

阿司匹林对体外培养骨髓基质细胞成骨性分化的影响

冯 靖 桑宏勋[△] 白建萍 秦国良 张振宇

(第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨阿司匹林对骨髓基质细胞成骨性分化的影响。**方法:**培养 SD 大鼠骨髓基质细胞(BMSCs),传代 3 次后进行成骨诱导分化,诱导培养基中加入不同浓度阿司匹林(0.5、1、2、5、10mmol/L),同时设立对照组。采用 cck-8 法分析细胞增殖情况。比较阿司匹林组与对照组在细胞碱性磷酸酶(ALP)活性、骨钙素(OC)分泌量、钙结节染色等方面的成骨性差异。**结果:**阿司匹林无促进细胞增殖活性,而高浓度阿司匹林能够强烈抑制细胞增殖。0.5、1、2 mmol/L 浓度阿司匹林可促进 BMSCs 的成骨性分化,中低浓度组碱性磷酸酶含量、骨钙素分泌量在不同阶段显著高于对照组。14 天茜素红染色可见中低浓度组钙结节数量高于对照组。**结论:**中低浓度阿司匹林作用于骨髓基质细胞可促进其成骨细胞特性表达,这表明阿司匹林有促进骨代谢合成的作用。

关键词:阿司匹林;骨髓基质干细胞;成骨分化;骨质疏松

中图分类号:Q95-3,R965,R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-448-04

Effects of Aspirin on Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells into Osteoblasts in Vitro

FENG Jing, SANG Hong-xun[△], BAI Jian-ping, QIN Guo-liang, ZHANG Zhen-yu

(Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of aspirin on differentiation of marrow stromal cells (MSCs) into osteoblast in vitro. **Methods:** Bone marrow stromal cells of 7 days old SD rats were cultured. After 3 times of passages, the cells were induced to osteogenic differentiate in mediums that contained 0.5, 1, 2, 5, 10mmol/L aspirin separately, and control group was establish. The cell proliferation was assayed by CCK-8 method. The osteogenic differentiation markers including alkaline phosphatase (ALP) activity, osteocalcin secretion and mineralized bone modulus between the Aspirin groups and the control were compared. **Results:** Aspirin didn't stimulate the proliferation of BMSCs, and high concentration of aspirin had the inhibited effect. 0.5, 1, 2 mmol/L aspirin stimulated the osteogenic differentiation of BMSCs. In different phase, alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretory volume in low and medium concentration of aspirin groups was higher than that of the control group. Alizarin red stain for calcium nodule in aspirin groups was far more than that in control group in 14 days. **Conclusions:** Low and medium concentration of aspirin stimulated the osteogenic differentiation of BMSCs, which indicated that aspirin had the ability to enhance the bone metabolism activity.

Key words: Aspirin; Bone marrow stromal cells; Osteogenic differentiation; Osteoporosis

Chinese Library Classification: Q95-3, R965, R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)03-448-04

前言

原发性骨质疏松是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征的,致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。骨质疏松症是一种年龄相关性疾病,人口老龄化程度越高,患病人数越多。我国目前是世界人口大国,亦是老年人口绝对数量最多的国家。按调查估算全国 2006 年在 50 岁以上人群中,约有 6,944 万人(男 1,534 万,女 5,410 万)患有骨质疏松症,约 21390 万人存在低骨量(男 10,043 万,女 11,347 万)^[1]。目前,骨质疏松性骨折的治疗包括外科干预、积极应用药物治疗及功能锻炼等。治疗骨质疏松药物种类很多,但存在诸多问题,如副作用较大,费用较高等等。近些年来,根据相关报道及流行病学调查发现阿司匹林能够提高老年人骨密度^[2,3]。阿司匹林是

一个常用药物,不但副作用较少、廉价,而且治疗疾病范围广泛。因此探讨阿司匹林对骨质疏松的作用及其机制具有重大意义。但目前系统的阿司匹林治疗骨质疏松的实验研究报导较少见,其具体的作用机制尚不清楚。本实验通过体外诱导培养骨髓基质细胞成骨,研究阿司匹林对其成骨性的影响,并初步探讨其相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

