

镧离子对骨髓基质细胞向成骨细胞分化的影响

刘红梅^{①②} 张天蓝^① 许善锦^① 王 夔^①(① 北京大学药学院化学生物学系, 北京 100083; ② 华中科技大学化学系, 武汉 430074. E-mail: hmliu2004@126.com)

摘要 研究了稀土离子 La^{3+} 对体外培养的骨髓基质细胞(MSCs)向成骨细胞分化过程的影响, 并初步探讨了相关机理. 通过测定碱性磷酸酶(ALP)活性、骨钙素分泌、I型胶原蛋白和骨钙素mRNA水平及基质钙化等指标表征MSCs分化程度. 结果显示, La^{3+} 抑制培养早、中期MSCs分化, 表现为显著抑制ALP活性和骨钙素分泌, 下调骨钙素mRNA水平; 但是, La^{3+} 对MSCs最终基质钙化无明显影响, 因为 La^{3+} 上调I型胶原蛋白mRNA水平, 并促进培养晚期细胞ALP活性和骨钙素分泌. 另外, Western Blot分析显示 La^{3+} 作用于MSCs短时间即可激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化, 而且MAPK激酶抑制剂PD98059能完全消除 La^{3+} 对培养中期MSCs ALP活性的抑制作用. 这些结果提示, La^{3+} 对MSCs向成骨细胞分化的影响依赖于细胞所处的分化时相. La^{3+} 可能通过MAPK信号途径抑制培养早、中期MSCs向成骨细胞分化, 但对最终的基质钙化成骨无明显影响.

关键词 La^{3+} 骨髓基质细胞 分化

随着稀土在工农业方面的应用, 通过环境和经由食物链等渠道进入人体内的稀土量也有所增加, 并且在骨组织中相对富集^[1]. 因此, 稀土对骨组织的影响成为人们关注的问题. 已有的动物实验结果表明, 长期低剂量摄入稀土离子 La^{3+} 会引起骨的显微结构改变, 如骨小梁稀疏、变细, 甚至断裂, 但骨结晶度增加^[2]. 然而对于上述现象发生的过程, 在细胞和分子层次的研究却不多, 还难以对动物实验结果做出合理的解释.

成骨细胞是骨形成细胞, 对骨组织的生长发育、损伤修复、骨代谢平衡及骨量维持起关键作用. 成骨细胞数目减少、功能减弱将导致骨形成降低, 进一步引起骨质疏松. 张金超等^[3]发现, La^{3+} 促进体外培养的成骨细胞系UMR106分化, 表现为增强细胞碱性磷酸酶(ALP)活性及钙化能力. 考虑到成骨细胞是由骨髓基质细胞(MSCs)中的间充质干细胞分化而来^[4], 稀土离子有可能通过影响MSCs分化影响骨形成过程. 早期研究显示, MSCs在 β -甘油磷酸钠、地塞米松和抗坏血酸诱导下可体外分化为成骨细胞, 形成与体内骨组成相似的钙化组织^[5,6]. MSCs向成骨细胞分化过程包含3个时相: 基质合成相、基质成熟相和基质钙化相^[7]. 每个时相有各自的标志性蛋白的基因表达, 推动细胞的整个分化进程. 在基质合成相, 表达及合成细胞外基质如I型胶原蛋白; 在基质成熟相, ALP等蛋白的基因表达上调, 为钙化提供条件; 在基

质钙化相, 调节羟基磷灰石有序沉淀的蛋白如骨钙素等的基因大量表达. 目前对MSCs向成骨细胞分化的信号转导过程了解不多, 一些文献报道丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号途径在其中发挥重要作用^[8-10]. 因此, 本文以 β -甘油磷酸钠、地塞米松和抗坏血酸诱导的MSCs为体外模型, 通过监测细胞培养过程中不同时间点时ALP活性、骨钙素分泌、I型胶原蛋白和骨钙素mRNA水平及基质钙化等, 研究了稀土离子 La^{3+} 对MSCs向成骨细胞分化过程的影响, 并对相关机制进行了初步探讨.

