

微小RNA在骨质疏松症治疗中的作用及机制的研究进展

陈煦¹ 王新力¹ 邹远康¹ 李天^{1,2*} 赵雄^{1*}

1. 第四军医大学西京医院骨科, 西安 710032

2. 第四军医大学生物医学工程学院, 西安 710032

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 06-0786-05

摘要: 骨质疏松症是以骨量减少、骨强度下降、骨折危险性增加为特征,受遗传因素和环境因素共同影响的一种全身骨代谢障碍的疾病。骨质疏松是骨折的重要原因之一,它影响骨折的处理及其预后。原发性骨质疏松症的防治主要包括物理治疗和药物治疗两个方面,物理治疗包括运动疗法和物理因子疗法;药物治疗包括雌激素替代疗法、降钙素、选择性雌激素受体调节剂以及双膦酸盐等,这些药物可以阻止骨吸收但对骨形成的作用影响较小。微小RNA(miRNA)是一种由高等真核生物基因组编码,在进化上十分保守的非编码小分子RNA,具有调控基因表达的能力。miRNA主要通过和靶基因mRNA碱基配对,引导沉默复合体降解mRNA或抑制其翻译。基于miRNA的作用机制,通过人工合成miRNA模拟物和miRNA抑制剂调节miRNA相关通路,或人工构建miRNA介导RNA干扰途径,进行基因和分子治疗,从而在分子水平上为研究新一代基因药物和生物治疗手段提供新的切入点。关于骨质疏松,目前研究发现miRNA主要通过影响Runx2和Osterix信号通路发挥调控成骨信号作用,因此,干预miRNA可通过影响干细胞骨再生延缓骨质疏松进程,促进骨折修复。本文重点对微小RNA在骨分化和骨再生的分子机制及治疗应用做一综述,旨在为骨质疏松的基础研究和临床治疗提供参考。

关键词: 微小RNA;信号通路;骨再生;骨质疏松

Research advance and mechanism of miRNA in the treatment of osteoporosis

CHEN Xu¹, WANG Xinli¹, ZOU Yuankang¹, LI Tian^{1,2}, ZHAO Xiong¹

1. Department of Orthopedics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

2. School of Biomedical Engineering, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: ZHAO Xiong, Email: zhaoxiong314@163.com; LI Tian, Email: fmmult@sina.com

Abstract: Osteoporosis is a disease of bone metabolism dysfunction in the whole body, characterized by a decrease of bone mass and bone strength, and an increase of fracture risk. Osteoporosis is one of the most important causes of fracture, which affects the treatment and prognosis of fractures. The prevention and treatment of osteoporosis include physical therapy and drug therapy. Physical therapy includes exercise therapy and physical factor therapy. Drug therapy includes estrogen replacement therapy, calcitonin, selective estrogen receptor modulators, and bisphosphonates, etc. These drugs can prevent bone resorption but have little effect on bone formation. miRNA is a highly conserved non-encoding small molecule RNA, which has the ability to regulate gene expression. miRNA is mainly directed to the mRNA base pairing of target genes, leading to the degradation of mRNA or inhibition of translation of the silent complex. Based on the mechanism of miRNA, genes and molecular therapy can be conducted by artificial synthesis of miRNA and miRNA inhibitors, or by artificial construction of miRNA interfering RNA pathway, thus providing a new perspective for the study of new generation of gene drugs and biological treatment. The present study of osteoporosis has found that miRNA plays an important role in the regulation of Runx2 and Osterix signaling pathway. Therefore the intervention of miRNA can delay the process of bone regeneration and promote the repair of bone. This review focuses on the molecular mechanism and application of miRNA in bone differentiation and bone regeneration, which provides a reference for the basic research and clinical treatment of osteoporosis.

