

S100A10过表达载体构建及其对鹿茸干细胞成骨分化的影响

贾宁¹ 胡鹏飞² 陈维佳¹ 刘洪源¹ 蒋甜甜¹ 何忠梅^{1*} 李春义^{1,2*}

(¹吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; ²长春科技学院鹿茸科学与产品技术研究所, 长春 130600)

摘要 该文旨在构建及鉴定过表达梅花鹿*S100A10*基因的慢病毒载体, 研究*S100A10*对鹿茸储备间充质干细胞(reserve mesenchyme cells, RMCs)成骨分化的影响。利用PCR技术扩增*S100A10*的编码区, 并将其与双酶切后的慢病毒表达载体质粒PCDH连接, 构建过表达*S100A10*的重组质粒。包装病毒, 感染鹿茸RMCs, 用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞感染效率。用碱性磷酸酶(ALP)染色及活性定量检测细胞早期成骨分化水平, 茜素红染色检测细胞晚期成骨分化水平, qRT-PCR检测骨形态发生蛋白-2(*BMP-2*)、Runx相关转录因子2(*Runx2*)、骨钙素(*OCN*)的mRNA表达水平。结果显示, 该研究成功构建了*S100A10*过表达慢病毒载体, 过表达组*S100A10* mRNA及蛋白水平较对照组显著上升($P<0.001$)。与对照组相比, 过表达组的ALP活性, 钙化结节形成量($P<0.01$)以及成骨分化标志基因*BMP-2*、*Runx2*和*OCN*的mRNA水平均显著提高。综上所述, *S100A10*可促进鹿茸RMCs的成骨分化, 这为进一步研究*S100A10*促进鹿茸成骨的机制奠定了基础。

关键词 *S100A10*; 载体构建; 成骨分化; 鹿茸

Construction of *S100A10* Overexpression Vector and Its Effect on Osteogenesis of Antler Stem Cells

JIA Ning¹, HU Pengfei², CHEN Weijia¹, LIU Hongyuan¹, JIANG Tiantian¹, HE Zhongmei^{1*}, LI Chunyi^{1,2*}

(¹College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

²Institute of Antler Science and Product Technology, Changchun Sci-Tech University, Changchun 130600, China)

Abstract The purpose of this study was to construct and identify the lentiviral vector overexpressing sika deer *S100A10* gene, and to study the effect of *S100A10* on osteogenic differentiation of antler RMCs (reserve mesenchyme cells). The coding region of *S100A10* was amplified by PCR and ligated with the lentiviral expression vector plasmid PCDH after double digestion to construct a recombinant plasmid overexpressing *S100A10*. The virus was packaged and infected with antler RMCs. The infection efficiency of the cells was detected by qRT-PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction) and Western blot. ALP (alkaline phosphatase) staining and activity quantification were used to detect the early osteogenic differentiation level of cells. Alizarin red staining was used to detect the late osteogenic differentiation level of cells. The mRNA expression levels of *BMP-2* (bone morphogenetic

收稿日期: 2022-12-18 接受日期: 2023-03-14

吉林省重大科技专项(批准号: 20220304001YY、20220304002YY)、吉林省自然科学基金自由探索重点项目(批准号: YDZJ202101ZYTS102)和国家自然科学基金区域联合基金(批准号: U20A20403)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13331662387, E-mail: heather78@126.com; Tel: 17790067914, E-mail: lichunyi1959@163.com

Received: December 18, 2022 Accepted: March 14, 2023

This work was supported by the Major Science and Technology Projects in Jilin Province (Grant No.20220304001YY, 20220304002YY), the Key Project of Free Exploration of Jilin Natural Science Foundation (Grant No.YDZJ202101ZYTS102), and the Regional Joint Fund of National Natural Science Foundation of China (Grant No.U20A20403)

*Corresponding authors. Tel: +86-13331662387, E-mail: heather78@126.com; Tel: +86-17790067914, E-mail: lichunyi1959@163.com

protein-2), *Runx2* (Runt-related transcription factor 2) and *OCN* (osteocalcin) were detected by qRT-PCR. The results showed that the *S100A10* overexpression lentiviral vector was successfully constructed, and the mRNA and protein levels of S100A10 in the overexpression group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.001$). Compared with the control group, the ALP activity, the formation of calcified nodules ($P < 0.01$) and the mRNA levels of osteogenic differentiation marker genes *BMP-2*, *Runx2* and *OCN* in the overexpression group were significantly increased. In summary, *S100A10* can promote the osteogenic differentiation of antler RMCs, which lays a foundation for further study on the mechanism of *S100A10* promoting antler osteogenesis.

