

青娥方对膝骨关节炎伴骨质疏松模型大鼠早期软骨下骨整合素及抑癌基因表达的影响

唐崇曦¹ 戴焱^{1,2△} 唐光平² 徐平²

[摘要] 目的:观察青娥方药液对膝骨关节炎伴骨质疏松模型大鼠软骨下骨中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 及 P53 基因表达的影响。方法:将 30 只 SD 大鼠编号后,随机分为正常组(A 组)、青娥方组(B 组)、骨质疏松组(C 组)、骨关节炎伴骨质疏松组(D 组)和骨关节炎组(E 组),每组 6 只。将 B 组、C 组和 D 组大鼠腹腔注射麻醉后,行骨质疏松造模。1 个月后,再将 B 组、D 组、E 组三组大鼠麻醉后行骨关节炎造模,术后行相同处理。经二次造模 1 d 后,B 组大鼠持续 4 周每天灌服 1 次药液。其余各组大鼠以相同剂量每天灌服 1 次生理盐水。结果:正常组整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因在第 2、4 周均呈弱上调表达,表达水平维持相对稳定;B 组整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因表达随着时间的推移先呈现出较 A 组增高的水平,但逐渐出现下降趋势;B 组整合素 $\alpha_v\beta_3$ 及 P53 基因水平表达相对稳定,趋近 A 组;相较于 D 组,B 组大鼠经青娥方治疗后,其胫骨髌软骨下骨组织中的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因表达水平在第 2、4 周的差异有统计学意义($P<0.05$)。C 组、D 组、E 组三个时间点 P53 基因均呈弱上调表达,随着时间的推移,P53 表达水平小幅度上升;B 组 P53 基因表达水平与 A 组差异无统计学意义($P>0.05$),且低于同时期其他三组。结论:青娥方能够抑制整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在软骨下骨组织中的表达,从而降低破骨细胞活性,减少骨吸收,有利于促进骨吸收、骨形成平衡的恢复,而对 P53 基因表达的抑制作用尚不明显。

[关键词] 青娥方;骨质疏松;骨关节炎;整合素;抑癌基因

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)05-0001-05

Efficacy of Qing'e Decoction on the Expression of $\alpha_v\beta_3$ Integrin and P53 Gene in Subchondral Bone of Knee Osteoarthritis with Osteoporosis Model Rats

TANG Chongxi¹ DAI Yi^{1,2△} TANG Guangping² XU Ping²

¹ Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

² Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430050, China.

Abstract Objective: To observe the efficacy of Qing'e prescription on $\alpha_v\beta_3$ integrin and P53 gene expression levels in subchondral bone tissue of osteoporotic knee osteoarthritis (KOA) rats, and to explore the mechanism of Qing'e policy on subchondral bone tissue in further discussion, so as to provide theoretical reference for the clinical treatment of osteoporotic KOA. **Methods:** 30 SD rats were randomly divided into normal group (group A), Qing'e prescription group (group B), osteoporosis model group (group C), osteoporosis osteoarthritis model group (group D) and osteoarthritis model (group E), with 6 rats in each group. Their osteoporosis models were established after group B, group C and group D rats being anesthetized by intraperitoneal injection. The osteoarthritis model of rats in groups B, D and E was established after anesthesia, and the same treatment was performed after operation one month after modeling. Then group B was per-

fused with Qing'e prescription solution on the second day after operation, and the other groups were perfused with the same amount of normal saline, once a day for 4 weeks. **Results:** The expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin was weakly up-regulated at 2 and 4 weeks in group A, and the expression level remained relatively. With the passage of time, the $\alpha_v\beta_3$ integrin expression in group B first increased compared with group A, but gradually decreed stable. Compared with group D,

基金项目:全国中医药创新骨干人才培训项目(国中医人教函 2019-128 号)

湖北省自然科学基金项目(2017CFB485)

武汉市卫健委重大项目(WZ21M02)

¹ 湖北中医药大学(武汉,430065)

² 武汉市中医医院骨伤科

△通信作者 E-mail:daiyiw@163.com

the difference of the $\alpha_v\beta_3$ integrin expression level in the subchondral bone tissue of tibial condyle in group B after treatment with Qing'e prescription in the second and fourth weeks was statistically significant. The expression of P53 gene was weakly up-regulated in group C, group D and group E. With the passage of time, the expression level of P53 increased slightly, there was no significant difference in P53 gene expression between group B and group A, and it was lower than that of the other three groups at the same time. **Conclusion:** Qing'e prescription can inhibit the expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin in subchondral bone tissue, and reduce the bone resorption of subchondral bone in osteoporotic osteoarthritis, and inhibit the imbalance of bone resorption in the process of bone reconstruction, but the inhibitory efficacy on P53 gene expression is not obvious.

