

· 论 著 ·

骨质疏松大鼠骨髓巨噬细胞的体外培养研究

周玲^{1,2,3} 许雄程^{1,2,3} 王松^{1,2,3} 何梦娇¹ 罗岚^{1,2,3} 陈玉玲¹ 李艳芬^{1*} 骆凯^{1*}

1. 福建医科大学附属口腔医院,福建 福州 350002

2. 福建省高校口腔医学重点实验室,福建 福州 350002

3. 福建医科大学口腔医学研究院,福建 福州 350002

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 04-0439-07

摘要: **目的** 体外分离培养骨质疏松大鼠骨髓巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMMs)并探讨其生物学行为。**方法** 采用双侧卵巢切除术建立大鼠绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)动物模型并分离培养骨质疏松大鼠 BMMs。通过倒置显微镜和瑞氏-姬姆萨染色对细胞进行形态学观察;通过 CCK-8 法检测骨质疏松大鼠 BMMs 的增殖能力;运用免疫荧光染色及荧光定量 PCR 法分析骨质疏松状态下大鼠 BMMs 的极化及炎症相关因子的表达情况。**结果** 成功建立大鼠 PMO 模型并分离培养骨质疏松大鼠 BMMs。骨质疏松大鼠 BMMs 主要呈多角形及煎蛋样。与假手术组相比, BMMs 的增殖能力较高。免疫荧光染色可见骨质疏松大鼠 BMMs 高表达 CCR7,低表达 MRC1。荧光定量 PCR 检测结果提示,骨质疏松大鼠 BMMs 促炎因子 TNF- α 及 IL-6 的表达较高,而抗炎因子 IL-10 及 TGF- β 的表达相对较低。**结论** 去卵巢可影响大鼠 BMMs 的增殖能力、细胞表面极化标志物以及炎症相关因子的表达水平。

关键词: 骨髓巨噬细胞;骨质疏松;去卵巢;极化

Culture of osteoporotic rat bone marrow-derived macrophages in vitro

ZHOU Ling^{1,2,3}, XU Xiongcheng^{1,2,3}, WANG Song^{1,2,3}, HE Mengjiao¹, LUO Lan^{1,2,3}, CHEN Yuling¹, LI Yanfen^{1*}, LUO Kai^{1*}

1.School and Hospital of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou 350002

2.Key Laboratory of Stomatology, Fujian Province University, Fuzhou 350002

3.Institute of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China

* Corresponding authors: LI Yanfen, Email: liyanfen2003@126.com; LUO Kai, Email: luokai39@163.com

Abstract: **Objective** To isolate and culture osteoporotic rat bone marrow-derived macrophages(BMMs) in vitro and explore their biological behaviors. **Methods** The postmenopausal osteoporosis (PMO) model of SD rats was established by bilateral ovariectomy. BMMs from osteoporotic rat were isolated and cultured *in vitro*. Inverted microscope and Wright Giemsa staining were employed for morphological observation of BMMs. The proliferation of BMMs from osteoporotic rat were detected by CCK-8 assay. The polarization and inflammation-related factors of BMMs in the PMO state were evaluated by immunofluorescence staining and real-time PCR. **Results** PMO model was established successfully. BMMs were mainly polygonal and omelette-like in osteoporotic rat. Comparing to sham group, the proliferation of osteoporotic rat BMMs significantly elevated. Immunofluorescence staining showed that BMMs of OVX group had higher expression of CCR7 and lower expression of MRC1. Real-time PCR demonstrated that the expression of pro-inflammatory factors of TNF- α and IL-6 increased in osteoporotic rat BMMs, while the expression of anti-inflammatory factors of IL-10 and TGF- β decreased. **Conclusion** Ovariectomy affects the proliferation, polarization and inflammation-related factors expression in rat BMMs.

Key words: bone marrow-derived macrophages; osteoporosis; ovariectomy; polarization

基金项目: 国家自然科学基金(81870766);福建省科技创新联合
资金项目(2016Y9023);福建省卫生计生委青年科研项目(2016-1-72)

* 通信作者: 李艳芬, Email: liyanfen2003@126.com; 骆凯,
Email: luokai39@163.com

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨微观结构退化为特征的一种全身性骨骼疾病^[1]。更年期妇女由于体内雌激素水平降低,易出现绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)。

