

· 论 著 ·

温肾固疏方调控去卵巢大鼠氧化应激及骨代谢指标的
机制研究孙振双¹ 徐道明² 朱媛媛¹ 陶文静¹ 耿元卿¹ 郭海英^{1*} 沈蕴茹¹

1. 南京中医药大学第二临床医学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中医院康复科, 江苏 南京 210023

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 06-0740-06

摘要: 目的 观察温肾固疏方对去卵巢骨质疏松模型大鼠氧化应激及骨代谢指标的影响。方法 通过切除大鼠双侧卵巢建立绝经后骨质疏松症模型。造模后, 将 40 只模型大鼠随机分为温肾固疏方高、中、低剂量组、雌二醇组、模型组; 假手术组仅切除卵巢旁脂肪组织。干预 2 月后, 检测骨组织形态学改变, 测定骨密度, 采用 ELISA 法测定血清 PINP、BGP、TRACP5b、RANKL、OPG 的含量。比色法检测血清中 MDA、CAT、SOD 水平。结果 与假手术组比较, 模型组股骨近端和股骨总 BMD 均明显降低, 模型组血清 MDA 活力明显升高 ($P < 0.05$), 而 CAT 活力下降明显 ($P < 0.01$), 血清 TRACP5b、BGP、PINP 含量明显升高 ($P < 0.01$), 而 OPG、OPG/sRANKL 比值下降 ($P < 0.05$), 骨形态改变与骨质疏松症一致; 与模型组相比: 各治疗组骨组织形态改善。雌激素组、温肾固疏方高、中剂量组 BMD 均明显增高 ($P < 0.05$)。雌激素组、温肾固疏高、中剂量组血清 PINP、BGP 含量下降 ($P < 0.05$)。雌激素组、温肾固疏中剂量组 TRACP5b 含量下降 ($P < 0.05$)。温肾固疏中、低剂量组血清 OPG 含量升高 ($P < 0.05$)。温肾固疏高、中剂量组 OPG/sRANKL 比值升高 ($P < 0.05$), 低剂量组比值明显升高 ($P < 0.01$); 雌激素组、温肾固疏中剂量组血清 MDA 活力降低 ($P < 0.05$), 温肾固疏中、高剂量组血清 CAT 活力升高 ($P < 0.05$)。结论 温肾固疏方可降低骨代谢高转换水平, 增加骨形成, 减少骨吸收而发挥抗骨质疏松作用, 抗氧化应激机制可能在其中发挥了作用。

关键词: 温肾固疏方; 绝经后骨质疏松症; 去卵巢大鼠; 氧化应激; 骨代谢

The mechanism of the warming kidney and astringing formula in oxidative stress and bone metabolism in ovariectomized rats with osteoporosis

SUN Zhenshuang¹, XU Daoming², ZHU Yuanyuan¹, TAO Wenjing¹, GENG Yuanqing¹, GUO Haiying^{1*}, SHEN Yunru¹

1. The Second Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China

2. Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing, Jiangsu 210023, China

Corresponding author: GUO Haiying, Email: sunzhenshuang@126.com

Abstract: Objective To observe the effect of the warming kidney and astringing formula on oxidative stress and bone metabolism of ovariectomized rats with osteoporosis. **Methods** Postmenopausal osteoporosis model was established in SD rats by using ovariectomized (OVX). After successful modeling, 40 rats were randomly divided into model group, estradiol valerate group, high-, middle-, and low-dose of the warming kidney and astringing formula groups, and sham group. Rats in the sham group were resected of adipose tissue only. The changes of bone mineral density (BMD), bone histomorphometry, procollagen type I amino-terminal propeptide (PINP), tartrate resistant acid phosphatase (TRACP5b), bone gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins (BGP), receptor activator of NF-kappaB ligand (sRANKL), serum osteoprotegerin (OPG), superoxide (SOD), malondialdehyde (MDA), and catalase (CAT) were detected respectively after 2 months. **Results** Compared to those in sham operation group, BMD of the proximal and the total femur in the model group decreased significantly. Serum MDA, TRACP5b, BGP, and PINP levels in rats of model group increased ($P < 0.05$), but serum CAT, OPG, and OPG/sRANKL decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the bone tissue morphology in each treatment group improved. BMD of the proximal and the total femur in estrogen group, the high- and middle-dose of the warming kidney and astringing formula group was significantly higher ($P < 0.05$). Serum OPG, CAT,