1 材料和方法

(i) 试剂和材料. DMEM培养基(高糖, 4.5 g/L)和TRIZol购自Gibco BRL; 胎牛血清(FBS)购自Hyclone; 抗坏血酸, β -甘油磷酸钠, 四甲基噻唑蓝(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT), PD98059, 地塞米松, ALP试剂盒, PMSF, DTT, aprotinin, leupeptin购自Sigma; [^{125}I]标记的骨钙素放射免疫试剂盒购自北京东亚免疫技术研究所. Taq DNA聚合酶和RNA酶抑制剂购自大连宝生物工程有限公司; M-MLV逆转录酶购自Promega; oligo(dT)₁₅, I型胶原蛋白和骨钙素cDNA引物以及管家基因GAPDH引物由上海博亚生物公司合成; 鼠抗磷酸化胞外信号调节激酶(Extracellular signal-Regulated Kinases, ERK1/2)抗体及辣根过氧化物酶标

记山羊抗小鼠IgG购自Santa Cruz; 其余试剂均为国产分析纯. 所有塑料器皿(培养瓶, 培养板, 培养皿)均购自Corning-Costar. La^{3+} (LaCl_3)溶液的制备: 纯度为 99.99%的氧化镧加浓盐酸溶解, 加热赶去多余的酸后用二次去离子水稀释得贮备液, 其浓度用EDTA络合滴定法标定; 在使用前用培养基稀释至所需工作浓度.

(ii) 原代 MSCs 的分离提取和体外分化诱导. 大鼠股骨MSCs分离和原代培养方法按文献方法如下进行^[6]. 体重 150 g左右的雄性SD大鼠(北京大学实验动物科学部)经引颈处死, 无菌条件下迅速取出股骨, 抽取骨髓, 加到含 15% FBS, 100 U/mL青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的DMEM培养基中. 为了诱导MSCs向成骨细胞分化, 在培养基中补加 10^{-8} mol/L地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和 50 $\mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸. 按 10^5 细胞/ cm^2 将细胞接种到培养板中, 放入 37°C , 5% CO_2 培养箱内静置培养. 培养 4 天后, 用PBS洗去未贴壁的血细胞. 已贴壁的细胞为MSCs, 加入新鲜培养基继续培养, 每 2~3 天换液一次. 所有实验中MSCs均为原代细胞. 对于多数实验, MSCs培养到 21 d.

(iii) 细胞活力测定. 培养第 4 天的MSCs在含 5% FBS 和不同浓度 La^{3+} 的培养基中培养 3 d, 用MTT法测定细胞活力^[11]. 往细胞中加入终浓度为 0.5 mg/mL MTT温育 4 h, 吸除上清液, 再加入DMSO将生成的紫色晶体溶解, 然后用全自动酶标仪(TECAN, 瑞士)测定 570 nm的吸光度.

(iv) 碱性磷酸酶活性测定. 培养第 4, 11 和 18 天的MSCs在含不同浓度 La^{3+} 的培养基中培养 3 d, 用PBS洗细胞 3 次, 再用 1% Triton X-100/0.9% NaCl于 4°C 裂解细胞 1 h. 离心后, 用试剂盒按文献方法^[12]测定上清液的ALP活性. 一个酶活性单位定义为 30 min内生成 1 μmol 对硝基苯酚. 用Lowry法测细胞裂解液中蛋白质含量^[13], ALP活性按蛋白质量归一化.

(v) 骨钙素分泌测定. 培养第 4, 11 和 18 天的MSCs在含不同浓度 La^{3+} 的培养基中培养 3 d, 收集细胞培养基, 按骨钙素放射免疫试剂盒所提供的放射免疫法(RIA)测定细胞分泌到培养基中的骨钙素含量. 细胞用PBS洗 3 次, 用 0.1 mol/L NaOH/0.1% SDS裂解细胞, 用Lowry法测细胞裂解液中蛋白质含量^[13]. 骨钙素分泌量按蛋白质量归一化.

