

# 雌激素缺乏导致的骨质疏松发病过程中T淋巴细胞对骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响及与TNF- $\alpha$ 的关系

邵秉一<sup>1,2</sup> 于洋<sup>1,2</sup> 傅潇慧<sup>3</sup> 廖立<sup>4</sup> 金岩<sup>4</sup> 杨德琴<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科, 重庆 401147; <sup>2</sup>口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147; <sup>3</sup>浙江大学医学院附属第二医院滨江院区, 杭州 310003; <sup>4</sup>第四军医大学口腔病理教研室, 西安 710032)

**摘要** 探讨骨质疏松发病过程中T淋巴细胞对骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMMSC)增殖分化的影响。选用健康雌性小鼠行双侧卵巢切除术(ovariectomy, OVX), 建立绝经后骨质疏松模型。选用同一批次健康小鼠行双侧卵巢脂肪组织部分切除, 建立假手术组(sham), Micro-CT确立模型成功建立。将sham组、OVX组、sham+anti-TNF $\alpha$ 组、OVX+anti-TNF $\alpha$ 组中T淋巴细胞与BMMSC共培养, ELISA检测sham组与OVX组T淋巴细胞上清液中TNF- $\alpha$ 表达的差异, MTT法检测四组共培养体系中BMMSC生长曲线; 成骨诱导后碱性磷酸酶和钙化结节茜素红染色法检测BMMSC成骨能力差异; RT-PCR检测小鼠BMMSC成骨相关基因Runx2、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的表达。结果显示, 与sham组相比, OVX组中BMMSC的增殖受到了抑制, 成骨分化减弱( $P < 0.05$ ), OVX anti-TNF- $\alpha$ 刺激组较OVX组增殖显著升高( $P < 0.05$ ), 成骨分化能力显著增强( $P < 0.05$ )。以上结果证明, 在雌激素缺乏下的T淋巴细胞能影响BMMSC增殖及成骨分化能力, 这可能与T淋巴细胞表达TNF- $\alpha$ 增强相关。

**关键词** 骨质疏松; T淋巴细胞; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

## Effect of T-lymphocytes on Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells

Shao Bingyi<sup>1,2</sup>, Yu Yang<sup>1,2</sup>, Fu Xiaohui<sup>3</sup>, Liao Li<sup>4</sup>, Jin Yan<sup>4</sup>, Yang Deqin<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Endodontics, the Affiliated Hospital of Stomatology, The Stomatology College The Chongqing Medical University; <sup>2</sup>Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science, Chongqing 401147, China; <sup>3</sup>The Second Affiliated Hospital (Binjiang Branch) Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China; <sup>4</sup>Department of Oral Histology and Pathology, School of Stomatology, The Forth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract** To investigate the effect of T-lymphocytes on the cell proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSC), the bone marrow-derived mesenchymal stem cell was co-cultured with T-lymphocytes from the sham, OVX group, sham+anti-TNF- $\alpha$  and OVX+anti-TNF- $\alpha$  group. The MTT method was used to analyze the growth curves of BMMSC. After osteogenic induction, calcium nodules were

收稿日期: 2013-10-25 接受日期: 2014-01-08

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2011CB964700)和重庆市医学重点学科建设经费基金资助项目《牙体牙髓病学》(2011)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-88860060, E-mail: yangdeqin@gmail.com

Received: October 25, 2013 Accepted: January 8, 2014

This work was supported by the National Major Scientific Research Program of China (973 program) (Grant No.2011CB964700) and Chongqing Key Disciplines Construction Special Fund Subsidization Project (Cariology and Endodontics 2011)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-88860060, E-mail: yangdeqin@gmail.com

网络出版时间: 2014-03-24 11:33

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0342.html>

observed by alizarin red staining and alkaline phosphatase staining. The expression levels of BMMSC osteogenesis related genes, for instance, *Runx2*, *OCN* were measured by RT-PCR. Compared with sham group, the proliferation capacity of BMMSC in OVX group was declined, and the osteogenic potential was decreased. Compared with OVX group, the proliferation capacity of BMMSC in OVX anti-TNF- $\alpha$  group was increased, and the osteogenic potential was enhanced. The results demonstrated that T-lymphocytes might influence the osteogenic activity of BMMSC by inhibiting proliferation and osteogenic differentiation under estrogen deficiency, which might be related to the increased expression of TNF- $\alpha$  by T-lymphocytes.

