

· 论著 ·

黄精多糖对 TNF- α 作用的大鼠成骨细胞增殖、凋亡影响及其机制研究

刘超¹ 徐飞² 吴涛¹ 王子平³ 赵晓明^{4*}

1.汉中市三二〇一医院急诊科,陕西 汉中 723000

2.汉中市三二〇一医院急诊科,陕西 汉中 723000

3.略阳县人民医院骨科,陕西 汉中 724300

4.宝鸡市中心医院骨科,陕西 宝鸡 721008

中图分类号: R783.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 08-1147-08

摘要: **目的** 探讨黄精多糖 (polygonatum sibiricum polysaccharide, PSP) 对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 作用的大鼠成骨细胞增殖、凋亡影响及其可能作用的机制。**方法** 采用 MTT 法检测不同浓度的 PSP 对 TNF- α 诱导的成骨细胞增殖能力的影响, 筛选出 PSP 的适宜浓度; 通过流式细胞术检测 PSP 对 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡能力的影响。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 PSP 对 TNF- α 作用的成骨细胞中 miR-212 表达的影响; 运用蛋白印迹法 (Western blot) 检测成骨细胞中 Cyclin D1、Bcl-2、Bax、P21 的蛋白表达水平。**结果** TNF- α 可抑制成骨细胞增殖, 促进 P21 蛋白表达, 而抑制 Cyclin D1 蛋白表达。PSP 不同剂量组可明显促进成骨细胞增殖, 令 Cyclin D1 蛋白表达上调, 而 P21 蛋白表达下调; TNF- α 可促进成骨细胞凋亡, 上调 Bax 表达, 而降低 Bcl-2、miR-212 表达, PSP 可提高 miR-212 的表达水平, 上调 miR-212 表达可显著逆转 TNF- α 对成骨细胞的作用; 抑制 miR-212 表达可明显逆转 PSP 对 TNF- α 诱导的成骨细胞增殖及凋亡的作用。**结论** 黄精多糖可通过上调 miR-212 表达, 进而促进成骨细胞增殖及抑制细胞凋亡。

关键词: 黄精多糖; miR-212; 成骨细胞; 增殖; 凋亡

Effect of polygonatum polysaccharide on proliferation and apoptosis of rat osteoblasts induced by TNF- α

LIU Chao¹, XU Fei², WU Tao¹, WANG Ziping³, ZHAO Xiaoming^{4*}

1.Department of Emergency, 3201 Hospital of Hanzhong City, Hanzhong 723000

2.Department of Emergency, 3201 Hospital of Hanzhong City, Hanzhong 723000

3.Department of Orthopaedics, Lueyang People's Hospital, Hanzhong 724300

4.Department of Orthopedics, Baoji Central Hospital, Baoji 721008, China

* Corresponding author; ZHAO Xiaoming, Email: 526202070@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effects of polygonatum sibiricum polysaccharide (PSP) on the proliferation and apoptosis of rat osteoblasts induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α) and its possible mechanism. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of different concentrations of PSP on TNF- α -induced osteoblast proliferation, and the appropriate concentration of PSP was screened. Flow cytometry was used to detect the effect of PSP on the apoptotic ability of osteoblasts induced by TNF- α . Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the effect of PSP on the expression of miR-212 in osteoblasts induced by TNF- α . The protein expression levels of Cyclin D1, Bcl-2, Bax and P21 in osteoblasts were detected by Western blot. **Results** TNF- α could inhibit the proliferation of osteoblasts, promote the expression of P21 protein, and inhibit the expression of Cyclin D1 protein. The different doses of PSP could promote the proliferation of osteoblasts, the expression of Cyclin D1 was up-regulated, and the expression of P21 was down-regulated. TNF- α could promote osteoblast apoptosis, up-regulate the expression of Bax, and decrease the expression of Bcl-2 and miR-212. PSP could increase the expression level of miR-212. Up-regulation of miR-212

* 通信作者: 赵晓明, Email: 526202070@qq.com

expression could significantly reverse the effect of TNF- α on osteoblasts. Inhibiting the expression of miR-212 could significantly reverse the effect of PSP on TNF- α -induced osteoblast proliferation and apoptosis. **Conclusion** Polygonatum polysaccharide can promote the osteoblast proliferation and inhibit apoptosis by up-regulating miR-212 expression.

Key words: polygonatum sibiricum polysaccharide; miR-212; osteoblasts; proliferation; apoptosis

骨质疏松症的主要病理特征为骨量减少及骨微结构退化,成骨细胞是一种功能性细胞并可在骨形成过程中发挥重要作用^[1-2]。研究^[3]表明中医药治疗具有补肾健脾及活血等功能,对骨质疏松症具有一定治疗效果。研究^[4-5]发现,黄精多糖(polygonatum sibiricum polysaccharide, PSP)具有抗骨质疏松的作用并可有效改善骨微结构。PSP可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[6]。研究报道^[7]指出补肾方可能通过上调微小RNA-212(miRNA-212, miR-212)表达进而有效治疗骨质疏松。然而,PSP是否通过上调miR-212的表达治疗骨质疏松尚未可知。因此,本研究通过应用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)作为诱导成骨细胞凋亡的介质,探讨黄精多糖是否可通过调控miR-212表达从而影响TNF- α 诱导的大鼠成骨细胞增殖及凋亡,以期从分子水平探讨黄精多糖防治骨质疏松症的作用,为临床合理用药提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠成骨细胞 CP-R091 购自武汉普诺赛生命科技有限公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)购自苏州赛业生物科技有限公司;黄精多糖购自陕西慈缘生物技术有限公司; α -MEM 培养基购自南京维森特生物技术有限公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Sigma 公司;噻唑蓝(MTT)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;反转录试剂盒与 Realtime PCR SYBR premix 均购自日本 TaKaRa 公司;Trizol 试剂与 Lipofectamine 2000 转染试剂均购自美国 Invitrogen 公司;miR-212 mimics、miR-212 抑制剂(anti-miR-212)及其阴性对照均购自广州锐博生物科技有限公司;兔抗鼠 Cyclin D1、P21、Bcl-2、Bax 一抗与辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;蛋白裂解液与 BCA 检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;显色液购自美国 BIO-BAD 公司;细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 成骨细胞 CP-R091 培养及黄精多糖处理:

