

Chemokine-Like Receptor 1 信号通路对 双氢睾酮诱导小鼠骨密度增加的影响

姜晓彤^{1,2} 向 亮¹ 范秀军¹ 葛利江² 张 键¹

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 生殖健康实验室 深圳 518055)

²(山东农业大学 泰安 271018)

摘 要 文章通过在小鼠体内注射双氢睾酮和 2α -萘酰乙基三甲基碘化铵以及体外水平培养诱导骨髓间充质干细胞, 研究 G 蛋白偶联受体趋化因子样受体 1 (Chemokine-Like Receptor 1, CMKLR1) 基因缺失对双氢睾酮诱导的骨髓间充质干细胞向成骨分化的影响。结果发现 CMKLR1 基因缺失后骨髓间充质干细胞的成骨分化率降低, 双氢睾酮刺激后, 野生型小鼠的骨髓间充质干细胞成骨分化有所提升, 而 CMKLR1 缺失小鼠的骨髓间充质干细胞成骨分化变化不大, 说明 CMKLR1 基因的缺失影响了双氢睾酮对骨细胞的作用。

关键词 成骨细胞; 骨质疏松; 双氢睾酮; G 蛋白偶联受体趋化因子样受体 1

中图分类号 TG 156 **文献标志码** A

Effects of Chemokine-Like Receptor 1 Signal Pathway on Mice Induced by Dihydrotestosterone Increased Bone Mineral Density

JIANG Xiaotong^{1,2} XIANG Liang¹ FAN Xiujun¹ GE Lijiang² ZHANG Jian¹

¹(Laboratory of Reproductive Health, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract To study the effect of dihydrotestosterone on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells after chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) gene knockout, dihydrotestosterone and N,N,N -trimethyl- γ -oxo-2-naphthalenepropanaminium, monoiodide were injected in mice and induced bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. The results showed that osteogenic differentiation rate decreased after CMKLR1 gene knockout and increased when dihydrotestosterone was injected in wild type mice bone marrow mesenchymal stem cells. However, there was no significant change in CMKLR1 knockout mice. The result indicated that the effect of dihydrotestosterone on bone cells was affected by the deletion of CMKLR1.

Keywords osteoblasts; osteoporosis; dihydrotestosterone; chemokine-like receptor 1

收稿日期: 2016-12-22 修回日期: 2017-02-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(1500684); 深圳市基础研究(JCYJ20150521144321006); 深圳市海外高层次人才创新创业专项资金项目(KQCX20140521115045442); 国家自然科学基金面上项目(81270074)

作者简介: 姜晓彤, 硕士研究生, 研究方向为动物生殖疾病与生殖内分泌; 向亮, 博士, 研究方向为海洋生物学; 范秀军, 博士, 副研究员, 研究方向为宫内微环境与妊娠相关疾病; 葛利江(通讯作者), 博士, 副教授, 研究方向为动物生殖疾病与生殖内分泌, E-mail: glj@sdau.edu.cn; 张键(通讯作者), 博士, 研究员, 研究方向为生殖与内分泌学, E-mail: jian.zhang@siat.ac.cn。

1 引言

骨质疏松症是一种常见的骨代谢性疾病。随着社会的老龄化, 该病的患病率正日益上升。哥本哈根(1990年)和香港(1993年)两次国际会议提出了骨质疏松的定义: 骨质疏松症是以低骨量及骨组织微结构蜕变为特征的一种全身性骨骼疾病, 伴有骨脆性增加, 易于发生骨折^[1]。骨质疏松严重影响着人类的健康, 据不完全统计, 中国40岁以上人群骨质疏松症总体患病率为13.2%, 男性人群中近五年患病率较五年前明显增加, 因此开展骨质疏松的预防与治疗意义重大^[2]。

由于老年男性骨质疏松发病率的提高, 雄激素对骨的作用机制成为人们关注的热点。成骨细胞、破骨细胞、骨细胞、骨髓间充质干细胞表面均有雄激素受体, 雄激素对成骨细胞的调控是直接通过成骨细胞上的雄激素受体实现的, 睾酮、双氢睾酮(Dihydrotestosterone, DHT)与雄激素受体有较强的亲和力^[3], 雄激素通过雄激素受体刺激骨膜的形成^[4]; 同样, 也有研究表明雄激素对骨的作用并不是直接作用于骨细胞^[5]。而骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)是可以向不同类型的细胞发生转化的, 其转化的命运是由细胞外信号分子调控的^[6-7]。其中, 细胞因子 Chemerin (也被称为他扎罗汀诱导基因 2 或视黄酸受体反应子 2) 是 2007 年被确定的一种新型脂肪细胞因子^[8]。目前, Yoshimura 和 Oppenheim^[9]研究发现, 与之对应的 G 蛋白偶联受体有: G 蛋白偶联受体趋化因子样受体 1 (Chemokine-Like Receptor 1, CMKLR1)、C-C 趋化因子样受体 2 (C-C Chemokine Receptor-Like, CCRL2) 和 G 蛋白偶联受体 1 (G-Protein Coupled Receptor 1, GPR1)。研究表明脂肪因子 Chemerin 与其受体之一 CMKLR1 能够介导免疫^[10]、炎症^[11]、代谢^[12]、生殖^[13]及癌症^[14]

