

· 论著 ·

脉冲电磁场抗骨质疏松作用及对 Smurf1 表达的影响

孙智路¹ 尹剑¹ 黄开亮¹ 谭位华¹ 刘静^{2*}

1. 南华大学附属第一医院急诊部, 湖南 衡阳 421001

2. 南华大学附属第一医院康复医学科, 湖南 衡阳 421001

中图分类号: R781.6 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 08-1093-05

摘要: 目的 研究脉冲电磁场(PEMF)对去卵巢骨质疏松(OVX-OP)大鼠的作用及机制。方法 将6月龄雌性SD大鼠随机分为假手术组(S组)、模型组(M组, 双侧卵巢切除)、雌激素治疗组(E组, M组基础上进行雌激素治疗)和PEMF组(M组基础上进行PEMF治疗), 每组各10只, 术后饲养8周后进行治疗, 治疗持续8周。称取治疗前后各组大鼠体重; 采用双能X射线实验动物骨密度测定仪检测各组大鼠右肱骨骨密度。治疗结束后, 采用半自动图像数字化分析仪对胫骨上1/3作静态骨形态计量学检测; 采用免疫印迹(WB)检测各组大鼠骨组织Smad泛素化调节因子1(Smurf1)蛋白表达量。结果 与S组比较, M组、E组、PEMF组精神状态欠佳, 饮食、活动及大小便未见异常。治疗前, 与S组比较, M组、E组、PEMF组大鼠体重显著增加($P<0.05$), 骨密度值显著降低($P<0.05$)。治疗后, E组、PEMF组大鼠体重显著降低($P<0.05$), 骨密度值较治疗前显著增加($P<0.05$); 与S组比较, M组大鼠骨密度值、BV/TV、Tb.N、Tb.Th显著降低($P<0.05$), 体重、Tb.Sp、Smurf1蛋白水平显著增加($P<0.05$); 与M组比较, E组、PEMF组大鼠骨密度值、BV/TV、Tb.N、Tb.Th显著升高($P<0.05$), 体重、Tb.Sp、Smurf1蛋白水平显著降低($P<0.05$); E组与PEMF组比较, 大鼠各指标差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 PEMF可增加骨密度、改善骨形态变化, 发挥抗骨质疏松的作用, 可能与Smurf1蛋白表达下调有关。

关键词: 骨质疏松; 脉冲电磁场; Smad泛素化调节因子1

Effect of pulsed electromagnetic field on anti-osteoporosis and expression of Smurf 1

SUN Zhilu¹, YIN Jian¹, HUANG Kailiang¹, TAN Weihua¹, LIU Jing^{2*}

1. Department of Emergency, The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001

2. Department of Rehabilitation Medicine; Hengyang 421001, China

* Corresponding author: LIU Jing, Email: 410505633@qq.com

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of pulsed electromagnetic field (PEMF) on ovariectomized osteoporosis (OVX-OP) rats. **Methods** Six-month-old female SD rats were randomly divided into four groups: sham operated group (S group), model group (M group, bilateral ovariectomy), estrogen treatment group (E group, estrogen treatment based on M group) and PEMF group (PEMF treatment based on M group), with 10 rats in each group, and they were treated for 8 weeks after 8 weeks of feeding. The weight of rats in each group before and after treatment was weighed; the bone mineral density of right humerus was measured by dual energy X-ray experimental animal bone densitometer. At the end of treatment, the static bone morphometry of 1/3 upper tibia was measured by the semi-automatic digital image analyzer; and Western blotting (WB) was used to detect the protein expression of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) in bone tissue of rats in each group. **Results** Compared with S group, the mental state of M group, E group and PEMF group was not good, and there was no abnormality in diet, activity and defecation. Before treatment, compared with S group, the weight of rats in M group, E group and PEMF group increased significantly ($P<0.05$), while the bone mineral density decreased significantly ($P<0.05$); while after treatment, the weight of rats in E group and PEMF group decreased significantly ($P<0.05$), and the bone mineral density increased significantly ($P<0.05$); compared with S group, the bone mineral density, BV/TV, Tb.N, and Tb.Th in M group decreased significantly ($P<$

基金项目: 国家自然科学基金(81674045); 湖南省卫健委课题(20200410); 湖南省自然科学基金(2019JJ50544)

* 通信作者: 刘静, Email: 410505633@qq.com

0.05), while the weight of rats, Tb.Sp and the protein level of Smurf1 increased significantly ($P<0.05$); compared with group M, the bone mineral density, BV/TV, Tb.N and Tb.Th in E group and PEMF group increased significantly ($P<0.05$), while the weight of rats, Tb.Sp and the protein level of Smurf1 decreased significantly ($P<0.05$); There was no significant difference between E group and PEMF group ($P>0.05$). **Conclusion** PEMF may improve bone morphology by up-regulating the expression of Smurf1 protein, and then play the role of anti osteoporosis, which may be related to the down-regulation of Smurf1 protein expression.