CP-R091 细胞培养于含有 10% FBS 的 α -MEM 培养基内,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 体积分数培养箱内培养,收集对数生长期细胞,加入完全培养基重悬细胞,接种于 96 孔细胞培养板,待细胞生长融合度达到 70% 时,使用不同浓度的黄精多糖处理细胞:5、10、25、50 mg/L^[8],同时将未经处理的 CP-R091 细胞作为对照即 CP-R091 组。

1.2.2 TNF- α 处理及实验分组:收集黄精多糖处理 24 h 后的 CP-R091 细胞,每组分别加入浓度为 30 μ g/L 的 TNF- α 进行处理 48 h^[9],实验分组分别为 CP-R091+TNF- α 组、CP-R091+TNF- α +PSP 5 mg/L 组、CP-R091+TNF- α +PSP 10 mg/L 组、CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L 组、CP-R091+TNF- α +PSP 50 mg/L 组,根据 MTT 实验检测结果选取黄精多糖适宜浓度进行后续实验。后续研究中为验证黄精多糖是否可通过调控 miR-212 表达进而影响成骨细胞增殖及凋亡,将 miR-212 mimics 及其阴性对照分别转染入 CP-R091 细胞(12 h),并加入 TNF- α 进行诱导 48 h,分别为 miR-212 组、miR-NC 组;将 anti-miR-212、anti-miR-NC 分别转染入 CP-R091 细胞(12 h),加入 TNF- α 进行诱导 48 h,加入适宜浓度的黄精多糖处理 24 h,分别为 CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L+anti-miR-212 组、CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L+anti-miR-NC 组,收集各组对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖:收集各组对数生长期 CP-R091 细胞,分别于药物处理或实验处理 24、48、72 h 时,向每孔加入 20 μ L 浓度为 5×10^3 mg/L 的 MTT 溶液,室温孵育 4 h,弃上清,每孔分别加入 150 μ L 二甲基亚砷(DMSO),放入摇床内振荡培养 15 min,利用酶标仪检测波长 490 nm 处各孔光密度值(OD),每组实验均设置 3 次重复。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡:收集实验处理后各组 CP-R091 细胞,胰蛋白酶消化细胞,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 转速离心 5 min,收集细胞,用 PBS 洗涤细胞,加入 100 μ L Binding Buffer 制备细胞悬液,相同离心条件下进行离心,加入加入 5 μ L 膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC),充分混匀后加入 10 μ L 碘化丙啶(PI)染色液,室温下避光孵育

15 min,加入 400 μ L Binding Buffer,每个样本分别收集 1×10^4 个细胞,利用流式细胞仪上机检测计算细胞凋亡率。

1.2.5 qRT-PCR 检测细胞中 miR-212 相对表达量:采用 Trizol 法提取各组 CP-R091 细胞 RNA,应用核酸蛋白分析仪检测 RNA 浓度与纯度,参照反转录试剂盒合成 cDNA,每组均设置 3 个复孔,根据 qRT-PCR 反应试剂盒配置 20 μ L 反应体系,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 次循环。miR-212 以 U6 为内参基因,反应结束后,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-212 相对表达量。

1.2.6 蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测 Cyclin D1、P21、Bcl-2、Bax 蛋白表达:收集各组 CP-R091 细胞,加入蛋白裂解液提取 CP-R091 细胞总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量,取蛋白样本 20 μ g 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳反应,将分离的蛋白凝胶转移至 PVDF 膜,室温条件下放入室温封闭液封闭 1 h, TBST 清洗 3 次 \times 5 min,加入一抗 (稀释比 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 清洗 3 次 \times 5 min,加入二抗 (稀释比 1:3 000),室温下振荡孵育 1 h, TBST 清洗 3 次 \times 5 min,加入显色液,置于凝胶成像仪内显影,调整曝光时间,应用 Quantityone 软件分析条带灰度值,蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/内参照条带灰度值。

1.3 统计学处理

利用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据,数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄精多糖对 TNF- α 作用的细胞 CP-R091 增殖影响

黄精多糖作用 TNF- α 诱导的成骨细胞 CP-R091 48 h 后,细胞增殖检测结果为:与 CP-R091 组比较,CP-R091+TNF- α 组 CP-R091 细胞增殖活性显著降低 ($P < 0.05$),Cyclin D1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),而 P21 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$);与 CP-R091+TNF- α 组比较,CP-R091+TNF- α +PSP 10 mg/L 组、CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L 组、CP-R091+TNF- α +PSP 50 mg/L 组 CP-R091 细胞增殖活性显著升高 ($P < 0.05$),Cyclin D1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),而 P21 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),但 CP-R091+TNF- α 组与 CP-R091+TNF- α +PSP 5 mg/L 组

