

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.02.015

穿山龙总皂苷对去卵巢模型大鼠骨质疏松的改善作用*

司 敏,孙倩舒[△],丁洪成,黄明炜

(湖北省十堰市人民医院·湖北医药学院附属人民医院内分泌科,湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨穿山龙总皂苷对去卵巢模型大鼠骨质疏松的改善作用。方法 将80只SD大鼠分为模型组(等体积0.9%氯化钠溶液)、17 β -雌二醇组(1.6 g/kg)和穿山龙总皂苷低、高剂量组(2 g/kg和4 g/kg),各20只。麻醉大鼠,结扎输卵管,切除双侧卵巢,以复制去卵巢大鼠模型。建模成功后,各组大鼠灌胃给予相应药物(10 mL/kg)或等体积0.9%氯化钠溶液,每天1次,持续8周。另取20只大鼠作为正常对照组(等体积0.9%氯化钠溶液)。检测大鼠股骨骨密度(BMD)及股骨弹性模量、刚度、最大应力、最大承载力;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠股骨病理形态学;采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法和Western blot法检测大鼠股骨组织Wnt、细胞外调节蛋白激酶(ERK)mRNA和蛋白表达水平。结果 与模型组比较,17 β -雌二醇组和穿山龙总皂苷低、高剂量组大鼠股骨BMD、弹性模量、刚度、最大应力、最大承载力,以及股骨组织Wnt、ERK mRNA和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$);股骨远端小梁的形态结构改善,股骨小梁密度增加,空骨腔减少,小梁排列有序。结论 穿山龙总皂苷能增加去卵巢骨质疏松模型大鼠的骨密度,逆转股骨的微观结构,并增强生物力学性能。其机制可能与促进Wnt、ERK mRNA和蛋白的表达,进而激活Wnt/ERK信号通路有关。
关键词:穿山龙总皂苷;Wnt/ERK信号通路;去卵巢模型;大鼠;骨质疏松;作用机制

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)02-0057-05

Improvement Effect of Total Saponins of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma on Osteoporosis in Ovariectomized Model Rats

SI Min, SUN Qianshu, DING Hongcheng, HUANG Mingwei

(Department of Endocrinology, Shiyan People's Hospital · People's Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Shiyan, Hubei, China 442000)

Abstract: Objective To investigate the improvement effect of total saponins of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma on osteoporosis in ovariectomized model rats. **Methods** A total of 80 SD rats were divided into the model group (equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution) and 17 β -estradiol group (1.6 g/kg) and total saponins of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma low- and high-dose groups (2 g/kg, 4 g/kg), with 20 rats in each group. The ovariectomized rat model was established by ligating fallopian tubes and removing bilateral ovaries after anesthesia. After successful modeling, rats in each group were gavaged with corresponding drugs (10 mL/kg) or equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution once a day for eight weeks. Another 20 rats were taken as the normal control group (equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution). The bone mineral density (BMD), elastic modulus, stiffness, maximum stress and maximum bearing capacity of rat femur were measured. The pathomorphology of rat femur was observed by the hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression levels of Wnt mRNA and protein and extracellular regulated protein kinase (ERK) mRNA and protein in the tissue of rat femur were detected by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. **Results** Compared with those in the model group, the BMD, elastic modulus, stiffness, maximum stress, maximum bearing capacity, the expression levels of ERK mRNA and protein and Wnt mRNA and protein in the 17 β -estradiol group and total saponins of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma low- and high-dose groups were significantly increased ($P < 0.05$), and the morphological structure of distal femoral trabecular was improved, the density of femoral trabecular was increased, the empty bone cavity was reduced, and the trabecular arrangement was orderly in the 17 β -estradiol group and total saponins of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma low- and high-dose groups. **Conclusion** Total saponins of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma can increase BMD, reverse the microstructure of femur and enhance its biomechanical properties in ovariectomized rats with osteoporosis. The mechanism may be related to promoting the expression of Wnt mRNA and protein and ERK mRNA and protein, and activating Wnt/ERK signaling pathway.

