

梅花鹿茸 I 型胶原对破骨细胞的影响及其分子机制

王艳双^{1,2}, 罗 速^{2*}, 张大方^{1*}, 曲晓波^{1*}, 王秀丽², 谭寅凤², 李 枫²

1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

2. 北华大学, 吉林 吉林 132013

摘 要: **目的** 探讨梅花鹿茸 I 型胶原 (SPC-I) 对破骨细胞的影响及其分子机制。**方法** 采用全骨髓细胞诱导法培养破骨细胞、成骨细胞。设对照组 (给予完全培养液)、诱导组 (给予高糖-DMEM 诱导液)、SPC-I (2.5、5、10 g/L) 组, 除对照组外, 其他组给予含核因子- κ B 受体活化因子配体 (RANKL)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 各 40 ng/mL 的高糖-DMEM 诱导液, 条件培养 7 d, 每隔 3 天更换培养液补足药物质量浓度。经 HE 染色、抗酒石酸盐性磷酸酶 (TRAP) 染色, 倒置显微镜下观察细胞形态; 分光光度计检测 TRAP 活性, RT-PCR 法检测 TRAP、核因子- κ B 受体活化因子 (RANK)、RANKL、骨保护素 (OPG) 基因的表达, Western blotting 法检测 RANK 蛋白的表达。**结果** 与破骨细胞组比较, SPC-I 5、10 g/L 组 TRAP 阳性细胞减少, TRAP 活性降低, TRAP、RANK、RANKL 基因的表达及 RANK 蛋白的表达下调 ($P < 0.01$); 与对照组比较, 质量浓度 2.5、10 g/L 组 OPG 基因表达上调, RANKL/OPG 的值减小 ($P < 0.01$), 2.5 g/L 质量浓度组的作用不显著。**结论** SPC-I 对破骨细胞的生成及分化具有抑制作用, 该作用通过 RANKL/OPG 信号转导途径调控 TRAP 基因、RANK 基因的表达实现的。

关键词: 梅花鹿茸 I 型胶原; 破骨细胞; 成骨细胞; 抗酒石酸盐性磷酸酶; 核因子- κ B 受体活化因子; RANKL/OPG 信号通路

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)24-3503-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.24.014

Effects of sika pilose antler type I collagen on osteoclast and its molecular mechanism

WANG Yan-shuang^{1,2}, LUO Su², ZHANG Da-fang¹, QU Xiao-bo¹, WANG Xiu-li², TAN Yin-feng², LI Feng²

1. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Beihua University, Jilin 132013, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of sika pilose antler type I collagen (SPC-I) on osteoclast and its molecular mechanism. **Methods** The osteoclasts and osteoblasts were cultured by the induction method of whole bone marrow cells. The control (with full medium), osteoclasts (with HG-DMEM inducing medium), and SPC-I (2.5, 5, and 10 g/L) groups were set up. Except the control group, others were given the HG-DMEM inducing medium with each 40 ng/mL of both RANKL and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), then conditioned cultured for 7 d, every other 3 d to replace medium for the complement of the drug concentration. By HE and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) stainings, the cell morphology was observed under inverted microscope. The TRAP activity was detected using spectrophotometer, the gene expression of TRAP, receptor activator of NF- κ B (RANK), receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), and osteoprotegerin (OPG) was measured by RT-PCR, and the RANK protein expression was detected by Western blotting. **Results** Compared with the osteoclast group, SPC-I (5 and 10 g/L) groups could make TRAP positive cells and TRAP activity decreased, TRAP, RANK, and RANKL expression in gene level reduced, and RANK expression in protein level down-regulated also ($P < 0.01$); Compared with the control group, SPC-I (2.5 and 10 g/L) could make the OPG expression in gene level increased and the RANKL/OPG ratio declined ($P < 0.01$). The effect of 5 g/L SPC-I was the most significant ($P < 0.01$). The effect of 2.5g/L SPC-I was not significant. **Conclusion** SPC-I has the inhibitory effect on the osteoclast formation and differentiation; The effect of implementation is through RANKL/OPG signal transduction pathway to regulate the expression of TRAP and RANK genes.

