

· 中医中药 ·

滋阴补肾方对糖尿病合并去卵巢骨质疏松大鼠的作用及对 Wnt/ β -catenin 信号的影响

孙勤国¹ 徐鸿婕¹ 罗蒙¹ 江波^{1*} 吕琨¹ 杨倩¹ 黄天慧² 张贤梅¹

1. 武汉大学同仁医院(武汉市第三医院)中医科, 湖北 武汉 430060

2. 湖北中医药大学第一临床学院, 湖北 武汉 430060

中图分类号: R322.6 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 03-0419-06

摘要: **目的** 探索滋阴补肾方对糖尿病合并去卵巢骨质疏松大鼠治疗及信号通路的影响,为骨质疏松的治疗奠定基础。**方法** 50只 SPF 级雌性 SD 大鼠被分为正常对照组(10只),模型组(8只),骨化三醇组(8只),滋阴补肾方低剂量组(8只),滋阴补肾方中剂量组(8只),滋阴补肾方高剂量组(8只)。投喂高糖高脂饲料并注射链脲佐菌素建立糖尿病合并去卵巢骨质疏松大鼠模型。造模成功后,滋阴补肾方低剂量组,滋阴补肾方中剂量组,滋阴补肾方高剂量组分别灌胃滋阴补肾方 5、10、20 g/(kg·d),骨化三醇组大鼠每天灌胃 0.1 μ g/(kg·d)骨化三醇,灌胃给药 8 周,每日 1 次。给药结束后,以 HE 染色的方法观察胫骨结构变化;以 Western blot 的方法检测 p-NF- κ B、NF- κ B、I κ B、MyD88 的蛋白表达水平;以 RT-PCR 的方法检测 Wnt-3 α 、LRP-5、 β -catenin 的表达。**结果** 和模型组比较,滋阴补肾方高剂量组胫骨骨小梁排列较密集,骨小梁之间连接增多;中剂量组和高剂量组的 p-NF- κ B、NF- κ B、I κ B、MyD88 表达水平均降低,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-8、IL-10 水平显著降低,Wnt-3 α 、LRP-5、 β -catenin 表达水平均显著升高($P < 0.05$)。**结论** 滋阴补肾方治疗糖尿病合并去卵巢骨质疏松大鼠可显著增加其成骨细胞的数量,增加骨量,可能上调 Wnt/ β -catenin 信号通路来实现的。

关键词: Wnt/ β -catenin;自噬;NF- κ B

Effect of nourishing Yin and tonifying kidney recipe on the treatment of diabetes mellitus combined with osteoporosis after ovariectomy and the Wnt/beta-catenin signal pathway in rats

SUN Qinguo¹, XU Hongjie¹, LUO Meng¹, JIANG Bo^{1*}, LV Kun¹, YANG Qian¹, HUANG Tianhui², ZHANG Xianmei¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Tongren Hospital of Wuhan University (Wuhan Third Hospital), Wuhan 430060, China

2. The First Clinical College, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430060, China

* Corresponding author: JIANG Bo, Email: 15527911867@qq.com

Abstract: Objective To explore the effect of nourishing Yin and tonifying kidney recipe on the treatment of diabetes mellitus combined with osteoporosis after ovariectomy and the signal pathway in rats, and to lay a foundation for the treatment of osteoporosis. **Methods** Fifty SPF-grade female SD rats were divided into control group ($n = 10$), model group ($n = 8$), calcitriol group ($n = 8$), low-dose nourishing Yin and tonifying kidney recipe group ($n = 8$), middle-dose nourishing Yin and tonifying kidney recipe group ($n = 8$), and high-dose nourishing Yin and tonifying kidney recipe group ($n = 8$). The model group was fed with high-sugar and high-fat diet and injected with streptozotocin to establish a diabetic rat model with ovariectomized osteoporosis. After successful modeling, rats in the low-dose nourishing Yin and tonifying kidney recipe group, the middle-dose nourishing Yin and tonifying kidney recipe group, and the high-dose nourishing Yin and tonifying kidney recipe group received 5 g/(kg·d), 10 g/(kg·d), and 20 g/(kg·d) of nourishing Yin and tonifying kidney recipe intragastrically, respectively. Rats in calcitriol group received 0.1 g/kg/d of calcitriol per day. The rats were gavaged once per day for 8 weeks. After the treatment, the structure change of the tibia was observed with HE staining. The protein expressions of p-NF- κ B, NF- κ B, I κ B, and MyD88 were detected with Western blotting. The expressions of Wnt-3 α , LRP-5, and β -catenin were detected using RT-PCR. **Results** Compared with those