Key words: miRNA; Signal pathway; Bone regeneration; Osteoporosis

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81300710)

* 通讯作者: 赵雄, Email: zhaoxiong314@163.com; 李天, Email: fmmult@sina.com

骨质疏松症的严重性仅次于心脑血管疾病和肿瘤。国内骨质疏松症总患病率为12.4%,老年人患病比例超过一半以上,其中,并发骨折发生率接近33%。微小RNA(miRNA)是一种广泛存在于真核生物中,影响细胞增殖、分化、凋亡的重要分子,在肿瘤预后与基因治疗、自身免疫疾病中的功能研究、心血管系统疾病及内分泌系统疾病诊疗上有广泛的应用前景。在骨分化与骨再生过程中,miRNA的异常表达与骨质疏松发生的关系尤为密切,成为当今的研究热点之一。本文将对miRNA与骨分化和骨再生相关机制做一综述,旨在为骨质疏松症的临床治疗提供参考。

1 miRNA 调节骨分化

miRNA是一类广泛存在于生物基因组中,由内含子和编码基因间隔区基因编码、长度在20~22 nt的单链小分子RNA。miRNA 5'端2到8位核苷酸可通过碱基互补配对靶向结合mRNA 3'端多个非翻译位点,进而发挥其生物学作用^[1]。目前,关于miRNA表达谱的分析方法有多种,如锁核酸探针PCR,高通量测序技术和微阵列分析^[2]。相关研究发现,Runx2和其下游分子Osterix是调节成骨细胞分化重要的特异性转录因子,也是miRNA作用的主要靶点,miRNA通过与它们相互作用激活或抑制骨的分化。

1.1 miRNA 调控 Runx2 信号通路

Runx2即核心结合因子 $\alpha 1$ (core-binding factor $\alpha 1$, Cbfa1),是对成骨细胞分化和骨质形成有重要影响的特异性转录因子。Runx2可促进成骨基因的表达,包括骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、I型胶原(collagen-1, ColI)、骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)等,进而发挥相应的生物学效应。研究发现,65%~80%锁骨或颅骨发育不全的人存在不同程度的Runx2突变^[3],Runx2基因敲除小鼠成骨细胞发育受阻,骨骼发育不良或缺如^[4]。这些表明Runx2参与骨代谢的一些信号通路,在骨生长发育过程中具有重要作用。

miRNA可以直接与Runx2相互作用调控Runx2表达。研究发现,miR-133可以靶向结合Runx2的mRNA,抑制小鼠C2C12细胞向成骨细胞的分化^[5]。在小鼠骨髓间充质干细胞中,miR-338-3p可直接作用于Runx2和成纤维细胞的生长因子2型受体(Fibroblast growth factor receptor 2, FGFR2),引起骨

质疏松^[6]。Jeong等^[7]研究发现,雌激素受体相关受体 γ (estrogen-related receptor γ , ERR γ)可通过下调Runx2在前成骨细胞的表达活性,抑制成骨细胞分化。其后续实验也表明,ERR γ 通过诱导小鼠C3H10T1/2细胞miR-433表达,在转录后水平直接调控Runx2,抑制骨形成蛋白-2(bone morphogenetic protein, BMP-2)的表达。另有研究^[8]表明,Smad泛素化调节因子1(Smad ubiquitination regulatory factor 1, Smurf1)可通过蛋白酶体途径降解Runx2,而miR-15b能通过减少骨髓间充质干细胞中Smurf1的表达间接上调Runx2的水平。因此,Runx2作为骨质疏松的信号通路中的关键分子,可以与许多上下游分子相互作用,通过“串话(crosstalk)”作用影响骨的生长发育。

1.2 miRNA 调控 Osterix 信号通路

Osterix(OSX)又称SP7,是一个含有锌指结构的重要转录因子,属Kruppel样家族的SP亚群,其基因敲除小鼠可因骨矿化异常在出生后迅速死亡。研究^[9]发现,在原代培养的小鼠成骨细胞中,miR-93过表达可作用于OSX基因,抑制骨矿化过程。据Li等^[10]报道,miR-143作为多种肿瘤如非小细胞肺癌、胰腺癌和乳腺癌的抑制剂,可通过减少OSX的表达抑制MC3T3-E1向成骨细胞分化。

miRNA主要作用于OSX基因或OSX mRNA来发挥负调控作用。近期研究^[11]表明,miR-145通过减少OSX的表达,抑制C2C12和MC3T3-E1细胞的成骨分化。另一项研究^[12]用BMP诱导成骨细胞分化,发现C2C12细胞内的miR-214作为OSX抑制物参与了此过程的调控。此外,miR-31可降低OSX mRNA的表达,抑制人骨髓间充质干细胞的成骨发育^[13]。与其类似的一项研究^[14]显示,通过上调miR-125b表达和下调OSX表达可抑制骨髓间充质干细胞的增殖与分化。另有研究^[15]发现,miR-31, miR-142和miR-138均表现出抑制OSX的表达,而miR-322明显上调OSX水平。

