

文章编号 1006-8147(2022)04-0378-05

论 著

BMPER 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路减轻高糖高脂对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的抑制

刘峥, 谢云

(天津医科大学朱宪彝纪念医院老年病科, 天津市内分泌研究所, 国家卫生健康委员会激素与发育重点实验室, 天津市代谢性疾病重点实验室, 天津 300134)

摘要 目的:探究骨形态发生蛋白内皮细胞前体来源调节因子(BMPER)在成骨分化中的生物学作用。方法:将 MC3T3-E1 细胞分为对照(control)组、成骨诱导(OM)组和成骨诱导+高糖高脂(OM+HG/PA)组。采用 Western 印迹法检测各组细胞 Runx2 相关转录因子 2(Runx2)、I 型胶原 $\alpha 1$ (Col1 $\alpha 1$)、BMPER 的表达。将空载体对照质粒及 BMPER 过表达质粒转染到 MC3T3-E1 细胞中,将细胞分为 p-NC 和 p-BMPER 组。使用 Western 印迹法检测各组细胞 BMPER、Runx2、Col1 $\alpha 1$ 、Wnt1、Wnt3a、active β -catenin 表达。碱性磷酸酶(ALP)染色检测 BMPER 对成骨分化的影响。应用非特异性 siRNA 及合成的靶向沉默 BMPER 小干扰 RNA(siRNA)转染 MC3T3-E1 细胞,将细胞分为 si-NC 组及 si-BMPER 组,使用 Western 印迹法检测各组细胞 Wnt1、Wnt3a、active β -catenin 表达。结果:与 OM 组相比,OM+HG/PA 组中 Runx2、Col1 $\alpha 1$ 、BMPER 蛋白表达显著减少($t=7.572$ 、 8.568 、 10.742 , 均 $P<0.05$)。与 p-NC 组相比,p-BMPER 组 Runx2、Col1 $\alpha 1$ 、Wnt1、Wnt3a、active β -catenin 蛋白表达水平显著升高($t=9.816$ 、 8.331 、 8.413 、 14.343 、 9.156 , 均 $P<0.05$),ALP 染色加深。与 si-NC 组相比,si-BMPER 组 Wnt1、Wnt3a、active β -catenin 的表达显著下调($t=10.807$ 、 8.678 、 10.167 , 均 $P<0.05$)。结论:BMPER 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路减轻高糖高脂对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的抑制。

关键词 Wnt 信号通路;BMPER;骨质疏松;MC3T3-E1 细胞;2 型糖尿病

中图分类号 R589.9

文献标志码 A

BMPER alleviates suppression of osteogenic differentiation by high glucose and high lipid in MC3T3-E1 cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway

LIU Zheng, XIE Yun

(Department of Geriatrics, Chu Hsien-I Memorial Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Endocrinology, NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Tianjin 300134, China)

Abstract **Objective:** To explore the biological role of bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator(BMPER) in osteogenic differentiation. **Methods:** MC3T3-E1 cells were divided into control group, osteogenic medium (OM group) and osteogenic medium+high glucose/palmitate(OM+HG/PA group). The expression of Runx2 related transcription factor 2(Runx2) and type I collagen $\alpha 1$ (Col1 $\alpha 1$) and BMPER were detected by Western blotting. Empty vector control plasmid and BMPER overexpression plasmid were transfected into MC3T3-E1 cells, and the cells were divided into p-NC and p-BMPER groups. The expression of Runx2, Col1 $\alpha 1$, BMPER, Wnt1, Wnt3a, active β -catenin in MC3T3-E1 cells were detected by Western blotting. The effect of BMPER on osteogenic differentiation was detected by alkaline phosphoric acid(ALP) staining. MC3T3-E1 cells were transfected with non-specific siRNA and targeted silencing BMPER siRNA. The cells were divided into si-NC group and si-BMPER group. The expression of Wnt1, Wnt3a, active β -catenin in MC3T3-E1 cells was detected by Western blotting. **Results:** Runx2, Col1 $\alpha 1$ and BMPER expression was decreased in the OM+HG/PA group compared with the OM group($t=7.572$, 8.568 , 10.742 , all $P<0.05$). Compared with the p-NC group, Runx2, Col1 $\alpha 1$, Wnt1, Wnt3a and active β -catenin protein levels were significantly increased in the p-BMPER group($t=9.816$, 8.331 , 8.413 , 14.343 , 9.156 , all $P<0.05$). BMPER overexpression deepened ALP staining. Compared with si-NC group, the expression of Wnt1, Wnt3a and active β -catenin was significantly downregulated in si-BMPER group($t=10.807$, 8.678 , 10.167 , all $P<0.05$). **Conclusion:** BMPER alleviates suppression of osteogenic differentiation by high glucose and high lipid in MC3T3-E1 cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words Wnt signaling pathway; BMPER; osteoporosis; MC3T3-E1 cell; type 2 diabetes