(vi) I 型胶原蛋白和骨钙素的mRNA水平测定. 在培养第 4 天的MSCs中加入 10^{-5} mol/L La^{3+} , 继续培养到第 14 天. 参照Gibco公司提供的TRIZol法提取细胞总RNA. I 型胶原蛋白和骨钙素的mRNA水平通过半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定. 取 5 μg 样品RNA, 利用随机引物oligo(dT)₁₅和M-MLV逆转录酶合成cDNA. 取 5 μL 逆转录所得cDNA, 利用PCR进行扩增. I 型胶原蛋白基因、骨钙素基因和管家基因GAPDH的特异性引物序列参考文献^[14]. 以不含cDNA模板的反应体系为空白对照组, 以GAPDH为内参照物测定每个样品的mRNA. PCR扩增程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 1 min, 60°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min^[14]. PCR产物经 2%琼脂糖凝胶电泳和溴化乙啶染色后, 采用计算机控制的Alphamager 2200 凝胶成像仪(Alpha innotech corporation)进行图像扫描和分析, 得到 I 型胶原蛋白和骨钙素相对于GAPDH的mRNA表达量的相对值.

(vii) 基质钙沉积测定. 在MSCs培养的第 4 天开始持续用不同浓度的 La^{3+} 处理细胞, 在第 21 天通过测定基质中的钙沉积来定量MSCs钙化程度^[15]. 用PBS洗细胞 3 次, 再用 0.6 mol/L HCl脱钙 24 h. 收集HCl溶液, 离心取上清, 用原子吸收光谱测定钙含量. 细胞用PBS洗 3 次, 用 0.1 mol/L NaOH/0.1% SDS裂解细胞, 用Lowry法测细胞裂解液中蛋白质含量^[13]. 钙沉积量按蛋白质量归一化.

(viii) ERK磷酸化分析. 在培养第 14 天的MSCs中, 加入 10^{-5} mol/L La^{3+} 分别作用 10 min, 20 min和 2 h 后, 用Western Blot检测MSCs中ERK1/2 磷酸化水平. 细胞用冷PBS洗 2 次, 用裂解液(50 mmol/L HEPES, pH 7.4, 含 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.4% SDS, 5 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin, 5 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin, 1 mmol/L PMSF 和 10 mmol/L DTT)在 4°C 裂解 5 min, 提取总蛋白. 用Lowry法测定细胞总蛋白浓度. 取 40 μg 蛋白进行 10% SDS-PAGE电泳, 然后将凝胶上蛋白电转移到硝酸纤维素膜上. 再用一抗鼠抗pERK1/2 和二抗辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG进行印迹反应, 最后用增强化学发光法显示蛋白带.

(ix) 统计分析. 所有数据进行方差分析, 以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示. 组间比较采用双侧 t 检验, $P < 0.05$ 时有显著性差异.

2 结果

2.1 La^{3+} 对MSCs活力的影响

由图1可知, 10^{-8} ~ 10^{-5} mol/L La^{3+} 作用MSCs 3 d对细胞活力均无显著影响, 表明该浓度范围的 La^{3+} 对MSCs既无明显的促增殖作用, 也无明显的毒性作用。

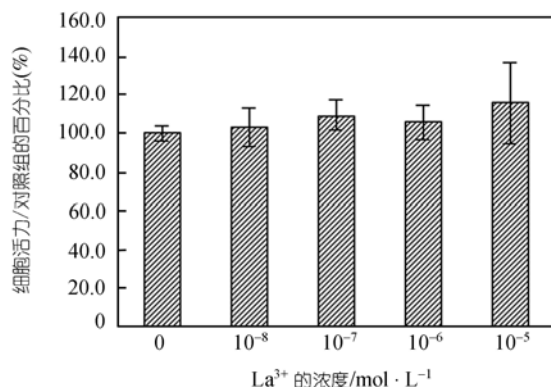


图1 不同浓度 La^{3+} 对MSCs活力的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=4$)
培养第4天的MSCs在含5% FBS和不同浓度 La^{3+} 的培养基中培养3 d, 用MTT法测定细胞活力

