

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.10.012

Periostin 表达上调对去势大鼠骨髓间充质干细胞生物学行为的作用 *

周维维 李豆豆 张洁云 刘思麟 李春绒 曹 猛[△](军事口腔医学国家重点实验室, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 陕西省口腔疾病临床医学研究中心,
第四军医大学口腔医院正颌科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探究 Periostin(骨膜蛋白)表达上调对雌性去势大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化、细胞增殖与凋亡特性的作用。**方法:**通过去势手术建立雌性大鼠骨质疏松模型,待建模成功后分离培养并鉴定 BMSCs,利用含有增强型绿色荧光蛋白(EGFP)和大鼠 Periostin 基因的重组慢病毒转染 P3 代 BMSCs,成骨诱导后鉴定其成骨分化能力改变,流式细胞仪检测其细胞周期以及细胞凋亡率的变化。**结果:**成功建立骨质疏松模型;荧光显微镜下观察到绿色荧光提示慢病毒载体实现转染并表达目的蛋白;慢病毒转染组 BMSCs 成骨诱导后 ALP 及茜素红染色较去势组 BMSCs 染色加深;慢病毒转染组 BMSCs 的 S 期细胞比例为 $(17.07 \pm 0.56)\%$,显著高于去势组 BMSCs 的 S 期细胞比例 $(8.42 \pm 0.02)\%$,差异具有统计学意义($P < 0.05$);慢病毒转染组 BMSCs 的细胞凋亡率为 $(7.3 \pm 0.1)\%$,显著低于去势组 BMSCs 的凋亡率 $(12.05 \pm 0.55)\%$,其差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**Periostin 表达上调可提高去势骨髓间充质干细胞的成骨分化及细胞增殖能力,并对其凋亡有抑制作用。

关键词:Periostin;绝经后骨质疏松症;骨髓间充质干细胞;成骨分化

中图分类号:R-33; R331.2; R780.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)10-1864-06

The Effect of Periostin Expression up-regulation on the Biological Behaviors of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Ovariectomized Rats*

ZHOU Wei-wei, LI Dou-dou, ZHANG Jie-yun, LIU Si-lin, LI Chun-rong, CAO Meng[△](State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases
& Shaanxi Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Orthodontics, School of Stomatology,
The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of Periostin up-regulation on osteoblastic differentiation, cell proliferation and apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in ovariectomized rats. **Methods:** An ovariectomized animal model was established by castrated surgery. Then BMSCs were separated, cultured and identified. BMSCs of P3 generation were transfected by recombinant lentivirus which have enhanced green fluorescent protein (EGFP) and rat Periostin gene. The osteoblastic differentiation ability were determined after osteoblastic induction. The cell cycle and cell apoptosis of BMSCs were detected by means of flow cytometry instrument. **Results:** The ovariectomized animal model was established successfully. Green fluorescence under fluorescence microscope indicated that lentivirus vector had been transfected and expressed the target protein. ALP and alizarin red staining of BMSCs in lentivirus transfection group after osteoblastic induction were deeper than that in castrated group. The proportion of s-phase cells in lentivirus transfected group was $(17.07 \pm 0.56)\%$, significantly higher than that in castrated group $(8.42 \pm 0.02)\%$, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The apoptosis rate of BMSCs in lentivirus transfected group was $(7.3 \pm 0.1)\%$, significantly lower than that in castrated-group $(12.05 \pm 0.55)\%$, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions:** Periostin up-regulation could improve osteoblastic differentiation and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), and inhibit apoptosis.

Key words: Periostin; Postmenopausal osteoporosis; BMSCs; Osteoblastic differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; R780.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)10-1864-06

前言

绝经后骨质疏松症 (Postmenopausal Osteoporosis, PMO)是妇女绝经后卵巢功能下降所引发的雌激素分泌减少,进而影响

骨代谢,导致的严重骨丢失疾病。PMO 常见的口腔并发症为慢性牙周炎,有研究证实,机体的雌激素水平不仅影响全身的骨代谢,对牙周组织局部的功能和代谢也产生直接影响^[1,2]。雌激素替代疗法作为传统的治疗手段对于抑制骨吸收有一定的作用,

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81470774)

作者简介:周维维(1992-),硕士研究生,主要研究方向:口腔正畸临床工作以及牙周成骨方面研究,E-mail: zhouweiwei916@163.com

[△] 通讯作者:曹猛(1974-),硕士生导师,副教授,主要研究方向:口腔颌面科学正畸牙移动过程中生物学原理方面研究,

E-mail: caomeng@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2019-01-22 接受日期:2019-02-27)

