

Ghrelin联合三氧化二砷对骨髓间充质干细胞增殖与成骨分化的影响

周刘涛 朱雪敏 邓雯*

(河南科技大学动物科技学院, 洛阳 471003)

摘要 该文主要探究Ghrelin对三氧化二砷(As_2O_3)导致的骨髓间充质干细胞(BMSCs)增殖和成骨分化的影响。BMSCs设为对照组、 As_2O_3 组、Ghrelin组和联合(As_2O_3 +Ghrelin)组。MTT法检测细胞增殖能力;成骨诱导的第7天和第14天, Real-time PCR及Western blot分别检测成骨相关因子OPN、ALP、RUNX2的mRNA及蛋白表达;第21天,茜素红染色分析钙盐沉积情况。结果显示,细胞增殖能力Ghrelin组>对照组>联合组> As_2O_3 组。与对照组比, As_2O_3 组各因子表达均显著下调($P<0.05$), Ghrelin组第14天OPN蛋白表达无显著变化,其余因子均上调($P<0.05$);联合组与 As_2O_3 组比,第14天OPN基因表达和第7天ALP蛋白表达无显著差异,其余均显著上调($P<0.05$)。钙盐沉积: Ghrelin组>对照组>联合组> As_2O_3 组。提示0.5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 抑制BMSCs增殖和成骨分化,600 ng/mL Ghrelin增强细胞增殖和成骨分化;且Ghrelin能减弱 As_2O_3 导致的BMSCs增殖和成骨分化抑制作用。

关键词 骨髓间充质干细胞; Ghrelin; 三氧化二砷; 增殖; 成骨分化

Effects of Combination of Ghrelin and Arsenic Trioxide on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells

ZHOU Liutao, ZHU Xuemin, DENG Wen*

(Henan University of Science and Technology, College of Animal Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract This work was to investigate the effects of Ghrelin on proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs (bone marrow mesenchymal stem cells) induced by As_2O_3 (arsenic trioxide). BMSCs were divided into four groups: control group, As_2O_3 group, Ghrelin group and As_2O_3 +Ghrelin group. MTT assay was used to detect cell proliferation. Real-time PCR and Western blot were used to detect the levels of OPN, ALP and RUNX2 mRNA and protein in BMSCs of different induction groups at day 7, 14 of osteogenesis induction. Alizarin red staining was used to analyze the calcium salt deposition of cells in different induction groups at day 21 of osteogenesis induction. The results showed that the cell proliferation ability of Ghrelin group>control group>combined group> As_2O_3 group. Compared with the control group, As_2O_3 group significantly decreased the mRNA and protein expression of osteogenesis-related factors OPN, ALP and RUNX2 ($P<0.05$). There was no significant change in OPN protein ex-

收稿日期: 2019-08-12 接受日期: 2019-11-25

国家自然科学基金(批准号: 31402153)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13673908786, E-mail: wen.dkj@163.com

Received: August 12, 2019 Accepted: November 25, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31402153)

*Corresponding author. Tel: +86-13673908786, E-mail: wen.dkj@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5178>

pression on the 14th day in Ghrelin group, and the other factors were up-regulated ($P<0.05$). Compared with As_2O_3 group, the expression of 14th day of *OPN* and 7th day of *ALP* in the combined group had no significant difference, and the other factors were up-regulated ($P<0.05$). Calcium deposition: Ghrelin group>control group>combined group> As_2O_3 group. The results showed that $0.5 \mu\text{mol/L } As_2O_3$ could inhibit the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs, while $600 \text{ ng/mL Ghrelin}$ could promote the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs. And Ghrelin could weaken the inhibition of proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs induced by As_2O_3 to some extent.

