

microRNA-494 通过 TLR-4 通路抑制成骨细胞分化及基质矿化的分子机制

匡嘉兵, 徐昊*, 张克良, 沈波, 许闫严

(武汉市普爱医院暨华中科技大学同济医学院附属普爱医院, 西院骨一科, 武汉 430030)

【摘要】 目的 探讨 microRNA-494 (miR-494) 通过 Toll 样受体 4 (TLR-4) 通路抑制成骨细胞分化及基质矿化的分子机制。**方法** 选用小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 作为体外模型, 采用 miR-494 mimic 转染小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1, 采用 qRT-PCR 法测定 miR-494 在小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后的表达情况; 通过 MTT 法检测转染前后小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 的增殖情况; 通过测定碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性, 研究小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 的分化情况; 通过骨钙素 (osteocalcin, OC) 定量检测分析和 Von Kossa 钙化染色检测小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 的基质矿化情况; 通过 Western blot 等检测转染前后 TLR-4 蛋白的表达差异。**结果** qRT-PCR 测定结果显示, 与阴性对照组相比, 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染后的 miR-494 的 mRNA 的表达量升高 ($P < 0.05$), 说明 miR-494 mimic 转染小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1, 成功使 miR-494 过表达。与阴性对照组相比, 经过 miR-494 mimic 转染后, 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 的增殖能力受到抑制 ($P < 0.05$)。转染后的小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中 ALP 的活性降低 ($P < 0.05$)。同时, 转染后的小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中 OC 的活性显著降低 ($P < 0.05$), 矿化结节的数目、减少 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, 与阴性对照组相比, miR-494 mimic 转染组细胞中的 TLR-4 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** miR-494 能够通过 TLR-4 通路抑制小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 的增殖活力, 降低细胞中 ALP、OC 的活力, 减少成骨细胞中的矿化结节数, 抑制成骨细胞分化及基质矿化。

【关键词】 microRNA-494; 成骨细胞; 基质矿化; TLR-4

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0055-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.009

MicroRNA-494 inhibits osteoblast differentiation and matrix mineralization through the TLR-4 pathway

KUANG Jiabing, XU Hao*, ZHANG Keliang, SHEN bo, XU Yanyan

(Department of orthopedics, Wuhan Pu AI hospital (Pu Yu Hospital Affiliated to Huazhong University of Science and Technology), Wuhan 430030, China)

【Abstract】 Objective In this study, the molecular mechanism by which microRNA-494 inhibits osteoblast differentiation and matrix mineralization through the TLR-4 pathway was examined. **Methods** The mouse osteoblast strain MC3T3-E1 was selected as an in vitro model, which was transfected with miR-494 mimic. The expression of miR-494 before and after this transfection was determined by qRT-PCR. The proliferation of MC3T3-E1 before and after transfection

[作者简介] 匡嘉兵, (1983—), 男, 学士, 专业: 成骨分化研究。E-mail: 9592662@qq.com

[通信作者] 徐昊, (1969—), 男, 学士, 专业: 骨科研究。E-mail: jmxhf@163.com

was also detected by MTT assay, while the differentiation was studied by measuring ALP activity. In addition, matrix mineralization of this cell line was determined by quantitative detection of osteocalcin (OC) and Von Kossa calcification staining. Finally, the difference of TLR-4 protein expression before and after transfection was determined by Western blotting. **Results** Compared with that in the negative control group, the mRNA expression of miR-494 after transfection of the mouse osteoblast cell line MC3T3-E1 was significantly increased ($P < 0.05$). The result showed that miR-494 mimic was transfected into this cell line and successfully led to the overexpression of miR-494. Compared with the negative control group, after transfection with miR-494 mimic, the proliferative capacity of mouse MC3T3-E1 osteoblasts was inhibited ($P < 0.05$). ALP activity in MC3T3-E1 was also significantly decreased after transfection ($P < 0.05$), indicating that the differentiation ability of MC3T3-E1 cells was inhibited. At the same time, the activity of OC in MC3T3-E1 was significantly decreased after transfection ($P < 0.05$) and the number of mineralized nodules was also significantly decreased ($P < 0.05$), which indicated that the overexpression of miR-494 inhibited the mineralization of matrix in these cells. Western blot result showed that TLR-4 protein expression was significantly increased in cells transfected with miR-494 mimic, compared with that in the negative control group ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-494 could inhibit the proliferative activity of the mouse osteoblast line MC3T3-E1 through the TLR-4 pathway, reduce the activity of ALP and OC in cells, decrease the number of mineralized nodules in osteoblasts, and inhibit osteoblast differentiation and matrix mineralization.

