

· 论 著 ·

补正续骨丸对去卵巢大鼠骨量及其相关骨折的作用机制研究

于岩松¹ 柳柳¹ 那俊夫² 于冬冬² 杨鹤祥^{2*}

1.沈阳市骨科医院,沈阳市骨科医院承基医院,辽宁 沈阳 110032

2.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032

中图分类号: R28 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 07-0889-06

摘要: 目的 探索中药复方补正续骨丸对去卵巢大鼠骨量及相关骨折的影响。方法 雌性大鼠卵巢切除法(OVX)造 PMOP 模型,分组给药 6 周后 DXA 行大鼠股骨 BMD 检测;HE 染色测量股骨骨小梁密度;ELISA 检测法检测大鼠血清中 PINP、 β -CTX;Western blot 法检测大鼠股骨中 4EBP-1、p70S6K 蛋白表达;同时比较不同处理组大鼠骨折愈合时间及相同时间骨痂密度,观察补正续骨丸对 OVX 大鼠骨折愈合时间及骨痂密度的影响。结果 补正续骨丸可增加 OVX 大鼠股骨 BMD、减少骨小梁断裂、降低去卵巢大鼠血清中 β -CTX 水平、抑制 mTOR1 信号通路中 p70S6K、4EBP1 的蛋白表达,补正续骨丸可促进 OVX 大鼠骨折处骨痂密度增加及减少骨折愈合时间。结论 中药复方补正续骨丸通过抑制 mTOR1 信号通路中 p70S6K、4EBP1 蛋白的表达抑制骨吸收、促进 OVX 大鼠骨折的愈合。

关键词: 中药复方;补正续骨丸;去卵巢大鼠;骨质疏松性骨折;mTOR 信号通路

Study of the effect of the Buzhengxugu pill on bone mass in ovariectomized rats and the mechanism in ovariectomy-related fractures

YU Yansong¹, LIU Ye¹, NA Junfu², YU Dongdong², YANG Dongxiang^{2*}

1.Shenyang Orthopedics Hospital, Shenyang 110032, China

2.Department of Orthopedics, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China

* Corresponding author; YANG Dongxiang, Email: 995090706@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of Buzhengxugu pill on bone mass and related fractures in ovariectomized (OVX) rats. **Methods** Female rats were ovariectomized to establish PMOP model. BMD of femur was detected with DEXA after 6 weeks of drug administration. Trabecular bone density of the femur was measured by HE staining. PINP and beta-CTX were detected using ELISA assay. Protein expressions of 4EBP-1 and p70S6K in the femur were detected with Western blotting. The effect of Buzhengxugu pill on fracture healing time and callus density of OVX rats was observed. **Results** Buzhengxugu pill increased BMD of the femur, decreased trabecular fracture, decreased the content of serum beta-CTX in OVX rats, and inhibited the expression of p70S6K and 4EBP1 in mTOR1 signaling pathway. Buzhengxugu pill promoted callus density at the fracture site and reduced fracture healing time of OVX rats. **Conclusion** Buzhengxugu pill inhibits bone resorption and promotes fracture healing in OVX rats by inhibiting the expression of p70S6K and 4EBP1 protein in mTOR1 signaling pathway.

Key words: traditional Chinese medicine compound; Buzhengxugu pill; ovariectomy; osteoporotic fracture; mTOR signal pathway

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是原发性骨质疏松症主要类型,其骨折发生率高^[1],老年 PMOP 在髋部及脊柱的骨质疏松性骨折 5 年后生存率不到 60%^[2]。其致死

原因为患者长期卧床出现如坠积性肺炎、下肢深静脉血栓形成等并发症。PMOP 患者骨量丢失严重,对内固定物把持力弱,手术失败率高^[3]。补正续骨丸在我院应用半个世纪,对骨质疏松症有一定的疗效^[4-7],但对 PMOP 及相关骨折的作用及机制还不清楚,本研究对补正续骨丸对 PMOP 及相关骨折的作用及潜在机制进行研究,为临床应用该药治疗

