

淫羊藿次苷 I 与其原型药物淫羊藿苷对 rBMSCs 成骨性分化的影响比较

訾慧 孙丽 蒋宁 林庶茹 郑洪新*

辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110847

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 08-1011-06

摘要: 目的 观察淫羊藿次苷 I (Icariside I) 与其原型药物淫羊藿苷 (Icariin, ICA) 对大鼠骨髓间充质干细胞 (rat bone marrow stromal cells, rBMSCs) 成骨分化过程中碱性磷酸酶 (ALP)、骨钙素 (BGP) 蛋白表达量及 ALP、BGP、Osterix 和 Runx-2 mRNA 表达的影响。方法 贴壁筛选法体外培养 rBMSCs, 以 1×10^{-5} mol/L 的 ICA 和 Icariside I 对 rBMSCs 的成骨性分化进行药物干预。ELISA 法检测 ICA 组、Icariside I 组和空白对照组及转化液组之间 ALP 活性、BGP 分泌量; RT Real-Time PCR 法检测 ALP、BGP、Osterix 和 Runx-2 mRNA 基因表达。结果 与空白对照组相比, Icariside I 与其原型药物 ICA 均可显著增强 rBMSCs 的 ALP 活性, 促进 BGP 的分泌, 提高 ALP、BGP、Osterix 和 Runx-2 的 mRNA 水平 ($P < 0.01$)。Icariside I 与 ICA 组比较, 其 ALP、BGP 蛋白表达量及基因表达明显高于 ICA 组 ($P < 0.01$), Osterix 和 Runx-2 的基因表达两组无显著性差异。结论 Icariside I 也能促进 rBMSCs 成骨性分化, 并且其活性高于原型药物 ICA, 也是淫羊藿发挥抗骨质疏松活性的主要成分。②提示补肾中药淫羊藿其补肾壮骨作用与促进 ALP、BGP 蛋白分泌量, 上调 ALP、BGP、Osterix 和 Runx-2 的 mRNA 水平有关。

关键词: 中医中药; 淫羊藿次苷 I; 淫羊藿苷; 成骨性分化

Comparative study on the osteogenic differentiation effects of icariin and icariside I in rat bone marrow stromal cells

ZI Hui, SUN Li, JIANG Ning, LIN Shuru, ZHENG Hongxin*

Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Corresponding author: ZHENG Hongxin, Email: zhenghx2002@126.com

Abstract: **Objective** To evaluate the effects of icariin and its major metabolite Icariside I on the protein expression of ALP and BGP and the mRNA expression of ALP, BGP, Osterix and Runx-2 during osteogenic differentiation in rat bone marrow stromal cells (rBMSCs). **Methods** By using the adherencemethod, BMSCs were cultured. Icariin and Icariside I were supplemented into the culture at 1×10^{-5} mol/L, respectively. The experiment groups were blank control, positive control, Icariin and Icariside I groups. ELISA was performed to examine the protein expression of ALP and BGP on the 6th, 9th, and 12th day. The expressions of ALP, BGP, Osterix and Runx-2 genes were detected using RT Real-Time PCR. **Results** Compared with that of the blank control group, Icariin and Icariside I significantly improved ALP activity and ALP and BGP amount ($P < 0.01$), and enhanced the gene expressions of ALP, BGP, Osterix and Runx-2 ($P < 0.01$). Compared with the Icariin group, Icariside I had significantly stronger effect on the gene expressions of ALP and BGP protein ($P < 0.01$), but there were no significant differences between the groups for Osterix and Runx-2 gene expressions. **Conclusion** 1) Icariside could promote the osteogenic differentiation of rBMSCs greater than Icariin, and is the main active anti-osteoporosis ingredient of the herb epimedium; 2) The function of the herb epimedium in strengthening bone of is associated with the increased production of ALP and BGP, and the upregulation of the mRNA expression of ALP, BGP, Osterix and Runx-2.

