

# 唑来膦酸对大鼠成骨细胞护骨素及肿瘤坏死因子 $\alpha$ mRNA表达的影响\*

荆波, 尹芸生, 张涛, 王兴宇, 郑振雨, 陈晓敏, 闻伟敬

## Effect of zoledronic acid on osteoprotegerin and tumor necrosis factor alpha mRNA expression in rats

Jing Bo, Yin Yun-sheng, Zhang Tao, Wang Xing-yu, Zheng Zhen-yu, Chen Xiao-min, Wen Wei-jing

### Abstract

**BACKGROUND:** Zoledronic acid is a new generation of diphosphate, which is the third generation of osteoporosis drugs. It is widely used to treat diseases related to increase of bone absorption in clinic. The effect of zoledronic acid on osteoclast has reached consensus, but its effect on osteoblast remains in dispute.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of zoledronic acid on the proliferation, differentiation and the mRNA expression of osteoprotegerin (OPG) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) of rat osteoblasts.

**METHODS:** The osteoblasts isolated from the calvaria of neonatal SD rats were cultured with different concentrations of zoledronic acid. The final concentration of zoledronic acid in the experimental group ranged from  $10^{-5}$ – $10^{-9}$  mol/L. At 3, 5, and 7 days after zoledronic acid intervention, MTT colorimetric assay was used to measure the absorbance to detect the effect of zoledronic acid on the proliferation of osteoblasts. p-nitrophenyl phosphate approach method was used to detect the activities of alkaline phosphatase, while RT-PCR was used to detect OPG and TNF- $\alpha$  mRNA expression.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Zoledronic acid at the concentration of  $10^{-5}$  mol/L could inhibit the proliferation of osteoblasts, but it had no effect at concentration of  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  mol/L. Zoledronic acid at concentration of  $10^{-5}$ – $10^{-9}$  mol/L could up-regulate the OPG mRNA expression, but down-regulate TNF- $\alpha$  mRNA expression. Zoledronic acid at low concentration cannot influence the proliferation and differentiation of osteoblasts; whereas, it can inhibit bone resorption by regulating the OPG and TNF- $\alpha$  mRNA expression.

Jing B, Yin YS, Zhang T, Wang XY, Zheng ZY, Chen XM, Wen WJ. Effect of zoledronic acid on osteoprotegerin and tumor necrosis factor alpha mRNA expression in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(2): 277-280. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 唑来膦酸属于第3代双膦酸盐类药物, 在临床上被广泛应用于治疗骨吸收增加类疾病, 其对破骨细胞的作用及影响已取得了共识, 而对于成骨细胞的影响尚有争议。

**目的:** 观察唑来膦酸对大鼠成骨细胞增殖、分化和护骨素及肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA表达的影响。

**方法:** 体外培养新生24 h内SD大鼠颅盖骨来源的成骨细胞, 用 $10^{-5}$ – $10^{-9}$  mol/L唑来膦酸进行干预, 分别于干预后第3, 5, 7天采用MTT法来测吸光度值, 以检测唑来膦酸对大鼠成骨细胞增殖的影响; 硝基苯基质动力学法和RT-PCR在干预后72 h, 测量细胞碱性磷酸酶活性和护骨素及肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA的表达。

**结果与结论:** 较高浓度( $10^{-5}$  mol/L)的唑来膦酸明显抑制成骨细胞增殖,  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  mol/L唑来膦酸不影响成骨细胞的增殖。低浓度( $10^{-5}$ – $10^{-9}$  mol/L)唑来膦酸能使成骨细胞护骨素 mRNA表达增加, 肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA表达下降。说明唑来膦酸在低浓度时不影响成骨细胞的增殖及分化, 其可通过调节成骨细胞护骨素、肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA的表达, 来发挥其抗骨吸收的作用。

**关键词:** 唑来膦酸; 成骨细胞; 增殖; 分化; 护骨素; 肿瘤坏死因子 $\alpha$

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.02.021

荆波, 尹芸生, 张涛, 王兴宇, 郑振雨, 陈晓敏, 闻伟敬. 成骨细胞护骨素及肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA表达与唑来膦酸的干预[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(2):277-280. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of Orthopaedics, the Second Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Jing Bo★, Studying for master's degree, Physician, Department of Orthopaedics, the Second Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
jingbo19850124@163.com

Correspondence to: Yin Yun-sheng, Professor, Master's supervisor, Department of Orthopaedics, the Second Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
yunshengyin@hotmail.com