基金项目: 湖北省卫计委科研项目(项目名称:滋阴补肾方对糖尿病合并骨质疏松大鼠的治疗及信号通路的影响)

* 通信作者: 江波, Email: 15527911867@qq.com

in the model group, the tibial trabeculae arranged densely and the connection between bone trabeculae increased in high-dose nourishing Yin and tonifying kidney recipe group. The expression levels of p-NF- κ B/NF- κ B, I κ B, and MyD88 decreased, the levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-10 decreased significantly, and the levels of Wnt-3 α , LRP-5, β -catenin increased significantly in both middle-dose group and high-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** The treatment of diabetic rats with ovariectomized osteoporosis with nourishing Yin and tonifying kidney recipe significantly increases the number of osteoblasts and bone mass possibly through up-regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: Wnt/ β -catenin; autophagy; NF- κ B

糖尿病合并骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种全身性代谢性骨病,主要特征为骨量系统性减少、骨组织结构退化,是一种代谢障碍性疾病^[1-3]。糖尿病合并骨质疏松可导致骨强度降低、骨密度降低、脆性增加,发生骨折的风险增加,是目前世界上发病率较高,医疗支出负担较重的慢性疾病之一。进入更年期的妇女,由于卵泡数量明显减少,卵巢功能低下,从而雌激素(E2)缺失和衰老的叠加作用,使得OP在绝经后妇女人群中的发病率相对较高^[4-5]。骨是E2发挥作用的主要靶器官之一,E2缺乏导致骨代谢中破骨细胞和成骨细胞的之间的相互制衡关系被打破,破骨细胞数量增加,骨吸收与骨重建的失衡,最终导致骨量丢失^[6-9]。因此,对于糖尿病合并骨质疏松的治疗和研究迫在眉睫。

Wnt/ β -catenin 信号通路是调控成骨分化的一条重要通路, β -catenin 调控细胞增殖、定向分化过程^[10]。李俊峰等^[11]研究认为 Wnt/ β -catenin 信号通路在调节调控骨量上发挥重要作用。滋阴补肾方由生龙骨、生牡蛎、桑寄生、续断、淫羊藿、天花粉、黄连组成。生龙骨和生牡蛎常相须为用,以治阳亢、益阴。董佳梓等^[12]通过研究具有滋补肾阴作用桑寄生、枸杞子和桑椹对去卵巢所致大鼠骨质疏松症的治疗作用及其机理,桑寄生的作用是促进 OPG 蛋白表达,降低 IL-1 含量;商学征等^[13]观察补肾通络中药(淫羊藿、黄芪、鹿角胶、生地黄、补骨脂、女贞子、三七、丹参、地龙)可明显改善糖尿病骨质疏松患者超声骨密度,调节平衡能力。本研究以糖尿病合并去卵巢骨质疏松大鼠为对象,探索滋阴补肾方对其作用及其相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

50 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,3 月龄,体质量(250 \pm 14)g,购于湖北省疾病预防控制中心。饲养环境温度控制在 23 $^{\circ}$ C 左右,湿度 60%左右,自然光源,标准饲养,自由饮水一周,适应环境。将大鼠分为正

