

· 论 著 ·

丹参素拮抗氧化应激所致骨质疏松并通过 PI3k/Akt 通路减少成骨细胞的凋亡

王秉义 潘剑*

兰州大学第二医院骨科, 甘肃 兰州 730030

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 01-0001-06

摘要: **目的** 探讨丹参素拮抗醋酸泼尼松所致大鼠骨质疏松的作用机理。**方法** 60 只雌性 4 月龄大鼠随机分为 6 组: 正常对照组、模型组(醋酸泼尼松 5 mg/kg 体重)、丹参素高中低剂量组(30 mg/kg 体重、20 mg/kg 体重、10 mg/kg 体重)和对照药白藜芦醇组(5 mg/kg 体重)。丹参素组和白藜芦醇组每日先给予模型组同样剂量的醋酸泼尼松, 然后给予不同浓度药物处理。连续 14w。将成骨细胞 MC3T3-E1 细胞随机分为 A 组(正常组)、B 组(醋酸泼尼松组)、C 组(醋酸泼尼松 + 丹参素干预组)、D 组(醋酸泼尼松 + 丹参素 + Ly294002 组)。采用双能 X 线骨密度检测仪检测腰椎及股骨的骨矿物密度(BMD); 采用 TUNEL 原位标记骨质疏松大鼠中骨组织检测细胞凋亡情况; 同时采用 Western-blot 检测细胞凋亡相关蛋白 Bax、AIF、cyto-C 表达情况; 免疫荧光和 Western-blot 检测成骨细胞 MC3T3-E1 中 PI3/Akt 信号通路相关蛋白 pAkt 表达情况。**结果** 与模型组相比, 不同浓度的丹参素和白藜芦醇均能升高 BMD 值(均 $P < 0.05$), 降低骨质疏松大鼠骨细胞凋亡率($P < 0.05$), 抑制凋亡相关蛋白 Bax、AIF、cyto-C 的表达(均 $P < 0.05$)。与 A 组相比, B 组和 D 组成骨细胞凋亡率和凋亡相关蛋白 Bax、AIF、cyto-C 表达均增高(均 $P < 0.05$); 与 B 组相比, C 组成骨细胞凋亡率和凋亡相关蛋白 Bax、AIF、cyto-C 表达均明显降低(均 $P < 0.05$); 免疫荧光和 Western-blot 检测显示 C 组 pAkt 表达量与 B 组相比明显增加($P < 0.05$), 具有统计学意义。**结论** 丹参素能够拮抗醋酸泼尼松诱导氧化应激所致骨质疏松大鼠中成骨细胞的凋亡, 并且在体外是通过活化 PI3k/Akt 通路而减少成骨细胞的凋亡。**关键词:** 丹参素; 骨质疏松; PI3k/Akt; 细胞凋亡

Tanshinol attenuates oxidative stress-induced osteoporosis and reduces apoptosis of osteoblasts via PI3/Akt signal pathway

WANG Bingyi, PAN Jian*

Department of Orthopedics, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

Corresponding author: PAN Jian, Email: ldeypj@163.com

Abstract; Objective To investigate the effect of tanshinol on prednisone acetate-induced osteoporosis and its mechanism. **Methods** Sixty SD rats were selected and randomly divided into 6 groups: sham group, model group (prednisone acetate, 5mg/kg), tanshinol high-, medium-, and low-dose group (30, 20, 10 mg/kg), and resveratrol group (5 mg/kg). The rats in tanshinol and resveratrol groups received same dose of prednisone acetate in the morning and then received drugs for 14 weeks. MC3T3-E1 cells were divided into 4 groups: group A (normal group), group B (prednisone acetate), group C (prednisone acetate + tanshinol), and group D (prednisone acetate + tanshinol + Ly294002). The bone mineral density (BMD) of the lumbar spine and femur was measured using dual energy X-ray absorptiometry (DEXA). The apoptosis of cells in the rat bone tissue in each group was observed with TUNEL assay. The expression of apoptosis-related proteins such as Bax, AIF, cyto-C in each group was detected with Western blotting. The expression of p-Akt in MC3T3-E1 cells was detected using immunofluorescence and Western blotting. **Results** Compared to those in the model group, BMD of the lumbar spine and femur in tanshinol high-, medium-, and low-dose group and resveratrol group increased ($P < 0.05$), cell apoptosis decreased ($P < 0.05$), and the expression of apoptosis-related proteins such as Bax, AIF, cyto-C decreased ($P < 0.05$). Compared to those in group A, the apoptosis of osteoblasts and the expression of apoptosis-related proteins such as Bax, AIF, cyto-C in group B and D increased obviously ($P < 0.05$). Compared

