

灯盏花对成骨细胞及破骨前体细胞 OPG/RANKL/RANK 表达的影响

刘长庚¹ 罗启贤¹ 凌天牖² 莫业跃¹ 程自力¹ 黄生高² 莫 晖¹

摘要 目的 研究不同浓度和不同作用时间的灯盏花对体外培养的成骨细胞和破骨前体细胞中 OPG/RANKL/RANK mRNA 及蛋白表达的影响,初步探讨灯盏花对骨改建的作用及其机制。**方法** 体外培养人 MG63 细胞和小鼠 RAW264.7 细胞,分别取第三代细胞分为对照组和不同的实验组,分别应用不同浓度的灯盏花(0、0.001、0.01、0.1、1 mg/mL)干预 48 h 后提取总 RNA 和蛋白质,同时单独对 0、1 mg 组设 12、24、48 h 时间点提取蛋白质,采用半定量 RT-PCR 方法检测 MG63 细胞 OPG mRNA 和 RANKL mRNA 的表达以及 RAW264.7 细胞 RANK mRNA 的表达,采用 Western blot 法检测 MG63 细胞 OPG 蛋白和 RANKL 蛋白的表达以及 RAW264.7 细胞 RANK 蛋白的表达。**结果** 灯盏花随浓度(0、0.001、0.01、0.1、1 mg/mL)增高,干预 48 h 后 MG63 细胞 OPG mRNA 和蛋白表达逐步降低($P < 0.05$);MG63 细胞 RANKL mRNA 和蛋白表达逐步增加($P < 0.05$);RAW264.7 细胞 RANK mRNA 表达增加($P < 0.05$),但 0.1 mg/mL 组较 0.01 mg/mL 组 mRNA 表达稍降低,RANK 蛋白表达逐步增加($P < 0.05$)。1 mg/mL 灯盏花干预 12、24、48 h 后 MG63 细胞 OPG 蛋白表达随时间逐步降低($P < 0.05$)、RANKL 蛋白表达随时间逐步增加($P < 0.05$);RAW264.7 细胞 RANK 蛋白表达随时间逐步增加($P < 0.05$)。**结论** 灯盏花大致上呈剂量和时间依赖性抑制成骨细胞 OPG 表达,促进成骨细胞 RANKL 的表达和破骨前体细胞 RANK 的表达,灯盏花可能有促进骨吸收的作用。

关键词 灯盏花;成骨细胞;破骨前体细胞;护骨素;细胞核因子- κ B 受体活化因子配体;细胞核因子- κ B 受体活化因子

Effect of *Erigeron Breviscapus* on the Expression of OPG/RANKL/RANK in Osteoblasts and Pre-osteoclasts *in Vitro* LIU Chang-geng¹, LUO Qi-xian¹, LING Tian-you², MO Ye-yue¹, CHENG Zi-li¹, HUANG Sheng-gao², and MO Hui¹ 1 Department of Stomatology, Guangfo Hospital, Guangzhou Medical University, Guangdong (528251), China; 2 Department of Stomatology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha (410011), China

ABSTRACT Objective To study the effect of *Erigeron Breviscapus* (EB) at different concentrations and different intervention time points on the mRNA and protein expression of OPG/RANKL/RANK in MG63 osteoblast-like cells and RAW264.7 pre-osteoclast cells cultured *in vitro*, thus exploring roles EB played in bone rebuilding and its mechanisms. **Methods** MG63 osteoblast-like cells and RAW264.7 pre-osteoclast cells were cultured *in vitro*. The 3rd passage cells were divided into the control group and different experimental groups. Total RNA and protein were respectively isolated from cells treated with different concentrations of EB (0, 0.001, 0.01, 0.1, and 1.0 mg/mL) for 48 h. Meanwhile, the protein was extracted from 0 and 1 mg/mL EB groups at 12, 24, and 48 h respectively. Expression of OPG mRNA and RANKL mRNA in MG63 osteoblast-like cells, and expression of RANK mRNA in RAW264.7 pre-osteoclast cells were detected by semi-quantitative RT-PCR. Expression of OPG protein and RANKL protein in MG63 osteoblast-like cells, and expression of RANK protein in RAW264.7 pre-osteoclast cells were de-

