

骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 Cbfa1 mRNA 表达的影响

刘天舒 李章华 陈友浩 柳铭 金林

中图分类号: R285.5;R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)05-0411-06

摘要: 目的 观察成骨细胞转录因子 Cbfa1 在去卵巢骨质疏松(Osteoporosis, OP)大鼠的表达,探讨骨碎补总黄酮调节骨代谢的作用机制。方法 36 只 Wistar 雌性大鼠随机均分为假手术组、模型组和药物组,术后 2、4、6、8 周检测血液雌二醇(E_2)水平,进行股骨和腰椎骨密度测量、组织学观察和 Cbfa1 mRNA 表达。结果 在每个时间点 3 组大鼠雌二醇水平均存在显著性差异($P < 0.05$),假手术组 > 模型组 > 对照组;比较股骨及腰椎骨密度,假手术组 > 模型组($P < 0.05$)。在每一个检测的时间点,药物组在术后 2 周和术后 8 周低于假手术组($P < 0.05$),在术后 6 周和术后 8 周高于模型组($P < 0.05$),其余时间点无显著性差异。组织学检查示模型组骨组织内骨小梁减少,稀疏,间隔增大,药物组该表现较少,而假手术组骨组织内未见该现象。模型组与药物组 Cbfa1 mRNA 表达在术后 4 周均低于假手术组($P < 0.05$),在术后 6 周和术后 8 周,假手术组 > 药物组 > 模型组($P < 0.05$)。结论 实验结果表明雌激素减少能导致大鼠 Cbfa1 表达降低,而骨碎补总黄酮能上调 Cbfa1 表达水平,促使骨髓间质干细胞向成骨细胞分化发挥其防治 OP 作用。

关键词: 骨质疏松症; 去卵巢; 骨碎补总黄酮

Effect of Drynaria Fortunei J. SM on Cbfa1 mRNA expression in bone of ovariectomized rats LIU Tianshu, LI Zhanghua, CHEN Youhao, et al. Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: LI Zhanghua, Email: lzh999999@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the expression of osteoblastic transcription factor Cbfa1 in ovariectomized osteoporosis (OP) rats, and to explore the mechanism of regulatory effect of drynaria flavonoids on bone metabolism. **Methods** Thirty-six Wistar female rats were randomly divided into the sham-operated group, the model group, and the drug group. Serum estradiol (E_2) level was determined on 2, 4, 6, and 8 weeks after the operation. Bone mineral densities of the femur and the lumbar vertebrae were measured. Histological observation and Cbfa1 mRNA expression were performed. **Results** Serum E_2 level of the rats among the 3 groups had a significant difference on each time point, the sham-operated group > drug group > model group ($P < 0.05$). Bone mineral densities of the femur and the lumbar vertebrae in the sham-operated group were higher than those in the model group on all time points examined ($P < 0.05$). Those in the drug group were lower than in the sham-operated group on 2 and 8 weeks, but higher than in the model group on 6 and 8 weeks after the operation ($P < 0.05$). No significant difference was found at other time points. The histological sections showed that the trabecular bone loss with sparse and larger distance in bones of the model group. This was not obvious in the drug group, and was not seen in the sham-operated group. The expression of Cbfa1 mRNA in the model group and the drug group was lower than that in the sham-operated group on 4 weeks after the operation ($P < 0.05$). The expression on 6 and 8 weeks after the

基金项目: 国家自然科学基金(30700854, 8107146)

作者单位: 430060 武汉, 武汉大学人民医院骨一科

通讯作者: 李章华, Email: lzh999999@yahoo.com.cn

operation showed the sham-operated group > drug group > model group ($P < 0.05$). **Conclusion** The results of this study showed that estrogen deficiency resulted in reduced Cbfa1 gene expression in rats. Drynaria flavonoids up-regulated the level of Cbfa1 gene expression, and exerted OP prevention and treatment effects by stimulating osteoblast differentiation by bone marrow mesenchymal stem cells.

