doi:10.11659/jjssx.01E019064

·基础研究·

高糖对成骨细胞 MC3T3-E1 凋亡和氧化应激的影响

高 瑞,辜 洁,康迪斯,王 萍 (陆军军医大学第二附属医院骨科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 评价高糖环境对成骨细胞 MC3T3-E1 凋亡和氧化应激的影响,为临床治疗糖尿病骨质疏松症提供实验基础。**方法** 在细胞培养瓶中加入不同浓度高糖溶液(0、20、40、80 mmol/L)培养成骨细胞株 MC3T3-E1,24 h 后分别采用 CCK-8 测定其细胞存活率、细胞凋亡率,线粒体膜电位试剂盒测定其去极化程度,半胱天冬酶-3(Caspase-3)试剂盒检测其活性,DCFH-DA 荧光探针检测 ROS 的生成。在 80 mmol/L 高糖环境暴露,MC3T3-E1 细胞在抗氧化剂 NAC 作用下,采用上述方法测其线粒体膜电位和 Caspase-3 含量。**结果** 与对照组相比,成骨细胞 MC3T3-E1 在高糖暴露下的存活率和线粒体膜电位下降,细胞凋亡率、细胞活性氧水平和 Caspase-3 活性增强,且都存在剂量依赖性;抗氧化剂 NAC 抑制高糖引起 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位降低和 Caspase-3 增高。**结论** 高糖环境下,NAC 通过抑制高糖引起的氧化应激,降低细胞凋亡率,保护成骨细胞 MC3T3-E1。

[关键词] 高糖环境;成骨细胞;凋亡;氧化应激;抗氧化剂 NAC;骨质疏松症

[中图分类号] R364.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-01-16

Effects of high glucose on apoptosis and oxidative stress of osteoblast MC3T3-E1

GAO Rui, GU Jie, KANG Di-si, WANG Ping (Department of Orthopedic, Second Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of high glucose on the apoptosis and oxidative stress of osteoblasts MC3T3-E1, and to provide a certain experimental basis for clinical treatment of diabetic osteoporosis. **Methods** Osteoblasts MC3T3-E1 were cultured in cell culture bottles with different concentrations of high glucose solutions (0, 20, 40, 80 mmol/L) for 24 hours. CCK-8 was used to determine the cell survival rate and apoptosis rate, mitochondrial membrane potential kit was used to measure the degree of depolarization, caspase-3 kit was used to detect its activity, and DCFH-DA fluorescence probe was used to detect the generation of ROS. The mitochondrial membrane potential and caspase-3 content of MC3T3-E1 cells were measured by the above method under the action of antioxidant NAC at 80 mmol/L high glucose exposure. **Results** Compared with the control group, osteoblasts MC3T3-E1 exposed to high glucose showed decreased cell survival rate and mitochondrial membrane potential, enhanced apoptosis rate, ROS level and caspase-3 activity, and dose-dependent tolerance. The antioxidant NAC inhibited the mitochondrial membrane potential decrease and caspase-3 increase of osteoblasts MC3T3-E1 induced by high glucose. **Conclusion** In high glucose environment, NAC can inhibit oxidative stress induced by high glucose, reduce apoptosis rate and protect osteoblasts MC3T3-E1.

Keywords: high glucose environment; osteoblasts; apoptosis; oxidative stress; antioxidant NAC; osteoporosis

