

文章编号 1006-8147(2021)03-0217-05

论著

wnt 经典信号通路在酸性 pH 抑制成骨细胞功能中的作用

张顺^{1,2}, 田爱现², 张杨², 郭悦², 王岩², 董本超², 马剑雄², 马信龙^{1,2}

(1.天津医科大学总医院骨科,天津 300052;2.天津市天津医院骨科研究所,天津大学天津医院骨科研究所,天津 300050)

摘要 目的:探讨 wnt 经典通路在酸性 pH 抑制成骨细胞功能中的作用。方法:胶原酶消化提取新生 Sprague-Dawley(SD)大鼠颅骨原代成骨细胞,碱性磷酸酶(ALP)和茜素红(ARS)染色鉴定。传代培养至第3代,分别用 pH6.0、pH6.4、pH6.8、pH7.4(对照)的 DMEM 高糖培养基进行培养。CCK8 法检测各组细胞增殖情况;Live/Dead 染色观察凋亡情况;反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组细胞 COL1A1、 β -catenin、RUNX2、wnt3a 的 mRNA 表达水平;Western 印迹法分析各组细胞 COL1A1、 β -catenin、RUNX2、wnt3a 蛋白的表达情况。结果:ALP 和 ARS 染色结果均为阳性,证明提取的原代细胞为成骨细胞。CCK8 结果显示随着 pH 值降低和时间延长,pH6.0、pH6.4、pH6.8 组实验各组细胞增殖活力均有下降($F=42.800, 93.700$, 均 $P<0.05$)。Live/Dead 染色结果显示,随着 pH 值降低,细胞凋亡百分比显著增加($F=63.74$, 均 $P<0.05$)。RT-PCR 结果显示,与对照组相比,pH6.0、pH6.4、pH6.8 组 mRNA 的表达显著降低($F=20.32, 17.76, 7.809, 11.16$, 均 $P<0.05$)。Western 印迹结果显示,与对照组相比,pH6.0、pH6.4、pH6.8 组蛋白表达水平均显著下降($F=20.02, 15.67, 22.11, 42.11$, 均 $P<0.05$)。结论:酸性 pH 可影响成骨细胞的增殖、凋亡和分化,其机制可能与 wnt 经典信号通路有关。

关键词 原代培养;成骨细胞;酸性环境;pH 值;wnt 经典信号通路

中图分类号 R681

文献标志码 A

Effects of wnt classic signaling pathway on the inhibition of osteoblast function by acidic pH

ZHANG Shun^{1,2}, TIAN Ai-xian², ZHANG Yang², GUO Yue², WANG Yan², DONG Ben-chao², MA Jian-xiong², MA Xin-long^{1,2}

(1.Department of Orthopedics, General Hospita, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Institute of Orthopedics, Tianjin Hospital of Tianjin, Tianjin University Tianjin Hospital, Tianjin 300050, China)

Abstract Objective: To explore the role of wnt classic pathway in inhibiting osteoblast function at acidic pH. **Methods:** The collagenase digestion method was used to extract primary osteoblasts from the skull of newborn Sprague-Dawley(SD) rats and stained with alkaline phosphatase(ALP) and alizarin red(ARS). After subculture to the third generation, DMEM high-glucose medium of pH 6.0, pH 6.4, pH 6.8, and pH 7.4 (control) was used for culture. CCK8 method was used to detect cell proliferation; Live/Dead staining was used to observe apoptosis; reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to detect mRNA expression levels of COL1A1, β -catenin, RUNX2, wnt3a; Western blotting was used to analysis the protein expression levels of COL1A1, β -catenin, RUNX2, wnt3a in each group of cells. **Results:** The results of ALP and ARS staining were both positive, which proved that the extracted primary cells were osteoblasts. CCK8 results indicated that as the pH value decreased and time prolonged, the cell proliferation activity in the pH6.0, pH6.4 and pH6.8 groups decreased($F=42.800, 93.700$, both $P<0.05$). Live/Dead staining results showed that as the pH value decreased, the percentage of apoptosis increased significantly($F=63.74, P<0.05$). RT-PCR results showed that compared with the control group, the expression of mRNA in the pH 6.0, pH 6.4, and pH 6.8 groups was significantly decreased($F=20.32, 17.76, 7.809, 11.16$, all $P<0.05$). Western blotting results indicated that compared with the control group, the protein expression level in the pH6.0, pH6.4 and pH6.8 groups decreased significantly($F=20.02, 15.67, 22.11, 42.11$, all $P<0.05$). **Conclusion:** The proliferation, apoptosis and differentiation of osteoblasts are affected by acidic pH, and the mechanism may be related to the classic wnt signaling pathway.

