

cAMP/PKA/CITED1 信号通路介导的甲状旁腺激素在骨代谢中的作用机制

邱奕雁^{1,2}, 郑羽晨¹, 郭伟壮¹, 周文钰¹, 颜滨¹, 杨欣建¹

1. 深圳市第二人民医院骨科, 广东 深圳 518000; 2. 南方医科大学第三附属医院, 广东 广州 510630

摘要: **目的** 在动物整体水平上分析甲状旁腺激素(PTH)对成骨的调节作用,探讨 Glu/Asp 丰富羧基端域 Cbp/p300 相互作用反式激活因子 1(CITED1)在骨代谢中的调节作用。**方法** 以间断小剂量 PTH 皮下注射的野生型 C57BL 小鼠为实验组,同体积生理盐水皮下注射的野生型 C57BL 小鼠为对照组。处死后取股骨检测小鼠的骨代谢表型,如皮质骨、松质骨的厚度和骨量;采用酶联免疫吸附法(ELISA)测量小鼠血清中 I 型原胶原肽(PINP)、骨钙素(OC)、骨碱性磷酸酶(BALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)的浓度。取 1 日龄野生型 C57BL 小鼠头盖骨制备颅骨成骨细胞,分别经含 PTH(PTH 处理组)、含 PTH 和蛋白激酶 A(PKA)信号通路特异性抑制剂 H 89 2HCl(共处理组)及不含此两制剂(未处理组)的培养基培养,Real-time PCR 和 Western blot 检测 PTH 处理组、共处理组、对照组颅骨成骨细胞中骨代谢相关分子的表达。**结果** 显微 CT 定量测量结果,实验组小鼠反映皮质骨及松质骨的骨量和骨厚度指标均较对照组明显增高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。ELISA 检测结果示,实验组小鼠外周血清中 PINP、OC、BALP 水平较对照组显著增加,TRAP 浓度较对照组显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。Real-time PCR 结果显示,共处理组颅骨成骨细胞 OC、碱性磷酸酶(ALP)的 mRNA 表达较 PTH 处理组显著下降,TRAP 的 mRNA 表达较 PTH 处理组增加(P 均 < 0.01)。Western blot 细胞定位结果发现,不用 PTH 刺激的未处理组,CITED1 蛋白均定位于细胞浆中;PTH 处理组,CITED1 明显转向细胞核;加 H 89 2HCl 的共处理组 CITED1 向细胞核转移被抑制。**结论** PTH 可能通过 cAMP/蛋白激酶 A(PKA)信号通路促进共转录因子 CITED1 出入细胞核,特异性地调节 OC 及 ALP 基因的表达,参与骨代谢的调节。

关键词: 甲状旁腺激素; 骨质疏松; Glu/Asp 丰富羧基端域 Cbp/p300 相互作用反式激活因子 1; 蛋白激酶 A 抑制剂; 骨代谢

中图分类号: R 589 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2020)01-0010-05

Role of parathyroid hormone in bone metabolism mediated by cAMP/PKA/CITED1 signaling pathway

QIU Yi-yan*, ZHENG Yu-chen, GUO Wei-zhuang, ZHOU Wen-yu, YAN Bin, YANG Xin-jian

*Department of Orthopaedics, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China

Abstracts: Objective To analyze the regulatory effect of parathyroid hormone (PTH) on osteogenesis and the effect of Glu/Asp-rich carboxy terminal domains Cbp/p300 interacting transactivator 1 (CITED1) in bone metabolism. **Methods** Wild-type C57BL mice subcutaneously injected with low-dose PTH were designed as experimental group, and wild type C57BL mice injected subcutaneously with the same volume of normal saline were served as control group. After being killed, the femur was taken to detect the bone metabolic phenotype, such as the thickness and bone mass of cortical bone and cancellous bone. The concentrations of procollagen I peptide (PINP), osteocalcin (OC), bone alkaline phosphatase (BALP) and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) were measured by ELISA. One-day-old wild-type C57BL mice cranium was used to prepare osteoblasts, which were cultured with PTH (PTH treatment group), PTH and protein kinase A (PKA) signal pathway specific inhibitor H 89 2HCl (co-treatment group) and culture medium without the two preparations (untreated group), respectively. Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression of bone metabolism-related molecules in mice cranial osteoblasts of the three groups. **Results** The bone mass and thickness of cortical and cancellous bone in experimental group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). ELISA results showed that the peripheral serum levels of PINP, OC and BALP in experimental group were