Keywords BMSCs; Ghrelin; As_2O_3 ; proliferation; osteogenic differentiation

三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)是砒霜的主要成分,环境中砷污染主要来源于含砷的工业废水、废气、废渣的排放以及高砷煤矿废水灌溉。自然环境中排放的砷污染了土壤和地下水,进而造成庄稼和饮用水的污染,砷相关疾病因受砷的污染而普遍存在^[1]。骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)分布在骨髓中,具有较强的自我更新潜能,可分化为成骨细胞、成纤维细胞、软骨细胞、脂肪细胞和心肌细胞等多种细胞类型, BMSCs潜在的多向分化能力使其成为组织修复、免疫调节和细胞治疗的优良材料^[2]。研究发现,砷暴露不仅导致骨骼中的磷被砷所取代,而且还抑制BMSCs的增殖能力和成骨分化能力,增加骨疾病的发病率^[3]。Ghrelin是一种脑肠肽,由28个氨基酸残基组成,主要由胃产生,在肠、胰腺、脑垂体、肾脏和胎盘中也有少量分泌^[4]。Ghrelin的生理功能众多,有促进生长激素的分泌、刺激食欲、调节能量代谢、调控细胞增殖和免疫抗炎等功能^[5]。研究发现, Ghrelin对于细胞增殖以及成骨分化具有一定的促进作用^[6-7]。因此,本研究通过Ghrelin联合砷作用于绵羊BMSCs,进而分析Ghrelin对 As_2O_3 导致的BMSCs增殖能力和成骨分化能力的影响,为砷污染引起的骨疾病治疗研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 绵羊BMSCs来源于河南科技大学动物科技学院实验中心,细胞分离培养及鉴定方法参照文献[8]描述。

1.1.2 主要试剂 完全培养液(89% DMEM/F12+10%胎牛血清+1%青/链霉素)、0.25%胰酶消化液、成骨诱导培养液(DMEM/F12+10%胎牛血清+10 mmol/L β -甘油磷酸钠+20 nmol/L地塞米松+50 $\mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸)、

茜素红染液购自赛默飞世尔科技有限公司); As_2O_3 购自中国医药集团有限公司; Ghrelin购自西格玛奥德里奇贸易有限公司; MTT试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 反转录试剂盒、Real-time PCR试剂盒、蛋白质提取和Western blot检测试剂购自上海生物工程有限公司; RUNX2抗体、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)抗体、ALP抗体、 β -actin抗体、HRP标记羊抗兔IgG二抗购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 绵羊BMSCs的复苏及培养 从液氮中取出冻存的第2代绵羊BMSCs,置 37°C 水浴中迅速溶解,溶解的细胞悬液,用 4°C 预冷的10%胎牛血清DMEM/F12溶液进行10倍稀释,1 500 r/min离心5 min,弃上清,加入适量完全培养基,轻吹混匀,接种到细胞培养瓶, 37°C 、5% CO_2 条件下培养,待细胞生长至80%左右,0.25%胰酶消化液消化接种,分组实验。

1.2.2 MTT法测定细胞增殖能力 将第3代绵羊BMSCs以 5×10^4 个/mL的密度接种到96孔板上,分为4组,每组21孔。经查阅文献及预实验,确定Ghrelin和 As_2O_3 的最佳作用浓度^[3,9],分别按照对照组(完全培养液)、Ghrelin组(600 ng/mL Ghrelin+完全培养液)、 As_2O_3 组(0.5 $\mu\text{mol/L } As_2O_3$ +完全培养液)、联合组(600 ng/mL Ghrelin+0.5 $\mu\text{mol/L } As_2O_3$ +完全培养液)培养细胞,每3天换液一次,共培养7天。每天每组选择3个复孔,测定在490 nm下的吸光度(D)值,取吸光度值均数作为结果,实验重复3次。

1.2.3 成骨诱导分化 将第3代绵羊BMSCs按照 5×10^4 个细胞/mL的密度接种于6孔板,分为4组,每组15孔(3个培养板)。当细胞达60%融合时,按照对照组(成骨诱导培养液)、Ghrelin组(600 ng/mL Ghrelin+成骨诱导培养液)、 As_2O_3 组(0.5 $\mu\text{mol/L } As_2O_3$ +成骨诱导培养液)、联合组(600 ng/mL Ghrelin+0.5 $\mu\text{mol/L } As_2O_3$ +成骨诱导培养液)进行成骨诱

