

雌激素作用下罗格列酮对 RAW264.7 向破骨细胞分化的影响

胡英英 哈珊珊 朱宁静 宋亚玲 汪昌宁*

(口腔基础医学省部共建国家重点实验室培育基地和口腔生物医学教育部重点实验室,
武汉大学口腔医学院 湖北 武汉 430079)

[摘要] 目的:研究雌激素作用下,罗格列酮对 RAW264.7 向破骨细胞分化的影响及机制。方法:破骨细胞诱导液核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)诱导鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞,加入罗格列酮和/或雌激素诱导 5 d,抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色检测破骨细胞数量,实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测破骨相关基因和转录因子的表达;噻唑蓝(methyl thiazol tetrazolium, MTT)检测罗格列酮和/或雌激素对细胞活性影响。结果:RANKL 诱导破骨细胞形成,且在罗格列酮或雌激素刺激下,破骨细胞数量增加,破骨相关基因和转录因子表达增高($P < 0.05$);但在雌激素作用下罗格列酮抑制破骨细胞形成,破骨相关基因及转录因子表达显著降低($P < 0.05$)。结论:雌激素作用下罗格列酮可能通过肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6)和活化 T 细胞核因子,细胞质 1(nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1, NFATc1)抑制破骨细胞形成。

[关键词] 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 罗格列酮 雌激素 破骨细胞

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)05—0502—05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.05.021

Effect of Rosiglitazone on Osteoclastic Differentiation of RAW264.7 Cells under Estrogen. HU Ying-ying, HA Shan-shan, ZHU Ning-jing, SONG Ya-ling, WANG Chang-ning*. *The State Key Laboratory Breeding Base of Basic Science of Stomatology (Hubei—Most) & Key Laboratory of Oral Biomedicine Ministry of Education, School & Hospital of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China.*

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of rosiglitazone on osteoclastic differentiation of RAW264.7 cells under estrogen. **Methods:** The murine macrophage RAW264.7 cells lines were induced by RANKL in the presence or absence of rosiglitazone and/or estrogen for 5 days. The number of osteoclasts was detected by TRAP staining and the expression of osteoclast related genes and transcription factors were detected by qRT-PCR. The effects of rosiglitazone and/or estrogen on cell viability were detected by MTT. **Results:** Rosiglitazone and estrogen increased cell viability. RANKL induced osteoclast formation and the number of osteoclasts, osteoclast related genes and translation factors increased under rosiglitazone or estrogen stimulation ($P < 0.05$). However, rosiglitazone inhibited osteoclast formation, and osteoclast related genes and translation factors were significantly decreased under estrogen ($P < 0.05$). **Conclusion:** Rosiglitazone could inhibit osteoclast formation by TRAF6 and NFATc1 under estrogen.

[Key words] PPAR γ Rosiglitazone Estrogen Osteoclast

骨组织通过成骨细胞的骨形成作用和破骨细胞的骨吸收作用维持动态平衡。破骨细胞来源于造血干细胞,分化进程由核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand,

RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)调控, M-CSF 促进破骨前体细胞增殖, RANKL 促进破骨前体细胞向成熟的破骨细胞分化^[1]。RANKL 与核因子- κ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)结合后,招募肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6),激活活化 T 细胞核因子,细胞质 1

基金项目 国家自然科学基金(编号:81670976)

作者简介 胡英英(1992~),女,江西九江人,硕士在读,主要从事牙周病学相关研究工作。

* 通讯作者 汪昌宁, E-mail:wangcn@whu.edu.cn

(nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1, NFATc1)及其下游的破骨细胞激活受体 (osteoclast activating receptor, OSCAR),使破骨标志基因抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)^[2]、ATP6V0D2^[1]等的表达增加而成为多核破骨细胞^[2,3]。破骨细胞数量增加及功能活跃时会导致病理性骨丢失,如更年期后骨质疏松、牙周炎导致的牙槽骨吸收及类风湿性关节炎等^[4]。牙周炎是口腔常见疾病之一,在更年期女性中发病率更高^[5],其典型特征是软组织炎症和骨组织破坏。如何抑制炎症和骨吸收一直是牙周炎防治的研究重点。