significantly higher than those in control group, and TRAP level was significantly lower than that in control group ($P < 0.01, P < 0.05$). Real-time PCR results showed that the mRNA expressions of OC and ALP in co-treatment group were significantly lower than those in PTH treated group, and the mRNA expression of TRAP was significantly higher than that in PTH treated group (all $P < 0.01$). Western blot results untreated that in untreated group CITED1 protein was located in the cytoplasm of cells, while in PTH treatment group CITED1 protein was obviously located in the nucleus of cells, and CITED1 nuclear transfer was inhibited in co-treatment group. **Conclusion** PTH may promote the co-transcription factor CITED1 in and out of the nucleus through the cAMP/protein kinase A (PKA) signaling pathway, specifically regulate the expression of OC and ALP genes and participate in the regulation of bone metabolism.

Key words: Parathyroid hormone; Osteoporosis; Glu/Asp-rich carboxy terminal domains Cbp/p300 interaction transactivator 1; Protein kinase A inhibitor; Bone metabolism

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81802237); Shenzhen Science and Technology Innovation Commission Fund (JCYJ20160425104432398)

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是一种全身性骨量减少、骨组织微细结构被破坏、骨脆性增加为主要特点的系统性骨骼疾病^[1]。随着人口平均寿命的延长和社会老龄化的进一步加速,骨质疏松已成为威胁人类健康,特别是中老年人健康的疾病^[2]。骨骼的重构存在于成骨与溶骨的动态平衡之中,因此如何调控骨骼重塑、促进骨修复,成为临床和基础研究的重点^[3]。研究骨形成过程中的分子机制不仅对于阐明骨代谢性疾病的机制具有重要意义,根据这些分子机制调控骨形成与吸收的过程也是治疗骨破坏性疾病的主要策略。

甲状旁腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 是甲状旁腺主细胞分泌的碱性单链多肽类激素^[4]。研究发现,PTH 可以显著促进骨合成代谢、增加骨质积累从而增加骨量^[5]。但是,亦有研究指出 PTH 本身有促进骨骼吸收的作用,药物应用机理复杂,机制不明确^[6]。PTH 是体内重要的骨代谢调节激素,亦是目前临床唯一用来促进骨合成代谢的药物。天然的 PTH 由 84 个氨基酸组成,与 I 型 PTH 受体相结合产生作用^[7]。研究发现 PTH 肽 N 端的 34 个氨基酸残基 [PTH(1-34)] 具有与 84 个氨基酸完整肽链相同的受体结合功能并可激活受体^[8]。人工合成的 PTH 类似物在体外实验上表现出与天然 PTH 几乎相同的细胞生理作用,从而使得 PTH 的体外实验进入新的阶段,极大地促进了相关研究的进展^[9]。

临床经验发现,低剂量间断使用 PTH 可以促进骨形成,而大剂量长期使用则诱导骨吸收溶解,其效果不够理想,存在很大的优化空间^[10],因此进一步探讨 PTH 调控骨代谢的分子机制,具有重要的临床意义。本研究通过 PTH 间断小剂量处理野生型 C57BL 小鼠,分析 PTH 对成骨的调节作用,利用蛋白激酶 A (PKA) 抑制剂 H 89 2HCl 处理小鼠颅骨成骨细胞,探讨环磷酸腺苷 (cAMP)/PKA/Glu/Asp 丰富羧基端域