Received: 2010-09-03  
Accepted: 2010-10-29

## 0 引言

双膦酸盐具有极强的抗骨吸收作用, 在临床上广泛用于治疗骨质疏松症、变形性骨炎以及恶性肿瘤骨转移和高钙血症等骨吸收增加类疾病<sup>[1]</sup>。双膦酸盐不仅可以直接抑制骨吸收, 选择性吸附于骨矿物质的表面, 被破骨细胞吸收后干扰破骨细胞的多个生化过程<sup>[2]</sup>, 而且对于成骨细胞及骨形成的过程也有影响, 还可以通过旁分泌各种细胞因子来间接抑制破骨细胞的骨吸收作用。对双膦酸盐类药物作用机制的研究

大多针对于破骨细胞, 且其对破骨细胞的作用及影响已取得了共识, 而它对于成骨细胞的影响尚有争议。

本实验采用体外培养大鼠成骨细胞, 观察第3代双膦酸盐唑来膦酸对大鼠成骨细胞增殖、分化和护骨素及肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA表达的影响, 探讨其在骨代谢中的作用, 为促进骨质疏松性骨愈合提供依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞生物学观察对照实验。

山西医科大学附属第二医院骨科, 山西省太原市 030001

荆波★, 男, 1986年生, 山西省运城市人, 汉族, 山西医科大学在读硕士, 医师, 主要从事创伤外科的研究。  
jingbo19850124@163.com

通讯作者: 尹芸生, 教授, 硕士生导师, 山西医科大学附属第二医院骨科, 山西省太原市 030001  
yunshengyin@hotmail.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2011)02-00277-04

收稿日期: 2010-09-03  
修回日期: 2010-10-29  
(20100903013/YJ·Z)

**时间及地点:** 实验于2009-10/2010-05在山西医科大学中心实验室完成。

**材料:** 选用6只新生24 h的清洁级SD大鼠, 雌雄不限, 由山西医科大学生理动物中心提供。

**主要试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
唑来膦酸标准品	美国 LKT 公司
II型胶原酶、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐(MTT)	Sigma 公司
DMEM 培养基	Gibco 公司
胎牛血清	杭州四季青生物工程研究所
ALP 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所
Trizol 试剂盒	QIAGEN 公司
RT-PCR 试剂盒	Promega 公司
Marker	Promega 公司
核酸蛋白分析仪	GeneQuant
酶标仪	TECAN 公司
电泳仪	北京君意电泳设备有限公司
凝胶成像仪	Alphalmager
梯度 PCR 仪	天隆科技有限公司

**实验方法:**

**成骨细胞的分离培养(酶消化法):** 将新生的SD大鼠投入体积分数75%乙醇中浸泡5 min, 无菌条件下摘取颅盖骨, 将颅盖骨置于含PBS液的培养皿中, 剔除颅盖骨上附着的软组织, 使用眼科剪将颅盖骨剪碎成1 mm<sup>3</sup>大小的骨片, PBS液充分冲洗后移入离心管内。先用0.25%胰蛋白酶消化20 min, 然后用0.1% II型胶原酶37 °C振荡消化60 min, 离心去上清, 在沉淀的细胞中加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液, 充分吹打含有细胞的培养液, 收集细胞悬液, 并接种于培养瓶中。将培养瓶置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养。24 h后贴壁, 48 h换液1次, 之后培养液每3 d更换1次。每日在倒置相差显微镜下观察细胞生长状况。当细胞在培养瓶中贴壁生长密集、接近完全平铺时, 吸弃旧培养液, 用PBS液冲洗细胞3次, 加入0.25%胰蛋白酶1 mL消化完成后, 加入含体积分数10%胎牛血清培养液终止消化, 用吸管轻轻吹打, 细胞脱落成细胞悬液, 传代。第4代细胞供实验用。

**用MTT法测唑来膦酸对大鼠成骨细胞增殖的影响:** 用体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液将传至第4代的成骨细胞接种于3块48孔培养板上, 细胞浓度为1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>, 每孔加含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液100 μL培养24 h。镜下观察细胞贴壁后, 将48孔分为6组, 每组8孔。对照组换普通培养液100 μL, 5个实