随着生活水平的提高和寿命的延长,2 型糖尿病(T2DM)和骨质疏松症的患病率都在增加^[1]。许多

作者简介 刘峥(1995-),女,硕士在读,研究方向:内分泌与代谢病;
通信作者:谢云, E-mail:xieyuntj@126.com。

研究表明,糖尿病与各种骨骼疾病有关,包括骨质疏松、骨微结构破坏和骨折率增加等^[2-3]。糖尿病性骨质疏松发生的主要原因是营养条件的变化和代谢微环境改变等^[4-5]。

骨形态发生蛋白内皮细胞前体来源调节因子(BMPER)最初在对果蝇胚胎内皮前体差异表达蛋白的筛选中被发现,不同情况下对骨形态发生蛋白的作用具有刺激和拮抗作用^[6]。BMPER 基因敲除小鼠的骨骼和软骨发育异常^[7]。BMPER 基因突变在透明椎体发育不良和坐骨棘骨发育不良中也有报道,这两种疾病均导致骨骼发育不良表型^[8-9]。这一发现提示 BMPER 可能参与成骨过程。目前关于 BMPER 在糖尿病条件下对成骨分化的作用及机制仍不清楚,因此,本研究旨在探究在糖尿病条件下 BMPER 在成骨分化中的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞购自武汉普诺赛生命科技公司; α -MEM 培养基、胎牛血清、青-链霉素和胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(货号:LK2001)、 β -actin 抗体(货号:KM9001)购自天津三箭生物技术公司;Active β -Catenin 抗体(货号:19807)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;Runx2 抗体(20700-1-AP)、Wnt3a 抗体(货号:26744-1-AP)、Wnt1 抗体(货号:27935-1-AP)购自美国 Protein-tech 公司;BMPER 抗体(ab73900)购于英国 Abcam 公司;I 型胶原 α 1(Col1 α 1)抗体(BS70155)购自美国 Bioworld 公司;BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶染色试剂盒(货号:C3206)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0012S)购自上海碧云天生物技术公司; β -甘油磷酸酯和抗坏血酸购自美国 Sigma 公司。低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;恒温金属浴购自杭州博日科技公司;凝胶成像仪购自上海天能公司; CO_2 恒温培养箱购自美国赛默飞公司。

1.2 细胞培养及传代 MC3T3-E1 细胞在加入 10% 胎牛血清、1%青-链霉素的 α -MEM 培养基中培养。细胞置于 37℃,5% CO_2 的恒温培养箱中。每 2~3 d 更换 1 次培养基。待细胞融合至 90%左右,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并传代。在成骨分化实验中,MC3T3-E1 细胞融合至 80%时用成骨培养基(α -MEM 培养基中加入 10%胎牛血清,5 mmol/L β -甘油磷酸酯和 50 $\mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸)处理 14 d,每 3 d 更换 1 次培养基。