Key words: osteoporosis; pulsed electromagnetic field; Smad ubiquitination regulator 1

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是由多种原因导致的骨密度和骨质量下降,可引发全身性骨折^[1]。目前临床治疗 OP 仍以药物缓解症状为主,雌激素及其受体调节剂、双膦酸盐、降钙素等药物对 OP 患者的骨丢失症状有一定抑制作用,但大多疗程长,有较多副作用^[2-3]。近来多项研究^[2,4]表明,脉冲电磁场(pulsed electromagnetic field, PEMF)可有效治疗 OP,刺激骨形成,提高骨密度,改善骨强度,且该治疗方法为生物物理手段,副作用小,然而其具体作用机制尚不完全明确。泛素-连接酶 E3 中 Smad 泛素化调节因子 1(Smad ubiquitin regulator 1, Smurf1)是泛素连接酶 Hect 家族新成员,可独立诱导 Smad1、Smad5 泛素化及降解,与 OP 发生发展及骨代谢异常密切相关^[5-9]。基于此,本研究以去卵巢骨质疏松(ovariectomy osteoporosis, OVX-OP)大鼠为模型,探究 PEMF 对 OVX-OP 大鼠的治疗作用及对 Smurf1 蛋白表达的影响,以期揭示其可能作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:选取 6 月龄 SPF 级未孕雌性 SD 大鼠 43 只(货号:J001),体重(300 ± 10)g,购自南京君科生物工程有限公司。饲养条件:室温(24 ± 2)℃、湿度(50 ± 10)%, 12 h/12 h 光照/黑暗,自由饮水饮食环境下适应性饲养 1 周。本研究经本院动物实验伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂及仪器:苯甲酸雌二醇注射液(批准文号:国药准字 H44023822)购自广州白云山明兴制药有限公司;戊巴比妥钠(批准文号:国药准字 H31021724)购自上海上药新亚药业有限公司;盐酸四环素荧光染料(货号:0422-100G)购自浙江联硕生物科技有限公司,钙黄绿素荧光染料(货号:FS1162)购自上海复申生物科技有限公司;蛋白抽提试剂盒(货号:P0028)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号:P0010S)均购自上海碧云天有限公司;一抗鼠源

anti-Smurf1 抗体(货号:ab57573)、兔源 anti-β-actin(货号:ab8227)、二抗羊抗兔 IgG(货号:ab6721)、羊抗鼠 IgG(货号:ab205719)抗体购自英国 Abcam 公司;FC 酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司;双能 X 射线实验动物骨密度测定仪(型号:InAlyzer,韩国)购自佰泰科技有限公司;Union2000 型 PEMF 骨质疏松治疗仪(大鼠型)、半自动图像数字化分析仪购自日本尼康公司等。

1.2 方法

1.2.1 模型建立:将 43 只大鼠用 2%戊巴比妥钠($0.2\text{ mL}/100\text{ g}$)经腹腔注射麻醉后,在严格无菌条件下取腰背椎后侧正中切口,钝性分离肌肉组织,摘除 33 只大鼠两侧卵巢组织,逐层缝合创口,术后青霉素连续注射 3 d。其中麻醉致死 1 只,术后创口感染致死 2 只,共存活 30 只,术后 6 d 将大鼠随机分为模型组(M 组)、雌激素治疗组(E 组)和 PEMF 组,每组 10 只。另 10 只大鼠只切除卵巢周围与卵巢大小相仿的脂肪组织,为假手术组(S 组)。术后各组大鼠分笼饲养,在室温(24 ± 2)℃、湿度(50 ± 10)%、定期紫外线消毒和通风、12 h 间隔照明条件下,自由摄取标准饲料和消毒的蒸馏水。术后 8 周除假手术组外的其他各组大鼠右肱骨骨密度显著降低,提示骨质疏松动物模型造模成功。E 组于术后 9 周采用苯甲酸雌二醇注射液($0.2\text{ mg}/\text{kg}$)进行皮下注射,每两周 1 次;PEMF 组于术后 9 周采用 Union 2000 型 PEMF 骨质疏松治疗仪(大鼠型)进行治疗,设置参数:8 Hz,自动跳转周期为 30 s,最大感应磁场强度 3.82 mT,每次 40 min,1 次/d;S 组、M 组常规饲养,不予以任何处理。治疗 8 周后,进行相关数据采集及检测。

