

基于 miR-146a-5p/Notch1 信号通路探讨补肾壮筋汤对骨质疏松小鼠骨密度及成骨分化的影响

杨 彬¹, 程 韶^{2,3*}, 杨 顺¹, 许俊杰³, 陶广义³, 王上增^{2,3}

1. 河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)疼痛科, 河南 郑州 450053

2. 河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)关节病科, 河南 郑州 450053

3. 河南中医药大学 骨伤学院, 河南 郑州 450046

摘 要: 目的 基于 miR-146a-5p/Notch1 信号通路探究补肾壮筋汤(BZD)对骨质疏松小鼠骨密度及成骨分化的影响。方法 采用地塞米松诱导的方法构建小鼠骨质疏松症模型, 造模成功 60 只小鼠, 将其随机分为模型组, BZD 低、高剂量(5.4、10.8 g·kg⁻¹)组, BZD+agomir NC(10.8 g·kg⁻¹+8 mg·kg⁻¹)组, BZD+miR-146a-5p agomir(10.8 g·kg⁻¹+8 mg·kg⁻¹)组, 每组 12 只。另取 12 只小鼠正常饲养, 记为对照组。造模成功后开始 ig BZD, 每天 1 次, 连续 8 周; agomir NC、miR-146a-5p agomir 采用尾 iv 给药, 隔天给药, 共 8 周。给药结束后测定小鼠骨密度和骨结构参数: 骨矿物质含量(BMC)、骨矿物质密度(BMD)、总体积(TV)、骨体积(BV)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)和骨小梁分离度(Tb.Sp); 酶联免疫吸附试验(ELISA)检查小鼠血清骨代谢指标: 骨钙素(OCN)、骨源性碱性磷酸酶(BALP)、I型前胶原羧基端前肽(PINP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(Trap); HE 染色观察小鼠骨组织的结构变化; 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法测定小鼠股骨组织 miR-146a-5p、Notch1 mRNA 的表达水平。Western blotting 检查小鼠股骨组织 Notch1 蛋白表达水平。从 Balb/c 小鼠中分离骨髓间充质干细胞(BMSCs)并诱导成骨分化, 分为对照组, 模型组(1×10⁻⁵ mol·L⁻¹地塞米松处理 48 h), BZD 低、高浓度组(造模后用 100、200 μg·mL⁻¹ BZD 处理 48 h), BZD+agomir NC 组(造模后用 200 μg·mL⁻¹ BZD 和转染 agomir NC 处理 48 h), BZD+miR-146a-5p agomir 组(造模后用 200 μg·mL⁻¹ BZD 和转染 miR-146a-5p agomir 处理 48 h)。CCK-8 实验检测细胞增殖, ALP 染色和茜素红染色分析细胞成骨分化, qRT-PCR 测定细胞 miR-146a-5p 及 Notch1 mRNA 表达, Western blotting 检查细胞成骨标志蛋白及 Notch1 蛋白表达, 双荧光素酶实验检测 miR-146a-5p 及 Notch1 的相互作用。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠 BMC、BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 水平, 血清 BALP、PINP 水平, 股骨组织 Notch1 mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P<0.05$); Tb.Sp 水平, 血清 OCN、Trap 水平, 股骨组织 miR-146a-5p 水平显著升高($P<0.05$); 骨小梁数量减少, 间隙变宽, 出现断裂, 骨陷窝增大。与模型组比较, BZD 高剂量组小鼠相关指标变化与上述相反($P<0.05$), 且过表达 miR-146a-5p 抑制了 BZD 对骨质疏松小鼠的上述改善作用。体外研究结果显示, 与对照组比较, 模型组 BMSCs 的活力, 相对 ALP 活力, 茜素红阳性染色面积比例, ALP、OCN、Runx2、Osterix 蛋白及 Notch1 mRNA 和蛋白表达显著降低, miR-146a-5p 表达显著增高($P<0.05$); 与模型组比较, BZD 高剂量组细胞中的上述指标均呈相反变化($P<0.05$), 且过表达 miR-146a-5p 逆转了高剂量 BZD 对小鼠 BMSCs 的上述作用。荧光素酶实验发现, Notch1 是 miR-146a-5p 的直接靶点, 且被 miR-146a-5p 负调控。**结论** BZD 可能通过下调 miR-146a-5p/Notch1 信号通路促进 BMSCs 成骨分化, 提高骨质疏松小鼠的骨密度。

关键词: 补肾壮筋汤; 骨质疏松; miR-146a-5p/Notch1 信号通路; 骨密度; 成骨分化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)01-0073-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.01.007

Exploring effect of Bushen Zhuangjin Decoction on bone density and osteogenic differentiation in osteoporosis mice based on miR-146a-5p/Notch1 signaling pathway

YANG Bin¹, CHENG Shao^{2,3}, YANG Shun¹, XU Junjie³, TAO Guangyi³, WANG Shangzeng^{2,3}

收稿日期: 2024-07-03

基金项目: 河南省自然科学基金青年项目(232300420269); 2023 年度河南省中医药科学研究专项课题重大专项(2023ZYZD06); 河南省高等学校重点科研项目(24A360002)