[Keywords] microRNA-494; osteoblast; matrix mineralization; TLR-4

microRNAs(miRNAs)是一类长度约为 22 个核苷酸、保守、进化的非编码单链 RNA 小分子^[1]。miRNA 存在于果蝇、小鼠、人类和植物等基因组中,均为内源性表达^[2]。研究已经证实,miRNAs 在多数肿瘤中表达失调,包括结直肠癌、淋巴瘤、乳腺癌、肝细胞癌等^[3]。此外,研究发现 miR-494 会参与脑缺血、神经变性病、多发性硬化、脑肿瘤以及脊髓病变等多种生理疾病中^[4-6]。骨质疏松症是世界上常见的病症,发病率极高。成骨细胞在骨代谢中起着重要的作用,参与骨吸收和骨重建的过程^[7]。当机体的骨吸收大于骨重建时,就会表现出骨量减少、骨流失以及骨显微结构被破坏的现象^[8]。成骨细胞是骨代谢的主要功能细胞,细胞的增殖和分化能力决定着最终的成骨量^[9]。Toll 样受体(toll-like receptor,TLR)广泛存在于人类和动物的多种细胞中,属于 I 型跨膜蛋白,参与机体的初级免疫过程,并调节机体的多种生理功能,例如骨细胞的代谢和干细胞的增殖等^[10]。此外,TLR 介导的炎症因子的分泌对早期的骨修复起着重要的作用。人的 TLR 共分为 5 个亚科、10 个亚型。成骨细胞表面主要表达 TLR-3 和 TLR-4^[11]。本研究即探讨 TLR-4 受体在成骨细胞分化及基质矿化的可能分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 购自于中国科学院上海细胞库,DMEM 培养基、胰酶、胎牛血清和青链霉素双抗均购自于美国 Gibco 公司。四甲基偶氮唑

蓝(MTT)、 β -甘油磷酸钠和 TritonX-100 均购于自美国 Sigma 公司。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天生物科技有限公司。Von Kossa 染色试剂盒购自于湖北百奥斯生物技术有限公司。TLR-4 抗体、 β -actin 抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠抗体购自于美国 CST 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 miR-494 mimic 转染小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1

miR-494 mimic 及其阴性对照均购自于锐博生物科技有限公司。使用含 10% 血清的 DMEM 培养基培养小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1,在 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。将 MC3T3-E1 细胞分为 miR-494 mimic 转染组和阴性对照组。miR-494 mimic 转染组:向培养中加入化学合成的 miR-494 mimic 和脂质体;阴性对照组:向培养液中加入无义序列 miR-494 mimic 和脂质体。

1.2.2 qRT-PCR 检测 miR-494 在小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中的表达

采用 Trizol 提取法提取细胞中的总 RNA,按照 Micro RNA 反转录试剂盒说明书对总 RNA 进行反转录。反转录体系为 20 μ L:1 μ L 总 RNA,4 μ L 5 $\times$ Reaction Mix,2 μ L 10 $\times$ Super Script Enzyme Mix,加入双蒸水将体系补足至 20 μ L,混匀后离心。反应条件为:37℃60 min,95℃5 min,置于 4℃保存备用。按照 qRT-PCR 试剂盒说明书进行转录扩增,反应体系为 20 μ L。使用 SYBR Green 染料法进行测定,每

个样本设置 4 个复孔。按照试剂盒说明书的反应条件进行扩增。miR-494 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算。