间比较差异不显著 ($P > 0.05$),CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L 组、CP-R091+TNF- α +PSP 50 mg/L 组间比较差异不显著 ($P > 0.05$),因此选取黄精多糖浓度为 25 mg/L 进行后续研究,见图 1。

2.2 黄精多糖对 TNF- α 作用的细胞 CP-R091 凋亡影响

实验结果显示 (图 2),同 CP-R091 组相比,CP-R091+TNF- α 组成骨细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白水平明显下降 ($P < 0.05$),而 Bax 蛋白水平明显上升 ($P < 0.05$);相较于 CP-R091+TNF- α 组,CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L 组成骨细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白水平明显升高 ($P < 0.05$),而 Bax 蛋白水平明显降低 ($P < 0.05$)。

2.3 黄精多糖对 TNF- α 作用的细胞 CP-R091 中 miR-212 表达的影响

实验结果显示 (图 3),TNF- α 诱导的 CP-R091 细胞中 miR-212 的表达水平较正常培养的 CP-R091 细胞显著降低 ($P < 0.05$),而 CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L 组 CP-R091 细胞中 miR-212 的表达水平与 CP-R091+TNF- α 组相比显著升高 ($P < 0.05$),见表 3。

2.4 过表达 miR-212 表达对 TNF- α 处理的细胞 CP-R091 增殖、凋亡的影响

qRT-PCR 法检测 CP-R091 细胞中转染 miR-212 mimics 的转染效果,结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-212 组 CP-R091 细胞中 miR-212 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$),见图 4 A。表明成功上调 TNF- α 处理的细胞 CP-R091 中 miR-212 的表达水平。实验结果显示 (图 4),同 miR-NC 组相比,miR-212 组 CP-R091 细胞增殖活性显著升高 ($P < 0.05$),细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$),Cyclin D1、Bcl-2 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$),而 Bax、P21 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)。

2.5 抑制 miR-212 能逆转黄精多糖对 TNF- α 作用的细胞 CP-R091 增殖的促进作用

黄精多糖是否通过上调 miR-212 表达而发挥作用,实现结果显示,与 CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L+anti-miR-NC 组相比,CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L+anti-miR-212 组 CP-R091 细胞增殖能力显著降低 ($P < 0.05$),Cyclin D1 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$),而 P21 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$),见图 5。

2.6 抑制 miR-212 能逆转黄精多糖对 TNF- α 作用

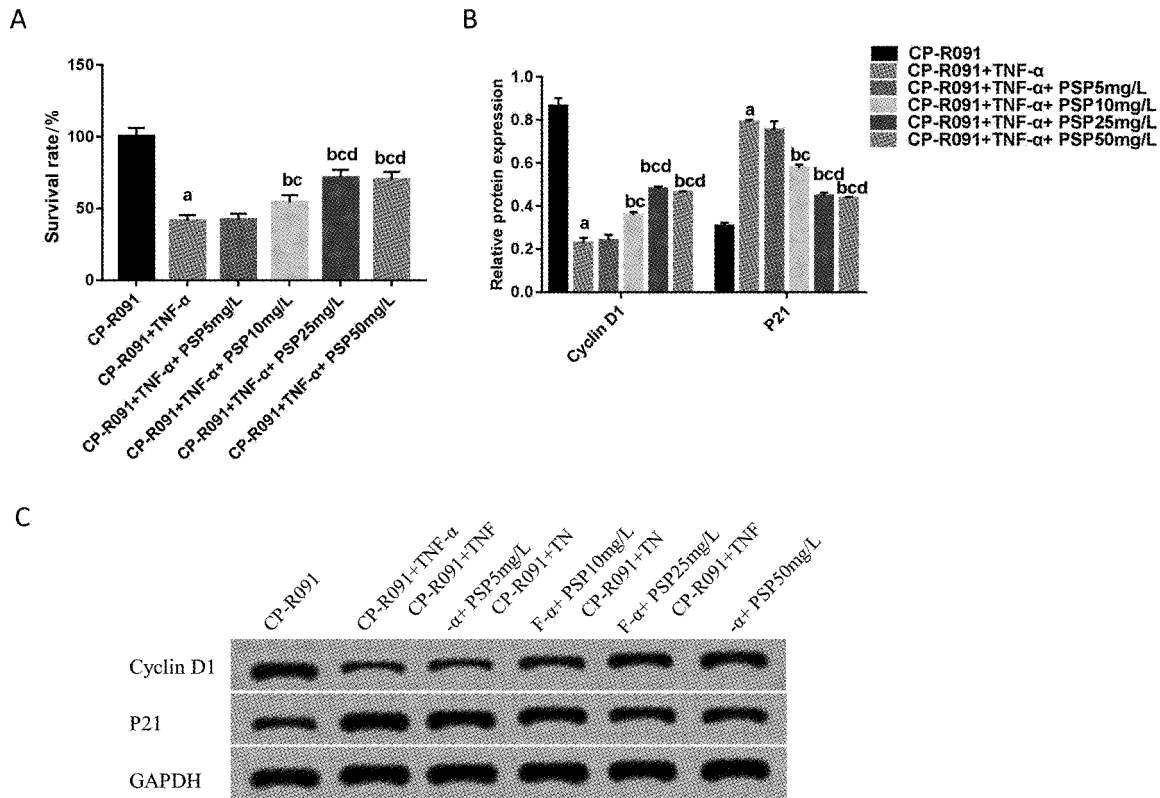


图1 黄精多糖对 TNF- α 作用的细胞 CP-R091 增殖蛋白影响

A: 黄精多糖对 TNF- α 作用的细胞 CP-R091 存活率的影响; B、C: 黄精多糖对 TNF- α 作用的细胞 CP-R091 增殖蛋白表达的影响。
注: 与 CP-R091 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CP-R091+TNF- α 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 CP-R091+TNF- α +PSP 5 mg/L 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 CP-R091+TNF- α +PSP 10 mg/L 组比较, ^d $P < 0.05$; 与 CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L 组比较, ^e $P < 0.05$ 。