2.2 La^{3+} 对MSCs ALP活性的影响

ALP是成骨细胞分化早期的一个标志性蛋白, 它为羟基磷灰石沉淀提供 PO_4^{3-} [5]。如图2所示, 在MSCs培养21 d的过程中, ALP活性变化趋势是: 在分化早期(第1~7天, 基质合成相)较低, 到分化中期(第8~14天, 基质成熟相)达到峰值, 在分化晚期(第15~21天, 基质钙化相)又下降。该结果与文献[5]报道的一致。 La^{3+} 对MSCs分化过程中ALP活性的影响因其浓度及细胞所处的分化时相而异(图2)。在MSCs培养的第4天和第

11天用不同浓度的 La^{3+} 处理, 然后在细胞培养的第7天和第14天检测ALP活性。结果显示, 与未处理的细胞相比, 处理后细胞中ALP活性都显著降低。但在细胞培养第18天用不同浓度的 La^{3+} 处理, 然后在细胞培养的第21天检测ALP活性。结果发现, 与未处理的细胞相比, 处理后细胞中ALP活性反而显著增强。此外, La^{3+} 对MSCs ALP活性的影响还表现出一定的浓度规律性: 10^{-7} 和 10^{-6} mol/L La^{3+} 无论是在培养早、中期的抑制作用还是在晚期时的增强作用均较强, 而 10^{-8} 和 10^{-5} mol/L La^{3+} 则均较弱。

2.3 La^{3+} 对MSCs骨钙素分泌的影响

骨钙素是成骨细胞分化晚期的一个标志性蛋白, 它是一个成骨细胞特异性蛋白 [5]。如图3所示, 在MSCs培养21 d的过程中, 骨钙素分泌逐渐升高, 到第21天时骨钙素分泌达到最大值。与ALP一样, La^{3+} 对MSCs分化过程中骨钙素分泌的影响也因其浓度及细胞所处的分化时相而异(图3)。在MSCs培养第7天的前3天用不同浓度的 La^{3+} 处理对骨钙素分泌均无显著影响; 培养第14天的前3天用不同浓度的 La^{3+} 处理都显著抑制了骨钙素分泌; 而在细胞培养第21天的前3天用不同浓度的 La^{3+} 处理反而均使骨钙素分泌显著增强。

2.4 La^{3+} 对MSCs中I型胶原蛋白和骨钙素mRNA水平的影响

I型胶原蛋白是成骨细胞正常分化及钙化所必需的 [16]。通过半定量RT-PCR技术研究了 La^{3+} 对MSCs中I型胶原蛋白和骨钙素的mRNA水平的影

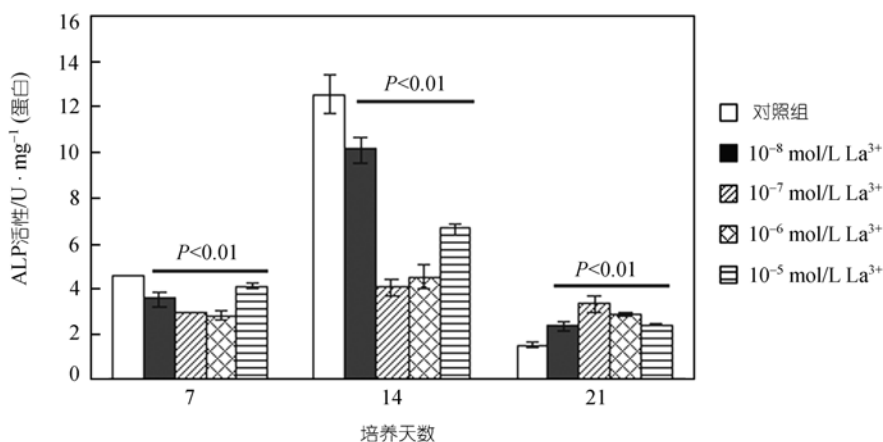


图2 La^{3+} 对MSCs中ALP活性的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=4$)
在培养的第4、11和18天加入不同浓度 La^{3+} 处理MSCs, 然后在培养的第7、14和21天检测细胞ALP活性

