

王晓仪,李苗,王琳霞,等. 棕榈酸诱导斑马鱼脂毒性损伤骨形成抑制模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(4): 461-467.

WANG X Y, LI M, WANG L X, et al. Establishment of a lipotoxic inhibition model of bone formation in zebrafish induced by palmitic acid [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(4): 461-467.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.04.006

棕榈酸诱导斑马鱼脂毒性损伤骨形成抑制模型的建立

王晓仪^{1,2}, 李苗², 王琳霞², 喻斌², 华永庆^{1,2,3*}

(1. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 3. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210023)

【摘要】 目的 建立棕榈酸诱导的斑马鱼脂毒性损伤骨形成抑制模型。**方法** 将 AB 品系斑马鱼胚胎分为对照组、棕榈酸组 (PA 组) 和辛伐他汀组 (SIM 组)。从 3 dpf (days post fertilization, dpf) 开始, PA 组、SIM 组给予 PA 造模。从 5 dpf 开始, SIM 组给予 SIM 连续给药 4 d。9 dpf 通过钙黄绿素染色法、尼罗红染色法、甘油三酯及总胆固醇含量测定、q-PCR 判断模型是否成功建立。**结果** PA 显著减少斑马鱼椎骨骨节数目、促进脂质堆积、增加甘油三酯及总胆固醇含量、促进成脂相关基因 PPAR γ 、c/EBP α 的表达并抑制成骨相关基因 ALP、RUNX2 的表达。SIM 可以改善 PA 对斑马鱼的骨形成抑制效应。**结论** 采用 PA 给药的方法可成功造成与骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 病理过程相似的脂毒性损伤骨形成抑制模型, 该方法简便、灵敏、可控, 可用于 OP 及相关疾病的药物筛选。

【关键词】 骨质疏松模型; 脂毒性; 斑马鱼; 棕榈酸; 辛伐他汀

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 04-0461-07

Establishment of a lipotoxic inhibition model of bone formation in zebrafish induced by palmitic acid

WANG Xiaoyi^{1,2}, LI Miao², WANG Linxia², YU Bin², HUA Yongqing^{1,2,3*}

(1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Jiangsu

Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica,

Nanjing 210023, China)

Corresponding author: HUA Yongqing. E-mail: hua_yq@njucm.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a palmitic acid (PA)-induced model of lipotoxic bone formation inhibition in zebrafish. **Methods** AB strain zebrafish embryos were divided randomly into a blank control group, PA group, and simvastatin (SIM) group. Embryos in the PA and SIM groups received PA from 3 days post-fertilization (dpf), and embryos in the SIM group received SIM continuously for 4 days from 5 dpf. Establishment of the model was confirmed at 9 dpf by calcein staining, Nile red staining, triglyceride and total cholesterol content determination, and q-PCR. **Results** PA significantly decreased the number of vertebrae, promoted lipid accumulation, increased triglyceride and total cholesterol contents, promoted the expression of lipid-related genes PPAR γ 、c/EBP α , and inhibited the expression of

【基金项目】 国家自然科学基金 (81473390), 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (20KJA360001)。

Funded by National Nature Science Foundation of China (81473390), the Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (20KJA360001)。

【作者简介】 王晓仪, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药内分泌药理。Email: wangxiaoyi2021@qq.com

【通信作者】 华永庆, 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 中药内分泌药理。Email: hua_yq@njucm.edu.cn

osteogenic genes ALP and RUNX2. SIM improved the inhibitory effect of PA on bone formation in zebrafish. **Conclusions** PA can successfully create a lipotoxic model of bone-formation inhibition, similar to the pathological process of osteoporosis, using a simple, sensitive, and controllable method. This model can then be used for drug screening for osteoporosis and related diseases.

[Keywords] osteoporosis model; lipotoxicity; zebrafish; palmitic acid; simvastatin

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着我国人口老龄化问题日趋加重,预计到 2050 年,我国老龄人口将达到 4 亿,骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 患者将达到 2.12 亿^[1]。OP 是由骨代谢失衡诱发的一种严重威胁中老年健康的常见病和多发病,特征表现为骨量减少、骨微结构退化^[2]。OP 发病原因复杂,治疗手段有限,寻找新的 OP 治疗药物仍然是医学研究的热点问题。

