

# 骨松安促进骨质疏松大鼠骨折愈合的信号通路研究

江涛<sup>1</sup> 侯秋科<sup>2</sup> 陈善创<sup>1</sup> 刘子桃<sup>1</sup> 刘启宇<sup>1</sup> 苏海涛<sup>1</sup> 黄永铨<sup>1△</sup>

**[摘要]** 目的:初步探索影响骨松安促进骨质疏松大鼠骨折愈合的信号通路。方法:建立骨质疏松骨折大鼠模型,采用院内制剂骨松安胶囊进行治疗,7,14,21 d后采用 ELISA 法检测血清 OPG、RANKL 的表达,同时取出骨折端骨痂,采用 Masson 染色检测骨折端胶原蛋白变化,并采用免疫组化检测 OPG、RANKL 的表达。结果:在骨折后不同时期,骨松安治疗均可明显促进骨折端软骨细胞增殖,促进纤维胶原形成;ELISA、免疫组化结果显示 OPG 在治疗 7 d 及 14 d 表达持续上升,到 21 d 达到顶峰,与没有骨松安治疗大鼠相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。RANKL 在骨折早期处于较高水平,骨质疏松骨折组大鼠最为明显,而骨松安治疗可明显抑制其表达,与没有骨松安治疗比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。骨松安治疗组 OPG/RANKL 比值较无骨松安治疗组高,治疗 14 d 最高,到 21 d 有所下降,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:骨松安可调控 OPG/RANKL 信号通路,抑制破骨细胞分化与成熟,抑制骨吸收,从而促进骨形成,能有效促进骨折愈合。

**[关键词]** 骨松安;破骨细胞;骨吸收;骨质疏松;骨折愈合

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)12-0006-06

## Study of Signal Pathway of Gusongan Promoting Fracture Healing in Rats with Osteoporosis

JIANG Tao<sup>1</sup> HOU Qiuke<sup>2</sup> CHEN Shanchuang<sup>1</sup> LIU Zitao<sup>1</sup>

LIU Qiyu<sup>1</sup> SU Haitao<sup>1</sup> HUANG Yongquan<sup>1△</sup>

<sup>1</sup> The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

<sup>2</sup> The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China.

**Abstract Objective:** To explore the signal pathways that affects Gusongan's promotion of fracture healing in osteoporotic rats. **Methods:** A rat model of osteoporotic fracture was established and treated with Gusongan Capsules. After 7, 14 and 21 d, the expression of serum OPG and RANKL was detected by ELISA. At the same time, the bone callus at the fractured end was taken out. Masson staining was used to detect the changes of collagen at the fracture end, and immunohistochemistry was used to detect the expression of OPG and RANKL. **Results:** In different periods after fracture, gusongan significantly promoted the proliferation of chondrocytes at the fracture end and promote the formation of fibrous collagen; ELISA and immunohistochemistry results showed that the expression of OPG increased continuously at 7 and 14 d of treatment, and reaches the peak at 21st day. Compared with rats without Gusongan treatment, the difference was statistically significant. RANKL was at a high level in the early stage of fracture, which was most obvious in the osteoporotic fracture group, while the treatment with Gusongan significantly inhibited its expression. Compared with rats without Gusongan treatment, the difference was statistically significant. The OPG/RANKL ratio of the Gusongan treatment group was higher than that of the no gusongan treatment group, and reached the highest level in the 14th day and decreased in the 21st day. The differences were statistically significant. **Conclusion:** Gusongan can regulate OPG/RANKL signaling pathway, inhibit osteoclast differentiation and maturation and inhibit bone resorption, thereby promote bone formation and effectively promote fracture healing.