1.3 碱性磷酸酶(ALP)染色 将 MC3T3-E1 细胞在成骨培养基中培养 14 d,磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤后,用 4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 洗涤 3 次,依照说明书使用 BCIP/NBT 染色工作液室温避光染色 30 min,去除 BCIP/NBT 染色工作液,用蒸馏水洗涤 2 次,终止显色反应,观察并记录。

1.4 细胞的分组及转染 将 MC3T3-E1 细胞均匀接种于 6 孔板中,每孔约 1×10^5 个细胞。当细胞增殖至 70%~80%左右时吸掉旧培养基,用无菌 PBS 洗涤 2 次后,对细胞进行成骨诱导或转染。

1.4.1 成骨诱导 采用成骨培养基(OM)培养 MC3T3-E1 细胞,诱导成骨分化。在成骨培养基中加入 25 mmol/L 葡萄糖(HG)和 0.25 mmol/L 棕榈酸(PA)模拟 T2DM 环境,将 MC3T3-E1 细胞分为对照(control)组、成骨诱导(OM)组和成骨诱导+高糖高脂(OM+HG/PA)组。

1.4.2 BMPER 过表达质粒转染 BMPER 过表达质粒及空载体对照质粒均委托美国 GeneCopoeia 公司进行构建。将空载体对照质粒及 BMPER 过表达质粒转染到 MC3T3-E1 细胞中,将 MC3T3-E1 细胞分为 p-NC 和 p-BMPER 组。采用 Lipofectamine 3000 试剂盒,根据转染说明书进行转染。

1.4.3 siRNA 转染 应用非特异性 siRNA 及合成的靶向沉默 BMPER 小干扰 RNA(siRNA)转染 MC3T3-E1 细胞,将细胞分为 si-NC 组及 si-BMPER 组。以 riboFECTTM 作为转染试剂,按照转染试剂盒说明进行 siRNA 转染。

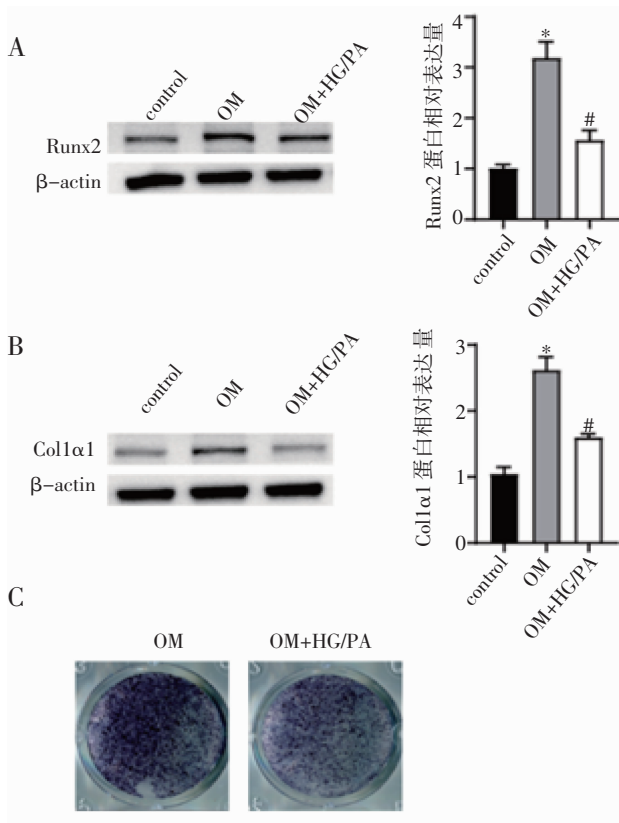
1.5 蛋白质印迹法检测各组蛋白表达水平 收集 MC3T3-E1 细胞,用预冷的 PBS 冲洗 3 次,加入 RIPA 裂解液对各组细胞充分裂解,提取总蛋白,冰上孵育 30 min,期间每 10 min 混匀 1 次。4℃,12 000 r/min,离心 15 min,并通过 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白水平。蛋白经 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,在室温下用 5%脱脂牛奶封闭 1 h。一抗 β -actin (1:10 000)、active β -catenin (1:5 000)、Runx2 (1:1 000)、Wnt3a (1:1 000)、Wnt1 (1:1 000)、BMPER (1:1 000)、Col1 α 1 (1:1 000)4℃孵育 12~16 h。TBST 洗涤 3 次,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 遍后使用 ECL 试剂盒进行化学发光显影,使用蛋白凝胶成像仪拍照。应用 Image J 软件进行分析。以 β -actin 为内参,目的条带灰度值与 β -actin 灰度值之比表示蛋白表达水平。