1.1.1 实验动物 1 周龄 SD 大鼠,雌雄不限,第四军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 CCK-8 细胞增殖检测试剂(日本同仁化学研究所),碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),骨钙素 Elisa 测定试剂盒(GBD 公司),阿司匹林(Sigma 公司),DMED-L G 培养液(Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone 公司), β -甘油磷酸钠、抗坏血酸、地塞米松、胰蛋白酶均为 Gibco 公司。

1.1.3 培养液配置 ①基础培养液:DMEM 低糖培养基(含 15%

作者简介:冯靖(1985-),男,硕士研究生,主要研究方向:脊柱外科、骨质疏松,电话:029-84772132, E-mail:kissesfj@163.com

[△]通讯作者:桑宏勋,硕士生导师,副教授, E-mail:hxsang@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-11-07 接受日期:2010-11-30)

胎牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100mg/L)。②成骨诱导培养液:基础培养液(10%胎牛血清)中加入 10mmol/L β -甘油磷酸钠、50mg/L 抗坏血酸、10-8mmol/L 地塞米松。③含不同浓度阿司匹林的成骨诱导培养基:成骨诱导培养液中各加入不同量的阿司匹林(低浓度组:0.5mmol/L;中浓度组:1、2mmol/L;高浓度组:5、10mmol/L)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 大鼠 BMSCs 分离 取 1 周龄 SD 大鼠,颈椎脱臼处死,75%乙醇浸泡 10min,无菌条件下取出双侧股骨、胫骨,除去骨表面附着的软组织,无菌 PBS 冲洗干净后剪去两端骨髓,显露骨髓腔,用 1ml 注射器无菌 PBS 冲出骨髓,收集冲洗液,1500r/min,离心 8 分钟,弃去上清液,加入基础培养基,反复吹打均匀,制成单细胞悬液。

1.2.2 大鼠 BMSCs 培养与传代 将单细胞悬液接种于培养瓶中,置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度下培养。48h 后半量换液,去除未贴壁的造血细胞,以后每 2-3 天全量换液一次。待细胞融合铺满瓶底 80%以上后,加入 0.25%胰蛋白酶消化,按 1:2 比例传代。

1.2.3 大鼠 BMSCs 成骨诱导分化培养 第三代 BMSCs 以 5×10^4 /孔、 5×10^3 /孔密度分别接种于 6 孔板和 96 孔板,24h 后细胞贴壁,吸去基础培养基,PBS 冲洗 1 次后,实验组加入含不同浓度阿司匹林的成骨诱导培养液,对照组加入等量的不含阿司匹林的成骨诱导培养液,每 2-3 天换液一次。

1.2.4 细胞增殖测定(CCK-8 法) 96 孔板培养板接种的细胞分别于诱导第 1、2、3、6、9、12 天时各取一板,吸去各孔内培养液,PBS 洗涤 3 次,每孔按 1:9 比例加入 CCK-8 及基础培养基共 100ul,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度下孵育 2h,终止培养,30 分钟内在波长 450nm 酶标仪上读取各孔 OD 值,以培养时间为横坐标,OD 值为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.5 碱性磷酸酶活性测定 在 96 孔板培养板接种的细胞,分别于诱导第 3、6、9、12、15 天时取各孔上层培养液 100ul,按照试剂盒说明书进行碱性磷酸酶含量测定,并转换为 ALP 含量(金氏单位/100 ml)。

1.2.6 骨钙素分泌量测定 于开始诱导培养后每 3 天更换 1 次培养液,于第 6、9、12、15 天留取旧培养液 100ul,冻存于 -80℃,样品收集齐后按照试剂盒说明书进行测定。

1.2.7 钙结节染色 6 孔培养板于第 14 天时,吸去各孔内培养液,PBS 冲洗 2 次,95%乙醇固定 10min,双蒸水冲洗 3 次,0.1%茜素红-Tris-Hcl 37℃,30min。蒸馏水冲洗,镜下观察染色结果。