Key words: TCM; Icariside I; Icariin; Osteogenic differentiation

基金项目: 辽宁省自然科学基金指导计划项目(201602510); 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用国家教育部重点实验室开放基金项目(ZYZX1507)

* 通讯作者: 郑洪新, Email: zhenghx2002@126.com

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 以骨量减少、骨的微观结构退化为特征,致使骨的脆性增加以致易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。成骨细胞 (osteoblast, OB) 的增殖抑制、分化程度降低是造成骨质疏松的重要原因。现阶段 OP 治疗主要以雌激素、钙剂、活性维生素 D、降钙素和氟化物等为常用药物,虽然对 OP 有一定疗效,但存在不良反应大及患者不能长期耐受等缺点。中医认为,肾藏精,主骨生髓,髓藏于骨腔内,滋养骨骼,骨的生长发育依赖肾气的滋养与推动。中医临床和实验证明中医药治疗原发性 OP 疗效显著,淫羊藿为中医临床治疗骨质疏松或促进骨折愈合常用中药。

淫羊藿,辛、甘,温,归肾、肝经。具有补肾壮阳,祛风除湿功效。淫羊藿苷 (ICA) 为淫羊藿主要活性成分,现代文献报道其具有明显的促进骨形成、抑制骨吸收的活性^[1]。笔者前期的研究表明^[2],ICA 经口服进入体内,经肠道细菌分解后会产生多种代谢产物如淫羊藿次苷 I (Icariside I),淫羊藿次苷 II (Icariside II)、淫羊藿素 (Icaritin) 等,在肾、肝、脾、肌肉等组织中分布浓度较高,并且与其代谢产物共存于组织中。另有报道 ICA 在体内的生物利用度较低^[3]。Icariside I 作为 ICA 主要体内代谢产物,在对抗骨质疏松促进 OB 分化方面的实验研究未见报道。本实验选用大鼠间充质干细胞作为研究对象,在体外诱导其成骨方向分化过程中,加入 ICA、Icariside I,比较研究 ICA 及其主要代谢产物 Icariside I 对 rBMSCs 成骨性分化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂与药品

试剂:DMEM/F12 培养基 (Gibco, USA); 甘油磷酸钠、磷酸化抗坏血酸 (ASAP)、地塞米松、二甲基亚砜 (DMSO) 均购自 Sigma 公司; 类标准胎牛血清 (兰州民海生物工程有限公司); MEM- α 细胞培养液 (GIBCO 12571-063)、RNA 提取试剂盒 (QIAGEN74316)、cDNA 反转录试剂盒 (BIO-RAD170-8890)、碱性磷酸酶 ALP 测定试剂盒 (AE91640Ra, 批号:201512); 骨钙素 BGP 检测试剂盒 (AE90937Ra, 批号:201512); I 型胶原蛋白 ELISA 测定试剂盒 (AE90739Ra, 201512); RNAisoReagent、反转录试剂盒、TaqDNA 聚合酶、EasyDilution 稀释液均购自 TaAaRa 公司,引物由 TaAaRa 公司设计合成。

药品:ICA 购于中国药品生物制品检定所,批号:110737-200415; Icariside I 购于上海融禾医药科技有限公司,批号:121020。纯度均大于 98%。

1.1.2 仪器

二氧化碳细胞培养箱 (THERMO FORMA 3110)、酶标仪 (BIO-TECK Synergy H1)、凝胶成像仪 (BIO-RAD, AIK9585) 预制胶 (BIO-RAD, Mini-PROTEANTMTGX)。荧光定量 PCR 仪 (Stratagene Mx3000P, 德国安捷伦); 蛋白核酸分析仪 (DU640, 美国贝克曼); 低温高速离心机 (MR1822, 法国 Jouan SA)

