

· 论著 ·

低分子量褐藻糖胶对破骨细胞凋亡的影响

金鑫¹ 朱立国² 李秀兰¹ 贾建¹ 张杨¹ 孙晓雷¹ 马剑雄¹ 李风波¹ 马信龙^{1*}

1. 天津市天津医院骨科研究所, 天津 300211

2. 中国中医科学院, 北京 100102

中图分类号: R34 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 06-0657-06

摘要: 目的 探讨低分子量褐藻糖胶(LMWF)对小鼠单核细胞 RAW264.7 诱导成熟破骨细胞凋亡的影响。方法 通过 100 ng/mL RANKL 诱导 RAW264.7 细胞株分化为破骨细胞,经 TRAP 特异性染色和骨吸收陷窝对诱导后的细胞进行鉴定。鉴定成功后,用 100 ng/mL RANKL 诱导 RAW264.7 细胞株 5 d 后,使用含有 LMWF 的培养基继续培养 3 d,通过对 TRAP 阳性细胞计数和分析骨吸收面积来观察低分子量褐藻糖胶对破骨细胞的抑制和骨吸收功能情况;采用流式细胞术检测 LMWF 对破骨细胞凋亡的影响,caspase-3 活性测试试剂盒检测 LMWF 对 caspase-3 活性进行测定;RT-PCR 检测 LMWF 对成熟破骨细胞 BAX 与 BCL-2 基因表达的影响。结果 单纯采用 100 ng/mL 的 RANKL 可成功诱导成熟的、有功能的破骨细胞。LMWF 可以明显抑制 RANKL 诱导成熟破骨细胞的形成以及成熟破骨细胞的骨吸收功能;流式细胞术显示 LMWF 可增加成熟破骨细胞的早期凋亡率;并且能升高 caspase-3 的活性;PCR 显示 LMWF 可明显下调破骨细胞凋亡相关的 BCL-2 和上调 BAX 基因 mRNA 表达,降低 BCL-2/BAX 的比值。结论 低分子量褐藻糖胶可抑制破骨细胞的活性与骨吸收能力,促进破骨细胞凋亡,其主要机制是通过下调 BCL-2 和上调 BAX mRNA 基因表达实现的。

关键词: 低分子量褐藻糖胶;破骨细胞;骨质疏松;凋亡;caspase-3;BCL-2

Effect of low-molecular-weight fucoidan on osteoclast apoptosis

JIN Xin¹, ZHU Ligu², LI Xiulan¹, JIA Jian¹, ZHANG Yang¹, SUN Xiaolei¹, MA Jianxiong¹, LI Fengbo¹, MA Xinlong¹

1. Institute of Orthopedics, Tianjin Hospital, Tianjin 300050

2. China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: MA Xinlong, Email: agzhb@sina.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of low-molecular-weight fucoidan (LMWF) on the apoptosis of RAW264.7 murine monocyte-induced mature osteoclasts. **Methods** RAW264.7 cells were induced to differentiate into osteoclasts by 100ng/ml RANKL. The induced cells were identified using TRAP staining and specific bone resorption pits. After successful authentication, RAW264.7 cells were cultured with 100 ng/ml RANKL for 5 days, and then with LMWF (5ng/ml) for 3 days. TRAP-positive cells and bone resorption area were observed to analyze the inhibition effect of LMWF on osteoclasts and bone resorption. The effect of LMWF on apoptosis of osteoclasts was detected using flow cytometry. Caspase-3 activity was measured using the caspase-3 activity assay kit. The effect of LMWF on BAX and BCL-2 gene expression was detected using RT-PCR. **Results** Mature and functional osteoclasts were successfully induced by 100 ng/ml RANKL. LMWF significantly inhibited the activity of mature osteoclasts and osteoclast resorption. LMWF promoted osteoclast apoptosis and caspases-3 activity. LMWF down-regulated apoptosis-associated BCL-2 and up-regulated BAX mRNA expression, thus decreasing the BCL-2/BAX ratio. **Conclusion** LMWF inhibits osteoclast activity and promotes osteoclast apoptosis by down-regulation of BCL-2 and up-regulation of BAX mRNA gene expression.