1.3 统计学分析

所有资料采用 SPSS 13.0 软件进行统计处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm SD$)形式表示,多个样本均数比较用方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

2.1.1 原代 BMSCs 培养 单细胞悬液中可见较大单核细胞,12-24h 后大部分球形细胞开始贴壁,培养液中可见少量悬浮的造血细胞,通过换液可清除,48h 后贴壁细胞明显增多,并开始分裂增殖,细胞呈短梭形、类圆形、多角形或不规则形,并出现细胞集落。此后细胞集落数目增加、体积增大。12-14 天细胞融合成单层,铺满瓶底 80%以上。

2.1.2 传代 BMSCs 培养 传代细胞多为圆形,24h 内开始贴壁、铺展,较原代细胞体积增大,细胞漩涡状生长,呈梭形或多角形,细胞核椭圆形或圆形。传代后细胞增殖速度增快,6-9d 细胞铺满瓶底。

2.2 细胞生长曲线

诱导培养后 1-2 天细胞数量无明显变化,为细胞的潜伏适应期;第 3 天起细胞数量开始增加,第 9 天细胞数量达到最大,为细胞对数生长期;以后细胞数目稍有下降,进入平台期。低中浓度组对细胞增殖无明显促进作用,但高浓度组对细胞增殖产生强烈抑制作用,传代细胞逐渐脱壁,5-6 天全部脱壁,细胞崩解。

2.3 碱性磷酸酶活性测定

对照组与中低浓度组第 3 天的 ALP 活性无显著区别;第 6 天低浓度组与对照组无明显区别,中浓度组显著高于对照组;第 9、12、15 天的 ALP 活性中低浓度组均显著高于对照组,中浓度组 ALP 活性高于低浓度组,组内无明显区别。随诱导时间的延长,逐渐增高,于第 12 天达到最高峰,之后趋于下降。高浓度阿司匹林组因细胞脱壁未测。

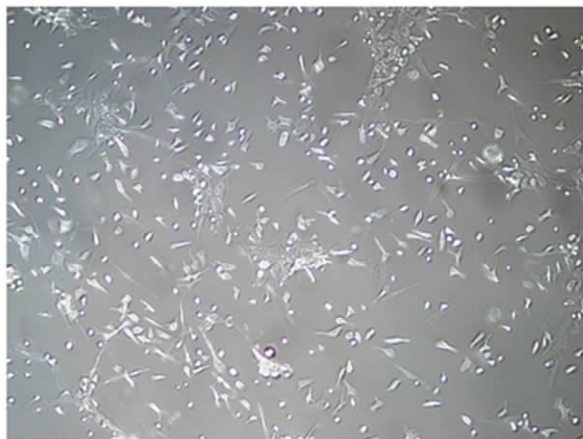


图 1 原代细胞

Fig. 1 Primary Cells

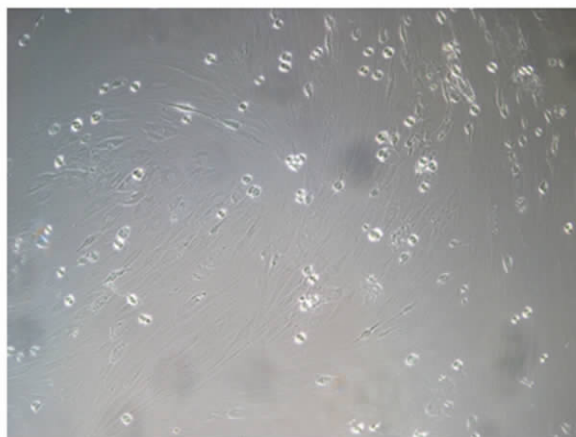


图 2 传代细胞

Fig. 2 Passage Cells

表 1 阿司匹林对骨髓基质干细胞 ALP 活性的影响
Table 1 The effect of Aspirin on ALP activities of BMSCs

