

guided antibiotic therapy: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Hosp Med*, 2013, 8(9): 530-540.

[25] 康彬, 孙静. 血清降钙素原对 AECOPD 抗生素应用的指导价值[J]. *临床肺科杂志*, 2014, 19(3): 426-428.

[26] Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, et al. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial [J]. *Lancet*, 2004, 363(949): 600-607.

[27] Stolz D, Christ-Crain M, Bingisser R, et al. Antibiotic treat-

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.23.048

ment of exacerbations of COFD: a randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy[J]. *Chest*, 2007, 131(1): 9-19.

[28] Schuetz P, Christ-Crain M, Thomann R, et al. Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections: the ProHOSP randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2009, 302(10): 1059-1066.

(收稿日期: 2015-02-08 修回日期: 2015-07-16)

## 雌激素诱导 BMSCs 成骨分化机制的研究进展

刘明曦 综述, 王亚军<sup>△</sup> 审校

(吉林大学第二医院骨科医院, 长春 130000)

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 雌激素; 成骨

[中图分类号] R816.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)23-3294-03

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMO) 是中老年女性的多发病、常见病, 严重影响患者的生活质量。PMO 是由于卵巢萎缩、功能下降, 雌激素水平降低引起成骨与破骨细胞功能失衡, 进而导致骨质丢失加速、骨脆性增加、骨强度减低的一种骨代谢性疾病。根据其发病机制, 临床上通过激素替代疗法 (hormone replacement therapy, HRT) 对 PMO, 已经获得了良好的效果。其中雌激素是 HRT 治疗的重要组成部分。雌激素具有广泛的生物学效应, 对细胞的迁移、增殖和分化均有影响。同时, 雌激素也是骨骼系统中重要的调节因子。有研究表明<sup>[1]</sup>, 雌激素可以诱导干细胞向成骨细胞分化, 进而影响骨重建过程。近年来, 雌激素通过调控干细胞成骨分化治疗骨质疏松的相关研究备受关注。

目前在组织工程领域应用较多的干细胞主要有两类, 即成体干细胞和胚胎干细胞。胚胎干细胞由于涉及伦理问题, 应用受到一定的局限。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是中胚层来源的成体干细胞, 因其具有取材方便、易于体外扩增等优势, 已成为组织工程重要的种子细胞。BMSCs 具有多向分化潜能, 在适当的条件下, BMSCs 可表现为成骨<sup>[2]</sup>、成软骨<sup>[3]</sup>、成肌<sup>[4]</sup>等方向的分化。

### 1 雌激素调控 BMSCs 成骨分化的机制

既往认为骨质疏松的发生主要是由于破骨细胞功能亢进, 使骨代谢处于高转换型的骨质丢失状态。但有学者认为, 破骨细胞功能的过度活化才是骨质疏松早期的主要影响因素, 当骨质疏松发展到后期时, 成骨细胞功能的下降起主要作用<sup>[5]</sup>。

雌激素是甾体类激素, 在人体主要由卵巢和肾上腺分泌产生。骨是雌激素作用的重要靶器官之一。雌激素对 BMSCs 具有促进成骨分化, 抑制成脂分化的作用, 且该作用具有一定的剂量依赖性<sup>[6]</sup>。BMSCs 的成脂与成骨分化存在着一种此消彼长、动态平衡的关系。绝经后妇女血清雌二醇水平下降, 使 BMSCs 成骨分化能力降低, 向脂肪细胞的分化增强, 同时由于破骨细胞功能过度活化的作用, 出现骨量减少和脂肪组织含量增高并存的情况。

**1.1 雌激素受体 (estrogen receptor, ER)** ER 属于核受体超家族, 是雌激素作用的直接对象。ER 包括 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  两种亚型。该两种亚型具有高度同源性, 在 ER $\alpha$  存在的情况下, ER $\beta$  可以抑制其表达过程。而在 ER $\alpha$  丧失时, ER $\beta$  可作为“替补”代替其某些功能。ER 广泛表达于多种细胞和组织, 与细胞的迁移、分化、增殖等过程息息相关。既往研究证实, BMSCs 表面亦存在 ER 的表达<sup>[7]</sup>。雌激素及其配体与 BMSCs 表面的 ER 发生特异性结合, 从而激活 ER $\alpha$  和 ER $\beta$ , 产生相应的生物学效应。雌激素与其受体的这种相互作用在女性成骨中具有关键性的作用。有研究表明<sup>[8]</sup>, 雌激素主要通过 ER $\alpha$  作用于 BMSCs, 增强其成骨活性。ER 是直接感知雌激素作用的靶蛋白, 也是整个雌激素成骨调控过程的起始点。ER 配体可以介导 ER、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路、骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) 和 Wnt 通路等形成信号网络, 共同作用于干细胞的成骨分化。因此, 多条成骨相关通路通过 ER 这个核心分子整合成为庞大而复杂的信号通路网络。