Key words: sika pilose antler type I collagen; osteoclasts; osteoblasts; tartrate-resistant acid phosphatase; receptor activator of NF- κ B; RANKL/OPG signal transduction pathway

收稿日期: 2013-05-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81073158)

作者简介: 王艳双 (1971—), 女, 吉林人, 讲师, 在读博士, 研究方向为中药开发及分子药理。E-mail: yanshuang2006@sohu.com

*通信作者 罗 速 Tel: 18604499969

张大方 Tel: 13843135879

曲晓波 Tel: 13804338605

正常骨组织代谢是一个动态的骨重建平衡,其过程包括破骨细胞黏附在旧骨区域,分泌酸性物质溶解矿物质,分泌蛋白酶消化骨基质,形成骨吸收陷窝;其后成骨细胞移行至被吸收部位,分泌骨基质,骨基质矿化而形成新骨。骨吸收与骨形成过程的平衡是维持正常骨量的关键。如果这一平衡被打破,导致骨形成的速度降低或骨吸收大于骨形成,进而引起骨量丢失,这是骨质疏松症发病的基本病理机制。

破骨细胞来源于骨髓造血干细胞,在破骨细胞分化因子核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)两种关键因子的诱导下形成,是唯一有骨吸收功能的细胞,对维持骨量稳态、防治骨质疏松起关键作用^[1]。破骨细胞主要受成骨细胞/骨髓基质干细胞的间接调控,表达核因子- κ B受体活化因子(RANK)的破骨前体细胞和表达RANKL、骨保护素(OPG, RANKL受体)的成骨细胞/骨髓基质干细胞之间的相互作用对于破骨细胞的生成很重要。

鹿茸具有强筋壮骨的确切疗效,其含量最多的蛋白是胶原。梅花鹿茸I型胶原(SPC-I)具有诱导骨髓基质干细胞向成骨细胞分化的作用,但SPC-I对破骨细胞的作用及其分子机制研究鲜见报道,本研究主要考察SPC-I对破骨细胞形态及相关基因表达的影响,为临床抗骨质疏松的治疗提供新的分子靶点,为鹿茸应用于临床治疗骨质疏松提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

SPC-I(相对分子质量 3.1×10^4 ,质量分数56.89%),长春中医药大学;高糖-DMEM(HG-DMEM)培养基,美国Gibco公司;胎牛血清(FBS),浙江天杭生物科技有限公司;M-CSF、RANKL,美国Sigma公司;抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)检测试剂盒,南京建成生物研究所;Trizol试剂,美国Invitrogen公司;引物合成、RT、PCR试剂盒,上海生物工程有限公司;兔抗大鼠RANK抗体、辣根过氧化物酶(HRP)-抗兔免疫球蛋白G(IgG),美国BD公司; β -actin多克隆抗体,武汉博士德生物公司;Western blotting检测用试剂,碧云天生物研究所。

1.2 动物

雌性SD大鼠,3月龄,体质量(220 ± 10)g,清洁级,由吉林大学动物实验中心提供,合格证号:SCXK(吉)2011-0004。

1.3 仪器

CO₂培养箱,日本Shellab公司;生物洁净安全柜,苏州净化设备有限公司;酶标仪、PCR仪、全自动数字凝胶成像仪、湿式转膜槽,美国BIO-RDA公司;倒置显微镜,日本Olympus公司;722分光光度计,上海隆拓仪器设备有限公司。

2 方法

2.1 破骨细胞诱导培养

采用全骨髓细胞诱导培养法^[9]。取SD大鼠10只,无水乙醚处死,75%乙醇浸泡10 min,相对无菌环境下切取双侧股骨,去除附着的肌肉和筋膜,75%乙醇浸泡1 min,移入超净台,剪掉两端干骺端暴露骨髓腔,用注射器抽取无菌磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗骨髓腔。冲出的骨髓细胞1 000 r/min离心5 min,弃上清,用HG-DMEM完全培养液(含10% FBS,青、链霉素各100 U/mL)接种于25 cm²培养瓶中,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养30 min,收集培养瓶中未贴壁细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^7 /mL,接种于6孔和24孔板中,用含RANKL和M-CSF各40 ng/mL的HG-DMEM诱导液诱导培养7 d,每隔3天更换培养液。

