

模拟微重力下柚皮苷对T细胞共育的成骨细胞增殖分化的影响[△]

陈建兴*, 尹文哲#, 孙奇峰, 周 森, 张亚龙, 王 翌(哈尔滨医科大学附属第二医院骨四科, 哈尔滨 150086)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)19-2333-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.19.06



摘要 目的 在模拟微重力情况下,探索柚皮苷作用于T细胞-成骨细胞共育体系后,对成骨细胞增殖分化的影响。方法 本实验设正常重力对照组、正常重力柚皮苷组、模拟微重力对照组、模拟微重力柚皮苷组,其中对照组分别在正常重力或模拟微重力条件下将T细胞与成骨细胞共育,柚皮苷组分别在对照组基础上加入 1×10^{-5} mol/L柚皮苷溶液。显微镜下观察成骨细胞形态学,CCK-8法检测成骨细胞增殖率,碱性磷酸酶(ALP)试剂盒检测ALP活性,实时荧光定量聚合酶链式反应检测Runt相关转录因子2(Runx2)、白细胞介素6(IL-6)mRNA相对表达水平,Western blot法检测Runx2和IL-6蛋白相对表达水平。结果 与正常重力对照组比较,模拟微重力对照组成骨细胞密度降低,仅有少量聚集,细胞形态以圆形居多;与模拟微重力对照组比较,模拟微重力柚皮苷组成骨细胞成梭形或多角形,形态饱满,成鱼群状聚集。与正常重力对照组比较,正常重力柚皮苷组成骨细胞增殖率、ALP活性、Runx2 mRNA和蛋白相对表达水平显著升高,IL-6 mRNA和蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.05$);模拟微重力对照组成骨细胞增殖率、ALP活性、Runx2 mRNA和蛋白相对表达水平显著降低,IL-6 mRNA和蛋白相对表达水平显著升高($P < 0.05$)。与模拟微重力对照组比较,模拟微重力柚皮苷组成骨细胞增殖率、ALP活性、Runx2 mRNA和蛋白相对表达水平显著升高,IL-6 mRNA和蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.05$)。结论 在T细胞-成骨细胞共育体系中,模拟微重力可以抑制成骨细胞的增殖分化能力;该条件下柚皮苷可以改善成骨细胞的增殖分化能力,其作用机制与IL-6水平的降低及Runx2水平的升高有关。

关键词 柚皮苷;成骨细胞;模拟微重力;增殖分化;T细胞

Effects of naringin on the proliferation and differentiation of osteoblasts co-cultured with T cells under simulated microgravity

CHEN Jianxing, YIN Wenzhe, SUN Qifeng, ZHOU Sen, ZHANG Yalong, WANG Yi (Dept. Four of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effects of naringin on the proliferation and differentiation of osteoblasts in T cell-osteoblast co-culture system under simulated microgravity. **METHODS** This experiment was setting normal gravity control group, normal gravity naringin group, simulated microgravity control group and simulated microgravity naringin group. In the control group, T cells were co-cultured with osteoblasts under normal gravity or simulated microgravity conditions. In the naringin group, 1×10^{-5} mol/L naringin solution was added additionally on the basis of control group. The morphology of osteoblasts was observed under the microscope. The proliferation rate of osteoblasts was detected by CCK-8 method. The alkaline phosphatase (ALP) activity was detected by ALP kit. mRNA relative expressions of Runt related transcription factor 2 (Runx2) and interleukin-6 (IL-6) were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. The relative expression of Runx2 and IL-6 protein were detected by Western blot. **RESULTS** Compared with normal gravity control group, the density of osteoblasts in the simulated microgravity control group decreased, only a small number of cells were aggregated, and the cell morphology was mostly round; compared with the simulated microgravity control group, the osteoblasts in the simulated microgravity naringin group formed spindle or polygonal, plump in shape, and clustered in groups of fish. Compared with normal gravity control group, the proliferation rate of osteoblasts, ALP activity, relative expressions of Runx2 mRNA and protein in the normal gravity naringin group were significantly increased, while the relative expressions of IL-6 mRNA and protein were significantly decreased ($P < 0.05$); the proliferation rate of osteoblasts, ALP activity, relative expressions of Runx2 mRNA and protein in the simulated microgravity control group were significantly decreased, while relative expressions of IL-6 mRNA and protein were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the simulated microgravity control group, the proliferation rate of osteoblasts, ALP activity, relative expressions of Runx2 mRNA and protein in the simulated microgravity naringin group were significantly increased, while relative expressions of IL-6 mRNA and protein were significantly decreased ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** In the T cell-osteoblast co-culture system, simulated microgravity can inhibit the proliferation and differentiation of osteoblasts; naringin can improve the

proliferation and differentiation ability of osteoblasts under this condition, and its mechanism of action is related to the decrease of IL-6 level and the increase of Runx2 level.

