· 中医中药 ·

温肾固疏方对去势大鼠骨组织中Ⅰ型胶原及组织蛋白酶 K 表达的影响

朱媛媛[1] 郭海英[1*] 孙振双[2] 徐道明[3] 沈蕴茹[1] 陶文静[1] 孙菁[1]
1. 南京中医药大学,江苏 南京 210000
2. 河南省人民医院,河南 郑州 450000
3. 江苏省中医院针灸康复科, 江苏 南京 210000

中图分类号: R285. 5 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006-7108(2019) 04-0533-07

摘要: **目的** 研究温肾固疏方对绝经后骨质疏松症的防治作用。**方法** 通过切除大鼠双侧卵巢建立绝经后骨质疏松大鼠模型。造模后,SD 大鼠随机分为模型组、雌激素组、温肾固疏方高、中、低剂量组,每组 8 只。假手术组仅切除卵巢旁脂肪组织。干预 2 个月后,通过 HE 染色观察骨组织、肾组织形态;ELISA 法测定血清 PICP、ICTP、CTX、NTX 的含量;免疫组化法测定 Col Ⅰ、Cath K 表达率的变化。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠血清 ICTP、NTX、CTX 含量均明显升高($P<0.01$),骨组织形态改变与骨质疏松症一致,肾组织出现炎性改变,骨组织中 Cath K 含量明显增高($P<0.01$),Col Ⅰ蛋白含量显著降低($P<0.01$);与模型组相比,血清 ICTP、NTX、CTX 含量显著降低($P<0.05$),且温肾固疏方高剂量组比中、低剂量组表达明显。温肾固疏方中、高剂量组血清 PICP 含量显著增高($P<0.01$)。各治疗组骨组织形态改善,肾组织炎性改变减轻。各治疗组骨组织 Cath K 蛋白的表达均降低($P<0.01$),Col Ⅰ蛋白表达显著升高($P<0.01$)。**结论** 温肾固疏方能够通过下调破骨细胞 Cath K 的表达来抑制骨基质中 Col Ⅰ的分解,起到治疗绝经后骨质疏松症的作用。

关键词: 温肾固疏方;绝经后骨质疏松症;去卵巢大鼠;Ⅰ型胶原;组织蛋白酶 K

Effects of the warming kidney and astringing formula on type Ⅰ collagen (Col Ⅰ) metabolism and the expression of Cathepsin K in bone tissue of ovariectomized rats

ZHU Yuanyuan[1], GUO Haiying[1*], SUN Zhenshuang[2], XU Daoming[3], SHEN Yunru[1], TAO Wenjing[1], SUN Jing[1]
1.Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000
2.Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000
3. Department of acupuncture and rehabilitation, Jiangsu Provincial Hospital of TCM, Nanjing 210000, China
* Corresponding author:GUO Haiying, Email: ghying63@126.com

Abstract: **Objective** To study the preventive and therapeutic effect of the warming kidney and astringing formula on postmenopausal osteoporosis. **Methods** Postmenopausal osteoporosis model was established in SD rats using ovariectomy (OVX). After successful modeling, 40 rats were randomly divided into model group, estradiol valerate group, and high-, middle-, and low-dose warming kidney and astringing formula groups. Rats in the sham group were resected of adipose tissue only. After treatment for 2 months, bone tissue and kidney tissue morphology was observed using HE staining; the content of PICP, ICTP, CTX and NTX were determined by ELISA. The expression of type Ⅰ collagen (Col Ⅰ) and cathepsin K (Cath K) in bone tissue was determined by immunohistochemistry. **Results** Compared with those in sham group, serum ICTP, NTX and CTX were all significantly increased ($P<0.01$) in the model group. The histomorphological change of the bone in the model group was consistent with osteoporosis, and the kidney tissue has undergone inflammatory changes; the expression of Cath K in bone tissue was increased ($P<0.01$), and the expression of Col Ⅰ protein was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the levels of serum ICTP, NTX and CTX were significantly decreased ($P<0.05$), and the decrease in the high dose warming kidney and astringing formula group

基金项目: 江苏省卫生计生委干部保健局项目(BJ16019);省级中医康复示范(江苏)中心建设项目(K2017ykf18); 江苏省研究生教育教学改革研究与实践课题(JGZZ15-078)

* 通信作者: 郭海英,Email: ghying63@126.com

was significantly greater than that in the medium and low dose groups. The serum PICP content in the middle and high dose groups of warming kidney and astringing formula was significantly increased ($P<0.01$). Bone tissue morphology was improved in each treatment group, and the inflammatory changes in the renal tissue were alleviated. The expression of Cath K was decreased in all treatment groups ($P<0.01$), and the expression of Col I protein was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** The expression of Cath K of osteoclasts can be reduced by the warming kidney and astringing formula, which can inhibit the decomposition of Col I in bone matrix and play certain role in the treatment of postmenopausal osteoporosis.