导,每3天换液一次,共诱导21天。

1.2.4 Real-time PCR 根据NCBI公布的基因(*RUNX2*、*OPN*、*ALP*、 *β -actin*) mRNA序列设计*RUNX2*、*OPN*、*ALP*、 *β -actin*的特异性引物,引物序列见表1,由上海生物工程有限公司合成。采用Trizol法提取成骨诱导第7天和第14天每组3孔细胞的RNA,测定RNA质量和浓度,质量合格的样品进行反转录反应,Real-time PCR测定成骨相关因子*RUNX2*、*OPN*、*ALP*、 *β -actin*的表达情况, *β -actin*作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.2.5 Western blot 用RIPA裂解液提取成骨诱导第7天和第14天每组3孔细胞的总蛋白,经95 °C变性5 min后,取30 μ g蛋白样品经10%的SDS-PAGE电泳分离,然后转移到PVDF膜上。脱脂奶粉于37 °C摇床封闭3 h后,4 °C一抗孵育过夜,然后用HRP标记的二抗,室温孵育1 h, ECL化学发光检测蛋白条带, *β -actin*作为内参。

1.2.6 茜素红染色 成骨诱导的第21天,用茜素红染色观察各组细胞钙盐沉积情况,并对红染面积分

数进行分析。

1.2.7 统计分析 使用GraphPad Prism 6和ImageJ对数据进行分析,实验数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间数据比较采用单因素方差分析。当 $P<0.05$,差异显著。

2 结果

2.1 Ghrelin联合三氧化二砷对BMSCs增殖能力的影响

MTT实验结果发现,与对照组相比,As₂O₃组在第1天的吸光度值无显著差异,而第2、3、4、5、6、7天的吸光度值均显著下降($P<0.05$); Ghrelin组在第1、5、6、7天的吸光度值无显著差异,而第2、3、4天的吸光度值显著升高($P<0.05$); 联合组在第1、2、3、7天的吸光度值无显著差异,而第4、5、6天的吸光度值均显著下降($P<0.05$)(表2)。与As₂O₃组比较,联合组在第1、2天的吸光度值无显著差异,而第3、4、5、6、7天的吸光度值均显著升高($P<0.05$)(表2)。

表1 Real-time PCR引物序列
Table 1 Sequence of primers for Real-time PCR

基因 Gene	编号 ID	方向 Direction	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>OPN</i>	NM_001009224.1	Forward	TGT TGG TTT CTT CGC TGT
		Reverse	TTC ACT CCA CCT TTC CCT A
<i>ALP</i>	XM_027965561.1	Forward	GAG CCT TTC CAT CTT CAG TT
		Reverse	GGG CAT AGA CTT CAA CCA G
<i>RUNX2</i>	XM_027959124.1	Forward	AGC AGC AGC AGC AAC AGC AG
		Reverse	CAC GAC AAC GCA CCA ATG
<i>β-actin</i>	XM_004013078.4	Forward	TCG CCG ACA GGA TGC AGA AGG
		Reverse	GCC AGG ATG GAG CCT CCG ATC

表2 MTT法测定各BMSCs组的吸光度值
Table 2 MTT assay was used to detect absorbance value of each BMSCs group

天数 Day	<i>D</i> ₄₉₀			
	对照组 Control group	As ₂ O ₃ 组 As ₂ O ₃ group	Ghrelin组 Ghrelin group	联合组 Combined group
1 d	0.156 \pm 0.034	0.137 \pm 0.024	0.207 \pm 0.04	0.144 \pm 0.044
2 d	0.367 \pm 0.023	0.184 \pm 0.007 ^a	0.527 \pm 0.037 ^a	0.319 \pm 0.036
3 d	0.517 \pm 0.04	0.329 \pm 0.016 ^a	0.861 \pm 0.033 ^a	0.516 \pm 0.025 ^b
4 d	0.842 \pm 0.029	0.497 \pm 0.012 ^a	1.278 \pm 0.058 ^a	0.649 \pm 0.014 ^{ab}
5 d	1.131 \pm 0.112	0.603 \pm 0.023 ^a	1.266 \pm 0.063	0.786 \pm 0.018 ^{ab}
6 d	1.312 \pm 0.105	0.685 \pm 0.034 ^a	1.306 \pm 0.124	0.883 \pm 0.039 ^{ab}
7 d	1.316 \pm 0.119	0.688 \pm 0.024 ^a	1.307 \pm 0.106	1.159 \pm 0.056 ^b