常对照组、模型组、骨化三醇组、滋阴补肾方低剂量组、滋阴补肾方中剂量组、滋阴补肾方高剂量组。大鼠的模型建立方法:腹腔内注射 1%戊巴比妥钠 30 mg/kg,麻醉成功后,固定大鼠向上,常规消毒,无菌条件下于大鼠最末肋骨下,腋中线至脊柱外侧约 1 cm 处备皮,切开皮肤、肌肉和腹膜,轻轻拉出脂肪团暴露卵巢,结扎卵巢下端输卵管,摘除双侧卵巢,止血后,逐层缝合,关腹。缝合切口,外敷消炎粉。术后正常饲养,切口每日消毒。进食高糖高脂饲料。喂养 14 d 之后,禁食 12 h 后腹腔注射链脲佐菌素(STZ),30 mg/kg,一次性注射。造模成功后,灌胃给药 8 周,每日一次。骨化三醇组灌胃骨化三醇 0.1 μ g/(kg·d)。滋阴补肾方由生龙骨 30 g、生牡蛎 30 g、桑寄生 10 g、续断 10 g、淫羊藿 10 g、天花粉 10 g、黄连 10 g 组成;以上药物均购于同仁医院中药房,经过中药传统方法浸润、煎煮、过滤、浓缩制成煎剂,按人与大鼠给药换算比计算相当生药量 5、10、20 g/(kg·d)制成低、中、高剂量。

p-NF- κ B 兔抗,购于 Abcam,货号:ab28856;NF- κ B 兔抗,购于 Abcam,货号:ab16502,I κ B 兔抗,购于 Abcam,货号:ab7217;MyD88 兔抗,购于 Abcam,货号:ab131071;GAPDH 兔抗,购于 Cell Signaling Technology,货号:2118;Goat Anti-Rabbit IgG 羊抗,购于 Bioswamp,货号:PAB160011。

1.2 HE 染色

给药周期结束后,断头处死大鼠,脱钙后的胫骨经过脱水,包埋于蜡块中,以 5 μ m 的厚度均匀切片。将苏木精加入蒸馏水内加温溶解,冷却后加入乙醇和甘油,备用。石蜡切片脱蜡至水。用 Regaud 苏木精染液染核 7 min。置于容器中,流水冲洗 2 h。以 1%的盐酸乙醇溶液分化 3 s,用伊红染液染色 5~10 min。用 95%乙醇、无水乙醇、二甲苯透明、中性树脂封固,光镜下观察各组大鼠胫骨骨小梁病理变化。

1.3 Western blot

骨组织以液氮冷冻后钢锤砸碎,加入超声裂解

细胞,超声裂解。4℃下 15 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清液获取总蛋白。根据 BCA 蛋白定量结果上样,10%SDS-PAGE 凝胶电泳 2.5 h,转膜后 NC 膜 TBS 稍荡洗,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,4℃下分别孵育 p-NF-kB(稀释比为 1:1 000),NF-kB(稀释比为 1:2 000),IkB(稀释比为 1:2 000),MyD88(稀释比为 1:2 000)一抗过夜,TBST 洗 10 min×3 次,室温孵育二抗 1 h,TBST 洗 10 min,重复 3 次,曝光显影;采用 BIO-RAD Image Lab 软件进行灰度值分析。

1.4 ELISA 检测血清中相关指标的变化

以 ELISA 的方法检测血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-8、IL-10 的水平。根据试剂盒的说明书稀释标准品。绘制标准曲线。在酶标包被板上设标准品孔,依次加入不同浓度的标准品 50 μL。分别设空白孔(空白对照孔不加样品、酶标试剂及生物素标记的抗体,其余各步操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品 40 μL,然后再加生物素标记的抗体 10 μL。将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。每孔加入酶标试剂 50 μL,空白孔除外。用封板膜封板后置 37℃温育 30 min。将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用。小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。每孔先加入显色剂 A 50 μL,再加入显色剂 B 50 μL,轻轻震荡混匀,37℃避光显色 10 min。每孔加终止液 50 μL,终止反应。