**Keywords:** gusongan; osteoclast; bone resorption; osteoporosis; fracture healing

基金项目:国家自然科学基金青年基金(82004387)

广东省自然科学基金(2018A030313694)

<sup>1</sup> 广州中医药大学第二附属医院(广州, 510006)

<sup>2</sup> 广州中医药大学第一附属医院

△通信作者 E-mail: huangyongquan@gzcm.edu.cn

骨质疏松症是一种与年龄相关的骨代谢疾病,以骨量减少为特征,随着年龄的增长,骨质连通性和结构完整性持续下降,导致骨骼脆性、骨折风险增加。据估计,年龄 $>50$ 岁的绝经女性,骨质疏松症的发病率约为10%;而年龄 $>80$ 岁的女性,骨质疏松症的发病率高达25%<sup>[1]</sup>。由于骨质的破坏(骨小梁稀疏、骨基质变少),骨质疏松症患者一旦发生骨折,将难以获得较为稳定的固定,即使采用手术治疗,也会因为骨质疏松而影响内固定的稳定性,导致内固定失败、并发症增加,康复时间明显延长<sup>[2]</sup>。已有研究发现,骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)作为核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand, RANKL)的受体,可以竞争性抑制核因子 $\kappa$ B受体活化因子(Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, RANK)与RANKL的结合,从而抑制破骨细胞分化与成熟破骨细胞活性<sup>[3-4]</sup>。研究还显示,RANKL可结合RANK促进骨吸收,激活破骨细胞活性,成为破骨细胞生长必须因子<sup>[5]</sup>。最新的研究表明,OPG与RANK及RANKL共同组成的OPG/RANK/RANKL信号系统,密切参与调节骨代谢及骨损伤重建<sup>[6]</sup>。近年来中医药在骨质疏松治疗中的优势不断被报道,广东省中医院院内制剂骨松安胶囊是临床上用于治疗绝经后妇女骨质疏松症的经验方,临床应用20多年,得到了广大患者的认可<sup>[7]</sup>,同时无明显不良反应,但其确切治疗机制尚未明确。基于目前骨质疏松的机制研究,本研究拟从OPG/RANKL信号通路入手,初步探索骨松安治疗骨质疏松骨折愈合的机制,为骨松安的临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

8周龄SPF级雌性SD大鼠60只,体质量(200 $\pm$ 10)g,广州中医药大学实验动物中心提供,实验动物许可证号为SCXK(粤)2019-0020。

### 1.2 实验药物及试剂

ELISA试剂盒(OPG)(ab255723,美国abcam公司);ELISA试剂盒(RANKL)(ab269553,美国abcam公司);OPG一抗(ab124820,美国abcam公司);RANKL一抗(ab239607,美国abcam公司);水合氯醛(302-17-0,美国Sigma-Aldrich公司);4%多聚甲醛(30525-89-4,美国Sigma-Aldrich公司);PBS(G002,中国赛维尔生物科技有限公司);异丙醇(67-63-0,美国Sigma-Aldrich公司);无水乙醇(A0010074,中国上海润捷化学试剂有限公司);二甲苯(1330-20-7,美国Sigma-Aldrich公司);中性树脂(E675007,中国生工生物工程有限公司);青霉素(36945-98-9,美国Sigma-Aldrich公司);EDTA(E112486,中国阿拉丁试剂(上

海)有限公司);NaOH(S140903,中国阿拉丁试剂(上海)有限公司);0.9%生理盐水(H37022337,中国辰兴药业股份有限公司);纯净水(LA0727,中国飞净生物科技有限公司)。骨松安(粤药制字Z20080140)由广东省中医院药房提供。

### 1.3 实验仪器

MicroCT(LCT-200,日本Hitachi-Aloka公司);生物洁净安全柜(BHC-1000IIA2,中国苏州净化设备有限公司);脱水机(JJ-12,中国武汉俊杰电子有限公司);生物组织包埋机(XGNP29-NP-B,北京海富达科技有限公司);病理切片机(RM2016,德国徕卡仪器有限公司);组织摊片机(TEC2601,中国上海精密仪器仪表有限公司);烤箱(DHG-9140A,中国上海慧泰仪器制造有限公司);载玻片及盖玻片(10212432C,中国江苏世泰实验器材有限公司);倒置荧光显微镜(CKX53,日本奥林巴斯);电子天平(BSA223S,中国赛多利斯有限公司);酶标仪(Multiskan FC,美国ThermoFisher公司)。

