

· 论 著 ·

斑马鱼 *notch1a* 对 *pka* 报告基因转录调控作用张颖^{1,2} 季策^{1,2} 任建峰^{1,2} 李伟明³ 张庆华^{1,2*}

1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306

2. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306

3. 密歇根州立大学渔业与野生生物系, 东兰辛, 48824

中图分类号: Q71 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 04-0502-06

摘要: **目的** 通过双荧光素酶报告基因研究斑马鱼 *notch1a* 对 *pka* 的转录调控作用。**方法** 利用 NCBI 数据库获得斑马鱼 *notch1a* 基因序列, 克隆 *notch1a* 基因的胞内段 NICD (Notch intracellular domain), 构建 pCMV-N1aICD 表达载体, 利用蛋白质印迹法检测 N1aICD 蛋白的表达水平; 利用加州大学圣克鲁兹分校基因组浏览器数据库获得斑马鱼 *pka* 基因的启动子序列, 构建 pGL3-*pka* 报告基因载体, 然后在 HEK293T 细胞系中证实构建的报告基因载体具有活性; 将重组荧光素酶报告载体和 N1aICD 表达载体共转染 HEK293T 细胞, 用双荧光素酶检测试剂盒测定荧光素酶活性, 验证 *notch1a* 胞内段对 *pka* 基因转录水平的调控作用。**结果** 经测序验证克隆成功后, 蛋白质印迹法检测 N1aICD 蛋白能够正常表达, 且蛋白大小与预测结果一致。双荧光素酶报告基因显示, pGL3-*pka* 组活性为 pGL3 空载组的 3.25 倍。转染 pGL3-*pka* 和 pCMV-N1aICD 组活性为转染 pGL3-*pka* 和 pCMV 空载对照组的 0.31 倍。**结论** 斑马鱼 *notch1a* 对 *pka* 启动子具有转录抑制作用。在骨形成和骨重建中, Notch 通路可能通过调控 *pka* 来参与成骨与破骨细胞的分化。

关键词: 斑马鱼; 骨质疏松; *notch1a*; *pka*; 双荧光素酶报告基因**Transcriptional regulation of *notch1a* on *pka* in zebrafish**ZHANG Ying^{1,2}, JI Ce^{1,2}, REN Jianfeng^{1,2}, LI Weiming³, ZHANG Qinghua^{1,2*}

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3. Department of Fisheries and Wildlife, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA

* Corresponding author: ZHANG Qinghua, Email: qhzhang@shou.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate the transcriptional regulation of zebrafish *notch1a* on *pka* by luciferase assay. **Methods** In this study, we used NCBI database to obtain the sequence of *notch1a*. Then, we cloned and constructed pCMV-N1aICD vector. Next, we detected the expression of pCMV-N1aICD vector by Western blotting. The University of California Santa Cruz Genome Browser Database was used to predict the promoter sequence of *pka*. We cloned the *pka* promoter and constructed dual luciferase reporter vectors. And then we used the dual luciferase reporter assay system detecting the activity of pGL3-*pka* in HEK293T cell line. We had cotransfected HEK293T cells with pGL3-*pka* and pCMV-N1aICD, and we verified the intracellular regulation of *notch1a* on the transcriptional level of *pka*. **Results** The result showed that we verified the constructed plasmids by sequencing. The N1aICD proteins were detected by Western blot with normal expression, and the protein size was consistent with the predicted result. The dual luciferase reporter assay system showed that the activity of pGL3-*pka* group was 3.25 times that of the pGL3 group. The activity of the cotransfected pGL3-*pka* and pCMV-N1aICD group was 0.31 times lower than that of the cotransfected pGL3-*pka* and pCMV group. **Conclusion** It was confirmed that *notch1a* of zebrafish has transcriptional inhibition on *pka* promoter. In the process of bone formation and reconstruction, Notch pathway may be involved in the differentiation of osteoblasts and osteoclasts by regulating *pka*.