1.5 RT-PCR

用 Trizol 法提取组织总 RNA 后反转录得到 cDNA。PCR 扩增条件为 95℃变性 5 min 后;95℃ 5 s,60℃ 35 s,72℃ 20 s,72℃ 延伸 5 min。目标基因的表达量用 2^{-ΔΔCt} 法计算。PCR 引物经 Primer 6.0 软件设计,如下表 1。

表 1 引物列表

Table 1 Primer sequences

引物名称	序列	扩增片段大小(bp)
Wnt-3α-F	GAACCGTCACAACAATG	106
Wnt-3α-R	CCAGCAGGTCTTCACT	
LRP5-F	GCCTTCATGGATGGGACCAA	248
LRP5-R	GCCCGTTCAATGCTATGCAG	
βcatenin-F	GGTGAAAATGCTTGGGTC	186
βcatenin-R	TGAAGGCAGTCTGTCTCTA	
GAPDH-F	CAAGTTCAACGGCACAG	138
GAPDH-R	CCACTAGACTCCACGACAT	

1.6 统计学处理

用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析。

数据用均数±标准差(x±s)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 滋阴补肾方对胫骨形态的影响

和正常对照组比较,模型组大鼠的骨小梁排列紊乱疏松干瘪,小梁宽、间距变大,骨小梁之间连接变少。滋阴补肾方低剂量组胫骨排列较紊乱疏松干瘪,小梁间距较大,连接较少。滋阴补肾方中剂量组胫骨排列较疏松,整齐,小梁宽、间距变小,之间连接渐变多;滋阴补肾方高剂量组胫骨骨小梁排列较密集,骨小梁之间连接增多。

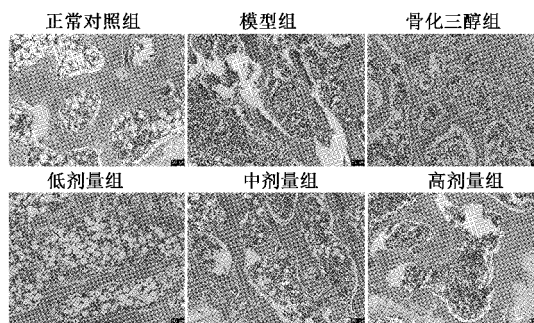


图 1 滋阴补肾方对胫骨形态的影响(×100)

Fig.1 Effect of nourishing Yin and tonifying kidney recipe on the morphology of the tibia (×100)

2.2 滋阴补肾方对炎症相关通路的影响

和正常对照组比较,模型组的 p-NF-kB、NF-kB、IkB、MyD88 表达水平均升高;和模型组比较,骨化三醇组,中剂量组和高剂量组的 p-NF-kB、NF-kB、IkB、MyD88 表达水平均降低。

检测 Wnt-3α、LRP-5、β-catenin 的 mRNA 表达水平见图 2。和正常对照组比较,模型组的 Wnt-3α、LRP-5、β-catenin 表达水平均显著降低(P<0.05);和模型组比较,骨化三醇组,中剂量组和高剂量组的 Wnt-3α、LRP-5、β-catenin 表达水平均显著升高(P<0.05)。

2.3 滋阴补肾方对血清中相关指标

和正常对照组比较,模型组的 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-8、IL-10 的水平均显著升高(P<0.05);和模型组比较,骨化三醇组,中剂量组和高剂量组的 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-8、IL-10 的水平均显著降低(P<0.05)。

