

· 论 著 ·

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

张楚天¹ 张文明^{1,2} 林燕萍^{1*} 魏振朴³ 杨娟¹ 张志恒¹ 孙攀¹ 王志强³

1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122

2. 河南省洛阳正骨医院郑州院区, 河南 郑州 450016

3. 福建中医药大学针灸学院, 福建 福州 350122

中图分类号: R28 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 04-0497-06

摘要: **目的** 观察健骨颗粒含药血清对去卵巢模型小鼠 BMSCs 成骨分化的影响, 并研究其调控 miR-141 影响 BMSCs 分化的可能机制。 **方法** 流式细胞计数法鉴定 BMSCs; 含药血清和空白血清分别干预体外培养的 BMSCs; 显微镜下观察细胞形态结构, 碱性磷酸酶染色、定量检测, 茜素红染色; RT-PCR 检测 miR-141 及 DLx5、Msx2、Runx2 的基因表达情况; Western blot 检测 DLx5、Msx2 及 Runx2 的蛋白表达情况。 **结果** 流式细胞计数法鉴定提取细胞符合实验要求; 镜下观察发现两组细胞有差异, 含药血清组细胞群落间结晶更为密集; ALP 染色及定量、茜素红染色结果含药血清组均优于空白血清组; RT-PCR 检测 DLx5、Msx2、Runx2 及 miR-141 的基因表达结果: 含药血清组 miR-141 和 Msx2 基因表达较空白血清组显著降低 ($P < 0.01$), 而 DLx5、Runx2 的基因表达显著升高 ($P < 0.01$); Western blot 检测 DLx5、Msx2、Runx2 的蛋白表达结果: 含药血清组较空白血清组相比, Msx2 的蛋白表达略微下降 ($P < 0.05$), 而 DLx5、Runx2 的蛋白表达相对升高 ($P < 0.01$)。 **结论** 健骨颗粒可以调低 miR-141 的表达, 进而调高 DLx5 的表达, 削弱 DLx5 的同源异形基因 Msx2 对 Runx2 抑制作用, 通过 miR-141 调控 DLx5/Msx2/Runx2 信号通路促进 BMSCs 成骨分化达到预防和治疗绝经后骨质疏松的目的。

关键词: 中医中药; 绝经后骨质疏松症; 健骨颗粒; miR-141; DLx5/Msx2/Runx2; 去卵巢小鼠

Effect of Jiangu granule drug-containing serum on the osteoblastic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells regulated by miR-141

ZHANG Chutian¹, ZHANG Wenming^{1,2}, LIN Yanping^{1*}, WEI Zhenpu³, YANG Juan¹, ZHANG Zhiheng¹, SUN Pan¹, WANG Chiqiang³

1. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. Zhengzhou Campus, Henan Province Luoyang Orthopedic Hospital, Zhengzhou 450016, China

3. College of Acupuncture, Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

* Corresponding author: LIN Yanping, Email: 17805938515@163.com

Abstract: Objective To investigate whether the drug-containing serum of Jiangu Granule could affect the osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) by regulating miR-141. **Methods** BMSCs were identified by flow cytometry, and BMSCs cultured in vitro were intervened with Jiangu granules-containing serum and blank serum. Cell morphology was observed under microscope, and ALP staining and quantitative detection, and the alizarin red staining were performed. Gene expression of osteogenic-induced factors including miR-141, DLx5, Msx2 and Runx2 was assessed using Quantitative Real-time PCR. Western blot was used to detect the expression of DLx5, Msx2 and Runx2. **Results** The cells were identified as BMSCs by flow cytometry. Microscopic observation revealed that there were differences between the two groups of cells, and there was more crystallization between the cells of Jiangu granules-containing serum group. The result of ALP staining and quantitative detection and the alizarin red staining showed that the drug-containing serum group was superior to the blank serum group. RT-PCR detection of osteogenic-induced miR-141 and DLx5, Msx2, Runx2 gene expression result showed that miR-141 and

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81574003)

* 通信作者: 林燕萍, Email: 17805938515@163.com

Msx2 of Jiangu granules-containing serum group decreased significantly compared with blank serum group ($P < 0.01$), while Dlx5 and Runx2 increased significantly ($P < 0.01$). Western-Blot detection of osteogenic induced protein expression of Dlx5, Msx2, Runx2 showed that compared with blank serum group, in Jiangu granules-containing serum group Msx2 was decreased ($P < 0.05$), and Dlx5 and Runx2 were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Jiangu granules-containing serum could inhibit the high expression of osteoblast negative regulator miR-141 in ovariectomized mouse BMSCs. It could regulate the expression of Dlx5/Msx2/Runx2 signal axis of BMP signal pathway and increase the expression of Runx2, the key factor of bone formation, so as to promote osteoblast differentiation and achieve the purpose of preventing and treating osteoporosis.