基金项目: 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWSKY-2014-09)

* 通讯作者: 潘剑, Email: ldeypj@163.com

to those in group B, the apoptosis of osteoblasts and the expression of apoptosis-related proteins such as Bax, AIF, cyto-C in C group decreased ($P < 0.05$). The p-Akt expression in group C increased significantly comparing to that in group B detected with immunofluorescence and Western blotting ($P < 0.05$). **Conclusion** Tanshinol antagonizes the apoptosis of osteoblasts in prednisone acetate-induced oxidative stress. Moreover, the effect of tanshinol in vitro is via the activation of PI3k/Akt pathway.

Key words: Tanshinol; Osteoporosis; PI3k/Akt; Apoptosis

近年来,骨质疏松发病率也呈增加的趋势,骨质疏松已经成为一个世界性的公共卫生问题^[1]。氧化应激作为骨质疏松的一个危险因素已受到高度重视,各种类型的骨质疏松的发病过程中都伴随氧化应激水平的升高和凋亡的发生^[2,3]。因此,具有抗氧化活性的物质有可能是防治骨质疏松的新靶点^[4]。迄今为止,研究最多的天然抗氧化治疗骨质疏松的药物是白藜芦醇^[5]。白藜芦醇能够清除细胞内的 ROS,减缓衰老进程并可维持骨密度。丹参中丹参素等水溶性酚酸类成分是天然抗氧化有效成分,结构和白藜芦醇极其相似,含有多个酚羟基,可以提供活性氧阻止脂质过氧化反应,能提高机体 SOD 活性,清除 ROS,减少 ROS 对机体细胞造成的损害,改善细胞缺血缺氧,可预防心脑血管疾病^[6]。本文探究丹参素拮抗氧化应激造成成骨细胞凋亡的作用,为骨质疏松的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4 月龄清洁级 SD 大鼠 60 只,雌性,体重为(240 ± 10)g,置于安静、恒温恒湿、无强光刺激的环境中饲养。大鼠由兰州大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(甘)2013-0006。

1.2 主要试剂与设备

醋酸泼尼松(批号 060328),广东华南药业;丹参素(纯度 > 85%,批号 20140816),鸿生生物;白藜芦醇(纯度 > 98%,批号 20140908),鸿生生物;一抗(Bax、AIF、cyto-C、pAkt 及 β -action),美国 Santa Cruz 公司;PI3K 抑制剂 Ly294002(批号:K1047),Cayman Chemical 公司;胰酶、山羊抗兔 IgG-HRP、Western 免疫印迹的化学发光检测试剂盒,购自美国 Sigma 公司; α -MEM 培养基购自 GIBco 公司。双能 X 线骨密度检测仪(Lunar 美国),Western blot 发光与凝胶成像系统,美国 ALPHA 公司;XYJ80-2 低速离心机,江苏南京金坛恒丰仪器厂;D37520 高速离心机,德国 Heraeus 公司;电泳仪,美国 Biorad 公司;电泳槽,美国 Biorad 公司;SDS_B 型倒置生物显微镜,中国重庆光电仪器有限公司。

1.3 大鼠分组与给药

将 60 只雌性大鼠随机分为 6 组:正常对照组、模型组、丹参素高中低剂量组(30、20、10 mg/kg 体重)和对照药白藜芦醇组(5 mg/kg 体重),每组 10 只。模型组给大鼠灌胃醋酸泼尼松 5mg/kg 体重,给药体积为 10 mL/kg,用 0.5% CMC-Na 配制 0.5mg/mL 的浓度。正常对照组大鼠每天灌注同样体积的 0.5% CMC-Na。丹参素组和白藜芦醇组每日先给予模型组同样剂量的醋酸泼尼松,之后分别给予丹参素和白藜芦醇。均按给药体积为 10 mL/kg,用 0.5% CMC-Na 配制。以上给药每日次,上午给予醋酸泼尼松,下午给予受试药物,连续 14w。