a: 与对照组比较差异显著($P<0.05$); b: 与As₂O₃组比较差异显著($P<0.05$)。

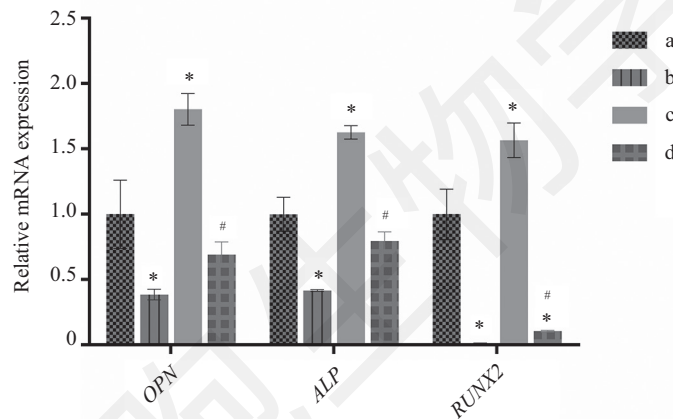
a: significant difference compared with the control group ($P<0.05$); b: significant difference compared with the As₂O₃ group ($P<0.05$).

2.2 Ghrelin联合三氧化二砷对BMSCs成骨分化能力的影响

2.2.1 成骨相关因子OPN、ALP、RUNX2的mRNA表达水平 Real-time PCR结果显示, 与对照组相比, 在成骨诱导分化的第7天和第14天, OPN、ALP、RUNX2的表达水平, As₂O₃组均显著下调($P<0.05$), Ghrelin组表达水平均呈现显著上调($P<0.05$); 联合组在第7天RUNX2及第14天OPN的表达水平显著下调($P<0.05$), 其他基因表达水平无显著差异(图1和图2)。与As₂O₃组相比, 联合组在第7、14天ALP、RUNX2及第7天OPN的表达水平均显著上调($P<0.05$), 而第14天OPN的表达水平无显著差异(图1和图2)。

2.2.2 成骨相关因子OPN、ALP、RUNX2的蛋白表达水平 Western blot结果显示, 与对照组比较, 在第7天和第14天, As₂O₃组OPN、ALP、RUNX2的表达水平均显著下调($P<0.05$); Ghrelin组在第7天和第14天, ALP、RUNX2及第7天OPN的表达水平显著上调($P<0.05$), 而第14天OPN的表达水平无显著差异; 联合组在第7天和第14天, OPN、ALP、RUNX2的表达水平均无显著差异(图3和图4)。与As₂O₃组比较, 联合组在第7天和第14天, OPN、RUNX2及第14天ALP的表达水平均显著上调($P<0.05$), 而第7天ALP的表达水平无显著差异(图3和图4)。

2.2.3 茜素红染色分析 采用茜素红染色分析钙盐沉积发现, 各成骨诱导组细胞均能红染, 但与对

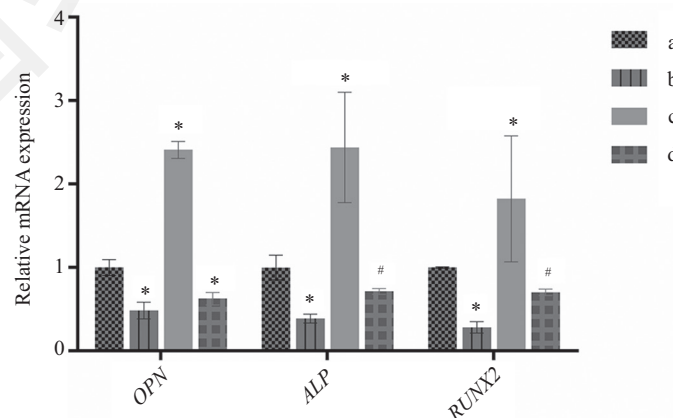


a: 对照组; b: As₂O₃组; c: Ghrelin组; d: 联合组。* $P<0.05$, 与对照组比较差异显著; # $P<0.05$, 与As₂O₃组比较差异显著。

a: control group; b: As₂O₃ group; c: Ghrelin group; d: combined group. * $P<0.05$, significant difference compared with the control group; # $P<0.05$, significant difference compared with the As₂O₃ group.

