

• 综 述 •

脱氢表雄酮抗骨质疏松作用的研究进展

李蔚 综述 孙宜萍 审校

脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)由肾上腺皮质网状带中的细胞色素 P450c17 为主酶催化胆固醇合成,主要以 DHEA-S 的形式进入血循环,在相关外周组织中转化为雄激素或雌激素发挥间接生物学效应。DHEA 于出生后随年龄增长而分泌增加,至 20 岁达峰值,之后随年龄的增长而减少。DHEA-S 不仅与衰老及老年病有关,还具有抗动脉硬化、抗糖尿病、抗痴呆和抗炎作用,其抗骨质疏松作用直到上世纪末才日益受到重视。

骨质疏松症是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征,导致骨骼脆性增加和易发生骨折的全身性疾病。正常成人期骨代谢的主要形式是骨重建,在破骨细胞(osteoclast, OC)作用下不断吸收旧骨,在成骨细胞(osteoblast, OB)作用下又合成新骨。骨吸收过多或形成不足引起平衡失调的最终结果导致骨量减少、骨微结构变化,形成骨质疏松。一切影响 OC 和 OB 数目和功能的因素,都与骨质疏松的发生有关。

1 DHEA 抗骨质疏松作用的循证医学证据

Gordon 等^[1]通过对 120 名绝经后女性(51~99 岁)的研究表明,其骨密度和血清 DHEA-S 水平明显相关。患者补充 DHEA 50mg/d 3 个月后,其 DHEA、雌二醇(estradiol, E₂)、睾酮(testosterone, T)及胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)均恢复正常水平,而尿中骨再吸收标志物 N-端交联减少,表明 OC 活性被抑制、溶骨过程停止。血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和骨钙素(bone gla protein, BGP)上升,表明 OB 活性增加,骨质再生开始。

Baulieu 等^[2]采用双盲安慰剂对照试验,280 名老年志愿者(60~79 岁)服用 DHEA 50mg/d 1 年,

结果发现,70 岁以下年龄段老年人体内钙代谢没有明显差异,而 70 岁以上老人经过 DHEA 治疗后,血清磷水平下降。无论是 70 岁以上还是 70 岁以下,85% 的志愿者有不同程度维生素 D 缺乏症,对照组和治疗组没有差异。男性服用 DHEA 后,无论骨密度还是生化指标均没有明显变化,而女性 C 端交联明显下降,BGP 和 ALP 没有变化。

Miller 等^[3]对成年发病的垂体前叶功能减退女性患者,结合血清激素水平进行单变量回归分析,提示雄激素尤其是 DHEA 和游离 T 与骨密度密切相关。Sun 等^[4]予男性骨质疏松患者口服 DHEA-S 100mg/d 6 个月,血中 DHEA-S 和 IGF-1 水平显著升高,L2-L4 及股骨颈的骨密度均比对照组增加。

上述临床研究提示,DHEA 不仅是一种激素的前体,而且具有独立于衍生激素之外对 GHRH-GH-IGF-1 轴系的作用,其抗骨质疏松的效应并不完全通过其衍生激素而发挥。

2 DHEA 抗骨质疏松机制研究进展

2.1 DHEA 和性激素 性激素在调节骨质量和骨转换中起重要作用。骨母细胞存在雄激素受体(androgen receptor, AR),DHEA 在骨母细胞经 3 β -羟甾脱氢酶作用形成雄烯二酮,然后经芳香化酶的作用进一步转化为雌酮、E₂。业已证明,雌激素具有抗骨质疏松作用。Takayanagi 等^[5]体外培养的人成骨细胞实验表明,DHEA 可被细胞内芳香化酶转化为雌激素而发挥维持骨密度作用。多家报道认为,雄激素缺乏是老年男性骨质疏松症的主要原因。雄激素能通过 OB 上的 AR 促进 OB 增殖,合成与分泌多种细胞因子,促使骨基质蛋白和胶原形成,保证骨矿化物质在骨内沉积。目前认为,男性睾酮对骨量的影响可能是通过在骨内代谢为双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)或直接经芳香化酶转化为雌激素,促进 OB 增殖。老年男性原发性骨质疏松症患者雌激素水平降低,可能与芳香化酶不足或活性下降有关^[6]。