Key words: total saponins of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma; Wnt/ERK signaling pathway; ovariectomized model; rats; osteoporosis; mechanism

骨骼是有机基质矿化而连续形成的组织,成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收促进了骨重塑平衡,破骨细胞与成骨细胞的形成和功能失衡导致骨质疏松

症^[1]。绝经后女性卵巢性激素缺乏是引起骨质疏松症的主要危险因素^[2]。目前,对于绝经后骨质疏松症,主要采用雌激素替代、双膦酸盐和选择性雌激素受体调节剂

*基金项目:湖北省卫生健康委员会科研项目[WJ2019F044]。

第一作者:司敏,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为糖尿病、骨质疏松的诊治,(电子信箱)476585478@qq.com。

[△]通信作者:孙倩舒,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为糖尿病、糖尿病足的诊治,(电子信箱)308939400@qq.com。

等药物治疗,但有一定的药品不良反应(如胃肠道耐受)^[3]。有研究表明,部分中药能有效缓解或治疗骨损失^[4]。穿山龙总皂苷广泛存在于自然界,具有抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡等多种药理活性,还可促进骨折愈合^[5]。本研究中探讨了穿山龙总皂苷对去卵巢模型大鼠骨质疏松的改善作用,以及 Wnt / ERK 信号通路^[6]在其中起到的作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

1.1.1 仪器

Lunar DPXIQ 型骨密度仪(美国 GE Healthcare 公司);Endura TELELF 3200 型机械测试仪(美国 Bose 公司);DP73 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);DH - 54152 型紫外 - 可见分光光度计(美国 Thermo Electron 公司)。

1.1.2 试剂

穿山龙总皂苷(广东省惠州市中药厂有限公司,批号为 6365412. 63,含量为 99. 958);17 β - 雌二醇(中生北控生物科技股份有限公司,批号为 1265963);Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号为 BG - 48596. 36);PrimescriptTM RT 试剂盒(宝日医生物技术 < 北京 > 有限公司,批号为 SA - 474152. 38);RIPA 裂解缓冲液(批号为 SD - 526996. 48),BCA 试剂盒(批号为 CV - 569633. 36),均购自中国碧云天生物技术有限公司;10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶(SDS - PAGE,批号为 XZ - 56969658. 36),电化学发光底物蛋白质印迹试剂盒(批号为 XC - 585963. 3),均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 EMD Millipore 公司,批号为 CB - 458582. 36);抗 Wnt, ERK, GAPDH 蛋白的一抗(批号分别为 sc - 47724, sc - 47952, sc - 47156),羊抗小鼠二抗(批号为 BV - 2563. 36),均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;乙二胺四乙酸(EDTA,批号为 MN - 415895. 65),苏木素 - 伊红(HE,批号为 MN - 2365. 36),均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 动物

清洁级 SD 大鼠 100 只,雌雄兼用,体质量为 (212. 32 $\pm$ 25. 52)g,购自山东大学实验动物中心,动物生产许可证号 SCXK(鲁)2020 - 01145。喂食标准饲料,自由饮水,并保持环境温度为 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,相对湿度为 70%,12 h 明暗循环。本研究符合《实验动物的护理和使用指南》。

1.2 方法

1.2.1 模型复制及分组、给药

选取 80 只大鼠,腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL / kg)

麻醉,切开腹部约 1. 5 cm 长的皮肤,暴露腹腔、肌肉,暴露卵巢,用丝线结扎输卵管,切除双侧卵巢^[7],以股骨骨密度(BMD)低于 1. 0 g / cm³ 为去卵巢骨质疏松大鼠模型复制成功。将建模成功的大鼠随机分为模型组(等体积 0. 9% 氯化钠溶液)、17 β - 雌二醇组(1. 6 g / kg)和穿山龙总皂苷低、高剂量组(2 g / kg 和 4 g / kg)^[8],各 20 只,灌胃给予相应药物(10 mL / kg),每天 1 次,持续 8 周。另取 20 只大鼠作为正常对照组,灌胃给予等体积 0. 9% 氯化钠溶液。