图1 成骨诱导第7天不同组细胞中OPN、ALP、RUNX2 mRNA的表达

Fig.1 Expression of the OPN, ALP and RUNX2 mRNA in different groups at day 7 of osteogenesis induction

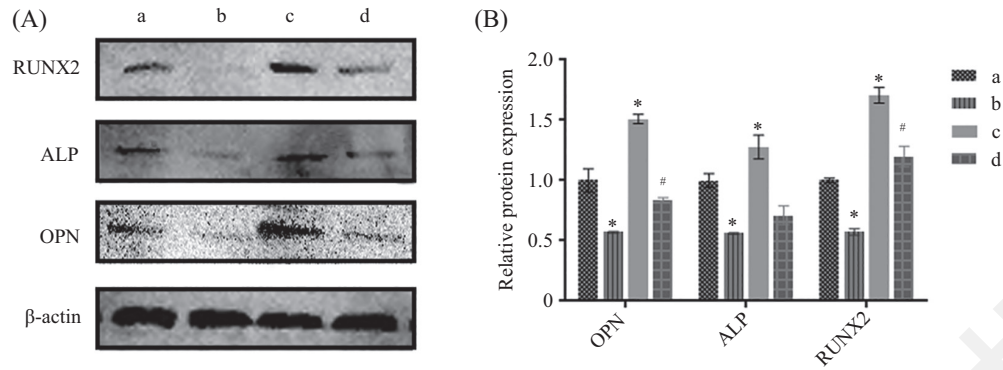


a: 对照组; b: As₂O₃组; c: Ghrelin组; d: 联合组。* $P<0.05$, 与对照组比较差异显著; # $P<0.05$, 与As₂O₃组比较差异显著。

a: control group; b: As₂O₃ group; c: Ghrelin group; d: combined group. * $P<0.05$, significant difference compared with the control group; # $P<0.05$, significant difference compared with the As₂O₃ group.

图2 成骨诱导第14天不同组细胞中OPN、ALP、RUNX2 mRNA的表达

Fig.2 Expression of the OPN, ALP and RUNX2 mRNA in different groups at day 14 of osteogenesis induction

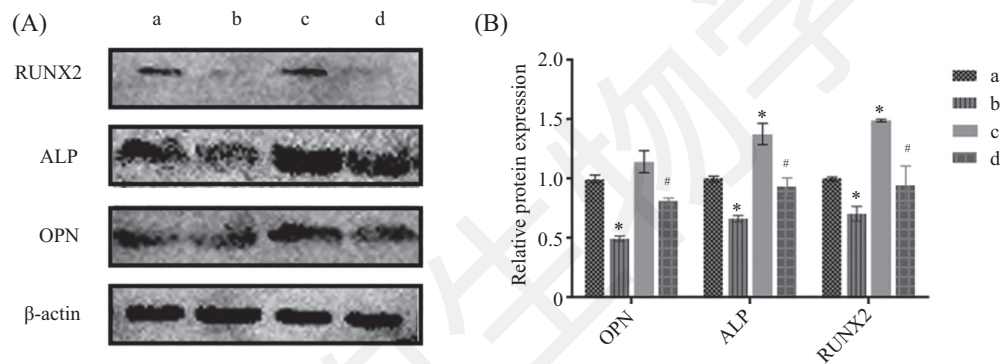


A: 蛋白免疫印迹图; B: 蛋白相对表达量。a: 对照组; b: As₂O₃组; c: Ghrelin组; d: 联合组。**P*<0.05, 与对照组比较差异显著; #*P*<0.05, 与As₂O₃组比较差异显著。

A: Western blot; B: relative protein expression. a: control group; b: As₂O₃ group; c: Ghrelin group; d: combined group. **P*<0.05, significant difference compared with the control group; #*P*<0.05, significant difference compared with the As₂O₃ group.

图3 成骨诱导第7天不同组细胞中OPN、ALP、RUNX2 蛋白表达水平

Fig.3 Expression of the OPN, ALP and RUNX2 protein in different groups at day 7 of osteogenesis induction



A: 蛋白免疫印迹图; B: 蛋白相对表达量。a: 对照组; b: As₂O₃组; c: Ghrelin组; d: 联合组。**P*<0.05, 与对照组比较差异显著; #*P*<0.05, 与As₂O₃组比较差异显著。

A: Western blot; B: relative protein expression. a: control group; b: As₂O₃ group; c: Ghrelin group; d: combined group. **P*<0.05, significant difference compared with the control group; #*P*<0.05, significant difference compared with the As₂O₃ group.

