

健骨方对破骨细胞-成骨细胞的偶联效应及作用机制

卢秀丽¹, 许华珍¹, 陈玉兴^{2,3}, 姚楠^{2,3}, 胡子旋^{2,3}, 黄丹娥^{2,3}

<https://doi.org/10.12307/2025.970>

投稿日期: 2024-06-17

采用日期: 2024-08-28

修回日期: 2025-03-03

在线日期: 2025-03-14

中图分类号:

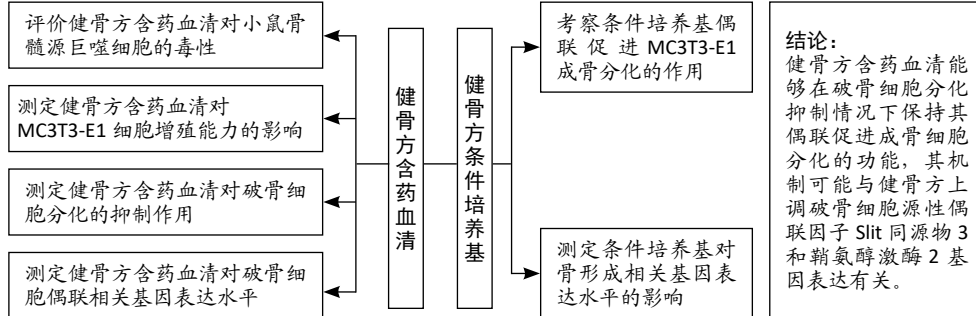
R459.9; R318; R580

文章编号:

2095-4344(2025)32-06828-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 基于破骨细胞-成骨细胞偶联分析健骨方治疗骨质疏松的作用机制



文题释义:

健骨方: 参考广东省第二中医临床应用效果较佳的经验方, 在中医基础理论的指导下, 根据《太平圣惠方》治腰脚疼痛不止方和《医学启源》生脉散方加减化裁而成。健骨方处方包含了骨碎补、牛膝、千年健、补骨脂、人参、麦冬、鸡血藤等7味中药。前期研究发现, 健骨方可以通过抑制骨吸收促进骨形成起到双效抗骨质疏松治疗作用。

骨吸收-骨形成偶联: 破骨细胞在分化、成熟过程中通过释放一些“偶联因子”如鞘氨醇-1-磷酸、Slit同源物3和补体C3a等, 这些“偶联因子”的释放会诱导成骨细胞分化、沉积形成新骨, 这个现象称为骨吸收-骨形成的“偶联”, 是一种破骨细胞与成骨细胞之间的通讯方式。

摘要

背景: 前期研究发现, 健骨方可以通过抑制骨吸收促进骨形成起到双效抗骨质疏松的治疗作用, 但其作用机制尚未阐明。

目的: 考察健骨方对骨吸收-骨形成的偶联效应和作用机制。

方法: 制备健骨方含药血清, 通过MTT法测定健骨方含药血清对小鼠骨髓源巨噬细胞的毒性; 应用CCK-8法测定健骨方含药血清对MC3T3-E1细胞增殖能力的影响; 采用抗酒石酸酸性磷酸酶染色法测定健骨方含药血清对破骨细胞分化的抑制作用; 制备健骨方条件培养基, 通过碱性磷酸酶染色测定条件培养基偶联促进MC3T3-E1细胞成骨分化的作用; RT-qPCR法测定健骨方含药血清对破骨细胞偶联基因鞘氨醇激酶2、含胶原三螺旋重复蛋白1、Slit同源物3 mRNA水平以及条件培养基对骨形成相关基因分泌型磷酸蛋白1、碱性磷酸酶、SP7转录因子、酸性富含半胱氨酸分泌型蛋白 mRNA水平的影响。

结果与结论: ①MTT法和CCK-8法结果显示, 健骨方含药血清在低于5%浓度下对细胞无显著毒性作用; ②抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果显示, 健骨方含药血清在2.5%、1.25%和0.63%浓度时剂量依赖性抑制破骨细胞的分化; ③碱性磷酸酶染色结果显示, 健骨方破骨细胞条件培养基呈剂量依赖性促进成骨细胞分化; ④RT-qPCR检测结果显示, 0.63%健骨方含药血清可以提高破骨细胞源性偶联因子Slit同源物3和鞘氨醇激酶2的mRNA水平, 其条件培养基可以提高骨形成相关基因分泌型磷酸蛋白1、SP7转录因子和酸性富含半胱氨酸分泌型蛋白mRNA表达水平; ⑤提示健骨方含药血清能够在抑制骨吸收的情况下促进骨形成, 其机制可能与促进骨吸收-骨形成偶联因子Slit同源物3和鞘氨醇激酶2的mRNA表达有关。

关键词: 健骨方; 骨吸收; 骨形成; 骨质疏松症; 偶联; 破骨细胞; 成骨细胞; 骨稳态; 工程化组织构建

Mechanism of Jiangu Formula in treating osteoporosis based on osteoclast-osteoblast coupling

Lu Xiuli¹, Xu Huazhen¹, Chen Yuxing^{2,3}, Yao Nan^{2,3}, Hu Zixuan^{2,3}, Huang Dane^{2,3}

¹The Fifth Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China; ²Guangdong Provincial Second Hospital of Traditional Chinese Medicine (Guangdong Provincial Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510095, Guangdong Province, China; ³Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China

Lu Xiuli, Master candidate, The Fifth Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China

Corresponding author: Huang Dane, Associate chief pharmacist, Guangdong Provincial Second Hospital of Traditional Chinese Medicine (Guangdong Provincial Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510095, Guangdong Province, China; ³Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China

¹广州中医药大学第五临床医学院, 广东省广州市 510095; ²广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院), 广东省广州市 510095;

³广东省中医药研究开发重点实验室, 广东省广州市 510095

第一作者: 卢秀丽, 女, 2000年生, 广州中医药大学第五临床医学院在读硕士, 主要从事中药药理学方面的研究。

通讯作者: 黄丹娥, 副主任药师, 广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院), 广东省广州市 510095; 广东省中医药研究开发重点实验室, 广东省广州市 510095

<https://orcid.org/0009-0002-1160-9834> (卢秀丽)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(82104473), 项目负责人: 黄丹娥; 国家自然科学基金青年科学基金项目(82474347),

项目负责人: 黄丹娥; 广东省自然科学基金(2023A1515010752), 项目负责人: 黄丹娥; 广东省第二中医院科研创新基金项目

(SEZY2023A02), 项目负责人: 姚楠

引用本文: 卢秀丽, 许华珍, 陈玉兴, 姚楠, 胡子旋, 黄丹娥. 健骨方对破骨细胞-成骨细胞的偶联效应及作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(32):6828-6835.