基金项目: 江苏省研究生科研创新计划项目 (KYZZ15-0272)

* 通讯作者: 郭海英, Email: sunzhenshuang@126.com

and OPG/sRANKL levels in rats of the warming kidney and astringing formula groups improved ($P < 0.05$), but serum TRACP5b, BGP, PINP, and MDA decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The warming kidney and astringing formula inhibits bone resorption, promotes bone formation, and corrects bone metabolism imbalance, which is beneficial to the treatment of postmenopausal osteoporosis. The antioxidant mechanism may play a role in the treatment process.

Key words: The warming kidney and astringing formula; Postmenopausal osteoporosis; Ovariectomized rats; Oxidative stress; Bone metabolism

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是一种与衰老有关的常见病, 由于绝经后妇女体内雌激素水平迅速降低, 导致骨量丢失显著增加, 全身骨密度 (BMD) 下降及骨组织结构变化, 使骨质疏松性增多易于骨折^[1]。随着我国的人口老龄化进程加快, 骨质疏松症已成为影响老人尤其是绝经后妇女生活质量的严重社会问题。近年来研究发现, 将雌激素缺乏作为骨质疏松的发病机制不够完善。雌激素的分泌减少、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的增加是绝经后骨质疏松症发生的重要原因^[2]。氧化应激 (oxidative stress, OS) 是绝经后骨质疏松的发病机制^[3,4]。温肾固疏方以补肾温阳, 健骨固疏为组方原则, 在绝经期骨质疏松防治中, 此方临床运用多年且安全有效。本研究通过建立绝经后骨质疏松模型, 观察温肾固疏方对去卵巢 PMOP 大鼠骨密度 (BMD)、骨代谢指标及氧化应激指标的药效作用, 探讨中药温肾固疏方治疗骨质疏松症的作用机制, 以期绝经后骨质疏松症的防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 动物

健康 9 月龄未孕 SPF 级 SD 大鼠 48 只, 雌性, 体重 (350 ± 30) g, 由南京中医药大学实验中心提供, 合格证号 SYXK(苏)2014-0001-201508662。

1.2 仪器、药物及试剂

温肾固疏方各药物组成由南京中医药大学百草堂药房提供, 方药组成: 熟地、淫羊藿、党参、丹参、枸杞、骨碎补、补骨脂等 7 味药, 按比例 8:8:4:4:4:4:3 配伍, 两次煎液过滤合并浓缩; 戊酸雌二醇 (补佳乐, 德国拜耳医药保健有限公司广州分公司, 批号 180A); 10% 水合氯醛溶液 (中国人民解放军第一医院, 批号 20130312), 青霉素 (山东鲁抗医药股份有限公司, 批号 B140808)。血清 I 型胶原分子 N 端前肽 (PINP) 试剂盒、骨钙素 (BGP) 试剂盒、抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRACP5b) 试剂盒、核因子- κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 试剂盒、骨保护素 (OPG)