### 1.4 方法

**1.4.1 造模方法** 术前1d备皮,术前30min青霉素 $8\times 10^4$ U腹腔注射预防感染,以0.33mL/100g水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,术区常规消毒、铺无菌洞巾,取背部单侧切口,钝性分离找到卵巢并摘除,生理盐水清洗伤口后逐层缝合至皮肤,全程无菌操作。术后3d予青霉素 $8\times 10^4$ U预防感染,对照组大鼠找到卵巢后仅将周围脂肪切除,保留双侧卵巢。8周后,大鼠采用水合氯醛麻醉后放置于micro-CT(LCT-200,日本Hitachi-Aloka)仪器中进行扫描,电压50kV、电流0.5mA,分辨率24 $\mu$ m,扫描角度360°,获取连续的200张断层图像,选取感兴趣区域(ROI)通过Latheta软件进行骨密度、骨体积、相对骨体积等分析。microCT检测后进行骨折造模,术前准备同前,参考既往研究<sup>[9]</sup>,取股骨外侧皮肤纵行切口长约3cm,切开皮肤后先暴露髌韧带,采用10mL注射器针头从股骨髁间窝处逆行插入股骨髓腔,然后暴露股外侧肌肌间隙,钝性分离暴露股骨干中段,行股骨中段横断骨折,斜行骨折、粉碎骨折不纳入本次研究,再次确定骨折固定稳固,伤口清洗,逐层缝合。术后处理同前。

**1.4.2 分组方法** 对照组大鼠按照给药与否分为单纯骨折组以及单纯骨折+骨松安组,骨质疏松大鼠按照给药与否分为骨质疏松骨折组以及骨质疏松骨折+骨松安组。

**1.4.3 干预方法** 骨松安使用前将其采用蒸馏水溶解为175mg/mL。参考“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表”换算中药使用剂量。单纯骨折组采用蒸馏水灌胃,单纯骨折+骨松安组采用骨松安

175 mg/kg 灌胃。骨质疏松骨折组采用蒸馏水灌胃,骨质疏松骨折+骨松安组采用骨松安 175 mg/kg 灌胃。在骨折模型制备后 24 h 给药,每天 9,13,17 点灌胃。

**1.4.4 标本制作方法** 按照中医骨折三期辨证原则,分别在治疗后第 7,14,21 天取 2 mL 静脉血进行 ELISA 检测,并取骨折端骨痂进行 Masson 染色以及免疫组化检测。采用 4 % 多聚甲醛固定骨折端骨痂,24 h 后采用 20 % EDTA 浸泡脱钙 5 周,洗涤、脱水、透明、包埋之后切片。

1.5 实验指标测定

采集血液样本后,按照 ELISA 试剂盒说明书进行标准品及对照品的制备,绘制标准曲线,酶标板加样后按要求孵育,在 450 nm 波长下检测吸光度,按照标准曲线计算样品中 OPG、RANKL 的表达水平。每个组织切片标本以骨折线为中心,矢状位连续切片 3 张,厚度 5 μm,采用改良 Masson 染色法观察骨痂的形成情

况。上述切片脱蜡之后,采用过氧化氢将内源性过氧化物封闭,然后采用复合消化液修复,加入 OPG、RANKL 一抗 4 ℃ 孵育过夜,洗涤后加入二抗,室温 30 min,然后加入生物素化 DAB 染色,洗涤之后苏木素复染,脱水、透明、封片,观察细胞核染色情况,细胞核深染为紫棕色即为阳性。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量资料采取  $\bar{x} \pm s$  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,组间两两比较采用 SNK 法检验,*P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨密度比较

骨质疏松模型建立之后,比较各组的松质骨、皮质骨的骨密度,结果显示,骨质疏松组骨密度明显低于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),上述结果表明骨质疏松造模成功。见表 1。