Cbp/p300 相互作用反式激活因子 1 (CITED1) 信号途径在骨代谢中的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 野生型 C57BL 小鼠购自上海斯莱克动物实验有限公司,PTH 购自 Sigma 公司 (# SCP0230);骨钙素 (OC)、骨碱性磷酸酶 (BALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP)、I 型胶原裂解片段 (NTX 和 CTX) 试剂盒购自上海煊翎生物有限公司,II 型胶原酶和抑制剂 H 89 2HCl 购自 Sigma 公司,Trizol 和 NEPER 核蛋白-胞浆蛋白抽提试剂盒购自 Thermo Scientific,荧光素酶测定 (Luciferase assay) 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 野生型 C57BL 小鼠的饲养 野生型 C57BL 小鼠饲养在 SPF 级动物房中,小鼠可任意进食及饮水 (SPF 级动物房提供的标准食物),动物房保持温度 (22 ± 3) °C,湿度 (35 ± 5) %, 12 h 昼夜周期 (早上 6:30 亮灯)。所有实验均使用雄鼠。小鼠处死之前均预先用戊巴比妥钠麻醉。所有小鼠实验操作均通过我院动物伦理委员会的审核。

1.3 检测间断小剂量 PTH 处理 (实验组) 和不处理 (对照组) 小鼠的骨代谢表型 采用 8 周龄野生型 C57BL 小鼠,实验组皮下注射 PTH 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$,每日 1 次,每周 5 次,共 4 周;对照组予同体积生理盐水。注射 4 周,处理结束后动物麻醉抽取外周血,分离血清;继处死小鼠迅速取一侧新鲜股骨用于分子学检测,取另一侧股骨福尔马林固定至少 24 h 后,显微 CT 定量测量皮质骨的厚度、骨量和松质骨的骨量。

1.4 检测实验组和对照组小鼠血清中骨代谢相关指标 采用 ELISA 法测量血清中 I 型前胶原 N 端前肽 (PINP)、OC、BALP、TRAPs 水平,试剂盒均采用双抗夹心法,所有操作根据试剂盒说明进行。

1.5 提取野生型 C57BL 小鼠颅骨成骨细胞 取用 1

日龄野生型 C57BL 小鼠,75% 酒精浸泡消毒后取出小鼠头盖骨,首先用 0.25% 胰酶消化去除表面结缔组织,然后 PBS 清洗后将头盖骨剪碎,用 0.1% II 型胶原酶 37 °C 培养箱中震荡消化 50 min,用血清终止法终止胶原酶的消化作用。反复吹打混匀混悬液,然后通过 220 目网筛过滤去掉杂质,PBS 洗涤三次,最后 1 000 转/min 离心 10 min 沉淀细胞,将细胞置于直径 6 cm 培养皿中传代培养 4 代后纯化成骨细胞,用于后续检测。

1.6 小鼠颅骨成骨细胞的处理和分组 将纯化后的小鼠颅骨成骨细胞,使用添加 20 mM PTH 的 DMEM 培养基(PTH 处理组)、添加 2 mM H 89 2HCl(PKA 特异性抑制剂)和 20 mM PTH 的 DMEM 培养基(共处理组)以及不添加的 DMEM 培养基(未处理组)培养 12 h,然后提取 PTH 处理组、共处理组和未处理组三组细胞的 RNA 进行 Real-time PCR,检测骨代谢相关基因在 mRNA 水平的变化。

1.7 抽提细胞核蛋白 使用 Thermo Scientific NEPER 核蛋白-胞浆蛋白抽提试剂盒,操作步骤根据试剂盒说明进行,使用含有去垢剂的低渗缓冲液 CER1 裂解细胞,微量离心 1 000 转/min 离心 2 min 以便沉淀完整的细胞核,去除胞浆组分,最终加入 CER2 裂解细胞核。关键是降低细胞质与细胞核组分之间的交叉污染。

1.8 Real-time PCR 检测小鼠颅骨成骨细胞中骨代谢相关基因的表达 提取总 RNA,Trizol 室温裂解细胞,氯仿分离去除蛋白,取水相加入异丙醇萃取 RNA 沉淀,用 75% 乙醇(DEPC 水配制)洗涤沉淀,晾干残留乙醇,将沉淀溶于适量 DEPC 水中,检测 RNA 纯度及浓度。用 M-MLV 逆转录系统进行反转录,获 cDNA。用 Applied Biosystems 公司的 SYBR Green PCR system,以 actin 为内参,进行基因的 Real-time PCR 比较相关基因表达差异。所使用引物见表 1。

