

低氧诱导自噬促进T2DM大鼠骨折愈合

沈佳康, 李 腾*, 赵志坚, 陈坤峰, 徐继胜

商丘市第一人民医院急诊外科, 河南 商丘

收稿日期: 2025年4月28日; 录用日期: 2025年5月21日; 发布日期: 2025年5月29日

摘 要

目的: 研究低氧状态下自噬对2型糖尿病(Diabetes mellitus type 2, T2DM)合并股骨骨折大鼠模型不同时间点的骨折愈合程度及低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、Runx-相关转录因子-2 (Runx2)、微管相关蛋白1A/1B-轻链3 (LC3II/I)表达情况。方法: 大鼠随机分为高糖高脂饲养前(Control)组、高糖高脂饲养8周后(HFD)组及T2DM模型(T2DM)组, 采用高糖高脂饲料联合链脲佐菌素制备T2DM模型, 在T2DM模型基础上制作股骨骨折模型。实验大鼠分为对照组(T2DM合并股骨骨折模型组, Model)及治疗组(氯化钴(CoCl₂)治疗的T2DM合并股骨骨折模型组, Treatment), 根据检测时间点每组继续分为造模后7 d、28 d、42 d的三个亚组。X线评估股骨愈合情况, WB检测HIF-1 α 、ALP、Runx2、LC3II/I表达。结果: T2DM合并股骨骨折模型随时间的增长, 治疗组在第28 d相比于对照组已有较好的恢复, 骨组织中ALP、Runx2表达增加, 自噬蛋白LC3II/I的检测结果随时间增长自噬水平有所减弱。结论: 低氧可以诱导自噬来促进T2DM大鼠骨折愈合。

关键词

低氧, 自噬, 骨折愈合, T2DM合并骨折, 低氧诱导因子

Hypoxia-Induced Autophagy Promotes Fracture Healing in Type 2 Diabetes Mellitus Rats

Jiakang Shen, Teng Li*, Zhijian Zhao, Kunfeng Chen, Jisheng Xu

Department of Emergency Surgery, The First People's Hospital of Shangqiu, Shangqiu Henan

Received: Apr. 28th, 2025; accepted: May 21st, 2025; published: May 29th, 2025

Abstract

Objective: To investigate fracture healing and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), alkaline

*通讯作者。

文章引用: 沈佳康, 李腾, 赵志坚, 陈坤峰, 徐继胜. 低氧诱导自噬促进 T2DM 大鼠骨折愈合[J]. 临床医学进展, 2025, 15(5): 2239-2246. DOI: 10.12677/acm.2025.1551614

phosphatase (ALP), runt-related transcription factor 2 (Runx2), and microtubule associated protein-II/I (LC3II/I) expression at different time points in T2DM rats with femoral fracture under hypoxic conditions. **Methods:** The rats were randomly divided into high-sugar and high-fat pre-feeding groups, high-sugar and high-fat feeding groups after 8 weeks of feeding and a T2DM model group, T2DM was prepared with high-glucose and high-fat diet combined with streptavidin. Femoral fractures were modeled on the basis of T2DM. Experimental rats were divided into a control group (T2DM with femoral fracture model group, Model) and a treatment group (CoCl₂ treatment group, Treatment) and continued to be divided into three subgroups on days 7, 28, and 42 post-molecularization for each group at the time of measurement. Femoral healing was assessed by X-ray. HIF-1 α , ALP, Runx2, and LC3II/I expression was measured by Western blotting. **Result:** In the T2DM combined femoral fracture model, as time progresses, the treatment group shows better recovery compared to the control group at day 28. The expression of ALP and Runx2 in bone tissue increases, and the detection results of autophagy protein LC3II/I indicate that autophagy levels weaken over time. **Conclusion:** Hypoxia can induce autophagy to promote fracture healing in T2DM rats.

