

针刺肾俞、足三里抑制大鼠绝经后骨质疏松症的机制研究*

李 俐¹, 余晓雯², 吴广文², 朱定钰¹, 曾雅芬², 吴明霞^{1△}

(1. 福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州 350003; 2. 福建中医药大学, 福建 福州 350122)

摘要: **目的** 探讨针刺肾俞足三里调节 wnt/ β -catenin 通路抑制大鼠绝经后骨质疏松症(PMOP)的作用机制。**方法** 将 50 只雌性 SD 大鼠随机分为空白组、假模型组、模型组、穴位组和非经非穴组。治疗组、非经非穴组每天针刺 1 次,留针 30 min,10 次为 1 个疗程,疗程间休息 5 d,共针刺 6 个疗程后,X 线检测股骨颈、股骨骨密度,比色法检测大鼠血清碱性磷酸酶(ALP)活性及 RT-PCR 法检测腰椎 Wnt1, β -catenin,GSK-3 β ,Dsh,mRNA 表达。**结果** 与模型组、非经非穴组比较,实验组大鼠股骨颈骨密度明显升高,血清 ALP 活性明显降低,Wnt1,GSK-3 β ,Dsh 的 mRNA 表达差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 针刺肾俞、足三里穴对绝经后骨质疏松症有明显抑制作用,其作用机制可能与调节 Wnt/ β -Catenin 通路中信号分子表达有关。

关键词: 肾俞; 足三里; 绝经后骨质疏松症; 骨密度; 碱性磷酸酶(ALP); Wnt/ β -Catenin 通路

中图分类号: R285.5; R245 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2018)04-0029-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.04.007

Study on the Mechanism of Acupuncture at “Shenshu” and “Zusanli” for the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis

LI Li¹, YU Xiaowen², WU Guangwen², ZHU Dingyu¹, ZENG Yafen², WU Mingxia¹

(1. The Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China;
2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: Objective To explore the mechanisms of acupuncture at “Shenshu”(BL 23) and “Zusanli”(ST 36) on the wnt/ β -catenin pathway in the treatment of postmenopausal osteoporosis (PMOP) in rats. **Methods** Fifty female SD rats were randomly divided into a blank group, a sham-model group, a model group, a acupoint group and a non-acupoint group. The treatment group and non-acupoint group were given acupuncture once per day, for 30miniter, 10 treatments made one session. There were 5 days at the interval between two sessions. Six sessions of treatment were required. Bone mineral density were measured using a Dual Energy X-Ray Bone Denstormeter. Activity of alkaline phosphatase (ALP) in serum was measured by chromatometry. The expression of Wnt1, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), β -catenin, Dsh and mRNA in lumbar vertebra were detected by RT-PCR. **Results** Bone mineral density in the experimental group were higher than those in the model group and non-acupoint group. And serum ALP were lower than those in the model group. The expression of Wnt1, GSK-3 β , β -catenin, Dsh and mRNA were significantly difference ($P<0.05$). **Conclusion** Acupuncture at “Shenshu”(BL 23) and “Zusanli”(ST 36) possesses marked preventive and therapeutic effect for PMOP. This action is probably associated with the regulation of the key molecules of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

KEY WORDS: Shenshu(BL23); Zusanli(ST36); postmenopausal osteoporosis(PMOP); bone mineral density; alkaline phosphatase(ALP); Wnt/ β -catenin signaling

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是指绝经后女性因卵巢功能衰退,分泌雌激素

不足,导致刺激成骨细胞功能的作用减弱,且对破骨细胞的抑制作用下降,使骨代谢过程中的骨吸收大于

收稿日期: 2018-07-26

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373719);福建省自然科学基金(2015J01479)