Abstract

BACKGROUND: Previous studies have found that *Jiangu* Formula can play a dual role in anti-osteoporosis therapy by inhibiting bone resorption and promoting bone formation, but its mechanism of action has not been elucidated.

OBJECTIVE: To investigate the effect of *Jiangu* Formula on the coupling mechanism between bone resorption and bone formation at the cellular and molecular levels.

METHODS: Serum containing *Jiangu* Formula was prepared and its toxicity to bone marrow derived macrophages was determined using MTT assay. The cell proliferation ability of MC3T3-E1 cells that treated *Jiangu* Formula medicated serum was measured by using cell counting kit-8 method. Tartrate resistant acid phosphatase staining was used to determine the bone resorption inhibition effect of serum containing *Jiangu* Formula on osteoclast differentiation. The *Jiangu* Fang conditional culture medium was prepared and the promoting effect of the conditional culture medium on bone formation of MC3T3-E1 was determined through alkaline phosphatase staining. The effect of serum containing *Jiangu* Formula on the mRNA levels of osteoclast associated sphingosine kinase 2, collagen triple helix repeat containing 1, and slit homolog 3 coupled genes, as well as the effect of conditioned culture medium on the mRNA levels of bone formation related secreted phosphoprotein 1, alkaline phosphatase, Sp7 transcription factor, and secreted protein acidic and rich in cysteine genes, were determined by RT-qPCR method.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The MTT and cell counting kit-8 methods showed that serum containing *Jiangu* Formula had no significant cytotoxic effects at a concentration of < 5%. (2) Tartrate resistant acid phosphatase staining results indicated that serum containing *Jiangu* Formula dose-dependently inhibited osteoclast differentiation at 2.5%, 1.25%, and 0.63% concentrations. (3) The alkaline phosphatase staining results showed that the osteoclast conditioned medium of *Jiangu* Formula promoted osteoblast differentiation in a dose-dependent manner. (4) In addition, RT-qPCR results showed that serum containing 0.63% *Jiangu* Formula could increase the mRNA levels of osteoclast derived slit homolog 3 and sphingosine kinase 2 coupling factors, and the conditional culture medium could increase the mRNA expression levels of bone formation related secreted phosphoprotein 1, Sp7 transcription factor, and secreted protein acidic and rich in cysteine. To conclude, the serum containing *Jiangu* Formula can promote bone formation while inhibiting bone resorption, and its mechanism may be related to the mRNA expression of the coupling factors osteoclast derived slit homolog 3 and sphingosine kinase 2 that promote bone resorption and bone formation.

Key words: *Jiangu* Formula; bone resorption; bone formation; osteoporosis; coupling; osteoclasts; osteoblasts; bone homeostasis; engineered tissue construction

Funding: National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 82104473 (to HDE); National Natural Science Foundation of China (Youth Program), No. 82474347 (to HDE); National Science Foundation of Guangdong Province, No. 2023A151010752 (to HDE); Guangdong Second Hospital of Traditional Chinese Medicine Scientific Research and Innovation Fund Project, No. SEZY2023A02 (to YN)

How to cite this article: LU XL, XU HZ, CHEN YX, YAO N, HU ZX, HUANG DE. Mechanism of *Jiangu* Formula in treating osteoporosis based on osteoclast-osteoblast coupling. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(32):6828-6835.

0 引言 Introduction

骨骼的健康主要依赖于骨重塑过程中破骨细胞介导的骨吸收和成骨细胞介导的骨形成对骨骼的持续更新以维持正常的机械力和钙稳态。衰老或雌激素缺乏等病理状态下，骨吸收功能大于骨形成功能，骨流失加剧，导致骨量减少、骨组织微结构退化，引发骨质疏松症^[1-2]。据统计，全球每年因骨质疏松而发生的脆性骨折患者约有 900 万^[3]，预计到 2050 年国内骨质疏松症或骨密度低的患者将达到 2.12 亿^[4-5]。随着老龄化社会的加剧，骨质疏松症已经成为严重危害人类健康和社会经济发展的重大老年慢性慢性疾病^[6]。

破骨细胞是目前发现的唯一具有骨吸收功能的细胞，它的过度活跃也被认为是骨质疏松症发生的核心因素^[7-8]。因此，抑制破骨细胞过度活跃所致的骨吸收是临床上治疗骨质疏松的核心疗法^[9-11]。然而越来越多的研究表明，在骨重塑过程中，破骨细胞除了负责吸收衰老或受损的骨质之外，还能够在细胞分化、成熟和吸收骨基质的过程中分泌含胶原三螺旋重复蛋白 1(collagen triple helix repeat containing 1, CTHRC1)、Slit 同源物 3(slit homolog 3, SLIT3)、磷脂酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)等“偶联因子”，促进成骨细胞前体细胞的招募并分化形成新生骨质^[12-14]。这种由破骨细胞介导骨吸收随后通过偶联因子传递信号诱导成骨细胞分化促进骨形成的过程，也被称之为“破骨细胞-成骨细胞偶联”^[15-16]。由此可见，在骨质疏松治疗中，抑制破骨细胞介导的骨吸收需要同时保留其偶联成骨细胞分化的功能^[17-18]。然而，多项临床研

究发现以双膦酸盐类药物为代表的临床一线骨吸收抑制剂，虽然在使用的早期阶段(通常是 5 年以内)具有良好的治疗效果，但更长时间的使用会产生骨痛、下颌骨坏死、骨脆、不规则骨折发生率增加等严重的不良反应^[19-21]，其原因与现有抗骨吸收药物抑制破骨细胞介导的骨吸收同时也抑制了破骨细胞偶联促进成骨细胞分化的功能有关^[22-23]。因此，寻找能够不影响骨形成的抗骨吸收药物是当前抗骨质疏松治疗领域的主要目标。

课题组前期研究发现，补肾中药方剂——健骨方在抗骨质疏松治疗中具有骨吸收抑制和骨形成促进的双重效应^[23-24]，但其作用机制尚未阐明。此次研究拟采用体外破骨细胞分化模型和破骨-成骨细胞间接共培养模型，研究健骨方对破骨细胞分化的抑制作用及其对破骨细胞偶联成骨细胞分化的影响，同时从破骨细胞源性偶联因子分泌的角度探讨健骨方对破骨细胞-成骨细胞偶联的调控机制，为健骨方抗骨质疏松治疗提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞干预实验。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 10 月至 2023 年 5 月在广东省第二中医院中药药理(毒理)研究室完成。

1.3 材料

1.3.1 动物 雌性 SD 大鼠 10 只，3 月龄，体质量(280.65±20.32) g，实验动物合格证号：44007200089088；雌性 C57BL/6 小鼠，6-8 周龄，体质量 18-20 g，实验动物合格证号：44007200088576。实验动物均购自广东省