**Key words** osteoporosis; T-lymphocytes; BMMSC; osteogenic; TNF- $\alpha$

绝经后骨质疏松是由于雌激素水平降低引起骨免疫功能增强, 导致骨重建失衡所致<sup>[1]</sup>。雌激素通过经典雌激素受体途径调控T淋巴细胞活化, 介导免疫因子的产生和表达, 影响成骨细胞、破骨细胞的活性和功能。研究报道, 雌激素减少能促进T淋巴细胞增殖, 激活的T细胞产生TNF- $\alpha$ 增多, 促进破骨细胞的活化, 打破骨的动力平衡<sup>[2-3]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC)是一类存在于骨髓基质中的成体干细胞, 参与骨髓微环境的形成, 具有向中胚层和神经外胚层来源的组织细胞分化的潜能<sup>[4]</sup>。BMMSC功能缺陷如增殖活性降低、成骨分化能力降低是导致绝经后骨质疏松发病的重要因素之一<sup>[5]</sup>。绝经后骨质疏松也被认为是炎症性疾病, 甚至是一种自身免疫状态。目前研究大多集中在T细胞与成骨细胞和破骨细胞的相互作用<sup>[6]</sup>, 对T细胞作用于骨髓间充质干细胞增殖分化的报道甚少。

本文通过构建骨质疏松模型观察雌激素缺乏下T淋巴细胞对骨髓间充质干细胞增殖分化的影响, 进一步探讨绝经后骨质疏松的发病机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

$\alpha$ -MEM培养基、胰蛋白酶(Gibco, 美国); 胎牛血清(四季青, 杭州); 无酚红的 $\alpha$ -MEM、 $\alpha$ -1640培养基(Gibco公司, 美国); 细胞总RNA提取试剂盒、一步法RT-PCR试剂盒(TaKaRa, 日本); CD3、CD28(BD Pharmingen, 美国); 体式显微镜、倒置相差显微镜以及照相系统(Olympus, 日本); 流式细胞分析仪(Beckmen Coulter, 美国); T淋巴细胞分离柱试剂盒(R&D, 美国); 碱性磷酸酶染色试剂盒(碧云天, 中国); 小鼠TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒(欣博盛, 中国); 小鼠雌激素酶联免疫吸附测定试剂盒(雅吉, 中国); 抗TNF- $\alpha$ 抗体(R&D, 美国)。

### 1.2 卵巢切除组(OVX)小鼠骨质疏松模型建立

取8周龄C57小鼠30只, 随机分成OVX组和假手术组(sham)组, 每组15只。OVX组以1%戊巴比妥钠麻醉后, 从背部开口寻找双侧卵巢, 切除后缝合伤口。Sham组找到卵巢后仅切除部分脂肪组织, 缝合伤口。置于无特定病原体(SPF)级动物房饲养, 1个月后Micro-CT验证模型是否构建成功。

### 1.3 Micro-CT检测

将Sham组和OVX组小鼠的股骨远端平行于扫描床长轴放置, 以透明胶布固定, 行Micro-CT扫描。扫描参数: 电压160 kV, 靶功率10 W, 扫描方式360°, 曝光时间3 000 ms, 图像平面分辨率1 024 $\times$ 1 024, 像素点尺寸10  $\mu$ m $\times$ 10  $\mu$ m。扫描完成后, 进行组织重建。重建完成后, 在重建区域生长板下1 mm和股骨远端1.5 mm的区域为感兴趣区域(range of interests, ROI), 进行骨小梁三维图像重建, 利用配套软件分析骨小梁微观三维结构并获得骨组织比例(bone volume relative to tissue volume, BV/TV, %)、骨小梁厚度(trabecula thickness, Tb.Th,  $\mu$ m)、骨小梁数量(trabecula number, Tb.N./mm)等骨小梁的空间结构参数。

### 1.4 血清雌二醇水平检测

取sham与OVX组小鼠摘除眼球采血收集于离心管, 室温静置2 h, 3 000 r/min离心10 min。取上清液于干净离心管中, 应用小鼠雌激素酶联免疫吸附测定试剂盒以双抗体夹心法测定血清雌二醇水平。按试剂盒说明, 每组3个复孔。以试剂盒提供的标准蛋白做标准曲线, 以所得吸光值并乘以稀释倍数计算雌激素浓度。

