

miR-295 抑制高糖诱导的小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 的凋亡

曲野, 刘立柱*, 徐瑞敏, 吴开弟, 代伟宏
(海南医学院第二附属医院 创伤骨科, 海南海口 570311)

摘要:目的 探讨微小 RNA(miR)-295 对高糖诱导的小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 凋亡的影响及其机制。方法 将 MC3T3-E1 细胞分为对照 (Ctrl) 组、高糖 (HG) 组 (以 22 mmol/L 葡萄糖诱导培养)、(HG+miR-control) 组 (转染 miR-control 后高糖诱导) 和 (HG+miR-295) 组 (转染 miR-295 模拟物后高糖诱导); 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 MC3T3-E1 细胞中 miR-295 表达水平; 噻唑蓝 (MTT) 法检测 MC3T3-E1 细胞存活率; 流式细胞测量术检测 MC3T3-E1 细胞凋亡率; 免疫印迹法检测 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白 β 连环蛋白 (β -catenin)、Dickkopf 同源物 1 (DKK1)、c-Myc 和 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 蛋白表达; 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-295 和 DKK1 的靶向关系。结果 与对照组比较, HG 组 MC3T3-E1 细胞中 miR-295 表达水平、细胞存活率和 β -catenin、c-Myc 及 Bcl-2 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), 而细胞凋亡率和 DKK1 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与 (HG+miR-control) 组比较, (HG+miR-295) 组 MC3T3-E1 细胞中 miR-295 表达水平、细胞存活率和 β -catenin、c-Myc、Bcl-2 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), 而细胞凋亡率和 DKK1 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。Dkk1 可能是 miR-295 的靶基因。结论 miR-295 可能通过下调 DKK1 表达激活 Wnt/ β -catenin 通路来抑制高糖诱导的成骨细胞系 MC3T3-E1 的凋亡。

关键词: 成骨细胞; 高糖; miR-295; 凋亡; Wnt/ β 连环蛋白通路

中图分类号: R587.2 文献标志码: A

miR-295 inhibits high glucose-induced apoptosis of mouse osteoblast cell line MC3T3-E1

QU Ye, LIU Li-zhu*, XU Rui-min, WU Kai-di, DAI Wei-hong

(Department of Trauma and Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of microRNA (miR)-295 on high glucose-induced apoptosis of mouse osteoblast cell line (MC3T3-E1) and underlying the mechanism. **Methods** MC3T3-E1 cells cultured *in vitro* were divided into three groups: control (Ctrl) group, high glucose (HG) group (induced by 22 mmol/L glucose), (HG + miR-control) group (induced by high glucose after miR-control transfection) and (HG+miR-295) group (induced by high glucose after transfection of miR-295 mimic). The expression of miR-295 in MC3T3-E1 cells was detected by real-time fluorescent quantitative PCR, the survival rate of MC3T3-E1 cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, the apoptosis rate of MC3T3-E1 cells was detected by flow cytometry, the protein expression of Wnt/ β -catenin pathway related proteins β -catenin, Dickkopf homolog 1 (DKK1), c-Myc and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) were detected by Western blot, double luciferase reporter gene assay was used to detect the targeting relationship between miR-295 and DKK1. **Results** Compared with those in the Ctrl group, the expression levels of miR-295, cell

收稿日期: 2020-11-16 修回日期: 2021-04-09

基金项目: 海南省卫生健康行业项目 (19A200138)

* 通信作者 (corresponding author): euqe05@163.com

survival rate and the protein expression levels of β -catenin, c-Myc and Bcl-2 in MC3T3-E1 cells in HG group were significantly lower, the apoptosis rate and protein expression level of DKK1 were significantly higher ($P < 0.05$); Compared with those in (HG + miR-control) group, the expression level of miR-295 ($P < 0.05$), cell survival rate and the protein expression levels of β -catenin, c-Myc and Bcl-2 in MC3T3-E1 cells in (HG + miR-295) group were significantly higher ($P < 0.05$), the apoptosis rate and protein expression level of DKK1 were significantly lower ($P < 0.05$). *Dkk1* might be the target gene of miR-295. **Conclusions** miR-295 may inhibit high glucose-induced MC3T3-E1 cell apoptosis by down-regulating DKK1 expression and activating Wnt/ β -catenin pathway.

