

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.02.010

TNF- α 对骨形成蛋白-2 诱导的小鼠 C2C12 细胞向成骨细胞分化的影响及可能机制 *

熊 军¹ 刘 韦¹ 曾 凡¹ 陈剑飞¹ 周海燕²

(1 海南省人民医院 创伤骨科 海南 海口 570311; 2 海南医学院附属医院 内科 海南 海口 570120)

摘要 目的:研究肿瘤坏死因子(TNF- α)对骨形成蛋白-2(BMP-2)诱导的小鼠成肌 C2C12 细胞向成骨细胞分化的影响并探讨相关的作用机制。**方法:**分别以 TNF- α (5 ng/mL)和 BMP-2(100 ng/mL)单独或联合处理小鼠成肌 C2C12 细胞,检测细胞中碱性磷酸酶(AKP)的活性;采用 BMP-2 100 ng/mL 联合不同浓度 TNF- α (0、2、5、8、10 ng/mL)或 TNF- α 5 ng/mL 联合不同浓度 BMP-2(0、100、200、300 ng/mL)处理细胞,检测细胞中 AKP 的活性。蛋白质印迹法(Western Blot)检测细胞中 Smad1 和 NF- κ B 磷酸化的水平。**结果:**与对照组相比,BMP-2(100 ng/mL)能显著增加 C2C12 细胞中 AKP 活性($P<0.05$),但 TNF- α (5 ng/mL)可显著抑制 C2C12 细胞中 AKP 活性($P<0.05$)。C2C12 细胞中 AKP 活性随着 TNF- α 浓度的增加显著降低($P<0.05$),但随着 BMP-2 浓度的增加而显著升高($P<0.05$)。与对照组相比,TNF- α 能显著降低 C2C12 细胞中磷酸化 Smad1 的水平,且显著升高炎症相关因子 NF- κ B 磷酸化水平,但加入 BMP-2 对 NF- κ B 无显著影响。**结论:**TNF- α 能抑制 BMP-2 诱导的 C2C12 细胞向成骨细胞分化,且具有一定的剂量效应,其作用机制可能与调控炎症相关因子 NF- κ B 活性干预 BMP2-Smad1 信号通路有关。

关键词: TNF- α ; BMP-2; NF- κ B; Smad1**中图分类号:** R-33; R68 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)02-249-04

The Effects of Tumor necrosis Factor- α (TNF- α) on Osteoblast Differentiation of Mouse my- oblasts C2C12 Induced by bone Morphogenetic Protein-2(BMP-2) and its Possible Mechanism

XIONG Jun¹, LIU Wei¹, ZENG Fan¹, CHEN Jian-fei¹, ZHOU Hai-yar²

(1 Department of orthopedics, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou, Hainan, 570311, China;

2 Department of medicine, Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, 570120, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on osteoblast differentiation of mouse myoblasts C2C12 induced by bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and its possible mechanism. **Methods:** The myogenic C2C12 cells were treated with TNF- α (5 ng/mL) and BMP-2(100 ng/mL) alone or in combination, and the activity of alkaline phosphatase (AKP) in the cells was detected; BMP-2 was maintained at 100 ng/mL combined with different concentrations of TNF- α (0 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL, 8 ng/mL, 10 ng/mL), or TNF- α to keep 5 ng/mL combined with different concentrations of BMP-2(0 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL) were used to treated cells, to analysis of the activity of AKP. The levels of Smad1 and NF- κ B phosphorylation in cells were detected by Western Blot. **Results:** Compared with the control group, BMP-2 (100 ng/mL) significantly increased AKP activity ($P<0.05$) in C2C12 cells, but TNF- α (5ng/mL) significantly inhibited the activity of AKP in C2C12 cells($P<0.05$). The activity of AKP in C2C12 cells decreased significantly with the increase of TNF- α concentration($P<0.05$), but increased significantly with the increase of BMP-2 concentration ($P<0.05$). Compared with the control group, TNF- α were significantly reduced the level of phosphorylated Smad1 in C2C12 cells and significantly increased the phosphorylation level of inflammatory related factor NF- κ B. However, BMP-2 had no significant effect on NF- κ B. **Conclusion:** TNF- α can inhibit the differentiation of C2C12 cells into osteoblasts induced by BMP-2, and has a certain dose effect. The mechanism may be related to the regulation of the inflammation-related factor NF- κ B activity in BMP2-Smad1 signaling pathway.