Key words: Osteoporosis; Ovariectomy; Drynaria flavonoids

骨质疏松症是常见的骨代谢性疾病,以骨量减少、骨的微观结构退化为特征的,致使骨脆性增加而易于发生骨折的一种全身代谢性骨骼疾病^[1]。美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)定义骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种以骨强度受损,骨组织显微结构退化(松质骨骨小梁变细、断裂、数目减少;皮质骨多孔,变薄)和骨折危险性增加的骨骼疾病,骨强度是骨密度和骨质量的综合反映^[2]。OP 包括原发性和继发性两类,其中继发性由某些疾病导致,其发生率约占 OP 发生率的 10%;原发性骨质疏松是随年龄增长而发生,与激素分泌减少相关,约占 90%,其中绝经后骨质疏松(postmenopausal osteoporosis, PMO)最为常见。其发生的原因是由于体内雌激素减少造成骨的代谢紊乱,致使骨吸收超过骨形成,出现骨重建平衡失调与骨转换加快,致骨组织内骨矿含量低下,骨组织微细结构破坏,最终导致骨脆性增加,易发生骨折。Cbfa1 是骨发育过程中调节骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化和成熟的关键因子^[3],其表达受多种细胞因子、激素、药物的调控,对于成骨细胞和破骨细胞均有效应,故在骨形成和骨吸收过程中起重要作用。深入研究 OP 发展过程中 Cbfa1 表达变化,将有助于进一步在基因水平认识 OP 的发病机制,并寻找新的 OP 治疗靶点。

骨碎补总黄酮是由水龙骨科植物槲蕨(*Drynaria fortunei* (kunze) J. SM.) 的干燥根茎中提取的有效成分,其活性成分为柚皮苷等二氢黄酮类化合物。我国中医学认为“肾主骨”,肾与骨的生理及病理有着密切关系。骨碎补总黄酮功用补肾活血、止血,始记载于《雷公炮炙论》,主治肾虚腰痛,跌打闪挫,骨伤,风湿痹痛。国内已有实验从骨密度和骨组织形态计量学方面证明骨碎补总黄酮能对大鼠卵巢切除所致的骨质疏松症具有明显治疗作用^[4],也有研究表明骨碎补总黄酮能通过一些细胞因子如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)诱导骨组织形成^[5]。本实验采用逆转录 PCR 的方法观察骨碎补总黄酮对去卵巢 OP 大鼠骨组织 Cbfa1 mRNA 表达变化,探讨骨碎补总黄酮改善 OP

骨代谢的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 雌性 3 月龄大鼠 36 只,体重 170 ± 10 g,由湖北省疾病预防控制中心实验动物中心提供,合格证号为鄂检证字第 00008977,00009353,00009648,00009950。饲养于武汉大学人民医院实验动物中心(AFP 级标准),各组动物均饲养于聚乙烯笼内,每笼 3 只,室温控制在 $18^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$,环境湿度为 $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,湿度为 70%,自由摄食与饮水。

1.2 主要设备及试剂

主要设备:Lambda 25 型紫外分光光度计,9600 型 PCR 扩增仪(美国 PE 公司),凝胶成像处理系统(法国 VILBER LOLJRMA 公司),双能 X 线骨密度检测仪(美国 Lunar 公司)。

受试药物:骨碎补总黄酮(由北京歧黄制药有限公司提供),使用时加蒸馏水配成一定浓度溶液(0.47g/L)灌胃^[6,7],批准文号:国药准字 Z20030007,生产批号 100104。

主要试剂:血清雌二醇(estradiol, E2)放射免疫测定试剂盒(上海西唐生物科技有限公司),逆转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司(MBI)),Trizol 试剂(invitrogen 公司),Cbfa1 及 β -actin 的 PCR 引物(上海英骏生物技术公司),Marker, $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ (TIANGEN 生化科技公司)。

1.3 实验分组

36 只 Wistar 大鼠随机均分成假手术组、模型组和药物组,每组 12 只。假手术组:开腹后切除小块卵巢周围脂肪组织。模型组:切除双侧卵巢,不给药。药物组:切除双侧卵巢,参考文献予以 $90\text{mg/kg} \cdot \text{d}$ 浓度给药^[6,7],每日 8 点准时灌胃给药一次,给药总时间为 8 周。