Key words: Chinese Traditional Medicine; postmenopausal osteoporosis; Jiangu granules; miR-141; Dlx5/Msx2/Runx2; ovariectomized mice

骨质疏松症是一种发病广泛而又隐蔽的退行性疾病,我国骨质疏松患者近九千余万,其发病诱因多样而绝经后骨质疏松症是最常见的病型,所占比例高达 80%^[1-2]。骨质疏松症的病理机制是骨骼吸收-重建动态平衡失调引起全身骨量降低和骨骼细微结构恶化^[3],骨髓间充质干细胞(BMSCs)是骨髓基质内具有多种分化潜能的干细胞,作为成骨细胞的来源细胞之一,是影响骨骼吸收-重建动态平衡的重要因素。MiRNA 是细胞内普遍存在的小分子 RNA,在基因表达和传递中有着广泛作用,当敲除小鼠 BMSCs 内一个 miRNA 合成必需的核酸内切酶后, BMSCs 失去成骨分化功能^[4],这一实验提示 miRNA 与成骨分化有着相关性,进一步研究发现 miRNA 在 BMSCs 分化的各个阶段均有着不同的影响^[5]。Runx2 是 BMP 信号通路中的关键成骨转录因子,其表达量被 Dlx5 及其同源异形基因 Msx2 共同调控,同时 Runx2 可以直接调控 BMSCs 细胞成骨分化^[6]。课题组前期研究结果显示:miR-141 通过对 Dlx5/Msx2/Runx2 信号通路的负性调控作用来影响 BMSCs 的成骨分化。本文基于以上基础,使用传统补肾健脾方剂健骨颗粒提取含药血清干预去卵巢模型小鼠 BMSCs,从 miR-141 及其下游 Dlx5/Msx2/Runx2 信号通路的角度出发,探究健骨颗粒影响 BMSCs 成骨分化的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验药物

健骨颗粒组方:煅狗骨、山茱萸、淫羊藿等药物。药物原材料福建省药材公司,成药由福建中医药研究院中试车间加工制备,颗粒剂含原生药比率 2.9:1。

1.2 实验细胞及动物

雌性 C57 小鼠 10 只(清洁级),4 周龄,体重 23 ± 2 g,购至中科院动物实验中心(上海),动物合格证编码:SCXK(沪)2013-0005,用于 BMSCs 细胞提

取。雌性 SD 大鼠 30 只(SPF 级),3 月龄,体重 265 ± 20 g,购至中科院动物实验中心(上海),动物合格证编码:SCXK(沪)2012-0002,用于含药血清制备。以上动物均饲养及实验于福建中医药大学动物实验中心 SPF 级实验室(合格证编码:闽 SYXK 2009-0001)。

1.3 主要实验材料和试剂

青/链霉素、胰蛋白酶、PBS 缓冲液由 Hyclone 公司提供,胎牛血清、 α -MEM 培养基由 Gibco 公司提供,CD29、CD34、CD44、CD45 单克隆抗体由 Abcam 公司提供,茜素红由 Sigma 公司提供,ALP 检测试剂盒由南京建成公司提供,Dlx5、Msx2、Runx2 抗体由 Santa Cruz 公司提供, β -actin、鼠二抗、兔二抗、TRIZOL 由北京全氏金生物技术有限公司提供,封闭液、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液、一抗稀释液、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、SDS-PAGE 电泳缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、PMSF、RIPA、Beyo plus 超敏化学发光试剂盒由碧云天生物技术有限公司提供,反转录试剂盒,SYBR Premix Ex TaqTM PCR Kit 由大连宝生物公司提供。