Aspirin solution (mmol/L)	N	ALP content(King/100 ml)				
		3d	6 d	9 d	12 d	15 d
0	6	0.20± 0.02	0.51± 0.03	0.66± 0.03	0.90± 0.04	0.84± 0.04
0.5	6	0.20± 0.01	0.53± 0.04 [▲]	0.80± 0.03 [▲]	1.01± 0.03 [▲]	0.98± 0.03 [▲]
1	6	0.20± 0.02 ^{▲●}	0.64± 0.03 ^{▲●}	1.00± 0.06 ^{▲●}	1.30± 0.03 ^{▲●}	1.26± 0.02 ^{▲●}
2	6	0.21± 0.03 ^{▲●}	0.65± 0.04 ^{▲●}	1.07± 0.05 ^{▲●}	1.32± 0.07 ^{▲●}	1.30± 0.03 ^{▲●}

Note : [▲] P <0.05 Aspirin groups compared with control group; [●] P <0.05 Medium concentration of aspirin group compared with low concentration of aspirin group

2.4 细胞内骨钙素分泌量测定

骨钙素是成骨分化重要标志蛋白之一。诱导培养第 6、9、12、15 天骨钙素分泌量,中低浓度组明显高于对照组,差异具

有统计学意义,中浓度组 OC 含量高于低浓度组,组内无明显区别。随着培养时间的延长,各组骨钙素分泌量均持续增加。

表 2 阿司匹林对骨髓基质干细胞 OC 分泌量的影响
Table 2 The effect of Aspirin on OC content of BMSCs

Aspirin solution (mmol/L)	N	OC content(ng/ml)			
		6d	9d	12d	15d
0	5	1.51± 0.04	3.01± 0.10	4.49± 0.13	5.47± 0.12
0.5	5	2.51± 0.08 [▲]	4.01± 0.14 [▲]	6.03± 0.09 [▲]	7.00± 0.13 [▲]
1	5	3.49± 0.08 ^{▲●}	6.00± 0.12 ^{▲●}	7.49± 0.12 ^{▲●}	8.52± 0.11 ^{▲●}
2	5	3.51± 0.07 ^{▲●}	6.00± 0.13 ^{▲●}	7.51± 0.14 ^{▲●}	8.53± 0.13 ^{▲●}

2.5 钙结节染色结果

诱导培养 14 天后茜素红染色,BMSCs 经诱导,可形成钙结

节,细胞密集部出现圆形红染。低浓度阿司匹林组钙化结节书显著多于对照组。

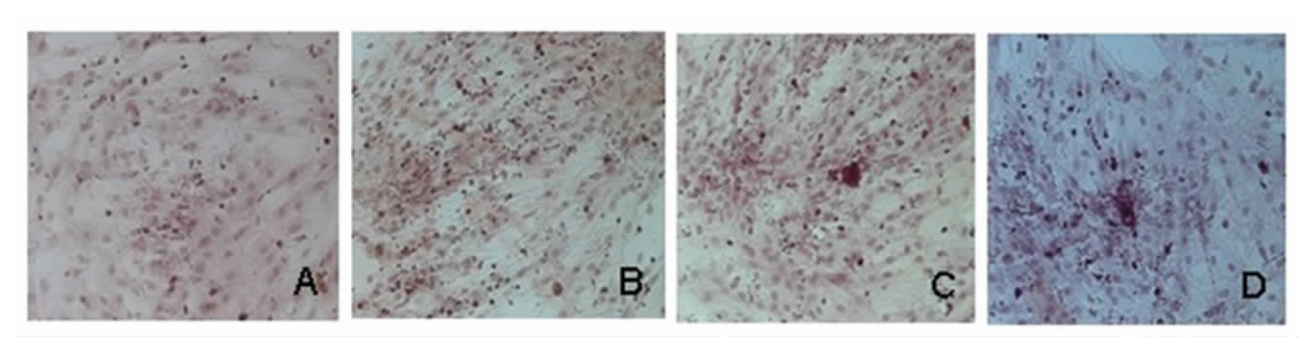


图 3 成骨诱导 14 天后茜素红钙结节染色:A:对照组;B:0.5mmol/L 阿司匹林组;C:1mmol/L 阿司匹林组;D:2mmol/L 阿司匹林组
Fig. 3 Alizarin red stain for calcium nodus 14 days following osteogenic induction;A: Control group; B: 0.5mmol/L aspirin group; C: 1mmol/L aspirin group; D: 2mmol/L aspirin group;

