

· 药物研究 ·

地塞米松通过线粒体途径诱导成骨细胞凋亡的研究

伍龙果 蔡劲薇 潘吉铭 梁敏*

广西医科大学第一附属医院内分泌科, 广西 南宁 530021

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 03-0380-06

摘要: **目的** 观察地塞米松对离体成骨细胞凋亡的影响,探讨地塞米松对成骨细胞凋亡的分子作用机制。**方法** 采用不同浓度地塞米松(10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} mol/L)干预SD大鼠离体成骨细胞,DAPI染色观察细胞核形态,透射电镜观察细胞核及线粒体形态,流式细胞术检测细胞凋亡率,JC-1荧光探针检测线粒体跨膜电位。**结果** 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} mol/L地塞米松干预24 h后,DAPI染色发现, 10^{-8} mol/L地塞米松组的成骨细胞很少发生凋亡, 10^{-6} mol/L和 10^{-4} mol/L地塞米松组的成骨细胞凋亡明显,地塞米松的浓度越高,核固缩、核裂解等凋亡现象越明显;透射电镜观察发现,随着地塞米松浓度增加,细胞核固缩明显,线粒体肿胀、空泡样变化现象增多;成骨细胞的凋亡率随着地塞米松浓度的增加而逐渐增高,与空白对照组相比, 10^{-8} mol/L地塞米松组细胞凋亡率无明显升高($P>0.05$), 10^{-6} mol/L和 10^{-4} mol/L地塞米松组的成骨细胞凋亡率分别较空白对照组增加7.240%和31.173%($P<0.05$);随着地塞米松浓度的增加,线粒体膜电位逐渐减低,与空白对照组相比较, 10^{-8} mol/L地塞米松组细胞膜电位下降不明显($P>0.05$), 10^{-6} mol/L和 10^{-4} mol/L地塞米松组膜电位下降分别较空白对照组降低6.814%和17.846%($P<0.05$)。**结论** 地塞米松通过激活线粒体途径诱导成骨细胞凋亡,存在浓度依赖性。

关键词: 地塞米松;成骨细胞;凋亡;超微结构

Apoptosis of osteoblasts induced-Dexamethasone via the mitochondria pathway

WU Longguo, CAI Jinwei, PAN Jiming, LIANG Min*

Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

* Corresponding author; LIANG Min, Email: liangm@gxmu.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate the effect of dexamethasone (Dex) induced apoptosis of osteoblasts in vitro and to explore the molecular mechanism of dexamethasone in the apoptosis of osteoblasts. **Methods** Different concentrations of dexamethasone (10^{-8} mol/L, 10^{-6} mol/L, 10^{-4} mol/L) were used in the isolated osteoblasts of SD rats. The nucleus morphology was observed by DAPI staining. The morphology of nuclei and mitochondria was observed by transmission electron microscopy. The apoptosis rate of osteoblasts was detected by flow cytometry, and the mitochondrial transmembrane potential was detected by JC-1 fluorescence probe. **Results** After intervention for 24 hours using 10^{-8} mol/L, 10^{-6} mol/L, and 10^{-4} mol/L dexamethasone, DAPI staining showed that the osteoblasts of 10^{-8} mol/L dexamethasone group were rarely apoptotic, and the apoptosis of osteoblasts in 10^{-6} mol/L and 10^{-4} mol/L dexamethasone groups was obvious, the higher the concentration of dexamethasone, the more obvious apoptotic phenomena, such as nuclear condensation and nuclear cracking. The transmission electron microscopy showed that with the increase of dexamethasone concentration, the nuclear condensation was obvious, the swelling and vacuolar changes of mitochondria increased. And the apoptosis rate of osteoblasts gradually increased with the increase of dexamethasone concentration. Compared with the blank control group, the apoptosis rate of 10^{-8} mol/L dexamethasone group was not significantly changed ($P>0.05$). The apoptosis rate of osteoblasts in 10^{-6} mol/L and 10^{-4} mol/L dexamethasone groups was increased by 7.240% and 31.173% respectively ($P<0.05$). With the increase of dexamethasone concentration, the mitochondrial membrane potential decreased gradually. Compared with the blank control group, the decrease of the cell membrane potential of 10^{-8} mol/L dexamethasone group was not obvious ($P>0.05$), The membrane potential of 10^{-6} mol/L and 10^{-4} mol/L dexamethasone groups decreased by 6.814% and 17.846% respectively ($P<0.05$). **Conclusion** Dexamethasone induces apoptosis of osteoblasts through activation of mitochondrial pathway in a concentration dependent manner.