斑马鱼幼鱼具有骨骼发育易于观察、饲养方便、繁殖能力强、实验周期短等特点,常被用于骨相关疾病的研究。目前较为常用的斑马鱼骨质疏松模型多采用糖皮质激素类药物诱导,能够一定程度地反映骨质疏松症的病理特点。然而,依据对 OP 病理过程的最新认识,脂代谢异常引起的脂毒性损伤可能是 OP 形成的关键环节^[3-4]。临床 OP 患者在发病过程中常伴有肥胖、高脂血、动脉粥样硬化等脂代谢相关疾病。代谢异常的脂肪组织分泌过量游离脂肪酸、细胞因子等造成脂毒性损伤,进而干预骨髓间充质干细胞分化,导致骨形成受到抑制^[5]。如能从脂毒性角度建立模型,则更能反映 OP 的临床病理特点。棕榈酸是脂毒性环境中具有代表性的游离饱和脂肪酸。本研究尝试利用棕榈酸构建斑马鱼脂毒性损伤骨形成抑制模型,并对斑马鱼骨形成及脂代谢相关指标进行评价,为 OP 治疗药物的机制研究和药效评价提供新的手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 月龄清洁级野生型 AB 品系斑马鱼 (南京一树梨花生物有限公司) 雌、雄各 20 条,养殖于循环的斑马鱼专用养殖系统中,饲养环境严格按照《江苏省地方标准》实验用斑马鱼饲养技术条件。养殖水电导率:400 ~ 800 $\mu\text{m}/\text{s}$, pH = 7 ~ 8,养殖温度:28.5 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$,光照 14 h 白天/10 h 黑暗,饲养于南京中医药大学动物实验中心【SYXK (苏) 2023-0077】。本研究所涉及的所有动物实验,均经过南京中医药大学实验动物伦理委员会的审批

(ACU211208)。

1.1.2 主要试剂与仪器

棕榈酸 (palmitic acid, PA), 北京索莱宝科技有限公司, 718Z021; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), 上海源叶生物科技有限公司, S25762; 氢氧化钠 (NaOH), 国药集团化学试剂有限公司, 10019764; 钙黄绿素, 上海源叶生物科技公司, S19167; 尼罗红, 阿拉丁, N121291; 辛伐他汀 (simvastatin, SIM), 上海源叶生物科技有限公司, S24506; 二甲基亚砷 (DMSO), 上海麦克林生化科技股份有限公司, D806645; 甘油三酯测试盒, 南京建成生物工程研究所, A110-1-1; RNA 裂解液, 南京诺唯赞生物科技公司, R401-01; 逆转录试剂盒, 南京诺唯赞生物科技公司, R223-01; 扩增试剂盒, 南京诺唯赞生物科技公司, Q111-02。

斑马鱼循环养殖系统, 南京一树梨花生物技术公司, ZF-104; 生化培养箱, 上海跃进医疗器械公司, SPX-150; 高通量样品组织研磨机, 南京乔贝琳生物公司, TissueLyser-48; 体式荧光显微镜, 德国徕卡公司, M205FA; 荧光定量 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems, Q6; 酶标仪, 美国 Bio-Tek, SyneRgy2。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼胚胎的获取

取 3 月龄野生型 AB 品系健康斑马鱼于前 1 d 傍晚雌:雄 = 1:1 放入繁殖缸, 隔板并保持黑暗环境。次日早上光照开始时拆去隔板令其交配繁殖, 收集受精卵置于含 0.5 mg/L 亚甲蓝养殖水 (电导率:400 ~ 800 $\mu\text{m}/\text{s}$, pH = 7 ~ 8) 中, 置于全自动控温控光人工气候培养箱中培养 (温度 28.5 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 昼:夜 = 14 h:10 h)。产卵当天记为 0 dpf。

1.2.2 药物配制方法

取 PA 溶于 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 配制成 100 mmol/L 的 PA 储备液。将 100 mmol/L 的棕榈酸储备液 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热至澄清, 快速地加入到 BSA 储备液中并吹打均匀, 得到溶于 10% BSA 的 10 mmol/L PA 储备液, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 中保存, 按需进行稀释使用。用 DMSO 为溶剂, 配制

1 mg/mL SIM 储备液,于-20 ℃中保存,按需进行稀释使用,DMSO 终浓度为 0.1%。

1.2.3 助溶剂及药物浓度筛选

(1)不同浓度 BSA 对斑马鱼存活的影响:于 3 dpf 时选取生长发育状况良好的斑马鱼于 12 孔板中进行随机分组,按照 BSA 不同浓度组(0%、0.001%、0.002%、0.005%、0.010%、0.10%)给药干预,以上各组给药前均调节 pH = 7。换液操作为半数换液,即每日吸走一半前 1 d 的培养液,并加入一半新的培养液。持续观察至 9 dpf,每天记录斑马鱼的生存情况。

