

· 综述 ·

高盐/肾素-血管紧张素-醛固酮系统与骨代谢

陈瑞晗^{1,2} 陈珺^{1,2*}

1. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006

2. 广东药科大学生物资源与创新药物研究中心, 广东 广州 510006

中图分类号: R589.4; R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 11-1518-05

摘要: 近年来,越来越多的研究证实高盐摄入除了导致高血压,还会影响骨代谢过程。而机体的水盐代谢主要受肾素-血管紧张素-醛固酮系统调节,亦有研究发现该系统具有参与调节骨代谢的作用。本文综述近年来对高盐/肾素-血管紧张素-醛固酮系统影响骨代谢及其机制的相关研究,旨在揭示水盐代谢与骨代谢相关性的理论依据。

关键词: 高盐; 钠离子; 肾素-血管紧张素-醛固酮系统; 骨代谢; 骨丢失; 骨质疏松

High salt/renin-angiotensin-aldosterone system and bone metabolism

CHEN Ruihan^{1,2}, CHEN Jun^{1,2*}

1. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006

2. Center for Bioresources & Drug Discovery, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Corresponding author: CHEN Jun, Email: weiwei6207@sina.com

Abstract: In recent years, more and more studies confirm that high salt intake may not only lead to hypertensive, but also affect bone metabolism. Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays an important role in regulation of water and salt metabolism, as well as in regulation of bone metabolism. This review focuses on the effects of high salt-intake and RAAS on bone metabolism and its mechanism, in order to provide theoretical basis for the correlation between water and salt metabolism and bone metabolism.

Key words: High salt; Sodium; RAAS; Bone metabolism; Bone loss; Osteoporosis

骨代谢包括骨形成和骨吸收两个方面,遗传、种族、年龄、体重、环境、生活习惯、饮食营养及内分泌等多种因素都将影响骨代谢过程,若各因素的综合影响使得骨吸收大于骨形成,就会导致骨量流失,骨密度(bone mineral density, BMD)降低,骨微结构破坏,骨脆性增加,引发骨质疏松症(osteoporosis, OP)。OP是最常见的老年病之一,随着世界人口老龄化的趋势日益明显,OP带来的公共卫生问题和社会经济问题愈发突出,进一步探明病因并寻找新的防治思路和药物靶点是OP临床与基础研究的当务之急。近年来,越来越多的研究证实高盐摄入与骨量和骨密度直接相关^[1-2],而调节机体水盐代谢的肾

素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS),在维持血压稳定和水盐平衡的同时,也能影响骨代谢^[3-6]。本文立足于RAAS系统,对高盐摄入-水盐代谢-骨代谢的关系展开综述。

1 饮食摄入高盐影响骨代谢

食盐(NaCl)不仅是常用的烹饪调味料,也是人类生存最重要的物质之一,具有维持机体渗透压、参与调节体内酸碱平衡和胃酸形成等重要生理功能。但过量摄入盐分可能引起机体内水盐代谢失衡,并导致一系列疾病。NaCl摄入量与高血压发病率、平均血压水平密切相关^[7];高盐饮食不仅可致小鼠心、肝、肾组织中超氧化物歧化酶活力降低,丙二醛含量升高,使心、肝、肾组织细胞发生损伤^[8],还可直接作用于免疫细胞、影响机体免疫内稳态的平衡^[9]。高盐摄入亦可能增加骨质疏松风险, Titze

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81400853);广东省普通高校国际暨港澳台合作创新平台及国际合作重大项目(2015KJHZ022);中央财政支持地方高校发展专项资金(粤财政[2016]202号)