Key words: zebrafish; osteoporosis; *notch1a*; *pka*; luciferase

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种因骨量低下、骨微结构破坏, 导致骨脆性增加、易发生骨折为

* 通信作者: 张庆华, Email: qhzhang@shou.edu.cn

特征的全身性骨病(世界卫生组织,WHO)^[1]。Notch 信号通路在包括哺乳动物在内的多个物种中表达,对器官、组织的发育过程起调控作用,可调控细胞的发育、增殖、分化及凋亡等过程^[2]。Notch 信号通过受体和相邻细胞的特异性配体结合,经 2 次酶解后释放胞内段(Notch intracellular domain, NICD)激活 Notch 信号通路相关转录因子的表达^[3]。国内、外研究证实 Notch 信号通路将直接作用于成骨细胞及破骨细胞的增殖和分化,在骨质疏松的发生和进展中发挥了重要的调控功能^[4]。

Notch 信号通路和蛋白激酶 A (protein kinase A, *pka*) 参与的丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路相辅相成,在生物进化的过程中发挥着重要的作用。Notch 信号通路在髓核内的表达和活化依赖于其与 MAPK 和核转录因子 kappa B 信号通路的交互作用,进而调控着髓核细胞增殖、分化^[5]。有研究^[6]表明,MAPK 信号通路和 Notch 信号通路相互联系,共同调控骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs) 成骨分化过程。

pka 在诱导间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSCs) 成骨分化方面有着很强的能力。*pka* 活性的增强能够促进成骨分化的基因,抑制破骨基因的表达,从而降低骨质疏松症的发生^[7]。一些研究发现间充质干细胞和成骨细胞中环腺苷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)/PKA 途径的激活导致 NF- κ B 配体 (kappa nuclear factor receptor) 与骨保护素 (osteoprotegerin) 的比例降低,抑制破骨细胞生成^[8]。PKA 可以被甲状腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 诱导激活,进而导致 cAMP 应答元件结合蛋白 (cAMP response element-binding protein, CREB) 磷酸化并激活,从而导致 NF- κ B 配体 (kappa nuclear factor receptor, RANKL) 的生成^[9]。纵观 Notch 分子通路影响多个基因调控骨骼的形成和发展机制为我们认识有关骨骼疾病的分子机制奠定了很好的基础,但目前关于 Notch 信号是否通过调控 *pka* 来影响骨骼的形成并不清楚,因此我们推测 Notch 信号通路可能通过调控 *pka* 进而影响骨细胞的成熟与分化。

在骨骼研究领域人们已经成功建立了许多动物骨骼模型,而新型模式生物斑马鱼则越来越受到人们的关注^[10]。成年斑马鱼骨属性与人类相似,目前已复制出数个成年鱼骨病(如骨质疏松)模型,用于分析病理生理机制和设计新的治疗方案。在细胞水

平上,斑马鱼的成骨细胞和破骨细胞与哺乳动物高度相似。因此,胚胎斑马鱼已被广泛应用于骨组织的发育研究^[11]。成年斑马鱼骨质疏松模型具有易饲养、成本低;给药方法简便,给药浓度可控;大幅度缩短造模及给药干预时间,提高研究效率;分子机制也与人类高度相似的特点。此外,斑马鱼的 *notch1a* 基因与哺乳动物的 *notch1* 高度相似。本研究以斑马鱼为模型,利用双荧光素酶报告基因系统探究 *notch1a* 的胞内段 (N1aICD) 与 *pka* 基因的调控关系,将有助于阐明骨质疏松的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用鱼:实验 AB 品系斑马鱼购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所斑马鱼平台。

1.1.2 实验细胞:实验所用 HEK293T 细胞(人胚肾细胞)由中国人民解放军海军军医大学曹雪涛教授惠赠。

1.1.3 主要试剂:荧光素酶报告基因载体 pGL3-Enhancer 由中国人民解放军海军军医大学曹雪涛教授惠赠, DMEM 培养基 (HyClone, AD24464275), Opti-MEM (gibco, 1894141), 转染试剂 FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, 0000352595), Dual Luciferase Reporter (REASEN, D4901060), 哺乳动物表达载体 p3XFLAG-CMV-7 (SIGMA), 同源重组试剂 2 $\times$ ClonExpress Mix (诺唯赞, C115-02-AA), 小鼠抗 FLAG-tag 单克隆抗体 (YSASEN, 30503ES60), Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, 31430), β -actin, Rabbit pAb (YSASEN, 30102ES40), Peroxidase-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (YSASEN, 33101ES60)。