Keywords S100A10; vector construction; osteogenic differentiation; deer antler

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨量减少、骨微结构破坏、骨脆性增加、易发生骨折为特征的全身性骨病^[1]。OP的治疗不仅需要抑制骨吸收,还需要促进骨形成^[2]。鹿茸骨组织可周期性完全再生,且生长速度极快,平均可达1.2 cm/d^[3],是研究哺乳动物骨质疏松的理想模型。储备间充质干细胞(reserve mesenchyme cells, RMCs)是鹿茸间充质组织中的一种干细胞,具有间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的特性^[4],能够在体外进行成骨分化^[5],是促进鹿茸骨组织快速再生的关键细胞^[6-7]。因此,调控鹿茸RMCs的成骨分化对骨质疏松的逆转具有重要意义。

S100钙结合蛋白A10(S100 calcium binding protein A10, S100A10),是S100家族中独特的成员,具有钙结合蛋白突变位点,对钙离子不敏感,一直处于活跃状态,广泛参与细胞内外过程^[8]。S100A10被鉴定为骨矿化相关蛋白^[9],其表达量增加可增强骨髓间充质干细胞的成骨作用,提高细胞矿化水平^[10]。同时S100A10也参与类风湿关节炎^[11]和骨关节炎^[12]等一些骨病的发生发展。值得注意的是,SHARMA等^[13]的一项研究将*S100A10*确定为鹿茸独特表达的成骨基因,其表达水平随鹿茸细胞分化进程的推进而上调,提示*S100A10*可能在鹿茸细胞分化过程中发挥一定作用。

因此,为明确*S100A10*对鹿茸干细胞成骨矿化的具体影响,本研究构建*S100A10*过表达载体,并用重组慢病毒载体感染鹿茸的RMCs,观察*S100A10*对RMCs成骨分化的影响。这为有效治疗和逆转人类OP提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RMCs、人胚肾细胞293T细胞、梅花鹿茸角间充质层cDNA由吉林省鹿茸生物学重点实验室保

存。载体质粒PCDH、包膜质粒pMD2.G、包装质粒pSPAX2、碱性磷酸酶检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;感受态细胞TransStbl3购自北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶*EcoR* I、*Bam*H I购自美国NEB公司;无内毒素质粒大提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;DMEM培养基、标准胎牛血清购自美国Gibco公司;荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;*S100A10*、 β -actin、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, *BMP-2*)、Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, *Runx2*)、骨钙素(osteocalcin, *OCN*)引物由上海生工生物科技有限公司合成;地塞米松、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸购自上海麦克林生化科技股份有限公司;氨苄青霉素、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)显色试剂盒、茜素红S染色液购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗S100A10抗体、兔抗GAPDH抗体、HRP标记的羊抗兔二抗购自美国Proteintech公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取冻存细胞,复苏后接种至含有10%胎牛血清和1%双抗(10 000 U/mL青霉素和10 000 μ g/mL链霉素)的DMEM培养基中,并置于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中培养,每2~3天进行传代。用50 mg/L抗坏血酸、10 nmol/L地塞米松和10 mmol/L β -甘油磷酸钠进行成骨诱导培养,每2~3天更换新的成骨诱导培养液,在显微镜下观察RMCs形态变化。

1.2.2 引物设计与*S100A10*基因片段获取 根据已公布的梅花鹿基因组序列(检索号: GWHA-NOY00000000, <https://ngdc.cnpc.ac.cn/gwh>),设计扩增*S100A10*的引物F: 5'-ATG CCG TCT CAA ATG GAA CA-3', R: 5'-CTA CTT CTT CCC CTT CTG CT-3';以梅花鹿茸角间充质层cDNA为模板,配制PCR反应体系: 5 μ L 10 $\times$ buffer, 4 μ L dNTP, 上、下游引物各2 μ L, 36 μ L

ddH₂O, 0.5 μL cDNA模板, 0.5 μL Ex-Taq。反应条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共30个循环; 最后72 °C延伸10 min, 4 °C保存。取5 μL扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。设计*S100A10*重组PCR引物, 在上下游加入载体同源序列及*EcoR* I、*Bam*H I酶切位点(单下划线部分), 引物F: 5'-ATT CTA GAG CTA GCG AAT TCA TGC CGT CTC AAA TGG AAC A-3', R: 5'-TCC TTC GCG GCC GCG GAT CCC TAC TTC TTC CCC TTC TGC T-3', 以前述目的片段为模板再次扩增, 反应条件同上。用Thermo Fisher PCR产物纯化试剂盒纯化扩增产物, 紫外分光光度法测定DNA浓度, -20 °C保存。