### 1.5 BMMSC原代培养及纯化

取c57小鼠断颈处死, 酒精浸泡5 min, 超净台内无菌分离其胫骨和股骨, 用完全培养基冲刷出全骨髓, 轻柔吹打冲洗液制成单细胞悬液, 加30 mL  $\alpha$ -MEM(含20% FBS)平分至3个9 cm培养皿, 培养24 h

候后弃去未贴壁细胞以后每3 d换液一次,待细胞生长达80%时进行传代。取对数生长期的第1代。

### 1.6 T淋巴细胞的培养和BMMSC共培养

取4~8周c57小鼠,断颈处死,乙醇浸泡5 min,在超净台内无菌摘取脾脏,将小鼠脾脏剪碎后混于Hanks液中,400目网滤过离心洗涤,每个脾脏加入2 mL红细胞裂解液充分裂解红细胞后,通过T淋巴细胞分离柱分离T淋巴细胞,加入 $\alpha$ -1640培养液(含10% FBS),按每孔按 $1 \times 10^5$ 接种于12孔板中。12孔板预先用CD3(5 mg/L)包被4 h后去除,每孔加入CD28(2 mg/L)激活12 h<sup>[7]</sup>。分别将sham组与OVX组小鼠的T淋巴细胞转移至预先种上BMMSC的培养板中,共培养7 d。同时设立对照组,即BMMSC单独培养组。

### 1.7 ELISA检测TNF- $\alpha$ 表达

培养T淋巴细胞(方法同6),收集sham组与OVX组小鼠淋巴细胞上清液,建立sham T淋巴细胞组与OVX T淋巴细胞组,为排除BMMSC自身分泌TNF- $\alpha$ 的干扰,同时设立BMMSC与T淋巴细胞共培养组作为对照组,用TNF- $\alpha$  ELISA检测试剂盒检测培养3组上清液中TNF- $\alpha$ 水平,每组5个复孔。以TNF- $\alpha$  ELISA检测试剂盒提供的标准蛋白做标准曲线,以所得吸光值计算TNF- $\alpha$ 浓度。

### 1.8 Anti-TNF- $\alpha$ 预处理T淋巴细胞

分别收集sham组与OVX组小鼠的T淋巴细胞于12孔板中(方法同4),将anti-TNF- $\alpha$ 稀释至预定浓度(3 ng/mL)加入至12孔细胞培养板的相应孔中,200  $\mu$ L/孔,终浓度为1 ng/mL,培养板在含5% CO<sub>2</sub>的37 °C孵箱中孵育2 h后备用。

### 1.9 T淋巴细胞对BMMSC增殖的测定

BMMSC细胞以1 500/孔、100  $\mu$ L/孔接种于96孔板,分别加入sham组、OVX组、sham+anti-TNF- $\alpha$ 组及OVX+anti-TNF- $\alpha$ 组(每组3个复孔)T淋巴细胞(密度为 $1 \times 10^3$ /孔),共培养24 h后,吸取培养孔中上层淋巴细胞悬液,PBS清洗2遍,加入MTT液20  $\mu$ L/孔(MTT液配制:5 g MTT/L PBS液),置于培养箱中4 h后,弃去旧液体,加入二甲基亚砷150  $\mu$ L/孔,震荡10 min,酶联免疫仪选取490 nm测定吸光度值(D),以后每隔24 h检测1组,以时间为横轴,D值为纵轴绘制生长曲线。

### 1.10 碱性磷酸酶染色检测

将BMMSC以 $5 \times 10^5$ /孔接种于6孔板,待细胞长至孔底80%时,加入sham组、OVX组、sham+anti-TNF- $\alpha$

组及OVX+anti-TNF- $\alpha$  T淋巴细胞(密度为 $1 \times 10^5$ /孔)与BMMSC共培养。成骨诱导液(配置250 mL诱导液:含10%FBS的 $\alpha$ -MEM培养液250 mL+Vitc+Dex)进行诱导,常规连续培养7 d后弃诱导液,PBS洗2遍,4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗3遍,参照碱性磷酸酶试剂盒说明书,加入BC2P/NBT工作液温育后检测碱性磷酸酶活性。