PMO患者随着体内雌激素水平的降低,骨代谢平衡被打破,骨吸收大于骨形成,出现骨量减少和骨微观结构退化。患者常由于骨脆性增加,引起骨骼变形,导致骨折甚至死亡,严重影响生活质量^[2]。因此,PMO的预防及治疗对提高更年期妇女的生活质量具有重要的临床意义。骨改建是由破骨细胞(osteoclasts, OC)、成骨细胞和骨细胞等多种细胞及细胞因子共同参与的过程^[3]。巨噬细胞作为OC的前体细胞,在OC参与的骨吸收活动中发挥着重要的作用^[4]。巨噬细胞可通过分泌肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) α 、白细胞介素(interleukin, IL)6、IL-10等炎症因子参与骨改建。当前对PMO状态下骨髓巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMMs)生物学活性的研究鲜有报道。因此,本研究拟通过体外分离培养PMO大鼠BMMs,探讨去卵巢对大鼠BMMs生物学行为的影响,为深入研究PMO的发病机制与防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3月龄同批次SPF级健康雌性未孕Sprague-Dawley(SD)大鼠20只,体重250~300g(由中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院提供),随机分为实验组与对照组。实验严格遵守福建医科大学动物伦理委员会准则。

1.2 实验试剂及仪器

DMEM培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶(Hyclone,美国);巨噬细胞集落刺激因子[macrophage colony stimulating factor, M-CSF(Pepro Tech,美国)];链霉素、青霉素、红细胞裂解液、DAPI(上海碧云天生物技术有限公司);快速瑞氏-姬姆萨染液(南京建成科技有限公司);CCK-8(Cell Counting Kit-8)(同仁化学研究所);反转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、荧光定量PCR试剂盒SYBR Premix Ex Taq™(Takara,日本);引物合成(上海生工工程股份有限公司);兔抗大鼠趋化因子受体7(CC-chemokine receptor 7, CCR7)单克隆抗体、兔抗大鼠甘露糖受体1(mannose receptor C-type 1, MRC1)单克隆抗体(Abcam,美国)。

HEAL FORCE超净工作台(苏州净化设备有限公司);生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);冷冻高速离心机(Heraeus,德国);细胞培养箱

(Heraeus,德国);倒置荧光相差显微镜(Olympus,日本);iMARK酶标仪(Bio-Rad,美国);实时荧光定量PCR仪(Roche LightCycler 480,德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 去卵巢PMO大鼠模型的建立:20只SD大鼠经腹腔注射氯胺酮(100 mg/kg)麻醉,随机分为实验组和对照组,每组各10只。参考课题组方法^[5],实验组即去卵巢(ovariectomy, OVX)组,在无菌操作下完整摘除大鼠双侧卵巢;对照组即假手术(sham-operated, Sham)组,在无菌操作下摘除卵巢附近大小相近的脂肪组织。术后根据组别分笼常规喂养。术后6周、12周记录两组大鼠的体重,术后12周取两组大鼠子宫及股骨做病理切片HE染色,以明确大鼠PMO模型的建立。

1.3.2 大鼠BMMs的分离培养:术后12周经腹腔注射氯胺酮(100 mg/kg)麻醉处死各组大鼠,参考文献方法^[6]于无菌操作下快速取出完整股骨及胫骨,去除附着的骨膜及筋肉,剪除两端干骺端,用DMEM培养液从两端交替冲洗骨髓腔并收集冲洗液,1 000 r/min离心5 min,弃上清,重悬。悬液经细胞筛过滤后离心,加入适量红细胞裂解液,重悬,静置5 min。再次离心,重悬,PBS洗3遍。以含10%FBS、青霉素100 U/mL、链霉素100 μ g/mL及30 ng/mL M-CSF的DMEM完全培养液重悬,置于培养箱中常规培养。每3天更换培养液,在倒置相差显微镜下观察并拍照。细胞生长达80%~90%融合时,以0.25%胰酶+0.1%EDTA消化细胞进行后续实验。

1.3.3 瑞氏-姬姆萨染色:分别将OVX组与Sham组大鼠BMMs以 1×10^5 个/孔的密度接种于24孔板中,待细胞贴壁后,用4%多聚甲醛于室温下固定20 min,按照瑞氏-姬姆萨染液操作说明进行染色,在倒置相差显微镜下观察拍照。

1.3.4 CCK-8增殖实验:将OVX组与Sham组大鼠BMMs以 3×10^3 个/孔的密度种于96孔板,分别于接种后第3天和第5天采用CCK-8检测细胞的增殖能力。即取两组细胞各6孔,根据CCK-8试剂盒操作说明,每孔加入200 μ L新鲜配置CCK-8溶液,37℃孵育4 h后用酶标仪于450 nm波长处测定光密度值(optical density, OD)。