试剂盒 (Jiangsu Yutong Biotechnology Co. LTD, 批号 201604)。过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20160420); 超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20160418); 丙二醛 (MDA) 测试盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20160419)。数字化双能 X 线骨密度仪 (MEDIX-90, 法国 MEDILINK 公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 去卵巢大鼠骨质疏松模型的建立: 采用双侧性腺 (卵巢) 摘除法^[5] 制备绝经后骨质疏松模型。大鼠在室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、清洁级环境饲养 1 w 后, 根据体重将 SD 大鼠随机分为两组: 假手术组 (SHAM, $n = 8$) 和去卵巢组 (OVX, $n = 40$)。OVX 组首先腹腔注射 35 mg/kg 的 10% 水合氯醛溶液麻醉, 然后背部切口行去势手术, 剪除双侧卵巢, 分层缝合。SHAM 组大鼠背部切口手术后, 仅切除卵巢旁约 1 g 重的脂肪, 不切除卵巢, 最后每只大鼠经后肢肌肉注射 8 万 U 青霉素, 连续 7 d, 密切观察。

1.3.2 分组及干预: 去卵巢组随机分为 5 组, 分别为: 模型对照组 (OVX), 中药高、中、低组及雌二醇组。大鼠自由摄食、饮水, 每周称量体重 1 次。各组大鼠均于手术后 1 个月, 切口愈合后开始分组治疗干预。大鼠等效剂量按成人 6.3 倍计算, 给药容积 0.5 mL/100 g, 中药高剂量组: 温肾固疏方 (21.21 g 生药/(kg·d)); 中药中剂量组: 温肾固疏方 (10.605 g 生药/(kg·d)); 中药低剂量组: 温肾固疏方 (5.3025 g 生药/(kg·d))。雌二醇组: 戊酸雌二醇 (10 μg /(kg·d))。模型组: 给予生理盐水 0.5 mL/100 g 灌胃; 假手术组给予生理盐水 0.5 mL/100 g 灌胃; 各组灌胃持续 2 个月。

1.3.3 标本采集及测定: 大鼠末次施治后, 禁食 24 h, 次日取材。处死前称量大鼠体质量, 用 10% 水合氯醛溶液 (35 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 右心室抽血处死。血液收集后, 4°C 静置 3 h, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血清。用酶联免疫法 (ELISA) 法检测 OPG、PINP、sRANKL、BGP、TRACP5b; 比色法检测血清中氧化应激相关指标 MDA、CAT、SOD。骨标本收

集:大鼠处死后,取右侧胫骨置于 4% 多聚甲醛中固定,用作骨形态学改变观察。骨密度(BMD)测定:取大鼠右侧胫骨,放在有机玻璃盒支架上固定,以 MEDIX-90 骨密度测定仪扫描其 BMD。

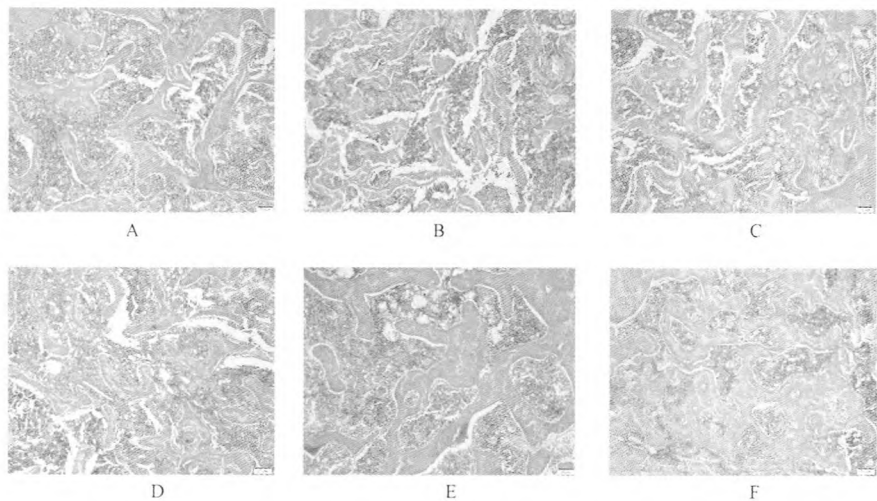
1.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均值比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠骨形态学改变