1.4 主要实验仪器

倒置相差显微镜由 TKO 光学仪器株式会社提供,流式细胞仪由 BD 公司提供,Q-PCR 仪由美国 ABI 公司提供。

1.5 实验方法

1.5.1 含药血清制备:30 只三月龄大鼠,分别健骨颗粒和生理盐水灌胃 1 周,通过大鼠体重按 2 g/kg 计算药量,生理盐水每日灌服量为 2 mL。腹主动脉采全血后 3000 r/min 离心 15 min 取上层血清,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,过滤除菌,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用。

1.5.2 BMSCs 细胞的培养和鉴定:卵巢切除法造模,microCT 三维图像采集分析骨质疏松指标数据确认小鼠建模成功后取双侧股骨, α -MEM 培养基(10% FBS)冲出骨髓,制备单细胞悬液置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 的培养箱培养 10 d,待细胞铺满瓶底后弃

培养液以 1.25% 胰酶消化传代,镜下观察 BMSCs 形态变化。取第三代 BMSCs 制成单细胞悬液,加入抗体上流式细胞仪检测。

1.5.3 含药血清诱导 BMSCs 分化情况:取第 3 代 BMSCs 加入成骨诱导培养液(β -磷酸甘油 10 $\mu\text{mol/L}$ 、地塞米松 10 $\mu\text{mol/L}$ 、维生素 C 50 $\mu\text{mol/L}$ 、10% FBS)和 10% 浓度的含药血清和空白血清成骨诱导,分别在诱导后第 3、8、13 天镜下观察两组细胞形态变化;第 8 天,行 ALP 染色及定量;第 13 天,茜素红

染色检测钙盐结节分布情况。

1.5.4 实时荧光定量 PCR 检测 miR-141 及 DLx5、Msx2、Runx2 的基因表达情况:成骨诱导第 3 代 BMSCs,第 13 天提取总 RNA,反转录后与相应的引物(如表 1)结合,上机,反应均为 20 μL 体系。以 U6 作为 miR-141 的内参, β -actin 作为 Runx2、DLx5、Msx2 mRNA 的内参,校正各组样品后对基因相对表达量进行计算。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequence table

名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
miR-141	GCAGTGTGGATGGTTGAAGTATG	无
U6	CGCTTCGGCAGCACATATACT	GAATTTGCGTGTTCATCCTTGC
Runx2	AGAACTTGGACGCTGTATTGGAGA	TGCAACAGCCAAAGCTGGA
Dlx5	GCAAGATCACTAGACGGAATCA	GCATTGTCGAAGTCGGATACAGAG
Msx2	CGAGACCCATTGTTGGATGTGTA	GGGCACATCCTTGCTCACAG
β -actin	AGGCTGTGTTGTCCTCTGTA	ATGTCACGCACGATTTC

1.5.5 Western blot 检测 DLx5、Msx2、Runx2 的蛋白表达情况:提取 BMSCs 总蛋白并用 BCA 法测取蛋白浓度,每泳道上样蛋白样品和预染蛋白标准品,电泳,电泳结束后湿转法转移胶上蛋白到 PVDF 膜。转膜后将膜浸入封闭液,摇床上孵育 2 h。加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,取出 PVDF 膜,浸入 TBST 摇洗 3 次。加入二抗室温下孵育 1 h,取出 PVDF 膜,浸入 TBST 摇洗 3 次。显影,使用 Image Pro-plus program version 5.0 图象分析系统分析条带。

1.6 统计学处理

数据采用 SPSS 18.0 统计软件分析,以($\bar{x} \pm s$)代表参数值,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞表型鉴定

BMSCs 表型鉴定结果(见图 1): CD29 (88.8%)、CD44 (94.3%) 表达阳性; CD34 (1.54%)、CD45 (1.04%) 表达阴性。