Key words: Low-molecular-weight fucoidan; Osteoclasts; Osteoporosis; Apoptosis; Caspase-3; BCL-2

褐藻多糖硫酸酯是一类从海带中提取的天然硫

酸化多糖,其主要成分为褐藻糖、硫酸根以及少量糖醛酸、半乳糖和木糖。国内外大量研究表明,褐藻糖胶具有多种生物活性,如抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、抗氧化等^[1]。骨重建是成骨细胞与破骨细胞共同参

基金项目:天津市卫生局科技基金(2011KZ57);天津市中医药管理局(13123)

* 通讯作者: 马信龙, Email: agzhb@sina.com

与的过程,骨形成与骨吸收的失衡是导致骨质疏松症和骨硬化症等疾病的重要病因。成骨细胞参与骨形成,破骨细胞参与骨吸收。因此,破骨细胞的凋亡直接影响骨吸收,从而影响骨重建过程。大量研究证实柚皮苷可以促进成骨细胞的增值、分化成熟;提高骨密度、提升骨骼力学性能,防治去势大鼠骨质疏松^[24]。但褐藻糖胶对破骨细胞凋亡的影响尚未见报道,本实验通过在体外 LMWF 对 RANKL 诱导的成熟破骨细胞的作用,观察 LMWF 对破骨细胞凋亡的影响以及其机制,为 LMWF 抗骨质疏松在破骨细胞方面提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

小鼠单核细胞 RAW264.7 细胞株(中国协和医科大学基础医学细胞中心);褐藻糖胶,(Sigma 公司);牛皮质骨(自制);小鼠重组可溶性核因子 κ B 受体活化因子配体(sRANKL)(Peprotech 公司);caspase-3 活性测试试剂盒(南京碧波公司);抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒(Sigma 公司);高糖 DMEM 培养基、10% 胎牛血清(Gibco 公司);胰蛋白酶、乙二胺四乙酸二钠(Sigma 公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、D-hank's 液(自制);All-in-OneTM qPCR Mix、All-in-OneTM qPCR Primer(美国 GeneCopoeia 公司)。

1.2 仪器

扫描电子显微镜;细胞培养皿(Corning 公司);倒置相差显微镜、CX-21 光学显微镜(日本 Olympus 公司);5% CO₂ 细胞培养箱(Heraeus 公司);流式细胞仪及相关分析软件(BD 公司);iQ5 Real Time PCR 检测洗脱(Bio-Rad)。

1.3 方法

1.3.1 薄骨片制备:粗切获取牛股骨的皮质骨,沿着股骨的长轴方向切取厚约 100 μ m 的皮质骨骨片,细砂纸将骨片打磨平滑,修剪成 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 大小的正方形,紫外线消毒正反面过夜,75% 乙醇浸泡 30 min,无菌 D-hank's 液清洗 3 遍,放置于培养基中,置于 4 $^{\circ}$ C 备用,用时取出晾干。

1.3.2 破骨细胞诱导与鉴定:(1)诱导:将 RAW264.7 单核细胞株接种于 6 孔板上的预置无菌玻片和薄骨片上,细胞接种密度 2×10^4 /mL,4 h 后待细胞贴壁,换为浓度为 100 ng/mL RANKL 的 10% FBS 高糖 DMEM 培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养,每两天换液 1 次。(2)鉴定:诱导 5 d 后,

①倒置相差显微镜观察细胞的形态特征;②TRAP 染色:将玻片取出,用柠檬酸盐/丙酮溶液固定 30 s,在以萘酚 AS-BI 磷酸盐作为底物的孵育液中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,蒸馏水洗 3 次,苏木精复染 2 min,干燥后二甲苯透明,封固后光镜观察抗酒石酸酸性磷酸酶阳性多核破骨细胞(≥ 3 个核)。③骨吸收陷窝:先用胰蛋白酶和 EDTA 将薄骨片上的破骨细胞消化,2.5% 的戊二醛固定 30 min,PBS 超声清洗 3 次,每次 5 min,30%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水,醋酸异戊酯置换乙醇,CO₂ 临界点干燥,喷金后扫描电镜观察骨吸收陷窝。