### 1.11 茜素红染色检测

将BMMSC以 $5 \times 10^5$ /孔接种于6孔板,待细胞长至孔底80%时,加入sham组、OVX组、sham+anti-TNF- $\alpha$ 组及OVX+anti-TNF- $\alpha$  T淋巴细胞(密度为 $1 \times 10^5$ /孔)与BMMSC共培养。成骨诱导液进行诱导,常规连续培养7 d后弃诱导液,PBS洗2遍,4%多聚甲醛固定,加茜素红染液染色拍照。

### 1.12 RT-PCR检测BMMSC成骨相关基因的表达

T淋巴细胞与BMMSC成骨诱导共培养(方法同上),常规连续培养7 d后吸去上清液中的淋巴细胞,PBS洗3遍,收集sham、OVX组、sham+anti-TNF- $\alpha$ 组及OVX+anti-TNF- $\alpha$ 组中的BMMSC,用总RNA提取试剂盒一步法提取细胞总RNA,用反转录试剂盒合成cDNA, $\beta$ -actin为内参照。参照GenBank数据库,采用Primer 5.0计算机软件设计引物,由TaKaRa公司合成基因序列: $\beta$ -actin上游引物:5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3',下游引物5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3';Runx2上游引物:5'-ATT GGC ACC ATC TTT ACT GTT ACC-3',下游引物:5'-CTC CTT AGA ATC TGT TTG CTC TCA TA-3';OCN上游引物:5'-CTG ACA AAG CCT TCA TGT CCA A-3',下游引物:5'-CCG CAC GAC AAC CGC ACC AT-3';采用RT-PCR进行检测,反应体系(premix 10  $\mu$ L、dye 0.4  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 6.6  $\mu$ L、上下游引物各0.5  $\mu$ L、样本模板2  $\mu$ L),反应条件参照产品说明。

### 1.13 统计学分析

使用SPSS 11.0软件进行统计分析,多组间总体比较用方差分析,两两独立样本比较用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Micro-CT结果

MicroCT结果显示,OVX组骨皮质比sham组薄,而其松质骨比sham组多;OVX组骨小梁较sham



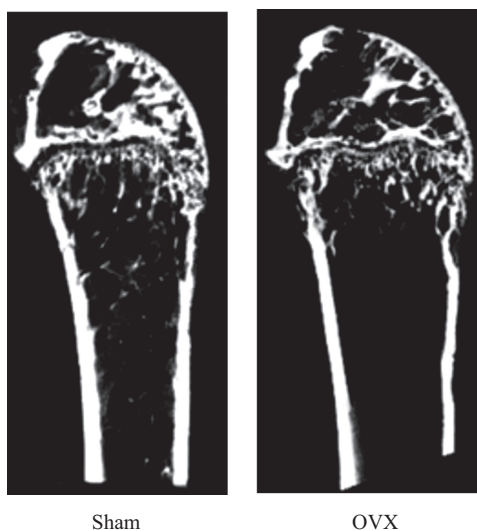


图1 sham组与OVX组股骨干骺端三维重建  
Fig.1 Metaphyseal 3D reconstruction of sham mice and OVX mice

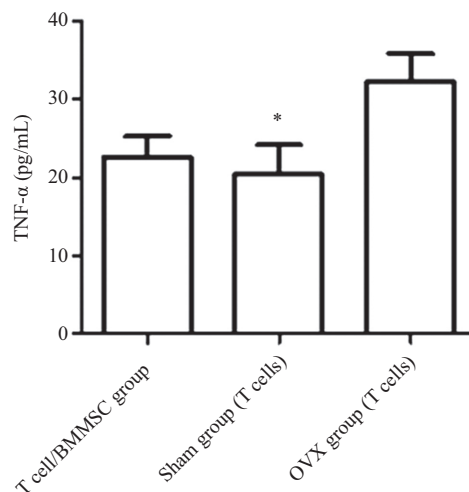


图2 酶联免疫法检测sham组和OVX组中T淋巴细胞TNF-α表达  
\*P<0.05, 与卵巢切除组(T淋巴细胞)比较。  
\*P<0.05 vs OVX group (T cells).  
Fig.2 The level of TNF-α in T lymphocytes in sham group and OVX group by ELISA

表1 Sham组和OVX组股骨干骺端形态学参数比较

Table 1 Metaphyseal morphological parameters in sham and OVX group

组别 Groups	骨体积分数(%) BV/TV (%)	骨小梁厚度(mm) Tb.Th (mm)	骨小梁数量(1/mm) T b.N (1/mm)	骨密度(mg/cc) BMD (mg/cc)
Sham	20.13±3.24	0.68±0.07	4.61±0.40	409.80±21.55
OVX	4.95±1.29**	0.08±0.02**	2.82±0.70*	260.45±18.79*

\*P<0.05, \*\*P<0.01, 与sham组比较。

\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs sham group.

