

# 补肾方含药血清处理的大鼠成骨细胞 miRNA 差异表达

梁兴伦<sup>1</sup>, 潘欣<sup>1</sup>, 曾思良<sup>1</sup>, 嵇承栋<sup>1</sup>, 周文锐<sup>1</sup>, 李琛<sup>1</sup>, 朱敏洁<sup>1</sup>,  
刘传颂<sup>1</sup>, 周文博<sup>1</sup>, 许诚<sup>1</sup>, 钱淑雯<sup>1</sup>, 于德华<sup>1</sup>, 张韶伟<sup>2</sup>, 朱卫红<sup>2</sup>

(1. 同济大学附属杨浦医院, 上海 200090; 2. 上海市杨浦区定海社区卫生服务中心, 上海 200090)

**[摘要]**目的 筛选补肾方含药血清干预的大鼠成骨细胞中差异表达的 miRNA, 为补肾方治疗骨质疏松症提供可供选择的靶点 miRNA, 以探讨其通过调控靶基因表达发挥治疗效应的机制。方法 经细胞性状鉴定的原代大鼠成骨细胞用含药血清干预, 采用 miRNA 芯片检测补肾方含药血清干预 3 d 与干预 1 d 的成骨细胞 miRNA 表达水平, 并挑选差异表达 2 倍以上的 miRNA 进行定量 PCR 验证。结果 培养的原代细胞具有典型的成骨细胞性状特征。与对照血清相比, 补肾方含药血清干预 3 d 的成骨细胞共有 24 个 2 倍以上表达差异的 miRNA, 其中上调的 16 个, 下调的 8 个。差异表达 2 倍以上的 miRNA 定量 PCR 结果与芯片数据一致。结论 补肾方通过成骨细胞中差异表达的 miRNA 调控靶基因改善骨质疏松症。

**[关键词]**miRNA 芯片; 补肾方; 成骨细胞; miRNA; 差异表达

**[中图分类号]**R285.5 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2017.04.021

中医学在防治骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 方面历史悠久, 同时对 OP 伴发的慢性疼痛、心悸失眠、抑郁、不良情绪、新陈代谢紊乱等一系列临床综合征的治疗均有一定疗效。同济大学附属杨浦医院老年科在中医“肾藏精, 主骨生髓”理论指导下, 根据“血瘀”“肾虚”证候, 采用熟地黄、菟丝子、牛膝、龟板胶、鹿角胶、山药、山茱萸、枸杞子、淫羊藿和女贞子 10 味中药配伍研制了补肾方 (由上海荣庆堂药店煎制加工成汤剂), 长期施用于临床 OP 患者, 在改善中老年 OP 患者症状, 增加骨密度方面取得了较好的疗效<sup>[1]</sup>。

由于补肾方成分复杂多样, 其改善骨质疏松症的分子机制尚未明确。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类广泛分布于真核生物中的具有调控基因表达作用的非编码的小分子 RNA, 长度为 18~25 个核苷酸。miRNA 具有最广泛的基因调节功能, 它能对生长、分化、凋亡及应激反应各个基因活动层面进行调节, 同时参与早期胚胎发育、细胞增殖、细胞凋亡、细胞死亡、脂肪代谢、干细胞分化等重要生命进程<sup>[2]</sup>。本研究采用 miRNA 芯片研究补肾方含药血清干预大鼠成骨细胞后 miRNA 的表达变化, 探讨 miRNA 与 OP 发生的关系, 为补肾方治疗 OP 的分子机制提供依据。

**基金项目:**国家自然科学基金项目 (81173312, 30972633); 国家重点基础研究发展计划 (2013CB531601); 上海市卫生和计划生育委员会科研项目 (201640253)

**作者简介:**梁兴伦 (1965-), 男, 博士, 主任医师

**通信作者:**潘欣, [xinpanpx@163.com](mailto:xinpanpx@163.com)

## 1 材料和方法

**1.1 大鼠成骨细胞培养** 1~5 日龄 SD 大鼠乳鼠 [上海第二军医大学动物实验中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2012-0003] 20 只, 无菌分离颅盖骨, 0.25% 胰酶 37℃ 消化 30 min, 以消化去除骨表面组织细胞; 再转入 2 mg/mL 的 I 型胶原酶中, 剪碎, 37℃ 继续消化 2 h, 用 PBS 洗 1 次, 去除 I 型胶原酶, 以低糖 DMEM 培养液重悬细胞, 过 100 μm 细胞滤网。细胞悬液补充含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的低糖 DMEM 培养液, 培养于含 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的 37℃ 的培养箱内。6 h 后换液, 以后每 2 d 换液 1 次。7 d 后行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色。