Fig.1 Effect of Polygonatum Polysaccharide on the Expression of Proliferating of CP-R091 in Cells Induced by TNF- α

的细胞 CP-R091 凋亡的抑制作用

实验结果显示(图 6), CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L+anti-miR-212 组 CP-R091 细胞凋亡率较 CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L+anti-miR-NC 组显著升高 ($P < 0.05$), Bax 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

黄精多糖可有效降低血糖血脂且具有抗炎、抗病毒等多种作用功能作用^[10]。研究报道^[11-12]指出黄精多糖可有效治疗动脉粥样硬化、糖尿病等多种疾病。黄精多糖可促进骨髓间充质干细胞骨向分化过程^[13-14]。以上研究结果提示黄精多糖可能成为治疗骨质疏松症的新型药物。本研究结果显示, TNF- α 诱导的成骨细胞增殖能力明显降低, 而细胞凋亡能力明显升高, 使用不同剂量的黄精多糖能够显著促进成骨细胞增殖并抑制细胞凋亡, 说明黄精多糖可能通过调控细胞增殖及凋亡相关蛋白表达进而促进成骨细胞增殖并抑制其凋

亡。P21 属于负向周期调控蛋白并可抑制细胞增殖, Cyclin D1 属于正向周期调控蛋白并可促进细胞增殖^[15]。本研究结果表明黄精多糖可显著上调 Cyclin D1 表达及下调 P21 表达而促进细胞周期由 G1 期进入 S 期进而促进成骨细胞增殖, 提示促进成骨细胞增殖可能是黄精多糖发挥抗骨质疏松作用的潜在分子机制。Bcl-2 家族相关基因表达可调控细胞凋亡过程, Bcl-2 基因是抗凋亡基因并可通过阻止细胞色素 C 释放进而抑制细胞凋亡, 而 Bax 是促凋亡基因并可通过激活 Caspase-3 级联反应继而促进细胞凋亡, 已有研究^[16]表明 Bcl-2 过表达可明显抑制 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡。本研究结果提示黄精多糖可明显抑制 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡。

miR-212 可通过抑制靶基因 ZNF133 表达进而抑制骨肉瘤细胞增殖及迁移^[17]。Liu 等^[18]研究表明 miR-212-3p 表达异常与骨关节炎等发生及发展密切相关。本研究结果显示 TNF- α 诱导的成骨细胞中 miR-212 的表达水平显著降低, 而使用黄精多

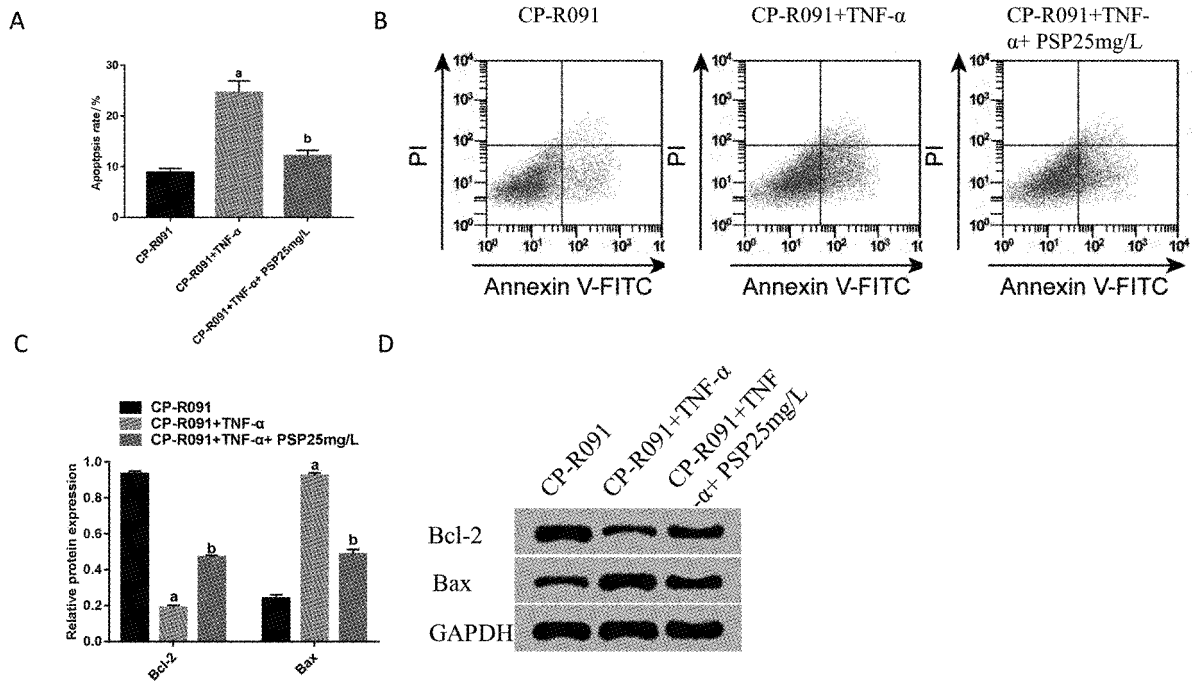


图2 黄精多糖对 TNF-α 作用的细胞 CP-R091 凋亡的影响 A、B:黄精多糖对 TNF-α 作用的细胞 CP-R091 凋亡的影响;C:黄精多糖对 TNF-α 作用的细胞 CP-R091 凋亡蛋白表达的影响;D: Western blot 法检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达。