Key words: osteoblast; high glucose; miR-295; apoptosis; Wnt/ β -catenin pathway

糖尿病(diabetes mellitus, DM)性骨质疏松症(diabetic osteoporosis, DOP)是多见于老年 DM 患者的慢性并发症,骨骼结构破坏和骨量减少是其重要病理特征^[1-2]。高糖引起的成骨细胞骨形成能力减弱是导致 DOP 的重要原因,无翅基因(wingless, Wnt)信号通路失活在其中发挥重要作用,而 Dickkopf 同源物 1(dickkopf homolog 1, DKK1)为 Wnt 信号通路的内源性抑制剂,其水平升高可抑制 Wnt 信号通路活化,阻碍成骨作用^[3]。微小 RNA(microRNAs, miRNAs)与代谢性骨病的发生密切相关,某些 miRNAs 可通过靶向抑制 DKK1 表达促进骨折愈合^[4]。miR-295 是 miRNAs 的一个成员,在 DOP 大鼠骨组织中表达下调^[2],但其是否参与高糖诱导(high glucose-induced, HG-induced)的成骨细胞凋亡及其作用机制尚不清楚。本研究以小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 为对象,探讨 miR-295 过表达对高糖诱导成骨细胞凋亡的影响并以 DKK1 为切点初步分析其机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1(宁波明舟生物科技有限公司); α -MEM 培养基和胎牛血清(HyClone 公司);青链霉素混合液($\times 100$)细胞培养专用、高效放射免疫沉淀法(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、TriQuick Reagent 总 RNA 提取试剂、Lipofectamine 3000、噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]试剂盒、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡检测试剂盒、二奎啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白质浓度测定试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限

公司);cDNA 第一链合成试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司);pGL3-basic 荧光素酶报告基因载体(上海海吉浩格生物科技有限公司);miR-295 模拟物及其阴性对照 miR-control(南通市百奥迈科生物技术有限公司); β 连环蛋白(β -catenin)、DKK1、c-Myc、B 淋巴瘤细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(Cell Signaling Technology 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的分组及处理:将细胞分为 1)对照(Ctrl)组;2)高糖(HG)组:用含 22 mmol/L 葡萄糖的培养基培养 24 h,“3)和 4)组与此相同”;3)(HG+miR-对照)组:转染 miR-对照组 48 h 后行高糖培养;4)(HG+miR-295)组:转染 miR-295 模拟物行高糖培养,每组设置 3 个复孔。其中,miR-295 模拟物和 miR-对照的转染参照 Lipofectamine 3000 说明书。

1.2.2 RT-qPCR 检测 MC3T3-E1 细胞中 miR-295 表达水平:向 MC3T3-E1 细胞中加入 TriQuick Reagent 总 RNA 提取试剂提取总 RNA,将 RNA 定量后,参照 cDNA 第一链合成试剂盒说明书将 RNA 反转录合成单链 cDNA。将 2 μ L cDNA、5 μ L SYBR Green、2.2 μ L DEPC(diethylpyrocarbonate)水和各 0.4 μ L 正反引物混匀制成总体积为 10 μ L 的反应体系;置于荧光定量 PCR 仪进行扩增,MC3T3-E1 细胞中 miR-295 的表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示。其中,扩增条件为 96 $^{\circ}$ C 5 min,1 个循环;96 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成:miR-295 正向引物序列:5'-CTCAAATGTGGGGCACAC-3',反向引物序列:5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3';内参 U6 正向引物序列:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物

序列:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.2.3 MTT法检测 MC3T3-E1 细胞活力:将对数增殖期 MC3T3-E1 细胞按照每孔 1×10^5 个接种至 96 孔板,按照 1.2 中分组进行相应处理,另外设不含细胞的空白组以进行调零检测;处理结束后,每孔加入 20 μL MTT 5 g/L 溶液孵育 4 h;弃上清液后,每孔加入 150 μL 二甲亚砜摇床孵育 10 min。运用全自动酶标仪测定各组 MC3T3-E1 细胞在 490 nm 波长处的吸光度(A)值,并以(A 实验组-A 空白组)/(A 对照组-A 空白组) $\times 100\%$ 表示各组细胞存活率。该实验行 3 次重复检测。

1.2.4 流式细胞仪检测 MC3T3-E1 细胞凋亡:胰蛋白酶消化收集按照 1.2 中分组处理结束后的各组 MC3T3-E1 细胞,加入预冷的磷酸缓冲液漂洗 2 次后,用 1 \times 结合缓冲液调整细胞为 1×10^6 个/mL;向 100 μL 细胞悬液中加入 5 μL annexin V-FITC、5 μL PI,充分混匀后避光反应 15 min,用流式细胞仪检测 MC3T3-E1 细胞凋亡率。该实验行 3 次重复检测。

