

脉冲电磁场抑制骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞自噬的机制研究*

肖 豪^{1,3,4} 黄福锦^{2,3,4} 黄夏荣^{2,3,4} 李 兰^{2,3,4} 杨 璐^{2,3,4} 刘丹妮^{2,3,4} 王金玲^{2,3,4} 周 君^{2,3,4,5,6}

摘要

目的:研究脉冲电磁场对骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞自噬的作用机制。

方法:24只雌性SD大鼠随机分为假手术组(Sham组)、去卵巢骨质疏松模型组(OVX组)、去卵巢骨质疏松模型+脉冲电磁场组(PEMF组),每组8只。OVX组和PEMF组均通过切除双侧卵巢构建骨质疏松动物模型。PEMF组予以脉冲电磁场干预,参数设置为频率8Hz,强度3.82mT,每次干预40min,每日1次,每周5天,共12周。ELISA法检测各组大鼠血清中大鼠雌二醇(estradiol, E2)和骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)水平,左胫骨行HE染色,右胫骨行Micro-CT骨扫描及骨微结构定量分析,左股骨及第5腰椎行骨密度检测,右股骨骨髓间充质干细胞采用RT-PCR和Western Blot检测Beclin 1、LC3、P62、Runx-2的mRNA和蛋白表达水平。

结果:脉冲电磁场治疗可提升E2和BALP水平,减少骨质流失。Micro-CT骨扫描和HE切片染色表明脉冲电磁场可增加骨小梁数目、骨体积分数,降低骨小梁分离度,改善骨微结构。与OVX组比较,PEMF组的Beclin 1、LC3、P62的mRNA及蛋白表达水平降低,Runx-2的mRNA及蛋白表达水平升高,差异具有显著性意义($P<0.05$)。

结论:脉冲电磁场可能通过抑制骨髓间充质干细胞的自噬,促进骨形成,发挥抗骨质疏松的作用。

关键词 脉冲电磁场;骨质疏松;骨髓间充质干细胞;自噬

中图分类号:R493,R684 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2023)-10-1351-07

The mechanism of pulsed electromagnetic field-induced inhibition of autophagy on bone marrow mesenchymal stem cells in osteoporotic rats/XIAO Hao, HUANG Fujin, HUANG Xiarong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2023, 38(10): 1351—1357

Abstract

Objective: The aim of this study was to explore the mechanism of pulsed electromagnetic field-induced inhibition of autophagy on bone marrow mesenchymal stem cells in osteoporotic rats.

Method: Twenty-four female Sprague-Dawley rats were assigned randomly into sham operation group (Sham group), ovariectomized model group (OVX group), ovariectomized model + pulse electromagnetic field group (PEMF group), 8 rats in each group. The bilateral ovariectomized was used to construct an animal model of osteoporosis animal models in OVX group and PEMF group. Rats in the PEMF group were exposed to PEMF (3.8mT, 8Hz, 40min/day, 5days/week, for 12weeks). E2 and BALP were detected by ELISA in each group. The left tibia was stained with HE and the right tibia was scanned by Micro-CT and quantitative analyzed of bone microstructure. The left femur and the fifth lumbar vertebrae were measured by the bone density. RT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA levels and the relative expression of Beclin1, LC3, P62 and Runx-2.

Result: Pulsed electromagnetic field could significantly increase E2 and BALP levels in serum, increase the

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.10.004

*基金项目:湖南省自然科学基金面上项目(2020JJ4085);湖南省卫生健康委重点项目(202103060198);湖南省卫生健康委科研项目(202103060200);湖南省卫生健康委科研项目(20200464);衡阳市科技计划项目(hkf201947220)

1 长沙市第一医院康复医学科,湖南省长沙市,410005; 2 南华大学衡阳医学院附属第一医院康复医学科; 3 南华大学衡阳医学院附属第一医院康复医学实验室; 4 南华大学衡阳医学院附属第一医院康复医学中心; 5 四川大学华西医院康复医学中心; 6 通讯作者
第一作者简介:肖豪,女,硕士,住院医师; 收稿日期:2022-02-19

bone mineral density in OP rats. Micro-CT detection and HE section staining showed that pulsed electromagnetic field could improve the trabecular bone microscopic parameters. Compared with the OVX group, PEMF group showed the significantly decreased mRNA and protein expression levels of Beclin1, LC3, and P62, and significantly increased Runx-2 expression level ($P < 0.05$).