血糖浓度高对许多类型的细胞均有不利影响,长期存在的高血糖可导致各种组织病变和功能障碍,进而引起许多疾病,如糖尿病[1]。糖尿病患者体液环境中长期存在的高血糖,可影响成骨细胞的分布[2]。成骨细胞是参与骨骼形成的主要细胞,对体内骨组织生长与发育、骨代谢的平衡以及损伤修复发挥关键作用,成骨细胞过度凋亡会影响骨骼修复,甚至导致骨质疏松[3]。糖尿病易并发骨质疏松症[4]。许多与糖尿病有关的因素,如氧化应激、高血糖、体质量降低等,参与了糖尿病性骨质疏松的发生和发展[1]。糖尿病性骨质疏松症是糖尿病患者常见的慢性并发症,存在骨量减少,骨密度降低,骨组织结构受损等病变,易导致病理性骨折,致残率高[5]。因此,高糖环境下,成骨细胞增殖、分化、凋亡等情况引起了广泛关注。有研究表明高糖可致成骨细胞增殖降低、凋亡增加[6-7]。在高血糖状态下,氧化应激明显增加,并可诱发各种类型细胞的功能障碍,而活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的生成与高血糖及其他许多糖尿病并发症发展过程中的代谢异常存在联系[1]。高糖引起的氧化应激是引起成骨细胞代谢紊乱的主要因素之一,而线粒体是氧化损伤最主要的靶细胞器,因此,细胞线粒体膜电位的变化,可以反映其氧化应激水平[8-9]。本研究通过成骨细胞株 MC3T3-E1 暴露于高糖建立实验模型,揭示抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)降低线粒体膜电位去

[基金项目] 国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ201503)

[通信作者] 王 萍,E-mail:175936095@qq.com

极化程度,即抑制高糖引起的氧化应激,进而降低成骨细胞 MC3T3-E1 的凋亡率,对其起到保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及配制

高糖溶液的制备:配制成浓度为 80 mmol/L 的葡萄糖溶液,高温灭菌,4 ℃保存,备用。成骨细胞株 MC3T3-E1 购自美国 ATCC 细胞库。JC-1 线粒体膜电位试剂盒、活性氧检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Caspase-3 活性检测试剂盒和 RIPA 裂解液均购自碧云天生物技术研究所。CCK-8 细胞增殖毒性检测试剂盒购自东仁化学科技公司。DMEM 培养基购自 Hyclone 公司。胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 培养 MC3T3-E1 细胞株采用的 DMEM 培养基(含体积分数 10% 的 FBS、100 ku/L 的青霉素和 100 mg/L 的链霉素),细胞培养箱参数为37 ℃,体积分数为 5% CO_2。

1.2.2 细胞存活率检测 将 MC3T3-E1 细胞按 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板,分为对照组(Control 组,不作任何处理)、高糖处理组(HG 组,加入葡萄糖溶液,使培养液中葡萄糖最终浓度分别为 20、40、80 mmol/L)和空白组(单纯培养基加上 CCK-8 试剂,无细胞)。每组设 5 个复孔,细胞置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 24 h。根据 CCK-8 细胞增殖毒性试剂盒说明书检测细胞存活率,测定时,吸干培养液,每孔加入含 10 μL CCK-8 试剂和新鲜培养液 90 μL,孵育 2 h,450 nm 波长测量吸光值(OD 值),根据 OD 值计算细胞存活率。细胞存活率(%) =(实验组 OD 值 - 空白 OD 值)/(对照组 OD 值 - 空白 OD 值) ×100% 。。

1.2.3 细胞凋亡率测定 实验分组同 1.2.2,成骨细胞以 2×10^5 个/瓶接种于 25 cm^2 培养瓶,隔夜贴壁后,以不同浓度高糖处理 24 h 后,根据 Annexin V-FITV/ PI双染试剂盒说明书,收集并处理细胞,用流式细胞仪检测细胞凋亡,凋亡率 = C4 早期凋亡细胞率 + C2 晚期凋亡细胞率。

1.2.4 细胞线粒体膜电位的检测 取生长情况好的 MC3T3-E1 细胞(细胞密度 8×10^4 个/mL)接种于 6 孔板中,培养过夜细胞贴壁后加药,使其最终分别达到上述实验分组所设置的浓度,此外还设置25 mmol/L NAC + 80 mmol/L 高糖处理组和 NAC 处理组。培养期满,加入 JC-1 探针,共同孵育 20 min 后用 JC-1 缓冲液洗涤 2 次。当线粒体膜电位处于较高水平时,JC-1 荧光探针主要聚集在线粒体的基质当中,形成聚合物,从而产生红色荧光;当线粒体膜电位处于较低水平时,JC-1 荧光探针大部分不能聚集在基质中,难以形成聚合物,因而 JC-1 单体产生绿色荧光。因此,使用TCS-SP5激光共聚焦显微镜通过检测红色与绿色荧光比例的增减来反映线粒体膜电位的变化。详细操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.5 细胞内 ROS 检测 将 MC3T3-E1 细胞接种于 6 孔板,接种量为 2×10^5 个/孔,待细胞生长旺盛时进行实验,分组情况与 1.2.2 相同,细胞置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 24 h,去除细胞培养液,每孔加入 2 mL 浓度为 10 μmol/L 的荧光探针 DCFH-DA 工作液,37 ℃孵育 2 min 后,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,荧光显微镜下观察。