方面的疾病。Chemerin 与其受体 CMKLR1 协调作用可以促进骨髓间充质干细胞向脂肪细胞转化^[15], 而 CMKLR1 介导的信号通路在骨形成中的作用至今没有报道, 本文主要阐释了 DHT 与 CMKLR1 信号通路对骨形成的影响。

2 材料和方法

2.1 实验材料

试验所用 CMKLR1^{-/-}小鼠 (CMKLR1 基因敲除 C57BL/6J 小鼠) 来自 Zabel 实验室的慷慨馈赠, C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物中心; 基础培养基、磷酸盐缓冲液均购自 Hyclone 公司; 胎牛血清、胰酶、成骨诱导培养基 (货号: A1007201) 和青、链霉素均购自 Gibco 公司; α -NETA (*N,N,N*-trimethyl- γ -oxo-2-naphthalenepropanaminium, monoiodide, CMKLR1 拮抗剂) 购自 R&D 公司; RNA 提取液 Trizol 购自 Invitrogen 公司; 实时荧光定量 PCR 引物由 Invitrogen 公司合成; 氯仿、异丙醇、无水甲醇、无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司; 茜素红 S 购于 Sigma 公司。

2.2 方法

2.2.1 动物实验

雌鼠在出生后的第 25 天, 将野生型 (Wild Type, WT) 小鼠随机分为: 对照组、DHT 组、DHT + α -NETA 组, 每组 5 只。对照组: 按照 6 mg/100 g 皮下注射芝麻油, 按照 1 mg/kg 腹腔注射生理盐水。DHT 组: 按照 6 mg/100 g 皮下注射 DHT, 按照 1 mg/kg 腹腔注射生理盐水。DHT + α -NETA 组: 6 mg/100 g 皮下注射 DHT, 1 mg/kg 腹腔注射 α -NETA, 共处理 21 天, 取材测试。

2.2.2 骨组织显微 CT 扫描分析

取小鼠的股骨和胫骨, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 将其平放于显微 CT 扫描床上, 固定, 进

行扫描：电压 70 kV，电流 114 μ A，功率 8 W。扫描重建完成后，对干骺端骨小梁进行结构分析。从股骨远端干骺端生长板消失处继续往下弃去 10 层后，选取 200 层作为骨小梁重建区域进行分析，使用显微 CT 自带软件选择 Bone Trab. Morphometry 程序进行重建，阈值为 170。主要分析指标包括骨密度、骨体积分数、骨小梁数量三项指标。

2.2.3 小鼠骨髓间充质干细胞分离培养

引颈脱臼法处死小鼠，75% 乙醇浸泡 10 min，无菌取胫骨和股骨，将肌肉剔除干净，用完全培养基(基本培养基+10% 胎牛血清+1% 青、链霉素)反复冲洗骨髓腔，直至胫骨、股骨变为苍白色，轻轻吹打骨髓液，200 目滤网过滤，收集滤液离心后去上清，用红细胞裂解液裂解 5 min，磷酸盐缓冲液洗两次，加入完全培养基，种板，37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 常规培养。24 h 后首次换液，以后每 2~3 天换液，细胞融合 70%~80% 后 1:2 传代培养，取 3~5 代用于试验。

2.2.4 骨髓间充质干细胞诱导分化

用完全培养基体外培养细胞，每 2 天换液，待细胞长到 70%~80%，传代培养， 1×10^5 个/孔接种到 12 孔板中，加入完全培养基待细胞长到 50% 更换为诱导培养基，分组加入 100 nmol/L

DHT 和 1 μ mol/L α -NETA 进行培养。72 h 后，用 RNA 提取液 Trizol 收集细胞，-80 $^{\circ}$ C 保存。细胞诱导培养 21 天后茜素红 S 染色。

2.2.5 茜素红 S 染色

茜素红 S 染色：21 天诱导结束，磷酸盐缓冲液清洗细胞 3 次，4% 多聚甲醛室温固定 30 min，磷酸盐缓冲液清洗细胞 3 次；然后室温用茜素红 S 染色 30 min，磷酸盐缓冲液清洗后正置显微镜拍照记录，分析钙结节的矿化。