1.9 Western blot 检测小鼠颅骨成骨细胞中骨代谢相关蛋白的表达 用 RIPA 裂解纯化成骨细胞,10 000 转/min 离心 20 min 制样。90 V 恒压电泳,然

后以 400 mA 恒流将蛋白电转到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 PVDF 膜 1 h。封闭结束后,在含 5% BSA 的 TBST 中 1:1 000 孵育一抗 4 °C 过夜,二抗室温结合 2 h,加入显影液曝光显影,定影,晾干,拍照。根据蛋白条带观察目的蛋白在胞核、胞浆、全细胞的表达。

1.10 统计学分析 使用 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计分析。定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据间的差异用独立样本 *t* 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,双侧检验。

2 结果

2.1 实验组和对照组显微 CT 定量测量结果对比 与对照组相比,实验组小鼠股骨皮质骨的骨组织面积比和骨厚度,及松质骨的骨体积分数和骨小梁厚度、数目明显增高($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

2.2 实验组和对照组小鼠血清中骨代谢指标结果对比 ELISA 结果示,实验组小鼠血清 PINP、OC、BALP 水平较对照组增加($P < 0.01, P < 0.05$);其 TRAP 浓度较对照组降低($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 PTH 处理组、共处理组和未处理组小鼠颅骨成骨细胞 OC、ALP mRNA 的表达 Real-time PCR 结果显示,PTH 处理组的小鼠颅骨成骨细胞中 OC、ALP mRNA 的表达较未处理组显著增加($P < 0.01, P < 0.05$);同时 TRAP mRNA 的表达较未处理组显著降低。然而应用 PKA 信号通路特异性抑制剂 H 89 2HCl 后的共处理组 OC、ALP 的 mRNA 表达较 PTH 处理组显著下降,TRAP 的 mRNA 表达较 PTH 处理组显著增加(P 均 < 0.01)。见图 1。

2.4 PTH 处理组、共处理组和未处理组小鼠颅骨成骨细胞 PKA、CITED1 蛋白定位对比 Western blot 细胞定位结果发现,不用 PTH 刺激的未处理组,CITED1 蛋白均定位于细胞浆中;PTH 处理组,CITED1 明显转向细胞核。见图 2。进一步检测可见,PTH 和

表 2 实验组和对照组小鼠股骨骨量检测结果对比

($n = 8, \bar{x} \pm s$)

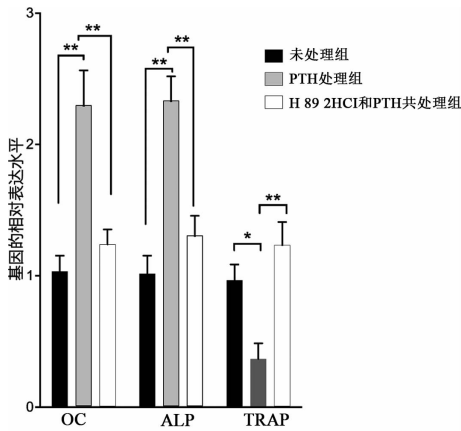
基因	引物序列
CITED1	正向 5'-TGGATGCTCGATCGTTCGG-3'
	反向 5'-GTCCATACCTCGCGCATCTGG-3'
TRAP 基因	正向 5'-CTGATCGCATCGTATACTCGCAG-3'
	反向 5'-GTCCAATCGCGCATATTATCTGG-3'
OC 基因	正向 5'-CGACTCGCTATCTCCAAGTGA-3'
	反向 5'-GTTGAACCACTCTCCGACCA-3'
ALP 基因	正向 5'-AAGCAACACTAATAGCTCTAGTTC-3'
	反向 5'-GGCGACGCATACGATGGACAAT-3'
Actin	正向 5'-AGTGTGACGATCGACTATCCGTA-3
	反向 5'-GCCAGAACGCGATTCTTCT-3'