Keywords: Qing'e decoction; osteoporosis; osteoarthritis; integrin; tumor suppressor gene

膝骨关节炎(KOA)是一种以关节软骨退变,继发性骨赘形成、软骨下骨代谢异常、滑膜炎表现等为主要特征的慢性退行性疾病^[1]。骨质疏松(OP)是一种慢性代谢性疾病,以骨量丢失、骨微观结构改变骨小梁稀疏为特征^[2]。由于OP会致使软骨下骨量丢失,并加速软骨的损失,故对骨关节炎(OA)的发生和发展起到重要作用^[3]。因此,如何抑制软骨下骨丢失、促进骨重建,成为防治KOA伴OP的重点。已有研究表明,骨基质弹性通过整合素/FAK/P53/Gadd45调控轴影响软骨细胞增殖、凋亡及OA的早期发生^[4]。其中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 可以诱导破骨细胞向骨基质的迁移、黏附与活化,促使骨吸收装置的形成^[5]。P53基因作为一种抑癌基因,能够影响特异性受体的表达,诱导成骨细胞凋亡,使成骨-破骨失衡^[6],影响骨重建。有关研究显示,青娥方能改善软骨下骨微观结构及软骨下骨代谢水平,故本研究以“成骨-破骨”作为切入点,观察青娥方对膝骨关节炎伴骨质疏松模型大鼠软骨下骨中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 及P53基因表达的影响,探究其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

30只健康SD大鼠,均为雌性,体质量150~170g,由三峡大学实验动物中心提供,许可证号为SCXK(鄂)2017-0012。实验前所有大鼠适应性喂养5d,实验期间自由饮水、摄食。

1.2 实验用品

1.2.1 主要试剂 寡核苷酸引物均购自上海博亚生物技术公司;RNA酶抑制剂均购自中国华美生物制品公司;反转录DNA合成试剂盒均购自美国赛默公司;TRAP酶染色试剂盒、DNA分子标记、TNF- α 、四氢唑蓝、RNase酶、碘化丙啶均购自美国西格玛公司;胰蛋白酶均购自美国BDH化工公司;Tag酶、脱氧核糖核苷三磷酸均购自中国晶美生物工程有限公司。

1.2.2 主要仪器设备 水浴箱购自Precision Scientific公司;微型涡旋振荡器购自中国上海沪西分析仪器厂;聚合酶链式反应仪(ABI PRISM 7000 Sequence Detection System);冷冻离心机购自Beckman公司;CO₂

培养箱购自日本RIKA-KOGYO公司;SYBR[®] Green PCR Master Mix均购自美国Applied Biosystems公司。

1.2.3 实验药物 根据《中国药典(2015版)》选取杜仲(盐炒)480g,补骨脂(盐炒)240g,核桃仁(炒)150g和大蒜120g,参照文献^[7]所述方法制作药液。将上述全部药物加水正常煎煮后,用灭菌纱布过滤、取汁,如此重复3次,并将3次煎煮后药液合并。合并后的药液加乙醇沉淀、过滤,再回收全部乙醇。加热药汁浓缩成浓度为1g/mL生药的药液,经脱色、滤装、灭菌后,密封冷藏。使用前将浓缩液加生理盐水按一定剂量配成4mL/d剂量灌服实验组大鼠。实验药液均由本院药理学三级实验室研制提供。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 将30只SD大鼠编号后,应用随机数字表法抽取大鼠,将所有大鼠分为正常组(A组)、青娥方组(B组)、骨质疏松模型组(C组)、骨关节炎伴骨质疏松模型组(D组)和骨关节炎模型(E组),每组6只。