光镜下观察病理切片显示:假手术组可见骨细胞排列整齐,骨小梁中的骨细胞清晰可见,骨小梁完整,排列规则,骨髓中造血细胞丰富,脂肪细胞大小一致,形态正常。模型组大鼠可见骨松质骨小梁纤细明显,数量明显减少,部分骨小梁断裂呈现典型骨质疏松改变,提示造模成功。各干预组中温肾固疏方高、中剂量组、阳性药物组可见骨松质骨小梁纤细但不明显,数量减少不明显,较模型组有明显减轻。温肾固疏方低剂量组较模型组骨组织病理形态有改善,但无明显差异。见图 1。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 戊酸雌二醇片组;D. 温肾固疏方低剂量组;E. 温肾固疏方中剂量组;F. 温肾固疏方高剂量组

图 1 温肾固疏方对骨质疏松大鼠骨形态的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of the warming kidney and astringing formula on bone morphology of the rats (HE, ×100)

2.2 各组大鼠骨密度变化

模型组股骨近端和股骨总 BMD 均明显降低,假手术组与之比较 BMD 均明显增高($P < 0.05$);与模型组比较,雌激素组、温肾固疏方高、中剂量组 BMD 均明显增高($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 温肾固疏方对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度的影响($\text{mg}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of the warming kidney and astringing formula on BMD of the rats with osteoporosis($\text{mg}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s$)

组别	股骨	股骨近端
Sham	233.50 ± 19.59 *	236.38 ± 26.98 *
OVX	202.75 ± 17.32	201.25 ± 23.05
雌激素	235.50 ± 13.69 [△]	232.75 ± 23.31 *
低剂量	213.75 ± 28.46	212.87 ± 31.81
中剂量	232.63 ± 21.94 *	233.75 ± 31.97 *
高剂量	230.25 ± 33.86 *	236.50 ± 35.79 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$

2.3 各组大鼠血清骨代谢指标变化

假手术组与模型组比较血清 TRACP5b、BGP、PINP 明显降低($P < 0.01$),而 OPG 含量、OPG/sRANKL 比值明显升高($P < 0.05$),sRANKL 含量降低,但无统计学差异;与模型组相比:雌激素组 TRACP5b、PINP 明显下降($P < 0.05$),BGP 下降显著($P < 0.01$);温肾固疏方低剂量组大鼠血清 OPG 含量明显升高($P < 0.05$),OPG/sRANKL 比值显著升高($P < 0.01$)。温肾固疏方中剂量组 TRACP5b 含量明显下降($P < 0.05$),PINP、BGP 含量下降显著($P < 0.01$),血清 OPG 含量、OPG/sRANKL 比值明显升高($P < 0.05$)。温肾固疏方高剂量组大鼠血清 PINP、BGP 含量明显下降($P < 0.05$),OPG/sRANKL 比值明显升高($P < 0.05$)。温肾固疏方各剂量组 sRANKL 含量均下降,但无统计学意义。见表 2。

表 2 温肾固疏方对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effect of the warming kidney and astringing formula on TRACP5b, BGP, PINP, OPG, and sRANKL of rats with osteoporosis ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	TRACP5b (ng/L)	PINP (μg/L)	OPG (μg/L)	BGP(μg/L)	sRANKL(ng/L)	OPG/sRANKL
Sham	2.06 ± 0.48 ^Δ	11.53 ± 2.12 ^Δ	1.49 ± 0.30 [*]	0.81 ± 0.10 ^Δ	278.17 ± 49.47	5.40 ± 0.93 ^Δ
OVX	2.79 ± 0.52	16.68 ± 4.31	1.23 ± 0.23	1.09 ± 0.14	315.95 ± 59.82	3.98 ± 0.92
雌激素	2.18 ± 0.43 [*]	13.29 ± 3.30 [*]	1.44 ± 0.20	0.83 ± 0.14 ^Δ	304.93 ± 20.01	4.73 ± 0.56
低剂量	2.45 ± 0.58	15.65 ± 2.92	1.53 ± 0.25 [*]	1.01 ± 0.18	291.57 ± 28.41	5.22 ± 0.57 ^Δ
中剂量	2.21 ± 0.37 [*]	11.30 ± 3.12 ^Δ	1.48 ± 0.14 [*]	0.84 ± 0.12 ^Δ	296.87 ± 38.14	5.06 ± 0.83 [*]
高剂量	2.32 ± 0.31	13.06 ± 1.38 [*]	1.46 ± 0.21	0.91 ± 0.16 [*]	300.79 ± 36.81	4.89 ± 0.70 [*]