实验动物中心, 生产许可证号: SCXK(粤)2018-0002。动物实验环境: 广东省中医药工程技术研究院 SPF 级动物实验室 [设施使用许可证号 SYXK(粤)2020-0059]。实验方案经广东省第二中医院 (广东省中医药工程技术研究院) 动物实验伦理委员会批准, 批准号为 048880。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 细胞 MC3T3-E1 细胞, 购自上海中乔新舟生物科技公司。

1.3.3 药品 健骨方 (批号: 20200615): 骨碎补购自广东天泰药业有限公司 (批号: 210901)、牛膝购自广东省药材公司中药饮片厂 (批号: N1421514)、千年健购自岭南中药饮片有限公司 (批号: 2104001)、补骨脂购自哈尔滨普方药业饮片有限公司 (批号: 200401)、人参购自岭南中药饮片有限公司 (批号: 2107003)、麦冬购自岭南中药饮片有限公司 (批号: 2109004)、鸡血藤购自广东源生泰药业有限公司 (批号: 21100103), 每克浸膏所含生药量为 5.63 g; 阿仑膦酸钠购自上海懋康生物有限公司 (纯度 ≥ 98%, 批号: 2006S18175)。

1.3.4 主要试剂 Penicillin-Streptomycin 双抗购自 Corning (批号: 30002321); 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 及相关目的基因, 购自生工生物工程股份有限公司; 胎牛血清购自美国 Gibco (批号: 2254367R); α-MEM 培养基购自美国 Gibco (批号: 8121307); 巨噬细胞集落刺激因子购自美国 Sigma (批号: 315-02); MTT 检测试剂购自索莱宝 (批号: M1020); 总 RNA 提取试剂 Trizol 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司 (批号: NEP019-2); SYBR GREEN PRO TAQ HS 预混合 qPCR 试剂盒购自艾科瑞生物 (批号: AG11701); 成骨诱导培养基购自美国 PYTHONBIO 公司 (批号: 20220104); 抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒购自 SIGMA-ALORICH 公司 (批号: SLBZ5562); BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒购自碧云天公司 (批号: 121820210304); 茜素红 S 染料购自 SIGMA-ALORICH 公司 (批号: MKCC2711)。

1.3.5 主要仪器 DMI8 倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司; Varioskan Flash 型全波长多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司; C1000 型荧光定量 PCR 仪器购自美国 Bio-Rad 公司; StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo 公司; Class II Type B2 型生物安全柜购自新加坡 Esco 公司; HH-6 数显恒温水浴锅购自金坛市富华仪器有限公司; RWD510 小动物麻醉机购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 健骨方提取物的制备 健骨方提取物按照课题组已

报道的方法制备^[24]: 首先根据处方用量将药材混合后加水浸泡; 浸泡 30 min 后, 将中药和浸泡液至于砂锅中大火煮至沸腾, 随后开中火煮沸 2 h, 用纱布将药液过滤出来, 剩余药渣复煎 30 min 后, 再次过滤收集药液; 最后将 2 次煎煮所得药液浓缩至含生药量为 5.63 g/g 的浸膏, 置于 -20 °C 冷冻备用。

1.4.2 健骨方含药血清的制备 含药血清制备参考已报道的实验方法^[25]: ①取 SD 大鼠 10 只, 编号, 采用完全随机分组的方法, 将编号后的大鼠随机分为 2 组, 每组 5 只, 空白组给予 10 mL/(kg·d) 生理盐水灌胃, 健骨方含药血清组给予健骨方生药 10.8 g/(kg·d) 灌胃 (临床剂量是根据《中国药典》规定的单一中药最大临床剂量确定的, 根据《中药药理研究方法学》中的“体表面积比”法换算, 得到大鼠临床等效剂量为生药 5.4 g/kg, 此次实验选用了生药 10.8 g/kg 是 2 倍临床等效剂量, 可参考文献 [23]); ②适应性喂养 1 周后, 连续灌胃 7 d; ③在第 7 天灌胃 1 h 后, 使用 RWD510 小动物麻醉机, 以 3% 异氟烷麻醉大鼠, 待大鼠麻醉后以腹主动脉采血的方法获取含药全血; ④ 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清; ⑤在 56 °C 水浴灭活含药血清 30 min 后, 过滤除菌, 放在 -20 °C 冷冻备用。

1.4.3 骨髓源巨噬细胞培养及鉴定 参考文献报道的方法^[26], 取 C57BL/6 小鼠, 使用 RWD510 小动物麻醉机, 以 3% 异氟烷麻醉小鼠, 待小鼠麻醉后断颈处死, 置于体积分数 75% 乙醇中消毒, 并分离出股骨。取小鼠股骨骨髓细胞, 用含 30 ng/mL 巨噬细胞集落刺激因子的完全培养基 (含体积分数 10% 无菌胎牛血清、1% 双抗的 α-MEM-基础培养基) 于 CO₂ 培养箱培养。在巨噬细胞集落刺激因子的作用下, 骨髓细胞悬液中的骨髓源巨噬细胞能够存活下来并贴壁、增殖。取巨噬细胞集落刺激因子刺激 24 h 后产生的贴壁细胞开展细胞毒性实验和破骨细胞分化实验。

骨髓源巨噬细胞的培养及鉴定

细胞来源	骨髓源巨噬细胞来源于 C57BL/6 小鼠股骨骨髓
原代培养方法	采用全骨髓贴壁培养进行原代培养, 并利用巨噬细胞集落刺激因子选择性地筛选出骨髓源巨噬细胞
基础培养基	采用 α-MEM 基础培养基进行培养
添加材料	培养基添加体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗和巨噬细胞集落刺激因子
原代培养时间	原代培养 24 h 得到骨髓源巨噬细胞后, 随即用来开展相关实验
细胞传代	此次研究所使用的细胞均为原代细胞, 不传代使用
细胞鉴定	在巨噬细胞集落刺激因子的作用下, 骨髓细胞悬液中的骨髓源巨噬细胞能够存活下来并贴壁、增殖。取巨噬细胞集落刺激因子刺激 24 h 后产生的贴壁细胞开展细胞毒性实验和破骨细胞分化实验
伦理学批准	实验方案经广东省第二中医院 (广东省中医药工程技术研究院) 动物实验伦理委员会批准, 批准号为 048880

1.4.4 MTT 法测定健骨方对骨髓源巨噬细胞的毒性 取 1.4.3 培养得到的骨髓源巨噬细胞, 以 1×10^4 个 / 孔密度接种于 96 孔板中, 细胞放置 CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 以每组 3 个复孔为单位, 根据 96 孔板的排布, 随机分组。除空白对照组外, 给药组分别加入不同浓度健骨方含药血清 (10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.63%, 0.33%)^[24], 继续培养 24 h。随后, 采用 MTT 法检测细胞存活率: 弃细胞上清, 每孔加入 20 μL (5 mg/mL) MTT 溶液, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 4 h。待细胞与 MTT 全部结合形成紫色结晶后, 每孔加入 150 μL DMSO 振荡 15 min, 使底部结晶充分溶解。最后于 490 nm 波长读取吸光度值, 计算细胞存活率。