KEYWORDS naringin; osteoblasts; simulated microgravity; proliferation and differentiation; T cell

[△]基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81873093)
* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药基础。E-mail: jianxingchen2021@126.com
通信作者 教授,博士生导师。研究方向:骨质疏松及关节疾病。电话:0451-86297531。E-mail:yinwenzhe@medmail.com.cn

太空飞行中,暴露在微重力环境中的宇航员易出现骨密度降低、肌肉萎缩、肾功能降低、免疫功能紊乱等生理问题^[1]。自从骨免疫学的概念首次提出以来,骨组织与免疫细胞之间的相互作用受到越来越多研究者的关注^[2]。太空实验研究表明,微重力下T细胞的激活显著减少,白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、 γ -干扰素等炎症因子的分泌水平也显著改变^[3-4]。

骨碎补是一味补肾壮骨中药材,具有抗炎、加速骨折愈合、预防及治疗骨质疏松等功效^[5-6]。笔者课题组的前期研究表明,在模拟微重力下骨碎补能够促进成骨细胞-破骨细胞共育体系中的成骨细胞增殖,提高碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,上调Runt相关转录因子2(Runt related transcription factor 2, Runx2)和骨保护素的基因表达^[7]。柚皮苷是从骨碎补中提取的活性成分,具有抗氧化、抗炎、降低胆固醇、改善微循环等多种药理作用^[8-9]。近年来,柚皮苷的骨保护作用被广泛研究。有研究表明,柚皮苷在去卵巢大鼠骨质疏松模型中能够促进骨形成,同时促进体外成骨细胞的增殖、提高ALP活性^[10-11];也可以提高伤口组织的生长因子水平,下调IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子 α 的mRNA表达^[12]。本研究通过建立T细胞-成骨细胞共育体系,探究模拟微重力下柚皮苷对成骨细胞增殖分化的影响,以期为航空医学应对失重性骨质丢失及临床上防治废用性骨质疏松提供一定的理论基础和研究思路。

1 材料

1.1 实验动物与细胞

3日龄SD乳鼠12只,由哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为SCXK(黑)2021-001,用于提取原代颅顶骨成骨细胞。小鼠T细胞购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。实验方案经哈尔滨医科大学附属第二医院伦理委员会批准,批件号为SYDW2022-058。

1.2 主要仪器

X70型光学倒置相差显微镜购自日本Olympus公司;HF240型细胞培养箱购自德国Heraeus公司;DL-CJ-2ND II型超净工作台购自东联北方科技(北京)有限公司;ST-16R型高速冷冻离心机购自美国Thermo Fisher Scientific公司;NY 14831型离心管、430488型冻存管、96孔板购自美国Corning公司;Infinite M200型多功能酶标仪购自奥地利Tecan公司;Applied Biosystems 7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪购自美国ABI公司;PowerPac™ Basic电泳仪购自美国Bio-Rad公司;Tanon GIS2010全自动数码凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司;BP310P型称量天平购自德国Sartorius公司;TY3062型旋转细胞培养系统(rotary cell culture system, RCCS)购自上海易扩仪器有限公司。