Key words primary culture; osteoblasts; acidic environment; pH; wnt classic signaling pathway

骨质疏松症(osteoporosis, OP)作为临床上中老年人和绝经期女性的常见病和多发病,其特征是低

骨量和骨组织的微结构性退化,易发生骨折等严重后果^[1]。骨形成和骨吸收过程的动态平衡是骨代谢正常的前提。成骨细胞(osteoblast, OB)与破骨细胞(osteoclast, OC)作为骨形成与骨吸收的主要功能细胞,前者主要促进骨形成,后者主要促进骨吸收。

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81871777, 11772226)

作者简介 张顺(1994-),男,硕士在读,研究方向:骨质疏松;通信作者:马信龙, E-mail: maxinlong5566@163.com。

正常骨代谢的维持离不开二者数量和活性的平衡。局部酸性环境会引起骨细胞数量和活性降低,成骨能力减弱。以往研究表明,随着培养基 pH 值降低,成骨细胞矿化能力显著降低,可能与碱性磷酸酶(ALP)表达受抑制有关^[2]。也有实验证明慢性代谢性酸中毒可通过对成骨细胞相关基因和蛋白质的不同作用,改变骨髓间充质干细胞的成骨分化,抑制骨形成^[3]。但是胞外酸性环境抑制成骨细胞功能的具体机制尚不明确。为此,本研究提取新生 Sprague-Dawley (SD)大鼠原代成骨细胞,用不同梯度的酸性 pH 值培养基干预,旨在探讨胞外酸性环境抑制成骨细胞功能相关的潜在通路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 CCK-8 试剂盒、BCIP/NBT 显色试剂盒、茜素红 S 染色液、高效 RIPA 组织/细胞裂解液(索莱宝公司,中国北京),Live/Dead 试剂盒(宇恒生物公司,中国杭州),COL1A1、 β -catenin、RUNX2、wnt3a 一抗(abcam 公司,美国),GAPDH 一抗(赛维尔生物科技有限公司,中国武汉),CO₂ 培养箱(Hera-cell 公司,德国),恒温摇床(Heidolph 公司,德国),酸度计(梅特勒托利多,中国上海),凝胶成像分析仪(昆明信诺莱伯科技有限公司,中国云南),定量 PCR 仪(Roche, Diagnostic, 瑞士),倒置显微镜(Leica 公司,德国),倒置荧光相差显微镜(Nikon 公司,日本),百级层流实验室(天津市骨科研究所组织与工程研究室)。

1.2 原代成骨细胞的分离、培养及实验分组 取 4 只雌性新生(1 周龄)SD 大鼠,脱颈处死后放入盛有 75%乙醇的烧杯中浸泡 20 min;移至超净工作台内,俯卧固定大鼠,剪开头部皮肤,剪下头盖骨,仔细剥离骨膜及结缔组织,剪至 1 mm×1 mm 大小,PBS 清洗 2 次。将剪下的组织块放入离心管,加入 5 mL 胰蛋白酶,置于 37℃水浴锅 30 min,期间给与适当震荡。弃去消化液,换用 5 mL II 型胶原酶消化 60 min。将细胞液移入新的离心管内终止消化,离心后吸去上清液体,用 10%胎牛血清(FBS)含青链霉素的高糖 DMEM 培养基重悬细胞并吹打均匀,种植在 25 cm² 的培养瓶内,培养箱内培养。3 d 更换 1 次培养基,勤观察细胞长势、密度、形态以及培养基颜色并及时传代。实验共分为 4 组:pH6.0 组、pH6.4 组、pH6.8 组及 pH7.4 组(对照组)。各组培养基 pH 值用 0.1 mmol/L 的 HCl 及 0.1 mmol/L 的 NaOH 进行调整。

1.3 成骨细胞的鉴定

1.3.1 ALP 染色采用第 3 代成骨细胞进行实验 以每孔 1×10^5 /mL 的密度接种在 6 孔板。细胞融合后吸

净培养液,PBS 洗 3 次,加入 BCIP/NBT 染色工作液,室温避光 30 min,ddH₂O 清洗 2 次终止显色,光镜下观察。

1.3.2 ARS 染色采用第 3 代成骨细胞进行实验 以每孔 1×10^5 /mL 的密度接种在 6 孔板。在第 21 天移除培养基,固定 15 min,用 4%多聚甲醛,丢弃固定物,用 ddH₂O 洗 3 次,将水完全吸净后缓慢加入 1%茜素红 S 染液染色 5 min,ddH₂O 洗 3 次,光镜下观察。