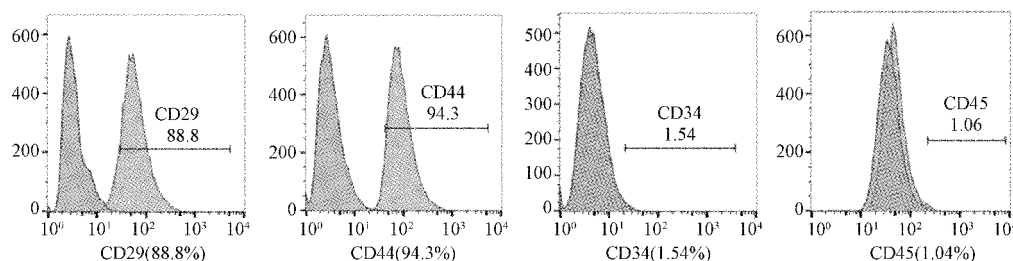


图 1 BMSCs 细胞表型鉴定结果

Fig.1 BMSCs cell phenotypic identification results

2.2 BMSCs 成骨分化结果

第 2 天,两组细胞数量均稀少且无明显差异,细胞形状呈梭形或不规则形;第 4 天,两组细胞数量有所增加,且些许细胞出现成对核,细胞形状为圆形或不规则形的多核细胞出现,空白血清组多核细胞出现较少;第 6 天,细胞数量密集,含药血清组成群的细胞开始聚集且在群落中散布有结晶颗粒,而空白

血清组细胞数量明显低于含药血清组,且细胞群落间结晶群稀疏(见图 2)。

成骨诱导后第 8 天进行 ALP 染色,空白血清为浅蓝色,含药血清组显示蓝紫色(见图 3)。ALP 定量检测显示,含药血清组的 ALP 定量结果显著高于空白血清组($P < 0.05$)。第 13 天行茜素红染色,染色后有深红色钙化结节散布,但空白血清组钙化结

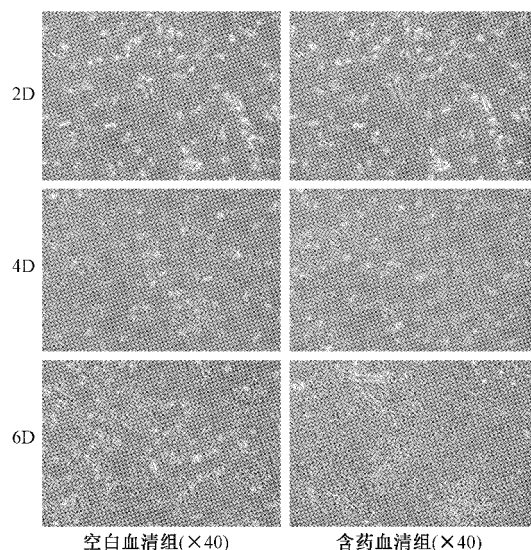


图 2 BMSCs 成骨分化结果

Fig.2 BMSCs osteogenic differentiation results

节较少,呈点状分布,无大的钙化结节;含药血清组钙化结节明显增多,呈珠状广泛分布,有大面积的甚至成片连接的钙化结节出现(见图 4)。

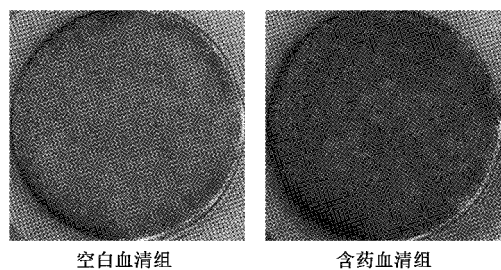


图 3 ALP 染色及定量结果

注: a 空白血清组; b 含药血清组;与空白血清组比较, * $P < 0.05$ 。

Fig.3 ALP staining and quantitative results

2.3 RT-PCR 检测成骨基因表达结果

RT-PCR 检测 miR-141 及 Dlx5、Msx2、Runx2 的基因表达情况(见表 2):含药血清组和空白血清组比较,含药血清组 miR-141 及 Msx2 的基因表达较空白血清组明显下降($P < 0.01$), Dlx5、Runx2 的基因表达显著升高($P < 0.01$)。