1.3 主要药品与试剂

柚皮苷(批号PCS-201021,纯度 $\geq 98\%$)购自成都植标化纯生物技术有限公司;二甲基亚砜、DMEM培养基、

II型胶原酶、胎牛血清、PBS(货号或批号分别为D8371、20210519、1225C071、11011-8611、20211115)购自北京索莱宝科技有限公司;RIPA裂解液、0.25%胰蛋白酶、青链霉素双抗、非离子型表面活性剂TritonX-100、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号分别为0803320200921、071019190812、080421211029、P0096、062521211026)购自上海碧云天生物技术有限公司;ALP试剂盒(批号20210722)购自南京建成生物工程研究所;茜素红染液(批号0518A21)购自北京雷根生物技术有限公司;CCK-8试剂盒(批号209586)购自上海尚宝生物科技有限公司;TB Green实时荧光定量PCR MasterMix试剂盒、逆转录试剂盒(货号分别为RR420A、RR036Q)购自日本TaKaRa公司;Runx2兔源抗体、IL-6兔源抗体、磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)兔源抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号分别为BA12249456、BA12227886、BA09211756、BA01235136)购自北京博奥森生物技术有限公司。

2 方法

2.1 成骨细胞培养

SD乳鼠使用颈椎脱臼法处死,乙醇消毒,无菌条件下分离取出颅顶骨,去除骨膜、血管等结缔组织,将颅顶骨剪成碎骨片;加入0.25%胰蛋白酶作用30 min,弃去胰蛋白酶,再加入II型胶原酶消化60 min,以1 200 r/min离心5 min,加入含10%胎牛血清及1%青链霉素双抗的DMEM培养基(以下简称“完全培养基”),制成细胞悬液,接种到培养皿中培养,之后每2 d换液1次。取第3代原代颅顶骨细胞经茜素红染液染色后,置于显微镜下观察,若有成骨细胞分化成熟的标志——矿化结节,则该原代颅顶骨培养的细胞为成骨细胞,之后选择第3代成骨细胞进行后续实验。

2.2 T细胞培养

将储存于冻存管中的T细胞放入37℃水浴锅内复苏,期间轻轻摇晃,融化后放入超净工作台内,将细胞悬液转移至离心管内,再加入10倍体积的完全培养基,以1 200 r/min离心5 min,弃去上清液,加入完全培养基,轻轻吹打均匀,接种到培养瓶,放入细胞培养箱,24 h后半量换液,之后每2 d换液1次。收集T细胞进行计数,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL。

2.3 柚皮苷溶液配制

取柚皮苷17.4 mg,溶于6 mL二甲基亚砜中,配制成浓度为 5×10^{-3} mol/L的母液,在超净工作台内过滤除菌后用完全培养基将母液稀释为 1×10^{-5} mol/L(此时二甲基亚砜终体积分数 $< 0.1\%$),再置于4℃冰箱保存备用。

2.4 实验分组与处理

本实验设正常重力对照组、正常重力柚皮苷组、模拟微重力对照组、模拟微重力柚皮苷组。正常重力对照组:正常重力下T细胞与成骨细胞共育(将T细胞与第3

代成骨细胞按照20:1的比例共同培养建立共育体系,下同)。正常重力柚皮苷组:正常重力下T细胞与成骨细胞共育,加入 1×10^{-5} mol/L柚皮苷溶液(剂量依据文献[13]设置,下同)。模拟微重力对照组:模拟微重力下T细胞与成骨细胞共育。模拟微重力柚皮苷组:模拟微重力下T细胞与成骨细胞共育,加入 1×10^{-5} mol/L柚皮苷溶液。根据文献[14]描述的实验方法建立模拟微重力环境:将模拟微重力对照组和模拟微重力柚皮苷组中的细胞接种于RCCS内,加入胎牛血清5 mL,然后加入完全培养基,用注射器排尽气泡。RCCS设置转速为30 r/min,作用时间为2 d(期间若产生气泡,立即将气泡赶尽,以避免流体剪切力的影响)。正常重力对照组和正常重力柚皮苷组于培养瓶中常规培养2 d。

2.5 成骨细胞形态学观察

收集“2.4”项下分组处理的成骨细胞,在低倍镜视野($\times 40$)下观察各组成骨细胞的形态。

2.6 成骨细胞增殖率检测

采用CCK-8法检测。将“2.4”项下分组收集的成骨细胞进行浓度调整,以 1×10^3 个/孔接种于96孔板,每孔加入200 μ L细胞悬液,培养箱孵育4 h,细胞贴壁良好后放入超净工作台,根据说明书要求向各孔中加入CCK-8试剂10 μ L,轻轻摇晃均匀后放入细胞培养箱孵育2 h,溶液变橙色后取出。另设只加培养基、不加细胞的空白组同法操作。使用酶标仪检测450 nm波长处的光密度(OD),计算各组细胞增殖率。细胞增殖率=(给药组OD-空白组OD)/(对照组OD-空白组OD) $\times 100\%$ 。