1.2.3 MTT 法检测小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后的增殖活性

将小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 调整至适宜浓度后,接种于 96 孔板。实验分为阴性对照组和 miR-494 mimic 转染组,每组设置 6 个复孔。孵育细胞 48 h,实验重复 3 次。培养结束后,每孔加入 20 μ L MTT 溶液,培养 4 h,弃上清液,加入 150 μ L DMSO, 37℃ 下振荡 10 min,使用酶标仪测定 570 nm 处测定吸光度值。

1.2.4 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后 ALP 活性的测定

阴性对照组和 miR-494 mimic 转染组的细胞培养结束后,将细胞经胰酶消化后转移至离心管,使用 PBS 溶液反复冻融细胞后,按照 ALP 测定试剂盒说明书操作,用来评价小鼠成骨细胞的分化能力。

1.2.5 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后骨钙素(osteocalcin,OC)活性的测定

将小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 接种于 96 孔板,分组同上。培养 4 d 后,使用骨钙素放射免疫分析试剂盒测定小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中骨钙素的活力。

1.2.6 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后矿化结节数的测定

本实验采用 Vonkossa 钙化染色法测定小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后的矿化结节数。将小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 接种于 96 孔板,分组同上。培养 18 d 后,使用 Vonkossa 钙化液对细胞进行换液,之后采用 Vonkossa 钙化染色法对细胞进行染色。各样本的矿化结节形成情况使用 HPIAS-100 高清晰度彩色病理图文报告分析系统计算。

1.2.7 Western blot 检测转染前后 TLR-4 蛋白的表达差异

将小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 接种于 6 孔板,分组同上。培养结束后,弃去培养液,用裂解液充分裂解细胞后,离心取上清液。使用 BCA 蛋白浓度试剂盒对提取的总蛋白进行定量。使用上样缓冲液,在沸水浴中使蛋白变性。SDS-PAGE 凝胶电泳选取 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶,在 150 Ma 下转膜 3 h,使用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h。分别使用 TLR-4 抗体(1:1000)和 β -actin(1:500)4℃ 下孵育

过夜。使用二抗(1:5000)在室温下孵育 2 h。使用灰度值软件对蛋白条带进行定量计算。

1.3 统计学处理

本研究中数据全部采用 SPSS20.0 统计分析软件进行处理;计量资料采用“平均数 $\pm$ 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析或者重复测量的方差分析,组间两两比较采用 t 检验;计数资料采用百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 分析;以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测 miR-494 在小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中的表达

如表 1 所示,qRT-PCR 结果显示 miR-494 在小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中的表达量极显著的低于 miR-494 mimic 转染组 ($P < 0.05$),说明 miR-494 mimic 转染小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 成功,使 miR-494 在小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中过表达。

表 1 miR-494 在小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中的表达($n = 16$)

Table 1 Expression of miR-494 in mouse osteoblast cell line MC3T3-E1

组别 Groups	miR-494 相对表达量 Relative expression of miR-494
阴性对照组 Negative control group	8.35 $\pm$ 1.06
miR-494 mimic 转染组 Transfection group of miR-494 mimic	19.54 $\pm$ 2.39 *

注:与阴性对照组相比,* $P < 0.05$ 。
Note. Compared with negative control group, * $P < 0.05$.

2.2 MTT 法检测小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后的增殖活性

本实验对 miR-494 mimic 转染小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 后,MTT 法检测转染 0 h、48 h 后细胞增殖率的变化。如表 2 所示,miR-494 mimic 转染组的细胞增殖率较阴性对照组显著降低 ($P < 0.05$),证实 miR-494 抑制小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 的增殖。

2.3 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后 ALP 活性的测定

本实验检测了小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后 ALP 的活性。结果如表 3 所示,与阴性对照组相比,miR-494 mimic 转染小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 后,细胞中 ALP 的活性显著受到抑制 ($P < 0.05$)。这说明 miR-494 会使小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中的 ALP 活力降低。