1.2.5 免疫印迹法检测 MC3T3-E1 细胞中 β -catenin、DKK1、c-Myc 和 Bcl-2 蛋白表达水平:向 MC3T3-E1 细胞中加入 RIPA 裂解液抽提总蛋白,用 BCA 法定量后,加入等体积上样缓冲液煮沸 5 min 变性。将蛋白样品行 SDS-PAGE 分离后,转至聚偏氟乙烯膜上;封闭液室温封膜 1h,加入 β -catenin (1 : 2 000)、DKK1(1 : 1 000)、c-Myc(1 : 1 000)、Bcl-2(1 : 1 000)和 GAPDH(1 : 2 000)特异性一抗室温孵育 2 h;洗涤液洗膜后,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 5 000)室温孵育 1 h。化学发光剂暗室内显色后,GAPDH 作内参,采用凝胶成像分析系统及图像处理软件进行分析。该实验重复检测 3 次。

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测 miR-295 和 *Dkk1* 靶向关系:采用 Targetscan 软件预测 miR-295 与 *Dkk1* 3' UTR 结合位点后,将含 miR-295 与 *Dkk1* 3' UTR 结合位点的序列片段和定点突变后的序列片段克隆重组至 pGL3-basic 载体上,构建野生型(Wt)-DKK1 和突变型(Mut)-DKK1 荧光素酶载体质粒。参照 Lipofectamine 3000 说明书分别将 miR-295 模拟物(miR-295) + Wt-DKK1、miR-295 + Mut-DKK1、miR-control + Wt-DKK1 和 miR-control + Mut-DKK1 共转染至 MC3T3-E1 细胞,记为(miR-295 + Wt-DKK1)组、(miR-295 + Mut-DKK1)组、(miR-control +

Wt-DKK1)组和(miR-control + Mut-DKK1)组,其中每组设 3 个复孔;转染 48 h 后,检测各组 MC3T3-E1 细胞的荧光素酶活性,操作步骤参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书。该实验重复检测 3 次。

1.3 统计学分析

用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计学分析,两组比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。

2 结果

2.1 高糖下 MC3T3-E1 细胞中 miR-295 的表达水平

与对照组比较,HG 组 MC3T3-E1 细胞中 miR-295 表达水平明显降低($P < 0.05$);与 HG + miR-control 组比较,HG + miR-295 组 MC3T3-E1 细胞中 miR-295 表达水平明显升高($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组 MC3T3-E1 细胞中 miR-295 表达水平

Table 1 Relative expression levels of miR-295 in MC3T3-E1 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

| group | miR-295 |
|----------------|------------------------------|
| Ctrl | 1.00 \pm 0.00 |
| HG | 0.45 \pm 0.03* |
| HG+miR-control | 0.47 \pm 0.03 |
| HG+miR-295 | 2.98 \pm 0.35 [#] |

* $P < 0.05$ compared with Ctrl group; [#] $P < 0.05$ compared with HG + miR-control group.

2.2 miR-295 对高糖下 MC3T3-E1 细胞活力的影响

HG 组 MC3T3-E1 细胞存活率较对照组明显降低($P < 0.05$),但(HG + miR-295)组 MC3T3-E1 细胞存活率明显高于(HG + miR-control)组($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组 MC3T3-E1 细胞存活率和凋亡率

Table 2 Survival rate and apoptosis rate of MC3T3-E1 cells in each group ($\bar{x} \pm s, \%, n=9$)

| group | survival rate | apoptosis rate |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Ctrl | 100.00 \pm 0.00 | 4.75 \pm 0.28 |
| HG | 54.65 \pm 3.26* | 18.38 \pm 1.52* |
| HG+miR-control | 52.18 \pm 3.05 | 17.26 \pm 1.75 |
| HG+miR-295 | 87.20 \pm 6.37 [#] | 10.54 \pm 0.65 [#] |

* $P < 0.05$ compared with Ctrl group; [#] $P < 0.05$ compared with HG + miR-control group.