1.2 实验方法

1.2.1 斑马鱼 *pka* 启动子序列的获得以及转录因子结合位点的分析:运用在线工具 UCSC Genome Browse (<http://www.genome.ucsc.edu>) 预测 *pka* 启动子序列。通过 AliBaba (<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) 分析转录因子的结合位点,通过 Methprimer-Design (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 和 EMBOSS Cpplot (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/) 预测启动子的 CpG 岛。

1.2.2 斑马鱼 *pka* 荧光素酶报告基因载体构建:根据启动子的序列设计的引物, Forward:

GTCGCCGTCTCTGTTCTAT, Reverse: AACCAGCCAACCAGCCTAG。以基因组 DNA 为模板,利用高保真酶进行 PCR 扩增,使用限制性内切酶 *NheI* 和 *XhoI* 对质粒载体 pGL3-Enhancer 和 PCR 纯化产物进行双酶切,将其与 PCR 产物进行纯化。之后将二者用 T4 连接酶连接,并转化至 DH5 α 中,测序并对其进行鉴定。

1.2.3 斑马鱼 *notch1a* 胞内段(N1aICD)真核表达载体的构建:根据 NCBI 网站上登录的斑马鱼 *notch1a* 基因(NM_131441.1)设计引物,Forward: GACAAGCTTGCATGCCTGCAGAACGAACCCAAAAAGAAGAGGA, Reverse: CAGGGATGCCACCCGGGATCCCTACTTGAAGGCTTCTGGAATATGG。以斑马鱼 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。使用限制性内切酶 *Pst* I 和 *Bam*H I 对载体 p3xFLAG-CMV-7 进行双酶切并纯化。纯化之后用同源重组连接酶 2 $\times$ ClonExpress Mix 将其与 p3xFLAG-CMV-7 相连接,产物转化至 DH5 α 中,测序并进行鉴定。

1.2.4 斑马鱼 N1aICD 的蛋白表达分析:将构建好的 pCMV-N1aICD 重组质粒转染至 HEK293T 细胞并提取蛋白。用 BCA 法进行蛋白定量,-20 $^{\circ}$ C 冻存。取 25 μ g 进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,并将蛋白质转至 NC 膜上,过夜封闭,PBST 漂洗滤膜 3 次,每次 5 min,以鼠源 FLAG-tag 抗体为一抗(1:2 000 倍稀释)孵育 3 h,之后 PBST 漂洗滤膜 3 次,每次 5 min,以山羊抗鼠为二抗(1:2 000 倍稀释)孵育 3 h,再用 PBST 漂洗滤膜 3 次,每次 5 min,ECL 显色,发光,检测分析 Western blot 结果。

1.2.5 *pka* 报告基因的活性检测:HEK293T 细胞培养于 10% FBS-DMEM 培养液中。当细胞汇合度达到 70%~80% 时即可转染。参照转染试剂 FuGENE HD Transfection Reagent 的说明书进行转染,之后按不同分组将转染复合物加入到 HEK293T 细胞中(表 1),24 h 后检测报告基因活性。

表 1 *pka* 报告基因表达活性检测实验分组情况

Table 1 Detection of *pka* promoter expression activity

组别	转染质粒及质量
实验组	pGL3- <i>pka</i> 质粒(100 ng), pRL-CMV 内参质粒(10 ng)
对照组	pGL3-Enhancer 质粒(100 ng), pRL-CMV 内参质粒(10 ng)

1.2.6 N1aICD 对 *pka* 启动子转录活性的影响:参照转染试剂 FuGENE HD Transfection Reagent 的说明书进行转染,之后按不同分组将转染复合物加入

到 HEK293T 细胞中(表 2),24 h 后检测荧光素酶活性。

表 2 双荧光素酶报告基因实验分组情况

Table 2 Grouping of double luciferase reporter genes

组别	转染质粒及质量
实验组	pCMV-N1aICD 质粒(100 ng), pGL3- <i>pka</i> 质粒(100 ng), pRL-CMV 内参质粒(10 ng)
对照组	p3xFLAG-CMV 空载质粒(100 ng), pGL3- <i>pka</i> 质粒(100 ng), pRL-CMV 内参质粒(10 ng)

1.3 统计学处理

实验数据利用 GraphPad Prism 6.01 软件进行数据统计,每组各设三个生物学重复和技术重复,两组之间采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *pka* 转录因子结合位点的分析