表2 小鼠血清雌二醇水平

Table 2 The level of serum estradiol

组别 Group	数量 Number	血清雌激素 Serum estradiol
Sham	10	48.88±17.89
OVX	10	10.44±3.80*

\*P<0.05, 与sham组比较。

\*P<0.05 vs sham group.

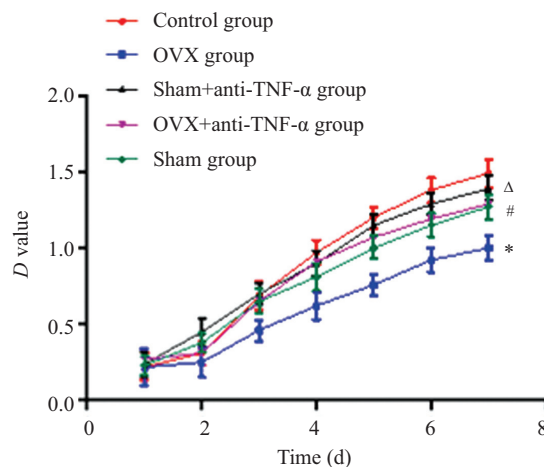
组骨小梁少, 且不连续呈扭曲状甚至断裂。OVX组与sham组股骨干骺端形态学参数比较, 骨体积分数(bone volume/total volume's, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁数量(trabecular number, Tb.N)和骨密度(bone mineral density, BMD)差异均有统计学意义(P<0.05)。以上结果表明, 卵巢摘除后的小鼠骨质疏松模型构建成功(图1、表1)。

### 2.2 血清雌二醇水平测定

切除手术一个月后, OVX组小鼠血清雌二醇水平显著低于sham组(P<0.05), 差异有统计学意义(表2)。

### 2.3 ELISA检测T淋巴细胞表达TNF-α

ELISA检测显示, OVX小鼠T淋巴细胞表达



\*P<0.05, 与卵巢切除组比较, \*P<0.05, 与卵巢切除+anti-TNF-α组比较, ΔP<0.05, 与假手术组比较。

\*P<0.05 vs OVX group, \*P<0.05 vs OVX+anti-TNF-α group, ΔP<0.05 vs sham group.

图3 T淋巴细胞对BMMSC增殖的影响

Fig.3 Effect of T lymphocytes on the BMMSC proliferation

TNF-α水平较sham组小鼠显著升高(P<0.05), T淋巴细胞与BMMSC共培养组中总TNF-α水平较sham组T淋巴细胞表达量有显著差异(P<0.05)。