1.2.2 一般状态观察:治疗期间观察各组大鼠生存状态、饮食情况等,称取治疗前后各组大鼠体重。

1.2.3 右肱骨骨密度检测:治疗结束后,采用 2%戊巴比妥($0.2\text{ mL}/100\text{ g}$)对各组大鼠行腹腔注射麻醉后置于双能 X 射线实验动物骨密度测定仪平台上,测定其右肱骨骨密度。

1.2.4 骨形态计量学检测:大鼠处死前第 13、14 天分别于皮下注射四环素 (25 mg/kg) 作为第一次荧光标记,注射后第 3、4 天分别于皮下注射钙黄绿素 (5 mg/kg) 作为第二次荧光标记。治疗结束后,采用 2%戊巴比妥 (0.2 mL/100 g) 对各组大鼠行腹腔注射麻醉处死,取右前肢,剔除肌肉及软组织,取适量骨髓于液氮中冻存备用。另继续完整取出胫骨,沿纵面锯开,进行不脱钙骨包埋。采用半自动图像数字化分析仪对胫骨上 1/3 作静态检测。静态参数包括:骨体积分数 (trabecular bone volume ratio, BV/TV)、骨小梁数 (trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th) 和骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb.Sp)。

1.2.5 骨组织 Smurf 1 蛋白表达量检测:采用免疫印迹 (western blot, WB) 检测各组大鼠骨组织 Smurf 1 蛋白表达量。严格按照蛋白提取试剂盒说明提取收集的各组大鼠骨髓组织总蛋白,并采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品进行 6 % SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 添加 anti-Smurf1 (稀释比 1:500)、anti- β -actin (稀释比 1:500) 抗体 4 ℃ 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜, 添加二抗 IgG (稀释比 1:5 000) 室温孵育 1 h, 按上述方法洗膜, 显色, 曝光, 观察结果并拍照分析各蛋白条带灰度值, 分别以靶蛋白 Smurf 1 灰度值与内参 β -actin 灰度值比值为 Smurf 1 蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 两组比较采用配对 t 检验, 多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

与 S 组比较, M 组、E 组、PEMF 组大鼠精神状态欠佳, 饮食、活动及大小便未见异常。治疗前, 与 S 组比较, M 组、E 组、PEMF 组大鼠体重均明显增加 ($P<0.05$)。治疗后, E 组、PEMF 组大鼠体重较治疗前均显著降低 ($P<0.05$); 与 S 组比较, M 组大鼠体重显著增加 ($P<0.05$); 与 M 组比较, E 组、PEMF 组大鼠体重显著降低 ($P<0.05$); E 组与 PEMF 组比较, 大鼠体重差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠治疗前后体重比较 ($g, \bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of weight of rats in each group before and after treatment ($g, \bar{x}\pm s, n=10$)

组别	治疗前	治疗后	t 值	P 值
S 组	307.43 $\pm$ 8.69	308.91 $\pm$ 9.03	0.373	0.713
M 组	339.65 $\pm$ 8.87 ^a	331.82 $\pm$ 9.13 ^a	1.945	0.068
E 组	338.46 $\pm$ 8.29 ^a	311.52 $\pm$ 9.64 ^b	6.700	0.000
PEMF 组	339.81 $\pm$ 8.32 ^a	314.26 $\pm$ 8.97 ^b	6.604	0.000
F 值	34.83	12.69	—	—
P 值	0.000	0.000	—	—

注: 与 S 组比较, ^a $P<0.05$; 与 M 组比较, ^b $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠骨密度值比较

