

· 论 著 ·

异补骨脂素改善骨质疏松大鼠骨代谢的作用探讨

尚延春* 张海英 柴巍巍

河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院),河南 郑州 450000

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 02-0220-05

摘要: **目的** 探讨异补骨脂素对骨质疏松大鼠骨代谢的改善作用和机制。**方法** 建模后测量治疗前后大鼠的骨密度和骨代谢水平;观察大鼠的骨组织结构改变;检测大鼠骨组织 Runx 2、MMP13 mRNA 及蛋白表达。**结果** 异补骨脂素提高了骨质疏松大鼠的骨密度,改善了骨代谢和骨组织结构,增强了骨组织 Runx 2 mRNA 及蛋白的表达,抑制了 MMP13 mRNA 及蛋白的表达,且其作用呈浓度依赖。**结论** 异补骨脂素可提高骨质疏松大鼠骨密度,改善其骨代谢和骨组织结构,还可上调骨组织 Runx 2 表达,抑制 MMP13 表达。

关键词: 异补骨脂素;骨质疏松;骨密度;骨代谢;骨组织

Exploration of the effect of isopsoralen on bone metabolism in osteoporotic rats

SHANG Yanchun*, ZHANG Haiying, CHAI Weiwei

Luoyang Orthopedic Traumatological Hospital of Henan Province/Henan Provincial Orthopedic Hospital, Zhengzhou 450000, China

* Corresponding author: SHANG Yanchun, Email: springriver8@163.com

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of isopsoralen on bone metabolism in osteoporosis rats. **Methods** After modeling, the bone mineral density and bone metabolism were measured before and after treatment. Bone tissue structures were observed. Runx 2, MMP13 mRNA and protein expressions were detected. **Results** Isopsoralen enhanced bone mineral density of rats with osteoporosis, improved bone metabolism and bone tissue structures, enhanced the expressions of Runx 2 mRNA and protein in bone tissues, and inhibited the expressions of MMP13 mRNA and protein, and its effect was concentration-dependent. **Conclusion** Isopsoralen can enhance bone mineral density, improve bone metabolism and bone tissue structures in rats with osteoporosis, which can up-regulate the expression of Runx 2 in bone tissues and inhibit the expressions of MMP13.

Key words: isopsoralen; osteoporosis; bone mineral density; bone metabolism; bone tissues

骨质疏松症是常见的内分泌疾病,可增加全身骨折的风险。据统计^[1],我国 50 岁以上居民的骨质疏松症发病率已高达 19.2%,且呈上升趋势。目前治疗骨质疏松症的常用药物有双膦酸盐、降钙素、雌激素等^[2],虽有一定作用但副作用大,仍需优化。异补骨脂素是补骨脂的重要成分,被证实具有抗骨质疏松作用^[3]。有实验证实^[4],核心结合因子 $\alpha 1$ (core binding factor $\alpha 1$, Runx 2)/人基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP13)信号通路可参与骨质疏松大鼠骨组织破坏病变。但是异补骨脂素是否能够通过上述信号通路途径治疗骨质疏松症尚未可知。鉴于此,本研究将设计进行大鼠对照试验以探讨上述问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 50 只 SD 大鼠,均为雌性,7 周龄,180~220 g,平均 (205.42 ± 10.12) g,SPF 级,均购自河南省实验动物中心,合格证号: SCXK(豫)20180001。

1.1.2 实验药物: 异补骨脂素干粉,购自上海纯优生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$ 。

1.1.3 试剂与仪器: 维酸钾购自博士德生物工程有限公司;血钙甲基百里酚蓝(methyl thymol blue, MTB)法检测试剂盒、血磷钼酸法测定试剂盒、血清骨钙素(bone gla protein, BGP)、尿胶原吡啶交联 N 末端肽(N-terminal telopeptides of type I collagen, NTX)、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒均购自美国

