小于 B 组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。

综上,初步判断老年骨质疏松 BMSCs 中的基础自噬水平较年轻正常 BMSCs 中明显降低。

2.2 老年骨质疏松 BMSCs 成骨分化能力减弱

为了探究 BMSCs 的自噬水平是否与成骨能力相关,探讨比较老年骨质疏松患者和正常年轻患者 BMSCs 的成骨分化能力。图 3 显示在成骨诱导分化 3 周后,A、B 两组茜素红染色均显示红染钙结节,但钙化结节数 A 组明显少于 B 组;碱性磷酸酶染色结果相似,两组均有碱性磷酸酶染色阳性细胞,但 A 组阳性细胞数及染色阳性程度均弱于 B 组。

为了更加定量比较两者成骨分化差异,采用荧光定量 PCR 检测主要成骨相关蛋白的 mRNA 表达。结果显示 I 型胶原、骨钙素、骨桥蛋白、RUNX2 等 4

为了比较来源于老年骨质疏松患者和正常年轻患者 BMSCs 的基础自噬水平,分别取 A 组和 B 组的原代细胞,首先通过 Western blot 检测比较自噬相关蛋白 LC3 和 P62 的表达。自噬形成时,胞浆型 LC3 (即 LC3-I) 会酶解一小段多肽,转变为自噬体膜型 (即 LC3-II),因此可以通过 LC3-II/I 比值来判断自噬的激活程度。而 P62 是自噬的降解底物,在自噬形成时与自噬体膜上的 LC3 相结合,继而被自噬体所降解,因此 P62 表达高低与自噬活跃程度呈反比。结果表明,A 组 BMSCs 的 LC3-II/I 表达比率比 B 组明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);而 P62 的蛋白表达在 A 组 BMSCs 中却明显升高,与 B 组相比差异同样具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 1。

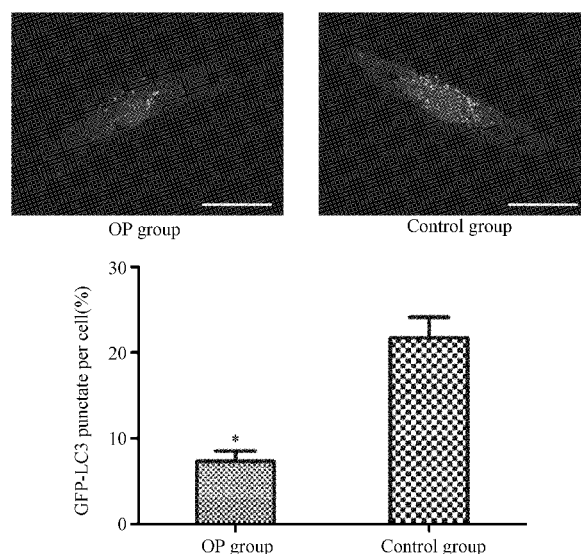
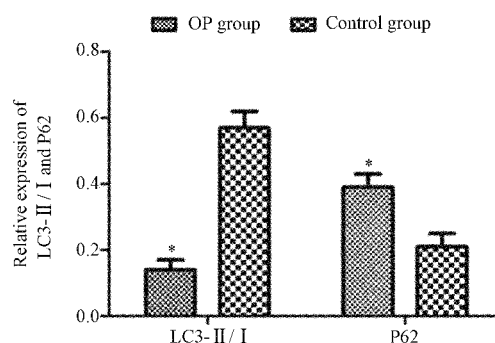


图 2 含 LC3-GFP 腺病毒转染后,激光共聚焦荧光显微镜观察,OP 组绿色荧光斑点率为 $(9.3 \pm 1.4)\%$,对照组为 $(22.7 \pm 3.8)\%$,标尺 = 100 μm

Fig. 2 After transfection of LC3-GFP adenovirus, the spot rate of green fluorescence in OP group was $(9.3 \pm 1.4)\%$, and in the control group was $(22.7 \pm 3.8)\%$ (ruler = 100 μm)