2.2 分组与给药

将破骨细胞分成5组:对照组,只加HG-DMEM完全培养液;诱导组,只加HG-DMEM诱导液(含RANKL、M-CSF各40 ng/mL的诱导液);SPC-I组,在HG-DMEM诱导液存在情况下,分别给予SPC-I 2.5、5、10 g/L。调整细胞密度为 1×10^7 /mL,接种于6孔和24孔板中,每组3个复孔,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养7 d,每隔3天更换培养液并补足药物质量浓度。

2.3 HE染色法观察破骨细胞形态

破骨细胞按“2.2”项下方法处理,24孔板诱导培养,HE染色,分别在第3、4、5、7天倒置显微镜下($\times 200$)观察细胞形态学变化。

2.4 对破骨细胞计数和TRAP活性的影响

破骨细胞按“2.2”项下方法处理,24孔板中诱导培养第7天,行TRAP染色。镜下观察,TRAP阳性部位呈红色颗粒样沉淀,分布于全部或大部分胞浆,细胞核呈阴性,有3个及3个以上细胞核的细胞为破骨细胞。每孔随机取3个视野($\times 200$),取均数作为该孔TRAP染色阳性的破骨细胞数。

分别在细胞培养第5、7天,收集上清,分光光

度计检测 530 nm 处吸光度 (A) 值, 按试剂盒说明计算 TRAP 活性。

2.5 对破骨细胞 TRAP 和 RANK 基因表达的影响

破骨细胞按“2.2”项下方法处理。6孔板中诱导培养第7天, 采用 Trizol 试剂分别提取细胞总 RNA, 进行完整性鉴定后按照 RT-PCR 试剂盒检测基因表达。引物序列: TRAP (220 bp) 正向引物 5'-AGCAGCCAAGGAGGACTACGTT-3', 反向引物 5'-TCGTTGATGTCGCACAGAGG-3'; RANK (181 bp) 正向引物 5'-CGAGTGAGGAAGGAGTGAGTG-3', 反向引物 5'-AAGAGGAAGGGAATGTGATG-3'; 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (G3PDH) (370 bp) 正向引物 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3', 反向引物 5'-TCCACCACCCTGTGCTGTA-3'。PCR 结束后, 2% 琼脂糖凝胶电泳 [0.5×Tris-硼酸 (TBE), 100 V, 20~30 min], 以数字凝胶成像仪保存图像并用 Quantity One 软件扫描吸光度, 以所扩增特定产物与管家基因扩增产物的吸光度比值表示基因表达水平。

2.6 对破骨细胞 RANK 蛋白表达的影响

破骨细胞按“2.2”项下方法处理。6孔板中诱导培养第7天, 用 Western blotting IP 裂解液裂解细胞, 提取细胞蛋白质; 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白的量; 取 40 μ g 蛋白样品, 与 5×蛋白上样缓冲液混匀, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质 (5%分离胶约 1.5 h, 12%积层胶约 4.5 h)。电泳结束后立即取下凝胶, 在转膜液中平衡约 30 min, 制作“阴极-3层滤纸-凝胶-薄膜-3层滤纸-阳极”的“三明治”, 30 V、转膜过夜; 次日取下薄膜封闭, 洗涤后加一抗 (1:200 稀释) 孵育, 洗涤后加二抗 (1:1 000 稀释) 孵育, 洗涤后加入 DAB 显色液 (A 液-B 液, 1:1), 约 3~5 min 出现棕色条带。数码相机拍照, Image J 2X 软件进行分析, 将特定蛋白与 β -actin 蛋白的吸光度比值表示蛋白表达水平。

2.7 对成骨细胞 RANKL 和 OPG 基因表达的影响

取对数生长期的第2代骨髓基质干细胞 (BMSCs), 消化、重悬、计数, 以 2.5×10^4 /孔的密度接种于6孔培养板中, 每组3个复孔。实验分成5组: 对照组 (给予含 β -甘油磷酸钠 10 mmol/L、L-抗坏血酸 50 g/L 的矿化液), 地塞米松组 (β -甘油磷酸钠 10 mmol/L+L-抗坏血酸 50 g/L+地塞米松 10 nmol/L), SPC-I 组 [β -甘油磷酸钠 10 mmol/L+L-