1.4 骨密度 BMD 测定

麻醉处死动物后取右股骨、第四腰椎骨, -4 ℃ 保存备用。测定时待骨组织自然恢复至室温,采用双能 X 线骨密度仪进行骨密度测定。

1.5 细胞培养及分组

小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 培养于含 10 % 的 α -MEM 培养基当中,置于 37 ℃,体积分数 5% 的细胞培养箱中培养,胰酶常规传代。实验分为 4 组:A 组(正常组)不加任何处理;B 组(醋酸泼尼松组)加入终浓度为 5 μ g/mL 醋酸泼尼松;C 组(醋酸泼尼松 + 丹参素干预组)加入终浓度为 20 μ g/mL,D 组(醋酸泼尼松 + 丹参素 + Ly294002 组)加入终浓度为 20 μ mol/mL 的 Ly294002。

1.6 骨组织切片原位末端转移酶标记法(TUNEL)染色

取各组大鼠部分骨组织,进行石蜡包埋。在视交叉后 1 ~ 4 mm 处切取 10 μ m 冠状位骨组织片,每隔 4 片选取 1 片,每只大鼠选取 5 片备用。进行常规脱蜡水合之后加入蛋白酶 K(蛋白酶 K 终浓度为 0.8mg/mL),于 37 ℃ 水浴孵育 30 min。每个待检测样本中加入 50 μ L TUNEL 反应混合液(按照 TdT:荧光素标记 dUTP 为 1:9 的比例配制)。每组样本中加入 100 μ L DNase I 反应液,加入含有 HRP 的荧光素抗体进行 37 ℃ 水浴孵育 30 min,采用二氨基联苯胺(DAB)进行染色,经苏木素复染之后,于 400 倍显微镜下观察细胞凋亡。如若镜下出现细胞核成桔

红色、细胞质不着色、染色质呈块状凝聚或者裂解为颗粒状的细胞,即为阳性染色细胞。根据骨组织细胞凋亡指数(AI)的计算公式,骨组织细胞凋亡指数(AI) = 阳性细胞数/(阳性细胞数 + 阴性细胞数) × 100%。

1.7 免疫荧光检测成骨细胞 MC3T3-E1 中 pAkt 表达水平

当细胞生长到 90% 融合时,用 0.25% 的胰酶消化细胞,均匀传代后,以密度为 5×10^4 的细胞密度铺 24 空板。第二日早晨分为不同组别进行加药处理。将孔板分为 4 组,每组 6 个孔,加药培养 24 h。将长好细胞的孔板用 PBS 冲洗 3 次,每次 10 min。再以 4% 的多聚甲醛固定 1 h。固定好的孔板再用 PBS 冲洗 3 次,每次 10 min。加入 0.2% 的曲拉通作透化处理,PBS 冲洗后以 5% BSA 溶液在 37 ℃ 水浴中封闭 50 min。在吸尽封闭液后加入(1:200)的 p-AKT 抗体在 4 ℃ 条件下孵育过夜。用 PBS 缓冲液冲洗孔板,吸取一抗残液,避光下加入 FITC 标记的二抗,37 ℃ 孵育 1 h 后在加入(1:100)的 Hest33342 染核处理,经过 PBS 冲洗后在荧光显微镜下观察,并拍照。

1.8 Western blot 实验

从上述各组大鼠骨组织中以及成骨细胞 MC3T3-E1 分别提取总蛋白,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移蛋白至 NC 膜上,进行脱脂奶粉封闭 2 h 之后用 PBS 洗膜,分别加入一抗(Bax、AIF、cyto-C 和 pAkt)(1:1000 稀释),4 ℃ 孵育过夜。进行常规洗膜之后,加入 II 抗即辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:2000 稀释)并置于室温中反应 1 h。经洗膜之后采用 Image J 软件测定各条带的灰度值,以目的蛋白条带灰度值与相应的 β -actin 灰度值的比值作为 Bax、AIF、cyto-C 和 pAkt 蛋白的表达水平。