基金项目: 国家自然科学基金(81260142,81760165)

* 通信作者: 梁敏, Email: liangm@gxmu.edu.cn

Key words: Dexamethasone; Osteoblasts; Apoptosis; Ultrastructure

地塞米松(dexamethasone, DEX)等糖皮质激素(glucocorticoid, GC)在临床上应用广泛,长期或大剂量使用糖皮质激素可引起骨量丢失,导致糖皮质激素性骨质疏松症(glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP),增加骨折发生风险,导致患者致死致残,严重影响患者的生活质量^[1]。GIOP的发病机制复杂,目前尚未完全阐明。有研究认为,成骨细胞凋亡是GIOP重要的发病机制之一^[2]。已知细胞凋亡信号通路有三条,分别是线粒体通路、内质网通路和死亡受体通路,其中线粒体凋亡通路是凋亡的主要途径^[3]。目前,尚无地塞米松对成骨细胞线粒体的超微结构改变的相关报道。本研究采用不同浓度的地塞米松干预体外培养SD大鼠的成骨细胞,检测成骨细胞的凋亡率,观察线粒体超微结构和线粒体膜电位的改变,探讨地塞米松对成骨细胞凋亡的分子作用机制,为临床防治GIOP提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物:SD大鼠(出生<24 h),不分雌雄,由广西医科大学动物中心提供。

1.2 实验材料与仪器

1.2.1 试剂:胎牛血清(Lonsera),低糖DMEM培养基、I型胶原酶(Gibco);地塞米松(Selleck);碱性磷酸酶BCIP/NBT染色试剂盒、JC-1试剂盒(碧云天);胰蛋白酶、茜素红S染色液、TritonX-100、DAPI溶液(索莱宝);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(BD公司)。

1.2.2 仪器:超净工作台(苏州净化公司),CO₂培养箱(Scientific公司),荧光倒置相差显微镜(Olympus公司),流式细胞仪(BD公司),荧光酶标仪(Scientific公司),电镜(HTACHI公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养:无菌条件下取出SD乳鼠的颅骨,放入PBS液中,清洗血迹、剔除附着的结缔组织。PBS液清洗3次,将清洗干净的骨片转移至3 mL 0.25%的胰蛋白酶溶液中,于37℃培养箱中消化10 min,用含胎牛血清的培养液终止消化,弃上清;骨片转移至5 mL 0.2%的I型胶原酶并完全剪碎约1 mm×1 mm×1 mm大小,置于37℃培养箱中消化2 h,1 000 r/min离心5 min,弃上清;用含10%的胎牛血清、100 mg/L链霉素、100 U/mL青霉素的DMEM培养液重悬沉淀物,接种于0.25 cm²的培养

瓶中,置于体积分数5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养,36 h后换液,以后每2天换液一次,连续消化纯化。待细胞密度>90%时,0.25%胰蛋白酶消化、传代。

1.3.2 成骨细胞鉴定:碱性磷酸酶染色鉴定:取对数增长期成骨细胞,按细胞密度1×10⁵/mL接种至无菌细胞培养皿中,48 h后弃培养皿中培养液,PBS液洗两次,95%乙醇固定15 min,按照碱性磷酸酶BCIP/NBT染色试剂盒说明书进行成骨细胞染色鉴定。

茜素红钙结节染色鉴定:连续培养细胞21 d后,弃培养液,用PBS液洗2次,95%乙醇固定15 min,用PBS液洗3次,0.2%茜素红染色45 min,PBS液冲洗3次,于倒置显微镜下拍照观察。