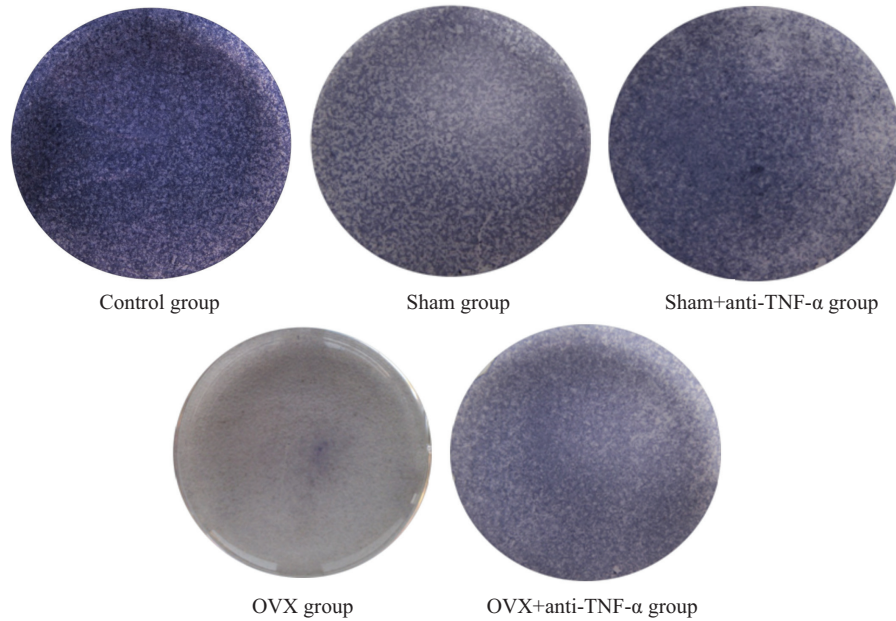


图4 碱性磷酸酶染色结果

Fig.4 Alkaline phosphatase staining

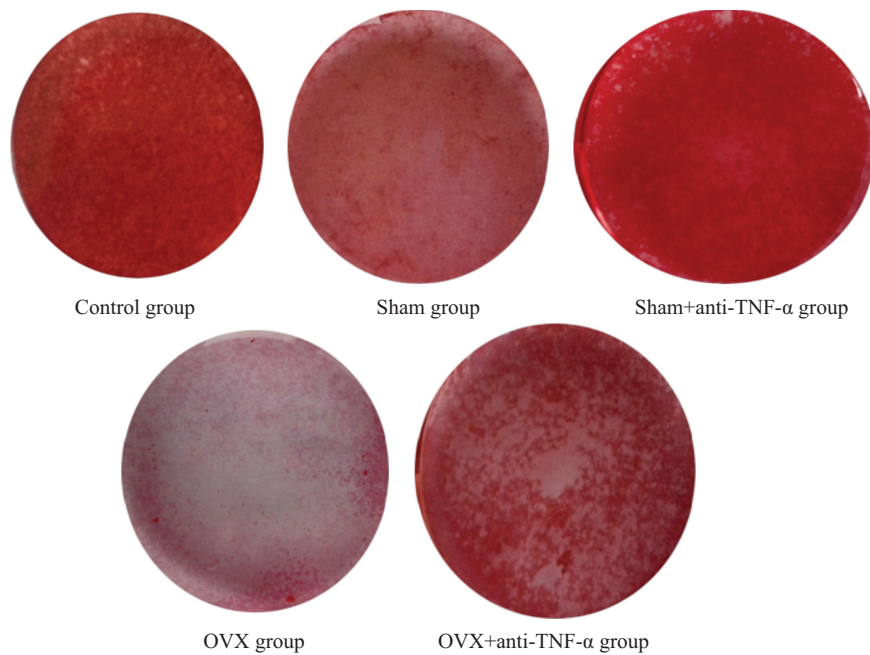


图5 茜素红染色结果

Fig.5 Alizarin red staining

## 2.4 BMMSCs生长曲线

MTT法检测BMMSC细胞增殖结果见图3。sham共培养组BMMSC增殖能力高于OVX组, sham组加入anti-TNF- $\alpha$ 后增殖能力较sham组显著提高( $P < 0.05$ ), OVX组在加入anti-TNF- $\alpha$ 后增殖能力较OVX组显著增强( $P < 0.05$ )。

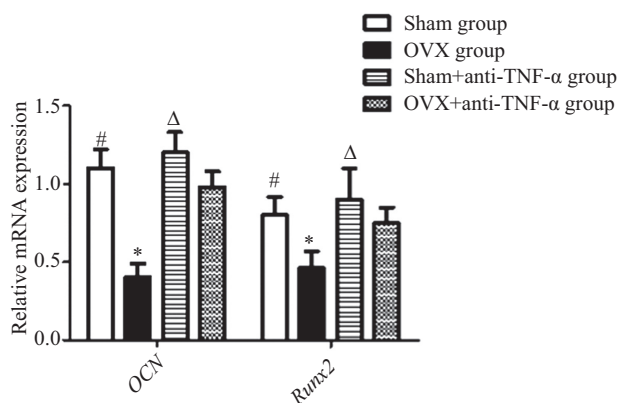
## 2.5 碱性磷酸酶染色结果

碱性磷酸酶染色显示, 对照组、sham组、OVX

组、sham+anti-TNF- $\alpha$ 组及OVX+anti-TNF- $\alpha$ 五组细胞胞浆都出现了紫色颗粒的阳性细胞, sham组阳性细胞数少于对照组(不加T淋巴细胞), 并且OVX组阳性细胞明显少于sham组, sham+anti-TNF- $\alpha$ 后碱性磷酸酶水平较sham组有一定提高。OVX+anti-TNF- $\alpha$ 后碱性磷酸酶水平较OVX组明显增高(图4)。