Key words: TNF- α ; BMP-2; NF- κ B; Smad1**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R68 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2019)02-249-04

前言

骨形成或者愈合过程中需要成骨细胞与破骨细胞参与,调控骨质的形成与钙化,从而调整骨体积和密度^[1]。骨形成蛋白

(Bone morphogenetic protein, BMP)是调控细胞形成成骨细胞的重要因子^[2-3]。多种炎性因子比如肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor- α , TNF- α)可以促进成骨细胞合成破骨细胞相关分化因子,通过与骨髓巨噬细胞膜表面受体结合,促进核因子- κ B(nu-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81260275)

作者简介:熊军(1985-),男,博士研究生,主要研究方向:骨外科专业,E-mail: docxiongjun126@126.com,电话:18689710199

(收稿日期:2018-03-28 接受日期:2018-04-23)

clear factor- κ B, NF- κ B)磷酸化,进而促进破骨细胞的形成^[4-7]。研究表明可持续性慢性炎症促进骨吸收与形成^[8],但可持续性慢性炎症对成骨细胞分化过程的影响尚不完全明确。因此,本研究主要探讨了 TNF- α 对 BMP-2 诱导的小鼠成肌 C2C12 细胞向成骨细胞分化的影响以及相关的作用机制,以期为骨折愈合的临床治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠成肌 C2C12 细胞株购自美国生物标准品收藏中心(American type culture collection, ATCC), DMEM 培养基、胎牛血清、碱性磷酸酶(AKP)荧光检测试剂盒、细胞培养板、TNF- α 均购自美国 Sigma 公司, BMP-2 购自美国 RD 公司, 胰酶购自美国 Gibco 公司, 磷酸化 Smad1 单克隆抗体、磷酸化 NF- κ B 单克隆抗体购自武汉博士德生物有限公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购自中国碧云天生物技术公司, 酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司, 离心机购自美国赛默飞公司, 细胞培养箱购自美国 Shellab 公司, 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 将 C2C12 细胞冻存管从液氮容器中取出, 快速浸入 37℃ 水浴锅中, 并不时晃动使细胞液融化完全。加入细胞悬液 10 倍以上体积的培养液, 800 rpm 离心 5 min, 去除上清液, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 静置培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。每 2-3 d 更换一次培养基, 待细胞汇合度达到 80 左右进行传代。弃去旧培养基, 加入 2 mL PBS 振荡漂洗细胞, 以除去细胞碎片和死细胞, 吸取 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化细胞, 显微镜下观察细胞变为圆形或者椭圆形, 弃去胰酶, 加入含血清的完全培养基, 按 1:6 的比例进行传代。

1.2.2 实验分组与处理 0.25% 胰酶消化对数期生长良好的 C2C12 细胞, 加入新鲜培养基调整细胞密度至 1×10^6 个/mL, 吸取 200 μ L 细胞悬浮液接种于 12 孔板中, 常规培养 24 h。将细胞分为 4 组: 对照组、骨形成蛋白组、炎症因子组、联合作用组。骨形成蛋白组为细胞培养液中加入 BMP-2(100 ng/mL); 炎症因子组为细胞培养液中加入 TNF- α (5 ng/mL); 联合组为细胞培养液中加入 BMP-2(100 ng/mL)和 TNF- α (5 ng/mL)联合处理; 对照组为正常培养的细胞。各组细胞放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2-3d 换液。