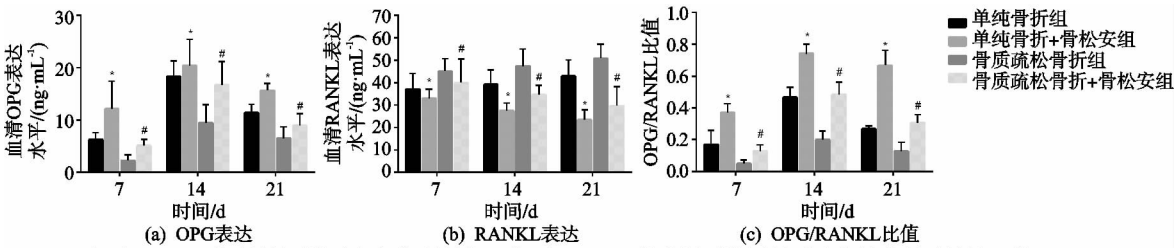
表 1 骨质疏松造模后骨密度比较(mg/cm<sup>3</sup>,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	皮质骨	松质骨	总体
骨质疏松组	6	600.40 ± 13.04	499.50 ± 12.36	542.60 ± 15.16
对照组	6	651.50 ± 19.81	575.73 ± 18.93	601.43 ± 21.88
<i>t</i>		4.818	7.539	4.942
<i>P</i>		0.001	< 0.001	0.001

2.2 治疗后各组血清 OPG、RANKL 表达比较

骨松安治疗 7 d,血清 OPG 水平比较,单纯骨折+骨松安组显著高于单纯骨折组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),同样骨质疏松骨折+骨松安组明显高于骨质疏松骨折组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。治疗 14 d,骨松安治疗组血清 OPG 水平升至最高,到 21 d 开始下降,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。血清

RANKL 水平比较,骨松安治疗组在 7 d、14 d、21 d 持续下降,与非骨松安治疗组比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);同时 OPG/RANKL 比值在骨松安治疗组较非骨松安治疗组高,差异有统计学意义(均 *P* < 0.05),治疗 14 d 时最高,到 21 d 时下降。上述结果表明骨松安可促进 OPG、抑制 RANKL 的表达,间接促进骨形成。



注: \**P* < 0.05, 单纯骨折+骨松安组与单纯骨折组比较; #*P* < 0.05, 骨质疏松骨折+骨松安组与骨质疏松骨折组比较。

图 1 治疗后各组血清 OPG 及 RANKL 表达比较

2.3 骨折端 Masson 染色

治疗 7 d,各组骨痂中均可见增殖的肥大软骨细胞,其中骨质疏松骨折+骨松安组、单纯骨折+骨松安组的软骨区域可见蓝色纤维状胶原;治疗 14 d,骨质疏松骨折+骨松安组、单纯骨折+骨松安组的纤维排列更紧密、生成更多,而骨质疏松骨折组纤维呈簇状排列,较骨质疏松骨折+骨松安明显要少;到 21 d 时,单纯骨折+骨松安组骨小梁融合,软骨成分