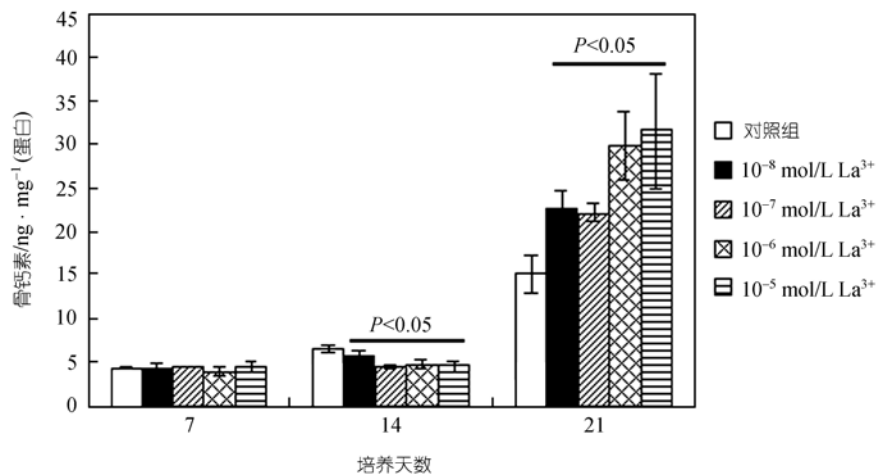


图 3 La^{3+} 对MSCs中骨钙素分泌的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 4$)

在培养的第 4, 11 和 18 天加入不同浓度 La^{3+} 处理MSCs, 然后在培养的第 7, 14 和 21 天检测细胞骨钙素分泌

响. 结果显示, 在培养第 4 天的MSCs中加入 10^{-5} mol/L La^{3+} 后, 作用到第 14 天, I 型胶原蛋白mRNA水平显著升高, 而骨钙素mRNA水平显著降低(图 4).

2.5 La^{3+} 对MSCs中基质钙沉积的影响

通过监测MSCs基质钙沉积过程发现, 培养到第 7 天时, MSCs中几乎检测不到钙沉积; 培养到第 14 天时, 钙沉积量仍较低($0.51 \pm 0.17 \mu\text{mol/mg}$ (蛋白)); 而培养到 21 d时, 钙沉积量显著增加 ($5.14 \pm 1.19 \mu\text{mol/mg}$ (蛋白)). 用 $10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ mol/L}$ La^{3+} 长时间作用 MSCs, 对晚期细胞基质钙沉积均无显著影响(图 5).

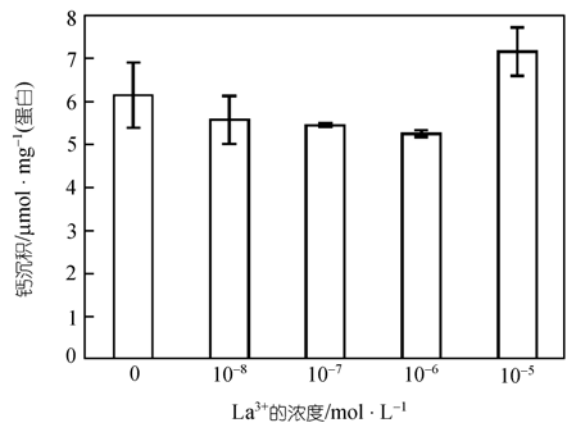


图 5 La^{3+} 对MSCs基质钙沉积的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 4$)