基金项目: 辽宁省自然科学基金指导计划 (20170540608)

* 通信作者: 杨鹤祥, Email: 995090706@qq.com

PMOP 及相关骨折提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SD 大鼠由辽宁长生生物技术有限公司提供,共 100 只,均为健康雌性大鼠,体重为 180 ± 20 g,许可证:SCXK(辽)2015-0001。辽宁中医药大学附属医院动物实验伦理委员会审核通过。

1.1.2 主要实验药物与试剂:本实验所用实验药品均源于辽宁中医药大学附属医院,补正续骨丸由沈阳金竹药业有限公司生产,组成:首乌(制)25 g、鹿茸 15 g、煅自然铜 40 g、骨碎补 30 g、续断 30 g、枸杞 20 g、菟丝子 15 g、香椽、鸡血藤、合欢、乌贼骨各 15 g;骨疏康颗粒由辽宁康辰药业有效公司生产,批号:160919;接骨七厘胶囊由湖南金沙药业有限公司生产,批号:Z20053999;雷帕霉素(分装)由上海 MKL 生化科技有限公司生产,批号:K1089;阿仑膦酸钠产于上海 MKL 生化科技有限公司,批号:A801267。

EDTA 脱钙液(AR1071,中国),P1NP ELISA 试剂盒(m1002251,中国), β -CTX ELISA 试剂盒(m1038002,中国),P70S6K 一抗(bs-0295G-HRP,美国),4EBP-1 一抗(bs-0885G-HRP,美国),羊抗兔二抗(bs-0195 A-HRP,美国),DAB 显色试剂(KIT9710,中国)。

1.1.3 实验仪器:骨密度仪(Straros DR,法国),光学显微镜(Nikon MODEL YS100,日本),酶标仪(Infinite F50,中国),脱水机(LEICA 300,德国),恒温箱(DHG-9 070 A,中国),电热恒温箱(101-0-BS,中国)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备及分组:大鼠称重后采取 0.7% 水合氯醛溶液(5 mL/kg)腹腔麻醉,麻醉成功后,消毒、备皮,剃除大鼠背部毛发约 $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$,碘伏消毒。采取纵向切口,切口起自大鼠双侧肋下缘连线中点,长约 2 cm,将切口拉向左侧,于背部旁开 2 cm、肋下 1 cm 处依次剪开筋膜、肌肉,进入腹腔,切口长约 0.5 cm,暴露子宫角,组织镊夹持卵巢,缝合线结扎子宫角,剪除卵巢、缝合线,对侧操作同上。冲洗、消毒、逐层缝合。术后 3 日予头孢呋辛(70 mg/kg)每日一次肌注以预防感染。术后 3 日每日更换垫料。摘除大鼠双侧卵巢(图 1a),造模成功 6 周后,腹腔注射麻药,采用双能 X 线骨密度仪测量大鼠股骨 BMD(图 1b)。结果见表 1,说明造模成功。

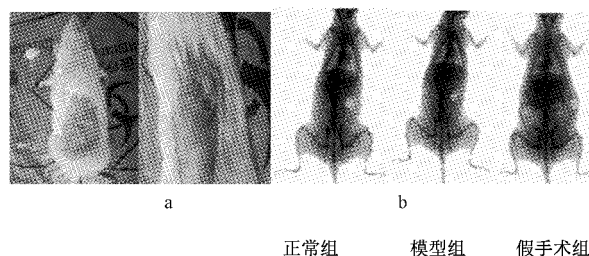


图 1 大鼠卵巢摘除及骨密度检查

a. 大鼠卵巢摘除, b. 正常组、模型组、假手术组大鼠骨密度检查

Fig.1 a, area of ovariectomy in rats, b, bone mineral density scan in rats (normal group, model group, and sham operation group)

表 1 摘除卵巢 6 周后 BMD 测量

Table 1 BMD was measured 6 weeks after removal of the ovary

组别	数量	BMD/(g/cm ²)
正常组	10	0.243 $\pm$ 0.012 [△]
模型组	80	0.190 $\pm$ 0.022
假手术组	10	0.242 $\pm$ 0.009 [△]