1.3.3 TRAP 阳性细胞计数与骨吸收面积分析:实验分为空白组和低分子量褐藻糖胶组,按照上述的方法诱导 5 d 后,LMWF 组采用含有 5 ng/mL LMWF 培养基进行诱导 3 d 后取出玻片,进行 TRAP 染色(方法同上)。计数标准:①两组分别在 100 倍视野下随机选取 10 个视野进行计数,取平均值;②细胞呈现玫瑰红色或粉红色,细胞核 ≥ 3 个,上述实验重复 3 次。骨吸收陷窝操作方法同上,两组各 10 张薄骨片,每张骨片随机选取 10 个区域,区域之间无重叠,采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件对骨吸收面积进行分析。

1.3.4 吖啶橙染色:RAW264.7 细胞株以 2×10^4 /mL 密度爬片,100 ng/mL RANKL 诱导 5 d 后,换为含有 5 ng/mL LMWF 的培养基继续培养 48 h,取出盖玻片,4% 多聚甲醛固定 5 min,醋酸酸化 30 s,PBS 清洗 1 min;加入 0.01% 吖啶橙染液 5 min,PBS 清洗,用 0.1 mol/L CaCl₂ 分色 2 min,PBS 缓冲液清洗 3 次(10 s/次)。以 PBS 缓冲液做介质封片,用激发滤板 BG-12,阻断滤片波长 515 nm,在荧光显微镜下观察。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡:细胞诱导培养 5 d 后,换为含有 LMWF 的培养基继续培养 2 d 后,胰酶消化,与培养液一起收集,离心 5 min(1500 r/min)。培养液洗涤细胞 1 次,之后用 PBS 洗涤 1 次,以 1×10^6 /mL 密度重悬细胞于结合缓冲液。取 100 μ L 细胞加入 2 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI(propidium iodide)。设置以下 3 组用于调试流式细胞仪:①不加 Annexin V-FITC 也不加 PI;②加 Annexin V-FITC 不加 PI;③加 PI 不加 Annexin V-FITC。轻轻混匀后室温避光反应 15 min 后,补加 400 μ L 结合缓冲液,流式细胞仪检测结果。

1.3.6 caspase-3 活性测定:细胞诱导培养 5 d 后,换为含有 LMWF 的培养基继续培养 3 d 后,胰酶消

化,离心(2000 r/min, 5 min),吸除上清,PBS 清洗 1 次。加入 50 μ L 裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 30 min,其间涡旋振荡 3 次(10 s/次)。4 $^{\circ}$ C 离心(12000 r/m, 10 min),小心吸取上清液(含裂解的蛋白质)转移至新的管中,按照试验说明书的反应体系进行加样。用酶标仪在 405 nm 波长处测定其吸光值(OD)。计算 caspase-3 的活性单位,饱和底物浓度下 1 个酶活力单位在 37 $^{\circ}$ C 每小时可以剪切 1 nmol/L Ac-DEVE-pNA 产生 1 nmol/L pNA 的 caspase-3 的酶量。计算结果显示为各组相对于对照组的相对量。

1.3.7 荧光定量 PCR 检测相关基因表达:细胞诱导培养 5 d 后,换为含有 LMWF 的培养基继续培养 3 d,之后将两组细胞采用胰酶消化,收集细胞,加 1 mL TRIzol 溶液,振荡混匀。采用相分离技术抽提取 RNA,琼脂糖电泳法检测:BCL-2 与 BAX 基因浓度及完整性。各组检测基因反转录为 cDNA,以 GAPDH 为内参基因,引物由广州复能基因有限公司设计。基因引物序列:GAPDH 正向引物正向引物 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3',反向引物 5'-AGCCTTCTCCATGGTGCTGAAGAC-3',扩增片段为 96 bp; BCL-2 正向引物 5'-ACGGGGTGAAGTGGGGGAGG-3' 反向引物 5'-GCATGCTGGGGCCGTACAGT-3', BAX 正向引物 5'-GATGGACGGGTCCGAG-3' 反向引物 5'-CTCAGCCCATCTTCTTCCAG-3' 逆转录反应体系、PCR 扩增体系以及反应条件按照试剂盒说明书设定。反应完成后进行扩增曲线和溶解曲线分析。基因表达量以检测基因的初始模板量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