注:与 CP-R091 组比较,^a $P < 0.05$;与 CP-R091+TNF-α+PSP 25 mg/L 组比较,^b $P < 0.05$ 。

Fig.2 Effect of Polygonatum Polysaccharide on Apoptosis of CP-R091 Cells induced by TNF-α

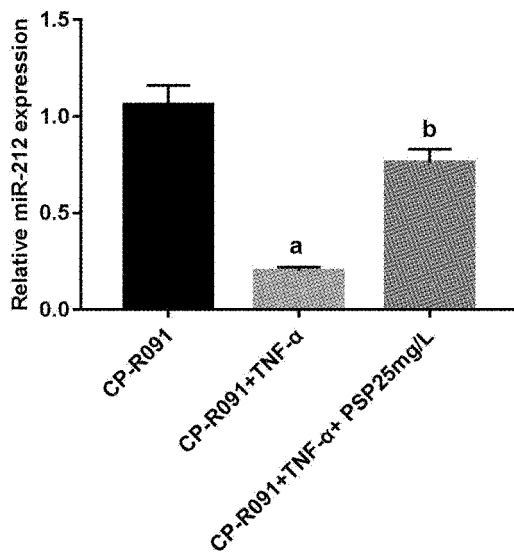


图3 黄精多糖对 TNF-α 作用的细胞 CP-R091 中 miR-212 表达的影响

注:与 CP-R091 组比较,^a $P < 0.05$;与 CP-R091+TNF-α+PSP 25 mg/L 组比较,^b $P < 0.05$ 。

Fig. 3 The effect of polygonatum sibiricum polysaccharide on the expression of miR-212 in CP-R091 cells treated with TNF-α

糖处理后可明显上调 miR-212 的表达水平,说明黄精多糖可能通过上调 miR-212 表达而发挥作用。同时本研究结果发现 TNF-α 诱导的成骨细胞中上调 miR-212 表达可显著促进成骨细胞增殖并降低细胞凋亡水平,Cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达升高,而 Bax、P21 蛋白表达降低,为进一步证实黄精多糖对 TNF-α 诱导的成骨细胞增殖及凋亡的影响是否与调控 miR-212 表达有关,本研究通过抑制 miR-212 表达发现其可明显逆转黄精多糖对 TNF-α 诱导的成骨细胞增殖的抑制作用及其对细胞凋亡的促进作用,并可逆转其对 Cyclin D1、Bcl-2、Bax、P21 蛋白表达的作用。提示黄精多糖可能通过上调 miR-212 表达进而促进成骨细胞增殖及抑制细胞凋亡进而减缓骨质疏松症进展。

综上所述,黄精多糖可能通过上调 miR-212 表达而明显抑制 TNF-α 诱导的成骨细胞凋亡并促进细胞增殖,其可能通过调控细胞增殖及凋亡相关蛋白表达而保护成骨细胞,为黄精多糖治疗骨质疏松症奠定理论基础。但关于黄精多糖对 TNF-α 诱导的成骨细胞相关信号通路及 miR-212 下游靶基因的调控作用仍需进一步探讨。