但其长期使用可致患者罹患乳腺及生殖系统肿瘤风险增加^[3]。

研究表明,颌骨髓内的间充质干细胞(BMSCs)可经过血管通道进入牙周组织,分化为牙周前体细胞并参与牙周组织的再生^[4]。对于绝经后骨质疏松骨髓间充质干细胞(PMO-BMSCs)^[5]和炎症状态的牙周膜干细胞(P-PDLSCs)^[6]的相关研究证实,其骨向分化能力出现明显下降,且诱导成骨过程中细胞凋亡增加,这可能是引起骨质疏松及牙周骨组织缺损的重要原因。

Mamalis 等人研究发现,雌激素及其受体(ER)主要通过调控 Periostin(骨膜蛋白)的表达来参与牙周组织的代谢和功能改建^[7]。大量研究证实,Periostin 还能够通过介导整合素依赖的细胞增殖、粘附和运动,保护细胞降低低氧引起的细胞损伤,并抑制细胞凋亡。然而,Periostin 能否改善 PMO-BMSCs 的生物学功能,未见相关报道。为此,本实验拟借助慢病毒载体系统,将携带 Periostin 目的基因的慢病毒转染 PMO-BMSCs,通过上调 Periostin 的表达,初步探讨 Periostin 对 PMO-BMSCs 的生理功能的调节作用,从而为伴有绝经后骨质疏松牙周病的干细胞治疗提供更多的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 实验动物 自空军军医大学实验动物中心购入 6 周龄 SD 大鼠(体重约 180 g)30 只,均为雌性,统一放入空军军医大学口腔医院动物实验中心培养(已经过实验动物伦理审查),SPF 级饲养环境,许可证号:SCXK(陕)2014-002。

1.1.2 实验试剂和仪器 α -MEM 培养基、胎牛血清、双抗(青霉素 100 U/L、链霉素 100 g/L)、PBS 缓冲液、 β -甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸、慢病毒载体(吉凯基因)、BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒(康为世纪)、茜素红染色试剂盒、细胞周期检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒、显微 CT (micro-CT)(Siemens, 德国)、CO₂ 恒温细胞培养箱(Thermo, 美国)、流式细胞仪(Beckman Coulter, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 雌性去势大鼠骨质疏松模型的构建与评估 大鼠适应性喂养一周后,随机分为 A、B 两组进行建模,A 组为去势组(OVX),B 组为假手术组(SHAM),经腹腔注射 1%浓度的戊巴比妥钠全身麻醉后,备皮处理,采用改良背部中间单切口,钝性分离皮下组织,找到输卵管后逆行找到一紫红色菜花状不规则组织团块,即为卵巢,OVX 组大鼠结扎输卵管及血管后切除卵巢,SHAM 组大鼠仅去除卵巢周围等量脂肪即可。相同条件下饲养三个月后,麻药过量处死大鼠,75%酒精浸泡消毒 10 分钟后,无菌条件下取其股骨进行浸泡于 4%多聚甲醛溶液中固定,48 h 后扫描 Micro-CT,三维重建后评估建模是否成功,并对相关骨形态学参数进行分析。

1.2.2 BMSCs 的分离、培养与鉴定 取上述处死并消毒大鼠,无菌条件下分离剩余股骨、胫骨及肱骨,彻底去除骨周围软组织后 PBS 缓冲液冲洗 3 次,剪断骨骺端暴露骨髓腔,用含 10%胎牛血清及 1%双抗的 α -MEM 培养基反复冲洗骨髓腔,吹打细胞悬液后转移至塑料细胞培养瓶中,放入 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞孵箱静置培养,待 48 h 后半定量换液,并在显微镜

下观察细胞贴壁情况,随后每 2~3d 更换培养基,观察细胞形态及生长情况,拍照记录。细胞生长至 90%以上时,及时消化传代。流式细胞仪检测第三代 BMSCs 干细胞表面标记物 CD29、CD34、CD45、CD90。

1.2.3 慢病毒转染 感染预实验确定慢病毒感染 BMSCs 的复感染指数(MOI)和最佳感染条件。取第三代 OVX 组 BMSCs,根据预实验结果进行正式转染,感染约 72 小时后,荧光表达丰度较高时,用荧光显微镜观察感染效率,并进行后续实验(OVX-Virus 组)。