1.6 统计学处理 利用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析,正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示结果。两组独立样本比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖高脂环境抑制 MC3T3-E1 细胞成骨分化 成骨诱导 14 d 后,OM 组 Runx2 蛋白水平较对照(control)组显著升高($t=11.628, P < 0.05$,图 1A),而 HG/PA 处理后显著降低($t=7.572, P < 0.05$,图

1A)。此外,OM 组 Col1 α 1 蛋白水平较对照组显著升高($t=12.202, P<0.05$,图 1B)。与 OM 组相比,HG/PA 处理后 Col1 α 1 蛋白水平显著降低($t=8.568, P<0.05$,图 1B)。与 OM 组相比,OM+HG/PA 组 ALP 染色减轻(图 1C)。



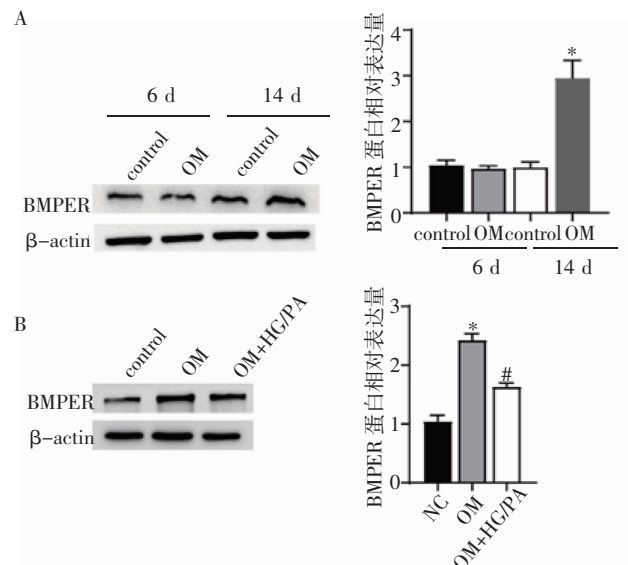
注:A,B:各组成骨相关蛋白检测;C:各组 ALP 染色;与 control 相比,* $P<0.05$;与 OM 组相比,* $P<0.05$;control:对照组;OM:成骨诱导组;OM+HG/PA:成骨诱导+高糖高脂组

图1 高糖高脂环境抑制 MC3T3-E1 细胞成骨分化

Fig1 HG/PA inhibited the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells

2.2 BMPER 在高糖高脂环境中表达降低 成骨培养基诱导 MC3T3-E1 细胞成骨分化 6 d 后,OM 组 BMPER 蛋白表达水平与对照组比较无明显差异($P>0.05$)。OM 成骨分化 14 d 后,与对照组相比,OM 组 BMPER 蛋白表达水平显著升高($t=8.535, P<0.05$),见图 2A。与 OM 组相比,OM +HG/PA 组 BMPER 蛋白表达水平显著降低($t=10.742, P<0.05$),见图 2B。