验组各孔分别换含10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> mol/L唑来膦酸的培养液100 μL。分别于加药后3, 5, 7 d各取1板行MTT检测, 每孔加入5 g/L噻唑蓝20 μL, 37 °C继续孵育4 h后终止培养, 吸出噻唑蓝, 每孔加入150 μL二甲基亚砷, 振荡10 min, 使蓝色结晶溶解, 用酶标仪(波长490 nm)测定各孔的吸光度值(A)。

**用硝基苯基质动力学法测唑来膦酸对大鼠成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响:** 将种于培养瓶中的第4代成骨细胞, 按照所含唑来膦酸浓度分为4组: 即10<sup>-9</sup> mol/L组, 10<sup>-8</sup> mol/L组, 10<sup>-7</sup> mol/L组及对照组。加药3 d后, 消化收集细胞, 加入含有1%SDS的细胞裂解液300 μL, 4 °C条件下裂解细胞30 min, 取50 μL裂解后的上清液至48孔培养板中, 每组8个孔, 按照碱性磷酸酶测定试剂盒说明来检测碱性磷酸酶的活性, 在波长490 nm下, 用酶标仪测各孔的吸光度值, 同时设空白及标准对照孔, 按公式计算碱性磷酸酶的活性: 碱性磷酸酶(金氏单位/100 mL)=样品管吸光度×标准管酚的含量(0.005 mg)×100 mL/标准管吸光度/0.05 mL。

**用RT-PCR分别测护骨素及肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA的表达:** 当种于培养瓶中的第4代成骨细胞贴壁达80%时, 随机分为实验组和对照组, 对照组用正常培养液, 实验组分别用含10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>及10<sup>-5</sup> mol/L唑来膦酸的培养液。药物干预72 h后, 收集各组细胞于无菌EP管中, 加冻存液保存于-80 °C冰箱。取冻存各组细胞, 解冻后按照Trizol试剂盒说明书提取细胞内的总RNA。用核酸蛋白分析仪检测提取的RNA含量和A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub>的比值以确定其纯度。将提取的总RNA在10 g/L琼脂糖凝胶中进行电泳, 以检测RNA的完整性。

**根据反转录-聚合酶链反应试剂盒说明书** 反转录得到cDNA, 再用此cDNA进行扩增。扩增条件: 首次95 °C预变性2 min, 然后94 °C变性20 s, 58 °C退火20 s, 72 °C延伸20 s, 循环32次, 最后72 °C延伸10 min。

**反转录聚合酶链反应产物分析:** 取扩增产物5 μL, 用2%的琼脂糖凝胶电泳, 在300 nm紫外光下摄影, 通过凝胶成像分析软件对目的基因和参照基因条带进行吸光度值测定(条带吸光度值=平均吸光度值×条带面积), 并算出两目的基因分别和参照基因的比值。

**主要观察指标:** 成骨细胞增殖情况和碱性磷酸酶活性, 护骨素、肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA表达水平。

**统计学分析:** 由第一作者采用SPSS 13.0软件包进行统计分析, 所有实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 实验组与对照组之间比较用单因素方差分析, 细胞增殖实验采用重复测量方差分析检验,  $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度唑来膦酸对成骨细胞增殖的影响** 与对照组相比, 当唑来膦酸浓度为 $10^{-5}$  mol/L时可明显抑制成骨细胞的增殖( $P < 0.05$ ); 而当唑来膦酸浓度为 $10^{-6}$  mol/L时成骨细胞的增殖无变化( $P > 0.05$ )。说明唑来膦酸在低浓度时不影响成骨细胞的增殖, 见表1。

表1 不同浓度唑来膦酸对成骨细胞增殖的影响  
Table 1 Effect of zoledronic acid at different concentrations on the proliferation of osteoblasts ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=7$ , A)

Group	Invention time (h)		
	72	120	168
Control	0.662±0.028	0.978±0.019	1.325±0.115
$10^{-9}$ mol/L	0.704±0.090	1.015±0.058	1.367±0.132
$10^{-8}$ mol/L	0.691±0.046	0.966±0.063	1.356±0.084
$10^{-7}$ mol/L	0.687±0.055	0.930±0.072	1.241±0.121
$10^{-6}$ mol/L	0.678±0.064	0.929±0.063	1.227±0.101
$10^{-5}$ mol/L	0.402±0.010 <sup>a</sup>	0.449±0.060 <sup>a</sup>	0.487±0.064 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. control group