Keywords

Hypoxia, Autophagy, Fracture Healing, T2DM with fracture, Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α)

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

发生骨折时, 骨折端局部产生的低氧环境可以检测出低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)-1 α [1], 有研究表明[2] HIF-1 α 不仅能够诱导断端的骨髓间充质干细胞发生迁移, 并且能够抑制成骨细胞转换, 在骨折愈合早期积累大量成骨细胞, 帮助骨折处愈合[3]。自噬是体内一种复杂的调节方式, 在低氧等应激环境时参与受损细胞器和线粒体的溶酶体降解。而对于发生骨折的糖尿病患者, 体内的高糖环境会阻碍成骨细胞的活力和功能, 影响骨折愈合进程, 近来一些学者[4]认为, 自噬是在高糖环境中维持成骨细胞活力和功能的重要机制。但目前关于低氧条件下机体是否通过自噬对高糖环境下骨折愈合进行调节的研究证据尚不明确, 本研究通过对大鼠空腔糖耐量(IPGTT)及胰岛素敏感性指数(ISI)进行检测, 建立糖尿病大鼠骨折模型, 通过皮下注射氯化钴(CoCl₂)制造低氧环境, 对比术后 7 d、28 d 及 42 d 对照组和治疗组低氧诱导因子(HIF-1 α)表达情况及 X 线中骨折愈合的程度评价低氧对骨折愈合的影响, WB 检测自噬标志物(ALP、Runx2、LC3II/I)表达, 对不同时间节点下两组 T2DM 大鼠骨折自噬水平进行检测, 探讨高糖环境中自噬对骨折愈合的影响及机制, 为临床上治疗合并 2 型糖尿病的骨折患者提供新的思路和方法。

2. 材料及方法

2.1. 伦理声明

本研究方案已取得商丘市第一人民医院伦理委员会批准, 本实验严格遵守国际通行的动物福利及伦理准则, 贯彻执行国家有关实验动物管理法律、法规和政策。伦理号 202030301。

2.2. 实验试剂和仪器

Wistar 雄性大鼠 200 g 左右, 共 60 只, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司; 链脲佐菌素(源叶生物, 18883-66-4); CoCl₂ (SIGMA, MKCL2511); 氯化钴(CoCl₂) (美国 Sigma 公司); 大鼠胰岛素(INS)试剂盒

(MM-0587R1, 酶免); Mouse Anti-GAPDH (HC301, TransGen Biotech, 1/2000); HRP conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H + L) (GB23301, Servicebio, 1/2000); Rabbit Anti ALP (DF6225, Affinity, 1/500); Rabbit Anti Runx2 (AF5186, Affinity, 1/1000); Rabbit Anti LC3 (#12741, CST, 1/500); HRP conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) (GB23303, Servicebio, 1/2000); 血常规检测仪(KT-6610VET, 锦瑞); 全自动酶标仪(WD-2102B, 六一)。

2.3. T2DM 大鼠模型的建立

大鼠适应性饲养 7 d, 适应性饲养结束前, 检测大鼠空腹血糖(FPG)、空腹血清胰岛素(FINS), 计算胰岛素敏感性指数($ISI = 1/(FPG * FINS)$)和进行腹腔注射糖耐量试验(IPGTT)。空腹血糖 $< 7.0 \text{ mmol/L}$ 者入选实验。适应性饲养结束后, 大鼠随机分为高糖高脂饲养前(Control)组、高糖高脂饲养 8 周后(HFD)组及 T2DM 模型(T2DM)组, HFD 组采用高糖高脂饲料连续饲养 8 周, 期间自由饮水采食。高糖高脂饲料饲喂结束前, 检测大鼠 FPG、FINS, 计算 ISI, 进行 IPGTT 实验。高糖高脂饲料饲喂结束后, 在非空腹状态下, 按照大鼠体重一次性腹腔注射 30 mg/Kg 2%链脲佐菌素(STZ), 72 h 内监测随机血糖, 随机血糖值高于 30 mmol/L 者腹腔注射胰岛素 $1 \sim 2 \text{ U/Kg}$; 血糖值过低(尤其出现精神萎靡症状)注射葡萄糖溶液。1 周后检测 FPG, 空腹血糖 $\geq 7.0 \text{ mmol/L}$ 即为成功 T2DM 组模型。成功模型检测 FINS, 计算 ISI, 进行 IPGTT 实验。