1.3.5 免疫荧光染色:将两组细胞以 1×10^5 个/孔分别接种于24孔板内,待细胞贴壁后,用4%多聚甲醛于室温下固定20 min,加入0.1% Triton X-100通透细胞膜,PBS轻轻冲洗2次,每孔加入含BSA的

PBS 封闭 30 min 后分别加入兔抗大鼠 CCR7 及 MRC1 单克隆抗体,于室温孵育 2 h。经 PBS 冲洗 3 遍,DAPI 染色,在倒置荧光相差显微镜下观察并拍照,通过 Image-Pro Plus 6.0 软件分析荧光表达强度。

1.3.6 实时荧光定量 PCR: 分别将生长状态良好

的 OVX 组及 Sham 组大鼠 BMMs 以 2×10^5 个/孔接种于 12 孔板,24 h 后吸弃培养液,PBS 清洗 3 次,采用 Trizol 提取细胞的总 RNA,经逆转录合成 cDNA。按照试剂盒说明书操作,采用实时荧光定量 PCR 检测两组细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 及 TGF- β 的表达,以 GAPDH 为内参。引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers used for real-time PCR

Target Gene	Forward Primer(5' to 3')	Reverse Primer(5' to 3')
GAPDH	CGGCAAGTTCAACGGCAGCTCAAGG	ACGACAATACTCAGCACCAGCATCACC
TNF- α	GACTGGCGTGTTCATCCG	TCTGAGCATCGTAGTTGTTGG
IL-6	ACCAAGACCATCCAACCTCATC	GTCCACAAACTGATATGCTTAGG
IL-10	GGAGTGAAGACCAGCAAAGG	ACTAAGGAATCTGTCAGCAGTATG
TGF- β	AATTCTCTCCCTTACCTTGC	CCTGTATTCCCTCTCCTTGC

1.4 统计学分析

上述实验均重复 3 次,实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 24.0 软件两样本 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 PMO 模型的建立

实验组及对照组大鼠术后均存活,未见异常。术前两组大鼠体重无明显差异,术后两组大鼠体重均有增加,OVX 组大鼠术后 6 周、12 周体重均明显大于 Sham 组 ($P < 0.001$),见图 1a。组织学染色结果显示术后 12 周,Sham 组大鼠的子宫腺腔扩张、腺体丰富(图 1b),股骨远端骨小梁排列较为整齐,呈网状结构(图 1d);而 OVX 组大鼠的子宫体积缩小,腺腔闭合,腺体萎缩(图 1c),股骨远端松质骨吸收明显,骨小梁不连续且数目明显减少,由于骨小梁变细使得骨髓腔面积变大(图 1e)。

2.2 BMMs 原代培养及形态学观察

去卵巢及假手术组大鼠 BMMs 原代培养 24 h,在倒置显微镜下可见有巨噬细胞贴壁,细胞透亮,折光性佳。细胞膜完整,边界清晰,可见少量伪足伸出,细胞核较大,呈圆形。培养 6 d 左右,细胞形态更为多样,在倒置显微镜下可见呈长梭形、多角形、鹅卵石状的巨噬细胞。随着培养时间的延长,细胞数量逐渐增多。Sham 组细胞的形态主要呈长梭形(图 2a、图 2b);OVX 组细胞的形态主要呈多角形(图 2c、图 2d)。

2.3 大鼠 BMMs 瑞氏-姬姆萨染色观察

瑞氏-姬姆萨染色结果显示大鼠 BMMs 呈长梭形、多角形及煎蛋样。其中 Sham 组 BMMs 的形态

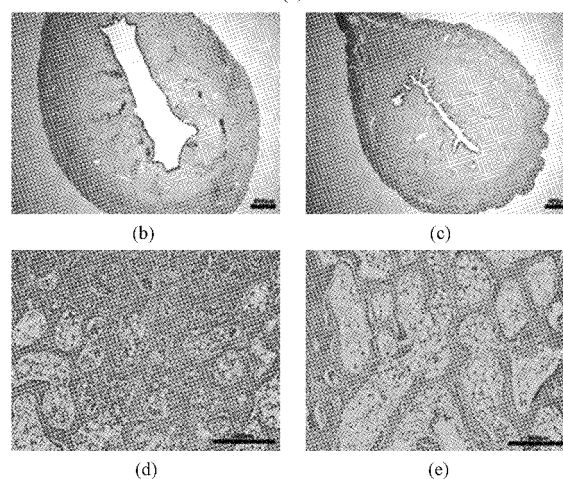
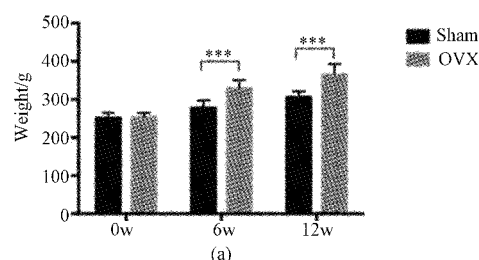


