

柚皮苷对兔骨髓基质细胞成骨分化、增殖和迁移及对 OPG/RANKL 信号通路的调节作用^{*}

覃浩然 宋泉生 覃海飏 钟远鸣 付拴虎 谷金 卢大汉 陈勇喜

(广西中医药大学第一附属医院骨一科, 广西 南宁 530023)

【摘要】 目的 探讨柚皮苷对兔骨髓基质细胞成骨分化、增殖和迁移及对 OPG/RANKL 信号的调节作用。方法 选用 2~3 月龄新西兰大白兔提取兔骨髓基质细胞, 用不同浓度(0~1000 μM)的柚皮苷处理细胞 48 h, CCK-8 试剂盒测量细胞活力。后续采用柚皮苷(0、10、25、50 μM)处理细胞 48 h, 碱性磷酸酶(ALP)活性测量试剂盒和茜素红 S(ARS)染色确定细胞成骨分化能力; 细胞划痕试验和结晶紫染色检测细胞的迁移能力; 实时荧光定量-聚合酶链式反应(RT-PCR)法测量细胞中 OPG、Runx2、OCN 和 RANKL mRNA 水平; 蛋白免疫印迹法测量细胞中 OPG、Runx2、OCN 和 RANKL 蛋白水平。结果 与 0 μM 组比较, 10 μM 、25 μM 和 50 μM 的柚皮苷对兔骨髓基质细胞活力并无影响。柚皮苷(25 μM 和 50 μM)组较 0 μM 组兔骨髓基质细胞的 ALP 活性增强, 且 ARS 染色增强。同时, 柚皮苷 10、25、50 μM 组细胞的迁移能力增强。柚皮苷处理组细胞中 OPG、Runx2 和 OCN mRNA 和蛋白水平明显上调, 但柚皮苷处理组细胞中 RANKL mRNA 和蛋白水平明显下调。结论 柚皮苷能促进兔骨髓基质细胞成骨分化和迁移, 且可能与调节 OPG/RANKL 信号通路有关。

【关键词】 柚皮苷; 兔骨髓基质细胞; 骨保护素; 核因子 κB 受体活化因子配体

【中图分类号】 R336 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 01. 010

Effects of naringin on the osteogenic differentiation, proliferation and migration and OPG/RANKL gene expression of rabbit bone marrow stromal cells

QIN Haoran, SONG Quansheng, QIN Haibiao, ZHONG Yuanming, FU Shuanhu, GU Jin, LU Dahan, CHEN Yongxi

(Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of Naringin on the osteogenic differentiation, proliferation and migration and OPG/RANKL gene expression of rabbit bone marrow stromal cells. **Methods** 2-3 months old New Zealand white rabbits were used to extract rabbit bone marrow stromal cells. The cells were treated with different concentrations (0-1000 μM) of naringin for 48 hours, and the cell viability was measured with CCK-8 kit. The cells were treated with naringin (0 μM , 10 μM , 25 μM and 50 μM) for 48 hours, alkaline phosphatase (ALP) activity measurement kit and Alizarin Red S (ARS) staining were used to determine the osteogenic differentiation ability of the cells. Cell scratch test and crystal violet staining were used to detect cell migration ability. Real-time quantitative-polymerase chain reaction (RT-PCR) method measures the levels of OPG, Runx2, OCN and RANKL mRNA in cells. Western blotting was used to measure OPG, Runx2, OCN and RANKL protein levels in cells. **Results** Compared with the 0 μM group, 10 μM , 25 μM and 50 μM naringin had no effect on the viability of rabbit bone marrow stromal cells. The ALP activity of rabbit bone marrow stromal cells in the naringin (25 μM and 50 μM) group was increased and the ARS staining was enhanced. At the same time, the cell migration ability of naringin 10 μM , 25 μM and 50 μM groups was enhanced. The mRNA and protein levels of OPG, Runx2 and OCN in the naringin treatment group were significantly up-regulated, but the RANKL mRNA and protein levels in the naringin treatment group were significantly down-regulated. **Conclusion** Naringin can promote the osteogenic differentiation and migration of rabbit bone marrow stromal cells, and it may be related to the regulation of OPG/RANKL gene expression.