1.2.3 重组慢病毒载体的构建与鉴定 取1 μg载体质粒、1 μL *EcoR* I、1 μL *Bam*H I、5 μL CutSmart Buffer, DEPC水补足至50 μL, 37 °C水浴1 h, 然后65 °C热失活20 min, 得到线性化载体, 进行载体纯化。将纯化后的线性化载体与*S100A10*基因片段按照同源重组反应体系进行连接: 4 μL Hi-Fusion Cloning Mix、100 ng线性化载体、200 ng插入片段, ddH₂O补足至20 μL, 混匀后50 °C水浴30 min。将连接产物转化至TransStbl3, 接种至含氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)的LB固体培养基中, 37 °C倒置培养过夜, 挑取单个阳性菌落摇菌, 取1 mL菌液测序。将阳性菌液扩大化培养, 按照无内毒素质粒大提试剂盒说明书提取质粒。构建过表达*S100A10*的慢病毒载体。

1.2.4 重组慢病毒包装 将已构建的过表达载体命名为PCDH-S100A10, 以PCDH空质粒为阴性对照组(NC)。待293T细胞融合度达到70%左右时, 使用PEI转染试剂, 按照PCDH-S100A10/NC:psPAX2:PMD2.

G=10 μg:5 μg:7.5 μg的比例, 将载体质粒与辅助质粒共转染至293T细胞, 放置于培养箱中, 6 h后更换新鲜完全培养基。在倒置荧光显微镜下观察荧光蛋白GFP的表达情况以确定转染效率。分别于48 h和72 h后分2次收集病毒上清液, 将2次上清液合并, 1 000 r/min、4 °C离心5 min去除细胞碎片, 然后用0.45 μm滤膜过滤, 最后用超滤管浓缩, -80 °C保存备用。

1.2.5 过表达S100A10细胞系的建立 取对数生长期的RMCs, 接种至25 cm²细胞培养瓶中, 待细胞融合度达到70%时, 吸弃原培养基, 加入含1 mL浓缩病毒液及5 μL polybrene助转剂的完全培养基, 12 h后更换新鲜培养基, 48 h后加入终浓度为4 μg/mL的嘌呤霉素, 筛选培养2~3天, 观察细胞状态以及RMCs荧光蛋白GFP的表达情况。对嘌呤素筛选后的细胞继续扩增培养, 获得的稳转细胞系用于后续实验。通过qRT-PCR和Western blot技术分别检测两组细胞中的*S100A10* mRNA和蛋白表达水平, 确认感染效果并为后续实验建立模型。

1.2.6 qRT-PCR 用Trizol法从过表达组和NC组的RMCs中提取总RNA, 并测定RNA浓度和纯度, 然后利用TaKaRa反转录试剂盒将其反转录为cDNA, 进行扩增: 10 μL 2× SYBR Green Master Mix, 1 μL cDNA模板, 上、下游引物各0.5 μL, 8 μL DEPC水。反应条件: 95 °C预变性2 min; 95 °C变性10 s, 60 °C退火10 s, 72 °C延伸15 s, 共40个循环; 最后72 °C延伸16 s, 4 °C保存。*β-actin*作为内参基因, 引物序列见表1, 每组实验设3个重复, 采用2^{-ΔΔCt}法进行数据分析。

1.2.7 Western blot 使用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取两组细胞的总蛋白,

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'→3')
Gene name	Primer sequence (5'→3')
<i>S100A10</i>	Forward: CGT CTC AAA TGG AAC ACG CC Reverse: GCC CAG CGA TTA GCG AAA AG
<i>BMP-2</i>	Forward: CGG AAA CAT ATG CCC GAA GC Reverse: CCT GGT GCA AAG ACC TGC TA
<i>Runx2</i>	Forward: TCA AGG TGG TAG CTC TCG GA Reverse: AAC AGC AGA GGC ATT TCG GA
<i>OCN</i>	Forward: CAG ATG CAA AGC CCG GTG AT Reverse: TCA GCT AGC TCG TCA CAG TC
<i>β-actin</i>	Forward: CAC CGC AAC CAG TTC ACC A Reverse: GAT GCC ATG CTC GAT AGG GT

BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度。将样品与蛋白质上样缓冲液混匀,煮沸10 min。120 V恒压下凝胶电泳分离,然后200 mA恒流转膜,5%脱脂奶粉4 °C封闭过夜,一抗(稀释比例为1:1 000)室温孵育3 h,二抗(稀释比例为1:2 000)室温孵育1 h, TBST洗膜3次,最后用化学发光法显影。

1.2.8 碱性磷酸酶活性测定与染色 RMCs成骨诱导分化14天后,移除6孔板中的培养基,用PBS洗涤2次,随后每孔加入500 μ L 4%多聚甲醛固定液,于室温固定30 min,移除固定液,蒸馏水洗涤2次后,参照碱性磷酸酶染色试剂说明书进行避光染色30 min,蒸馏水洗涤2次,在显微镜下观察拍照。根据试剂盒说明书进行ALP活性测定,实验重复3次,最后按照ALP酶活性的定义,计算ALP活性。