抗坏血酸 50 g/L+SPC-I (2.5、5、10 g/L)]。细胞接种 24 h 后, 各组更换条件培养液, 此后每3天换液1次, 连续培养9d, 采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 并检测其完整性, 按照 RT-PCR 试剂盒检测基因的表达式。引物序列: RANKL (149 bp) 正向引物 5'-CACCATCAGCTGAAGATAGT-3', 反向引物 5'-CCAAGATCTCATACATGACG-3'; OPG (106 bp) 正向引物 5'-CTCATCAGTTGGTGGGAA-TGAAGA-3', 反向引物 5'-ACCTGGCAGCTTTGCAACAATTA-3'; G3PDH 基因序列同“2.5”项。PCR 结束后, 电泳及结果分析同“2.5”项。

2.8 统计学分析

每项实验均重复3次, 所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS v 16.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用双侧 t 检验。

3 结果

3.1 对破骨细胞形态的影响

3.1.1 HE 染色 倒置显微镜下观察正常破骨细胞的动态形成过程, 并行 HE 染色, 单核细胞逐渐汇聚, 融合成多核的破骨细胞, 胞核染色明显呈蓝色 (图1)。刚收集的骨髓造血干细胞大小均一, 呈圆形, 悬浮生长, 随着培养液的晃动而移动。3d 换液后可见单核细胞量居多, 细胞突起互相连接, 细胞间隔逐渐模糊, 有互相趋化融合的迹象; 培养5d 时细胞融合现象明显, 出现多个胞核的破骨细胞; 培养7d 时多个胞核的破骨细胞数量达峰值, 细胞呈不规则形, 胞体较大, 胞核3~20个不等, 质膜边缘不整, 周边可见伸展的伪足。

3.1.2 TRAP 染色 特异的破骨细胞, 胞浆 TRAP 活性部位内呈紫红色阳性反应, 可见均匀的酒红色颗粒沉淀, 胞浆可见吞饮空泡; 细胞核阴性; 胞体煎蛋状、漏斗状、索条状等不规则形, 周边可见伪足。见图2。

3.2 对破骨细胞计数和 TRAP 活性的影响

与诱导组比较, SPC-I 2.5 g/L 组 TRAP 阳性破骨细胞的数量无显著变化, 而 SPC-I 5、10 g/L 组 TRAP 阳性破骨细胞的数量显著减少 ($P < 0.01$), 其中 SPC-I 5 g/L 的作用更为显著。结果见图3。

与诱导组比较, SPC-I 2.5 g/L 组 TRAP 活性无显著改变, 表明此质量浓度对破骨细胞生成及分化无显著影响; SPC-I 5、10 g/L 组 TRAP 活性显著降低 ($P < 0.01$), 表明此质量浓度具有抑制破骨细胞生成及分化的作用, 与镜下观察结果一致。结果见图4。