1.4 成骨细胞增殖率检测 采用 CCK8 法检测成骨细胞增殖活力,以 1×10^3 /孔的种植密度将成骨细胞接种于 96 孔板,每组设置 3 组复孔,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h 后换用 pH 值 6.0、6.4、6.8、7.4 的培养基处理 7 d,分别于第 1、4、7 天测各组 OD 值。检测时每组各孔加入 10 μ L CCK-8 工作液,避光孵育 4 h。紫外分光光度计测定 450 nm 光吸收值。

1.5 Live/Dead 荧光双染色检测细胞凋亡 用 Live/Dead 染色试剂盒进行凋亡检测,CalceinAM/EthD-I 染色工作液配制按照说明书。将成骨细胞以 2×10^4 /mL 接种于 48 孔板,实验各组均设置 3 组复孔,于第 7 天去除各组培养液,PBS 清洗 3 次,吸弃 PBS,加入适量染色工作液,室温避光孵育 20 min,荧光显微镜下观察。

1.6 RT-PCR 检测 COL1A1、 β -catenin、Runx2、wnt3a mRNA 的表达 以 2×10^4 /孔的密度将成骨细胞接种于 6 孔板,分组培养第 7 天用 Trizol 法裂解各组成骨细胞,加入氯仿,4℃离心,12 000 $\times g$,15 min 后取上清液加入等体积异丙醇,4℃离心,12 000 $\times g$,10 min 后弃上清,加入 75%乙醇,4℃离心 7 500 $\times g$,5 min 后弃上清后加入 10 μ L DEPC 水,即为细胞 RNA,后经逆转录合成 cDNA。RT-PCR 检测目的基因表达情况,以 GAPDH 为内参,用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 值计算目的基因的相对表达量。COL1A1 引物序列:上游 5'-AGAGGCATAAAGGGTCATCGTG-3',下游 5'-AGACCGTTGAGTCCATCTTTGC-3',产物长度 161 bp。 β -catenin 引物序列:上游 5'-TGCGGCTGCTGTCTAT TCC-3',下游 5'-CCATCAACTGGATAGTCAGCACC-3',产物长度 294 bp。RUNX2:引物序列:上游 5'-CAGTATGAGAGTAGGTGTCGCCG-3',下游 5'-AAGAGGGGTAAGACTGGTCATAGG-3',产物长度 152 bp。wnt3a 引物序列:上游 5'-TGCCATGAACCGTCACAACA-3',下游 5'-ACTTCGCAACTGCCGATAG-3',产物长度 99 bp。GAPDH 引物序列:上游 5'-CTGGA-GAAACCTGCCAAGTATG-3',下游 5'-GGTGGAA-GAATGGGAGTTGCT-3',产物长度 138 bp。扩增条件:95℃预变性 1 min,94℃变性 10 s,60℃退火 15 s,70℃

延伸 20 s, 共 40 个循环。每次反应至少重复 3 次。

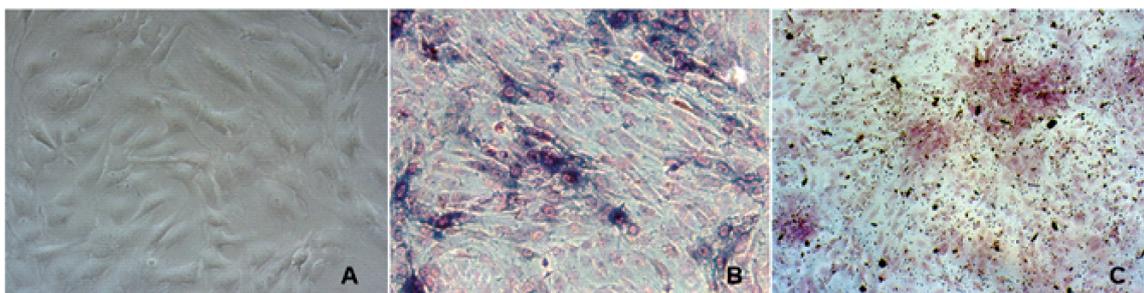
1.7 Western 印迹观察 COL1A1、 β -catenin、RUNX2、wnt3a 的表达 以 2×10^4 孔的种植密度将成骨细胞接种于 6 孔板, 分组培养第 7 天提取各组蛋白。经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 每孔上样 10 μ L, 电泳后转膜到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入 COL1A1 抗体 (1:5 000), β -catenin 抗体 (1:4 000), RUNX2 抗体 (1:1 000), wnt3a 抗体 (1:1 000), GAPDH 抗体 (1:5 000) 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次后加 ECL 试剂反应显像。Image J 软件分析目标