1.2.4 成骨诱导与鉴定 选取第三代 SHAM 组、OVX 组 BMSCs, 2×10^5 孔接种于六孔板,待细胞汇集至 80%左右时换成成骨诱导液(含 10%胎牛血清及 1%双抗的 α -MEM 培养基中加入 10 mmol/L β -甘油磷酸钠、0.1 μ mol/L 地塞米松、0 μ mol/L 抗坏血酸);选取慢病毒感染成功的 OVX-Virus 组细胞,待细胞汇集至 80%左右时换成成骨诱导液。三组成骨诱导细胞每 3 d 更换新成骨诱导液,诱导 7 d 后,用 BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色法进行 ALP 染色;诱导 21 d 后,使用茜素红染色液染色,镜下观察比较各组细胞成骨钙化结节形成情况。

1.2.5 流式细胞仪检测各组 BMSCs 的细胞周期 选取第三代 SHAM 组、OVX 组 BMSCs,以及 OVX-Virus 组 BMSCs,分别消化三组细胞,PBS 洗涤细胞 1 次(离心 2000 rpm, 5 min),收集并调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,各取 1 mL 单细胞悬液,离心弃上清,加入 3 mL 70%冷乙醇固定,制成单细胞悬液,使用流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.6 流式细胞仪检测各组 BMSCs 的细胞凋亡率 选取第三代 SHAM 组、OVX 组 BMSCs,以及 OVX-Virus 组 BMSCs,分别消化三组细胞(使用不含 EDTA 的胰酶),PBS 洗涤细胞 2 次(离心 2000 rpm, 5 min),收集并调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,各取 1 mL 单细胞悬液,离心弃上清,加入 2.5 mL 含血清培养基,制成单细胞悬液,使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3 统计学分析

各组实验数据使用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS17.0 软件进行统计学数据分析,多组间的比较采用单因素方差分析,组间两两的比较采用非配对 t 检验。

2 结果

2.1 去势大鼠模型的评估及相关参数分析

建模 3 个月后处死 SHAM 组及 OVX 组大鼠,股骨 Micro-CT 扫描结果显示,OVX 组松质骨骨小梁数目明显减少,密度降低,松质骨内间隙增宽。骨形态学参数分析,OVX 组大鼠骨体积分数(Bone Volume/Total Volume, BV/TV)为 $(0.18 \pm 0.02)\%$,显著低于 SHAM 组大鼠 $(0.62 \pm 0.02)\%$,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$)。以上所有结果说明雌性去势大鼠骨质疏松模型建模成功。见图 1、图 2。

2.2 BMSCs 形态学观察及其干细胞特性鉴定

显微镜下观察,原代培养 BMSCs 呈现集落样生长,可见细胞自各集落向四周伸展,细胞形态较多样,分布不均,但以梭形细胞为主。传代后细胞形态逐渐单一,呈梭形或多边形,分布均匀,旋涡状生长,高倍镜下可见细胞以突触相联系。

流式细胞术干细胞表面标志物检测结果显示,实验所提取

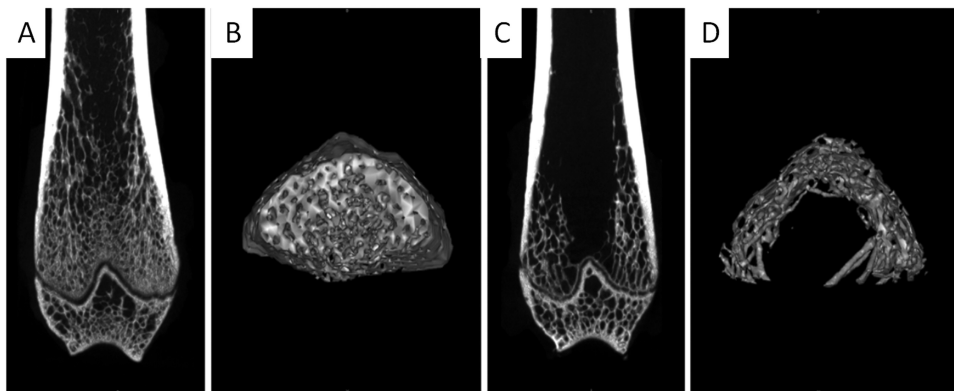


图 1 两组大鼠股骨 Micro-CT 扫描结果比较

Fig.1 Comparison of Micro-CT results of the femur among the two groups

Note: A, B are the results of group SHAM; C, D are the results of group OVX.