基金项目:湖南省卫生厅科研基金(No.B2007195);佛山市科学技术局科研立项项目(No.201208137)

作者单位:1.广州医科大学附属广佛医院口腔中心(广东 佛山 528251);2.中南大学湘雅二医院口腔中心(湖南 长沙 410011)

通讯作者:刘长庚, Tel:0757-88386033, E-mail:502891288@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.12.1658

ected by Western blot. Results Along with increased EB concentration, expression of OPG mRNA and protein in MG63 osteoblast-like cells was gradually lowered ($P < 0.05$) after 48-h intervention of EB, the expression of RANKL mRNA and protein in MG63 osteoblast-like gradually increased ($P < 0.05$); the expression of RANK mRNA in RAW264.7 pre-osteoclast cells increased ($P < 0.05$). But the expression of RANK mRNA was slightly lower in the 0.1 mg/mL EB group than in the 0.01 mg/mL EB group, and the expression of RANK protein in RAW264.7 pre-osteoclast cells gradually increased ($P < 0.05$). After treatment with 1 mg/mL EB for 12, 24, 48 h, the expression of OPG protein in MG63 osteoblast-like cells gradually decreased as time went by ($P < 0.05$), and the expression of RANKL protein in MG63 osteoblast-like and RANK protein in RAW264.7 pre-osteoclast cells gradually increased ($P < 0.05$). The expression of RANKL protein in RAW264.7 pre-osteoclast cells increased as time went by ($P < 0.05$). Conclusion EB could inhibit the expression of OPG in osteoblasts in a dose- and time-dependent manner, promote the expression of RANKL in osteoblasts and the secretion of RANK in pre-osteoclast, indicating EB might play roles in promoting bone resorption.

KEYWORDS *Erigeron Breviscapus*; osteoblast; pre-osteoclast; osteoprotegerin; receptor activated nuclear factor kappa B ligand; receptor activated nuclear factor kappa B

国内实验证明,灯盏花能加快正畸牙移动,组织学观察可见灯盏花能使受力牙的牙周组织中张力侧的成骨细胞增多和压力侧的破骨细胞增多^[1-4]。Ogasawara T、裴松波等^[5,6]通过鼠正畸实验原位杂交发现骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activated nuclear factor kappa B ligand, RANKL)均在牙周膜的成骨细胞中阳性表达,而核因子 κ B受体活化因子(receptor activated nuclear factor kappa B, RANK)在牙周膜压力侧的破骨细胞中检测到。而 OPG/RANKL/RANK 系统是参与骨代谢以及正畸牙移动的关键细胞因子群^[7-9],但是有关灯盏花对体外培养的成骨细胞和破骨细胞 OPG/RANKL/RANK 系统分泌的影响,目前国内外尚无报导。为此,本实验采用体外培养成骨细胞和破骨前体细胞,应用不同浓度的灯盏花干预后,提取总 RNA 和蛋白质,检测细胞中 OPG/RANKL/RANK mRNA 及蛋白表达,以探讨灯盏花对成骨细胞与骨改建的作用及其机制。

材料与方法

1 细胞株人骨肉瘤成骨样细胞系 MG63 (美国培养物保存中心, ATCC 号 CRL-1427), 小鼠单核细胞 RAW264.7 细胞株(美国培养物保存中心, ATCC 号 TIB-710)。

2 药物 灯盏花制剂(每瓶含野黄芩苷 8.7 mg、总咖啡酸脂 40.0 mg, 云南生物谷生物医药研究所生产, 批号:20060502), 临时用 DMEM 培养基稀释并分别配制成 0.001、0.01、0.1、1 mg/mL 四种浓度后过滤分装备用。