在培养的第 4 天开始持续用不同浓度的 La^{3+} 处理细胞, 在第 21 天检测基质钙沉积

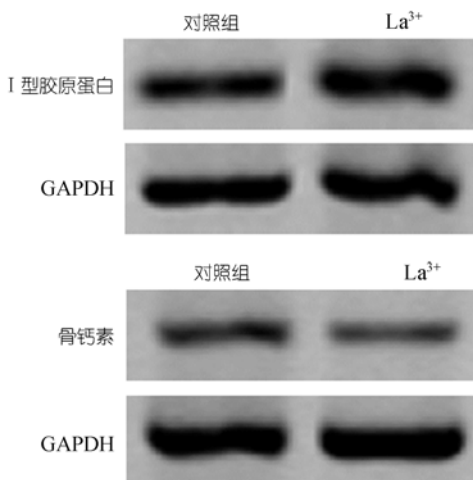


图 4 La^{3+} 对MSCs中 I 型胶原蛋白和骨钙素的mRNA 水平的影响

在培养第 4 天的MSCs中加入 10^{-5} mol/L La^{3+} , 继续培养到第 14 天, 提取细胞总 RNA 进行半定量 RT-PCR 分析, PCR 产物经凝胶电泳后紫外扫描

2.6 MAPK信号途径在 La^{3+} 影响MSCs分化中的作用

为了研究MAPK信号途径在 La^{3+} 影响MSCs分化中的作用, 将细胞用 La^{3+} 处理之前先用PD98059 预处理, 然后测定ALP活性. PD98059 是MAPK激酶(MAPKK)MEK的选择性抑制剂, 它可以特异地阻断MAPK信号途径介导的细胞反应. 结果显示, PD98059 预处理完全消除了 10^{-5} mol/L La^{3+} 对培养中期细胞ALP活性的抑制作用, 提示MAPK信号途径可能介导了 La^{3+} 对培养中期MSCs分化的影响(图 6).

为了进一步探讨MAPK信号途径在 La^{3+} 影响MSCs分化中的作用, 采用Western Blot技术分析了 La^{3+} 对MSCs中ERK1/2 磷酸化的影响. 结果显示, 在

培养第14天的MSCs中, 10^{-5} mol/L La^{3+} 作用10 min即使ERK1/2磷酸化水平开始上升, 在2 h时ERK1/2磷酸化水平显著高于激活前的水平(图7)。

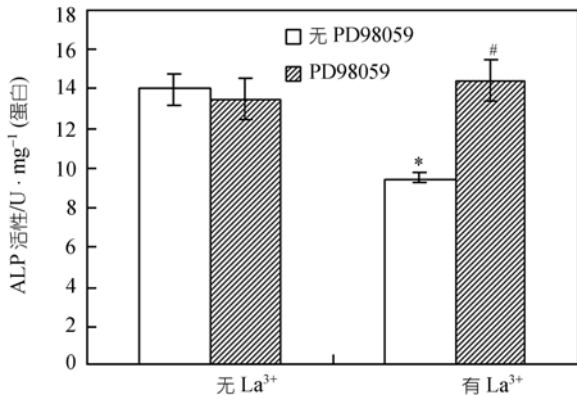


图6 MEK抑制剂PD98059对 La^{3+} 抑制培养中期MSCs ALP活性作用的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=4$)

培养第7天的MSCs用2 $\mu\text{mol/L}$ PD98059预处理2 h, 然后加入 10^{-5} mol/L La^{3+} 作用到第14天。* $P < 0.01$, 与对照组比较; # $P < 0.01$, 与 La^{3+} 处理组比较