1.2.3 测定碱性磷酸酶的活性 收集培养 3 d 的各组细胞, 采用 4-硝基苯基磷酸二钠盐 (4-nitrophenyl phosphate hexahydrate, PNPP)法测定 AKP 活性, 根据细胞碱性磷酸酶荧光检测试剂盒说明书检测。弃去培养基, PBS 缓冲液漂洗 3 次, 每孔细胞加入 100 μ L 0.2% 的裂解液 TritonX-100, 振荡混匀 30 min, 显微镜下观察细胞已发生破碎且无完整细胞结构后, 吸取 4 mmol/L PNPP 按体积 1:1 的比例接入细胞培养孔中, 37℃ 反应 30 min, 吸取适量的 1 mol/L NaOH 终止反应。酶标仪上检测细胞 405 nm 波长下的光密度值(OD 值)。

1.2.4 TNF- α 对 BMP-2 诱导的 C2C12 细胞向成骨细胞分化的剂量关系的研究 收集对数期 C2C12 细胞, 胰酶消化调整细胞浓度, 吸取 200 μ L 细胞悬浮液接种于 12 孔板上, 37℃ 培养 24 h, 将细胞进行分组, 加入不同的刺激物处理细胞。细胞培养

液中加入 BMP-2(100 ng/mL)和 TNF- α (0、2、5、8、10 ng/mL); 以及细胞培养液中加入 TNF- α (5 ng/mL)和 BMP-2(0、100、200、300 ng/mL), 37℃ 培养 3d, 依据 1.3 所示实验方法测定 AKP 活性, 分析成骨细胞分化的程度。

1.2.5 检测细胞中 Smad1 和 NF- κ B 磷酸化的水平 以 β 肌动蛋白(β -actin)为内参, 蛋白质印迹法(Western Blot)检测细胞中 Smad1 和 NF- κ B 磷酸化的水平。收集经 BMP-2、TNF- α 处理的各组细胞, 加入 5 倍体积的 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白质, 测定蛋白质的浓度。配置十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的 10% 分离胶, 置于玻璃板中, 加入适量去离子水封闭, 静置 30 min, 加入浓缩胶, 插入梳子, 静置 30 min。将蛋白样品与适量的 SDS 凝胶加样缓冲液混合, 取 60 μ g 蛋白样品加入上样孔, 电压调整为 120 V, 电泳至溴酚蓝迁移至凝胶底部。将聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)置于凝胶上, 上下各放置 3 张滤纸, 置于转移缓冲液中, 4℃ 下转膜 2 h。加入 5% 脱脂奶粉室温中封闭 1-2 h。加入封闭液稀释的一抗, 4℃ 摇床过夜。TBS-T 洗膜 3 次 $\times$ 5 min, 放入封闭液稀释的 HRP 标记的二抗中, 置于摇床上 37℃ 孵育 1h, TBS-T 洗膜 3 次 $\times$ 5 min, 加入 ECL 发光试剂显色 5 min, 暗室中曝光 1-5 min, 显影, 定影后, 分析蛋白质的表达量。

1.3 统计学分析

实验重复 3 次, 结果采用 SPSS 22.0 统计软件分析, 以平均数 $\pm$ 标准差表示($\bar{x} \pm s$), 多组间比较采用单因素方差分析, 组间差异使用 SNK-q 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- α 抑制 BMP-2 诱导的 C2C12 细胞向成骨细胞分化

BMP-2(100 ng/mL)单独干预细胞较对照组显著增加 AKP 的活性, 促进 C2C12 细胞向成骨细胞分化; TNF- α (5 ng/mL)单独处理细胞较对照组显著降低 AKP 的活性; 联合作用细胞中 AKP 的活性较单独使用 BMP-2 显著降低, 抑制 C2C12 细胞向成骨细胞分化。

表 1 TNF- α 抑制 BMP-2 诱导的 C2C12 细胞向成骨细胞分化($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 1 TNF- α inhibits BMP-2-induced differentiation of C2C12 cells into osteoblasts($\bar{x} \pm s$, n=3)

Groups	OD _{405nm}
Control group	0.809 $\pm$ 0.046
BMP group	5.613 $\pm$ 0.501 ^a
Inflammatory factor group	0.312 $\pm$ 0.012 ^{ab}
Combined group	1.752 $\pm$ 0.137 ^{abc}
P	0.000

Note: Compared with the control group, ^a $P < 0.01$; Compared with the BMP group, ^b $P < 0.01$; Compared with the inflammatory factor group, ^c $P < 0.01$.