第一作者简介: 李俐(1966-),女,主任医师,研究方向:针灸治疗骨与关节病。

△通信作者: 吴明霞, E-mail: wumingxiafz@163.com

骨形成,生物学表现为低骨量和骨组织显微结构的退化性变,临床表现为骨脆性和骨折易感性增加^[1-2]。PMOP为骨质疏松症的一种重要分型,其引起的全身疼痛及脆性骨折不仅严重影响老年人的身心健康和生活质量,而且骨折后长期卧床引起的呼吸及循环系统等疾病,也会大大增加患者的死亡率^[3]。目前西药治疗方面副作用较多,部分患者不能耐受或者不能接受。针刺凭其安全性及有效性获得患者青睐,但因作用机制不明限制了针刺的发展。

中医学认为,肾主骨生髓藏精,女性到了绝经的年龄,“天癸”绝,肾精衰少,不能充养骨骼,骨髓化源不足,从而发生PMOP^[4]。研究经典Wnt/ β -catenin信号通路对成骨细胞的作用已成为近年来骨代谢的研究热点^[5]。Wnt/ β -catenin信号通路与骨质疏松的发生密切相关,在整个成骨细胞分化增殖过程中起着重要的作用,而成骨细胞是骨形成的主要功能细胞。肾俞穴是足太阳膀胱经在背腰部的腧穴,为肾经经脉之气输注于背部之处,针之可培肾壮骨、补元回阳、强壮体质,固护人体先天之本。足三里为胃经合穴,胃腑之下合穴,针之可健脾胃,脾胃为后天之本,故针刺足三里能固护后天之本。本课题前期实验以肾俞养肾固先天之本,足三里健脾补后天之本治疗本病取得良好疗效。故本课题通过观察针刺肾俞和足三里穴对PMOP大鼠骨密度、血清ALP及腰椎Wnt/ β -catenin中关键调节因子Wnt1、 β -catenin、Dsh、GSK-3 β 表达的影响,探讨针刺肾俞和足三里治疗PMOP的微观作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 由福建中医药大学实验动物中心(许可证号:SYXK(闽)2009-0001)购自上海斯莱克实验动物有限公司,50只7周龄SPF级SD大鼠(动物许可证号SCXK(沪)2012-0002)。通过福建中医药大学实验动物伦理委员会审批,严格遵守《实验动物管理条例》处理实验大鼠。采用一笼5只喂养,以常规饲料喂养,自由饮水,饲养于标准无病原菌饲养室,保持良好通风,室温控制在(22±1)℃,湿度40%~60%,噪音<50分贝,光照与黑暗时间为每12h交替。

1.2 主要仪器材料和试剂 仪器和材料:双能X射线骨密度仪(美国HOLOGIC DISCOVERY CI型)、酶标仪(DENLEY DRAGON Wellscan MK 3, Thermo,芬

兰,分析软件:Ascent software for Multiskan)、洗板机(Wellwash 4 MK2, Thermo 芬兰)、基因扩增仪(美国Applied Biosystems 9700 PCR System)、华佗牌一次性使用无菌针灸针(0.25 mm×13 mm,苏食药器械生产许2001-0020号)。

试剂:Trizol RNA提取试剂盒(Vazyme公司)、cDNA一链合成试剂盒、逆转录试剂盒(Vazyme公司)、PCR Mix PCR聚合酶(Vazyme公司)、琼脂糖-凝胶电泳用(英国OXOID公司)、水合氯醛(福建中医药大学附属第二人民医院提供)。

1.3 动物分组和造模 喂养1月后,用安尔碘黄染标记大鼠四肢及背部,代表编码1-10,每个数字5只,用SPSS软件生成随机数字表,随机分为造模组(30只),假手术组(10只)和空白组(10只)。