2.4 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后骨钙素(OC)活性的测定

在成骨细胞分化中期,骨钙素的含量会上升。本实验测定了 miR-494 mimic 转染后,小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中骨钙素的含量。结果如表 4 所示,与阴性对照组相比,miR-494 mimic 转染小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 后,细胞中 OC 的活性显著受到抑制($P<0.05$)。这说明 miR-494 会使小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中的 OC 活力降低。

2.5 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后矿化结节数的测定

矿化结节是成骨细胞晚期分化的重要标志。因此,本实验通过检测小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中矿化结节的数目,反映 miR-494 对成骨细胞晚期分化的程度。结果如表 5 所示,阴性对照组中的成

骨细胞形成了圆形矿化结节,且边界清晰。miR-494 mimic 转染组细胞形成的矿化结节数显著低于阴性对照组($P<0.05$)。说明 miR-494 会抑制成骨细胞形成矿化结节。

2.6 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后 TLR-4 蛋白的表达差异

本实验测定了 miR-494 mimic 转染细胞后,细胞中 TLR-4 蛋白的表达差异。结果如表 6 所示,Western blot 检测结果表明,与阴性对照组相比,miR-494 mimic 转染组细胞中 TLR-4 蛋白表达量显著升高($P<0.05$)。说明 miR-494 会增加小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中 TLR-4 蛋白的表达量,即 miR-494 可能通过 TLR-4 通路抑制成骨细胞分化及基质矿化。

表 2 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后的增殖率($n=16, \%$)
Table 2 Proliferative rate of mouse osteoblast cell line MC3T3-E1 before and after transfection

组别 Groups	培养时间 0 h Incubation time 0 h	培养时间 48 h Incubation time was 48 h
阴性对照组 Negative control group	100	342.27 ± 25.18 *
miR-494 mimic 转染组 Transfection group of miR-494 mimic	100	201.56 ± 18.39 #

注:与阴性对照组培养 0 h 相比, * $P<0.05$; 与阴性对照组培养 48 h 相比, # $P<0.05$ 。
Note. Compared with negative control group (Incubation time 0 h), * $P<0.05$. Compared with negative control group (Incubation time was 48 h), # $P<0.05$.

表 3 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后 ALP 活性($n=16$)
Table 3 ALP activity of mouse osteoblast cell line MC3T3-E1 before and after transfection

组别 Groups	碱性磷酸酶(U/L) ALP
阴性对照组 Negative control group	1.37 ± 0.24
miR-494 mimic 转染组 Transfection group of miR-494 mimic	0.87 ± 0.11 *

注:与阴性对照组相比, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with negative control group, * $P<0.05$.

表 4 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染前后 OC 活性($n=16$)
Table 4 OC activity of mouse osteoblast cell line MC3T3-E1 before and after transfection

组别 Groups	骨钙素($\mu\text{g/L}$) OC
阴性对照组 Negative control group	9.17 ± 1.43
miR-494 mimic 转染组 Transfection group of miR-494 mimic	5.84 ± 0.91 *

注:与阴性对照组相比, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with negative control group, * $P<0.05$.

表 5 小鼠成骨细胞矿化结节形成情况比较($n=16$)
Table 5 Comparison of the formation of mineralized nodules in mouse osteoblasts

组别 Groups	矿化结节数 Number of mineralized nodules
阴性对照组 Negative control group	77.13 ± 9.39
miR-494 mimic 转染组 Transfection group of miR-494 mimic	51.64 ± 6.97 *

注:与阴性对照组相比, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with negative control group, * $P<0.05$.

表 6 小鼠成骨细胞 TLR-4 蛋白的表达差异 (n = 16)

Table 6 Difference in expression of TLR-4 protein in mouse osteoblasts

组别 Groups	TLR-4/β-actin
阴性对照组 Negative control group	0.93 ± 0.08
miR-494 mimic 转染组 Transfection group of miR-494 mimic	1.86 ± 0.15 *

注:与阴性对照组相比, * P < 0.05。
Note. Compared with negative control group, * P < 0.05.