2.2 不同浓度 TNF- α 对 BMP-2 诱导的 C2C12 细胞成骨细胞分化的影响

BMP-2 的浓度为 100 ng/mL, 与不同浓度的 TNF- α 联合作用处理细胞。与未加 TNF- α 作用组(0 ng/mL)相比较, 2、5、8、10

ng/mL TNF- α 处理组的 AKP 活性显著降低,以 TNF- α 作用组 5(10 ng/mL)细胞中 AKP 活性最低,且随着 TNF- α 浓度的增加,AKP 活性逐渐下降,两两比较显示差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 不同浓度 TNF- α 对 BMP-2 诱导的 C2C12 细胞 AKP 活性的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of different concentrations of TNF- α on BMP-2-induced AKP activity in C2C12 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)	
Groups	OD _{405nm}
TNF- α group 1(0 ng/mL)	8.845 $\pm$ 0.721
TNF- α group 2(2 ng/mL)	4.269 $\pm$ 0.356 ^a
TNF- α group 3(5 ng/mL)	1.782 $\pm$ 0.134 ^{ab}
TNF- α group 4(8 ng/mL)	0.833 $\pm$ 0.069 ^{bc}
TNF- α group 5(10 ng/mL)	0.136 $\pm$ 0.011 ^{abcd}
P	0.000

Note: Compared with the control group, ^a $P<0.01$; Compared with the BMP group, ^b $P<0.01$; Compared with the inflammatory factor group, ^c $P<0.01$.

2.3 不同浓度 BMP-2 对 TNF- α 诱导的 C2C12 细胞成骨细胞分化的影响

TNF- α 的浓度为 5 ng/mL,与不同浓度的 BMP-2 联合作用处理细胞,细胞中 AKP 活性具有显著差异(如表 3)。与 BMP-2 作用组 1 相比较,100、200、300 ng/mL BMP-2 组 AKP 活性显著增加,以 BMP-2 作用组 4(300 ng/mL)细胞中 AKP 活性最大,随着 BMP-2 浓度的增加,AKP 活性逐渐增加,两两比较显示差异具有统计学意义($P<0.01$)。

表 3 不同浓度 BMP-2 对 TNF- α 诱导的 C2C12 细胞 AKP 活性的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of different concentrations of BMP-2 on TNF- α -induced AKP activity in C2C12 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)	
Groups	OD _{405nm}
BMP-2 group 1(0 ng/mL)	0.336 $\pm$ 0.035
BMP-2 group 2(100 ng/mL)	1.783 $\pm$ 0.135 ^a
BMP-2 group 3(200 ng/mL)	3.125 $\pm$ 0.420 ^{ab}
BMP-2 group 4(300 ng/mL)	5.263 $\pm$ 0.522 ^{abc}
P	0.000

Note: Compared with the control group, ^a $P<0.01$; Compared with the BMP group, ^b $P<0.01$; Compared with the inflammatory factor group, ^c $P<0.01$.

2.4 BMP-2 和 TNF- α 对 C2C12 细胞中 Smad1 和 NF- κ B 磷酸化的影响

BMP-2 和 TNF- α 单独或者联合作用 C2C12 细胞,细胞中 Smad1 和 NF- κ B 磷酸化的水平具有显著的差异(如表 4、图 1)。与对照组相比,BMP-2 可促进 Smad1 磷酸化水平显著升高,但对 NF- κ B 磷酸化水平无显著影响;TNF- α 作用 C2C12 细胞可显著增加 NF- κ B 磷酸化水平,但对 Smad1 磷酸化水平无显著影响;与 BMP-2 单独作用相比,BMP-2 与 TNF- α 联合作用 C2C12 细胞能显著抑制 Smad1 磷酸化水平。