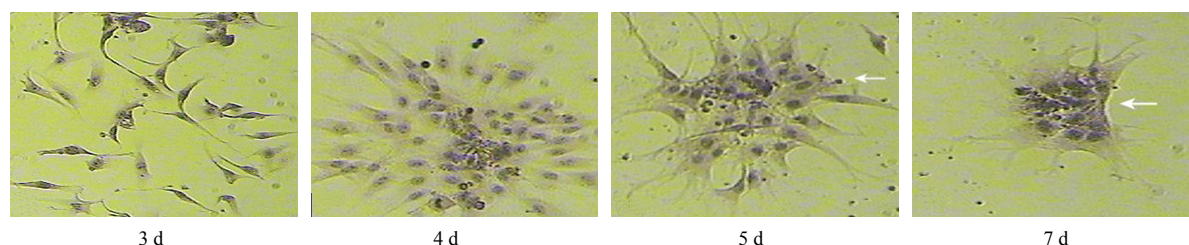


图1 正常破骨细胞 HE 染色观察

Fig. 1 Observation on normal osteoclast by HE staining

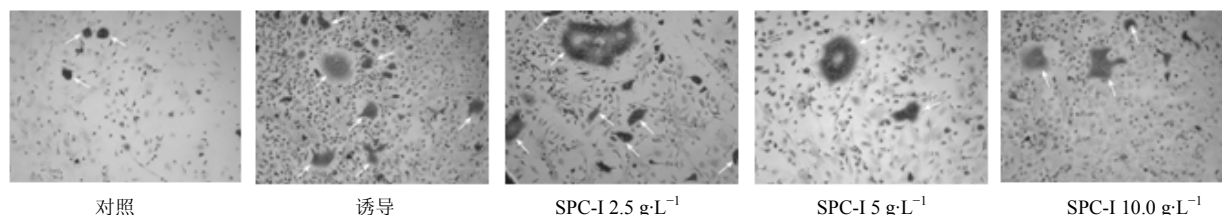
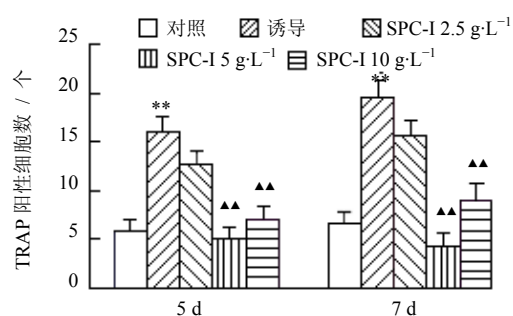


图2 各组破骨细胞形态 TRAP 染色观察

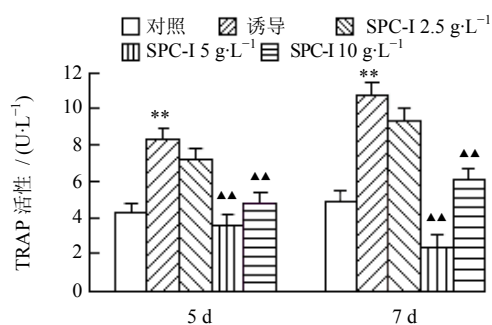
Fig. 2 Observation on osteoclast morphology in each group by TRAP staining



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与诱导组比较: ▲▲ $P < 0.01$, 下同
 ** $P < 0.01$ vs control group; ▲▲ $P < 0.01$ vs induced group, same as below

图3 SPC-I 对 TRAP 阳性细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of SPC-I on TRAP positive cell numbers

($\bar{x} \pm s, n = 3$)图4 SPC-I 对 TRAP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of SPC-I on TRAP activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 对破骨细胞 TRAP 和 RANK 基因表达的影响

RT-PCR 检测结果显示, 与诱导组比较,

SPC-I 2.5 g/L 组 TRAP、RANK 基因的表达无显著变化, 5、10 g/L 组 TRAP、RANK 基因的表达显著下调 ($P < 0.01$); 5 g/L 组的作用更加显著, 表明 SPC-I 抑制破骨细胞的分化机制之一是通过调控 TRAP、RANK 基因的表达实现的。结果见图 5。

3.4 对破骨细胞 RANK 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示, 与诱导组比较, SPC-I 2.5 g/L 组 RANK 蛋白的表达无显著变化, 5 g/L 组 RANK 蛋白的表达显著下调 ($P < 0.01$); 10 g/L 组 RANK 蛋白表达也显著低于诱导组。进一步表明 SPC-I 抑制破骨细胞的生成及分化与通过调控 RANK 基因的表达有关。结果见图 6。

3.5 对成骨细胞 RANKL 和 OPG 的影响

RT-PCR 检测结果显示, 各组 RANKL 基因表达不同程度地下调, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。与对照组比较, SPC-I 2.5 g/L 组 OPG 基因表达显著下调 ($P < 0.01$), SPC-I 5 g/L 组、地塞米松组能够明显促进 OPG 基因的表达 ($P < 0.01$), 10 g/L 组与对照组 OPG 基因表达无显著差异。与对照组比较, 地塞米松组, SPC-I 5、10 g/L 组 RANKL/OPG 的值明显降低 ($P < 0.01$), SPC-I 2.5 g/L 组 RANKL/OPG 的值与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。结果见图 7。