## 2.6 茜素红染色检测

Sham组T淋巴细胞与BMMSC共培养同时成骨



\* $P < 0.05$ , 与卵巢切除组比较, \* $P < 0.05$ , 与卵巢切除+anti-TNF- $\alpha$ 组比较,  $\Delta P < 0.05$ , 与假手术组比较。

\* $P < 0.05$  vs OVX group, \* $P < 0.05$  vs OVX+anti-TNF- $\alpha$  group,  $\Delta P < 0.05$  vs sham group.

图6 T淋巴细胞对BMMSC表达成骨相关基因的影响

Fig.6 Effect of T lymphocytes on expression of bone related genes by BMMSC

诱导细胞成骨诱导7 d后可见大量的钙化结节, 而OVX组可见少量的钙化结节出现, sham+anti-TNF- $\alpha$ 后钙化结节数较sham组显著增加, OVX+anti-TNF- $\alpha$ 后钙化结节数量较OVX组明显增加(图5)。

### 2.7 RT-PCR结果

RT-PCR结果显示(图6), 与OVX组T淋巴细胞共培养中的BMMSC中成骨相关基因*Runx2*、*OCN*较sham组显著降低( $P < 0.05$ ), sham+anti-TNF- $\alpha$ 组后成骨基因表达较sham组表达上升( $P < 0.05$ ), OVX+anti-TNF- $\alpha$ 后成骨基因表达较OVX组显著增高( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

TNF- $\alpha$ 是目前公认的最重要的一个内源性诱导型促炎细胞因子, TNF- $\alpha$ 通过激活靶细胞内MAPKS与NF- $\kappa$ B通路使细胞发生增殖、分化、炎症等应激反应。NF- $\kappa$ B是一种广泛存在于体内细胞的核转录因子, NF- $\kappa$ B通路激活导致MAPK家族成员JNK失活<sup>[8-9]</sup>进而调节细胞因子、趋化因子、生长因子、黏附分子, 影响体内的细胞分化、免疫反应、炎症反应、细胞凋亡等多种生物学功能。TNF- $\alpha$ 刺激破骨细胞的生成已被许多研究者证实<sup>[10]</sup>, 但TNF- $\alpha$ 对干细胞增殖及成骨分化的影响仍在不断地探索中。

本实验中, OVX小鼠T淋巴细胞表达TNF- $\alpha$ 较sham组显著增强, 茜素红染色发现OVX组成骨分化能力抑制作用较sham组T淋巴细胞明显增强。在给予anti-TNF- $\alpha$ 刺激后BMMSC成骨能力显著上升,

说明雌激素通过调控T淋巴细胞表达TNF- $\alpha$ 影响BMMSC的增殖与分化。ELISA检测发现, BMMSC自身能够分泌一定量的TNF- $\alpha$ , 因此实验仍需排除BMMSC自身分泌的TNF- $\alpha$ 对自身增殖与成骨分化的影响。Feng等<sup>[11]</sup>发现, TNF- $\alpha$ 抑制小鼠BMMSC的碱性磷酸酶活力和矿化结节的形成及*ALP*、*Runx2*和*Osterix*的mRNA表达。Huang等<sup>[12]</sup>发现, TNF- $\alpha$ 对BMMSC成骨抑制作用与浓度呈正相关。Yang等<sup>[13]</sup>发现, TNF- $\alpha$ 通过抑制MSC中miR-21表达调控MSC的成骨分化能力。以上表明, TNF- $\alpha$ 能够抑制小鼠BMMSCs的成骨分化。

成骨细胞起源于骨髓间充质干细胞, BMMSC是多能性的, 在合适的条件下能分化成为骨细胞、脂肪细胞、肌细胞等。BMMSC向成骨细胞分化需要转录因子协同作用。Runx2和OCN是调节成骨分化的两个关键性转录因子, *Runx2*基因缺陷小鼠骨骼中没有成骨细胞, 表明*Runx2*基因对于成骨分化和骨形成是必需的<sup>[14]</sup>。本实验中, OVX组T淋巴细胞对BMMSC中Runx2和OCN显著下调, 且抑制TNF- $\alpha$ 水平后, Runx2和OCN显著上调, 表明TNF- $\alpha$ 抑制了BMMSC中Runx2和OCN的表达。