作者简介: 杨 彬, 硕士研究生, 副主任中医师, 主要从事脊柱及骨关节相关疾病的保守治疗。E-mail: yangbinhzy@163.com

*通信作者: 程 韶, 博士研究生, 主要从事中医药治疗慢性筋骨疾病。E-mail: chengshao4476@163.com

1. Department of Pain, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine (the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine), Zhengzhou 450053, China
2. Department of Arthropathy, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine (the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine), Zhengzhou 450053, China
3. College of Bone Injury, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Bushen Zhuangjin decoction (BZD) on bone density and osteogenic differentiation in osteoporosis mice based on the miR-146a-5p/Notch1 signaling pathway. **Methods** A mouse model of osteoporosis was constructed using dexamethasone induction, and 60 mice were successfully modeled. They were randomly divided into model groups, BZD low and high dose ($5.4, 10.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups, BZD+agomir NC ($10.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} + 8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and BZD+miR-146a-5p agomir ($10.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} + 8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, with 12 mice in each group. Another 12 mice were taken from normal feeding and designated as the control group. After successful modeling, start ig BZD once a day for 8 consecutive weeks; agomir NC and miR-146a-5p agomir were administered via tail vein injection every other day for a total of eight weeks. After administration, the bone density and structural parameters of the mice were measured, including bone mineral content (BMC), bone mineral density (BMD), total volume (TV), bone volume (BV), bone volume fraction (BV/TV), trabecular number (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th), and trabecular separation/spacing (Tb.SP). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to examine serum bone metabolism indicators in mice, including osteocalcin (OCN), bone alkaline phosphatase (BALP), N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP), and tartrate acid-resistant phosphatase (Trap). HE staining was applied to observe structural changes in bone tissue. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was applied to determine the expression levels of miR-146a-5p and Notch1 mRNA in femoral tissue. Western Blot was applied to examine the expression level of Notch1 protein in mouse femoral tissue. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated from Balb/c mice, induced osteogenic differentiation, and then divided into control group, model group (treated with $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dexamethasone for 48 h), BZD low and high concentration groups (treated with 100 and $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BZD after modeling for 48 h), BZD+agomir NC group (treated with $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BZD and transfected agomir NC after modeling for 48 h), BZD+miR-146a-5p agomir group (treated with $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BZD and transfected miR-146a-5p agomir after modeling for 48 h). Cell proliferation was detected by CCK-8 assay, cell osteoblastic differentiation was analyzed by ALP and alizarin red staining, the expression of miR-146a-5p and Notch1 mRNA were determined by RT-qPCR, and the expression of osteoblastic marker protein and Notch1 protein were detected by Western Blot. The interaction between miR-146a-5p and Notch1 was detected by dual luciferase assay. **Results** Compared with the control group, the BMC, BMD, BV/TV, Tb.N, Tb.Th levels, serum BALP, PINP levels, and Notch1 mRNA and protein expression levels in the femur tissue of mice in Model group were obviously lower ($P < 0.05$), the Tb.SP level, serum OCN, Trap levels, and miR-146a-5p level in femoral tissue were obviously higher ($P < 0.05$), the number of bone trabeculae decreased, gaps widen, fractures occurred, and bone lacunae increased. Compared with the Model group, the changes in relevant indicators of mice in the BZD high dose group were opposite to the above ($P < 0.05$). Overexpression of miR-146a-5p inhibited the increase of bone density in osteoporotic mice induced by BZD. *In vitro* study results showed that compared with control group, cell vitality, relative ALP activity, alizarin red positive staining area ratio, the expression of ALP, OCN, Runx2, Osterix protein and Notch1 mRNA and protein of BMSCs in model group were significantly decreased the expression of miR-146a-5p was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the above indexes were inversely expressed in BZD high dose group ($P < 0.05$). Overexpression of miR-146a-5p reversed the promoting effect of high dose BZD on proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs in mice ($P < 0.05$). The luciferase assay found that Notch1 was a direct target of miR-146a-5p and was negatively regulated by miR-146a-5p. **Conclusion** BZD may promote osteogenic differentiation of BMSCs by down-regulating miR-146a-5p/Notch1 signaling pathway and increase bone density in osteoporosis mice.

Key words: Bushen Zhuangjin Decoction; osteoporosis; miR-146a-5p/Notch1 signaling pathway; bone density; osteogenic differentiation

随着社会人口老龄化的发展,骨质疏松成为常见疾病。骨质疏松症是由于多种因素导致全身骨量减少,骨微结构损伤、骨密度和韧性降低,骨强度变小的一种骨科病,是中老年致残的主要原因^[1-3]。

临床治疗骨质疏松症有双膦酸盐、甲状旁腺激素等药物,能一定程度发挥疗效,但有相关报道这些药物可能导致严重并发症^[4-5]。因此,寻找治疗骨质疏松症新的安全有效药物是迫切需要的。补肾壮筋汤

(Bushen Zhuangjin Decoction, BZD) 记载于清代钱秀昌所著的《伤科补要》，是骨质疏松、骨关节炎、风湿性关节炎等疾病的治疗名方。BZD 由熟地黄、山茱萸、续断、杜仲、五加皮、茯苓、青皮、白芍、当归、牛膝组成，具有补肝益肾、强壮筋骨的功效^[6]。中医认为肾虚是引发骨质疏松的主要原因，治疗骨质疏松的关键在于补肾^[7]。但关于 BZD 对于骨质疏松的治疗机制研究还较少。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度为 20~24 个核苷酸的非编码 RNA，能通过影响 RNA 的稳定性和翻译过程，调控多种基因的转录^[8]。miR-146a-5p 是一种重要的 miRNA，与类风湿性关节炎、骨关节炎、骨肉瘤、肥胖、癌症等多种疾病相关^[9]。有研究发现 miR-146a 对骨形成和成骨细胞的增殖具有重要的影响^[10]。据报道，Notch1 表达异常可能会引发多种骨骼疾病^[11]。但 BZD 是否能够通过调控 miR-146a-5p/Notch1 信号通路参与骨质疏松症的发展还尚不明确。因此，本研究建立骨质疏松症小鼠模型，基于 miR-146a-5p/Notch1 信号通路探究 BZD 对于骨质疏松小鼠骨密度及成骨分化的影响。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 Balb/c 小鼠，雌性，体质量 18~22 g，购自山东绿叶制药有限公司，实验动物生产许可证号为 SYXK (鲁) 2023-0017。实验前所有小鼠饲养于室温 20~25 °C，相对湿度 40%~60% 的通风实验室。本实验已得到河南省中医院动物伦理委员会批准实施 (审批号：HNSZYWZ-2023002021)。

1.2 药物、主要试剂与仪器

BZD 组方药材熟地黄 12 g、山茱萸 12 g、杜仲 10 g、续断 12 g、五加皮 10 g、当归 12 g、白芍 10 g、茯苓 12 g、青皮 5 g、牛膝 10 g 由河南省中医院药剂科提供，且经药剂科高松鉴定符合《中国药典》2020 年版要求。BZD 组方中各药材按上述质量称取，研成粉末，加入适量纯水，药材粉末与纯水质量体积比为 1:100，水煎浓缩，并用纯水调节药物质量浓度至生药 1 g·mL⁻¹。经 HPLC 法鉴定，BZD 中梓醇、橙皮苷、莫诺苷、芍药苷和松脂醇二葡萄糖苷质量分数分别为 5.001 0、4.598 0、1.034 0、0.422 4、0.077 2 mg·g⁻¹^[12]。地塞米松 (质量分数 99%，批号 50-02-2) 购自南京尚书生物科技有限公司；骨钙素 (OCN)、骨源性碱性磷酸酶 (BALP)、I 型前胶原羧基端前肽 (PINP)、抗酒石酸酸性磷酸

酶 (Trap) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自广州博辉生物有限公司；碱性磷酸酶 (ALP) 染色试剂盒及茜素红染色试剂盒购自上海碧云天生物公司；RIPA 裂解液、HE 染色试剂盒购自上海信裕生物有限公司；miR-146a-5p 激动剂 (agomir)、agomir NC 购自美国 Sigma 公司；Notch1、ALP、OCN、人 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2)、成骨相关转录因子 (Osterix)、GAPDH 一抗和相应二抗购自美国 Abcam 公司；逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司。Micro-CT 成像系统 (vivaCT 40) 购自瑞士 Scanco Medical 公司。

2 方法

2.1 骨质疏松症小鼠模型的建立

参考文献报道^[13]，采用地塞米松诱导小鼠骨质疏松症模型。随机选取 60 只小鼠，sc 40 mg·kg⁻¹ 地塞米松，每天 1 次，连续给药 35 d。

2.2 动物分组与给药

造模成功 60 只小鼠，将其随机分为模型组，BZD 低、高剂量 (5.4、10.8 g·kg⁻¹)^[14]组，BZD+agomir NC (10.8 g·kg⁻¹+8 mg·kg⁻¹) 组，BZD+miR-146a-5p agomir (10.8 g·kg⁻¹+8 mg·kg⁻¹)^[15]组，每组 12 只。另取 12 只小鼠正常饲养，作为对照组。造模成功后各给药组开始 ig 给予 BZD，每天 1 次，连续给药 8 周。Agomir NC、miR-146a-5p agomir 采用尾 iv 给药，隔天给药，共 8 周。对照组与模型组 ig 与尾 iv 等量的 0.9% 氯化钠溶液。BZD 低、高剂量组小鼠尾 iv 等量的 0.9% 氯化钠溶液。