1.4.5 CCK-8 法测定健骨方对成骨细胞增殖的影响 MC3T3-E1 细胞以 1×10^4 个 / 孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 以每组 3 个复孔为单位, 根据 96 孔板的排布, 随机分组。除空白对照组外, 加入不同浓度的健骨方含药血清 (10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.63%, 0.33%)^[24], 继续培养 24 h。按照 CCK-8 试剂使用说明提供的办法, 分别向每孔加入 10 μL CCK-8 工作液, 细胞培养箱中继续培养 1 h, 最后于 450 nm 波长测定吸光度值。

1.4.6 健骨方抑制破骨细胞分化活性测定和条件培养基制备 骨髓源巨噬细胞用含 20 ng/mL 巨噬细胞集落刺激因子的 α -MEM 完全培养基制备成混悬液, 并以 1×10^4 个 / 孔密度接种于 96 孔板中。培养 24 h 后, 以每组 3 个复孔为单位, 根据 96 孔板的排布随机分组, 分别为空白对照组、模型组、阿仑膦酸钠组 (1 $\mu\text{mol/L}$)、健骨方高、中、低剂量组 (分别含有 2.5%、1.25% 和 0.63% 含药血清)。除空白对照组外, 每组加入 100 ng/mL 核因子 κB 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κB ligand, RANKL) 进行破骨细胞分化诱导, 同时加入相应的药物进行干预。隔天换液, 连续培养 5 d 后, 破骨细胞分化完成。收集各组破骨细胞分化过程的上清液, 使用 Amicon 超滤管将上清液浓缩至原有体积的 1/10, 并以 PBS 进行溶液置换。之后, 用 40 g/L 多聚甲醛固定细胞, 并按抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒说明书进行染色, 随后用显微镜观察 ≥ 3 个核的抗酒石酸酸性磷酸酶阳性细胞。计算每孔所产生的破骨细胞所占的面积, 记录数值。

1.4.7 破骨-成骨细胞偶联功能测定 MC3T3-E1 细胞以 3×10^4 个 / 孔密度接种于 24 孔板中, 培养 24 h 后随机分组, 分别为空白对照组、模型组、阿仑膦酸钠组 (1 $\mu\text{mol/L}$)、健骨方高、中、低剂量组 (分别含有 2.5%、1.25% 和 0.63% 含药血清)。空白对照组更换完全培养基, 除空白对照组外其余各组换成骨诱导分化培养基, 每组加入相应的 10% 条件培养基, 每个浓度设置 3 个复孔。隔天更换 1 次培养液, 连续培养 7 d 后, 按照 BCIP/NBT 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 显色试剂盒说明书的方法对细胞内的

ALP 进行染色, 染色结束后置于显微镜下观察并记录染色结果。

1.4.8 偶联因子和成骨细胞分化基因表达水平测定 按照 1.4.6 和 1.4.7 描述的方法, 破骨细胞分化成熟或条件培养基干预 MC3T3-E1 成骨细胞分化 7 d 后, 采用 PBS 将细胞清洗 1 次, 每孔加入 1 mL Trizol 提取细胞总 RNA; 随后, 参考 PCR 试剂盒操作说明书的方法, 将 mRNA 反转录为 cDNA; 最后, 取 0.5 μg cDNA, 根据 (5 \times)PrimeScript RT Master Mix 反转录试剂盒说明书加入规定量的反应试剂, 并放入 RT-qPCR 仪中对目的基因进行扩增。检测的目的基因包括破骨细胞分泌的促进骨形成的偶联基因鞘氨醇激酶 2 (Sphingosine kinase 2, SPHK2)、CTHRC1 和 SLIT3, 以及促进成骨细胞分化的 ALP、分泌型磷酸蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP1)、SP7 转录因子 (Sp7 transcription factor, SP7 也称 osterix) 和酸性富含半胱氨酸分泌型蛋白 (secreted protein acidic and cysteine rich, SPARC)。结果运用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各组目的基因与内参基因 GADPH 的相对表达量。目的基因引物序列如表 1 所示。

表 1 | RT-qPCR 目的基因序列
Table 1 | Target gene sequences for RT-qPCR

基因	引物序列
SPHK2-F	5' CTA CAC GGT TAC TTG GAG AAT GAA C 3'
SPHK2-R	5' TTT GGT GTT GGA CAG GAT GA 3'
CTHRC1-F	5' GTG CCC GAG TTA GTG CCT GTT AAA A 3'
CTHRC1-R	5' TCA TGT GCG GTC CAC AGA GA 3'
SLIT3-F	5' AGG AGT CTA ACA ACG GCA GCC T 3'
SLIT3-R	5' GTG GTA CAC CTC AGT CTC GAA G 3'
SPP1-F	5' CTGA CCC ATC TCA GAA GCA G 3'
SPP1-R	5' CATG GCT TTC ATT GGA ATT G 3'
ALP-F	5' GCA GAA ACC GAA GAA AGG AG 3'
ALP-R	5' CCG ATT TCT CAT CCT CCA AT 3'
SP7-F	5' CGC TTT GTG CCT TTG AAA T 3'
SP7-R	5' CCG TCA ACG ACG TTA TGC 3'
SPARC-F	5' ACA TTG CAC CAC ACG TTT CT 3'
SPARC-R	5' ACA TTG CAC CAC ACG TTT CT 3'
GADPH-F	5' TCA AGA AGG TGG TGA AGC AG 3'
GADPH-R	5' AGT GGG AGT TGC TGT TGA AGT 3'

表注: CTHRC1 为含胶原三螺旋重复蛋白 1; SLIT3: Slit 同源物 3; SPHK2: 鞘氨醇激酶 2; ALP: 碱性磷酸酶; SPP1: 分泌型磷酸蛋白 1; SP7: SP7 转录因子; SPARC: 酸性富含半胱氨酸分泌型蛋白。

1.5 主要观察指标 考察健骨方干预后: ①骨髓源巨噬细胞和 MC3T3-E1 细胞的增殖能力; ②破骨细胞分化的抑制作用; ③破骨细胞偶联成骨细胞分化的效应; ④破骨细胞源性偶联因子和成骨细胞分化相关基因的表达水平。