3 讨论

骨质疏松发生的机制现在还不清楚,但目前考虑与 T 细胞有关。据美国科学院报 PNAS 报道,去势骨质疏松模型小鼠骨髓内有更多的 T 细胞及活化 T 细胞(产生 TNF),转移 T 细胞到去势的 T 细胞缺失小鼠体内能够使小鼠的骨质发生流失而导致骨质疏松作,并认为分泌 TNF 的 T 细胞增加可能是绝经后骨质疏松发生的关键分子机制^[9]。另一组关于慢性肠炎与骨质损伤的研究表明,患有肠炎的患者常常伴有骨量减少,增加骨质疏松症风险,增加与此相关的脆弱性骨折发病率^[5]。据报

道,T 细胞转移到去势小鼠体内能够使小鼠的骨质发生流失而导致骨质疏松作用^[6,7]。转移 CD4⁺CD45RB^{hi} T 细胞到免疫缺损的受体中能使机体患结肠炎^[8]。与此相反,转移 CD4⁺CD45RB^{low} T 细胞人不仅不会引起结肠炎,反而能起预防肠炎^[9]。虽然破骨细胞和成骨细胞对低骨量的肠炎患者的确切作用机制仍不清楚,特别是是否激活 T 细胞而影响成骨祖细胞的祖细胞,仍需进一步进行研究^[9-11]。Yamaza T 等^[6]在研究阿司匹林对骨质疏松的作用时采用 T 细胞转移到去势小鼠体体,证实了 CD4⁺CD45RB^{hi} T 细胞可以导致骨髓间质干细胞损伤,正是这个机制导致骨质疏松症的发生。Kataoka T 等^[12]发现在

死亡骨髓间质干细胞的体内有 Fas 抗原,因此认为 T 细胞和骨髓间质干细胞的相互作用是通过 Fas / FasL 的信号途径而导致骨质疏松症的,认为这可能是骨质疏松发病机制的关键。

目前研究表明骨髓基质干细胞表达 FAS 抗原,活化的 T 淋巴细胞在直接细胞共培养系统中能够促使 BMSCs 细胞凋亡,然而在间接细胞共培养系统则无此作用^[6]。相比之下,穿孔素通路,另一个重要的 T 淋巴细胞诱导细胞凋亡的机制,并不能介导活化 T 淋巴细胞诱导 BMSC 细胞凋亡^[13]。此外,在 FAS 突变的 BMSC 细胞中,活化的 T 淋巴细胞并不能诱导细胞凋亡。因此 T 细胞和骨髓间质干细胞的相互作用是通过 Fas / FasL 的信号途径而导致骨质疏松症的,认为这可能是骨质疏松发病机制的关键^[6,14]。最新研究表明,雌激素对骨质的保留或保护作用是通过成骨细胞 FasL 表达调节与破骨细胞的动态平衡,从而维持正常骨量^[15]。而绝经后骨质疏松的发生,需要 Fas 受体(CD95)的参与其中,提示 Fas 可以作为治疗骨质疏松的一潜在靶向目标^[16]。

抗成骨细胞凋亡或改进成骨细胞功能是一种治疗骨质疏松症有效的方法^[17]。阿司匹林可以预防和治疗多种疾病,副作用较少并且廉价,如能老药新用,有效对抗各种骨质疏松症,其意义将十分重大,将有非常良好的应用前景^[18]。阿司匹林有多种生物学途径,但目前还未能阐明阿司匹林治疗骨质疏松详细的功能机制。Yamaza T 等^[9]通过研究发现阿司匹林可能存在多种与治疗骨质疏松的生物学途径:阿司匹林能够抑制 Fas 抗体诱导骨髓间质干细胞的死亡;阿司匹林抑制去势小鼠成纤维细胞集落单位的生成和诱导骨髓间质干细胞的增殖;阿司匹林稍有提高骨髓间质干细胞端粒酶活性和长度^[19],阿司匹林的这种机制影响骨的新陈代谢似乎与某种成骨基因表达的增加如 Runx2 有关,Chae YM 等^[20]认为 Runx2 通过刺激 BMP2 形成而防止骨质疏松;体外阿司匹林治疗可以阻止 RANKL 诱导的骨质疏松,Fonseca JE^[21]通过实验认为提高 OPG/RANKL 比率可以抑制破骨细胞的活性;体外阿司匹林治疗能加速退化磷酸 β - 蛋白的降解,因而增加了 Wnt 信号的水平,这是一个公认的促进成骨途径。