个主要指标的 mRNA 在 A 组均明显少于 B 组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。

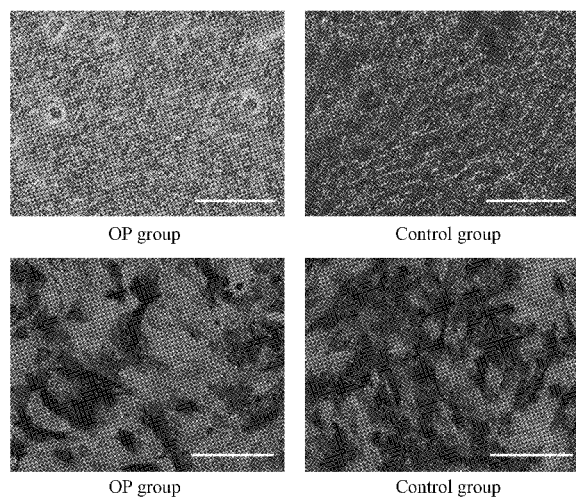


图 3 不同组别成骨诱导培养基刺激 3 周后的染色结果。A:茜素红染色,B:碱性磷酸酶染色

Fig. 3 Results of staining after 3 weeks of osteogenic induction medium stimulation in different groups. A: Alizarin red staining, B: Alkaline phosphatase staining.

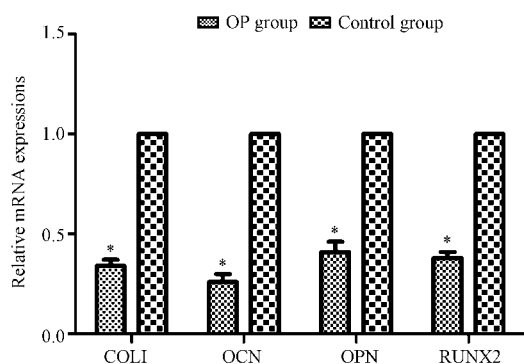


图 4 荧光定量 PCR 检测成骨相关基因 I 型胶原、骨钙素、骨桥蛋白、RUNX2 等 Mrna 表达

Fig. 4 Detection of Mrna expression of osteogenic related genes including collagen type I, osteocalcin, osteopontin and RUNX2 by fluorescence quantitative PCR

上述研究结果表明老年骨质疏松 BMSCs 成骨诱导分化能力较弱,显示了在 BMSCs 中较低的自噬水平表现出较弱的成骨分化能力。

3 讨论

成骨能力降低是导致老年性 OP 的主要病因,但如何提高老年患者的成骨分化能力目前仍是一个研究热点^[9]。BMSCs 作为一种具有多向分化潜能

的前体细胞,相对其他组织干细胞而言,具有取材丰富,提取简便的优势。

自噬是细胞适应外界应激的主动生理调控机制,近年来自噬在骨形成中的作用才逐渐被发现^[10]。Nuschke 等^[11]研究表明在成骨分化的早期,人间充质干细胞内的自噬水平会明显提高,而当分化为成熟骨细胞后自噬又会明显下降,提示自噬在成骨分中扮演了重要作用。更进一步的研究表明,自噬可以通过调控 NF- κ B^[12] 和 TNFSF11/RANKL^[13] 两条信号通路,促进成骨分化、提高矿化能力,从而有利于骨形成。而在体内研究中同样发现桡骨远端的骨密度与自噬水平密切相关^[14]。但国内有研究表明当上调 BMSCs 自噬活性后,其向成骨分化的潜力减弱^[7]。由此可见,当前自噬与成骨分化的关系并不明确,分析其原因可能与所选用种子细胞的差异,以及成骨分化的同阶段有关,所以本实验的目的是通过比较骨质疏松和正常对照的原代 BMSCs 自噬和成骨分化能力,初步判断在 BMSCs 中自噬与成骨能力间的关系。