(2)不同浓度 PA 对斑马鱼存活的影响:于 3 dpf 时选取生长发育状况良好的斑马鱼于 12 孔板中进行随机分组,按照对照-1 组(0.001% BSA)、PA-1 组(0.001% BSA、1 μmol/L PA)、对照-2 组(0.002% BSA)、PA-2 组(0.002% BSA、2 μmol/L PA)给药干预,以上各组给药前均调节 pH = 7,每天半数换液,持续观察至 9 dpf,每天记录斑马鱼的生存情况。

(3)不同浓度 SIM 对斑马鱼存活的影响:于 3 dpf 时选取生长发育状况良好的斑马鱼于 12 孔板中进行随机分组,按照 SIM 不同浓度组(0.1% DMSO、0、10、20、50、100、1000 ng/mL)给药干预,以上各组给药前均调节 pH = 7,每天半数换液,持续观察至 9 dpf,每天记录斑马鱼的生存情况。

1.2.4 棕榈酸诱导的骨形成抑制模型的建立及阳性药效观察

于 3 dpf 时选取生长发育状况良好的斑马鱼于 12 孔板中进行随机分组,分为对照组、PA 组和 SIM 组。从 3 dpf 开始,对照组持续在含 0.001% BSA、0.1% DMSO 的亚甲蓝养殖水中培养至 9 dpf,PA 组和 SIM 组给予含 1 μmol/L PA、0.001% BSA、0.1% DMSO 的亚甲蓝养殖水。从 5 dpf 开始,SIM 组加入含有 1 μmol/L PA、0.001% BSA、0.1% DMSO、10 ng/mL SIM 的亚甲蓝养殖水,连续给药 4 d。以上各组给药前均调节 pH = 7,每天半数换液,9 dpf 进行各项指标的检测。

1.2.5 尼罗红染色

上述 9 dpf 斑马鱼除去药液,置于 0.5 μg/mL 的尼罗红工作液(pH = 7)中,用人工海水(电导率:400 ~ 800 μm/s,pH = 7 ~ 8)漂洗数次至澄清无色状态。体式荧光显微镜下观察斑马鱼脂肪组织分布情况并拍照。以上步骤均需避光。

1.2.6 甘油三酯及总胆固醇含量检测

上述 9 dpf 斑马鱼除去药液。将每组 30 条斑马鱼幼鱼冰浴处死后,按照试剂盒说明书的方法,加入无水乙醇稀释,低温匀浆、离心,吸出上清液,测定斑马鱼幼鱼体内甘油三酯及总胆固醇含量。

1.2.7 钙黄绿素染色

上述 9 dpf 斑马鱼除去药液,置于 0.2%钙黄绿素(pH = 7)溶液中,孵育 1 h,用人工海水漂洗数次至澄清无色状态。体式荧光显微镜下观察斑马鱼骨形成情况并拍照。以上步骤均需避光。

1.2.8 基因表达分析

上述 9 dpf 斑马鱼除去药液。将每组 90 条斑马鱼幼鱼冰浴处死后,于 TRIzol 试剂中提取总 RNA 并检测成骨相关指标 RUNX2、ALP 及成脂相关指标 PPARγ、c/EBPα 的 mRNA 表达。引物序列见表 1。

表 1 引物序列	
引物 Primers	序列 Sequence
RUNX2	F:5'-GTGGAGATCATAGCGGACCA-3'
	R:5'-CTCCCAGAGCCACAACCTTA-3'
ALP	F:5'-GGCCTTACATGAAGCTGTGG-3'
	R:5'-GTTTCCTCGTGTGTGTAGC-3'
C/EBPα	F:5'-CATCGACATCAGCGCCTACA-3'
	R:5'-CACCCTGGTGGTAGTCGTAG-3'
PPARγ	F:5'-CAGTTTGCAGAGAACAGCGT-3'
	R:5'-GGCTCTTCTTGTGTATGCGG-3'
GAPDH	F:5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'
	R:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