### 1.2 成骨细胞鉴定

**1.2.1 碱性磷酸酶细胞化学染色** 培养 10 d 的原代细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 蒸馏水清洗 2 次, 按照 Vector Laboratories 公司 (美国) 的 Vector blue alkaline phosphatase substrate (蓝色碱性磷酸酶底物) 试剂盒说明书进行染色, 显微镜下检测。

**1.2.2 茜素红染色** 培养 14 d 的原代细胞用 95% 乙醇室温固定 15 min, 蒸馏水洗后, 用 0.1% 茜素红染液于 37℃ 染色 30 min, 蒸馏水洗去浮色后, 显微镜下检测。

**1.2.3 I 型胶原免疫荧光染色** 细胞爬片与免疫荧光染色方法依本项目已建立的方法<sup>[1]</sup>执行, 其中 I 型胶原兔抗大鼠一抗用 PBS 按 1:500 稀释。

**1.3 miRNA 芯片分析** 含药血清干预成骨细胞、细胞 RNA 制备与定量参照本项目已建立的方法<sup>[1]</sup>

执行。Affymetrix Gene Chip miRNA 4.0 Array 芯片的标记、杂交按照 Affymetrix 公司 miRNA 芯片试剂盒说明书进行。采用 Partek 软件完成各组芯片表达数据的比较。

1.4 miRNA 表达的定量 PCR 验证 从上调或下调 4 倍以上差异表达的 miRNA 中各挑选一个(上调的 miRNA 选择 rno-miR-212, 下调的 miRNA 选择 rno-miR-28)进行验证, U6snRNA 设为内参基因。引物为广东省广州市锐博生物科技有限公司产品, rno-miR-212 引物编号为 miRQ0000883-1-1, rno-miR-322 引物编号为 miRQ0001619-1-1, U6 引物编号为 MQP-0202, 采用该公司的 Bulge-Loop miRNA qRT-PCR 引物试剂盒完成 PCR 反应, 反应条件依产品说明书进行。

1.5 统计学方法 使用 SAS 4.0 软件对数据进行统计分析。连续型变量以“均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )”表示。两组均数比较采用独立样本  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大鼠成骨细胞原代培养的活细胞观察 大鼠原代成骨细胞培养 72 h 后呈多形性(图 1A), 有较多突起。HE 染色显示细胞核内有 1~2 个核仁(图 1B)。



图1 大鼠原代成骨细胞(A)和 HE 染色的原代成骨细胞(B)

2.2 成骨细胞性状鉴定 碱性磷酸酶染色可见细胞呈现深蓝色(图 2A); 茜素红染色可见胞内沉积钙与茜素红反应, 得到红染阳性结果, 可见矿化结节形成(图 2B); I 型胶原免疫荧光法染色可见胞质中呈现红色(红色荧光通道示 I 型胶原, 蓝色荧光通道示细胞核, 明场示细胞轮廓融合), 为强阳性反应(图 2C)。

2.3 miRNA 芯片分析 分别将补肾方含药血清或对照血清干预成骨细胞 1 d 和 3 d, 得到 miRNA, 分别杂交 2 张芯片。采用 Partek 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 结果(见图 3)显示, 补肾方含药血清处理成骨细胞 1 d 的 2 张芯片(蓝点)之间重复样本数据的均一性较好, 与补肾方含药血清处理成骨细胞 3 d 芯片数据(红点,

均一性好)之间差异较大。而对照血清处理成骨细胞 1 d 的 2 张芯片(蓝圈, 均一性好)与处理 3 d 的芯片(红圈, 均一性好)之间差异较小。提示实验设计较为合理。