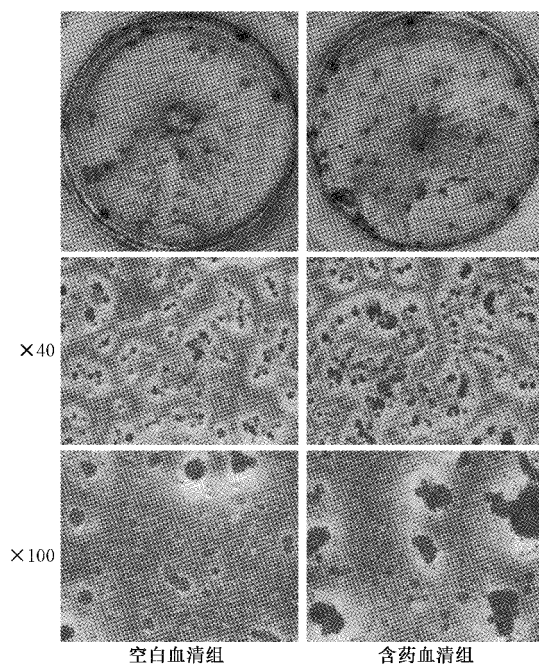


图 4 茜素红染色结果

Fig.4 Alizarin red staining results

表 2 RT-PCR 检测成骨基因表达结果

Table 2 Detection of osteogenic gene expression results by RT-PCR

组别	miRNA-141	Dlx5	Msx2	Runx2
空白血清组	1.000	1.000	1.000	1.000
含药血清组	0.500±0.021 **	2.390±0.106 **	0.330±0.014 **	3.620±0.241 **

注:与空白血清组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.4 Western blot 检测成骨蛋白表达结果

Western blot 检测成骨诱导第 13 天 Dlx5、Msx2 和 Runx2 蛋白表达情况:含药血清组 Msx2 较空白血清组稍有下降($P < 0.05$),而 Dlx5 和 Runx2 的蛋白表达相对升高($P < 0.01$),三者的蛋白变化情况与 RT-PCR 结果基本一致(见图 5,表 3)。

表 3 Western blot 检测成骨蛋白表达结果

Table 3 Western blot analysis of osteogenic protein expression results

组别	Dlx5	Msx2	Runx2
空白血清组	0.330±0.012	0.800±0.025	0.532±0.046
含药血清组	0.430±0.019 **	0.498±0.096 *	0.830±0.043 **

注:与空白血清组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

BMSCs 作为成骨细胞的主要来源细胞之一在骨质疏松的研究中有着至关重要的地位,雌激素降低影响着 BMSCs 的命运,其成骨分化降低导致骨量丢失是绝经后骨质疏松的病理机制,因此 BMSCs 可

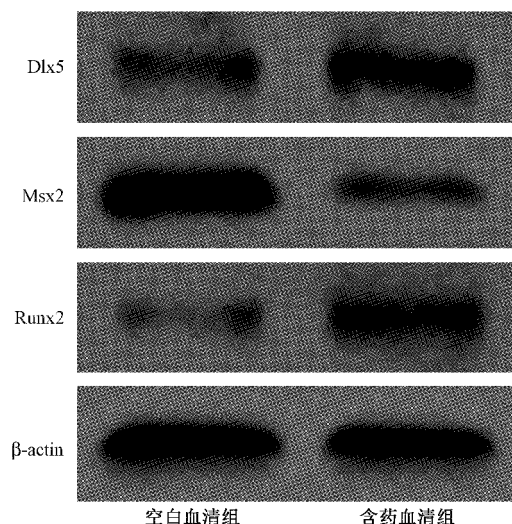


图 5 Western blot 检测成骨蛋白表达结果

Fig.5 Western blot analysis of osteogenic protein expression results

以作为阐释补肾健脾类中药治疗绝经后骨质疏松机理的切入点^[7]。中药或复方水提取液干预体外细胞是中药研究的常用方法,但是这种方法的严谨性目前存在争议,主要矛盾集中于药物在体内代谢后的产物不确定性和药物成分自身的复杂性,这两点的存在会一定程度上影响实验结果的准确性^[8]。含药血清就是对以上不足的改进,通过模拟体内代谢的方法减少了实验的误差,使实验更加科学^[9]。miRNA 是维持干细胞特征和特性的关键遗传因子^[10],对于细胞生长和分化的各个阶段有着综合性的调节作用^[11]。研究发现 miR-141-3P 作为 Wnt 靶基因通过 Wnt 通路抑制人间充质干细胞的增殖和成骨分化^[12],同时课题组前期研究也明确了 miR-141 与 BMP/Smad 信号通路及骨代谢中间的关联^[13]。因此,以 miRNA 为“钥匙”来揭示中医药抗绝经后骨质疏松症的机理成为了当前研究的重心^[14]。