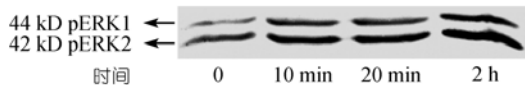


图7 La^{3+} 对MSCs中ERK1/2磷酸化的影响

3 讨论

3.1 La^{3+} 对MSCs向成骨细胞分化的影响依赖于细胞所处的分化时相

为了评价含镧羟基磷灰石材料的细胞毒性及细胞相容性, 张玉梅等^[17]研究了含镧羟基磷灰石对大鼠头盖骨成骨细胞生长情况的影响, 发现含镧羟基磷灰石对细胞无毒性作用, 且对细胞ALP活性无显著影响, 说明该材料不影响成骨细胞的正常分化。另外, 张金超等^[3]发现, La^{3+} 促进体外培养的成骨细胞系UMR106分化, 表现为增强细胞ALP活性及钙化能力。但是, 目前尚未见到关于 La^{3+} 对原代培养的正常MSCs向成骨细胞分化过程的影响的报道。本实验通过测定MSCs中ALP活性、骨钙素分泌、I型胶原蛋白和骨钙素的mRNA水平及基质钙沉积等成骨细胞分化指标来评价 La^{3+} ($10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L)对MSCs分化过程的影响。结果显示, 处于不同分化时相的MSCs对 La^{3+} 的响应方式不同。当MSCs处于分化早期(基质合成相)时, La^{3+} 处理显著抑制ALP活性,

但对骨钙素分泌无明显影响。当MSCs处于分化中期(基质成熟相)时, La^{3+} 处理仍显著抑制ALP活性, 同时抑制骨钙素分泌, 下调骨钙素的mRNA水平, 但却上调I型胶原蛋白的mRNA水平。当MSCs处于分化晚期(基质钙化相)时, La^{3+} 处理反而使ALP活性和骨钙素分泌显著增高。而且, 不同浓度的 La^{3+} 长时间作用于MSCs均对晚期基质钙沉积无明显影响。这些结果表明, La^{3+} 对MSCs向成骨细胞分化的影响依赖于细胞所处的分化时相。尽管细胞基质最终的钙化似乎未受影响, 然而应当注意到, La^{3+} 抑制了处于分化前、中期的MSCs向成骨细胞分化, 对处于分化晚期MSCs的分化却有促进作用。

La^{3+} 对MSCs最终钙化成骨之所以无明显影响, 可能部分由于其上调I型胶原蛋白mRNA水平, 促进处于培养晚期细胞ALP活性以及骨钙素分泌。一些研究结果显示, I型胶原蛋白是成骨细胞正常分化和钙化的关键调节因子^[16]。它可作为羟基磷灰石晶体有序构筑的载体, 控制晶体的定向生长和尺寸。另外, 处于基质钙化相细胞的ALP活性增强, 为羟基磷灰石沉淀提供了较多的 PO_4^{3-} 。从骨形成的角度来看, 若 La^{3+} 对MSCs分化过程中前两个时相的抑制作用与对第三个时相的促进作用大致相抵, 则不会导致骨矿物含量改变。至于动物实验中所观察到的骨结构的改变^[2], 可能是由于低浓度 La^{3+} 促进了破骨细胞活性, 从而导致骨吸收增强^[18]。然而, 关于 La^{3+} 对钙化成骨包括骨结构、骨密度、骨矿物质的组成和晶体结构的影响还需要进一步的实验结果来阐明。

值得注意的是, 不同浓度 La^{3+} 对MSCs ALP活性和骨钙素分泌的影响程度不同, 并未呈现出浓度依赖性的抑制或增强, 其原因尚需进一步研究。

3.2 La^{3+} 通过激活MAPK信号途径抑制培养前中期MSCs向成骨细胞分化

MAPK信号途径由一组以级联方式依次磷酸化活化的丝/苏氨酸蛋白激酶组成, 包括MAPKKK, MAPKK和MAPK。细胞外信号通过该途径逐级放大并传导到细胞内乃至细胞核, 把与膜受体结合的胞外刺激物和细胞质及细胞核中的效应分子连接起来, 调控细胞的增殖、分化和凋亡。ERK1/2是MAPK信号通路的核心分子, 它与其上游激活分子MAPKK和下游效应分子一起, 组成一个信号转导体系。MAPK信号途径(尤其ERK1/2)是MSCs向成骨细胞分化过