* 通信作者: 尚延春, Email: springriver8@163.com

OXTEX 公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒、脱氧核苷酸(deoxynucleotide, DNA)提取试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒均购自美国 Bio-Rad 公司;兔抗鼠 Runx 2、MMP13 单克隆抗体、山羊抗兔 Runx 2、MMP13 多克隆抗体均购自美国 Invitrogen 公司;Runx 2、MMP13 及内参(β -actin)均由深圳晶美生物科技公司设计合成。DPX 型双能 X 射线骨密度仪购自 Lunar 公司;UH4150 型紫外/可见分光光度计购自天美(中国)科学仪器有限公司;7600 型全自动生化分析仪购自日本 ATACH 公司;BX53 型光学显微镜购自日本 Olympus 公司;9700 型聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪购自美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 建模、分组与干预:将 50 只 SD 大鼠采用随机数字表分为 5 组:正常对照组、模型空白组、异补骨脂素低浓度组、异补骨脂素中浓度组、异补骨脂素高浓度组,每组 10 只。除正常对照组外,均采用维甲酸灌胃建立骨质疏松症大鼠模型:取维酸钾和 1%羧甲基纤维素钠,混合均匀并配置成终浓度为含 7%维酸钾的混悬液,1 mL/100 g 灌胃,每天 1 次,持续 2 周^[5]。与此同时,正常对照组大鼠每天灌胃 1%羧甲基纤维素钠+蒸馏水,共 2 mL,每天 1 次。建模成功后,异补骨脂素低浓度组、异补骨脂素中浓度组、异补骨脂素高浓度组分别给予 25、50、100 mg/kg 异补骨脂素(溶于 2 mL 生理盐水中)灌胃,正常对照组和模型空白组给予 2 mL 生理盐水灌胃,每天 1 次,每周停用 1 d,持续 3 个月。

1.2.2 骨密度检测:分别于治疗前后采用双能 X 射线骨密度仪检测大鼠股骨近端、L₄₋₆ 腰椎骨骨密度,取平均值。

1.2.3 骨代谢检测:分别于治疗后取大鼠尾静脉血 3 mL 检测骨代谢指标,其中血钙、血磷分别采用 MTB 法、钼酸法测得;BGP 和 NTX 均采用 ELISA 法检测。

1.2.4 骨结构变化检测:治疗后将实验大鼠断头处死,取股骨干骺端组织 1 mm³。常规脱钙、切片、脱蜡、水化,给予苏木精染色。以盐酸酒精分化,以氨水返蓝,持续 5 s 后以自来水冲洗 1 min。伊红染色,梯度浓度乙醇脱水,固定封片后镜检。

1.2.5 骨组织 Runx 2、MMP 13 mRNA 检测:取股骨干骺端组织常规提取总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA),测定其浓度与纯度。Runx 2 上游引物:

5'-ACTGATCGTTGCTAGCTAGGCT-3',下游引物:5'-CTGACTGCTAGCTAGTTTGATC-3';MMP13 上游引物:5'-CTCGATCGATAAACTAGCTGGA-3',下游引物:5'-CCGGATCGATGTTTCAGTAGTT-3'; β -actin 上游引物:5'-TTAAACTAGCTAGTTTAGCTAA-3',下游引物:5'-CTCTCGATCAGTCTAGTCATGG-3'。PCR 反应:94 °C (5 min)→94 °C (40 s)→51 °C (40 s)→72 °C (1 min),35 个循环,72 °C (10 min)。分析目的基因的相对表达强度。

1.2.6 骨组织 Runx 2、MMP 13 蛋白表达检测:取股骨干骺端组织 BCA 蛋白定量,上样。电泳分离并转膜,洗膜后以脱脂牛奶封闭 10 min。加入一抗,4 °C 过夜;洗脱后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,漂洗。染膜,暗室内曝光,分析目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,计量资料组间比较采用单因素方差分析(F 检验),每两组间比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异补骨脂素对骨质疏松症大鼠骨密度的影响