3 试剂及仪器 无酚红 DMEM 培养液; 0.25% 胰酶-EDTA; 抗坏血酸; 焦碳酸二乙酯(DEPC); 四甲基偶氮唑盐(MTT)和 TRAP 染色试剂盒(美国 Sigma 公司); TRIzol 和胎牛血清(FBS, 美国 Gibco 公司); 逆转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司); Taq 酶(大连 Takara 公司); 引物(合成于上海博亚生物工程有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司); PVDF 膜(美国 Millipore 公司); OPG、RANKL 和 β -actin 抗体; 辣根过氧化物酶标记的抗兔及抗鼠二抗(Santa Cruz 生物工程公司)。细胞培养箱; 超净台(美国 Forma Scientific 公司); 高速低温离心机(美国 Beckman 公司 Allegra 64R); 紫外可见分光光度计(美国 Beckman 公司 DU800); 全波长多功能酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司 Varioskan Flash); 凝胶影像分析仪(美国 Bio-Rad 公司 Jeldoc2000), PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司 T personal); Nikon 300 型自动摄像倒置显微镜(美国 Nikon 公司); 电子天平(瑞士 mettler toledo 公司 AG245); 超声粉碎仪(美国 Branson 公司 SONIFIER S-450D); 细胞培养瓶和培养板(美国 Corning Costar 公司)。

4 细胞培养、分组及干预实验 MG63 及 RAW264.7 细胞培养(培养基、传代、冻存和复苏)按常规方法。MG63 细胞和 RAW264.7 细胞分别接种于 6 孔塑料培养板, 接细胞即将铺满培养板时弃原培养液, 换 1% FBS 培养液培养 2 天, 含 0.25% 牛血清白蛋白(BSA, Sigma 公司)无血清 DMEM 培养 1 天, 用 0.001、0.01、0.1 mg/mL 灯盏花干预 48 h, 用 0(含 0.25% BSA 无血清 DMEM)、1.0 mg/mL 干预 12、24、48 h。

5 OPG、RANKL 和 RANK mRNA 检测 用

TRIzol 按操作说明方法提取细胞总 RNA,取 3 μL 置 1.5% 琼脂糖凝胶快速电泳鉴定其质量,紫外分光仪测定其浓度及纯度,后将其 -70 °C 冻存备用。在 Biometra PCR 扩增仪上进行 RT-PCR。PCR 法检测 OPG、RANKL、RANK mRNA 表达,同时以 β-actin 基因为内对照。引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

基因	引物序列 (5'~3')	片段大小 (bp)
OPG	上游 5'CGTCAAGCAGGAGTGAATC3'	126
	下游 5'CCAGCTTGCACTCCAA3'	
RANKL	上游 5'TCGTTGGATCACAGCACATCA3'	141
	下游 5'TATGGGAACAGATGGGATGTC3'	
人 β-actin	上游 5'CCCAGCCATGTACGTTGCTA3'	126
	下游 5'AGGCATACCCCTCGTAGATG3'	
RANK	上游 5'ACCTCCAGTCAGCAAGAAGT3'	371
	下游 5'TCAGCCCTCAGAAATCCAC3'	
小鼠 β-actin	上游 5'GAAGACTATGAGCTGCCTG3'	305
	下游 5'CACAGAGTACTGCGCTCAG3'	

OPG、RANKL 和人 β-actin PCR 条件:预变性 94 °C 5 min;变性 94 °C 45 s,退火 60 °C 45 s,延伸 72 °C 1 min,共 30 个循环,于 72 °C 延伸 10 min。

RANK 和小鼠 β-actin PCR 条件:预变性 94 °C 5 min;变性 94 °C 30 s,退火 60 °C 30 s,延伸 72 °C 45 s,共 30 个循环,于 72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物用 1.5% 琼脂糖电泳,溴化乙锭染色后紫外灯下拍照。用 BioRad-Jeldoc2000 图像分析系统进行光密度扫描。凝胶影像分析仪测定每条带的光密度,分别计算上述基因 PCR 产物的光密度值与 β-actin 基因 PCR 产物的光密度值的百分比。

7 OPG、RANKL 和 RANK 蛋白质表达检测 灯盏花 0、0.001、0.01、0.1 mg/mL 组在干预 48 h 后,0、1 mg/mL 在干预 12、24、48 h 后进行细胞总蛋白提取,过程参照分子克隆实验指南操作。采用 BCATM 蛋白检测试剂盒测定蛋白含量。采用 Western blot 检测 OPG、RANKL 和 RANK 蛋白质表达。

8 统计学方法 实验结果均用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析。各实验独立重复 3 次以上。