1.3 miRNA 与骨代谢信号间通路之的相互作用

Runx2和OSX的许多上游或下游分子也参与骨分化与代谢,骨的分化与代谢正是这些调控分子与信号通路的协同作用下完成的,即“串话”作用(crosstalk)。BMP是一种属于TGF- β 家族的多功能的生长因子,可通过Smad依赖的BMP信号通路刺激间充质骨成熟,是一种受Runx2调节的成骨诱导剂^[16]。BMP信号可通过I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶细胞膜受体特异性激活Smad-1, -5, -8, 并与

Smad-4 形成配合物,激活转录过程^[17]。Li 等研究表明,在 MC3T3 细胞中,miR-29b 通过抑制 TGF- β 3 以及激活素 II 型受体(activin receptor 2A, ACVR2A, TGF- β 超家族的另一成员)维持 Runx2 等一些重要转录因子的正常水平。此外,一些其他经典的 Wnt 信号通路,如 MiR-335-5p 通过激活 Wnt/ β -catenin, 促进糖原合成酶激酶-3 (glycogen synthase kinase 3, GSK-3)的磷酸化,增强 β -catenin 转录信号,并通过下调 Dickkopf 相关蛋白 1 (Dickkopf-related protein-1, DKK1) 促进小鼠 C3H10T1 / 2 细胞的成骨分化^[18]。除了 BMP、TGF β 和 Wnt 信号转导,一些其他信号通路,如 MAPK 信号、Notch 信号通路、Hedgehog 信号通路、ncl-1 信号通路、IGF 信号与氧化应激信号通路也在其中发挥着重要作用,有待进一步深入研究。

2 miRNA 调节骨再生

2.1 寻找合适的再生前体——间充质干细胞

骨骼发育涉及整个生命过程,包括骨的生长,再生和重塑。骨质疏松和骨损伤会导致骨强度的减弱,从而增加骨折的风险。对于骨质疏松及骨折患者的骨修复,目前研究的首要突破是找到了合适的再生前体:间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。间充质干细胞是骨、软骨、肌肉、韧带、肌腱、脂肪等间充质组织的再生基础。实验表明,移植后的 MSCs 可产生胚胎发育中神经外胚层起源的细胞,如骨骼肌细胞、心肌细胞、内皮细胞、肝细胞、胆管上皮细胞等^[19]。骨组织的形成始于骨髓基质干细胞的生长,后者可分化为成骨细胞的前体,再逐渐发育成熟。在这一发育过程中,均可检测到 miRNA 在其中发挥的重要调节作用^[20]。此外,基因和 miRNA 的表达的检测技术使我们能够揭示特定 miRNA 调控骨髓间充质干细胞向不同细胞的分化过程,如 miR-96、miR-124、miR-199a 可诱导成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞不同的分化去向^[21]。研究也发现,各种 miRNA 水平在未分化的间充质干细胞和分化的骨细胞之间具有差异,如 miR-30c、miR-15b 和 miR-130b 在成骨细胞中过表达,其水平明显高于未分化的间充质干细胞^[22]。

2.2 探索调节的关键靶点——目标基因

骨重建的关键是识别 miRNA 的靶基因。有关靶基因预测的生物信息学技术产品如 pictar-4,5 和荧光素酶等检测技术,可为 miRNA 靶基因的检测提供帮助^[23]。一方面,经典的骨转录元件如 Satb2 的