1.2.2 BMD 检测

末次给药后,处死大鼠,分离双侧后肢股骨组织。采用骨密度仪检测大鼠右股骨的 BMD。

1.2.3 股骨生物力学性能检测

采用机械测试仪,将垂直载荷施加到股骨的左中轴和左股骨头的顶部,保持机械负荷速率 5 mm / min,直至股骨中轴和股骨颈断裂。记录断裂负荷数据,包括弹性模量、刚度、最大应力、最大承载力。

1.2.4 组织病理形态学观察

将股骨近端组织以 4% 多聚甲醛固定 48 h,用 EDTA 脱钙 30 d,石蜡包埋,5 μ m 厚切片,二甲苯中脱蜡,经系列乙醇水合后,HE 染色,用光学显微镜观察大鼠股骨近端组织病理形态学。

1.2.5 股骨组织 Wnt 和 ERK mRNA 表达水平检测

采用逆转录 - 聚合酶链式反应(RT - PCR)法。取大鼠股骨组织,在液氮中研磨成粉末,Trizol 法取总 RNA,使用紫外 - 可见分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分别检测 RNA 的纯度和浓度,以及 RNA 的完整性。反转录制备 cDNA,37 $^{\circ}$ C 逆转录 15 min,85 $^{\circ}$ C 逆转录 5 s。Wnt, ERK, GAPDH 引物由中国宝酒生医有限公司合成,序列见表 1。PCR 反应条件如下,95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 34 s(40 个循环)。反应系统包括 2 μ L DNA 模板,0. 4 μ L PCR 反向引物(10 μ mol / L),0. 4 μ L PCR 正向引物(10 μ mol / L),10 μ L SYBR Premix Ex TaqTM II 和 7. 2 μ L 无菌蒸馏水。以 GAPDH 作内参,并采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算 Wnt 和 ERK mRNA 的相对表达量。各组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

表 1 Wnt,ERK,GAPDH 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of Wnt,ERK and GAPDH

基因	引物序列(5' - 3')	退火温度($^{\circ}$ C)	产物大小(bp)
Wnt	F TCGATCGATGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCT	65	160
	R CGTCATCGACGGCGGAGCGATCGTAGCTAG		
ERK	F TCCGGAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCT	62	150
	R TGGGGCAGTCATCGATCGCTAGCTAGCTGATCG		
GAPDH	F CTGCTAGCTGATCGATCGATCGTCTAGCTAGCTAG	62	150
	R CGTAGCTGACTAGCTCGATCGTCTAGCTAGCTAG		

1.2.6 股骨组织 Wnt 和 ERK 蛋白表达水平检测

采用 Western blot 法。取 1.2.5 项下大鼠股骨组织粉末,加入含 PMSF 的 RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白,以 BCA 法检测总蛋白质含量。用 10%SDS - PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上。在含 5%脱脂牛奶的 TBST 中封闭 1 h,加入抗 Wnt,ERK,GAPDH 蛋白的一抗,4℃孵育过夜,TBST 清洗 3 次,加入羊抗小鼠二抗,室温振摇 2 h,加入电化学发光底物蛋白质,通过 Image J 软件将条带灰度值数字化,目的条带与内参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内多重比较采用 LSD - *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 股骨 BMD

与正常对照组比较,模型组大鼠 BMD 显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,17 β - 雌二醇组及穿山龙总皂苷低、高剂量组大鼠 BMD 显著升高 ($P < 0.05$)。详见表 2。