蛋白相对表达量。

1.8 统计学处理 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用统计软件 GraphPad Prism8 的单因素方差分析 (ANOVA) 中的多重比较进行分析, 两两比较采用 *Dunnnett's* 法进行数据分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代成骨细胞鉴定结果 原代成骨细胞镜下外观大多呈梭形、三角形和多边形, 以梭形细胞居多, 延展性较好, 符合成骨细胞形态特征 (图 1A); 光镜下可见碱性磷酸酶染色的深蓝色沉淀 (图 1B); 光镜下可见茜素红染色散在分布的钙结节 (图 1C)。

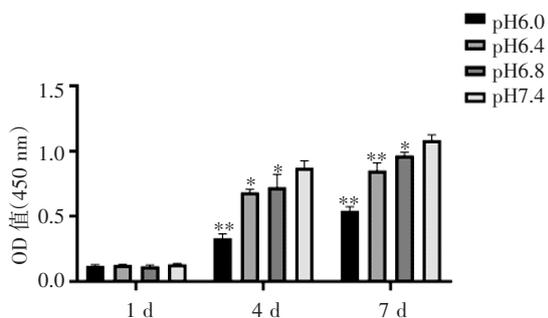


注:A:原代成骨细胞;B:碱性磷酸酶染色结果;C:茜素红染色结果

图 1 原代成骨细胞鉴定结果 (200 \times)

Fig 1 Primary osteoblast identification results (200 \times)

2.2 不同 pH 值对大鼠原代成骨细胞增殖的影响 CCK-8 检测结果显示, 不同 pH 值培养 1 d 时, 细胞增殖率差异没有统计学意义 ($F=2.185, P>0.05$), 培养 4 d 和 7 d 时, pH6.0 组、pH6.4 组、pH6.8 组细胞增殖率均显著小于对照组 ($F=42.800, 93.700$, 均 $P < 0.05$), 见图 2。

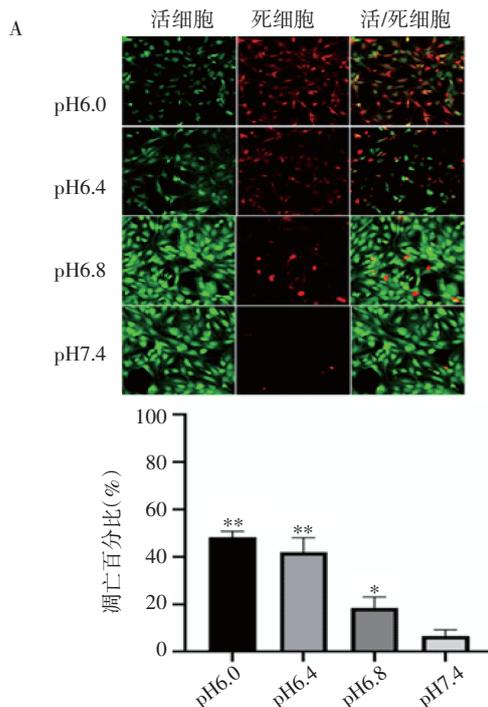


注:与对照组 (pH7.4) 相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

图 2 CCK-8 检测原代成骨细胞在不同 pH 下的增殖情况

Fig 2 CCK-8 detection of the proliferation of primary osteoblasts at different pH