抑制分子 miR-34b 和 miR-34c 在小鼠主要的成骨细胞中可同时被检测到^[24]。另一方面,许多新的或易被忽视的靶基因如 PPAR γ 可被 miR-20a 和 miR-548d-5p 抑制。而 miR-20a 的过表达,会导致 Bambi 和 Crim1 基因沉默,无法发挥正常的生物学功能^[25]。值得注意的是,除了 3'UTR 区,miRNA 可能在许多天然靶基因的氨基酸编码序列中发挥生物学功能。刘等^[26]发现,CDS 和 3'UTR 等靶向目标能有效地被 miR-15a / miR-16 和 miR-92a 抑制。Tay 等^[27]研究发现:miR-134 能靶向结合性别决定区 Y 相关的 HMG 盒 2,miR-296 能靶向结合基因的同源异型盒和 miR-470 能特异结合八聚体结合转录因子 4 (Oct4, 也称 POU 结构域第 5 类转录因子 1)。这些 miRNA 均作用于编码区,共同促进维甲酸对小鼠胚胎干细胞的诱导分化作用。此外,除了转录后控制的 mRNAs,miR-2861 已被证实结合 HDAC5 mRNA 的 CDS,而 miR-3960 已被证实能与 Hoxa2 mRNA CDS 相互作用^[28],且 miR-93 表达对 Osterix mRNA 的 CDS 抑制性效果也通过荧光素酶报告基因分析得以验证^[29]。

2.3 控制细微的调节过程——诱导阻遏因子

鉴于目前已有的发现,通过影响骨相关的 miRNA 的表达水平能够调节骨修复和再生。进一步的研究方向应该集中在如何通过调控 miRNA 在基因水平的表达作用来影响骨骼发育。通常采用的方法是使用抗 miRNA 的分子阻碍这些目标蛋白编码基因的启动子,抑制那些靶向蛋白编码基因的表达^[30]。目前,一类新构建的化学修饰、胆固醇结合的单链 RNA 类似物可用于结合互补的 miRNA。Ebert 和他的同事发明了一种新型 miRNA 抑制剂,可在哺乳动物细胞中表达,他们称之为“miRNA 海绵”^[31]。Qureshi 等^[32]使用了一个银纳米粒子复合物光活化 miR-148b 模拟传递,成功诱导细胞成骨分化。另一项研究^[33]发现,细胞穿透性肽(cell penetrating peptides, CPP)富含精氨酸,可通过介导 miR-29b 在细胞内作用,促进 hMSCs 向成骨细胞分化。这些成果的发现为骨质疏松及骨折等多种复杂疾病的修复治疗带来了前景,将成为未来研究靶向药物治疗的研究热点。

3 述评

综上所述,骨质疏松症是一种病因复杂,治疗困难的疾病;其分子机制涉及遗传基因、信号通路、激素及旁分泌因子等。目前研究试图通过影响

miRNA 调节骨分化的过程实现骨再生的方案主要存在两方面的问题,其一是虽然在 miRNA 调节骨分化的机制方面已取得一定进展,发现了与成骨细胞分化相关的信号网络,但骨质疏松的发病与破骨细胞功能亢进,骨代谢不平衡等多种因素有关。在这些异常生理现象中,关于 miRNA 具体机制的研究为数不多,有待进一步探究。可喜的是,近期低氧诱导因子、血小板源生长因子、蛋白激酶 B、局部粘着斑激酶等新的信号通路的发现,为我们寻求 miRNA 在骨质疏松治疗上提供了新的路径,如目前新发现的 miR-214 就是通过调控 Akt 通路来影响骨代谢过程^[34]。其二是在干细胞的骨再生领域,以 miRNA 为基础的骨骼再生是否能应用于体内骨再生。miRNA 这种新兴疗法可能存在很多潜在的安全性问题。由于每个细胞的 miRNA 都能够调控上百种基因的表达,因此 miRNA 途径的微小失调也会对骨骼造成非常严重的后果。目前 miRNA 的在临床应用遇到的瓶颈是给药途径、给药浓度上的问题。虽然 Eskildsen 等^[35]在构建的非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠模型中发现羟基磷灰石/磷酸三钙(HA/TCP)与 anti-mir-138 分子填充骨髓间充质干细胞可以促进骨形成。但这种模拟或干扰 miRNA 研究多基于细胞株及动物实验,所用的 miRNA 浓度并非正常生理条件下的人体内的 miRNA 浓度,所以其具体相关性功能还需进一步验证。