1.2.9 茜素红染色及定量分析 RMCs成骨诱导21天后,移除6孔板中的培养基,用PBS洗2次,随后用4%多聚甲醛固定液固定15 min,弃去固定液,用ddH₂O洗3次,将固定液完全洗干净后慢慢加入茜素红S染色液,室温染色30 min。弃去染料,用ddH₂O洗3~5次,在显微镜下观察钙结节的形成情况。之后用10%十六烷基吡啶溶液溶解钙结节,将上清液转移至96孔板中,测定450 nm波长处的吸光度(D)值,将所得结果(D值)用于茜素红定量分析。

1.3 统计分析

每组实验独立重复3次,应用GrapPad Prism 9.0软件作图,结果以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示,组间两两比较采用 t 检验,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 S100A10目的基因的扩增

以鹿茸间充质组织的cDNA为模板,进行PCR扩增获得S100A10基因序列,然后进行琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,在294 bp左右的位置出现特异性条带,这与预期结果一致,说明成功获得目的基因(图1)。

2.2 测序鉴定重组慢病毒载体

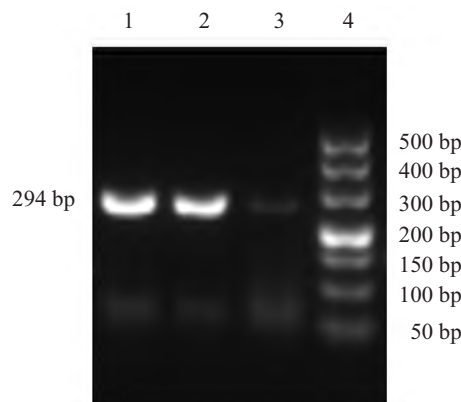
S100A10过表达慢病毒载体PCDH-CMV的结构图谱见图2A。将连接产物转化至TransStbl3感受态细胞,菌液涂布至固体平板上,挑取单个菌落,振荡培养,取适量菌液进行测序(图2B)。通过序列比对,发现测序结果与目的序列一致,这表明成功将S100A10片段插入PCDH载体,载体构建成功。

2.3 重组慢病毒包装

将过表达载体和空载体,与包膜质粒psPAX2、包装质粒PMD2.G共转染至293T细胞中,72 h后在荧光显微镜下观察荧光蛋白GFP的表达情况(图3)。在PCDH-S100A10组及NC组中绿色荧光分布均匀,且细胞生长旺盛、排列紧密,显示已成功完成载体的慢病毒包装。

2.4 过表达慢病毒感染RMCs并检测感染效率

用过滤和浓缩后的重组慢病毒感染RMCs,然后进行嘌呤霉素筛选,2~3天后观察荧光情况。发现S100A10过表达组和NC对照组的RMCs生长状况良好,同时细胞内呈现绿色荧光且荧光均匀分布于视野中(图4A)。进一步用qRT-PCR及Western blot检测两组细胞中的S100A10表达量,结果显示过表达组S100A10的蛋白水平明显提高(图4B),且mRNA水平

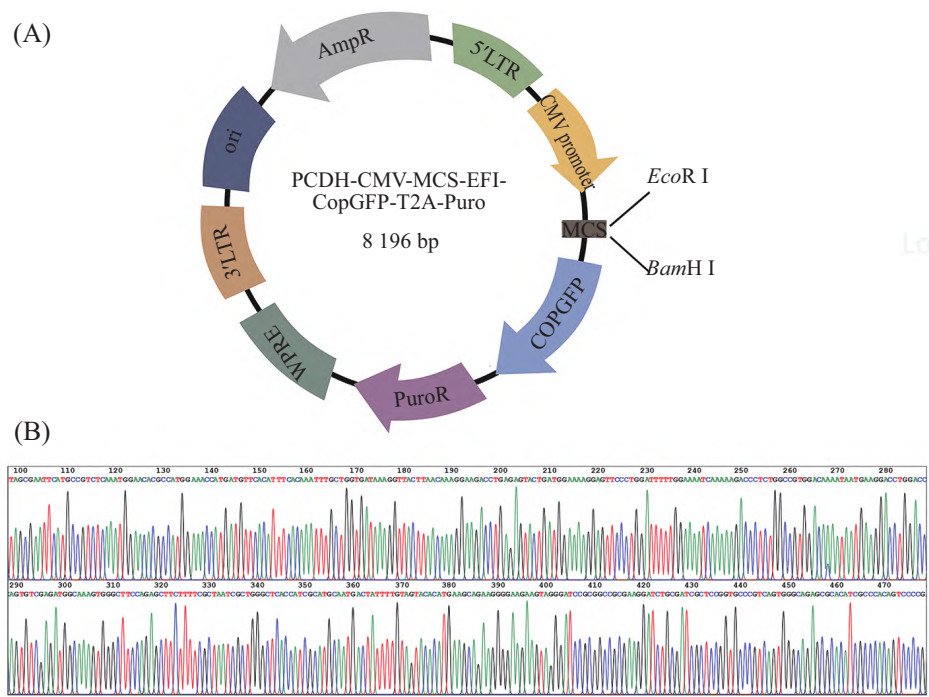


1~3: PCR产物条带; 4: DNA Marker DL500。

1-3: PCR product bands; 4: DNA Marker DL500.