图 1 C2C12 细胞中 Smad1 和 NF- κ B 磷酸化的水平的检测

Fig.1 Detection of Smad1 and NF- κ B phosphorylation levels in C2C12 cells

3 讨论

机体的生理性炎症反应可促进骨折的愈合过程,但感染或其他原因引起机体产生慢性炎症反应对骨折的愈合是无益的,可能导致愈合过程延迟或者发生骨不连反应。在骨形成过程中,成骨细胞和破骨细胞发挥重要作用^[9-11]。骨骼中的成骨细胞由间充质干细胞分化而成,主要作用是合成骨基质^[12];破骨细胞的作用与成骨细胞恰恰相反,主要由骨髓巨噬细胞分化而来,其主要作用是降解骨基质^[13]。成骨细胞与破骨细胞的相互制约、平衡的过程在骨形成过程起关键作用。

近年来,炎症因子对成骨细胞分化过程的影响已成为目前研究的热点之一。BMP 家族是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族中成员之一,参与生长发育和骨诱导过程^[14-16]。BMP-2 是 BMP 家族诱导间质细胞分化为软骨细胞效率最高的细胞因子,既能在体内促进成骨细胞分化,也能在体外作用于成骨细胞分化过程。TNF- α 是肿瘤坏死因子家族的成员,由单核巨噬细胞分化形成,是体内一种重要的炎症因子,参与细胞的增殖、分化等过程^[17]。研究表明在骨质疏松患者、慢性炎症患者的骨组织中,TNF- α 的水平上调,表明 TNF- α 参与骨代谢过程^[18,19]。文献报道显示 TNF- α 不仅直接作用于单核巨噬细胞的有丝分裂以及分化过程,而且促进成熟破骨细胞骨吸收作用^[20,21]。TNF- α 可通过调控破骨细胞前分化过程以

表 4 细胞中 Smad1 和 NF- κ B 磷酸化的水平的检测($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Detection of Smad1 and NF- κ B phosphorylation levels in cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Groups	p-Smad1 protein level	p-NF κ B protein level
Control group	0.123 $\pm$ 0.014	0.115 $\pm$ 0.012
BMP group	0.784 $\pm$ 0.073 ^a	0.117 $\pm$ 0.019
Inflammatory factor group	0.130 $\pm$ 0.012 ^b	0.451 $\pm$ 0.048 ^{ab}
Combined group	0.421 $\pm$ 0.046 ^{abc}	0.420 $\pm$ 0.046 ^{ab}
P	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, ^a $P<0.01$; Compared with the BMP group, ^b $P<0.01$; Compared with the inflammatory factor group, ^c $P<0.01$.

及破骨细胞的活性,从而促进体外培养的骨组织中破骨细胞的骨吸收功能。在本研究中,以 BMP-2 诱导的小鼠成肌 C2C12 细胞向成骨细胞分化为模型,研究炎症因子 TNF- α 对成骨细胞分化的调控作用,结果显示 BMP-2 能提高 C2C12 细胞中 AKP 活性,提示 BMP-2 可促进 C2C12 细胞向成骨细胞分化;TNF- α 可降低 C2C12 细胞中 AKP 活性,且随着浓度的增加 AKP 活性降低,提示 TNF- α 可抑制 BMP-2 诱导的小鼠成肌 C2C12 细胞向成骨细胞分化,并呈现一定的浓度依赖性。

NF- κ B 参与机体免疫反应、细胞增殖、凋亡等过程,细胞外 TNF- α 等炎性因子可刺激 NF- κ B 抑制蛋白磷酸化,NF- κ B 与抑制蛋白结合形成的三聚体被激活的泛素化途径降解为二聚体,从而进入细胞核调控基因的转录过程^[22,23]。骨形成蛋白可通过调控 Smad 信号通路以及下游效应因子磷酸化水平促进和诱导成骨细胞分化过程^[24-26]。NF- κ B 通过作用于 BMP-Smad 信号通路调控成骨细胞分化过程^[27-30]。在本实验中,TNF- α 能显著降低 BMP-2 诱导的 C2C12 细胞中 Smad1 的磷酸化水平,显著升高磷酸化炎症相关因子 NF- κ B 含量,但加入 BMP-2 对 NF- κ B 无显著影响,提示 TNF- α 抑制 BMP-2 诱导的 C2C12 细胞向成骨细胞分化的作用机制可能与激活 NF- κ B 磷酸化抑制 BMP2-Smad1 信号通路有关。