2.7 成骨细胞ALP活性检测

采用ALP试剂盒检测。收集“2.4”项下分组处理的成骨细胞,吸弃培养液,用PBS反复润洗后加入适量1% TritonX-100覆盖细胞。显微镜下观察细胞形态消失说明细胞已经裂解充分,然后把待测液体转移至96孔板中,根据试剂盒说明书要求,使用酶标仪检测520 nm波长处的OD;同时提取细胞总蛋白,通过BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,再计算各组ALP活性。ALP活性=(检测OD/标准OD) \times 酚标准液浓度/样本蛋白浓度,其中标准OD为试剂盒中标准品检测出的OD,酚标准液浓度为试剂盒标注浓度。

2.8 成骨细胞中Runx2、IL-6 mRNA相对表达的检测

采用实时荧光定量PCR法检测。按“2.4”项下操作分组处理细胞,分别提取各组细胞总RNA,行RNA纯度检测;逆转录合成cDNA,以cDNA为模板进行扩增,扩增产物行琼脂糖凝胶电泳;经实时荧光定量PCR反应后分析基因扩增的循环阈值(Ct值),以 β -actin为内参基因,根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算所得数值表示Runx2和IL-6的mRNA相对表达水平。反应条件:95 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s(共40个循环)。引物序列及产物长度见表1。

表1 引物序列及产物长度

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Runx2	上游引物:GCTTGATGACTCTAAACCTA	236
	下游引物:AAAAAGGGCCAGTTCGAA	
IL-6	上游引物:CCCCAGGAGAAGATTCCA	221
	下游引物:CGCAGAATGAGATGAGTTGT	
β -actin	上游引物:CTTCTGGGCATGGAATCCT	306
	下游引物:TTGATCTTCATTGTGCTGGGTG	

2.9 成骨细胞中Runx2、IL-6蛋白相对表达的检测

采用Western blot法检测。按“2.4”项下操作分组处理细胞,使用RIPA裂解液提取蛋白,测定总蛋白浓度。取定量后的蛋白与PBS混合,加热变性后进行凝胶电泳;然后加入Runx2、IL-6、GAPDH一抗(稀释度分别为1:1 000、1:1 000、1:5 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(稀释度为1:5 000),室温孵育,显影。使用Image J软件分析蛋白条带,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.10 统计学分析

实验均重复3次以上。采用SPSS 26.0软件进行数据分析,计量资料满足正态分布时以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 成骨细胞形态学观察结果

显微镜下可见,与正常重力对照组比较,模拟微重力对照组成骨细胞密度降低,仅有少量聚集,细胞形态以圆形居多;与模拟微重力对照组比较,模拟微重力柚皮苷组成骨细胞成梭形或多角形,形态饱满,成鱼群状聚集。结果见图1。

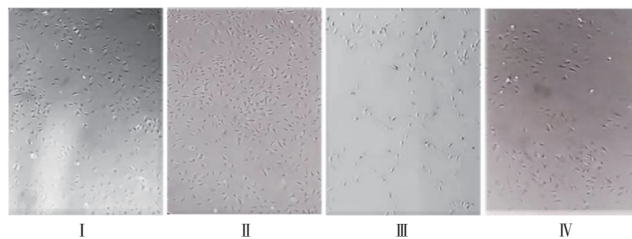


图1 各组成骨细胞形态学观察显微图($\times 40$)

图1 各组成骨细胞形态学观察显微图($\times 40$)