1.2.6 细胞提取液制备 将 MC3T3-E1 细胞培养于规格为 75 cm^2 的培养瓶中,待细胞生长旺盛时进行实验,分组与 1.2.2 中的设置一样,细胞置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 24 h,收集细胞培养液,备用。用胰酶消化细胞后移至备用的细胞培养液中。4 ℃ 600 g 离心 5 min 收集细胞,除去上清,PBS 洗涤 1 次,除去上清,按照每 200 万细胞加入 100 μL 裂解液的比例加入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 15 min,4 ℃16 000 ~ 20 000 g 离心 15 min,吸取上清,BCA 法测定蛋白浓度后 -70 ℃保存备用。

1.2.7 Caspase-3 活性检测 Caspase-3 的活性通过 Caspase-3 活性检测试剂盒完成。用 1.2.6 制备的蛋白,催化底物 Ac-DEVD-ρNA 产生黄色的 ρNA(具体操作见说明书),之后用酶标仪通过测量 405 nm 处的吸光度,反映 Caspase-3 的活性。

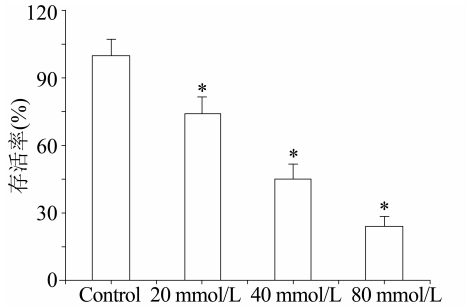
1.3 统计学分析

应用统计软件 SPSS 21.0 对所测实验数据进行分析,统计数据采用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),组间两两比较采用 q 检验(LSD 法)。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖环境下 MC3T3-E1 细胞存活率

MC3T3-E1 细胞暴露于 20、40、80 mmol/L 的葡萄糖溶液 24 h 后,高糖组与 Control 组相比存活率显著降低($P<0.05$),且细胞存活率随葡萄糖浓度的增高逐渐下降(图 1),可能与葡萄糖浓度存在剂量依赖性关系,表明高糖暴露会降低 MC3T3-E1 细胞存活率。