表 3 1 mg/mL 灯盏花干预各时间点 MG63 细胞 OPG、RANKL 蛋白表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

指标	12 h		24 h		48 h	
	-	+	-	+	-	+
OPG/β-actin 蛋白	103 ± 33	24 ± 11 *	102 ± 19	15 ± 10 *	98 ± 13	12 ± 13 *
RANKL /β-actin 蛋白	92 ± 12	312 ± 47 *	95 ± 17	443 ± 68 *	95 ± 14	703 ± 60 *

注:与对照组比较,*P < 0.05;正负号分别为 1、0 mg/mL 组结果

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析,多样本均数两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

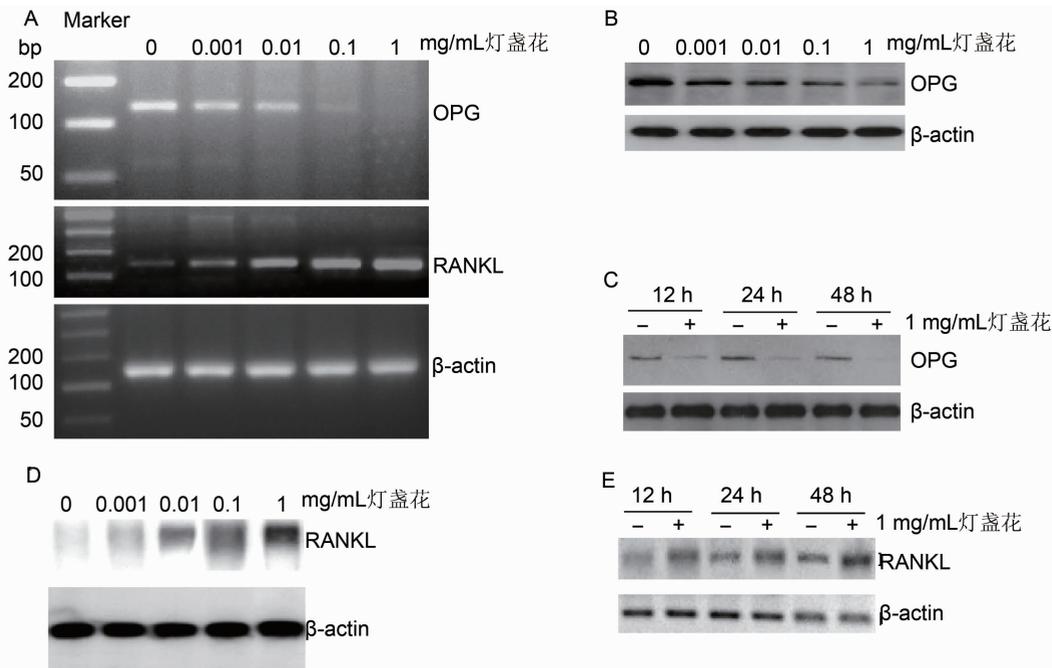
1 各组 MG63 细胞 OPG、RANKL mRNA 及蛋白表达比较(图 1,表 2、3) 灯盏花呈剂量及时间依赖性抑制 MG63 细胞 OPG mRNA 及蛋白表达。0.001 ~ 1 mg/mL 灯盏花干预 48 h 后,OPG mRNA 及蛋白表达随灯盏花浓度升高而逐步降低(P < 0.05),1 mg/mL 灯盏花干预 OPG mRNA 表达基本检测不到(图 1A);而 1 mg/mL 灯盏花干预 12、24、48 h 后,OPG 蛋白量较对照组逐步下降(P < 0.05)。灯盏花呈剂量及时间依赖性促进 MG63 细胞 RANKL mRNA 及蛋白表达。0.001 ~ 1 mg/mL 灯盏花干预 48 h 后,RANKL mRNA 及蛋白表达较对照组逐步升高(P < 0.05);1 mg/mL 灯盏花干预 12、24、48 h 后,RANKL 蛋白量较对照组逐渐升高(P < 0.05)。

表 2 各浓度灯盏花干预 48 h 后 MG63 细胞 OPG、RANKL mRNA 及蛋白表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