2.3 取材及小鼠骨密度和骨结构参数测定

末次给药后，小鼠断头取血 2 mL，于 4 °C 放置 4 h 后，离心，取其上清液即为小鼠血清，放置于 -20 °C 备用。解剖分离出小鼠右侧小腿骨组织和肌肉，取胫骨，置于甲醛中固定。24 h 后，采用 Micro-CT 成像系统扫描胫骨，扫描完成后进行三维重建，利用 Scanco Medical Version 6.0 软件进行骨组织微结构分析。检测的骨密度参数包括：骨矿物质含量 (BMC)、骨矿物质密度 (BMD)；测定的骨结构参数包括：总体积 (TV)、骨体积 (BV)、骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁厚度 (Tb.Th) 和骨小梁分离度 (Tb.Sp)。

2.4 ELISA 法测定小鼠血清骨代谢指标

取“2.3”项中冻存的小鼠血清，根据血清 OCN、BALP、PINP、Trap ELISA 试剂盒说明书的检测方法，检测小鼠血清骨代谢指标的水平。

2.5 HE 染色观察小鼠骨组织结构的变化

每组随机选取 6 只小鼠,取左侧完整股骨,经 4%多聚甲醛固定。对股骨组织进行脱钙和脱水处理,进行石蜡包埋和切片机切片,制备约 5 μm 厚的组织切片。切片用二甲苯脱蜡、水化,使用 HE 染色试剂盒对其进行染色,最后封片,在光镜下观察小鼠骨组织的结构变化。每组剩余 6 只小鼠的左侧股骨组织冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法测定小鼠股骨组织 *miR-146a-5p*、*Notch1* mRNA 的表达水平

取“2.5”项中冻存的小鼠股骨组织,用 Trizol 试剂提取组织总 RNA。经反转录为 cDNA 后进行扩增,操作按照试剂盒说明书进行。引物序列设计如表 1 所示。以 U6、GAPDH 为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算小鼠股骨组织 *miR-146a-5p*、*Notch1* mRNA 的相对表达量。

表 1 引物设计序列

Table 1 Primer design sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>miR-146a-5p</i>	上游: TGAGAACTGAATTCCATGGGTT 下游: CCCATGGAATTCAGTTCTCATTT
<i>Notch1</i>	上游: GAGGCGTGGCAGACTATGC 下游: CTTGTACTCCGTCAGCGTGA
U6	上游: CAAGGATGACACGCAAA 下游: TCAACTGGTGTCTCGTG
GAPDH	上游: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC 下游: TGGTGAAGACGCCAGTGGAA

2.7 Western blotting 检查小鼠股骨组织 *Notch1* 蛋白表达水平

取“2.5”项中冻存的小鼠股骨组织并提取蛋白,BCA 法进行蛋白定量,蛋白质进行电泳,湿法转移至 PVDF 膜上,封闭 2 h,加入 *Notch1* 一抗稀释液 (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,次日加入相应二抗稀释液 (1:5 000) 在室温下孵育 2 h, ECL 显影,以 GAPDH 为内参,分析目标蛋白的灰度值。

2.8 分离培养和鉴定小鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs)

采用颈椎脱位法处死 Balb/c 小鼠,灭菌后浸泡于 75%乙醇中 5~10 min,无菌条件下分离股骨和胫骨,切成体积小于 3 mm^3 的小块。用红细胞裂解液裂解红细胞,离心后将碎片重悬于培养基中,接种于培养瓶中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% O_2 、湿度饱和的培养箱中。每次细胞在培养瓶中形成一定数量的菌落时传代。采用 APC-CD90、FITC-CD105、

FITC-CD45 和 PE-CD11b 将培养的第 3 代细胞进行流式分选,采用 Beckman 流式细胞仪分析细胞 CD90、CD105、CD45 和 CD11b 表达。

2.9 BMSCs 的成骨分化诱导及细胞分组与干预

将 BMSCs 接种到 6 孔板中,采用含 10%胎牛血清、1% *L*-谷氨酰胺、1%双抗、0.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗坏血酸、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -磷酸甘油和 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松的高糖 MEM 培养基诱导成骨分化。

诱导后的 BMSCs 在 DMEM (含 10%胎牛血清、1%双抗) 中培养至融合度为 90%,将其接种在 96 孔板 (每孔 4×10^5 个),分为对照组 [磷酸盐缓冲液 (PBS) 处理],模型组 ($1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松处理 48 h),BZD 低、高浓度组 (先用 $1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松处理 48 h,再用 100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BZD^[16]处理 48 h)、BZD+agomir NC 组 (先用 $1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松处理 48 h,再用 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BZD 和转染 agomir NC 处理 48 h)、BZD+*miR-146a-5p* agomir 组 (先用 $1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松处理 48 h,再用 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BZD 和转染 *miR-146a-5p* agomir 处理 48 h)。利用 Lipofectamine 3000 将 agomir NC 和 *miR-146a-5p* agomir 转染至细胞中 48 h。

2.10 CCK-8 实验检测细胞增殖

诱导后的 BMSCs 接种于 96 孔板 (每孔 4×10^5 个),依据“2.9”项的分组方法进行处理,在 24、48、72 h 分别加入 10 μL CCK-8 溶液。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗中孵育 2 h,利用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度 (*A*) 值。

2.11 ALP 染色和茜素红染色分析细胞成骨分化

ALP 染色: BMSCs 经“2.9”项的方法诱导分化和分组处理后,在成骨诱导第 7 天用 ALP 染色液染色。在显微镜下观察染色结果,并拍摄代表性图像。使用 Image J 软件分析染色区域的 *A* 值,并将其归一化为对照组。

茜素红染色: BMSCs 经“2.9”项的方法诱导分化和分组处理后,在成骨诱导第 21 天后,加入 60%异丙醇固定细胞 60 s, PBS 洗涤 2 min。再用 10%茜素红染料染色 10 min, PBS 洗涤 3 次。丢弃液体,用光学显微镜观察并采集图像。使用 Image J 软件分析茜素红阳性染色面积比例。

2.12 qRT-PCR 测定细胞 *miR-146a-5p* 及 *Notch1* mRNA 表达

BMSCs 经“2.9”项的方法诱导分化和分组处理后,收集细胞,采用“2.6”项中方法检测 *miR-146a-5p* 及 *Notch1* mRNA 表达。

2.13 Western blotting 检查细胞成骨标志蛋白及 Notch1 蛋白表达

BMSCs 经“2.9”项的方法诱导分化和分组处理后,收集细胞,采用“2.7”项的方法检测 ALP、OCN、Runx2、Osterix 及 Notch1 蛋白表达。

