

本文引用:刘 勇,易振宇,张信成.基于 OPG/RANK/RANKL 信号通路探究益肾健骨颗粒对绝经后骨质疏松大鼠 BMSCs 成骨分化的影响[J].湖南中医药大学学报,2022,42(8):1277-1282.

# 基于 OPG/RANK/RANKL 信号通路探究益肾健骨颗粒对绝经后骨质疏松大鼠 BMSCs 成骨分化的影响

刘 勇<sup>1</sup>,易振宇<sup>2</sup>,张信成<sup>3</sup>

(1.湖南省中西医结合医院医保科,湖南 长沙 410006;2.湖南省中西医结合医院脊柱骨肿瘤科,湖南 长沙 410006;  
3.湖南省中西医结合医院创伤关节科,湖南 长沙 410006)

**〔摘要〕**目的 探讨益肾健骨颗粒对绝经后骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化的影响及其作用机制。**方法** 给予大鼠分别灌胃益肾健骨颗粒、生理盐水 1 周,制备含药血清及正常血清。采用背侧双切口切除双侧卵巢建立绝经后骨质疏松模型,分离并培养大鼠 BMSCs,流式细胞术鉴定 BMSCs,将 BMSCs 细胞随机分为对照组(N 组)、含药血清组(J 组)、含药血清+si-NC 组(J+C 组)、含药血清+si-OPG 组(J+O 组),按组进行相应处理,对各组 BMSCs 进行诱导成骨分化,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色与茜素红 S 染色法检测 ALP 活性及矿化结节数,实时荧光定量 PCR(real-time PCR, RT-qPCR)检测 ALP、Runx2 相关转录因子 2(Runx2)、骨钙素(osteocalcin, OCN)mRNA 表达,Western blot 检测骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、核因子  $\kappa$ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor kappa B, RANK)、RANK 配体(RANK ligand, RANKL)蛋白表达。**结果** 成骨分离绝经后骨质疏松大鼠 BMSCs,并通过形态及 CD29、CD44、CD45、CD34 表达鉴定;与 N 组比较,J 组与 J+C 组细胞染色加深,ALP 活性、矿化结节数、ALP、Runx2、OCN mRNA 表达水平及 OPG 蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ ),RANK、RANKL 蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ );与 J 组、J+C 组比较,J+O 组细胞 ALP 染色变浅,ALP 活性、矿化结节数、ALP、Runx2、OCN mRNA 表达水平及 OPG 蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ ),RANK、RANKL 蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ )。**结论** 益肾健骨颗粒通过调节 OPG/RANK/RANKL 信号通路,促进绝经后骨质疏松大鼠 BMSCs 成骨分化。

**〔关键词〕** 益肾健骨颗粒;绝经后骨质疏松;OPG/RANK/RANKL 信号通路;骨髓间充质干细胞;成骨分化

**〔中图分类号〕** R271.9

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.08.009

## Effects of Yishen Jiangu Granules on the osteogenic differentiation of BMSCs in postmenopausal osteoporosis rats based on OPG/RANK/RANKL signaling pathway

LIU Yong<sup>1</sup>, YI Zhenyu<sup>2</sup>, ZHANG Xincheng<sup>3</sup>

(1. Medical Insurance Department of Hunan Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Changsha, Hunan 410006, China; 2. Department of Spinal Bone Oncology, Hunan Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Changsha, Hunan 410006, China; 3. Department of Traumatic Arthritis, Hunan Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Changsha, Hunan 410006, China)

**〔Abstract〕 Objective** To investigate the effect and mechanism of Yishen Jiangu Granules on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in postmenopausal osteoporosis rats. **Methods** Rats were given Yishen Jiangu