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)是配体激活转录因子,属于核激素受体家族成员^[6]。研究表明 PPAR γ 抑制炎症反应,参与脂质代谢、糖脂代谢及骨代谢等生命进程^[6]。2型糖尿病药物噻唑烷二酮类 (thiazolidinedione, TZD,如罗格列酮、匹格列酮等)是 PPAR γ 的合成配体。临床研究发现,糖尿病患者服用此类药物后,体重增加,骨折发生率升高^[7]。体内研究结果显示,罗格列酮灌胃小鼠出现骨量降低,成骨速度减少,破骨指标表达增加^[8]。PPAR γ 可抑制成骨细胞分化^[9],并且通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共受体 1 β (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 β , PGC1 β)和雌激素受体相关受体 α (estrogen receptor related receptor α , ERR α)促进破骨细胞的形成^[2]。但也有研究结果显示,PPAR γ 可抑制由炎症因子诱导的破骨形成^[10,11]。

雌激素生理浓度范围为 10^{-11} mol/L ~ 10^{-7} mol/L^[12]。女性更年期后,由于体内雌激素水平降低,可出现全身骨质疏松。全身性骨质疏松与牙槽嵴顶高度降低和牙周骨组织破坏密切相关^[5]。行雌激素替代疗法,可以使全身骨密度明显增高。体内外研究结果显示雌激素可促进骨形成并抑制破骨吸收^[13,14]。临床研究发现,服用 TZD 类药物产生骨吸收在女性较男性中更明显,在更年期较非更年期更明显^[7,15]。由此推测,雌激素可能干扰 TZD 类药物对破骨细胞的诱导作用。因而本研究旨在探究雌激素作用下,罗格列酮对破骨细胞的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 低糖 DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、胰酶 (Gibco, 美国); 罗

格列酮 (Rosiglitazone, R)、雌激素 (Estrogen, ES)、TRAP 染色试剂盒 (Sigma 公司, 美国); RANKL 液 (R&D, 美国); 总 RNA 提取试剂盒 (Omega, 美国); 逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应试剂盒 (诺维赞, 中国)。

1.2 破骨细胞诱导与实验分组 RAW264.7 细胞培养在基础培养基 [DMEM + 10% FBS + 1% 双抗 (青霉素/链霉素)] 中,待细胞长满后,用细胞刮刮取细胞,按 2×10^4 /mL 密度种于 96/12 孔板中,加入破骨诱导液 (基础培养基 + 50 μ g/L RANKL) 诱导 5 d,培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中。第 3 天时换液。细胞按如下分组进行处理:对照组 (N): 基础培养基/破骨诱导液; 罗格列酮组 (R): 基础培养基/破骨诱导液 + 20 nmol/L R; 雌激素组 (ES): 基础培养基/破骨诱导液 + 10^{-8} mol/L ES (雌激素浓度根据以往文献选择^[12,14,16]); 雌激素 + 罗格列酮组 (ES+R): 基础培养基/破骨诱导液 + 10^{-8} mol/L ES + 20 nmol/L R。

1.3 细胞活性分析 用噻唑蓝 (methyl thiazol tetrazolium, MTT) 法检测药物对细胞活性影响。MTT 粉末用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 配置成 5 g/L 的溶液避光保存。将细胞接种于 96 孔板中,每组设 6 个复孔,不同刺激培养 3 d 和 5 d 后,弃去培养基。每孔加入 150 μ L 混合液 (MTT : DMEM = 4 : 11),置于 37 $^{\circ}$ 孵育箱。4 h 后,吸出液体,每孔加 200 μ L 二甲基亚砷,避光摇床孵育 30 min,测波长 490 nm 处 A 值。