Conclusion: The inhibition of osteoporosis induced by pulsed electromagnetic fields may be achieved through inhibiting the autophagy of bone marrow mesenchymal stem cells and promoting bone formation.

Author's address Department of Rehabilitation, The First Hospital of Changsha City, Changsha, 410005

Key word pulsed electromagnetic field; osteoporosis; bone marrow mesenchymal stem cells; autophagy

随着老龄化趋势加剧,骨质疏松症(osteoporosis, OP)的患病率逐年增长,已成为全球性的公共卫生问题^[1-2],促进骨形成是防治骨质疏松症的关键环节。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC)是具有自我增殖和成骨分化能力的干细胞,是维持骨形成、骨重建以及保持骨量必不可少的因素^[3]。研究发现,脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMF)在减轻骨质疏松性疼痛^[4]、改善平衡功能^[5]、降低跌倒风险^[6-7]等方面疗效确切,同时可以调控骨髓间充质干细胞成骨分化活性,但具体作用机制尚不明确^[8]。

自噬(autophagy)是指细胞通过形成自噬体膜,包裹受损的细胞器或构象错误的蛋白质等,通过溶酶体依赖途径分解,重新生成小分子物质和能量^[9]。研究证实,自噬是维持骨髓间充质干细胞内自我增殖分化潜能的重要生物学机制^[10],与骨代谢密切相关^[11-12]。研究发现,在去卵巢大鼠中,雌激素水平的下降可导致氧化应激后的活性氧堆积,激活细胞自噬,启动自身清除实现再循环进程^[13]。因此,脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞的作用是否与调控细胞自噬有关是个值得探讨的问题。本研究旨在探讨脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞自噬作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

实验动物是体质量为250g—300g的3月龄清洁级SD雌性大鼠,购于湖南省斯莱克景达实验动物有限公司(许可证号:SCXK(湘)2019-0004)。动物饲养室的温度设置为20℃—25℃,相对湿度保持在50%—60%,12h明暗交替,自由摄食饮水。实验所涉及的操作严格遵循南华大学附属第一医院伦理委员会的相关规定和准则。将大鼠随机分成3组:假手术组

(Sham组)、去卵巢骨质疏松模型组(OVX组)、去卵巢骨质疏松模型+脉冲电磁场组(PEMF组),每组各8只。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂:大鼠雌二醇(estradiol, E2)和骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)检测试剂盒:上海酶联生物科技有限公司。Beclin 1抗体(ab62557)、Runt相关转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx-2)抗体(ab236639):英国ABCAM公司。LC3抗体(#12741)、P62抗体(18420-1-AP):美国Proteintech公司。mRNA逆转录试剂盒(CW2569):中国北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2.2 主要仪器及设备:脉冲电磁场(FE-500A):湖南省永逸科技有限公司。台式高速冷冻离心机(H1650R):湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。多功能酶标分析仪(MB-530):深圳市汇松科技发展有限公司。荧光定量RCP仪(Thermo Pikoreal96):美国Thermo公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型构建:实验动物SD雌性大鼠称体质量后,使用2%的戊巴比妥钠以40mg/kg的剂量行腹腔注射麻醉。OVX组及PEMF组大鼠均使用双侧去卵巢术造模。麻醉成功后遵循无菌原则在背部行长约2cm的纵向切口,钝性分离肌层后找到双侧卵巢,将卵巢与子宫连接处结扎切除,缝合消毒。3个月后检测骨组织形态学,具有骨小梁数目减少、稀疏断裂等病理改变的实验大鼠,则表明造模成功。本研究共建模18只,成功16只。Sham组则结扎切除双侧卵巢旁同体积的脂肪组织,设为对照组。所有实验大鼠术后转至鼠笼常温常规饲养,定期手术部位消毒,术后密切观察大鼠精神、活动及进食情况。