浓度 (mg/mL)	OPG/β-actin mRNA	OPG/β-actin 蛋白	RANKL/β-actin mRNA	RANKL /β-actin 蛋白
0	97 ± 22	98 ± 13	106 ± 44	92 ± 12
0.001	42 ± 16 *	44 ± 12 *	216 ± 25 *	103 ± 36 *
0.01	30 ± 12 *	26 ± 14 *	347 ± 55 *	543 ± 41 *
0.1	8 ± 7 *	22 ± 11 *	446 ± 90 *	577 ± 57 *
1	4 ± 5 *	12 ± 13 *	482 ± 103 *	703 ± 60 *

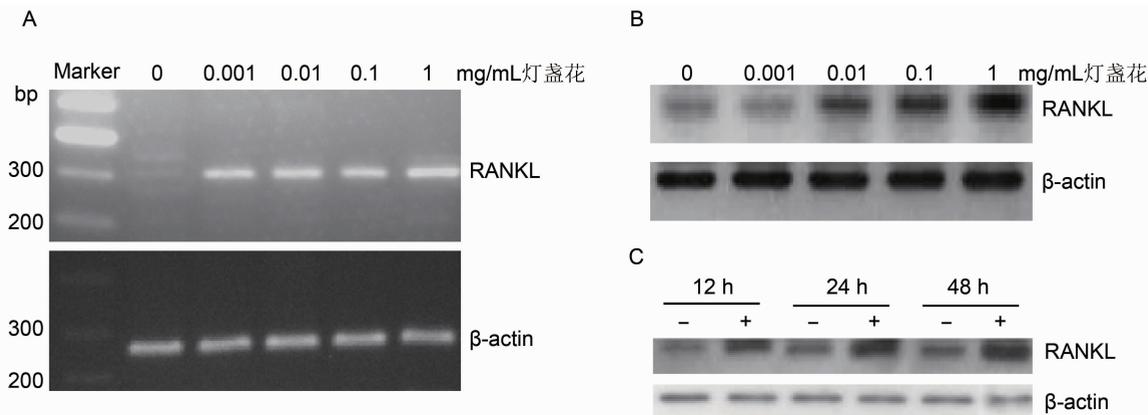
注:与对照组比较,*P < 0.05

2 各组 RAW264.7 细胞 RANK 蛋白及 mRNA 表达比较(图 2,表 4、5) 灯盏花促进 RAW264.7 细胞 RANK mRNA 及蛋白表达。0.001 ~ 1 mg/mL 灯盏花干预 RAW264.7 细胞 48 h 后,RANK mRNA 表达均较对照组显著增加(P < 0.05),1 mg/mL 剂量增加最显著(图 2A),但 0.1 mg/mL 组较 0.01 mg/mL 组要低;RANK 蛋白表达随灯盏花浓度升高而逐步增加(表 5)且均有统计学意义(P < 0.05)。1 mg/mL 灯盏花干预 12、24、48 h 后,RANK 蛋白表达逐步增加且均有统计学意义(P < 0.05)。



注:A 为 OPG、RANKL mRNA 表达;B、D 为各浓度灯盏花干预 48 h OPG、RANKL 蛋白表达;C、E 为 1 mg/mL 灯盏花干预各时间点 OPG、RANKL 蛋白表达,负号为 0 mg/mL 组结果

图 1 各浓度及时间点 MG63 细胞 OPG、RANKL mRNA 及蛋白表达



注:A 为 RANK mRNA 表达;B 为各浓度灯盏花干预 48 h RANK 蛋白表达;C 为 1 mg/mL 灯盏花干预各时间点 RANK 蛋白表达,负号为 0 mg/mL 组结果

图 2 各浓度及时间点 RAW264.7 细胞 RANK mRNA 及蛋白表达

表 4 各浓度灯盏花干预 48 h 后 RAW264.7 细胞 RANK mRNA 及蛋白表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

浓度 (mg/mL)	RANK/β-actin mRNA	RANK/β-actin
0	98 ± 76	105 ± 22
0.001	401 ± 71 *	89 ± 31
0.01	486 ± 92 *	331 ± 44 *
0.1	462 ± 33 *	363 ± 50 *
1	711 ± 52 *	594 ± 81 *