减少,骨质被吸收,骨质疏松骨折+骨松安组蓝染较骨质疏松骨折组明显,可见少量纤维状纤维。上述结果表明骨松安可促进骨折端骨痂以及纤维胶原的形成,促进骨愈合。

2.4 骨松安治疗后骨折端 OPG 表达比较

OPG 为骨保护蛋白。治疗 7 d,除骨质疏松骨折组外,其余 3 组均可见显著 OPG 表达,以单纯骨折+骨松安组最为显著,骨质疏松骨折+骨松安组

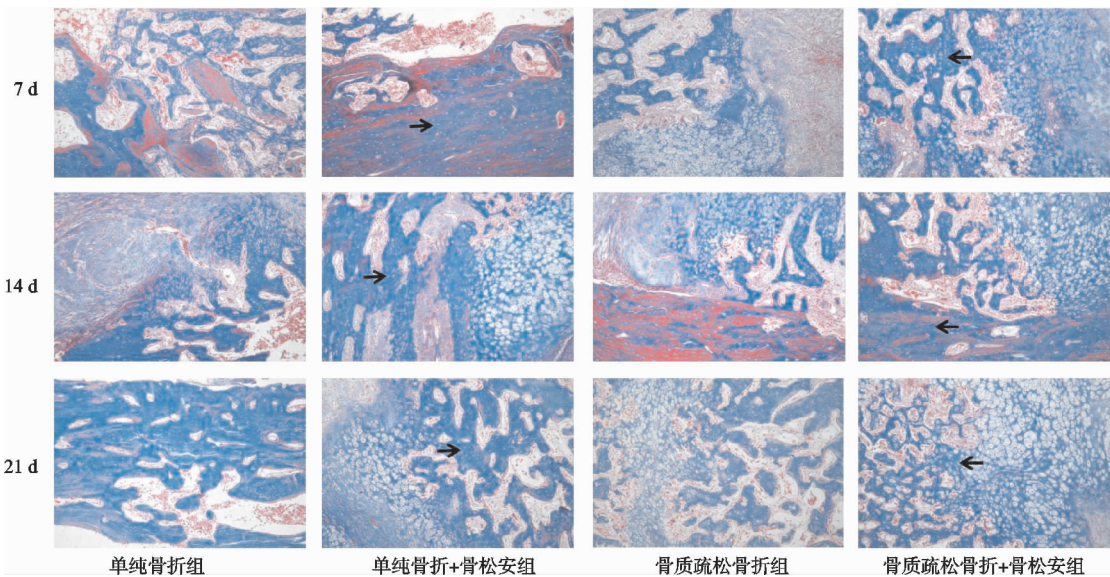


图 2 骨松安治疗后骨折端 Masson 染色 (×100)

与单纯骨折组比较,无明显差异;治疗 14 d,4 组大鼠骨折端 OPG 的表达均有所上升,但骨质疏松组上升较慢,骨质疏松骨折+骨松安组与单纯骨折+骨松安组上升较为明显;治疗 21 d,4 组大鼠骨折端 OPG 的

表达达到顶峰,骨松安治疗组与非骨松安治疗组比较,差异显著。上述结果表明,骨松安可上调骨折端 OPG 的表达,促进骨折愈合。

2.5 骨松安治疗后骨折端 RANKL 表达比较

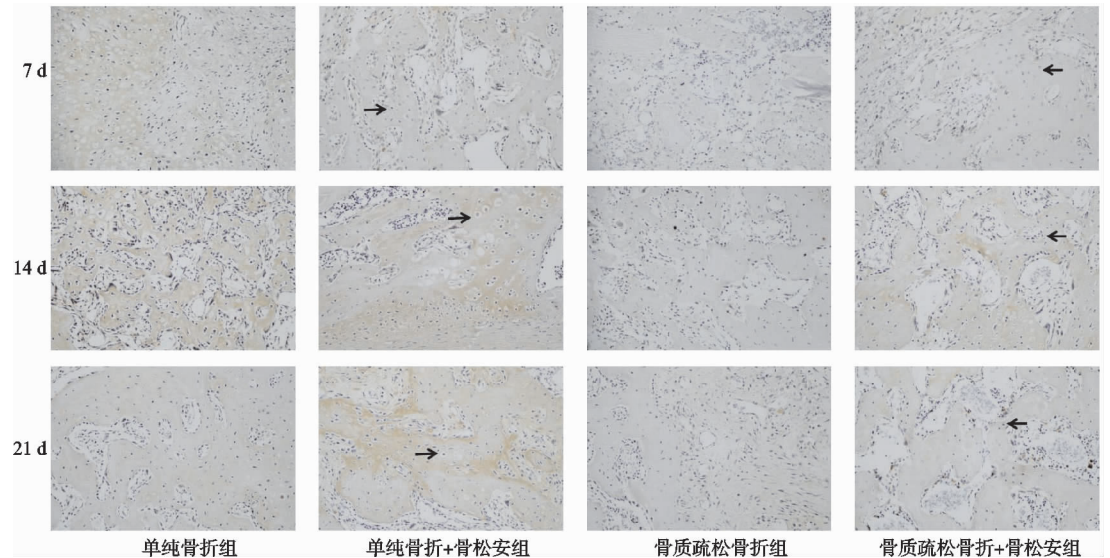


图 3 骨松安治疗后骨折端 OPG 表达比较 (×100)

RANKL 可诱导破骨细胞分化,促使骨吸收。骨折 7 d,单纯骨折组、骨质疏松骨折组 RANKL 的表达处于较高水平,且骨质疏松骨折组更为明显。而经骨松安治疗,单纯骨折+骨松安组与骨质疏松骨折+骨松安组 RANKL 的表达受到了抑制。持续治疗 14 d 和 21 d,单纯骨折+骨松安组与骨质疏松骨折+骨松安组 RANKL 的表达持续受到抑制,与单纯骨折组、骨质疏松骨折组比较,差异明显。上述结果表明,骨松安可抑制骨折端 RANKL 的表达,抑制破骨细胞的形成与成熟。