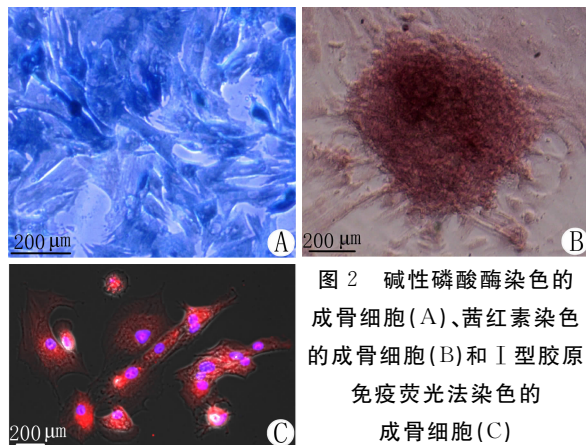


图2 碱性磷酸酶染色的成骨细胞(A)、茜素红染色的成骨细胞(B)和 I 型胶原免疫荧光法染色的成骨细胞(C)

图 4 为 miRNA 芯片数据差异表达的火山图( $x$  轴示数据组比较后表达差异倍数变化的  $\log_2$  转换值,  $y$  轴示数据组间  $t$  检验分析得到的  $P$  值的负常用对数值), 提示补肾方含药血清处理组与对照血清处理组数据经比较后存在 2 倍以上上调或下调表达的基因, 且这种差异有统计学意义。

图 5 为 miRNA 差异表达的聚类分析, 其中红色代表 miRNA 表达升高, 蓝色代表 miRNA 表达降低, 绿色表示表达无变化。根据上调或下调 2 倍以上和  $P < 0.05$  的标准, 得到 16 个上调 miRNA 和 8 个下调 miRNA。

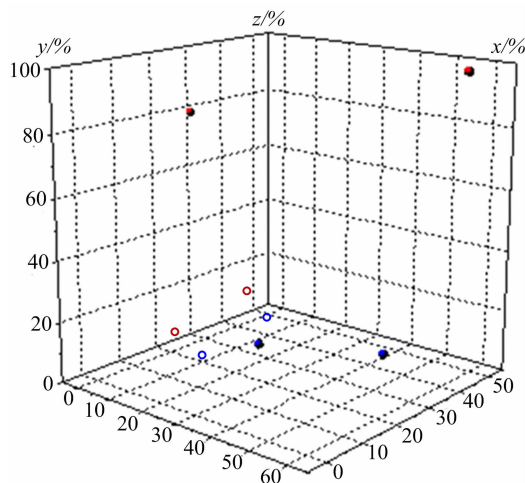


图3 补肾方含药血清处理的成骨细胞 miRNA 表达谱的主成分分析

2.4 定量 PCR 验证 根据 miRNA 芯片分析结果, 在补肾方含药血清或对照血清处理成骨细胞 1 d 或 3 d 后, 分别用 rno-miR-212 和 rno-miR-322 的上下游引物检测两种 miRNA 的转录表达水平。图 6 结果显示, rno-miR-212 在补肾方含药血清处理成

骨细胞 3 d 后的转录表达水平是 1 d 的 4.15 倍 ( $P=0.000\ 3, t=20.56$ ), rno-miR-322 在补肾方含药血清处理成骨细胞 3 d 后的转录表达水平是 1 d 的 0.19 倍 ( $P=0.000\ 1, t=87.81$ )。结果提示与 miRNA 芯片差异变化趋势基本吻合, 芯片结果可信。