2.4. 胰岛素敏感性指数(ISI)计算

高糖高脂饲养前(Model)组、高糖高脂饲养 8 周后(HFD)组及 T2DM 模型(T2DM)组构建后, 分别采集大鼠空腹 12 h 后血清, 检测空腹血糖(FPG), ELISA 检测血清胰岛素(FINS)含量, 计算胰岛素敏感性指数($ISI = 1/(FPG * FINS)$)。

2.5. 空腹糖耐量(IPGTT)检测

高糖高脂饲养前(Control)组、高糖高脂饲养 8 周后(HFD)组及 T2DM 模型(T2DM)组构建后分别做空腹糖耐量检测, 其中 T2DM 模型组给予高糖高脂饲养 8 周, 非空腹下给予 1 次性腹腔注射 30 mg/kg 的 2% STZ (链脲佐菌), 分别使大鼠空腹 12 h 后腹腔注射 2 g/kg 的葡萄糖, 在注射后的 0、15、30、60、90、120 min 检测血糖[5]。

2.6. 动物分组

通过检测大鼠 FPG、FINS, 计算 ISI 及 IPGTT, 确定 T2DM 大鼠模型[6]。共 14 只实验室大鼠成模。成功成模的 T2DM 大鼠构建 T2DM 合并股骨骨折模型[7], 术前 1 周, 所有的大鼠按照实验分组分笼, 均饲养在同一环境下。手术时, 所有的大鼠均采用乙醚吸入基础麻醉后, 再用 10%水合氯醛(150 mg/Kg)腹腔注射麻醉, 麻醉生效后, 将大鼠右侧卧位, 充分显露左侧下肢, 一次性备皮刀备皮后, 以 5%碘酊, 75%酒精常规消毒左下肢, 在外侧沿股骨表面, 自左侧髌部至左膝部切开皮肤, 钝性分离皮下筋膜、肌肉, 用骨剥离分离股骨表面软组织, 充分显露股骨干, 于股骨骨干中部用 3.0 线锯横行锯断股骨, 造成股骨干横行骨折, 然后使用 1.0 克氏针。行股骨骨折髓内固定, 检查骨折端对位良好, 无移位及成角后, 3-0 不可吸收缝线。逐层缝合伤口。术后 3 天内, 所有动物局部注射青霉素注射液 40 万单位/只, 预防感染。14 只 T2DM 大鼠模型随机分为对照组(T2DM 合并股骨骨折模型组, Model)及治疗组(氯化钴(CoCl_2)治疗的 T2DM 合并股骨骨折模型组, Treatment), 治疗组大鼠给予 15 mg/kg 的 CoCl_2 皮下注射处理, 每天 1 次连续 7 d。