*:与 Control 组相比,$P<0.05$

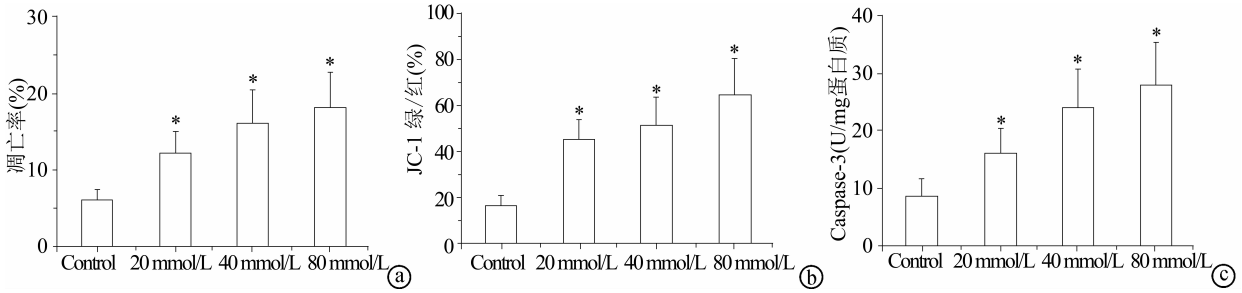
图 1 高糖环境下 MC3T3-E1 细胞存活率

2.2 高糖环境对 MC3T3-E1 细胞凋亡率、线粒体膜电位和 Caspase-3 活性的影响

MC3T3-E1 细胞暴露于 20、40、80 mmol/L 的葡萄糖溶液 24 h 后,与 Control 组相比,高糖组凋亡率显著增高($P<0.05$),且细胞凋亡率随葡萄糖浓度的增加逐渐增高(图2a);与Control组相比,各高糖组线粒体膜电位去极化程度显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),表明线粒体膜电位降低,且体现出明显的剂量依赖性(图 2b);此外,Caspase-3 含量测定显示,与对照组相比,各高糖组 Caspase-3 蛋白含量显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),且随着葡萄糖浓度增高,Caspase-3 合成量逐渐增加(图 2c),表明高糖暴露24 h 后,引起 MC3T3-E1 细胞凋亡率增加,线粒体膜电位降低,Caspase-3 合成增加。

2.3 高糖环境对 MC3T3-E1 细胞氧化应激的影响

MC3T3-E1 细胞在 0、20、40、80 mmol/L 葡萄糖溶液中暴露 24 h 后,高糖组与 Control 组比较,正常情况下细胞 ROS 活性低,在荧光显微镜下观察并不明显,高糖组细胞 ROS 活性与 Control 组相比明显升高(图 3);定量测定活性氧水平(图 4),结果与显微镜观察一致。提示高糖环境下,ROS 活性水平随葡萄糖浓度升高而增加。



a:不同浓度葡萄糖处理,细胞凋亡率;b:不同浓度葡萄糖处理,线粒体膜电位去极化程度;c:不同浓度葡萄糖处理,Caspase-3 蛋白活性 *:与 Control 组比较,$P<0.05$

图 2 高糖环境对 MC3T3-E1 细胞凋亡率,线粒体膜电位和 Caspase-3 活性的影响

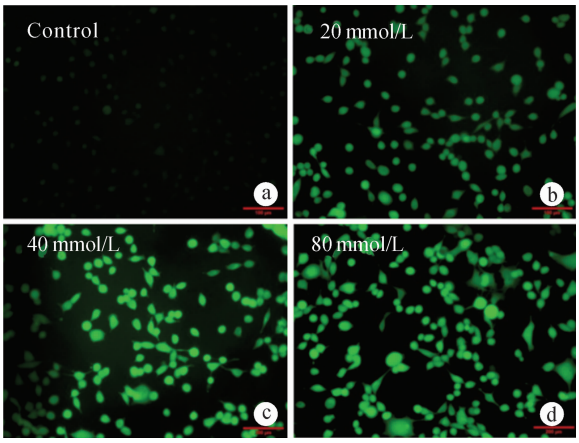
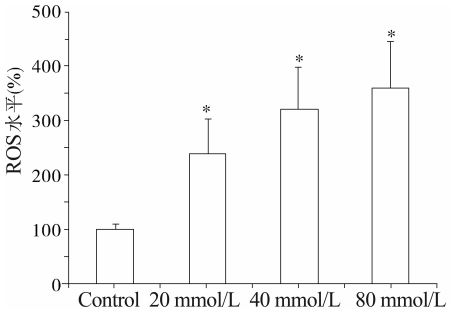


图 3 高糖环境对 MC3T3-E1 细胞氧化应激的影响

2.4 抗氧化剂 NAC 对高糖暴露下的 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位和 Caspase-3 活性的影响

与 Control 组相比,80 mmol/L 高糖(HG)组细胞线粒体膜电位去极化程度显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);Control 组与 NAC 组比较,2 组的线粒体膜电位去极化程度无明显差异;NAC +80 mmol/L HG组