2.2.6 实时荧光定量 PCR

按照 Invitrogen 公司 Trizol 法，从骨组织和 72 h 诱导的骨髓间充质干细胞中提取 RNA，反转录为 cDNA，进行实时荧光定量 PCR。反应体系：预变性 95 $^{\circ}$ C 1 min，变性 95 $^{\circ}$ C 15 s，退火 60 $^{\circ}$ C 15 s，延伸 72 $^{\circ}$ C 45 s，41 个循环，所用引物见序列表 1。

2.2.7 统计分析

用 ImageJ 分析矿化结果，统计钙结节数量。根据实时荧光定量 PCR 的反应曲线得到目的基因和内参基因的 CT 值，各目的基因的相对表达量采用 Δ CT 法计算，目的基因相对表达水平 = $2^{-\Delta CT}$ 。用 Prism6.0 软件处理实验数据，所有实验结果均以“均值 \pm 标准差 (Means \pm SEM)”表示，对试验结果进行 t 检验， $P < 0.05$ 具有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 Primers for RT-PCR

Genes	Forward(5'-3')	Reverse(3'-5')
Mouse beta-actin	GTATCCATGAAATAAGTGGTTACAGG	GCAGTACATAATTTACACAGAAGCAAT
Mouse Chemerin	TACAGGTGGCTCTGGAGGAGTTC	CTTCTCCCGTTTGGTTTGATTG
Mouse CMKLR1	CGAGTTCTCAAACCCTGAAGTCGC	CAAGTCCACAAAGTAGCCAAAGCC
Mouse CCRL2	CTCTGCTTGTCTCGTGCTT	GCCCACTGTTGTCCAGGTAG
Mouse GPR1	GGAGCTCAGCATTCATCACA	GACAGGCTCTTGTTTCAGC
Mouse Runx2	TTCAACGATCTGAGATTTGTGGG	GGATGAGGAATGCGCCCTA
Mouse ALP	GCCCTCCAGATCCTGACCAA	GCAGAGCCTGCTGGTCTTA
Mouse Osterix	ATGGCTCGTGGTACAAGGC	GCAAAGTCAGATGGGTAAGTAGG
Mouse Col1a2	CTGGAACAAATGGGCTCACTG	CAGGCTCACCAACAAGTCTC

3 结果

3.1 小鼠骨和骨髓间充质干细胞中 Chemerin 和 CMKLR1 mRNA 的表达

为了检测小鼠的骨组织与骨髓间充质干细胞中是否存在 Chemerin mRNA、CMKLR1 mRNA、GPR1 mRNA 和 CCRL2 mRNA, 提取了野生型小鼠的骨组织及骨髓间充质干细胞进行检测。实时荧光定量 PCR 结果显示, 脂肪因子 Chemerin 与其三个受体 CMKLR1、GPR1 和 CCRL2 在正常饲料喂养的 C57 小鼠的骨组织和骨髓间充质干细胞中均有表达, 如图 1 所示。

3.2 拮抗 CMKLR1 对双氢睾酮诱导小鼠骨形成的影响

为了检测 CMKLR1 信号通路对双氢睾酮诱导成骨的作用, 我们用 α -NETA 拮抗了 CMKLR1 与 Chemerin 的结合。结果显示, 在 DHT 组中, 小鼠的骨密度 (Bone Mineral Density, BMD)、骨体积分数 (Bone Volume/Total Volume, BV/TV)、骨小梁数 (Trabecular Number, Tb.N) 显著高于对照组。而在 α -NETA 组中, 骨密度、骨体积分数和骨小梁数比 DHT 组减少。另外, 我们检测了骨组织中的碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP), 骨细胞特异性转录因子 (Runt-Related Transcription Factor, Runx2) 和 I 型胶原

$\alpha 2$ (Collagen, type, alpha2, col1a2), DHT 组骨组织中 ALP、Runx2 和 Col1a2 表达水平显著升高, 而在 α -NETA 组中的表达则下降 (图 2)。