1.9 统计学处理

采用统计软件 SPSS20.0 进行分析,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据进行单因素分析及 LSD-t 组间检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠骨密度 BMD 测定

与对照组相比,模型组大鼠腰椎、右股骨的 BMD 值均有降低($P < 0.05$),给予低、中、高剂量的丹参素及白藜芦醇治疗后 BMD 值逐渐升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),低、中剂量丹参素与白藜

芦醇差异明显,高剂量丹参素与白藜芦醇差异不明显,见表 1。

表 1 各组大鼠中骨密度 BMD 值($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 BMD of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	腰椎 BMD (g/cm ²)	股骨 BMD (g/cm ²)
对照组	—	1.087 ± 0.081	0.915 ± 0.185
模型组	—	0.452 ± 0.026 *	0.432 ± 0.019 *
丹参素低剂量组	10	0.632 ± 0.019 **	0.650 ± 0.018 **
丹参素中剂量组	20	0.814 ± 0.023 **	0.792 ± 0.026 **
丹参素高剂量组	30	0.867 ± 0.015 **	0.876 ± 0.034 **
白藜芦醇组	5	0.872 ± 0.016 **	0.889 ± 0.018 **

注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,** $P < 0.05$

2.2 各组大鼠骨组织中细胞凋亡指数

从图 1 中可以看出,与正常对照组(0.193 ± 0.023%)相比,模型组骨组织中阳性细胞数目最多,细胞核呈桔红色,细胞质不着色、染色质呈块状凝聚或者裂解为颗粒状,细胞凋亡指数最大(0.741 ± 0.026%)($P < 0.05$);与模型组相比,丹参素各剂量组(从高剂量到低剂量依次为 0.385 ± 0.071%、0.296 ± 0.069%、0.193 ± 0.075%)和白藜芦醇组(0.286 ± 0.053%)骨组织中细胞凋亡均明显减少($P < 0.05$)。

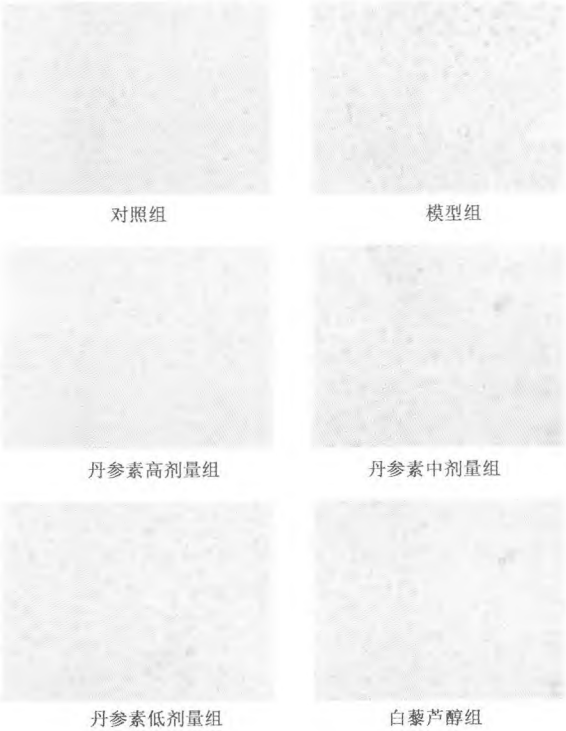


图 1 各组大鼠骨组织中细胞凋亡检测

Fig.1 The apoptosis in rat bone tissue in each group

2.3 各组大鼠骨组织中 Bax、AIF、cyto-C 蛋白表达量

如表 2 所示,与正常对照组相比,模型组大鼠骨组织中凋亡相关蛋白 Bax、AIF、cyto-C 表达量明显增加($P < 0.05$);与模型组相比,丹参素各剂量组和