4 讨论

破骨细胞是高度分化的多核巨细胞, 来源于骨髓造血干细胞, 其不是通过有丝或无丝分裂来增殖,

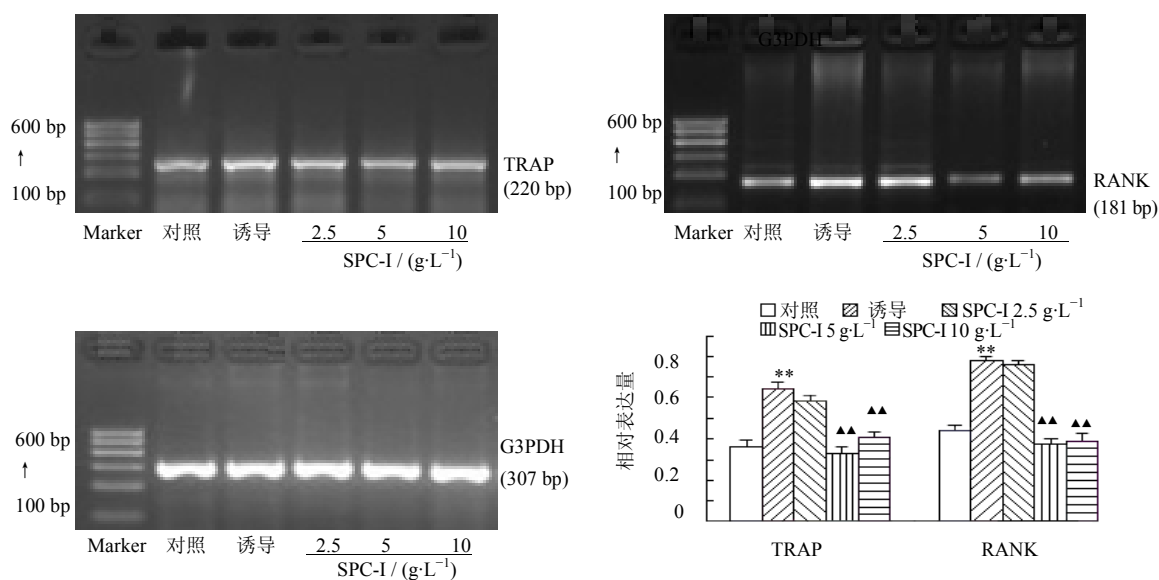


图 5 SPC-I 对 TRAP、RANK 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of SPC-I on expression of TRAP and RANK genes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

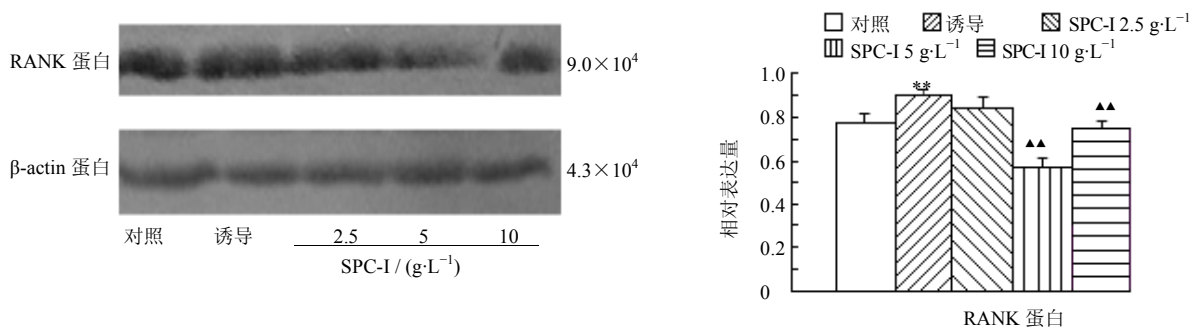


图 6 SPC-I 对 RANK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of SPC-I on expression of RANK protein ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