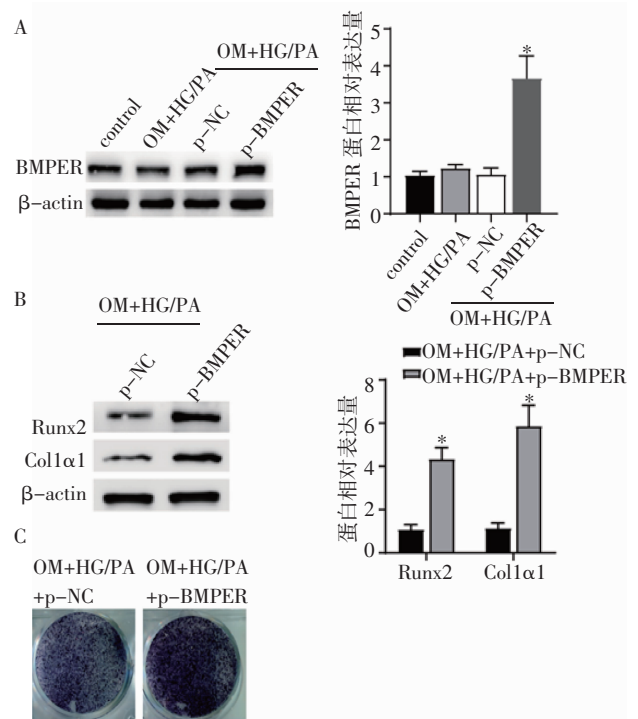
2.3 BMPER 过表达促进成骨分化 Western 印迹显示 p-BMPER 组 BMPER 蛋白水平较 p-NC 组明显升高($t=7.181, P<0.05$),见图 3A。在高糖高脂环境中,成骨分化后,与 p-NC 组相比,p-BMPER 组 Runx2 和 Col1 α 1 表达水平升高 ($t=9.816, 8.331, P<0.05$,图 3B)。与 p-NC 组相比,p-BMPER 组碱性磷酸酶(ALP)染色加深(图 3C)。



注:与 control 相比,* $P<0.05$;与 OM 相比,* $P<0.05$;control:对照组;OM:成骨诱导组;OM+HG/PA:成骨诱导+高糖高脂组;BMPER:骨形态发生蛋白内皮细胞前体来源调节因子

图2 BMPER 在高糖高脂环境中表达降低

Fig 2 The expression of BMPER decreased in HG/PA conditions



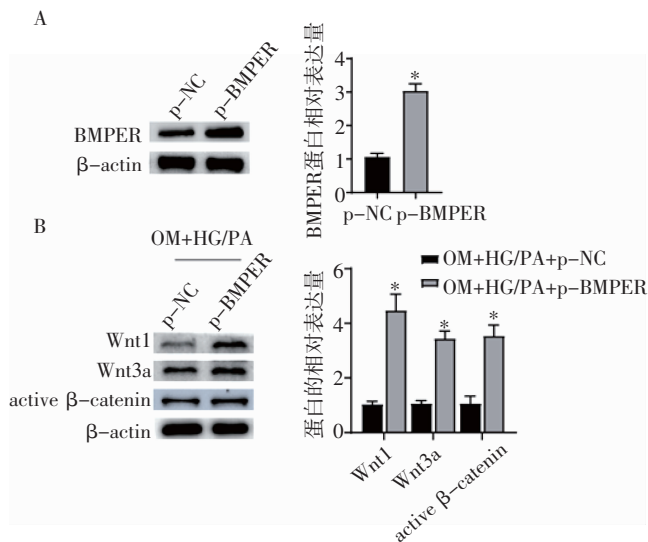
注:A,B:各组成骨相关蛋白检测;C:各组碱性磷酸酶染色;与 p-NC 相比,* $P<0.05$;control:空白对照组;OM+HG/PA:成骨诱导+高糖高脂组;p-NC:阴性对照组;p-BMPER:过表达 BMPER 组;BMPER:骨形态发生蛋白内皮细胞前体来源调节因子

图3 BMPER 过表达促进成骨分化

Fig 3 Osteogenic differentiation facilitated by the overexpression of BMPER

2.4 BMPER 过表达上调 Wnt/ β -catenin 信号通路 Western 印迹结果显示,BMPER 在 MC3T3-E1 细胞中过表达($t=13.023, P<0.05$),见图 4A。与 p-NC 组相比,p-BMPER 组 MC3T3-E1 细胞中 Wnt1、