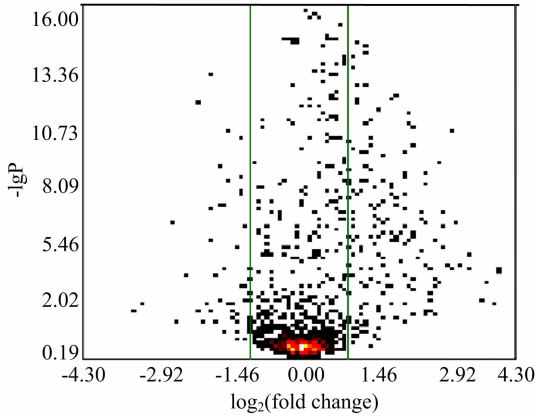


图 4 miRNA 芯片数据差异表达的火山图

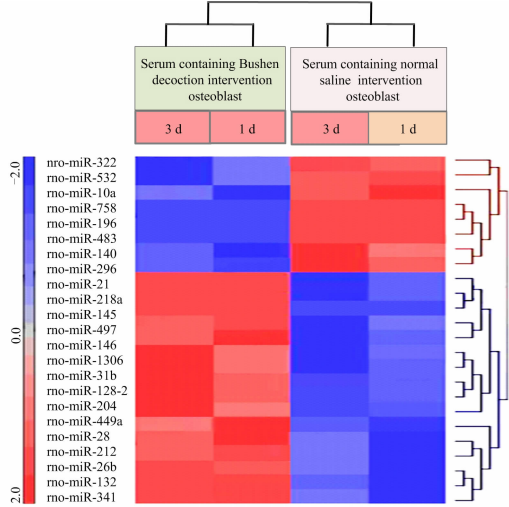


图 5 miRNA 芯片数据的聚类分析结果

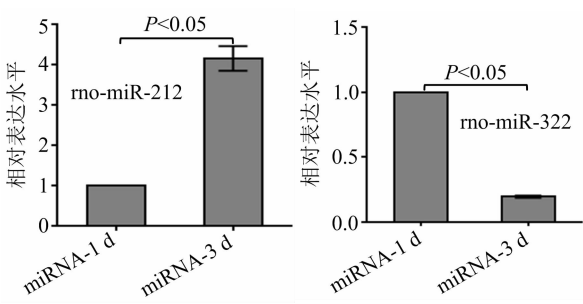


图 6 定量 PCR 验证补肾方含药血清处理的成骨细胞 miRNA 的差异表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3 讨论

临床观察显示, 补肾方可明显改善中老年骨质疏松症。由于其成分复杂, 以多靶点、多环节发挥作用见长。根据“全方→拆方→单味药有效成分→药物成分”的中药复方霰弹理论研究方法<sup>[3]</sup>, 课题组分

析认为, 补肾方中熟地黄为补肾的经典中药, 具有补血滋阴、益精填髓的作用。主治肝肾阴虚、腰膝酸软、骨蒸潮热、盗汗遗精、内热消渴、血虚萎黄、心悸怔忡、月经不调、崩漏下血、眩晕耳鸣、须发早白。在临床治疗骨质疏松症验方中高频出现, 梓醇、益母草苷、地黄苷 A、地黄苷 D 为其主要有效成分<sup>[4]</sup>。牛膝补肝肾、强筋骨、利尿通淋、逐瘀通经、引血下行。主治腰膝酸痛、筋骨无力、淋证、水肿、头痛、眩晕。其总皂苷、脱皮甾酮可促进成骨细胞增殖<sup>[5]</sup>。龟板胶主要成分为骨原胶, 可滋补肝肾之阴, 具有填精补髓之功, 可促进骨髓间充质干细胞增殖<sup>[6]</sup>。鹿角胶生精补髓、养血益阳、强筋健骨、散寒止痛<sup>[7]</sup>。淫羊藿为补骨壮阳中药, 可抑制骨髓间充质干细胞的成脂分化, 其黄酮类植物雌激素成分(如淫羊藿总黄酮、淫羊藿苷)是淫羊藿发挥抗骨质疏松症药理作用的主要有效成分。女贞子具有扶正固本、滋补肝肾、明目乌发之功效, 含有 100 多种化合物, 其中萜类(如齐墩果酸、熊果酸)、黄酮类是抗骨质疏松作用的主要成分<sup>[8]</sup>。山药中薯蓣皂苷元有利于成骨细胞的增殖和分化<sup>[9]</sup>。山茱萸为滋阴益肾中药, 山茱萸总苷可有效抑制骨丢失, 保存骨量<sup>[10]</sup>。枸杞子滋补肝肾, 益精明目, 枸杞多糖为其主要活性成分<sup>[11]</sup>。菟丝子温肾益精、养肝明目, 菟丝子黄酮为其主要有效成分, 可抑制骨量丢失, 改善骨密度<sup>[12]</sup>。