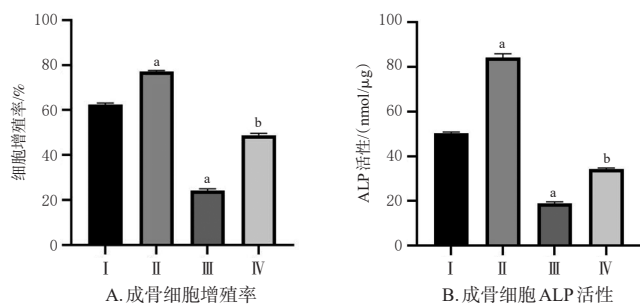
3.2 成骨细胞增殖率检测结果

CCK-8法检测结果显示,与正常重力对照组比较,正常重力柚皮苷组成骨细胞增殖率显著升高($P < 0.05$),模拟微重力对照组成骨细胞增殖率显著降低($P < 0.05$);与模拟微重力对照组比较,模拟微重力柚皮苷组成骨细胞增殖率显著升高($P < 0.05$)。结果见图2A。

3.3 成骨细胞ALP活性检测结果

ALP试剂盒检测结果显示,与正常重力对照组比较,正常重力柚皮苷组成骨细胞ALP活性显著升高($P <$

0.05),模拟微重力对照组成骨细胞 ALP 活性显著降低 ($P<0.05$);与模拟微重力对照组比较,模拟微重力柚皮苷组成骨细胞 ALP 活性显著升高 ($P<0.05$)。结果见图 2B。

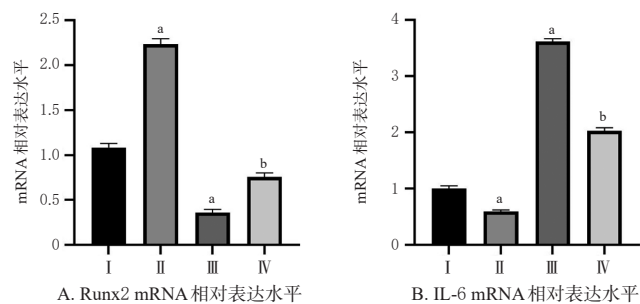


I:正常重力对照组;II:正常重力柚皮苷组;III:模拟微重力对照组;IV:模拟微重力柚皮苷组;a:与正常重力对照组比较, $P<0.05$;b:与模拟微重力对照组比较, $P<0.05$

图2 各组成骨细胞增殖率及成骨细胞 ALP 活性比较

3.4 成骨细胞中 Runx2、IL-6 mRNA 相对表达的检测

实时荧光定量 PCR 检测结果显示,与正常重力对照组比较,正常重力柚皮苷组成骨细胞的 Runx2 mRNA 相对表达水平显著升高、IL-6 mRNA 相对表达水平显著降低 ($P<0.05$),模拟微重力对照组成骨细胞的 Runx2 mRNA 相对表达水平显著降低、IL-6 mRNA 相对表达水平显著升高 ($P<0.05$);与模拟微重力对照组比较,模拟微重力柚皮苷组成骨细胞的 Runx2 mRNA 相对表达水平显著升高、IL-6 mRNA 相对表达水平显著降低 ($P<0.05$)。结果见图 3。



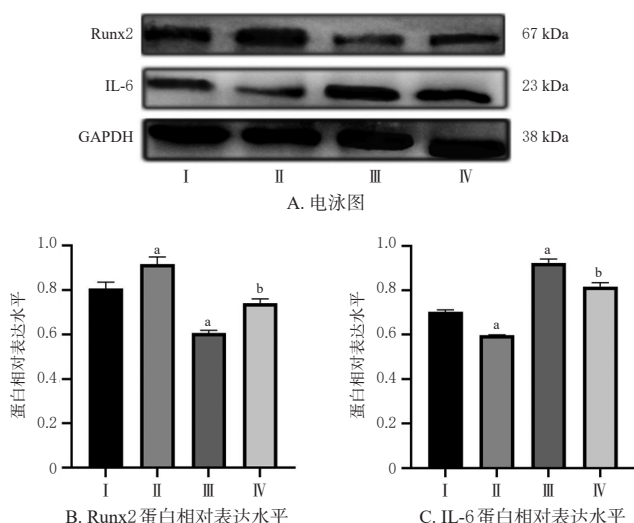
I:正常重力对照组;II:正常重力柚皮苷组;III:模拟微重力对照组;IV:模拟微重力柚皮苷组;a:与正常重力对照组比较, $P<0.05$;b:与模拟微重力对照组比较, $P<0.05$