**2.2 不同浓度唑来膦酸对成骨细胞分化的影响** 与对照组相比, 当唑来膦酸浓度为 $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ 及 $10^{-7}$  mol/L时成骨细胞碱性磷酸酶的活性无明显变化( $P > 0.05$ ), 说明唑来膦酸在低浓度时不影响成骨细胞的分化。

**2.3 不同浓度唑来膦酸对成骨细胞护骨素、肿瘤坏死因子  $\alpha$  mRNA表达的影响** 见表2。

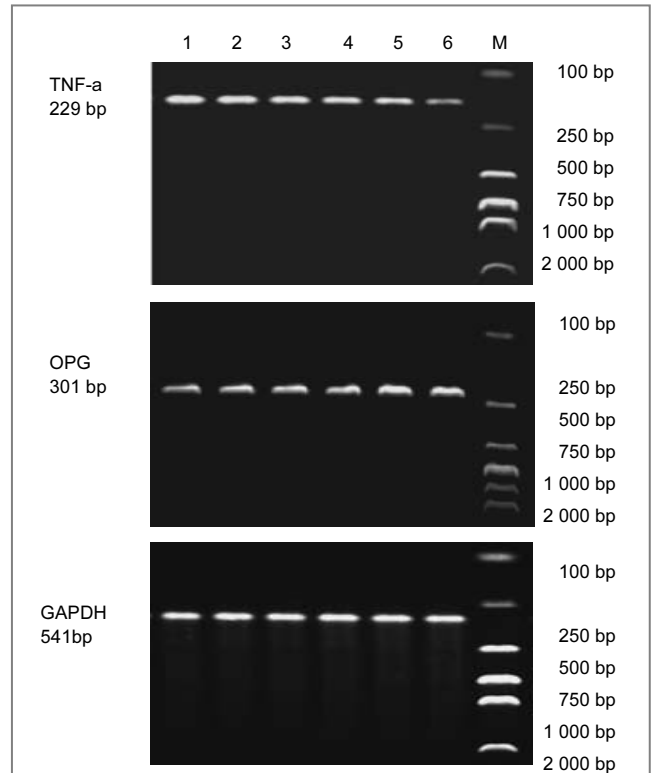
表2 护骨素、肿瘤坏死因子  $\alpha$  条带分别和内参条带吸光度积分比值  
Table 2 Effect of zoledronic acid at different concentrations on the mRNA expression of osteoprotegerin (OPG) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) of osteoblasts at 72 h after culture ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

Group	R <sub>OPG</sub>	R <sub>TNF-<math>\alpha</math></sub>
Control	0.870 6±0.014 8	1.229 4±0.019 2
$10^{-9}$ mol/L	0.957 9±0.017 7 <sup>a</sup>	1.072 7±0.018 9 <sup>a</sup>
$10^{-8}$ mol/L	1.047 7±0.022 4 <sup>a</sup>	0.976 4±0.017 8 <sup>a</sup>
$10^{-7}$ mol/L	0.940 6±0.020 8 <sup>a</sup>	0.798 4±0.015 6 <sup>a</sup>
$10^{-6}$ mol/L	1.229 7±0.017 1 <sup>a</sup>	0.772 3±0.015 5 <sup>a</sup>
$10^{-5}$ mol/L	1.113 2±0.014 4 <sup>a</sup>	0.411 7±0.008 6 <sup>a</sup>

R<sub>OPG</sub>=V<sub>OPG</sub>/V<sub>GAPDH</sub>; R<sub>TNF- $\alpha$</sub> =V<sub>TNF- $\alpha$</sub> /V<sub>GAPDH</sub>; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. control group

唑来膦酸可增加成骨细胞护骨素mRNA的表达, 当浓度为 $10^{-6}$  mol/L时增加作用最明显, 约为对照组表达量的1.412倍, 而当浓度为 $10^{-5}$  mol/L时增加的幅度又减小。唑来膦酸呈浓度依赖性降低成骨细胞肿瘤坏死因子  $\alpha$  mRNA的表达, 当浓度为 $10^{-5}$  mol/L时抑制作用最大,

约为对照组表达量的0.335, 见图1, 表2。



1: control group; 2:  $10^{-9}$  mol/L; 3:  $10^{-8}$  mol/L; 4:  $10^{-7}$  mol/L; 5:  $10^{-6}$  mol/L; M: maker

Figure 1 Effect of zoledronic acid at different concentrations on the mRNA expression of osteoprotegerin (OPG) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) of osteoblasts at 72 h after culture

