

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.010

磷离子对 BM-hMSCs 增殖及成骨分化的影响 *

雷 群¹ 陈 江^{1△} 林恒章² 黄文秀¹ 吴 东¹ 杨 静¹

(1 福建医科大学附属口腔医院 福建 福州 350000; 2 福建省级机关医院口腔科 福建 福州 350000)

摘要 目的:探讨磷离子对人骨髓来源的间充质干细胞(Human bone marrow mesenchymal stem cells, BM-hMSCs)增殖及成骨分化的影响。**方法:**从 ScienCell 实验室购买的 BM-hMSCs 分别在无血清生长培养基(对照组)和添加 4mmol(4P 组)、8mmol(8P 组)磷离子的无血清生长培养基中培养 21 天,通过 CCK8 比色法评估细胞的增殖情况;RT-PCR 检测成骨分化标记性基因胶原蛋白 I、骨钙素、碱性磷酸酶的表达水平;茜素红染色检测 BM-hMSCs 成骨分化产生的矿化结节。**结果:**在培养 4、7、14 天时,4P 和 8P 组中 BM-hMSCs 的增殖都明显高于对照组,且 8P 组中 BM-hMSCs 的增殖高于 4P 组;培养 21 天时,4P 和 8P 组中 BM-hMSCs 的增殖明显低于对照组。与对照组相比,在培养 7 天时,4P 和 8P 组 OC 的表达下调,而 14、21 天时,OC 的表达上调。4P 和 8P 组中 ALP 的表达水平与对照组无明显差异。7 天时,4P、8P 组 Col I 的表达水平均明显高于对照组;14 天时,8P 组 Col I 的表达水平与对照组表达无明显差异;21 天时,4P、8P 组中 Col I 的表达水平都均与对照组表达无明显差异。培养 21 天时,4P、8P 组矿化结节的形成明显增加。**结论:**磷离子在早期可以促进 BM-hMSCs 的增殖,晚期诱导其成骨分化。

关键词:磷离子;骨髓间充质干细胞;增殖;成骨分化

中图分类号:R78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)35-6839-04

Study on the Effect of P Ion on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of BM-hMSCs*

LEI Qun¹, CHEN Jiang^{1△}, LIN Heng-zhang², HUANG Wen-xiu¹, WU Dong¹, YANG Jing¹

(1 School and Hospital of Stomatological, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, 350000, China;

2 Department of stomatology, Fujian provincial hospital, Fuzhou, Fujian, 350000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of P ion on proliferation and differentiation of BM-hMSCs. **Methods:** BM-hMSCs purchased from ScienCell Research Laboratories were subjected to serum free growth medium (control group) and serum free growth medium with additional 4mmol Pi(4P) or 8mmol Pi(8P) for 21d. CCK8 colorimetric method was used to assess the cellular proliferation; RT-PCR was used to examine the mRNA expression of osteogenic marker genes, including alkaline phosphatase, collagen type I and osteocalcin; Alizarin Red-S method was used to study the mineralization of BM-hMSCs. **Results:** The proliferation of BM-hMSCs significantly increased in 4P and 8P groups in day 4, 7 and 14 whereas decreased in day 21 compared to that in the control group. The proliferation of BM-hMSCs was more obvious in 8P group. The mRNA expression of OC was down-regulated in 4P and 8P groups in day 7 whereas the mRNA expression of OC was up-regulated in day 14 and 21 compared to control group. The mRNA expression of ALP in 4P and 8P group was not different with that in control group. The mRNA expression of collagen type I significantly increased in 4P group in day 7 and 14, but only increased in 8P group in day 7. The formation of mineralization nodules in BM-hMSCs were obvious in both 4P and 8P groups in day 21. **Conclusion:** Our data indicated that Pi could promote proliferation at an early stage and induced osteogenic differentiation of BM-hMSCs at late stage.