注:与模型组比较,[△] $P < 0.05$ 。

将大鼠随机分为正常组、模型组、假手术组、中药组(高、中、低)、骨疏康、接骨七厘胶囊、雷帕霉素组(通路抑制剂组)、阿仑膦酸钠 10 组,每组 10 只。中药组以常规剂量作为中剂量,高:中:低 = 2:1:1/2,每日 2 次,雷帕霉素予 8 mg/(kg·2 d)腹腔注射。骨疏康、接骨七厘胶囊予人体等效剂量为 0.315 g、0.038 g,正常组、模型组、假手术组予等量蒸馏水灌胃。每周称重调整给药量。

1.2.2 骨密度仪测量大鼠股骨 BMD:大鼠造模成功后,按计划给药 6 周,予腹腔麻醉后测量大鼠股骨 BMD。观察各组在用药后 BMD 差别。

1.2.3 HE 染色观察大鼠股骨组织形态计量学指标:取大鼠股骨组织,固定、脱水、封闭、切片。每组选择 4 张完整载玻片进行 HE 染色,选取合适大小盖玻片用树胶完成封片、镜检。

1.2.4 ELISA 检测法检测大鼠外周血血清中 β -CTX、P1NP 含量的影响:抽取大鼠腹主动脉血并制备血清。在 96 孔板上设置标 A 孔为标准品孔,依次在标准品孔加入标准品浓度为 0、0.5、1、2、4、8 倍浓度的标准品 50 μ L。设置 B-C 行为待测样品孔,分别为正常组、模型组、中药组(中)、骨疏康组、阿仑膦酸钠组、雷帕霉素组,H 行为空白孔,每组 12 孔以保证可重复性。加稀释液 40 μ L、样品 10 μ L,除空白孔外,加入酶标试剂 100 μ L。通过标准曲线计算样品中 CTX、P1NP 含量。

1.2.5 免疫组化测定大鼠胫骨组织中 4EBP-1、p70S6K 蛋白表达:组织脱蜡成功后行抗原修复、内源性过氧化物酶封闭、非特异性抗原封闭。以试剂 2 作为抗原稀释液一抗孵育,以试剂 3 行二抗孵育,以试剂 4 行过氧化物酶标记。显色剂显色后加入苏木素复染。树胶封片、镜检。

1.2.6 Western-blot 测定大鼠胫骨样本中蛋白含量:取 150 mg 大鼠胫骨组织样本,加入细胞裂解液提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。制备上样蛋白、配胶。20 μ g 蛋白样品进行电泳,电泳结束后调整电压至 90 V 转膜至 PVDF 膜上。37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h、一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。辣根过氧化物酶(HRP)标记的稀释二抗孵育。ECL 发光法曝光成像,扫描入电脑。Image J 软件测定平均灰度值。

1.2.7 观察各组大鼠骨折愈合时间及骨痂密度:大鼠摘除卵巢 6 周后,进行骨折造模。给药后,大鼠腹腔麻醉后测量大鼠骨痂区的骨密度及骨折骨性愈合时间。观察各组在用药后骨痂区密度、愈合时间的差别。

1.3 统计学处理

所得数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示实验数据,数据整理后用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析, $P<0.05$ 则差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨密度仪测量大鼠股骨 BMD

股骨骨密度:与正常组相比,模型组、雷帕霉素组(通路抑制剂)骨密度明显降低, $P<0.05$;与模型组相比,中药组骨密度明显上调, $P<0.05$;中药组中剂量骨密度高于高、低剂量组。

表 2 给药后各组去卵巢大鼠骨密度

Table 2 BMD after drug administration

组别	数量	BMD/(g/cm^2)
正常组	10	0.244 $\pm$ 0.010
模型组	10	0.197 $\pm$ 0.012 $^{\Delta}$
中药组高剂量	10	0.223 $\pm$ 0.005 $^{\Delta}$ *
中药组中剂量	10	0.240 $\pm$ 0.007 $^{\Delta}$ *
中药组低剂量	10	0.221 $\pm$ 0.020 $^{\Delta}$ *
骨疏康组	10	0.231 $\pm$ 0.007 $^{\Delta}$ *
阿仑膦酸钠组	10	0.226 $\pm$ 0.013 $^{\Delta}$