参照李恩等主编的文献[6]中造模方法:(1)去卵巢造模:将30只大鼠用10%的水合氯醛按0.3 mL/100 g的剂量腹腔注射麻醉。仰卧于手术台上,沿腹部腹正中线(腹白线)剑突下2 cm处备皮,安尔碘消毒,切开皮肤约1~1.5 cm,切开肌肉、腹膜,打开腹腔,腹部侧寻见乳白色组织,用镊子轻轻将之提出腹腔,暴露出被包裹的粉红色“桑椹样”卵巢^[7],结扎输卵管,钳夹分离并剪去卵巢,确认无渗血后,腹腔给予青霉素生理盐水(2万U/mL),分层缝合皮肤,盖软毛巾保温待麻醉苏醒。大鼠手术后连续1周做阴道图片,检测卵巢是否切除干净。术后造模组死亡2只,死亡原因考虑麻醉药过敏或麻醉时间过长引起体温过低死亡。(2)假手术组造模:将10只大鼠用同样的术式在卵巢附近切取与卵巢大小相近的脂肪组织1块。术后假手术组死亡2只大鼠,死亡原因考虑同上述。(3)36只大鼠术后苏醒后均腹腔注射青霉素生理盐水(2万U/mL)抗炎,每天注射0.5 mL,连续3d。(4)造模后适应性喂养90d。将去卵巢造模大鼠同上述随机分组方法分为模型组(9只),肾俞足三里组(10只),非经非穴组(9只)。

1.4 治疗方法 肾俞足三里组:选穴:肾俞和足三里穴,穴位定位参照实验针灸学^[8]。操作:将大鼠黑色袜子套头固定,穴位局部剪去鼠毛,常规消毒,以0.5寸毫针进行针刺,行提插捻转,补手法,留针30 min,每隔10 min行针1次,每日1次,10次为1个疗程,疗程间休息5 d,共治疗6个疗程,持续90 d。

非经非穴组:选穴,选取非经非穴(双侧肋下髂嵴上10 cm和15 cm,后正中线上旁开20 mm处^[9-10]),针刺操作同肾俞、足三里组,余同肾俞、足三里组。

模型组、假手术组、空白组:不进行针刺,套头等干预同针刺组,余同肾俞、足三里组。

操作由福建中医药大学两名针灸推拿学研究生配合进行,保证各组接受两名操作者治疗的大鼠只数相同,期间,各组动物均正常饮食,自由饮水。

1.5 标本采集 治疗3个月后,处死实验动物,腹主动脉采血,离心取上层血清,置于PE管中,-20℃储存备用,检测碱性磷酸酶(ALP);取右股骨,剔除附着的肌肉、肌腱,无菌纱布浸透0.9%盐水后包裹,放入PE密封袋,用于骨密度的测定;取第1-3腰椎,生理盐水纱布包裹,放入PE密封袋,迅速置入液氮中保存,用于mRNA的检测。以上标本取材时均按分组编号做好标记。

1.6 指标检测 (1)右股骨颈骨密度测定:取右股骨用美国HOLOGIC DISCOVERY CI型双能X线骨密度仪,测定大鼠右股骨颈骨密度、右股骨干骨密度。骨密度检测服务由福建省中医药研究院提供。(2)碱性磷酸酶(ALP)分析:取出备用血清,参照碱性磷酸酶诊断试剂盒说明书操作,用全自动生化分析仪测定碱性磷酸酶的活性。(3)RT-PCR法检测mRNA:取L1-L3椎体加200μL Trizol,研磨后加入800μL的Trizol溶液,混匀,静置15 min,加氯仿,静置后离心15 min。将上层水相加入等体积的异丙醇,混匀后放于-20℃中30 min后离心10 min,留取沉淀,再水溶解。用HiScript® II RT SuperMix for PCR进行逆转录反应。由福州沃森生物技术有限公司合成内参及引物,内参序列:GAPDH (Rat)140bp 上游:5'-ACG-GCAAGTTCAACGGCACAG-3'。引物序列:Wnt1(rat)452 bps: 上游5'-TGCTGTCCCTGTGTTATTGTGC-3', 下游5'-GGCTGGCAGACAAGAGGAGTGA-3'; GSK3(rat)409 b 上游5'-GAGGCAATCGCACTGTG-TAG-3', 下游5'-AGGTAGAGTTGGAGGCTGATG-3';β-catenin (rat)243 bp 上游5'-GCAGCGAC-TAAGCAGGAAG-3', 下游5'-CAGATGACGAA-GAGCACAGATG-3';DSH(rat)183 bp 上游5'-AGT-CACTACCGCCATTTCCT-3', 下游5'-AC-CTTCAGCACCTCTCCAT-3'。经历预变性(94℃,5