**〔收稿日期〕** 2022-03-09

**〔基金项目〕** 湖南省中医药管理局科研计划重点课题(2020021)。

**〔第一作者〕** 刘 勇,女,医师,研究方向:中医药防治类风湿关节炎。

**〔通信作者〕** \*张信成,男,硕士,副主任医师, E-mail: zxc0556@163.com。

Granules and normal saline for 1 week to prepare drug-containing serum and normal serum. A rat model of postmenopausal osteoporosis was established by bilateral ovaries resection through dorsal double incision, BMSCs were isolated and cultured, and the BMSCs were identified by flow cytometry. The BMSCs were grouped into control group (N group), medicated serum group (J group), medicated serum+si-NC group (J+C group), and medicated serum+si-OPG group (J+O group), after treated according to the groups, the BMSCs in each group were induced to differentiate into osteogenic cells, alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red S staining were performed to measure ALP activity and the number of mineralized nodules, respectively, real-time PCR (RT-qPCR) was performed to measure the expressions of ALP, Runt-associated transcription factor 2 (Runx2), and osteocalcin (OCN) mRNA, Western blot was performed to measure the protein expression of osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) and RANK ligand (RANKL). **Results** BMSCs from postmenopausal osteoporotic rats were isolated, and the morphology and expression of CD29, CD44, CD45 and CD34 were identified. Compared with the N group, the staining of cells in the J group and J+C group was deepened, and the ALP activity, the number of mineralized nodules, ALP, Runx2, OCN mRNA expression levels and OPG protein expression levels were significantly increased ( $P<0.05$ ), the protein expression levels of RANK and RANKL were significantly decreased ( $P<0.05$ ); compared with the J group, J+C group, the ALP staining of the J+O group cells became lighter, ALP activity, and the number of mineralized nodules, ALP, Runx2, OCN mRNA expression levels and OPG protein expression levels were significantly decreased ( $P<0.05$ ), while RANK and RANKL protein expression levels were significantly increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Yishen Jiangu Granules can promote the osteogenic differentiation of BMSCs in postmenopausal osteoporosis rats by regulating the OPG/RANK/RANKL signaling pathway.

[**Keywords**] Yishen Jiangu Granules; postmenopausal osteoporosis; OPG/RANK/RANKL signaling pathway; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

骨质疏松症主要表现为骨量减少、骨微结构破坏,可增加骨折风险,多发于老年人,在绝经后的女性中发病率高达 50%,雌激素替代疗法为治疗骨质疏松症的有效措施,但是长期使用可增加乳腺癌的风险<sup>[1-2]</sup>。益肾健骨颗粒具有补益肝肾、益气养血、化痰通络的作用,对芳香化酶抑制剂相关的肌肉骨骼症状具有良好的改善作用<sup>[3]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)可分化为成骨细胞,在维持骨的重建过程中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。研究显示,健骨颗粒可以调低 miR-141 的表达,促进 BMSCs 成骨分化<sup>[5]</sup>。骨保护素(osteoprotegerin, OPG)/核因子  $\kappa$ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B, RANK)/RANK 配体(RANK ligand, RANKL)信号通路在骨吸收与骨形成过程中发挥调控作用,激活 OPG/RANKL/RANK 信号通路可抑制破骨细胞的分化和成熟,促进 BMSCs 细胞成骨分化<sup>[6]</sup>。因此,本研究探索肾健骨颗粒对绝经后骨质疏松大鼠 BMSCs 成骨分化及 OPG/RANK/RANKL 信号通路的影响,以期阐明其作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物