1.3.2 实验干预:本实验采用永逸科技FE-500A型

脉冲电磁场(湖南永逸科技有限公司),大小:600mm×500mm×200mm,对PEMF组大鼠进行干预,干预时大鼠放置在线圈中心区域,干预参数为:频率8Hz,强度3.82mT,每次干预40min,每日1次,每周5天,共12周。Sham组和OVX组大鼠以同种方式放置在脉冲电磁场线圈中心区域,但不开启仪器,放置时间及频次同PEMF组。

1.3.3 实验检测:①大鼠血清E₂、BALP水平检测:干预12周后,处死所有大鼠,取眼球血5ml,静置2h后离心。取离心后的上层血清500μl行ELISA法检测,具体实验步骤严格按照ELISA试剂盒产品说明书进行,测定血清E₂、BALP水平。②大鼠骨组织形态学检测:麻醉处死大鼠后,取大鼠左胫骨放入40g/L多聚甲醛中固定,并依次置于梯度乙醇溶液中脱水,再经脱钙处理后,完成常规的石蜡包埋,冰冻切片切片,厚度约为4—6μm,常规行HE染色,封片后于显微镜下观察骨组织形态。③大鼠骨密度检测:干预结束后处死各组实验大鼠,取左股骨及第5腰椎体用生理盐水浸泡过的湿纱布包裹,置于-20℃冰箱中保存,以完成骨密度检测。左股骨及第5腰椎使用Challenger骨密度仪扫描(相关参数设置:35keV能量,等效电流0.4mA,笔束束点大小:1.2mm×1.2mm),采集左股骨全长及第5腰椎椎体的骨密度。④Micro-CT骨扫描及骨组织定量分析:取大鼠右胫骨行Micro-CT骨扫描,并完成松质骨骨组织定量分析。使用QuantunGX软件完成样本扫描,扫描数据及图像上传至Caliper Analyze系统分析,计算松质骨骨体积分数(percent bone volume, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁数目(trabecular number, Tb.N)、骨小梁分离度(trabecular separation, Tb.Sp)等参数。⑤各组大鼠骨髓间充质干细胞的自噬相关基因表达检测:取大鼠右股骨骨髓完成PR-PCR检测:Trizol提取右股骨骨髓组织总RNA,以骨髓组织样品总mRNA为模板,进行逆转录cDNA,以cDNA为模板加入靶基因上下游引物,进行扩增,以β-actin为内参,记录PCR仪测定的Ct值,计算2^{-ΔΔCt}值(表1)。⑥各组大鼠骨髓间充质干细胞的自噬相关蛋白表达检测。称取0.02g右股骨骨髓组织,并加入200μl RIPA裂解液,裂解、研磨均匀。在4℃下将裂解组织离

心(参数设置:12000r/min;15min)。离心完成后,缓慢吸取1.5ml的离心上清液。10%的分离胶中加入TEMED,电泳分离,转膜后封闭。分别加入Beclin1(1μg/ml)、LC3(1:1000)、P62(1:3000)、Runx-2(1:1000)和β-actin(1:5000)一抗孵育90min后,洗膜加二抗HRP goat anti-mouse IgG(1:5000)和HRP goat anti-rabbit IgG(1:6000)室温孵育90min,滴加ECL液显色/曝光,将曝光后的底片扫描,并用quantity one专业灰度分析软件进行分析。

表1 引物序列

基因名称	序列	大小
Beclin1	上游 GTGGCGGCTCCTATTCCATC	106bp
	下游 GACACCCAAGCAAGACCCCA	
LC3B	上游 AACACAGCCACCTCTCGACCT	125bp
	下游 ACACAACCCACACACGCGCAG	
P62	上游 CTTTGATTTGAGGCACCCCGTA	179bp
	下游 ATTCAACCGCCATGTGCTT	
Runx-2	上游 CCACCCAGTAGCAAACCGAA	173bp
	下游 GCATCAGACAAACACACGGAC	
Actin	上游 ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223bp
	下游 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

1.4 统计学分析

使用SPSS 22.0软件进行统计分析,用均数±标准差描述计量资料。当组间数据比较方差齐时,采用单因素方差分析(one way-ANOVA)检验;组间数据比较方差不齐时,采用Dunnett T3检验,以P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组大鼠骨组织形态学变化