1.6 统计学分析 首先使用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析统计, 所用正态计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均值比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间均值两两比较使用 SNK 检验; $P < 0.05$ 表示组间差异有显著性意义。使用 GraphPad Prism 9 完成统计可视化图片处理。文章统计学方法已经广州中医药大学第五临床医学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 健骨方含药血清对骨髓源巨噬细胞和 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 如图 1 显示, 健骨方干预细胞 24 h 后, 与空白组相比, 10%, 5% 的健骨方含药血清组显著抑制了骨髓源巨噬细胞存活率 ($P < 0.01$), 2.5%, 1.25%, 0.63% 和 0.33% 的健骨方含药血清组对骨髓源巨噬细胞存活率没有显著性影响, 提示 2.5% 健骨方含药血清及以下浓度对骨髓源巨噬细胞生长没有显著影响。

如图 2 所示, 健骨方干预细胞 24 h 后, 与空白组相比, 10% 的健骨方含药血清显著抑制了 MC3T3-E1 细胞存活率 ($P < 0.01$), 其余各浓度的健骨方含药血清对 MC3T3-E1 细胞存活率没有影响, 提示在 5% 及以下浓度健骨方含药血清对 MC3T3-E1 细胞生长没有影响。因此, 后续实验选用 2.5%、1.25% 以及 0.63% 的健骨方含药血清浓度作为高、中、低剂量组。

2.2 健骨方含药血清对破骨细胞分化的影响 RANKL 诱导骨髓源巨噬细胞破骨细胞分化模型的抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果如图 3 所示, 与空白组相比, 模型组的骨髓源巨噬细胞分化成不规则形状的细胞核数目 ≥ 3 个的破骨细胞。与模型组相比, 阿仑膦酸钠组和健骨方高 (2.5% 含药血清)、中 (1.25% 含药血清)、低 (0.63% 含药血清) 剂量组的破骨细胞分化面积明显得到抑制 ($P < 0.01$), 提示阿仑膦酸钠和健骨方能显著抑制破骨细胞生成, 并且健骨方高、中、低剂量组呈现剂量依赖性地抑制破骨细胞生成。

2.3 健骨方条件培养基对成骨细胞分化的影响 条件培养基是指健骨方含药血清干预破骨细胞成熟后收集的上清液, 超滤去无机盐和健骨方化学成分, 仅保留有破骨细胞分泌的活性因子的浓缩液。如图 4 破骨细胞染色所示, 给予 $1 \mu\text{mol/L}$ 阿仑膦酸钠和健骨方 2.5%、1.25% 和 0.63% 含药血清干预后, RANKL 诱导的骨髓源巨噬细胞分化形成破骨细胞的数量明显减少。使用各组条件培养基干预 MC3T3-E1 细胞后, 其 ALP 染色结果显示, 与空白组相比, 模型组成骨细胞分化增加 (蓝色染色面积更多), 说明破骨细胞分化后的条件培养基里含有的活性因子有促进成骨细胞分化的作用; 与模型组对比, 健骨方各剂量组的条件培养基也具有明显促进成骨细胞分化的作用; 而阿仑膦酸钠组的条件培养基则明显抑制成骨细胞分化。这些结果表明, 健骨方不仅能够抑制破骨细胞分化, 还能够保留破骨细胞偶联成骨细胞分化的能力。

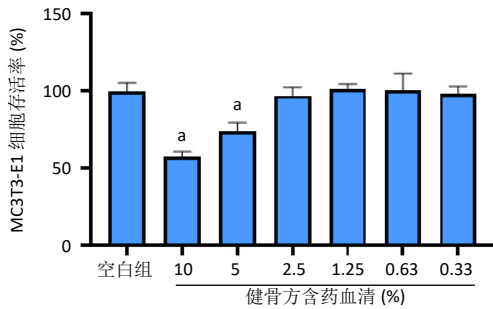
2.4 健骨方含药血清对骨吸收-骨形成相关 mRNA 的影响 为了进一步考察健骨方对骨吸收-骨形成偶联影响的机制, 此次研究采用 RT-qPCR 法测定健骨方含药血清干预破骨细胞分化后破骨细胞源性偶联因子 CTHRC1、SLIT3 和 SPHK2 mRNA 表达水平, 同时考察健骨方干预破骨细胞分化的条件培养基对成骨细胞分化关键基因 ALP、SPP1、

SP7 和 SPARC 的 mRNA 表达情况。结合图 3 健骨方含药血清对破骨细胞分化抑制结果对偶联因子基因表达结果进行分析。如图 5 所示, 与空白组相比, 模型组破骨细胞分化形成, CTHRC1 和 SPHK2 的 mRNA 表达水平显著上升 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且 SLIT3 表达水平也有上升的趋势, 说明经过 RANKL 诱导的破骨细胞可以表达促进骨形成的偶联基因; 与模型组相比, 健骨方各剂量组在破骨细胞分化抑制情况下, 显著抑制 CTHRC1 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$), 但其高、中剂量组在破骨细胞分化显著抑制的情况下对 SLIT3 mRNA 水平仍然没有显著影响, 且低剂量组对 SLIT3 mRNA 表达水平有显著提高作用 ($P < 0.01$); 同时中、低剂量组对 SPHK2 mRNA 表达水平也表现出显著上调的作用 ($P < 0.01$); 而阿仑膦酸钠干预破骨细胞分化后, CTHRC1 和 SLIT3 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且 SPHK2 mRNA 水平有下降的趋势。

破骨细胞分化条件培养基对成骨细胞分化关键基因表达的影响如图 6 所示, 与空白组相比, 模型组可显著提高成骨细胞分化关键基因 ALP、SPP1 和 SPARC mRNA 表达水平 ($P < 0.05-0.01$)。与模型组比较, 阿仑膦酸钠组成骨细胞中的 ALP 和 SPARC 的 mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.01$), 而健骨方高剂量组显著提高 SPP1 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$), 且对 ALP、SP7 和 SPARC mRNA 表达水平没有显著影响; 中剂量组能够显著提高 ALP、SPP1、SP7 和 SPARC mRNA 表达水平 ($P < 0.01$); 低剂量组显著提升 SPP1、SP7 和 SPARC mRNA 表达水平 ($P < 0.01$), 且对 ALP 没有显著影响。这些结果表明, 健骨方在抑制破骨细胞分化的情况下, 可能通过上调 SLIT3、SPHK2 的 mRNA 表达发挥偶联促进成骨细胞分化的作用, 而阿仑膦酸钠对骨吸收-骨形成偶联的抑制效应与其抑制相关偶联因子的表达水平有关。