本实验结果无论是 Western blot 还是激光共聚焦观察均显示 OP 组中的 BMSCs 自噬水平显著低于正常对照组,而通过组织学染色比较以及荧光定量 PCR 结果则提示 OP 组的成骨分化能力同样较弱。这些结果均提示在 BMSCs 自噬水平似乎与成骨分化能力呈正相关。

本实验研究同样存在一些局限性,首先该研究只是一个观察性研究,自噬对成骨分化的影响需要进一步验证;其次在所检测的几个成骨指标中,I 型胶原属于早期成骨指标,骨钙素属于中期成骨指标,而骨桥蛋白属于晚期成骨指标^[15],在以后的实验中可以通过不同时间的成骨诱导,比较不同的成骨指标,使实验结果更为客观、可靠。

【参 考 文 献】

- [1] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(9): 726-736.
- [2] Li X, Ling W, Khan S, et al. Therapeutic effects of intrabone and systemic mesenchymal stem cell cytotherapy on myeloma bone disease and tumor growth [J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(8): 1635-1648.
- [3] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. Autophagy, 2016, 12(1): 1-222.

(下转第 1463 页)

- in Postmenopausal Females; Correlation with Bone Mineral Density and Serum Biochemical Markers. *J Osteoporos*, 2013, 2013, 2013; 460210.
- [10] Chen Y, Whetstone HC, Youn A, et al. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *J Bio Chem*, 2007, 282(1): 526-533.
- [11] Garner P, Tabassi NC, Voorzanger-Rousselot N. Circulating dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with etanercept. *J Rheumatol*, 2008, 35(12): 2313-2315.
- [12] Corrado A, Neve A, Macchiarola A, et al. RANKL/OPG ratio and DKK-1 expression in primary osteoblastic cultures from osteoarthritic and osteoporotic subjects. *J Rheumatol*, 2013, 40(5): 684-694.
- (收稿日期: 2018-03-22; 修回日期: 2018-06-21)

(上接第 1450 页)

- [4] Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice[J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 885-889.
- [5] Zhang S, Zhang L, Zhang H, et al. Hongjingtian injection attenuates myocardial oxidative damage via promoting autophagy and inhibiting apoptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017(21): 1-11.
- [6] Mortensen M, Ferguson DJ, Edelman M, et al. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(2): 832-837.
- [7] 李军, 王倩, 林小星, 等. 自噬活性改变对骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(6): 675-679.
- [8] Liu X, Wang Y, Cao Z, et al. Staphylococcal lipoteichoic acid promotes osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells by increasing autophagic activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(2): 421-426.
- [9] Hu HM, Yang L, Wang Z, et al. Overexpression of integrin $\alpha 2$ promotes osteogenic differentiation of hBMSCs from senile osteoporosis through the ERK pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(5): 841-852.
- [10] 万永鲜, 徐丽丽, 卓乃强, 等. 自噬对骨质疏松症骨代谢的影响研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(4): 552-556.
- [11] Nuschke A, Rodrigues M, Stolz DB, et al. Human mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells consume accumulated autophagosomes early in differentiation[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(6): 140.
- [12] Chang KH, Sengupta A, Nayak RC, et al. p62 is required for stem cell/progenitor retention through inhibition of IKK/NF- κ B/Ccl4 signaling at the bone marrow macrophage-osteoblast niche[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(6): 2084-2097.
- [13] Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis[J]. *Autophagy*, 2014, 10(11): 1965-1977.
- [14] Zhang L, Guo YF, Liu YZ, et al. Pathway-based genome-wide association analysis identified the importance of regulation-of-autophagy pathway for ultradistal radius BMD[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(7): 1572-1580.
- [15] Marciano DP, Kuruvilla DS, Boregowda SV, et al. Pharmacological repression of PPAR γ promotes osteogenesis[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7443.
- (收稿日期: 2018-03-24; 修回日期: 2018-05-07)