* 通讯作者: 陈珺, Email: weiwei6207@sina.com

等^[10]以高盐的饮食对盐敏感性大鼠进行研究,结果发现高盐饮食增加盐敏感性大鼠尿钠、钙的排泄,造成胫骨 BMD 减少、骨量减少,说明高盐摄入与骨丢失有直接关系。Woo 等的临床研究也证实 65 岁及以上受试者的总髌 BMD、腰椎 BMD 与年龄、尿钠/肌酐(Na/Cr)呈负相关,绝经后妇女平均 BMD 随着尿 Na/Cr 的增加而下降,与体质量指数、饮食钙摄入呈正相关,说明高盐摄入会减少总髌 BMD、腰椎 BMD 并增加绝经后妇女 OP 的风险^[1-2]。Kim 等^[11]对 3635 名绝经后妇女的调查分析亦认为每日过度的钠摄入量与较高的骨质疏松患病率有关。此外,本课题组亦在动物实验中观察到高盐饮食导致大鼠腰椎骨骨量下降,骨结构变差的现象,主要是成骨功能相关基因表达抑制,骨形成能力降低所致^[12-13]。

2 高盐引起钙失衡和代谢性酸中毒,导致骨代谢失衡

早在 1937 年 Harrison 就指出,骨骼中不仅含有大量的钙,也存在数量不小的钠,约占体内总钠量 50% 的钠离子存在于骨骼中,钙/钠比例约为 30:1^[14-15]。研究者们普遍认为,高盐摄入在增加尿钠排泄的同时也使尿钙排泄升高,而钙代谢失衡会影响正常的钙磷代谢,导致骨重建和骨丢失增加的补偿性反应而使骨质流失^[16]。长期大量摄入的 NaCl 也会降低动脉血浆中 pH 值和碳酸氢盐的水平,而骨矿物质的溶解度是高度 pH 敏感的,当 pH 下降到 7.0 以下,会刺激破骨细胞介导的骨吸收和抑制成骨细胞介导的骨形成,直接诱导骨矿物的溶解,最终导致骨钙的净损失;长期的盐负荷还会减少磷酸盐和碳酸氢盐的重吸收,诱发代谢性酸中毒,刺激破骨细胞骨吸收,导致骨钙丢失^[17-18]。此外,钠负荷导致水盐代谢失衡、血压增高,也是钙代谢紊乱的诱因之一,由于甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)分泌增多,骨化三醇(1,25-(OH)₂D₃)也随之增加,从而增加钙的吸收速率,诱发过量的钙丢失,增加骨重建^[19]。临床研究发现绝经后妇女的低钙高盐饮食会使尿钙排出增多,血清钙降低,PTH 分泌亢进,最终导致高血压和 OP^[20];使用降压药物噻嗪类利尿剂可以减少尿钙排泄,改善 BMD^[21];Dvorak 等^[22]的体外细胞实验亦证实噻嗪类药物能直接刺激成骨细胞成骨特异性转录因子(RUNX2)和骨桥蛋白的产生,增加矿化结节的形成。

3 高盐与醛固酮-RAAS 系统的相关性

RAAS 系统主要由肾素、血管紧张素 I(Ang II)、

血管紧张素 II(Ang II)、血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)、醛固酮(alдостерone, Ald)等构成,是人体内重要的水盐代谢调节系统,对心血管系统的正常发育,心血管稳态、电解质和体液平衡的维持,以及血压的调节均有重要作用。Ald 是 RAAS 系统的终产物,属于类固醇类激素,主要作用于肾脏,负责调控钠离子及水分的再吸收,是维持细胞外液容量和电解质平衡的重要激素。Natarajan 等^[23]、Cavka 等^[24]的临床研究证实高盐饮食血浆肾素活性和 Ald 水平降低,RAAS 系统受到抑制,上皮钠运输减少。Maia 等^[25]通过对雌性大鼠在妊娠前和妊娠期间高盐饮食,发现母体肾脏 ACE 活性、Ang II 均降低,而后代中雌性肾脏 ACE 活性较低,雄性肾脏 Ang II 较低。Nakagawa 等^[26]在鸟苷酸环化酶-A(GC-A)基因敲除小鼠中发现,高盐饮食能够增加 Ald 用药组中 GC-A 基因敲除小鼠的 Sgk1 的表达。因此,推测高盐通过影响 Ang II、ACE、Sgk1 活性从而来调节 RAAS。