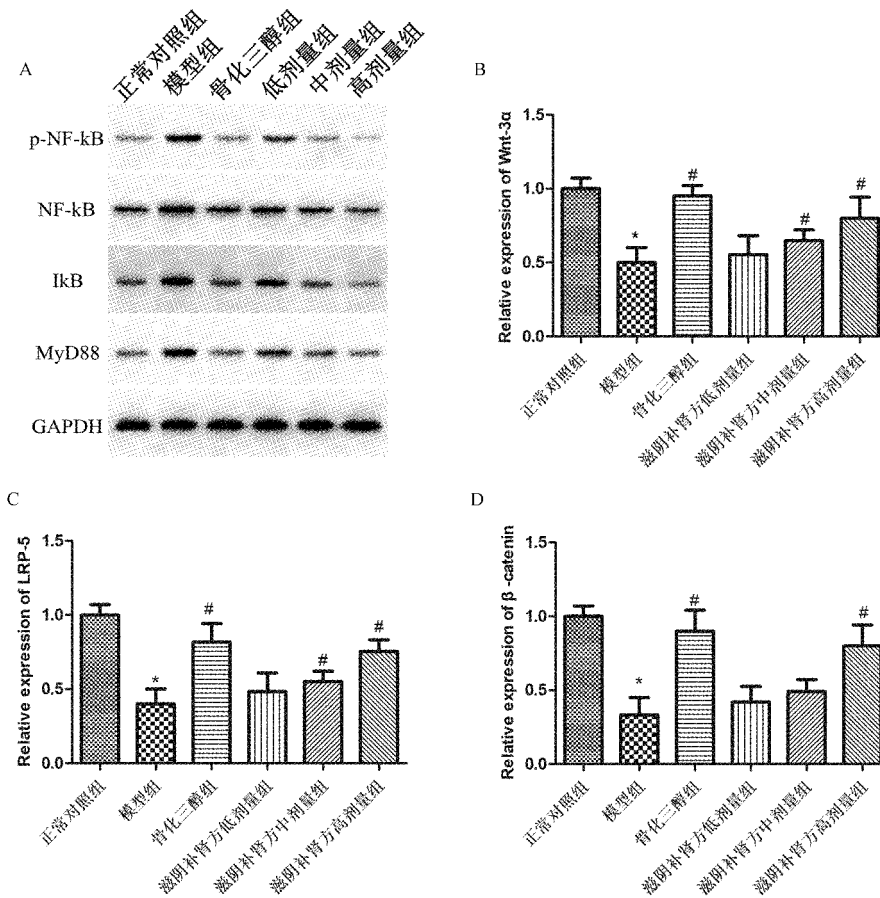


图2 与炎症相关蛋白和基因的表达

注:图2A为p-NF-kB、NF-kB、IκB、MyD88蛋白的表达;图2B、图2C、图2D分别为Wnt-3α、LRP-5、β-catenin的表达水平;与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

Fig.2 Expression of inflammation-related proteins and genes

表2 滋阴补肾方对血清中相关指标的影响 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of nourishing Yin and tonifying kidney recipe on the related indicators in serum (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-6	IL-1 β	IL-8	IL-10
正常对照组	68.47 \pm 7.14	35.62 \pm 5.21	41.03 \pm 3.21	67.39 \pm 7.01	170.21 \pm 15.42
模型组	241.58 \pm 26.12*	195.24 \pm 20.33*	180.77 \pm 20.15*	332.15 \pm 29.56*	52.17 \pm 6.23*
骨化三醇组	106.21 \pm 9.70#	70.65 \pm 8.23#	71.82 \pm 9.91#	131.27 \pm 14.21#	119.56 \pm 12.48#
低剂量组	210.63 \pm 24.84#	179.56 \pm 15.64	129.51 \pm 18.3#	261.34 \pm 45.89#	77.54 \pm 9.71#
中剂量组	121.59 \pm 13.41#	96.51 \pm 11.46#	72.37 \pm 8.56#	151.68 \pm 16.13#	112.41 \pm 10.67#
高剂量组	120.63 \pm 11.61#	75.96 \pm 8.92#	70.32 \pm 9.16#	146.21 \pm 16.14#	120.82 \pm 19.81#