注:与对照组比较, *P < 0.05

讨 论

OPG/RANKL/RANK 系统是参与骨代谢的最主

要最关键的因子^[7-9]。OPG/RANKL/RANK 系统的发现及其相互之间关系的阐明,解决了骨生物学一个长期没能解决的问题,即破骨细胞的形成分化由成骨前体细胞和间质细胞控制。OPG/RANKL/RANK 系统是使成骨细胞(和或骨髓间质细胞)与破骨细胞相偶联,在破骨细胞分化、活化过程中发挥重要作用的信号传导通路。OPG 有效地抑制骨吸收是骨代谢研究领域近十年来取得的一项重大发现,它与 RANKL 竞争性结合 RANK 调节破骨细胞生成与活化,从而调节骨代谢^[10,11]。OPG 广泛分布于人和动物的多种组织

表 5 1 mg/mL 灯盏花干预各时间点 RAW264.7 细胞 RANK 蛋白表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

指标	12 h		24 h		48 h	
	-	+	-	+	-	+
RANK/ β -actin 蛋白	105 \pm 27	356 \pm 46 *	97 \pm 18	424 \pm 44 *	99 \pm 21 %	594 \pm 81 *

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;正负号分别为 1,0 mg/mL 组结果

细胞中,许多细胞如骨髓间质细胞、成骨细胞、成纤维细胞、主动脉平滑肌细胞、成骨肉瘤细胞等均可分泌 OPG。RANKL 与巨噬细胞集落刺激因子(macro-phage-colony stimulating factor, M-CSF)是目前已知的破骨细胞生成过程中必需的两种细胞因子^[12]。M-CSF 主要维持破骨细胞的生存,RANKL 则是促进破骨细胞的定向分化^[13,14]。RANKL 主要由骨髓间质细胞和成骨细胞分泌,破骨细胞不分泌 RANKL。RANKL 的受体 RANK 是一种跨膜蛋白,主要存在于骨髓巨噬细胞的表面。当 RANKL 与 RANK 结合后,RANK 就通过其膜内部分和肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor associated factors, TRAFs)相结合,然后不同的 TRAFs 再通过其下游的 4 条信号传导途径,即细胞核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)、氨基末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 蛋白、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)来调节破骨细胞的分化和功能^[15]。研究显示,促进破骨细胞激活的多种生物活性物质,包括各种激素、细胞因子等,均最终通过促进成骨细胞表达 RANKL 而激活破骨细胞。OPG 作为诱饵受体,竞争性地与两种活性形式的 RANKL 结合,从而阻断 RANKL 与 RANK 相互作用,这不仅抑制了 RANKL 对破骨细胞的促进作用,也使其他促骨吸收因子失去作用。

位于成骨细胞(和或骨髓间质细胞)表面的 RANKL 与位于破骨前体细胞表面的受体 RANK 结合,与此同时 M-CSF 与位于破骨前体细胞表面的受体 c-Fms 结合,这些对于破骨前体细胞向破骨细胞的形成分化将起决定性作用^[16],而 OPG 可抑制或阻断 RANKL 的这种作用^[17]。许多激素和细胞因子,如 TNF- α (刺激 M-CSF 形成和提高 RANKL 的表达^[18])、IL-1 (刺激 M-CSF 形成和提高 RANKL 的表达^[18])、TGF- β (增加 OPG 产物^[19])、甲状旁腺激素(Parathyroid Hormone, PTH 增加 RANKL 产物和减少 OPG 产物^[20])、1,25-(OH)₂ 维生素 D₃ (增加 RANKL 产物^[21])、糖皮质激素(增加 RANKL 产物和减少 OPG 产物^[22])、雌激素(增加 OPG 产物^[23])等通过调节成骨细胞和骨髓间质细胞的 OPG 和

RANKL 产物从而影响破骨细胞的形成分化。其中,雌激素能抑制破骨细胞的分化和诱导破骨细胞的凋亡^[24],其机制是通过干扰 RANK 信号,尤其是干扰 RANKL 诱导的 c-Jun 氨基端激酶(JNK)和原癌基因 c-Jun 的激活与表达^[25,26]。TGF- β 也能刺激破骨前体细胞 RANK 的表达,于是增强破骨细胞对 RANKL 的敏感性^[27]。