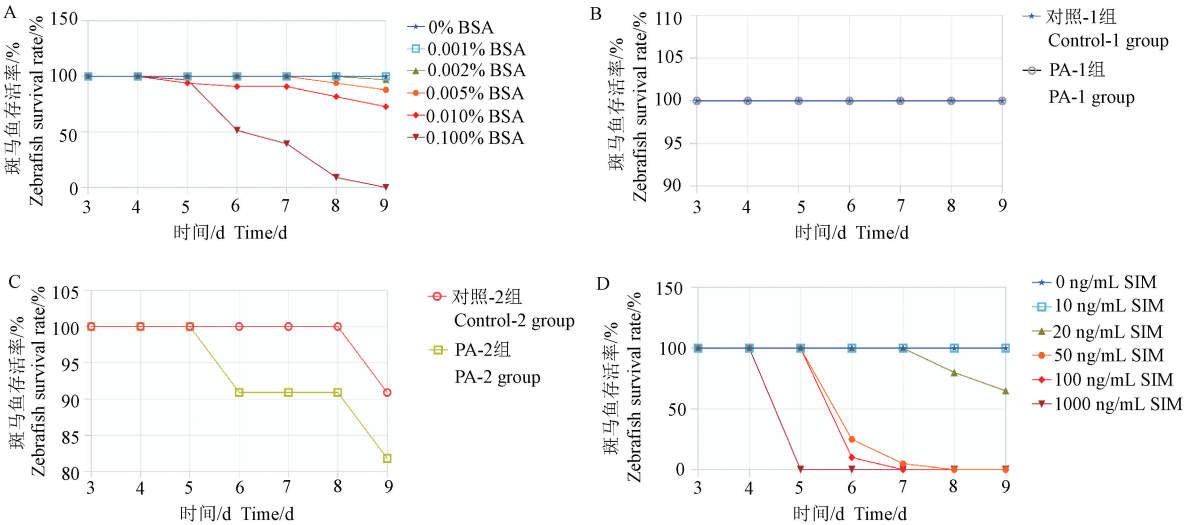
1.3 统计学分析

所有数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有统计分析均采用 GraphPad Prism 9.0 中单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多重比较,两组间比较采用 Dunnett's *t* 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 助溶剂及药物浓度确定

助溶剂及药物浓度对斑马鱼存活影响见图 1。由于 PA 溶解需要 BSA 的辅助,因此对 BSA 的安全剂量进行了探索。结果表明,0.001%、0.002% BSA 对整个实验过程中斑马鱼的存活影响较小(图 1A)。图 1B、1C 显示,PA-1 组药物浓度(0.001% BSA、1 μmol/L PA)在整个实验周期内不会造成斑马鱼死亡,选择该浓度作为造模浓度进行后续实验。图 1D 结果表明,10 ng/mL 的 SIM 不会引起斑马鱼死亡,该浓度可作为阳性药备选浓度。



注:A:不同浓度 BSA 对斑马鱼存活率的影响;B,C:不同浓度 PA 对斑马鱼存活率的影响;D:不同浓度 SIM 对斑马鱼存活率的影响。

图 1 药物安全浓度确定($\bar{x} \pm s, n \geq 10$)

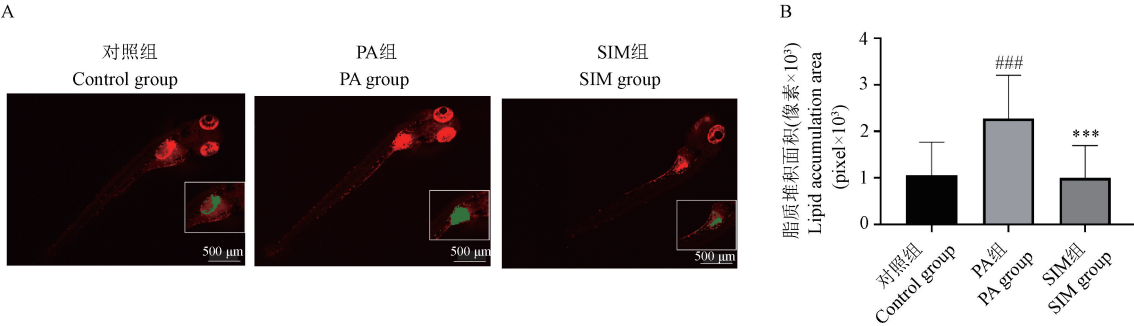
Note. A. Effects of different concentrations of BSA on zebrafish survival rate. B, C. Effects of different concentrations of PA on zebrafish survival rate. D. Effects of different concentrations of SIM on zebrafish survival rate.