AliBaba 软件分析启动子上存在 Oct-1、Oct-1 A、AP-1、HNF-1、E1、myogenin、MyoD、NF-kappaB、IK-1、IK-2 等重要的转录因子结合位点(图 1 A)。通过 EMBOSS Cpgplot 和 Methprimer-Design 软件分析,没有发现与转录起始有关的 CpG 岛(图 1B;1C)。

2.2 *pka* 报告基因载体的构建

以斑马鱼的基因组为模板,克隆 *pka* 启动子片段。电泳结果显示,在约 3 000 bp 处出现单一条带(图 2)。测序结果与预测信息比对一致后将 PCR 纯化产物双酶切,然后与双酶切载体 pGL3-Enhancer 连接并测序检验克隆成功。

2.3 N1aICD 真核表达载体的构建

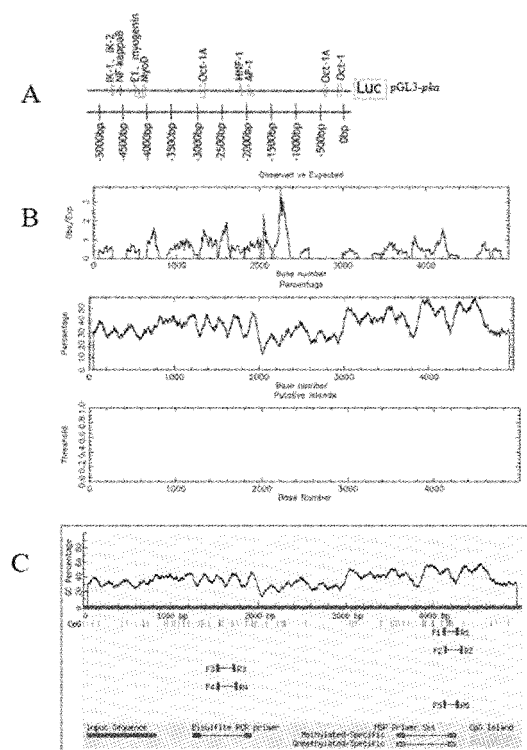
以斑马鱼的 cDNA 为模板,克隆 *notch1a* 基因的胞内段,电泳结果显示,在约 2 000 bp 处出现单一条带(图 3 A)。将纯化后的 PCR 产物与双酶切载体 p3xFLAG-CMV 用同源重组的方式连接,并经测序验证其与预测信息一致。

2.4 Western blot 分析 N1aICD 蛋白的表达情况

为了验证实验组质粒转染 HEK293T 细胞后成功表达 N1aICD 蛋白,我们进行了 Western blot 分析。转染 pCMV-N1aICD 质粒的实验组使用 Flag 抗体出现了明显的特异性条带,而转染 p3xFLAG-CMV 空载质粒的对照组中却未见相关条带,表明实验组有 N1aICD 蛋白的表达(图 3B)。

2.5 *pka* 报告基因的活性检测

将 pGL3-*pka* 重组质粒和 pGL3-Enhancer 空载质粒分别转染 HEK293T 细胞,24 h 后检测启动子活



注:A AliBaba 软件预测的 *pka* 的 5' 调控序列的潜在转录因子结合位点;B EMBOS Cpgplot 软件预测 *pka* 启动子的 CpG 岛;C: Methprimer-Design 软件预测 *pka* 启动子的 CpG 岛。

图 1 斑马鱼 *pka* 启动子转录因子结合位点和 CPG 岛的预测

Fig. 1 Prediction of *pka* promoter transcription factor binding site and CpG island in zebrafish

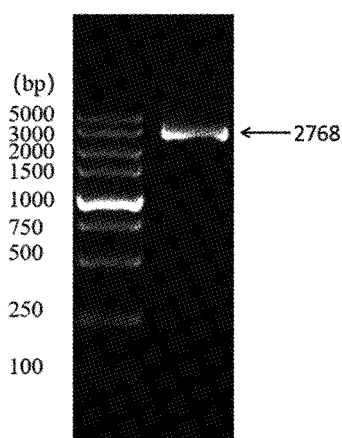
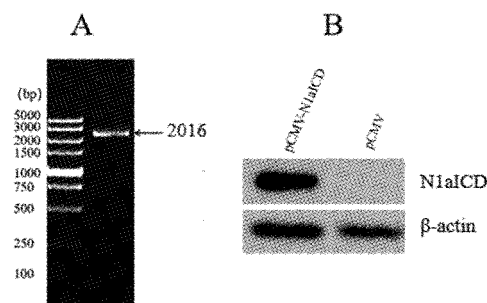