Key words: P Ion; Bone marrow mesenchymal stem cells; Proliferation; Osteogenic differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6839-04

前言

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种在体外能进行反复自我复制、并保持其生物学性能特别是多向分化潜能的细胞。在不同因素的诱导刺激下, MSCs 可以向不同的

细胞系分化生长。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 因其独特的优势近年来也引起了研究者的广泛关注^[1-3]。扩增人的间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs) 特别是人骨髓来源的间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, BM-hMSCs) 后通过

* 基金项目:2012 年福建省临床重点专科项目资助(闽卫科教[2012]149 号)

作者简介:雷群(1982-),女,博士,医师,口腔医学

△通讯作者:陈江,电话:18805900619, E-mail: dentistjiangchen@163.com

(收稿日期:2014-07-26 接受日期:2014-08-24)

基因疗法或者构建骨组织工程用于骨组织再生或骨组织缺损修复的方法成为了当前研究的热点。而我们所面临的一个重要挑战是确定促进 BM-hMSCs 增殖和成骨分化的因素和途径。

磷是人体骨骼无机成分的主要组成部分,而骨骼中含有全身 80% 的磷^[4]。人工合成的各种含磷骨粉及支架材料因具有良好的生物相容性和机械性能,已被广泛用于口腔及整形外科的骨缺损修复。以支架材料复合种子细胞构建的组织工程骨较传统的填充材料在修复程度、修复速度、新生骨形态等方面具有更多的优越性,是骨组织工程学的重要研究内容,也是近年来的研究热点。了解骨粉、支架材料组成成分对种子细胞生物学行为与功能的影响对于更好的构建组织工程骨至关重要。以往关于磷离子(Pi)对其它干细胞的作用研究表明,4 mmol、8 mmol 的 Pi 对干细胞的调控作用相对明显^[5,7],但多数采用含血清的培养基进行细胞培养研究。血清的成分复杂,可能对研究结果有一定的影响,而且不同的物种对同一种材料的反映也不尽相同^[8]。因此,本研究选择在没有血清培养基培养条件下,探讨 4 mmol、8 mmol 的 Pi 对 BM-hMSCs 增殖及成骨分化的影响,以期未来更合理的应用磷材料提供更多的参考依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人骨髓间充质干细胞(美国 ScienCell),间充质干细胞生长培养基-无血清(美国 ScienCell),间充质干细胞完全培养基(美国 ScienCell),二水氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)(上海恒远),二水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)(上海恒远),二水磷酸氢钠($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)(上海恒远),CCK8 试剂盒(北京泰泽瑞达),Trizol 试剂盒(美国 Gibco),引物(上海博亚),反转录酶(美国 Invitrogen),SYBR Green I 荧光染料(美国 Biotium),茜素红(上海恒远)

1.2 主要仪器

液氮罐(上海赛岐),-80℃低温冰箱(德国 Heraeus HFU586),CO₂培养箱(德国 Heraeus BB622002),超净工作台(北京半导体设备厂 JJT-1300),全自动酶标仪(美国 BIO),CFX96 实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad),倒置显微镜(日本 Olympus)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 对照组 (GM): BM-hMSCs+ 间充质干细胞生长培养基-无血清

4P 组:BM-hMSCs+4mM Pi+ 间充质干细胞生长培养基-无血清

8P 组:BM-hMSCs+8mM Pi+ 间充质干细胞生长培养基-无血清

1.3.2 Pi 离子溶液的制备 普通培养液中的 Pi 主要来源于 NaH_2PO_4 ,但添加不同浓度的 NaH_2PO_4 将会对培养液 pH 值构成显著影响,因此本试验参照文献方法^[9],将 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 按 1:4 的摩尔比溶解于 Hepes 缓冲液制成 Pi 浓度为 400 和 800 mmol 的母液,通过孔径为 200 目筛网过滤。用无血清间充质干细胞生长培养基稀释母液配制成为 Pi 浓度为 4 和 8 mmol 的培养液。

1.3.3 BM-hMSCs 的复苏和传代 从液氮罐中取出 BM-hMSCs 的冻存管,置于 37℃温水中溶解,吸出细胞悬液,注入 EP 管中

并加入合适体积的完全培养基,低速离心,弃上清,重复一次。离心得到的 BM-hMSCs 在 5% CO₂、37℃培养箱培养,每 3 天更换培养液。BM-hMSCs 达到 80%汇合时以 1:3 传代,传至第三代时用于实验。