HE染色观察3组大鼠左胫骨松质骨骨小梁结构,检测骨质疏松模型建立情况及脉冲电磁场治疗效应(图1)。光学显微镜下显示Sham组骨小梁结构完整。与Sham组对比,OVX组骨小梁稀疏断裂,紊乱无序。PEMF组对比OVX组显示骨小梁数目增多,排列较规则并相互连接成网状。

2.2 各组大鼠血清E₂、BALP水平的比较

与Sham组比较,OVX组的E₂和BALP水平下降,差异有显著性意义(P<0.05);与OVX组对比,PEMF组的E₂和BALP水平升高,差异有显著性意义(P<0.05)(图2—3)。

2.3 各组大鼠骨密度的比较

与Sham组对比,OVX组左股骨及第5腰椎的

图1 各组实验大鼠骨组织形态学变化

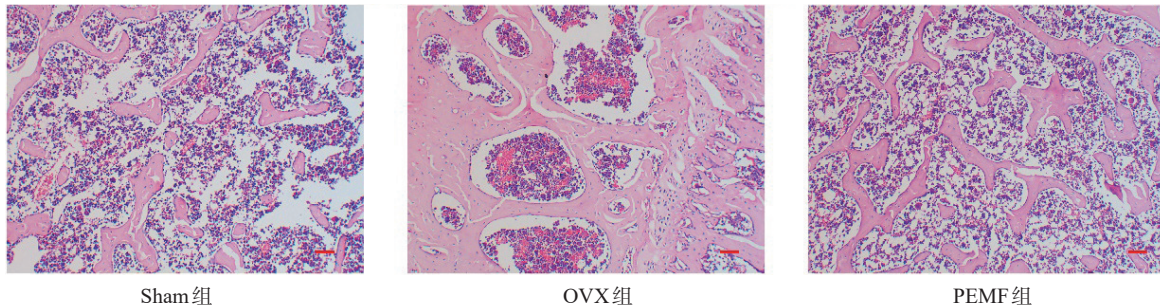
(HE染色, $\times 100$)

图2 不同组别的E2浓度

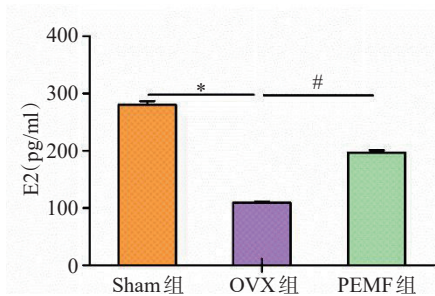


图3 不同组别的BALP浓度

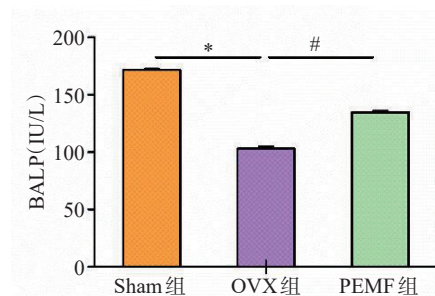


图4 不同组别的左股骨的骨密度

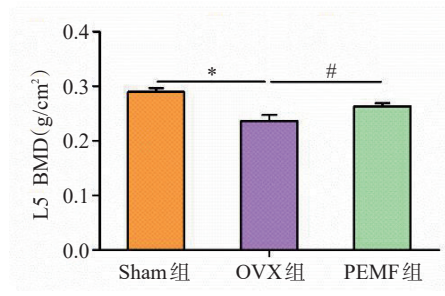
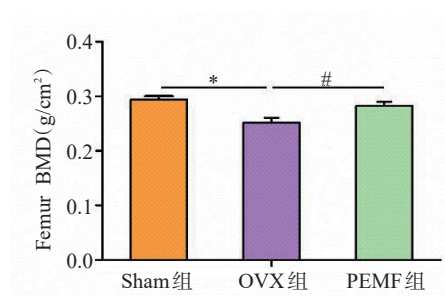


图5 不同组别的第5腰椎的骨密度



注: *与Sham组对比, $P < 0.05$; #与OVX组对比, $P < 0.05$ 。

骨密度均下降, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 与OVX组相比, PEMF组左股骨和第5腰椎的骨密度均增加, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$) (图4, 5)。