Key words: the warming kidney and astringing formula; postmenopausal osteoporosis; ovariectomized rats; Col Ⅰ; Cath K

绝经后骨质疏松(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是由于妇女绝经后雌激素分泌减少,相对稳定状态被破坏,骨重建偶联过程失衡,所导致的全身性、代谢性骨病[1]。PMOP与其常见并发的骨折严重影响了绝经后妇女的健康,其发病率预计会随着寿命的延长而增长。温肾固疏方以补肾壮骨为组方原则,临床应用于PMOP的治疗且安全有效。本研究通过建立PMOP大鼠模型,观察温肾固疏方对去卵巢大鼠成骨细胞Ⅰ型胶原(Col I)代谢、破骨细胞组织蛋白酶K(cathepsin K, Cath K)表达的影响,探求温肾固疏方治疗PMOP的作用机制,以期为PMOP的防治提供新的方向。

1 材料和方法

1.1 动物

健康9月龄未孕SPF级雌性SD大鼠48只,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。本实验操作均于SPF级动物房完成,实验过程中对动物的处置均依据科技部《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 仪器、药物及试剂

温肾固疏方各中药均购置于南京中医药大学百草堂,共7味药:熟地、淫羊藿、枸杞、党参、丹参、骨碎补、补骨脂,按比例配伍,煎煮浓缩;戊酸雌二醇(德国拜耳医药保健有限公司);10%水合氯醛溶液(中国人民解放军第一医院);青霉素(山东鲁抗医药股份有限公司);血清Ⅰ型前胶原羧基末端前肽(PICP)、Ⅰ型胶原交联羧基末端肽(ICTP)、Ⅰ型胶原交联氨基末端肽(NTX)和Ⅰ型胶原交联碳端肽(CTX)试剂盒(南京翼飞雪生物科技有限公司);Col I、Cath K抗体(SAB公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 去势大鼠骨质疏松模型的建立:用双侧性腺(卵巢)摘除法[2]制备PMOP大鼠模型。把SD大鼠随机分为两组:假手术组(SHAM, $n=8$)和去卵巢组(OVX, $n=40$)。麻醉后在无菌条件下,固定大鼠使其呈俯卧位,OVX组行背部切口剪除双侧卵巢,分层缝合。SHAM组大鼠行背部切口,切除卵巢旁脂肪1 g,不切除卵巢。最后每只大鼠经后肢肌注8万U青霉素,密切观察一周。

1.3.2 分组及干预:随机把OVX组大鼠分为5组,8只/组。分为:模型组、雌激素组、温肾固疏方高、中及低剂量组。大鼠常规饲养,每周称重1次。手术1个月后切口愈合,开始对大鼠分组干预。大鼠同类药等效剂量按照成人的6.3倍计算,给药容积0.5 mL/100 g。温肾固疏方高剂量组:温肾固疏方[21.21 g/(kg·d)生药];中剂量组:温肾固疏方[10.605 g/(kg·d)生药];低剂量组:温肾固疏方[5.3 025 g/(kg·d)生药];雌激素组:戊酸雌二醇[10 μg/(kg·d)];模型组和假手术组均给予生理盐水0.5 mL/100 g灌胃。各组均连续灌胃2个月。

1.3.3 标本的采集及测定:大鼠末次灌胃给药后,禁食24 h后取材。处死前称量大鼠体重,腹腔注射10%水合氯醛溶液(35 mg/kg)进行麻醉,右心室抽血处死。血液收集后,4 ℃静置3 h,3 000 r/min离心10 min,分离血清。用酶联免疫法(ELISA)法检测PICP、ICTP、CTX、NTX含量。骨标本收集:大鼠处死后,取左侧股骨置于4%多聚甲醛中固定,待做石蜡切片,用于骨形态学观察和免疫组化。肾脏收集后,待做石蜡切片,用于形态学观察。