Wnt3a、active β -catenin 显著上调($t=8.413, 14.343, 9.156$, 均 $P<0.05$), 见图 4B。

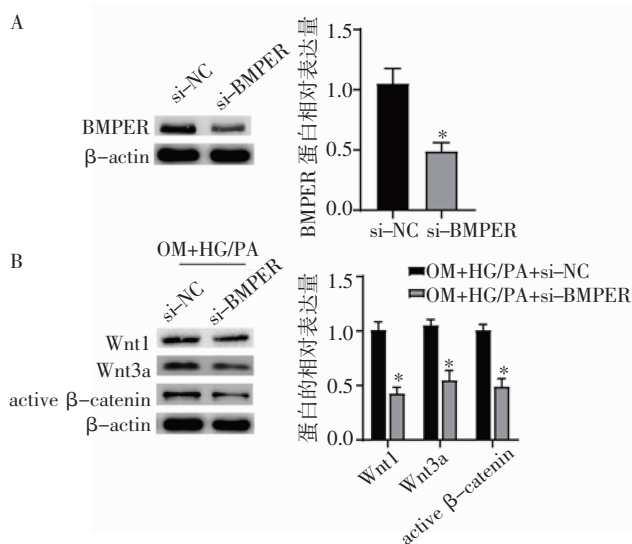


注:各组蛋白表达水平;与 p-NC 组相比, $*P<0.05$; OM+HG/PA: 成骨诱导+高糖高脂; p-NC: 阴性对照组; p-BMPER: 过表达 BMPER 组; BMPER: 骨形态发生蛋白内皮细胞前体来源调节因子

图 4 BMPER 过表达上调 Wnt/ β -catenin 信号通路

Fig 4 BMPER overexpression promoted the Wnt/ β -catenin signaling pathway

2.5 BMPER 下调抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路 Western 印迹结果显示,与 si-NC 组相比, si-BMPER 组 MC3T3-E1 细胞中 BMPER 显著下调($t=6.911$, $P<0.05$), 见图 5A。与 si-NC 组相比, si-BMPER 组 MC3T3-E1 细胞中 Wnt1、Wnt3a、active β -catenin 的表达水平显著降低($t=10.807, 8.678, 10.167$, 均 $P<0.05$), 见图 5B。



注:各组蛋白表达水平;与 si-NC 组相比, $*P<0.05$; OM+HG/PA: 成骨诱导+高糖高脂; si-NC: 阴性对照组; si-BMPER: 下调 BMPER 组; BMPER: 骨形态发生蛋白内皮细胞前体来源调节因子

图 5 下调 BMPER 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路

Fig 5 Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibited by the down-regulation of BMPER

3 讨论

本研究探讨了 BMPER 在 MC3T3-E1 细胞成骨分化中的作用。结果显示,与未成骨诱导组相比, OM-MC3T3-E1 组细胞中 BMPER 表达增加。BMPER 在高糖高脂环境中表达降低。在高糖高脂环境中过表达 BMPER 可促进成骨分化及上调 Wnt/ β -catenin 信号通路,下调 BMPER 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路。这些数据表明, BMPER 在高糖高脂环境中 MC3T3-E1 细胞成骨分化中具有促进作用。

骨质疏松症是一种常见的全身性骨骼疾病,会导致骨骼脆弱并增加骨折风险^[10]。T2DM 是一种慢性代谢性疾病,以糖代谢受损和胰岛素抵抗导致血糖水平升高为特征,随着时间的推移转化为胰岛素缺乏^[11]。T2DM 与骨质疏松的发生有关^[12]。研究表明,糖尿病诱发的骨质疏松症是由慢性高血糖、晚期糖基化终末产物和氧化应激引起的^[13-14]。在体外,高糖通过抑制成骨细胞增殖和分化显著抑制骨形成^[15]。Runx2 和 Col1 α 1 是参与调控成骨细胞分化的关键因子。在本实验中,与对照组相比,高糖高脂刺激下的 MC3T3-E1 细胞成骨生物标志物 Runx2 和 Col1 α 1 的表达降低。此外,有研究发现高糖可诱导成骨细胞凋亡并抑制前成骨细胞的成骨分化^[16]。