综上所述,本研究结果表明 TNF- α 抑制 BMP-2 诱导的 C2C12 细胞成骨细胞分化,且具有一定的浓度依赖性,其作用机制可能与激活炎症相关因子 NF- κ B 活性从而抑制 BMP2-Smad1 信号通路有关。

参 考 文 献(References)

- [1] Shimazu J, Wei J, Karsenty G. Smurf1 inhibits osteoblast differentiation, bone formation, and glucose homeostasis through serine 148[J]. Cell reports, 2016, 15(1): 27-35
- [2] Liu J, Liang C, Guo B, et al. Increased PLEKHO1 within osteoblasts suppresses Smad-dependent BMP signaling to inhibit bone formation during aging[J]. Aging cell, 2017, 16(2): 360-376
- [3] Wu M, Chen G, Li Y P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease [J]. Bone Research, 2016, 4(1): 16009
- [4] Li A, Yang L, Geng X, et al. Rocaglamide-A Potentiates Osteoblast Differentiation by Inhibiting NF- κ B Signaling[J]. Molecules & Cells, 2015, 38(11): 941
- [5] Liu S P, Wang G D, Du X J, et al. Triptolide inhibits the function of TNF- α in osteoblast differentiation by inhibiting the NF- κ B signaling pathway [J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2017, 14(3): 2235
- [6] Noguchi T, Ebina K, Hirao M, et al. Progranulin plays crucial roles in preserving bone mass by inhibiting TNF- α -induced osteoclastogenesis and promoting osteoblastic differentiation in mice[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2015, 465(3): 638-643
- [7] 王链链,郭晓英.破骨细胞分化过程中的信号通路及信号因子的研究进展[J].中国骨质疏松杂志, 2015, 27(6): 742-748
Wang Lian-lian, Guo Xiao-ying. Advances in Signal Pathways and Signal Factors during Osteoclast Differentiation [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2015, 27(6): 742-748
- [8] Chen W, Gao B, Hao L, et al. The silencing of cathepsin K used in gene therapy for periodontal disease reveals the role of cathepsin K in chronic infection and inflammation[J]. Journal of periodontal research, 2016, 51(5): 647-660
- [9] 陈丽珍,周英,黄俊飞,等.大血藤对破骨细胞活性及成骨细胞增殖分化作用的研究[J].中国中药杂志, 2015, 40(22): 4463-4468
Chen Li-zhen, Zhou Ying, Huang Jun-fei, et al. Study on the activity of osteopontin and the proliferation and differentiation of osteoblasts in *Rhodiola sachalinensis* [J]. Chinese Journal of Medicine, 2015, 40 (22): 4463-4468
- [10] Dixon S J, Sims S M. P2 purinergic receptors on osteoblasts and osteoclasts: Potential targets for drug development [J]. Drug Development Research, 2015, 49(3): 187-200
- [11] Baum R, Gravalles E M. Bone as a Target Organ in Rheumatic Disease: Impact on Osteoclasts and Osteoblasts [J]. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2016, 51(1): 1
- [12] Chen Q, Shou P, Zheng C, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? [J]. Cell Death & Differentiation, 2016, 23(7): 1128-1139
- [13] Millard S M, Pettit A R, Ellis R, et al. Intrauterine bone marrow transplantation in osteogenesis imperfecta mice yields donor osteoclasts and osteomacs but not osteoblasts[J]. Stem cell reports, 2015, 5 (5): 682-689
- [14] 刘彩宏,王军强.转化生长因子 β 1 在骨形态发生蛋白 2 诱导的人牙周膜干细胞成骨分化中的作用 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2016, 26(6): 332-337
Liu Cai-hong, Wang Jun-qiang. Role of transforming growth factor β 1 in osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells induced by bone morphogenetic protein 2 [J]. Journal of endodontics, periodontal diseases, 2016, 26(6): 332-337
- [15] Zhao W, Wang T, Luo Q, et al. Cartilage degeneration and excessive subchondral bone formation in spontaneous osteoarthritis involves altered TGF- β signaling [J]. Journal of Orthopaedic Research Official Publication of the Orthopaedic Research Society, 2016, 34(5): 763
- [16] Hyuck C, Byung-Chul J, Min-Suk K, et al. Betulinic acid synergically enhances BMP2-induced bone formation via stimulating Smad 1/5/8 and p38 pathways[J]. Journal of Biomedical Science, 2016, 23(1): 45
- [17] 李蓉,杜军辉,常远.肿瘤坏死因子 - α 对 RF/6A 细胞自噬促进细胞增殖、迁移和管腔形成的影响 [J]. 眼科新进展, 2015, 35(12): 1132-1136
Li Rong, Du Jun-hun, Chang Yuan. Effects of TNF - α on autophagy promoting cell proliferation, migration and lumen formation in RF/6A cells [J]. New progress in Ophthalmology, 2015, 35 (12): 1132-1136
- [18] Raetz S, Bierhalter H, Schoenherr D, et al. Estrogen Deficiency Exacerbates Type 1 Diabetes-Induced Bone TNF- α Expression and Osteoporosis in Female Mice [J]. Endocrinology, 2017, 158 (7): 2086-2101
- [19] Toussiot ϵ , Aubin F. Paradoxical reactions under TNF- α blocking agents and other biological agents given for chronic immune-mediated diseases: an analytical and comprehensive overview [J]. RMD open, 2016, 2(2): e000239
- [20] Jackaman C, Yeoh T L, Acuil M L, et al. Murine mesothelioma induces locally-proliferating IL-10+ TNF- α + CD206- CX3CR1+ M3 macrophages that can be selectively depleted by chemotherapy or immunotherapy[J]. Oncoimmunology, 2016, 5(6): e1173299