1.4 统计学处理

实验结果定量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用统计软件SPSS 22.0进行分析。定量资料满足正态分布以及方差齐性时,组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),组内比较用配对t检验,以$P<0.05$定为差异有统计学意义。当方差齐性时,采用LSD方法进行组间多重比较;方差不齐时,组间比较采用非参数检验Kruskal-Wallis进行统计学分析;组内比较运用Wilcoxon秩和检验分析。

2 结果

2.1 骨组织形态学观察

光镜下观察病理切片显示，假手术组大鼠股骨形态正常，骨小梁结构正常，排列整齐且紧密，间隙较小（图 1 A）；模型组与假手术组相比，大鼠骨小梁变细，存在连续性中断，排列稀疏，间隙较大，视野中大量骨陷窝空泡，提示造模成功（图 1B）；各干预组中，温肾固疏方高剂量组大鼠股骨形态基本恢复正常，骨陷窝空泡消失。温肾固疏方低、中、高剂量组和雌激素组与模型组相比，骨小梁结构有所恢复，骨陷窝空泡逐渐减少，且中药组疗效与浓度有关，高剂量组疗效优于中、低剂量组，见图 1C～图 1F。

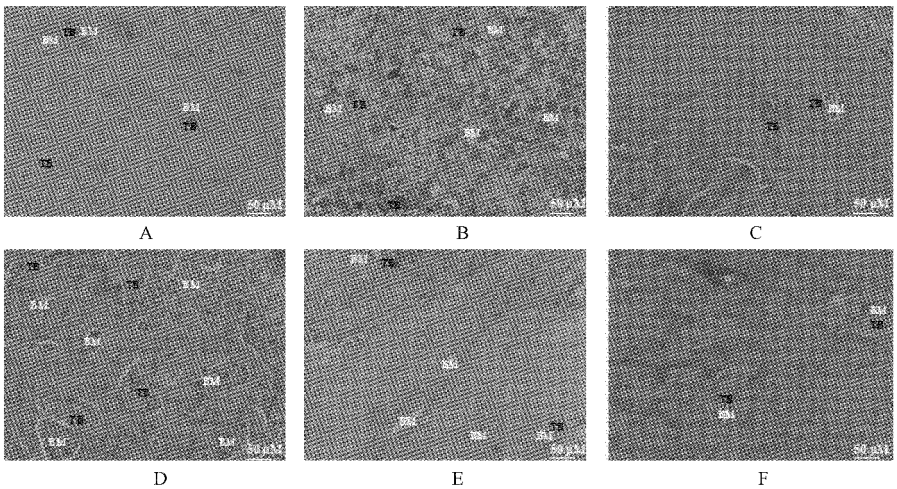

图 1 温肾固疏方对去势大鼠骨形态的影响（HE，×200） TB：骨小梁；BM：骨髓腔；A：假手术组；B：模型组；C：雌激素组；D：温肾固疏方低剂量组；E：温肾固疏方中剂量组；F：温肾固疏方高剂量组。

Fig.1 Effects of the warming kidney and astringing formula on bone morphology in rats with osteoporosis (HE, ×200) TB: trabecular bone; BM: bone marrow cavity; A: sham group; B: model group; C: estradiol valerate group; D: low-dose of the warming kidney and astringing formula group; E: middle-dose of the warming kidney and astringing formula group; F: high-dose of the warming kidney and astringing formula group.