1.3.2 实验动物模型制备 将B组、C组和D组大鼠腹腔注射麻醉后,按照骨质疏松造模法^[8]造模,其余各组大鼠在腹腔注射麻醉后仅切开背部皮肤,再逐层缝合伤口。造模1个月后,将B组、D组、E组三组大鼠腹腔注射麻醉后,按照骨关节炎造模法^[9]造模,其余组在相同位置切开皮肤,逐层分离软组织后暴露关节腔,予适量生理盐水冲洗,不破坏韧带及半月板等组织,再逐层缝合。经二次造模1d后,B组大鼠持续4周每天灌服1次药液。其余各组大鼠以相同剂量每天灌服1次生理盐水。

1.3.3 标本采集及处理 在所有实验大鼠灌服1周后,各组分别选取2只大鼠,麻醉后暴露左侧后肢膝关节,剔除清理软组织后,截取胫骨髁组织,分离后用腹主动脉彻底抽血法处死大鼠。剩余实验大鼠分别在灌服2周及4周后均照此法操作,获取实验标本。

1.3.4 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 及P53基因的mRNA表达的测定

1.3.4.1 引物设计及合成 实验引物设计运用Primer Expression 5.0软件计算机辅助进行。引物基因序列从基因银行数据库中获得,由美国英杰生命公

司合成,见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物	
基因	引物序列
Integri	正向 5'ACCAGCAATCAGAGATGGATACTTC3'
	逆转 5'ATCAGGGCTTGAAACTCCTCTTAT3'
P53	正向 5'GTGACTGGTGGCTGCCTGAG3'
	逆转 5'ACGTGCCCAGAAAGTGGACG3'
GAPDH	正向 5'GCGGGGCTCTCCAGAACATC3'
	逆转 5'ACTGACACGTTGGCAGTGGG3'

1.3.4.2 骨组织总 mRNA 的提取及 $\alpha_v\beta_3$ 和 P53 的 RNA 测定 将少量液氮倒入研钵内,再将实验标本加入研钵研成粉末状后,再移入玻璃匀浆器,加入 Trizol (100 mg组织+2 mL 以上 Trizol)冷冻,室温孵育 5 min 后,移入 EP 管内离心 12 min,再取上清液分装入无酶 EP 管,加氯仿(0.2 mL 氯仿/1 mL Trizol),混匀 15 s,室温静置 3 min,4 ℃ 12 000g 离心 17 min,取上清液至新无酶 EP 管;加异丙醇(0.5 mL 异丙醇/1 mL Trizol),室温静置 10 min,4 ℃ 12 000g 离心 12 min,弃上清液,留取沉淀;75%冷乙醇振荡洗涤沉淀(至少 1 mL 75%乙醇/1 mL

Trizol),4 ℃ 7 500g 离心 7 min,弃乙醇,空气干燥;加 50 μ L DEPC 处理水溶解 RNA,即获得所需样品。为了保证实验样品有效性,避免样品内标本降解,在室温下将所得样品分别装入 3 管,选取 1 管样品先进行相关检测和逆转录,其余样品管冷藏备用。样品检测合格后,选取适量标本首先进行反转录 DNA 的提取,再扩增 RNA,最后测定出所需的 $\alpha_v\beta_3$ 及 P53 的 RNA 表达数值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,服从正态分布的数据用 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。组间比较用单因素方差分析、方差齐性检验。不符合正态分布的数据,先行自然对数转换再分析。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨下骨 RT-qPCR 反应

所测的 2 种基因的溶解曲线及扩增曲线如图 1—图 3 所示,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 及 P53 两个目的基因及内参基因 GAPDH 的表达均为单峰,表明整合素 $\alpha_v\beta_3$ 及 P53 基因在现有的实验条件下的扩增方式为特异性扩增。