为进一步探讨补肾方治疗骨质疏松症的作用机制, 本研究用补肾方含药血清干预原代培养的成骨细胞, 通过 miRNA 芯片分析筛选出差异表达的 miRNA, 以期通过预测 miRNA 作用的靶基因及其参与的信号通路调节来理解补肾方通过 miRNA 调控靶基因的表达进而发挥治病效应。

ZHAO 等研究<sup>[13]</sup>显示, 与骨形成信号通路有关的 miRNA 主要有: Wnt 骨形成通路中的 miR-335-5p(Wnt 通路中降低 DKKK1 抑制因子水平, 增强 Wnt 信号)、miR-218(抑制 DKKK1 和 SOST, 增强 Wnt 通路)、miR-let-7f(调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 活性), BMP 骨分化通路中 miR-20a(负向调节 BMP 通路中抑制因子 Bambi 和 Crim1 的表达, 通过减少 PPAR $\gamma$  的表达降低软骨形成, 增强 BMP2、BMP4、Runx2、Osx/Sp7、Ocn 和 Opn 的表达促进骨形成)、miR-3960、miR-370、miR-17, Runx2 骨矿化通路中 miR-140(抑制 Runx2 通路中转录因子 HDAC4 表达, 促进软骨细胞和成骨细胞发育), Osterix(Osx) 骨矿化通路(Runx2 下游)中 miR-145 和 miR-143

与 *klf4* 和 *Osx* 构成的反馈回路,Notch 细胞接触通路中 *miR-34c*(骨稳态中调节成骨细胞发生),*FoxO* 氧化应激通路(诱导年龄相关的骨丢失)中 *miR-182* (过表达可促进成骨细胞凋亡,抑制成骨细胞分化)。

本研究用补肾方含药血清或对照血清分别干预经细胞性状鉴定过的成骨细胞,经 *miRNA* 芯片筛选,获得 2 倍以上表达变化的 *miRNA* 共计 24 个,其中上调的 16 个,下调的 8 个。分别从上调或下调 2 倍以上的 *miRNA* 中各选 1 个行荧光定量 RT-PCR 验证,提示芯片数据结果可信。

本研究中,16 个表达水平上调 2 倍以上的 *miRNA* 是 *rno-miR-296*、-21、-218a、-145、-497、-146、-1306、-31b、-128-2、-204、-449a、-28、-212、-26b、-132、和-341。这些上调表达的 *miRNA* 与前述提到的骨形成通路中 *miRNA* 不同,可能为补肾方所特别激发的。

下一步工作将预测差异表达 *miRNA* 的靶基因,在成骨细胞模型上研究 *miRNA* 干预对靶基因表达的影响,探索补肾方通过干预 *miRNA* 调节靶基因表达在骨发育、骨形态发生、骨吸收中的分子作用机制。

#### 参考文献:

- [1] 潘欣,梁兴伦,曾思良,等. 补肾方含药血清干预大鼠椎间盘软骨细胞 *miRNA* 的差异表达[J]. 上海中医药杂志,2016,50(1):71-76.
- [2] MISHRA S, SRIVASTAVA A K, SUMAN S, et al. Circulating *miRNAs* revealed as surrogate molecular signatures for the early detection of breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2015,369(1):67-75.
- [3] 赵立春,薛燕. 中药复方化学研究之霰弹靶点理论[C]// 中华中医药学会中药基础理论分会第二届临床中药学

学术会议论文集. 南宁:中华中医药学会中药基础理论分会,2009:479-482.