**1.2 骨形态发生蛋白 (BMPs)/Smad 通路** BMPs 属于转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor Beta, TGF- $\beta$ ) 超家族, 是一类与干细胞成骨分化密切相关的生长因子, 它的存在与 Smad 通路的激活密切相关。其中 BMP-2 具有很强的成骨诱导能力。有学者已证明 BMP-2 可以促进间充质干细胞的成骨分化<sup>[9]</sup>。雌激素可以通过刺激间充质干细胞合成 BMP-2, 进而促进其向成骨细胞分化<sup>[10]</sup>。BMPs 也可直接作用于 BMSCs 上的特异性跨膜丝/苏氨酸激酶受体, 激活 Smad 蛋白通路。外源性的药物刺激可通过诱导 Smad1、Smad5 和 Smad8 磷酸化水平升高, 促进 BMPs 信号的转导<sup>[11]</sup>。有研究发现, 人为诱导 BMP-2 mRNA 表达上调后, 成骨标志物碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、I 型胶原、骨钙素等均有升高, 矿化结节也有一定程度的增多, 细胞具有明显的成骨分化特征<sup>[12]</sup>。此外, BMP-4 也是对间充质干细胞有促成骨分化作用的细胞因子之一。Lambertini 等<sup>[13]</sup>发现, 雌激素也可以通过上调 BMP-4 对细胞的成骨分化起促进作用。

**1.3 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路** Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是骨代谢过程中一条重要的通路。Wnt 是一类富含 L-半胱氨酸的糖蛋白,该类蛋白可以促进前体成骨细胞的生长,并促进成骨细胞的早期分化<sup>[14]</sup>。新近研究表明,雌激素抑制细胞成脂分化,促进成骨分化的作用与 Wnt 通路的激活有关,这种作用具有剂量依赖性<sup>[15]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可以通过与 ER 相关通路的相互作用促进间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells, MPCs)的成骨分化<sup>[16]</sup>。BMSCs 是成骨细胞的前体细胞之一, $\beta$ -catenin 蛋白在成骨前体细胞的增殖、分化等生命活动中具有重要作用。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可以受 BMP-2 调控,其中  $\beta$ -catenin 蛋白对间充质干细胞成骨的促进作用是通过增强其对 BMP-2 的应答而完成的,且这种作用可以被 ER 阻断剂 ICI 182780、ER $\alpha$  敲除等方法所终止<sup>[17]</sup>。提示雌激素诱导成骨的信号通路并非是独立作用的,而是相辅相成、共同调控成骨过程。

**1.4 NO/NOS 信号通路** NO 可以调节成骨细胞功能,在成骨细胞分化过程中起重要作用。NO 的作用机制在于增加环磷酸鸟苷(cGMP)的含量,通过 cGMP 的作用加速成骨细胞的分化<sup>[18]</sup>。NOS 抑制剂 L-NMMA (NG-Monomethyl-L-arginine)可以通过抑制酶的活性阻断 NO 对成骨分化的刺激作用。既往有研究发现<sup>[19]</sup>,在 L-NMMA 作用下,17 $\beta$ -雌二醇诱导的 ALP 升高、矿化小结形成增多等现象均未出现。在内皮型一氧化氮合酶(endothelial NO synthase, eNOS)基因缺陷的小鼠,其成骨细胞对雌激素刺激不产生反应。说明在 NO/NOS 信号通路,雌激素可能是通过调节 NOS 对 NO 的敏感性,放大 NO 作用,从而对成骨产生促进作用。此外,Fukumoto 等<sup>[20]</sup>还发现,17 $\beta$ -雌二醇也可直接增加组织中 NO 的含量,这可能也是其调节 NO/NOS 通路、促进成骨的机制之一。