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

3 讨论

糖尿病合并骨质疏松是一种全身性代谢性疾病,其主要是由于患者体内代谢平衡被打破、骨密度降低等特点导致骨组织微结构被破坏,骨脆性增加,从而使患者骨折风险大大增加,给患者带来不便和困苦^[14]。近年来,Wnt/ β -catenin信号通路对骨代谢的影响日益受到关注。 β -链蛋白(β -catenin)在

Wnt信号通路中起到关键性作用^[15-16]。 $C_3H_{10}T_{1/2}$ 细胞是可以分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等多种细胞的多潜能干细胞系,在BMP-2的作用下可以分化为成骨细胞^[17]。Bain等^[18]发现,BMP-2可以促进 $C_3H_{10}T_{1/2}$ 细胞分化为成骨细胞,在此过程中,在BMP-2的调控下, $C_3H_{10}T_{1/2}$ 细胞过渡表达 β -catenin,使成骨细胞分化的早期标志物ALP表达活跃。此外,Wnt参与成骨细胞分化形成的过程。稳

定表达 Wnt1/Wnt3 α 能促进 C₃H₁₀T_{1/2} 细胞系的增殖,并激活标志物 ALP 的活性^[19]。Wnts 不仅促进了成骨细胞的生长,还能促进成骨细胞早期分化的过程。LRP-5 表达于成骨细胞的表面,对骨量的积累过程中起到重要的作用,LRP-5 的功能丧失性突变可导致骨量减少,骨质疏松;功能获得性突变能够导致高骨密度症。它还是 Wnt 蛋白的跨膜蛋白,通过 Wnt/LRP-5 信号通路调节成骨细胞的增殖和分化,从而影响人体骨量的积累^[20]。有研究证明,LRP-5 的表达改变或者功能丢失,可阻止骨质的获得,致使体外培养鼠的头盖骨质密度降低,骨质厚度变薄^[21-22]。本文研究了糖尿病合并去卵巢骨质疏松大鼠在滋阴补肾方的作用下,Wnt/ β -catenin 和 Wnt/LRP-5 信号通路的表达情况。结果显示,糖尿病合并去卵巢骨质疏松大鼠经过滋阴补肾方的干预作用后,Wnt-3 α 、LRP-5、 β -catenin 的表达均升高,提示滋阴补肾方可通过激活 Wnt/LRP-5 和 Wnt/ β -catenin 信号通路,可能增加成骨细胞的数量,增加骨量。这和滋阴补肾方高剂量组胫骨骨小梁排列较密集,骨小梁之间连接增多的结果相符。

研究发现,糖尿病肾病是一种炎症疾病。在糖尿病合并骨质疏松的发展过程中,肾小球和肾小管的炎症反应为其主要的病症之一。炎症细胞大量浸润及细胞因子、趋化因子等炎症反应因子的产生在糖尿病的伤害中发挥重要作用^[23]。其中 TLR-MyD88 信号通路在炎症信号的传导中起着至关重要的作用。MyD88 参与了糖尿病炎症反应和发展的全过程,它调控的下游因子 NF- κ B 可激活多种炎症因子(IL-6,IL-10 等)的表达来发挥作用,此外,可调节 TGF- β 1 的表达致使肾脏的纤维化。因此,TLR-MyD88 信号通路是糖尿病炎症反应中,导致 NF- κ B 活化的关键性通路^[24-25]。糖尿病合并去卵巢骨质疏松大鼠经过滋阴补肾方的干预作用后,p-NF- κ B、NF- κ B、I κ B 以及 MyD88 蛋白表达水平均显著降低,提示滋阴补肾方抑制了 MyD88 和 NF- κ B 的表达,可能有效抑制了其相关的炎症通路。同时,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-8、IL-10 等炎症因子的水平随着滋阴补肾方的剂量而逐渐降低,提示滋阴补肾方对机体的糖尿病有所缓解,可达到增加骨密度的目的。

综上,滋阴补肾方治疗糖尿病合并去卵巢骨质疏松大鼠可显著增加其成骨细胞的数量,增加骨量,可能是通过抑制 NF- κ B 炎症通路,并激活 Wnt/ β -catenin 信号通路对其产生影响。