【参 考 文 献】

- [1] Vimalraj S, Selvamurugan N. MicroRNAs: Synthesis, gene regulation and osteoblast differentiation. *Curr Issues Mol Biol*, 2012, 15:7-18.
- [2] Hu R, Li H, Liu W, et al. Targeting miRNAs in osteoblast differentiation and bone formation. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14: 1109-1120.
- [3] Tou L, Quibria N, Alexander JM. Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by bone morphogenetic protein-7. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 205: 121-129.
- [4] Komori TA. Fundamental transcription factor for bone and cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276: 813-816.
- [5] Li Z, Hassan MQ, Volinia S, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 13906-13911.
- [6] Liu H, Sun Q, Wan C, et al. MicroRNA-338-3p regulates osteogenic differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells by targeting Runx2 and Fgfr2. *J Cell Physiol*, 2014, 229: 1494-1502.
- [7] Kim EJ, Kang IH, Lee JW, et al. MiR-433 mediates $\text{ERR}\gamma$ -suppressed osteoblast differentiation via direct targeting to Runx2 mRNA in C3H10T1/2 cells [J]. *Life Sci*, 2013, 92: 562-568.
- [8] Vimalraj S, Partridge NC, Selvamurugan N. A positive role of microRNA-15b on regulation of osteoblast differentiation. *J Cell Physiol*, 2014, 229: 1236-1244.
- [9] Yang L, Cheng P, Chen C, et al. MiR-93/Sp7 function loop mediates osteoblast mineralization. *J Bone Miner Res*, 2012, 27: 1598-1606.
- [10] Li E, Zhang J, Yuan T, et al. miR-143 suppresses osteogenic differentiation by targeting Osterix. *Mol Cell Biochem*, 2014, 390: 69-74.
- [11] Jia J, Tian Q, Ling S, et al. miR-145 suppresses osteogenic differentiation by targeting Sp7. *FEBS Lett*, 2013, 587: 3027-3031.
- [12] Shi K, Lu J, Zhao Y, et al. MicroRNA-214 suppresses osteogenic differentiation of C2C12 myoblast cells by targeting Osterix. *Bone*, 2013, 55: 487-494.
- [13] Baglio SR, Devescovi V, Granchi D, et al. MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31. *Gene*, 2013, 527: 321-331.
- [14] Chen S, Yang L, Jie Q, et al. MicroRNA-125b suppresses the proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*, 2014, 9: 1820-1826.
- [15] Gómez B, Rodríguez-Carballo E, Ventura F. MicroRNAs and post-transcriptional regulation of skeletal development. *J Mol Endocrinol*, 2014, 52: R179-R197.
- [16] Liu DD, Zhang JC, Zhang Q, et al. TGF- β /BMP signaling pathway is involved in cerium-promoted osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 2013, 114: 1105-1114.
- [17] Phimpilai M, Zhao Z, Boules H, et al. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res*, 2006, 21: 637-646.
- [18] Zhang J, Tu Q, Bonewald LF, et al. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. *J Bone Miner Res*, 2011, 26: 1953-1963.
- [19] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418: 41-49.
- [20] Kim KM, Lim SK. Role of miRNAs in bone and their potential as therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol*, 2014, 16: 133-141.
- [21] Laine SK, Alm JJ, Virtanen SP, et al. MicroRNAs miR-96, miR-124, and miR-199a regulate gene expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 2012, 113: 2687-2695.
- [22] Gao J, Yang T, Han J, et al. MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem*, 2011, 112: 1844-1856.