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,^Δ $P < 0.01$

2.4 各组大鼠血清抗氧化应激指标变化

假手术组与模型组比较血清 MDA 活力明显下降 ($P < 0.05$),而 CAT 活力显著升高($P < 0.01$),SOD 活力升高,但无统计学差异;与模型组相比:雌激素组 MDA 活力明显降低($P < 0.05$),温肾固疏方中剂量组大鼠血清 CAT 活力明显升高($P < 0.05$),MDA 活力明显降低($P < 0.05$)。高剂量组 CAT 活力显著升高($P < 0.01$)。雌激素与温肾固疏方各剂量组 SOD 活力均升高,但无统计学意义。见表 3。

表 3 温肾固疏方对去卵巢骨质疏松大鼠氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effect of the warming kidney and astringing formula on CAT, SOD, and MDA of rats with osteoporosis ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	CAT (U/mL)	SOD (U/mL)	MDA(nmol/mL)
Sham	17.67 ± 2.91 ^Δ	229.08 ± 11.23	9.61 ± 1.84 [*]
OVX	10.78 ± 2.19	213.41 ± 15.48	12.43 ± 2.63
雌激素	12.57 ± 2.98	228.68 ± 14.48	9.96 ± 1.36 [*]
低剂量	13.72 ± 4.15	219.71 ± 31.19	10.36 ± 2.87
中剂量	14.30 ± 1.93 [*]	225.31 ± 12.00	10.18 ± 1.28 [*]
高剂量	15.56 ± 4.33 ^Δ	229.88 ± 10.23	11.36 ± 1.42

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,^Δ $P < 0.01$

3 讨论

双侧卵巢摘除建立绝经后骨质疏松症大鼠模型是美国食品与药物管理局(FDA)和世界卫生组织(WHO)推荐的最佳模型。此模型构建后大鼠雌激素水平迅速下降,表现为骨高转换、骨吸收增加,造成骨质疏松。FDA 建议采用月龄 6~10 个月的大鼠造模,本研究选取 9 月龄大鼠造模,可较好的模拟绝经后骨质疏松状态,本研究中模型组股骨近端和股骨总 BMD 均明显降低,假手术组与之比较 BMD 均明显增高($P < 0.05$);结合各组大鼠的骨形态学改变提示了绝经后骨质疏松症大鼠模型造模成功,与模型组比较,雌激素组、温肾固疏方高、中剂量组 BMD 均明显增高($P < 0.05$)。提示温肾固疏方可

明显改善骨质疏松大鼠骨密度。

妇女绝经后期,与衰老相关的骨损失及伴随的改变使雌激素不足相关的骨质流失加剧。衰老影响机体抗氧化效应,被视为影响骨组织易受氧化应激攻击的重要因素,它与绝经后的大多数代谢改变和疾病密切相关^[6]。绝经期妇女与绝经后模型小鼠均被证实其抗氧化水平显著下降,从而导致氧自由基水平的上升和骨量的丢失^[7,8]。绝经后妇女血清炎性细胞因子浓度和促氧化生物标志物,如 4-羟基壬烯醛和丙二醛均高于绝经前妇女^[9]。本研究结果显示模型组抗氧化指标 CAT、SOD 活力下降,MDA 活力升高,各给药组血清 CAT、SOD 活力均有提高,温肾固疏方中、高剂量组 CAT 活力显著增加。雌激素组及温肾固疏方中剂量组血清 MDA 活性降低。提示与上述研究相符合,温肾固疏方具有较强的抗氧化应激损伤作用。