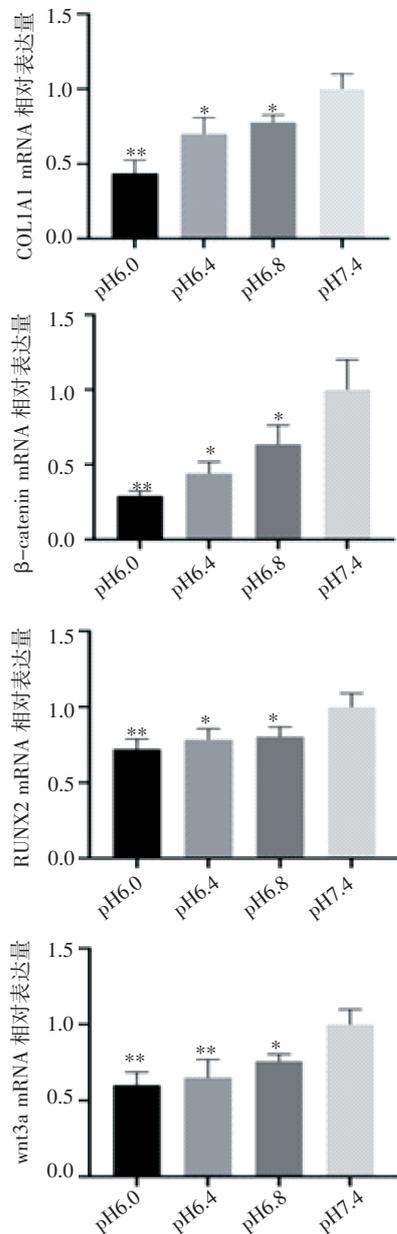
2.3 不同 pH 值对大鼠原代成骨细胞凋亡的影响 Live/Dead 荧光染色结果显示酸性环境下成骨细胞凋亡百分比显著上升 ($F=63.74, P < 0.05$), 见图 3。



注:A:各组成骨细胞 Live/Dead 荧光显微镜下观察 (200 \times), 活细胞呈现为绿色, 死细胞呈现为红色; B:镜下随机选取 3 个视野留取照片, Image J 软件分析各视野下死、活细胞数量, 与对照组 (pH7.4) 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 Live/Dead 染色检测原代成骨细胞在不同 pH 下的凋亡情况
Fig 3 Live/Dead staining detection of the apoptosis of primary osteoblasts at different pH

2.4 不同 pH 值对大鼠原代成骨细胞 COL1A1、 β -catenin、RUNX2、wnt3a mRNA 表达的影响 与对照组(pH7.4)相比,其余各组 COL1A1、 β -catenin、RUNX2、wnt3a mRNA 的表达水平均显著降低 ($F=20.32, 17.76, 7.809, 11.16$, 均 $P<0.05$), 见图 4。