2 结果

2.1 TRAP 阳性细胞计数与骨吸收面积分析

由图 1A、1B 可见,RANKL 诱导 5 d 后,加入含有 LMWF 的培养液(LMWF 浓度 5 ng/mL)继续诱导培养 3 d,进行 TRAP 染色。空白组成熟破骨细胞数量比较多于柚皮苷组,且细胞核较多;经统计学比较, $P < 0.05$,有差异。由图 1C、1D 可见对照组骨吸收陷窝数目较多,骨吸收总面积较大;而 LMWF 组骨吸收数目少,总面积小,经统计学比较, $P < 0.05$,有差异。提示 LMWF 可以抑制破骨细胞的活性以及骨吸收功能,见表 1。

2.2 吖啶橙染色结果

吖啶橙可以非特异性的结合细胞核的核酸,在

592 nm 波长激发光下显黄色荧光,图 2A 正常的破骨细胞吖啶橙染色浅淡,细胞核大小均匀、染色质分布均匀;图 2B 凋亡的破骨细胞吖啶橙着色较深,细胞核浓缩,细胞核大小不均、染色质分布不均。提示 LMWF 能明显的促进成熟破骨细胞的凋亡。

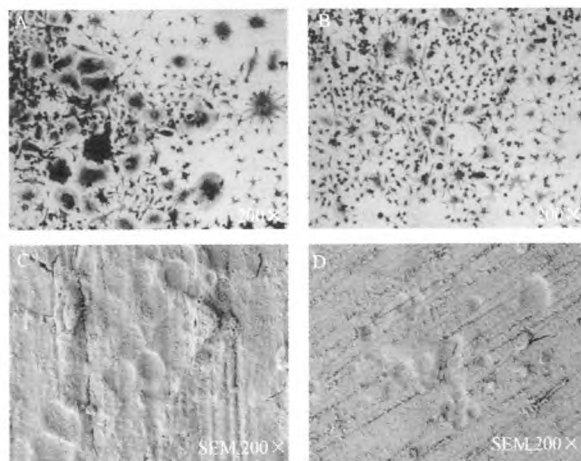


图 1 LMWF 对破骨细胞 TRAP 染色与骨吸收陷窝的影响

1A 为对照组,1B 为 LMWF 组,1C 为对照组,1D 为 LMWF 组

Fig. 1 Effect of LMWF on TRAP staining and resorption pits

1A, 1C: Control group; 1B, 1D: LMWF group

表 1 两组对 TRAP 阳性细胞数目与骨吸收面积的影响

Table 1 Effect of LMWF on the number of TRAP-positive cells and bone resorption

组别	样本数目(n)	TRAP 阳性细胞数目(n)	骨吸收面积 μm^2
对照组	5	29.4 ± 3.2	3451.6 ± 108.2
LMWF 组	5	$17.6 \pm 2.4^*$	$1972.4 \pm 96.4^*$

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$

2.3 流式细胞术检测 LMWF 对细胞凋亡的影响

破骨细胞经 Annexin V 与 PI 双染后,进行流式细胞仪分析,得出四个象限。分别为 Q1(左上)象限:为 PI 单阳性,代表细胞膜破坏而核膜存在的细胞,一般指机械损伤细胞;Q2(右上)象限为 PI, V-FITC 双阳性,代表中晚期凋亡细胞和坏死细胞;Q3(右下)象限为 V-FITC 单阳性,代表早期凋亡细胞;Q4(左下)象限为双阴性,代表活细胞。由图 2C、2D 可见,与对照组相比,LMWF 组破骨细胞的凋亡率明显上升。