雄激素还具有独立于芳香化酶通路以外的效

收稿日期:2006-07-26

作者单位:200233 上海市,上海交通大学附属第六人民医院老年科

作者简介:李蔚,女,1972 年 10 月生,浙江绍兴人,医学学士,在读硕士研究生,主治医师。Tel: 021-64369181 - 8946, E-mail: li-wei@medmail.com.cn

应。除 AR 外,雄激素对骨的作用还可通过雌激素受体 α 介导,二者之间的相互影响迄今尚不清楚^[7]。雄激素对维持骨量有重要意义,但由 DHT 引发的 AR 转活却可以增加再育的成骨细胞前体和成熟的骨细胞凋亡。DHT 通过对转录后水平的调控作用于细胞凋亡调节基因 Bcl-2(具有抗凋亡作用)和 Bax(具有促凋亡作用),消除局部的干扰 RNA,导致 Bcl-2 表达下降,Bax 表达升高,Bax/ Bcl-2 比值上升,从而促进 OB 凋亡,所以,与雌激素不同,雄激素对骨代谢存在双相作用,对维持骨骼的自身稳定有重要的意义^[8]。

2.2 DHEA 和维生素 D Scheven 等^[9]通过体外培养人 OB 研究提示,单独给予 DHEA 和 DHEA-S 对 OB 的生长和分化无影响,但同时给予 1, 25(OH)₂D₃ 能提高特异性 ALP 的活性。Zofkova 等^[10]采用 PCR 技术发现,维生素 D 受体(VDR)基因 FokI、ApaI、TaqI、和 BsmI 等位点与血清 DHEA-S、T、雄烯二酮和 E₂ 有关。经体重和年龄校正后,Ff 基因型的 DHEA-S 水平高于 FF 和 ff 基因型个体。而 Ff 基因型个体髋骨和椎骨的 BMD 最高,结果提示 DHEA/DHEA-S 促进 OB 生长和分化需通过 1, 25(OH)₂D₃ 介导,VDR 基因预示性激素合成前体 DHEA 水平与骨密度平行。

2.3 DHEA 对 OPG/RANKL/RANK 系统的影响

骨保护素(osteoprotegerin, OPG)属于肿瘤坏死因子受体超家族成员,其配体(osteoprotegerin ligand, OPGL)即破骨细胞分化因子(osteoclast differentiation factor, ODF)或 NF- κ B 受体活化因子的配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)。NF- κ B 的活化受体(receptor activator of NF- κ B, RANK)表达于 OC 的前体细胞表面,与 OB、基质细胞表面的 RANKL 结合,启动 OC 的分化和成熟。RANKL, RANK 和 OPG 三者构成了对 OC 分化、活化与凋亡的三角调节关系^[11]。

近年发现人 OPG 基因存在 12 种多态性,尤其在启动子区域的多态性,如 A-163G、T245-G 与骨质疏松密切相关。OPG 基因敲除小鼠可以表现为 OC 形成过多导致的骨质疏松^[12]。能刺激 OB 高表达 OPG mRNA 的因素包括 1, 25(OH)₂D₃、雌激素、转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)、骨形成蛋白-7(bone morphogenetic protein-7)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、高浓度的 Ca²⁺ 和瘦素等;抑制成骨细胞 OPG mRNA 表达的

因素有地塞米松、甲状旁腺素(parathyroid hormone)、前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)、高浓度 1, 25(OH)₂D₃、脑啡肽类似物 ICI-182 及免疫抑制剂等^[13]。绝经后骨质疏松的发病机制就是在雌激素缺乏状态下 IL-1、PGE₂、IL-6、TNF- α 和巨噬细胞-集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)等多种细胞因子共同作用于 OPG 和 ODF 的结果。多种“上游”激素和细胞因子通过调节“下游”的 ODF 和 M-CSF 而起作用,提示 OC 分化的调节机制非常精确有效^[14]。