3 讨论

骨质疏松是临床常见的骨科疾病,会出现骨骼密度降低、脆性增加、骨折或腰背疼痛等现象^[12]。骨骼的矿化是维持人体骨骼正常状态的关键,这一过程主要由成熟的成骨细胞分泌细胞外基质,与体内的无机盐共同完成,从而实现骨骼的正常代谢^[13]。因此,起源于骨髓基质间质细胞的成骨细胞,主要参与增殖、分化以及基质钙化^[14]。MC3T3-E1 来源于 C57BL/6 小鼠的颅盖骨细胞,具有成骨细胞的生物学特性,因此作为成骨细胞研究中的体外模型^[15]。

在本研究中,miR-494 mimic 转染结果显示,与阴性对照组相比,小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 转染后的 miR-494 的 mRNA 的表达量显著升高,说明 miR-494 mimic 转染小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1,成功使 miR-494 过表达。MTT 法检测结果表明:miR-494 mimic 转染组的细胞增殖率较阴性对照组显著降低,证实 miR-494 抑制小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 的增殖。

ALP 是成骨细胞膜上所分泌的一种钙结合转运蛋白,能够促进细胞的成熟和钙化^[16]。ALP 在细胞内的表达量可以作为衡量成骨细胞分化程度的指标,应用十分广泛。ALP 的活性会随着成骨细胞不断成熟而呈上升趋势,当骨细胞的增殖和分化受到抑制时,成骨细胞的矿化作用受阻,ALP 的活性降低^[17]。在本实验中,miR-494 mimic 转染组细胞中的 ALP 活性显著低于阴性对照组,说明 miR-494 会使小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 的早期分化能力降低。骨钙素是维持骨组织正常钙化的必需因子,ALP 和骨钙素(OC)分别是成骨细胞分化早期和分化中期的标志物^[18]。本实验结果表明,与阴性对照组相比,miR-494 mimic 转染组 MC3T3-E1 细胞中骨钙素的活力显著降低。上述结果提示 miR-494 具有抑制成骨细胞 MC3T3-E1 中期分化的作用。

矿化结节是衡量骨细胞晚期分化程度的指标,是成骨细胞分化成熟的阶段,是成骨功能的形态表现^[19]。Von Kossa 钙化染色法的原理是:将矿化基

质中的碳酸盐和磷酸盐转化为碳酸银和磷酸银,然后将银离子还原成银后进行测定。Von Kossa 钙化染色法可以通过矿化结节的数目,反映成骨细胞的钙化程度。本实验证实,与阴性对照组相比,miR-494 mimic 转染组 MC3T3-E1 细胞中矿化结节的数目显著降低。说明 miR-494 会抑制 MC3T3-E1 细胞的矿化。

TLR-4 是细胞膜上一种重要的跨膜受体,不仅参与机体内细胞的增殖、分化及凋亡,还参与骨代谢功能的调控^[20]。研究证实,TLR-4 受体上调会抑制骨细胞的增殖和分化。在成骨细胞中,TLR-4 通路是参与调控细胞增殖和分化的重要通路之一^[21-22]。因此,本研究通过 Western blot 检测了小鼠成骨细胞中 TLR-4 的蛋白表达,初步探讨 miR-494 对成骨细胞的潜在作用机制。结果表明,miR-494 可上调成骨细胞中 TLR-4 的蛋白表达,该作用可能是 miR-494 抑制成骨细胞增殖和分化的潜在机制。

综上所述,miR-494 能够通过 TLR-4 通路抑制小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 的增殖活力,降低细胞中 ALP、OC 的活力,减少成骨细胞中的矿化结节数,抑制成骨细胞分化及基质矿化。

参考文献:

[1] Zhan MN, Yu XT, Tang J, et al. MicroRNA-494 inhibits breast cancer progression by directly targeting PAK1 [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(1):e2529.

[2] Yang A, Wang X, Yu C, et al. microRNA-494 is a potential prognostic marker and inhibits cellular proliferation, migration and invasion by targeting SIRT1 in epithelial ovarian cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 14(3):3177-3184.

[3] Zhu H, Xie R, Liu X, et al. MicroRNA-494 improves functional recovery and inhibits apoptosis by modulating PTEN/AKT/mTOR pathway in rats after spinal cord injury [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92(8):879-887.