有关药物(包括中药)对体外培养成骨细胞或破骨细胞的 OPG、RANKL mRNA 表达影响的国内外文献很多。WANG F 等^[28]应用不同浓度的 1,25-(OH)₂D₃ 诱导大鼠骨髓细胞破骨样细胞的形成,采用体外破骨细胞溶骨模型,观察牙本质片上骨吸收陷窝数目,采用原位杂交技术检测骨髓基质细胞 RANKL mRNA 的表达,结果发现随着 1,25-(OH)₂D₃ 浓度的增加,骨陷窝数明显增多,陷窝面积增大,RANKL mRNA 的表达的阳性信号显著增强。Tanishima S 等^[29]实验发现,米诺磷酸可影响骨关节中 RANKL 的表达,抑制胶原诱导的关节炎老鼠的破骨性骨吸收。国内学者实验发现,骨灵片、淫羊藿甙、金雀异黄素、三七总甙、蛇床子素等中药均可通过促进成骨细胞 OPG 的合成和抑制成骨细胞 RANKL 的分泌,从而促进骨形成,防治骨质疏松的发生^[30-34]。灯盏花在中医中常用于治疗跌打损伤、风湿疼痛等,均有大量研究证明其有改善器官血供、降低血压及血液黏滞程度、改善微循环等作用^[35],能加速骨改建,但暂时没有大量证据表明其会引起骨质疏松。有关灯盏花对体外培养成骨细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响,尚未见报导,因此本课题组进行了实验。

实验结果提示,灯盏花 0.001、0.01、0.1、1.0 mg/mL 四种药物浓度和给药 12、24、48 h 三个时间内,灯盏花呈时间和剂量依赖性抑制 MG63 细胞 OPG mRNA 和蛋白的表达,同时呈时间和剂量依赖性促进 MG63 细胞 RANKL mRNA 和蛋白的表达。灯盏花通过抑制成骨细胞 OPG 分泌的同时促进成骨细胞 RANKL 的分泌。而成骨细胞分泌的 RANKL,就会与体内存在于骨髓巨噬细胞表面的受体 RANK 结合。当 RANKL 与 RANK 结合后,就会通过如上所述的途径来调节破骨细胞的分化和功能,从而达到加快牙槽骨改建、加快正畸牙移动的功效。

由云南生物谷生物医药研究所提供的灯盏细辛粉剂每瓶含野黄芩苷 8.7 mg, 总咖啡酸脂 40.0 mg, 另有许多其他成分, 所以上述作用可能是野黄芩苷在起主要作用^[36,37], 也可能是另外的某种成分在起主要作用, 更可能是该药物制剂中多种成分共同作用的结果。

灯盏花通过抑制成骨细胞 OPG 分泌的同时促进成骨细胞 RANKL 的分泌, 证明了灯盏花能促进破骨细胞活跃而加快骨吸收, 对正畸患者可加快正畸牙移动。但长期应用灯盏花是否会引起机体全身骨质疏松, 对正畸患者应用是否会影响牙齿正畸结束时牙的固位稳固, 这些还有待进一步的实验和更长时间的观察。