ODF 具有可相互转换的两种活性形式,一种为膜结合形式(40~45ku),另一种为可溶性形式(31ku),这两种活性形式可以解释已知的 OC 形成时所需要的条件。ODF 在应答细胞上的受体即 RANK(TNF 受体家族成员)是一种 I 型跨膜蛋白。具有 RANK 的破骨细胞前体通过与成骨细胞/干细胞的相互作用,识别 ODF,并在 M-CSF 的作用下分化为 OC。成熟的 OC 也可产生 RANK,并与 ODF 作用,激活转录因子 NF- κ B 和 c-Jun 氮末端激酶(JNK),从而促进骨吸收。因此,RANK 介导的 NF- κ B 和 JNK 的活化是 OC 形成与活化的关键^[15]。在原始骨髓细胞和巨噬细胞系 RAW264.7,雌激素可抑制转录因子 c-Jun 的水平和功能,使 JNK 不能被激活,从而抑制 OC 的分化^[16]。

所以,OC 数量增加是一系列细胞因子共同作用的结果。ODF、RANK 和 OPG 是调节 OC 形成和功能的 3 个关键分子。王玉东等^[17]在体外培养小鼠 OB 和 OC 的基础上,证实 DHEA 可以增进 OB 对 OPG/RANKL 的表达,而且只有当 OB 存在时,DHEA 可以抑制 OC 的骨吸收作用,但 DHEA 不能直接抑制 OC 的破骨作用。

2.4 DHEA 和 IGF-1 IGF-1 基因是雌激素作用的靶器官,IGF-1 介导雌激素对骨的作用。IGF-1 是依赖于生长激素(growth hormone)的多肽蛋白,由 70 个氨基酸残基组成一级多肽链。它与骨骼中受体结合发生受体自身磷酸化后激活酪氨酸蛋白酶,促使胰岛素受体底物的磷酸化,从而调节细胞的生长、增殖和代谢^[18]。IGF-1 还具有特异结合蛋白(IGF-BP1~6),通过与 IGF-1R 竞争性结合方式改变 IGF-1 的作用,调节不同组织细胞代谢。IGF-1 对参与骨转换的所有细胞均具有刺激有丝分裂和(或)启动分化的活性,尤其增加 OB 数目和功能^[19]。

雌激素和生长激素可引起占 IGFBP 活性 95%

的IGFBP3增多,与激素促进骨细胞生长、IGF-1分泌一致。反之雌激素缺乏,生长激素分泌减少引起血清IGF-1和IGFBPs水平下降,骨转化异常^[20]。DHEA可刺激IGF-1 mRNA的表达,提高IGF-1的浓度^[21]。DHEA-S和IGF-1水平与椎骨及髌骨的T评分显著相关^[22]。

2.5 DHEA和白介素(IL) 白介素包括IL-1、IL-2、IL-6、IL-11等。IL-1受雌激素的调节不仅可诱导破骨细胞前体(osteoclast precursor, OCP)分化为成熟的OC并将其激活以促进骨吸收,而且可刺激OC产生大量的胶原酶,以促进骨吸收过程中基质的降解。IL-1还促进其他细胞因子如IL-6、IL-11和白血病抑制因子(leucocyte inhibitory factor, LIF)等的产生,这些因子的信号由IL-6受体的信号传导链gp-130介导。IL-11和LIF可诱导破骨细胞的形成,也参与雌激素缺乏促进骨吸收的过程。IL-1也可作为OC活性增强因子直接作用于OC^[23]。Gordon等^[24]发现在纤维囊性骨病患者中,IL-1b和骨密度呈负相关。