注:与正常组比较, $^{\Delta}P<0.05$;与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$;与阿仑膦酸钠组比较,* $P>0.05$,* $P<0.05$ 。

股骨骨密度:与正常组相比,模型组、雷帕霉素组(通路抑制剂)骨密度明显降低, $P<0.05$;与模型组相比,中药组骨密度明显上调, $P<0.05$;中药组

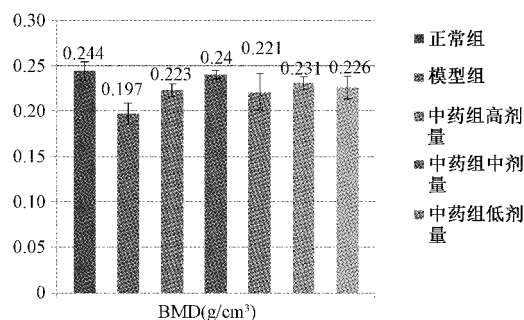


图 2 给药后各组去卵巢大鼠骨密度

Fig.2 BMD after drug administration

中剂量骨密度高于高、低剂量;与阿仑膦酸钠组相比,中药组骨密度差异不具有统计学意义, $P>0.05$ 。

2.2 补正续骨丸对去势大鼠股骨组织形态计量学指标的影响

通过骨组织切片染色,比较各组骨小梁数量和形态。骨组织形态显微 Mimics 图像分析:制作股骨髁部松质骨的 HE 染色切片后(图 3),每个切片随机选择一个视野,在 Mimics 图像处理与分析系统中进行骨小梁面积测量(表 3)。

由图 3 可见,正常组骨小梁分布均匀、连续完整。模型组、雷帕霉素组骨小梁分布稀疏,且有部分连续性中断。中药组骨小梁分布较模型组密集、均匀,无明显断裂;较骨疏康组分布均匀,断裂少;较阿仑膦酸钠组,骨小梁宽度增宽。

由表 3、图 4 可见,与正常组相比,模型组、雷帕霉素组(通路抑制剂)骨小梁面积明显降低, $P<0.05$;与模型组相比,中药组骨小梁面积明显上调, $P<0.05$;与阿仑膦酸钠组相比,中药组骨小梁面积明显上调, $P<0.05$ 。

2.3 ELISA 法检测补正续骨丸对去势大鼠外周血清中 β -CTX、P1NP 含量的影响

根据样品 OD 值计算标准曲线(图 5)。

P1NP 测量结果显示,模型组较正常组明显降低, $P<0.05$ 。各给药组与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明中药组对 P1NP 水平无明显影响。

β -CTX 测量结果显示,正常组与假手术组差异无统计学意义($P>0.05$),与正常组比较,模型组 CTX 显著升高。各给药组与模型组比较, β -CTX 水平不同程度降低($P<0.05$),说明各治疗组药物均能不同程度降低 β -CTX 水平。与模型组比较,中药组 β -CTX 水平显著降低,补正续骨丸高剂量组与中、