图 2 *pka* 启动子的扩增

Fig. 2 The promoter fragment of *pka*

性。检测结果显示,在 HEK293T 细胞中,实验组活性为对照组的 3.25 倍,两组差异有显著性意义($P=0.0009$)(图 4),说明构建的报告基因在 HEK293T 细胞中具有一定活性。



注:A *notch1a* 基因的胞内段扩增;B Western blot 通过 Flag 标签显示了 N1aICD 蛋白的表达水平。

图 3 *notch1a* 基因的胞内段扩增与 Western blot 分析 N1aICD 蛋白的表达

Fig. 3 Intracellular amplification of *notch1a* and western blot analysis the expression of N1aICD

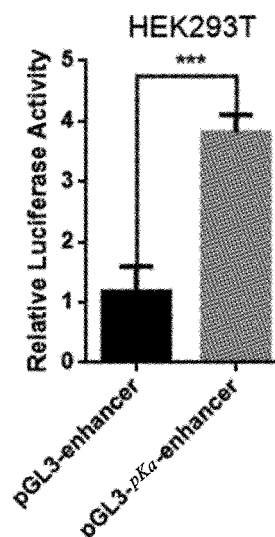


图 4 重组质粒 pGL3-*pka* 转染 HEK293T 细胞后荧光素酶相对表达量

Fig. 4 Luciferase relative expression of recombinant plasmid pGL3-*pka* after transfecting HEK293T

2.6 N1aICD 对 *pka* 启动子转录活性的影响

pGL3-*pka* 及 pRL-CMV 内参质粒和 pCMV-N1aICD 共转染至 HEK293T 细胞中,对照组则转染 p3×FLAG-CMV 空载。荧光素酶报告基因活性检测显示,实验组的荧光素酶活性是对照组的 0.31 倍,两组差异具有统计学意义($P=0.0020$)(图 5),说明 *notch1a* 胞内段对 *pka* 启动子具有明显的抑制作用。

3 讨论

骨骼生长和修复是通过骨重塑实现的,正常的

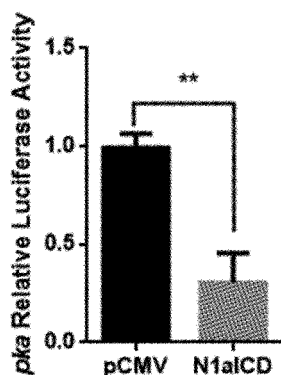


图 5 在 HEK293T 细胞中验证 N1aICD 对 *pka* 启动子转录活性的影响

Fig.5 Verify the effect of N1aICD on the transcriptional activity of *pka* promoter in HEK293T cells

骨重塑使骨量保持平衡,这基于骨形成和骨吸收过程之间的动态平衡^[12]。斑马鱼骨质疏松模型相比于其他模式生物具有特殊的优点,已被广泛用于骨骼发育及相关疾病机制的研究与治疗^[13]。然而因缺乏抗体和细胞系,在研究具体的分子机制方面仍存在瓶颈,因此以斑马鱼为研究模型找到一种简单而又可行的方法,深入研究基因的功能就显得格外重要。双荧光素酶报告基因实验已成为研究转录因子参与基因调控的有效手段,可以在最大程度上减小细胞活性和转染效率等外在因素对实验的影响,使得数据结果更为可信。因此正确构建报告基因系统可对目的基因所具备的功能及其所参与的信号通路提供有力的研究工具。

本研究利用 AliBaba 在线分析发现 *pka* 启动子上存在 Oct-1、Oct-1 A、AP-1、HNF-1、E1、myogenin、MyoD、NF- κ B、IK-1、IK-2 等重要的转录因子结合位点。有研究证实 AP-1 在废用性骨质疏松破骨细胞分化方面有着重要影响^[14]。