【Key words】 Naringin; Rabbit bone marrow stromal cells; Osteoprotegerin; Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand

基金项目: 广西自然科学基金项目(2018JJA140428)

引用本文: 覃浩然, 宋泉生, 覃海飏, 等. 柚皮苷对兔骨髓基质细胞成骨分化、增殖和迁移及对 OPG/RANKL 信号通路的调节作用[J]. 西部医学, 2022, 34(1): 51-56. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 01. 010

股骨头坏死的治疗一直是临床骨科的主要问题,治疗周期长且困难,给患者的生理、心理和财务状况带来了巨大负担^[1-2]。随着间充质干细胞研究的进展,多能干细胞已成为重要的种子细胞,而骨髓基质细胞是髓内多能基质细胞,可以分化为成年细胞,如骨细胞、软骨细胞等^[3]。这些细胞产生大量的细胞外基质分子和细胞因子(胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白,白介素-3/6/8, MCS-F 和血小板生成素),不仅有促进局部造血作用,而且还有效促进骨修复。骨髓基质细胞不仅易于管理,而且不会引起自身免疫反应。因此,如何有效促进骨髓基质细胞的成骨分化成为骨损伤相关疾病治疗的热点。

柚皮苷属于类黄酮,是重要的次生代谢产物,是水果中发现的生物活性化合物,广泛分布在植物来源的食物,如蔬菜、水果、茶和葡萄酒等^[4]。这些植物、药物因其不易上瘾且无毒的性质,在传统医学中具有重要意义。有研究表明,柚皮苷具有抗氧化、抗白内障、抗微生物、抗诱变、抗癌、抗炎和降低胆固醇的作用^[5-7]。进一步的研究还表明,柚皮苷的配方可促进骨骼再生,并具有预防 PM10 引起的肺损伤的作用^[8]。柚皮苷口服或直接与骨髓基质细胞注射对兔膝关节软骨缺损具有修复作用^[9]。但柚皮苷是否影响骨髓基质细胞的成骨分化和迁移依然不太清晰,故本研究旨在探讨柚皮苷对骨髓基质细胞的成骨分化和迁移的作用和机制。

1 材料与方 法

1.1 试剂 DMEM 细胞培养液、胎牛血清(FBS)均购自 GIBIC(USA);柚皮苷(阿拉丁,中国);十六烷基氯化吡啶鎓(CPC, Sigma, USA);RNA 提取试剂(Takara, 中国);CCK-8 试剂盒(MCE, 中国);碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(南京建成, 中国);茜素红 S(ARS)染色(上海歌凡生物, 中国);anti-OPG、anti-RANKL、anti-OCN、anti- β -Actin(Abcam, USA);结晶紫染色液(碧云天, 中国)。

1.2 细胞培养 提取兔骨髓基质细胞原代培养^[10]:选用 2~3 月龄新西兰大白兔,戊巴比妥钠麻醉,酒精消毒,切开两侧股骨和胫骨,用含有 5 mL 生理盐水和肝素(100 μ L/mL)的 20 mL 注射器抽取骨髓,收集细胞悬液于离心管。1500 r/m 离心 10 min,弃上清,加入含有 10% FBS 的 DMEM 培养基制备细胞悬液,反复吹打均匀,细胞计数,接种于 25 mL 细胞培养瓶,于 37℃ 和 5% CO₂ 条件下培养,隔日换一次液,待细胞长至 80% 时,胰酶消化传代,待细胞长至第 3 代则开始用于后续试验。

1.3 细胞活性测量 将兔骨髓基质细胞以每孔 1000

个细胞的密度接种在 96 孔板中。然后用不同浓度的柚皮苷(0、5、10、25、50、100、1000 μ M)处理细胞 48 h。根据 CCK-8 试剂盒说明,每孔加入 10% CCK-8 液,继续孵育 1 h,于 450 nm 处的吸光度测量细胞活力。

1.4 ALP 活性 将兔骨髓基质细胞以 3×10^4 /cm² 的密度接种到 12 孔板中,然后用不同浓度的柚皮苷(0、10、25、50 μ M)处理细胞 48 h。然后将板用 PBS 洗涤 3 次,根据制造商的说明使用 ALP 活性测定法确定 ALP 活性。

1.5 ARS 染色 将兔骨髓基质细胞用不同浓度的柚皮苷(0、10、25、50 μ M)处理细胞 48 h,根据制造商的说明 ARS 染色。首先,在室温下将样品在 4% 多聚甲醛中固定 30 min。用 PBS 洗涤 3 次后,使用 0.5% ARS(PH 4.1)染色细胞。然后,将兔骨髓基质细胞再次用 PBS 洗涤 3 次,并使用 10% 的 CPC 提取钙沉积物。然后通过测量 560 nm 处的吸光度对进行定量。

1.6 细胞划痕试验 将兔骨髓基质细胞每孔 4×10^4 个细胞的密度接种在 6 孔板中,然后使用无菌微量移液器吸头从 6 孔细胞培养板的一端到另一端刮擦细胞层。然后用不同浓度的柚皮苷(0、10、25、50 μ M)处理细胞 48 h,于倒置显微镜下观察拍照。