2.2 肾组织形态学观察

假手术组未见肾间质炎细胞浸润，肾小管结构完整，系膜细胞排列整齐，肾小管上皮细胞没有变性坏死（图 2 A）；模型组出现弥散性肾间质炎细胞浸

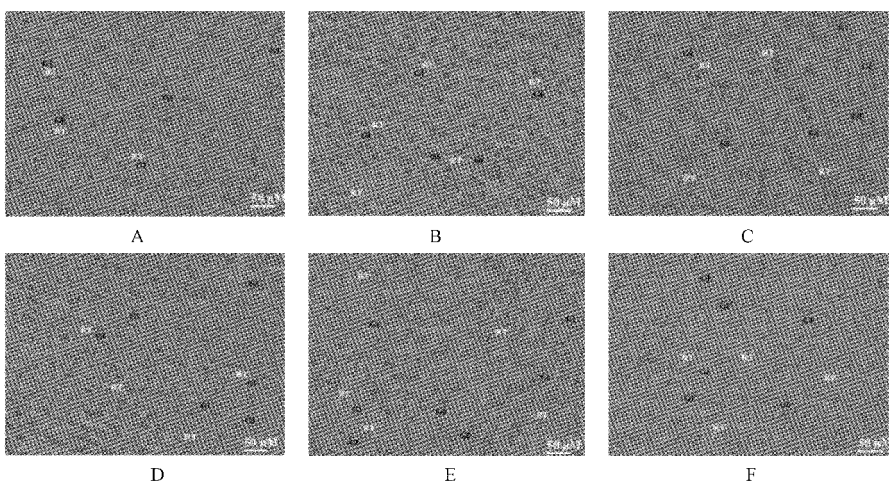

图 2 温肾固疏方对去势大鼠肾脏组织形态的影响（HE，×200） GI：肾小球；RT：肾小管；A：假手术组；B：模型组；C：雌激素组；D：温肾固疏方低剂量组；E：温肾固疏方中剂量组；F：温肾固疏方高剂量组。

Fig.2 Effects of the warming kidney and astringing formula on kidney morphology of rats with osteoporosis (HE, ×200) GI: glomeruli; RT: renal tubules.; A: sham group; B: model group; C: estradiol valerate group; D: low-dose of the warming kidney and astringing formula group; E: middle-dose of the warming kidney and astringing formula group; F: high-dose of the warming kidney and astringing formula group.

润，系膜细胞增生，系膜区基质增多，肾小管基底膜明显增厚，肾小管上皮细胞存在肿胀、变性及部分小管呈灶状萎缩（图 2B）；中药各组与雌激素组肾间质炎细胞浸润减弱，肾小球基底膜增厚得到缓解，系膜细胞增生、系膜区基质增多有所减轻，见图 2C～图 2F。

2.3 血清骨转化指标 PICP、ICTP、NTX 和 CTX 的测定

假手术组与模型组相比较，血清 ICTP、NTX、CTX 明显降低（$P<0.01$），而 PICP 含量虽降低，但无统计学意义；与模型组相比较，雌激素组血清 ICTP、NTX、CTX 明显降低（$P<0.01$），PICP 含量升高，但无统计学意义；温肾固疏方低剂量组血清 ICTP 含量明显降低（$P=0.001$），NTX 含量降低（$P<0.01$），CTX 含量降低（$P=0.05$），PICP 含量升高，但无统计学意义；中药温肾固疏方高、中剂量组血清 ICTP、NTX、CTX 显著降低（$P<0.01$），PICP 含量明显升高（$P<0.01$）。见表 1。

表 1 温肾固疏方对去势大鼠血清 PICP、ICTP、NTX、CTX 的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Table 1 Effects of the warming kidney and astringing formula on PICP, ICTP, NTX and CTX levels of rats with osteoporosis ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

	PICP/（ng/L）	ICTP/（ng/L）	NTX/（nmol/L）	CTX /（ng/L）
假手术组	6.00±0.66	502.08±56.04*	9.06±0.66*	64.65±10.83*
模型组	6.71±0.44	1130.26±87.09	14.79±0.73	203.14±6.91
雌激素组	7.43±0.80	561.91±44.95*	10.01±0.48*	62.10±16.02*
中药低剂量组	6.65±0.77	981.51±55.14*	10.92±0.49*	190.61±9.63△
中药中剂量组	9.24±0.70*	890.10±86.14*	9.82±0.58*	136.98±8.98*
中药高剂量组	11.91±0.45*	767.41±84.93*	8.67±0.40*	79.39±9.49*

注：与模型组比较，*$P<0.01$，△$P=0.05$。

2.4 温肾固疏方对 Col I 蛋白表达的影响

Col I 蛋白阳性染色呈黄色、棕黄色，为颗粒状或纤维状，主要在成骨细胞间质中，少量表达于骨细胞胞质中。病理显微镜下观察各组染色切片可以发现，雌激素组、假手术组、中药温肾固疏方高、中及低剂量组 Col I 蛋白表达呈现阳性。与假手术组相比，模型组大鼠的皮质骨及骨小梁中染色略浅，温肾固疏方高、中、低剂量组、雌激素组的灰度比模型组略有增加。免疫组织化学染色结果采用 Image Pro Plus6.0 分析软件做图像分析，计算阳性区域的积分光密度（integra optical density，IOD）计算其平均值。结果见表 2、图 3。

表 2 温肾固疏方对去势大鼠骨组织 Col I、Cath K 蛋白免疫组化染色的平均 IOD 值（$\times10^3$，$\bar{x}\pm s$）

Table 2 The IOD values of the warming kidney and astringing formula on immunohistochemical staining of Col I and Cath K protein in bone tissue of rats with osteoporosis ($\times10^3$, $\bar{x}\pm s$)