1.3.3 DAPI染色观察成骨细胞核的形态变化:取第2代对数生长期成骨细胞,消化重悬,按4×10⁴/mL接种于细胞爬片6孔板中,待细胞长至80%时进行干预,24 h后用镊子夹出细胞爬片,PBS液洗3次,4%多聚甲醛固定15 min,弃固定剂,PBS液洗3次,每次10 min。加入15 μg/mL 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)溶液常温避光孵育10 min,荧光显微镜下观察细胞核的形态学变化。

1.3.4 透射电镜观察成骨细胞及其线粒体变化:取第2代对数生长期的成骨细胞接种至培养瓶,待细胞密度达90%进行干预,24 h后弃培养液,PBS洗2次,用含有0.25%胰酶消化并收集细胞至15 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min;加入1 mL PBS并转移至1.5 mL EP管中,1 200 r/min离心5 min,清洗3次;弃上清,向沉淀中加入4%戊二醛,于4℃过夜,对样本进行一系列处理后,用透射电镜观察细胞切片并拍照。

1.3.5 Annexin V-FITC/PI流式细胞术测定成骨细胞凋亡率:将干预24 h后的细胞消化、离心、收集、漂洗,加入Binding Buffer 150 μL重悬细胞。加入Annexin V-FITC 5 μL充分混匀后再加入PI染色液10 μL,室内温度下避光反应10 min。最后,向各组细胞中加入Binding Buffer定容至500 μL,立即用流式细胞仪检测。

1.3.6 线粒体膜电位检测:取第4代的成骨细胞,按4×10⁴/mL密度接种于96孔板中,待其密度>90%,加入药物进行干预24 h,弃培养液,加入JC-1工作液(300 nmol/L JC-1),于37℃孵育20 min,JC-

1 缓冲液洗涤 2 次后,加入细胞培养液。荧光酶标仪检测线粒体膜电位。设置激发光为 490 nm、发射光为 530 nm 检测 JC-1 单体;设置激发光为 525 nm、发射光设为 590 nm 检测 JC-1 聚合物。

1.4 统计学处理

实验数据采用 SPSS 23.0 进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两两比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

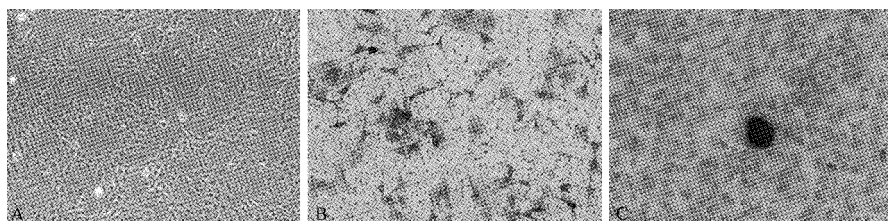


图 1 成骨细胞形态及染色

A:成骨细胞形态 $\times 40$ B:碱性磷酸酶染色 $\times 100$ C:茜素红染色 $\times 100$ 。

Fig.1 Morphology and staining of osteoblast

2.2 地塞米松对成骨细胞核影响

采用 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} mol/L 地塞米松干预成骨细胞 24 h, DAPI 染色后,用荧光显微镜观察,发现空白对照组成骨细胞界限清晰,胞质完整,胞浆丰富; 10^{-8} mol/L 地塞米松组成骨细胞界限较清晰,无明显细胞核缩小、核裂解,很少发生凋亡; 10^{-6} mol/L 和 10^{-4} mol/L 地塞米松组成骨细胞发生明显凋亡,细胞核缩小,可见核解体等凋亡现象;与 10^{-6} mol/L 地塞米松组相比, 10^{-4} mol/L 组成骨细胞凋亡现象明显增多。提示随着地塞米松的浓度增加,成骨细胞凋亡现象增加。见图 2。

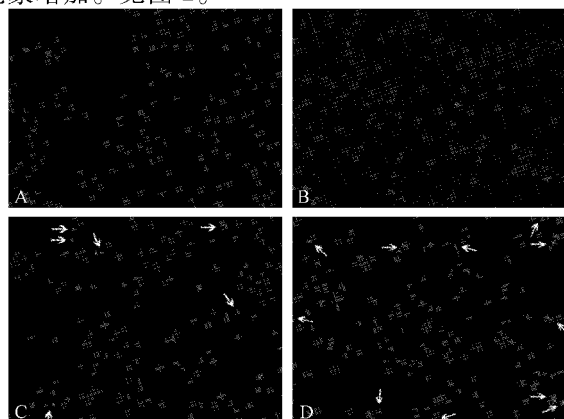


图 2 地塞米松对成骨细胞凋亡的影响($\times 40$)