图 1 大鼠 PMO 模型的建立 a: 两组大鼠手术前后体重比较; b: Sham 组大鼠子宫 HE 染色; c: OVX 组大鼠子宫 HE 染色; d: Sham 组大鼠股骨 HE 染色; e: OVX 组大鼠股骨 HE 染色; *** $P < 0.001$, 标尺 400 μm 。

Fig. 1 Establishment of rat osteoporosis model a: comparison of body weight before and after ovariectomy in two groups; b: the uterus hematoxylin-cosin (H&E) stain of Sham rats; c: the uterus H&E stain of OVX rats; d: the femur H&E stain of Sham rats; e: the femur H&E stain of OVX rats. *** $P < 0.001$, Bars 400 μm .

主要为长梭形(图 3a、图 3b);OVX 组 BMMs 主要呈煎蛋样及多角形(图 3c、图 3d)。

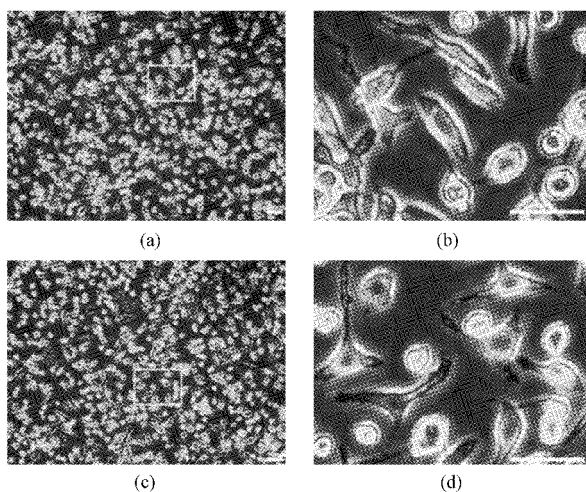


图 2 大鼠 BMMs 原代培养 a&b: Sham 组; c&d: OVX 组; 标尺 50 μm。

Fig.2 The morphological appearance of rat BMMs a&b: Sham group; c&d: OVX group. Bars 50 μm.

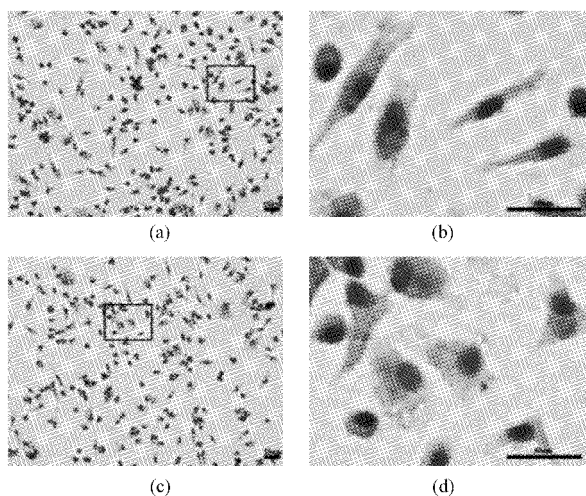


图 3 大鼠 BMMs 瑞氏-姬姆萨染色 a&b: Sham 组; c&d: OVX 组; 标尺 50 μm。

Fig.3 Wright-Giemsa staining of rat BMMs. a&b: Sham group; c&d: OVX group. Bars 50 μm.

2.4 去卵巢对大鼠 BMMs 增殖能力的影响

CCK8 检测结果显示细胞接种后 3 d 和 5 d, OVX 组大鼠 BMMs 的 OD 值均显著高于 Sham 组 ($P < 0.001$), 提示大鼠去卵巢后随着雌激素水平的降低 BMMs 的增殖能力相应的增强(图 4)。

2.5 去卵巢对大鼠 BMMs 极化的影响

免疫荧光染色结果可见, 相较于 Sham 组, OVX 组大鼠 BMMs 高表达 M1 型巨噬细胞标志物 CCR7 (图 5a、图 5b), 而 M2 型巨噬细胞标志物 MRC1 的