OPG/RANK/RANKL 信号通路是雌激素参与破骨细胞生成和抑制骨吸收作用的重要路径之一,其参与骨质疏松的发病^[10]。随着年龄的增加,成骨细胞的存活率呈下降趋势,导致骨代谢轴失衡,OPGmRNA 表达降低和 RANKLmRNA 表达增高可能是增龄性骨量流失的重要原因之一^[11]。研究发现绝经后妇女的骨密度与 OPG 水平呈正相关^[12,13],OPG 水平下降提示绝经后妇女的骨代谢正处于高转换水平,OPG 水平和 OPG/RANKL 比值升高时,说明骨形成增加而骨吸收减少^[14]。本研究中模型组与假手术组比较血清 OPG/sRANKL 比值明显升高,而 OPG 含量下降明显,提示模型组骨代谢处于高转换水平。温肾固疏方能显著提高大鼠血清 OPG 含量及 OPG/sRANKL 比值,说明其可促进骨形成增加,减少骨吸收;PINP 是骨形成的特异和敏感指标,2012 年国际骨健康联盟推荐血清 PINP 为骨形成参考指标^[15]。研究发现,绝经后骨质疏松妇女血清 PINP 值明显高于绝经后骨量减少或骨量正常

妇女^[16]。BGP是反映成骨细胞活动度的特异性骨代谢指标,研究发现,绝经后骨质疏松妇女BGP与雌激素、骨密度呈负相关^[17]。女性绝经后血清TRACP5b水平较绝经前明显增高,与骨密度呈负相关,是骨质疏松症筛查、诊断、药物治疗效果检测的敏感指标。TRACP5b不受昼夜节律变化及肝肾功能影响,是高特异性骨吸收指标^[18]。研究结果表明雌激素及温肾固疏方能显著降低OVX所致的PINP、BGP、TRACP5b水平的增加。以上结果提示温肾固疏方可能通过降低骨代谢高转换水平,提高成骨细胞活性,使骨形成增加,减少骨吸收而发挥作用抗骨质疏松作用。

中医认为“肾主骨,生髓”。肾藏先天之精,肾阳为五脏阳气的根本。本病的发病基础是肾精衰少,根本在于肾虚阳亏。温肾固疏方以补肾填精,偏以补阳组方,适于与衰老相关的绝经后骨质疏松的防治。方中多为抗骨质疏松常用药且具有抗氧化作用。如:淫羊藿可明显降低血清MDA,提高SOD、性激素水平,清除活性氧^[19]。补骨脂素(psoralen)可能通过植物雌激素OPG/RANKL/RANK系统产生骨保护作用,从而抑制骨吸收,防治骨质疏松^[20]。枸杞多糖对D-半乳糖致衰引起的小鼠肝脏、脑组织及血清中SOD含量下降、MDA含量上升具有比较显著的抑制作用,能较好地促进机体对氧自由基等的清除^[21]。温肾固疏方药可能具有抗氧化应激及抗骨质疏松的双重作用。