3 讨论

中医并无骨质疏松一说,但属于“骨痿”的范畴,骨

痿发病关键在于“肾虚”,“肾主骨生髓”,肾中精气随着年龄的增长是一个由盛转衰的过程,肾精不足,骨骼失养,日久则发为骨痿,也就是西医所说的骨质疏松。因此中医在治疗骨质疏松时,多在“肾主骨”和“虚则补之”等理论指导下组方用药<sup>[10]</sup>。现代医学认为“肾虚”的本质是下丘脑-垂体轴发生了紊乱,即脑信号影响激素内分泌水平进而引起成骨密度下降,“补肾”可以纠正丘脑-肾上腺-垂体轴,调整内环境激素的稳定,纠正骨代谢,提高骨量,有助于骨质疏松骨折的康复愈合<sup>[11]</sup>。骨松安胶囊是本院研发的治疗绝经后骨质疏松的经验方,在临床上使用超过 20 年,取得了良好的临床效果<sup>[3]</sup>。方剂中重用了补骨脂、骨碎补作为君药,



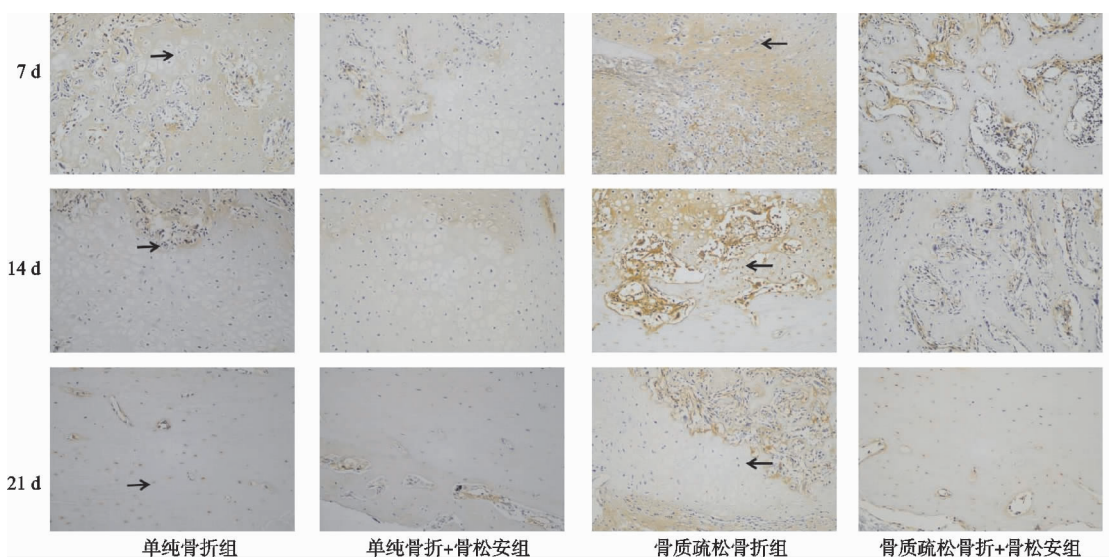


图 4 骨松安治疗后骨折端 RANKL 表达比较(×100)

具有补肾壮骨的作用;另用北芪取其益气助血行之功,丹参性苦、微寒,归肝经,善通行血脉、活血化瘀;淫羊藿性辛甘温,入肝肾经,善补肾阳,强筋骨,共为臣药;续断具有补肾舒经通络之效,可引药下行,作为使药;全方配伍发挥补肾壮骨、活血通络之效。在临床上主治肾虚血瘀型骨质疏松症。然而中医用药讲究配伍和“君、臣、佐、使”,用现代医药的观点来看是多种药物联合作用,具有多靶点、协同作用的功效,因此其治疗骨质疏松的确切分子机制尚未明确。