- [23] Trompeter HI, Dreesen J, Hermann E, et al. MicroRNAs miR-26a, miR-26b, and miR-29b accelerate osteogenic differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood. *BMC Genomics*, 2013, 14: 111.
- [24] Wei J, Shi Y, Zheng L, et al. miR-34s inhibit osteoblast proliferation and differentiation in the mouse by targeting SATB2. *J Cell Biol*, 2012, 197: 509-521.
- [25] Sun J, Wang Y1, Li Y, et al. Downregulation of PPAR γ by miR-548d-5p suppresses the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and enhances their osteogenic potential. *J Transl Med*, 2014, 12: 168.
- [26] Liu G, Zhang R, Xu J, et al. Functional conservation of both CDS- and 3'-UTR located microRNA binding sites between species. *Mol Biol Evol*, 2015, 32: 623-628.
- [27] Tay Y, Zhang J, Thomson AM, et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008, 455: 1124-1128.
- [28] Hu R, Liu W, Li H, et al. A Runx2/miR-3960/miR-2861 regulatory feedback loop during mouse osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, 2011, 286: 12328-12339.
- [29] Yang L, Cheng P, Chen C, et al. MiR-93/Sp7 function loop mediates osteoblast mineralization. *J Bone Miner Res*, 2012, 27: 1598-1606.
- [30] Vimalraj S, Selvamurugan N. MicroRNAs: Synthesis, gene regulation and osteoblast differentiation. *Curr Issues Mol Biol*, 2012, 15: 7-18.
- [31] Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007, 4, 721-726.
- [32] Qureshi AT, Monroe WT, Dasa V, et al. miR-148b-nanoparticle conjugates for light mediated osteogenesis of human adipose stromal/stem cells. *Biomaterials*, 2013, 34: 7799-7810.
- [33] Suh JS, Lee JY, Choi YS, et al. Peptide-mediated intracellular delivery of miRNA-29b for osteogenic stem cell differentiation. *Biomaterials*, 2013, 34: 4347-4359.
- [34] Zhao C, Sun W, Zhang P, et al. miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway. *RNA Biology [J]*, 2015, 12(3): 343-353.
- [35] Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA [J]*, 2011, 108 (15): 6139-6144.

(收稿日期: 2015-12-19, 修回日期: 2016-01-12)

(上接第 785 页)

- [23] 李鸿泓, 于峥, 赵宏艳, 等. “脾肾相关”机理探讨补肾健脾方对脾肾两虚型骨质疏松症大鼠外周血中 OPG、RANKL、VIP、MTL、GAS 含量的影响. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(12): 1628-1631.
- Li HH, Yu Z, Zhao HY, et al. Discussion of the spleen kidney related mechanism-study of effects of Bushen Jianpi Decoction on the OPG, RANKL, VIP, MTL, GAS content in peripheral blood on both deficiency of spleen and kidney type osteoporosis rat. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2014, 20(12): 1628-1631.
- [24] 刘亦恒, 张海英, 臧洪敏, 等. 淫羊藿总黄酮对大鼠成骨细胞代谢调控的机制研究. *中国中药杂志*, 2006, 31(6): 487.
- Liu YH, Zhang HY, Zang HM, et al. Effect of Herba Epimedii flavone on the osteoblasts metabolism in vitro. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, 31(6): 487.
- [25] 许样赫, 刘钊, 王虹, 等. 杜仲对 MC3T3-E1 成骨细胞及 OPG/RANKL 比值的影响. *天津医科大学学报*, 2013, 19(3): 203.
- Xu XH, Liu Z, Wang H, et al. Effect of Eucommia Cortex on the MC3T3-E1 Cells and the Ratio of OPG/RANKL from MC3T3-E1 Cells. *Journal of Tianjin Medical University*, 2013, 19 (3): 203.
- [26] 王艳灵, 姚新苗. 补肾活血法对骨质疏松症血液流变学的影响. *光明中医*, 2011, 26(10): 1959-1961.
- Wang YL, Yao XM. Effect of reinforcing kidney nourishing blood on osteoporosis hemorheology. *Bright Chinese Medicine*, 2011, 26 (10): 1959-1961.
- [27] 蒋宁, 杨芳, 孙鑫, 等. 中医不同治法对骨质疏松症小鼠骨密度、碱性磷酸酶、抗酒石酸性磷酸酶影响的实验研究. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(7): 789-791.
- Jiang N, Yang F, Sun X, et al. Experimental study on the effect of different therapies of TCM on bone mineral density, alkaline phosphatase, and tartrate resistant acid phosphatase in osteoporotic mice. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2015, 21(7): 789-791.
- [28] 廖二元. 男性骨质疏松的研究进展. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2010, 3(1): 1-5.
- Liao EY. Advances in studies of male osteoporosis. *Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research*, 2010, 3(1): 1-5.

(收稿日期: 2015-12-05, 修回日期: 2016-01-23)