2.3 miR-295 对高糖下 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响

与对照组比较, HG 组 MC3T3-E1 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); (HG+miR-295) 组 MC3T3-E1 细胞凋亡率较 (HG + miR-control) 组明显降低 ($P < 0.05$) (表 2, 图 1)。

2.4 miR-295 对高糖下 MC3T3-E1 细胞中 Wnt/ β -catenin 通路的影响

与对照组比较, HG 组 MC3T3-E1 细胞中 β -catenin 蛋白及下游相关蛋白 c-Myc, Bcl-2 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 而 DKK1 表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 (HG + miR-对照) 组比较, (HG + miR-295) 组 MC3T3-E1 细胞中 β -catenin、c-Myc 和 Bcl-2 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 而 DKK1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$) (图 2, 表 3)。

2.5 miR-295 和 *Dkk1* 靶向关系的验证

TargetsCan 软件预测结果显示, miR-295 和 *Dkk1* 3'UTR 之间存在互补的结合位点; 双荧光素酶报告基因实验检测结果显示, (miR-295 + Wt-DKK1) 组 MC3T3-E1 细胞的荧光素酶活性明显低于 (miR-control + Wt-DKK1) 组, 但 (miR-control + Mut-DKK1) 组和 (miR-295 + Mut-DKK1) 组 MC3T3-E1 细胞的荧光素酶活性差异无统计学意义 (图 3, 表 4)。

3 讨论

DOP 是一种常见的代谢性疾病, 严重威胁人们健康^[5]。成骨细胞过度凋亡引发成骨细胞功能异常、骨吸收增多和骨形成减少^[3]; DM 患者的高糖环境对成骨细胞的增殖不利^[6]。miRNAs 不具有编码蛋白质的功能, 但可通过与靶基因碱基互补配对在

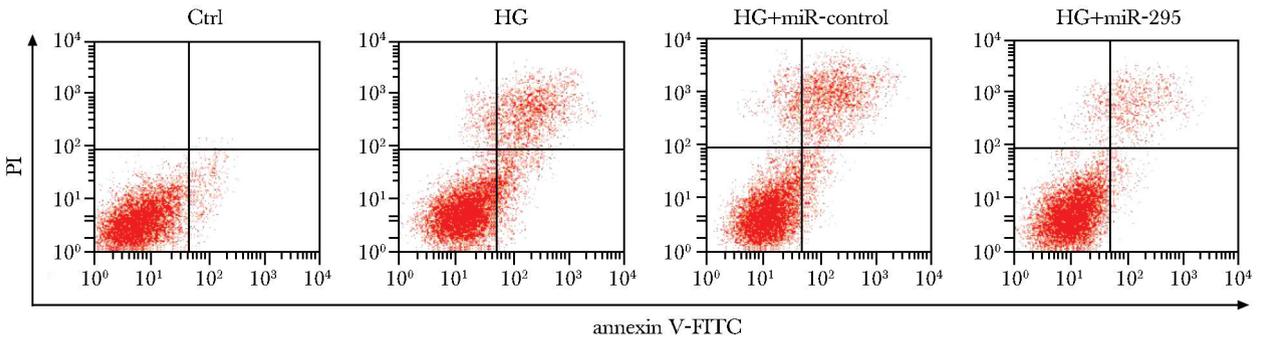


图 1 miR-295 对高糖诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响
Fig 1 Effect of miR-295 on high glucose-induced apoptosis

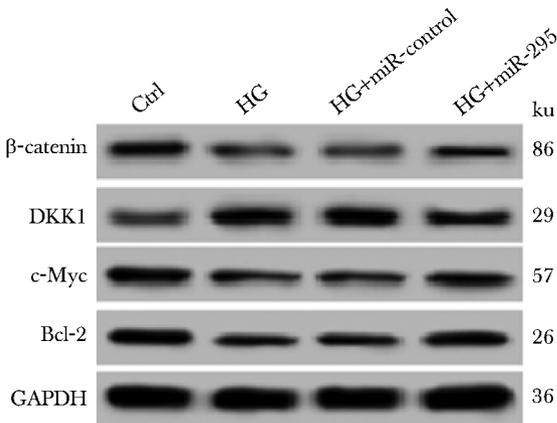


图 2 Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达
Fig 2 Western blot was used to detect the expression of Wnt/ β -catenin pathway related proteins

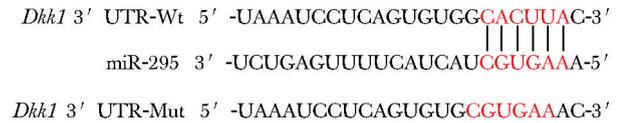


图 3 miR-295 和 *Dkk1* 3'UTR 互补的结合位点
Fig 3 Complementary binding sites of miR-295 and *Dkk1* 3'UTR