min)、变性:(94℃,30 s),退火:(58℃,30 s)、延伸(72℃,20 s)、重复变性→延伸(30个循环)、延伸(72℃,7 min)。反应完成后取4μL PCR扩增产物于0.9%琼脂糖凝胶中电泳30 min后,凝胶成像仪检测条带。

1.7 数据统计处理 实验数据采用SPSS24.0版统计软件进行处理、分析、制图,结果用($\bar{x} \pm s$)或误差条形图表示。多组数据之间比较服从正态分布并方差齐的使用单因素方差分析;任一组数据不符合正态分布的,对秩转换后产生的新变量进行SNK检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨密度

表1 各组大鼠股骨颈、股骨骨密度、ALP比较($\bar{x} \pm s$)

分组项目	股骨颈骨密度	股骨骨密度	ALP活性
假手术组	0.283±0.004	0.312±0.004	7.34±0.60
肾俞足三里组	0.295±0.009	0.301±0.006	15.0±1.46
非经非穴组	0.274±0.006	0.297±0.005	20.7±1.18
空白组	0.286±0.003	0.303±0.005	2.97±0.31
模型组	0.264±0.006	0.288±0.005	27.6±1.05

表2 各组大鼠 Wnt1、β-catenin、GSK-3β、Dsh mRNA 灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

分组项目	Wnt1	β-catenin	GSK-3β	Dsh
假手术组	0.44±0.06	0.33±0.06	1.31±0.14	0.17±0.03
肾俞足三里组	0.76±0.09	0.42±0.09	0.74±0.13	0.21±0.03
非经非穴组	1.24±0.17	0.57±0.12	0.59±0.12	0.24±0.03
空白组	0.33±0.04	0.29±0.05	1.40±0.39	0.11±0.20
模型组	1.07±0.13	0.53±0.37	0.45±0.11	0.25±0.04

2.1.1 右股骨颈骨密度测定结果 如图1所示,肾俞、足三里组不符合正态分布,各组间采用秩转换后SNK检验。假手术组、空白组股骨颈骨密度较模型组高,差异有统计学意义($P < 0.05$),证明造模对骨密度有降低作用。肾俞、足三里组股骨颈骨密度较模型组高,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示针刺肾俞、足三里对绝经后骨质疏松症模型大鼠骨密度有升高作用。非经非穴组股骨颈骨密度比较模型组,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明针刺非经非穴组对绝经后骨质疏松症模型大鼠骨密度无影响。

2.1.2 右股骨骨密度测定结果 如图2所示,各组数值均符合正态分布($W > 0.05$),且方差齐($P > 0.05$),采用单因素方差分析。模型组骨密度均值较假手术组、

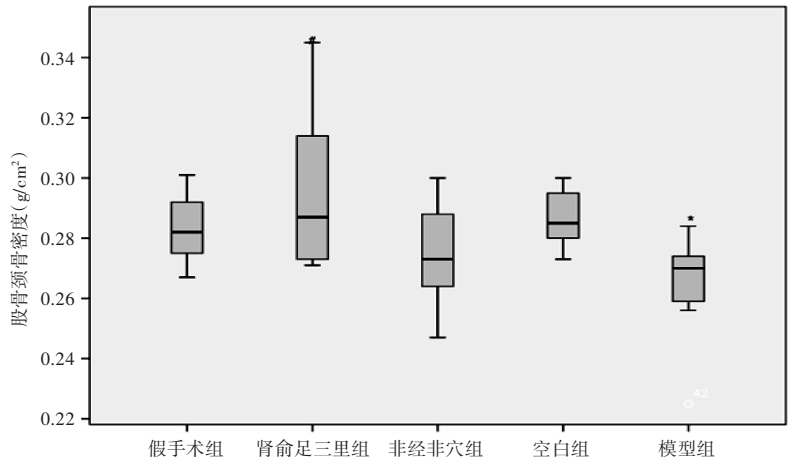
空白组低,证实造模干预后骨密度差异具有统计学意义($P<0.05$)。肾俞、足三里组骨密度均值虽大于非经非穴组、模型组,差异无统计学意义($P>0.05$),考虑受样本量、干预时间限制,目前股骨干骨密度还不足以体现差异。