2.14 双荧光素酶实验检测 miR-146a-5p 及 Notch1 的相互作用

基于 psiCheck-2 构建野生型和突变型 Notch1 3'UTR 荧光素酶报告载体,命名为 Notch1-WT/MUT。报告载体与 agomir NC/miR-146a-5p agomir 共转染 BMSCs,随后测定荧光素酶活性。

2.15 统计学处理

数据采用 GrapahPad Prism 7.0 进行统计分析,

以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较行 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 BZD 对小鼠骨密度参数的影响

如表 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠 BMC、BMD 显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较,BZD 高剂量组小鼠 BMC、BMD 显著升高 ($P<0.05$)。与 BZD + agomir NC 组比较,BZD + miR-146a-5p agomir 组小鼠 BMC、BMD 显著降低 ($P<0.05$)。

3.2 BZD 对小鼠骨结构参数的影响

如图 1、表 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 水平显著降低 ($P<0.05$),Tb.Sp 水平显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,

表 2 各组小鼠骨密度参数的比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BMC/g	BMD/(mg·cm ⁻³)
对照	—	0.84±0.08	189.38±19.88
模型	—	0.30±0.03*	80.54±12.30*
BZD	5.4	0.32±0.03	83.66±11.79
	10.8	0.73±0.07#	163.24±18.49#
BZD+agomir NC	10.8+0.008	0.72±0.07	161.03±17.60
BZD+miR-146a-5p agomir	10.8+0.008	0.52±0.05△	116.89±13.36△

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与 BZD+agomir NC 组比较: △ $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; △ $P<0.05$ vs BZD+agomir NC group.

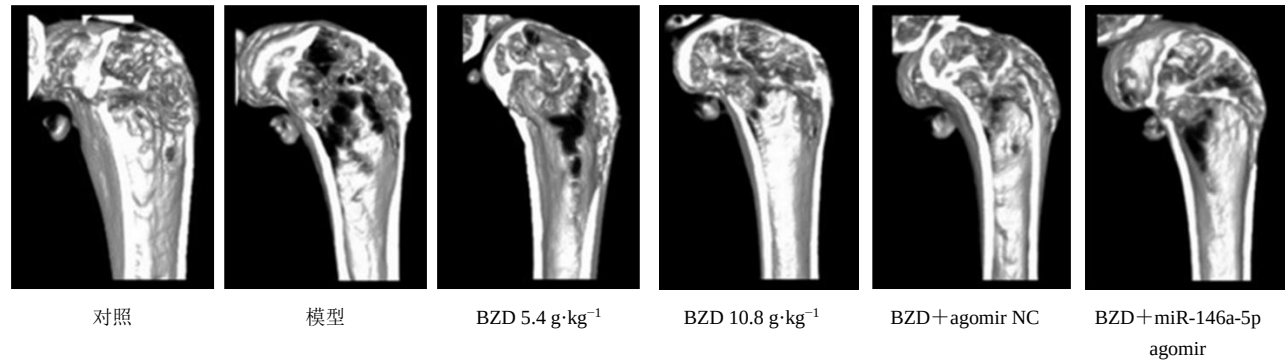


图 1 各组小鼠骨组织 Micro-CT 影像图像 (×10 000)

Fig. 1 Micro-CT images of bone tissue in each group of mice (×10 000)

表 3 各组小鼠骨结构参数的比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BV/TV/%	Tb.N/mm ⁻¹	Tb.Th/mm	Tb.Sp/mm
对照	—	36.55±2.40	3.46±0.39	0.14±0.03	0.61±0.09
模型	—	17.26±1.88*	1.30±0.19*	0.05±0.02*	0.89±0.12*
BZD	5.4	18.35±2.13	1.33±0.14	0.05±0.01	0.88±0.11
	10.8	31.68±1.89#	2.95±0.32#	0.12±0.01#	0.65±0.07#
BZD+agomir NC	10.8+0.008	30.94±2.56	2.90±0.34	0.12±0.03	0.66±0.09
BZD+miR-146a-5p agomir	10.8+0.008	21.20±1.45△	1.65±0.18△	0.07±0.01△	0.82±0.09△

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与 BZD+agomir NC 组比较: △ $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; △ $P<0.05$ vs BZD+agomir NC group.

BZD 高剂量组小鼠 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 水平显著升高 ($P<0.05$), Tb.Sp 水平显著降低 ($P<0.05$)。与 BZD+agomir NC 组比较, BZD+miR-146a-5p agomir 组小鼠 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 水平显著降低 ($P<0.05$), Tb.Sp 水平显著升高 ($P<0.05$)。

3.3 BZD 对小鼠血清骨代谢指标的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清

OCN、Trap 水平显著升高 ($P<0.05$), BALP、PINP 水平显著下降 ($P<0.05$)。与模型组比较, BZD 高剂量组小鼠血清 OCN、Trap 水平显著下降 ($P<0.05$), BALP、PINP 水平显著升高 ($P<0.05$)。与 BZD + agomir NC 组比较, BZD + miR-146a-5p agomir 组小鼠血清 OCN、Trap 水平显著升高 ($P<0.05$), BALP、PINP 水平显著下降 ($P<0.05$)。

表 4 各组小鼠血清骨代谢指标的比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Comparison of serum bone metabolism indexes of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	OCN/(μg·L ⁻¹)	BALP/(U·L ⁻¹)	PINP/(ng·mL ⁻¹)	Trap/(U·L ⁻¹)
对照	—	1.22±0.14	273.64±19.55	13.13±1.89	11.13±1.94
模型	—	1.97±0.21 [*]	225.16±17.43 [*]	4.35±0.79 [*]	26.65±3.10 [*]
BZD	5.4	1.95±0.20	227.58±18.22	4.39±0.84	25.23±3.02
	10.8	1.36±0.15 [#]	264.19±23.70 [#]	11.68±1.56 [#]	14.08±1.87 [#]
BZD+agomir NC	10.8+0.008	1.37±0.16	262.44±28.12	11.60±1.45	14.14±1.95
BZD+miR-146a-5p agomir	10.8+0.008	1.86±0.19 ^Δ	237.36±17.62 ^Δ	6.22±0.92 ^Δ	22.88±2.75 ^Δ

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 BZD+agomir NC 组比较: ^Δ $P<0.05$ 。

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; ^Δ $P<0.05$ vs BZD+agomir NC group.