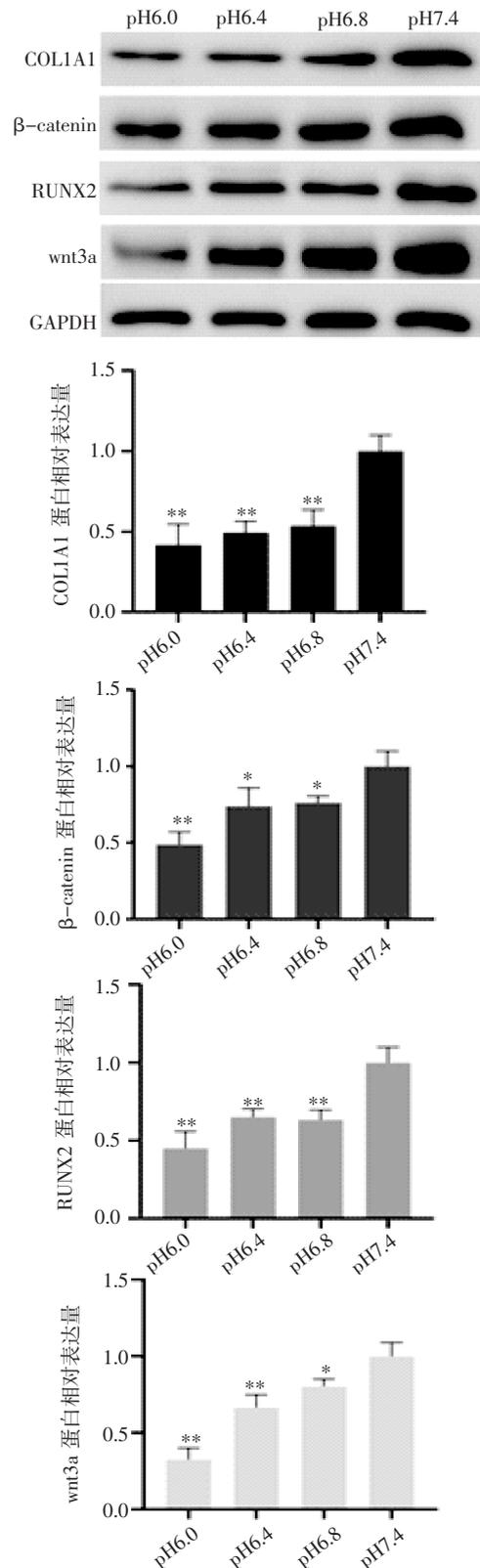


注:与对照组(pH7.4)相比,* $P<0.05$; ** $P<0.01$

图4 RT-PCR 检测各组原代成骨细胞目的基因表达情况

Fig 4 RT-PCR detection of target gene expression in primary osteoblasts of each group

2.5 不同 pH 值对大鼠原代成骨细胞 COL1A1、 β -catenin、RUNX2、wnt3a 蛋白表达的影响 与对照组(pH7.4)相比,其余各组 COL1A1、 β -catenin、RUNX2、wnt3a 的蛋白表达水平均显著降低 ($F=20.02, 15.67, 22.11, 42.11$, 均 $P<0.05$), 见图 5。



注:与对照组(pH7.4)相比,* $P<0.05$; ** $P<0.01$

图5 Western 印迹检测各组原代成骨细胞相关蛋白表达情况

Fig 5 Western blotting detection of protein expression in primary osteoblasts of each group

3 讨论

OP 作为临床上的常见病和多发病,好发于老年男性和绝经期女性,是多种基因-环境因素等微

小作用积累的共同结果^[4]。各种原因导致的骨代谢失衡是 OP 发病的重要因素,而 OB 的数量和分化能力是骨形成的重要保证,所以可以通过促进成骨细胞增殖和成骨分化来防治 OP 的发生。新生大鼠的颅骨为板层骨,几乎无髓腔和小血管,混杂的其他细胞相对较少^[5],因此获取的成骨细胞纯度相对较高,生物学活性较为稳定。

生物体内的酸碱平衡对细胞功能有重要影响,蛋白质的结构和功能受组织液中质子浓度的精细调控,因此酸性内环境可广泛影响体内各种细胞的活性和生物学功能^[6-8]。体外研究表明,酸性环境显著抑制大鼠原代成骨细胞的增殖并促进其凋亡^[9]。本研究也观察到相同的结果,并且在荧光显微镜下观察到实验各组的成骨细胞形态较对照组有皱缩趋势,且荧光强度小于对照组(以 pH6.4 组和 pH6.8 组最为明显),此现象是否说明较为严重的酸中毒能直接影响成骨细胞骨架结构有待进一步研究。酸性内环境对成骨细胞中酶的活性、转录因子的活性和参与骨代谢的其他蛋白质的结构和功能也有显著影响^[10]。体外研究表明在酸性环境下,成骨细胞分泌的白细胞介素-6(IL-6)和组织蛋白酶 B(cathepsin B)的水平均增加,提示酸性环境可能促进局部炎症反应,进而影响骨代谢^[11]。体内实验证明,慢性酸中毒能显著降低大鼠的骨密度以及骨钙素的表达^[12],但是慢性阻塞性肺疾病患者体内的成骨细胞数量及活性如何有待进一步研究。

近年来经研究证实 wnt 信号通路包括 wnt/ β -catenin 通路(经典 wnt 通路)、wnt-PCP 通路(平面细胞极化通路)以及 wnt-Ca²⁺通路(钙离子依赖型通路)^[3],其中 wnt/ β -catenin 信号通路的激活与失活和骨代谢密切相关^[4]。在已发现的 19 种 wnt 配体中,wnt3a 可通过 wnt 经典信号通路促进骨生成^[15]。研究表明,在以酸中毒为主要特征的内毒素性休克大鼠模型的肺组织中,wnt3a、 β -catenin 的表达受到明显抑制^[16],提示酸性环境可能对经典的 wnt 信号通路产生影响。体外实验证明糖皮质激素和炎症因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)可通过促进氧化应激进而抑制成骨细胞的 wnt 信号通路^[17],但氧化应激状态下的酸性内环境在其中是否发挥作用有待进一步研究。RUNX2 是介导成骨细胞分化成熟的重要转录因子,敲除此基因可导致成骨细胞发育抑制及骨发育不良^[18-19]。此外,RUNX2 还是 wnt 经典通路的下游成分,其残缺的结构域存在于 I 型胶原、骨桥蛋白等成骨标志蛋白中^[20]。COL1A1 作为成骨细胞分泌表达的特异性基因,是骨基质的主要有机成分,参