图3 各组成骨细胞 Runx2、IL-6 mRNA 相对表达水平比较

3.5 成骨细胞中 Runx2、IL-6 蛋白相对表达的检测

Western blot 法检测结果显示,与正常重力对照组比较,正常重力柚皮苷组成骨细胞的 Runx2 蛋白相对表达水平显著升高、IL-6 蛋白相对表达水平显著降低 ($P<0.05$),模拟微重力对照组成骨细胞的 Runx2 蛋白相对表达水平显著降低、IL-6 蛋白相对表达水平显著升高 ($P<0.05$);与模拟微重力对照组比较,模拟微重力柚皮苷组成骨细胞的 Runx2 蛋白相对表达水平显著升高、IL-6 蛋

白相对表达水平显著降低 ($P<0.05$)。结果见图 4。



I:正常重力对照组;II:正常重力柚皮苷组;III:模拟微重力对照组;IV:模拟微重力柚皮苷组;a:与正常重力对照组比较, $P<0.05$;b:与模拟微重力对照组比较, $P<0.05$

图4 各组成骨细胞 Runx2、IL-6 的蛋白相对表达水平比较

4 讨论

骨免疫学研究表明,骨细胞和免疫细胞在骨髓中共享相同的微环境,并存在复杂而密切的相互作用,例如 T 细胞及其分泌的炎症因子被证明在骨质疏松、类风湿性关节炎等疾病中发挥了关键作用^[15-17]。

既往研究结果显示,T 细胞在活化后产生 IL-6,经核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路途径促进破骨细胞活性、加强骨吸收,Runx2 是骨形成过程中必需的转录因子,其可以激活骨形态蛋白表达,从而促进成骨细胞的进一步分化^[18-20]。本实验结果显示,模拟微重力环境下 IL-6 的 mRNA 和蛋白相对表达上调的同时,成骨细胞增殖率、ALP 活性、Runx2 的 mRNA 和蛋白相对表达均明显降低,提示 IL-6 可促进成骨细胞中 NF- κ B 通路的激活,从而参与微重力对成骨细胞的负性调控作用。既往研究发现,将成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 培养于 RCCS 中,ALP、Runx2、骨钙素等成骨标志物表达下调,IL-6 水平异常升高,NF- κ B 信号分子磷酸化水平升高^[21-22]。这些研究结果与本实验结果一致,提示模拟微重力条件下 IL-6 水平的异常升高及 Runx2 水平的降低是成骨细胞功能抑制的重要因素之一。

有研究显示,柚皮苷能够通过抑制 NF- κ B 活性来抑制成骨细胞炎症因子的分泌,此外,柚皮苷能提高成骨细胞 Runx2 的水平,从而激活骨形态蛋白表达,并促进成骨反应^[23-26]。本实验结果显示,柚皮苷作用于模拟微重力条件下 T 细胞-成骨细胞共育体系,能够显著抑制炎症因子 IL-6 的表达,提示柚皮苷可能通过降低 IL-6 水平,抑制 NF- κ B 通路活性,从而减轻炎症反应。同时,本实验结果发现,柚皮苷干预下成骨细胞增殖率、ALP 活

性、Runx2的 mRNA 和蛋白相对表达均出现明显升高,这提示柚皮苷可通过抑制炎症因子表达促进成骨细胞的增殖分化。

综上所述,在 T 细胞-成骨细胞共育体系中,模拟微重力可以抑制成骨细胞的增殖分化能力;该条件下柚皮苷可以改善成骨细胞的增殖分化能力,其作用机制与 IL-6 水平的降低及 Runx2 水平的升高有关。