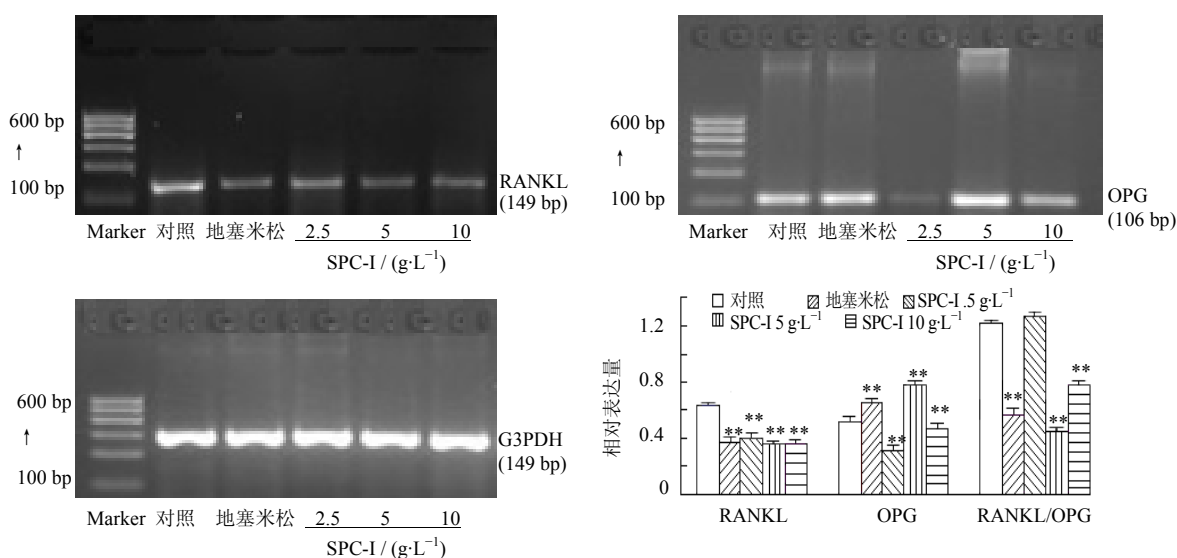


图 7 SPC-I 对 RANKL mRNA、OPG mRNA 表达及其比值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of SPC-I on expression of RANKL and OPG genes and their ratios ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

而是通过血源性单核巨噬细胞融合而成,属于终末细胞^[2]。破骨细胞不能传代,且生命周期短暂,难以获得足够数量的高纯度,所以体外培养较困难。RANKL和M-CSF是刺激破骨前体细胞融合和向成熟破骨细胞分化的关键细胞因子^[3]。本实验采用体外全骨髓细胞诱导培养法^[4],利用RANKL与M-CSF,共同诱导全骨髓细胞分化形成破骨细胞。破骨细胞含有丰富的酸性磷酸酶(ACP),但ACP并非破骨细胞所特有,成骨细胞也含有少量ACP^[5]。TRAP是ACP同工酶之一,则为破骨细胞所特有,被认为是破骨细胞的标志酶,因此TRAP染色被广泛用于破骨细胞鉴定^[6]。本实验综合HE染色及TRAP特异性染色证实,采用全骨髓细胞培养法诱导获得破骨细胞,与文献报道相符^[7-8]。本实验结果表明,SPC-I具有抑制破骨细胞生成、分化的作用,且5 g/L组的作用最为显著。破骨细胞前体及成熟的破骨细胞均表达膜表面受体RANK,RANK基因表达的多少在一定程度上反应破骨细胞前体向破骨细胞分化的潜能,本实验对RANK基因和蛋白检测的结果与上述理论是一致的。SPC-I 5 g/L通过调控TRAP、RANK基因的表达,实现对破骨细胞生成、分化及其成熟的抑制,这是其作用的重要分子机制之一。

破骨细胞的分化、成熟主要受成骨细胞或BMSCs的间接调控,许多对破骨细胞起重要作用的分子都是通过调节OB/BMSCs中RANKL、OPG等的表达来控制破骨细胞的分化与激活^[9]。OB/BMSCs表达RANKL为破骨细胞分化刺激因子。破骨细胞前体及成熟的破骨细胞均表达膜表面受体RANK,RANK是RANKL刺激破骨细胞分化、生存与融合和活化的唯一靶受体,一旦受RANKL刺激就会启动细胞内信号,引起级联瀑布反应,可启动破骨细胞分化、成熟及调节成熟破骨细胞的骨吸收^[10]。但OB/BMSCs还表达OPG,OPG为破骨细胞分化抑制因子,一方面可促进破骨细胞凋亡,另一方面作为诱饵受体与RANK竞争性结合RANKL,可阻断上述信息的传递,抑制破骨细胞的分化、成熟^[11]。RANKL/OPG值的升高是破骨细胞生成、分化与成熟的直接原因,因此RANKL/OPG是破骨细胞生成、活化的关键,也是骨吸收与骨形成保持动态平衡的关键^[1]。OPG对RANKL的竞争结合能力比RANK更强,高表达的OPG与RANKL相结合,阻断RANKL与破骨细胞表达的RANK相