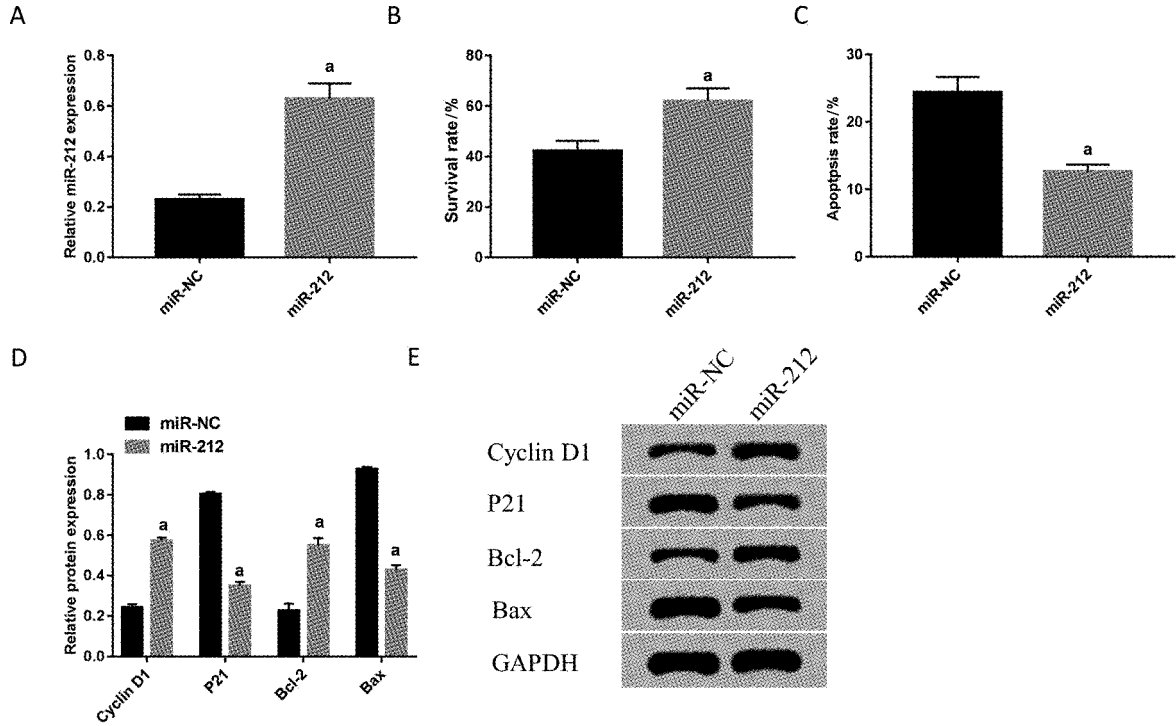


图4 过表达 miR-212 对 TNF- α 处理的细胞 CP-R091 增殖、凋亡的影响 A: miR-212 的表达; B: 过表达 miR-212 对 TNF- α 处理的细胞 CP-R091 存活率的影响; C: 过表达 miR-212 对 TNF- α 处理的细胞 CP-R091 凋亡的影响; D、E: 过表达 miR-212 对 TNF- α 处理的细胞 CP-R091 增殖、凋亡蛋白表达的影响。

注: 与 miR-NC 组比较, ^a $P < 0.05$ 。

Fig.4 Effect of overexpression of miR-212 expression on proliferation and expression of apoptosis protein in TNF- α -treated cells

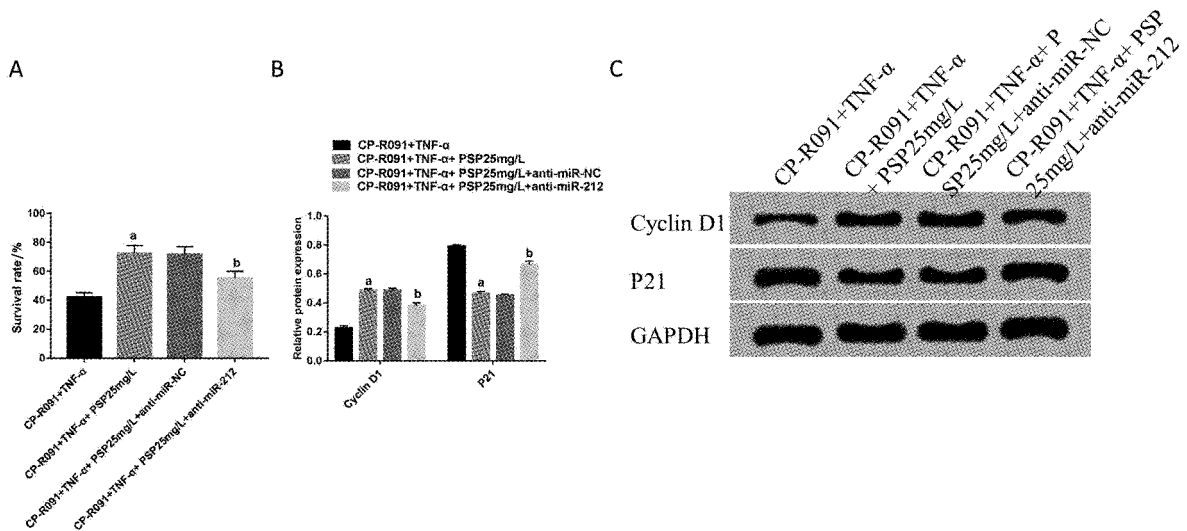


图5 抑制 miR-212 能逆转黄精多糖对 TNF- α 作用的细胞 CP-R091 增殖的影响 A: 抑制 miR-212 能逆转黄精多糖对 TNF- α 作用的细胞 CP-R091 存活率的影响; B、C: 抑制 miR-212 能逆转黄精多糖对 TNF- α 作用的细胞 CP-R091 增殖蛋白表达的影响。

注: 与 CP-R091+TNF- α 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CP-R091+TNF- α +PSP 25 mg/L+anti-miR-NC 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

Fig.5 Inhibition of miR-212 can reverse the expression of proliferating of CP-R091 in the cells affected by TNF- α