白藜芦醇组骨组织中细胞凋亡相关蛋白 Bax、AIF、cyto-C 表达量均明显减少($P < 0.05$),低、中剂量丹参素与白藜芦醇差异明显,高剂量丹参素与白藜芦醇差异不明显,有统计学意义。

表 2 各组大鼠骨组织中 Bax、AIF、cyto-C 蛋白表达量($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 The expression of Bax, AIF, and cyto-C protein in rat bone tissue in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	Bax	AIF	cyto-C
对照组	-	0.149 $\pm$ 0.026	0.138 $\pm$ 0.016	0.156 $\pm$ 0.021
模型组	-	0.718 $\pm$ 0.019 *	0.685 $\pm$ 0.015 *	0.722 $\pm$ 0.024 *
丹参素高剂量组	30	0.138 $\pm$ 0.022 **	0.139 $\pm$ 0.023 **	0.136 $\pm$ 0.014 **
丹参素中剂量组	20	0.221 $\pm$ 0.016 **	0.236 $\pm$ 0.023 **	0.145 $\pm$ 0.025 **
丹参素低剂量组	10	0.241 $\pm$ 0.013 **	0.265 $\pm$ 0.034 **	0.276 $\pm$ 0.021 **
白藜芦醇组	5	0.234 $\pm$ 0.012 **	0.246 $\pm$ 0.029 **	0.253 $\pm$ 0.025 **

注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,** $P < 0.05$

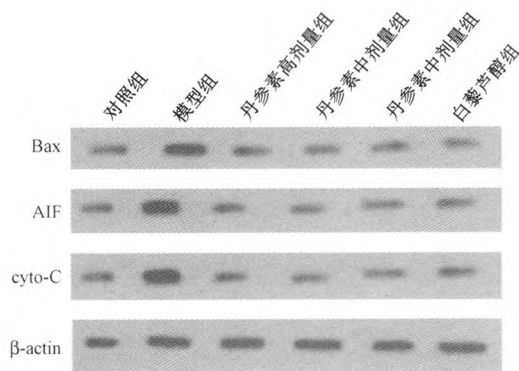


图 2 各组大鼠骨组织中 Bax、AIF、cyto-C 蛋白表达

Fig. 2 The expression of Bax, AIF, and cyto-C protein in rat bone tissue in each group

2.4 免疫荧光检测各组成骨细胞 MC3T3-E1 中 pAkt 的表达情况

如图 3 所示,从免疫荧光结果看,A 组和 B 组 pAkt 蛋白无明显区别,而 C 组 pAkt 蛋白表达明显比 B 组增加,D 组 pAkt 蛋白表达明显比 C 组减少。

2.5 成骨细胞 MC3T3-E1 中 Bax、AIF、cyto-C 和 pAkt 的表达情况

从 Western-blot 检测蛋白表达结果看,B、D 2 组中 Bax、AIF 和 cyto-C 蛋白表达明显增高,分别与 A 组、C 组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。而 C 组与 B 组相比凋亡相关蛋白 Bax、AIF 和 cyto-C 的表达明显降低。差异有显著性意义($P < 0.05$)。然而,A、B 两组中 pAkt 表达量相比并无显著差异,C 组 pAkt 表达量明显高于 D 组($P < 0.05$)。