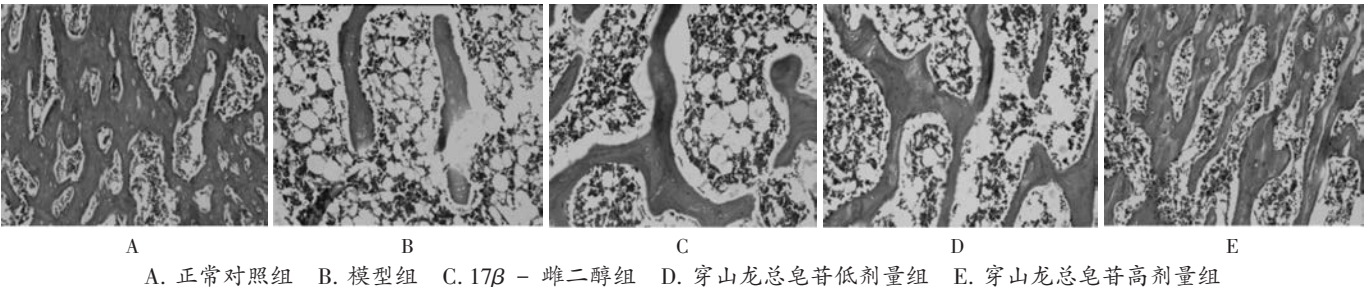
表 2 各组大鼠股骨 BMD 比较 ($\bar{X} \pm s, n = 20$)

Tab. 2 Comparison of femoral BMD index of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 20$)

组别	剂量(g/kg)	BMD(g/cm ³)
正常对照组		1.99 ± 0.13
模型组		1.13 ± 0.11*
17 β - 雌二醇组	1.6	1.74 ± 0.12 [#]
穿山龙总皂苷低剂量组	2	1.37 ± 0.11 [#]
穿山龙总皂苷高剂量组	4	1.56 ± 0.12 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。下表同。

Note: Compared with those in the normal control group,* $P < 0.05$ (for Tab. 2 - 5); Compared with those in the model group,[#] $P < 0.05$ (for Tab. 2 - 5)。



A. 正常对照组 B. 模型组 C. 17 β - 雌二醇组 D. 穿山龙总皂苷低剂量组 E. 穿山龙总皂苷高剂量组

图 1 各组大鼠右侧股骨组织病理形态学比较(HE, × 200)

A. Normal control group B. Model group C. 17 β - Estradiol group D. Total saponins of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma low - dose group E. Total saponins of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma high - dose group

Fig. 1 Comparison of the pathomorphology of the right femur tissue of rats in each group(HE, × 200)

2.2 股骨生物力学性能指标

与正常对照组比较,模型组大鼠弹性模量、刚度、最大应力、最大承载力均显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,17 β - 雌二醇组及穿山龙总皂苷低、高剂量组大鼠的弹性模量、刚度、最大应力、最大承载力均显著升高 ($P < 0.05$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠股骨生物力学性能指标比较 ($\bar{X} \pm s, n = 20$)

Tab. 3 Comparison of biomechanical indexes of femoral bone in each group ($\bar{X} \pm s, n = 20$)

组别	剂量(g/kg)	弹性模量(MPa)	刚度(N/mm)	最大应力(N/mm ²)	最大承载力(N)
正常对照组		395.48 ± 26.96	1 237.69 ± 63.65	35.19 ± 3.63	328.63 ± 13.63
模型对照组		204.52 ± 32.65 [*]	598.52 ± 98.46 [*]	19.52 ± 3.58 [*]	241.52 ± 13.57 [*]
17 β - 雌二醇组	1.6	354.62 ± 21.41 [#]	1 024.63 ± 69.96 [#]	29.65 ± 3.54 [#]	287.62 ± 13.54 [#]
穿山龙总皂苷低剂量组	2	256.54 ± 16.96 [#]	729.65 ± 69.52 [#]	23.54 ± 3.03 [#]	267.96 ± 13.13 [#]
穿山龙总皂苷高剂量组	4	301.29 ± 26.41 [#]	869.63 ± 85.96 [#]	26.54 ± 3.02 [#]	298.85 ± 13.06 [#]