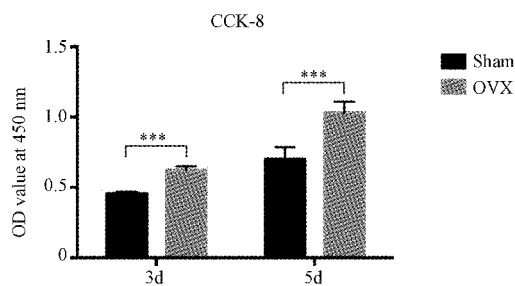


图 4 去卵巢对大鼠 BMMs 增殖的影响 (***) $P < 0.001$

Fig.4 The effect of ovariectomy on proliferation of rat BMMs (***) $P < 0.001$

荧光强度较低(图 6a、图 6b)。该结果提示 PMO 状态下, BMMs 更倾向于向 M1 型极化。

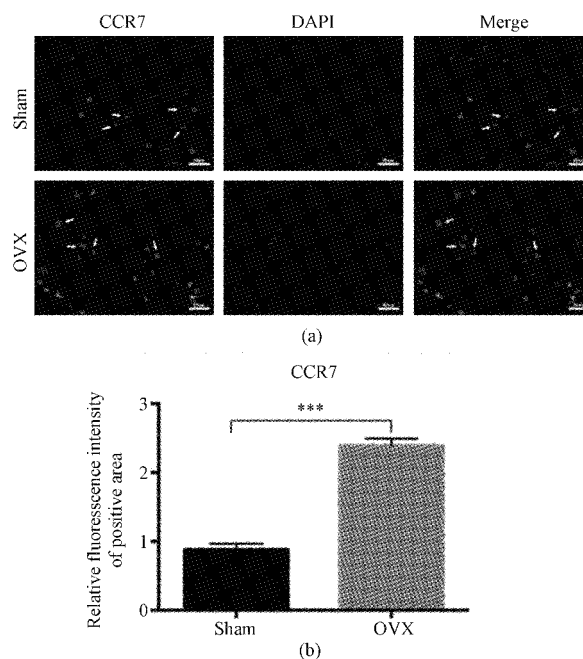


图 5 大鼠 BMMs CCR7 免疫荧光染色 a: CCR7 免疫荧光染色; b: CCR7 荧光强度定量分析。标尺 50 μm。

Fig.5 Immunofluorescence staining of CCR7 in rat BMMs a: Immunofluorescence images of CCR7; b: Quantitative analysis of CCR7 fluorescence intensity. Bars 50 μm.

2.6 去卵巢对大鼠 BMMs 炎症相关基因表达的影响

荧光定量 PCR 检测结果显示体外培养 24 h, OVX 组大鼠 BMMs 的 TNF-α 及 IL-6 的表达水平显著高于 Sham 组(图 7a、图 7b); 而 IL-10 及 TGF-β 的表达水平显著低于 Sham 组(图 7c、图 7d), 该结果提示 PMO 大鼠 BMMs 高表达促炎因子, 而抗炎因子的表达较低。

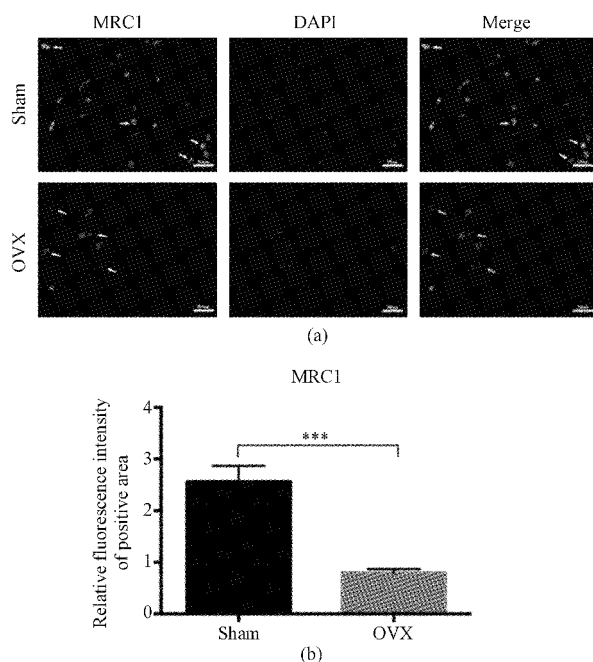


图6 大鼠 BMMs MRC1 免疫荧光染色 a: MRC1 免疫荧光染色; b: MRC1 荧光强度定量分析. 标尺 50 μm 。

Fig.6 Immunofluorescence staining of MRC1 in rat BMMs a: Immunofluorescence images of MRC1; b: Quantitative analysis of MRC1 fluorescence intensity. Bars 50 μm .