本实验通过对去卵巢大鼠骨密度、骨代谢及氧化应激指标的研究,证实温肾固疏方通过降低骨代谢高转换水平,使骨形成增加,减少骨吸收而发挥作用抗骨质疏松作用,同时具有抗氧化应激作用,抗氧化应激机制可能是本方抗骨质疏松的潜在机制,因此可能较适合绝经后骨质疏松这一与衰老相关的疾病的治疗。但温肾固疏方抗氧化应激防治骨质疏松的具体机制目前尚不明确,有待进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Puntus Thomas, Schneider Barbara, Meran Johannes, et al. Influence of age and gender on associations of body mass index with bone mineral density, bone turnover markers and circulating calcium-regulating and boneactive sex hormones. *Bone*, 2011, 49 (4): 824-829.
- [2] Hamidi MS, Corey PN, Cheung AM. Effects of vitamin E on bone turnover markers among US postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2012, 27 (6): 1368-1380.
- [3] Cervellati C, Bonaccorsi G, Cremonini E, et al. Oxidative stress and bone resorption interplay as a possible trigger for postmenopausal osteoporosis. *Biomed Res Int*, 2014 (2014): 569563.
- [4] Ibáñez L, Ferrándiz ML, Brines R, et al. Effects of Nrf2 deficiency on bone microarchitecture in an experimental model of osteoporosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2014 (2014): 726590.
- [5] 祁珊珊, 杨祺, 庞田田, 等. 去卵巢法构建绝经后骨质疏松模型手术探讨. *中国兽医杂志*, 2014, 2 (3): 100-103.
- [5] Qi SS, Yang Q, Pang TT, et al. A successful surgical procedure of rat ovariectomy for establishing an animal model of women's postmenopausal osteoporosis. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 2 (3): 100-103. (in Chinese)
- [6] Pansini F, Mollica G, Bergamini CM. Management of the menopausal disturbances and oxidative stress. *Curr Pharm Des*, 2005, 11: 2063-2073.
- [7] Almeida M, Han L, Martin-Millan M, et al. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem*, 2007, 282: 27285-27297.
- [8] Ozgocmen S, Kaya H, Fadillioglu E, et al. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem*, 2007, 295: 45-52.
- [9] Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S, et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas*, 2006, 53: 77-82.
- [10] 李欣艺, 邓晓莉, 刘湘源. 骨质疏松治疗新靶点. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22 (9): 1201-1210.
- [10] Li XY, Deng XL, Liu XY. New therapeutic targets of osteoporosis. *Chin J Osteoporos*, 2016, 22 (9): 1201-1210. (in Chinese)
- [11] 郭梁. 成骨细胞、破骨细胞及OPG/RANKL/RANK轴与骨质疏松. *中医正骨*, 2010, 22 (7): 41-44.
- [11] Guo L. Osteoblast, osteoclast and OPG/RANKL/RANK Axis and osteoporosis. *The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology*, 2010, 22 (7): 41-44. (in Chinese)
- [12] 高延征, 高坤, 沈彬, 等. 去卵巢后大鼠骨组织中核因子B受体活化因子配体和骨保护素表达的变化. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13 (15): 2877-2881.
- [12] Gao YZ, Gao K, Shen B, et al. Changes of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in ovariectomized rats. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2009, 13 (15): 2877-2881. (in Chinese)
- [13] 崔双, 薛昊罡. 绝经后女性骨质疏松患者骨密度与血脂和护骨素的相关性. *中国老年学杂志*, 2012, 32 (10): 2051-2053.
- [13] Cui S, Xue HG. Relationship between bone mineral density and serum lipids and bone protection in postmenopausal women with osteoporosis. *Chinese Journal of Gerontology*, 2012, 32 (10): 2051-2053. (in Chinese)
- [14] 陈鑫, 朱雄白, 林文军, 等. 仙灵骨葆胶囊治疗绝经后骨质疏松的疗效及其机制研究. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31 (10): 827-837.
- [14] Chen X, Zhu XB, Lin WJ, et al. Effect of Xianlinggubao capsule in the treatment of postmenopausal osteoporosis and its effect on osteoprotegerin, receptor activator of nuclear factor-kB ligand. *Chin J Clin Pharmacol*, 2015, 31 (10): 827-830. (in Chinese)

(下转第750页)