Figure 1 Determination of safe concentration of drugs($\bar{x} \pm s, n \geq 10$)

2.2 PA 促进斑马鱼脂质积累

尼罗红染色结果如图 2 所示,腹部强烈桔红色信号代表脂质积聚。与对照组相比,PA 组斑马鱼腹部脂质含量显著增多($P < 0.001$),说明 PA 给药

后可诱导斑马鱼脂代谢紊乱、造成脂质堆积。与 PA 组相比,SIM 组可显著降低斑马鱼体内脂质含量,说明给药 SIM 后,斑马鱼幼鱼脂代谢紊乱的情况得到改善($P < 0.001$)。



注:A:斑马鱼尼罗红染色拍照结果;B:斑马鱼脂质堆积面积统计;与对照组相比,### $P < 0.001$;与 PA 组相比,*** $P < 0.001$ 。(下同)

图 2 PA 及 SIM 对斑马鱼脂质形成的影响($\bar{x} \pm s, n \geq 10$)

Note. A. Zebrafish Nile red staining results. B. Zebrafish lipid accumulation area statistics. Compared with control group, ### $P < 0.001$. Compared with PA group, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 2 Effects of PA and SIM on lipid formation in zebrafish($\bar{x} \pm s, n \geq 10$)

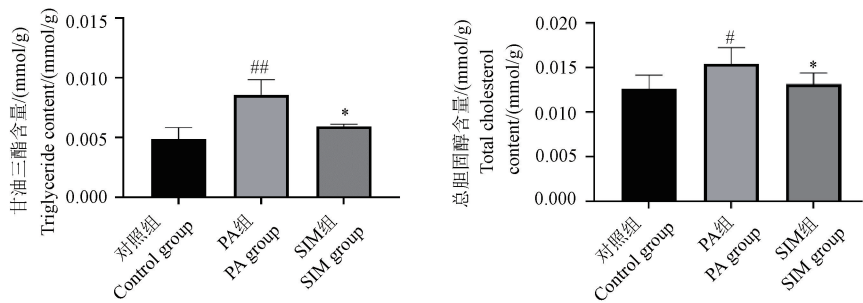
2.3 PA 升高斑马鱼体内甘油三酯、总胆固醇含量

甘油三酯检测结果如图 3 所示。与对照组相比,PA 组甘油三酯含量显著增高($P < 0.01$),与 PA 组相比,SIM 组显著降低斑马鱼幼鱼体内甘油三酯含量($P < 0.05$)。总胆固醇检测结果如图 3 所示。与对照组相比,PA 组总胆固醇含量显著增高($P < 0.05$),与 PA 组相比,SIM 组显著降低斑马鱼幼鱼

体内总胆固醇含量($P < 0.05$)。上述研究表明,PA 可引起斑马鱼脂代谢异常。

2.4 PA 抑制斑马鱼椎骨形成

斑马鱼的骨骼发育与人类骨骼发育的过程相似^[6],其椎骨的形成情况是反映斑马鱼骨形成状况的代表性指标^[7-8]。钙黄绿素染色结果如图 4 所示。与对照组相比,PA 组斑马鱼椎骨数目显著减



注:与对照组相比, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01;与 PA 组相比, ^{*}*P* < 0.05。(下图同)

图 3 PA 及 SIM 对斑马鱼甘油三酯和总胆固醇含量的影响($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

Note. Compared with control group, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01. Compared with PA group, ^{*}*P* < 0.05. (The same in the following figures)

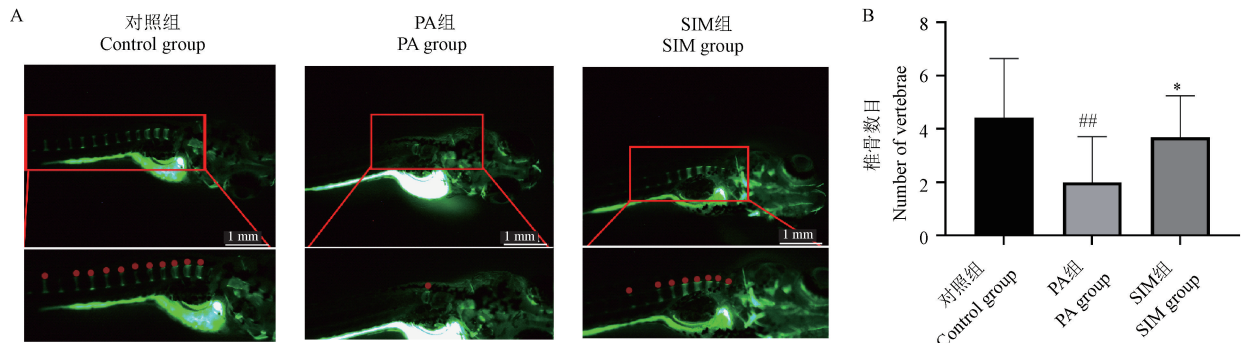
Figure 3 Effects of PA and SIM on triglyceride and total cholesterol contents in zebrafish($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