1.3.4 BM-hMSCs 增殖的测定 将 BM-hMSCs 以细胞密度 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 96 孔培养板内,每组设 5 个平行孔,共 3 组 15 孔。4 天、7 天、14 天、21 天,每个时间点设置一块培养板,共 4 板。37℃,5%CO₂ 培养 24 小时使细胞贴壁后去除原培养基,添加 4 mmol 或 8 mmol Pi 的无血清生长培养基和单纯的无血清生长培养基,各 200μL,每 3 天换相应的培养液一次。在培养 4、7、14、21 天时,分别取相应培养板,去除原培养基,将无血清生长培养液与 CCK8 溶液按 10:1 的比例混合,每孔加入 150μL CCK-8 混合培养液,继续培养 5 小时,检测 450 nm 波长下的 OD 值。计算细胞的相对增长率 $P\% = \text{OD 实验组} / \text{OD 对照组} \times 100\%$ 。

1.3.5 定量 RT-PCR 检测 将 BM-hMSCs 以细胞密度 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 3 块 6 孔板,37℃,5%CO₂ 培养 24 小时使细胞贴壁后去除原培养基,添加 4 mmol Pi 或 8 mmol Pi 的无血清生长培养基和单纯的无血清生长培养基,各 2 ml,每 3 天换相应的培养液一次,培养 21 天。PCR 引物序列由上海博亚生物技术有限公司合成。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)引物序列:5'-AACATCAGGGACATTGACGTG-3' (正义链),5'-GTATCTCGGTTTGAAGCTCTTCC-3' (反义链);I 型胶原蛋白(collagen type I, COL I)引物序列:5'-GAGGGCCAAGACGAAGACATC-3' (正义链),5'-CAGATCACGTCATCGCAACAAC-3' (反义链);骨钙素(osteocalcin, OC)引物序列:5'-CACTCCTCGCCCTATTGGC-3' (正义链),5'-CCCTCCTGCTTGACACAAAG-3' (反义链);内参磷酸甘油醛脱氢酶(Phosphoric acid glycerol aldehyde dehydrogenase protein, GAPDH)引物序列:5'-GAGTCAACGGATTGGACGT-3' (正义链),5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3' (反义链)。细胞总 RNA 抽提按 Trizol RNA 试剂盒的操作说明进行,总 RNA 反转录,调节不同样本的 cDNA 模板量,以每 25 μL PCR 反应体系加 1 μL 模板。定量 PCR 扩增不同样品的 cDNA,以 GAPDH 为内参,采用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪扩增并检测目的基因。计算机分析 Ct 值,样品中基因表达相对值表示为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.3.6 茜素红矿化结节染色 将 BM-hMSCs 以细胞密度 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 24 孔板,37℃,5%CO₂ 培养 24 小时使细胞贴壁后去除原培养基,添加 4 mmol 或 8 mmol Pi 的无血清生长培养基和单纯的无血清生长培养基,每 3 天换相应的培养液一次。培养 21 天,弃去培养上清液,用 PBS 缓冲液冲洗 2 遍,加入 95%乙醇固定 10 分钟,再用蒸馏水冲洗 3 次,风干,倒置显微镜下观察。将 0.5%茜素红-Tris-HCl(PH8.3)加入培养孔中,在 37℃恒温条件下放置 30 分钟弃去染液,用蒸馏水冲洗干净,观察染色情况。

1.4 统计学分析

利用 SPSS16.0 分析实验数据,计量资料数据统一表示为均数±标准差($\bar{x} \pm s$),方差齐时通过单因素方差分析,两组间的比较采用 SNK-q 检验,方差不齐时通过秩和(χ^2)检验分析, $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Pi 对 BM-hMSCs 增殖的影响

在培养 4 天、7 天、14 天时,4P 和 8P 组中 OD 值明显高于

对照组;21 天时,低于对照组,说明 4P 和 8P 组中 BM-hMSCs 的增殖在培养 4 天、7 天、14 天时都明显高于对照组,且 8P 组中 BM-hMSCs 的增殖高于 4P 组;21 天时,4P 和 8P 组中 BM-hMSCs 的增殖明显低于对照组(见表 1、图 1)。