项目	对照组	实验组	<i>P</i> 值
松质骨			
骨体积分数(BV/TV ^a ,%)	20.35 ± 0.13	24.11 ± 0.47	0.015
骨小梁厚度(TbTh, μm)	52.18 ± 5.44	66.11 ± 4.66	0.016
骨小梁数目(TbN, mm ⁻¹)	5.15 ± 0.44	5.66 ± 0.48	0.032
皮质骨			
骨组织面积比(BA/TA,%)	44.18 ± 1.06	48.48 ± 1.56	0.023
骨厚度(Corti-Th ^b ,mm)	154.67 ± 9.50	196.78 ± 11.12	0.005

注:BV/TV^a 表示骨体积/总体积;Corti-Th^b 为 Cortical bone Thickness 的缩写形式。

表 3 实验组和对照组小鼠血清中骨代谢指标实验对比
($n = 8, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	实验组	P 值
PINP (ng/ml)	10.58 ± 0.97	14.33 ± 0.89	0.003
OC (ng/ml)	4.22 ± 0.82	5.48 ± 0.79	0.022
BALP (IU/L)	3.54 ± 0.34	6.25 ± 0.43	0.021
TRAP (U/L)	7.56 ± 0.76	5.33 ± 0.43	0.016



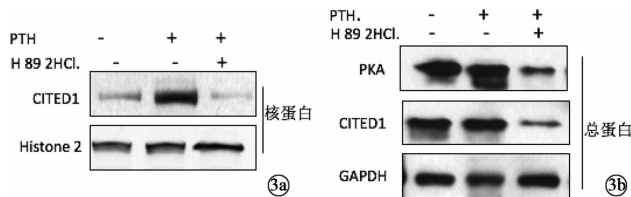
注: * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。

图 1 PTH 处理组、共处理组和未处理组小鼠颅骨成骨细胞骨代谢相关基因的表达



注:2a:以 GAPDH 作为胞浆蛋白的内参,两组 CITED1 和内参在胞浆中的蛋白表达;2b:以 Histone 2 作为胞核蛋白的内参,两组 CITED1 和内参在胞核中的蛋白表达。

图 2 PTH 处理组和未处理组小鼠颅骨成骨细胞 CITED1 蛋白表达的定位



注:3a:以 Histone 2 作为胞核蛋白的内参,两组 CITED1 和内参在胞核中的蛋白表达;3b:以 GAPDH 作为细胞总蛋白的内参,两组 PKA、CITED1 和内参在细胞中总蛋白的表达。

图 3 共处理组和 PTH 处理组小鼠颅骨成骨细胞 CITED1 蛋白表达的定位

H 89 2HCl 共处理组,其 CITED1 蛋白向胞核转移被抑制。见图 3。

3 讨论

在 PTH 对骨量的直接作用上,目前主流观点认为其通过与成骨细胞表面的 I 型 PTH 受体(PTH1R)结合级联产生一系列信号通路反应。PTH1R 是 G 蛋白结合受体,与多种 G 蛋白相结合产生作用,可激发

数个第二信使转导系统,包括:(1)激动型 G 蛋白(G_s)/cAMP/PKA 信号转导系统,这是 PTH 作用于骨组织的主要机制^[11]。(2)磷脂酶 C(PLC)/PKC 体系[包括 1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)分子的生成以及后续胞内钙离子的释放,二酯酰甘油(DAG)形成,进而激活 PKC 和引导 PKC 在细胞内的再分布]对骨组织的产生影响^[12-13]。(3)不依赖 PLC 的 PKC 激活途径,这一途径主要在受力区骨组织内发挥作用,考虑与力学信号介导相关^[14-15]。

PTH 可能通过多条信号通路作用于成骨细胞增殖周期,这一过程中伴随了 CITED1 的表达上调^[16],但 CITED1 表达增强在这一过程中的意义尚不清楚,相关蛋白结合 CITED1 共转录的方式既往未见深入研究,机制尚未阐明。2008 年首次报道 CITED1 与骨代谢和 PTH 功能相关^[17],目前国内外缺乏相关报道。仅有的研究侧重于细胞学试验,将骨骼代谢的调节过程脱离了整体的生物环境,成骨细胞从体内复杂的生理环境分离开来,过分简化了生物模型^[18];另一方面,前期研究侧重于现象的报道,对于机制的研究也未充分涉及。