2.7. X 线检测

在术后第 7 d、28 d、42 d 分别做 X 线检测骨愈合情况, 取术后不同时期股骨骨折的骨组织样本。根据

Walker EC [8]骨痂体积的测算方法，测量骨痂体积百分比(percent bone volume)，进而评价骨折愈合质量。

2.8. 蛋白免疫印迹法(Western Blotting, WB)检测

使用 WB 检测法检测 HIF-1 α 及自噬标志物 ALP、Runx2、LC3II/I 表达。即取 50 mg 的骨组织样本于离心管内，加入 1 mL 的裂解液，研磨充分后离心取上清，取上清液。加入缓冲溶液，煮沸 5 min。用 BCA 蛋白质定量试剂盒检测细胞上清中蛋白质浓度，绘制标准曲线。制作 SDS-PAGE 胶，上样，开始跑胶，电泳 60 V 压缩蛋白，80 V 分离蛋白，当条带跑至胶板一半的时候配置 1 $\times$ 转膜液，并预冷。根据预计条带的位置裁剪好 PVDF 膜(约 1~2 cm)，甲醇激活 15 s。切好大小合适含有内参或目的条带的胶，放好“三明治”(海绵-滤纸-胶-膜-滤纸-海绵)，用 1 $\times$ 转膜液将“三明治”浸没，用 300 mA 恒流转膜。用 1 $\times$ TBST 配置 3%的脱脂牛奶封闭液，封闭 1 h。将 PVDF 膜孵育一抗过夜。洗膜，用 1 $\times$ TBST 浸泡 10 min 后弃掉，重复 3 次。将 PVDF 膜孵育二抗 2 h。洗膜，用 1 $\times$ TBST 浸泡 10 min 后弃掉，重复 3 次。用发光液浸湿 PVDF 膜后放置于超高灵敏度化学发光成像系统样品放置区运行程序显影成像。

2.9. 统计分析

应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。所有实验重复 3 次，定量结果采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。显著性分析采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法。

3. 实验结果

3.1. 高脂饲养及 T2DM 对胰岛素敏感性的影响

在高脂饲养前(Control)、高脂饲养后(HFD)及构建 T2DM 模型后检测空腹胰岛素含量，计算胰岛素敏感性指数($ISI = 1/FPG \times FINS$)，T2DM 组的 ISI 明显降低(见表 1)。

T2DM 组的 ISI 明显降低(见表 1)，与 Control、HFD 相比均有显著性($P < 0.05$) (见图 1)。

Table 1. Insulin sensitivity
表 1. 胰岛素敏感性

组别	数量(n)	FPG (mmol/L)	FINS (mU/L)	ISI
Control	18	5.19944 $\pm$ 0.50814	2.2631 $\pm$ 0.53696	0.0857 $\pm$ 0.01836
HFD	17	6.0059 $\pm$ 0.33066	3.6819 $\pm$ 3.11324	0.0608 $\pm$ 0.02432
T2DM	14	9.8429 $\pm$ 0.88380	1.9895 $\pm$ 1.57675	0.0380 $\pm$ 0.01647

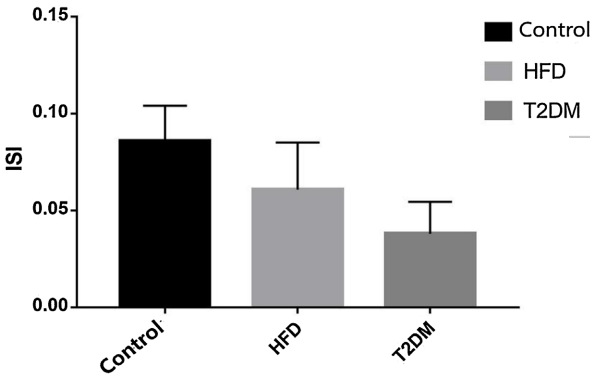


Figure 1. Insulin sensitivity index
图 1. 胰岛素敏感指数

3.2. 高脂饲养及 T2DM 空腹糖耐量(IGPTT)检测

在高脂饲养前(Control)、高脂饲养后(HFD)及构建 T2DM 模型后分别做空腔糖耐量检测。T2DM 模型构建后耐糖能力减弱, 0、15、30、60、90、120 min 与 Control、HFD 组均有显著差异($P < 0.05$), 见图 2。