治疗前, 与 S 组比较, M 组、E 组、PEMF 组大鼠骨密度值显著降低 ($P<0.05$); 治疗后, E 组、PEMF 组大鼠骨密度值较治疗前显著升高 ($P<0.05$); 与 S 组比较, M 组大鼠骨密度值显著降低 ($P<0.05$); 与 M 组比较, E 组、PEMF 组大鼠骨密度值显著增加 ($P<0.05$); E 组与 PEMF 组比较, 大鼠骨密度值差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠治疗前后骨密度值比较 ($g/cm^3, \bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Comparison of bone mineral density of rats in each group before and after treatment ($g/cm^3, \bar{x}\pm s, n=10$)

组别	治疗前	治疗后	t 值	P 值
S 组	0.25 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.04	0.632	0.535
M 组	0.14 $\pm$ 0.02 ^a	0.15 $\pm$ 0.02 ^a	1.118	0.278
E 组	0.15 $\pm$ 0.03 ^a	0.24 $\pm$ 0.04 ^b	5.692	0.000
PEMF 组	0.15 $\pm$ 0.02 ^a	0.23 $\pm$ 0.03 ^b	7.016	0.000
F 值	41.41	20.74	—	—
P 值	0.000	0.000	—	—

注: 与 S 组比较, ^a $P<0.05$; 与 M 组比较, ^b $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠形态计量学结果比较

与 S 组比较, M 组大鼠 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 显著降低 ($P<0.05$), Tb.Sp 显著增加 ($P<0.05$); 与 M 组比较, E 组、PEMF 组大鼠 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 显著升高 ($P<0.05$), Tb.Sp 显著降低 ($P<0.05$); E 组与 PEMF 组比较, 大鼠 BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Tb.Sp 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠形态计量学结果比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Comparison of morphometric results of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	BV/TV/%	Tb.N/(个/mm)	Tb.Th/ μ m	Tb.Sp/ μ m
S 组	9.16 $\pm$ 1.43	1.35 $\pm$ 0.18	61.75 $\pm$ 3.52	234.26 $\pm$ 15.15
M 组	5.21 $\pm$ 0.82 ^a	0.62 $\pm$ 0.05 ^a	47.26 $\pm$ 6.54 ^a	363.14 $\pm$ 17.68 ^a
E 组	6.61 $\pm$ 1.03 ^{ab}	1.33 $\pm$ 0.17 ^{ab}	58.96 $\pm$ 4.31 ^{ab}	241.42 $\pm$ 14.63 ^{ab}
PEMF 组	6.59 $\pm$ 1.01 ^{ab}	1.32 $\pm$ 0.16 ^{ab}	57.86 $\pm$ 5.30 ^{ab}	244.61 $\pm$ 14.58 ^{ab}
F 值	22.63	56.99	17.73	157.10
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 M 组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠骨组织 Smurf1 蛋白表达量比较

与 S 组比较, M 组大鼠骨组织 Smurf1 蛋白表达量显著升高($P<0.05$);与 M 组比较, E 组、PEMF 组大鼠骨组织 Smurf1 蛋白表达量显著降低($P<0.05$);E 组与 PEMF 组比较,大鼠骨组织 Smurf1 蛋白表达量差异无统计学意义($P>0.05$),详见图 1、表 4。

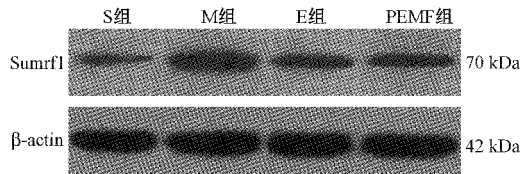


图 1 WB 检测大鼠骨组织 Smurf1 蛋白表达量

Fig.1 WB detection of Smurf1 protein expression in rat bone

表 4 各组大鼠治疗后骨组织 Smurf1 蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 4 Comparison of Smurf1 protein expression in bone tissue of rats in each group after treatment ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	Smurf1
S 组	0.19±0.03
M 组	1.05±0.13 ^a
E 组	0.31±0.04 ^{ab}
PEMF 组	0.32±0.05 ^{ab}
F 值	281.80
P 值	0.000

注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 M 组比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨论