转录水平上调控其表达^[7]。有报道^[8-10], miR-139-3p 低表达具有抑制成骨细胞分化和促进成骨细胞凋亡的作用, miR-7223-5p 可靶向调控 PI3KR1 表达抑制成骨细胞增殖并促进其凋亡; miR-455-3p 可通过靶向 HIPK2 拮抗高糖诱导的成骨细胞凋亡并促进成骨细胞增殖。miR-295 在胚胎干细胞中具有潜在的促生存功能^[11]。已有研究表明^[2], DOP 大鼠骨

表3 MC3T3-E1 细胞中 β -catenin、DKK1、c-Myc 和 Bcl-2 蛋白表达水平Table 3 Relative protein expression levels of β -catenin, DKK1, c-Myc and Bcl-2 in MC3T3-E1 cells of each group ($\bar{x}\pm s, n=9$)

| group | β -catenin | DKK1 | c-Myc | Bcl-2 |
|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Ctrl | 0.46 \pm 0.03 | 0.18 \pm 0.02 | 0.52 \pm 0.03 | 0.49 \pm 0.04 |
| HG | 0.15 \pm 0.03* | 0.55 \pm 0.04* | 0.24 \pm 0.02* | 0.27 \pm 0.03* |
| HG+miR-control | 0.13 \pm 0.02 | 0.58 \pm 0.05 | 0.22 \pm 0.03 | 0.30 \pm 0.03 |
| HG+miR-295 | 0.24 \pm 0.03 [#] | 0.39 \pm 0.04 [#] | 0.37 \pm 0.03 [#] | 0.46 \pm 0.03 [#] |

* $P < 0.05$ compared with Ctrl group; [#] $P < 0.05$ compared with HG+miR-control group.

表4 比较各组 MC3T3-E1 细胞荧光素酶活性

Table 4 Comparison of relative luciferase activity of MC3T3-E1 cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=9$)

| group | luciferase activity |
|----------------------|---------------------|
| miR-control+Wt-DKK1 | 1.01 \pm 0.08 |
| miR-295+Wt-DKK1 | 0.31 \pm 0.02* |
| miR-control+Mut-DKK1 | 0.97 \pm 0.06 |
| miR-295+Mut-DKK1 | 1.03 \pm 0.08 |

* $P < 0.05$ compared with miR-control+Wt-DKK1 group.

组织中 miR-295 表达下调,但其作用并不清楚。本研究表明,miR-295 过表达可抑制 MC3T3-E1 细胞凋亡。提示,miR-295 可能通过调控成骨细胞凋亡在 DOP 发生发展过程中扮演着重要角色。

Wnt/ β -catenin 信号通路 Wnt 可通过与 Frizzled 结合被活化,经过一系列作用可导致 β -catenin 过度积累入核,通过激活下游相关基因,如原癌基因 *c-Myc* 和抗凋亡基因 *Bcl-2* 等表达;DKK1 可通过细胞膜上 LRP5/6 和 Kremen1/2 形成三聚体,进而阻断 Wnt 信号的传递^[12]。Wnt/ β -catenin 信号通路失调与包括 DOP 在内的多种疾病的发生发展密切相关^[13]。

Wnt/ β -catenin 信号通路活化可促进成骨细胞增殖并抑制其凋亡,而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可促进成骨细胞凋亡^[14]。本研究发现,MC3T3-E1 细胞中 β -catenin、c-Myc 和 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,而 DKK1 蛋白表达水平明显升高,MC3T3-E1 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路活化明显受到抑制。与文献报道相似^[15]。进一步检测表明,miR-295 过表达可激活高糖下 MC3T3-E1 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路。提示,miR-295 过表达抑制高糖诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡可能与其激活 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。进一步预测到 miR-295 与 *Dkk1* 3'UTR 区域存在互补的结合位点,*Dkk1* 可能是 miR-295 的潜在靶基因,miR-295 可能通过靶向抑制 DKK1 表达激活 Wnt/ β -catenin 信号通路影响成骨细胞功能。

综上所述,miR-295 可抑制高糖诱导的成骨细胞凋亡,其作用机制可能与靶向下调 DKK1 表达激活 Wnt/ β -catenin 通路有关。本研究局限于细胞水平,后期拟用 DOP 大鼠模型进一步从整体水平探讨 miR-295 的作用,以期对 DOP 发病机制及防治提供新依据。

参考文献:

- [1] 骆时木, 欧阳航, 蒋燕成, 等. TCF7L2 rs290481 基因多态性与 2 型糖尿病合并冠心病相关[J]. 基础医学与临床, 2020, 40:1484-1488.
- [2] 李增英, 赵恒侠, 刘雪梅, 等. 滋肾降糖丸对 1 型糖尿病骨质疏松大鼠骨组织 miRNAs 表达谱的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36:1993-2000.