1.4 TRAP 染色 将 RAW264.7 细胞种于 96 孔板中,每组设 5 个复孔。破骨诱导 5 d 后,弃上清,用 4% 多聚甲醛固定 1 h。根据 TRAP 染色试剂盒说明书进行染色,待染色成功,弃去染色液,终止染色,37 $^{\circ}$ C 烘干。镜下观察破骨细胞并计数核数目 ≥ 3 个的破骨细胞数目。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 将 RAW264.7 细胞种于 12 孔板中,破骨诱导 5 d 后,依据说明书用 RNA 试剂盒提取破骨细胞总 RNA,并用逆转录试剂盒逆转得到 cDNA,随后根据荧光定量 PCR 试剂说明书进行 qRT-PCR。用 7900HT 仪器检测,数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行处理。引物序列如表 1 所示。

1.6 统计学分析 每组实验至少重复 3 次。采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验, ≥ 3 组间比较采用单因素方差分析。采用 GraphPad Prism 7 软件

表 1 引物序列表

Tab. 1 Primers sequences for RT-PCR

基因名称	引物序列(5' → 3')
PPAR γ	F: CCAAGAATACCAAAGTGCAT R: TCACAAGCATGAACTCCATAG
ATP6V0D2	F: CAGAGCTGTACTTCAATGTGGAC R: AGGTCTCACACTGCACTAGGT
OSCAR	F: CCGTGCTGACTTCACACCAA R: GGGGTGACAAGGCCACTTTT
TRAF6	F: AAAGCGAGAGATTCTTCCCTG R: ACTGGGGACAATTCAGTAGAGC
NFATc1	F: GACCCGGAGTTCGACTTCG R: TGACACTAGGGGACATAACTG
GAPDH	F: TCCATGACAACCTTGGTATCG R: TGTAGCCAAATTCGTTGTCA

计算与制图,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞形成破骨细胞
加入 50 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ RANKL 液诱导 RAW264.7 细胞 5 d 后,进行 TRAP 染色,发现两种浓度的 RANKL 诱导液可成功诱导出多核破骨细胞,且随诱导液浓度升高(0、50、100 $\mu\text{g/L}$),破骨细胞数量增加(0.00 \pm 0.00、28.33 \pm 0.47、69.00 \pm 2.94)。50 $\mu\text{g/L}$ 的 RANKL 液诱导的破骨数量即具有统计学差异,将 50 $\mu\text{g/L}$ 作为后续诱导液浓度。

2.2 罗格列酮促进破骨细胞形成和 PPAR γ 表达
罗格列酮刺激破骨细胞,TRAP 染色结果显示,罗格列酮促进破骨细胞形成,随着浓度升高(0、10、20 nmol/L),破骨细胞数量增加(34.67 \pm 2.05、42.33 \pm 3.78、52.33 \pm 2.87);20 nmol/L 罗格列酮作用时破骨细胞数量与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。20 nmol/L 罗格列酮刺激 RAW264.7 细胞 24 h 和 48 h 后,qRT-PCR 结果显示,罗格列酮可明显提高 PPAR γ 的表达,且随时间增加(0、24、28 h),表达增高(1.01 \pm 0.17、2.88 \pm 0.35、4.51 \pm 0.45),所以将 20 nmol/L 作为罗格列酮后续实验浓度。

表 2 药物对 RAW264.7 细胞活性影响

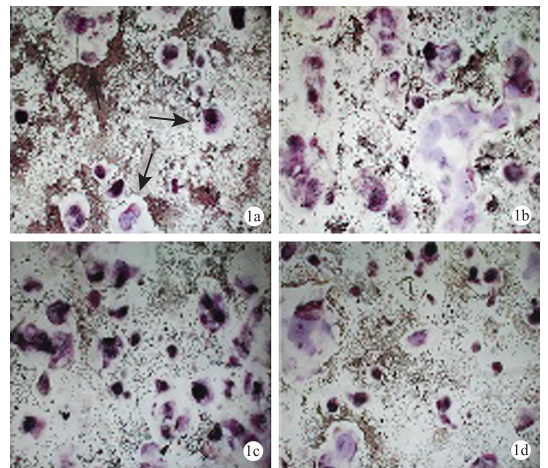
Tab. 2 Effects of drugs on the viability of RAW264.7 cells