1.2 方法

1.2.1 骨髓间充质干细胞培养及分组

大鼠骨髓间充质干细胞 rBMSCs (购自广州赛业有限公司), 采用胰蛋白酶消化法进行大鼠骨髓间充质干细胞的传代。

实验分组:①空白组:基础培养液:DMEM + 10 mL/dL 胎牛血清 (含 100 U/mL 青、链霉素); ②阳性转化液对照组:成骨诱导液:DMEM + 10 mL/dL 胎牛血清 (含 100 U/mL 青、链霉素) + 0.1 mol/L 地塞米松 + 50 μ g/mL 维生素 C + 10 mmol/L β -甘油磷酸钠。③ICA 组:基础培养液 + ICA 1×10^{-5} mol/L; ④ Icariside I 组:基础培养液 + Icariside I 1×10^{-5} mol/L。

1.2.2 碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定

于成骨性诱导培养第 6、9、12 天测定 ALP 活性,具体方法如下:弃培养液, PBS 洗 2 次,每孔加入缓冲液和基质液各 0.3 mL 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 加入 0.9 mL 显色液,显色后在紫外分光光度计上测定 507 nm 处光密度 D(λ) 值,空白调零,检测酚标准及样本的 D(λ) 值,根据公式换算为金氏单位。

1.2.3 骨钙素 (BGP) 含量的测定

成骨诱导培养后每 3 d 换液 1 次,每次换液时留取 1 mL 旧培养液,于 -20 $^{\circ}$ C 保存,于成骨性诱导培养第 6、9、12 天,采用 ELISA 法检测 BGP 的分泌量,以 μ g/孔表示。

1.2.4 RT-RealTime PCR 分析

药物干预 48 h,提取细胞 RNA,实时定量 PCR 检测相关基因 (ALP、BGP、Osterix 和 Runx-2) 表达量。

所用引物均委托 TaKaRa (大连) 公司根据 GeneBank 所发布的序列设计并合成 (表 1)。总 RNA 的提取采用 Trizol 一步法进行,使用核酸蛋白分析仪检测吸光度。使用 PrimeScript[®] RT reagent

Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行逆转录。使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), ROX plus 试剂盒, 以 Stratagene Mx3000p 荧光定量 PCR 仪进行检测。逆转录体系、PCR 扩增体系及反应条

件均参照说明书设定。以标本中所提取的高浓度 RNA 逆转录得到的 cDNA 作为标准品, 经等比稀释后, 进行 PCR 反应制备标准曲线。经内参校正, 求得目的基因的相对表达水平。

表 1 RT-Real Time PCR 所用引物序列
Table 1 Primer sequences for RT-Real Time PCR

物种	基因名称	GenBank 编号	引物序列(5'-3')	产物大小
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	ALP	NM_053650	F: GGCCCTAACATTCTTTGGA R: GGCTTCACTCATGGAGGTG	160bp
	Runx2	NM_001278483	F: GCCTTCAAGGTTGTAGCCCT R: TGAAGCTTTCCTCGTCCG	178bp
	Osterix	NM_001037632	F: GCCAGTAATCTTCGTGCCAG R: TAGTGAGCTTCTTCCTGGGA	77bp
	BGP	NM_013414	F: TCAACAATGGACTTGGAGCCC R: GCAACACATGCCCTAAACGG	161bp
	β -actin	NM_031144	F: CGCGAGTACAACCTTCTTGC R: CGTCATCCATGGCGAAGTGG	70bp

1.3 统计学处理

测定结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS16.0 软件处理数据, 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有极统计学意义。

2 结果

2.1 对 ALP 活性的影响

检测各组在第 6、9、12 天 ALP 的活性及含量, 随着培养时间的延长而增加。在第 12 天达到了高值。结果如图 1 所示。

2.2 对 BGP 分泌量的影响

BGP 分泌量随着培养时间的延长而增加。检测各组在第 6、9、12 天 BGP 分泌量, 在第 12 天达到了高值。结果如图 2 所示。

2.3 ICA 与 Icariside I 对 rBMSCs 骨向分化过程中 ALP、BGP、Osterix、RUNX2 基因表达的影响

ALP、BGP、Osterix、Runx2 的溶解曲线均只见一特异性峰, 表明引物的特异性好。各基因的扩增曲线均呈“S”型, 表明扩增效率较高。各组细胞 ALP、BGP、Osterix、RUNX2 基因表达结果见表 2。