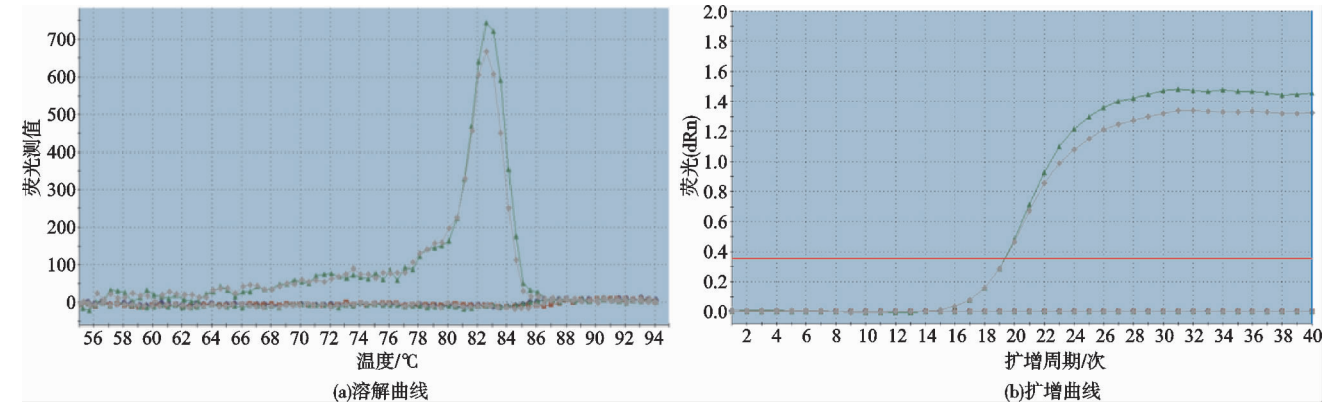


图 1 正常组胫骨组织整合素 $\alpha_v\beta_3$ 溶解曲线及扩增曲线

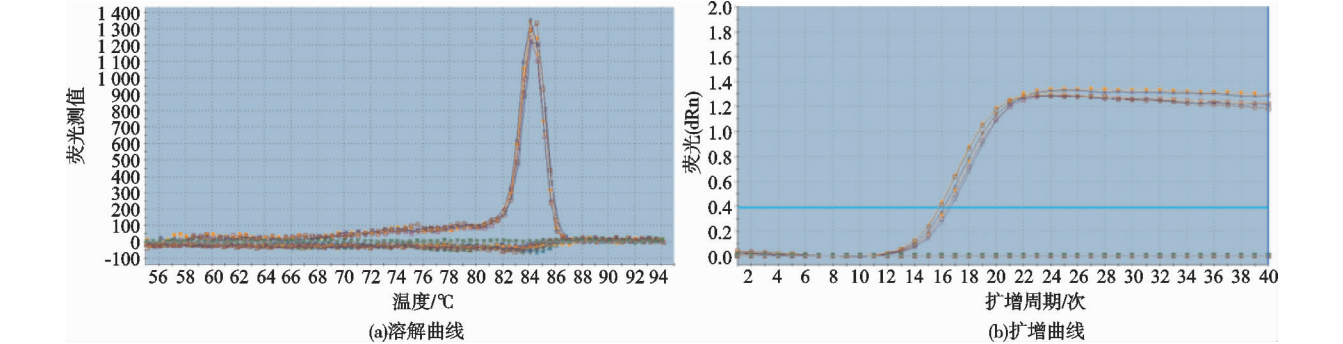


图 2 正常组胫骨组织 P53 溶解曲线及扩增曲线

2.2 软骨下骨整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达结果

随着时间的推移,A 组整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因在第 2、4 周均呈弱上调表达,表达水平维持相对稳定;B 组整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因表达随着时间的推移先呈现出较 A 组增高的水平,但逐渐出现下降趋势;C 组整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因在第 1、2、4 周的表达强度明显高于 A 组,其中第 2 周的基因表达水平为峰值,随后有大幅度下降;D 组整

合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因第 1、2、4 周的表达强度均明显高于其他组,其中第 2 周的基因表达水平为峰值,随后有大幅度下降;E 组整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因表达水平在第 1 周至第 2 周没有明显变化,反而在第 4 周基因表达水平达到实验峰值。最终,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在 C 组、D 组和 E 组三组的表达均显著高于同期 B 组水平。相较于 D 组,B 组大鼠经青娥方药液治疗后,其胫骨髌软骨下骨组织