少(*P* < 0.01),说明 PA 诱导后对斑马鱼骨形成具有显著抑制作用;与 PA 组相比,SIM 组可显著增加斑马鱼椎骨数目(*P* < 0.05)。上述研究表明,PA 可抑制斑马鱼骨形成。

2.5 PA 干预斑马鱼成脂成骨相关基因的表达

q-PCR 对成脂标志基因 PPAR γ 、c/EBP α 以及成骨标志基因 ALP、RUNX2 的表达分析,见图 5。

与对照组相比,PA 显著促进斑马鱼幼鱼 PPAR γ 的表达,抑制 ALP、RUNX2 基因的表达(*P* < 0.05,*P* < 0.01)。与 PA 组相比,SIM 组的 PPAR γ 及 c/EBP α 的表达显著降低,RUNX2 基因表达显著增加(*P* < 0.05,*P* < 0.01)。上述结果表明,PA 引起斑马鱼脂代谢紊乱及骨形成抑制与干预 PPAR γ 、c/EBP α 、ALP、RUNX2 等成脂成骨相关基因的表达有关。

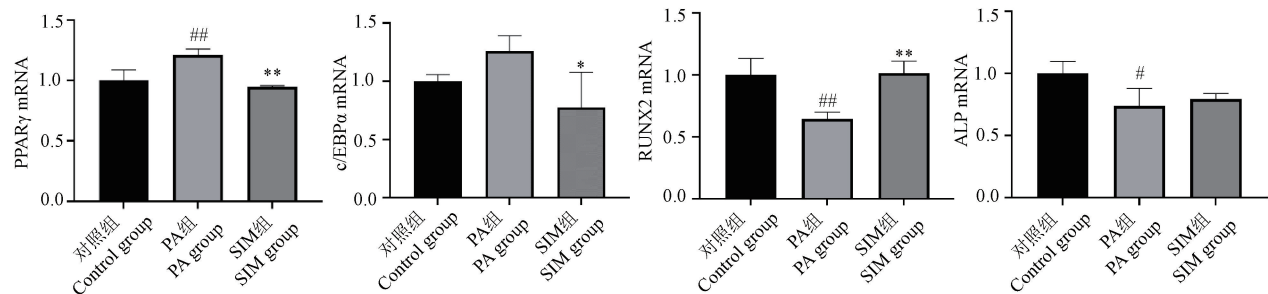


注:A:斑马鱼钙黄绿素染色;B:斑马鱼椎骨数目统计。

图 4 PA 及 SIM 对斑马鱼椎骨形成的影响($\bar{x} \pm s, n \geq 10$)

Note. A. Zebrafish calcein staining results. B. Zebrafish vertebrae number statistics.

Figure 4 Effects of PA and SIM on the vertebrae formation in zebrafish($\bar{x} \pm s, n \geq 10$)



注:与 PA 组相比, ^{**}*P* < 0.01。

图 5 对成骨成脂相关基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with PA group, ^{**}*P* < 0.01。

Figure 5 Expression of genes related to osteogenesis and lipogenesis($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