建模和干预期间正常对照组、模型空白组、异补骨脂素低浓度组、异补骨脂素中浓度组、异补骨脂素高浓度组分别有 1、3、2、2、1 只死亡,多死于灌胃时不慎穿破食道,有 2 只大鼠死亡原因未明。治疗前后采用双能 X 射线骨密度仪测量骨密度,正常对照组骨密度均无明显变化($P < 0.05$),余四组骨密度均下降($P < 0.05$)。治疗后与正常对照组比较,其余四组骨密度均下降($P < 0.05$);与模型空白组比较,异补骨脂素三个浓度组的骨密度均升高($P < 0.05$),且呈浓度依赖。见表 1。

2.2 异补骨脂素对骨质疏松症大鼠骨代谢的影响

分别采用 MTB 法、钼酸法、ELISA 测定治疗后各组大鼠的骨代谢。与正常对照组比较,模型空白组血钙无明显变化($P > 0.05$),异补骨脂素三个浓度组的血钙均升高($P < 0.05$),且呈浓度依赖;各组血磷均相近($P > 0.05$);与正常对照组比较,其余四组 BGP 均下降($P < 0.05$),NTX 均升高($P < 0.05$);与模型空白组比较,异补骨脂素三个浓度组的 BGP 均升高($P < 0.05$),NTX 均下降($P < 0.05$),且呈浓度依赖。见表 2。

表 1 异补骨脂素对骨质疏松症大鼠骨密度的影响($\bar{x}\pm s, \text{mg}/\text{cm}^2$)Table 1 Effect on bone mineral density in rats with osteoporosis ($\bar{x}\pm s, \text{mg}/\text{cm}^2$)

组别	例数 /n	股骨		股骨近端 2 cm		L ₄₋₆ 腰椎	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
正常对照组	9	232.68±12.36	234.56±14.71	237.35±14.98	237.41±15.12	243.97±15.48	243.51±16.83
模型空白组	7	233.79±13.15	200.41±12.43 ** & &	236.99±15.12	201.06±11.69 ** & &	244.12±16.71	206.74±14.29 ** & &
异补骨脂素低浓度组	8	231.88±13.57	209.45±11.29 ** # & &	235.83±15.39	207.96±10.62 ** # & &	245.63±16.83	213.84±12.57 ** # & &
异补骨脂素中浓度组	8	232.09±13.60	218.52±10.61 ** # & &	236.71±15.67	215.48±11.49 ** # & &	245.11±15.92	220.45±10.96 ** # & &
异补骨脂素高浓度组	9	233.24±13.58	227.81±11.86 * # & &	236.92±14.74	226.74±12.83 * # & &	244.69±16.88	231.86±11.52 * # & &

注:与正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型空白组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与治疗前比较, & $P<0.05$, && $P<0.01$ 。

表 2 异补骨脂素对骨质疏松症大鼠骨代谢的影响($\bar{x}\pm s$)Table 2 The effects on bone metabolism in rats with osteoporosis ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数/n	血钙/(mg/dL)	血磷/(mg/dL)	BGP/(μg/L)	NTX/(pmol/mL)
正常对照组	9	10.51±0.33	8.36±1.22	4.46±0.41	27.10±3.52
模型空白组	7	10.49±0.35	8.32±1.20	3.25±0.35 **	45.88±4.62 **
异补骨脂素低浓度组	8	11.20±0.42 ** #	8.43±1.21	3.55±0.32 ** #	39.51±4.03 ** #
异补骨脂素中浓度组	8	11.76±0.51 ** #	8.33±1.18	3.81±0.30 ** #	35.45±3.96 ** #
异补骨脂素高浓度组	9	12.20±0.55 ** #	8.46±1.20	4.19±0.33 * #	31.85±3.54 * #

注:与正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型空白组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

2.3 异补骨脂素对骨质疏松症大鼠骨结构的影响

通过 HE 染色观察骨质疏松症大鼠的骨结构,正常对照组可见骨小梁形态结构完整,髓腔相对小,且腔内造血细胞丰富;模型空白组骨小梁数目显著减少,形态结构破坏严重,骨髓腔内造血细胞数量显著减少,脂肪细胞显著增多;异补骨脂素低浓度组骨小梁数目明显减少,形态结构破坏明显,骨髓腔内造