- [3] Tsentidis C, Gourgiotis D, Kossiva L, et al. Increased levels of Dickkopf-1 are indicative of Wnt/ β -catenin downregulation and lower osteoblast signaling in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus, contributing to lower bone mineral density[J]. Osteoporos Int, 2017, 28:945-953.

- [4] Wang F, Hu XY, Cao C, *et al.* miR-488 promotes fracture healing by targeting DKK1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22:8965-8972.
- [5] 何文涛, 余学锋. 糖尿病性骨质疏松发病情况及机制新认识[J]. *诊断学理论与实践*, 2018, 17:5-10.
- [6] Zhang N, Jiang H, Bai Y, *et al.* The molecular mechanism study of insulin on proliferation and differentiation of osteoblasts under high glucose conditions[J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37:385-394.
- [7] Dou C, Ding N, Luo F, *et al.* Drug delivery: graphene-based microRNA transfection blocks preosteoclast fusion to increase bone formation and vascularization [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2017, 5:1700578.doi:10.1002/adv.201700578.
- [8] Wang YX, Wang Ke, Hu ZB, *et al.* MicroRNA-139-3p regulates osteoblast differentiation and apoptosis by targeting ELK1 and interacting with long noncoding RNA ODSM[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9:1107-1107.
- [9] Mi B, Xiong Y, Chen L, *et al.* CircRNA AFF4 promotes osteoblast cells proliferation and inhibits apoptosis via the Mir-7223-5p/PIK3R1 axis [J]. *Aging (Albany NY)*. 2019, 11:11988-12001.
- [10] 匡嘉兵, 申文娟, 马永刚, 等. miR-455-3p 靶向 HIPK2 调控高糖环境下成骨细胞的增殖和凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24:1641-1646.
- [11] Yuan K, Ai WB, Wan LY, *et al.* The miR-290-295 cluster as multi-faceted players in mouse embryonic stem cells[J]. *Cell and Bioence*, 2017, 7:38-47.
- [12] 沈佳怡, 徐涛涛, 陆超锋, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路拮抗蛋白 DKK1 在骨骼发育和骨代谢中的作用[J]. *浙江中医药大学学报*, 2015, 39:325-328.
- [13] 陈哲, 李惠林, 李增英, 等. miRNA 调控 Wnt/ β -catenin 通路与糖尿病骨质疏松的中西医研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25:1327-1330.
- [14] Li P, Wang Y, Liu X, *et al.* Atypical antipsychotics induce human osteoblasts apoptosis via Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Bmc Pharmacol Toxicol*, 2019, 20:1-10.
- [15] 颜晓芳, 袁欣, 严孙杰, 等. 间歇性高糖环境通过激活过氧化物酶增殖物激活受体 γ 下调成骨细胞 Wnt 信号通路 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34:1890-1893.

本刊稿件格式要求(1)

1.1 题名:应与内容相符,言简意赅,体现创新点或主要结论,避免过大、空泛,一般不超过 20 个汉字,不用副标题。英文题名应与中文一致,除专有名词外,只第 1 个词的首字母大写,其他均小写。

1.2 基金:在首页页脚标注所受资助的基金项目及编号。

例:基金项目:国家自然科学基金(39470325)。

1.3 作者:应是对文章做出贡献、能对内容负责者,一般 ≤ 7 个。如有不同单位作者,在右上角标注不同数字以区别。通信作者以“*”标注。作者英文的“姓”需用全称并且大写,“名”的第 1 个字拼音的首字母大写,后面均用小写,两字之间用连字符。

例:WANG Xiao-san。

1.4 作者单位:

1.4.1 中文:写标准全称(由大单位到小单位,中间用空格隔开)、所在省份、城市及邮编。如有不同单位,以作者右上角标的数字对应标注单位。

例:华中科技大学 同济医学院 1. 免疫学系;2. 病理生理学系,湖北 武汉 430022

1.4.2 英文:由小单位到大单位,中间用“,”隔开,省份略去。每个实义词的首字母大写。

例:1. Department of Immunology;2. Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China