2.2 碱性磷酸酶(ALP)比较 如图3所示,模型组ALP活性较假手术组、空白组高,差异具有统计学意义($P<0.05$),证实造模干预后ALP活性有升高趋势。肾俞、足三里组ALP活性较模型组低,差异有统计学意义($P<0.05$),证实针刺肾俞、足三里对绝经后骨质疏松症模型大鼠ALP活性有降低作用。

2.3 mRNA测定凝胶成像仪检测条

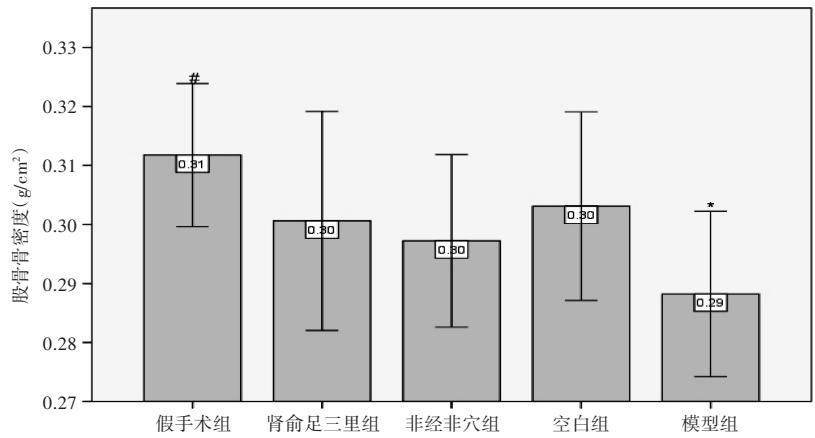
2.3.1 Wnt1、DSHmRNA测定比较 两组数值均符合正态分布,用方差分析统计学处理。DSH方差齐用LSD分析,Wnt1方差不齐用Games howell分析,模型组Wnt1mRNA测定较假手术组、空白组高,差异具有统计学意义($P<0.05$),证实造模干预后Wnt1mRNA灰度值较空白组、假手术升高。假手术组、空白组,差异无统计学意义($P>0.05$)。非经非穴组Wnt1mRNA较假手术组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。肾俞、足三里组Wnt1mRNA灰度值较假手术组高,差异无统计学意义($P>0.05$),证实针刺肾俞、足三里与假手术组大鼠Wnt1mRNA灰度值相当,而针刺非经非穴组灰度值并无此作用。模型组DSHmRNA测定较空白组高,差异具有统计学意义($P<0.05$),证实造模干预后DSHmRNA灰度值有升高趋势。肾俞、足三里组与假手术组DSH灰度值对比差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3.2 β -catenin mRNA测定比较 如前实验数据表所示:数据符合正态分布,方差不齐,用Games howell分析。 β -catenin mRNA灰度值均值模型组>