1.7 细胞结晶紫染色 将 Transwell 小室置于 24 孔板,用含不同浓度柚皮苷的培养基重悬细胞,并以 3×10^4 /cm² 的密度接种到 Transwell 上室。下室中加入含 10% FBS 的培养基,于细胞培养箱培养 48 h。吸弃上室中的细胞,将小室置于 4% 多聚甲醛溶液中室温固定 30 min,随后用 0.01% 的结晶紫溶液染色 30 min,用 PBS 漂洗 3 次。显微镜拍照观察,ImageJ 图像软件计数,并计算细胞迁移率。

1.8 实时荧光定量-聚合酶链式反应(RT-PCR) 兔骨髓基质细胞以每孔 4×10^4 个细胞的密度接种在 6 孔板中。细胞达到 80% 后,用不同浓度的柚皮苷(0、10、25、50 μ M)处理细胞 48 h。使用 RNAiso 试剂提取细胞总 RNA。然后,根据制造商的说明使用 PrimeScript™ RT Master Mix(Takara, 日本)通过反转录获得 cDNA, qPCR 使用 ABI Step One Plus 实时 PCR 系统(Applied Biosystems, Warrington, 英国)。将反应循环设置为 95℃ 30 s,然后将 95℃ 5 s 和 60℃ 30 s 设置为 45 个循环。本实验使用 GAPDH 作为内参基因,并通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法表示目标基因的相对表达。引物序列如下:OPG Forward 5'-TACAGCATCACT ACGTAGGAC-3', OPG Reverse 5'-ACGTCATGCG ATCACATATCG-3'; RANKL Forward 5'-GACAG GCACGGACTCGTA-3', RANKL Reverse 5'-CGCT CATGCTAGTCGTCTA -3'; Runx2 Forward 5'-AGCG

CTTCTCAGGAGTTCCA-3', Runx2 Reverse 5'-GCCG GGCCACATCGA-3'; OCN Forward 5'-CTGGCTG CGCTCTGTCTCT-3', OCN Reverse 5'-TGCTTGG ACATGAAGGCTTTG-3'; GADPH Forward 5'-CA ACTTTGGCATTGTGGAAGG-3', GADPH Reverse 5'-ACACATTGGGGGTAGGAACAC-3'.

1.9 蛋白免疫印迹(Western blot) 使用 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白,使用 BCA 测定试剂盒蛋白定量。用 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白,然后转移到 PVDF 膜。在室温下用 5% 脱脂奶封闭 1 h,将膜与相应抗体于 4℃ 孵育过夜:抗 OPG (1:1000 稀释),抗 RANKL (1:1000 稀释),抗 RunX2 (1:1000 稀释),抗 OCN (1:1000 稀释) 和 β -Actin (1:1000 稀释)。将膜用 TBST 洗涤,然后与 HRP 标记的二抗在室温下孵育 45 min。用化学发光检测试剂检测,用 ImageJ 图像软件分析相对蛋白水平,并根据 β -Actin 进行归一化。

1.10 统计学分析 数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用单向方差分析比较两组之间的差异,然后使用 GraphPad Prism 软件 Tukey 的多重比较进行统计学分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 柚皮苷对兔骨髓基质细胞活性的影响 细胞活性测量结果表明,与 0 μ M 组比较,柚皮苷 100 μ M 和 1000 μ M 明显抑制细胞活性,但 50、25、10、5 μ M 对细胞活性无影响,因此后续采用柚皮苷 50 μ M、25 μ M 和 10 μ M 进行后续试验,见图 1。

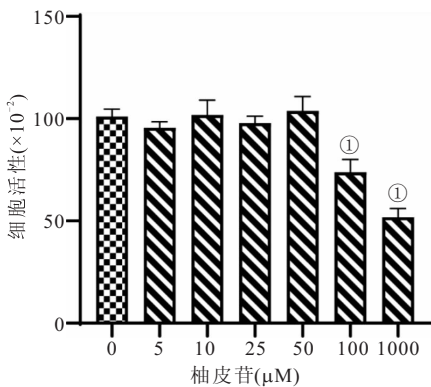


图 1 柚皮苷对兔骨髓基质细胞活性的影响

Figure 1 The effect of naringin on the activity of rabbit bone marrow stromal cells

注:与 0 μ M 组比较,① $P<0.001$

2.2 柚皮苷对兔骨髓基质细胞成骨分化的影响

ALP 染色结果表明,与 0 μ M 组比较,柚皮苷 25 μ M 和 50 μ M 组细胞中 ALP 活性明显增强($P<0.05$),见图 2A~B。ARS 染色结果同样表明,与 0 μ M 组比较,柚皮苷 25 μ M 和 50 μ M 组细胞有明显的钙沉积物