图1 PCR产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis of PCR products



A: *S100A10*过表达慢病毒PCDH-CMV载体; B: *S100A10*过表达载体测序结果。
A: *S100A10* overexpression lentivirus PCDH-CMV vector; B: sequencing results of *S100A10* overexpression vector.
图2 *S100A10*过表达重组质粒测序图谱
Fig.2 *S100A10* overexpression recombinant plasmid sequencing map

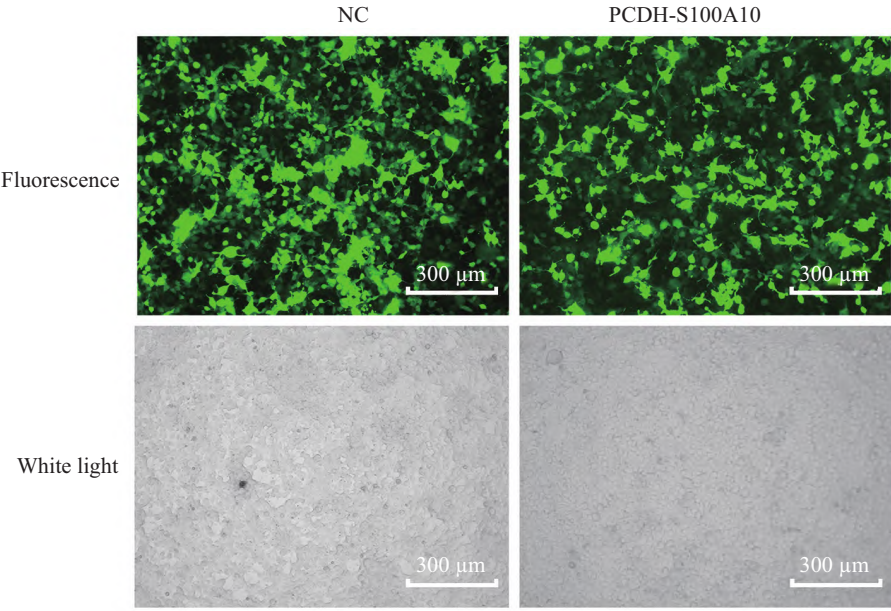


图3 慢病毒感染293T细胞荧光结果
Fig.3 Fluorescence results of 293T cells infected by lentivirus