IL-6为多功能的细胞因子,是介导破骨细胞性骨吸收的中心因子。许多全身激素和局部因子均作用于OB或骨髓基质细胞而调节IL-6的形成,通过IL-6间接作用于OC,如雌激素、雄激素、PTHrp、TGF、IL-1、TNF。IL-6通过与膜表面受体的作用,刺激OCP分化为成熟的OC。IL-6受体由两部分组成,其一为80 ku亚单位的配基结合链,即可溶性IL-6受体(sIL-6R);另一为信号传导链,即gp-130。IL-6先与sIL-6R结合,再与gp-130形成复合体,促进OC的形成^[24]。雌激素不仅直接抑制IL-6 mRNA的表达,而且还间接抑制IL-1和TNF启动子的活性,使IL-1、TNF及IL-6减少^[25]。动物实验表明,DHEA-S可能是通过激活IGF-1和(或)抑制IL-6发挥促生长作用。随着年龄的增长,DHEA-S和IGF-1的水平显著降低,IL-6水平显著升高,DHEA-S与IGF-1呈正相关,与IL-6负相关^[22]。但是,Hierl等^[26]通过体外人原代OB培养证实DHEA并不能抑制OB分泌IL-6。所以,DHEA通过IL介导影响骨代谢的作用和机制有待进一步研究。

2.6 DHEA抗骨质疏松的可能机制 (1)TNF- α : TNF- α 是目前已知的由单核细胞和巨噬细胞产生最强的骨吸收刺激因子,并且抑制成骨,直接促进OCP有丝分裂,还可间接激活成熟的OC,增强其吸收功能,呈现出对骨的快速分解效果。雌激素缺乏时,由单核细胞产生的TNF- α 和由淋巴细胞产生的

TNF- β 增多,可间接激活成熟的OC,并与IL-1一起共同促进其他细胞因子的产生,如IL-6、GM-CSF和M-CSF^[27]。因此,就OC的发生而言,TNF和IL-1被视为“上游”的细胞因子,可诱导产生“下游”的细胞因子,共同促进OCP增殖。其结果是,TNF和IL-1的轻微变化就可诱导产生大量的OC。TNF和IL-1在绝经后早期的骨丢失阶段起主要作用。有研究首先证明具有高骨转换率的骨质疏松妇女外周血单核细胞培养液中IL-1的活性比低骨转换率的正常对照者要高得多。随后,他们又发现这些妇女外周血单核细胞培养液中IL-1和TNF的总量明显升高,而在绝经后立即接受雌激素替代治疗者则不出现这种情况^[28]。(2)M-CSF: M-CSF在OCP的增殖和分化方面起关键作用。M-CSF与OCP上的受体(c-Fms)结合,有利于细胞的存活并融合为成熟的OC。Tsurukai等^[29]通过对造血干细胞分化为OCP和OCP分化为成熟OC的实验研究发现,OB支持的OCP和成熟OC的形成均被OPG抑制,但是当造血干细胞培养液中同时加入可溶性的OPG和M-CSF,即使在缺乏OB的条件下,OCP也能形成,并且在48h内OCP发育为成熟OC。所以,M-CSF和OB产生的OPG是OCP和成熟OC形成的两个必要因素。Pacifice等^[25]发现,正常妇女卵巢切除后,M-CSF随着雌激素的下降而上升。(3)血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF): Niida等^[30]对op/op鼠(一种由于基因突变引起M-CSF缺乏而导致骨硬化症的动物模型)注射重组人VEGF后发现,OC得以恢复,其作用和M-CSF相当。进一步研究提示,此种作用通过VEGF受体-1介导,并可被抗VEGF抗体抑制。Kodama等^[31]对op/op鼠行卵巢切除术后发现,股骨的松质骨体积减少,OC数量显著增加,血清VEGF浓度升高,这一作用也被VEGF拮抗剂抑制。因此,雌激素可以调节VEGF的产生,并进一步调节OC的形成及其活性。(4)TGF- β : TGF- β 能刺激OB表达OPG,抑制OPGL mRNA的表达^[32]。在胚胎发育期和出生后,TGF- β 超家族成员——骨形成蛋白和TGF- β 亚型共同参与软骨和骨的分化。在非人灵长类中,成骨蛋白-1和TGF- β_1 被证明是异位软骨成骨诱导作用的诱导剂和调节剂,两者的最佳比例为30:1^[33]。雌激素或DHEA是否通过TGF- β 介导而发挥抗骨质疏松的作用目前尚无研究。

如前所述,DHEA可被细胞内芳香化酶转化为雌

激素从而发挥作用,因此,DHEA 在体内转化为雌激素后是否通过 TNF- α 、M-CSF、VEGF、TGF- β 等细胞因子而对 OC 或 OB 产生影响有进一步探索的必要。