2.4 caspase-3 活性的变化

RANKL 诱导 5 d 后的破骨细胞中 caspase-3 活性随时间延长逐渐增加;当 5 ng/mL LMWF 作用于

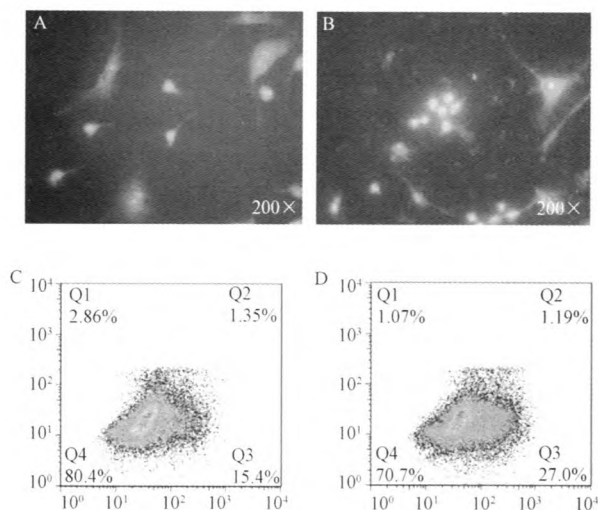


图2 LMWF对破骨细胞凋亡的吖啶橙染色与流式细胞术

Fig. 2 Effect of LMWF on osteoclast apoptosis

2A为对照组, 2B为LMWF组, 2C为对照组, 2D为LMWF组

2A, 2C: Control group; 2B, 2D: LMWF group

诱导5 d后的破骨细胞24 h后 caspase-3 活性稍微升高;随着作用时间的延长, caspase-3 活性进一步上升,并在作用72 h后达到高峰。提示 LMWF 诱导破骨细胞凋亡的过程中,可提高 caspase-3 的活性,见图3。

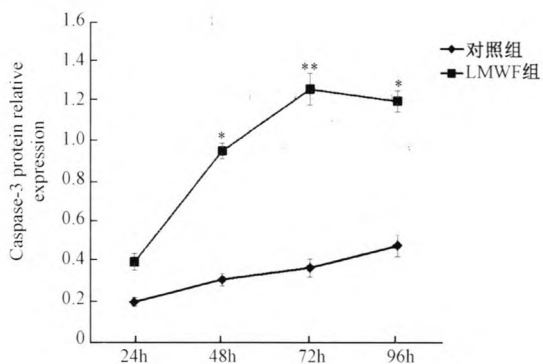


图3 LMWF在不同时间点对破骨细胞 caspase-3 活性的影响

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 3 Effect of LMWF on caspase-3 activity at different time points

Note: * $P < 0.05$ vs Control group;

** $P < 0.01$ vs Control group

2.5 对破骨细胞分化过程相关基因的表达情况

荧光定量 PCR 检测各组 BCL-2 和 BAX 基因 mRNA 表达结果发现。与空白组比较, 5 ng/mL LMWF 组中成熟破骨细胞中 BCL-2 表达明显减少,

$P < 0.05$, 有统计学差异; BAX 表达明显升高, $P < 0.05$, 有统计学差异; BCL-2/BAX 比值显著下降, $P < 0.01$, 有统计学差异, 见图4。

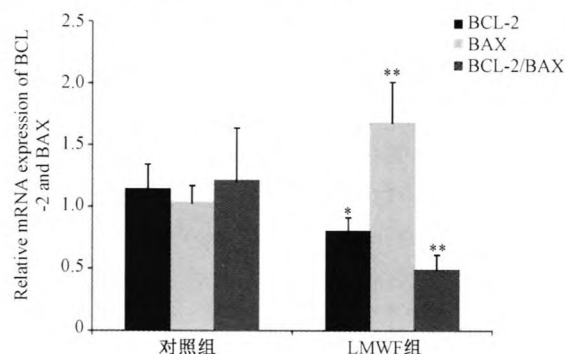


图4 LMWF处理后细胞中 BCL-2 与 BAX mRNA 表达水平的变化

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 4 Expression of BCL-2 and BAX mRNA in osteoclasts after 72 h-treatment with LMWF detected using RT-PCR