表 1 Pi 对 BM-hMSCs 增殖的影响(OD 值)

Table 1 The effects of Pi on the proliferation of BM-hMSCs(OD)

	GM	4P(P%)	8P(P%)	P(4P/8P)
4d	0.094± 0.006	0.166± 0.004*(177%)	0.174± 0.004**(185%)	<0.05
7d	0.148± 0.008	0.217± 0.003**(147%)	0.271± 0.008**(183%)	<0.01
14d	0.250± 0.005	0.393± 0.006**(157%)	0.405± 0.006**(162%)	<0.05
21d	0.210± 0.011	0.123± 0.006**(59%)	0.091± 0.005**(43%)	<0.01

注:* P<0.05, **P<0.01 与对照组比较。

Note:*P<0.05, ** P<0.01 compared with control group.

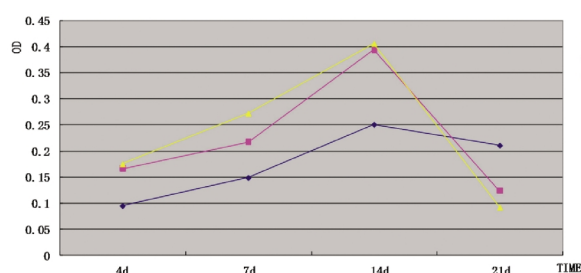


图 1 Pi 对 BM-hMSCs 增殖的影响

Fig. 1 The effects of Pi on the proliferation of BM-hMSCs

2.2 Pi 对 BM-hMSCs 中 OC、COL I 及 ALP mRNA 表达水平的影响

与对照组相比,BM-hMSCs 在添加 4 mmol 和 8 mmol Pi 的培养基培养 7 天时,OC 的表达下调;培养 14 天、21 天时,OC 的表达明显上调(见表 2)。4P 和 8P 组中 ALP 的表达水平与对照组无明显差异(见表 3)。7 天时,4P、8P 组 Col I 的表达水平均明显高与对照组;14 天时,8P 组 Col I 的表达水平与对照组表达无明显差异;21 天时,4P、8P 组中 Col I 的表达水平均与对照组表达无明显差异(见表 4)。

表 2 Pi 对 OC 表达的影响(2^{-ΔΔCt})

Table 2 The effects of Pi on the expression of OC(2^{-ΔΔCt})

	4P	8P	P
7d	0.40± 0.18*	0.42± 0.03*	>0.05
14d	60.14± 26.02**	75.59± 20.89**	>0.05
21d	68.04± 29.17*	66.10± 29.46*	>0.05

注:与对照组比较 *P<0.05;与对照组比较 **P<0.01。

Note:*P<0.05 compared with control group; ** P<0.01 compared with control group.

表 3 Pi 对 ALP 表达的影响(2^{-ΔΔCt})

Table 3 The effects of Pi on the expression of ALP(2^{-ΔΔCt})

	4P	8P	P
7d	5.27± 4.34	4.55± 3.75	>0.05
14d	6.19± 4.66	5.64± 3.85	>0.05
21d	1.34± 0.49	1.01± 0.21	>0.05

表 4 Pi 对 COL I 表达的影响(2^{-ΔΔCt})

Table 4 The effect of Pi on the expression of COL I(2^{-ΔΔCt})

	4P	8P	P
7d	133.18± 19.76**	163.25± 7.38**	>0.05
14d	13.77± 6.73*	10.69± 7.29	>0.05
21d	1.86± 0.79	1.79± 1.14	>0.05

注:与对照组比较 *P<0.05;与对照组比较 **P<0.01。

Note:*P<0.05 compared with control group; ** P<0.01 compared with control group.