2.4 各组大鼠的Micro-CT骨扫描分析及骨组织量的变化

2.4.1 各组大鼠的Micro-CT骨扫描分析: Sham组的骨小梁结构致密, 排列规则; 与Sham组相比, OVX组骨小梁稀疏, 出现空腔改变; 与OVX组相对, PEMF组骨小梁数量增多, 分布较致密, 部分排列呈网状改变(图6)。

2.4.2 各组大鼠的骨组织定量变化: 与Sham组相比, OVX组Tb.N、BV/TV均减少, Tb.Sp增加, 差异

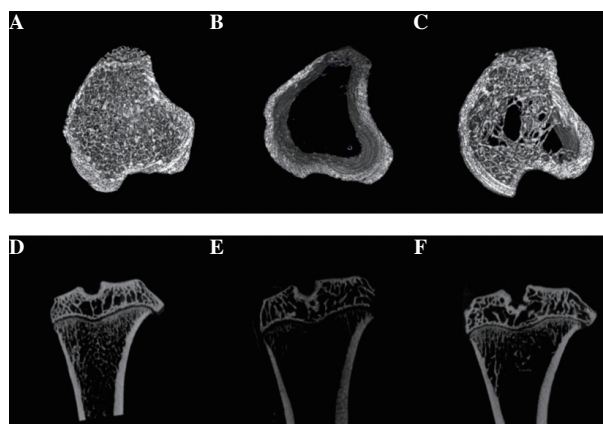
注: *与Sham组对比, $P < 0.05$; #与OVX组对比, $P < 0.05$ 。

均有显著性意义 ($P < 0.05$); 而OVX组的Tb.Th虽减少, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。与OVX组相比, PEMF组Tb.N、BV/TV增加, Tb.Sp减少, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$); Tb.Th虽然增加, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$) (图7)。

2.5 各组大鼠骨髓间充质干细胞的自噬相关基因表达的比较

与Sham组相比, OVX组的Beclin 1、LC3B和P62的mRNA水平升高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。Runx-2的mRNA水平下降, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。PEMF组的Beclin 1、LC3B、P62的mRNA水平较OVX组降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

图6 不同组别 Micro-CT 骨扫描显像图像



注:第一排为横断面,第二排为冠状面;A为Sham组;B为OVX组;C为PEMF组;D为Sham组;E为OVX组;F为PEMF组。

0.05)。另外,对比于OVX组,PEMF组的Runx-2的mRNA水平升高,差异有显著性意义($P<0.05$)(图8)。

2.6 各组大鼠骨髓间充质干细胞的自噬相关蛋白的表达的比较

OVX组中Beclin1、LC3II/I、P62的蛋白表达水平高于Sham组,差异有显著性意义($P<0.05$)。与Sham组对比,OVX组中的Runx-2的蛋白表达水平降低,差异有显著性意义($P<0.05$)。与OVX组相比,PEMF组中的Beclin 1、LC3II/I、P62的蛋白表达水平下降,差异有显著性意义($P<0.05$);Runx-2的蛋白表达水平升高,差异有显著性意义($P<0.05$)(图9)。