	Col I	Cath K
假手术组	28.84±0.88*	16.78±0.64*
模型组	14.64±1.39	65.98±1.13
雌激素组	26.9±0.90*	20.80±0.98*
中药低剂量组	18.46±1.14*	55.16±1.50*
中药中剂量组	22.18±0.77*	43.76±1.29*
中药高剂量组	25.88±1.72*	22.62±1.48*

注：与模型组比较，*$P<0.01$。

2.5 温肾固疏方对 Cath K 蛋白表达的影响

Cath K 蛋白阳性染色为棕黄色，主要在破骨细胞胞质中，少量阳性颗粒存在于成骨细胞细胞质。病理显微镜下观察各组染色切片发现，与假手术组相比，Cath K 蛋白在模型组表达明显增多；与模型组相比，Cath K 蛋白在中药温肾固疏方组和雌激素组表达显著减少。结果见表 2、图 4。

3 讨论

绝经后骨质疏松症的发生与众多因素相关，主要与卵巢功能的衰退、雌激素分泌减少密切相关。《素问》提及：“女子七七，任脉虚，天癸竭”。“肾主骨，生髓”，绝经后妇女肾精亏虚，故骨骼不养，导致了 PMOP 的发生。补肾温阳是中医抗衰老及防治 PMOP 的共同治则，温肾固疏方以温肾壮骨为组方原则，临床防治 PMOP 疗效显著。本课题组多项实验及临床研究，均证实了温肾固疏方的疗效，与模型组相比较，温肾固疏方各治疗组大鼠的骨密度（bone mineral density, BMD）均显著升高（$P<0.05$），骨形态学发生改变，并且从其抗氧化应激、调节炎细胞因子、调控 ApoE 水平的角度探讨了温肾固疏方抗 PMOP 的机制[3-5]。本次研究观察到，中药温肾固疏方组可以通过抑制 Cath K 的表达来抑制 Col I 蛋白的分解，改善骨质疏松大鼠的骨结构。

现代医学研究[6]发现，绝经后妇女雌激素的流

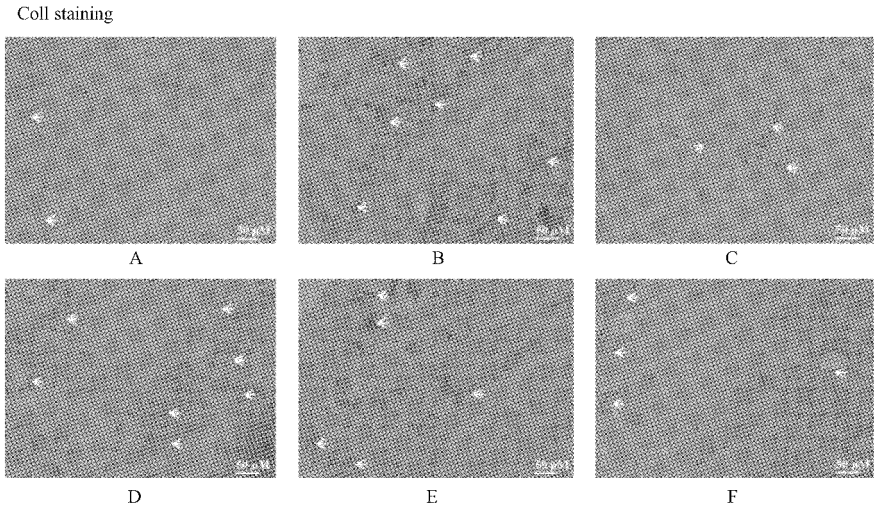

图 3 温肾固疏方对去势大鼠骨组织 Col I 蛋白免疫组化染色结果(×200)

Fig.3 Results of the warming kidney and astringing formula on immunohistochemical staining of Col I in bone tissue of rats with osteoporosis(×200)