OPG 是 1997 年由两个实验室独立分离出来的<sup>[12-13]</sup>,是一种对骨骼具有保护作用的蛋白质,作为 TNF 受体超家族成员,该家属由引起不同信号转导的蛋白组成,介导多种生物学效应,例如细胞毒性、凋亡和细胞存活、增殖和分化。OPG 具有两种已知的 TNF 家族配体——RANKL<sup>[14]</sup> 和 TRAIL<sup>[15]</sup> (见图 5)。RANKL 通常与其膜受体 RANK 结合,诱导破骨细胞的分化、活化和存活。通过与 RANKL 结合,OPG 充当可溶抑制剂,可防止 RANKL/RANK 相互作用和随后的破骨细胞生成<sup>[15]</sup>。

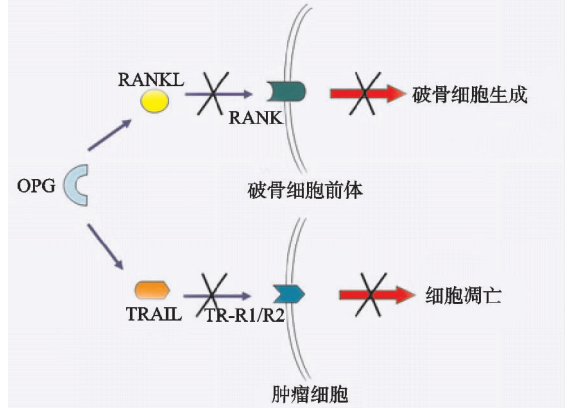


图 5 OPG/RANK/RANKL 信号系统抑制破骨细胞生成示意图

OPG 在许多组织和细胞中均有表达,在骨组织中由成骨细胞产生,其表达受成骨细胞诱导 RANKL 表达的大多数因素的调节<sup>[16]</sup>。OPG 的最佳特征活性是通过与 RANKL 结合来抑制破骨细胞的分化和活性<sup>[13,17]</sup>。研究表明,OPG(-/-)小鼠存活且肥胖,但由于破骨细胞形成和功能增强,它们表现出严重的骨质疏松<sup>[17-18]</sup>。本研究结果显示,骨松安治疗可明显促进骨折端软骨细胞增殖,促进纤维胶原形成。骨松安治疗 7 d 时,血清及骨折端 OPG 的表达在单纯骨折+骨松安组及骨质疏松骨折+骨松安组明显升高。治疗 14 d 时,OPG 的表达到达峰值,到 21 d 有所回落,与文献报道一致<sup>[19]</sup>。OPG 是骨骼生长过程中破骨细胞介导的骨吸收的生理调节剂。

研究发现骨折愈合过程中 OPG 与 RANKL 的表达比例关系密切,几乎决定着骨折的愈合和修复<sup>[5]</sup>。RANKL 的上调与 OPG 的下调或较低的 OPG 的诱导相关,OPG 与 RANKL 的比率下降有利于破骨细胞生成。也就是说,OPG/RANKL 比值升高则骨形成大于骨吸收,骨量形成增多,有利于骨折愈合;反之则破骨细胞生成增多,骨吸收作用大于骨形成,骨量形成减少,骨折愈合速度减慢,或进入塑型期。本研究结果显示,血清及骨折端 RANKL 的表达在单纯骨折+骨松安组及骨质疏松骨折+骨松安组则持续下降,到 21 d 时下降至最低,表明骨松安治疗可抑制骨吸收,但并不会无限抑制;同时 OPG/RANKL 比值在骨松安治疗组较无骨松安治疗组高,治疗 14 d 时最高,到 21 d 时有所下降,表明骨松安治疗在早期可抑制骨吸收,促进骨形成,加速骨折愈合,与文献报道一致<sup>[20]</sup>。

综上所述,骨松安可调节 OPG/RANK/RANKL 信号系统,抑制破骨细胞前体向成熟破骨细胞分化,从而抑制骨吸收,促进骨形成,加速骨折愈合。但本研究

仍存在一定的局限性,如骨松安治疗 3 周与临床骨质疏松骨折治疗三期辨证是否衔接,尚无准确定论;单纯采用骨松安治疗,未考虑到中医骨折治疗三期辨证的重要性;骨松安中起作用的有效成分尚未明确,同时笔者仅知道与 OPG/RANK/RANKL 信号系统相关,但对其具体作用机制尚未明确。骨折愈合机制复杂,且中药的调控存在多靶点、多途径、多层次的特点,因此尚需进一步的研究对其进行探索。