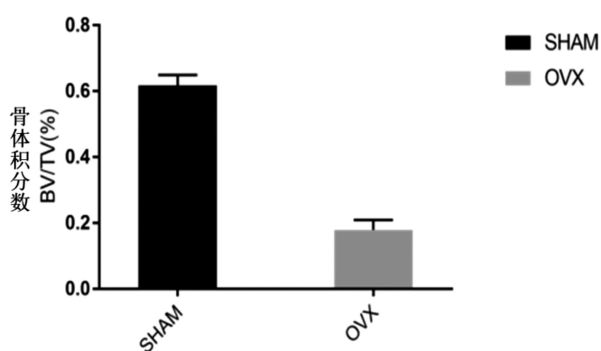


图 2 骨形态学参数分析比较

Fig.2 Comparison of analysis of bone morphological parameters among the two groups

细胞表面高表达 CD29 和 CD90, 很少甚至不表达 CD34 和 CD45, 符合骨髓间充质干细胞的免疫学特征。见图 3。

2.3 慢病毒转染评估

根据慢病毒转染感染条件及 MOI 的选择原则, 预实验结果确定本实验所用 BMSCs 的 MOI=70, 感染条件为常规培养基 + Polybrene, 感染后 8 h 换回常规培养基继续培养。感染约 72 h 后, 荧光显微镜观察增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 绿色荧光的表达, 感染效率 80% 左右, 且细胞生长良好, 既可做后续实验。见图 4。

2.4 各组 BMSCs 的成骨分化能力鉴定

三组细胞经成骨诱导 7d 后, BCIP/NBT 碱性磷酸酶染色结果显示, OVX 组较 SHAM 组 ALP 着色少, 但 OVX-Virus 组 ALP 染色较 OVX 组明显增强; 成骨诱导 21d 后, 茜素红染色结果显示, OVX 组较 SHAM 组钙化结节数目少, 但 OVX-Virus 组较 OVX 组钙化结节数目增多。见图 5、图 6。

2.5 Periostin 表达上调对雌性去势大鼠 BMSCs 细胞周期的作用

流式细胞术细胞周期检测结果显示, OVX 组 BMSCs 的 S 期细胞比例为 $(8.42 \pm 0.02)\%$, 低于 SHAM 组 BMSCs 的 S 期细胞比例 $(18.6 \pm 0.24)\%$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); OVX-Virus 组 BMSCs 的 S 期细胞比例为 $(17.07 \pm 0.56)\%$, 显著高于去势组 BMSCs 的 S 期细胞比例 $(8.42 \pm 0.02)\%$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 7。

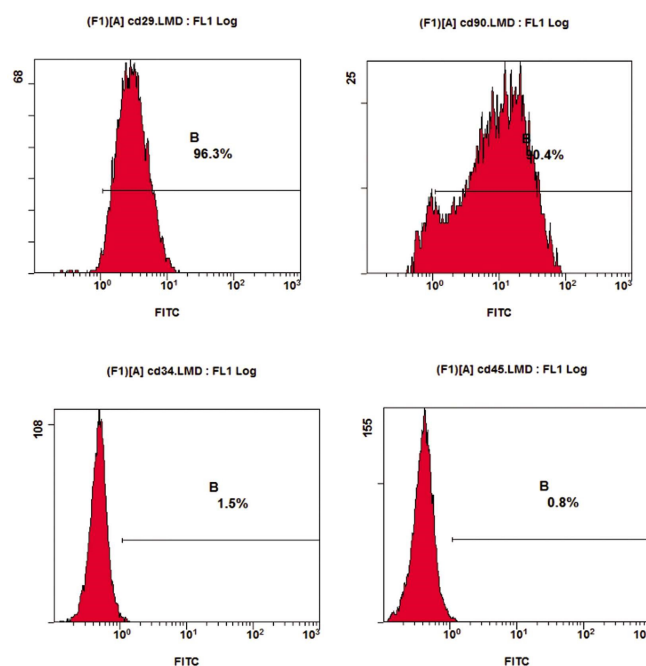


图 3 BMSCs 表面免疫标志物的表达

Fig.3 The expression of surface immune markers on BMSCs

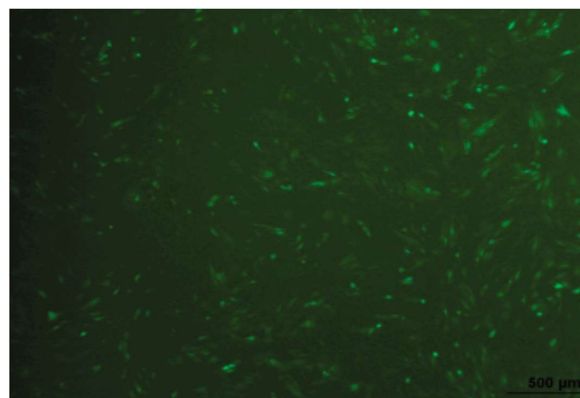


图 4 病毒转染 72h 后荧光显微镜下绿色荧光表达

Fig.4 The Green fluorescence expression under fluorescence microscope on BMSCs, which transfected by virus 72 hours later