图4 成骨诱导第14天不同组细胞中OPN、ALP、RUNX2 蛋白表达水平

Fig.4 Expression of the OPN, ALP and RUNX2 protein in different groups at day 14 of osteogenesis induction

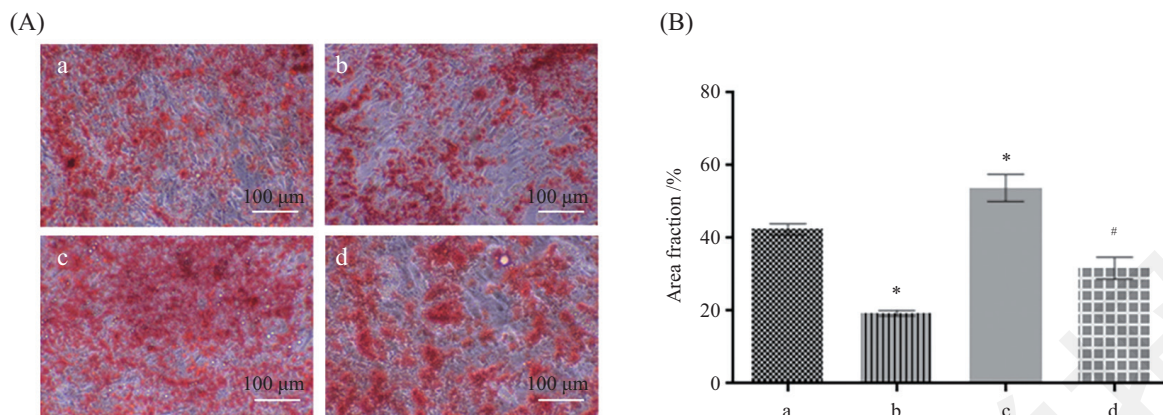
对照组相比, As₂O₃组细胞钙盐沉积较少(*P*<0.05), 而 Ghrelin组的钙盐沉积显著高于对照组(*P*<0.05)(图5)。联合组的钙盐沉积显著高于As₂O₃组(*P*<0.05)(图5)。

3 讨论

As₂O₃是一种常见的环境污染物, 流行病学研究发现砷暴露能增加患骨疾病的风险^[10-11]。As₂O₃最早被用于研究治疗急性早幼粒细胞白血病。研究发现, As₂O₃对于多种类型的肿瘤细胞生长具有一定的抑制作用^[12-13]。YUAN等^[14]发现, 小鼠胚胎干细胞经0.2~0.5 μmol/L As₂O₃处理后, 细胞凋亡程度不断升高, 细胞增殖能力受到抑制。Ghrelin 是一种促生长激素释放肽, 具有广泛的生理功能, 对多种类型细胞

均有促增殖的作用^[15-17]。本研究以绵羊BMSCs为实验对象, 探讨了Ghrelin联合As₂O₃对细胞增殖和成骨分化能力的影响。MTT结果显示, 0.5 μmol/L As₂O₃作用于BMSCs后, 从第2天开始对细胞增殖就具有显著的抑制作用, 即能显著抑制细胞增殖; 600 ng/mL Ghrelin作用于BMSCs, 从第2天开始出现显著促细胞增殖作用, 细胞生长至第4天就达到接触抑制; 而Ghrelin联合As₂O₃作用于BMSCs, 在一定程度上减弱As₂O₃对BMSCs的增殖抑制效应, 但并未完全消除As₂O₃对细胞增殖的抑制作用, 这可能与Ghrelin的作用浓度与时间存在一定的关系。推测在一定范围内, Ghrelin对As₂O₃所致的增殖抑制具有缓解作用。

研究发现, Ghrelin不仅可以促进BMSCs的增



A: 茜素红染色图; B: 茜素红染色面积分数。a: 对照组; b: As₂O₃组; c: Ghrelin组; d: 联合组。**P*<0.05, 与对照组比较差异显著; #*P*<0.05, 与As₂O₃组比较差异显著。

A: alizarin red staining; B: alizarin red staining area fraction. a: control group; b: As₂O₃ group; c: Ghrelin group; d: combined group. **P*<0.05, significant difference compared with the control group; #*P*<0.05, significant difference compared with the As₂O₃ group.