- [4] 刘振海,刘红,王少君,等. 防治骨质疏松症常用单味中药实验研究概况[J]. 环球中医药,2013,6(6):473-479.
- [5] 卞玉群,李超,樊巧玲. 补肾方药诱导 BMSCs 骨向分化的研究述评[J]. 中医学报,2014,29(5):692-694.
- [6] 陈凯佳. 中医五脏相关理论探讨及补脾益肾法对大鼠 MSCs 增殖和分化的影响[D]. 广州:广州中医药大学,2006.
- [7] 邓伟民,邵玉,张金玉,等. 补肾壮骨冲剂治疗绝经后妇女骨质疏松疼痛的效果分析[J]. 广州中医药大学学报,2007,24(5):355-358.
- [8] 康学,刘仁慧,王秀娟. 淫羊藿、女贞子抗骨质疏松症的应用与机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):331-334.
- [9] 贾英民,李瑞玉,武密山,等. 补肾方药有效成分不同比例配伍对成骨细胞增殖和分化的影响[J]. 中国组织工程研究,2015,19(24):3773-3777.
- [10] MENG Q X, WANG B L, YU P, et al. Extract of *Cor-nus officinalis* SIEB ameliorates osteoporosis in spinal cord-injured rats[J]. *Chin J Osteoporos*, 2015,21(5):627-633.
- [11] 马锋,高俊,王一农,等. 枸杞多糖含药血清对 MC3T3-E1 细胞内  $Ca^{2+}$  及 I 型胶原蛋白合成的影响[J]. 中国组织工程研究,2012,16(20):3743-3746.
- [12] 李小林,武密山,朱紫薇,等. 去卵巢骨质疏松模型大鼠小肠钙结合蛋白 mRNA 表达与菟丝子黄酮的干预[J]. 中国组织工程研究,2014,18(27):4271-4276.
- [13] ZHAO X, XU D, LI Y, et al. MicroRNAs regulate bone metabolism[J]. *J Bone Miner Metab*, 2014,32(3):221-231.

(收稿日期:2017-02-08;编辑:姚实林)

## Differentially Expressed *miRNAs* in Rat Osteoblasts Treated by Serum Containing Bushen Prescription

LIANG Xing-lun<sup>1</sup>, PAN Xin<sup>1</sup>, ZENG Si-liang<sup>1</sup>, JI Cheng-dong<sup>1</sup>, ZHOU Wen-rui<sup>1</sup>, LI Chen<sup>1</sup>, ZHU Min-jie<sup>1</sup>, LIU Chuan-song<sup>1</sup>, ZHOU Wen-bo<sup>1</sup>, XU Cheng<sup>1</sup>, QIAN Shu-wen<sup>1</sup>, YU De-hua<sup>1</sup>, ZHANG Shao-wei<sup>2</sup>, ZHU Wei-hong<sup>2</sup>

(1. Yangpu Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200090, China; 2. Dinghai Community Health Service Center, Shanghai 200090, China)

**[Abstract] Objective** To investigate the differentially expressed *miRNAs* in rat osteoblasts treated by serum containing Bushen Prescription, the target *miRNAs* for the treatment of osteoporosis with Bushen Prescription, and mechanisms for the therapeutic effect of Bushen Prescription by regulating the expression of target genes. **Methods** Primary rat osteoblasts were treated by serum containing Bushen Prescription after identification. The *miRNA* microarray was used to measure the expression of *miRNAs* in osteoblasts treated by serum containing Bushen Prescription for 1 or 3 days, and real-time quantitative PCR was used to further validate the *miRNAs* which were  $> 2$ -fold differentially expressed between the two groups. **Results** The primary cultured

# 希望Ⅱ号对被动吸烟小鼠心脏的保护作用

张睿<sup>1</sup>,彭金娥<sup>1</sup>,王湘<sup>1</sup>,冯玄烨<sup>1</sup>,刘琳琳<sup>1</sup>,戴宁<sup>1</sup>,冯丽莉<sup>1</sup>,孙燕<sup>1</sup>,赵欣<sup>2</sup>,蔡大勇<sup>2</sup>,王玥琦<sup>1</sup>

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029; 2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