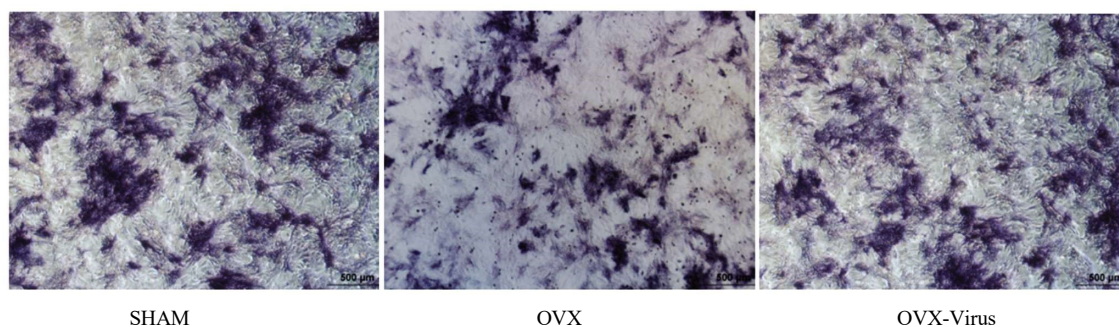


图 5 三组细胞成骨诱导 7d ,ALP 染色结果比较

Fig.5 Comparison of ALP staining results after osteogenic induction for 7d among different groups

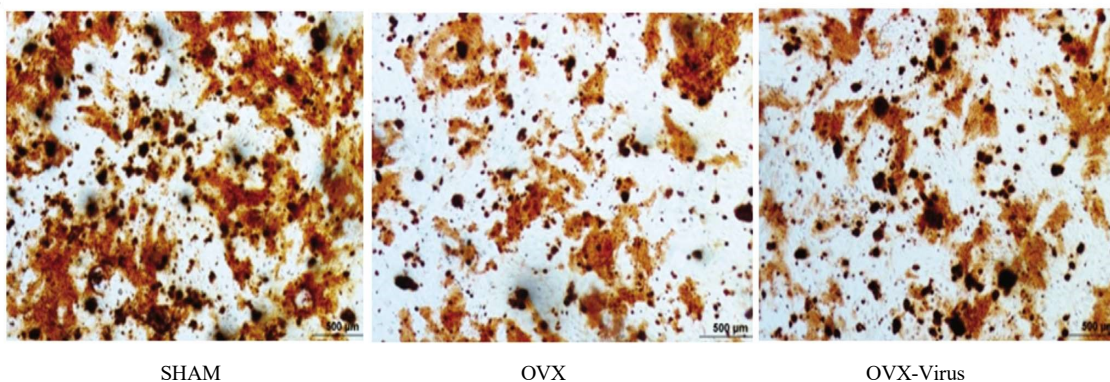


图 6 三组细胞成骨诱导 21d 茜素红染色结果比较

Fig.6 Comparison of alizarin red staining results after osteogenic induction for 21d among different groups

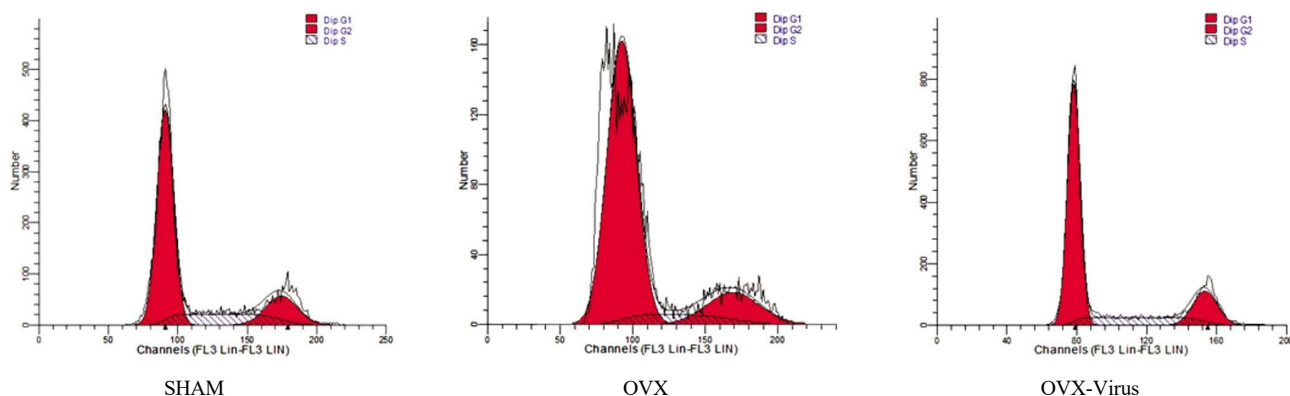


图 7 三组细胞流式细胞术细胞周期检测结果比较

Fig.7 Comparison of results of cell cycle detection by flow cytometry among different groups