流式细胞计数法鉴定提取的 BMSCs 细胞显示:造血干细胞及白细胞表型的 CD 34、CD 45 表达为阴性,细胞间充质干细胞表型的 CD 29、CD 44 表达均呈阳性,既全骨髓培养法提取的细胞满足实验需要。课题组前期研究表明,健骨颗粒有促进成骨分化的功效,且含药血清浓度为 10% 时干预效果最佳,该功效归因于健骨颗粒的类植物雌激素样作用^[15]。此类作用在成骨分化的多个阶段均有体现,ALP 染色及定量的实验中含药血清组明显优于空白血清组,同时茜素红染色结果同 ALP 染色结果一

致,进一步印证健骨颗粒的促成骨分化作用。该作用可能归功于健骨颗粒组方中淫羊藿、煅狗骨、山茱萸等补肾壮骨中药,朱晓峰等^[16]通过研究传统补肾阳中药淫羊藿发现,其主要药理成分淫羊藿苷在体内可代谢为淫羊藿素,淫羊藿素可以发挥类雌激素样作用激活 BMP/Smad 信号通路促进成骨细胞分化。Smads 蛋白作为胞内信号传递的中介因子,是 BMP 信号传导及转导的关键一环,Smads 蛋白整合多种不同信号进而转换成一种总的效应来调节目标靶基因的转录^[17]。BMP 与细胞表面受体结合后,细胞内 Co-Smad 与 Phospho-R-Smad 形成复合物后进入细胞核内结合于 DNA 序列上,协同其他转录因子相互作用,促进 Dlx5 表达,而 Dlx5 增高可以激活 Runx2 的表达^[18],而这一系列反应中的共激活因子可能就是 miR-141 类的短基因片段^[19]。RT-PCR 结果显示,含药血清组 miR-141 及 Msx2 的基因表达量明显低于空白血清组,而 Dlx5、Runx2 的基因表达结果刚好相反,Western blot 检测结果同 RT-PCR 结果一致,说明健骨颗粒可以通过影响 miR-141 表达水平来调节 BMSCs 成骨分化,即健骨颗粒的类雌激素作用可以抑制 miR-141 的表达,从而降低 miR-141 对 Dlx5 表达的抑制,高表达的 Dlx5 竞争结合能力增强,相对地降低了其同源异形基因 Msx2 对 Runx2 表达的抑制作用,Runx2 表达水平升高促进 BMSCs 成骨分化。

总之,健骨颗粒可以通过抑制 BMSCs 中 miR-141 的内源性表达水平来缓解去卵巢早期雌激素急剧下降导致的 Dlx5/Msx2 降低,进而调高的 Runx2 表达,促进成骨分化,达到防治绝经后骨质疏松的目的。

【参 考 文 献】

- [1] Slagter Kirsten W, Raghoobar Gerry M, Vissink Arjan. Osteoporosis and edentulous jaws [J]. Int J Prosthodont, 2008, 21: 19-26.
- [2] Eastell, O'Neill TW, Hofbauer LC, et al. Postmenopausal osteoporosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 2: 16069.
- [3] 夏维波,章振林,林华,等.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017) [J].中国骨质疏松杂志,2019,25(3):281-309.
- [4] Harfe BD, Mc Manus MT, Mansfield JH, et al. The R Naselli enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(31): 10898-10903.
- [5] Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells [J]. Hum Gene Ther, 2010, 21(10): 1226-2238.

(下转第 584 页)