A:空白对照组;B:DEX 10^{-8} mol/L; C: DEX 10^{-6} mol/L; D: DEX 10^{-4} mol/L 白色箭头所指为凋亡细胞核。

Fig. 2 Effect of dexamethasone on apoptosis of osteoblasts ($\times 40$)

2 结果

2.1 SD 大鼠体外培养成骨细胞的鉴定

纯化后的成骨细胞贴壁生长 48 h 后,细胞呈梭行、三角形等不规则形,可见胞质、胞核(图 1 A)。碱性磷酸酶染色后,成骨细胞胞浆中有许多染成紫黑色颗粒或块状沉淀(图 1 B)。成骨细胞连续培养 21 d 后,细胞会重叠生长,形成不透明的钙化结节,结节经茜素红染色呈橙红色(图 1 C)。

2.3 地塞米松对成骨细胞线粒体的影响

采用透射电镜观察,发现空白对照组成骨细胞中细胞核形状规整,胞质内线粒体丰富,线粒体结构完整,线粒体嵴清晰完整; 10^{-8} mol/L 地塞米松组成骨细胞的细胞核形状较规整,胞质内线粒体数目较多,线粒体结构较完整,线粒体嵴较清晰,与空白对照组相比,细胞核及线粒体结构变化不明显; 10^{-6} mol/L 地塞米松组成骨细胞的细胞核出现核固缩,核染色质致密浓染,凝集于核膜周边,出现染色质边集,胞质内线粒体数目较空白对照组的明显减少,线粒体肿胀,仍可见线粒体嵴; 10^{-4} mol/L 地塞米松组成骨细胞的细胞核固缩明显、染色质凝集成块,线粒体大小不一,肿胀明显,出现大量空泡样改变,线粒体嵴断裂(图 3)。

2.4 地塞米松对成骨细胞凋亡的影响

采用不同浓度的地塞米松干预成骨细胞 24 h,结果发现, 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} mol/L 组成骨细胞凋亡率分别为 $(2.070 \pm 0.644)\%$ 、 $(8.340 \pm 0.835)\%$ 、 $(32.273 \pm 0.870)\%$,与空白对照组相比较, 10^{-8} mol/L 组成骨细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$); 10^{-6} mol/L 和 10^{-4} mol/L 地塞米松组成骨细胞凋亡率明显升高, 10^{-6} mol/L 和 10^{-4} mol/L 地塞米松组的成骨细胞凋亡率分别较空白对照组增加 7.240% 和 31.173% ($P < 0.05$),差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。随着地塞米松浓度的增加,成骨细胞的凋亡率也逐渐升高,提示地塞米松可诱导成骨细胞凋