**[摘要]**目的 观察希望Ⅱ号对被动吸烟小鼠心脏的保护作用,并探究其作用机制。方法 将72只雄性昆明种小鼠随机分为6组,分别为对照组,模型组,阳性药组,希望Ⅱ号低、中、高剂量组。对照组暴露于实验室空气中,模型组每日暴露于香烟烟雾3 h,持续45 d,至第16天开始给药,第45天处死小鼠,分离心脏。检测心脏丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、铜锌超氧化物歧化酶(copper-zinc superoxide dismutase, Cu-ZnSOD)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性。进行心脏组织形态学观察,计算心脏胶原纤维面积比,采用免疫组织化学法检测心脏转化生长因子 $\beta_1$ (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta_1$ )表达水平。结果 与对照组比较,模型组 Cu-ZnSOD、T-SOD 活性显著降低( $P<0.05$ ),MPO 活性和 MDA 含量显著升高( $P<0.05$ ),心肌纤维比显著增加( $P<0.05$ ),心脏 TGF- $\beta_1$  表达水平显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,希望Ⅱ号低、中、高剂量组 Cu-ZnSOD、T-SOD 活性显著升高( $P<0.05$ ),MPO 活性、MDA 含量、心肌纤维比、心脏 TGF- $\beta_1$  表达水平显著降低( $P<0.05$ )。结论 希望Ⅱ号对被动吸烟小鼠心脏的保护作用与调节心脏氧化应激反应有关。

**[关键词]**希望Ⅱ号;被动吸烟;心肌损伤;抗氧化酶;氧化应激反应;转化生长因子- $\beta_1$

**[中图分类号]**R285.5 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2017.04.022

据 WHO 统计,中国是世界最大的香烟生产国和消费国,烟民超过 3 亿人,被动吸烟者约有 7.4 亿人<sup>[1]</sup>。香烟经燃烧后形成固体小颗粒,可使封闭环境的 PM<sub>2.5</sub> 显著上升,其在空气中含量浓度越高,就代表空气污染越严重<sup>[2]</sup>。由空气污染(包括接触二手烟草烟雾)造成的非传染性疾病死亡人数目前高达 820 万人<sup>[3]</sup>。二手烟暴露情况十分严重,每年中国由二手烟所导致的死亡人数估计为 10 万人次<sup>[4]</sup>。然而,人们对被动吸烟,即吸二手烟的重视程度并不够。中国人群二手烟暴露率呈现上升趋势<sup>[5]</sup>,因此,研究被动吸烟具有社会意义,又因被动吸烟与心脏病发生直接相关,故研究被动吸烟损伤心脏的机制具有科学意义。

希望Ⅱ号由《太平惠民和剂局方》中预知子圆衍化而来<sup>[6]</sup>,具有补益精血、滋阴填精的功效。本研究

以小鼠暴露于香烟烟雾中复制被动吸烟模型,探究希望Ⅱ号防止心肌损伤的作用机制。

- 1 材料
- 1.1 动物及分组 健康雄性昆明小鼠[北京市维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2014-0006]72 只,体质量 18~20 g。动物饲养于清洁级动物房,自然光照,室温 20~26 ℃,湿度 40%~70%,自由摄食、饮水。
- 1.2 主要设备 MK3 型酶标仪:赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;SleeMPS/P2 型包埋机:德国 SLEE 公司;RM2245 型切片机:德国 Leica;全自动数字切片扫描系统 KF-PRO-005 型:宁波江丰生物信息技术有限公司;自制有机玻璃烟草烟雾暴露箱(60 cm×50 cm×40 cm),上端密封,侧面开通风口。
- 1.3 试剂药品 希望Ⅱ号(由枸杞子和黄精按质量比 2:1 组成):北京中医药大学中医学院中医药基础理论与关键技术研究提供;大前门牌香烟:焦油含量 11 mg,烟气碱含量 0.8 mg,烟气中一氧化碳含量 13 mg,上海烟草集团有限公司;原花青素:每

**基金项目:**北京中医药大学创新团队项目(2011-CXTD-04)  
**作者简介:**张睿(1988-),男,硕士研究生  
**通信作者:**王玥琦,yueqiawang@gmail.com

osteoblasts had the typical properties of osteoblasts. A total of 24 miRNAs were >2-fold differentially expressed between the two groups, and compared with the control serum group, the serum containing Bushen Prescription had 16 up-regulated miRNAs and 8 down-regulated miRNAs. The real-time PCR results for these 24 miRNAs were consistent with the microarray results. **Conclusion** Bushen Prescription can regulate target genes via differentially expressed miRNAs in osteoblasts and thus improve osteoporosis.

**[Key words]**miRNA microarray; Bushen Prescription; Osteoblast; miRNA; Differential expression