SPF 级 SD 雌性未受孕大鼠(7~8 周龄),体质量(200±20) g,购自广州中医药大学[生产许可证号:SCXK(粤)2019-0047]。

### 1.2 主要材料

益肾健骨颗粒(批号:20210320,湖南省中医药研究院制剂室); $\beta$ -磷酸甘油钠(批号:G9422)、地塞米松磷酸钠注射液(批号:D1576)、茜素红 S(批号:A5533)均购自美国 Sigma 公司;OPG 小干扰 RNA (small interfering RNA-OPG, si-OPG,批号:Z190301)、小干扰RNA 阴性对照(small interfering RNA negative control, si-NC,批号:A20210324)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP,批号:202104085)、Runt 相关转录因子 2(Runt-associated transcription factor 2, Runx2,批号:202006011)、骨钙素(osteocalcin, OCN,批号:H20210816)引物均购自广州锐博生物科技有限公司;反转录第一链 cDNA 合成试剂盒(批号:K1622,美国 Thermo Fisher 公司);通用型荧光定量试剂盒(批号:04913914001,美国 Roche 公司);5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP)/四唑硝基蓝(nitro blue tetrazolium chloride monohydrate, NBT)碱性磷酸酯酶显色试剂盒(批号:C3206)及 ALP 活性试剂盒(批号:P0321M)均购自碧云天生物科技有限公司;OPG(sc-390518)、RANK(批号:sc-59981)、RANKL(批号:sc-52950)抗体均购自美国 Santa cruz 公司;异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)荧光标记抗体 CD29-FITC(批号:ab21845)、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的 CD44-PE(批号:ab23396)、CD45-FITC

(批号:ab33916)和 CD34-PE(批号:ab223930)抗体均购自美国Abcam公司。凝胶成像系统(型号:FluorChem HD2,美国自然基因科技有限公司);流式细胞仪(型号:CytoFLEX,美国贝克曼库尔特公司);相差显微镜(型号:CX23,日本奥林巴斯公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 含药血清制备 给予大鼠益肾健骨颗粒灌胃,根据大鼠与人药物计量换算关系,大鼠每日用量为140 mg,溶解于0.5 mL生理盐水。另取大鼠给予不含药的生理盐水0.5 mL灌胃。所有大鼠均给药1周,给药结束后,腹主动脉采全血后,1500 r/min,离心半径10 cm,离心10 min取上清液并过滤除菌,分别获得益肾健骨颗粒含药血清及正常血清,置于-20℃冰箱冷冻备用。

1.3.2 BMSCs细胞分离与鉴定 参照文献[7]中的方法,采用背侧双切口切除双侧卵巢建立绝经后骨质疏松模型,术后1 d开始各组每日注射青霉素(2.0×10<sup>5</sup> IU/kg),共3 d。造模12周后,用microCT股骨远端扫描及检测体质量,当骨密度、骨体积分数、骨小梁数量等数值较正常显著降低时,提示造模成功<sup>⑧</sup>。

造模成功后断颈处死大鼠,无菌条件分离股骨和胫骨,去两端骨髓暴露骨髓腔,使用注射器注射α-MEM培养基反复吹打骨髓腔,收集细胞并过滤,接种至培养瓶中常规传代培养,每隔3 d换液,取第3代BMSCs用于后续实验,倒置相差显微镜观察细胞形态。

流式细胞术鉴定 BMSCs 表面标志物:收集细胞液,1000 r/min,离心半径10 cm,离心5 min收集细胞沉淀,PBS洗涤并重悬,加入CD29-FITC、CD44-FITC、CD45-PE-Cy5.5和CD34-PE抗体,避光孵育,流式细胞仪检测。

1.3.3 BMSCs细胞分组及成骨分化诱导 第3代BMSCs制备成1×10<sup>4</sup>/mL的细胞悬液,接种于6孔板中,将细胞分为对照组(N组)、含药血清组(J组)、含药血清+si-NC组(J+C组)、含药血清+si-OPG组(J+O组),每组6个复孔。J+C组、J+O组细胞分别转染si-NC、si-OPG质粒。转染48 h后,N组培养液加入正常血清,其余组培养液中均加入益肾健骨颗粒含药血清。待细胞融合至约90%时,进行成骨分化诱导培养,使用α-MEM培养基(含有10% FBS、10 μmol/Lβ-磷酸甘油、10 μmol/L地塞米松、50 μmol/L维生素C)进行诱导培养,每隔3 d换成骨分化诱导培养基。