组别	时间	
	3 d	5 d
N	0.43 \pm 0.04	2.41 \pm 0.15
R	0.43 \pm 0.01	3.45 \pm 0.08 [#]
ES	0.52 \pm 0.02 [*]	3.35 \pm 0.21 [#]
ES+R	0.45 \pm 0.02	3.38 \pm 0.28 [#]

注:与 3 d 时 N 组相比, * $P < 0.01$;与 5 d 时 N 组相比, # $P < 0.01$, # # $P < 0.001$

2.3 MTT 检测 加入不同刺激(R:20 nmol/L, ES:10⁻⁸ mol/L)培养细胞,在第 3 天和第 5 天进行细胞活性 MTT 检测。结果显示,在第 3 天时,雌激素提高细胞活性,罗格列酮和罗格列酮+雌激素对细胞活性无明显影响。刺激 5 d 后,罗格列酮和雌激素都使细胞活性提高(表 2)。

2.4 TRAP 染色结果 细胞加入不同刺激破骨诱导 5 d 后,进行 TRAP 染色,镜下拍照并计数核 ≥ 3 个的破骨细胞(如图 1 中黑色箭头所示,比例尺 = 50 μm)。结果显示,PPAR γ 激动剂罗格列酮可明显促进破骨细胞的生成,雌激素也可明显提高破骨细胞数量。但 ES+R 组(39.67 \pm 4.03)较 ES 组(58.00 \pm 3.74),破骨细胞数量明显减少($P < 0.01$)。



1a:对照组(N);1b:罗格列酮组(R);1c:雌激素组(ES);1d:雌激素+罗格列酮组(ES+R)

图 1 TRAP 染色($\times 4$)Fig. 1 TRAP staining ($\times 4$).

2.5 qRT-PCR 结果 破骨诱导 5 d 后,提取细胞总 RNA 进行 qRT-PCR。结果显示,在罗格列酮组和雌激素组破骨相关基因 ATP6V0D2、OSCAR 表达明显增加。同时加入雌激素和罗格列酮后,ATP6V0D2、OSCAR 表达明显降低。破骨转译因子 TRAF6 和 NFATc1 在每组与破骨细胞数目和破骨相关基因表达呈现相同的变化趋势(表 3)。

3 讨论

牙周炎是危害口腔健康,影响人类生活质量的高发病率疾病。牙周炎发病时破骨细胞功能活跃导致病理性骨丢失,牙槽骨破坏^[4]。PPAR γ 对骨代谢的影响一直以来受到关注。本研究中,PPAR γ 激动剂罗格列酮可促进破骨细胞形成,使破骨标记基因表达增加,与以往研究结论一致^[17]。牙周炎时牙槽骨吸收增加,骨形成减少,如何促进牙槽骨量增

表 3 各组破骨相关基因表达情况

Tab. 3 Expression of osteoclastic related genes in each group

组别	ATP6V0D2	OSCAR	TRAF6	NFATc1
N	1.00±0.02	1.00±0.01	1.00±0.02	1.00±0.02
R	1.20±0.09*	1.16±0.01**	1.20±0.04*	1.14±0.06*
ES	1.50±0.05**	1.32±0.02**	1.44±0.09**	1.80±0.06**
ES+R	1.04±0.01 [#]	0.93±0.11 [#]	0.85±0.07 [#]	1.46±0.16 [#]

注:与 N 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 ES 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