Notch 信号通路和 *pka* 基因在骨细胞的分化和成熟中有着重要的作用。在成骨细胞分化方面,为了探究 Notch 信号通路对 *pka* 基因的调控作用,本文构建了斑马鱼 *notch1a* 基因胞内段的真核表达载体和 *pka* 启动子的报告基因载体,为今后探究 *pka* 基因的表达调控提供了基础,同时实验也通过双荧光素酶报告基因系统证明了斑马鱼 N1aICD 对 *pka* 基因的转录抑制效率达到 69.44%,初步揭示了 Notch 信号通路和 *pka* 之间的调控作用,并可能为探究不同信号途径在骨吸收和骨形成中的相互作用提出新证据。

在小鼠的研究中发现 Notch1 通过直接作用于

破骨细胞前体并间接作用于成骨细胞而抑制破骨细胞分化,破骨细胞前体中 Notch1 的基因缺失增强了破骨细胞生成。N1ICD 在成骨细胞中的过度表达会导致骨质疏松症的表型^[15]。研究表明,*pka* 信号通路的激活可以提高 runt 相关转录因子 2 (Runx2) 的稳定性和活性,促进成骨细胞分化^[16]。骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 通过依赖 PKA 机制来抑制盐诱导激酶 1 (salt-inducible kinase 1, SIK1) 的表达和 SIK1 活性,从而刺激成骨作用^[17]。但是对斑马鱼骨骼形成的研究中主要集中在单通路的调控机制方面,其两个甚至多个通路之间的调控作用的研究却处于初级阶段。所以本研究克隆了斑马鱼 N1aICD 胞内段和 *pka* 启动子,通过双荧光素酶报告基因系统更直观地证明了 N1aICD 胞内段对 *pka* 基因的转录抑制效率达到 69.44%。

我们的研究结果表明斑马鱼 *notch1a* 分子过表达负向调控 *pka* 的表达。而 *pka* 参与的 MAPK 信号通路与 Notch 通路相互作用,共同调控斑马鱼成骨细胞及破骨细胞的分化,为鱼类骨骼发育机制的研究提供崭新的认识,对人类骨骼疾病的分子机制提供一定的借鉴意义,但详细机制有待今后深入研究。

【参 考 文 献】

- [1] Hosking SM, Dobbins AG, Ju LA. Knowledge change regarding osteoporosis prevention: translating recommended guidelines into user-friendly messages within a community forum [J]. BMC Res Notes, 2015, 8(1): 1-5.
- [2] Bicker Frank, Vasic Verica, Horta Guilherme, et al. Neurovascular EGFL7 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone and thereby affects olfactory perception [J]. Nat Commun, 2017, 8: 15922.
- [3] Sainson Richard CA, Harris Adrian L. Hypoxia-regulated differentiation: let's step it up a Notch [J]. Trends Mol Med, 2006, 12: 141-143.
- [4] 张一奇, 刘子云, 付勤. Notch 通路在骨疾病领域的研究进展 [J]. 解剖科学进展, 2018, 24(4): 411-414.
- [5] 钟远鸣, 梁梓扬, 何嘉, 等. Notch 信号通路在退变的髓核细胞: 在修复重建中的作用与角色 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(20): 3256-3262.
- [6] 冯倩, 曾祥伟, 杨瑞, 等. 骨髓间充质干细胞成骨分化相关信号通路及其与 BMP-2 关系的研究进展 [J]. 山东医药, 2017, 57(48): 97-99.
- [7] 韩宁, 郭晏华, 于艳. 补骨脂素介导 cAMP/PKA/CREB 信号通路调控促进骨髓 MSC 成骨分化作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1597-1600.
- [8] Xie Weixin, Li Fan, Han Yi, et al. Neuropeptide Y1 receptor antagonist promotes osteoporosis and microdamage repair and enhances osteogenic differentiation of bone marrow stem cells via