1.3.4 ALP染色 成骨分化诱导7 d后,弃去培养液,于4%多聚甲醛中固定15 min,加入BCIP/NBT碱性磷酸酯酶染色液,避光染色30 min,观察染色情况。另收集细胞,使用ALP检测试剂盒检测ALP活性。

1.3.5 茜素红S染色 BMSCs成骨诱导28 d后,弃去培养液加入4%多聚甲醛固定30 min,加入0.2%茜素红S染色液染色30 min,蒸馏水冲洗多余液体,待细胞干燥后,倒置相差显微镜观察并拍照,随机选取5个视野,计算矿化结节数。

1.3.6 RT-qPCR实验检测ALP、Runx2、OCN mRNA表达 收集各组BMSCs细胞,加入Trizol试剂提取中总RNA,使用反转录试剂盒反转录合成cDNA,PCR扩增检测ALP、Runx2、OCN mRNA相对表达量。ALP正向引物为TGGTACTCGGACAATGAGATGC,反向引物为GCTCTTCCAAATGCTGATGAGGT;Runx2正向引物为CCTCTGACTTCTGCCTCTGG,反向引物为GATGAAATGCTGGGAAGCTG;OCN正向引物为GGGCTCCAAGTCCATTGTT,反向引物为ACCGAATGTTGAGCGAGAG。以β-actin为内参,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算各基因相对表达量。

1.3.7 Western blot检测OPG、RANK、RANKL蛋白表达 BMSCs成骨诱导培养7 d后,离心收集各组细胞加入RIPA裂解液裂解细胞,离心收集上清液,BCA法检测蛋白浓度,取40 μg蛋白加上样缓冲液煮沸变性后,进行SDS-PAGE分离蛋白并转膜,分别加入稀释后的OPG、RANK、RANKL抗体和β-actin抗体,4℃摇床过夜,加入相应二抗37℃孵育1 h,加入增强ECL化学发光液显色,FluorChem HD2凝胶成像系统成像,以β-actin为内参,Image J软件分析蛋白表达。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 25.0进行统计分析。计量资料符合正态分布及方差齐检验,用“ $\bar{x} \pm s$ ”描述,多组间比较行单因素方差分析,组间两两比较行SNK-q检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BMSCs形态观察、鉴定

成功分离BMSCs细胞,大鼠第1代细胞培养24 h后,贴壁细胞形态不一,呈现长梭形,培养至第3代细胞时,细胞铺满瓶底呈梭形,且形态均一,排列紧密呈放射状或旋涡状。详见图1。

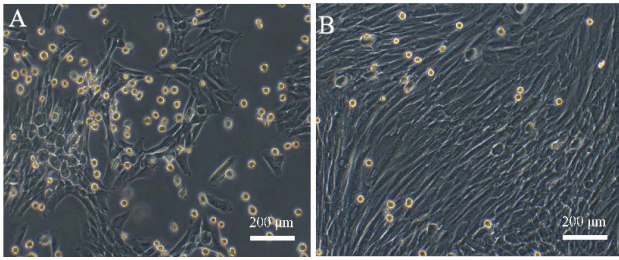


图 1 显微镜下观察 BMSCs 形态

注:A. BMSCs 第 1 代细胞;B. BMSCs 第 3 代细胞。

流式细胞术检测 BMSCs 细胞显示:CD29(97.34%)、CD44(98.35%)呈阳性表达,CD45(1.85%)、CD34(2.34%)呈阴性表达。详见图 2。

### 2.2 益肾健骨颗粒对 BMSCs ALP 的影响

成骨分化诱导 7 d 后,ALP 染色阳性为蓝黑色。与 N 组比较,J 组与 J+C 组染色加深,ALP 活性明显升高( $P<0.05$ )。与 J 组、J+C 组比较,J+O 组 ALP 染色变浅,ALP 活性明显降低( $P<0.05$ )。详见表 1、图 3。