3 讨论

3.1 BMSCs 成骨分化过程中相关骨形成蛋白和细胞因子

骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 是一种多能间充质干细胞, 在一定条件下可以向成骨、成脂、成软骨分化。这个过程需要谱系特异性的转录因子如 Runx-2、Osterix 等参与。BMSCs 向成骨分化的重要

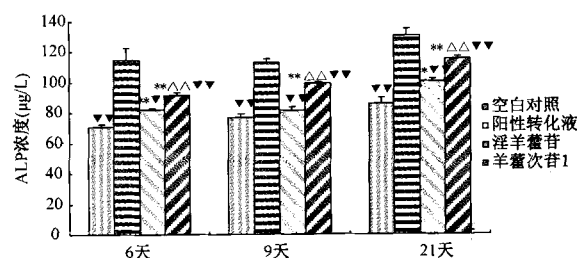


图 1 成骨性诱导后不同时间四组间 ALP 活性对比 ($n = 8$)

注: 与空白对照组比较, $**P < 0.01$; 与阳性转化液组比较, $▼▼P < 0.01$; 与 ICA 组比较, $△△P < 0.01$

与空白对照组比较, 除 ICA 组第 9 天外, 各组 ALP 的活性及含量均显著高于空白对照组 ($**P < 0.01$); 与阳性转化液对照组比较, 各组结果均有显著差异 ($▼▼P < 0.01$), 但 Icariside I 组第 12 天 ALP 活性达到阳性转化液组的近 90%, 与其最为接近; Icariside I 组和 ICA 组比较, Icariside I 组各个时间点对 ALP 活性的影响均强于 ICA 组 ($△△P < 0.01$), 并且在第 9 天即接近达到作用最高点, 达到阳性转化液组的近 90%。

Fig. 1 Comparison of ALP activity in the four groups at different time after osteogenic induction

表现是: 细胞能够合成、分泌表达成骨特异性的蛋白和细胞外基质成分, 如早期出现的碱性磷酸酶、I 型胶原蛋白等及较晚出现的骨钙素、骨涎蛋白等^[4]。

ALP 是成骨细胞分泌的一种特异性的酶, 标志着成骨细胞早期的分化程度^[5]。BGP 是成熟成骨细胞分泌的一种特异非胶原基质蛋白, 是反映成骨细胞活性的敏感指标, 也作为成骨细胞向新骨生成过程的特异性指标^[6]。

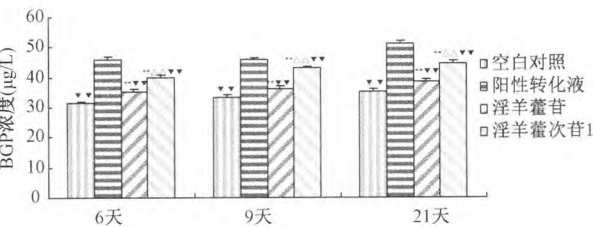


图 2 成骨性诱导后不同时间四组间 BGP 分泌量对比 (n = 8)

注:与空白对照组比较, ** P < 0. 01, 与阳性转化液组比较, ▼▼ P < 0. 01; 与 ICA 组比较, △△ P < 0. 01
与空白对照组比较, 各组 BGP 分泌量均显著高于空白对照组 (** P < 0. 01); 与阳性转化液对照组比较, 各组结果均有显著差异 (▼▼ P < 0. 01), 但 Icariside I 组第 12 天 BGP 分泌量达到阳性转化液组的近 86%; Icariside I 组和 ICA 组比较, Icariside I 组各个时间点 BGP 分泌量均强于 ICA 组 (△△ P < 0. 01)。

Fig. 2 Comparison of BGP secretion in the four groups at different time after osteogenic induction

表 2 各组细胞 ALP、BGP、Osterix、RUNX2 基因表达结果 (n = 5)
Table 2 Gene expression of ALP, BGP, Osterix and RUNX2 in each group