加及减少牙槽骨的破骨吸收,一直是牙周炎干预的研究热点。

更年期后,雌激素水平降低,破骨功能活跃导致绝经期妇女骨量下降,牙槽骨吸收增加,牙周炎高发并加重^[5]。雌激素直接靶向作用于破骨细胞,从而抑制破骨细胞的形成^[13],因而雌激素替代疗法可以缓解更年期后骨质疏松。但本研究中,加入雌激素后,破骨细胞数量及破骨相关因子表达却明显升高。这和预期结果不一致。研究显示,在 RAW264.7 细胞中,雌激素促进同种异体移植炎症因子(allograft inflammatory factor 1,AIF-1)的表达,该因子和关节炎、胰岛素依赖型糖尿病等密切相关^[12]。在巨噬细胞系及造血干细胞中,雌激素可提高炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达^[16,18]。在长期缺乏雌激素的乳腺癌细胞系和滑膜细胞中加入雌激素,炎症因子 TNF- α 、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和活性氧簇因子(reactive oxygen species, ROS)表达增多^[19,20]。雌激素可提高普通培养成软骨细胞中转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)表达,但将该细胞培养在含炎症因子的培养基中,雌激素抑制 TGF- β 表达^[21],而 TGF- β 抑制炎症促进成骨^[22]。炎症和氧化应激因子促进破骨细胞形成^[23,24]。本研究中,加入雌激素后破骨形成增多,推测可能和炎症因子的增多有关,需进一步检测相关炎症因子的表达。

同时加入雌激素和罗格列酮后,破骨细胞数量和破骨相关基因的表达明显减少。原因可能是:(1) PPAR γ 作用:PPAR γ 通过核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)等信号通路抑制炎症因子产生^[6,11],从而抑制由炎症因子带来的破骨形成。炎症因子和 PPAR γ 促进破骨,但两者同时作用时,PPAR γ 可抑制由炎症所导致的骨吸收^[10,11]; (2) ES 作用:切除卵巢后小鼠体内 PPAR γ 表达增高,破骨吸收增加,外源性加入雌激素后,PPAR γ 含量明显

降低,骨量增加,可见雌激素会影响 PPAR γ 的促破骨作用^[13]。这也和以往临床研究的结果一致,TZD 类药物引起的骨吸收在更年期较非更年期更显著^[7,15]。这对治疗女性更年期后牙周炎具有指导意义。

多核破骨细胞由破骨前体细胞融合而成,破骨功能基因 ATP6V0D2 缺乏影响融合过程,破骨细胞形成减少^[1],OSCAR 表达减少,OSCAR 的促破骨效应降低^[3]。TRAF6 和 NFATc1 对 RANKL 诱导破骨至关重要。破骨功能活跃时,TRAF6 和 NFATc1 表达增高,反之亦然^[25]。当造血干细胞缺乏 TRAF6 或 NFATc1 时,无法单用 RANKL 诱导破骨细胞形成^[23,26]。本研究中,在罗格列酮+雌激素组,TRAF6 和 NFATc1 表达降低时,破骨数量和破骨相关因子表达降低。雌激素作用下罗格列酮可能通过 TRAF6 和 NFATc1 抑制破骨细胞的形成。

本研究尚存在较多局限,需要更多的体内外研究进一步验证,从而为临床治疗牙周炎,尤其是女性更年期后牙周炎提供进一步指导。

参考文献

- [1] Wang Q, Yao L, Xu K, et al. Madecassoside inhibits estrogen deficiency-induced osteoporosis by suppressing RANKL-induced osteoclastogenesis [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(1):380-394.
- [2] Wei W, Wang X, Yang M, et al. PGC1beta mediates PPARgamma activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss [J]. Cell Metab, 2010, 11(6):503-516.
- [3] Humphrey MB, Nakamura MC. A comprehensive review of immunoreceptor regulation of osteoclasts [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2016, 51(1):48-58.
- [4] Xin Z, Jin C, Chao L, et al. A matrine derivative M54 suppresses osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss by targeting ribosomal protein S5 [J]. Front Pharmacol, 2018, 9:22.
- [5] Reddy MS, Morgan SL. Decreased bone mineral density and periodontal management [J]. Periodontol 2000, 2013, 61(1):195-218.
- [6] 杨芳,陈明月,胡英英,等. PPAR γ 在脂多糖刺激牙周膜细胞中调控 NF- κ B 信号通路的作用研究[J]. 口腔医学研究,