2.6 Periostin 表达上调对雌性去势大鼠 BMSCs 细胞凋亡率的作用

流式细胞术细胞凋亡率检测结果显示,OVX 组 BMSCs 的细胞凋亡率为 $(12.05 \pm 0.55)\%$, 高于 SHAM 组 BMSCs 的细胞凋亡率 $(8.4 \pm 0.9)\%$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); OVX-Virus 组 BMSCs 的细胞凋亡率为 $(7.3 \pm 0.1)\%$, 显著低于去势组 BMSCs 的凋亡率 $(12.05 \pm 0.55)\%$, 其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。图 8。

3 讨论

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)是女性绝经后雌激素的合成与分泌降低,造成的机体骨改建平衡

失调的一种常见病多发病,其常表现为骨密度降低,骨组织代谢紊乱以及骨脆性增加^[8]。研究表明,50 岁以上的中年女性约有一半以上患有骨质疏松,随着老年人口的快速增长,骨质疏松及其引起的病理性骨折的发生率逐年增长^[9],在世界范围内,其发生率每五年约增长 18%,严重影响了中老年女性的身体健康及生活质量,增加了整个社会 and 患者家属的经济和人力负担^[10]。PMO 常见的口腔并发症为慢性牙周炎,是导致慢性牙周炎持续加重的重要危险因素,临床常表现为进行性发展的牙槽骨组织吸收破坏及牙周附着组织的丧失,口腔临床治疗难度大大增加^[11]。

切除双侧卵巢建立的去势大鼠骨质疏松模型,与绝经后骨质疏松症的病理变化相似,且造模方式简单易行,模型质量稳

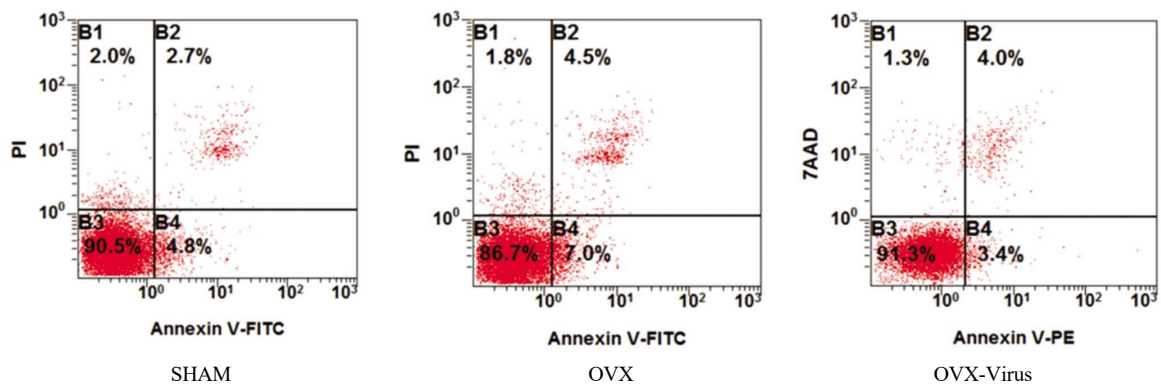


图8 三组细胞流式细胞术细胞凋亡率检测结果比较

Fig.8 Comparison of results of cell apoptosis rate by flow cytometry among different groups

定,可复制性好,基于这些优点,使其成为了研究骨质疏松症相关骨病的经典动物模型^[12,13]。本实验使用该方式建立动物骨质疏松模型,经 Micro-CT 扫描,三维重建并分析骨形态学参数,模型大鼠骨密度显著下降,证明模型建造成功。