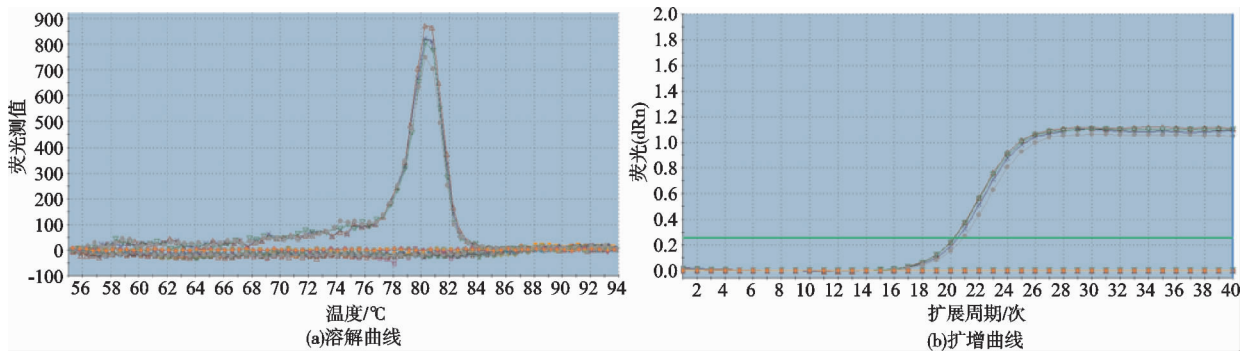


图3 正常组胫骨组织 GAPDH 溶解曲线及扩增曲线

中的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因表达水平在第 2 周和第 4 周的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表2 各软骨下骨组织整合素 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 周	第 2 周	第 4 周
A 组	1.00 ± 0.00	1.36 ± 0.08	1.42 ± 0.07
B 组	2.10 ± 0.19	1.72 ± 0.16▲	1.54 ± 0.09▲
C 组	2.57 ± 0.21	2.90 ± 0.11	2.64 ± 0.09
D 组	3.06 ± 0.37	3.89 ± 0.13	3.14 ± 0.26
E 组	2.35 ± 0.30	2.18 ± 0.41	3.09 ± 0.47

注: ▲青娥方组(B组)在治疗后第 2 周 $t = 42.74$, $P = 0.0411$; 在治疗后第 4 周 $t = 52.61$, $P = 0.0396$ 。

2.3 软骨下骨 P53 基因表达结果

C 组、D 组、E 组三个时间点 P53 基因均呈弱上调表达, 随着时间的推移, P53 表达水平小幅度上升; B 组 P53 基因表达水平与 A 组无显著性差别, 且低于同时期其他三组, 见表 3。

表3 各骨组织 P53 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 周	第 2 周	第 4 周
A 组	1.00 ± 0.00	1.24 ± 0.15	1.22 ± 0.01
B 组	1.37 ± 0.06	1.33 ± 0.06	1.43 ± 0.12
C 组	1.43 ± 0.11	1.73 ± 0.34	1.76 ± 0.07
D 组	1.56 ± 0.13	1.83 ± 0.35	1.84 ± 0.03
E 组	1.40 ± 0.12	1.55 ± 0.22	2.06 ± 0.34

3 讨论

本研究为了模拟膝关节关节炎伴骨质疏松的病理表现, 利用两种方法分别建立了大鼠骨关节炎模型和骨质疏松模型, 并在两种模型上构建了膝关节关节炎伴骨质疏松模型。相关研究表明, 相比单纯的骨质疏松症与骨关节炎的造模组, 运用此种方法的造模组的软骨损伤程度更加严重^[10-11], 满足了本研究的造模要求。

软骨下骨作为骨组织中的一种特殊结缔组织, 由细胞外基质 (ECM) 和多种骨细胞共同组成。软骨下骨重建由按一定时序交替进行的骨吸收与骨形成组成, 骨吸收是骨基质不断降解的过程, 正常的骨重建有赖于两者间的动态平衡, 以维持机体骨量的稳定^[12]。女性在绝经后, 由于卵巢功能衰退, 内源性雌激素分泌减少, 骨细胞上雌激素受体下降, 骨吸收与骨形成之间的偶联出现缺陷, 吸收陷窝加深^[13]。同时, 骨形成速

度减慢, 逐渐出现不可逆的骨丢失, 从而造成关节下骨质疏松表现^[14]。

在骨吸收过程中, 发挥主要功能的细胞是破骨细胞。破骨细胞发挥其骨吸收作用时首先需要向骨基质迁移、黏附, 而破骨细胞膜上的整合素在此过程中起到至关重要的作用^[15]。整合素是一种细胞黏附分子, 具有介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质黏附的作用, 同时还参与细胞的信号传递和功能调控^[16-18]。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是破骨细胞表达水平最强的黏附分子^[19], 骨吸收启动前, 破骨细胞先被整合素 $\alpha_v\beta_3$ 诱导向骨基质的转移、黏附和活化后, 再协同形成骨吸收装置, 骨吸收即由此展开。因此, 抑制整合素 $\alpha_v\beta_3$ 基因的表达, 就能降低破骨细胞活性, 减少骨吸收, 促进骨吸收与骨形成平衡的恢复。