4 醛固酮-RAAS 系统与骨代谢的相关性

近年来的研究表明,Ald 也具有促进氧化应激、致心肌纤维化、血管重塑等作用,与多种疾病的发生发展有关(如 Bartter 氏综合征、Addison 病等)。研究者们也注意到 Ald 水平变化对骨代谢的影响,并指出上皮细胞的醛固酮信号通路与骨代谢相关基因通路存在显著相关性^[27]。NR3C2 和 PIK3R1 醛固酮信号通路参与骨代谢,其中 NR3C2 编码 MR、Ald 通过与骨细胞、成骨细胞、破骨细胞上的 MR 结合从而促进成骨细胞分化,而 PIK3R1 编码磷脂酰肌醇激酶 3 的亚基,通过调节成骨细胞和破骨细胞分化来参与骨代谢。此外,PRKCH 和 SCNN1B 可能是影响骨代谢的潜在候选基因,即醛固酮信号通路可能通过编码骨代谢相关基因而诱发 OP。Jaffe 等^[28]通过免疫印迹和腺病毒启动子报告基因分析证实 Ald 通过独立于骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)成骨途径的机制来激活内源性盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor, MR)促进钙化血管细胞(calcifying vascular cell, CVC)的成骨细胞分化和矿化,并伴有成骨指标基因(alkaline phosphatase, ALP)的增加。另外,Ald 还能通过调节钠氯共同转运子(sodium chloride cotransporter, NCC)蛋白、上皮钠离子通道(epithelial sodium channel, ENaC)影响骨代谢^[29]。Runyan 等^[30]实验发现大鼠高醛固酮会伴随着尿钙、尿镁排泄的增加,

继发性甲状旁腺功能亢进,骨吸收增加。临床研究则发现充血性心力衰竭伴有继发性醛固酮增多症的老年患者出现了改变氧化还原状态和组织消化(包括骨)的全身性疾病,其骨骼表现为 BMD 和骨强度大量下降,骨折发生增加,即使是短期的醛固酮增多症也会使老年人面临骨折的风险^[31]。

研究发现,RAAS 在参与血压调节的同时也能调控破骨细胞的骨吸收作用,RAAS 系统中的 AngII 不仅能显著增加酒石酸抗性酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)阳性多核破骨细胞的数目,同时还能诱导成骨细胞中 RANKL 受体活化剂的表达,提高成骨细胞线粒体中活性氧和超氧化物水平,促进破骨细胞活化,损伤成骨细胞中的线粒体 DNA(mtDNA),导致成骨细胞凋亡,而这些作用受 AngII 1 型受体(AT₁)阻断剂(奥美沙坦)和丝裂原-活化蛋白激酶抑制剂的抑制^[5-6]。另有报道称骨组织局部肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)能够通过经典(ACE-Ang II-AT1R 轴)和非经典(ACE-Ang II-AT2R 轴)途径共同维持血压稳定和水盐平衡,RAS 由 AngII、ACE、AT₁ 和 AT₂ 组成,成骨细胞上有 AT₁ 和 ACE 的表达,RAS 还能促进前成骨细胞表达 NF-κB 配体和基质金属蛋白酶,抑制成骨细胞分化,诱导前破骨细胞、间接刺激破骨细胞形成,导致骨吸收增加,OP 发生^[34]。Shimizu 等^[6]对去卵巢大鼠施用 Ang II [200ng/(kg·min)],能加速 TRAP 活性增加,并伴随骨密度显著降低和尿脱氧吡啶啉增加;而对自发性高血压大鼠构建的去卵巢模型大鼠,采用奥美沙坦(一种 AngII 受体拮抗剂)治疗能明显减弱卵巢切除术诱导的 BMD 降低、TRAP 活性和尿脱氧吡啶啉增加。

另外,Bayorh 等^[32]研究发现,长期高盐饮食的大鼠虽然血浆中 Ald 和 Ang II 水平降低,但心脏局部独立的 RAAS 活性增加,心脏组织中的血浆 AngII 的表达增高,Ald 浓度亦升高。而 Michel 等^[33]的实验证明,长期高盐饮食会抑制循环血中肾素的释放和 RAAS 系统的激活,这可能是机体在早期高盐摄入时出现的代偿机制,以便于促进钠排出体外。