3 未来的研究方向和展望

DHEA 具有抗骨质疏松的作用目前已有不少循证医学依据,但同雌激素相比,在其作用机制方面的研究还较少,尤其是对细胞因子的作用。从理论上讲,DHEA 在细胞内被转化为雌激素,进而发挥生物学效应,但其究竟对哪些细胞因子起作用及起何种作用目前正在研究中,这也是今后的研究方向。与此同时,过多补充 DHEA 可能会带来一系列并发症,如痤疮、肝脏损害及某些性激素相关的肿瘤发病增加等,所以如何选择合适的人群、合理的剂量和疗程,以及扩大受试对象观察其不良反应等,尚待进一步探讨^[34]。

参 考 文 献

[1] Gordon CM, Grace E, Emans SJ. et al. Changes in bone turnover markers and menstrual function after short-term oral DHEA in young women with anorexia nervosa. *J Bone Miner Res*, 1999, 14:136-145.

[2] Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEA study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:4279-4284.

[3] Miller KK, Biller BMK, Hier J, et al. Androgens and bone density in women with hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87:2770-2776.

[4] Sun YP, Mao MW, Sun LH, et al. Treatment of osteoporosis in men using dehydroepiandrosterone sulfate. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115:402-404.

[5] Takayanagi R, Goto K, Suzuki S, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) as a possible source for estrogen formation in bone cells: correlation between bone mineral density and serum DHEA-sulfate concentration in post menopausal women, and the presence of aromatase to be enhanced by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ in human osteoblasts. *Mech Aging Dev*, 2002, 123: 1107-1114.

[6] Van Pottelbergh I, Goemaere S, Kaufman JM. Bioavailable estradiol and an aromatase gene polymorphism are determinants of bonemoneral density changes in men over 70 years of age. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 3075-3081.

[7] Lindberg MK, Vandenput L, Moverare Skrtic S, et al. Androgens and the skeleton. *Minerva Endocrinol*, 2005,30: 15-25.

[8] Wiren KM, Toombs AR, Semirale AA, et al. Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *Bone*, 2006, 38:637-651.

[9] Scheven BA, Milne JS. Dehydroepiandrosterone(DHEA) and DHEA-S interact with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1, 25(OH)₂D₃) to stimulate human osteoblastic cell differentiation. *Life Sci*, 1998, 62:59-68.

[10] Zofkova I, Hill M, Zajickova K. Dehydroepiandrosterone status in postmenopausal women is determined by the gene for the vitamin D receptor. *Horm Metab Res*, 2002, 34: 127-131.

[11] Gonzales EA. The role of cytokines in skeletal remodeling: possible consequences for renal osteostrophy. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15: 945-950.

[12] Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*, 2000,289: 1509-1514.

[13] Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, et al. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*, 2002, 17: 1245-1255.

[14] Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 2000,289:1504-1508.

[15] Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necroses factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 256: 449-455.

[16] Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, et al. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Sci USA*, 2000, 14: 7829-7834.

[17] 王玉东,李大金,高兼军. 脱氢表雄酮抑制骨吸收的作用机制. *中国药学杂志*, 2004, 39:429-431.

[18] Myers MG Jr, Sun XJ, Cheatham B, et al. IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor- I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology*, 1993,132:1421-1430.

[19] Hock JM, Centrella M, Canalis E. IGF-I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*, 1988, 122 :254-259.

[20] 舒强. 骨质疏松与胰岛素样生长因子. *国外医学内分泌学分册*. 2000, 20:21-23.

[21] Ribeiro MF, Garcia Segura LM. Dehydroepiandrosterone regulates insulin-like growth factor-1 system in adult rat hypothalamus. *Endocrine*, 2002, 17:129-134.