3.3 CMKLR1 基因缺失对双氢睾酮诱导小鼠骨髓间充质干细胞成骨的影响

为了进一步验证 CMKLR1 信号通路对双氢睾酮诱导成骨的作用, 我们体外分离培养 CMKLR1^{-/-}和野生型小鼠的骨髓间充质干细胞。结果发现, 在未进行成骨诱导组中 (图 3(a)) 加入双氢睾酮后, 野生型小鼠的骨髓间充质干细胞中的 ALP, Runx2 及成骨相关转录因子 Osterix 的表达均升高, 而在 CMKLR1^{-/-}小鼠的骨髓间充质干细胞中的变化并不明显。同时, 我们对这几组细胞进行了成骨诱导 (图 3(b)), 与野生型组相比较, CMKLR1 基因缺失后成骨相关基因 ALP、Runx2 和 Osterix 的表达降低。另外, 在两组中分别加入双氢睾酮, 野生型组中成骨相关基因的表达明显升高, 但在 CMKLR1 基因缺失组的变化不明显。由于成骨诱导后钙盐形成影响细胞生长, 使成骨诱导组成骨基因的表达低于对照组。21 天成骨诱导后茜素红染色结果显示 (图 3(c)), 野生型组的钙盐沉积较多, 钙结节数量明显增多, CMKLR1^{-/-}组中钙结节的数量相对较少, 统计分析后发现双氢睾酮能够增加了野生型组的钙结节的形成, 但在 CMKLR1^{-/-}组中的变化并不显著 (图 3)。

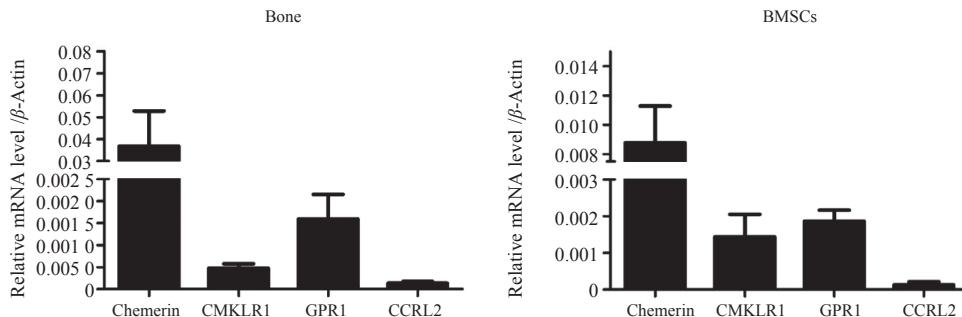


图 1 C57 小鼠骨和骨髓间充质干细胞中 Chemerin、CMKLR1、GPR1 和 CCRL2 的表达 (图中数据为平均值 \pm 标准差, $n=3$)

Fig. 1 Expression of Chemerin, CMKLR1, GPR1 and CCRL2 in bone and bone marrow mesenchymal stem cells

(BMSCs) in C57 mice (The data is presented as the Means \pm SEM, $n=3$)

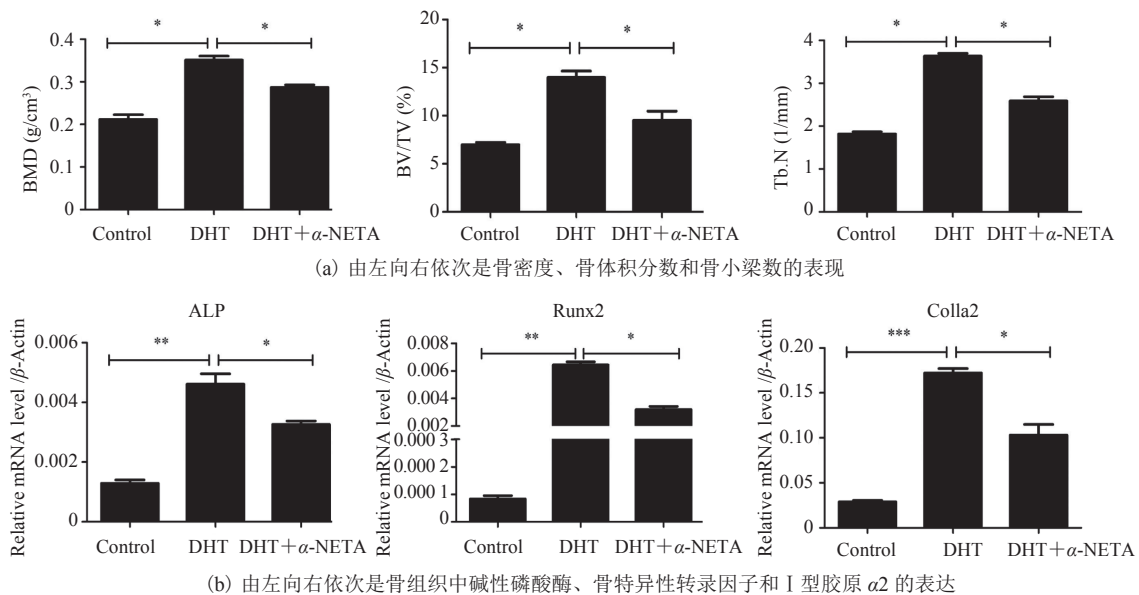


图 2 野生型小鼠股骨 CT 分析结果以及成骨相关基因表达

(图中数据为平均值±标准差, $n=5$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

Fig. 2 Micro CT analysis of the femoral in wild-type mice and expression of osteogenesis