3 讨论 Discussion

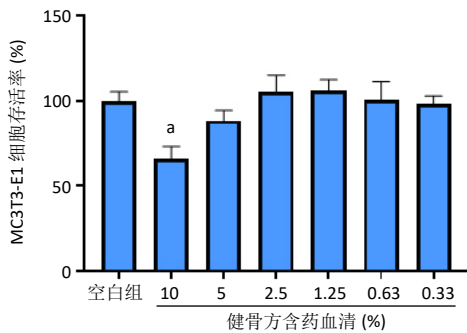
破骨细胞是来源于造血干细胞的组织特异性巨噬细胞, 造血干细胞经巨噬细胞集落刺激因子刺激分化成破骨细胞前体细胞, 再经 RANKL 诱导分化成单核早期破骨细胞, 随后融合为具有骨吸收功能的成熟的多核破骨细胞^[27-28]。成熟的破骨细胞会高度表达抗酒石酸酸性磷酸酶, 因此常用组织化学法检测抗酒石酸酸性磷酸酶活性来观察破骨细胞生成数量或对破骨细胞的骨吸收和破骨细胞活性状态进行评估^[26]。成骨细胞来源于骨髓间充质干细胞, ALP 是成骨细胞早期分化的重要标志物, 可以通过检测 ALP 活性观察成骨细胞的分化程度^[29]。此外, SPP1、SP7 转录因子和酸性富含半胱氨酸分泌型蛋白 SPARC 等关键基因也在成骨细胞从间充质干细胞分化成具有骨形成功能的成熟成骨细胞中发挥重要的调控作用^[30-32]。



图注: 与空白组比较, ^a $P < 0.01$. $n=3$.

图 1 | MTT 法检测健骨方含药血清对骨髓源巨噬细胞存活率的影响

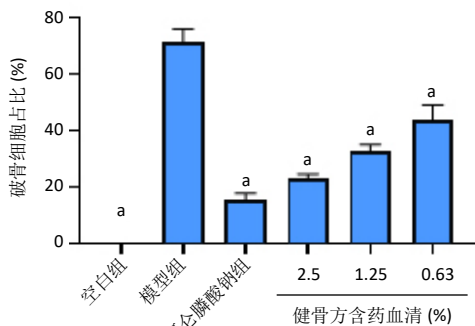
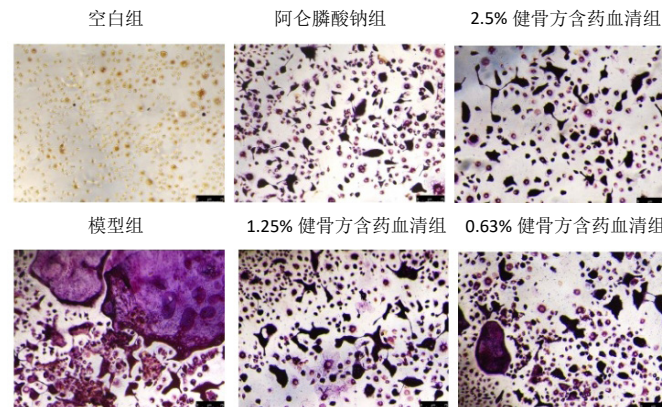
Figure 1 | The effect of Jiangu Formula drug-containing serum on the survival rate of bone marrow derived macrophages detected by MTT assay



图注: 与空白组比较, ^a $P < 0.01$. $n=3$.

图 2 | CCK-8 法检测健骨方含药血清对 MC3T3-E1 细胞存活率的影响

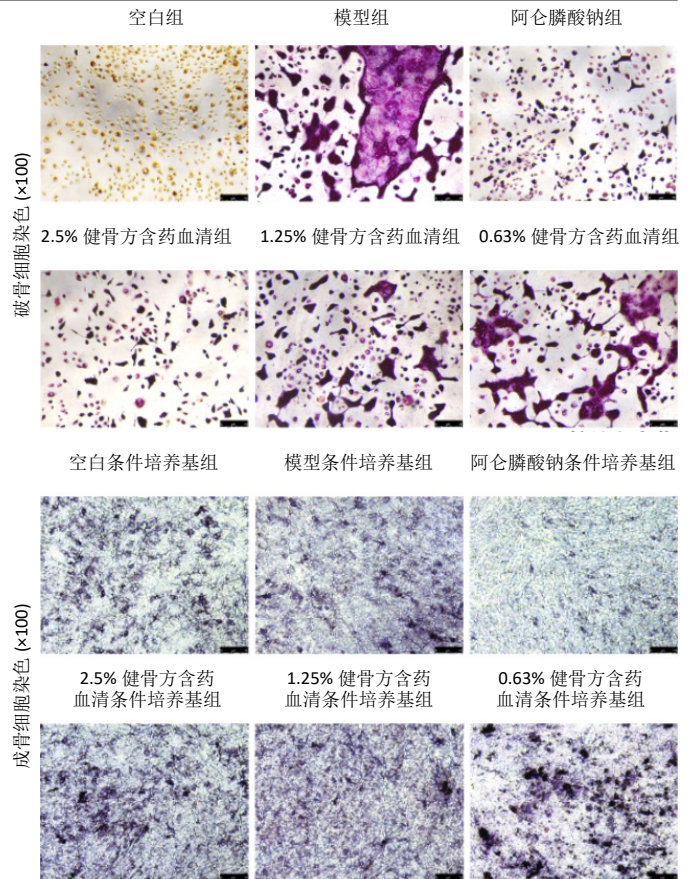
Figure 2 | The effect of Jiangu Formula drug-containing serum on the survival rate of MC3T3-E1 cells detected by cell counting kit-8 method



图注: 图中紫红色多核细胞为破骨细胞, 标尺 = 75 μm . 与模型组比较, ^a $P < 0.01$. $n=3$.

图 3 | 抗酒石酸性磷酸酶染色检测健骨方含药血清对破骨细胞分化的影响

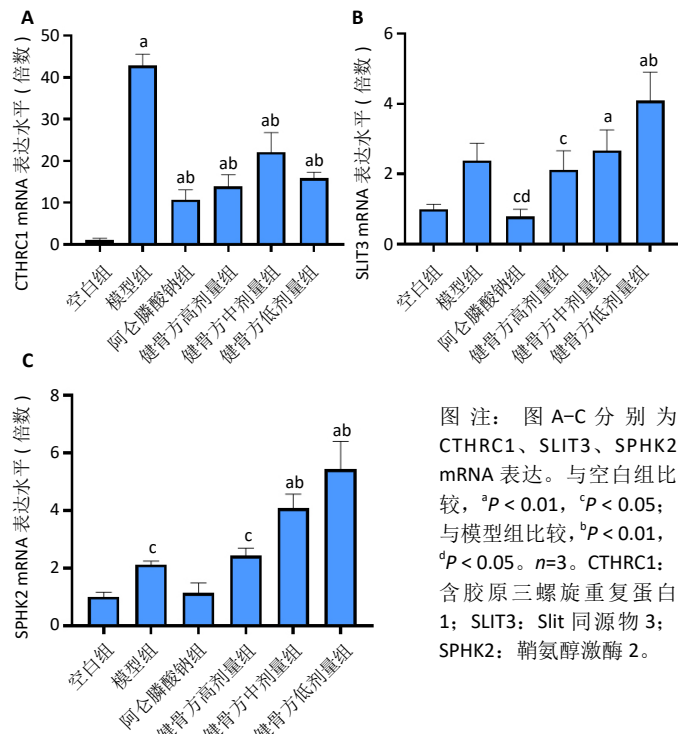
Figure 3 | Tartrate-resistant acid phosphatase staining detection of the effect of Jiangu Formula drug-containing serum on osteoclast differentiation