2.3 Pi 对 BM-hMSCs 矿化结节形成的影响

培养 21 天时,肉眼观察和显微镜 200 倍镜下观察茜素红矿化结节染色,可见 4P、8P 组形成多处红染矿化结节,而对照组未见任何红染矿化结节(图 2、3),表明 BM-hMSCs 可在 4 mmol 或 8 mmol Pi 诱导下成骨分化,并形成细胞外矿化结节。

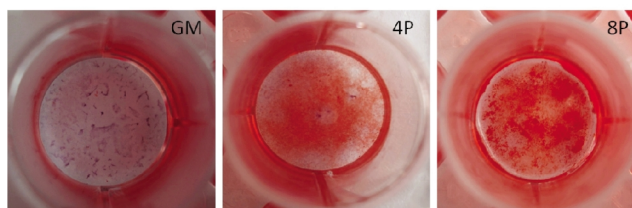


图 2 茜素红矿化结节染色

Fig. 2 Mineralized nodules staining by alizarin red

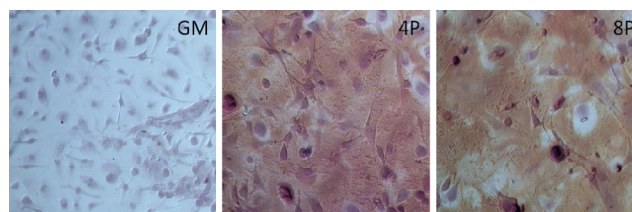


图 3 显微镜下观察茜素红矿化结节染色(× 200)

Fig. 3 Mineralized nodules staining by alizarin red under microscope(× 200)

3 讨论

BM-hMSCs 是具有多向分化潜能的间充质干细胞,是近年

来受到研究者广泛关注适用于骨组织工程的种子细胞^[10-12],如何诱导其定向分化成骨是目前其应用于骨组织工程所面临的重大困难。而磷是目前大多数商用骨粉和支架材料共同含有的物质,也是矿化骨组织的重要组成成分之一,在调节细胞生物过程如复制、分化、矿化、凋亡方面都起着重要作用^[13,14]。了解磷对 BM-hMSCs 增殖和定向成骨的作用可以更合理利用其为构建骨组织创造一种新的途径,但迄今为止,关于 Pi 对 BM-hMSCs 的作用尚未完全阐明。由于血清的成分复杂,为避免其影响,本实验建立在体外无血清培养条件下,通过检测干细胞增殖及成骨分化过程中表达的一些特定指标来探讨 Pi 对 BM-hMSCs 增殖和成骨分化的调控作用,旨在为优化 BM-hMSCs 在骨组织工程、骨再生中的应用提供理论基础。

MSCs 的成骨分化过程一般包括以下几个阶段:首先,在各种促成骨的生长因子或激素的刺激下, MSCs 复制,增生,转化为成骨母细胞;随着 ALP 的表达升高,成骨母细胞复制受到抑制,分化形成前成骨细胞和成熟的成骨细胞,分泌细胞外基质;随后细胞外基质出现聚集,矿化沉淀^[15,16]。本研究中,4 mmol/L 和 8 mmol/L Pi 培养 BM-hMSCs 4 天、7 天、14 天时,其增殖均明显高于对照;培养 21 天时,其增殖均明显低于对照,表明在前期时, Pi 可以促进 BM-hMSCs 的明显增殖,而后期 BM-hMSCs 可能进入分化、矿化阶段。

ALP 是组织非特异性多功能酶,广泛分布于人体各组织,能催化核酸分子脱掉 5' 磷酸基团;水解含磷基质增加局部环境的磷酸根;拮抗抑制矿化因子焦磷酸盐作用促进骨矿化。Ca²⁺、Pi 在 ALP 作用下沉积在胶原上完成骨基质矿化。ALP 是细胞成骨分化的早期标志物,在启动和加强基质矿化中扮演着重要角色^[17,18]。本实验中,4 mmol/L 和 8 mmol/L Pi 培养 BM-hMSCs 7 天、14 天、21 天时,其 ALP 的表达与对照组均无明显差异。究其原因,可能是因为外部补充的 Pi 已经能满足基质矿化的需要,而减少了对 ALP 作用使局部 Pi 增加的需要。COLI 是成骨分化早期的标志物,是矿化的胞外基质的主要有机成分,可达到总的有机成分的 90 % 左右^[19]。骨基质中除了主要的胶原蛋白,还包含一些非胶原蛋白,如 OC。OC 又名 γ - 羧基谷氨酸蛋白,占骨组织中非胶原蛋白的 15 %^[20],是惟一只在成骨细胞中表达的特异性标志物。该蛋白可以通过其特有的谷氨酸序列选择性地与羟基磷灰石和胶原联系在一起,形成钙沉积;可以调节矿化晶体增长速度和体积,是细胞分化晚期的标志物^[21]。本研究结果显示,4 mmol/L 和 8 mmol/L Pi 培养 BM-hMSCs 在相应的时间点上调成骨分化早期基因 COL I 和晚期基因 OC 的表达水平。此外,矿化结节检测结果显示,4 mmol/L 和 8 mmol/L Pi 培养的 BM-hMSCs 都有矿化结节生成,而对照组未见红染矿化结节,说明 BM-hMSCs 即使在无血清培养条件下也可在 Pi 诱导下成骨分化,生成矿化结节。