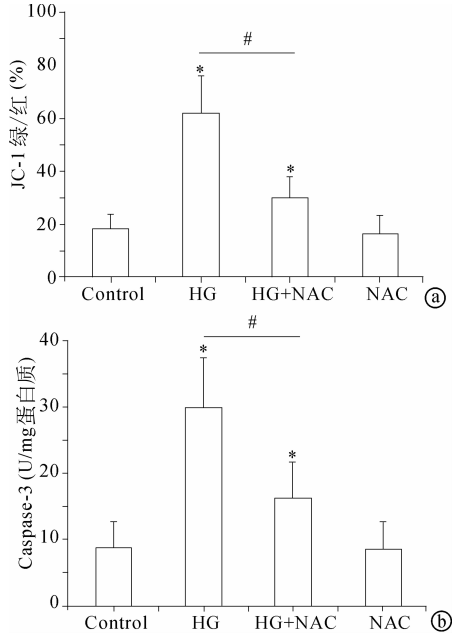


*:与 Control 组比较,$P<0.05$

图 4 酶标仪测定 ROS 活性水平

与 Control 组相比,其线粒体膜电位去极化程度显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);80 mmol/L HG 组与 NAC +80 mmol/L HG 组比较,后者线粒体膜电位去极化程度显著降低($P<0.05$),表明 NAC 抑制高糖暴露引起的 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位降低(图 5a)。80 mmol/L HG 组与 Control 组相比,Caspase-3 活性显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);NAC 组与 Control 组比较,Caspase-3 活性差异无统计学意义($P>0.05$);NAC +80 mmol/L HG 组与 Control 组相比,Caspase-3 活

性显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);80 mmol/L HG 组与 NAC + 80 mmol/L HG 组相比,后者 Caspase-3 活性明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),表明 NAC 抑制高糖暴露引起的 MC3T3-E1 细胞内 Caspase-3 活性升高(图 5b)。由此得出,NAC 可通过抑制高糖暴露引起的 MC3T3-E1 细胞氧化应激的增强,降低 MC3T3-E1 细胞的凋亡率,对 MC3T3-E1 起到保护作用。



a:不同处理组线粒体膜电位去极化程度;b:不同处理组 Caspase-3 蛋白活性 *:与 Control 组比较,$P<0.05$;#:组间比较,$P<0.05$

图 5 NAC 对高糖暴露下的 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位和 Caspase-3 活性的影响

3 讨论

高糖可显著抑制成骨细胞 MG-63 及 MC3T3-E1 的增殖分化。成熟骨组织主要依靠持续循环性的破骨和成骨过程,由破骨细胞和成骨细胞协同完成。大部分糖尿病患者伴有骨密度减低,可能是高血糖状态下,成骨细胞增殖分化障碍而致上述循环被破坏,并最终导致糖尿病骨质疏松[10-13]。同时,也有专家认为,糖尿病患者由于长期血糖控制欠佳引起牙周炎、糖尿病足等并发症,可能与骨质疏松等骨骼病变有关[14]。高糖对成骨细胞功能影响显著,因此,我们通过建立体外成骨细胞高糖环境模型,对高糖暴露影响成骨细胞功能进行了研究,结果表明,高糖可抑制成骨细胞增殖,提高凋亡率,且存在剂量依赖性关系,与国内外学者的研究结论一致[13,15]。

成骨细胞的增殖分化与氧化应激息息相关,当细胞内 ROS 增加,最终可影响成骨细胞功能[16-17]。同时,Caspase-3 活性在细胞凋亡过程中,起着非常重要的作用,Caspase-3 活性增高,可诱发细胞凋亡[18]。因此本实验研究在高糖刺激下加入 NAC,检测其 MC3T3-E1 线粒体膜电位去极化程度及 Caspase-3 活性水平,以反映氧化应激与细胞凋亡的关系。实验表明,NAC + 高糖组的线粒体膜电位相对高糖组升高,即降低了氧化应激,同时 NAC + 高糖组的 Caspase-3 活性也相对下降,提示 NAC 通过抑制氧化应激,可降低成骨细胞在高糖环境下的凋亡率,与还原型谷胱甘肽、二甲双胍等抗氧化剂促进高糖成骨细胞的增殖和分化一致[19-20]。

综上所述,本研究证实高糖能够显著抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖,促进细胞凋亡,而抗氧化剂 NAC 则可通过降低高糖引起的氧化应激水平,对 MC3T3-E1 细胞的增殖起到积极的促进作用,使其凋亡率下降。但其中的作用机制极其复杂,具体机制尚未完全明确,仍需要更加深入地探讨 ROS 相关信号通路在其中的调节作用,以便后期针对糖尿病引起的骨质疏松等骨骼病变研发新的、高效的药物,减少糖尿病骨质疏松的发生。

[参考文献]

[1] 王筱婧,赵点点,郁静嘉,等. 高糖环境下成骨细胞增殖和分化与 FoxO1 及氧化应激的关系[J]. 诊断学理论与实践,2015(2):113 - 119. doi:10.16150/j.1671 - 2870.2015.02.006.