图5 茜素红染色分析结果

Fig.5 The analysis results of alizarin red staining

殖, 而且还能促进其向成骨细胞的分化^[9]。而浓度 $\geq 2 \mu\text{mol/L}$ 的无机砷能显著降低大鼠颅骨成骨细胞的分化^[18]。0.5 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃能显著降低体外BMSCs向成骨细胞分化的能力, 长期暴露于As₂O₃饮用水(0.05和0.5 mg/L, 12周)中的大鼠的骨密度显著降低, 成骨特征性基因RUNX2的表达也显著下调, 并减弱BMSCs的成骨分化, 显著改变骨的微观结构^[3]。OPN是骨骼矿化细胞外基质的重要组成部分, 在骨细胞、成骨细胞和软骨细胞等多种细胞类型中均有表达, 并参与骨形成和骨重建过程, 也是成骨细胞的标志物^[19-20]。ALP在骨骼中分布广泛, 在成骨细胞膜上表达丰富, 参与基质矿化等过程, 因而常被作为检测成骨细胞数量的一个指标^[21]。RUNX2是一种调节骨形成的主要转录因子, 参与形成功能完整的成骨细胞^[22-23]。ADHAMI等^[24]研究发现, RUNX2缺失小鼠在发育过程中, 成骨细胞标志物的基因表达减少, 细胞外基质中胶原的装配受损, 导致骨骼的硬度和结构完整性降低, 骨形成减少。本研究探讨了Ghrelin联合As₂O₃对BMSCs成骨分化的影响作用。结果显示, 与对照组相比, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃作用于成骨诱导的BMSCs, 不同时间均显著下调成骨相关因子OPN、ALP、RUNX2的mRNA和蛋白表达水平, 钙盐沉积减少; 而600 ng/mL Ghrelin单独作用于成骨诱导的BMSCs, 成骨相关因子OPN、ALP、RUNX2的mRNA和蛋白表达水平总体呈现上调, 钙盐沉积增多; 结果提示, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃抑制了BMSCs的成骨分化过程, 而600 ng/mL Ghrelin对成骨分化具

有促进作用。Ghrelin联合As₂O₃作用于成骨诱导的BMSCs, 表现为Ghrelin在一定程度上减弱As₂O₃所致的成骨分化抑制作用。

WU等^[25]证实, BMSCs的成骨分化受ERK相关信号通路调控。As₂O₃在BMSCs成骨细胞分化过程中激活ERK, 而ERK抑制剂PD98059显著逆转As₂O₃抑制成骨细胞分化过程, 提示砷可能通过ERK相关的信号途径抑制成骨细胞的形成^[3]。而YE等^[9]发现Ghrelin能通过ERK信号通路促进BMSCs的成骨分化过程。那么, Ghrelin联合As₂O₃作用于成骨诱导的BMSCs, 是否通过ERK信号通路来促进绵羊BMSCs的成骨分化过程, 还有待进一步研究。Ghrelin联合As₂O₃在成骨诱导分化过程中存在什么样的互作效应, 也将是我们进一步研究的重点。

参考文献 (References)

- [1] JUNYA W, TAIPING Z, MIN L, et al. Arsenic removal from water/wastewater using layered double hydroxide derived adsorbents, a critical review [J]. Rsc Adv, 2018, 8(40): 22694-709.
- [2] SONG G, MA Z, LIU D, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate severe acute pancreatitis via regulation of microRNA-9 to inhibit necroptosis in rats [J]. Life Sci, 2019, 223: 9-21.
- [3] WU C T, LU T Y, CHAN D C, et al. Effects of arsenic on osteoblast differentiation *in vitro* and on bone mineral density and microstructure in rats [J]. Environ Health Persp, 2014, 122(6): 559-65.
- [4] LI E, KIM Y, KIM S, et al. Ghrelin-induced hippocampal neurogenesis and enhancement of cognitive function are mediated independently of GH/IGF-1 axis: lessons from the