显著升高($P<0.001$, 图4C)。以上结果表明成功获得稳转细胞系。

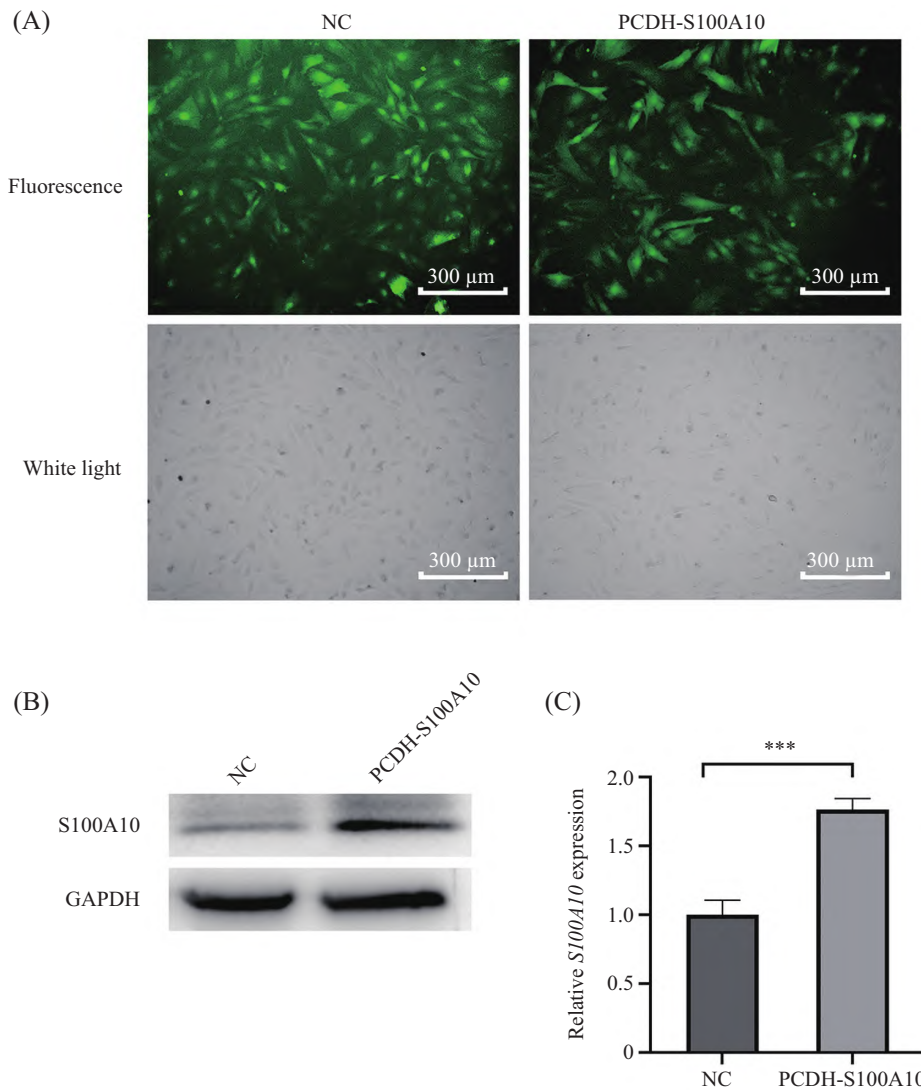
2.5 *S100A10*过表达促进RMCs成骨相关基因表达

取两组RMCs培养48 h后, qRT-PCR检测*S100A10*基因表达量增加对细胞内成骨相关基因表达水平的

影响(图5), 与对照组相比, 过表达组*BMP-2*、*Runx2*、*OCN*的mRNA相对表达量均显著提高。

2.6 *S100A10*促进RMCs的成骨分化

细胞成骨诱导第14天, 进行ALP染色(图6A)及ALP活性定量分析(图6B)以检测细胞早期成骨能力, 结果



A: 慢病毒感染RMCs的荧光结果; B: Western blot检测S100A10蛋白的表达量; C: qRT-PCR检测S100A10 mRNA的表达量; *** $P<0.001$ 。

A: fluorescence results of RMCs infected by lentivirus; B: detection of S100A10 protein expression by Western blot; C: detection of S100A10 mRNA expression by qRT-PCR; *** $P<0.001$.

图4 S100A10过表达细胞系的建立

Fig.4 Establishment of S100A10 overexpression cell line

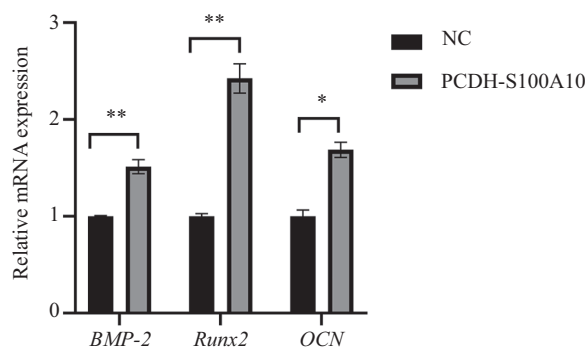
显示S100A10过表达组碱性磷酸酶染色呈强阳性,且ALP活性显著高于NC组($P<0.01$)。同时细胞诱导第21天,进行茜素红S染色(图6C)以及定量分析(图6D),发现S100A10过表达组的钙化结节形成量较NC组显著增加($P<0.01$)。

3 讨论

OP的发病机制主要是由于骨吸收大于骨形成,导致骨代谢失衡^[14]。而鹿茸组织也是在抑制破骨和促进成骨两个方面的联合作用下实现骨质疏松逆转,此外,RMCs的快速分裂分化,导致鹿茸具有前所未有的生长速度。基于鹿茸这一生物学特性,本研

究构建了S100A10过表达慢病毒载体,并用重组慢病毒感染RMCs,进一步观察了细胞成骨能力的变化。

慢病毒载体是一种逆转录病毒载体,通过逆转录过程将目的基因整合到宿主基因组中并使其长期表达^[15]。相比于物理瞬时转染方法,慢病毒表达的外源基因更持久且稳定。之前的研究由于电穿孔介导的瞬时转染不成功,改用小鼠间充质干细胞代替人骨髓间充质干细胞^[13],本研究构建S100A10过表达慢病毒载体,并用重组慢病毒感染RMCs,qRT-PCR和Western blot以及荧光显微镜观察均证实获得有效感染,与NC组相比过表达组中S100A10显著高表达。以上结果表明,成功构建了S100A10过表达慢病毒载