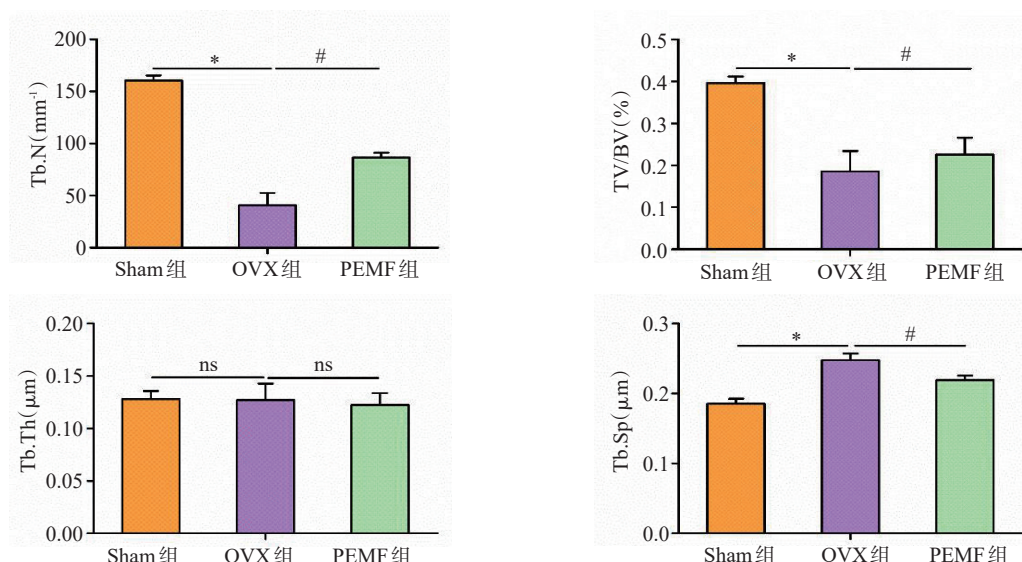
3 讨论

骨组织微结构是承载和分散应力负荷的关键因素,而骨小梁是具有支撑作用、保持良好空间构筑的特殊结构^[14]。研究发现,雌激素减少的去卵巢大鼠骨小梁结构的骨流失程度不一,松质骨中矿化程度弱的骨小梁迅速减少或丧失,骨质疏松逐步进展时骨小梁微结构可出现断裂、空腔的改变^[15]。本实验通过HE染色和Micro-CT骨扫描发现,OVX组大鼠骨小梁多处断连,呈现出骨质疏松样的空腔表现,与骨质疏松症的进程相吻合^[16],表明本实验造模成功。脉冲电磁场治疗后,骨小梁分布较致密,部分排列成网状,提示脉冲电磁场能有效改善骨微结构。

骨密度值不仅是骨质疏松症的重要诊断依据,也是骨质疏松性骨折独立的预测因子^[17]。鉴于OVX大鼠皮质骨和松质骨骨质丢失的差异^[18],本实验分别检测了皮质骨丰富的左股骨和松质骨丰富的第5腰椎的骨密度。本实验骨密度测量结果表明,双侧去卵巢大鼠左股骨和第5腰椎的骨密度均明显下降,符合骨质疏松症的诊断原则^[19]。随着年龄的增长和骨质疏松的进展,骨密度呈不可逆的下降趋势。本实验的结果表明,脉冲电磁场可有效延缓骨质流失、骨密度下降的进展,与相关临床研究一致^[20-21],但无法逆转至正常骨量水平。

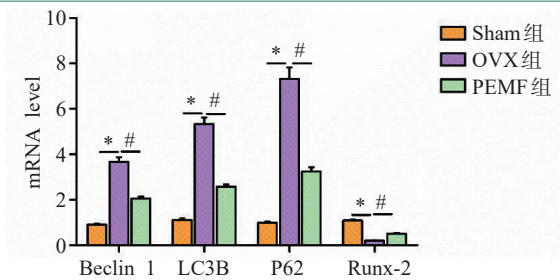
BALP作为骨形成的标志物,其水平与骨髓间

图7 不同组别右胫骨骨组织定量分析



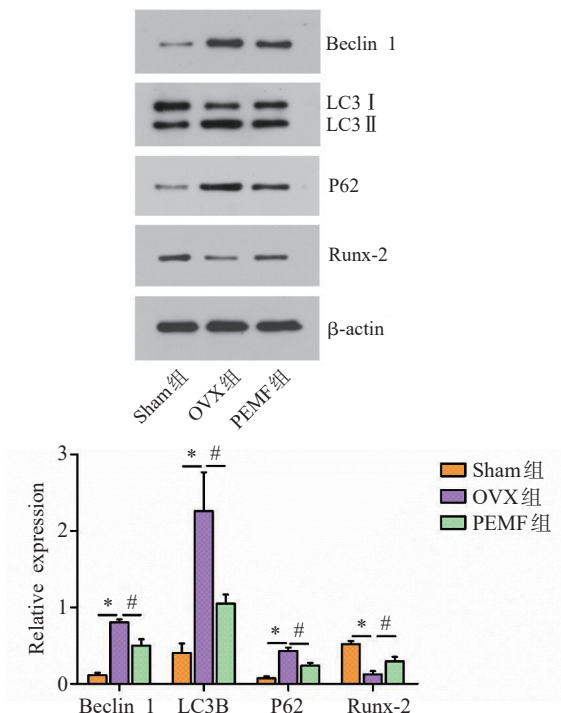
注:*与Sham组相比, $P<0.05$; #与OVX组相比, $P<0.05$;ns两者之间无显著性意义, $P>0.05$ 。