与成骨细胞的分化^[21]。RUNX2 作为成骨的正向调节因子可上调包括 COL1A1 在内的骨基质蛋白基因的表达^[22]。

本研究发现,与对照组(pH7.4)相比,随着培养基 pH 的降低,大鼠原代成骨细胞的增殖受到明显抑制且凋亡率显著上升,成骨细胞 wnt 经典信号通路的核心因子 β -catenin 和配体 wnt3a 的 mRNA 及蛋白的表达显著降低,提示酸性环境可抑制成骨细胞的 wnt 经典信号通路。此外,酸性环境下 RUNX2 和 COL1A1 的 mRNA 和蛋白表达均受到明显抑制,说明酸性环境对成骨细胞分化的抑制作用。综上所述,成骨细胞增殖、凋亡和分化功能均会受到胞外酸性环境的影响,wnt 经典信号通路可能在酸性 pH 抑制成骨细胞功能中发挥作用。

参考文献:

- [1] Compston J E, McClung M R, Leslie W D. Osteoporosis[J]. Lancet, 2019, 393(10169):364
- [2] Brandao-Burch A, Utting J C, Orriss I R, et al. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts *in vitro* by preventing mineralization[J]. Calcif Tissue Int, 2005, 77(3): 167
- [3] Disthabanchong S, Radinahamed P, Stitthantrakul W, et al. Chronic metabolic acidosis alters osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells[J]. Kidney Int, 2007, 71(3):201
- [4] 夏维波,章振林,林华,等.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(3):281
- [5] 李玲慧,丁道芳,杜国庆,等.不同胶原酶消化对原代成骨细胞获得率及活性的比较[J].中国骨伤,2013,26(4):328
- [6] 杨召,苑珍珍,张杨,等. pH 值对大鼠退变椎间盘髓核细胞凋亡的影响[J].中国矫形外科杂志,2018,26(1):66
- [7] 江立波,王会仁,张其琛,等.酸环境对大鼠髓核细胞自噬及功能的影响[J].中国脊柱脊髓杂志,2019,29(7):641
- [8] 耿同会,徐金升,韩迎迎,等.酸性环境抑制高磷诱导大鼠 VSMCs 钙化的机制研究[J].中国现代医学杂志,2018,28(17):1
- [9] 张志超,李雅南,来庆国,等.酸性 pH 环境对成骨细胞增殖和凋亡的影响[J].中国口腔颌面外科杂志,2017,15(1):11
- [10] Kato K, Morita I. Promotion of osteoclast differentiation and activation in spite of impeded osteoblast-lineage differentiation under acidosis: effects of acidosis on bone metabolism [J]. Biosci Trends, 2013, 7(1):33
- [11] Han S H, Chae S W, Choi J Y, et al. Acidic pH environments increase the expression of cathepsin B in osteoblasts: the significance of ER stress in bone physiology[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2009, 31(3):428
- [12] Gasser J A, Hulter H N, Imboden P, et al. Effect of chronic metabolic acidosis on bone density and bone architecture *in vivo* in rats[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(5):F517
- [13] Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, et al. The regulation of bone metabolism and disorders by Wnt signaling [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22):5525