- cAMP/PKA/CREB pathway [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12: 8120-8136.
- [9] Xiang Li-Xin, Ran Qian, Chen Li, et al. CR6-interacting factor-1 contributes to osteoclastogenesis by inducing receptor activator of nuclear factor κ B ligand after radiation [J]. World J Stem Cells, 2020, 12: 222-240.
- [10] 杨国柱, 段涛, 卢丽, 等. 桃红四物汤对泼尼松诱导斑马鱼骨质疏松的治疗作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(8): 1007-1010, 1021.
- [11] 尹恒, 王建伟, 马勇, 等. 斑马鱼动物模型在骨骼疾病研究中的应用现状分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(8): 1097-1102.
- [12] Salamanna Francesca, Maglio Melania, Borsari Veronica, et al. Peripheral blood mononuclear cells spontaneous osteoclastogenesis: mechanisms driving the process and clinical relevance in skeletal disease [J]. J Cell Physiol, 2016, 231: 521-530.
- [13] Marc A, Egerman, Samuel M, et al. GDF11 increases with age and inhibits skeletal muscle regeneration [J]. Cell Metabol, 2015, 22: 164-174.
- [14] 马涛, 贾磊, 苏红燕. 运动对废用性骨质疏松大鼠破骨细胞分化 JNK/AP-1 信号通路的影响 [J]. 西安体育学院学报, 2017, 34(5): 599-606+640.
- [15] Park Kwang Hwan, Choi Yoorim, Yoon Dong Suk, et al. Zinc promotes osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells via activation of the cAMP-PKA-CREB signaling pathway [J]. Stem Cells Dev, 2018, 27: 1125-1135.
- [16] Han Younho, Jin Yifeng, Lee Sung Ho, et al. Berberine bioisostere Q8 compound stimulates osteoblast differentiation and function in vitro [J]. Pharmacol Res, 2017, 119: 463-475.
- [17] Kim Min Kyung, Kwon Jun-Oh, Song Min-Kyoung, et al. Salt-inducible kinase 1 regulates bone anabolism via the CRTCL-CREB-Id1 axis [J]. Cell Death Dis, 2019, 10: 826.
- (收稿日期: 2020-04-09; 修回日期: 2020-07-14)

(上接第 491 页)

- [7] Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Autophagy in bone: Self-eating to stay in balance [J]. Ageing Res Rev, 2015, 24(9): 206-217.
- [8] Nolan J Hoffman, Jamie Whitfield, Natalie R Janzen, et al. Genetic loss of AMPK-glycogen binding destabilises AMPK and disrupts metabolism [J]. Mol Metab, 2020, 41: 101048.
- [9] Steinberg GR, Carling D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(7): 527-551.
- [10] Ma Y, Qi M, An Y, et al. Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging [J]. Aging Cell, 2018, 17(1): 903-915.
- [11] Everts-Graber J, Reichenbach S, Ziswiler HR, et al. A Single infusion of zoledronate in postmenopausal women following denosumab discontinuation results in partial conservation of bone mass gains [J]. J Bone Miner Res, 2020, 35(7): 1207-1215.
- [12] 史传道, 姚艺豪, 陈志辉, 等. 抗疏健骨颗粒治疗原发性骨质疏松症 40 例 [J]. 河南中医, 2016, 36(1): 169-170.
- [13] 史传道, 张快强, 贾文鹏. 抗疏健骨颗粒治疗原发性骨质疏松症 54 例 [J]. 陕西中医, 2005, 26(8): 763-764.
- [14] 陈奇. 中药药理研究方法学 (第 2 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [15] Xu X, Zhang C, Trotter TN, et al. Runx2 deficiency in osteoblasts promotes myeloma progression by altering the bone microenvironment at new bone sites [J]. Cancer Res, 2020, 80(5): 1036-1050.
- [16] Miller PD, Pannacciulli N, Malouf-Sierra J, et al. Efficacy and safety of denosumab vs. bisphosphonates in postmenopausal women previously treated with oral bisphosphonates [J]. Osteoporos Int, 2020, 31(1): 181-191.
- [17] 曹盼举, 张晓刚, 于海洋, 等. 基于 OPG/RANK/RANKL 信号轴探讨中医“瘀证”与骨质疏松症之间的关系 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(1): 114-117.
- [18] Dan Sun, Fanghao Cao, Lili Cong, et al. Cellular heterogeneity identified by single-cell alkaline phosphatase (ALP) via a SERRS-microfluidic droplet platform [J]. Lab Chip, 2019, 19(2): 335-342.
- [19] 徐志平, 卞龙艳, 闻纯. 防己诺林碱对糖皮质激素诱导雄性骨质疏松大鼠影响的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(3): 323-327.
- [20] Zhang Yang, Lin Tonghui, Lian Na, et al. Hop2 Interacts with ATF4 to Promote Osteoblast Differentiation [J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(12): 2287-2300.
- (收稿日期: 2020-09-16; 修回日期: 2020-11-23)