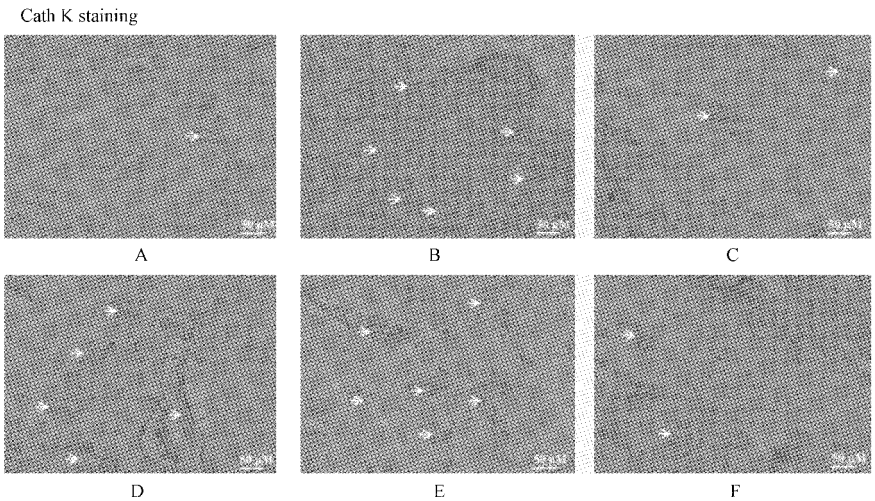

图 4 温肾固疏方对去势大鼠骨组织 Cath K 蛋白免疫组化染色结果(×200) A:假手术组; B:模型组; C:雌激素组; D:温肾固疏方低剂量组; E:温肾固疏方中剂量组; F:温肾固疏方高剂量组。

Fig.4 Results of the warming kidney and astringing formula on immunohistochemical staining of Cath K in bone tissue of rats with osteoporosis (×200) A: sham group; B: model group; C: estradiol valerate group; D: low-dose of the warming kidney and astringing formula group; E: middle-dose of the warming kidney and astringing formula group; F: high-dose of the warming kidney and astringing formula.

失与骨的流失呈正相关,因此雌激素替代疗法(HRT)是女性的主要骨骼保护方法。因易引发乳腺癌变和子宫内膜癌等不良事件,美国食品及药物管理局(FDA)下达安全警告,并建议慎用雌激素替代疗法用于预防和治疗骨质疏松治症[7],临床常用的其他西药也副作用层出。近来,对于具有抗骨吸收以及与合成代谢相关的药物研发日渐增多,比如以 Cath K 为靶点的抑制剂,拥有良好的应用前景。本课题组使用方药为郭海英教授研制的温肾固疏方,依据 PMOP 患者肾虚精亏,髓减骨枯为根本病机,建立补肾壮骨之法,兼补益脾气,活血化瘀之效。本方由 7 种药物组成,以淫羊藿、熟地黄共为君药,温肾阳、滋肾阴;党参健脾益气;补骨脂脾肾双补;丹参活血补血;枸杞、骨碎补补肾温阳,填精益髓。全方共奏补肾壮骨、健脾益气之功。药理学研究[8-10]发现,淫羊藿、补骨脂、骨碎补等中药存在有类雌激

素样作用的黄酮类物质。淫羊藿可以双向调节骨代谢，淫羊藿总黄酮明显下调PMOP大鼠的Cath K表达，促进COLI蛋白的合成，抑制骨吸收，减少破骨细胞陷窝形成，从而提高大鼠骨BMD，改善骨质量[11-12]。补骨脂可有效的提高大鼠的血清骨钙素含量[13]，此外，补骨脂中可能富含多个具有抑制Cath K活性作用的成分[14]。骨碎补提取物，与激酶抑制药渥曼青霉素(WT)作用类似，在骨吸收过程中抑制Cath K前体的胞内转运与表达[15-17]，骨碎补总黄酮能增强骨组织COL Ⅰ的表达，降低骨转换率[9]。研究表明[18-19]，丹参可以抗骨质疏松，其水提物主要成分丹参素可以显著降低破骨特异性基因Cath K。

Col Ⅰ是人体最丰富的胶原类型，是主要的骨结构蛋白，占骨基质的80%～90%。Cath K是参与骨吸收的一种关键蛋白酶，是破骨细胞中最主要、表达水平最高的细胞因子。具有活性的Cath K，降解一系列的骨基质成分，尤其是Col Ⅰ蛋白[20]。Cath K降解Col Ⅰ蛋白的N-端肽，产生NTX，降解Col Ⅰ蛋白的C-端肽，产生CTX。血清和尿液中的CTX和NTX被认为最能反映骨胶原纤维降解并具有反映骨吸收最敏感、最特异的生化指标，且对骨质疏松症患者的诊断和疗效评估均具有重要意义[21]。原胶原羧基端的非胶原结构PICP，在胶原形成时被切除，水解成进入血液，所以，血液中PICP水平反映了胶原合成速率、成骨细胞的活性[22]。ICTP是成熟的Ⅰ型胶原交联物的一部分，于Col Ⅰ蛋白降解时释放，其与Col Ⅰ蛋白降解的比例为1:1。所以，血清中ICTP在反映骨吸收中是高度特异性的敏感指标。因此，联合检测血清中PICP及ICTP的水平直接反映了骨Col Ⅰ合成和降解状态[23]。一旦Cath K在激活的破骨细胞中高度表达，骨基质成分会被快速降解，破骨细胞代谢增强、骨吸收加快，最终形成骨质疏松症[24]。