本研究发现,PTH 处理组小鼠无论皮质骨还是松质骨均具有较高的骨量和骨厚度,提示 PTH 处理可以促进松质骨的骨体积以及骨小梁的厚度和数目的增多;间断小剂量 PTH 处理组小鼠外周血清中 PINP、OC、BALP 较对照组小鼠显著增加,TRAP 的浓度较对照组小鼠显著降低,表明间断小剂量 PTH 处理小鼠其骨形成增加、骨吸收降低。应用 PKA 信号通路特异性抑制剂 H 89 2HCl 和 PTH 共处理小鼠颅骨成骨细胞,Real-time PCR 结果显示,成骨细胞 OC、BALP 的 mRNA 表达较单纯 PTH 处理组显著下降,TRAP 的 mRNA 表达较单纯 PTH 处理组增加,提示 H 89 2HCl 可以显著抑制 PTH 的作用;Western blot 细胞定位结果发现,PTH 处理可激活 cAMP/PKA 信号通路,应用 PTH 刺激前,CITED1 蛋白均定位于胞浆中,而采用 PTH 刺激培养细胞后,CITED1 明显转向细胞核,说明 PTH 诱导刺激 CITED1 参与转录过程,进而发挥其转录调节作用。

CBP/P-300 与 CITED1 的结合对骨代谢产生影响并起到调控细胞分化的功能^[19]。生物信息学研究发现,在 PTH 作用通路中与 CITED1 共转录因子表达上移相关的蛋白远不止一种^[20],包括机械应力刺激和荧光细胞周期指示剂介导的细胞周期调控因子都在此过程中有所参与^[21],其机制的阐明有助于指导 PTH 用于骨质疏松的治疗;相比于 PTH 受体抑制剂的调控方式,明确 CITED1 共转录的调控模式有利于

骨质疏松的药物设计和临床治疗方案的开辟。

通过 PTH 诱发的信号转导特征,设计各种信号通路的选择性模拟肽片段,或者应用各种化学抑制剂可以选择性地激活 PTH 的单一信号通路,是目前 PTH 应用基础领域研究方向之一^[22]。PTH 拟似物的化学修饰方法使得其活性和特异性大幅改变,为 PTH 信号通路研究提供了方法。例如,将天然 PTH 多肽 N 端的 3 个氨基酸残基截除可以使得 PTH 不再具有 cAMP/PKA 激活活性,其中首个氨基酸的变异(Ser1 → Gly1)使 PTH(1-34)失去激活 PLC 信号的特性,C 端切除 29-34 号氨基酸可以使得 PTH 与受体的结合活性降低为天然多肽的 1/100^[23]。而第 19 位的谷氨酸变成精氨酸后,可以部分增强 PTH 拟似物与受体的结合活力^[24]。但上述选择性模拟肽片段的生物学活性尚未详细研究,故难以投入临床应用,因此下一步我们将利用本研究的结论用于对 PTH 调节骨代谢的选择性模拟肽片段的筛选,以期为临床骨质疏松的治疗提供一定的理论依据。

参考文献

[1] Wood CL, Stenson C, Embleton N. The developmental origins of osteoporosis[J]. *Curr Genomics*, 2015, 16(6):411-418.

[2] Rasheed M, Kaim Khani GM, Rasheed N. Awareness of osteoporosis in men[J]. *J Pak Med Assoc*, 2015, 65: S12-16.

[3] Ralston SH, Fraser J. Diagnosis and management of osteoporosis[J]. *Practitioner*, 2015, 259: 15-19.

[4] Fan Y, Hanai JI, Le PT, et al. Parathyroid hormone directs bone marrow mesenchymal cell fate [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(3): 661-672.

[5] Fang L, Tang B, Hou DW, et al. Effect of parathyroid hormone on serum magnesium levels; the neglected relationship in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism [J]. *Ren Fail*, 2016, 38(1): 50-56.

[6] Chen HL, Fu TZ, Ma YY, et al. Intermittent administration of parathyroid hormone ameliorated alveolar bone loss in experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Arch Oral Biol*, 2017, 83: 76-84.