【参 考 文 献】

- [1] 卢广民,周生艳,徐剡.降钙素联合骨化三醇胶丸对糖尿病合并骨质疏松症的影响[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(1):103-106.
- [2] He H, Liu Y, Tian Q, et al. Relationship of sarcopenia and body composition with osteoporosis. [J]. Osteoporos Int, 2016, 27(2):1-10.
- [3] Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, et al. Immunology of osteoporosis: a mini-review [J]. Gerontology, 2016, 62(2):128-137.
- [4] Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, et al. Romosozumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis [J]. N Engl J Med, 2016, 375(16):1532-1543.
- [5] Sato Y, Honda Y, Kaji M, et al. Amelioration of osteoporosis by menatetrenone in elderly female Parkinson's disease patients with vitamin D deficiency[J]. Bone, 2018, 106(1):114-118.
- [6] Macknight JM. Osteopenia and osteoporosis in female athletes [J]. Clin Sports Med, 2017, 36(4):687-702.
- [7] Khashayar P, Qorbani M, Keshkar A, et al. Awareness of osteoporosis among female head of household: an Iranian experience [J]. Arch Osteoporos, 2017, 12(1):36-43.
- [8] Yuan X, Bi Y, Yan Z, et al. Psoralen and isopsoralen ameliorate sex hormone deficiency-induced osteoporosis in female and male mice[J]. Biomed Res Int, 2016,2016:6869452.
- [9] Alhomood IA, Sheshah I, Mohammed AGA, et al. The prevalence and risk factors of osteoporosis among a Saudi female diabetic population [J]. Open Access Maced J Med Sci, 2017, 5(2):177-181.
- [10] 陈云刚,谭国庆,任维龙,等.骨碎补含药血清经 wnt/ β -catenin 信号通路对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].中国药理学通报,2017,33(6):830-836.
- [11] 李俊峰,郭庆山,傅捷辉,等.Wnt/ β -catenin 信号通路在调控骨量的作用[J].重庆医学,2017,46(3):119-121.
- [12] 董佳梓,鞠大宏,贾朝娟,等.桑寄生、枸杞子、桑椹对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用及其机理探讨[J].中国中医基础医学杂志,2010,16(6):483-486.
- [13] 商学征,谢培凤,郭翔宇,等.补肾通络中药对糖尿病骨质疏松患者骨密度及平衡能力的影响[J].首都医药,2010,(8下):60-61.
- [14] 赵心,张晓梅,纪立农.2型糖尿病患者骨代谢改变的研究进展[J].中国糖尿病杂志,2018,26(7):613-616.
- [15] Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis [J]. Calcif Tissue Int, 2013, 93(2):121-132.
- [16] Wolski H, Drwęska-Matelska N, Seremak-Mrozikiewicz A, et al. The role of Wnt/ β -catenin pathway and LRP5 protein in metabolism of bone tissue and osteoporosis etiology [J]. Ginekol Pol, 2015, 86(4):311-314.
- [17] Miyawaki J, Kamei S, Sakayama K, et al. 4-tert-octylphenol regulates the differentiation of C3H10T1/2 cells into osteoblast and adipocyte lineages [J]. Toxicol Sci, 2008, 102(1):82-88.