图1 不同浓度唑来膦酸干预 72 h 对成骨细胞护骨素、肿瘤坏死因子  $\alpha$  mRNA 表达的影响

## 3 讨论

双膦酸盐可以直接抑制破骨细胞胆固醇代谢, 通过阻止破骨细胞活化, 诱导破骨细胞凋亡, 减少破骨细胞介导的骨吸收, 降低骨转换率, 从而增加骨量<sup>[3]</sup>。研究证实成骨细胞也是双膦酸盐的靶向细胞, 双膦酸盐可调节成骨细胞增殖、分化和细胞外基质蛋白的合成以及矿化的形成<sup>[4-6]</sup>, Sahni等<sup>[7]</sup>发现双膦酸盐的抗骨吸收作用需要有成骨细胞参与。唑来膦酸是第3代异环型含氮双膦酸盐类药物, 其主要药理作用是通过抑制破骨细胞活性和诱导破骨细胞凋亡来抑制骨吸收<sup>[8]</sup>, 是目前抑制骨吸收作用最强的双膦酸盐类药物<sup>[9]</sup>。

护骨素是肿瘤坏死因子受体家族成员, 属于可溶性糖蛋白。护骨素在成骨细胞、软骨细胞、主动脉平滑肌细胞及内皮细胞均有表达。体外研究表明, 护骨素具有抑制破骨细胞形成、分化、活化并诱导破骨细胞凋亡的功能<sup>[10]</sup>, 其功能与核因子 $\kappa B$ 受体活化因子配体和核因子 $\kappa B$ 受体活化因子密切相关。护骨素/核因子 $\kappa B$ 受体活化因子配体/核因子 $\kappa B$ 受体活化因子系统是破骨细胞和成

骨细胞之间相互调节的耦联因子之一<sup>[11]</sup>。核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体和破骨细胞表面的核因子 $\kappa$ B受体活化因子结合后,可以促进破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞,同时可增强破骨细胞的活性并延长破骨细胞的存活期<sup>[12]</sup>。成骨细胞分泌的护骨素是核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体的可溶性假受体,通过与核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体的结合,竞争性的阻断核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体与核因子 $\kappa$ B受体活化因子的结合,从而抑制破骨细胞的形成和活化<sup>[13-14]</sup>。此外护骨素还可阻断TNF- $\alpha$ 诱导的成骨细胞凋亡,减少TNF- $\alpha$ 转基因鼠的骨丢失<sup>[15]</sup>。

本实验采用MTT法观察唑来膦酸对大鼠成骨细胞增殖的影响,结果表明,当唑来膦酸浓度 $\geq 10^{-5}$  mol/L时,明显抑制成骨细胞增殖,且当浓度越大作用时间越长时,抑制作用越明显。而当唑来膦酸浓度 $\leq 10^{-6}$  mol/L时,对成骨细胞增殖没有明显影响( $P > 0.05$ )。这与Orriss等<sup>[16]</sup>和Pan等<sup>[6]</sup>的研究结果相似,他们证实唑来膦酸浓度高时,由于药物毒性作用而抑制成骨细胞增殖,且时间越长抑制作用越明显,并可影响其碱性磷酸酶活性和矿化功能,但在低浓度组( $\leq 10^{-9}$  mol/L)时则不影响增殖和分化,甚至促进矿化沉积。另外,彭晨等<sup>[17]</sup>研究结果显示,用唑来膦酸连续干预大鼠成骨细胞,在低浓度( $10^{-7} \sim 10^{-11}$  mol/L)时不影响其增殖和分化。实验发现当唑来膦酸浓度为 $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ 及 $10^{-7}$  mol/L时大鼠成骨细胞碱性磷酸酶的活性无变化( $P > 0.05$ ),这说明唑来膦酸在低浓度时不影响成骨细胞分化。当用反转录-聚合酶链反应来检测唑来膦酸对成骨细胞护骨素、TNF- $\alpha$  mRNA表达的影响时发现,与对照组相比,随着浓度逐渐增大,唑来膦酸可降低TNF- $\alpha$  mRNA的表达,当浓度为 $10^{-5}$  mol/L时抑制作用最大;同时,随着浓度增大,唑来膦酸可增加护骨素mRNA的表达,当浓度为 $10^{-6}$  mol/L时增加作用最明显。