- postmenopausal women: a cross-sectional investigation in Taiwan [J]. *BMJ Open*, 2019, 9(1):e021990.
- [23] Prawiradilaga RS, Gunmalm V, Lund-Jacobsen T, et al. FRAX calculated without bmd resulting in a higher fracture risk than that calculated with bmd in women with early breast cancer[J]. *J Osteoporos*, 2018, 2018:4636028.
- [24] Crandall CJ, Larson J, LaCroix A, et al. Predicting fracture risk in younger postmenopausal women: Comparison of the garvan and frax risk calculators in the women's health initiative study[J]. *J Gen Intern Med*, 2019, 34(2):235-242.
- [25] Bergh C, Söderpalm AC, Brisby H, et al. Preoperative dual-energy X-ray absorptiometry and FRAX in patients with lumbar spinal stenosis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2018, 13(1):253.
- [26] White R, Binkley N, Krueger D. Effect of vertebral exclusion on TBS and FRAX calculations[J]. *Arch Osteoporos*, 2018, 13(1):87.
- [27] Samelson EJ, Broe KE, Xu H, et al. Cortical and trabecular bone microarchitecture as an independent predictor of incident fracture risk in older women and men in the bone microarchitecture international consortium (BoMIC): a prospective study[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(1):34-43.
- [28] Harvey NC, Odén A, Orwoll E, et al. Measures of physical performance and muscle strength as predictors of fracture risk independent of FRAX, Falls, and aBMD: a meta-analysis of the osteoporotic fractures in men (MrOS) study [J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(12):2150-2157.
- [29] Lorentzon M, Nilsson AG, Johansson H, et al. Extensive undertreatment of osteoporosis in older Swedish women [J]. *Osteoporos Int*, 2019, 30(6):1297-1305.
- [30] Nguyen TV. Individualized fracture risk assessment: State-of-the-art and room for improvement[J]. *Osteoporos Sarcopenia*, 2018, 4(1):2-10.
- [31] Samelson EJ, Broe KE, Xu H, et al. Cortical and trabecular bone microarchitecture as an independent predictor of incident fracture risk in older women and men in the Bone Microarchitecture International Consortium (BoMIC): a prospective study[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(1):34-43.
- [32] Lorentzon. Treating osteoporosis to prevent fractures: current concepts and future developments[J]. *J Intern Med*, 2019, 285(4):381-394.
- [33] Liu J, Curtis EM, Cooper C, et al. State of the art in osteoporosis risk assessment and treatment[J]. *J Endocrinol Invest*, 2019, 42(10):1149-1164.
- [34] Chandran M, McCloskey EV, Thu WPP, et al. FRAX © based intervention thresholds for management of osteoporosis in Singaporean women[J]. *Arch Osteoporos*, 2018, 13(1):130.
- (收稿日期: 2019-03-18; 修回日期: 2019-04-22)

(上接第 501 页)

- [6] Kawane Tetsuya, Qin Xin, Jiang Qing, et al. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3 [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 13551.
- [7] 王大伟, 郑洪新. 补肾中药对骨髓间充质干细胞成骨分化的作用研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(2):268-271.
- [8] 王领弟, 孙孟瑶, 张芳, 等. 体外细胞实验中药干预方法研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(4):1448-1451.
- [9] 国锦, 高燕, 赵渤年. 中药复方血清药理学研究方法进展[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4):1656-1658.
- [10] Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, et al. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway [J]. *Nature*, 2005, 435: 974-978.
- [11] Blakaj Adriana, Lin Haifan. Piecing together the mosaic of early mammalian development through microRNAs [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 9505-9508.
- [12] Hu R, Liu W, Li H, et al. A Runx2/miR-3960/miR-2861 regulatory feedback loop during mouse osteoblast differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 12328-12339.
- [13] 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.
- [14] 张文明, 张媛媛, 林燕萍. miRNA 调节骨髓间充质干细胞成骨分化作用研究[J]. *山西中医学院学报*, 2016, 17(2):60-62.
- [15] 王冬生, 韩婧, 康文博, 等. 植物雌激素防治骨质疏松作用的机制进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(5):632-640.
- [16] 朱晓峰, 张荣华, 孙升云, 等. 淫羊藿素通过雌激素受体和骨形态发生蛋白信号诱导 MC3T3-E1 subclone 14 细胞分化[J]. *中国病理生理学杂志*, 2011, 27(12):2351-2356.
- [17] Wu MR, Chen GQ, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease [J]. *Bone Res*, 2016, 4: 16009.
- [18] Zhang JF, Zhang WB, Dai JW, et al. Overexpression of Dlx2 enhances osteogenic differentiation of BMSCs and MC3T3-E1 cells via direct upregulation of osteocalcin and Alp [J]. *Int J Oral Sci*, 2019, 11: 12.
- [19] Sartori EM, das Neves AM, Magro-Filho O, et al. The role of micrnas in the osseointegration process [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2019, 34(2):397-410.
- (收稿日期: 2019-05-21; 修回日期: 2019-06-15)