总之,本研究结果表明,即使在无血清培养条件下, Pi 不仅可以刺激种子细胞 BM-hMSCs 的增殖,同时可以诱导 BM-hMSCs 的成骨分化,是一种具有骨诱导性的化学物质,是适合构建骨组织工程学的材料。本研究为诱导种子细胞 BM-hMSCs 的定向成骨分化提供了一种方法,有助于骨组织工程学的构建。但 Pi 促进种子细胞 BM-hMSCs 的增殖与诱导其定向成骨分化的作用机制目前尚不清楚,有待下一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics [J]. *Ann Rev Biomed Eng*, 2010, 12: 87-117
- [2] Asari S, Itakura S, Ferreri K, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation [J]. *Experimental Hematology*, 2009, 37 (5): 604-615
- [3] Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, et al. The immunosuppressive effects of human bone marrow derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function [J]. *Cell Immunol*, 2008, 251(2): 131-136
- [4] Bonjour JP. Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health [J]. *J Am Coll Nutr*, 2011, 30(5): 438-448
- [5] Chai YC, Roberts SJ, Schrooten J, et al. Probing The Osteoinductive Effect of Calcium Phosphate by Using An in Vitro Biomimetic Model [J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(7-8): 1083-1097
- [6] Chai YC, Roberts SJ, Van Bael S, et al. Multi-Level Factorial Analysis of Ca²⁺/Pi supplementation as Bio-instructive Media for in Vitro Biomimetic Engineering of Three-Dimensional Osteogenic Hybrids [J]. *Tissue Eng Part C*, 2012, 18(2): 90-103
- [7] McCullen SD, Zhan J, Onorato ML, et al. Effect of varied ionic calcium on human adipose-derived stem cell mineralization [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(6): 1971-1981
- [8] Siddappa R, Mulder W, Steeghs I, et al. cAMP/PKA signaling inhibits osteogenic differentiation and bone formation in rodent models [J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(8): 2135-2143
- [9] Honda Y, Anada T, Kamakura S, et al. Elevated extracellular calcium stimulates secretion of bone morphogenetic protein 2 by a macrophage cell line [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345 (3): 1155-1160
- [10] Ciciarello M, Zini R, Rossi L, et al. Extracellular purines promote the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the osteogenic and adipogenic lineages [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(7): 1097-1111
- [11] Gaebel R, Furlani D, Sorg H, et al. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e15652-15652
- [12] Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability [J]. *Cell Transplant*, 2011, 20 (6): 797-811
- [13] Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, et al. Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone Mineralization [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(12): 4465-4474
- [14] Julien M, Magne D, Masson M, et al. Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(2): 530-537
- [15] Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, et al. Bone regeneration and stem cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(4): 718-746
- [16] Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease [J]. *Nat Med*, 2007, 13(7): 791-801
- [17] Orimo H, Shimada T. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 315(1-2): 51-60

DC 表型和自身因子分泌的机制如果能进一步认识, 可以为过敏性哮喘治疗提供一种新的手段。

参 考 文 献(References)