3.4 BZD 对小鼠骨组织结构的影响

如图 2 所示, 对照组小鼠可见骨小梁排列有序、紧密, 骨微结构完整。模型组小鼠骨小梁数量减少, 间隙变宽, 出现断裂, 骨陷窝增大。与模型组比较, BZD 低、高剂量组小鼠骨小梁明显改善, 数量增多且增宽, 连续性增加, 且 BZD 高剂量组的改善更为明显。与 BZD+agomir NC 组比较, BZD+miR-146a-

5p agomir 组小鼠骨小梁出现损伤、断裂, 数量减少。

3.5 BZD 对小鼠股骨组织 *miR-146a-5p*、*Notch1* mRNA 表达水平的影响

如表 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠股骨组织 *miR-146a-5p* 水平显著升高 ($P<0.05$), *Notch1* mRNA 水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, BZD 高剂量组小鼠股骨组织 *miR-146a-5p* 水平显著

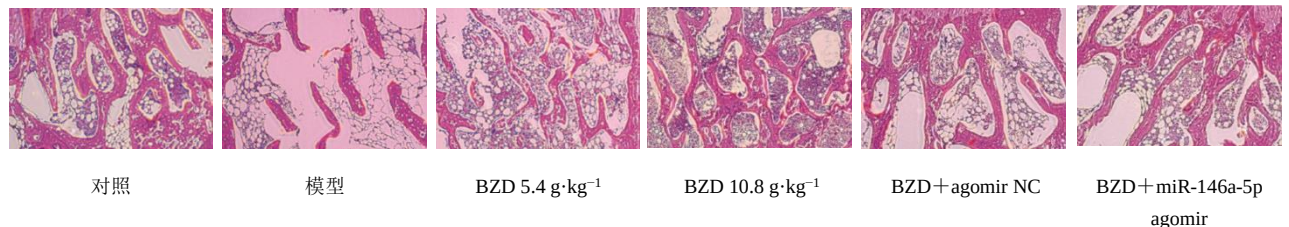


图 2 HE 染色观察小鼠股骨组织结构变化 (×100)

Fig. 2 Structural changes of mouse femur observed by HE staining (×100)

表 5 各组小鼠股骨组织 *miR-146a-5p*、*Notch1* mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Comparison of *miR-146a-5p* and *Notch1* mRNA expression levels in femur tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>miR-146a-5p</i> /U6	<i>Notch1</i> /GAPDH
对照	—	1.00±0.10	1.00±0.11
模型	—	2.36±0.25 [*]	0.28±0.03 [*]
BZD	5.4	2.33±0.23	0.30±0.03
	10.8	1.54±0.15 [#]	0.86±0.09 [#]
BZD+agomir NC	10.8+0.008	1.52±0.15	0.84±0.08
BZD+miR-146a-5p agomir	10.8+0.008	2.10±0.21 ^Δ	0.43±0.04 ^Δ

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 BZD+agomir NC 组比较: ^Δ $P<0.05$ 。

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; ^Δ $P<0.05$ vs BZD+agomir NC group.

降低 ($P<0.05$), *Notch1* mRNA 水平显著升高 ($P<0.05$)。与 BZD+agomir NC 组比较, BZD+miR-146a-5p agomir 组小鼠股骨组织 *miR-146a-5p* 水平显著升高 ($P<0.05$), *Notch1* mRNA 水平显著降低 ($P<0.05$)。

3.6 BZD 对小鼠股骨组织 Notch1 蛋白表达水平的影响

如图 3 和表 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠股骨组织 Notch1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, BZD 高剂量组小鼠股骨组织 Notch1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。与 BZD+agomir NC 组比较, BZD+miR-146a-5p agomir 组小鼠股骨组织 Notch1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。



图 3 Western blotting 检测小鼠股骨组织 Notch1 蛋白水平

Fig. 3 Western blotting examination of femoral organization Notch1 protein expression level in mice

3.7 BMSCs 的培养和鉴定

如图 4-A 所示, 光镜下观察, BMSCs 增殖正常, 呈纺锤形或梭形、集落样生长。流式细胞术检测发现, CD90、CD105 阳性表达 (96.3%、98.5%), CD45 和 CD11b 阴性表达 (1.2%、2.7%), 见图 4-B。

表 6 各组小鼠股骨组织 Notch1 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 6 Comparison of Notch1 protein expression in femur of each group in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Notch1/GAPDH
对照	—	0.89 ± 0.09
模型	—	0.23 ± 0.02*
BZD	5.4	0.25 ± 0.03
	10.8	0.72 ± 0.07 [#]
BZD+agomir NC	10.8 ± 0.008	0.73 ± 0.07
BZD+miR-146a-5p agomir	10.8 ± 0.008	0.34 ± 0.03 [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 BZD+agomir NC 组比较: [△] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs BZD+agomir NC group.

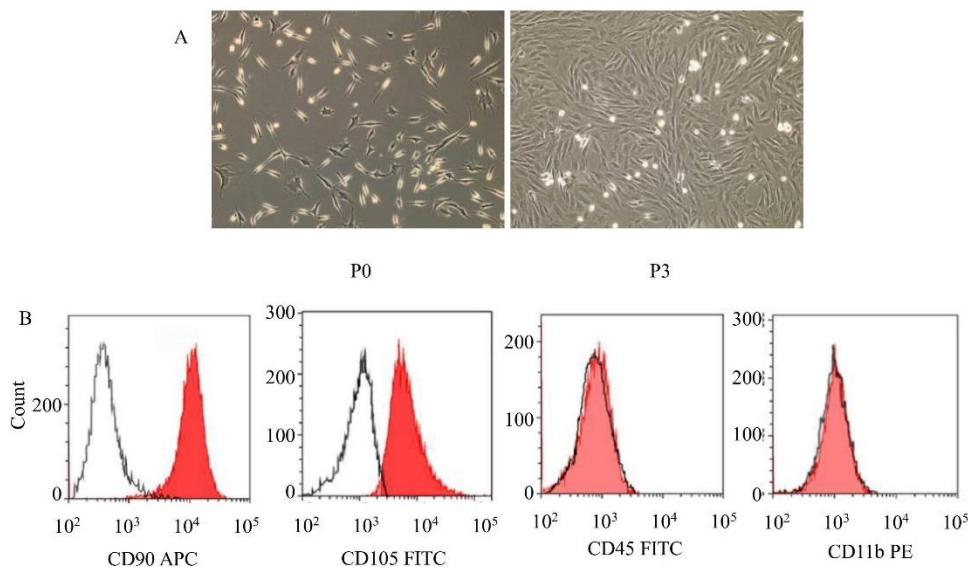


图 4 BMSCs 光镜下观察 (A) 和流式细胞术鉴定 (B)

Fig. 4 Observation of BMSCs under light microscopy (A) and identification by flow cytometry (B)

3.8 BZD 对 BMSCs 增殖和成骨分化的影响

如图 5 和表 7 所示, 与对照组比较, 模型组 *A* 值、相对 ALP 活力、茜素红阳性染色面积比例

显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, BZD 高剂量组 *A* 值、相对 ALP 活力、茜素红阳性染色面积比例显著升高 ($P<0.05$)。与 BZD+agomir NC