P53 基因是一种抑制癌细胞生成与扩散的基因, 作为被最早发现且研究最广泛的抑癌基因之一, 能够调节细胞周期、诱导细胞凋亡。Jika 等^[20]研究认为: 当骨细胞凋亡率升高时, 空骨陷窝通过扩大的骨小管相互融合, 致使骨小梁的空隙加大, 并导致力学性能下降和骨量减少, 使骨组织对应力刺激感受降低, 导致整个网络活性降低, 结果骨吸收和骨形成拆偶联, 使骨吸收大于骨形成。相关研究显示^[21], P53 基因不仅参与 OP 的发病, 且是成骨细胞形成、成骨细胞依赖性、破骨细胞形成和骨重塑的负调控因子。因此, 抑制 P53 基因的过度表达, 理论上就能减少成骨细胞的过度凋亡, 避免过度形成拆偶联, 促进骨形成, 进而恢复骨重建的动态平衡。

本研究中, 伴随着时间的推移, C 组、D 组、E 组三组的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 P53 基因的表达均显著增长, 说明二者与骨质疏松和骨关节炎的形成均密切相关。相反, B 组 (青娥方组) 的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达在青娥方的作用下, 随着时间的推移不断趋于正常水平, 提示青娥方能够抑制整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达, 减少此类骨关节炎中软骨下骨的骨吸收。尽管青娥方对于 P53 基因表达的抑制作用不如对整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的作用明显, 但仍可看出 B 组 P53 基因表达水平趋近 A 组。先期研究表明^[22], 青娥方针对 KOA 伴 OP 模型大鼠的软骨下骨组织,

能够改善其微观结构及骨小梁四项评分,抑制基质金属蛋白酶 3(MMP3)和骨桥蛋白(OPN)的表达,防止骨丢失。结合本研究结果,其作用可能是通过 MMP3/OPN/整合素 $\alpha_v\beta_3$ /P53 途径实现。

青娥方中杜仲为坚固肾气、强筋健骨之要药,善治腰腿酸胀、脚膝作痛。补骨脂,辛、温、苦,归脾肾二经,能够益肾精、强肾阳,善治因肾虚阳亏导致的腰部酸胀疼痛,膝部冰冷刺痛等,常与杜仲同用,疗效更好。核桃仁,甘、温,亦归肾经,具有填精益肾、温阳敛气之功,善治腰膝酸软等证。大蒜,辛、温,能行气温里,散寒导滞,可防诸药补涩碍气之过。四药合用,共奏益肾补阳、强腰舒筋之功。本研究表明青娥方至少能够作用于两类完全不同的靶点,不仅能够提高骨形成率,也能降低骨吸收作用,起到双向调节的良好效果。另有研究也从其他角度证明,青娥方是对机体整体状态进行调整,通过作用于不同靶点,使机体多环节失衡的因素得以纠正,从而发挥抗骨质疏松的作用^[23-24]。有关临床研究显示,相对于其他抗骨质疏松药物,青娥丸安全简便,无不良反应,患者依从性好,无影响患者心理精神行为、增加恶性肿瘤发病率等副作用,值得临床推广应用^[23]。

综上所述,经骨质疏松及骨关节炎造模后的大鼠,相较于正常大鼠,其胫骨髁软骨下骨中的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 及 P53 基因表达水平均显著提高,表明在软骨下骨的骨重建失衡过程中,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 P53 基因的表达有重要作用,其表达水平的增加明显促进了骨吸收作用,导致了骨重建的失衡,其影响途径可能通过 MMP3/OPN/整合素 $\alpha_v\beta_3$ /P53 通路实现。而青娥方能够抑制整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达,抑制骨重建过程进一步向骨吸收失衡,起到延缓此类骨性关节炎发展恶化的作用。至于青娥方能否降低 P53 基因的表达,尚需要进行大样本多层次的研究。