**1.5 MAPK 信号通路** MAPK 信号通路广泛存在于细胞分化、发育等生命活动中,是细胞内调控力学-生化转导过程的重要通路。在力学刺激诱导成骨方面研究较多。MAPK 通路包括 p38MAPK、细胞外信号调节激酶(extracellular-signal regulated kinase, ERK1/2)和 c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK),三者均参与了 BMSCs 的成骨分化过程,其中 P38 主要对细胞的分化起作用,而 ERK 主要影响细胞的增殖活动<sup>[21]</sup>。Liao 等<sup>[22]</sup>发现,金雀异黄酮(genistein)具有类似于 17 $\beta$ -雌二醇的作用,在其诱导 ER $\alpha$  基因表达的过程中,存在 MAPK 的激活,并可观察到成骨细胞分化特征性基因的表达升高及矿化作用的增强。另有研究发现<sup>[23]</sup>,淫羊藿苷也具有雌激素样作用,其作用于 ER,激活 ERK 和 JNK 通路,从而诱导成骨分化。相似的,葛根素也可促进成骨分化,并诱导 ALP 和 I 型胶原表达,葛根素的这种作用可以被 ER 拮抗剂 ICI 182780 和 P38MAPK 拮抗剂 SB203580 所阻断<sup>[24]</sup>,提示葛根素也可以直接作用于 ER,其诱导分化的作用于 P38 的激活有关。Niu 等<sup>[25]</sup>发现, BMP-2 诱导成骨分化存在着 P38 和 ERK1/2 通路的激活,这也从另一方面证实了雌激素诱导 BMSCs 的成骨分化中的各条通路相互交叉、相辅相成的关系。

## 2 雌激素在诱导成骨分化过程中的量-效和时-效关系

雌激素在促进成骨分化过程中的量-效与时-效关系是研究的重要方面。有学者对雌激素干预后 BMSCs 的钙盐沉积及成骨基因 RUNX2 和 OCN 等进行检测发现,雌激素对 BMSCs 的成骨促进作用在低剂量范围内具有剂量依赖性,该作用在雌二醇浓度为  $1 \times 10^{-9}$  mol/L 时最为明显<sup>[26]</sup>。但单次给药的雌激素作用于细胞的时间较短,难以维持稳定的浓度,从而影响其成骨促进作用,这可能与雌激素本身的药理作用、半衰

期等有关。为了解决维持雌激素作用浓度的相关问题,Hong 等<sup>[27]</sup>采用聚乳酸-聚乙醇酸共聚物制备了负载雌二醇的缓释颗粒,该颗粒能够维持雌二醇稳定释放时长为 7 d。将该颗粒运用于实验中能够为干细胞营造稳定浓度雌激素的微环境,较单次给药更符合体内的生长环境,因而实验结果也更为可靠。

## 3 结 语

雌激素作为 HRT 治疗的一部分,已经广泛应用于女性 PMO 的治疗,并已取得了良好的临床效果。对于雌激素促进 BMSCs 成骨分化的机制研究,目前已经发现了 BMPs/Smad、Wnt/ $\beta$ -catenin、NO/NOS 和 MAPK 等多条信号通路,ER 作为药物作用的起始靶蛋白,整合了这些错综复杂的信号通路,形成了复杂而有序的信号通路网络。雌激素对成骨的促进作用已被许多学者证实,但在雌激素的应用过程中仍存在着一些问题:(1)既往文献中雌激素对 BMSCs 的干预大部分采用单次刺激的方法,微环境中雌激素浓度难以维持稳定,如何采取措施维持刺激浓度的稳定,是该研究领域的一个重要课题;(2)在实验设计中,雌激素浓度梯度的设置比较粗略,通常是以数量级来进行划分,而精确的最适浓度鲜有文献报道,且实验进程中雌激素的实际干预浓度易受操作过程、药品存放条件等外界因素影响,如何使干预过程标准化,仍需要进一步摸索;(3)采用体外实验研究雌激素对 BMSCs 的成骨促进作用具有一定的局限性。BMSCs 体内移植后受到体内复杂环境的影响,如何控制其分化方向,雌激素在体内应用的安全性、可控性,都是有待解决的问题。

综上所述,研究雌激素对于这些通路的作用,探讨其深层机制,解决干细胞移植治疗中的一些实际问题,将为雌激素治疗骨质疏松症等疾病提供可靠指导,也将为其他骨相关疾病的治疗奠定理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] Matsumoto Y, Otsuka F, Takano-Narazaki M, et al. Estrogen facilitates osteoblast differentiation by upregulating bone morphogenetic protein-4 signaling[J]. *Steroids*, 2013, 78(5):513-520.
- [2] Zou J, Yuan C, Wu C, et al. The effects of platelet-rich plasma on the osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Connect Tissue Res*, 2014, 55(4):304-309.
- [3] Roeder E, Henrionnet C, Goebel JC, et al. Dose-response of superparamagnetic Iron oxide labeling on mesenchymal stem cells chondrogenic differentiation: a multi-scale in vitro study[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e98451.
- [4] Supokawej A, Kheolamai P, Nartprayut K, et al. Cardiogenic and myogenic gene expression in mesenchymal stem cells after 5-azacytidine treatment[J]. *Turk J Haematol*, 2013, 30(2):115-121.
- [5] Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(12):3318-3325.
- [6] Gao B, Huang Q, Lin YS, et al. Dose-dependent effect of estrogen suppresses the osteo-adipogenic transdifferentiation of osteoblasts via canonical Wnt signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e99137.
- [7] Zhang M, Chen FM, Wang AH, et al. Estrogen and its receptor enhance mechanobiological effects in compressed bone mesenchymal stem cells[J]. *Cells Tissues Organs*,