随着近年来研究的深入,越来越多的研究人员关注到“脂平衡”在 OP 研究中的重要性。脂质代谢紊乱导致血游离脂肪酸(free fat acids, FFAs)增多,当超过脂肪组织贮存能力和各组织对血游离脂肪酸的氧化能力时,高浓度的 FFAs 会破坏细胞酸碱平衡并转化为具有高度生物活性和细胞毒性的脂质。FFAs 可导致细胞功能障碍和细胞死亡的破坏性作用被统称为“脂毒性”^[9]。在 OP 患者骨髓内,骨骼与脂肪的关系体现了脂毒性物质对骨骼的损伤作用^[10-11]。有研究指出,骨中的脂毒性是由骨髓脂肪通过脂蛋白和 FFAs 的分泌施加的^[12]。将脂肪细胞与成骨细胞进行共培养^[13],发现脂肪细胞释放的 FFAs 抑制成骨细胞的增殖和分化,并诱导成骨细胞凋亡。作为最常见的 FFAs,PA 被证明可以促进多种细胞内脂质沉积、ROS 含量增加、促进细胞凋亡^[14-15],已被广泛用于研究脂肪酸对各种类型细胞的影响。有研究用去卵巢加高脂饮食^[16]在大鼠及小鼠上模拟骨质疏松伴脂代谢失常症状,还有报道将 PA 作用于骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)^[17],模拟骨髓脂毒性微环境。斑马鱼在 3 dpf 骨骼开始形成,5 dpf 已有部分骨骼形成。在本实验的周期内,斑马鱼的椎骨生长变化最为明显,且染色后边界清晰。斑马鱼的骨骼发育与人类骨骼发育的分子机制相似,且椎骨生长具有时空的连续性和方向性,易于观察^[6]。椎骨的形成情况在斑马鱼骨质疏松模型中是反映骨形成状况的代表性指标。对斑马鱼椎骨进行钙黄绿素染色,PA 组椎骨数目显著减少,结果表明 PA 会引起斑马鱼骨形成抑制。尼罗红染色及甘油三酯、总胆固醇含量测定的结果表明,PA 会引起斑马鱼脂代谢紊乱。q-PCR 实验表明 PA 引起斑马鱼脂代谢紊乱及骨形成抑制与干预 PPAR γ 、c/EBP α 、ALP、RUNX2 等成脂成骨相关基因的表达有关。上述结果表明,PA 可以诱导斑马鱼形成脂毒性损伤骨形成抑制模型,且该模型简便、灵敏,可用于 OP 及相关疾病的药物筛选。

他汀类药物是最常用的降脂药物,靶向胆固醇合成关键酶 HMG-CoA 还原酶。研究发现,他汀类药物可以通过抑制 BMSCs 成脂分化^[18]促进其成骨分化^[19]、抑制破骨细胞形成^[20]等途径来发挥骨保护作用。临床研究表明,他汀类药物增加骨密度、

减少骨折的作用与改善低密度脂蛋白有关,但其通过改善脂代谢发挥骨保护作用的潜在机制仍待进一步研究^[21]。本研究表明,辛伐他汀对棕榈酸诱导的斑马鱼脂毒性损伤骨形成抑制模型具有改善作用,表明本方法建立的 OP 模型可以被药物调控。

糖皮质激素类诱导斑马鱼骨质疏松模型是目前较为成熟的模型,已被广泛应用于药物活性评价^[22]。铁超载被证明是骨质疏松病理过程中的重要因素,有研究报道,在高铁环境下能成功构建斑马鱼骨质疏松模型^[23],其应用范围仍有待进一步探索。越来越多的证据表明,骨髓脂肪分泌 FFAs 诱导的脂毒性损伤是 OP 形成的关键环节。本研究利用 PA 作为造模药物、建立了一种棕榈酸诱导的脂毒性骨质疏松斑马鱼幼鱼模型。该方法更好地模拟了 OP 状态下的骨髓脂毒性微环境,更加贴近骨质疏松疾病的病理状态,为从脂代谢角度进行 OP 的研究提供了更加可靠、便捷的造模方法,为后期从“脂平衡”的角度入手开展研究,发现新的 OP 防治药物奠定基础。

参 考 文 献(References)

- [1] 白璧辉, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 我国近 5 年来骨质疏松症流行病学研究现状 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(2): 253-258.
BAI B H, XIE X W, LI D P, et al. Epidemiological studies on osteoporosis in the past five years in China [J]. Chin J Osteoporos, 2018, 24(2): 253-258.
- [2] COMPTON J E, MCCLUNG M R, LESLIE W D. Osteoporosis [J]. Lancet, 2019, 393(10169): 364-376.
- [3] LIU C, XIONG Q, LI Q, et al. CHD7 regulates bone-fat balance by suppressing PPAR- γ signaling [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1989.
- [4] PENG H, HU B, XIE L Q, et al. A mechanosensitive lipolytic factor in the bone marrow promotes osteogenesis and lymphopoiesis [J]. Cell Metab, 2022, 34(8): 1168-1182.
- [5] 王晓仪, 王海邴, 刘雨彤, 等. 健脾利湿药治疗骨质疏松症的脂代谢调控相关机制探讨 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(12): 1819-1825.
WANG X Y, WANG H L, LIU Y T, et al. Exploring the mechanisms of spleen-fortifying and dampness-draining medicine in the treatment of osteoporosis from the perspective of the regulation of lipid metabolism [J]. Chin J Osteoporos, 2023, 29(12): 1819-1825.
- [6] TONELLI F, BEK J W, BESIO R, et al. Zebrafish: a resourceful vertebrate model to investigate skeletal disorders [J]. Front Endocrinol, 2020, 11: 489.
- [7] JIANG Z, DENG L, LI M, et al. Ginsenoside Rg1 modulates PI3K/AKT pathway for enhanced osteogenesis via GPER [J]. Phytomedicine, 2024, 124: 155284.