- e003186.
- [6] Mani A, Radhakrishnan J, Wang H, et al. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science*, 2007, 315(5816): 1278-1282.
 - [7] Kuipers AL, Miljkovic I, Carr JJ, et al. Association of circulating sclerostin with vascular calcification in Afro-Caribbean men. *Atherosclerosis*, 2015, 239(1): 218-223.
 - [8] Morales-Santana S, Garcia-Fontana B, Garcia-Martin A, et al. Atherosclerotic disease in type 2 diabetes is associated with an increase in sclerostin levels. *Diabetes Care*, 2013, 36(6): 1667-1674.
 - [9] Christiane D, Pieter E, Marc GV, et al. high levels of circulating sclerostin are associated with better cardiovascular survival in incident dialysis patients; results from the NECOSAD study. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30: 288-293.
 - [10] Alper K, Mustafa B, Aysel T, et al. serum sclerostin levels, arteriovenous fistula calcification and 2-year all-cause mortality in prevalent hemodialysis patients. *Nefrologia*, 2016, 36(1): 24-32.
 - [11] Marinou K, Christodoulides C, Antoniadis C, et al. Wnt signaling in cardiovascular physiology. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(12): 628-636.
 - [12] Jean G, Chazot C, Bresson E, et al. High serum sclerostin levels are associated with a better outcome in haemodialysis patients. *Nephron*, 2016, 132(3): 181-190.
 - [13] Register TC, Hruska KA, Divers J, et al. Sclerostin is positively associated with bone mineral density in men and women and negatively associated with carotid calcified atherosclerotic plaque in men from the African American-diabetes heart study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(1): 315-321.
 - [14] Evenepoel P, D'Haese P, Brandenburg V. Romosozumab in postmenopausal women with osteopenia. *N Engl J Med*, 2014, 370(17): 1664.
 - [15] Poole KE, van Bezooijen RL, N Loveridge, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *Faseb J*. 2005, 19(13): 1842-1844.
 - [16] Szule P, Bertholon C, Borel O, et al. Lower fracture risk in older men with higher sclerostin concentration: a prospective analysis from the MINOS study. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(4): 855-864.
 - [17] Khosla S. Pathogenesis of age-related bone loss in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2013, 68(10): 1226-1235.
 - [18] Canepa M, Ameri P, AlGhatrif M, et al. Role of bone mineral density in the inverse relationship between body size and aortic calcification: results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Atherosclerosis*, 2014, 235(1): 169-175.

(收稿日期: 2016-11-08; 修回日期: 2016-12-15)

(上接第 744 页)

- [15] Bauer D, Krege J, Lane N, et al. National Bone Health Alliance Bone Turnover Marker Project: current practices and the need for US harmonization, standardization, and common reference ranges. *Osteoporos Int*, 2012, 23(10): 2425-2433.
- [16] Kucukalic-Selimovic E, Valjevac A, Hadzovic-Dzuvo A. The utility of procollagen type I N-terminal propeptide for the bone status assessment in postmenopausal women. *Bosn J Basic Med Sci*, 2013, 13(4): 259-265.
- [17] Vs K, Ramesh M, Venkatesan V, et al. The association of serum osteocalcin with the bone mineral density in postmenopausal women. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7(5): 814-816.
- [18] Shidara K, Inaba M. Bone metabolic marker for osteoporosis. *Nihon Rinsho*, 2009, 67(5): 927-931.
- [19] 刘波, 张睿, 徐彭, 等. 淫羊藿对去卵巢大鼠骨质疏松的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(7): 178-181.
- [20] 王建华, 郭敏, 郑丽, 等. 补骨脂素干预大鼠成骨细胞骨保护素/核因子 KB 受体激活因子配体 mRNA 的表达. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 37(14): 6927-6930.
- [21] 龚涛, 王晓辉, 赵巍, 等. 枸杞多糖抗氧化作用的研究. *生物技术*, 2010, 20(1): 84-86.

(收稿日期: 2016-09-20; 修回日期: 2016-11-17)