图8 不同组别的RT-PCR检测结果



注: *与Sham组相比, $P < 0.05$; #与OVX组相比, $P < 0.05$ 。

图9 不同组别的WB检测结果



注: *与Sham组相比, $P < 0.05$; #与OVX组相比, $P < 0.05$ 。

充质干细胞的成骨分化活性具有线性关系,对促进骨基质的矿化沉积具有不可替代的作用^[22]。本研究结果显示,脉冲电磁场能增加BALP水平,促进骨髓间充质干细胞的成骨分化活性。Runx-2是启动成骨分化路径的关键转录因子^[23-24],是保证骨髓间充质干细胞发挥成骨分化效应的重要因素^[25]。本研究发现,脉冲电磁场干预后能使Runx-2的表达增加,提示脉冲电磁场在调控成骨分化相关的转录因子方面具有一定潜力,值得进一步探索。

自噬是保证细胞内物质的循环再利用,维持细胞稳态的重要途径^[26]。研究发现,自噬相关基因通过调

控成骨转录分化因子如Runx-2、Osterix等介导调控骨髓间充质干细胞成骨分化进程^[27-28]。自噬具有双重性,适度的自噬才是维持细胞稳态的关键,自噬过度则可引发自噬相关性细胞死亡^[29]。那么脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞自噬的调控究竟是何种效应呢?本实验结果显示,脉冲电磁场干预后有效降低Beclin 1、LC3和P62的表达水平,表明脉冲电磁场可有效抑制骨髓间充质干细胞的自噬,从而为干细胞提供成骨分化所需的适度自噬水平,但具体作用环节尚未完全明确,在接下来的实验研究中有待开展。

目前国内外有关脉冲电磁场治疗骨质疏松症的研究大部分集中在成骨细胞的分化机制及相关信号通路等方面,尽管学者们从不同角度研究了脉冲电磁场对骨质疏松症的影响,但是尚未见基于自噬的角度探索脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞的影响与机制。本研究以骨髓间充质干细胞自噬为切入点,凝练且新颖,可为脉冲电磁场治疗骨质疏松症的临床实践提供全新的理论基础!

4 结论

目前,脉冲电磁场调控骨髓间充质干细胞成骨分化的作用机制研究仍处于初步探索阶段。本研究从细胞自噬的角度出发,证实了脉冲电磁场可能通过抑制去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞的自噬发挥抗骨质疏松的作用效应,但调控骨髓间充质干细胞自噬的作用通路还需进一步研究。

参考文献

- [1] Martin J, Viprey M, Castagne B, et al. Interventions to improve osteoporosis care: a systematic review and meta-analysis[J]. Osteoporos Int, 2020, 31(3): 429—446.
- [2] 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.
- [3] Wang C, Meng H, Wang X, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in osteoblasts and adipocytes and its role in treatment of osteoporosis[J]. Med Sci Monit, 2016(22): 226—233.
- [4] Lin CC, Chang YT, Lin RW, et al. Single pulsed electromagnetic field restores bone mass and microarchitecture in denervation/disuse osteopenic mice[J]. Med Eng Phys, 2020 (80): 52—59.