(The data is presented as the Means±SEM, $n=5$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

3.4 双氢睾酮对 CMKLR1 拮抗的小鼠骨髓间充质干细胞成骨的影响

体外培养野生型小鼠的骨髓间充质干细胞, 用 α -NETA 拮抗 CMKLR1, 试验结果与之前的结果基本一致。CMKLR1 被拮抗后, ALP mRNA 的表达降低, 在成骨诱导前(图 4(a)), 双氢睾酮增加了野生型小鼠的骨髓间充质干细胞中 ALP mRNA 的表达, 而这种变化在 α -NETA 组中的变化并不明显, 然而, Runx2 mRNA 的表达与之前不太一致。成骨诱导后的结果显示(图 4(b)), CMKLR1 被拮抗后, 成骨相关基因 ALP 和 Runx2 的表达都明显下降, 增加双氢睾酮后, 野生型组的成骨相关基因表达升高, α -NETA 拮抗组没有明显的变化。21 天诱导后茜素红染色钙结节结果显示(图 4(c)), CMKLR1 基因被拮抗后, 钙盐沉积减少, 钙结节数量也相应减少, 双氢睾酮的增加, α -NETA 组的结节的形成没有明显影响, 但对野生型组钙结节的形成有

一定的改善。

4 讨论

骨髓间充质干细胞具有向成骨细胞和成脂细胞分化的能力^[16,17], 其分化的方向受多种胞外的信号因子调控^[4,5]。Gomez 等^[18]研究表明脂肪因子调控成骨和成脂分化以及骨代谢功能, 如瘦素和脂联素能够诱导骨细胞分化和骨骼生长, 同时抑制骨髓脂肪细胞生成。而新的脂肪因子 Chemerin 既可以调节骨髓间充质干细胞向成骨方向分化, 又可以调节造血干细胞向破骨细胞方向分化^[19]。实验结果显示, Chemerin 与其受体 CMKLR1、GPR1、CCRL2 在野生型小鼠的骨组织和骨髓间充质干细胞中均有表达。Zabel 等^[11]研究表明 Chemerin 与受体 CMKLR1 有较强的结合力, 并协调促进骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化。Muruganandan 等^[15]实验结果也显