1.4 实验方法

1.4.1 造模与取材:无菌操作下作 1cm 下腹部正中切口,分离皮肤筋膜及腹腔脏器,显露双侧卵巢。假手术组切除双侧卵巢旁近卵巢质量大小脂肪组织

一小块;模型组和药物组切除双侧卵巢。分层缝合腹腔。手术过程顺利,未见大鼠死亡。术后药物组按体重灌服骨质疏松水溶液,假手术组和模型组按相同比例灌服蒸馏水。术后自由饮食水,分别于术后2,4,6,8周,对各实验组中随机取出3只大鼠进行骨密度(bone mineral density, BMD)检测,测定后活杀动物,腹主动脉取血,离心取血清,置于-80℃低温冰箱中保存,待用;同时迅速取出一侧股骨,-80℃储存备用,取另一侧股骨及第一腰椎,固定于10%甲醛液中留作骨组织切片(Manson三色染色法),剩余股骨存于冻存管中备提取总RNA。

1.4.2 骨密度(BMD)测定:用3%戊巴比妥钠(0.1ml/100g)腹腔麻醉大鼠,四肢展开平置于双能X线骨密度检测仪(美国Lunar公司)平台上,应用小动物检测软件测定大鼠后肢股骨及腰椎的骨密度。

1.4.3 血清雌二醇(E_2)测定:采用放射免疫法(RIA)检测大鼠血清中的雌二醇,按试剂盒说明书进行操作。将标准品、待测样本加入到预先包被大鼠雌激素单克隆抗体透明酶标包被板中,温育足够时间后,依次加入底物A、B,底物(TMB)在辣根过氧化物酶(HRP)催化下转化为蓝色产物,在酸的作用下变成黄色,颜色的深浅与样品中 E_2 浓度呈正相关,450nm波长下测定OD值,根据标准品和样品的OD值,计算样本中 E_2 含量。试剂盒由上海西唐生物科技有限公司提供。

1.4.4 组织学检查:常规石蜡切片脱蜡至水,蒸馏水洗,Weigert氏铁苏木素染色5min,盐酸酒精分化,温水返蓝,流水冲洗3min,蒸馏水稍洗,变色酸2R亮绿复合液5min,倾去余液,1%冰醋酸分化1min,常规脱水透明,中性树脂胶封片。

1.4.5 骨组织总RNA提取:活体骨组织约100mg取出后立即置于盛有液氮的研钵内,咬碎并研磨成粉末状,移入匀浆器中,加入TRIZOL试剂1ml,冷冻匀浆后,将匀浆液移入EP管内,加入氯仿0.2ml,混匀15s,室温静置5min,4℃12 000×g离心15min,取上清加入等体积异丙醇,室温下静置10min,4℃12 000×g离心10min,弃上清,留沉淀,75%冷乙醇振荡洗涤,4℃7 500×g离心5min,弃上清,在空气中干燥,加入DEPC溶解RNA至20μl,-80℃保存备用或立即进行后续实验。

1.4.6 RNA完整性及浓度检测:各个样本各取5μl RNA置于1%琼脂糖凝胶电泳,泳毕在紫外灯下观察比较灰度;28S和18S条带明亮,清晰,且28S亮

度在18S亮度2倍以上,证明RNA质量较好。紫外分光光度计检测RNA的浓度及纯度, A_{260}/A_{280} 在1.8~2.1之间,据 A_{260} 值算得浓度,后加入DEPC将浓度调整一致。

1.4.7 引物设计及合成:GenBank数据库中获得基因序列,采用Primer Expression 5.0软件进行引物序列设计。Cbfa1引物序列:上游引物5'-CGTCCACCTGTTCCAAAGTT-3';下游引物5'-GGCATTGCCATTTTCAGTTT-3';其基因扩增片段长度为285bp。 β -actin引物序列:上游引物5'-CACCATGGAGGGGCGGACTCATC-3';下游引物5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3';其基因扩增片段长度为240bp。