3 讨论

当前学者们常采用建立骨质疏松动物模型来开展骨质疏松的相关研究。成年雌性大鼠由于去卵巢后骨松质的骨量减少,骨转换率增高,与绝经后妇女骨质疏松代谢特点相似,因而常被用于构建 PMO 模型进行相关实验研究^[7]。本研究采用切除 SD 大鼠双侧卵巢建立 PMO 模型,术后 12 周可见 OVX 组大鼠体重较 Sham 组明显增加;HE 染色可见 OVX 组大鼠子宫体积缩小,腺体萎缩;股骨远端骨小梁变薄,数目减少。上述结果证实本研究成功建立 PMO 大鼠模型。

细胞增殖是评价细胞活性、代谢、生理和病理状况的重要指标。相较于 MTT 法而言,CCK8 法操作简便,可最大限度的减少实验误差^[8]。因此本实验选择 CCK8 法检测 PMO 大鼠 BMMs 的增殖能力。实验结果发现体外培养不同时间点 OVX 组 BMMs 的增殖水平始终高于 Sham 组。课题组前期研究^[9]也发现 PMO 大鼠颌骨成骨细胞的增殖能力较强。Gao 等^[10]研究报道去卵巢大鼠的骨髓基质细胞增殖能力高于正常大鼠。结合上述研究结果,笔者推测 PMO 大鼠 BMMs 增殖能力的提高可能是由于 PMO 状态下机体处于高代谢水平。

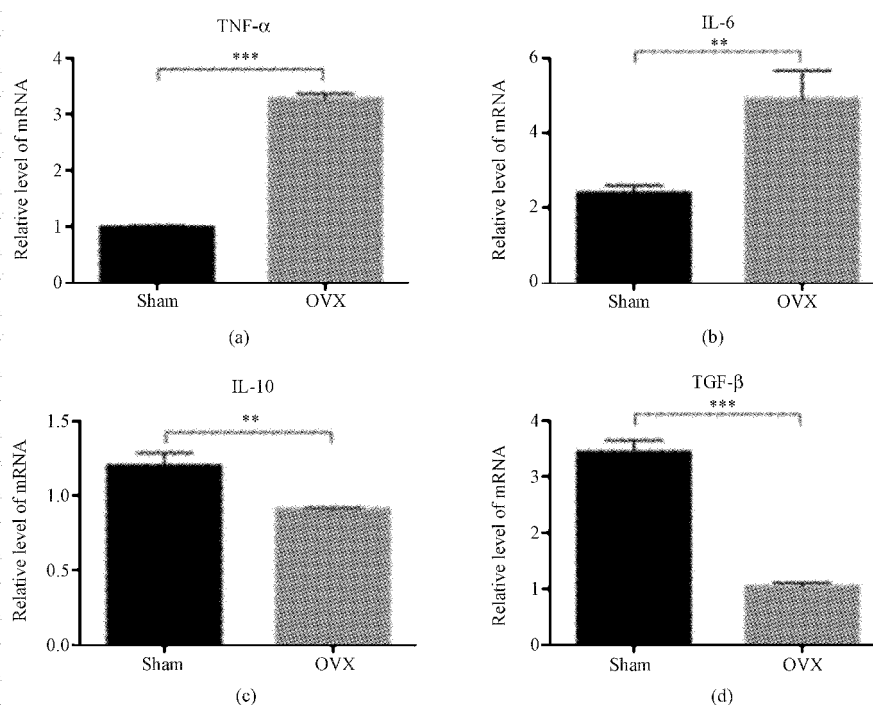


图7 大鼠 BMMs 炎症相关基因表达检测 (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

Fig.7 Inflammation-related gene expression of rat BMMs (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