Note: * $P < 0.05$ vs Control group; ** $P < 0.01$ vs Control group

3 讨论

骨质疏松是以骨量减少、骨的微结构退变为特征, 导致脆性增加容易发生骨折的全身性疾病^[5]。在骨代谢过程中, 破骨细胞对骨吸收起主要作用, 陈旧骨折的吸收速率与时间长短主要由破骨细胞的活性和数量决定; 破骨细胞是来源于单核巨噬细胞系统, 成熟的破骨细胞有多个细胞核, 细胞质中有大量的线粒体、高尔基体、溶酶体等特点, 成熟破骨细胞不能进行有丝分裂, 寿命约为 14d 左右^[6-8]。目前破骨细胞的培养方法主要有两种: ①四肢长骨机械分离法: 采用酶消化法分离提取动物四肢长骨的成熟破骨细胞, 分离的破骨细胞骨吸收活性大, 但数量较小, 难以大量使用; ②破骨样细胞诱导培养法: 采用 RANKL、M-CSF 等诱导单核细胞为成熟的破骨样细胞, 诱导得到的破骨样细胞数量较多, 但骨吸收活性稍弱^[9-11]。由于本实验需要大量的破骨细胞, 因此采用了 100 ng/mL RANKL 诱导 RAW264.7 细胞株为成熟的破骨细胞, 经破骨细胞特异性的 TRAP 染色和骨吸收功能成功的进行了鉴定, 已有大量文献证明^[12-14] 单独 100 ng/mL 的 RANKL 即可诱导出成熟的破骨细胞。

褐藻糖胶是目前研究最多的非哺乳动物来源的, 具有生物学活性的硫酸化多糖, 主要存在于藻类

和棘皮动物中。褐藻糖胶又称岩藻聚糖、岩藻聚糖硫酸酯、褐藻多糖硫酸酯,是从褐藻中提取的一类硫酸多糖,主要位于褐藻的细胞壁基质中,占褐藻细胞壁干重的 40% 以上,是藻体维持体内湿度、防止体表干燥和保护其免受损伤的一种成分,为褐藻利用光能所必需。大量研究已表明褐藻糖胶具有广泛的生物学活性,如具有调节血脂、抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、抗氧化、调节免疫和保护肾脏等作用^[15]。

已经有报道^[16]采用含有褐藻糖胶的骨支架,可以诱导成骨性,但褐藻糖胶对破骨细胞的影响尚未见报道。通过我们的实验对 TRAP(+) 细胞计数发现 LMWF 可以减少 RANKL 诱导成熟破骨细胞的数量;应用扫描电子电镜对薄骨片骨吸收陷窝扫描发现 LMWF 可以抑制破骨细胞的骨吸收功能,骨吸收陷窝数量与骨吸收面积显著减少。提示 LMWF 不仅可以促进成骨细胞的分化、增值。同时能抑制破骨细胞的数量及骨吸收功能。

吖啶橙染色发现 LMWF 组的破骨细胞细胞核变小,染色质不均匀,细胞核着色较深,提示 LMWF 组的破骨细胞凋亡率明显高于正常对照组的破骨细胞;流式细胞术 Annexin V 与 PI 双染得出 LMWF 组早期凋亡破骨细胞明显高于正常对照组,而中晚期凋亡细胞和坏死细胞与正常对照组无差异,提示 LMWF 具有促进破骨细胞的凋亡的作用。

Caspase 家族是一组半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶,在细胞凋亡的启动和完成中起重要作用,是细胞凋亡的执行人,决定了细胞凋亡的形态学改变和生物化学改变。Caspase 的活化途径有两条:一条途径是由死亡受体如 Fas 或 TNFR 介导的。另一条途径由很多的促凋亡信号(如 Bax)集中在线粒体水平,使细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质中,与 Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) 结合,进而激活 Caspase-9,三者共同组成一个重要的效应 Caspase 的激活因子,接着逐步活化 Caspase-3 和 Caspase-6、Caspase-7,产生 Caspase 的级联放大反应^[17-19]。Caspase-3 处于凋亡 Caspase 级联反应的下游,是最重要的效应型 Caspase。Caspase-3 是多种凋亡刺激信号传递的汇聚点,是细胞凋亡性死亡的最终执行者,Caspase-3 的活化说明凋亡进入不可逆阶段^[20]。本实验研究发现 LMWF 可以明显提高破骨细胞 Caspase-3 的活性,促进破骨细胞的凋亡。