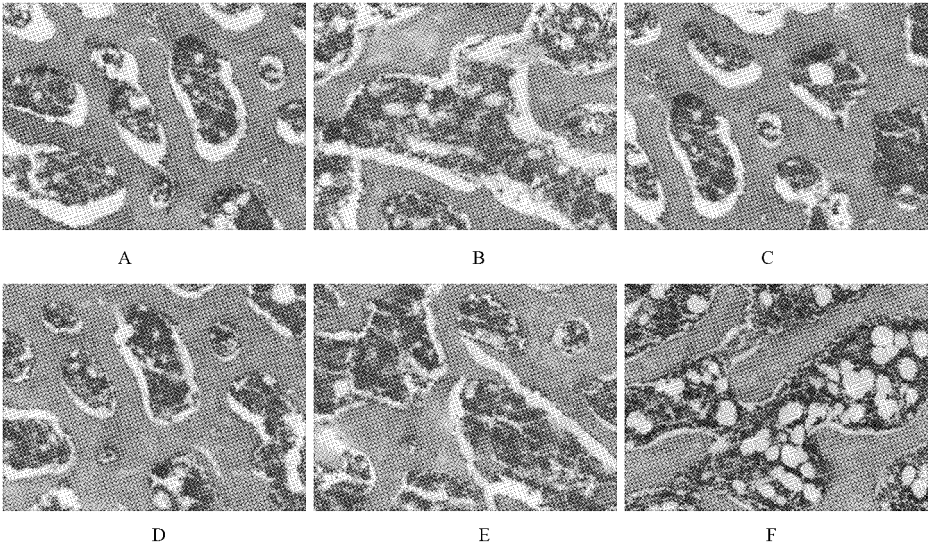


图 3 各组骨小梁 HE 染色(10×10)

A 正常组、B 模型组、C 中药中剂量组、D 骨疏康组、E 阿仑膦酸钠组、F 雷帕霉素组。

Fig.3 HE staining of trabecular bone in each group (10×10 times)

A, normal group, B, model group, C, medium-dose Chinese medicine group, D, Gushukang group, E, Alendronate group, F, rapamycin group.

表 3 给药后各组骨小梁面积比

Table 3 Ratio of trabecular bone area after drug administration

组别	数量	骨小梁面积比
正常组	10	0.318±0.012 [△]
模型组	10	0.233±0.012 [▲]
中药组中剂量	10	0.308±0.032 ^{▲*}
骨疏康组	10	0.262±0.036 ^{▲*}
阿仑膦酸钠组	10	0.208±0.029 [▲]
雷帕霉素组	10	0.233±0.012 ^{▲●}

注:与正常组比较,▲ P<0.05,■ P>0.05;与模型组比较,△ P<0.01,● P>0.05;与西药组比较,* P>0.05,☆ P<0.05。

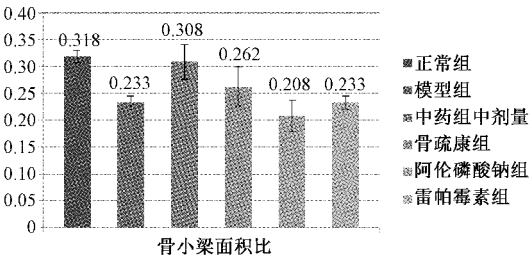


图 4 给药后各组骨小梁面积比

Fig. 4 Ratio of trabecular bone area after drug administration

低剂量组 β-CTX 水平差异有统计学意义。说明补正续骨丸中、低剂量组能够降低 CTX 水平,补正续骨丸高剂量组对 β-CTX 水平影响小于中低剂量。与骨疏康组比较,补正续骨丸中、低剂量组 β-CTX 水平升高,说明补正续骨丸中、低剂量对 β-CTX 水

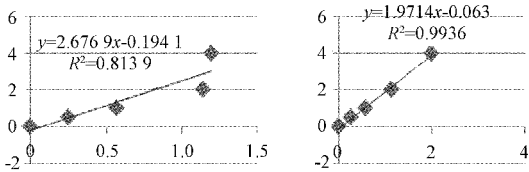


图 5 β-CTX、P1NP 标准曲线

β-CTX 标准曲线 (Y=2.6769X-0.1941) P1NP 标准曲线 (Y=1.9714X-0.063)

Fig.5 The standard curve of β-CTX and P1NP

平抑制作用强于骨疏康(见表 4、图 6)。

表 4 大鼠外周血清中 β-CTX、P1NP 含量 (ng/mL, $\bar{x}\pm s$)