- expression and reverses spatial memory deficits in rats [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8):e24001
- [19] Naidu A, Peters D M, Tan A Q, et al. Daily acute intermittent hypoxia to improve walking function in persons with subacute spinal cord injury: a randomized clinical trial study protocol [J]. *BMC Neurol*, 2020, 20(1):273
- [20] Hassan A, Arnold B M, Caine S, et al. Acute intermittent hypoxia and rehabilitative training following cervical spinal injury alters neuronal hypoxia-and plasticity-associated protein expression [J]. *PLoS One*, 2018, 13(5):e0197486
- [21] Cui L L, Golubczyk D, Jolkkonen J. Top 3 behavioral tests in cell therapy studies after stroke: difficult to stop a moving train [J]. *Stroke*, 2017, 48(11):3165
- [22] Ritzl A, Meisel S, Wittsack H J, et al. Development of brain infarct volume as assessed by magnetic resonance imaging (MRI): follow-up of diffusion-weighted MRI lesions [J]. *JMRI*, 2004, 20(2):201
- [23] Tipirneni-Sajja A, Christensen S, Straka M, et al. Prediction of final infarct volume on subacute MRI by quantifying cerebral edema in ischemic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(8):3077
- [24] Diekhorst L, Gómez-de Frutos M C, Laso-García F, et al. Mesenchymal stem cells from adipose tissue do not improve functional recovery after ischemic stroke in hypertensive rats [J]. *Stroke*, 2020, 51:342
- [25] Yang C J, DeMars K M, Alexander J C, et al. Sustained neurological recovery after stroke in aged rats treated with a novel prostacyclin analog [J]. *Stroke*, 2017, 48:1948
- [26] Kim Y, Kim Y S, Kim H Y, et al. Early treatment with poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitor (JPI-289) reduces infarct volume and improves long-term behavior in an animal model of ischemic stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(9):7153
- [27] Carling D. AMPK signalling in health and disease [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45:31
- [28] Jiang S, Li T, Ji T, et al. AMPK: potential therapeutic target for ischemic stroke [J]. *Theranostics*, 2018, 8(16):4535
- [29] Thomas A, Belaidi E, Moulin S, et al. Chronic intermittent hypoxia impairs insulin sensitivity but improves whole-body glucose tolerance by activating skeletal muscle AMPK [J]. *Diabetes*, 2017, 66(12):2942
- [30] Perim R R, Fields D P, Mitchell G S. Spinal AMP kinase activity differentially regulates phrenic motor plasticity [J]. *J Appl Physiol*, 2020, 128(3):523
- [31] Toyama E Q, Herzig S, Courchet J, et al. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress [J]. *Science*, 2016, 351(6270):275
- [32] Yu J, Li X, Matei N, et al. Ezetimibe, a NPC1L1 inhibitor, attenuates neuronal apoptosis through AMPK dependent autophagy activation after MCAO in rats [J]. *Exp Neurol*, 2018, 307:12
- [33] Yun C W, Lee J H, Lee S H. Hypoxia-induced PGC-1 α regulates mitochondrial function and tumorigenesis of colorectal cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(9):4865
- [34] Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, et al. PGC-1{alpha} and PGC-1{beta} regulate mitochondrial density in neurons [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(32):21379
- [35] Yu K, Kuang S, Wang C, et al. Changes in mitochondria-associated protein expression and mitochondrial function in response to 2 weeks of enriched environment training after cerebral ischaemia-reperfusion injury [J]. *J Mol Neurosci*: MN, 2020, 70(3):413
- [36] Zhang Q, Liang X C. Effects of mitochondrial dysfunction via AMPK/PGC-1 α signal pathway on pathogenic mechanism of diabetic peripheral neuropathy and the protective effects of chinese medicine [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(5):386
- [37] Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige J N, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity [J]. *Nature*, 2009, 458(7241):1056
- [38] Ashabi G, Khodaghali F, Khalaj L, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin protects against global cerebral ischemia in male rats: interference of AMPK/PGC-1 α pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2014, 29(1):47
- [39] Chen C Y, Tsai Y L, Kao C L, et al. Effect of mild intermittent hypoxia on glucose tolerance, muscle morphology and AMPK-PGC-1 α signaling [J]. *Chin J Physiol*, 2010, 53(1):62

(2020-11-24 收稿)

(上接第 221 页)

- [14] Kim J H, Liu X, Wang J, et al. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2013, 5(1):13
- [15] 肖启程, 严光文, 田一男, 等. Wnt 信号配体种类及其在骨代谢中的作用 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2018, 11(6):613
- [16] Hii H P, Liao M H, Chen S J, et al. Distinct patterns of Wnt3a and Wnt5a signaling pathway in the lung from rats with endotoxemic shock [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e134492
- [17] Almeida M, Han L, Ambrogini E, et al. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(52):44326
- [18] Gomathi K, Akshaya N, Srinath N, et al. Regulation of Runx2 by post-translational modifications in osteoblast differentiation [J]. *Life Sci*, 2020, 245:117389
- [19] Komori T. Roles of Runx2 in skeletal development [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 962:83
- [20] Xu M L, Bi C, Liu E, et al. Wnt3a induces the expression of acetylcholinesterase during osteoblast differentiation via the Runx2 transcription factor [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(30):12667
- [21] 张晓晓, 李婧, 王俊妹, 等. 银杏叶提取物对成骨细胞分化及相关机制研究 [J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(5):491
- [22] Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7):1964

(2020-11-14 收稿)