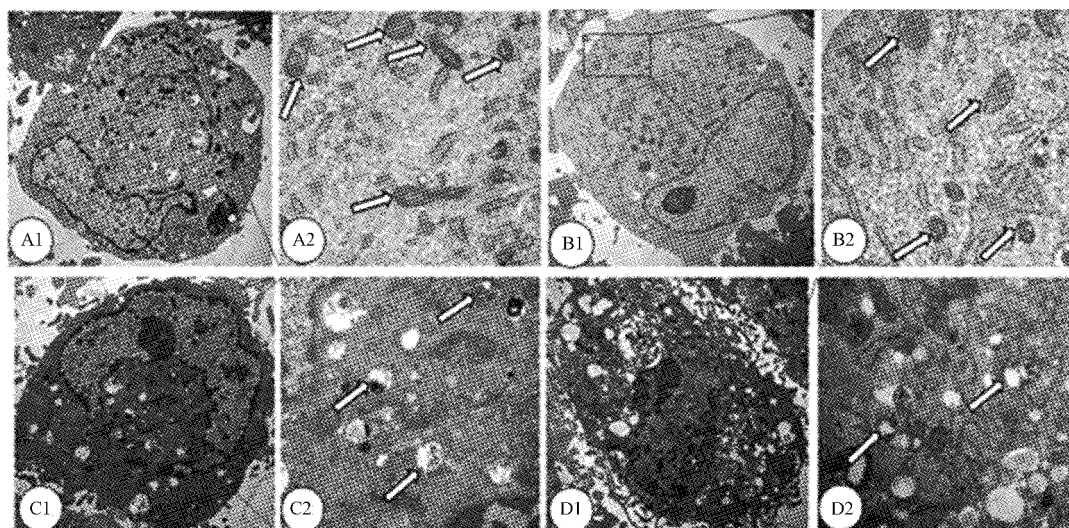


图3 透射电镜下观察地塞米松诱导成骨细胞凋亡的影响

A:空白对照组;B:DEX 10^{-8} mol/L;C:DEX 10^{-6} mol/L; D:DEX 10^{-4} mol/L; A1、B1、C1、D1 标尺 2 μ m, A2、B2、C2、D2 标尺 1 μ m;白色箭头所指为线粒体。

Fig.3 Effect of dexamethasone on osteoblasts apoptosis with transmission electron microscope

亡,呈剂量依赖性(表1)。

表1 地塞米松对成骨细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of dexamethasone on osteoblast apoptosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率(%)
空白对照组	1.100 $\pm$ 0.875
10^{-8} mol/L Dex 组	2.070 $\pm$ 0.644
10^{-6} mol/L Dex 组	8.340 $\pm$ 0.835 ^{ab}
10^{-4} mol/L Dex 组	32.273 $\pm$ 0.870 ^{abc}

注:与空白对照组相比,^a $P < 0.05$;与 10^{-8} mol/L 地塞米松组相比,^b $P < 0.05$;与 10^{-6} mol/L 地塞米松组相比,^c $P < 0.05$ 。

2.5 地塞米松对成骨细胞线粒体跨膜电位的影响

采用不同浓度地塞米松干预成骨细胞,结果发现 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} mol/L 组 F 值(即发生线粒体膜电位下降的细胞比例)分别为 $(45.760 \pm 2.811)\%$ 、 $(52.533 \pm 3.058)\%$ 、 $(63.565 \pm 3.107)\%$,与空白对照组相比较 $(45.719 \pm 4.076)\%$, 10^{-8} mol/L 组成骨细胞线粒体跨膜电位无明显下降,差异无统计学意义($P > 0.05$), 10^{-6} mol/L 和 10^{-4} mol/L 地塞米松组成骨细胞线粒体跨膜电位明显减低, 10^{-6} mol/L 和 10^{-4} mol/L 地塞米松组膜电位分别较空白对照组降低 6.814% 和 17.846% ($P < 0.05$),差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。随着地塞米松浓度的增加,成骨细胞线粒体跨膜电位逐渐下降,提示地塞米松可诱导线粒体电位减低,呈剂量依赖性(表2)。

表2 地塞米松对成骨细胞线粒体膜电位的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes in mitochondrial membrane potential of osteoblasts by dexamethasone ($\bar{x} \pm s$)

组别	F 值(%)
空白对照组	45.719 $\pm$ 4.076
10^{-8} mol/L Dex 组	45.760 $\pm$ 2.811
10^{-6} mol/L Dex 组	52.533 $\pm$ 3.058 ^{ab}
10^{-4} mol/L Dex 组	63.565 $\pm$ 3.107 ^{abc}

注:与空白对照组相比,^a $P < 0.05$;与 10^{-8} mol/L 地塞米松组相比,^b $P < 0.05$;与 10^{-6} mol/L 地塞米松组相比,^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