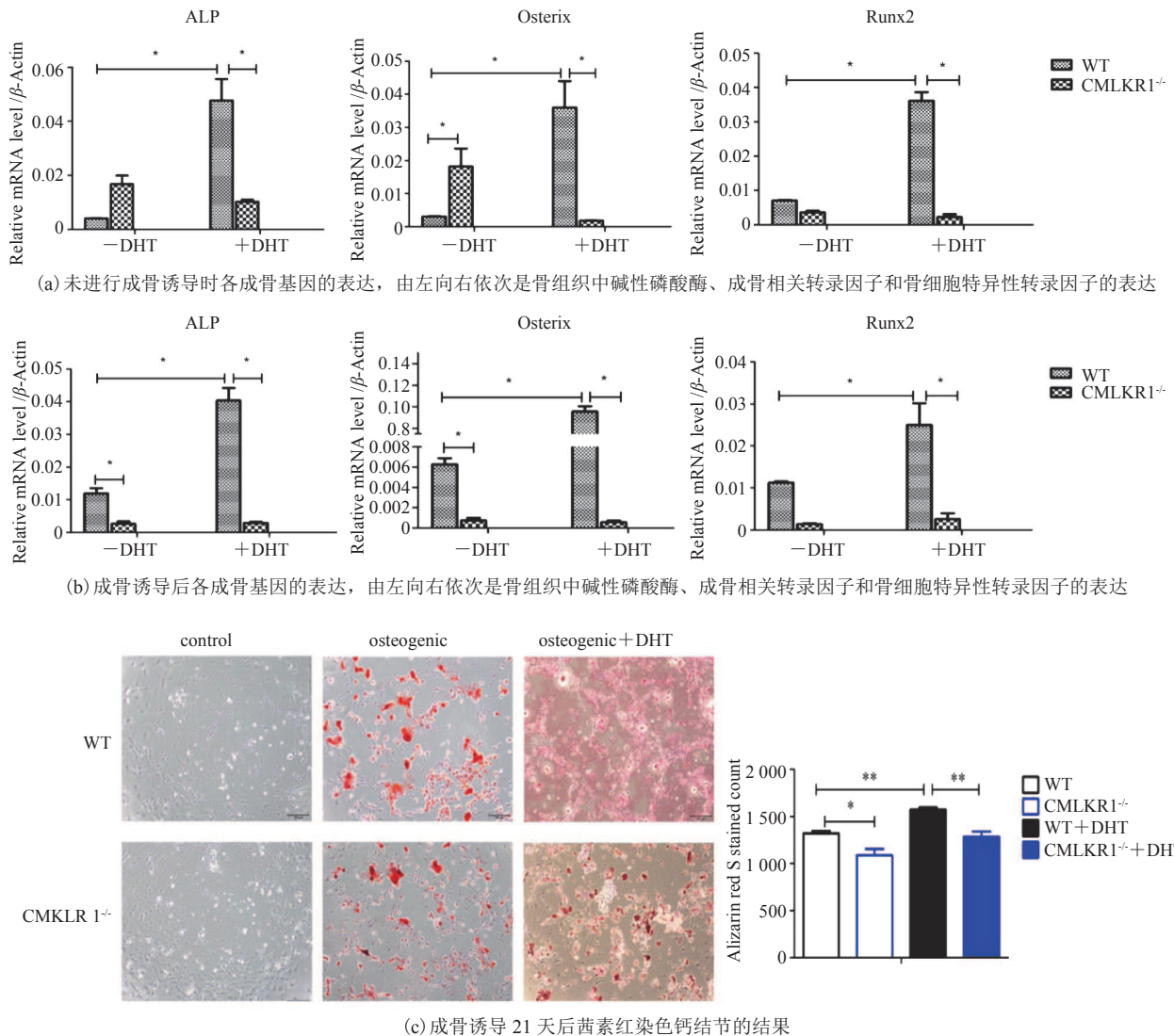


图 3 野生型和 $\text{CMKLR1}^{-/-}$ 骨髓间充质干细胞成骨基因表达及钙结节形成

(图中数据为平均值 \pm 标准差, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$)

Fig. 3 ALP, Runx2 and Osterix levels in the BMSCs of wild-type and $\text{CMKLR1}^{-/-}$ mice, and formation of calcium nodules

(The data is presented as the Means \pm SEM, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$)

示, Chemerin/ CMKLR1 能够抑制骨细胞的矿化作用。

男性体内主要的雄激素是睾酮。有研究报道, 男性骨密度与其血中睾酮水平呈正相关, 睾酮缺乏是男性骨质疏松的重要原因之一^[20], 老年男性中骨密度的下降伴随睾酮浓度的下降^[21]。前期研究发现雄性 CMKLR1 基因敲除小鼠体内

睾酮含量明显偏低并且骨密度明显减少, 提示 CMKLR1 与睾酮合成有关, 且与睾酮相关的骨形成有关(未发表)。野生型小鼠体内试验结果表明, 双氢睾酮能够增加骨密度及骨体积分数, 促进成骨基因的表达。 α -NETA 能够与 CMKLR1 竞争性地结合 Chemerin^[22], 当 CMKLR1 被拮抗后骨密度降低, 骨体积分数降低, 成骨基因的表