PMOP患者血清Cath K水平增高，与骨密度有很强的相关性[25]，由于Cath K在骨代谢中扮演着独特的角色，过度表达会导致松质骨转换增加，已成为近10年来全球代谢性疾病学术界的研究热点[26]。通过阻止Cath K表达可以抑制骨吸收及胶原分解，将有利于骨基质的稳定性[27-28]。CathK抑制剂是一种新的治疗方法，目前Cath K抑制剂的研发工作正在积极开展，其中一些抑制剂已通过临床前研究，处于不同进展的临床试验阶段。

本研究通过对去卵巢大鼠股骨形态观察、相关骨吸收生化指标的测定，表明温肾固疏方能够通过下调破骨细胞Cath K的表达从而抑制去卵巢大鼠骨组织中Col Ⅰ蛋白的降解，同时促进Col Ⅰ蛋白的合成，降低骨代谢转换率，改善骨小梁的结构，从而达到对绝经后骨质疏松症的防治作用。此外，对肾组织的观察发现，温肾固疏方不仅对肾功能无影响，还可以减轻PMOP大鼠存在的肾脏病理改变，改善绝经后妇女肾精亏虚的症状，起到补肾填精的作用。然而，本次研究对象为PMOP大鼠，尚需与临床试验相结合。

【参考文献】

[1] 刘奋斗，丁海. 绝经后骨质疏松症对股骨近端的生物学影响[J]. 中国骨质疏松杂志，2017,23(5):672-675.

[2] 祁珊珊，杨祎琦，庞田田，等. 去卵巢法建立SD大鼠绝经后骨质疏松模型手术探讨[J]. 中国兽医杂志，2014(2):27-29.

[3] 孙振双，徐道明，朱媛媛，等. 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[J]. 中国骨质疏松杂志，2017,23(6):740-744.

[4] 张静，孙振双，郭海英. 温肾固疏方对PMOP大鼠骨密度及细胞因子表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学，2017(1):53-59.

[5] 沈蕴茹，郭海英.温肾固疏方干预绝经后骨质疏松药理研究[J]. 中国骨质疏松杂志，2018,24(4):503-506.

[6] Howe T, Shea B, Dawson L, et al. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women[J]. Journal of Aging and Physical Activity, 2012,20S:S135.

[7] Stephenson J. FDA orders estrogen safety warnings: agency offers guidance for HRT use[J]. JAMA, 2003,289(5):537-538.

[8] 韦妍妍，张紫佳，徐颖，等. 补骨脂对去卵巢大鼠雌激素样作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2011,13:158-161.

[9] 吴海洋，索欢，王平. 绝经后骨质疏松症的临床中药治疗进展[J]. 中国骨质疏松杂志，2015,21(2):241-244.

[10] 伍海昭，朱敏，詹红生，等. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织Ⅰ型胶原表达及骨代谢的影响[J]. 中医正骨，2014,4:11-14.

[11] 朱志刚，宋利格，张秀珍. 淫羊藿总黄酮对去卵巢大鼠骨组织Ⅰ型胶原代谢及组织蛋白酶K表达的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志，2006,3:213-217.

[12] 王蓉，沈安达，朱福瑛，等. 血清组织蛋白酶K在骨质疏松症诊断中的应用[J]. 检验医学，2016,8:647-651.

[13] 塔娜，谭明生，移平，等. 异补骨脂素对小鼠胚胎前成骨细胞胶原的影响[J]. 中国中医药信息杂志，2011,4:23-25.

[14] 丁黎艳，郭晏华，张明波. 补骨脂中组织蛋白酶K抑制剂的虚拟筛选[J]. 辽宁中医杂志，2012,4:710-711.

[15] 史晓林，李春雯，孙金谓，等. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠组织蛋白酶K的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志，2010,4:285-290.

(下转第545页)

Mineral Metabolism, 2002, 20(4):216-222.

[49] Young HE, Mancini ML, Wright RP, et al. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs[J]. Developmental Dynamics, 1995, 202(2):137-144.