- 2012,195(5):400-413.
- [8] Chen FP, Hu CH, Wang KC. Estrogen modulates osteogenic activity and estrogen receptor mRNA in mesenchymal stem cells of women[J]. *Climacteric*, 2013, 16(1): 154-160.
- [9] Xu S, Lin J, Liu W, et al. Osteodifferentiation of bone marrow mesenchymal stem cells after transfected by lentiviral vector mediated bone morphogenetic protein 2[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2013, 27(11):1380-1385.
- [10] Zhou S, Turgeman G, Harris SE, et al. Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(1):56-66.
- [11] Lv H, Huang X, Jin S, et al. Strontium ranelate promotes osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells through bone morphogenetic protein-2/Smad signaling pathway[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2013, 33(3):376-381.
- [12] Toom A, Arend A, Gunnarsson D, et al. Bone formation zones in heterotopic ossifications; histologic findings and increased expression of bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factors beta2 and beta3[J]. *Calcif Tissue Int*, 2007, 80(4):259-267.
- [13] Lambertini E, Penolazzi L, Aquari G, et al. Osteoblastic differentiation induced by transcription factor decoy against estrogen receptor alpha gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(3):761-770.
- [14] Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, et al. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop[J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(10):1842-1853.
- [15] Colaianni G, Brunetti G, Faienza MF, et al. Osteoporosis and obesity; role of Wnt pathway in human and murine models[J]. *World J Orthop*, 2014, 5(3):242-246.
- [16] Gao Y, Huang E, Zhang H, et al. Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -catenin and estrogen receptor signaling synergistically promotes osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e82436.
- [17] Armstrong VJ, Muzylak M, Sunter A, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(28):20715-20727.
- [18] Saura M, Tarin C, Zaragoza C. Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblast differentiation and proliferation during bone development [J]. *Scientific World J*, 2010(10):624-632.
- [19] O'shaughnessy MC, Polak JM, Afzal F, et al. Nitric oxide mediates 17 beta-estradiol-stimulated human and rodent osteoblast proliferation and differentiation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277(3):604-610.
- [20] Fukumoto T, Tawa M, Yamashita N, et al. Protective effects of 17 beta-estradiol on post-ischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow through the non-genomic estrogen receptor/nitric oxide-mediated pathway in the rat heart[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 699(1/3):74-80.
- [21] Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, et al. Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation[J]. *Bone*, 2002, 30(1):91-98.
- [22] Liao MH, Tai YT, Cherng YG, et al. Genistein induces oestrogen receptor- $\alpha$  gene expression in osteoblasts through the activation of mitogen-activated protein kinases/NF- $\kappa$ B/activator protein-1 and promotes cell mineralisation[J]. *Br J Nutr*, 2014, 111(1):55-63.
- [23] Song L, Zhao J, Zhang X, et al. Icaritin induces osteoblast proliferation, differentiation and mineralization through estrogen receptor-mediated ERK and JNK signal activation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 714(1/3):15-22.
- [24] Wang PP, Zhu XF, Yang L, et al. Puerarin stimulates osteoblasts differentiation and bone formation through estrogen receptor, p38 MAPK, and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14(9):897-905.
- [25] Niu Y, Li Y, Huang H, et al. Asperosaponin VI, a saponin component from *Dipsacus asper* wall, induces osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway[J]. *Phytother Res*, 2011, 25(11):1700-1706.
- [26] 朱晓斐, 王飏, 金岩, 等. 雌激素剂量依赖性促进小鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(19):3433-3437.
- [27] Hong L, Krishnamachari Y, Seibold D, et al. Intracellular release of 17- $\beta$  estradiol from cationic polyamidoamine dendrimer surface-modified poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles improves osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(3):319-325.

(收稿日期:2015-02-08 修回日期:2015-07-28)

## 更正

本刊 2015 年 44 卷 20 期 2774 页,第一作者“冉坤”文章“帕珠沙星与左氧氟沙星治疗老年葡萄球菌下呼吸道感染的对比研究”。现将该文通讯作者更正为:通讯作者“杨辉”,共同通讯作者“陶勇”。

特此更正!

《重庆医学》编辑部  
二〇一五年七月三十日