### 2.3 益肾健骨颗粒对 BMSCs 成骨分化矿化结节的影响

诱导成骨分化 28 d 行茜素红染色,矿化结节被染成红色。J 组、J+C 组较 N 组矿化结节数显著增加

表 1 益肾健骨颗粒对 BMSCs ALP 活性的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	ALP/(U·L <sup>-1</sup> )
N 组	278.26±21.64
J 组	426.51±30.29*
J+C 组	435.62±28.46*
J+O 组	383.47±24.32 <sup>##</sup>

注:与 N 组相比,\* $P<0.05$ ;与 J+C 组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 J 组相比,<sup>##</sup> $P<0.05$ 。

( $P<0.05$ ),J+O 组较 J 组、J+C 组矿化结节数显著减少( $P<0.05$ )。详见图 4、表 2。

表 2 益肾健骨颗粒对 BMSCs 成骨分化矿化结节的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	矿化结节数/个
N 组	6.53±1.13
J 组	15.43±2.76*
J+C 组	14.90±2.95*
J+O 组	9.53±1.78 <sup>##</sup>

注:与 N 组相比,\* $P<0.05$ ;与 J+C 组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 J 组相比,<sup>##</sup> $P<0.05$ 。

### 2.4 益肾健骨颗粒对 BMSCs 成骨分化相关基因 mRNA 表达的影响

与 N 组比较,J 组与 J+C 组 ALP、Runx2、OCN mRNA 表达水平显著升高( $P<0.05$ )。与 J 组、J+C 组比较,J+O 组 ALP、Runx2、OCN mRNA 表达水平显著降低( $P<0.05$ )。详见表 3。

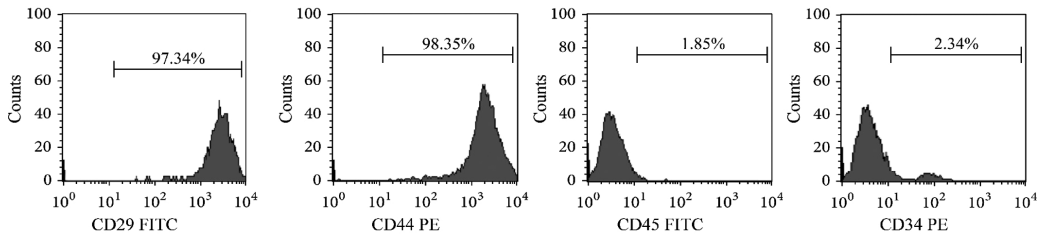


图 2 BMSCs 的流式细胞仪分析

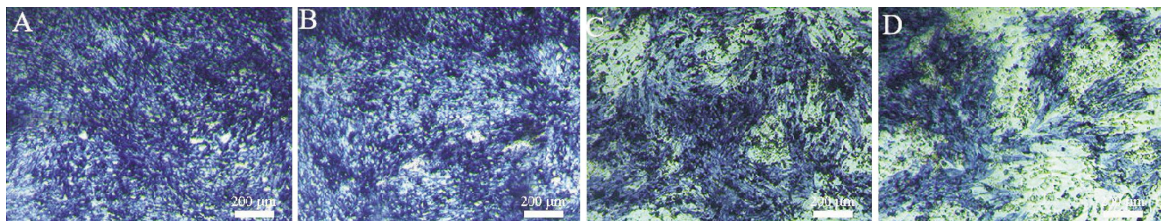


图 3 各组 BMSCs 的 ALP 染色( $\times 200$ )

注:A. N 组;B. J 组;C. J+C 组;D. J+O 组。

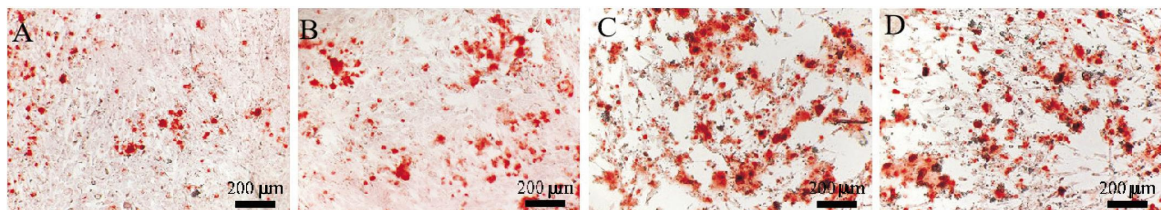


图 4 各组 BMSCs 成骨分化的茜素红染色( $\times 200$ )