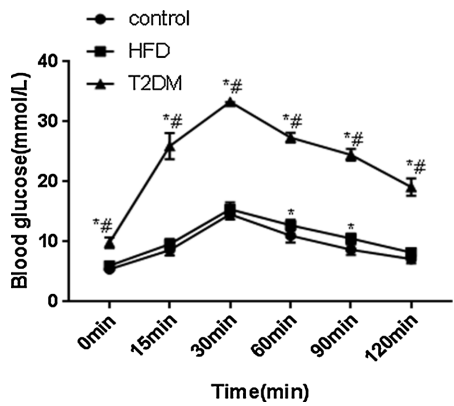
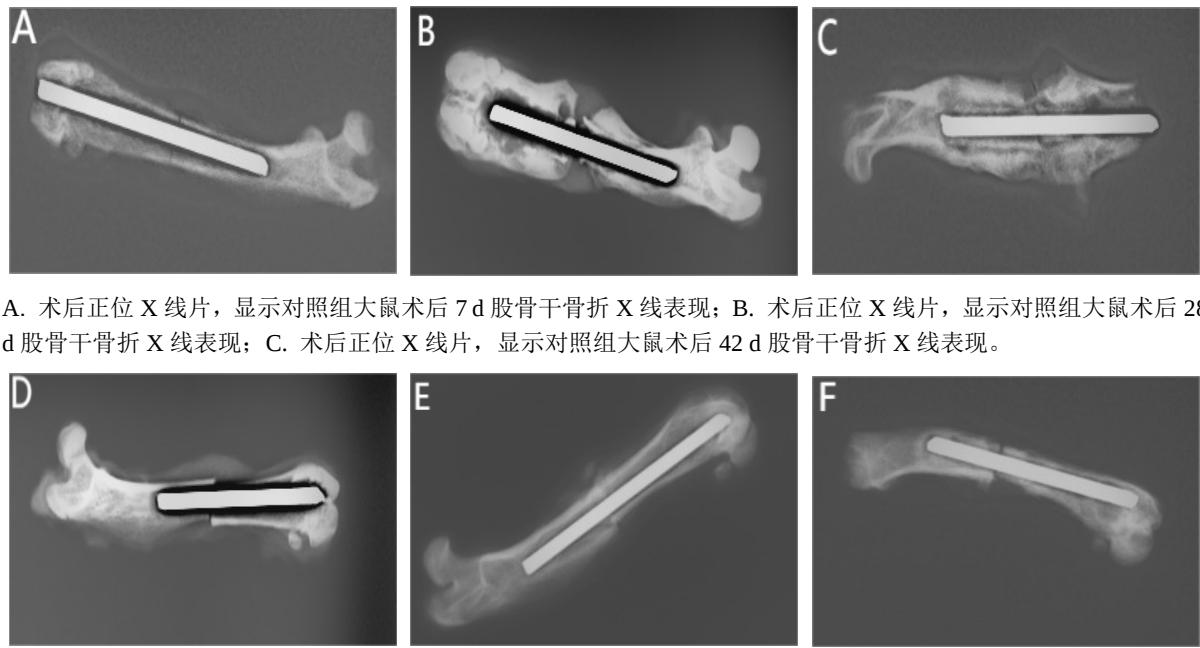


Figure 2. Glucose tolerance test
图 2. 糖耐量检测

3.3. CoCl₂ 治疗对骨愈合的影响



A. 术后正位 X 线片, 显示对照组大鼠术后 7 d 股骨干骨折 X 线表现; B. 术后正位 X 线片, 显示对照组大鼠术后 28 d 股骨干骨折 X 线表现; C. 术后正位 X 线片, 显示对照组大鼠术后 42 d 股骨干骨折 X 线表现。

D. 术后正位 X 线片, 显示治疗组大鼠术后 7 d 股骨干骨折 X 线表现; E. 术后正位 X 线片, 显示治疗组大鼠术后 28 d 股骨干骨折 X 线表现; F. 术后正位 X 线片, 显示治疗组大鼠术 42 d 股骨干骨折 X 线表现。

Figure 3. X-ray examination
图 3. X 线检查

术后 7 d, X 线检查显示治疗组有少量骨痂, 对照组未发现(见图 3), 差异具有统计学差异($P < 0.05$); 术后 28 d 对照组和治疗组 X 线测量的骨痂体积均较 7 d 时增加, 且差异有统计学差异($P < 0.05$), 同时, 在骨折的 28 d 对照组存在骨缺损, 术后 28 d 治疗组的骨痂体积比对照组骨痂体积大, 此差异具有统计学差异(P