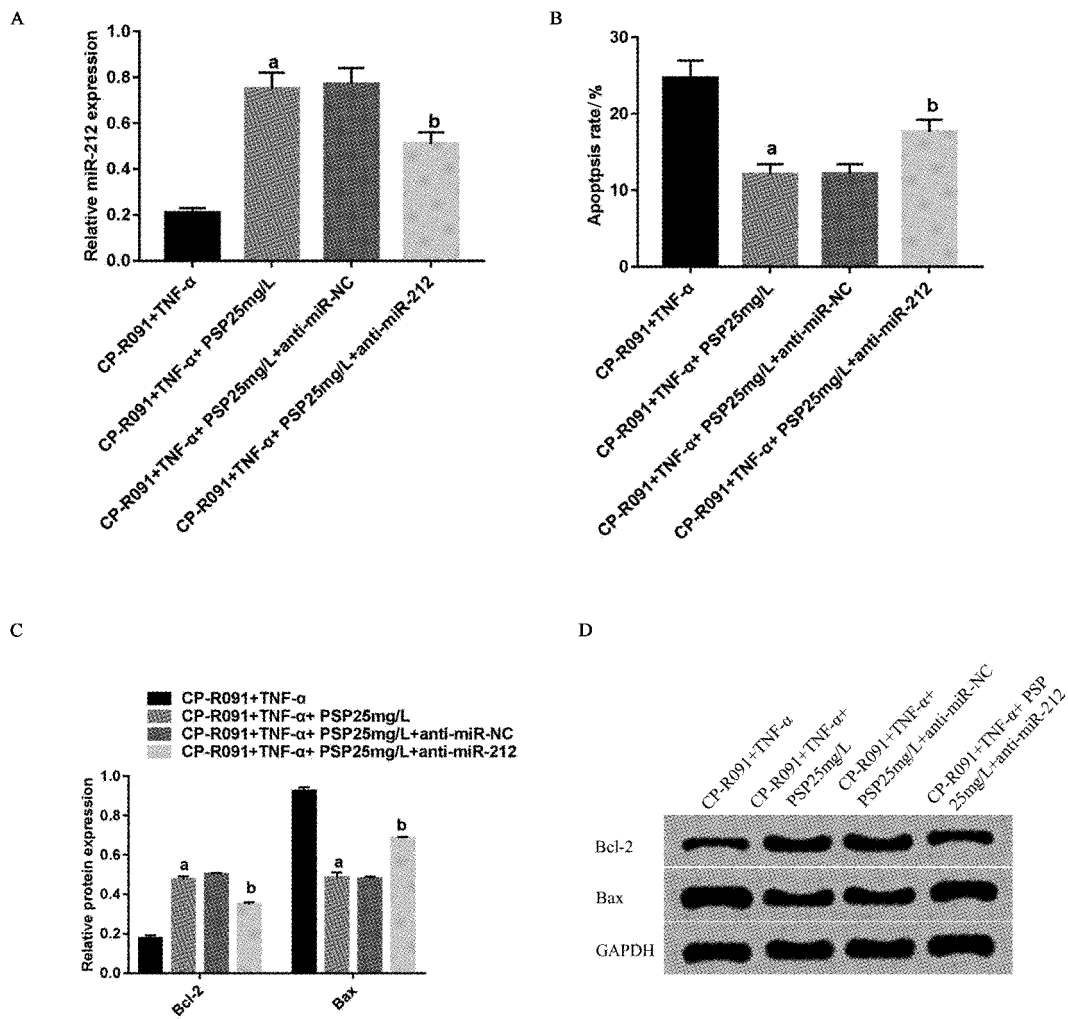


图6 抑制 miR-212 能逆转黄精多糖对 TNF-α 作用的细胞 CP-R091 凋亡表达的影响 A:miR-212 的表达; B:抑制 miR-212 能逆转黄精多糖对 TNF-α 作用的细胞 CP-R091 凋亡的影响;C、D:抑制 miR-212 能逆转黄精多糖对 TNF-α 作用的细胞 CP-R091 凋亡蛋白表达的影响。

注:与 CP-R091+TNF-α 组比较,^a*P*<0.05;与 CP-R091+TNF-α+PSP 25 mg/L+anti-miR-NC 组比较,^b*P*<0.05。

Fig.6 Inhibition of miR-212 can reverse the effect of Polygonatum polysaccharides on the apoptosis expression of CP-R091 in cells treated with TNF-α

【 参 考 文 献 】

[1] 张莹莹,周建斌,曾祥伟,等. 葛根素对成骨细胞增殖能力及靶向 Runx2 的 miRNA 的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(10):1457-1462.

[2] Saito A, Yoshimura K, Miyamoto Y, et al. Enhanced and suppressed mineralization by acetoacetate and β-hydroxybutyrate in osteoblast cultures[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(2):537-544.

[3] 陈树清,孙保国,周厚明,等. 龟龙坚骨汤对 TNF-α 诱导大鼠成骨细胞凋亡中 Fas 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10):2285-2287.

[4] 张磊,曾高峰,宗少晖,等. 黄精多糖防治绝经后骨质疏松症的分子机制[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(4):

493-498.

[5] 严芳娜,曾高峰,宗少晖,等. 黄精多糖对去卵巢大鼠骨质疏松模型中 OPG 和 RANKL 蛋白表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(8):1243-1246.

[6] 杜力. 黄精多糖对小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化影响的研究[D]. 广西医科大学, 2016.

[7] 梁兴伦,潘欣,曾思良,等. 补肾方含药血清处理的大鼠成骨细胞 miRNA 差异表达[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(4):71-75.

[8] 农梦妮,曾高峰,宗少晖,等. 黄精多糖调控骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(15):2133-2139.

(下转第 1158 页)