注:A. N 组;B. J 组;C. J+C 组;D. J+O 组。

表3 益肾健骨颗粒对 BMSCs 细胞成骨分化相关基因表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	ALP	Runx2	OCN
N组	1.05±0.06	1.03±0.07	0.93±0.08
J组	1.67±0.10*	1.52±0.14*	1.45±0.11*
J+C组	1.63±0.09*	1.53±0.15*	1.50±0.12*
J+O组	1.26±0.07 <sup>#</sup>	1.39±0.10 <sup>#</sup>	1.32±0.09 <sup>##</sup>

注:与N组相比,\* $P<0.05$ ;与J+C组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与J组相比,<sup>##</sup> $P<0.05$ 。

### 2.5 益肾健骨颗粒对 BMSCs 蛋白 OPG、RANK、RANKL 表达的影响

与N组比较,J组与J+C组 OPG 表达水平显著升高( $P<0.05$ ),RANK、RANKL 表达水平显著降低( $P<0.05$ )。与J组、J+C组比较,J+O组 OPG 表达水平显著降低( $P<0.05$ ),RANK、RANKL 表达水平显著升高( $P<0.05$ )。详见图5、表4。

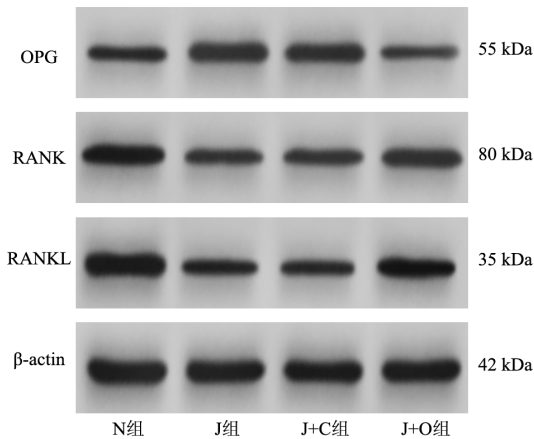


图5 Western blot 检测各组 BMSCs 蛋白 OPG、RANK、RANKL 表达

表4 各组细胞 OPG、RANK、RANKL 蛋白表达比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	OPG	RANK	RANKL
N组	0.62±0.08	0.97±0.11	1.05±0.12
J组	1.01±0.11*	0.63±0.07*	0.51±0.07*
J+C组	1.03±0.12*	0.65±0.08*	0.53±0.06*
J+O组	0.56±0.09 <sup>#</sup>	0.83±0.06 <sup>#</sup>	0.75±0.08 <sup>##</sup>

注:与N组相比,\* $P<0.05$ ;与J+C组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与J组相比,<sup>##</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨论

BMSCs 在一定的条件下可向软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞等分化,BMSCs 在成骨诱导条件下,向成骨细胞分化,促进 BMSCs 成骨分化是治疗与预防骨质疏松症的有效策略<sup>[9-10]</sup>。目前,促进 BMSCs 成骨分化的报道有很多,中药提取物如补骨脂素可诱导 BMSCs 成骨分化<sup>[11]</sup>。另有研究显示,固本增骨方(炙黄芪、当归、烫狗脊)含药血清可促进 BMSCs 的增殖,并诱导其成骨分化<sup>[12]</sup>。中医学认为骨