< 0.05); 42 d 时, 对照组和治疗组在 X 线片上测量的骨痂体积均较 28 d 有所增长, 且差异均具有统计学差异($P < 0.05$), 同时, 术后 42 d 时, 治疗组较对照组骨痂体积更大, 此差异具有统计学差异($P < 0.05$) (见图 4)。

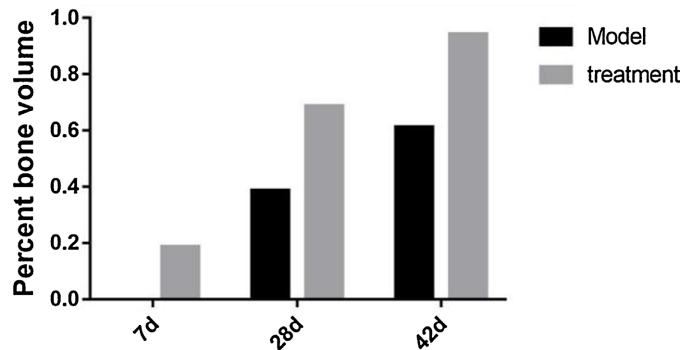


Figure 4. Percentage of callus volume
图 4. 骨痂体积百分比

3.4. 两组骨痂组织中 HIF-1 α 表达水平检测

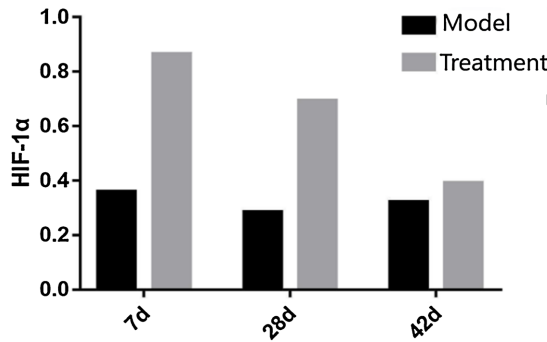


Figure 5. The expression level of HIF-1 α
图 5. HIF-1 α 表达水平

在第 7 d 及 28 d 时检测治疗组 HIF-1 α 蛋白表达水平较对照组显著增加($P < 0.05$), 在 42 d 时两组差异不明显($P > 0.05$) (见图 5)。

3.5. CoCl₂ 治疗对 ALP、Runx2、LC3II/I 表达影响

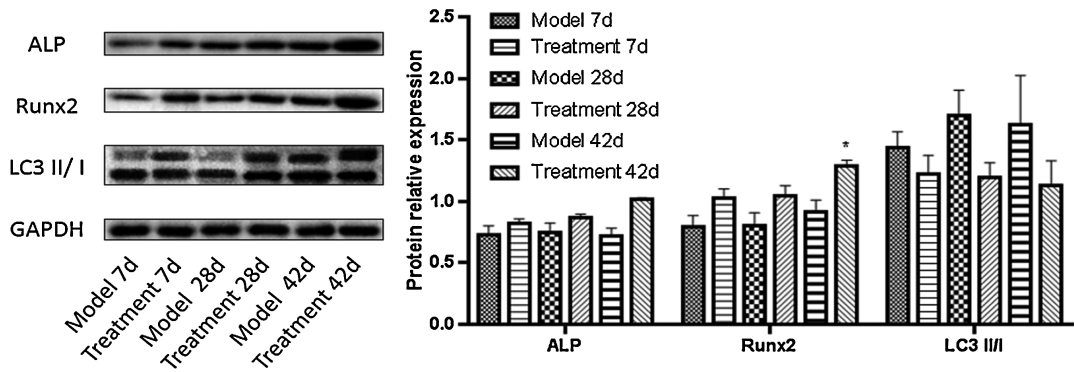


Figure 6. Detect the expression levels of ALP, Runx2, and LC3II/I by Western Blot (WB)
图 6. WB 检测 ALP、Runx2、LC3II/I 的表达情况