1.4.8 逆转录合成cDNA:按照逆转录试剂盒操作说明书操作。模板RNA补充适量DEPC水,加入引物Oligo(dT)₁₈轻轻混匀、离心,70℃加热5min,即刻冰浴;加入RNasin、dNTPs、M-MLV逆转录酶,轻轻混匀、离心;42℃下孵育60min;70℃加热10min,终止反应。-20℃保存备用。

1.4.9 PCR检测:Cbfa1 mRNA表达Taq酶、cDNA、NTP、引物等试剂在PCR管中短暂混匀。PCR反应条件为95℃4min;95℃30s,58℃30s,72℃30s,35个循环后16℃延伸10min。完毕后取5μl PCR产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶成像分析系统扫描条带光密度,获得每例样品目的片段扩增条带平均灰度值。目的片段mRNA相对表达水平为目的片段扩增条带的光密度积分与内参照 β -actin扩增条带的光密度积分的比值。

1.5 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行数据分析。实验数据均以均数±标准差(±s)表示,组间比较采用成组资料配对t检验。

2 结果

2.1 一般情况

整个实验过程中未有实验动物死亡,最终纳入结果分析的大鼠数量是36只。各组大鼠手术切口愈合良好,无出血、感染、溃疡等。所有大鼠未见拒食、分泌物增多、呼吸困难、胀气、腹泻、眼球突出等异常症状。各组大鼠体重随时间增加略增重,对照组体重相对较低,空白组体重最高,各组之间未见显著性差异($P>0.05$)。

2.2 血清雌激素(E_2)水平检测

去势后,在术后2,4,6,8周四个所测时间点,三

组实验大鼠的血清 E_2 浓度均有显著性差异 ($P < 0.05$), 浓度大小依次为假手术组 $>$ 药物组 $>$ 模型组。并且随术后时间增加, 大鼠去卵巢后 E_2 水平有递减趋势, 药物组 E_2 水平明显高于模型组 ($P < 0.05$), 但低于假手术组 ($P < 0.05$)。结果如表 1。

表 1 各组大鼠所测得雌二醇 (E_2) 水平
($\bar{x} \pm s, n = 3, \text{pmol/L}$)

组别	术后 2w	术后 4w	术后 6w	术后 8w
假手术组	1003.7 $\pm$ 40.3	1019.3 $\pm$ 31.3	1030.0 $\pm$ 138.9	1031 $\pm$ 69.7
模型组	357.3 $\pm$ 36.0 [#]	287.3 $\pm$ 13.5 [#]	215.3 $\pm$ 33.8 [#]	195 $\pm$ 8.6 [#]
药物组	695.3 $\pm$ 34.8 ^{#*}	632.3 $\pm$ 54.0 ^{#*}	609.7 $\pm$ 27.6 ^{#*}	568 $\pm$ 31.2 ^{#*}

注: 与假手术组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$

2.3 骨密度测定

骨质疏松是一个全身骨组织的变化过程。各组大鼠所测股骨骨密度与腰椎骨密度结果基本吻合。去势后 2 周, 无论股骨骨密度还是腰椎骨密度, 模型组均低于假手术组 ($P < 0.05$), 且随时间推移, 差异越大。药物组在术后 2 周与模型组无显著性差异 ($P > 0.05$), 低于假手术组 ($P < 0.05$), 随时间推移至术后 8 周, 股骨骨密度与腰椎骨密度均高于模型组 ($P < 0.05$), 低于假手术组 ($P < 0.05$)。结果如

表 2, 3。

表 2 各组大鼠所测得股骨骨密度 ($\bar{x} \pm s, n = 3, \text{g/cm}^2$)