图注: 图中紫红色多核细胞为破骨细胞, 成骨细胞中碱性磷酸酶被染成蓝紫色, 颜色越深表明碱性磷酸酶活性越高。标尺 = 75 μm 。

图 4 | 健骨方对破骨细胞分化及破骨细胞偶联成骨细胞分化的影响

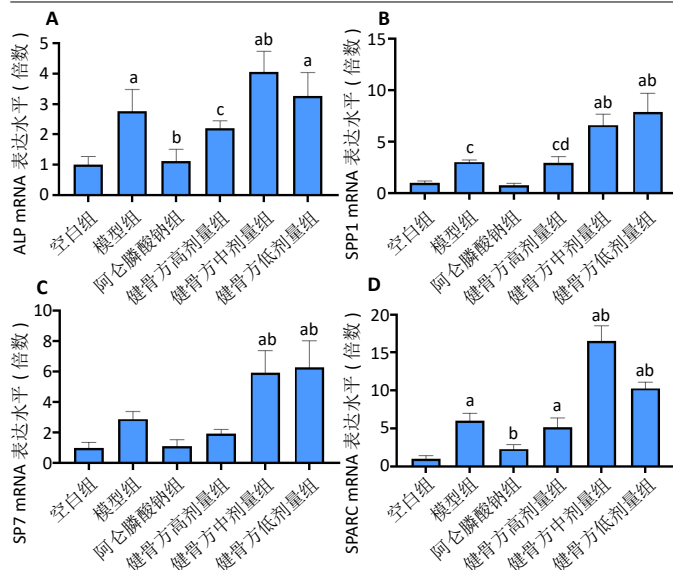
Figure 4 | Effect of Jiangu Formula on osteoclast differentiation and osteoclast-coupled osteoblast differentiation



图注: 图 A-C 分别为 CTRC1、SLIT3、SPHK2 mRNA 表达。与空白组比较, ^a $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$. $n=3$. CTRC1: 含胶原三螺旋重复蛋白 1; SLIT3: Slit 同源物 3; SPHK2: 鞘氨醇激酶 2。

图 5 | RT-qPCR 检测健骨方含药血清对破骨细胞分化相关 mRNA 的影响

Figure 5 | RT-qPCR detection of the effect of Jiangu Formula drug-containing serum on mRNAs related to osteoclast differentiation



图注：图A-D分别为ALP、SPP1、SP7、SPARC mRNA表达。与空白组比较，^a $P < 0.01$ ，^c $P < 0.05$ ；与模型组比较，^b $P < 0.01$ ，^d $P < 0.05$ 。 $n=3$ 。ALP：碱性磷酸酶；SPP1：分泌型磷酸蛋白1；SP7：SP7转录因子；SPARC：酸性富含半胱氨酸分泌型蛋白。

图6 | RT-qPCR检测各组破骨细胞条件培养基对成骨细胞分化相关mRNA的影响

Figure 6 | Effect of conditional culture medium on osteoblast differentiation related mRNA expression detected by RT-qPCR assay

近年来越来越多的研究表明，破骨细胞在分化和成熟的过程中，可以通过分泌偶联相关活性因子与成骨细胞前体细胞发生相互作用，进而促进成骨细胞分化和矿化，进而维持骨重塑过程中骨吸收与骨形成之间的平衡^[33]。目前，已有CTHRC1、SLIT3、S1P和补体C3a、核因子 κ B受体激活因子囊泡、WNT家族成员10B和骨形态发生蛋白6等多个破骨细胞来源的偶联因子被鉴定出具有促进成骨细胞分化的能力^[34-36]。在机体骨骼新陈代谢过程中，破骨细胞介导的旧骨或受损骨质的吸收和成骨细胞介导的新骨形成之间的相对平衡对维持骨机械力和钙稳态起着至关重要的作用，当骨吸收的速度大于骨生成速度时，即破坏骨稳态，引起骨质疏松^[37]。然而，因破骨细胞同时促进骨吸收和骨形成的双重效应，临床常用的抗骨吸收抑制剂，尤其是双膦酸盐类这一类的强效破骨细胞抑制剂，长期使用将会有一定的骨形成减少相关不良反应，其原因可能与破骨细胞源性偶联因子的分泌抑制有关，从而从另一层面上抑制了成骨细胞分化，导致新骨形成障碍^[23, 34]。

健骨方具有补肾强骨、健脾益气、活血止痛的作用，是临床治疗骨质疏松的常用方。此次研究测定了健骨方含药血清对破骨细胞分化的抑制作用，结果显示在无细胞毒性浓度下，健骨方呈现剂量依赖性地抑制RANKL诱导的破骨细胞分化，在考察浓度范围2.5%–0.63%内均对破骨细胞有显著的抑制作用。破骨–成骨细胞间接共培

养模型实验表明，2.5%–0.63%健骨方含药血清破骨细胞条件培养基能够维持正常的偶联促进成骨细胞分化的功能并显著提高成骨分化关键基因SPP1 mRNA的表达水平。此外，健骨方含药血清浓度为1.25%时，对成骨分化关键基因ALP、SPP1、SP7和SPARC都表现出显著的促进作用，进一步表明健骨方不会抑制骨吸收–骨形成偶联功能。在健骨方含药血清浓度为2.5%情况下，破骨细胞分化受到极大抑制，但破骨细胞源性偶联因子相关基因表达检测结果显示，促进骨形成的偶联因子相关基因如SLIT3、SPHK2的mRNA表达仍然不影响；当健骨方含药血清浓度降低至0.63%时，破骨细胞抑制降低，同时也能够观察到SLIT3、SPHK2表达水平的升高。临床数据也显示，血浆中破骨细胞源性偶联因子SLIT3水平与骨密度水平呈正相关^[13]；SPHK2是鞘氨醇激酶的其中一种亚型，是调控破骨细胞源性偶联因子S1P合成的一种关键酶^[38]。由此推测，健骨方抑制骨吸收促进骨形成的双效抗骨质疏松作用可能与增加破骨细胞源性偶联因子SLIT3和SPHK2的表达水平有关。