综上所述,醛固酮-RAAS 系统可以通过编码骨代谢相关基因,调控成骨细胞和破骨细胞功能而影响骨代谢过程。

5 高盐-Ald-ENaC 参与调节骨代谢

上皮钠离子通道(epithelial sodium channel, ENaC)是细胞膜上的一种糖基化大分子蛋白,属于

ENaC/DEG 超基因家族,是非电压依赖性钠离子通道蛋白,它通过活性和开放概率的变化来调节 Na⁺ 的转运速率,维持细胞内外 Na⁺ 的平衡^[34]。20 世纪 90 年代末已有研究证实 UMR-106 成骨细胞样细胞系和原代培养的人成骨细胞中都表达 ENaC,且 α-ENaC 整个编码区的 cDNA 克隆序列与从大鼠结肠克隆得到的 α-ENaC 序列相同^[35]。研究发现环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)、氮氧化合酶(NO synthetase, NOS)、电压敏感性钙通道(voltage-sensitive calcium channels, VSCCs)和环氧合酶-2(cyclooxygenase 2, COX2)等都参与了 ENaC 的调节^[36-41]。本课题组的前期研究也从多角度探讨了 ENaC 参与调节骨代谢的作用。体外细胞实验证实 ENaC/Na⁺ 的变化能调节大鼠、小鼠成骨细胞增殖分化并影响成骨功能指标基因和蛋白的表达,并且发现 Na⁺ 对成骨细胞的影响具有双向作用^[15,42-43];动物实验发现饮食中摄入较低钠盐有利于幼鼠骨骼生长,给予高盐饮食的幼鼠骨量减少、血清 Ald 水平明显降低^[44]。此外,在针对 ENaC 调节因素和相关信号通路的研究中发现,雌激素、糖皮质激素、中药提取物/中药含药血清等作用于成骨细胞后,均可能通过 ENaC 这一胞膜受体调节其他成骨功能相关基因^[45-49];而外源性给予 cGMP 可以通过直接作用于 ENaC,或通过 cGMP/pKG II/ENaC 通路实现促成骨作用^[50]。

ENaC 也是 Ald 调控 Na⁺ 重吸收,实现电解质内环境稳态和酸碱平衡并维持血压作用的主要靶点。Ald 与 MR 结合后能够激活 Sgk1 信号通路,从而使 Medd-2 磷酸化,而后者可以激活 ENaC^[51]。Chen 等^[52]用 Ald 处理细胞培养物导致 MR 迁移到细胞核室,并且能刺激人类骨髓内皮细胞中的 ENaC 从头合成;可溶性 MR 和膜结合的 ENaC 与细胞微管蛋白原位共定位,导致内皮细胞体积增加,并且能在高血压的情况下调节血管生成。

Beavan 等^[53]对新生儿肋骨和成人髌骨活检标本的研究发现,骨细胞、成骨细胞、破骨细胞以及软骨细胞组织上也存在 MR。刘德凤等^[29]发现大鼠高盐饮食时 Ald 减少,肾远端小管 NCC 及 ENaC 的表达减少,反之,低盐饮食时 Ald 增多,NCC 及 ENaC 的表达增多。而高 Ald/盐的大鼠在应用螺内酯等 Ald 受体拮抗剂干预后,BMD 增加,并减少甲状旁腺功能亢进和骨丢失^[54]。因此,推测 Ald 可能通过骨功能细胞上的 MR 调节 ENaC 而影响骨代谢。

6 小结

综上所述,高盐摄入影响骨代谢已经有多方面的研究和证据支持,长期高盐摄入不利于骨健康的现象也越来越受到重视,但高盐导致骨代谢失衡的机制目前仍未完全清楚,本文主要以 ENaC-RAAS 系统为切入点来综述高盐影响骨代谢的可能机制,进一步探究钠盐及其调控因素与骨代谢之间的内在联系与机制,阐明水盐代谢和骨代谢的关系,对于预防和治疗骨代谢疾病具有重要意义。