组别	ALP	BGP	Osterix	Runx-2
空白对照组	1	1	1	1
阳性转化液组	8. 89 ± 0. 16 [◇]	9. 25 ± 0. 18 [◇]	4. 52 ± 0. 14 [◇]	7. 05 ± 0. 20 [◇]
淫羊藿苷组	5. 92 ± 0. 61 ^{◇*}	5. 78 ± 0. 38 ^{◇*}	3. 86 ± 0. 16 ^{◇*}	5. 72 ± 0. 11 ^{◇*}
淫羊藿次苷 I 组	7. 25 ± 0. 16 ^{◇*■}	7. 52 ± 0. 98 ^{◇*■}	3. 64 ± 0. 09 ^{◇*}	4. 53 ± 0. 23 ^{◇*}

注:与空白对照组比较, [◇] P < 0. 01; 与阳性转化液组比较, ^{*} P < 0. 01; Icariside I 组与 ICA 组比较, [■] P < 0. 01。

与空白对照组相比, ICA 组和 Icariside I 组及阳性转化液组 ALP、BGP 基因表达均显著增高[◇] P < 0. 01, Icariside I 组表达高于 ICA 组; 与阳性转化液组相比, ICA 组、Icariside I 组 ALP、BGP 基因表达均较低且^{*} P < 0. 01, Icariside I 组的表达为阳性转化液组的 80% 以上; Icariside I 组与 ICA 组相比, Icariside I 组 ALP、BGP 基因表达显著增高, [■] P < 0. 01。

与空白对照组相比, ICA 组和 Icariside I 组及阳性转化液组 Osterix、Runx-2 基因表达均显著增高[◇] P < 0. 01; 与阳性转化液组相比, ICA 组、Icariside I 组 Osterix、Runx-2 基因表达均较低且^{*} P < 0. 01; Icariside I 组与 ICA 组相比, 无显著性差异。

3.2 中医理论“肾藏精”与干细胞相关性

中医认为“肾藏精生髓主骨”, 肾主藏精, 精生髓, 髓养骨。肾中的精气可以濡养和滋润骨髓, 骨的生长发育又有赖于骨髓的充养, 肾中精气旺盛则骨就强壮, 否则反之。正如《医经精义·五脏所主》所言:“肾藏精, 精生髓, 髓养骨, 故骨者肾气之所合也, 髓者肾之所生也, 精足则髓足, 髓在骨内, 髓足者则骨强。”这些论述表明出生后, 甚至成年后“肾精”仍具有生成性, 有再生的功能^[10]。即“肾精”也担负成年组织修复的功能。

《灵枢·决气》, “肾藏精”精的来由是: “两神相搏, 合而成形, 常先身生, 是为精”。因此, 肾所藏之精可相应于胚胎干细胞及它分化为各种组织器官的成体干细胞。干细胞具有先天之精的属性。现代医学研究, 干细胞是具有多向分化潜能的成体干细胞,

Runx-2 作为成骨细胞的特异转录因子和成骨细胞分化的关键调节因子, 是骨发育过程中激活与启动 BMSCs 向成骨细胞分化并调节成骨细胞成熟的重要转录因子^[7]。Runx2 通过结合成骨细胞特异性激活元件, 直接调节成骨细胞特异性基因的表达, 包括骨钙素、骨桥蛋白、I 型胶原和 ALP 等多种成骨相关基因的表达, 在骨形成的多个阶段起调控作用^[8]。Osterix 是 Runx-2 的靶基因, 受到 Runx-2 的转录调控。Osterix 是成骨细胞 OB 晚期分化所必需的特异性转录因子, 调控许多重要的 OB 晚期表型和功能蛋白的表达, 如骨钙素、骨桥素、骨涎蛋白和 I 型胶原蛋白等, 通过诱导前体成骨细胞分化为成熟的功能性成骨细胞, 对骨细胞的分化成熟和骨质形成有重要影响^[9]。