- [5] Wang T, Yang L, Jiang J, et al. Pulsed electromagnetic fields: promising treatment for osteoporosis[J]. *Osteoporos Int*,2019,30(2):267—276.
- [6] Zhu S, He H, Zhang C, et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on postmenopausal osteoporosis[J]. *Bioelectromagnetics*,2017,38(6):406—424.
- [7] 徐换,郝赤子,郑俊,等.脉冲电磁场治疗绝经后骨质疏松症的Meta分析[J].*中国康复*,2017,32(3):230—234.
- [8] Androjna C, Yee CS, White CR, et al. A comparison of alendronate to varying magnitude PEMF in mitigating bone loss and altering bone remodeling in skeletally mature osteoporotic rats[J]. *Bone*,2021(143):115761.
- [9] New J, Thomas SM. Autophagy-dependent secretion: mechanism, factors secreted, and disease implications[J]. *Autophagy*,2019,15(10):1682—1693.
- [10] Ma Y, Qi M, An Y, et al. Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging[J]. *Aging Cell*,2018,17(1):e12709.
- [11] Wang S, Deng Z, Ma Y, et al. The role of autophagy and mitophagy in bone metabolic disorders[J]. *Int J Biol Sci*,2020,16(14):2675—2691.
- [12] 徐庆,陈旭,李建军.自噬调控成骨细胞矿化的研究进展[J].*山东医药*,2019,59(17):106—108.
- [13] 王伟舟,郭皓,袁勇.自噬在绝经后骨质疏松中作用的研究进展[J].*中国骨质疏松杂志*,2017,23(12):1675—1680.
- [14] Costa S, Fairfield H, Reagan MR. Inverse correlation between trabecular bone volume and bone marrow adipose tissue in rats treated with osteoanabolic agents[J]. *Bone*,2019(123):211—223.
- [15] O'Sullivan LM, Allison H, Parle EE, et al. Secondary alterations in bone mineralisation and trabecular thickening occur after long-term estrogen deficiency in ovariectomised rat tibiae, which do not coincide with initial rapid bone loss[J]. *Osteoporos Int*,2020,31(3):587—599.
- [16] Johnston CB, Dagar M. Osteoporosis in older adults[J]. *Med Clin North Am*,2020,104(5):873—884.
- [17] Boutroy S, Khosla S, Sornay-Rendu E, et al. Microarchitecture and peripheral bmd are impaired in postmenopausal white women with fracture independently of total hip t-score: an international multicenter study[J]. *J Bone Miner Res*,2016,31(6):1158—1166.
- [18] Yang H, Xu X, Bullock W, et al. Adaptive changes in micromechanical environments of cancellous and cortical bone in response to in vivo loading and disuse[J]. *J Biomech*,2019(89):85—94.
- [19] Biver E, Ferrari S. Ostéoporose[J]. *Rev Med Suisse*,2020,16(676—677):78—80.
- [20] Iwasa K, Reddi AH. Pulsed electromagnetic fields and tissue engineering of the joints[J]. *Tissue Eng Part B Rev*,2018,24(2):144—154.
- [21] Daish C, Blanchard R, Fox K, et al. The application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for bone fracture repair: past and perspective findings[J]. *Ann Biomed Eng*,2018,46(4):525—542.
- [22] 张萌萌,张秀珍,邓伟民,等.骨代谢生化指标临床应用专家共识(2020)[J].*中国骨质疏松杂志*,2020,26(6):781—796.
- [23] Hu L, Yin C, Zhao F, et al. Mesenchymal stem cells: cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment[J]. *Int J Mol Sci*,2018,19(2):360.
- [24] 李悦,官萍,王燕,等.Runx2基因调控致病的研究进展[J].*医学综述*,2018,24(11):2081—2086.
- [25] Gomathi K, Akshaya N, Srinaath N, et al. Regulation of runx2 by post-translational modifications in osteoblast differentiation[J]. *Life Sci*,2020(245):117389.
- [26] Lamming DW, Bar-Peled L. Lysosome: the metabolic signaling hub[J]. *Traffic*,2019,20(1):27—38.
- [27] 郭健民,章岚.自噬对成骨细胞调控作用的研究进展[J].*中国骨质疏松杂志*,2018,24(11):1535—1540.
- [28] Zhang Z, Yang M, Wang Y, et al. Autophagy regulates the apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells under hypoxic condition via amp-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway[J]. *Cell Biol Int*,2016,40(6):671—685.
- [29] Maiuri MC, Kroemer G. Therapeutic modulation of autophagy: which disease comes first?[J]. *Cell Death Differ*,2019,26(4):680—689.