- [18] Bain G, Müller T, Wang X, et al. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction.[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301(1):84.
- [19] Chen Z, Xue J, Shen T, et al. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 37(2):329.
- [20] Chung HJ, Kim WK, Oh J, et al. Anti-osteoporotic activity of harpagoside by upregulation of the BMP2 and Wnt Signaling pathways in osteoblasts and suppression of differentiation in osteoclasts[J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(2):434-442.
- [21] Williams BO. LRP5: From bedside to bench to bone [J]. *Bone*, 2017,102:26-30.
- [22] Chang M, Kramer I, Keller H, et al. Reversing LRP5-dependent osteoporosis and SOST deficiency-induced sclerosing bone disorders by altering WNT signaling activity [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(1):29-42.
- [23] Liang G, Song L, Chen Z, et al. Fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetic nephropathy by an anti-inflammatory mechanism [J]. *Kidney Int*, 2018,93(1):95-109.
- [24] Liu P, Li F, Qiu M, et al. Expression and cellular distribution of TLR4, MyD88, and NF- κ B in diabetic renal tubulointerstitial fibrosis, in vitro and in vivo. [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 105(2):206-216.
- [25] Guo C, Zhang L, Nie L, et al. Association of polymorphisms in the MyD88, IRAK4 and TRAF6 genes and susceptibility to type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy in a southern Han Chinese population [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 429(C):114-119.

(收稿日期:2018-12-12;修回日期:2019-05-06)

(上接第418页)

明显增加,说明骨愈灵胶囊能够通过抑制骨吸收,促使骨转换的再平衡趋于骨形成。而比较之下,雷洛昔芬替代疗法会抑制骨转换(即骨形成标志物和骨吸收标志物水平显著降低)。这说明骨愈灵胶囊能有效抑制绝经后妇女的骨量丢失,而且它的细胞机制与雷洛昔芬替代疗法不同。

我们的研究证实了骨愈灵胶囊可以明显增加绝经后骨质疏松症女性患者髌部及腰椎骨密度,促进成骨、抑制破骨,血清 B-ALP 和 TRAP-5b 的改善很好地证实这点。尽管本研究已经证实骨愈灵胶囊在治疗绝经后骨质疏松症的优势,但本研究只涉及单一剂量,而这一剂量是我们的临床常规使用剂量。未来,我们应该进一步探讨骨愈灵胶囊的剂量依赖效应,从而确定既能预防绝经后妇女骨质流失又能避免不良反应的最佳剂量。

【参 考 文 献】

- [1] Cao H, Zhang Y, Qian W, et al. Effect of icariin on fracture healing in an ovariectomized rat model of osteoporosis [J]. *Exp Therapeut Med*, 2017, 13(5):2399.
- [2] Lai Y, Cao H, Wang X, et al. Porous composite scaffold incorporating osteogenic phytomolecule icariin for promoting skeletal regeneration in challenging osteonecrotic bone in rabbits [J]. *Biomater*, 2018, 153:1.
- [3] Alwahabi BK, Alsuwaine BA. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis [J]. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2017,95(4):1555-1565.
- [4] 杜增峰,贺耀耀,马晓磊,等. 骨愈灵胶囊联合注射用骨肽治疗骨质疏松症的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2016,31(9):1382-1385.
- [5] Shi ZY, Zhang XG, Li CW, et al. Effect of traditional Chinese medicine product, QiangGuYin, on bone mineral density and bone turnover in chinese postmenopausal osteoporosis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017,2017:6062707
- [6] Schutte R, Nawrot TS, Richart T, et al. Bone resorption and environmental exposure to cadmium in women: a population study [J]. *Environ Health Perspect*, 2008,116(6):777-783.
- [7] Homik J, Cranney A, Shea B, et al. Bisphosphonates for steroid induced osteoporosis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, (2):CD001347.
- [8] Grosso G, Godos J, Lamuela-Raventos R, et al. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(4). doi: 10.1002/mnfr.201600930.
- [9] Blanton C. Bone response to dietary co-enrichment with powdered whole grape and probiotics [J]. *Nutrients*, 2018, 10(2):146.
- [10] Wilkins CH, Birge SJ. Prevention of osteoporotic fractures in the elderly [J]. *Bone*, 2005,118(11):1190-1195.
- [11] Riancho JA. Epigenetics of osteoporosis: critical analysis of epigenetic epidemiology studies [J]. *Curr Genomics*, 2015, 16(6):405-410.

(收稿日期:2018-11-22;修回日期:2019-01-05)