Table 4 The content of beta -CTX and P1NP in peripheral blood of rats (ng/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	β-CTX	P1NP
正常组	3.21±0.21	10.96±0.22
模型组	3.58±0.18 [▲]	8.44±0.68 [▲]
中药组中剂量	2.51±0.17 ^{△☆}	8.45±0.19 ^{△*}
骨疏康组	3.04±0.33 ^{△☆}	8.89±0.61 ^{△*}
阿仑膦酸钠组	3.56±0.20 [●]	10.74±0.29 [●]
雷帕霉素组	3.06±0.37 [△]	8.78±0.48 [△]

2.4 WB 检测 4EBP-1、p70S6K 蛋白量

正常组的蛋白的相对含量为 1,各实验组与正常组进行比较,计算得出比值。与正常组比较,模型组 p70S6K、4EBP1 相对灰度值表达显著升高 (P<0.05),差异具有统计学意义,说明模型对照组

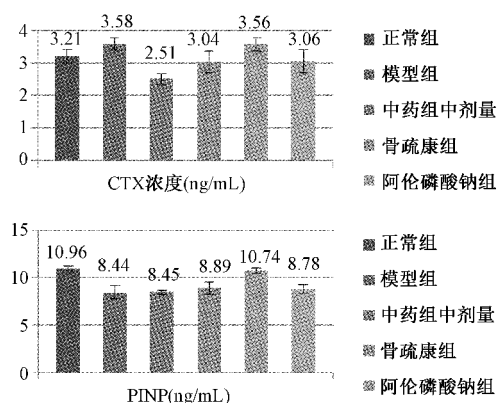


图6 大鼠外周血清中 β -CTX、PINP水平

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\blacksquare P > 0.05$;与模型组比较比较, $\Delta P < 0.05$, $\bullet P > 0.05$;与西药组比较, $\star P > 0.05$, $\ast P < 0.05$ 。

Fig.6 The concentration of PINP and beta - CTX in peripheral blood of rats

p70S6K、4EBP1 的表达显著升高。与模型组相比,补正续骨丸中剂量组相对灰度值降低($P < 0.05$),说明补正续骨丸能够降低 p70S6K、4EBP1 的表达。中药组与雷帕霉素组比较,补正续骨丸中剂量组 p70S6K、4EBP1 相对灰度值升高,说明补正续骨丸中剂量对 p70S6K、4EBP1 抑制作用弱于雷帕霉素(图7、表5)。

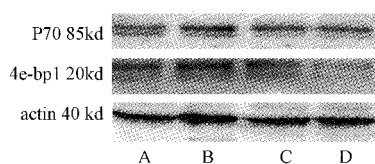


图7 4EBP1、p70S6K 蛋白表达

A 正常组、B 模型组、C 中药中剂量组、D 雷帕霉素组。

Fig.7 4EBP1, p70S6K expression from left to right, A, normal group, B, model group, C, medium-dose group, D, rapamycin group.

表5 4EBP1、p70S6K 蛋白表达(相对灰度值)比较

Table 5 Comparison of protein expressions of 4EBP1 and p70S6K (relative gray value)

组别	4EBP1	p70S6K
正常组	0.147 $\pm$ 0.012	0.145 $\pm$ 0.017
模型组	0.418 $\pm$ 0.072 Δ	0.408 $\pm$ 0.055 Δ
补正续骨丸(中)	0.308 $\pm$ 0.033 $\Delta\star$	0.366 $\pm$ 0.018 $\Delta\ast$
雷帕霉素组	0.266 $\pm$ 0.029 Δ	0.242 $\pm$ 0.020 Δ

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与雷帕霉素组比较, $\star P > 0.05$, $\ast P < 0.05$ 。

2.5 补正续骨丸对去势大鼠骨质疏松性骨折的影响

大鼠摘除卵巢6周后,进行骨折造模(图8、图9)。成功造模后,各组按计划连续给药6周,观察各组在用药后骨痂区密度、愈合时间的差别。

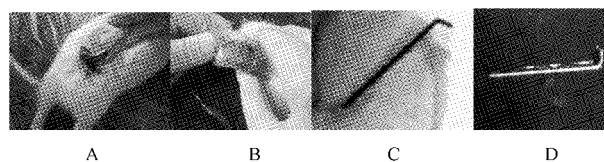


图8 A、B 大鼠造模操作,C 股骨 DR,D 内固定(取出)