【 参 考 文 献 】

- [1] Woo J, Kwok T, Leung J, et al. Dietary intake, blood pressure and osteoporosis. *J Hum Hypertens*, 2009, 23 (7) : 451-455.
- [2] Kim SW, Jeon JH, Choi YK, et al. Association of urinary sodium/creatinine ratio with bone mineral density in postmenopausal women; KNHANES 2008-2011. *Endocrine*, 2015, 49 (3) : 791-799.
- [3] Nakai K, Kawato T, Morita T, et al. Angiotensin II suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation via AT1 receptor in ROS17/2. 8 cells. *Arch Med Sci*, 2015, 11 (3) : 628-637.
- [4] Asaba Y, Ito M, Fumoto T, et al. Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension. *J Bone Miner Res*, 2009, 24 (2) : 241-250.
- [5] Li Y, Shen G, Yu C, et al. Angiotensin II induces mitochondrial oxidative stress and mtDNA damage in osteoblasts by inhibiting SIRT1-FoxO3a-MnSOD pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 455 (1-2) : 113-118.
- [6] Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB J*, 2008, 22 (7) : 2465-2475.
- [7] Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24-hour urinary sodium and potassium excretion. *BMJ*, 1988, 297 (6644) : 319-328.
- [8] 刘春, 李卫, 缪进, 等. 高盐饮食对小鼠心肝肾的影响. *现代预防医学*, 2010, 37 (24) : 4653-4654.
Liu C, Li W, Miao J, et al. Effect of high-salt diet on the heart, liver and kidney of mice. *Modern Preventive Medicine*, 2010, 37 (24) : 4653-4654. (in Chinese)
- [9] Binger KJ, Gebhardt M, Heinig M, et al. High salt reduces the activation of IL-4-and IL-13-stimulated macrophages. *J Clin Invest*, 2015, 125 (11) : 4223-4238.
- [10] Titze J, Rittweger J, Dietsch P, et al. Hypertension, sodium retention, calcium excretion and osteopenia in Dahl rats. *J Hypertens*, 2004, 22 (4) : 803-810.
- [11] Kim Y, Kim HY, Kim JH. Associations between reported dietary sodium intake and osteoporosis in Korean postmenopausal women; the 2008-2011 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Asia-Pacific Journal of Public Health*, 2017, 29 (5) : 430-439.
- [12] Lu L, Cheng Q, Chen J, et al. The influence of dietary sodium on bone development in growing rats. *Arch Anim Nutr*, 2011, 65 (6) : 486-496.
- [13] 贾欢欢, 卢丽, 陈珺, 等. 高盐饮食对雄性大鼠腰椎松质骨的影响及其机理研究. *广东药学院学报*, 2014, 30 (4) : 463-466.
Jia HH, Lu L, Chen J, et al. Effect and mechanism of high salt diet on lumbar spongy bone in male rats. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2014, 30 (4) : 463-466. (in Chinese)
- [14] Harold E. The sodium content of bone and other calcified material. *J Biol Chem*, 1937, 120 (2) : 457-462.
- [15] 李英彬, 李青南. 钠盐及其调控因素对骨骼影响的研究进展. *中国药理学通报*, 2012, 28 (10) : 1342-1345.
Li YB, Li QN. Advances in sodium salt and its regulating factors effects on bone. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2012, 28 (10) : 1342-1345. (in Chinese)
- [16] Park SM, Joung JY, Cho YY, et al. Effect of high dietary sodium on bone turnover markers and urinary calcium excretion in Korean postmenopausal women with low bone mass. *Eur J Clin Nutr*, 2015, 69 (3) : 361-366.
- [17] Frings-Meuthen P, Baecker N, Heer M. Low-grade metabolic acidosis may be the cause of sodium chloride-induced exaggerated bone resorption. *J Bone Miner Res*, 2008, 23 (4) : 517-524.
- [18] Kato K, Morita I. Promotion of osteoclast differentiation and activation in spite of impeded osteoblast-lineage differentiation under acidosis: effects of acidosis on bone metabolism. *Biosci Trends*, 2013, 7 (1) : 33-41.
- [19] Heaney R. Role of dietary sodium in osteoporosis. *J Am Coll Nutr*, 2006, 25 (3 Suppl) : 271-276.
- [20] Park JS, Choi SB, Rhee Y, et al. Parathyroid hormone, calcium, and sodium bridging between osteoporosis and hypertension in postmenopausal Korean women. *Calcif Tissue Int*, 2015, 96 (5) : 417-429.
- [21] Arrabal-Polo MA, Arias-Santiago S, de Haro-Muñoz T, et al. Effects of aminobisphosphonates and thiazides in patients with osteopenia/osteoporosis, hypercalciuria, and recurring renal calcium lithiasis. *Urology*, 2013, 81 (4) : 731-737.
- [22] Dvorak MM, De Joussineau C, Carter DH, et al. Thiazide diuretics directly induce osteoblast differentiation and mineralized nodule formation by interacting with a sodium chloride co-transporter in bone. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18 (9) : 2509-2516.
- [23] Natarajan AR, Eisner GM, Armando I, et al. The renin-angiotensin and renal dopaminergic systems interact in normotensive humans. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27 (1) : 265-279.
- [24] Cavka A, Cosic A, Jukic I, et al. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. *J Physiol*, 2015, 593 (24) : 5313-5324.
- [25] Maia DR, Lopes KL, Heimann JC, et al. High maternal sodium intake alters sex-specific renal renin-angiotensin system components in newborn Wistar offspring. *J Dev Orig Health Dis*, 2016, 7 (3) : 282-289.
- [26] Nakagawa H, Somekawa S, Onoue K, et al. Salt accelerates