本研究发现低浓度阿司匹林具有促进骨髓基质细胞成骨的特性。从生长曲线上中低浓度阿司匹林没有明显促进细胞增殖的作用,但高浓度阿司匹林对细胞增殖产生强烈抑制作用。ALP、OC 均为骨髓基质细胞向成骨方向分化的早期重要标志,钙化结节是成骨细胞分泌的胶原亲合钙盐而成,是成骨细胞分化成熟的重要标志。结合 ALP、OC 指标,阿司匹林可以显著促进骨髓基质细胞成骨,但是中浓度阿司匹林效果优于低浓度阿司匹林。从钙结节染色中,阿司匹林组钙结节数明显高于对照组。高浓度对骨髓基质细胞的杀伤作用,考虑与阿司匹林浓度过高,导致培养液 pH 下降,不利于细胞生存有关。

本实验结果表明,阿司匹林在一定浓度下能够促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化,有可能成为治疗骨质疏松的新型药物之一。但其治疗骨质疏松详细的功能机制以及能否直接作用于成骨细胞以促进成骨细胞的增殖、成熟、矿化,尚需做进一步研究。

参考文献(References)

[1] Zhu H, Fang J, Luo X, et al, Bone mass epidemiology: bone mass

change and mean peak bone mass for mainland China. Proceeding of International Osteoporosis Conference China bone and joint decade [C]. Oct19~21st, 2007, 4-18

- [2] Carbone LD, Tylavsky FA, Cauley JA, et al. Association between bone mineral density and the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and aspirin: impact of cyclooxygenase selectivity [J]. Bone Miner Res, 2003, 18:1795-1802
- [3] Bauer DC, Orwoll ES, Fox KM, et al. Aspirin and NSAID use in older women: effect on bone mineral density and fracture risk. Study of Osteoporotic Fractures Research Group [J]. Bone Miner Res, 1996,11 (1):29-35
- [4] Roggia C, Gao Y, Cenci S, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24):13960-5
- [5] Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases [J]. World Gastroenterol, 2006, 14;12(30):4819-31
- [6] Yamaza T, Miura Y, Bi Y, et al. Pharmacologic Stem Cell Based Intervention as a New Approach to Osteoporosis Treatment in Rodents [J]. PLoS ONE, 2008, 3(7): 2615-2624
- [7] Kovacic N, Lukić IK, Grcević D, et al. The Fas/Fas ligand system inhibits differentiation of murine osteoblasts but has a limited role in osteoblast and osteoclast apoptosis [J]. Immunol, 2007, 178 (6): 3379-89
- [8] Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25 (+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation [J]. Exp Med, 2000, 92(2):295-302
- [9] Powrie F, Leach MW, Mauze S, et al. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. [J]. Int Immunol, 1993,5(11):1461-71
- [10] Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, et al. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells[J]. Exp Med, 1993,178(1):237-44
- [11] Sylvester FA. IBD and skeletal health: children are not small adults. [J]. Inflamm Bowel Dis, 2005, 11(11):1020-3
- [12] Kataoka T, Shinohara N, Takayama H, et al. Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity [J]. Immunol, 1996, 156(10):3678-86
- [13] Kogianni G, Mann V, Ebetino F, et al. Fas/CD95 is associated with glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis. [J]. Life Sci, 2004,75: 2879-2895
- [14] Kovacic N, Lukić IK, Grcević D, et al. The Fas/Fas ligand system inhibits differentiation of murine osteoblasts but has a limited role in osteoblast and osteoclast apoptosis [J]. Immunol, 2007, 178 (6): 3379-89
- [15] Krum SA, Miranda CGA, Hauschka PV, et al. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival [J]. EMBO, 2008, 27(3):535-45