骨髓间充质干细胞(BMSCs)由中胚层分化而来,具有强大的增殖扩增和多向分化潜能的一种干细胞^[14],其来源方便,易于分离培养。另外,BMSCs 具有易受外源基因转染且表达相对稳定,体外增殖迅速,免疫原性低等特点^[15]。在特定诱导条件下,BMSCs 可分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、基质细胞、神经母细胞等细胞系。因此,骨髓间充质干细胞成为了临床应用干细胞治疗的重要种子细胞之一^[16]。对于绝经后骨质疏松骨髓间充质干细胞(PMO-BMSCs)相关研究证实,其成骨和增殖能力均减弱^[17],本实验 OVX 组 BMSCs 的成骨能力低于 SHAM 组,其细胞凋亡率显著高于 SHAM 组细胞,S 期细胞比例低于 SHAM 组,与前期研究一致。

绝经后卵巢功能低下从而引起的雌激素缺乏被认为是绝经后骨质疏松的重要原因^[18]。雌激素通过雌激素受体(ER)直接作用于成骨细胞和破骨细胞,导致骨吸收和骨形成失衡,骨量和骨密度降低,骨脆性增加,从而发生骨质疏松^[19]。雌激素水平下降和 ER 在骨组织的表达降低是其重要的发病机制之一^[20]。ER 在成骨和破骨细胞中均表达,雌激素通过调控 ER 来刺激成骨细胞的形成,抑制破骨细胞的活性,从而实现骨平衡的调节^[21]。雌激素替代疗法被认为是治疗 PMO 的首选治疗方式,可以抑制典型的月经暂停症状并预防骨质疏松症,但其副作用如乳腺癌、子宫内膜癌、心血管意外引起人们的担忧^[22,23]。

Periostin 首次从 MC3T3-E1 成骨细胞系分离出来时,被命名为成骨细胞特异性因子 2(osteoblast-specific factor 2, OSF-2)^[24],后来由于其在骨膜和牙周组织的特异定位表达而被更名为 Periostin^[25,26]。Periostin 主要由成骨细胞以及其前体细胞合成和分泌,有些成纤维细胞也分泌 Periostin,并在成年哺乳动物的骨骼和心脏瓣膜中表达^[27]。Periostin 是一种黏附分子,通过与细胞表面受体结合,以促进成骨细胞的增殖分化、黏附聚集。小鼠骨生物学研究表明,Periostin 通过改变胶原交联(尤其在皮质部位)和刺激骨保护素生成来调节成骨活动、骨改建等^[28]。在炎症微环境下,成骨细胞、牙周膜细胞 Periostin 表达显著降低;Periostin 的缺失型突变可直接导致骨质疏松和牙周结构紊乱^[29]。新近研究发现,Periostin 的表达与雌激素及其受体(ER)

的调控有关。因此,围绕 Periostin 设计的牙周再生策略^[30],将有望成为治疗 PMO 相关牙周炎的全新手段。

基因治疗(Gene Therapy)是指将目的基因导入靶细胞,以纠正或补偿基因缺陷或异常引起的疾病。其作为一种特异性高的治疗手段,已成为治疗遗传病、肿瘤等的有效方法,是当今生命科学领域的研究热点之一。慢病毒载体来源于人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1),其优点是操作相对简单,致病性低且相对容易生产^[31]。本实验借助慢病毒载体系统,将携带 Periostin 基因的慢病毒转染 PMO-BMSCs,上调 Periostin 的表达,使得去势组骨髓间充质干细胞恢复一定的成骨能力,同时 S 期细胞比例增多,细胞凋亡率减低,提高了 BMSCs 的存活率。我们推测,通过上调 Periostin 的表达,可改善去势骨髓间充质干细胞的生理功能,但其具体机制仍需更为深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Pan F, Zhang R, Wang G, et al. Oestrogen receptors are involved in the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells [J]. Bioscience Reports, 2011, 31(2): 117-124
- [2] Wang Q, Yu J, Zhai H, et al. Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 347(1): 117-123
- [3] Marjoribanks J, Farquhar C, Roberts H, et al. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women (Review) [J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017, 1: 1469-493x
- [4] Hughes F J, Turner W, Belibasakis G, et al. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation [J]. Periodontology 2000, 2006, 41(1): 48-72
- [5] Padial-Molina M, Volk S L, Rodriguez J C, et al. Tumor Necrosis Factor- α and Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharides Decrease Periostin in Human Periodontal Ligament Fibroblasts [J]. Journal of Periodontology, 2013, 84(5): 694-703
- [6] Liu Y, Liu W, Hu C, et al. MiR-17 Modulates Osteogenic Differentiation Through a Coherent Feed-Forward Loop in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Periodontal Ligaments of Patients with Periodontitis [J]. STEM CELLS, 2011, 29(11): 1804-1816
- [7] Mamalis A, Markopoulou C, Lagou A, et al. Oestrogen regulates proliferation, osteoblastic differentiation, collagen synthesis and periostin gene expression in human periodontal ligament cells through oestrogen receptor beta [J]. Archives of Oral Biology, 2011,