血细胞数量明显减少,脂肪细胞明显增多;异补骨脂素中浓度组骨小梁数目减少,形态结构遭破坏,骨髓腔内造血细胞数量减少,脂肪细胞增多;异补骨脂素高浓度组骨小梁数目轻微减少,形态结构轻微受损,骨髓腔内造血细胞数量轻微减少,可见少量脂肪细胞。见图 1。

图 1 骨质疏松大鼠骨结构 HE 染色($\times 50$)

注:A:正常对照组;B:模型空白组;C:异补骨脂素低浓度组;D:异补骨脂素中浓度组;E:异补骨脂素高浓度组。

Fig.1 HE staining of bone structure in osteoporotic rats ($\times 50$)

2.4 异补骨脂素对骨质疏松大鼠骨组织 Runx 2、MMP 13 mRNA 表达的影响

采用 qRT-PCR 方法检测骨质疏松症大鼠骨组织 Runx 2、MMP 13 mRNA 表达。与正常对照组比较,其余四组 Runx 2 mRNA 表达水平均下降($P<0.05$),与模型空白组比较,异补骨脂素三个浓度组的 Runx 2 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$),且呈浓度依赖;MMP13 mRNA 变化趋势正相反。见表 3。

2.5 异补骨脂素对骨质疏松大鼠骨组织 Runx 2、MMP13 蛋白表达的影响

采用 Western blotting 方法检测骨质疏松大鼠骨

表 3 异补骨脂素对骨质疏松大鼠骨组织 Runx 2、MMP 13 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effects on the expressions of Runx 2 and MMP 13 mRNA in bone tissues of osteoporotic rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数/n	Runx 2 mRNA	MMP 13 mRNA
正常对照组	9	0.892±0.012	0.713±0.016
模型空白组	7	0.562±0.010 **	1.163±0.015 **
异补骨脂素低浓度组	8	0.652±0.015 ** #	1.042±0.013 ** #
异补骨脂素中浓度组	8	0.704±0.011 ** #	0.932±0.014 ** #
异补骨脂素高浓度组	9	0.791±0.013 ** #	0.825±0.012 ** #

注:与正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型空白组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

组织 Runx 2、MMP 13 蛋白表达。与正常对照组比较,其余四组 Runx 2 蛋白表达水平均下降 ($P < 0.05$);与模型空白组比较,异补骨脂素三个浓度组的 Runx 2 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$),且呈浓度依赖;MMP 13 蛋白表达趋势正相反。见表 4 和图 2。

表 4 异补骨脂素对骨质疏松大鼠骨组织 Runx 2、MMP13 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects on the expressions of Runx 2 and MMP13 proteins in bone tissues of osteoporotic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数/n	Runx 2/ β -actin	MMP 13/ β -actin
正常对照组	9	1.562 $\pm$ 0.183	0.241 $\pm$ 0.033
模型空白组	7	0.169 $\pm$ 0.036 **	1.769 $\pm$ 0.192 **
异补骨脂素低浓度组	8	0.263 $\pm$ 0.042 ** #	1.205 $\pm$ 0.097 ** #
异补骨脂素中浓度组	8	0.794 $\pm$ 0.038 ** #	0.763 $\pm$ 0.048 ** #
异补骨脂素高浓度组	9	1.287 $\pm$ 0.152 ** #	0.443 $\pm$ 0.039 ** #

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型空白组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

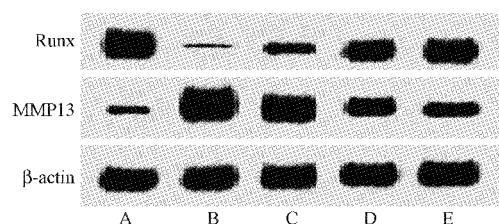


图 2 异补骨脂素对骨质疏松大鼠骨组织 Runx2、MMP13 蛋白表达的影响

注:A:正常对照组;B:模型空白组;C:异补骨脂素低浓度组;D:异补骨脂素中浓度组;E:异补骨脂素高浓度组。

Fig. 2 Effects on the expressions of Runx2 and MMP13 proteins in bone tissues of osteoporotic rats