- [1] Saleh AM, Ali HA, Ahmed SA. House dust mites: a risk factor to be considered for occupational safety or source of work-related allergens [J]. J Egypt Soc Parasitol, 2013, 43(3): 669-678
- [2] Huang HJ, Lin YL, Liu CF, et al. Mite allergen decreases DC-SIGN expression and modulates human dendritic cell differentiation and function in allergic asthma [J]. Mucosal Immunol, 2011, 4(5): 519-527
- [3] 孔存权, 彭霞, 白萍, 等. 尘螨粗提浸液致敏小鼠的方法学研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2010(6): 528-531
Kong Cun-quan, Peng Xia, Bai Ping, et al. Construction of Asthma Model with Different Way and Their Comparison [J]. International J of laboratory medicine, 2010(6): 528-531
- [4] Broide DH, Finkelman F, Bochner BS, et al. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010 [J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 127(3): 689-695
- [5] Gill MA. The role of dendritic cells in asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(4): 889-901
- [6] Charbonnier AS, Hammad H, Gosset P, et al. Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response [J]. J Leukoc Biol, 2003, 73(1): 91-99
- [7] Morel PA, Feili-Hariri M, Coates PT, et al. Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions [J]. Clin Exp Immunol, 2003, 133(1): 1-10
- [8] Lombardi V, Akbari O. Dendritic cell modulation as a new interventional approach for the treatment of asthma [J]. Drug News Perspect, 2009, 22(8): 445-451
- [9] Hayashi Y, Ishii Y, Hata-Suzuki M, et al. Comparative analysis of circulating dendritic cell subsets in patients with atopic diseases and sarcoidosis [J]. Respir Res, 2013, 5(4): 14-29
- [10] Chen XQ, Yang J, Hu SP, et al. Increased Expression of CD86 and Reduced Production of IL-12 and IL-10 by Monocyte-Derived Dendritic Cells from Allergic Asthmatics and Their Effects on Th1- and Th2-Type Cytokine Balance [J]. Respiration, 2006, 73(1): 34-40
- [11] Kurts C. CD11c: not merely a murine DC marker, but also a useful vaccination target [J]. Eur J Immunol, 2008, 38(8): 2072-2075
- [12] van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, et al. In vivo depletion of lung CD11c (+) dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma [J]. J Exp Med, 2005, 201(6): 981-991
- [13] Boks MA, Kager-Groenland JR, Haasjes MS. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC [J]. Clin Immunol, 2012, 142(3): 332-342
- [14] Wu K, Bi Y, Sun K, et al. IL-10-Producing Type 1 Regulatory T Cells and Allergy [J]. Cellular & Molecular Immunology, 2007, 4(4): 269-275
- [15] Amodio G, Gregori S. Human tolerogenic DC-10: perspectives for clinical applications [J]. Transplant Res, 2012, 1(1): 1-14
- [16] Fogel M, Long JA, Thompson PJ, et al. Dendritic cell maturation and IL-12 synthesis induced by the synthetic immune-response modifier S-28463 [J]. J Leukoc Biol, 2002, 72(12): 932-938
- [17] Machida K, Inoue H. Airway immune responses in asthma [J]. Arerugi, 2013, 62(12): 1565-1574
- [18] Zedan MM, El-Chennawi FA, Fouda AE. Interleukin-12 and peripheral blood invariant natural killer T cells as an axis in childhood asthma pathogenesis [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2010, 9(1): 43-48
- [19] Ebner S, Ratzinger G, Krösbacher B, et al. Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4 [J]. J Immunol, 2001, 166(1): 633-641
- [20] Vuillefroy SR, Coulon F, Poirier N, et al. Transplant tolerance is associated with reduced expression of cystathionine- γ -lyase that controls IL-12 production by dendritic cells and TH-1 immune responses [J]. Blood, 2012, 119(11): 2633-2643
- [20] Price PA, Otsuka AA, Poser JW. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing Protein from bone [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, 73(5): 1447-1445
- [21] Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption [J]. Cell Biol Int, 1994, 6: 17-18

(上接第 6842 页)

- [18] Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, et al. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process [J]. Acta Biochim Pol, 2003, 50(4): 1019-1038
- [19] Shi S, Kirk M, Kahn AJ. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype [J]. J Bone Miner Res, 1996, 11(8): 1139-1145