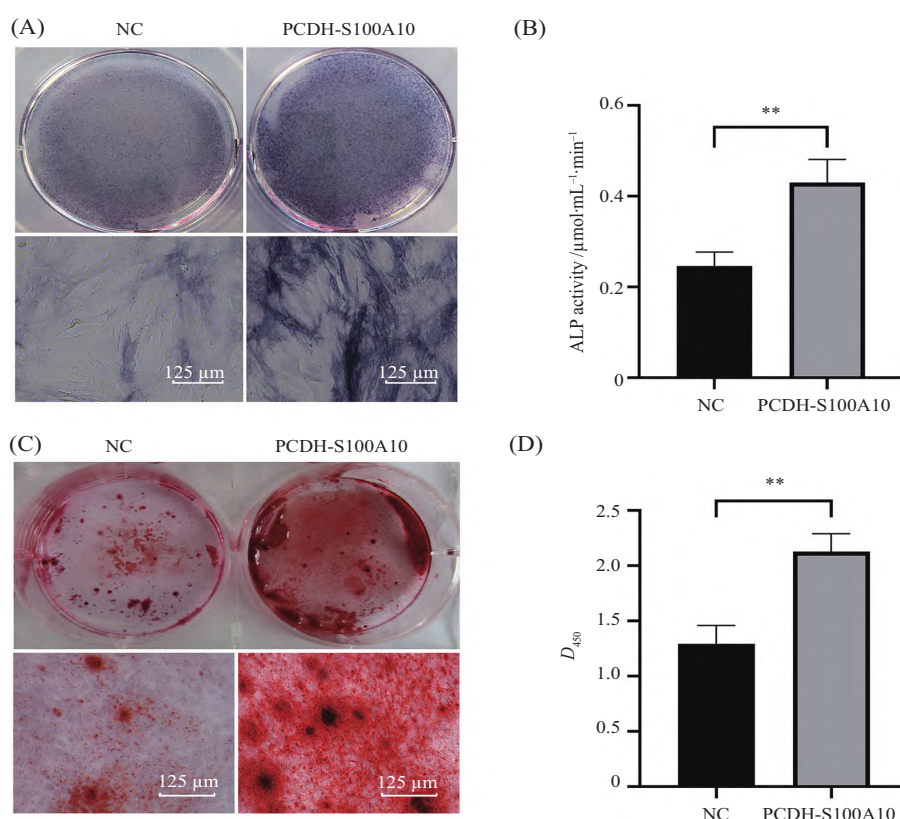


qRT-PCR检测成骨相关基因BMP-2、Runx2、OCN的表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

qRT-PCR detection of the expression levels of osteogenic genes BMP-2, Runx2 and OCN. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 *S100A10*过表达促进RMCs成骨相关基因表达

Fig.5 Overexpression of *S100A10* promotes osteogenic gene expression in RMCs



A: 成骨诱导14天后进行ALP染色; B: 成骨诱导14天后进行ALP活性检测; C: 成骨诱导21天后进行茜素红染色; D: 茜素红染色结果的定量分析。 ** $P < 0.01$ 。

A: ALP staining after osteogenic induction for 14 days; B: detection of ALP activity after 14 days of osteogenic induction; C: alizarin red staining after 21 days of osteogenic induction; D: quantitative analysis of alizarin red staining. ** $P < 0.01$.

图6 *S100A10*对RMCs成骨分化的影响

Fig.6 Effect of *S100A10* on osteogenic differentiation of RMCs

体, 且*S100A10*在RMCs内稳定高效表达, 为后期研究*S100A10*基因在鹿茸细胞中的作用奠定了基础。

*S100A10*作为骨相关基因, 在成骨矿化相关领域展现出巨大潜力。MORI等^[16]研究发现*S100A10*与*S100A1*和*S100B*的功效相似, 都能够抑制小鼠软骨

细胞的肥大分化, 并促进小鼠骨骼发育过程中的软骨内骨化; WANG等^[17]发现在体外成骨诱导条件下, *S100A10*可发挥钙沉积作用, 从而提高人牙周韧带干细胞的矿化能力; 而SHARMA等^[13]发现*S100A10*是鹿茸细胞矿化的独特新基因, 但*S100A10*对鹿茸细胞成

骨矿化的具体影响目前尚不清楚,本研究在此基础上进行了更深入的分析。

在本研究中,我们首先检测了RMCs成骨分化14天后的ALP活性,并通过ALP和茜素红染色验证细胞分化程度。结果显示,与NC组相比,*S100A10*过表达组的ALP活性显著升高,且矿化结节形成量明显增加,这一结果与之前BROWE等^[10]关于*S100A10*剂量增加可促进干细胞成骨矿化的研究结果相吻合。以上结果初步表明,*S100A10*在RMCs成骨分化中具有重要作用。然后我们检测了成骨分化标志基因*BMP-2*、*Runx2*和*OCN*的mRNA表达量变化,结果显示这些基因的mRNA水平均显著上升,提示*S100A10*可能通过促进成骨分化相关基因表达进而促进RMCs成骨分化。*Runx2*、*OCN*是BMP通路表达的特异性成骨因子^[18],而BMP-2是BMP家族中具有很强的成骨和软骨再生潜力的成员,可有效治疗骨缺损^[19],*Runx2*又被鉴定为BMP-2诱导成骨分化作用的靶基因^[20]。因此推断*S100A10*也可能通过影响BMP通路而发挥成骨作用,或者通过影响BMP-2的表达,进而诱导*Runx2*靶基因及相关同源蛋白共同促进RMCs成骨分化。