行,从小量活动开始,逐渐增加。对一般患者,每日至少进行中等强度(如快走、慢跑、骑自行车、爬山、打球等)活动 30min,中等强度活动 1h,可消耗热量约 150 千卡。每周宜增加运动 150min,增加到 250~300min/周,运动即受益,活动增加获益增加,最好户外活动,并充分利用工作中和家务劳动进行锻炼,最大限度地减少久坐静坐的不良生活方式,通过锻炼消耗热量,第 1 年体重应下降 5%~10%,轻度的体重下降也能使患者获益,应避免晚餐过量,晚饭后进行一定量的活动,可有效减轻体重,体重下降 1 公斤,血压下降 1/0.8mmHg,体重下降同时伴有血脂、血糖、促炎高凝异常状态的改善和血管事件的降低,预防或减少骨质疏松症,还能增强机体免疫力,降低感染性疾病和肿瘤的发生。

保持乐观情绪,心理健康和平衡,避免过度紧张和焦虑,对代谢综合征的防治也是必不可少的,通过暗示心理压力的减轻可能使代谢综合征的发病率下降。吸烟可加速代谢综合征及相关疾病的发生和发

展,应强调戒烟。

对生活方式的干预仍难以控制的高血压、糖尿病、血脂紊乱和肥胖者,应在专业医师的指导下进行药物治疗,切忌以为有了药物就可以放松饮食与运动的干预治疗。对血压 $\geq 130/85$ mmHg 的患者,可选用钙拮抗剂、血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素 II 受体拮抗剂等治疗。对脂代谢异常者应当根据患者的危险分层,制定控制的靶目标,应首选他汀类使低密度脂蛋白胆固醇达标,如甘油三酯重度增高 ≥ 500 mg/dl,可诱发急性坏死型胰腺炎,应首选贝特类药物降甘油三酯。血糖和糖化血红蛋白增高者可选用二甲双胍、胰岛素增敏剂等药物,这些药物可通过纠正血压、血糖和纤溶系统等异常,改善血管内皮功能、减轻炎症反应等机制,发挥抗动脉粥样硬化的作用,具有潜在的器官保护意义。

不良的生活方式是代谢综合征形成的土壤,血管等并发症则是代谢综合征的恶果,从改变不良的生活方式入手,积极控制代谢综合征。

(上接第 214 页)

[22] Haden ST, Glowzcki J, Hurwitz S, et al. Effect of age on serum dehydroepiandrosterone sulfate, IGF-I, and IL-6 level in women. *Calcif Tissue Int*, 2000,66: 414-418.

[23] Udagawa N. Mechanisms involved in bone resorption. *Biogerontology*, 2002,3:79-83.

[24] Gordon CM, BinelloE, Leboff MS, et al. Relationship between insulin-like growth factor I, dehydroepiandrosterone sulfate and proresorptive cytokines and bone density in cystic fibrosis. *Osteoporos Int*, 2006,17:783-790.

[25] Pacifice R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miners Res*, 1996,11: 1043-1051.

[26] Hierl T, Borsok I, Sommer U, et al. Regulation of interleukin-6 expression in human osteoblastic cells *in vitro*. *Exo Clin Endocrinol Diabetes*, 1998,106:324-333.

[27] Kimble RB, Bain S, Pacifici R. The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*, 1997,12:935-941.

[28] Lorenzo J. Interactions between immune and bone cells; new insights with many remaining questions. *J Clin Invest*, 2000,106:749-752.

[29] Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K, et al. Roles

of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Bone Miner Metab*, 2000, 18:177-184.

[30] Niida S, Kaku M, Amano H, et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med*, 1999, 190:293-298.

[31] Kodama I, Niida S, Sanada M, et al. Estrogen regulates the production of VEGF for osteoclast formation and activity in op/op mice. *J Bone Miner Res*, 2004, 19: 200-206.

[32] 钱莹. OPG/RANKL/RANK 系统的研究进展. *国外医学泌尿系统分册*,2003, 23:748-750.

[33] Matsaba T, Ramashebi LN, Crooks J, et al. Transforming growth factor-beta 1 supports the rapid morphogenesis of heterotopic endochondral bone initiated by human osteogenic protein-1 via the synergistic up-regulation of molecular markers. *Growth Factors*, 2001, 19: 73-86.

[34] Whelan AM, Jurgens TM, Bowles SK. Natural health products in the prevention and treatment of osteoporosis: systematic review of randomized controlled trials. *Pharmacotherapy*, 2006, 17: 836-849.