通过蛋白免疫印迹法检测不同时间点骨样本中 ALP、Runx2、LC3II/I 的表达。随时间增长 ALP、Runx2 蛋白的表达均为上升趋势, 且在治疗组中表达高于对照组, 差异具有显著性($P < 0.05$)。自噬蛋白 LC3II/I 的检测结果随时间增长自噬水平有所减弱, 在治疗组中表达低于对照组, 差异具有显著性($P < 0.05$) (见图 6)。

4. 讨论

本实验中通过对大鼠空腔糖耐量(IPGTT)及胰岛素敏感性指数(ISI)进行检测, 筛选出符合条件的 T2DM 大鼠模型, 将建立的糖尿病大鼠骨折模型随机分为对照组及治疗组。通过对治疗组皮下注射 CoCl_2 模拟低氧环境, 检测出低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)-1 α 过表达。已有研究发现过表达的 HIF-1 α 在促进骨折愈合中占据重要地位[9], 但具体机制仍然不明确。有可能的机制是[10] HIF-1 α 通过上调成骨细胞因子 Runx2 和调节 microRNAs 的表达, 促进 VEGF 的表达从而促进骨痂中血管的生长, 同时通过成骨-血管生成偶联, 对成骨细胞、破骨细胞等骨系细胞进行直接调控, 从而达到促进骨折愈合的作用。本研究发现 CoCl_2 治疗组大鼠 HIF-1 α 的表达较对照组明显增加, 联系术后 7 d、28 d 及 42 d 治疗组 X 线检查骨折愈合的程度相比于对照组也有较好的恢复, 且结果具有统计学意义, 再次证明了低氧环境可以促进骨折的愈合。

此前我们的研究[11][12]已经证明了自噬与骨折愈合的相关性, 在骨折等严重创伤时会引起局部和系统性的免疫反应, 如 IL-6、IL-8/IL-10 以及 HMGB1 等都显著增加。并且一定程度的自噬可以促进大鼠的骨折愈合。另外, 低氧环境可以诱导自噬已在多种领域得到证实[13][14], 我们猜想自噬在低氧促进愈合的机制中发挥作用。因此本研究中, 我们留意了检测骨折后不同时期自噬相关蛋白(ALP、Runx2、LC3II/I)表达水平。观察到 7 d 时治疗组大鼠的骨折处 ALP、Runx2 水平较对照组升高, X 线见骨折处骨痂明显形成, 在 28 d, 治疗组骨折端已有较好的恢复, 骨折线已基本连续, 并且检测到治疗组的自噬标志物同样地高于对照组, 这证明自噬水平在一定范围内的增强可促进糖尿病大鼠骨折愈合。42 d 时, 我们观察到 LC3II/I 有所下降, 推测骨折愈合、炎症因子等因素基本达到平衡, 低氧引起自噬的显著性降低。Zhang P 等人[15]通过抑制 TGF- β 1 信号增强自噬水平观察到糖尿病大鼠骨缺损的愈合增快。这也与我们观察到自噬帮助糖尿病大鼠骨折愈合的现象相一致。

综上证实低氧可以增加自噬水平促进骨折愈合, 但是本研究中尚不够深入, 具体的机制尚待下一步探究。

5. 结论

在本研究中, 我们发现低氧环境可以通过自噬一定程度上促进大鼠骨折的愈合程度, 并且可以促进合并有 2 型糖尿病大鼠的骨折愈合程度, 这为以后治疗合并 2 型糖尿病的骨折患者提供了新的治疗思路。但本研究仍不够深入, 需要我们进一步完善。