本研究采用大鼠 OVX-OP 模拟原发性 OP,摘除卵巢后,大鼠体内雌激素显著降低,可引起破骨细胞凋亡减少,成骨细胞凋亡增加,发生 OP^[11]。目前国内外研究发现,PEMF 对促进骨形成、抑制骨吸收、改善骨密度具有重要作用,可有效治疗 OP。Lei 等^[13]研究报道,PEMF 可提高 OVX-OP 小鼠椎体骨量,增强其骨结构及骨强度,与 OVX 组比较,OVX+PEMF 组骨形成标志物骨特异性碱性磷酸酶(bone isoenzyme alkaline phosphatase, BALP)、血清骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、I 型前胶原 n 端前肽(N-terminal propeptide of type I procollagen, P1NP)明显升高,腰椎小梁骨质量下降和小梁骨显微结构的恶化减轻,可能与 Wnt3a/LRP5/β-catenin 和 OPG/RANKL/RANK 信号通路骨骼基因表达有关。刘西纺等^[21]研究报道,

极低频脉冲电磁场结合全身振动治疗可提高废用性 OP 大鼠骨密度,改善骨小梁微结构,提高骨生物力学性能,两者有协同作用,治疗效果优于单一治疗。本研究结果发现,与 S 组比较, M 组大鼠骨密度值、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 显著降低, Tb.Sp 显著增加;与 M 组比较, E 组、PEMF 组大鼠骨密度、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 显著升高, Tb.Sp 显著降低,与文献报道一致;E 组与 PEMF 组比较,各指标差异无统计学意义, BV/TV 可反映骨量变化, Tb.Sp 可反映骨小梁的显微结构,提示 PEMF 可增加骨密度、改善骨形态,与雌激素的作用相似,对 OP 具有一定治疗作用,提示 PEMF 在 OP 的治疗中可能有雌激素样作用。

泛素-蛋白水解酶复合体通路(ubiquitin-proteolytic pathway, UPP)是一种特异性降解胞内调控蛋白的主要途径,具有 ATP 依赖性,主要由泛素、泛素连接酶和 26S 蛋白水解酶复合体组成^[14]。Smurf1 是一种泛素连接酶,具有 HECT 结构域,属于泛素连接酶 Hect 家族新成员,在骨形成、胚胎发育和肿瘤发生的调控中发挥重要作用^[15]。Smurf1 还可优先与 Smad1、5 接头区域的 PPXY 结构域结合,诱导其泛素化和降解,而 Smad 可通过介导转化生长因子-β(transforming growth factor-beta, TGF-β)或骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)参与骨形成和骨吸收等骨代谢调节^[16-20]。Liang 等^[21]研究报道,抑制成骨细胞中 Smurf1 表达可促进年龄相关性骨质疏松小鼠模型的骨形成。尚德阳等^[22]研究报道,与正常组、假手术组比较, OVX-OP 大鼠骨、肾组织中 Smurf1/Smurf2 mRNA 表达明显降低,下丘脑中表达升高,补肾中药可改善 Smurf1/Smurf2 mRNA 表达,防治骨质疏松。本研究结果发现,与 S 组比较, M 组大鼠骨组织 Smurf1 蛋白表达量显著升高;与 M 组比较, E 组、PEMF 组大鼠骨组织 Smurf1 蛋白表达量显著降低,与尚德阳等文献报道^[22]不完全一致,与 Liang、Zhang 等文献报道一致^[21,23]。Smurf1 蛋白调控骨形成可能存在不同机制,综合文献报道及本研究结果,提示骨组织 Smurf1 蛋白表达量升高可能与骨质疏松症有关。PEMF 可促进骨形成、增加骨密度,防治骨质疏松,可能与骨组织 Smurf1 蛋白表达下调有关,但有待进一步验证。

综上所述,PEMF 可增强骨形成,提高 OP 大鼠骨密度,改善其骨丢失症状,发挥抗骨质疏松作用,可能与 Smurf1 蛋白下调表达有关,为临床 OP 的治疗提供了新的思路。但本研究只是进行了初步探