质疏松症是脾虚、肾亏等引起的,益肾健骨颗粒主要由千年健、红花、砂仁、熟地黄等构成,方中千年健有强筋止痛功效,红花、丹参具有益气活血的作用,淫羊藿有活血补肾的作用,熟地黄可以强筋健骨,诸药合用可以强筋健骨、补肾健脾之功效<sup>[13-14]</sup>。本研究建立绝经后骨质疏松大鼠模型,经前期研究,灌胃给药益肾健骨颗粒可改善大鼠的骨质疏松症,但其具体作用机制尚不清楚。

本研究建立绝经后骨质疏松大鼠模型,成功分离大鼠的 BMSCs 细胞,经观察细胞形态与鉴定细胞表面标志物,与相关报道<sup>[15]</sup>一致。本研究 BMSCs 细胞使用益肾健骨颗粒含药血清培养后,经成骨分化诱导培养 7 d 后,ALP 染色加深,ALP 活性明显升高( $P<0.05$ ),诱导成骨分化 28 d 行茜素红染色显示矿化结节数显著升高( $P<0.05$ ),提示益肾健骨颗粒可能具有促进 BMSCs 细胞成骨分化的作用。Runx2 是成骨过程中最重要的转录因子,调控间充质干细胞向成骨细胞分化;OCN 为钙结合蛋白,参与骨钙代谢,可反映骨形成<sup>[16-17]</sup>。本研究 RT-qPCR 检测 ALP、Runx2、OCN mRNA 表达显示,J组 ALP、Runx2、OCN mRNA 表达水平显著升高( $P<0.05$ ),证实益肾健骨颗粒有促进 BMSCs 细胞成骨分化的作用。

OPG/RANK/RANKL 信号通路在参与骨代谢、免疫调节、肿瘤发生方面发挥重要调控作用,该通路可诱导破骨细胞分化成熟、促进骨吸收,而上调 OPG 水平可降低 RANKL 与 RANK 的相互作用,降低骨吸收,促进成骨分化<sup>[18-19]</sup>。激活 OPG/RANKL/RANK 信号通路可抑制破骨细胞的分化和成熟,促进 BMSCs 向成骨分化<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,经益肾健骨颗粒含药血清的大鼠 BMSCs 细胞中 OPG 表达水平显著升高( $P<0.05$ ),RANK、RANKL 表达水平显著降低( $P<0.05$ ),提示益肾健骨颗粒可调节 OPG/RANK/RANKL 信号通路。本研究结果也显示,与只经益肾健骨颗粒含药血清处理的 BMSCs 细胞相比,先转染抑制 OPG 表达、再用含药血清处理的 BMSCs 细胞的 OPG 表达水平显著降低,RANK、RANKL 表达水平显著升高,且 ALP 活性及矿化结节数降低,即抑制 OPG 表达可部分逆转益肾健骨颗粒对 BMSCs 细胞成骨分化的促进作用。以上结果表明,益肾健骨颗粒可通过调节 OPG/RANK/RANKL 信号通路,促进绝经后骨质疏松大鼠 BMSCs 成骨分化。