程所必需的^[18~10]。本实验结果表明, MEK抑制剂 PD98059 能完全拮抗 La^{3+} 对于基质成熟相MSCs ALP活性的抑制作用; 而且Western Blot分析显示, La^{3+} 作用于MSCs短时间即可激活ERK1/2 磷酸化, 这意味着在 La^{3+} 抑制处于分化前、中期MSCs分化的过程中, MAPK信号途径起关键作用。我们先前的研究结果也表明, La^{3+} 短时间作用于成纤维细胞系NIH3T3 可激活ERK1/2 磷酸化^[19]。 La^{3+} 对ERK1/2 磷酸化的迅速激活作用可能类似于生长因子或细胞因子的作用。不过, MTT法测定结果显示, 不同浓度的 La^{3+} 对MSCs活力并无显著影响, 即它并不刺激MSCs增殖。因此, 对于 La^{3+} 影响MSCs分化的信号转导过程的细节还需进一步研究。

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 20031010 和 20271005)。

参 考 文 献

- 1 倪嘉缙. 稀土生物无机化学. 北京: 科学出版社, 2002. 30~31
- 2 李荣昌, 杨惠雯, 王夔. 低剂量长期饲喂 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 后La在大鼠骨中的蓄积及骨微结构的改变. 北京大学学报(医学版), 2003, 35(6): 622~624
- 3 张金超, 李晓新, 许善锦, 等. 稀土离子对体外培养的成骨细胞增殖、分化和功能表达的影响. 自然科学进展, 2004, 14(4): 404~409
- 4 Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. Science, 1999, 284: 143~147[DOI]
- 5 Malaval L, Modrowski D, Gupta A K, et al. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. J Cell Physiol, 1994, 158: 555~572[DOI]
- 6 Maniopoulos C, Sodek J, Melcher A H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res, 1988, 254: 317~330
- 7 Stein G S, Lian J B, Stein J L, et al. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. Physiol Rev, 1996, 76(2): 593~629

- 8 Lai C F, Chaudhary L, Fausto A, et al. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. J Biol Chem, 2001, 276: 14443~14450
- 9 Lai C F, Cheng S L. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β in normal human osteoblastic cells. J Biol Chem, 2002, 277: 15514~15522[DOI]
- 10 Parhami F, Jackson S M, Le V, et al. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. J Bone Min Res, 1999, 14(12): 2067~2078
- 11 Denizot E, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods, 1986, 89: 271~277[DOI]
- 12 Parhami F, Morrow A D, Balucan J, et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17: 680~687
- 13 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193: 265~275
- 14 Drissi H, Lomri A, Lasmoles F, et al. Skeletal unloading induces biphasic changes in insulin-like growth factor-1 mRNA levels and osteoblast activity. Exp Cell Res, 1999, 251: 275~284[DOI]
- 15 Wada T, McKee M D, Steitz S, et al. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures inhibited by osteopontin. Circ Res, 1999, 84: 166~178
- 16 Knott L, Bailey A J. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. Bone, 1998, 22: 181~187 [DOI]
- 17 张玉梅, 付涛, 徐可为, 等. 含镧羟基磷灰石的细胞毒性研究. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2000, 10(3): 152~154
- 18 张金超, 许善锦, 王夔, 等. 稀土离子对体外兔成熟破骨细胞骨吸收功能的影响. 科学通报, 2003, 48(16): 1767~1771[PDF]
- 19 Yu S, Yuan L, Yang X, et al. La^{3+} -promoted proliferation is interconnected with apoptosis in NIH 3T3 cells. J Cell Biochem, 2005, 94: 508~519[DOI]

(2005-06-07 收稿, 2005-08-19 接受)