(下转第 274 页)

227-233

- [16] Gao Q, Bo D N, Liu Y Y. Curative effect of atorvastatin combining Tanshinone II A Sodium Injection on angina pectoris of coronary heart disease [J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2016, 8(2): 177-179
- [17] Long R, You Y, Li W, et al. Sodium tanshinone II A sulfonate ameliorates experimental coronary no-reflow phenomenon through down-regulation of FGL2[J]. Life Sci, 2015, 1(142): 8-18
- [18] Gu J, Li H L, Wu H Y, et al. Sodium tanshinone II A sulfonate attenuates radiation-induced fibrosis damage in cardiac fibroblasts [J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16(9): 941-952
- [19] Xu H J, Wu L L. Clinical Observation of Sodium Tanshinone II ASilate Combined with Heart-protecting Musk Pill on Angina Pectoris[J]. J Hubei UnivChinMed, 2014, 16(2): 66-67
- [20] Lang C H, Xu C L, Zhang Y Q, et al. Clinical significance of change of plasma CRP, UA, lipids and bilirubin and role of tanshinone II A sulfonate in patients with angina [J]. J Clin Med Pract, 2012, 16(21): 25-27
- [21] Wang C L, Gu F, Wang S L. Meta-analysis on Randomized Controlled Trials for Treatment of Angina Pectoris by Sodium Tanshinone II A Sulfonate [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovas Dis, 2011, 9(6): 644-647
- [22] He W, Shi Y L, Zheng C G. Clinical study of tanshinone II A sodium sulfonate combined with simvastatin in the treatment of patients with angina of coronary heart disease [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2016, 32(5): 393-395
- [23] Sun Y G, Liu H X. Comparison of therapeutic effect and safety between atorvastatin and simvastatin in patients with angina pectoris of coronary heart disease[J]. Chin J Cardiovasc Rehabil Med, 2014, 3(3): 315-317
- [24] Xia S J, Yin Y G, Fang Y. Atorvastatin Combined with Danshen Ketone II A Sulfonic Acid Sodium Injection in the Treatment of Angina Pectoris of Coronary Heart Disease [J]. Hebei Med, 2016, 22(7): 1067-1070
- [25] Zhao X J, Zhang L P, Zhen Y F, et al. Tan II A Impact on Limb Ischemia Reperfusion Injury in Rats Hemorheology [J]. Guide China Med, 2013, 11(34): 299-300
- [26] Wang J P, Tian Y F, Xu T, et al. Effects of tanshinone II A sulfonate combined with atorvastatin on serum levels of APN, TNF- α and HS CRP in patients with coronary heart disease [J]. Hebei MedJ, 2015, 32(23): 3586-3588
- [27] Zhou Y Y, Wu M, Ye Z Z, et al. Effect of Tanshinone II A Sulfonic Sodium combined with Clopidogrel on coronary heart disease and angina pectoris and vascular endothelium function[J]. Modern J Integr Tradit Chin West Med, 2016, 25(7): 705-707
- [28] Cao T T, Xu H L, He Y. Therapeutic effect of Tanshinone II A-sulfonic sodium on CHD patients and its influence on hemorheology, cytokines and blood lipid levels [J]. Chin J Cardiovasc Rehabil Med, 2017, 26(1): 104-107