GC 在临床上应用广泛,在抗炎、抗休克、抑制免疫等方面发挥着重要的作用^[4]。国外一项约四万人的流行病学调查研究发现,约 1%~2% 的患者长期接受糖皮质激素治疗^[5]。长期服用地塞米松等糖皮质激素,可致内源性及外源性 GC 过多,引起骨质流失和 GIOP 等不良反应^[6]。引起这些不良反应是由于地塞米松可抑制骨形成,骨形成与成骨细胞的数量及变化密切相关^[7]。我们前期的研究也发现,长期、大剂量的地塞米松可明显抑制骨形成,导致 SD 大鼠发生骨质疏松^[8]。临床研究发现,长期使用 GC 治疗可引起骨组织中成骨细胞凋亡率增加、成骨细胞数量减少。细胞实验研究证实,大剂量地塞米松可诱导成骨细胞凋亡^[9-10],但具体的凋亡机制目前仍不明确。

常用检测细胞凋亡的方法有:①显微镜观察;②荧光标记膜蛋白;③流式细胞术;④ TUNEL 等^[11]。透射电镜可以观察到细胞在凋亡不同时期超微结构的变化,比生化指标更敏感,被认为是研究细胞凋亡的经典方法^[12]。本研究通过采用透射电镜观察成骨细胞及其线粒体超微结构、检测成骨细胞线粒体跨膜电位的变化,探讨地塞米松诱导成骨细胞凋亡可能的机制。

DAPI 是一种可与细胞核中的双链 DNA 结合的荧光染料^[13]。对细胞核进行 DAPI 染色后,用荧光显微镜观察细胞核的变化以判断细胞凋亡的进程。本研究采用 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} mol/L 的地塞米松干预成骨细胞,DAPI 染色结果显示, 10^{-6} mol/L 和 10^{-4} mol/L 的地塞米松作用于成骨细胞 24 h 后,成骨细胞出现核解体、核固缩等典型的凋亡特征;而 10^{-8} mol/L 地塞米松组成骨细胞凋亡不明显。我们进一步采用流式细胞术检测成骨细胞凋亡,结果发现,随着地塞米松浓度的增大,成骨细胞的凋亡率也随之增高, 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} mol/L 地塞米松组成骨细胞凋亡率分别较空白对照组增加 0.970%、7.240% 和 31.173%,呈剂量依赖性。Liu 等^[14]的研究也发现随着地塞米松浓度的增高,成骨细胞的凋亡率逐渐增加。采用透射电镜观察成骨细胞的超微结构,结果发现,随着地塞米松浓度的增加,细胞核固缩、染色质边集现象明显,这提示地塞米松可诱导细胞凋亡;同时随着地塞米松浓度的增加,成骨细胞的线粒体肿胀、空泡样变化增多,提示地塞米松诱导成骨细胞凋亡可能与线粒体结构改变有关。

线粒体是细胞凋亡过程中的核心细胞器,线粒体跨膜电位变化与细胞凋亡关系密切^[15]。在细胞凋亡过程中,线粒体内膜的通透性变化引起线粒体跨膜电位改变^[16]。当各种凋亡信号刺激线粒体,导致线粒体膜电位下降甚至消失,从而启动细胞凋亡程序^[17]。国内有研究发现,随着地塞米松浓度的增加,MC3T3-E1 成骨样细胞的线粒体膜电位逐渐下降^[18]。本研究也发现,随着地塞米松浓度的增加,线粒体跨膜电位明显下降, 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} mol/L 地塞米松组成骨细胞线粒体跨膜电位分别较空白对照组下降 0.04%、6.81%、17.85%,提示地塞米松可引起成骨细胞线粒体膜电位下降,呈剂量依赖性,从而诱导了成骨细胞凋亡。