2.3 股骨组织病理形态学

正常对照组大鼠股骨结构正常;模型组大鼠股骨小梁稀疏,出现空骨空洞;17 β - 雌二醇组及穿山龙总皂苷低、高剂量组大鼠股骨远端小梁的形态结构改善,股骨小梁密度增加,空骨腔减少,小梁排列有序,且穿山龙总皂苷低剂量组仍可见一定程度的骨质疏松。详见图 1。

2.4 股骨组织 Wnt 和 ERK mRNA 表达水平

与正常对照组比较,模型组大鼠股骨 Wnt 和 ERK mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,17 β - 雌二醇组及穿山龙总皂苷低、高剂量组大鼠股骨 Wnt 和 ERK mRNA 水平均显著升高 ($P < 0.05$)。详见表 4。

2.5 股骨组织 Wnt 和 ERK 蛋白表达水平

与正常对照组比较,模型组大鼠 Wnt 和 ERK 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,17 β - 雌二醇组及穿山龙总皂苷低、高剂量组大鼠股骨 Wnt 和 ERK 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。详见表 5。

表 4 各组大鼠股骨组织 Wnt 和 ERK mRNA 表达水平比较
($\bar{X} \pm s, n = 20$)

Tab. 4 Comparison of the expression levels of Wnt and ERK mRNA in femur tissues of rats in each group($\bar{X} \pm s, n = 20$)			
组别	剂量(g/kg)	Wnt	ERK
正常对照组		4.93 ± 0.23	4.74 ± 0.24
模型组		1.16 ± 0.24 [*]	1.01 ± 0.25 [*]
17β-雌二醇组	1.6	3.58 ± 0.27 [#]	3.39 ± 0.23 [#]
穿山龙总皂苷低剂量组	2	1.93 ± 0.23 [#]	1.81 ± 0.24 [#]
穿山龙总皂苷高剂量组	4	2.45 ± 0.28 [#]	2.60 ± 0.28 [#]

表 5 各组大鼠股骨组织 Wnt 和 ERK 蛋白表达水平比较
($\bar{X} \pm s, n = 20$)

Tab. 5 Comparison of the expression levels of Wnt and ERK protein in femur tissues of rats in each group($\bar{X} \pm s, n = 20$)			
组别	剂量(g/kg)	Wnt	ERK
正常对照组		1.26 ± 0.16	1.29 ± 0.17
模型组		0.37 ± 0.14 [*]	0.34 ± 0.19 [*]
17β-雌二醇组	1.6	0.96 ± 0.12 [#]	0.93 ± 0.14 [#]
穿山龙总皂苷低剂量组	2	0.58 ± 0.06 [#]	0.63 ± 0.08 [#]
穿山龙总皂苷高剂量组	4	0.72 ± 0.09 [#]	0.74 ± 0.10 [#]

3 讨论

骨质疏松症分为原发性和继发性 2 种。前者常由衰老和性腺功能下降(如雌激素水平降低)而引起,后者常由其他健康问题和药物(如长期使用皮质类固醇激素治疗)引起^[9]。绝经后妇女中约 40% 受骨质疏松症影响,且随着人口老龄化程度的加剧,这一数字将持续增长。目前临床常使用的治疗药物包括双膦酸盐、抗 RANKL、甲状旁腺激素和雷奈酸锶,均可降低初次和反复骨折的风险,但价格昂贵^[10]。

本研究结果显示,穿山龙总皂苷可改善去卵巢骨质疏松模型大鼠的骨密度,逆转股骨的微观结构,并增强生物力学性能。同时 17β-雌二醇组及穿山龙总皂苷低、高剂量组大鼠股骨组织的 Wnt 与 ERK mRNA 和蛋白表达水平均高于模型组。提示穿山龙总皂苷能促进去卵巢骨质疏松模型大鼠股骨组织的 Wnt 与 ERK mRNA 和蛋白表达水平,进而激活 Wnt / ERK 信号通路。Wnt / ERK 信号通路参与包括骨骼组织在内的许多组织的生长、发育和维持的重要途径^[11]。经典的 Wnt / ERK 信号传导极复杂,并受到广泛的反馈控制。在无 Wnt 配体的情况下,胞质 β-连环蛋白结合 APC - Axin - GSK - 3β 降解复合物,而该复合物中的 GSK - 3β 磷酸化 β-连环蛋白以诱导其蛋白体降解。当 Wnt 蛋白与受体卷曲蛋白和共受体蛋白 LRP5 / 6 结合时信号蛋白 Dsh 被激活,导致丝氨酸 / 苏氨酸激酶(GSK - 3β)失活,从而抑制 ERK 的泛素化和降解,导致 ERK 聚集于细胞核中并与 LEF - 1 / TCF 结合,以上调成骨细胞中 Wnt 靶基因