# 参考文献

- [1] World congress on osteoporosis,osteoarthritis and musculoskeletal diseases (WCO-IOF-ESCEO 2019): ESCEO-WHO collaborating centre for public health aspects of musculoskeletal health and ageing symposium abstracts (ESCEO-WHO CC) [J]. Osteoporosis International, 2019,30(Suppl 2):191-192.
- [2] LESLIE WD, LIX LM, BINKLEY N. Osteoporosis treatment considerations based upon fracture history, fracture risk assessment, vertebral fracture assessment, and bone density in Canada[J]. Archives of Osteoporosis, 2020, 15(1):93.
- [3] YANG B, LI S, CHEN Z, FENG F, et al. Amyloid beta peptide promotes bone formation by regulating Wnt/beta-catenin signaling and the OPG/RANKL/RANK system [J]. FASEB Journal, 2020, 34(3):3583-3593.
- [4] LIAO L, LIN Y, LIU Q, et al. Cepharanthine ameliorates titanium particle-induced osteolysis by inhibiting osteoclastogenesis and modulating OPG/RANKL ratio in a murine model[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 517(3):407-412.
- [5] CHEN D, YE Z, WANG C, et al. Arctiin abrogates osteoclastogenesis and bone resorption via suppressing RANKL-induced ROS and NFATc1 activation[J]. Pharmacological Research, 2020, 159:104944.
- [6] FU D, QIN K, YANG S, et al. Proper mechanical stress promotes femoral head recovery from steroid-induced osteonecrosis in rats through the OPG/RANK/RANKL system[J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2020, 21(1):281.
- [7] 黄永明, 许少健, 石宇雄, 等. 骨松安胶囊治疗绝经后骨质疏松症 34 例[J]. 陕西中医, 2006, 27(8):954-956.
- [8] WANG H, LI Y K, CUI M, et al. Effect of lncRNA AK125437 on postmenopausal osteoporosis rats via MAPK pathway [J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2020, 24(5):2173-2180.
- [9] 王斌, 罗毅文, 黄永铨, 等. 补肾活血汤促骨折端间充质干

细胞体外迁移及 CCR2 表达的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(8):1-5.

- [10] 王斌, 胡年宏, 罗毅文. 从中医“肾主骨”“髓生骨”理论出发防治骨质疏松[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 1(3):3-4.
- [11] 黄宏兴, 吴青, 李跃华, 等. 肌肉、骨骼与骨质疏松专家共识[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(10):1221-1229.
- [12] TSUDA E, GOTO M, MOCHIZUKI S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 234(1):137-142.
- [13] SIMONET W S, LACEY D L, DUNSTAN C R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997, 89(2):309-319.
- [14] WANG P, CAO Y, ZHAN D, et al. Influence of DNA methylation on the expression of OPG/RANKL in primary osteoporosis[J]. International Journal of Medical Sciences, 2018, 15(13):1480-1485.
- [15] BERNARDI S, BOSSI F, TOFFOLI B, et al. Roles and clinical applications of OPG and TRAIL as biomarkers in cardiovascular disease[J]. BioMed Research International, 2016:1752854.
- [16] MA Q L, FANG L, JIANG N, et al. Bone mesenchymal stem cell secretion of sRANKL/OPG/M-CSF in response to macrophage-mediated inflammatory response influences osteogenesis on nanostructured Ti surfaces[J]. Biomaterials, 2018, 154:234-247.
- [17] MIZUNO A, AMIZUKA N, IRIE K, et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 247(3):610-615.
- [18] BUCAY N, SAROSI I, DUNSTAN C R, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification[J]. Genes & Development, 1998, 12(9):1260-1268.
- [19] 孙晓新, 张柳, 姜小华, 等. 脑外伤对大鼠骨折愈合过程中 OPG/RANKL 表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18(4):412-416.
- [20] WANG J, HE M, WANG G, et al. Organic gallium treatment improves osteoporotic fracture healing through affecting the OPG/RANKL ratio and expression of serum inflammatory cytokines in ovariectomized rats[J]. Biological Trace Element Research, 2018, 183(2):270-279.

(收稿日期:2021-06-21)