组别	术后 2w	术后 4w	术后 6w	术后 8w
假手术组	0.208 $\pm$ 0.006	0.208 $\pm$ 0.007	0.204 $\pm$ 0.005	0.210 $\pm$ 0.006
模型组	0.192 $\pm$ 0.004 [#]	0.187 $\pm$ 0.004 [#]	0.183 $\pm$ 0.003 [#]	0.177 $\pm$ 0.003 [#]
药物组	0.196 $\pm$ 0.003 [#]	0.199 $\pm$ 0.008	0.201 $\pm$ 0.004 [*]	0.199 $\pm$ 0.002 ^{#*}

注: 与假手术组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$

表 3 各组大鼠所测得腰椎骨密度
($\bar{x} \pm s, n = 3, \text{g/cm}^2$)

组别	术后 2w	术后 4w	术后 6w	术后 8w
假手术组	0.228 $\pm$ 0.009	0.224 $\pm$ 0.006	0.214 $\pm$ 0.003	0.218 $\pm$ 0.006
模型组	0.199 $\pm$ 0.005 [#]	0.201 $\pm$ 0.010 [#]	0.194 $\pm$ 0.001 [#]	0.186 $\pm$ 0.004 [#]
药物组	0.204 $\pm$ 0.005 [#]	0.212 $\pm$ 0.008	0.212 $\pm$ 0.005 [*]	0.204 $\pm$ 0.002 ^{#*}

注: 与假手术组比较, [#] $P < 0.05$, 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$

2.4 组织学检测结果

在整个实验过程中, 假手术组大鼠骨组织切片观察未见骨小梁密度有明显改变, 骨小梁完整, 无断裂, 新生骨组织少; 模型组大鼠随着时间延长骨小梁密度逐渐减少, 断裂的骨小梁增多, 新生骨组织增多; 而药物组大鼠骨小梁断裂的数量明显少于模型组大鼠, 骨密度也明显高于模型组, 可见少量新生骨组织。如图 1a~c。



图 1 术后 8 周股骨组织切片 (10 $\times$)

注: a: 模型组; b: 假手术组; c: 药物组

表 4 各组大鼠 Cbfa1 平均灰度值/ β -actin
平均灰度值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	术后 2w	术后 4w	术后 6w	术后 8w
假手术组	1.087 $\pm$ 0.058	1.153 $\pm$ 0.071	1.273 $\pm$ 0.054	1.138 $\pm$ 0.039
模型组	1.112 $\pm$ 0.070	0.808 $\pm$ 0.048 [#]	0.546 $\pm$ 0.044 [#]	0.472 $\pm$ 0.027 [#]
药物组	1.048 $\pm$ 0.018	0.820 $\pm$ 0.024 [#]	0.759 $\pm$ 0.025 ^{#*}	0.760 $\pm$ 0.026 ^{#*}

注: 与假手术组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$

2.5 RT-PCR 检测 Cbfa1 mRNA 表达

随时间推移, 假手术组大鼠 Cbfa1 表达基本平稳, 模型组与药物组呈递降趋势。去势后 2 周, 三组实验大鼠 Cbfa1 表达相互间无明显差异 ($P > 0.05$); 术后第 4 周, 模型组及药物组低于假手术组 ($P < 0.05$), 两者相互间无明显差异 ($P > 0.05$); 术后 6 周及 8 周, 模型组及药物组低于假手术组 ($P <$

0.05), 同时药物组高于模型组 ($P < 0.05$)。结果如图 2、表 4。

3 讨论

成骨细胞多由骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 分化而来, Cbfa1 是这一分化过程中的关键转录因子^[8]。用基因剔除方法剔除 Cbfa1 基因 (Cbfa1 -/-) 的大鼠体内成骨细胞完全抑制, 均不能软骨内成骨和膜内成骨^[9], 而杂合子基因 (Cbfa1 +/-) 仍可存活, 骨骼系统形态缺陷, 表现出和人的锁骨颅骨发育异常 (Cleidocranial dysplasia, CCD) 综合征相似的临床症状。Zheng 等^[10]将携带 Cbfa1/osf2 基因的腺病毒质粒所转导的 MSCs 植入 BALB/c 小鼠 5mm