Runx2 和 Osx 的表达,从而促进成骨细胞的分化和增殖^[12-14]。成骨细胞中的 Wnt / ERK 信号可诱导骨保护素(OPG)的表达,从而抑制破骨细胞的分化^[15-16]。LI 等^[17]的研究显示,成骨细胞的分化减弱,骨髓基质细胞中的脂肪细胞分化增强,表明 Wnt / ERK 信号是促成骨细胞分化的决定因素^[17]。ERK 是 Wnt / ERK 信号通路中的重要蛋白,小鼠 ERK 突变失活,其骨量会明显减少^[18-20]。

综上所述,穿山龙总皂苷能增加去卵巢骨质疏松模型大鼠的骨密度,逆转股骨的微观结构,并增强生物力学性能。其机制可能与促进股骨组织 Wnt 与 ERK mRNA 和蛋白的表达,进而激活 Wnt / ERK 信号通路有关。

参考文献

[1] ASPRAY TJ, HILL TR. Osteoporosis and the Ageing Skeleton[J]. Subcell Biochem, 2019, 91: 453 - 476.

[2] BIJELIC R, MILICEVIC S, BALABAN J. Risk Factors for Osteoporosis in Postmenopausal Women[J]. Med Arch, 2017, 71(1): 25 - 28.

[3] KANIS JA, COOPER C, RIZZOLI R, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women[J]. Osteoporos Int, 2019, 30(1): 3 - 44.

[4] 汪小飞, 李晶晶. 淫羊藿总黄酮对老年骨质疏松大鼠 Notch 和 Smads 通路蛋白表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019, 27(2): 1 - 5.

[5] 安晓晖, 刘恩, 吕飞, 等. 基于 VEGF / VEGFR - 2 信号通路探讨穿山龙总皂苷促进去势大鼠骨折血管形成和骨折愈合的效果[J]. 中国中医急症, 2020, 29(5): 846 - 849.

[6] 王晨亮, 孔令俊, 李兴国, 等. 基于 Wnt / β - catenin 信号通路的调节作用探讨苦寒类中药治疗骨质疏松症的研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(35): 138 - 141.

[7] 欧阳利云, 唐颖, 上官文峰. EPCs 移植对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(3): 372 - 377.

[8] 江立斌, 戴金峰. 穿山龙总皂苷对哮喘小鼠 BRP - 39 表达及 PI3K / AKT 信号通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(1): 75 - 79.

[9] LEVIN VA, JIANG X, KAGAN R. Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era[J]. Osteoporos Int, 2018, 29(5): 1049 - 1055.

[10] SLATON RM, BOYD K, IRANIKHAH M. Romosozumab and Sequential Therapy in Postmenopausal Osteoporosis[J]. Sr Care Pharm, 2020, 35(7): 297 - 308.

[11] MOORER MC, RIDDLE RC. Regulation of osteoblast metabolism by Wnt signaling[J]. Endocrinol Metab, 2018, 33(3): 318 - 330.

[12] SHEN L, SHARMA D, YU Y, et al. Biphasic regulation of glutamine consumption by WNT during osteoblast differentiation[J]. J Cell Sci, 2021, 134(1): jcs251645.

[13] ABUNA RPF, OLIVEIRA FS, LOPES HB, et al. The Wnt / β - catenin signaling pathway is regulated by titanium with nanoto-