OP 是由于骨吸收大于骨形成而导致骨重建失衡的慢性骨破坏性疾病,OP 形成过程涉及 OC、成骨细胞等以及细胞因子的共同参与^[1]。OC 由单核巨噬细胞分化而来,是高度分化的多核巨细胞,可直接参与骨吸收。巨噬细胞作为 OC 的前体细胞,表面含有核因子 κ B 受体活化因子 (receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK), 可经由 M-CSF 和核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 诱导形成 OC 参与骨吸收^[4]。日前学者们普遍认为巨噬细胞在局部微环境中主要分为经典型 (M1) 巨噬细胞和非经典型 (M2) 巨噬细胞^[11]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 或干扰素 (interferon, INF) γ 可通过信号传导及转录激活因子 1 (signal transducers and activators of transcription 1, STAT1) 途径激活单核细胞,使其形成经典的 M1 型巨噬细胞;IL-13 或 IL-4 则通过 STAT6 途径,诱导巨噬细胞成为非经典的 M2 型^[12]。M1 型巨噬细胞主要发挥促炎、抗菌及呈递抗原的功能,M2 型巨噬细胞主要起抑制炎症和组织修复的作用^[13]。M1 和 M2 型巨噬细胞形态差异较大,M1 型巨噬细胞可伸出伪足,呈多角形及煎蛋样;M2 型巨噬细胞主要呈长梭形^[14]。本实验通过倒置相差显微镜对体外培养大鼠原代 BMMs 的形态进行观察并进行瑞氏-姬姆萨染色,结果发现 OVX 组大鼠 BMMs 主要呈煎蛋样及多角形,Sham 组大鼠 BMMs 主要呈长梭形。BMMs 形态的变化提示 PMO 状态下大鼠 BMMs 更趋向于向 M1 型极化。

M1 和 M2 型巨噬细胞存在不同的表面标志物。M1 型巨噬细胞表面标志物主要为 CCR7、CD86 及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS),可分泌 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎因子防御病原体,提供抗原和启动适应性免疫应答的功能;M2 型巨噬细胞表面标志物主要为 MRC1 和 CD163,可分泌 IL-10、TGF- β 、Arg1 等抗炎因子,下调免疫应答,抑制和调节免疫炎症^[15-16]。Wang 等^[17]发现胰高血糖素样肽-4 可通过降低巨噬细胞 M1/M2 的比例,诱导巨噬细胞极化为 M2 型,进而分泌 TGF- β 1 以促进骨生成。本实验通过免疫荧光染色对体外培养的大鼠 BMMs 表面标志物进行检测,结果显示与 Sham 组相比,OVX 组大鼠 BMMs 的 CCR7 表达量较高而 MRC1 的表达量较低,该结果提示大鼠去卵巢后随着体内雌激素水平的下降,BMMs 多表现为 M1 型。

TNF- α 是一种重要的促炎因子,在调节炎症反应、免疫应答、凋亡等过程中发挥作用。IL-6 是一种

多功能的细胞因子,可在机体应答感染时产生,参与调节免疫反应过程。报道证实单核细胞产生的 TNF- α 和 IL-6 可促进 RANKL 的产生并提高 RANKL 的活性,进而促进骨吸收^[18]。临床研究发现,当患有 PMO 的妇女使用选择性雌激素受体调节剂雷洛昔芬 (Raloxifene, RAL) 治疗后,血清中 TNF- α 、IL-6 的水平降低,骨密度增加。表明 TNF- α 、IL-6 在参与 RAL 对 OC 的生成及骨吸收过程中起重要作用^[19]。动物实验^[20]也证实,随着大鼠体内雌激素水平的降低,TNF- α 、IL-6 等炎症因子的水平可显著上升,刺激并提高 OC 活性,最终导致大鼠出现骨质疏松。

IL-10 是一种有效的抗炎因子,可下调 IL-1、TNF- α 和 IL-6 等促炎因子水平,抑制免疫炎症反应^[21]。TGF- β 1 是免疫调节细胞因子,可调节免疫细胞的增殖、分化,在骨骼组织的发展和维持中起着关键作用^[22]。IL-10 可通过降低巨噬细胞中活化 T 细胞核因子 (nuclear factor-activated T cell 1, NFATc1) 的表达进而抑制 RANKL 诱导的 OC 生成^[23]。调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 分泌的 IL-10 及 TGF- β 可参与雌二醇对骨代谢的调节,抑制 OC 的分化及骨吸收^[24]。Shin 等^[25]发现 4-1BB 和 4-1BB 配体的相互作用可通过调节 IL-10 的分泌而影响破骨细胞的形成。降低 IL-10 的水平可增强 BMMs 向 OC 的分化能力。本研究采用荧光定量 PCR 在 mRNA 水平比较 OVX 组与 SHAM 组大鼠 BMMs 炎症相关因子 TNF- α 、IL-6 及 IL-10、TGF- β 的表达水平,结果发现去卵巢大鼠 BMMs 在基因水平高表达 TNF- α 及 IL-6,而 IL-10 和 TGF- β 的表达则显著低于 Sham 组。结合巨噬细胞表面标志物的检测结果,笔者推测 PMO 状态下 BMMs 处于炎症状态,更倾向于向 M1 型方向极化,更容易分化形成 OC。