56(5): 446-455

- [8] J A Kanis, the WHO Study Group. Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis: Synopsis of a WHO Report[J]. *Osteoporosis Int*, 1994, 4: 368-381
- [9] Pfeifer M, Kohlwey L, Begerow B, et al. Effects of Two Newly Developed Spinal Orthoses on Trunk Muscle Strength, Posture, and Quality-of-Life in Women with Postmenopausal Osteoporosis[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2011, 90(10): 0894-9115
- [10] Itabashi A, Yoh K, Chines A A, et al. Bridging analysis of the efficacy and safety of bazedoxifene in Japanese and global populations of postmenopausal women with osteoporosis [J]. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2015, 33(1): 61-72
- [11] Pepelassi E, Nicopoulou-Karayianni K, Archontopoulou A D, et al. The relationship between osteoporosis and periodontitis in women aged 45-70 years[J]. *Oral Diseases*, 2012, 18(4): 353-359
- [12] Dempster D W, Birchman R, Xu R, et al. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy[J]. *Bone*, 1995, 16(1): 157-161
- [13] Komori T. Animal models for osteoporosis [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 759: 287-294
- [14] Jie-mei G L W H. The efficacy and safety of weekly 35-mg risedronate dosing regimen for Chinese postmenopausal women with osteoporosis or osteopenia: 1-year data [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2015, 36(7): 841-846
- [15] Qiu J, Huang G, Chen L. MicroRNA-214-5p/TGF- β /Smad2 signaling alters adipogenic differentiation of bone marrow stem cells in postmenopausal osteoporosis [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(5): 6301-6310
- [16] Phinney D G, Prockop D J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair-Current Views [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (11): 2896-2902
- [17] Yan J, Liu H J, Li H, et al. Circulating periostin levels increase in association with bone density loss and healing progression during the early phase of hip fracture in Chinese older women [J]. *Osteoporosis International*, 2017, 28(8): 2335-2341
- [18] Das S, Crockett J C. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment [J]. *Drug design, development and therapy*, 2013, 7: 435-448
- [19] Xu B, Lovre D, Mauvais-Jarvis F. Effect of selective estrogen receptor modulators on metabolic homeostasis [J]. *Biochimie*, 2016, 124: 92-97
- [20] Liu Y, Wang X, Chang H, et al. Mongolian Medicine echinops prevented postmenopausal osteoporosis and induced ER/AKT/ERK pathway in BMSCs[J]. *BioScience Trends*, 2018, 12(3): 275-281
- [21] Sjögren K, Lagerquist M, Moverare-Skrtic S, et al. Elevated Aromatase Expression in Osteoblasts Leads to Increased Bone Mass Without Systemic Adverse Effects [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2009, 24(7): 1263-1270
- [22] Nagai S, Ikeda K, Horie-Inoue K, et al. Estrogen signaling increases nuclear receptor subfamily 4 group A member 1 expression and energy production in skeletal muscle cells [J]. *Endocrine Journal*, 2018, 1348-4540
- [23] Morris Notelovitz, MD, PhD. Estrogen Therapy and Osteoporosis : principles & practice [J]. *The American Journal Of The Medical Sciences*, 1997, 313(1): 2-12
- [24] Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, et al. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I [J]. *Biochemical Journal*, 1993, 294 (1): 271-278
- [25] Bonnet N, Garnero P, Ferrari S. Periostin action in bone [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 432: 75-82
- [26] Garnero P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis[J]. *Bone*, 2014, 66: 46-55
- [27] Wen L, Chen J, Duan L, et al. Vitamin K-dependent proteins involved in bone and cardiovascular health (Review)[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 18(1): 3-15
- [28] Bonnet N, Conway S J, Ferrari S L. Regulation of beta catenin signaling and parathyroid hormone anabolic effects in bone by the matricellular protein periostin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(37): 15048-15053
- [29] Padial-Molina M, Volk S L, Taut A D, et al. Periostin is Down-regulated during Periodontal Inflammation [J]. *Journal of Dental Research*, 2012, 91(11): 1078-1084
- [30] Kii I, Amizuka N, Minqi L, et al. Periostin is an extracellular matrix protein required for eruption of incisors in mice [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342(3): 766-772
- [31] Wong LF, Goodhead L, Prat C, et al. Lentivirus-Mediated Gene Transfer to the Central Nervous System: Therapeutic and Research Applications[J]. *Human gene therapy*, 2006, 17(1): 1-9