Fig.8 A, B, rat model operation, C, femur DR, D internal fixation (taken out)

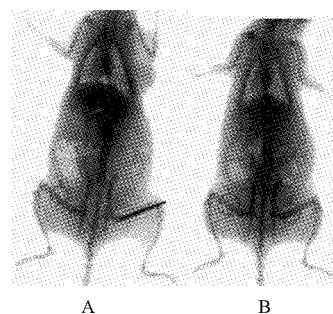


图9 大鼠股骨骨折骨性愈合 DR(箭头标记处 A 未拆除内固定,B 拆除内固定)

Fig.9 Bone-healing DR of rat femur fractures (A internal fixation not being removed, B internal fixation being removed)

与正常组相比,模型组骨痂密度明显降低, $P < 0.01$;与模型组相比,中药组骨痂密度明显上调, $P < 0.05$;与中药对照组相比,中药组骨痂密度差异不具有统计学意义, $P > 0.05$, (表6)。

表6 补正续骨丸对骨质疏松大鼠骨痂密度的影响

Table 6 Effect of Buzhengxug pill on osteophyte density in osteoporotic rats

组别	数量	BMD/(g/cm ²)
正常组	9	0.218 $\pm$ 0.012
模型组	8	0.190 $\pm$ 0.020 Δ
补正续骨丸(中)	9	0.215 $\pm$ 0.008 $\Delta\star$
接骨七厘组	9	0.211 $\pm$ 0.010

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与接骨七厘组比较, $\star P > 0.05$, $\ast P < 0.05$ 。

与正常组相比,模型组骨折愈合时间明显延长, $P < 0.05$;与模型组相比,中药组骨折愈合时间明显缩短, $P < 0.05$,;与中药对照组相比,中药组骨折愈合时间差异不具有统计学意义, $P > 0.05$, (表7)。

表 7 补正续骨丸对骨质疏松大鼠股骨骨折愈合时间的影响

Table 7 Effect of Buzhengxugu pill on the healing time of femoral fracture in osteoporotic rats

组别	数量	愈合时间/(d)
正常组	9	54±2.5
模型组	8	64±2.1 [▲]
补正续骨丸(中)	9	60±1.4 ^{△*}
接骨七厘组	9	59±2.5 [*]

注:与正常组比较,[▲] $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与接骨七厘组比较,^{*} $P>0.05$,^{*} $P<0.05$ 。

3 讨论

骨形成作用和骨吸收作用之间的动态平衡是维持骨骼健康的关键因素^[8]。雌激素分泌减少导致的骨吸收能力增强,是绝经后骨质疏松的主要因素^[9-10]。雌激素通过调节自噬而调节骨折端血管内皮及成骨细胞增殖促进骨折愈合^[11]。成骨细胞分泌骨保护素亦受到雌激素调控^[12],雌激素可调节破骨细胞凋亡^[13]。骨折愈合起初由破骨细胞吞噬坏死骨细胞,随后破骨细胞通过自噬活性逐步降低,成骨细胞活性升高。

研究发现抑制 mTOR1 信号通路可对成骨及破骨细胞增殖有一定的影响^[14]。自噬在代谢性骨病发病中发挥重要作用^[15],与自噬影响细胞生长、存活、分化和细胞自身稳态密切相关,ROS-AKT-mTOR1 信号轴在信号轴也参与调节细胞凋亡和增殖^[16]。Alvarez-Garcia 等^[17]给 4 周 70 g 左右的雄性大鼠,腹腔注射 Rapamycin [2 mg/(kg/day)] 两周,发现通过雷帕霉素抑制 mTOR1 通路能明显减少生长板中破骨细胞的数量。与此同时,mTOR1 通路亦可通过调节破骨细胞的数量促进软骨生成^[18],也涉及促红细胞生成诱导成骨^[19]。