[4] Zhang Y, Guo L, Li Y, et al. MicroRNA-494 promotes cancer progression and targets adenomatous polyposis coli in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1):1.

[5] Xiang Z, Sun M, Yuan Z, et al. Prognostic and clinicopathological significance of microRNA-494 overexpression

- in cancers: a meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1):1279–1290.
- [6] Xi T, Jin F, Zhu Y, et al. MicroRNA-126-3p attenuates blood-brain barrier disruption, cerebral edema and neuronal injury following intracerebral hemorrhage by regulating PIK3R2 and Akt [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2017, 494(1–2):144–151.
- [7] Oh SH, Kim JW, Kim Y, et al. The extracellular matrix protein Edil3 stimulates osteoblast differentiation through the integrin $\alpha 5 \beta 1$ /ERK/Runx2 pathway [J]. *PloS One*, 2017, 12(11):e0188749.
- [8] Liu Q, Guo Y, Wang Y, et al. miR-98-5p promotes osteoblast differentiation in MC3T3E1 cells by targeting CKIP-1 [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3):4797–4802.
- [9] Laxman N, Mallmin H, Nilsson O, et al. miR-203 and miR-320 regulate bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5 (Dlx5) [J]. *Genes(Basel)*, 2016, 8(1):pii: E4.
- [10] Both T, Jeroen VDPH, Zillikens MC, et al. Hydroxychloroquine decreases human MSC-derived osteoblast differentiation and mineralization in vitro[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(2):873–882.
- [11] Chen XL, Zhang ZY, Zhou H, et al. Characterization of mesenchymal stem cells under the stimulation of Toll-like receptor agonists[J]. *Dev Growth Differ*, 2014, 56(3):233–244.
- [12] Cai Y, Gao T, Fu S, et al. Development of zoledronic acid functionalized hydroxyapatite loaded polymeric nanoparticles for the treatment of osteoporosis[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(2):704–710.
- [13] Yao J, Chen H, Gao Q, et al. Evaluation of osteoinductive calcium phosphate ceramics repairing alveolar cleft defects in dog model[J]. *Biomed Mater Eng*, 2018, 29(2):229–240.
- [14] Zhang Y, Yin C, Hu L, et al. MACF1 overexpression by transfecting the 21-kbp large plasmid PEGFP-C1A-ACF7 promotes osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(2):259–270.
- [15] Webb EA, Balasubramanian M, Fratzlzelman N, et al. Phenotypic spectrum in osteogenesis imperfecta due to mutations in TMEM38B: unravelling a complex cellular defect[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, 102(6):2019–2028.
- [16] Zhang Y, Xia G, Zhang Y, et al. Palmitate induces VSMC apoptosis via toll like receptor (TLR)4/ROS/p53 pathway[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 263:74–81.
- [17] Chang J, Xia Y, Wasserloos K, et al. Cyclic stretch induced IL-33 production through HMGB1/TLR4 signaling pathway in murine respiratory epithelial cells[J]. *PloS One*, 2017, 12(9):e0184770.
- [18] Zhou Q, Lin FF, Liu SM, et al. Influence of the total saponin fraction from *Dioscorea nipponica* Makino on TLR2/4-IL1R receptor signaling pathway in rats of gouty arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 206(12):274–282.
- [19] Mei Z, Chen J, Wang YC, et al. $\alpha 7$ -nAChR Agonist GTS-21 reduces radiation-induced lung injury by inhibiting HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway[J]. *J Thoracic Oncol*, 2017, 12(1):S1030-S1031.
- [20] Ragot SA, Kertesz MA, Mészáros É, et al. Soil phoD and phoX alkaline phosphatase gene diversity responds to multiple environmental factors[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2017, 93(1):118–120.
- [21] Rao SR, Snaith AE, Marino D, et al. Tumor-derived alkaline phosphatase regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer [J]. *BrJ Cancer*, 2017, 116(2):227–236.
- [22] Han D, Chen W, Gu X, et al. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells through PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9):14680–14692.

[收稿日期]2018–06–07