形成,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2C~D。

2.3 柚皮苷对兔骨髓基质细胞迁移的影响 细胞划痕和结晶紫染色结果表明,与 0 μ M 组比较,柚皮苷 10 μ M、25 μ M 和 50 μ M 组细胞的迁移能力增强,且随浓度升高而增强,呈浓度依赖性(均 $P<0.05$),见图 3。

2.4 柚皮苷对兔骨髓基质细胞中 OPG 和 RANKL 相关基因表达的影响 与 0 μ M 组比较,柚皮苷处理组细胞中 OPG、Runx2 和 OCN mRNA 水平明显上调,且呈浓度依赖性。但柚皮苷处理组细胞中 RANKL mRNA 水平较 0 μ M 组明显下调,差异有统计学意义(均 $P<0.05$),见图 4。

2.5 柚皮苷对兔骨髓基质细胞中 OPG 和 RANKL 相关蛋白表达的影响 与 0 μ M 组比较,柚皮苷处理组细胞中 OPG、Runx2 和 OCN 蛋白水平明显上调,且呈浓度依赖性。但柚皮苷处理组细胞中 RANKL 蛋白水平较 0 μ M 组明显下调(均 $P<0.05$),见图 5。

3 讨论

股骨头坏死主要是由于临床长期大剂量使用类固醇激素治疗,如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤以及其他炎性和自身免疫性疾病引起的严重并发症^[11]。随着疾病的进展,病变逐渐涉及关节和骨髓,然后在晚期发展为股骨头塌陷和髓样骨关节炎,导致难以忍受的疼痛,折断甚至残疾。当疾病严重到一定程度时,通常需要进行人工关节置换手术以确保关节的正常功能和减轻症状^[12]。但手术费用昂贵,且二次手术风险较高,给社会和家庭带来了沉重的经济负担。深入分析股骨头坏死的发病机理以及开发相应的新药对于缓解患者的压力非常重要^[13]。到目前为止,虽然尚不清楚股骨头坏死的发病机理,但主要的机制理论集中于骨髓基质细胞的成骨分化稳态过程。

骨髓基质细胞是机体骨髓中的一类多功能干细胞,可用作种子细胞以分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等^[14]。越来越多的证据表明,股骨头坏死患者骨髓基质细胞的成骨分化能力下降,而脂肪形成分化能力增强,这导致细胞组织的供血和供氧不足,促进细胞功能障碍和细胞凋亡,然后导致股骨头坏死的恶性循环^[15]。因此,提高骨髓基质细胞的成骨分化和迁移有望成为股骨头坏死治疗的新策略。口服柚皮苷在骨关节炎模型中具有治疗软骨破坏的潜力^[16]。柚皮苷也能够调节炎症性蛋白分泌并促进软骨细胞浸润^[17]。柚皮苷能够促进骨骼再生以及口服或直接与骨髓基质细胞注射对兔膝关节软骨缺损具有修复作用^[18]。本研究发现,柚皮苷能够直接促进骨髓基质细