- aldosterone-induced cardiac remodeling in the absence of guanylyl cyclase-A signaling. *Life Sci*, 2016, 165:9-15.
- [27] Gupta M, Cheung CL, Hsu YH, et al. Identification of homogeneous genetic architecture of multiple genetically correlated traits by block clustering of genome-wide associations. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(6):1261-1271.
- [28] Jaffe IZ, Tintut Y, Newell BG, et al. Mineralocorticoid receptor activation promotes vascular cell calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(4):799-805.
- [29] 刘德凤. 醛固酮-WNK4 参与盐负荷对远端肾小管钠离子转运体表达的调节. 上海:复旦大学, 2010.
- Liu DF. The involvement of MNK4 in the dietary salt regulation of sodium transports in the kidney through aldosterone. Shanghai: Fudan University, 2010. (in Chinese)
- [30] Runyan AL, Chhokar VS, Sun Y, et al. Bone loss in rats with aldosteronism. *Am J Med Sci*, 2005, 330(1):1-7.
- [31] Chhokar VS, Sun Y, Bhattacharya SK, et al. Loss of bone minerals and strength in rats with aldosteronism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(5):2023-2026.
- [32] Bayorh MA, Ganafa AA, Emmett N, et al. Alterations in aldosterone and angiotensin II levels in salt-induced hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 2005, 27(4):355-367.
- [33] Michel FS, Norton GR, Majane OH, et al. Contribution of circulating angiotensinogen concentrations to variations in aldosterone and blood pressure in a group of African ancestry depends on salt intake. *Hypertension*, 2012, 59(1):62-69.
- [34] Haerteis S, Krueger B, Korbmayer C, et al. The delta-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) enhances channel activity and alters proteolytic ENaC activation. *J Biol Chem*, 2009, 284(42):29024-29040.
- [35] Kizer N, Guo XL, Hruska K, et al. Reconstitution of stretch-activated cation channels by expression of the alpha-subunit of the epithelial sodium channel cloned from osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(3):1013-1018.
- [36] Chraïbi A, Vallet V, Firsov D, et al. Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol*, 1998, 111(1):127-138.
- [37] Carattino MD, Sheng S, Kleyman TR. Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress. *J Biol Chem*, 2004, 279(6):4120-4126.
- [38] Van't Hof RJ, Macphie J, Libouban H, et al. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 2004, 145(11):5068-5074.
- [39] McAllister TN, Frangos JA. Steady and transient fluid shear stress stimulate NO release in osteoblasts through distinct biochemical pathways. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(6):930-936.
- [40] Xu Z, Choudhary S, Okada Y, et al. Cyclooxygenase-2 gene disruption promotes proliferation of murine calvarial osteoblasts in vitro. *Bone*, 2007, 41(1):68-76.
- [41] Lu XL, Huo B, Chiang V, et al. Osteocytic network is more responsive in calcium signaling than osteoblastic network under fluid flow. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(3):563-574.