此次研究发现健骨方治疗骨质疏松具有同时抑制骨吸收又促进骨形成的双重效应的潜在作用机制，提示破骨细胞源性偶联因子分泌这一视角有望为骨质疏松治疗中维持正常骨吸收–骨形成偶联提供新的解决思路。后续将进一步研究健骨方调控破骨细胞源性偶联因子表达的作用靶点，为开发不影响正常骨吸收–骨形成偶联的抗骨质疏松药物提供理论基础。

致谢：感谢国家自然科学基金委、广东省基础与应用基础研究基金委和广东省第二中医院提供的资金资助；感谢赵自明博士对此文统计学方法进行审核。

作者贡献：卢秀丽负责收集资料和论文撰写，许华珍负责实验实施，陈玉兴负责数据分析，姚楠、胡子旋负责数据分析，黄丹娥负责实验设计、文章审核。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名–非商业性使用–相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] DU J, YANG J, HE Z, et al. Osteoblast and Osteoclast Activity Affect Bone Remodeling Upon Regulation by Mechanical Loading-Induced Leukemia Inhibitory Factor Expression in Osteocytes. *Front Mol Biosci.* 2020;7:585056.

- [2] WANG L, YOU X, ZHANG L, et al. Mechanical regulation of bone remodeling. *Bone Res.* 2022;10(1):16.
- [3] JOHNNELL O, KANIS JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 2006;17(12):1726-1733.
- [4] 白璧辉, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 我国近 5 年来骨质疏松症流行病学研究现状 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018,24(2):253-258.
- [5] SI L, WINZENBERG TM, JIANG Q, et al. Projection of osteoporosis-related fractures and costs in China: 2010-2050. *Osteoporos Int.* 2015; 26(7):1929-1937.
- [6] RUIZ-ESTEVEZ KN, TEYSIR J, SCHATOFF D, et al. Disparities in osteoporosis care among postmenopausal women in the United States. *Maturitas.* 2022;156:25-29.
- [7] VEIS DJ, O'BRIEN CA. Osteoclasts, Master Sculptors of Bone. *Annu Rev Pathol.* 2023;18:257-281.
- [8] COMPSTON JE, MCCLUNG MR, LESLIE WD. Osteoporosis. *Lancet.* 2019; 393(10169):364-376.
- [9] FOESSL I, DIMAI HP, OBERMAYER-PIETSCH B. Long-term and sequential treatment for osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol.* 2023;19(9):520-533.
- [10] 于龙, 王亮. 老年骨质疏松症现状及进展 [J]. *中国临床保健杂志*, 2022,25(1): 6-11.
- [11] REID IR, BILLINGTON EO. Drug therapy for osteoporosis in older adults. *Lancet.* 2022;399(10329):1080-1092.
- [12] TAKESHITA S, FUMOTO T, MATSUOKA K, et al. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. *J Clin Invest.* 2013;123(9):3914-3924.
- [13] KIM BJ, LEE YS, LEE SY, et al. Osteoclast-secreted SLIT3 coordinates bone resorption and formation. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1429-1441.
- [14] GREWE JM, KNAPSTEIN PR, DONAT A, et al. The role of sphingosine-1-phosphate in bone remodeling and osteoporosis. *Bone Res.* 2022; 10(1):34.
- [15] 任明诗, 丁羽, 李子涵, 等. 成骨细胞与破骨细胞相互调节作用的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2022,38(6):822-827.
- [16] BORCIANI G, MONTALBANO G, BALDINI N, et al. Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches. *Acta Biomater.* 2020;108:22-45.
- [17] SIMS N, MARTIN TJ. Osteoclasts Provide Coupling Signals to Osteoblast Lineage Cells Through Multiple Mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 2020; 82:507-529.
- [18] PARK-MIN KH, LORENZO J. Osteoclasts: Other functions. *Bone.* 2022; 165:116576.
- [19] SHI S, DUAN H, OU X. Targeted delivery of anti-osteoporosis therapy: Bisphosphonate-modified nanosystems and composites. *Biomed Pharmacother.* 2024;175:116699.
- [20] BROWN SA, GUISE TA. Drug insight: the use of bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis in men. *Nat Clin Pract Urol.* 2007;4(6):310-320.
- [21] ROSINI S, ROSINI S, BERTOLDI I, et al. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(17):3309-3317.
- [22] JENSEN PR, ANDERSEN TL, CHAVASSIEUX P, et al. Bisphosphonates impair the onset of bone formation at remodeling sites. *Bone.* 2021; 145:115850.
- [23] XU H, LU X, LI M, et al. Jiangu formula: A novel osteoclast-osteoblast coupling agent for effective osteoporosis treatment. *Phytomedicine.* 2024;128:155501.
- [24] 许华珍, 黄丹娥, 郑柳怡, 等. 健骨方对破骨细胞形成和成骨细胞增殖分化的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022,28(12):1728-1734.
- [25] 许金松, 邓娜, 张潇. 骨碎补影响破骨细胞分化的程度与含药血清浓度有关 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(29):4620-4625.
- [26] HUANG D, LUO X, YIN Z, et al. Diterpenoids from the aerial parts of *Flueggea acicularis* and their activity against RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bioorg Chem.* 2020;94:103453.
- [27] UDAGAWA N, KOIDE M, NAKAMURA M, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab.* 2021; 39(1):19-26.
- [28] TSURUKAI T, UDAGAWA N, MATSUZAKI K, et al. Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab.* 2000;18(4):177-184.
- [29] VIMALRAJ S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene.* 2020;754:144855.
- [30] JIANG Q, NAGANO K, MORIISHI T, et al. Roles of Sp7 in osteoblasts for the proliferation, differentiation, and osteocyte process formation. *J Orthop Translat.* 2024;47:161-175.
- [31] HOJO H, OHBA S. Gene regulatory landscape in osteoblast differentiation. *Bone.* 2020;137:115458.
- [32] LIU Y, CHEN Y, LI XH, et al. Dissection of Cellular Communication between Human Primary Osteoblasts and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis at Single-Cell Resolution. *Int J Stem Cells.* 2023;16(3):342-355.
- [33] KIM JM, LIN C, STAVRE Z, et al. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells.* 2020;9(9):2073.
- [34] KIM BJ, KOH JM. Coupling factors involved in preserving bone balance. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(7):1243-1253.
- [35] PEDERSON L, RUAN M, WESTENDORF JJ, et al. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(52):20764-20769.
- [36] MATSUOKA K, PARK KA, ITO M, et al. Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2014;29(7):1522-1530.
- [37] SALHOTRA A, SHAH HN, LEVI B, et al. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(11):696-711.
- [38] XU X, HAN Y, ZHU T, et al. The role of SphK/S1P/S1PR signaling pathway in bone metabolism. *Biomed Pharmacother.* 2023;169:115838.

(责任编辑: GD, ZN, WL, LCH)