本文通过实验证实补正续骨丸对 PMOP 有一定的防治作用。其能够降低大鼠血清中 β -CTX 水平从而抑制骨吸收。然而,其对 P1NP 无明显影响,说明补正续骨丸对骨形成无明显影响。PMOP 的发生可升高 mTOR1 信号通路中 p70S6K、4EBP1 的表达,然而我们通过实验证实:补正续骨丸可以抑制 mTOR1 信号通路中 p70S6K、4EBP1 的表达,继而促进骨质疏松性骨折的愈合,提升骨密度。

综上所述,本研究对补正续骨丸治疗 PMOP 及骨质疏松性骨折进行研究,结果表明补正续骨丸对 PMOP 及骨质疏松性骨折有一定的防治作用,并且是通过调节自噬相关 mTOR1 信号通路 p70S6K、

4EBP1 的表达来抑制骨吸收来实现的,为补正续骨丸用于临床防治 PMOP 提供新的理论基础。

【参考文献】

- [1] 伍贤平,廖二元,刘忠厚.不同国家和地区各种族人群骨密度参考值及其相互比较[J].中国骨质疏松杂志,2007,13(1):1-21.
- [2] Dawson-Hughes B, Tosteson AN, Melton LJ et al. National Osteoporosis Foundation Guide Committee. Implications of absolute fracture risk assessment for osteoporosis practice guidelines in the USA [J]. Osteoporosis Int, 2008, 19(4):449-458.
- [3] Burton AW, Rhines LD. Vertebroplasty and kyphoplasty: a comprehensive review[J].Neurosurg Focus,2005,18(3):e1.
- [4] 侯德才,王健,邓小磊,等.补正续骨丸对肾虚大鼠治疗作用的实验研究[J].中华中医药学刊,2017,35(3):631-634.
- [5] 栾图.补正续骨丸配合熏洗颗粒剂治疗 Sudeck 骨萎缩病的临床观察[D].辽宁中医药大学,2014.
- [6] 齐琳.补正续骨丸治疗 45 例骨折延迟愈合的临床疗效观察[D].辽宁中医药大学,2013.
- [7] 王秀华.补正续骨丸对老年不稳定股骨粗隆间骨折术后骨愈合的影响[J].中医药信息,2013,30(2):56-58.
- [8] 李宏超,宋慧.抗骨吸收和促骨形成药物在骨质疏松症治疗中的联合应用[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(3):399-405.
- [9] 招文华,任辉,沈耿杨,等.基于肾脑相关理论探讨海马-HPOA 对绝经后骨质疏松症的调控作用[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(2):264-269.
- [10] 曲强,万新海,陈翠珠,等.雌激素通过调节骨髓来源的成骨细胞所产生的细胞因子抑制破骨细胞功能[J].中国骨质疏松杂志,2002,8(1):8-9.
- [11] Yasui T, Fukuoka M. Calcium and bone metabolism across women's life stages. Bone metabolism and estrogen/androgen balance in women.[J]. Clinical Calcium, 2017, 27(5):673.
- [12] Scholefield H. Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology [J].Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol,2008,22(5):761-762.
- [13] Eastell R.Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche[J].J Endocrinol,2005,185(2):223-234.
- [14] 佟庆,金哲,刘欣.补肾健脾、养血通利中药对多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬影响的实验研究[J].北京中医药,2011,30(3):235-238.
- [15] 王伟舟,郭皓,袁勇.自噬在绝经后骨质疏松中作用的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(12):1675-1680.
- [16] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy [J].Nat Cell Biol,2010,12(9):814-822.
- [17] Alvarez-Garcia O, Carbajo-Pérez E, García E, et al., Rapamycin retards growth and causes marked alterations in the growth plate of young rats[J].Pediatr Nephrol,2007,22(7):954-961.
- [18] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al.Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice [J]. Nature,2006,441(7095):880-884.
- [19] Yang YH, Zheng XF, Li B, et al.Increased activity of osteocyte autophagy in ovariectomized rats and its correlation with oxidative stress status and bone loss[J].Biochem Biophys Res Commun, 2014,451(1):86-87.

(收稿日期:2018-05-31;修回日期:2018-11-06)