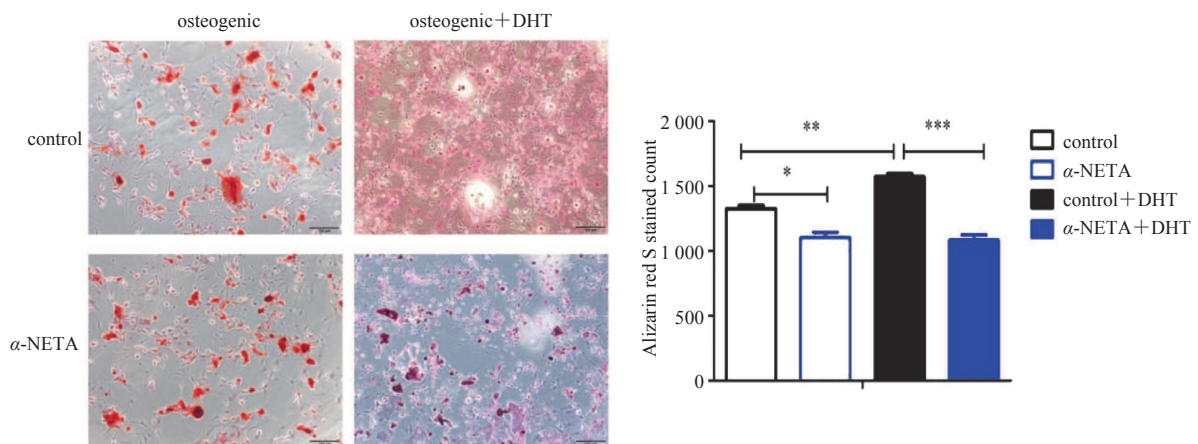
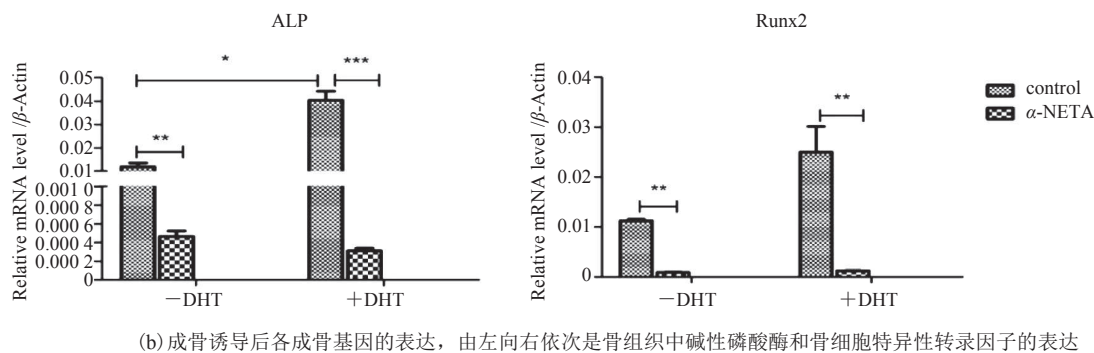
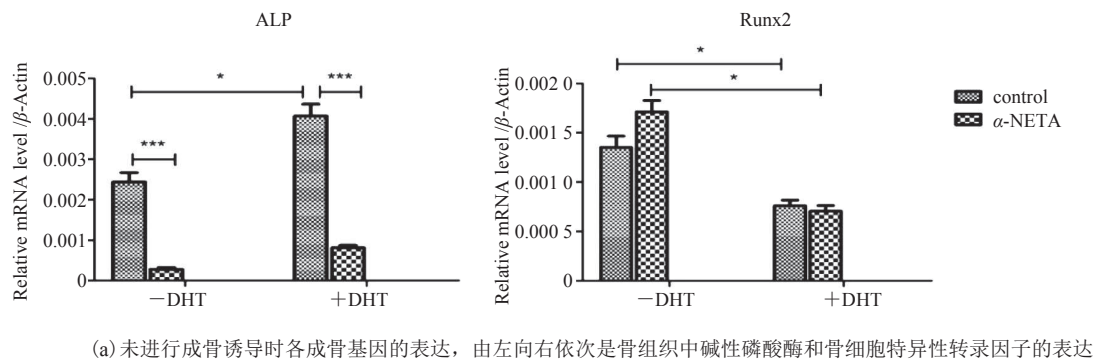


图 4 拮抗 CMKLR1，骨髓间充质干细胞成骨基因表达及钙结节形成

(图中数据为平均值±标准差， $n=3$ ， $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ ， $***P<0.001$)

Fig. 4 ALP, Runx2 levels in the BMSCs of WT after CMKLR1 inhibited, and formation of calcium nodules

(The data is presented as the Means±SEM, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)

达也下调，与我们之前的试验结果是一致的。同时，我们发现 CMKLR1^{-/-} 小鼠的骨髓间充质干细胞成骨诱导后，成骨相关基因的表达低于野生型小鼠，我们推测这可能是由于 CMKLR1 基因

缺失后影响了雄激素的形成及其对骨形成的作用。本实验室之前的研究显示，在多囊卵巢综合症模型中，CMKLR1 基因缺失能够缓解双氢睾酮诱导形成的卵巢功能障碍^[23]，进一步说明

了 CMKLR1 基因缺失能够影响双氢睾酮对其他组织的作用。随后我们用双氢睾酮诱导野生型和 CMKLR1^{-/-} 小鼠的骨髓间充质干细胞, 野生型小鼠的成骨基因的表达升高, 但 CMKLR1^{-/-} 小鼠的成骨基因的表达变化不大, 这可能与 CMKLR1 基因的缺失有关。另外, 我们也用 α -NETA 对野生型小鼠的骨髓间充质干细胞中的 CMKLR1 进行拮抗, 结果与 CMKLR1^{-/-} 小鼠的骨髓间充质干细胞成骨诱导的结果基本一致, 这也进一步验证了我们的推测。