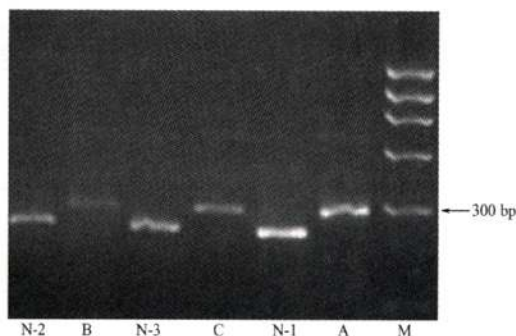


图2 M代表DNA MARKER, A、B、C分别代表术后8周的假手术组,模型组,药物组的目标基因 *Cbfa1*。N-1, 2, 3分别代表相应的术后8周的假手术组,模型组,药物组的内参基因 β -actin

直径颅骨缺损处,4周后植入组85%缺损处骨性闭合,相反,对照组无骨性闭合。在前成骨细胞MC3T3-E1或非成骨细胞(如成肌细胞)中过表达 *Cbfa1*,可诱导成骨细胞特异性标志物——I型胶原 $\alpha 1$ 、骨钙素等的表达^[10]。在成熟成骨细胞用反义寡核苷酸或小干扰RNA阻断 *Cbfa1*,可使I型胶原、骨钙素、碱性磷酸酶等表达下降,阻止成骨过程。可见 *Cbfa1* 对于成骨细胞分化及维持其功能有着重要功能。本研究中药物组及模型组在造模成功后 *Cbfa1* 表达均低于假手术组 ($P < 0.05$),而药物组表达量又高于模型组 ($P < 0.05$),说明骨碎补总黄酮能够促进 *Cbfa1* 的表达;而通过骨密度检测和骨组织切片检查,发现 *Cbfa1* 表达在本研究中与骨质疏松程度呈负相关,能够防止骨量丢失,对骨组织有保护作用。但是 *Cbfa1* 的表达对骨吸收的影响并不是单一的正相关。Liu等^[11]在成骨细胞中过表达 *Cbfa1* 反而抑制成骨细胞成熟并造成骨量减少,因而,维持 *Cbfa1* 在一个合适浓度有助于促进成骨细胞表达,防治OP。

雌激素对于正常的骨重建是非常重要的,绝经后妇女和切除卵巢的动物试验导致的OP均是由于雌激素的缺乏引起^[12]。许多研究都证实了在软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞3种细胞上均存在 $ER\alpha$ 和 β ,雌激素与成骨细胞内的受体结合后,促使其分泌胶原酶、释放细胞因子及生长因子等进行骨重建,表明了雌激素对骨代谢有直接的调节作用。研究发现 $ER\alpha KO$ ($ER\alpha$ 基因敲除)鼠的股骨长度短于正常对照组,尤其在雌性小鼠中更加明显^[13],但是 $ER\beta KO$ 鼠的股骨长度却无明显变化;两种 ER 亚型基因均敲除 ($DERKO$) 鼠的股骨长度也变短^[13]。同时发现 $ER\alpha KO$ 鼠的BMD低于对照组;而 $ER\beta KO$ 鼠的

BMD高于对照组^[14],认为可能是雌激素通过 $ER\alpha$ 作用刺激成骨细胞的活性,而通过 $ER\beta$ 的作用抑制成骨细胞的活性,但其具体作用机制目前仍不清楚。

骨碎补总黄酮具有补肾、强骨、止痛的功能。药理实验表明^[15],其可以增加骨密度,提高骨骼抗外力,调节血钙、甲状旁腺素、碱性磷酸酶水平,促进骨形成,抑制骨吸收,临床用于治疗骨质疏松、腰背疼痛等症。谢雁鸣等^[16]利用骨碎补总黄酮溶液灌胃去势大鼠,发现药物组大鼠骨密度比去势大鼠骨密度高 ($P < 0.05$),与假手术组无显著性差异 ($P > 0.05$),与本研究结果吻合。近有利用细胞杂交基因研究骨碎补总黄酮对雌激素受体的作用,发现低剂量的骨碎补总黄酮对雌激素受体的影响不显著,但高剂量对雌激素的两种受体均有显著的激活作用^[17]。因此骨碎补总黄酮可能是通过影响雌激素受体的活性,而达到治疗OP等骨科疾病的疗效。Zhou等^[18]发现雌激素可以阻断cAMP依赖的PKA途径,增加 *Cbfa1* 表达,减少骨丢失。笔者推测骨碎补总黄酮抗OP的机制可能与之相关。