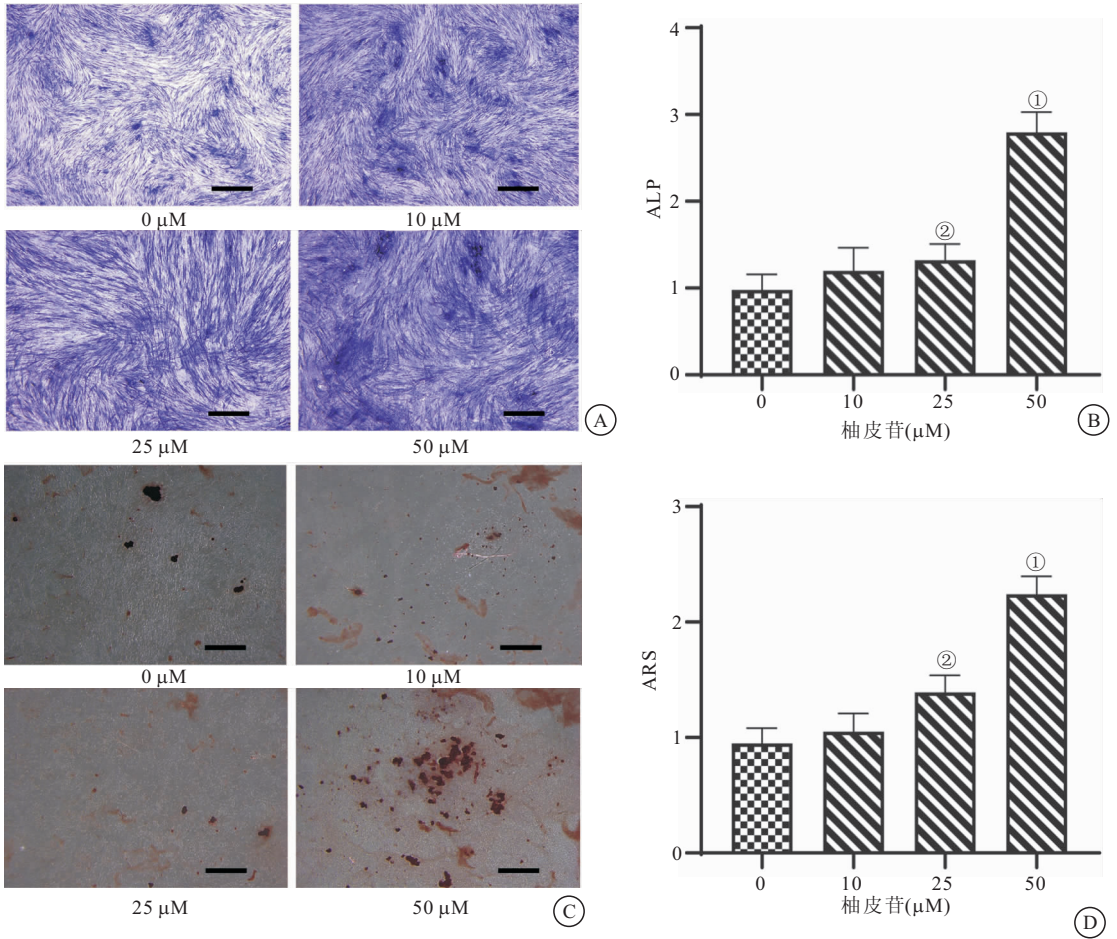


图 2 柚皮苷对兔骨髓基质细胞成骨分化的影响

Figure 2 The effect of naringin on the osteogenic differentiation of rabbit bone marrow stromal cells

注: A. 兔骨髓基质细胞 ALP 染色图; B. 兔骨髓基质细胞 ALP 染色统计图结果; C. 兔骨髓基质细胞 ARS 染色图; D. 兔骨髓基质细胞 ARS 染色统计图结果。ALP 图标尺: 500 μm; ARS 图标尺: 200 μm。与 0 μM 组比较, ①P < 0.001, ②P < 0.01

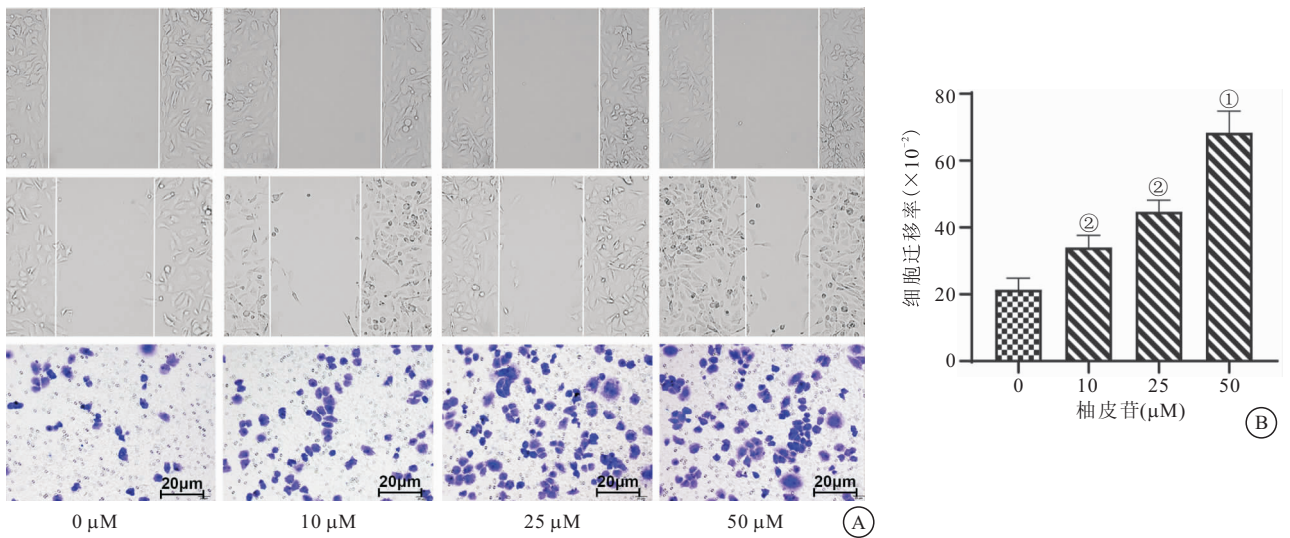


图 3 柚皮苷对兔骨髓基质细胞迁移的影响

Figure 3 The effect of naringin on the migration of rabbit bone marrow stromal cells