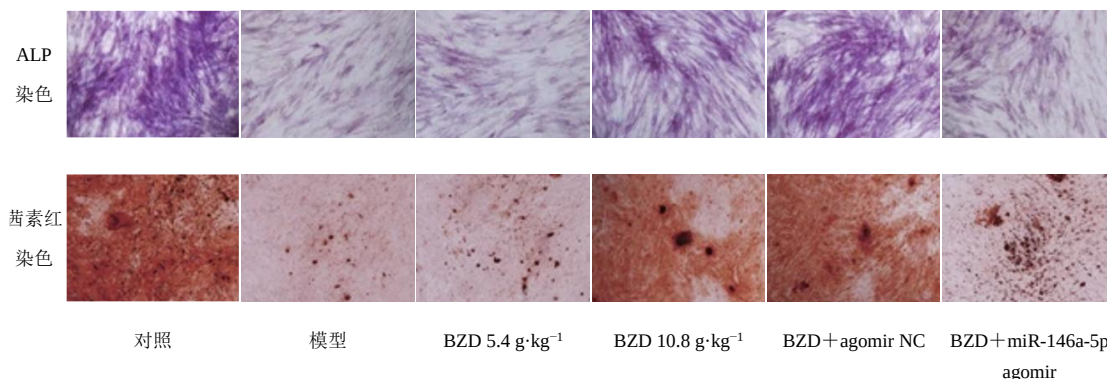


图 5 ALP 染色和茜素红染色观察 BMSCs 成骨分化 (×100)

Fig. 5 Bone differentiation of BMSCs observed by ALP and alizarin red staining (×100)

表 7 各组 BMSCs 增殖和成骨分化的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 7 Comparison of BMSCs proliferation and osteogenic differentiation among all groups ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	A 值			相对 ALP 活力	茜素红阳性染色面积 比例/%
		24 h	48 h	72 h		
对照	—	0.45±0.04	0.97±0.08	1.42±0.15	1.00±0.05	97.65±6.23
模型	—	0.16±0.03*	0.42±0.04*	0.78±0.06*	0.48±0.04*	20.42±3.14*
BZD	5.4	0.19±0.04	0.45±0.06	0.81±0.08	0.50±0.05	22.31±3.45
	10.8	0.38±0.05 [#]	0.79±0.08 [#]	1.15±0.11 [#]	0.79±0.07 [#]	81.69±5.23 [#]
BZD+agomir NC	10.8+0.008	0.40±0.06	0.81±0.07	1.17±0.16	0.81±0.06	83.14±5.39
BZD+miR-146a-5p agomir	10.8+0.008	0.26±0.04 [△]	0.55±0.05 [△]	0.92±0.09 [△]	0.63±0.06 [△]	36.52±3.75 [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 BZD+agomir NC 组比较: [△] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs BZD+agomir NC group.

组比较, BZD+miR-146a-5p agomir 组 A 值、相对 ALP 活力、茜素红阳性染色面积比例显著降低 ($P<0.05$)。

3.9 BZD 对 BMSCs 成骨标志蛋白 ALP、OCN、Runx2、Osterix 表达的影响

如图 6 和表 8 所示, 与对照组比较, 模型组 ALP、OCN、Runx2、Osterix 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, BZD 高剂量组 ALP、OCN、Runx2、Osterix 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)。与 BZD+agomir NC 组比较, BZD+miR-146a-5p agomir 组 ALP、OCN、Runx2、Osterix 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$)。

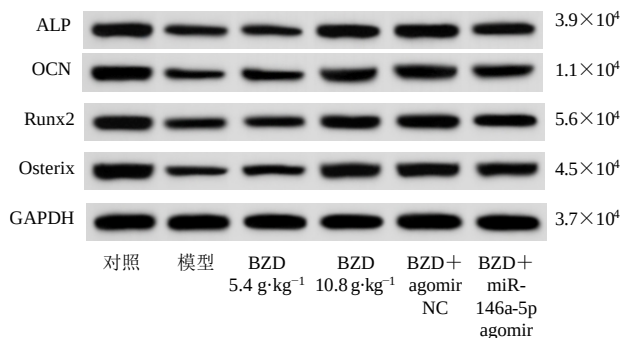


图 6 Western blotting 检测 BMSCs 成骨标志蛋白表达
Fig. 6 Western blotting detection of expression of bone marker protein in BMSCs

表 8 各组 BMSCs 成骨标志蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 8 Comparison of osteogenic marker protein expression levels among different groups of BMSCs ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALP/GAPDH	OCN/GAPDH	Runx2/GAPDH	Osterix/GAPDH
对照	—	0.96±0.05	0.92±0.04	0.98±0.06	1.02±0.08
模型	—	0.42±0.02*	0.38±0.03*	0.40±0.04*	0.35±0.04*
BZD	5.4	0.45±0.04	0.40±0.05	0.43±0.06	0.37±0.05
	10.8	0.82±0.06 [#]	0.77±0.05 [#]	0.79±0.08 [#]	0.72±0.06 [#]
BZD+agomir NC	10.8+0.008	0.80±0.07	0.75±0.06	0.77±0.05	0.69±0.05
BZD+miR-146a-5p agomir	10.8+0.008	0.58±0.05 [△]	0.55±0.04 [△]	0.57±0.07 [△]	0.49±0.05 [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 BZD+agomir NC 组比较: [△] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs BZD+agomir NC group.

3.10 BZD 对 miR-146a-5p/Notch1 通路的影响

如图 7 和表 9 所示,与对照组比较,模型组 *miR-146a-5p* 表达显著增高, *Notch1* mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, BZD 高剂量组 *miR-146a-5p* 表达显著降低, *Notch1* mRNA 和蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)。与 BZD+agomir NC 组比较, BZD+*miR-146a-5p* agomir 组 *miR-146a-5p* 表达显著增高, *Notch1* mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P<0.05$)。

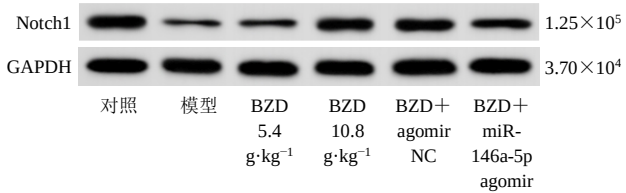


图 7 Western blotting 检测 BMSCs 中 Notch1 蛋白水平
Fig. 7 Western blotting detection of Notch1 protein expression in BMSCs

表 9 各组 BMSCs 中 *miR-146a-5p*、*Notch1* mRNA 和蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 9 Comparison of *miR-146a-5p* and *Notch1* mRNA and protein expression levels in BMSCs among all groups ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>miR-146a-5p</i> 相对表达量	<i>Notch1</i> mRNA 相对表达量	<i>Notch1</i> 蛋白相对表达量
对照	—	1.02±0.11	1.00±0.09	0.91±0.08
模型	—	2.42±0.21*	0.31±0.04*	0.25±0.04*
BZD	5.4	2.45±0.24	0.35±0.05	0.28±0.03
	10.8	1.68±0.15 [#]	0.83±0.07 [#]	0.75±0.08 [#]
BZD+agomir NC	10.8+0.008	1.70±0.16	0.85±0.08	0.77±0.09
BZD+ <i>miR-146a-5p</i> agomir	10.8+0.008	2.23±0.19 [△]	0.53±0.06 [△]	0.47±0.05 [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 BZD+agomir NC 组比较: [△] $P<0.05$ 。
* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs BZD+agomir NC group.