综上所述,益肾健骨颗粒可通过调节 OPG/RANK/RANKL 信号通路,促进绝经后骨质疏松大鼠 BMSCs 成骨分化。

## 参考文献

- [1] BOGACZ A, KAMIŃSKI A, ŁOCHYŃSKA M, et al. The importance of the UGT1A1 variants in the development of osteopenia and osteoporosis in postmenopausal women[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 17385.
- [2] 纪元元,李劲峰,寇红伟,等.微小 RNA-23a-3p 负调控 Runx2 基因抑制骨髓间充质干细胞成骨分化诱导绝经后骨质疏松的研究[J]. *中华实验外科杂志*,2022,39(1):112-115.
- [3] GUO Y Z, DU J, JIANG M, et al. Full composition granules of Huanglian decrease the serum monocyte chemotactic protein-1 and connective tissue growth factor levels and inhibit kidney nuclear factor- $\kappa$ B expression in rats with high-fat diet-induced diabetes[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 41(3): 424-431.
- [4] ZHAO S J, KONG F Q, JIE J, et al. Macrophage MSR1 promotes BMSC osteogenic differentiation and M2-like polarization by activating PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway[J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 17-35.
- [5] 张楚天,张文明,林燕萍,等.健骨颗粒含药血清调控 miR-141 对小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].*中国骨质疏松杂志*,2020,26(4):497-501,584.
- [6] MENG B W, WU D L, CHENG Y F, et al. Interleukin-20 differentially regulates bone mesenchymal stem cell activities in RANKL-induced osteoclastogenesis through the OPG/RANKL/RANK axis and the NF- $\kappa$ B, MAPK and AKT signalling pathways[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2020, 91(5): e12874.
- [7] 颜春鲁,李盛华,郭爱军,等.藤黄健骨胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度和骨代谢的影响[J].*中国骨质疏松杂志*,2018,24(1):5-9,19.
- [8] 张志恒,张文明,魏振朴,等.健骨颗粒对去卵巢小鼠 miR-141 及成骨基因 Dlx5/Msx2/Runx2 的影响[J].*康复学报*,2018,28(6):26-31.
- [9] YOU W L, XU Z L. Curculigoside promotes osteogenic differentiation of ADSCs to prevent ovariectomized-induced osteoporosis[J]. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2021, 16(1): 279.
- [10] LIN H Z, ZHOU Y, LEI Q, et al. Effect of inorganic phosphate on migration and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *BioMed Central Developmental Biology*, 2021, 21(1): 1.
- [11] 杨 锋,李文雄,康武林,等.补骨脂素诱导 BMSCs 成骨分化中的 LncRNA 表达谱分析[J].*中国骨质疏松杂志*,2021,27(3):385-391.
- [12] 宋 敏,巩彦龙,董 平,等.基于 BMP-Smad/RUNX2 信号通路探讨固本增骨方含药血清对大鼠 BMSCs 增殖和成骨分化的影响[J].*世界科学技术-中医药现代化*,2020,22(4):1159-1165.
- [13] 李志鹏,徐 磊,杜仲补肾健骨颗粒对骨折不愈合患者 siCAM-1,sVCAM-1 及骨诱导蛋白 BMP-2 及微循环因子的影响 [J].*现代中西医结合杂志*,2018,27(7):749-752.
- [14] 郭万英,马凌风.补肾健骨汤在促进骨质疏松性压缩骨折术后愈合及腰椎功能改善中的作用[J].*长寿*,2021(2):155.
- [15] 魏振朴,张文明,孙 攀,等. miR-141 及成骨基因 Dlx5、Msx2、Runx2 在去卵巢骨质疏松模型小鼠 BMSCs 成骨分化中的表达[J].*康复学报*,2019,29(6):37-43.
- [16] WANG X C, MI Y C, HE W, et al. Down-regulation of miR-340-5p promoted osteogenic differentiation through regulation of runt-related transcription factor-2 in MC3T3-E1 cells[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 1126-1137.
- [17] 邢 磊,耿远明,李文昊,等. RUNX2/LAPTM5 在小鼠颅骨前成骨细胞矿化诱导中的表达[J].*南方医科大学学报*,2021,41(9):1394-1399.
- [18] MENG B W, WU D L, CHENG Y F, et al. Interleukin-20 differentially regulates bone mesenchymal stem cell activities in RANKL-induced osteoclastogenesis through the OPG/RANKL/RANK axis and the NF- $\kappa$ B, MAPK and AKT signalling pathways[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2020, 91 (5): e12874.
- [19] XU X Y, TANG Y Z, LANG Y Y, et al. Oral exposure to ZnO nanoparticles disrupt the structure of bone in young rats via the OPG/RANK/RANKL/IGF-1 pathway[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 9657-9668.
- [20] 曹端广,杨文龙,夏汉庭,等.基于 OPG/RANKL/RANK 轴观察加味阳和汤及其拆方对去卵巢骨质疏松大鼠的影响[J].*中国骨质疏松杂志*,2020,26(6):818-821,848.

(本文编辑 黎志清)