- 2017, 33(7):698-702.
- [7] Kahn SE, Zinman B, Lachin JM, et al. Rosiglitazone-associated fractures in type 2 diabetes: an analysis from a diabetes outcome progression trial (ADOPT) [J]. *Diabetes Care*, 2018, 31(5):845-851.
- [8] Lazarenko OP, Rzonca SO, Hogue WR, et al. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(6):2669-2680.
- [9] Case N, Thomas J, Xie Z, et al. Mechanical input restrains PPARgamma2 expression and action to preserve mesenchymal stem cell multipotentiality [J]. *Bone*, 2013, 52(1):454-464.
- [10] Koufany M, Chappard D, Netter P, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone preserves bone microarchitecture in experimental arthritis by reducing the interleukin-17-dependent osteoclastogenic pathway [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(12):3084-3095.
- [11] Qiao W, Wang C, Huang W, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays dual roles on experimental periodontitis in rats [J]. *J Clin Periodontol*, 2018, 45(5):514-523.
- [12] Yan DJ, Chen ZW. 17beta-estradiol increased the expression of daintain/AIF-1 in RAW264. 7 macrophages [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(10):2103-2105.
- [13] Guo L, Chen K, Yuan J, et al. Estrogen inhibits osteoclasts formation and bone resorption via microRNA-27a targeting PPARgamma and APC [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1):581-594.
- [14] Chen F, Ouyang Y, Ye T, et al. Estrogen inhibits RANKL-induced osteoclastic differentiation by increasing the expression of TRPV5 channel [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(4):651-658.
- [15] Schwartz AV, Sellmeyer DE, Vittinghoff E. Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(9):3349-3354.
- [16] Nakaya M, Tachibana H, Yamada K. Isoflavone genistein and daidzein up-regulate LPS-induced inducible nitric oxide synthase activity through estrogen receptor pathway in RAW264. 7 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 71(1-2):108-114.
- [17] Wu J, Ru N, Li S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates bone remodeling after midpalatal suture expansion in mice [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2015, 30(6):1423-1430.
- [18] You HJ, Kim JY, Jeong HG. 17β-Estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303(4):1129-1134.
- [19] Powell B, Szeleifer I, Dhaher YY. In silico study of principal sex hormone effects on post-injury synovial inflammatory response [J]. *PLoS One*, 2018, 13(12):e0209582.
- [20] Fan P, Abderrahman B, Chai TS, et al. Targeting peroxisome proliferator-activated receptor gamma to increase estrogen-induced apoptosis in estrogen-deprived breast cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(12):2732-2745.
- [21] Peng X, Qiao Z, Wang Y, et al. Estrogen reverses nicotine-induced inflammation in chondrocytes via reducing the degradation of ECM [J]. *Int J Rheum Dis*, 2019, 22(4):666-676.
- [22] Yang Y, Zhang N, Lan F, et al. Transforming growth factor-beta 1 pathways in inflammatory airway diseases [J]. *Allergy*, 2014, 69(6):699-707.
- [23] Li Z, Zhang W, Huang Y. MiRNA-133a is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promoting osteoclast differentiation [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50:273-280.
- [24] Pi Y, Liang H, Yu Q, et al. Lowfrequency pulsed electromagnetic field inhibits RANKL induced osteoclastic differentiation in RAW264. 7 cells by scavenging reactive oxygen species [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5):4129-4136.
- [25] Wang J, Wu X, Duan Y. Magnesium lithospermate B protects against lipopolysaccharide-induced bone loss by inhibiting RANKL/RANK pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:64.
- [26] Yao Z, Lei W, Duan R, et al. RANKL cytokine enhances TNF-induced osteoclastogenesis independently of TNF receptor associated factor (TRAF) 6 by degrading TRAF3 in osteoclast precursors [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(24):10169-10179.

[收稿日期:2019-01-15]

(本文编辑 关隽)