- spontaneous dwarf rats [J]. *Endocr J*, 2013, 60(9): 1065-75.
- [5] HERNANDEZ D, MEHTA N, GELIEBTER A. Meal-related acyl and des-acyl ghrelin and other appetite-related hormones in people with obesity and binge eating [J]. *Obesity*, 2019, 27(4): 629-35.
- [6] TESAURO M, SCHINZARI F, CARAMANTI M, et al. Cardiovascular and metabolic effects of ghrelin [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2010, 6(4): 228-35.
- [7] LI B, LIN Q, GUO H. Ghrelin regulates sepsis-induced rat acute gastric injury[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 5424-32.
- [8] ZHU X, LIU Z, DENG W, et al. Derivation and characterization of sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced with telomerase reverse transcriptase [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2017, 24(3): 519-25.
- [9] YE N, JIANG D. Ghrelin accelerates the growth and osteogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells through the ERK1/2 pathway [J]. *BMC Biotechnol*, 2015, 15(1): 51-61.
- [10] AKBAL A, YLMAZ H, TUTKUN E. Arsenic exposure associated with decreased bone mineralization in male [J]. *Aging Male*, 2014, 17(4): 256-8.
- [11] PEREIRA JA, LAW S. Microenvironmental scenario of the bone marrow of inorganic arsenic-exposed experimental mice [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2018, 181(2): 1-10.
- [12] CHIU H W, TSENG Y C, HSU Y H, et al. Arsenic trioxide induces programmed cell death through stimulation of ER stress and inhibition of the ubiquitin-proteasome system in human sarcoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2): 762-72.
- [13] 张琳刚, 张天禹, 谭宁, 等. 维生素C联合三氧化二砷对膀胱癌T-24细胞株的作用[J]. *肿瘤防治研究*(ZHANG L G, ZHANG T Y, TAN N, et al. Combined application of vitamin C and arsenic trioxide in inhibiting bladder cancer cell lines T-24 *in vitro* [J]. *Cancer Res Preven Treat*), 2017, 44(2): 103-7.
- [14] YUAN W L, CHEN J, HUANG H R. Low-dose arsenic trioxide modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells[J]. *Chem Res Toxicol*, 2018, 31(6): 472-81.
- [15] PENG Y, XUAN M, ZOU J, et al. Freeze-dried rat bone marrow mesenchymal stem cell paracrine factors: a simplified novel material for skin wound therapy [J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(5/6): 1036-46.
- [16] LIN Y, LIANG Z, HE L, et al. Gut ghrelin regulates hepatic glucose production and insulin signaling via a gut-brain-liver pathway[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 8.
- [17] ZHANG W, ZHANG Z, CHEN J, et al. Ghrelin is expressed in the pregnant mammary glands of dairy goats and promotes the cell proliferation of mammary epithelial cells [J]. *Gen Comp Endocr*, 2018, 260: 115-24.
- [18] HU Y C, CHENG H L, HSIEH B S, et al. Arsenic trioxide affects bone remodeling by effects on osteoblast differentiation and function [J]. *Bone*, 2012, 50(6): 1406-15.
- [19] AMARJOT S, GURVEEN G, HARSIMRAT K, et al. Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review [J]. *Prog Orthod*, 2018, 19(1): 18.
- [20] 赵嘉睿, 邓卓越, 穆莉莉. 骨桥蛋白的生物学功能及研究现状[J]. *国际免疫学杂志*(ZHAO J R, DENG Z Y, MU L L. The function and research status of osteopontin [J]. *Inter J Immunol*), 2018, 41(4): 448-451.
- [21] BOVER J, PABLO UREÑA, AGUILAR A. Alkaline Phosphatases in the Complex Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorders [J]. *Calcified Tissue Int*, 2018, 103(6): 1-14.
- [22] LIM K, PARK N, CHE X. Core Binding factor β of osteoblasts maintains cortical bone mass via stabilization of Runx2 in mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(4): 715-22.
- [23] 李娜, 代晓霞. Runx2在骨形成中的作用及调控[J]. *国外医学医学地理分册*(LI N, DAI X X. Role and regulation of Runx2 in bone formation [J]. *Foreign Med Sci*), 2018, 39(4): 353-6.
- [24] ADHAMI M D, RASHID H, CHEN H, et al. Loss of Runx2 in committed osteoblasts impairs postnatal skeletogenesis [J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(1): 71-82.
- [25] WU Y, ZHANG X, ZHANG P, et al. Intermittent traction stretch promotes the osteoblastic differentiation of bone mesenchymal stem cells by the ERK1/2-activated Cbfa1 pathway [J]. *Connect Tissue Res*, 2012, 53(6): 451-9.