骨骼是一个动态活性组织, 它通过持续的重塑来维持其矿化平衡及自身结构的完整^[24]。在健康的人体中, 成骨细胞的骨形成与破骨细胞的骨吸收协调发展, 共同调控骨内动态平衡。成骨细胞和破骨细胞起源于不同类型的干细胞^[25]。骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化是由复杂的信号通路控制的, 目前研究较多的是骨形态发生蛋白信号通路和 Wnt 信号通路, 而作为 Chemerin 的功能性受体之一, CMKLR1, 所介导的通路在骨形成中的作用至今没有报道, 本实验对此进行了初期的探索。

5 结 论

本研究用双氢睾酮诱导 WT/CMKLR1^{-/-} 小鼠的骨髓间充质干细胞。结果显示双氢睾酮能够促进成骨基因的表达, CMKLR1 基因缺失降低了骨髓间充质干细胞的成骨分化率, 影响了双氢睾酮对骨细胞的作用。通过用 α -NETA 拮抗野生型小鼠骨髓间充质干细胞中 CMKLR 与 Chemerin 的结合进一步验证了 DHT/CMKLR1 对小鼠骨形成的影响。

本实验关于 DHT/CMKLR1 对小鼠骨形成的影响, 可能会为阐明 CMKLR1 信号系统在雄激素合成异常引起的骨质疏松中的作用机制提供新的见解, 对推动 CMKLR1 分子作为治疗男性骨

质疏松疾病的新药开发及应用提供一定的帮助。

参 考 文 献

- [1] Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk [J]. *Lancet*, 2002, 359(9321): 1929-1936.
- [2] 韩亚军, 帖小佳, 伊力哈木·托合提. 中国中老年人骨质疏松症患病率的 Meta 分析 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(7): 1129-1134.
- [3] 周涛, 周智梁. 雄激素对骨的作用 [J]. *中华男科学杂志*, 2005, 11(5): 371-374.
- [4] Vanderschueren D, Laurent MR, Claessens F, et al. Sex steroid actions in male bone [J]. *Endocrine Reviews*, 2014, 35(6): 906-960.
- [5] Ucer S, Iyer S, Bartell SM, et al. The effects of androgens on murine cortical bone do not require AR or ER α signaling in osteoblasts and osteoclasts [J]. *Journal of Bone & Mineral Research*, 2015, 30(7): 1138-1149.
- [6] Kobayashi T, Kronenberg H. Minireview: transcriptional regulation in development of bone [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(3): 1012-1017.
- [7] Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2008, 473(2): 98-105.
- [8] Goralski KB, Mccarthy TC, Hanniman EA, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(38): 28175-28188.
- [9] Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2): two multifunctional receptor with unusual properties [J]. *Experimental Cell Research*, 2011, 317(5): 674-687.
- [10] Wittamer V, Bondue B, Guillabert A, et al. Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity [J]. *Journal of Immunology*, 2005, 175(1): 487-493.
- [11] Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, et al. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades [J].

- Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(41): 487-493.
- [12] Bozaoglu K, Bolton K, Mcmillan J, et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(10): 4687-4694.
- [13] Garces MF, Sanchez E, Acosta BJ, et al. Expression and regulation of chemerin during rat pregnancy [J]. *Placenta*, 2012, 33(5): 373-378.
- [14] Pachynski RK, Zabel BA, Kohrt HE, et al. The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2012, 209(8): 1427-1435.
- [15] Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ, et al. Role of Chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells [J]. *Journal of Bone & Mineral Research*, 2010, 25(2): 222-234.
- [16] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. *Science*, 1997, 276: 71-74.
- [17] Tuli R, Tuli S, Nandi S, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(6): 681-693.
- [18] Gomez R, Conde J, Scotece M, et al. What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases? [J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2011, 7(9): 528-536.
- [19] Muruganandan S, Dranse HJ, Rourke JL, et al. Chemerin neutralization blocks hematopoietic stem cell osteoclastogenesis [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(10): 2172-2187.
- [20] Bhasin S, Cunningham GR, Hayes F, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society clinical practice guideline [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2010, 95(6): 2536-2559.
- [21] Venken K, Callewaert F, Boonen S, et al. Sex hormones, their receptors and bone health [J]. *Osteoporosis International*, 2008, 19(11): 1517-1525.
- [22] Graham KL, Zhang JV, Lewén S, et al. A novel CMKLR1 small molecule antagonist suppresses CNS autoimmune inflammatory disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e112925.
- [23] 唐蜜. CMKLR1 基因缺失对 DHT 诱导的小鼠类 PCOS 模型中卵巢功能的影响 [D]. 西安: 西北农林科技大学, 2015.
- [24] Marcus R, Leary D, Schneider DL, et al. The contribution of testosterone to skeletal development and maintenance: lessons from the androgen insensitivity syndrome [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2000, 85: 1032-1037.
- [25] Khosla S, Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, et al. Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001, 86(8): 3555-3561.