参考文献

- [1] Wang, J., Zhang, Y., Cao, J., Wang, Y., Anwar, N., Zhang, Z., *et al.* (2023) The Role of Autophagy in Bone Metabolism and Clinical Significance. *Autophagy*, **19**, 2409-2427. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2186112>
- [2] Serocki, M., Bartoszewska, S., Janaszak-Jasiecka, A., Ochocka, R.J., Collawn, J.F. and Bartoszewski, R. (2018) MiRNAs Regulate the HIF Switch during Hypoxia: A Novel Therapeutic Target. *Angiogenesis*, **21**, 183-202. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9600-2>
- [3] Ye, D., Chen, C., Wang, Q., Zhang, Q., Li, S. and Liu, H. (2020) Short-Wave Enhances Mesenchymal Stem Cell Recruitment in Fracture Healing by Increasing HIF-1 in Callus. *Stem Cell Research & Therapy*, **11**, Article No. 382. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01888-0>
- [4] Bartolomé, A., López-Herradón, A., Portal-Núñez, S., García-Aguilar, A., Esbrit, P., Benito, M., *et al.* (2013) Autophagy

- Impairment Aggravates the Inhibitory Effects of High Glucose on Osteoblast Viability and Function. *Biochemical Journal*, **455**, 329-337. <https://doi.org/10.1042/bj20130562>
- [5] 卢芙蓉, 秦铀, 沈霖, 等. 胡芦巴总皂苷对饮食诱导肥胖大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(9): 34-36.
- [6] 许芳芳, 王楠, 李刚强, 等. 2 型糖尿病小鼠模型的建立与评价[J]. 中国医学科学院学报, 2017, 39(3): 324-329.
- [7] Sung, J., Barratt, K.R., Pederson, S.M., Chenu, C., Reichert, I., Atkins, G.J., *et al.* (2023) Unbiased Gene Expression Analysis of the Delayed Fracture Healing Observed in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Bone & Joint Research*, **12**, 657-666. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.1210.bjr-2023-0062.r1>
- [8] Walker, E., McGregor, N., Chan, A. and Sims, N. (2021) Measuring Bone Volume at Multiple Densities by Micro-Computed Tomography. *BIO-PROTOCOL*, **11**, e3873. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3873>
- [9] Xue, Y., Li, Z., Wang, Y., Zhu, X., Hu, R. and Xu, W. (2020) Role of the HIF-1 α /SDF-1/CXCR4 Signaling Axis in Accelerated Fracture Healing after Craniocerebral Injury. *Molecular Medicine Reports*, **22**, 2767-2774. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11361>
- [10] 罗涛, 齐进, 周琦, 等. 骨折愈合过程中低氧诱导因子-1 α 的表达及其调节作用[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2009, 29(8): 902-908.
- [11] Yang, G., Duan, X., Lin, D., Li, T., Luo, D., Wang, L., *et al.* (2015) Rapamycin-Induced Autophagy Activity Promotes Bone Fracture Healing in Rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **10**, 1327-1333. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2660>
- [12] Luo, D., Ren, H., Li, T., Lian, K. and Lin, D. (2015) Rapamycin Reduces Severity of Senile Osteoporosis by Activating Osteocyte Autophagy. *Osteoporosis International*, **27**, 1093-1101. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3325-5>
- [13] Zhang, F., Wang, J., Chu, J., Yang, C., Xiao, H., Zhao, C., *et al.* (2015) MicroRNA-146a Induced by Hypoxia Promotes Chondrocyte Autophagy through BCL-2. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **37**, 1442-1453. <https://doi.org/10.1159/000438513>
- [14] Chun, Y. and Kim, J. (2021) AMPK-mTOR Signaling and Cellular Adaptations in Hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article 9765. <https://doi.org/10.3390/ijms22189765>
- [15] Zhang, P., Zhang, H., Lin, J., Xiao, T., Xu, R., Fu, Y., *et al.* (2020) Insulin Impedes Osteogenesis of BMSCs by Inhibiting Autophagy and Promoting Premature Senescence via the TGF- β 1 Pathway. *Aging*, **12**, 2084-2100. <https://doi.org/10.18632/aging.102723>