凋亡相关基因中的 BCL-2 家族是细胞凋亡的关键调节因子,由抗凋亡和促凋亡成员协同作用,发挥着细胞凋亡开关的作用。BCL-2 是 B 细胞淋巴

瘤/白血病 2 基因的缩写,能抑制细胞凋亡,其作用机制为:①抑制氧自由基;②影响细胞内细胞器的 Ca^{2+} 内流;③干扰细胞色素 C 的释放而阻断 Caspase 蛋白酶的激活,抑制细胞凋亡;④影响其他诱导凋亡的基因,如 BCL-2 可抑制 p53、c-myc 诱发的细胞凋亡^[21]。BAX 即 BCL-2 相关的 X 蛋白,可促进细胞凋亡,BAX 基因的表达并不立即导致细胞凋亡,而是仅在细胞接受死亡信号之后 BAX 才可以开始发挥作用,通过抑制 BCL-2 的作用而导致细胞凋亡。BAX 可以同 BCL-2 形成异二聚体,使后者丧失抑制凋亡的作用,从而导致细胞凋亡的发生^[22]。研究发现细胞凋亡的发生与 BCL-2/BAX 比值有关,比值降低有利于破骨细胞发生凋亡^[23]。BCL-2/BAX 降低,可引起线粒体膜电位的改变,进一步激活 Caspase-3 诱导细胞发生凋亡。BCL-2/BAX 的相互抑制关系是细胞死亡的细胞内检测点。在正常情况下,BCL-2 和 BAX 在细胞内保持平衡。如果 BCL-2 相对量高于 BAX,则促进形成 BCL-2/BAX 异二聚体,并使 BCL-2 同二聚体的量增多,从而抑制细胞凋亡;如果 BAX 相对量高于 BCL-2,则 BAX 同二聚体的量增多,并抑制形成 BCL-2/BAX 异二聚体,从而促进细胞凋亡^[24]。本实验 PCR 结果发现,LMWF 可以可下调 Bcl-2 基因的表达,上调 BAX 基因的表达,导致 BCL-2/BAX 比值降低,这可以促进线粒体膜的通透性的下降,导致细胞色素 C 等促细胞凋亡因子向细胞质的释放,最终激活 Caspase-3 诱导细胞发生凋亡。

综上所述,本课题组认为,低分子量褐藻糖胶可以抑制破骨细胞的活性与骨吸收功能,促进破骨细胞的凋亡,其机制与线粒体凋亡途径密切相关。本研究发现了褐藻糖胶在骨科中的用途,为海洋医药在骨科中的应用提供了基础理论。

【参 考 文 献】

- [1] 章义利,吴波拉. 褐藻多糖硫酸酯的药理学研究进展[J]. 海峡药学, 2008, 20(10): 14-17.
Zhang YL, Wu BL. Research progress in Pharmacology of fucoidan[J]. Strait Pharmacy, 2008, 20(10): 14-17 (in Chinese).
- [2] Li F, Sun X, Ma J, et al. Naringin prevents ovariectomy-induced osteoporosis and promotes osteoclasts apoptosis through the mitochondria-mediated apoptosis pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 452(3): 629-635
- [3] Wang J, Jiang J, Xie Y, et al. Population pharmacokinetics of naringin in total flavonoids of *Drynaria Fortunei* (Kunze) J. Sm. in Chinese women with primary osteoporosis[J]. Chinese Journal