免疫反应的调节与骨的调节存在许多共同的交叉机制。在炎症或损伤等情况下, 免疫细胞可以接受到信息传递, 而且作用于成骨细胞和破骨细胞, 同样T淋巴细胞对BMMSC也存在着调控作用, 过去的研究发现, 骨髓间充质干细胞能够分泌和旁分泌多种细胞因子影响T淋巴细胞的增殖与分化。然而机体是一个有机整体, 我们的实验发现, T淋巴细胞同样能够影响骨髓间充质干细胞的生物学活性。最近的研究显示, BMMSC的生物学功能与雌激素水平相关, 在雌激素缺乏的情况下, BMMSC自身成骨能力降低促进骨质疏松的发生<sup>[15]</sup>。本实验首次发现, 骨质疏松发病过程中T淋巴细胞对BMMSC的增殖与成骨分化产生了抑制, 并可能与T淋巴细胞表达TNF- $\alpha$ 增强相关, 这为雌激素缺乏导致BMMSC功能异常机制提供了另一条思路。

### 参考文献 (References)

- 1 Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008; 61(5): 577-87.
- 2 Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: A key mechanism by which estrogen deficiency induces bone

- loss *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 20(98): 13960-5.
- 3 Juhasz K, Buzas K, Duda E. Importance of reverse signaling of the TNF superfamily in immune regulation. Expert Rev Clin Immunol 2013; 9(4): 335-48.
  - 4 Pilz GA, Ulrich C, Ruh M, Abele H, Schäfer R, Kluba T, *et al*. Human term placenta-derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Stem Cells Dev 2011; 20(4): 635-46.
  - 5 Gimble JM, Nuttall ME. The relationship between adipose tissue and bone metabolism. Clin Biochem 2012; 45(12): 874-9.
  - 6 Singh A, Mehdi AA, Srivastava RN, Verma NS. Immuno-regulation of bone remodeling. Int J Crit Llln Inj Sci 2012; 2(2): 75-81.
  - 7 Yamaza T, Miura Y, Bi Y, Liu Y, Akiyama K, Sonoyama W, *et al*. Pharmacologic stem cell based intervention as a new approach to osteoporosis treatment in rodents. PLoS One 2008; 3(7): e2615.
  - 8 Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Pham CG, Kuntzen C, Knabb JR, *et al*. The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. Cell Death Differ 2006; 13(5): 712-29.
  - 9 Shen HM, Pervaiz S. TNF receptor superfamily-induced cell death: Redox-dependent execution. FASEB J 2006; 20(10): 1589-98.
  - 10 Kudo O, Fujikawa Y, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T, Athanasou NA. Proinflammatory cytokine (TNFalpha/IL-1alpha) induction of human osteoclast formation. J Pathol 2002; 198(2): 220-7.
  - 11 Feng X, Feng G, Xing J, Shen B, Li L, Tan W, *et al*. TNF- $\alpha$  triggers osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via the NF- $\kappa$ B signaling pathway. Cell Biol Int 2013; 37(12): 1267-75.
  - 12 Huang H, Zhao N, Xu X, Xu Y, Li S, Zhang J, *et al*. Dose-specific effects of tumor necrosis factor alpha on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Cell Prolif 2011; 44(5): 420-7.
  - 13 Yang N, Wang G, Hu C, Shi Y, Liao L, Shi S, *et al*. Tumor necrosis factor  $\alpha$  suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. J Bone Miner Res 2013; 28(3): 559-73.
  - 14 Otto F, Thornell AP, Cropton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, *et al*. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell 1997; 89(5): 765-71.
  - 15 廖立, 杨晓红, 金岩. 骨髓间充质干细胞功能异常在雌激素所致骨质疏松发病过程中的作用研究. 创伤外科(Liao Li, Yang Xiaohong, Jin Yan. Effect of dysfunction of marrow-derived mesenchymal stem cells in osteoporosis caused by estrogen deficiency. Journal of Traumatic Surgery) 2012; 14(1): 60-5.