- [8] 郑慧丽, 华永庆, 刘欣慧, 等. 基于斑马鱼模型的枸杞子改善骨质疏松活性部位筛选及其机制初探 [J]. 药学报, 2023, 9(1): 127-138.
- ZHENG H L, HUA Y Q, LIU X H, et al. Screening of active components and preliminary mechanism exploration of Lycii Fructus for improving osteoporosis based on the zebrafish model [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 9(1): 127-138.
- [9] ZECHNER R, MADEO F, KRATKY D. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(11): 671-684.
- [10] TRIPATHI A K, RAI D, KOTHARI P, et al. Benzofuran pyran compound rescues rat and human osteoblast from lipotoxic effect of palmitate by inhibiting lipid biosynthesis and promoting stabilization of RUNX2 [J]. Toxicol In Vitro, 2020, 66: 104872.
- [11] DUQUE G. Bone and fat connection in aging bone [J]. Curr Opin Rheumatol, 2008, 20(4): 429-434.
- [12] SINGH L, TYAGI S, MYERS D, et al. Good, bad, or ugly: the biological roles of bone marrow fat [J]. Curr Osteoporos Rep, 2018, 16(2): 130-137.
- [13] DONG X, BI L, HE S, et al. FFAs-ROS-ERK/P38 pathway plays a key role in adipocyte lipotoxicity on osteoblasts in co-culture [J]. Biochimie, 2014, 101: 123-131.
- [14] ADRIAN L, LENSKEI M, TÖDTER K, et al. AMPK prevents palmitic acid-induced apoptosis and lipid accumulation in cardiomyocytes [J]. Lipids, 2017, 52(9): 737-750.
- [15] KOROVILO I, JUNG T, DEUBEL S, et al. Punicalagin attenuates palmitate-induced lipid droplet content by simultaneously improving autophagy in hepatocytes [J]. Mol Nutr Food Res, 2020, 64(20): e2000816.
- [16] ALI, FIGEAC F, CACI A, et al. High-fat diet-induced obesity augments the deleterious effects of estrogen deficiency on bone: Evidence from ovariectomized mice [J]. Aging Cell, 2022, 21(12): e13726.
- [17] 张元澍, 何旭, 薛源, 等. 鳕尾素缓解棕榈酸对骨髓间充质干细胞的成骨抑制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(1): 26-31.
- ZHANG Y S, HE X, XUE Y, et al. Irisin alleviates palmitic acid-induced osteogenic inhibition in bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(1): 26-31.
- [18] 郭耀. 辛伐他汀抑制骨髓间充质干细胞成脂分化的机制研究 [D]. 太原: 山西医科大学; 2020.
- GUO Y. Mechanism research of simvastatin inhibiting adipogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University; 2020.
- [19] FENG C, XIAO L, YU J C, et al. Simvastatin promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in rat model of osteoporosis through BMP-2/Smads signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(1): 434-443.
- [20] KIM H, OH B, PARK-MIN K H. Regulation of osteoclast differentiation and activity by lipid metabolism [J]. Cells, 2021, 10(1): 89.
- [21] ZHENG J, BRION M J, KEMP J P, et al. The effect of plasma lipids and lipid-lowering interventions on bone mineral density: A mendelian randomization study [J]. J Bone Miner Res, 2020, 35(7): 1224-1235.
- [22] 彭伟, 张文娟, 薛钰. 斑马鱼作为骨骼疾病模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 248-253.
- PENG W, ZHANG W J, XUE Y. Research progress of zebrafish models of bone diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 248-253.
- [23] JIANG Y, CHEN B, YAN Y, et al. Hepeidin protects against iron overload-induced inhibition of bone formation in zebrafish [J]. Fish Physiol Biochem, 2019, 45(1): 365-374.

[收稿日期] 2023-12-19