- [42] 虎松艳, 金小冬, 张豪, 等. 上皮钠离子通道对大鼠破骨细胞分化和骨吸收功能的影响. 南方医科大学学报, 2016, 36(8):1148-1152.
- Hu SY, Jin XD, Zhang H, et al. Role of epithelial sodium channel in rat osteoclast differentiation and bone resorption. *J South Med Univ*, 2016, 36(8):1148-1152. (in Chinese)
- [43] 卢丽, 林晓慧, 陈珺, 等. 钠离子调节成骨细胞功能及其相关基因的差异性变化. 广东医学, 2012, 33(3):299-302.
- Lu L, Lin XH, Chen J, et al. Regulation of sodium on osteoblast and osteogenesis genes. *Guangdong Medical Journal*, 2012, 33(3):299-302. (in Chinese)
- [44] 卢丽, 何敬韬, 陈珺, 等. 钠离子对幼年期雌性大鼠骨骼生长的影响. 广东医学, 2011, 32(15):1953-1955.
- Lu L, He JT, Chen J, et al. The effects of sodium intake on bone growth in immature female rats. *Guangdong Medical Journal*, 2011, 32(15):1953-1955. (in Chinese)
- [45] Yang GZ, Nie HG, Lu L, et al. Estrogen regulates the expression and activity of epithelial sodium channel in mouse osteoblasts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2011, 57(Suppl):1480-1486.
- [46] 陈珺, 巫小容, 卢丽, 等. 上皮钠离子通道参与雌激素影响成骨细胞成骨的作用. 中国药理学杂志, 2011, 46(3):180-184.
- Chen J, Wu XR, Lu L, et al. Effects of estrogen on osteoblast via epithelial sodium channel. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2011, 46(3):180-184. (in Chinese)
- [47] Lu L, Wu L, Jia H, et al. The epithelial sodium channel is involved in dexamethasone-induced osteoblast differentiation and mineralization. *Cell Biol Toxicol*, 2012, 28(5):279-289.
- [48] 陈珺, 刘家剑, 卢丽, 等. 血清药理学研究车前子对成骨细胞功能的影响. 中药材, 2012, 35(11):1820-1824.
- Chen J, Liu JJ, Lu L, et al. Effects of drug serum of plantagin semen on bone formation function of rat osteoblast in vitro. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2012, 35(11):1820-1824. (in Chinese)
- [49] Gao JL, Chen J, Yang GZ, et al. Ferulic acid induces proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro through cGMP/PKGII/ENaC signaling. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 12(27):1-12.
- [50] Chen J, Zhang H, Zhang X, et al. Epithelial sodium channel enhanced osteogenesis via cGMP/PKGII/ENaC signaling in rat osteoblast. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(4):2161-2169.
- [51] Studer RA, Person E, Robinson-Rechavi M, et al. Evolution of the epithelial sodium channel and the sodium pump as limiting factors of aldosterone action on sodium transport. *Physiol Genomics*, 2011, 43(13):844-854.
- [52] Chen W, Valamanesh F, Mirshahi T, et al. Aldosterone signaling modifies capillary formation by human bone marrow endothelial cells. *Vascul Pharmacol*, 2004, 40(6):269-277.
- [53] Beavan S, Horner A, Bord S, et al. Colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in human bone. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(8):1496-1504.
- [54] Law PH, Sun Y, Bhattacharya SK, et al. Diuretics and bone loss in rats with aldosteronism. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(1):142-146.