与健康个体相比,自发发展为高胰岛素血症和胰岛素抵抗的小鼠的 BMPER 血清水平较低,代谢综合征(MS)患者的 BMPER 血浆水平降低了约 50%^[17],提示 BMPER 参与了调控 T2DM 发生的关键分子机制。促进骨形成是治疗骨折、骨折延迟愈合和其他相关疾病的关键^[18]。研究发现, BMPER 在成骨分化过程中发挥积极作用^[19]。BMPER 通过上调成骨细胞标志物如 ALP 和 Runx2 促进人冠状动脉平滑肌细胞的成骨分化^[20]。本实验发现成骨分化后 BMPER 表达增加,而高糖高脂环境中的 MC3T3-E1 细胞 BMPER 表达减少。在高糖高脂环境中 BMPER 过表达促进 MC3T3-E1 细胞成骨生物标志物 Runx2 和 Col1 α 1 的表达,表明 BMPER 在 T2DM 患者骨质疏松发展中具有重要作用。

Wnt/ β -catenin 信号通路是维持骨稳态的重要通路。该信号通路的激活促进骨形成,而该通路的失活导致骨质减少^[21-22]。成骨过程中经典 Wnt 信号通路的激活和失活异常分别导致硬化症和骨质疏松症^[23]。活化的 β -Catenin 与细胞核内 TCF/LEF-1 或其他转录辅激活因子相互作用,诱导成骨相关蛋白的表达,调控成骨^[24-25]。Wnt3a 可与低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6(LRP5/6)协同受体结合,通过诱导 GSK-3 β 磷酸化,稳定细胞质 β -catenin。 β -catenin

在细胞质中积累,并转运到细胞核中对靶基因进行调控^[25]。在笔者的研究中,BMPER 过表达上调Runx2和Col1 α 1,证明 BMPER 过表达促进成骨分化。此外,BMPER 过表达上调 Wnt/ β -catenin 信号通路,而 BMPER 下调抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路。这些数据表明,BMPER 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 MC3T3-E1 细胞成骨分化。

本研究的所有数据均来自于使用 MC3T3-E1 细胞株建立的 T2DM 模型,因此还需要使用其他成骨细胞株进行进一步验证。此外,目前的研究还没有从 T2DM 动物模型或 T2DM 患者中获得对应结果,这些数据还需要进一步收集,以证实体外结果。

总之,本研究发现 BMPER 在成骨分化后表达增加,而在高糖高脂环境中的 MC3T3-E1 细胞中表达减少。BMPER 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路减轻高糖高脂对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的抑制。本研究揭示了 BMPER 在 MC3T3-E1 细胞成骨分化中发挥重要的调节作用。BMPER 可能成为 T2DM 患者骨代谢疾病临床治疗的潜在靶点。

参考文献:

- [1] SEALAND R, RAZAVI C, ADLER R A. Diabetes mellitus and osteoporosis [J]. *Curr Diab Rep*, 2013, 13(3): 411-418.
- [2] KURRA S, FINK D A, SIRIS E S. Osteoporosis-associated fracture and diabetes [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2014, 43(1): 233-243.
- [3] YAMAMOTO M, SUGIMOTO T. Advanced glycation end products, diabetes, and bone strength [J]. *Curr Osteoporosis Rep*, 2016, 14(6): 320-326.
- [4] ANTONOPOULOU M, BAHTIYAR G, BANERJI M A, et al. Diabetes and bone health [J]. *Maturitas*, 2013, 76(3): 253-259.
- [5] MASCITELLI L, PEZZETTA F. Diabetes and osteoporotic fractures [J]. *CMAJ*, 2007, 177(11): 1391-1392.
- [6] MOSER M, BINDER O, WU Y, et al. BMPER, a novel endothelial cell precursor-derived protein, antagonizes bone morphogenetic protein signaling and endothelial cell differentiation [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(16): 5664-5679.
- [7] IKEYA M, KAWADA M, KIYONARI H, et al. Essential pro-Bmp roles of crossveinless 2 in mouse organogenesis [J]. *Development*, 2006, 133(22): 4463-4473.
- [8] BEN-NERIAH Z, MICHAELSON-COHEN R, INBAR-FEIGENBERG M, et al. A deleterious founder mutation in the BMPER gene causes diaphanospodilydysostosis (DSD) [J]. *Am J Med Genet A*, 2011, 155A(11): 2801-2806.
- [9] KUCHINSKAYA E, GRIGELIONIENE G, HAMMARSSJÖ A, et al. Extending the phenotype of BMPER-related skeletal dysplasias to ischiopspinal dysostosis [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2016, 11: 1.
- [10] ENSRUD K E, CRANDALL C J. Osteoporosis [J]. *Ann Intern Med*, 2017, 167(3): 17-22.
- [11] FU C, ZHANG X, YE F, et al. High insulin levels in KK-Ay diabetic mice cause increased cortical bone mass and impaired trabecular micro-structure [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(4): 8213-8226.
- [12] CHIODINI I, CATALANO A, GENNARI L, et al. Osteoporosis and fragility fractures in type 2 Diabetes [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 9342696.
- [13] CORTET B, LUCAS S, LEGROUX-GEROT I, et al. Bone disorders associated with diabetes mellitus and its treatments [J]. *Joint Bone Spine*, 2019, 86(3): 315-320.
- [14] MOHSIN S, BANIYAS M M, ALDARMAKI R S, et al. An update on therapies for the treatment of diabetes-induced osteoporosis [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(9): 937-948.
- [15] ZHANG Y, YANG J H. Activation of the PI3K/Akt pathway by oxidative stress mediates high glucose-induced increase of adipogenic differentiation in primary rat osteoblasts [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(11): 2595-2602.
- [16] FENG Z, DENG H, DU J, et al. Lentiviral-mediated RNAi targeting p38MAPK ameliorates high glucose-induced apoptosis in osteoblast MC3T3-E1 cell line [J]. *Indian J Exp Biol*, 2011, 49(2): 94-104.
- [17] MAO H, LI L, FAN Q, et al. Loss of bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator causes insulin resistance [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1927.
- [18] LANE J M, RUSSELL L, KHAN S N. Osteoporosis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2000, (372): 139-150.
- [19] TERAOKA Y, SATOMI-KOBAYASHI S, HIRATA K, et al. Involvement of Rho-associated protein kinase (ROCK) and bone morphogenetic protein-binding endothelial cell precursor-derived regulator (BMPER) in high glucose-increased alkaline phosphatase expression and activity in human coronary artery smooth muscle cells [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2015, 14: 104.
- [20] SATOMI-KOBAYASHI S, KINUGASA M, KOBAYASHI R, et al. Osteoblast-like differentiation of cultured human coronary artery smooth muscle cells by bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator (BMPER) [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(36): 30336-30345.
- [21] HUANG P, YAN R, ZHANG X, et al. Activating Wnt/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: challenges and opportunities [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 196: 79-90.
- [22] JIANG T, XIA C, CHEN X, et al. Melatonin promotes the BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by activating the AMPK/ β -catenin signalling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 408.
- [23] JACKULIAK P, PAYER J. Osteoporosis, fractures, and diabetes [J]. *Int J Endocrinol*, 2014, 2014: 820615.
- [24] XIA K, CEN X, YU L, et al. Long noncoding RNA expression profiles during the NEL-like 1 protein-induced osteogenic differentiation [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(9): 6010-6022.
- [25] YU A X, XU M L, YAO P, et al. Corylin, a flavonoid derived from Psoralea Fructus, induces osteoblastic differentiation via estrogen and Wnt/ β -catenin signaling pathways [J]. *FASEB J*, 2020, 34(3): 4311-4328.

(2021-11-22 收稿)