综上所述, 10^{-6} mol/L 和 10^{-4} mol/L 地塞米松可诱导 SD 大鼠体外分离培养的成骨细胞发生凋亡,其机制可能与线粒体有关。

【参 考 文 献】

- [1] Wang T, Yu X. Pro-inflammatory cytokines: cellular and molecular drug targets for glucocorticoid-induced-osteoporosis via osteocyte[J]. *Current Drug Targets*, 2018, 19(8): 1-15.
- [2] Moriishi T, Komori T. Glucocorticoid and Bone The inhibition of osteoblast differentiation and induction of osteocyte apoptosis through the regulation of Bcl-2 by glucocorticoids [J]. *Clin Calcium*, 2014, 24(9): 1329-1336.
- [3] Zhang JY, Yi T, Liu J, et al. Quercetin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in KB and KBv200 cells [J]. *J Agricult Food Chem*, 2013, 61(9): 2188-2195.
- [4] 夏正坤. 糖皮质激素临床应用再认识 [J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(2): 113-117.
- [5] Overman RA, Yeh JY. Prevalence of oral glucocorticoid usage in the United States: a general population perspective [J]. *Arthritis Care Res*, 2013, 65(2): 294-298.
- [6] Yang J, Wu Q, Lv J. 4-Phenyl butyric acid prevents glucocorticoid-induced osteoblast apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress [J]. *J Bone Mineral Metabol*, 2017, 35(4): 366-374.
- [7] Lin H, Gao X, Chen G, et al. Indole-3-carbinol as inhibitors of glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblastic cells through blocking ROS-mediated Nrf2 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Communicat*, 2015, 460(2): 422-427.
- [8] 吴丽婷, 蔡劲薇, 潘吉铭, 等. 不同剂量和作用时间地塞米松对大鼠骨密度和成骨细胞作用的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(6): 762-768.
- [9] Yu W, Zhu C, Xu W, et al. Neuropeptide Y1 receptor regulates glucocorticoid-induced inhibition of osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells via ERK signaling [J]. *Int J Molecul Sci*, 2016, 17(12): 1-13.
- [10] Ding S, Peng H, Fang HS, et al. Pulsed electromagnetic fields stimulation prevents steroid-induced osteonecrosis in rats [J]. *BMC Musculoskel Disorders*, 2011 (12): 215.
- [11] Zhou C, Yu C, Guo L, et al. Study of the Effects of ER on Apoptosis and Proliferation of Hormone-Independent Prostate Cancer Cell Lines PC-3M [J]. *Bio Med Res Int*, 2018, 6(19): 1-10.
- [12] Kerr JF, Wyllie AH. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239-257.
- [13] Won SJ, Ki YS, Chung KS, et al. 3 α , 23-isopropylidenedioxyolean-12-en-27-oic acid, a triterpene isolated from *Aceriphyllum rossii*, induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress [J]. *Bio Pharmaceut Bulletin*, 2010, 33(9): 1620-1626.
- [14] Liu W, Zhao Z, Na Y, et al. Dexamethasone-induced production of reactive oxygen species promotes apoptosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy in MC3T3-E1 cells [J]. *Int J Molecul Med*, 2018, 41(4): 2028-2036.

(下转第 403 页)