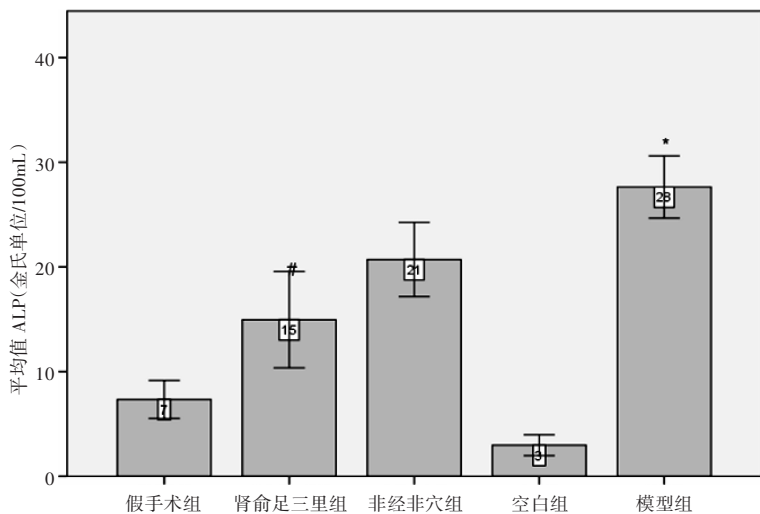
注:与假手术组、空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$

图1 大鼠股骨颈骨密度比较



注:与假手空白组比较,# $P>0.05$;与假手术组、空白组比较,* $P<0.05$;误差条形图:±1标准差

图2 各组大鼠股骨骨密度比较($\bar{x} \pm s$)



注:与假手术组、空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;误差条形图:±1标准差

图3 大鼠血清ALP活性比较

非经非经非穴组>肾俞足三里>假手术组>空白组($P<0.05$),差异无统计学意义。

2.3.3 GSK-3 β mRNA 测定比较 如前实验数据表所示:数据不符合正态分布,方差不齐,用秩和检验分析。GSK-3 β mRNA 灰度值均值模型组<非经非经非穴组<肾俞足三里<假手术组<空白组($P<0.05$),差异有

统计学意义。

3 讨论

股骨颈作为生物力学的薄弱点,为骨质疏松导致的骨折中最常见的三大部位之一^[11],老年人股骨颈骨折后因基础病或社会心理因素不能接受或耐受髋关节置换手术而致残,增加死亡风险,也增加了家庭及社会负担^[12]。本实验证实了针刺肾俞、足三里对抑制股骨颈骨密度下降有重要意义($P<0.05$),值得更多实验论证及引入临床应用。大鼠股骨整体的骨密度,模型组均值较假手术组、空白组低($P<0.05$),证实了造模干预后大鼠骨密度显著降低。然而肾俞、足三里组股骨骨密度虽有高于非经非穴组、模型组的趋势,差异却无统计学意义,考虑股骨颈是以骨松质为主,外层覆骨密质较薄,股骨干外覆骨密质较厚^[13],干预后早期以骨松质变化明显,骨密质变化还不明显,受干预时间限制,目前股骨整体骨密度还不足以体现差异。ALP 是参与骨代谢的重要蛋白质,是骨形成所必需的酶,其活性反应成骨细胞的活性是成骨细胞早期和中期分化的标志物^[14-15]。造模成功后刺激 ALP 活性代偿性升高以弥补丢失的骨量,而针刺肾俞、足三里可增加骨密度,抑制它的活性代偿升高。Wnt 信号通路的组成包括细胞外因子 Wnt 蛋白、跨膜受体 Fz、细胞膜上共受体 LRP5/6、胞质内散乱蛋白(Dsh)、 β -catenin、糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)、支架蛋白 Axin、APC 蛋白、核内转录因子 TCF/LEF、下游靶基因等^[16-17]。它们分别对成骨细胞、破骨细胞的分化增殖起着重要的作用^[18]。Wnt1 蛋白为 Wnt/ β -catenin 经典通路的起始因子,它对细胞的分化增殖有着重要作用。Wnt1 也是原癌基因的重要组成部分,本实验发现针刺肾俞、足三里能够抑制 Wnt1 表达,使破骨细胞分化增殖受阻;同时抑制 Wnt 信号时,使 GSK-3 β 活性激活。对原癌基因的抑制,也为癌症治疗