以骨髓组织含量最为丰富。骨髓间充质干细胞的分化能力与分化方向代表骨髓的功能, 该功能由中医“肾”的功能主宰, 因此认为补“肾”可以增强骨髓间充质干细胞的分化功能。干细胞分化的潜能与中药治疗骨质疏松症、骨折、骨坏死、骨缺损等骨相关疾病有着理论上的相通性。因此, 中医采用补肾中药调控骨髓间充质干细胞向成骨分化的机制以“肾藏精生髓主骨”为理论基础^[11]。

3.3 淫羊藿苷及其代谢产物促进骨代谢的研究现状

《本草纲目》: “淫羊藿味甘气香, 性温不寒, 能益精气, 乃手足阳明命门药也”。中药淫羊藿具有补肾壮阳, 益精健骨的功效, 是临床治疗 OP 常用药, 因其显著的促进骨形成、抑制骨吸收作用一直是国内外研究的热点。

ICA 是淫羊藿中含量最为丰富的黄酮苷类化合物,体外细胞实验表明 ICA 可促进 rBMSCs 的成骨性分化,促进成骨细胞 ALP 活性,促进成骨细胞 I 型胶原的分泌,从而促进成骨细胞的增殖、分化和矿化,以及抑制破骨细胞的骨吸收活性^[12,13];ICA 可通过上调成骨细胞核心结合因子 $\alpha 1$ (Cbf $\alpha 1$)、BMP-2、BMP-4 mRNA 和 Runx2 的表达而促进成骨细胞骨形成^[14]。此外,ICA 对化疗药物环磷酰胺导致小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化障碍具有保护作用,可能与 ICA 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路有关^[15]。因而具有开发为抗骨质疏松新药的潜力。

淫羊藿常以口服途径给药,主要成分 ICA 经肠道细菌分解后产生多种代谢产物,如 Icariside I、Icariside II、icariitin 等,而 ICA 生物利用度较低^[16,17],其代谢途径见图 5。翟远坤等^[18]进行 Icariside II 对体外培养 rBMSCs 成骨性分化的影响,发现 Icariside II 促进 BMSCs 成骨性分化的活性高于 ICA。Icariside I 也是 ICA 的体内主要代谢产物之一,在对抗 OP 促进 OB 分化方面的实验研究未见报道。因此本实验研究 Icariside I 抗骨质疏松活性并与 ICA 活性进行比较。

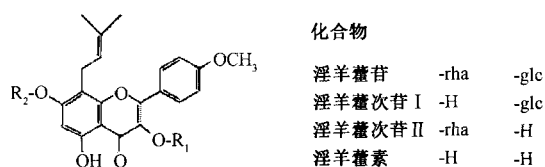


图 3 淫羊藿苷代谢途径与产物

Fig. 3 metabolic pathways and metabolites of icariin

3.4 ICA 和 Icariside I 对主要成骨活性标志物 ALP、BGP 蛋白的影响

实验发现,ICA 和 Icariside I 均能够促进 BMSCs 成骨性分化,具体表现在明显提高 ALP 活性,增加 BGP 分泌量,且随着培养时间的延长而增加。与正常对照组比较,除 ICA 组第 9 天外,各组 ALP 的活性及含量均显著高于空白对照组 ($P < 0.01$); Icariside I 组和 ICA 组比较, Icariside I 组各个时间点 ALP 活性及 BGP 分泌量均强于 ICA 组 ($P < 0.01$)。

3.5 ICA 和 Icariside I 对 ALP、BGP、Osterix 和 Runx-2 基因表达的影响

实验发现,ICA 和 Icariside I 均可强烈促进成骨性分化因子 ALP、BGP,上调体外培养的成骨细胞 Runx-2,并可进一步调节其下游基因 Osterix 的转录

表达,促进 OB 增殖、分化。与空白对照组比较,ICA 和 Icariside I 组及阳性转化液组 ALP、BGP、Osterix、Runx-2 基因表达均显著增高 $P < 0.01$,但低于阳性转化液组且 $P < 0.01$; Icariside I 组 ALP、BGP 基因表达显著高于 ICA 组且 $P < 0.01$ 。ICA 组、Icariside I 组 Osterix、Runx-2 基因表达相比,无显著性差异。