参 考 文 献

- [1] 刘侃, 夏翔, 潘胜利, 等. 中草药(灯盏花)加速豚鼠牙移动的实验研究[J]. 口腔医学, 1992, 12(1): 17-19.
- [2] 刘侃, 沈刚, 潘胜利, 等. 复方灯盏花加速正畸牙移动的实验研究[J]. 上海第二医科大学学报, 1991, 11(3): 222-223.
- [3] 刘长庚, 黄生高, 凌天旸, 等. 中草药灯盏花对兔正畸牙移动过程中牙周组织血管内皮生长因子表达的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(5): 458-461.
- [4] 刘长庚, 黄生高, 王月辉, 等. 灯盏花离子导入与局部注射对兔正畸牙移动影响的对比研究[J]. 中成药, 2007, 29(7): 1077-1078.
- [5] Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, et al. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue[J]. J Periodont Res, 2004, 39(1): 42-49.
- [6] 裘松波, 杨健, 谭颖徽. 核因子 κ B 受体活化因子配体在大鼠正畸牙压力侧牙周组织中的表达[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2005, 15(2): 76-79.
- [7] Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 234(1): 137-142.
- [8] 刘长庚, 凌天旸. OPG/RANKL/RANK 系统及其临床应用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(6): 534-538.
- [9] Baudhuin M, Duplomb L, Ruiz Velasco C, et al. Key roles of the OPG-RANK-RANKL system in bone oncology[J]. Exp Rev Anticancer Ther, 2007, 7(2): 221-232.
- [10] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997, 89(2): 309-319.
- [11] Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 234(1): 137-142.
- [12] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(7): 3597-3602.
- [13] Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families[J]. Endocr Res, 1999, 20(3): 345-357.
- [14] Hofbauer L, Khosla S, Dunstan C, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(1): 2-12.
- [15] Shi W, Michael WH, Steven L, et al. Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF- κ B and mitogen-activated protein kinase signaling[J]. J Biol Chem, 2002, 277(8): 6622-6630.
- [16] Liu JZ, Ji ZL, Chen SM. The OPG/RANKL/RANK system and bone resorptive disease[J]. Chin J Biotechnol, 2003, 19(6): 655-660.
- [17] Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(18): 7260-7264.
- [18] Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells[J]. Bone, 1999, 25(3): 255-259.
- [19] Takai H, Kanematsu M, Yano K, et al. Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells[J]. J Biol Chem, 1998, 273(42): 27091-27096.
- [20] Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteo-

- clast-like cell formation [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(8): 3552-3561.
- [21] Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promotor structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1445(1): 134-141.
- [22] Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(10): 4382-4389.
- [23] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(10): 4367-4370.
- [24] Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β [J]. *Nat Med*, 1996, 2(10): 1132-1136.
- [25] Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, et al. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stomal cell independent mechanism involving c-Jun repression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14): 7829-7834.
- [26] Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, et al. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced JNK activation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(12): 8836-8840.
- [27] Yan T, Riggs BL, Boyle WJ, et al. Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF- β_1 [J]. *J Cell Biochem*, 2001, 83(2): 320-325.
- [28] Wang F, Lin Z, Li YM, et al. Effects of 1,25-(OH)
2D3 on stimulation of osteoclast-like cells formation and expression of ODF mRNA in murine marrow cells *in vitro* [J]. *J Oral Sci Res*, 2004, 20(4): 400-403.
- [29] Tanishima S, Kishimoto Y, Fukata S, et al. Mino-dronic acid influences receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression and suppresses bone resorption by osteoclast in rats with collagen-induced arthritis [J]. *Mod Rheumatol*, 2007, 17(3): 198-205.
- [30] Zhao Y, Li J, Liu Y, et al. Gu Ling Pian, a traditional Chinese medicine, regulates function and OPG/RANKL synthesis of osteoblasts via the p38 MAPK pathway [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59(8): 1167-1173.
- [31] 张秀珍,杨黎娟.淫羊藿对大鼠成骨细胞护骨素、RANKL 表达的影响 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2006, 22(30): 222-225.
- [32] 王运林,刘晓晴,杨菲,等.金雀异黄素刺激人成骨细胞分泌护骨素以及抑制 IL-6 生成 [J]. *中国康复*, 2006, 21(2): 75-77.
- [33] 吴丽萍,陶天遵,石义刚,等.三七总甙对成骨细胞增殖分化及 OPG 表达影响的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2004, 10(2): 239-241.
- [34] 胡彬,吴翠环,陈璐璐.蛇床子素对大鼠成骨细胞中 OPG 和 RANKL 基因 mRNA 表达的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2004, 10(4): 415-419.
- [35] 夏修龙.灯盏花的研究与临床应用 [J]. *九江学院学报*, 2006, 21(3): 86-89.
- [36] 李昂,赵俊杰,郭宁,等.黄芩苷对人牙周膜细胞功能活性调节的实验研究 [J]. *口腔生物医学*, 2011, 2(2): 62-66.
- [37] 葛志华,杨宁,孙立新.野黄芩苷对内毒素抑制人牙周膜细胞碱性磷酸酶活性的影响 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2010, 19(4): 365-367.

(收稿:2013-1-16 修回:2013-09-20)