- events reported in clinical trials[J]. Clin Oral Implants Res, 2016,27(3): 367-375.
- [27] de Boissieu P, Kanagaratnam L, Mahmoudi R, et al. Adjudication of osteonecrosis of the jaw in phase III randomized controlled trials of denosumab: a systematic review[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2017,73(5): 517-523.
- [28] Body JJ, Bone HG, de Boer RH, et al. Hypocalcaemia in patients with metastatic bone disease treated with denosumab[J]. Eur J Cancer, 2015,51(13): 1812-1821.
- [29] Huynh AL, Baker ST, Stewardson AJ, et al. Denosumab-associated hypocalcaemia: incidence, severity and patient characteristics in a tertiary hospital setting [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2016,25(11): 1274-1278.
- [30] Miller PD, Bolognese MA, Lewiecki EM, et al. Effect of denosumab on bone density and turnover in postmenopausal women with low bone mass after long-term continued, discontinued, and restarting of therapy: a randomized blinded phase 2 clinical trial[J]. Bone, 2008,43(2): 222-229.
- [31] Anastasilakis AD, Yavropoulou MP, Makras P, et al. Increased osteoclastogenesis in patients with vertebral fractures following discontinuation of denosumab treatment[J]. Eur J Endocrinol, 2017,176(6): 677-683.
- [32] Cummings SR, Ferrari S, Eastell R, et al. Vertebral fractures after discontinuation of denosumab: a post hoc analysis of the randomized placebo-controlled FREEDOM trial and its extension [J]. J Bone Miner Res, 2018,33(2): 190-198.
- [33] Maugars Y, Bart G, Guillot P, et al. Multiple vertebral osteonecroses (Kummell's disease) after 10 years on denosumab: is osteocyte apoptosis to blame[J]? Calcif Tissue Int, 2018,102(3): 368-372.
- [34] Brown JP, Roux C, Torring O, et al. Discontinuation of denosumab and associated fracture incidence: analysis from the Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis Every 6 Months (FREEDOM) trial [J]. J Bone Miner Res, 2013,28(4): 746-752.
- [35] Horne AM, Mihov B, Reid IR. Bone loss after romosozumab/denosumab: effects of bisphosphonates[J]. Calcif Tissue Int, 2018,103(1): 55-61.
- [36] Anagnostis P, Paschou SA, Mintziori G, et al. Drug holidays from bisphosphonates and denosumab in postmenopausal osteoporosis: EMAS position statement [J]. Maturitas, 2017, 101: 23-30.
- [37] Tsourdi E, Langdahl B, Cohen-Solal M, et al. Discontinuation of Denosumab therapy for osteoporosis: A systematic review and position statement by ECTS[J]. Bone, 2017,105: 11-17.
- [38] Parthan A, Kruse M, Agodoa I, et al. Denosumab: a cost-effective alternative for older men with osteoporosis from a Swedish payer perspective[J]. Bone, 2014,59: 105-113.
- [39] Morizio P, Burkhart JI, Ozawa S. Denosumab: a unique perspective on adherence and cost-effectiveness compared with oral bisphosphonates in osteoporosis patients [J]. Ann Pharmacother, 2018,52(10): 1031-1041.

(收稿日期: 2018-05-20;修回日期: 2018-06-28)

(上接第 384 页)

- [15] Ding DW, Zhang YH, Huang XE, et al. Bufalin induces mitochondrial pathway-mediated apoptosis in lung adenocarcinoma cells[J]. APJCP, 2014,15(23): 10495-10500.
- [16] Mane SD, Thoh M, Sharma D, et al. Ascorbyl Stearate Promotes Apoptosis Through Intrinsic Mitochondrial Pathway in HeLa Cancer Cell[J]. Anticancer Res, 2016,36(12): 6409-6417.
- [17] Qiu Y, Yu T, Wang W, et al. Curcumin-induced melanoma cell death is associated with mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening[J]. Biochem Biophys Res Communicat, 2014, 448(1): 15-21.
- [18] 赵硕,李成.糖皮质激素通过线粒体途径诱导成骨细胞凋亡[J].中国生化药物杂志, 2015, 35(7): 35-38.

(收稿日期: 2018-08-01;修回日期: 2018-08-22)

(上接第 392 页)

- [42] Marietta EV, Murray JA, Luckey DH, et al. Suppression of Inflammatory arthritis by human gut-derived prevotella histicola in humanized mice [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(12): 2878-2888.
- [43] Pianta A, Arvikar SL, Strle K, et al. Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints [J]. J Clin Invest, 2017, 127(8): 2946-2956.
- [44] Iain B McInnes, Georg Schett. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2011,365(23): 2205-2219.
- [45] Braun JSJ. Ankylosing spondylitis[J]. Lancet 2007, 369(9570): 1379-1390.
- [46] Rashid TEA. Ankylosing spondylitis is linked to Klebsiella-the evidence[J]. Clin Rheumatol, 2007,26(6): 858-864.
- [47] Costello ME, Ciccio F, Willner D, et al. Brief Report: Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis [J]. Arthritis Rheumatol, 2015,67(3): 686-691.
- [48] Dominguez-López ML, Burgos-Vargas R, Galicia-Serrano H, et al. IgG antibodies to enterobacteria 60 kDa heat shock proteins in the sera of HLA-B27 positive ankylosing spondylitis patients [J]. Scand J Rheumatol, 2002,31(5): 260-265,.
- [49] Wen C, Zheng Z, Shao T, et al. Quantitative metagenomics reveals unique gut microbiome biomarkers in ankylosing spondylitis[J]. Genome Biol, 2017,18(1): 142.

(收稿日期: 2017-11-29;修回日期: 2018-03-14)