注: A. 兔骨髓基质细胞划痕和结晶紫染色图; B. 兔骨髓基质细胞结晶紫染色统计结果; 与 0 μM 组比较, ①P < 0.001, ②P < 0.01

胞成骨分化和迁移。

本研究选择茜素红 S 染色和 ALP 染色评价骨髓

基质细胞的成骨分化能力。其中, ALP 是一种膜结合酶, 可以水解有机磷酸盐以释放无机磷并开始钙化过

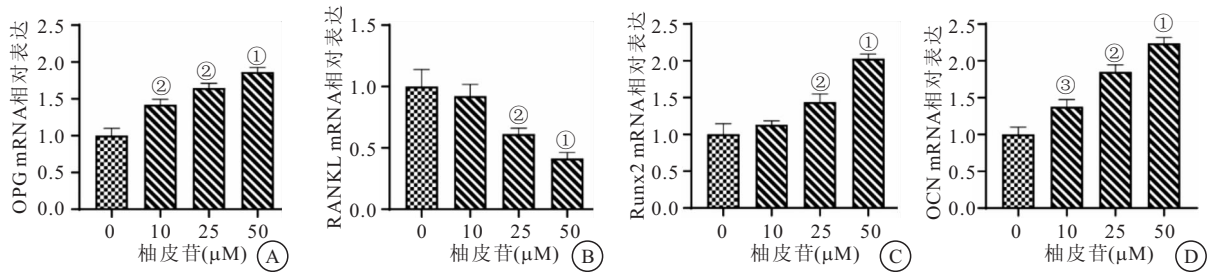


图 4 柚皮苷对兔骨髓基质细胞中 OPG/RANKL 相关基因表达的影响

Figure 4 The effect of naringin on the expression of OPG/RANKL related genes in rabbit bone marrow stromal cells

注: A. 总骨髓基质细胞中 OPG mRNA 水平; B. 兔骨髓基质细胞中 RANKL mRNA 水平; C. 兔骨髓基质细胞中 Runx2 mRNA 水平; D. 兔骨髓基质细胞中 OCN mRNA 水平。与 0 μM 组比较, ① $P < 0.001$, ② $P < 0.01$, ③ $P < 0.05$

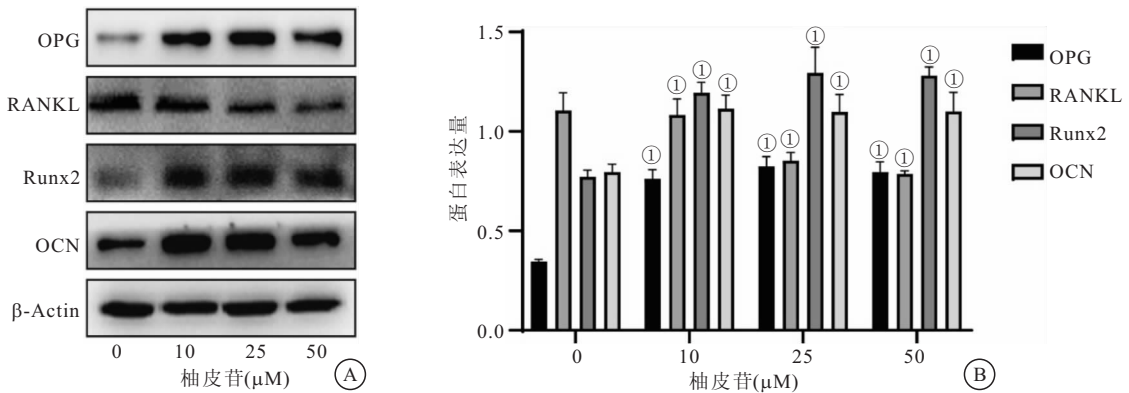


图 5 柚皮苷对兔骨髓基质细胞中 OPG 和 RANKL 相关蛋白表达的影响

Figure 5 The effect of naringin on the expression of OPG and RANKL related proteins in rabbit bone marrow stromal cells