(上接第 252 页)

- [21] Cao Y, Jansen I D C, Sprangers S, et al. TNF- α has both stimulatory and inhibitory effects on mouse monocyte-derived osteoclastogenesis [J]. Journal of Cellular Physiology, 2017, 232(12): 3273-3285
- [22] Zhao G, Yu Y M, Kaneki M, et al. Simvastatin Reduces Burn Injury-induced Splenic Apoptosis via Down-regulation of the TNF- α /NF- κ B Pathway[J]. Annals of surgery, 2015, 261(5): 1006
- [23] Fu H, Li G, Liu C, et al. Probucol Prevents Atrial Remodeling by Inhibiting Oxidative Stress and TNF- α /NF- κ B/TGF- β Signal Transduction Pathway in Alloxan-Induced Diabetic Rabbits [J]. Journal of cardiovascular electrophysiology, 2015, 26(2): 211-222
- [24] Kato. Nanotopography Directs Mesenchymal Stem Cells to Osteoblast Lineage Through Regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 Circuit (vol 229, pg 1690, 2014)[J]. Journal of Cellular Physiology, 2016, 231(11): 2548-2548
- [25] Nai A, Rubio A, Campanella A, et al. Limiting hepatic Bmp-Smad signaling by matriptase-2 is required for erythropoietin-mediated hepcidin suppression in mice[J]. Blood, 2016, 127(19): 2327
- [26] BS Kim, HJ Kang, JY Park, et al. Fucoidan promotes osteoblast differentiation via JNK- and ERK-dependent BMP2-Smad 1/5/8 signaling in human mesenchymal stem cells [J]. Experimental & molecular medicine, 2015, 47(1): e128
- [27] Mao C Y, Wang Y, Zhang X, et al. Double-edged-sword effect of IL-1 β on the osteogenesis of periodontal ligament stem cells via crosstalk between the NF- κ B, MAPK and BMP/Smad signaling pathways[J]. Cell death & disease, 2016, 7(7): e2296
- [28] Luo K. Signaling Cross Talk between TGF- β /Smad and Other Signaling Pathways [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2017, 9(1): a022137
- [29] Li A, Cong Q, Xia X, et al. Pharmacologic Calcitriol Inhibits Osteoclast Lineage Commitment via the BMP-Smad1- I κ B-NF- κ B Pathway[J]. Journal of Bone & Mineral Research, 2017, 32(7): 1406-1420
- [30] Hirata-Tsuchiya S, Fukushima H, Kokabu S, et al. Fine-tuning between BMP and NF- κ B pathways regulates osteoblastic bone formation[J]. Journal of Oral Biosciences, 2016, 58(3): 73-77