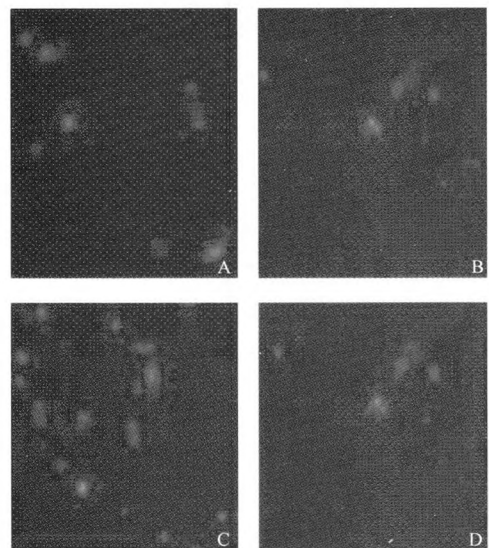


图 3 各组成骨细胞 MC3T3-E1 中 pAkt 免疫荧光表达

Fig. 3 The immunofluorescence expression of pAkt in MC3T3-E1 cells in each group

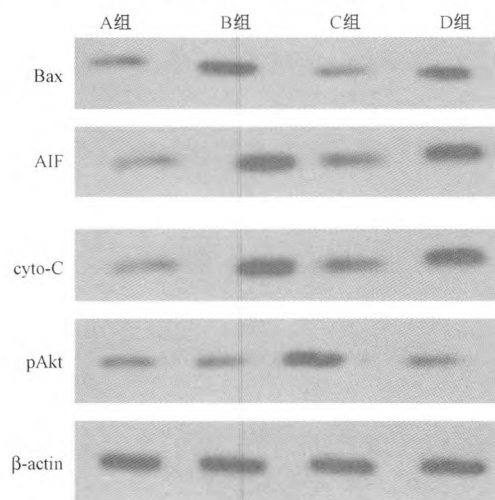


图 4 各组成骨细胞 MC3T3-E1 中 Bax、AIF、cyto-C 和 pAkt 的表达

Fig. 4 The expression of Bax, AIF, cyto-C, and pAkt proteins in MC3T3-E1 cells in each group

表 3 各组成骨细胞 MC3T3-E1 中 Bax、AIF、cyto-C 和 pAkt 的表达量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 The expression of Bax, AIF, cyto-C, and pAkt proteins in MC3T3-E1 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Bax	AIF	cyto-C	pAkt
A 组	0.145 ± 0.023	0.136 ± 0.024	0.129 ± 0.022	0.203 ± 0.019
B 组	0.786 ± 0.021 *	0.769 ± 0.016 *	0.698 ± 0.021 *	0.302 ± 0.015
C 组	0.256 ± 0.014 #	0.325 ± 0.018 #	0.295 ± 0.034 #	0.732 ± 0.013
D 组	0.732 ± 0.021 **	0.699 ± 0.018 **	0.678 ± 0.016 **	0.296 ± 0.024 **

注:与 A 组相比, * $P < 0.05$; 与 B 组相比, # $P < 0.05$; 与 C 组相比, ** $P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松症 (osteoporosis) 是一种以骨量低下, 骨微结构损坏, 导致骨脆性增加, 易发生骨折为特征的全身性骨病^[7,8]。在骨质疏松的发病过程中, 氧化应激 (ROS) 甚至凋亡都扮演了重要的角色, 各型的骨质疏松中都普遍伴有不同程度的成骨细胞凋亡和氧化应激^[9,10]。氧化应激通过抑制成骨细胞前体细胞成熟, 使成骨细胞分化率明显降低^[11], 通过对成骨细胞的矿化作用的抑制^[12], 诱导其凋亡。氧化应激也通过对骨髓基质细胞系和成骨细胞前体细胞系的分化的抑制发挥作用^[13-15]。众所周知, 长期大剂量应用糖皮质激素 (Glucocorticoid, GO) 能够诱导继发性骨质疏松, 即糖皮质激素也是诱发机体产生氧化应激并导致生理功能受阻的重要因素^[16, 17]。因此拮抗成骨细胞的凋亡以及氧化应激反应, 可以发挥减少骨质疏松现象的作用^[18]。

天然抗氧化剂丹参素是丹参中的一种水溶性多酚类成分, 具有抗骨质疏松的作用^[19, 20]。PI3K/AKT 信号传导通路作为细胞生长, 分化, 凋亡等细胞生理代谢的常见通路^[21]。为了探究丹参素抗骨质疏松的作用是否与拮抗细胞凋亡以及 PI3K/AKT 信号传导通路有关, 在本研究中, 我们采用醋酸泼尼松制备大鼠骨质疏松模型, 探究了丹参素对骨质疏松大鼠中骨组织细胞凋亡指数以及凋亡相关蛋白表达的影响。白藜芦醇是目前治疗骨质疏松常用药物, 因此被研究中采用白藜芦醇处理组作为阳性对照组。从图 1 和图 2 可以得知, 丹参素能够抑制醋酸泼尼松诱导骨质疏松大鼠中骨细胞的凋亡, 明显降低细胞凋亡蛋白 Bax、AIF、cyto-C 的表达, 并且呈现剂量依赖性关系。与白藜芦醇组相比, 不同浓度丹参素处理组对骨质疏松大鼠中骨细胞凋亡的拮抗能力各不相同, 随着剂量浓度增加而增加。这表明丹参素对骨质疏松大鼠具有保护作用, 并且高剂量丹参素处理组对骨质疏松大鼠保护能力高于白藜芦醇组。对于其机制研究, 我们发现丹参素能够上调