注: A. 兔骨髓基质细胞中 OPG 和 RANKL 相关蛋白表达电泳图。B. 兔骨髓基质细胞中 OPG 和 RANKL 相关蛋白表达统计图; 与 0 μM 组比较, ① $P < 0.05$

程, 标志着成骨细胞分化的开始。茜素红 S 可以与钙离子螯合形成复合物, 识别细胞中的钙盐成分, 并标记骨髓基质细胞的成骨分化形成的钙结节。根据染色结果, 柚皮苷诱导的骨髓基质细胞中茜素红 S 染色和 ALP 染色均为阳性, 且染色强度具有浓度依赖性。另外, 柚皮苷与骨髓基质细胞合用能够促进膝关节炎大鼠的软骨修复^[19]。这些实验现象表明, 柚皮苷可以诱导骨髓基质细胞的成骨分化。另外, 骨髓基质细胞迁移至骨损伤部位是骨修复的重要环节, 柚皮苷也能够促进骨髓基质细胞的迁移能力。

成骨细胞是骨代谢中最重要的细胞之一, 骨髓基质细胞的成骨分化过程涉及许多信号通路。柚皮苷通过转化生长因子 β (TGF- β) 信号通路促进大鼠软骨组织修复^[20]。柚皮苷也能够通过影响 NF- κ B 信号通路缓解骨关节炎大鼠基质破坏^[17]。柚皮苷通过抑制 NF- κ B 信号通路的活化来逆转 TNF- α 诱导的骨髓基质细胞成骨抑制^[19]。本研究发现, 柚皮苷通过调控 OPG/RANKL 信号通路直接促进骨髓基质细胞的成骨分化和迁移。

OPG/RANK/RANKL 系统与骨重塑紧密相关,

对调节骨代谢平衡至关重要。RANKL 作为配体的肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族的一员, 主要表达于成骨细胞和骨髓基质细胞, 并以膜结合的形式存在于细胞表面, 对淋巴细胞、树突状细胞和破骨细胞活化至关重要。RANK 是破骨前体细胞中 RANKL 唯一的受体, 可以直接与 RANKL 结合, RANK 可以与 TRAF2, TRAF5 和 TRAF6 结合, 其中 TRAF6 与破骨细胞的产生密切相关, 可通过 NF- κ B、JNK、蛋白质激酶 B (PKB) 和钙调神经磷酸酶/活化 T 细胞的核因子 (CN/NFATc1) 等信号转导促进破骨前体细胞的分化、活化、成熟以及组织细胞凋亡。OPG 作为肿瘤坏死因子受体超家族的成员, 是成骨细胞分化的诱饵受体, 可以与 RANKL 竞争并抑制 RANKL 和 RANK 之间的相互作用, 从而阻碍了成骨细胞诱导的破骨细胞前体的分化和融合, 同时调节破骨细胞的分化、增殖和凋亡^[21]。本研究发现, 柚皮苷呈依赖性促进骨髓基质细胞 OPG 表达, 且抑制 RANKL 表达水平, 这说明柚皮苷的促骨髓基质细胞分化能力与调控 OPG/RANKL 信号通路有关。目前认为干细胞向特定细胞系的分化主要是由特定的转录因子介导的。RUNX2

是骨髓基质细胞分化为成骨细胞系所必需的关键转录因子,它可以直接促进成骨细胞分化所需的基因(如 OCN 和 COL1A1)的合成和分泌^[22]。COL1A1 是骨基质的主要有机成分,可以控制骨细胞的形态、分化和其他生物学功能,在维持骨骼结构的完整性和生物力学特性方面起着重要作用。OCN 是骨骼钙化的重要因素,在维持正常矿化中起关键作用,并且是成骨晚期分化的标志之一。通常 RUNX2, OCN 和 COL1A1 的表达降低表明细胞的成骨分化减少,而这些指标的表达升高则提示成骨分化能力增强^[23]。本研究结果显示,柚皮苷明显上调骨髓基质细胞 RUNX2 和 OCN 表达。

4 结论

柚皮苷能促进骨髓基质细胞的成骨分化和迁移能力,这可能与调控 OPG/RANKL 信号通路有关,暗示柚皮苷可能具有抗股骨头坏死的潜在活性。但柚皮苷抗股骨头坏死的活性和机制还需更进一步研究。

【参考文献】

[1] 周占国,郭浩山,关涛,等. 股骨头坏死病因的相关因素分析[J]. 中医正骨, 2020, 32(1):13-16.

[2] 刘光波,汪爱媛,辛海莉,等. 股骨头坏死骨吸收区对股骨头内应力分布及疾病进展的影响[J]. 中华骨科杂志, 2020, 40(7):408-416.