[2] 滕 腾,孙 鑫,张 冉,等. 黄芪多糖对高糖环境下 MC3T3-E1 细胞活性影响的研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志,2015,25(6):348 - 353. doi:10.15956/j.cnki.chin.j.conserv.dent.2015.06.004.

[3] Chen X,Wang Z,Duan N,et al. Osteoblast-osteoclast interactions[J]. Connective Tissue Research,2017,59(2):99 - 107. doi:10.1080/03008207.2017.1290085.

[4] Wittrant Y,Gorin Y,Woodruff K,et al. High d(+)glucose con? centration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. Bone,2008,42(6):1122 - 1130. doi:10.1016/j.bone.2008.02.006.

[5] Rachner TD,Khosla S,Hofbauer LC. Osteoporosis:now and the future[J]. Lancet,2011,377(9773):1276 - 1287. doi:10.1016/S0140 - 6736(10)62349 - 5.

[6] Yaturu S. Diabetes and skeletal health[J]. J Diabetes,2010,1(4):246 - 254. doi:10.1111/j.1753 - 0407.2009.00049.x.

[7] Zhen D,Chen Y,Tang X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function[J]. J Diabetes Complications,2010,24(5):334 - 344. doi:10.1016/j.jdiacomp.2009.05.002.

[8] 王小菊,冯正平,邓华聪,等. 活化蛋白 1 在高糖诱导 MC3 T3-E1 成骨细胞凋亡中的作用[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2014(3):258 - 262. doi:10.3969/j.issn.1674 - 2591.2014.03.012.

[9] Steiner JL,Lang CH. Etiology of alcoholic cardiomyopathy:mitochondria,oxidative stress and apoptosis[J]. Int J Biochem Cell Biol,2017,89:125 - 135. doi:10.1016/j.biocel.2017.06.009.

[10] 陈 涛,高 攀,王延伟,等. 不同浓度高糖状态对 MG-63 细胞影响的实验研究[J]. 中国口腔种植学杂志,2015,20(4):155 - 157.

doi:10.11659/jjssx.09E018029

·基础研究·

胃癌组织中 HuR 表达与临床病理及生存状况的关系

雷海锋,寇振宇,闫 磊,王永奇 (铜川矿务局中心医院普外科,陕西 铜川 727000)

[摘 要] **目的** 研究 RNA 结合蛋白 HuR 在胃癌组织中的表达及其临床意义。**方法** 选择铜川矿务局中心医院 2010 年 8 月至 2012 年 3 月收治的胃癌根治术患者的 73 份胃癌组织标本作为胃癌组,选择在同一时期内接受胃切除术的 21 例正常胃组织作为对照组。通过免疫组织化学技术检测胃组织福尔马林固定标本的表达情况,分别用细胞质和核染色评估 HuR 表达。比较正常胃组织和胃癌组织中 HuR 表达的差异。探讨 HuR 的表达与临床病理特征之间的关系,并比较不同 HuR 表达患者的生存率差异。通过 COX 模型确定胃癌根治术后预后的影响因素。**结果** 在胃癌组织细胞中,癌细胞核中 HuR 的表达在53 个样本中表达率很高(72.6%;得分 2,$n=33$;得分 3,$n=20$)。癌细胞中的细胞质表达在 20 个样本中表达较高(27.4%;得分 2,$n=13$;得分 3,$n=7$)。与正常胃组织相比,胃癌细胞核和细胞质 HuR 的表达显著增高($Z=5.269$、8.475,$P<0.01$)。在癌细胞核中,未观察到 HuR 表达与临床病理学特征有明显相关($P>0.05$);而在癌细胞质中,观察到 HuR 表达与 TNM 分期、淋巴结转移和肿瘤大小明显相关($P<0.05$)。在细胞质中,HuR 阴性表达患者的中位生存期(54 个月)比 HuR 阳性表达患者(29 个月)更长($P<0.01$)。在细胞核中,HuR 阴性表达患者的中位生存期(52 个月)比 HuR 阳性表达患者(44 个月)长($P=0.016$)。应用多元 Cox 回归模型分析独立预后因素,结果表明细胞质 HuR 蛋白表达、肿瘤大小、淋巴结转移和 TNM 分期是影响患者生存的独立预后因素($P=0.046$、0.041、0.035 和 0.012)。**结论** 细胞质 HuR 表达与胃癌患者的恶性侵袭性和预后显著相关,可作为胃癌根治术后转移的预测指标。