3 讨论

补骨脂中含有丰富的异补骨脂素,在既往的大鼠实验研究^[6]中证实补骨脂注射液可促进成骨细胞的增殖,抑制成骨细胞的凋亡。该药物还可促进体外培养的骨髓间充质干细胞的增殖与分化,并且还可促进 BGP 的分泌,减少钙盐沉积,证实异补骨脂素是抗骨质疏松的有效成分^[7]。本次研究采用维甲酸与 1% 羧甲基纤维素钠混合灌胃建立骨质疏松症大鼠模型,相较于常规去卵巢造模方法可减轻对大鼠造成的伤害,符合实验动物福利原则,与刘颖等^[8]报道的造模方法一致。但有研究^[9]认为,该方法建模成功率不理想,可能是由于维酸钾与 1% 羧甲基纤维素钠混合灌胃对骨吸收和骨形成的影响不显著,作用缓慢。本研究发现治疗后异补骨脂素三

个浓度组的骨密度和骨代谢均显著改善,作用效果呈浓度依赖性。

Runx 2 是转录因子 Runxx 家族的重要成员之一,是一种特异性转录因子,可参与骨组织的形成和重建。Runx 2 决定着多能干细胞向成骨细胞的分化,并且还可促进软骨的血管化,加快软骨细胞的成熟,与破骨细胞与细胞外基质的形成也密切相关^[10-11]。MMP13 是靶向软骨降解的主要酶,主要局限于结缔组织,具有特异性切割 II 型胶原作用,在骨骼发育和软骨重建中均有参与^[12]。有报道发现^[13-14],通过调控骨组织 Runx 2/MMP13 信号通路的基因与蛋白表达可促进骨细胞的增殖,诱导其向成骨细胞分化,改善骨代谢和骨微结构,是骨质疏松症临床治疗研究的新靶点。本研究推测异补骨脂素可对骨组织 Runx 2/MMP13 信号通路产生调控作用,对骨代谢的调控作用、骨结构的保护作用很可能均通过此途径实现。

本研究中异补骨脂素三个浓度组的骨结构破坏减轻,可见异补骨脂素可减轻骨质疏松症大鼠的骨结构破坏,且呈浓度依赖性。此外,异补骨脂素三个浓度组的骨组织 Runx 2 mRNA 及蛋白表达均高于模型空白组,MMP13 mRNA 与蛋白表达均低于模型空白组,推测异补骨脂素可调控骨质疏松大鼠骨组织 Runx 2/MMP13 信号通路,促进 Runx 2 基因及蛋白表达,抑制 MMP13 基因及蛋白表达,从而实现骨保护作用。Jian Wang 等^[15]研究发现异补骨脂素对骨质疏松症大鼠模型疗效理想,且发现该药物可减轻其氧化应激反应;Ge L 等^[16]指出异补骨脂素可通过激活成骨细胞的生物学活性改善骨代谢,也证实该药物在骨质疏松症治疗方面有良好的应用前景。

综上所述,在骨质疏松症大鼠中采用异补骨脂素治疗可提高大鼠的骨密度,改善骨代谢,并且可上调 Runx 2 mRNA 及蛋白表达、下调 MMP13 mRNA 及蛋白表达。

【参考文献】

- [1] Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women [J]. Osteoporosis International, 2019, 30(1):3-44.
- [2] Zhu W, Shen H, Zhang JG, et al. Cytosolic proteome profiling of monocytes for male osteoporosis [J]. Osteoporosis International, 2017, 28(3):1035-1046.
- [3] Han S, Jang IT. Analysis of adjacent fractures after two-level percutaneous vertebroplasty: is the intervening vertebral body