【 参 考 文 献 】

- [1] Hilgsmann M, Kanis JA, Juliet C, et al. Health technology assessment in osteoporosis [J]. *Calcified Tissue International*, 2013,93(1): 1-14.
- [2] Pisani P, Renna MD, Conversano F, et al. Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact[J]. *World J Orthopedics*, 2016,7(3): 171-173.
- [3] Dimai HP, Pietschmann P, Resch H, et al. Österreichischer leitfaden zur medikamentösen therapie der postmenopausalen osteoporose-update 2009 [J]. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2009,159(122): 100-102.
- [4] Hans D, Baim S. Quantitative ultrasound (QUS) in the management of osteoporosis and assessment of fracture risk[J]. *J Clin Densitometry*, 2017, 20(3):322-333.
- [5] Leslie WD, Adler RA, Fuleihan EH. Application of the 1994 WHO classification to populations other than postmenopausal caucasian women: the 2005 ISCD official positions(2006 *J Clin Densitom*; 9(1):22-30)[J]. *J Clin Densitometry*,2006,9(1): 22-30.
- [6] Hans D, Krieg MA. The clinical use of quantitative ultrasound (QUS) in the detection and management of osteoporosis [J]. *IEEE Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics & Frequency Control*, 2008,55(7): 1529-1538.
- [7] Vallipakorn SA, Vallipakorn O, Sophonsritsuk A, et al. The optimal cut-points for weight and non-weight quantitative ultrasound of the calcaneus to screen osteoporosis in postmenopausal women[J]. *J Med Assoc Thai*, 2016,99(3): 249-256.
- [8] 刘翔,熊明洁,黄静,等.双能X线骨密度测量和超声骨密度检测在社区居民骨质疏松症筛查中的应用研究[J].*中国骨质疏松杂志*, 2017,23(11): 100-104.
- [9] Dargentmolina PB. A comparison of different screening strategies to identify elderly women at high risk of hip fracture: results from the EPIDOS prospective study [J]. *Osteoporos Int*, 2003, 14(12): 969-977.
- [10] Duncan R, Francis RM, Jagger C, et al. Magnitude of fragility fracture risk in the very old-are we meeting their needs? The Newcastle 85 + Study [J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26(1): 123-130.
- [11] Mcleod KM, Johnson S, Rasali D, et al. Discriminatory performance of the calcaneal quantitative ultrasound and osteoporosis self-assessment tool to select older women for dual-energy X-ray absorptiometry [J]. *J Clin Densitometry*, 2015, 18(2): 157-164.
- [12] Maclaughlin EJ, Maclaughlin AA, Snella KA, et al. Osteoporosis screening and education in community pharmacies using a team approach[J]. *J Human Pharmacology & Drug Therapy*, 2012,25(3): 379-386.
- [13] Boonen S, Nijs J, Borghs H, et al. Identifying postmenopausal women with osteoporosis by calcaneal ultrasound, metacarpal digital X-ray radiogrammetry and phalangeal radiographic absorptiometry: a comparative study[J]. *Osteoporos Int*, 2005, 16(1): 93.
- [14] Gemalmaz A, Discigil C, Sensoy N, et al. Identifying osteoporosis in a primary care setting with quantitative ultrasound; relationship to anthropometric and lifestyle factors [J]. *J Bone Miner Metabolism*, 2007,25(3): 184-192.
- [15] Bagher L, Mohammad Hossein D, Shahriar A, et al. Correlation of quantitative heel ultrasonography with central dual-energy X-ray absorptiometric bone mineral density in postmenopausal women[J]. *J Ultrasound Med*,2005,24(7): 941-946.
- [16] Flöter M, Bittar CK, Zabeu JL, et al. Review of comparative studies between bone densitometry and quantitative ultrasound of the calcaneus in osteoporosis [J]. *Acta Reumatologica Portuguesa*, 2011,36(36): 327-335.
- [17] Thomsen K, Jepsen DB, Matzen L, et al. Is calcaneal quantitative ultrasound useful as a prescreen stratification tool for osteoporosis? [J]. *Osteoporos Int*, 2015,26(5): 1459-1475.
- (收稿日期: 2019-02-23;修回日期: 2019-03-10)
-
- (上接第 1153 页)
- [9] 韩清民,施佳平,林一峰,等.肿瘤坏死因子 α 诱导大鼠成骨细胞凋亡与中药骨康的干预效应形态学观察[J].*中国组织工程研究*, 2005, 9(23):170-172.
- [10] 曾高峰,张志勇,鲁力,等.黄精多糖对骨质疏松性骨折大鼠骨代谢因子的影响[J].*中国组织工程研究*, 2011, 15(33):6199-6202.
- [11] Yang JX, Wu S, Huang XL, et al. Hypolipidemic activity and antiatherosclerotic effect of polysaccharide of polygonatum sibiricum in rabbit model and related cellular mechanisms[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015(1): 391065-391071.
- [12] Zhang H, Cao Y, Chen L, et al. A polysaccharide from Polygonatum sibiricum attenuates amyloid- β -induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 117(5):879-886.
- [13] 曾高峰,宗少晖,邹斌,等.黄精多糖对小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中 PINP 和 BMP-2 表达的影响[J].*天然产物研究与开发*, 2014, 26(8):1188-1192.
- [14] 文珠,胡国柱,俞火,等.黄精多糖干预长春新碱抑制骨髓基质细胞增殖的研究[J].*中华中医药杂志*, 2011, 26(7): 1630-1632.
- [15] 姚曼,梁淑芳,程彬彬,等.人参皂昔促进小鼠成骨细胞增殖的作用及机制[J].*湖南中医药大学学报*, 2015, 35(9): 16-19.
- [16] 付文举,张德志,王国喜,等.磷酸化 PKC- δ 对地塞米松诱导大鼠成骨细胞凋亡的影响[J].*山东医药*, 2015, 55(31): 20-22.
- [17] 裴祯,张晓晶,郑珂,等. miR-212 抑制骨肉瘤细胞恶性生物学行为的实验研究[J].*中国医科大学学报*, 2018, 47(10): 924-928.
- [18] Liu Y, Zhang XL, Li XF, et al. miR-212-3p reduced proliferation, and promoted apoptosis of fibroblast-like synoviocytes via down-regulating SOX5 in rheumatoid arthritis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(2):461-471.
- (收稿日期: 2019-09-11;修回日期: 2019-11-08)