综上所述,唑来膦酸不仅可直接抑制破骨细胞介导的骨吸收作用,还可通过调节成骨细胞护骨素、TNF- $\alpha$  mRNA的表达水平来间接抑制破骨细胞的骨吸收作用。这可能是唑来膦酸治疗骨质疏松症的机制之一。但在骨微环境中唑来膦酸对成骨细胞的影响至今仍未形成共识<sup>[18]</sup>。本实验发现唑来膦酸低浓度时对成骨细胞没有明显影响,因而推测该药对破骨细胞的抑制作用更明显。如何在发挥双膦酸盐抑制破骨作用的同时最大限度地减小其对成骨作用的影响将是今后预防和治疗骨质疏松症等骨量丢失类疾病的研究重点。

#### 4 参考文献

[1] Lin H, Han ZB, Sun YF, et al. Jiangsu Yiyao. 2002;28(8):566-568. 林华, 韩祖斌, 孙燕芳, 等. 骨吸收抑制剂治疗绝经后骨质疏松的临床评价[J]. 江苏医药, 2002,28(8):566-568.

[2] Richman S, Edusa V, Fadiel A, et al. Low-dose estrogen therapy for prevention of osteoporosis: working our way back to monotherapy. Menopause. 2006;13(1):148-155.

[3] Huang ZH. Xin Yixue. 1999;30(9):429-430. 黄祖斌. 正电子发射型计算机断层显像[J]. 新医学, 1999,30(9):429-430.

[4] Idris AI, Rojas J, Greig IR, et al. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. Calcif Tissue Int. 2008;82(3):191-201.

[5] Im GI, Qureshi SA, Kenney J, et al. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. Biomaterials. 2004;25(18):4105-4115.

[6] Pan B, To LB, Farrugia AN, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. Bone. 2004;34(1):112-123.

[7] Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, et al. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. J Clin Invest. 1993;91(5):2004-2011.

[8] Skerjanec A, Berenson J, Hsu C, et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with varying degrees of renal function. J Clin Pharmacol. 2003;43(2):154-162.

[9] Mundy GR, Yoneda T, Hiraga T. Preclinical studies with zoledronic acid and other bisphosphonates: impact on the bone microenvironment. Semin Oncol. 2001;28(2 Suppl 6):35-44.

[10] Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev. 1999;20(3):345-357.

[11] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med. 2006;12(1):17-25.

[12] Lam J, Nelson CA, Ross FP, et al. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. J Clin Invest. 2001;108(7):971-979.

[13] Pischon N, Darbois LM, Palamokumbura AH, et al. Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor- $\alpha$  in osteoblasts. J Biol Chem. 2004;279(29):30060-30065.

[14] Abbas S, Zhang YH, Clohisy JC, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor. Cytokine. 2003;22(1-2):33-41.

[15] Schett G, Redlich K, Hayer S, et al. Osteoprotegerin protects against generalized bone loss in tumor necrosis factor-transgenic mice. Arthritis Rheum. 2003;48(7):2042-2051.

[16] Orriss IR, Key ML, Colston KW, et al. Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. J Cell Biochem. 2009;106(1):109-118.

[17] Peng C, Wang ZQ, Li QJ, et al. Shuli Yiyaoxue Zazhi. 2009;22(3):267-270. 彭晨, 王志强, 李琪佳, 等. 唑来膦酸对大鼠成骨细胞增殖、分化和矿化功能的影响[J]. 数理医药学杂志, 2009,22(3):267-270.

[18] Recker RR, Delmas PD, Halse J, et al. Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. J Bone Miner Res. 2008;23(1):6-16.

#### 来自本文课题的更多信息—

**作者贡献:** 实验的设计、评估由全体作者共同完成,资料收集、实验实施以及成文由荆波完成,审核由尹芸生完成,荆波对文章负责。

**利益冲突:** 该课题不涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求。

#### 本文创新性:

**提供证据:** 作者于2010-10检索万方、维普和中国知网等,检索关键词:成骨细胞;护骨素;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;唑来膦酸,检索到2篇文献。均未出现与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的相互关系的内容。

**创新点说明:** 双膦酸盐是一种有效的破骨细胞抑制剂,其对破骨细胞的影响及作用已得到了大家的共识。本实验旨在观察唑来膦酸对成骨细胞增殖、分化以及成骨细胞调控破骨细胞骨吸收作用的影响,从成骨细胞角度进一步认识双膦酸盐在防治骨质疏松过程中可能发挥的骨保护作用机制,为其用于临床促进骨质疏松性骨愈合提供理论依据。