[关键词] 胃癌;人抗原 R;临床病理;胃癌根治术;预后

[中图分类号] R735 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-09-13

Expression of HuR in gastric carcinoma and its relationship with clinicopathology and survival

LEI Hai-feng, KOU Zhen-yu, YAN Lei, WANG Yong-qi (Department of General Surgery, Tongchuan Mining Bureau Central Hospital, Tongchuan Shaanxi 727000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of RNA binding protein HuR in gastric carcinoma and to analyze their clinical significance. **Methods** A total of 73 gastric cancer tissue samples of patients who underwent gastric surgery in Tongchuan mining bureau central hospital from August 2010 to March 2012 were included in this observational study. Meanwhile, 21 patients with normal gastric tissues, who underwent gastrectomy during the same period, were included as control group. All expressions were examined by immunohistochemical

[11] 董 凯,郝鹏杰,周文娟,等. 高压氧对高糖状态下成骨细胞增殖和分化的影响[J]. 中国口腔种植学杂志,2018,23(3):105-108. doi:10.3969/j.issn.1007-3957.2018.03.002.

[12] Yan W, Li X. Impact of diabetes and its treatments on skeletal diseases [J]. Front Med, 2013, 7(1): 81-90. doi: 10.1007/s11684-013-0243-9.

[13] 梁军波. 高血糖对成骨细胞增殖分化影响的实验研究[J]. 医学研究杂志,2012,41(3):117-120. doi:10.3969/j.issn.1673-548X.2012.03.035.

[14] 张金钮,李玉坤. 糖尿病对成骨功能影响[J]. 中华生物医学工程杂志,2013,19(4):338-341. doi:10.3760/cma.j.issn.1674-1927.2013.04.018.

[15] Pan M, Bin G, Wei X, et al. Glimepiride promotes osteogenic differentiation in rat osteoblasts via the PI3K/Akt/eNOS pathway in a high glucose microenvironment[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112243. doi: 10.1371/journal.pone.0112243.

[16] Liang D, Xiang L, Yang M, et al. ZnT7 can protect MC3T3-E1 cells from oxidative stress-induced apoptosis via PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways [J]. Cellular Signalling, 2013, 25(5): 1126-1135. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.02.003.

[17] Yin H, Shi ZG, Yu YS, et al. Protection against osteoporosis by statins is linked to a reduction of oxidative stress and restoration of nitric oxide formation in aged and ovariectomized rats[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 674(2-3): 200-206. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.11.024.

[18] 胡 峰,赵劲民,李晓峰,等. 早期激素性股骨头缺血性坏死模型的建立及半胱天冬酶 3 活性测定[J]. 中国组织工程研究,2010,14(20):3701-3704. doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.20.021.

[19] 张琳琳,张静莹,曲 哲,等. 还原型谷胱甘肽促进高糖成骨细胞的增殖和分化[J]. 中国组织工程研究,2015,19(7):985-990. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.07.001.

[20] 曹小俊,施毕旻,杜 宣,等. 二甲双胍对高糖介导的成骨细胞 MG63 增殖及相关基因表达的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志,2012,28(12):972-974. doi:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2012.12.006.

(编辑:左艳芳)