[3] 冯玮,谢正松,罗岑,等. 过表达 Notch 配体 Delta-like 基因的 MLO-Y4 骨细胞株的建立及其对骨髓基质细胞成骨分化的作用[J]. 第三军医大学学报, 2020, 584(9):50-58.

[4] ALAM AM, SUBHAN N, RAHMAN MM, *et al.* Sarker Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action[J]. Adv Nutr, 2014, 5(4):404-417.

[5] JOSHI R, KULKARNI YA, WAIRKAR S, *et al.* Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin [J]. An update Life Sci, 2018, 215(15):43-56.

[6] MU L, HU G, LIU J, *et al.* Qiao Protective Effects of Naringenin in a Rat Model of Sepsis-Triggered Acute Kidney Injury via Activation of Antioxidant Enzymes and Reduction in Urinary Angiotensinogen[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:5986-5991.

[7] AKINTUNDE JK, AKINTOLA TE, HAMMED MO, *et al.* Naringin protects against Bisphenol-A induced oculoopathy as implication of cataract in hypertensive rat model[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 126:110043.

[8] CHEN K, LIN K, CHEN Y, *et al.* A Novel Porous Gelatin Composite Containing Naringin for Bone Repair Evid Based Complement[J]. Alternat Med, 2013, 2013:283941.

[9] AKINTUNDE JK, ABIOYE JB, EBINAMA ON, *et al.* Potential protective effects of naringin on oculo-pulmonary injury induced by wood smoke PM10 exposure by modulation of oxidative

damage and acetylcholine esterase activity in a rat model[J]. Current Ther Res, 2020, 92:100586.

[10] YE C, CHEN J, QU Y, *et al.* Naringin and bone marrow mesenchymal stem cells repair articular cartilage defects in rabbit knees through the transforming growth factor- β superfamily signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(5):59.

[11] 张莹,程晓东,胡玉皎,等. 自身免疫性疾病患者检测 PAI-1(4G/5G), ABCB1(3435T>C)在预防甲强龙治疗发生股骨头坏死风险的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(2):14-16.

[12] KUBO T, UESHIMA K, SAITO M, *et al.* Clinical and basic research on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in Japan Journal of orthopaedic science[J]. J Japanese Orthopaedic Association, 2016, 21:407-413.

[13] RAHMAN WA, GARBUZ DS, MASRI BA. Total hip arthroplasty in steroid-induced osteonecrosis: early functional and radiological outcomes[J]. Can J Surg J, 2013, 56:41-46.

[14] 郭宏亮,郑纪伟,王鹏来,等. TGF- β 1 基因修饰骨髓基质细胞复合 Bio-Oss 胶原修复犬颌骨缺损的效果[J]. 口腔医学研究, 2019, 35(5):74-78.

[15] SUN ZB, WANG JW, XIAO H, *et al.* Icarin may benefit the mesenchymal stem cells of patients with steroid-associated osteonecrosis by ABCB1-promoter demethylation: a preliminary study [J]. Osteoporos Int, 2015, 26:187-197.

[16] MANNA K, DAS U, DAS D, *et al.* Naringin inhibits gamma radiation-induced oxidative DNA damage and inflammation, by modulating p53 and NF- κ B signaling pathways in murine splenocytes[J]. Free Radical Res, 2015, 49(4):422-439.

[17] ZHAO Y, ZHONG L, WANG W, *et al.* Naringin protects against cartilage destruction in osteoarthritis through repression of NF- κ B signaling pathway[J]. Inflammation, 2016, 39:385-392.

[18] XU Q, ZHANG ZF, SUN WX. Effect of naringin on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis pain in rats[J]. Med Sci Monitor, 2017, 23:3746-3751.

[19] CAO X, LIN W, LIANG C, *et al.* Naringin rescued the TNF- α induced inhibition of osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by depressing the activation of NF- κ B signaling pathway[J]. Immunol Res, 2015, 62:357-367.

[20] YE C, CHEN J, QU Y, *et al.* Naringin and bone marrow mesenchymal stem cells repair articular cartilage defects in rabbit knees through the transforming growth factor- β superfamily signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(5):59.

[21] 郑德开,阮诗钜,叶春华,等. 巴戟天对卵巢切除大鼠 OPG、RANKL 蛋白表达的影响[J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(3):74-76.

[22] 陈伟健,黄永青,晋大祥,等. Runx2 基因参与骨代谢相关通路的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(4):557-560.

[23] ZHANG K, WANG MM, LI YJ, *et al.* The PERK-EIF2 α -ATF4 signaling branch regulates osteoblast differentiation and proliferation by PTH[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2019, 316(4):590-604.