[7] Wu SQ, Ma SZ, Zhang C, et al. Effects of human parathyroid hormone on bone morphogenetic protein signal pathway following spinal fusion in diabetic rats[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2017, 31(1): 111-117.

[8] Kumabe Y, Lee SY, Waki T, et al. Triweekly administration of parathyroid hormone (1-34) accelerates bone healing in a rat refractory fracture model[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2017, 18(1): 545.

[9] Osagie-Clouard L, Sanghani A, Coathup M, et al. Parathyroid hormone 1-34 and skeletal anabolic action; the use of parathyroid hormone in bone formation[J]. *Bone Joint Res*, 2017, 6(1): 14-21.

[10] Ziablitsev DS, Larin OS. Influence of single nucleotide polymor-

phisms of vitamin D receptor-gene on the level of osteoassociated hormones linkage with postmenopausal osteoporosis [J]. *Fiziol Zh*, 2015, 61(5): 21-27.

[11] Wein MN. Parathyroid hormone signaling in osteocytes [J]. *JBM Plus*, 2018, 2(1): 22-30.

[12] Siddiqui JA, Partridge NC. CCL2/monocyte chemoattractant protein 1 and parathyroid hormone action on bone [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017, 8: 49.

[13] Ichise T, Yoshida N, Ichise H. CBP/p300 antagonises EGFR-Ras-Erk signalling and suppresses increased Ras-Erk signalling-induced tumour formation in mice [J]. *J Pathol*, 2019, 249(1): 39-51.

[14] Suarez-Bregua P, Torres-Nuñez E, Saxena A, et al. Pth4, an ancient parathyroid hormone lost in eutherian mammals, reveals a new brain-to-bone signaling pathway [J]. *FASEB J*, 2017, 31(2): 569-583.

[15] Tsai CN, Tsai CL, Yi JS, et al. Activin A regulates the epidermal growth factor receptor promoter by activating the PI3K/SPI pathway in oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5197.

[16] Takeda S, Sakai S, Tanaka K, et al. Intermittent ibandronate maintains bone mass, bone structure, and biomechanical strength of trabecular and cortical bone after discontinuation of parathyroid hormone treatment in ovariectomized rats [J]. *Calcif Tissue Int*, 2017, 101(1): 65-74.

[17] Iwaniec UT, Trevisiol CH, Maddalozzo GF, et al. Effects of low-dose parathyroid hormone on bone mass, turnover, and ectopic osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse [J]. *Bone*, 2008, 42(4): 695-701.

[18] Yang DH, Guo J, Divieti P, et al. CBP/p300-interacting protein CITED1 modulates parathyroid hormone regulation of osteoblastic differentiation [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(4): 1728-1735.

[19] Xia EJ, Wang YH, Bhandari A, et al. CITED1 gene promotes proliferation, migration and invasion in papillary thyroid cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1): 105-112.

[20] Lin Z, Feng R, Li J, et al. Nuclear translocation of CBP/p300-interacting protein CITED1 induced by parathyroid hormone requires serine phosphorylation at position 79 in its 63-84 domain [J]. *Cell Signal*, 2014, 26: 2436-2445.

[21] Shirakawa J, Harada H, Noda M, et al. PTH-induced osteoblast proliferation requires upregulation of the ubiquitin-specific peptidase 2 (Usp2) expression [J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 98(3): 306-315.

[22] Morgan EF, Mason ZD, Bishop G, et al. Combined effects of recombinant human BMP-7 (rhBMP-7) and parathyroid hormone (1-34) in metaphyseal bone healing [J]. *Bone*, 2008, 43(6): 1031-1038.

[23] Ohshima K, Takeda S, Hirose M, et al. Structure-function relationship of the nuclear localization signal sequence of parathyroid hormone-related protein [J]. *Biomed Res*, 2012, 33(3): 191-199.

[24] Benvenega S, Guarneri F, Vita R. Sequence homology of parathyroid hormone against amyloidogenic regions of proteins [J]. *Endocrine*, 2017, 55(2): 635-639.

收稿日期: 2019-05-27 修回日期: 2019-07-18 编辑: 石嘉莹