综上所述,本研究在细胞水平探讨了*S100A10*对鹿茸干细胞成骨分化的影响,发现*S100A10*可正向调控RMCs成骨分化,为有效治疗和逆转人类OP提供了新的思路。但其发挥作用的调控靶点以及所参与的信号通路还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] 葛继荣, 王和鸣, 郑洪新, 等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2020)[J]. 中国骨质疏松杂志(GE J R, WANG H M, ZHENG H X, et al. Traditional Chinese medicine expert consensus on the prevention and treatment of primary osteoporosis, 2020 [J]. Chinese Journal of Osteoporosis), 2020, 26(12): 1717-25.
- [2] MCCONNELL M, SHIEH A. Polypharmacy in osteoporosis treatment [J]. Clin Geriatr Med, 2022, 38(4): 715-26.
- [3] HU P F, WANG Z, LI J P, et al. IGF1R and lox modules are related to antler growth rate revealed by integrated analyses of genomics and transcriptomics [J]. Animals, 2022, 12(12): 1522-34.
- [4] ZHANG W, KE C H, GUO H H, et al. Antler stem cells and their potential in wound healing and bone regeneration [J]. World J Stem Cells, 2021, 13(8): 1049-57.
- [5] WANG D T, BERG D, BA H X, et al. Deer antler stem cells are a novel type of cells that sustain full regeneration of a mammalian organ-deer antler [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 443-55.
- [6] LIN H B, CHEN Z, GUO Q Q, et al. Deer antler reserve mesenchyme cell-conditioned medium reduces the destruction of periodontitis in mice [J]. Stem Cells Dev, 2022, 31(23/24): 766-76.
- [7] LI C Y, CLARK D E, LORD E A, et al. Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery [J]. Anat Rec, 2002, 268(2): 125-30.
- [8] GŁOWACKA A, BIEGANOWSKI P, JUREWICZ E, et al. Regulation of S100A10 gene expression [J]. Biomolecules, 2021, 11(7): 974-82.
- [9] LI H, LI J, JIANG J, et al. An osteogenesis/angiogenesis-stimulation artificial ligament for anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Acta Biomater, 2017, 54: 399-410.
- [10] DÍAZ-PAYNO P J, BROWE D C, CUNNIFFE G M, et al. The identification of articular cartilage and growth plate extracellular matrix-specific proteins supportive of either osteogenesis or stable chondrogenesis of stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 528(2): 285-91.
- [11] 柏干苹, 周丽娜, 贺伟峰, 等. S100A4, A10在类风湿关节炎滑膜成纤维细胞中的表达及意义[J]. 第四军医大学学报(BAI G P, ZHOU L N, HE W F, et al. Expressions and significance of S100A4 and S100A10 in synovial fibroblasts obtained from rheumatoid arthritis patients [J]. J Fourth Mil Med Univ), 2008(7): 645-9.
- [12] PEFFERS M, RIGGS C, MCDERMOTT B, et al. Comprehensive protein profiling of synovial fluid in osteoarthritis following protein equalization [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(7): 1204-13.
- [13] KER D F E, WANG D, SHARMA R, et al. Identifying deer antler uhrfl proliferation and s100a10 mineralization genes using comparative RNA-seq [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 292-306.
- [14] YANG W, WANG W. Research progress of partial signaling pathways in the pathogenesis of osteoporosis [J]. Journal of Contemporary Medical Practice, 2022, 4(8): 39-41.
- [15] MARTÍNEZ-MOLINA E, CHOCARRO-WRONA C, MARTÍNEZ-MORENO D, et al. Large-scale production of lentiviral vectors: current perspectives and challenges [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(11): 1051-70.
- [16] MORI Y, MORI D, CHUNG U I, et al. S100A1 and S100B are dispensable for endochondral ossification during skeletal development [J]. Biomed Res, 2014, 35(4): 243-50.
- [17] WANG H, MA D, ZHANG X, et al. Comparative proteomic profiling of human dental pulp stem cells and periodontal ligament stem cells under *in vitro* osteogenic induction [J]. Arch Oral Biol, 2018, 89: 9-19.
- [18] LOWERY J W, ROSEN V. The BMP pathway and its inhibitors in the skeleton [J]. Physiol Rev, 2018, 98(4): 2431-52.
- [19] LI Y, FU G, GONG Y, et al. BMP-2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by enhancing mitochondrial activity [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2022, 22(1): 123-31.
- [20] HUANG H, DOU L, SONG J, et al. CBFA2T2 is required for BMP-2 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(4): 1095-101.