成骨细胞 MC3T3-E1 中 pAkt 的表达, 这表明 PI3k/Akt 通路在丹参素拮抗成骨细胞 MC3T3-E1 的凋亡过程中起到关键作用。通过抑制该通路之后, 丹参素的抗凋亡作用大大被抑制。因此, 我们推断丹参素拮抗骨质疏松中骨细胞的凋亡是通过 PI3k/Akt 通路发挥作用的。但丹参素抗凋亡的作用方式可能不是唯一的。它可能通过其他方式发挥作用。它或许激活了许多与凋亡相关的酶类, 例如某些锌指蛋白。也可能通过某些细胞因子起作用, 如胰岛素生长因子, 转移因子等等。这些还都待进一步研究。本研究发现的丹参素拮抗氧化应激引起的成骨细胞的凋亡, 这可能会是治疗骨质疏松的新途径, 期待在未来的应用中得到检验。

【参 考 文 献】

[1] Postnov A, Tsijbers DS. Glucocorticoid-induced osteoporosis in growing mice is not prevented by simultaneous intermittent PTH treatment. *Calcif Tissue Int*, 2009, 85(6): 530-537.

[2] Zhong X, Xiu L. Bezafibrate prevents palmitate-induced apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells through the NF-kappaB signaling pathway. *Int J Mol Med*, 2011, 28(4): 535-542.

[3] He X, Anderson G. Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264.7 cells through inhibition of ROS production. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 401(3): 356-362.

[4] Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev*, 2010, 31(3): 266-300.

[5] Lagouge M, Arqmann C. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, 2006, 127(6): 1109-1122.

[6] Zhou L, Zuo Z. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(12): 1345-1359.

[7] Choudhary S, Halbout P. Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells; involvement of prostaglandins. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(7): 1002-1010.

(下转第 11 页)

- estrogen deficiency. *Osteoporosis International: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2003,14(9):728-733.
- [17] Kastelan D, Giljevic Z, Kraljevic I, et al. Selective estrogen receptor modulators: A possible new treatment of osteoporosis in males. *Medical Hypotheses*, 2006,67(5):1052-1053.
- [18] Ding Y, Tang J, Zou J, et al. The effect of microgravity on tissue structure and function of rat testis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2011,44(12):1243-1250.
- [19] Engdahl C, Jochems C, Windahl SH, et al. Amelioration of collagen-induced arthritis and immune-associated bone loss through signaling via estrogen receptor alpha, and not estrogen receptor beta or g protein-coupled receptor 30. *Arthritis and Rheumatism*, 2010,62(2):524-533.
- [20] Gallo D, Mantuano E, Fabrizi M, et al. Effects of a phytoestrogen-containing soy extract on the growth-inhibitory activity of ici 182 780 in an experimental model of estrogen-dependent breast cancer. *Endocrine-related Cancer*, 2007, 14(2):317-324.
- [21] Carani C, Qin K, Simoni M, et al. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 1997,337(2):91-95.
- [22] Sims NA, Dupont S, Krust A, et al. Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone*, 2002,30(1):18-25.
- [23] Spencer GJ, McGrath CJ, Genever PG. Current perspectives on nmda-type glutamate signalling in bone. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007,39(6):1089-1104.
- [24] Kalariti N, Lembessis P, Koutsilieris M. Characterization of the glutamatergic system in mg-63 osteoblast-like osteosarcoma cells. *Anticancer Research*, 2004,24(6):3923-3929.
- [25] Cauley JA. Estrogen and bone health in men and women. *Steroids*, 2015,99(Pt A):11-15.