讨,关于 Smurf1 蛋白下游信号的分子机制尚不明确,还有待进一步深入探究及验证。

【参 考 文 献】

- [1] Janiszewska M, Baranska A, Jedrych T, et al. The impact of selected factors on acceptance of illness and life satisfaction among female residents of rural areas treated for osteoporosis[J]. *Ann Agric Environ Med*, 2019, 26(4): 592-599.
- [2] 刘西纺, 杨民毅, 惠国栋, 等. 极低频脉冲电磁场结合全身振动对大鼠用性骨质疏松影响的实验研究[J]. *中华骨科杂志*, 2018, 38(22): 1384-1391.
- [3] Hsiao FY, Hsu WW. Comparative risks for cancer associated with use of calcitonin, bisphosphonates or selective estrogen receptor modulators among osteoporosis patients: a population-based cohort study[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2017, 47(10): 935-941.
- [4] 喻澜, 崔高亮, 徐群, 等. 脉冲电磁场对脑卒中后男性骨质疏松患者骨密度和骨代谢的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2018, 40(11): 830-833.
- [5] Zhao B, Xing G, Wang A. The BMP signaling pathway enhances the osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with osteoporosis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 462.
- [6] Liang C, Peng S, Li J, et al. Inhibition of osteoblastic Smurf1 promotes bone formation in mouse models of distinctive age-related osteoporosis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3428-3441.
- [7] Zhang Y, Wang C, Cao Y, et al. Selective compounds enhance osteoblastic activity by targeting HECT domain of ubiquitin ligase Smurf1[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 50521-50533.
- [8] Liu W, Qi M, Konermann A, et al. The p53/miR-17/Smurf1 pathway mediates skeletal deformities in an age-related model via inhibiting the function of mesenchymal stem cells[J]. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(3): 205-218.
- [9] Cui Q, Xing J, Yu M, et al. Mmu-miR-185 depletion promotes osteogenic differentiation and suppresses bone loss in osteoporosis through the Bgn-mediated BMP/Smad pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 172-185.
- [10] 沈健, 陈秋晴, 曹兰兰, 等. 吡格列酮对去卵巢大鼠骨代谢指标的影响及机制[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(13): 1359-1362.
- [11] 曹志林, 曲晓怡, 成功, 等. 长链非编码 RNA LINC00311 对骨质疏松大鼠破骨细胞增殖能力的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(5): 912-914.
- [12] 王林, 陈佳佳, 龚沈初, 等. 双能 CT 虚拟平扫诊断骨质疏松的初步研究[J]. *中华放射学杂志*, 2017, 51(12): 949-953.
- [13] Lei T, Liang Z, Li F, et al. Pulsed electromagnetic fields (PEMF) attenuate changes in vertebral bone mass, architecture and strength in ovariectomized mice[J]. *Bone*, 2018, 108(1): 10810-10819.
- [14] 孙莉, 杨宇东, 刘殿波, 等. NL63 冠状病毒木瓜样蛋白酶去泛素化酶活性和对宿主抗病毒天然免疫反应调节作用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(8): 871-880.
- [15] Zhang Y, Wang C, Cao Y, et al. Selective compounds enhance osteoblastic activity by targeting HECT domain of ubiquitin ligase Smurf1[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 50521-50533.
- [16] Liu J, Liang C, Guo B, et al. Increased PLEKHO1 within osteoblasts suppresses Smad-dependent BMP signaling to inhibit bone formation during aging[J]. *Aging Cell*, 2017, 16(2): 360-376.
- [17] Iezaki T, Fukasawa K, Horie T, et al. The MAPK Erk5 is necessary for proper skeletogenesis involving a Smurf-Smad-Sox9 molecular axis[J]. *Development*, 2018, 145(14): 1-14.
- [18] Zhang Y, Gu X, Li D, et al. METTL3 regulates osteoblast differentiation and inflammatory response via smad signaling and mapk signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 1-15.
- [19] Wang QL, Li HF, Wang DP, et al. Effect of GGCX on the differentiation function of osteoporosis bone marrow mesenchymal stem cells through regulating TGFbeta/smad signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(17): 7224-7231.
- [20] Lin XS, Wang HY, Zhang Z, et al. Effects of acupoint application therapy with tiangui powder on osteoporosis in ovariectomized rats through TGF-beta1 and Smad2/3 signaling pathway[J]. *Orthop Surg*, 2019, 11(1): 143-150.
- [21] Liang C, Peng S, Li J, et al. Inhibition of osteoblastic Smurf1 promotes bone formation in mouse models of distinctive age-related osteoporosis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3428-3441.
- [22] 尚德阳, 邓洋洋, 孙鑫, 等. 补肾中药对肾虚骨质疏松症大鼠骨、肾、下丘脑组织中 Smurf1/Smurf2 的 mRNA 表达影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(10): 3629-3633.
- [23] Zhang Y, Wang C, Cao Y, et al. Selective compounds enhance osteoblastic activity by targeting HECT domain of ubiquitin ligase Smurf1[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 50521-50533.

(收稿日期: 2020-02-21; 修回日期: 2020-04-21)