参考文献

- [1] KOZLOVSKAYAI B, GRIGORIEVA I. Russian system of countermeasures on board of the International Space Station (ISS): the first results[J]. *Acta Astronaut*, 2004, 55(3/4/5/6/7/8/9):233-237.
- [2] MORRISON S J, SCADDEN D T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2014, 505(7483):327-334.
- [3] CRUCIAN B, STOWE R, MEHTA S, et al. Immune system dysregulation occurs during short duration spaceflight on board the space shuttle[J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33(2):456-465.
- [4] VICO L, COLLET P, GUIGNANDON A, et al. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts[J]. *Lancet*, 2000, 355(9215):1607-1611.
- [5] LAU R Y C, GUO X. A review on current osteoporosis research; with special focus on disuse bone loss[J]. *J Osteoporos*, 2011, 2011:293808.
- [6] 秦岭,石印玉,“倡议”工作组.建立防治骨质疏松症的中草药研发国际标准的倡议[J].*中国骨质疏松杂志*, 2004, 10(3):356-361, 366.
- [7] 尹文哲,张小玲,叶义杰,等.骨碎补对微重力下共育骨细胞中成骨细胞分化的影响[J].*中医药学报*, 2017, 45(4):16-20.
- [8] LI G L, XU Y R, SHENG X, et al. Naringin protects against high glucose-induced human endothelial cell injury via antioxidation and CX3CL1 downregulation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6):2540-2551.
- [9] YU M F, YOU D Q, ZHUANG J J, et al. Controlled release of naringin in metal-organic framework-loaded mineralized collagen coating to simultaneously enhance osseointegration and antibacterial activity[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(23):19698-19705.
- [10] WONG R W, RABIE A B. Effect of naringin on bone cells[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(11):2045-2050.
- [11] ZHOU X X, ZHANG P, ZHANG C, et al. Promotion of bone formation by naringin in a titanium particle-induced diabetic murine calvarial osteolysis model[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(4):451-456.
- [12] KANDHARE A D, GHOSH P, BODHANKAR S L. Naringin, a flavanone glycoside, promotes angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis through modulation of inflammatory and growth factor expression in diabetic foot ulcer in rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 219:101-112.
- [13] WU J B, FONGY C, TSAIH Y, et al. Naringin-induced bone morphogenetic protein-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun and AP-1 pathway in osteoblasts[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 588(2/3):333-341.
- [14] MORABITO C, GUARNIERI S, CUCINA A, et al. Antioxidant strategy to prevent simulated microgravity-induced effects on bone osteoblasts[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10):3638.
- [15] DANKS L, TAKAYANAGI H. Immunology and bone[J]. *J Biochem*, 2013, 154(1):29-39.
- [16] ROBINSON J W, LI J Y, WALKER L D, et al. T cell-expressed CD40L potentiates the bone anabolic activity of intermittent PTH treatment[J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(4):695-705.
- [17] JIMI E, TAKAKURA N, HIURA F, et al. The role of NF- κ B in physiological bone development and inflammatory bone diseases: is NF- κ B inhibition “killing two birds with one stone”? [J]. *Cells*, 2019, 8(12):1636.
- [18] HOFBAUER C, SCHOPPET M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases[J]. *JAMA*, 2004, 292(4):490-495.
- [19] TAKAYANAGI H, OGASAWARA K, HIDA S, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ [J]. *Nature*, 2000, 408(6812):600-605.
- [20] CHANG J, WANG Z, TANG E, et al. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB[J]. *Nat Med*, 2009, 15(6):682-689.
- [21] 韩标,张扬,李昊,等.模拟微重力环境下核因子 κ B信号通路调节MC3T3-E1细胞成骨分化的实验研究[J].*生物医学工程学杂志*, 2019, 36(3):421-427.
- [22] SONG S H, GAO Z Y, LEI X J, et al. Total flavonoids of drynariae rhizoma prevent bone loss induced by hindlimb unloading in rats[J]. *Molecules*, 2017, 22(7):E1033.
- [23] 任静,青薇,郑佳俊,等.新型抗菌肽DP7对大鼠骨髓间充质干细胞影响探讨[J].*实用医院临床杂志*, 2020, 17(1):1-6.
- [24] 付殷,孙贵才,陈水林,等.基于雌激素受体研究氯化锂干预成骨细胞的分化及自噬[J].*中国组织工程研究*, 2019, 23(5):680-684.
- [25] 周骅,曹新生,胡泽兵,等.模拟微重力通过调节AKT磷酸化抑制前成骨细胞的增殖[J].*现代生物医学进展*, 2017, 17(2):229-232.
- [26] YANG C, LIU W, SHAN H J, et al. Naringin inhibits titanium particles-induced up-regulation of TNF- α and IL-6 via the p38 MAPK pathway in fibroblasts from hip periprosthetic membrane[J]. *Connect Tissue Res*, 2021, 62(5):485-494.

(收稿日期:2022-05-25 修回日期:2022-07-28)
(编辑:舒安琴)