(收稿日期:2016-06-01;修回日期:2016-08-04)

(上接第 5 页)

- [8] 王新详, 张允岭, 黄启福. 对骨质疏松症中医主要病机和现代病因学的认识与探讨. *中国中医结合学报*, 2010,8(12):1119-1121.
- Wang XX, Zhang L, Huang QF. The understand and discussion of main pathogenesis and modern etiology on osteoporosis. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2010,8(12):1119-1121. (in Chinese)
- [9] Fatokun AA, Stone TW. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells; The effects of glutamate and protection by purines. *Bone*, 2006,39(3):542-551.
- [10] 杨亚军, 崔燎. FoxO_Wnt 通路在氧化应激介导的骨质疏松中的调控机制. *中国药理学通报*, 2013, 29(1): 27-30
- Yang YJ, Cui L. The regulating mechanism of FoxO_Wnt pathways in oxidative stress mediated osteoporosis. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2013, 29(1): 27-30. (in Chinese).
- [11] 易莉娟, 田旭, 宋国敏. 氧化应激与糖尿病骨质疏松症相关性研究进展. *中国骨质疏松杂志*, 2015,21(1):99-102
- Yi LJ, Tian X, Song GM. The study progress of the relationship between the oxidative stress and diabetic osteoporosis. *Chin J Osteoporos*, 2015,21(1):99-102. (in Chinese)
- [12] Cervellati C, Bonaccorsi GL. Oxidative stress and bone resorption interplay as a possible trigger for postmenopausal osteoporosis. *Biomed Res Int*, 2014, 563-569.
- [13] Wu Q, Zhong ZM. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in postmenopausal osteoporosis. *Med Sci Monit*, 2015, 21:2428-2432
- [14] Wilson C. Bone: Oxidative stress and osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(1): 1-3.
- [15] 周姗姗, 董慧, 徐丽君. 绝经后骨质疏松症患者性激素水平、应激相关指标与骨密度的相关性分析. *中国妇幼保健*, 2013, 28, 1298-1300.
- Zhou S, Dong H, Xu LJ. The correlation analysis of sexual hormones and oxidative stress with bone mineral density in patients with postmenopausal osteoporosis. *Chin Matern Child Health Care*, 2013, 28, 1298-1300. (in Chinese)
- [16] Yao W, Dai W. Sclerostin-antibody treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis maintained bone mass and strength. *Osteoporos Int*, 2015, Sep 18.
- [17] Zhang S, Li D. Plumbagin protects against glucocorticoid-induced osteoporosis through Nrf-2 pathway. *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20(4): 621-629.
- [18] Xue ST, Guo HF. Synthesis of a novel class of substituted benzothiophene or benzofuran derivatives as BMP-2 up-regulators and evaluation of the BMP-2-up-regulating effects in vitro and the effects on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. *Eur J Med Chem*, 2015, 96: 151-161.
- [19] Yang Y, Su Y. Tanshinol attenuates the deleterious effects of oxidative stress on osteoblastic differentiation via Wnt/FoxO3a signaling. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, Article ID 351895.
- [20] 周年, 刘波, 徐彭. 氧化应激与骨质疏松症的研究进展. *中国骨质疏松杂志*, 2014,20(12):1845-1849.
- Zhou N, Liu B, Xu P. The research progress of oxidative stress and osteoporosis. *Chin J Osteoporos*, 2014,20(12):1845-1849. (in Chinese).
- [21] 王雪鹏, 李茂强, 边振宇. PI3K_Akt 信号通路在骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化调控中的作用. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2014,7(3):250-256.
- Wang XP, Li MQ, Bian ZY. Roles of PI3K / Akt signaling pathway in regulating bone mesenchymal stem cells proliferation and differentiation. *Chin J Osteoporosis & Bone Miner Res*, 2014,7(3):250-256. (in Chinese)

(收稿日期:2015-11-03;修回日期:2016-01-24)