结果表明,ICA 作为淫羊藿的主要有效成分,经体内生物转化后,其代谢物 Icariside I 也具有抗 OP 活性,并且其作用强于原型药物 ICA。根据中医理论,肾中精气充盛,对骨形成有较好的促进作用,其作用机制与其能够促进 ALP、BGP、Osterix、Runx-2 基因及蛋白表达有关。提示 ICA 可通过口服途径给药,进行抗骨质疏松药效学评价。Icariside I 与 ICA 比较,主要差别在于脱去 3 位鼠李糖,这可能是活性增强的主要原因,但具体机理还需做进一步的研究。

【参考文献】

- [1] 鲍远,黄俊明,靖兴志,等.淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化.中国组织工程研究,2016,20(24):3501-3507.
Bao Y, Huang JM, Jing XZ, et al. Icaritin promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2016, 20(24): 3501-3507. (in Chinese)
- [2] 晔慧,李可强,尚德阳,等.单体及复方中的淫羊藿苷在骨质疏松模型大鼠体内代谢及组织分布的比较.中国实验方剂学杂志,2015,21(6):135-139.
Zi H, Li KQ, Shang DY, et al. Comparative study on metabolism and tissue distribution in osteoporosis model rats treated by single icariin and compound containing icariin. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 21(6): 135-139. in Chinese)
- [3] Xu W, Zhang Y, Yang M, et al. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of icariin and its major metabolites in rat plasma. J Pharm Biomed Anal, 2007, 45(4): 667-672.
- [4] Yuan ZH, Shang J, Shao GJ, et al. Construction of BMP4 /7 fusion gene adeno-associated virus and biological effects of transfection on bone marrow stromal cells in rabbits. Orthopedic J China, 2008, 20: 1568-1572.
- [5] Kyeyune - Nyombi E, Lau KH, Baylink DJ, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates both alkaline phosphatase gene transcription and mRNA stability in human bone cells. Arch Biochem Biophys, 1991, 291(2): 316-325.
- [6] Alexandrakis MG, Passam FH, Malliaraki N, et al. Evaluation of bone disease in multiple Myeloma: a correlation between biochemical markers of bone metabolism and other clinical parameters in Untreated multiple myeloma patients. Chim Acta, 2002, 325: 51-57.
- [7] Saito T, Ogawa M, Hata Y, et al. Acceleration effect of human

- recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod*, 2004, 30: 205-208.
- [8] 董世武, 应大君, 段小军, 等. 核心结合因子 $\alpha 1$ 对骨髓间充质干细胞成骨细胞标志基因表达的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19: 746-750.
- Dong SW, Ying DJ, Duan XJ, et al. Effect of core-binding factor $\alpha 1$ on the expression of osteoblast gene marker mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 2005, 19: 746-750. (in Chinese)
- [9] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002, 108: 17-29.
- [10] Liu TH, Wang Y, Wang BX, et al. Studies on the metabolism of icariin by intestinal bacteria part I: The transformation of icariin by intestinal flora. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2000, 31 (11): 834-837.
- [11] 葛继荣, 郑洪新, 万小明, 等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识 (2015). *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21 (9): 1023-1028.
- Ge JR, Zheng HX, Wan XM, et al. Expert consensus on the prevention and treatment for primary osteoporosis with traditional Chinese medicine. *Chin J Osteoporos*, 2015, 21 (9): 1023-1028. (in Chinese)
- [12] Xu W, Zhang Y, Yang M, et al. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of icariin and its major metabolites in rat plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45 (4): 667-672.
- [13] 何伟, 李自力, 崔元璐, 等. 淫羊藿苷对大鼠成骨细胞核结合因子 $\alpha 1$ 、骨形成蛋白-2、骨形成蛋白-4 mRNA 表达的影响. *北京大学学报: 医学版*, 2009, 41 (6): 669-673.
- HE W, Li ZL, Cui YL, et al. Effect of icariin on the MRNA expressions of Cbfa1, BMP2, BMP4 in rat osteoblast. *Journal of Peking University*, 2009, 41 (6): 669-673. (in Chinese)
- [14] 李佳, 朱爱松, 谢晚晴, 等. 关于补肾中药防治骨关节炎分子机制的体外实验研究. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22 (7): 877-882.
- Li J, Zhu AS, Xie WQ, et al. Study of the mechanism of benefiting kidney herbs in the prevention and treatment of osteoarthritis in vitro. *Chin J Osteoporos*, 2016, 22 (7): 877-882. (in Chinese)
- [15] 杨志烈, 王成龙, 赵东峰, 等. 淫羊藿苷对环磷酸腺苷导致小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化障碍的保护作用. *中国组织工程研究*, 2016, 20 (6): 777-784.
- Yang ZL, Wang L, Zhao DF, et al. Icarin protects against cyclophosphamide-induced obstacle of mouse bone marrow mesenchymal stem cells differentiating into osteoblasts. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2016, 20 (6): 777-784. (in Chinese)
- [16] 刘铁汉, 王毅, 吴立军, 等. 淫羊藿苷的肠菌代谢研究 I. 肠内细菌对淫羊藿苷的代谢转化. *中草药*, 2000, 31 (11): 834-837.
- Liu TH, Wang Y, Wu J, et al. Studies on the metabolism of icariin by intestinal bacteria part I: the transformation of icariin by intestinal flora. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2000, 31 (11): 834-837. (in Chinese)
- [17] Yao ZH, Liu MY, Dai Y, et al. Metabolism of Epimedium-derived flavonoid glycosides in intestinal flora of rabbits and its inhibition by gluconolactone. *Chin J Nat Med*, 2011, 9 (6): 461-465.
- [18] 翟远坤, 葛宝丰, 陈克明, 等. 淫羊藿苷与其代谢产物淫羊藿次苷 II 对骨髓间充质干细胞成骨性分化影响的比较研究. *中药材*, 2010, 33 (12): 1896-1900.
- Zhai YK, Ge BF, Chen KM, et al. Comparative study on the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells effected by icariin and icaraside II. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2010, 33 (12): 1896-1900. (in Chinese)
- (收稿日期: 2017-01-14; 修回日期: 2017-02-20)

(上接第 1006 页)

- [10] Duarte VM, Ramos AM, Rezende LA, et al. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. *J Bone Miner Metab*, 2005, 23 (1): 58-68.
- [11] 杨虹, 卢学勉, 林爱菊, 等. 老年男性 2 型糖尿病患者下肢血管病变与骨质疏松的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (1): 75-77.
- Yang H, Lu XM, Lin AJ, et al. Relationship vascular lesions in the lower extremities and osteoporosis in elderly male people with type 2 diabetic mellitus. *Chin J Arteriosclerosis*, 2010, 18 (1): 75-77.
- [12] Niernarm I, HanneHlarln A, Nauck M, et al. The association between insulin-like growth factor I and bone turnover markers in the general adult population. *Bone*, 2013, 56 (1): 184-190.
- [13] 徐覃莎, 张海涛, 郁明姬, 等. 胰岛素及降糖药物治疗对 2 型糖尿病骨密度的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2012, 18 (10): 937-939.
- Xu QS, Zhang HT, Yu MJ, et al. Effect of insulin and glucose-reducing drug therapy on bone mineral density in patients with type 2 diabetes mellitus. *Chin J Osteoporos*, 2012, 18 (10): 937-939.
- [14] Mackawy AMH, Badawi MEH. Association of vitamin D and vitamin D receptor gene polymorphisms with chronic inflammation, insulin resistance and metabolic syndrome components in type 2 diabetic Egyptian patients. *Meta Gene*, 2014, 2: 540-556.
- (收稿日期: 2016-12-13; 修回日期: 2017-02-25)