本实验比较去卵巢大鼠 *Cbfa1* 的表达与假手术组的 *Cbfa1* 表达差异,并通过对于大鼠的雌激素、骨密度检测,组织学切片证明 *Cbfa1* 的较高表达具有抑制OP的效应,并证实骨碎补总黄酮可以上调 *Cbfa1* 的表达。然而,本实验只是观察了 *Cbfa1* 的基因变化,并未能对 *Cbfa1* 表达做定量检测,得出 *Cbfa1* 表达在大鼠体内的相对利于骨形成的浓度,并且骨碎补总黄酮上调 *Cbfa1* 表达的机制也有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] 刘忠厚主编.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998:142.
- [2] Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. JAMA, 2001, 285(6):785-795.
- [3] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. *Osf2/cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell, 1997, 89(5):747-754.
- [4] 谢雁鸣,鞠大宏,赵晋宁.骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和骨组织形态计量学影响.中国中药杂志,2004,29(4):343-346.
- [5] 张迪华,曹大宁,刘振东,等.骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织骨形态蛋白-2和血清骨钙素表达的影响.现代生物医学进展,2008,8(9):1634-1636.
- [6] 赵晋宁,谢雁鸣,张文军,等.骨碎补总黄酮急性毒性实验.医药导报,2005,24(1):12-14.

(下转第423页)

【参考文献】

- [1] Ahn S, Song R. Bone mineral density and perceived menopausal symptoms: factors influencing low back pain in postmenopausal women. *J Advanced Nursing*, 2009, 65(6):1228-1236.
- [2] 刘忠厚. 主编. 骨矿与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2006; 3-4.
- [3] Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, et al. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J Med Sci*, 2007, 53(1):25-35.
- [4] Lymperi S, Horwood N, Marley S, et al. Strontium can increase some osteoblasts without increasing hematopoietic stem cells. *Blood*, 2008, 111(3):1173-1181.
- [5] Canalis E, Hott M, Deloffre P, et al. The divalent strontium salt Sr12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone*, 1996, 18:517-523.
- [6] Marie PJ, Amman P, Boivin G, et al. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int*, 2001, 69(3):121-129.
- [7] Ammann P, Shen V, Rorin B, et al. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(3):548-548.
- [8] Delannoy P, Bazot D, Marie PJ. Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. *Metabolism*, 2002, 51(7):906-911.
- [9] René Rizzoli, Michel Laroche, Marc-Antoine K, et al. Strontium ranelate and alendronate have differing effects on distal tibia bone microstructure in women with osteoporosis. *Rheumatology Int*, 2010, 30: 1341-1348.
- [10] Azria M. Possible mechanisms of the analgesic action of calcitonin. *Bone*, 2002, 30:80-83.
- [11] Ofluoglu D, Akyuz G, Unay O, et al. The effect of calcitonin on β -endorphin levels in postmenopausal osteoporotic patients with back pain. *Clinical Rheumatology*, 2007, 16(2):207-212.
- [12] Meunier PJ, Roux C, Seeman E, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*, 2004, 350: 459-468.
- [13] Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, et al. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90: 2816-2822.
- (收稿日期: 2011-01-20)
-
- (上接第 415 页)
- [7] 谢雁鸣, 张露, 王智, 等. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠基因水平的影响. *中国中药杂志*, 2005, 30(14):1092-1095.
- [8] Komori T, Kishimoto T. Cbfa1 in bone development. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(4):494-499.
- [9] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997, 89(5):677-680.
- [10] Kern B, Shen J, Starbuck M, et al. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem*, 2001, 276(10):7101-7107.
- [11] Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol*, 2001, 155(1):157-166.
- [12] Takano-Yamamoto T, Rodan GA. Direct effects of 17 beta-estradiol on trabecular bone in ovariectomized rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(6):2172-2176.
- [13] Vidal O, Lindberg MK, Hollberg K, et al. Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10):5474-5479.
- [14] Windahl SH, Vidal O, Andersson G, et al. Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female ERbeta(-/-) mice. *J Clin Invest*, 1999, 104(7):895-901.
- [15] 王和鸣, 葛继荣, 田金洲, 等. 强骨胶囊治疗原发性骨质疏松症临床试验. *中药新药与临床药理*, 2004, 15(4):284-287.
- [16] 谢雁鸣, 赵晋宁, 丁会, 等. 强骨胶囊抗去势大鼠骨质疏松症的实验研究. *中国中医药科技*, 2000, 7(3):151-152.
- [17] 王海彬, 王军舰, 徐传毅, 等. 利用细胞杂交技术检测强骨胶囊对雌激素受体的影响. *上海中医药大学学报*, 2006, 20(3): 43-45.
- [18] Zhou Y, Zhu ZL, Guan XX, et al. Reciprocal roles between caffeine and estrogen on bone via differently regulating cAMP/PKA pathway: the possible mechanism for caffeine-induced osteoporosis in women and estrogen's antagonistic effects. *Med Hypotheses*, 2009, 73(1):83-85.
- (收稿日期: 2010-12-07)

骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织Cbfa1 mRNA表达的影响

作者: 刘天舒, 李章华, 陈友浩, 柳铭, 金林
作者单位: 武汉大学人民医院骨一科, 武汉, 430060
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS
年, 卷(期): 2011, 17 (5)

参考文献(18条)

1. Zhou Y;Zhu ZL;Guan XX [Reciprocal roles between caffeine and estrogen on bone via differently regulating cAMP/PKA pathway:the possible mechanism for caffeine-induced osteoporosis in women and estrogen's antagonistic effects](#) 2009(01)
2. 王海彬;王军舰;徐传毅 [利用细胞杂交技术检测强骨胶囊对雌激素受体的影响](#) 2006(03)
3. 谢雁鸣;赵晋宁;丁会 [强骨胶囊抗去势大鼠骨质疏松症的实验研究](#) 2000(03)
4. 王和鸣;葛继荣;田金洲 [强骨胶囊治疗原发性骨质疏松症临床试验](#) 2004(04)
5. Windahl SH;Vidal O;Andersson G [Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female ERbeta\(-/-\) mice](#) 1999(07)
6. Vidal O;Lindberg MK;Hollberg K [Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice](#) 2000(10)
7. Takano-Yamamoto T;Rodan GA [Direct effects of 17 betaestradiol on trabecular bone in ovariectomized rats](#) 1990(06)
8. Liu W;Toyosawa S;Furuiehi T [Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures](#) 2001(01)
9. Kern B;Shen J;Starbuck M [Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes](#) 2001(10)
10. Komori T;Yagi H;Nomura S [Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts](#) 1997(05)
11. Komori T;Kishimoto T [Cbfa1 in bone development](#) 1998(04)
12. 谢雁鸣;张露;王智 [骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠基因水平的影响](#) 2005(14)
13. 赵晋宁;谢雁鸣;张文军 [骨碎补总黄酮急性毒性实验](#) 2005(01)
14. 张迪华;曹大宁;刘振东 [骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织骨形态蛋白-2和血清骨钙素表达的影响](#) 2008(09)
15. 谢雁鸣;鞠大宏;赵晋宁 [骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和骨组织形态计量学影响](#) 2004(04)
16. Ducy P;Zhang R;Geoffroy V [Osf2/cbfa1:a transcriptional activator of osteoblast differentiation](#) 1997(05)
17. [Osteoporosis prevention diagnosis and therapy](#) NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention,Diagnosis, and Therapy 2001(06)
18. 刘忠厚 [骨质疏松学](#) 1998