- prone to re-fracture? [J]. *Asian Spine Journal*, 2018, 12(3): 524-532.
- [4] Zhu W, Yang ML, Yang GY, et al. Changes in serum runt-related transcription factor 2 levels after a 6-month treatment with recombinant human parathyroid hormone in patients with osteoporosis [J]. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2012, 35(6):602-606.
- [5] 方朝晖, 刘健, 章小平, 等. 骨疏灵改善维甲酸诱导的骨质疏松症大鼠骨质代谢作用的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2000, 6(5):40-42.
- [6] Lekamwasam S, Chandran M, Subasinghe S. Revised FRAX®-based intervention thresholds for the management of osteoporosis among postmenopausal women in Sri Lanka [J]. *Archives of Osteoporosis*, 2019, 14(1):33.
- [7] 张健, 张伟. 不同炮制方法对补骨脂中抗骨质疏松成分含量水平的影响[J]. *陕西中医*, 2018, 39(11):168-171.
- [8] 刘颖, 袁晓美, 毕亚男, 等. 补骨脂对维甲酸诱导的大鼠骨质疏松的治疗[J]. *实验动物科学*, 2018, 35(1):44-47.
- [9] Cheng M, Liang XH, Wang QW, et al. Ursolic acid prevents retinoic acid-induced bone loss in rats [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2019, 25(3):210-215.
- [10] Yin Q, Wang J, Fu Q, et al. CircRUNX2 through has-miR-203 regulates RUNX2 to prevent osteoporosis [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018, 22(12):6112-6121.
- [11] Shan Y, Wang L, Li G, et al. Methylation of bone SOST impairs SP7, RUNX2, and ER α transactivation in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2019, 97(4):369-374.
- [12] Zheng X, Zhang Y, Guo S, et al. Dynamic expression of matrix metalloproteinases 2, 9 and 13 in ovariectomy-induced osteoporosis rats [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018, 16(3):1807-1813.
- [13] Huang Y, Zhang X, Du K, et al. Inhibition of β -catenin signaling in chondrocytes induces delayed fracture healing in mice [J]. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2012, 30(2):304-310.
- [14] 王艳娇, 马厚勋, 李宝善, 等. 腺相关病毒介导的 klotho 基因表达对去势大鼠骨 Runx2 及 MMP-13 表达的影响[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(5):487-492.
- [15] Jian Wang, Gang Wang, Li Gong, et al. Is opsoralein regulates PPAR γ /WNT to inhibit oxidative stress in osteoporosis [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(1):1125-1131.
- [16] Ge L, Cui Y, Cheng K, et al. Is opsoralein enhanced osteogenesis by targeting AhR/ER α [J]. *Molecules*, 2018, 23(10):2600.
- (收稿日期: 2020-03-31;修回日期: 2020-05-26)

(上接第 219 页)

- [2] 王玉珏, 邹倩, 郭声敏, 等. 绝经后女性骨密度与骨代谢生化指标的相关性分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(3): 378-381.
- [3] 王欣燕, 刘建红, 黄显元. 育娥丸对绝经后骨质疏松症患者骨密度、骨代谢指标和骨硬化蛋白的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(3): 412-415.
- [4] 迟宏杰, 陈丽霞, 刘淑芬, 等. 交感神经对骨质疏松骨代谢的影响及其临床应用[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(4): 590-594.
- [5] Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: Its role in pathogenesis and therapy [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125(4): 1379-1387.
- [6] Ishii M, Kikuta J. Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1831(1):256-275.
- [7] J Ryu, HJ Kim, EJ Chang, et al. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling [J]. *The EMBO Journal*, 2006, 25(24): 5840-5851.
- [8] M Ishii, J Kikuta. Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1831(1): 223-227.
- [9] K BeomJun, K JungMin, L SunYoung, et al. Plasma sphingosine 1-phosphate levels and the risk of vertebral fracture in postmenopausal women [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2012, 97(10): 3807-3814.
- [10] LS Hun, Lee SunYoung, Lee YoungSun, et al. Higher circulating sphingosine 1-phosphate levels are associated with lower bone mineral density and higher bone resorption marker in humans [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2012, 97(8): E1421-1428.
- [11] M Ishii, J Kikuta, Y Shimazu, et al. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2010, 207(13): 2793-2798.
- (收稿日期: 2020-02-16;修回日期: 2020-06-13)