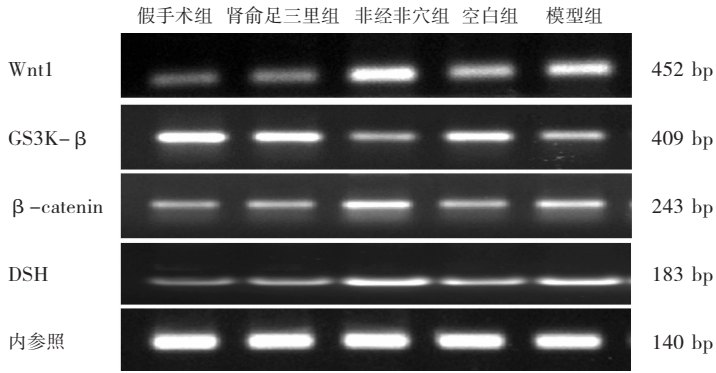
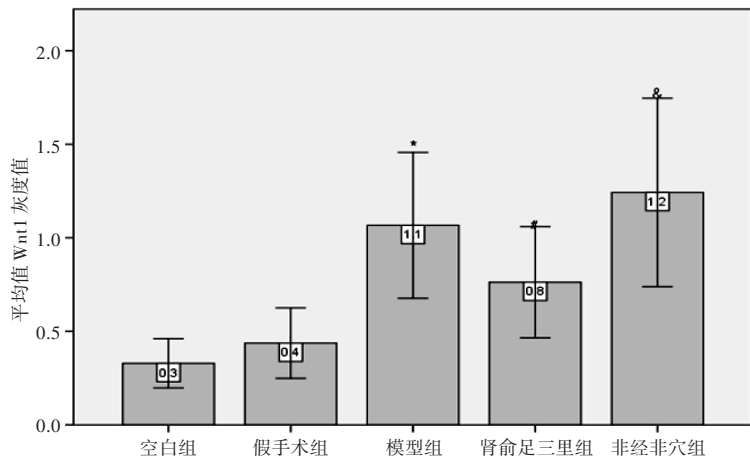
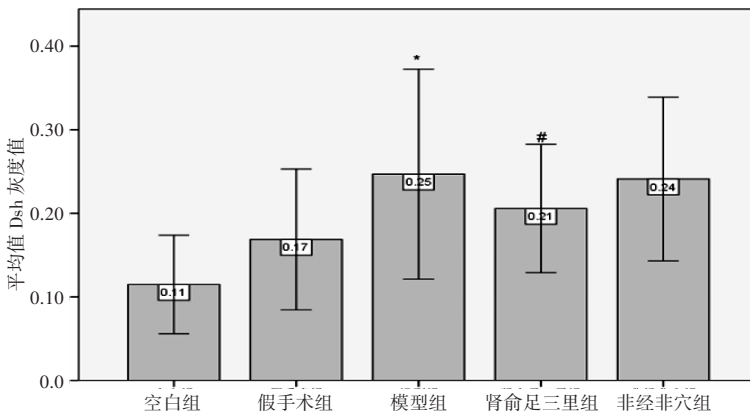


图 4 mRNA 凝胶测定凝胶成像仪检测条



注:与假手术组、空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与模型组比较,# $P>0.05$;误差条形图: +/- 1 标准差

图 5 Wnt 灰度值比较



注:与空白组比较,* $P<0.05$;与假手术组比较,# $P>0.05$;误差条形图: +/- 1 标准差

图 6 Dsh 灰度值比较

提供一条思路。 β -catenin 是 Wnt 信号通路关键的因子^[19-20],从实验的数据图中可以看到针刺足三里肾俞有抑制 β -catenin 表达的趋势,但没有统计学意义,延长实验周期或者扩大样本量也许能进一步发现他们的关系,也可能是针刺足三里、肾俞作用靶向并非是 β -catenin。DSH 为细胞质内散在蛋白,实验发现针刺肾俞、足三里能够抑制其表达,增加骨量。肾俞穴是足太阳膀胱经在背腰部的腧穴,为肾经经脉之气输注于背部之处,针之可培肾壮骨、补元回阳、强壮体质,固护人体先天之本。足三里为胃经下合穴,脾胃为后天之本,针之可补益后天之本。中医从整体出发先天后天并顾,可治疗包括绝经后骨质疏松在内的多种疾病。