参考文献

- [1] SHARMA L. Osteoarthritis of the knee[J]. N Engl J Med, 2021, 384(1): 51-59.
- [2] MILLER P D. Management of severe osteoporosis[J]. Expert Opin Pharmacother, 2016, 17(4): 473-488.
- [3] HUGLE T, GEURTS J. What drives osteoarthritis-synovial versus subchondral bone pathology[J]. Rheumatology, 2017, 56(9): 1461-1471.
- [4] 祖岩, 李强, 杨春. 基质弹性通过整合素/FAK 触发 p53 核内聚集影响软骨细胞功能及骨关节炎发病[J]. 医用生物力学, 2019, 34(S1): 53.
- [5] 孙雨晴, 罗文娟, 王柄祺, 等. 青娥方对卵巢切除大鼠骨组织骨桥蛋白、骨唾液蛋白及其受体整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的影响[J]. 康复学报, 2017, 27(3): 23-30.
- [6] FUJITA K, JANZ S. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF[J]. Molecular Cancer, 2007, 6: 71.

- [7] 帅波, 杨功旭, 沈霖, 等. 加味青娥丸对激素性股骨头坏死小鼠局部 1, 25(OH)₂D₃/VDR mRNA/RAS 信号转导通路的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(7): 1-5.
- [8] 李晓曦, 陈宇恒, 唐秀凤, 等. 基于雌激素作用的淫羊藿女贞子配伍对绝经后骨质疏松症大鼠的影响研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019, 27(9): 1-6.
- [9] 金剑飞, 何维英, 周钰龙. 淫羊藿总黄酮对膝关节骨性关节炎大鼠核因子- κ B 通路的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(3): 5-9.
- [10] 钟培瑞, 廖瑛, 廖源, 等. 去卵巢对大鼠膝关节软骨及软骨下骨的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2017, 6(11): 5-10.
- [11] ZHOU J, ZHONG P R, LIAO Y, et al. Electroacupuncture ameliorates subchondral bone deterioration and inhibits cartilage degeneration in ovariectomised rats[J]. Acupuncture Med, 2018, 36(1): 37-43.
- [12] 周丕琪, 沈霖, 杨艳萍, 等. 密骨片治疗绝经后骨质疏松症的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 1997, 5(1): 20-22.
- [13] ZOU C, SONG G, LUO Q, et al. Mesenchymal stem cells require integrin β_1 for directed migration induced by osteopontin in vitro[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Animal, 2011, 47(3): 241-250.
- [14] MALAVAL L, AUBIN J E, VICO L. Role of the small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein(SIBLING), bone sialoprotein (BSP) in bone development and remodeling[J]. Osteoporos Int, 2009, 20(6): 1077-1080.
- [15] ZHAO H, PATRICK R F. Mechanisms of osteoclastic secretion[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1116(1): 238-244.
- [16] ZOU W, TEITELBAUM S L. Integrins, growth factors, and the osteoclast cytoskeleton[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1192(1): 27-31.
- [17] BARCZYK M, CARRACEDO S, GULLBERG D. Integrins[J]. Cell Tissue Res, 2010, 339(1): 269-280.
- [18] CAMPBELL I D, HUMPHRIES M J. Integrin structure, activation, and interactions[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(3): 594-601.
- [19] NAKAMURA I, LE T D, RODAN S B, et al. Involvement of $\alpha_v\beta_3$ integrins in osteoclast function[J]. J Bone Miner Metab, 2007, 25(6): 337-344.
- [20] JIKA R L, WEMSTEIN R S, BELLIDO T, et al. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone[J]. J Clin Invest, 1999, 104(4): 439-446.
- [21] 朱换平, 石敏, 张维平, 等. 杜仲腰痛丸调控 p53 对老年骨质疏松症患者骨密度、骨代谢及骨形成影响的作用机制[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(2): 257-262.
- [22] 戴焱, 范彦博, 赵雅靓, 等. 青娥方对骨质疏松骨关节炎模型鼠早期软骨下骨基质金属蛋白酶 3 和骨桥蛋白表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(10): 1-5.
- [23] 王金蕴, 林燕萍. 青娥丸治疗绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(10): 70-72.
- [24] 马陈, 沈霖, 杨艳萍, 等. 青娥丸对绝经后骨质疏松症患者血清抗原相关细胞黏附分子 1, β -链蛋白水平及骨密度的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(2): 15-18.

(收稿日期: 2021-11-03)