- of Integrative Medicine, 2012, 18; 925-933.
- [4] Zhai YK, Niu YB, Pan YL, et al. Effects of naringin on proliferation, differentiation and maturation of rat calvarial osteoblasts in vitro [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(1): 105-111.
- [5] Silverman S. Individualizing osteoporosis medications [J]. Menopause, 2014, 21(3): 1.
- [6] Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts [J]. Science, 2000, 289(5484): 1504-1508.
- [7] Reed M, Baker RJ, Mehta AB, et al. Enhanced differentiation of osteoclasts from mononuclear precursors in patients with Gaucher disease [J]. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2013, 51(3): 185-194.
- [8] Yi Z, Yu C, Yining W. Research progress on osteoclasts precursor cells [J]. International Journal of Stomatology, 2011, 6: 019.
- [9] Singh PP, van der Kraan AG J, Xu J, et al. Membrane-bound receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) activity displayed by osteoblasts is differentially regulated by osteolytic factors [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 422(1): 48-53.
- [10] Shiraishi T, Ohashi K, Morishita S, et al. Investigation of mechanism of proliferation promotion of cultured osteoblasts by mechanical vibration [C]//ASME 2011 International Mechanical Engineering Congress and Exposition. American Society of Mechanical Engineers, 2011: 691-692.
- [11] 潘淳, 何波, 杨雪婷, 等. 诱导法与机械法体外培养破骨细胞的比较研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(9): 1-7 (in Chinese).
Pan C, He B, Yang XL, et al. Comparison of the culturing methods of osteoclasts between induced and mechanical procedure [J]. Journal of Kunming Medical University, 2012, 33(9): 1-7.
- [12] del Mar Arriero M, Ramis JM, Perelló J, et al. Inositol Hexakisphosphate Inhibits Osteoclastogenesis on RAW 264.7 Cells and Human Primary Osteoclasts [J]. PloS one, 2012, 7(8): e43187.
- [13] Shibata K, Yoshimura Y, Kikuri T, et al. Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2011, 28(1): 73.
- [14] 戴闯, 程明, 张斌, 等. RAW264.7 细胞在体外分化成破骨细胞的研究 [J]. 天津医药, 2010 (7): 596-598.
- Dai M, Cheng M, Zhang B, et al. The Study of RAW264.7 Cells Differentiate into Osteoclasts in Vitro [J]. Tianjin Medical Journal, 2010 (7): 596-598 (in Chinese).
- [15] 程忠玲. 海带中褐藻糖胶研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(004): 181-184.
- Cheng ZL. Research progress in Fucoidan Kelp [J]. Food Research and Development, 2010, 31 (004): 181-184 (in Chinese).
- [16] Venkatesan J, Bhatnagar I, Kim SK. Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering [J]. Mar Drugs, 2014, 12(1): 300-316.
- [17] Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis [J]. BMC Cell Biology, 2013, 14(1): 32.
- [18] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2011, 351(1-2): 41-58.
- [19] Cryns V, Yuan J. Proteases to die for [J]. Genes & Development, 1998, 12(11): 1551-1570.
- [20] Rossé T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [J]. Nature, 1998, 391(6666): 496-499.
- [21] Nuvoli B, Santoro R, Catalani S, et al. CELLFOOD™ induces apoptosis in human mesothelioma and colorectal cancer cells by modulating p53, c-myc and pAkt signaling pathways [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33: 24.
- [22] Shi L, Chen J, Yang J, et al. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity [J]. Brain Research, 2010, 1352: 255-264.
- [23] Xu F, Zang J, Chen D, et al. Neohesperidin induces cellular apoptosis in human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells via activating the Bcl-2/Bax-mediated signaling pathway [J]. Natural Product Communications, 2012, 7(11): 1475-1478.
- [24] Zhou HY, Ma YF, Zhou YF, et al. Effects of magnesium sulfate on neuron apoptosis and expression of caspase-3, bax and bcl-2 after cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chinese Medical Journal, 2003, 116(10): 1532-1534.
- (收稿日期: 2014-08-28, 修回日期: 2014-11-06)

更正

我刊在 2016 年第 22 卷第 4 期刊发的文章《骨质疏松症“病本在脾, 以阴阳两虚为要”之见探讨》的第 5 作者范文强应为苑文强, 特此更正。