参考文献:

- [1] 文天林,孙天胜,王玲. 骨质疏松症的流行病学、病因和分类[J]. 人民军医,2010,53(9):662-663.
- [2] 鲍圣涌,阎德文,张少君,等. “双固一通”针法对绝经后骨质疏松模型大鼠骨生物力学的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志,2012,18(2):108-112.
- [3] BECKER D J, KILGORE M L, MORRISEY M A. The societal burden of osteoporosis [J]. Current rheumatology reports,2010,12(3):186-191.
- [4] 吴启梅,刘之浩,刘立平,等. 神阙穴隔中药灸治疗绝经后骨质疏松症临床观察[J]. 河南中医,2018(2):302-305.
- [5] 许兵,刘慧,许应星,等. 成骨细胞中经典 Wnt/ β -catenin 通路研究进展[J]. 生命科学,2011(5):477-481.
- [6] 李恩. 骨质疏松鉴别诊断与治疗[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:620-623.
- [7] 潘芳芳,周志华,王永平,等. 针药并用对绝经后骨质疏松症大鼠血清 E2、骨密度的影响 [J]. 上海针灸杂志,2012,31(6):444-446.
- [8] 余曙光,郭义. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2014:146-148.
- [9] 牛维,刘海全. 补肾中药对膝骨性关节炎合并绝经后骨质疏松症骨密度、雌激素水平的影响[J]. 北京中医药大学学报,2005,28(4):69-71.
- [10] 林莺,纪峰,黄桂榕,等. 针刺实验研究中大鼠非经非穴选取方法及思考[J]. 针刺研究,2013,38(4):334-338
- [11] 杨海明,徐天舒,刘莹露,等. 唑来膦酸对绝经后女性血脂及骨量的影响 [J]. 蚌埠医学院学报,2017,42(8):1070-1072.
- [12] 杨琦,王景杰,陈慧群,等. 电针大鼠足三里穴调控胃运动的相关差异基因的研究 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2009,18(5):447-450.
- [13] 李晓红,赵献银,朱晓姝,等. 雌激素对去势大鼠颌骨和股骨结构影响的实验研究 [J]. 实用口腔医学杂志,2003,19(4):333-335.
- [14] 周晓莉,鲍圣涌,刘品莉,等. “双固一通”针法对绝经后骨质疏松症模型大鼠生化指标的影响 [J]. 山西中医,2012,28(10):43-46.
- [15] 孙纪元,王四旺,谢艳华,等. 染料木素对去卵巢大鼠骨代谢的影响[J]. 华西药学杂志,2003,18(6):403-406.
- [16] KESTLER H A, KUHL M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signaling network[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,2008,363(1495):1333-1347.
- [17] 刘厚琴,王毅. WNT 信号通路研究进展[J]. 社区医学杂志,2015,13(5):15-19.
- [18] SHI Y C, WORTON L, ESTEHEEN L, et al. Effects of continuous activation of vitamin D and Wnt response pathways on osteoblastic proliferation and differentiation [J]. Bone,2007,41(1):87-96.
- [19] TAURIN S, SANDBO N, QIN Y, et al. Phosphorylation of β -catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase [J]. J Biol Chem,2006,281(15):9971-9976.
- [20] MATSUBAYASHI S, NAKASHIMA M, KUMAGAI K, et al. Immunohistochemical analyses of β -catenin and cyclin D1 expression in giant cell tumor of bone (GCTB):a possible role of Wnt pathway in GCTB tumorigenesis[J]. Pathol Res Pract,2009,205(9):626-633.