3.11 *miR-146a-5p* 对 *Notch1* 的靶向验证

Targetscan 网站预测显示 *miR-146a-5p* 与 *Notch1* 有结合位点,见图 8。如表 10 所示,与 agomir NC 组比较, *miR-146a-5p* agomir 组的 *Notch1*-WT 荧光素酶活性显著下降 ($P<0.05$), *Notch1*-MUT 荧光素酶活性基本不变。

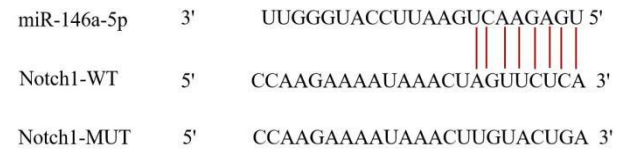


图 8 *miR-146a-5p* 与 *Notch1* 的结合位点
Fig. 8 Binding site of *miR-146a-5p* to *Notch1*

表 10 *miR-146a-5p* 与 *Notch1* 双荧光素酶实验 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 10 *miR-146a-5p* and *Notch1* dual luciferase assay ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	<i>Notch1</i> -WT	<i>Notch1</i> -MUT
agomir NC	1.00±0.12	1.02±0.15
<i>miR-146a-5p</i> agomir	0.38±0.06*	1.01±0.13

与 agomir NC 组比较: * $P<0.05$ 。
* $P<0.05$ vs agomir NC group.

4 讨论

骨质疏松症是因各种原发性、继发性因素引起的骨稳态失衡,患者出现骨量和骨强度下降^[17-18]。现阶段,采用的治疗药物具有较为严重的不良反应,包括下颌骨坏死、非典型股骨骨折等^[19]。因此,开发治疗骨质疏松症新的安全有效药物是迫切需要的。本实验采用地塞米松诱导的方式建立体内小鼠骨质疏松症模型,结果显示,与对照组比较,模型组小鼠 BMC、BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 水平、血清 BALP、PINP 水平显著降低, Tb.Sp 水平、血清 OCN、Trap 水平显著升高, HE 结果显示骨小梁数量减少,间隙变宽,出现断裂,骨陷窝增大。这些结果符合骨质疏松症的病理结果,说明骨质疏松症模型构建成功。

BZD 的君药熟地黄、山茱萸具有补益肝肾、填精益髓、补血养阴等功效;臣药包括杜仲、续断、五加皮,可以增强补肾的功效;当归活血通络、白芍养血敛阴、茯苓利水渗湿、青皮破气化痰、牛膝补益肝肾,诸药合用可以补肾、益肝、健脾、活血,从而治疗骨质疏松症^[20-21]。吴琦等^[22]研究发现在老年骨质疏松性腰痛的临床治疗中,通过 BZD 联合

针刺的治疗干预,能够有效缓解腰痛、提高腰部骨质密度,改善腰椎活动功能。束伟平^[23]研究发现将 BZD 应用到骨质疏松性桡骨远端闭合性骨折患者中,可以促进患者骨折愈合。本研究结果显示,与模型组比较,BZD 高剂量组小鼠 BMC、BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 水平、血清 BALP、PINP 水平显著升高,Tb.Sp 水平、血清 OCN、Trap 水平显著降低,HE 结果显示骨小梁明显改善,数量增多且增宽,连续性增加。这说明 BZD 能够提高骨质疏松小鼠的骨密度,改善骨代谢。BMSCs 是体内成骨细胞和脂肪细胞最重要的来源,它们能相互拮抗成骨细胞和脂肪细胞的分化^[24]。研究证实,BMSCs 的成骨分化与骨质疏松症密切相关^[25]。与这一观点相一致的是,越来越多的中药成分及复方被发现在体外和体内促进 BMSCs 的成骨分化,在临床前动物模型中预防骨质疏松^[26-27]。与这些研究一致,本研究数据表明,高剂量 BZD 能够促进体外 BMSCs 的成骨分化,这是通过增加成骨细胞标志物(如 ALP、Runx2、OCN 和 Osterix)^[28]的表达来揭示的。以上研究结果提示 BZD 可能是治疗骨质疏松症的潜在药物,但其调节机制还不清楚。

MiR-146a-5p 是一种重要的 miRNA,许多证据表明其与骨相关疾病的发生发展密切相关。Zheng 等^[29]研究发现 miR-146a-5p 是成骨细胞生长和骨形成的抑制因子,下调 miR-146a-5p 可能是治疗骨质疏松症的一种策略。Notch1 能够参与调节骨骼的发育,提高骨细胞中 Notch1 水平能抑制骨吸收^[30]。伏守用等^[31]研究发现上调 Notch1 的表达能够提高骨质疏松性骨折大鼠的 BMD,促进骨折愈合。本研究结果显示,与对照组比较,模型组小鼠股骨组织和 BMSCs 中 Notch1 mRNA 和蛋白表达水平显著降低,miR-146a-5p 水平显著升高,说明 miR-146a-5p 和 Notch1 可能参与介导骨质疏松进展。与模型组比较,BZD 高剂量组小鼠股骨组织和 BMSCs 中 Notch1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高,miR-146a-5p 水平显著降低,提示 BZD 可能通过调节 miR-146a-5p 和 Notch1 表达促进 BMSCs 成骨分化,提高骨质疏松小鼠骨代谢。本研究通过生信分析和荧光素酶实验发现,Notch1 是 miR-146a-5p 的直接靶点,且被 miR-146a-5p 负调控。深入研究发现,过表达 miR-146a-5p 抑制了 BZD 对骨质疏松小鼠骨密度的提高和对 BMSCs 成骨分化的促进。这说明 BZD 可能通过下调 miR-146a-5p/Notch1 信号通

路促进 BMSCs 成骨分化、提高骨质疏松小鼠的骨密度。

BZD 可能通过下调 miR-146a-5p/Notch1 信号通路促进 BMSCs 成骨分化,提高骨质疏松小鼠的骨密度。这为治疗骨质疏松症提供了新的科学依据。然而,本研究还存在不足之处,BZD 对于骨质疏松症的改善可能还存在其他途径,还需进一步探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Johnston C B, Dagar M. Osteoporosis in older adults [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(5): 873-884.
- [2] Brown J P. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Endocrinol Metab*, 2021, 36(3): 544-552.
- [3] Aspray T J, Hill T R. Osteoporosis and the ageing skeleton [J]. *Subcell Biochem*, 2019, 91: 453-476.
- [4] 周佳, 张亚男, 白亦光, 等. 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 调控破骨细胞对骨质疏松小鼠骨密度的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(29): 4680-4684.
Zhou Q, Zhang Y N, Bai Y G, et al. Effect of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 regulating osteoclasts on bone mineral density in osteoporotic mice [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2021, 25(29): 4680-4684.
- [5] Anthamatten A, Parish A. Clinical update on osteoporosis [J]. *J Midwifery Womens Health*, 2019, 64(3): 265-275.
- [6] 杜丽坤, 李佳睿. 骨质疏松症的中医认识及防治 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(2): 296-299.
Du L K, Li J R. TCM cognition and prophylaxis and treatment of osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2022, 28(2): 296-299.
- [7] 王伟伟, 欧志学, 章晓云, 等. 补肾壮筋汤治疗膝关节炎作用机制的网络药理学研究 [J]. *中医正骨*, 2022, 34(7): 6-14, 26.
Wang W W, Ou Z X, Zhang X Y, et al. Mechanism of Bushen Zhuangjin Tang in treatment of knee osteoarthritis: A network pharmacology-based study [J]. *J Tradit Chin Orthop Traumatol*, 2022, 34(7): 6-14, 26.
- [8] Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6249.
- [9] Iacona J R, Lutz C S. MiR-146a-5p: Expression, regulation, and functions in cancer [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2019, 10(4): e1533.
- [10] Ammari M, Presumey J, Ponsolles C, et al. Delivery of miR-146a to Ly6Chigh monocytes inhibits pathogenic bone erosion in inflammatory arthritis [J]. *Theranostics*, 2018, 8(21): 5972-5985.