[50] Tsukamoto Y, Ichise H, Kakuda H, et al. Intake of fermented soybean (natto) increases circulating vitamin K2 (menaquinone-7) and gamma-carboxylated osteocalcin concentration in normal individuals[J]. J Bone Miner Metab, 2000,18(4):216-222.

[51] Hodges SJ, Pilkington MJ, Stamp TC, et al. Depressed levels of circulating menaquinones in patients with osteoporotic fractures of the spine and femoral neck[J]. Bone, 1991,12(6):387-389.

[52] Kaneki M, Hodges SJ, Hosoi T, et al. Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: possible implications for hip-fracture risk[J]. Nutrition, 2001,17(4):315-321.

[53] van Summeren MJH, Braam LAJLM, Lilien MR, et al. The effect of menaquinone-7 (vitamin K2) supplementation on osteocalcin carboxylation in healthy prepubertal children[J]. Br J Nutr, 2009, 102(8):1171-1178.

[54] Inaba N, Sato T, Yamashita T. Low-Dose Daily Intake of Vitamin K(2) (Menaquinone-7) Improves Osteocalcin γ-Carboxylation: A Double-Blind, Randomized Controlled Trials[J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2015,61(6):471-480.

[55] Knapen MH, Drummen NE, Smit E, et al. Three-year low-dose menaquinone-7 supplementation helps decrease bone loss in healthy postmenopausal women[J]. Osteoporosis International, 2013, 24(9):2499-2507.

[56] Forli L, Bollerslev J, Simonsen S, et al. Dietary vitamin K2 supplement improves bone status after lung and heart transplantation[J]. Transplantation, 2010,89(4):458-464.

[57] Marles RJ, Roe AL, Oketch-Rabah HA. US Pharmacopeial Convention safety evaluation of menaquinone-7, a form of vitamin K[J].Nutr Rev, 2017,75(7):553-578.

(收稿日期: 2019-01-01;修回日期: 2019-03-14)

(上接第 538 页)

[16] 倪力刚, 刘康, 史晓林. 不同浓度骨碎补总黄酮对模型大鼠的组织蛋白酶 K 及骨矿含量的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013,3:8-10.

[17] Duque G, Troen BR. Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome[J]. J Am Geriatr Soc, 2008,56 (5):935-941.

[18] 沙鑫, 李锋, 吴太林, 等. 丹参素抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化[J]. 现代生物医学进展, 2015,36:7017-7020.

[19] Liu XH, Pan LL, Jia YL, et al. A novel compound DSC suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by inhibition of Akt/NF-kappaB signalling in macrophages[J]. Eur J Pharmacol, 2013,708 (1-3):8-13.

[20] 宋倩, 李玉坤. 组织蛋白酶 K 与骨质疏松症治疗的研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制, 2014, 4:498-501.

[21] Simsek B, Karacaer O, Karaca I. Urine products of bone breakdown as markers of bone resorption and clinical usefulness of urinary hydroxyproline: an overview[J]. Chin Med J (Engl), 2004,117 (2):291-295.

[22] 孔德策, 杨铁毅, 邵进. 绝经后骨质疏松骨代谢标志物研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2016,1:36-41.

[23] 李明慧, 王桂敏. 仙草附子汤对去卵巢大鼠骨组织中Ⅰ型胶原代谢及组织蛋白酶 K 表达的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2011,5:356-359.

[24] Tanaka M, Hashimoto Y, Sekiya N, et al. Effects of novel cathepsin K inhibitor ONO-5334 on bone resorption markers: a study of four sustained release formulations with different pharmacokinetic patterns[J]. J Bone Miner Metab, 2014, 32 (4):447-454.

[25] 何伟涛, 刘康, 孙金谓, 等. 组织蛋白酶 k 与骨质疏松症治疗的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14 (9): 670-673.

[26] Shi X, Liu K, Wu L. Interventional value of total flavonoids from Rhizoma Drynariae on Cathepsin K, a potential target of osteoporosis[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2011, 17 (7):556-560.

[27] Selinger CI, Day CJ, Morrison NA. Optimized transfection of diced siRNA into mature primary human osteoclasts: inhibition of cathepsin K mediated bone resorption by siRNA[J]. J Cell Biochem, 2005,96 (5):996-1002.

[28] Bromme D, Lecaille F. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects[J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2009,18 (5):585-600.

(收稿日期: 2018-03-19;修回日期: 2018-07-03)