综上所述,本研究通过体外培养 PMO 大鼠 BMMs,发现去卵巢大鼠随着雌激素水平的下降 BMMs 处于炎症状态,高表达 M1 型巨噬细胞表面标志物 CCR7 和促炎因子 TNF- α 及 IL-6;而巨噬细胞 M2 型表面标志物 MRC1 及抗炎因子 IL-10 和 TGF- β 的表达降低,提示 OP 状态下 BMMs 更倾向于向 M1 型极化。上述研究结果将为探讨 BMMs 在 PMO 发病过程中的作用以及通过调控 BMMs 防治 PMO 提供实验依据。本研究仅通过动物模型初步探讨了 PMO 状态下大鼠 BMMs 的增殖能力、细胞极化表面标志物以及炎症相关因子的表达水平,对于 PMO 状

态下 BMMs 的破骨分化能力还有待进一步深入研究。

【参 考 文 献】

- [1] Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects [J]. J Clin Invest, 2005, 115(12):3318-3325.
- [2] Abraham A, Cohen A, Shane E. Premenopausal bone health: osteoporosis in premenopausal women [J]. Clin Obstet Gynecol, 2013, 56(4):722-729.
- [3] Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters' [J]. Trends Mol Med, 2014, 20(8):449-459.
- [4] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation [J]. Nature, 2003, 423(6937):337-342.
- [5] 何梦娇, 江俊, 郑宝玉, 等. 骨质疏松大鼠骨髓基质细胞膜片的体外构建研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(8):996-1001.
- [6] Chen B, Ni Y, Liu J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells exert diverse effects on different macrophage subsets [J]. Stem Cell Int, 2018, 2018:8348121.
- [7] Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research [J]. Comp Med, 2008, 58(5):424-430.
- [8] 侯春梅, 李新颖, 叶伟亮, 等. MTT 法和 CCK-8 法检测悬浮细胞增殖的比较 [J]. 军事医学, 2009, 33(4):400-401.
- [9] 许雄程, 阳雪, 何梦娇, 等. 去卵巢对大鼠颌骨成骨细胞增殖与成骨分化能力的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(5):567-572.
- [10] Gao Y, Jiao Y, Nie W, et al. In vitro proliferation and differentiation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from ovariectomized rats [J]. Tissue Cell, 2014, 46(6):450-456.
- [11] Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment [J]. F1000 prime Rep, 2014, 6(13):1-13.
- [12] Liu YC, Zou XB, Chai YF, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases [J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(5):520-529.
- [13] Das A, Sinha M, Datta S, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration [J]. Am J Pathol, 2015, 185(10):2596-2606.
- [14] Reygiraud F, Hafner M, Ries CH. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions [J]. PLoS One, 2012, 7(8):1-10.
- [15] Fu A, Yang W, Wu Y, et al. Echinacea purpurea extract polarizes M1 macrophages in murine bone marrow - derived macrophages through the activation of JNK [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017, 118(9):2664-2671.
- [16] Smith TD, Tse MJ, Read EL, et al. Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activation signals [J]. Integr Biol(Camb), 2016, 8(9):946-955.
- [17] Wang N, Gao J, Jia M, et al. Exendin-4 induces bone marrow stromal cells migration through bone marrow-derived macrophages polarization via PKA-STAT3 signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(5):1696-1714.
- [18] Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, et al. The molecular triad OPG/RANKL/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(6):457-475.
- [19] Gianni W, Ricci A, Gazzaniga P, et al. Raloxifene modulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha synthesis in vivo: results from a pilot clinical study [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(12):6097-6099.
- [20] Dar HY, Shukla P, Mishra PK, et al. Lactobacillus acidophilus inhibits bone loss and increases bone heterogeneity in osteoporotic mice via modulating Treg-Th17 cell balance [J]. Bone Rep, 2018(8):46-56.
- [21] Zhang Q, Chen B, Yan F, et al. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:284836.
- [22] Kasagi S, Chen W. TGF-beta1 on osteoimmunology and the bone component cells [J]. Cell & Bioscience, 2013, 3(1):4.
- [23] Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, et al. Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells [J]. Bone, 2007, 41(4):592-602.
- [24] Luo CY, Wang L, Sun C, et al. Estrogen enhances the functions of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro [J]. Cell Mol Immunol, 2011, 8(1):50-58.
- [25] Shin HH, Lee JE, Lee EA, et al. Enhanced osteoclastogenesis in 4-1BB-deficient mice caused by reduced interleukin-10 [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(12):1907-1912.

(收稿日期: 2018-11-15; 修回日期: 2018-12-10)