- [11] 李怡璇, 刘伟, 吴君璇, 等. Notch 信号通路在泛髓系统中的作用探讨 [J]. 山东中医药大学学报, 2019, 43(1): 19-23.
- Li Y X, Liu W, Wu J X, et al. Discussion on significance of Notch signaling pathway in pan-medullary system [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2019, 43(1): 19-23.
- [12] 许云腾, 黄思贤, 施颖, 等. 补肾壮筋汤多种成分的定量和定性分析 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(5): 2451-2455.
- Xu Y T, Huang S X, Shi Y, et al. Quantitative and qualitative analysis of various components of Bushen Zhuangjin Decoction [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2024, 39(5): 2451-2455.
- [13] 张锦明, 田滢舟, 赵玲, 等. 淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化缓解小鼠骨质疏松的机制 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(19): 2991-2996.
- Zhang J M, Tian Y Z, Zhao L, et al. Icaritin alleviates osteoporosis by promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in mice [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(19): 2991-2996.
- [14] 李宇, 王伟, 李爽. 补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖对大鼠膝软骨缺损修复机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 43-49.
- Li Y, Wang W, Li S. Effect of Bushen Zhuangjintang combined with glucosamine hydrochloride on repairing knee cartilage defect in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(17): 43-49.
- [15] 徐晓荣, 王海滨, 白晓月, 等. MiR-146a-3p 靶向 TLR4 减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2021, 20(7): 495-502.
- Xu X R, Wang H B, Bai X Y, et al. MiR-146a-3p alleviates LPS-induced acute lung injury in mice by targeting TLR4 [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2021, 20(7): 495-502.
- [16] 黄艳峰, 马德尊, 付长龙, 等. 基于 SDF-1/CXCR4 轴探讨补肾壮筋汤促进小鼠 BMSCs 归巢和保护关节软骨的机制研究 [J]. 康复学报, 2024, 34(1): 44-54.
- Huang Y F, Ma D Z, Fu C L, et al. Mechanism of Bushen Zhuangjin Decoction to promote BMSCs homing and protect articular cartilage in mice by the SDF-1/CXCR4 axis [J]. Rehabil Med, 2024, 34(1): 44-54.
- [17] Arceo-Mendoza R M, Camacho P M. Postmenopausal osteoporosis: Latest guidelines [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2021, 50(2): 167-178.
- [18] 梁晓霞, 谢保城, 罗世英. 环烯醚萜类化合物防治骨质疏松症作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(1): 251-256.
- Liang X X, Xie B C, Luo S Y. Research progress of mechanism of iridoids on prevention and treatment of osteoporosis [J]. Clin Drug, 2024, 39(1): 251-256.
- [19] Kanis J A, Cooper C, Rizzoli R, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women [J]. Osteoporos Int, 2019, 30(1): 3-44.
- [20] 周宇星, 肖潇. 补肾壮筋汤对原发性骨质疏松症骨密度及骨代谢的影响 [J]. 海军医学杂志, 2023, 44(7): 711-715.
- Zhou Y X, Xiao X. Effects of Bushen Zhuangjin oral liquid on bone mineral density and bone metabolism in primary osteoporosis [J]. J Navy Med, 2023, 44(7): 711-715.
- [21] 玛依拉·艾尔肯, 许倩倩, 杨爱琼. 补肾壮筋汤加减治疗对肝肾不足型膝骨关节炎的影响 [J]. 实用医院临床杂志, 2023, 20(1): 135-138.
- Mayila E, Xu Q Q, Yang A Q. The effect of modified Bu-Shen-Zhuang-Jin decoction in the treatment of knee osteoarthritis (liver-kidney insufficiency type) [J]. Pract J Clin Med, 2023, 20(1): 135-138.
- [22] 吴琦, 丁志鸿, 黄志雄. 补肾壮筋汤联合针刺治疗骨质疏松腰痛的临床效果观察 [J]. 福建医药杂志, 2021, 43(5): 95-98.
- Wu Q, Ding Z H, Huang Z X. Clinical observation of Bushen Zhuangjin decoction combined with acupuncture in the treatment of osteoporosis and low back pain [J]. Fujian Med J, 2021, 43(5): 95-98.
- [23] 束伟平. 补肾壮筋汤治疗骨质疏松性桡骨远端闭合性骨折的价值 [J]. 北方药学, 2022, 19(9): 55-57, 60.
- Shu W P. Value of Bushen Zhuangjin Decoction in treating osteoporotic closed fracture of distal radius [J]. J N Pharm, 2022, 19(9): 55-57, 60.
- [24] Xia C J, Xu H H, Fang L, et al. β -catenin inhibition disrupts the homeostasis of osteogenic/adipogenic differentiation leading to the development of glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. eLife, 2024, 12: RP92469.
- [25] Zeng C Y, Wang S, Chen F L, et al. Alpinetin alleviates osteoporosis by promoting osteogenic differentiation in BMSCs by triggering autophagy via PKA/mTOR/ULK1 signaling [J]. Phytother Res, 2023, 37(1): 252-270.
- [26] Xu L, Xu G, Sun N, et al. Catalpol ameliorates dexamethasone-induced osteoporosis by promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via the activation of PKD1 promoter [J]. J Pharmacol Sci, 2023, 153(4): 221-231.
- [27] Chen Y Q, Wei Z Y, Shi H X, et al. BushenHuoxue formula promotes osteogenic differentiation via affecting Hedgehog signaling pathway in bone marrow stem cells to

- improve osteoporosis symptoms [J]. PLoS One, 2023, 18(11): e0289912.
- [28] Li D, Yuan Q, Xiong L, et al. The miR-4739/DLX3 axis modulates bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMSC) osteogenesis affecting osteoporosis progression [J]. Front Endocrinol, 2021, 12: 703167.
- [29] Zheng M X, Tan J L, Liu X N, et al. MiR-146a-5p targets Sirt1 to regulate bone mass [J]. Bone Rep, 2021, 14: 101013.
- [30] Ballhause T M, Jiang S, Baranowsky A, et al. Relevance of Notch signaling for bone metabolism and regeneration [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(3): 1325.
- [31] 伏守用, 宋国, 梅皓, 等. MiR-141 对老年骨质疏松性骨折大鼠预后的影响及相关机制 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(9): 2259-2263.
- Fu S Y, Song G, Mei H, et al. Effect of miR-141 on the prognosis of senile osteoporotic fracture rats and its related mechanism [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(9): 2259-2263.

[责任编辑 兰新新]

~~~~~

## • 公益广告 •