(下转第 488 页)

- Xiao Cheng-han, Zhao Jian-wei, He Feng-xian. Nuclear type research of 3 kinds crucifer[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 1995.13 (3):283-286
- [12] Saranya Srisuwan, Darasinh Sihachakr, Sonja Siljak-Yakovlev The origin and evolution of sweet potato (Ipomoea batatas Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches Plant [J]. Science 171,2006, 424-433
- [13] 白文林, 马力. Ag-NORs 多态性及其在动物遗传育种研究中的应用[J]. 西南民族学院学报·自然科学版, 2000,26(3)
- Bai Wen-lin, Ma Li. Ag-NORs Polymorphism and Its Applications in Studies of Animal Genetics and Breeding [J]. Journal of Southwest University for Nationalities(Natrual Science Edition), 2000,26(3)
- [14] 徐延浩, 杨飞, 程有林, 马璐, 王建波, 李立家. 45S rDNA 和 5S rDNA 在南瓜、丝瓜和冬瓜染色体上的比较定位 [J]. 遗传,2007,29(5): 614-620
- Xu Yan-hao, Yang Fei, Cheng You-lin, Ma Lu, Wang Jian-bo, Li Li-jia. Comparative analysis of rDNA distribution in metaphase chromosomes of Cucurbitaceae species[J]. Hereditas, 2007,29(5): 614-620
- [15] Liu Bo, Chen Cheng-Bin, Li Xiu-Lan, Qi Li-Wang, Han Su-Ying. Karyotype analysis and physical mapping of 45S rDNA in eight species of Sphora, Robinia and Amorpha[J]. Acta Botanica Yunnanica, 2005, 27(3):261-268
- [16] 徐川梅, 别同德, 王春梅, 周波, 陈佩度. 45S rDNA 在小麦及其近缘物种染色体上的分布[J]. 遗传,2007,29(9):1126-1130
- Xu Chuan-mei, Bie Tong-de, Wang Chun-mei, Zhou Bo, Chen Pei-du. Distribution of 45S rDNA sequence on chromosomes of Triticum aestivum and its relative species [J]. Hereditas,2007,29(9): 1126-1130
- [17] Hutchinson J, Miller TE. The nucleolus organizers of tetraploid and hexaploid wheats revealed by in situ hybridization [J]. Theor Appl Genet, 1982, 61: 285-288
- [18] Liu Z L, Zhang D, Hong D Y, Wang XR. Chromosomal localization of 5S and 18S-5.8S-25S ribosomal DNA sites in five Asian Pines using fluorescence in situ hybridization [J]. Theor A ppl Genet, 2003,106 (2):198-204

(上接第 451 页)

- [16] Kovacic N, Grcevic D, Katavic V, et. al. Fas receptor is required for estrogen deficiency-induced bone loss in mice. [J]. Lab Invest, 2010, 90(3):402-13
- [17] Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. [J]. Clin Invest, 2006, 116(5):1202-9
- [18] Songtao S, Takayoshi Y, Kentaro A. Is aspirin treatment an appropriate intervention to osteoporosis [J]. Fut Rheumatol, 2008, 3 (6): 499-502
- [19] Bode-Böger SM, Martens LJ, Täger M, et al. Aspirin reduces endothelial cell senescence [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005,334(4):1226-32
- [20] Chae YM, Heo SH, Kim JY, et al. HUpreulation of smpd3 via BMP2 stimulation and Runx2.M, Cho JY [J]. BMB Rep, 2009, 42(2): 86-90
- [21] Fonseca JE. Rebalancing bone turnover in favour of formation with strontium ranelate: implications for bone strength. [J]. Rheumatology (Oxford), 2008,47,4: 17-19