结合,从而阻断骨吸收信号的传递,抑制破骨细胞的生成、分化与成熟,进而抑制骨吸收。本实验结果表明SPC-I 5 g/L组OPG基因表达量最高,即其诱导成骨能力最强,并能增加成骨细胞的分泌功能,可使破骨细胞分化刺激因子RANKL基因的表达下降最明显,使得RANKL/OPG的值明显降低。

RANKL/RANK/OPG系统是目前已知的将成骨细胞系与破骨细胞系紧密联系的纽带^[12],因此破骨细胞的生成、分化与成熟受成骨细胞的间接调控,是通过OPG/RANKL/RANK信号传导途径实现的^[13-14]。本实验研究结果表明,SPC-I 5 g/L组通过促进BMSCs向成骨细胞分化,促进骨的合成;通过下调RANKL/OPG的值和调节OPG/RANKL/RANK信号转导途径,抑制TRAP、RANK基因的表达,进而抑制破骨细胞的生成、分化与成熟,抑制骨的吸收,使得成骨细胞的骨形成与破骨细胞的骨吸收达到一个动态的平衡,维持骨量的稳态,因此SPC-I有望成为抗骨质疏松的新药。

参考文献

- [1] Hofbauer L C, Schoppert M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases [J]. *JAMA*, 2004, 292(4): 490-495.
- [2] Atanga E, Bolder S, Dauwalder T. TNF- α inhibits the development of osteoclasts through osteoblast-derived GM-CSF [J]. *Bone*, 2011, 49(5): 1090-1100.
- [3] Sugatani T, Hruska K A. Impaired micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function [J]. *Biol Chem*, 2009, 284(7): 4667-4678.
- [4] Kaufman P L, Bito L Z. The occurrence of senile cataracts, ocular hypertension and glaucoma in rhesus monkeys [J]. *Exp Eye Res*, 1982, 34(2): 287-291.
- [5] Hayman A R, Bune A J, Bradley J R, et al. Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5): its localization to dendritic cells and diverse marine tissues [J]. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48(2): 219-228.
- [6] Halleen J M, Raisanen S R, Alatalo S L, et al. Potential function for the ROS-generating activity of TRAP [J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(10): 1908-1911.
- [7] Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, et al. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 246(1): 199-204.
- [8] 郭子杰, 奕文民, 于世凤, 等. 破骨细胞分化因子诱导小鼠骨髓细胞形成破骨细胞的实验研究 [J]. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(6): 445-458.

- [9] Yeh L C, Ma X, Matheny R W, *et al.* Protein kinase D mediates the synergistic effects of BMP-7 and IGF-I on osteoblastic cell differentiation [J]. *Growth Factors*, 2010, 28(5): 318-328.
- [10] Schramck D, Leibbrandt A, Sig V, *et al.* Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer [J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 98-102.
- [11] Simonet W S, Lacey D L, Dunstan C R, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [J]. *Cell*, 1997, 89(2): 309-319.
- [12] 陈良娇, 兰泽栋, 陈建明. rhIL-1 α 与 1, 25-(OH) $_2$ D $_3$ 对人牙周膜成纤维细胞表达 RANKL 和 OPG 的影响 [D]. 福建: 福建医科大学, 2010.
- [13] Akiyama T, Dass C R, Shinoda Y, *et al.* PEDF regulates osteoclasts via osteoprotegerin and RANKL [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 789-794.
- [14] Markus C, Kuhn A, Holger S, *et al.* Scherbaum a, Sven Schinner a Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation molecular and cellular [J]. *Endocrinology*, 2012, 34(9): 180-188.