

· 论 著 ·

芍药苷促进小鼠成骨分化抗骨质疏松作用的实验研究

杨立宇 郭然 牟帅 张一奇 杨礼庆 付勤*

中国医科大学附属盛京医院骨科, 辽宁 沈阳 110003

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020)12-1742-08

摘要: **目的** 探讨芍药苷对 MC3T3-E1 成骨细胞分化以及小鼠骨质疏松模型的影响。**方法** 体外细胞实验分为对照组、不同剂量芍药苷干预组。通过 CCK-8 法检测芍药苷对 MC3T3-E1 成骨细胞活力的影响;采用碱性磷酸酶(ALP)染色以及活性检测芍药苷促进 MC3T3-E1 成骨分化能力;通过茜素红染色检测芍药苷促矿化能力;运用荧光定量 PCR、Western blot 检测 Runx2、OPG、RANKL、Col1 α 1 的 mRNA 以及蛋白表达情况。选取 8 周龄 C57BL/6 小鼠 24 只,分为假手术组、骨质疏松模型组、药物干预组。选取各小鼠左侧股骨远端以及胫骨近端的区域进行苏木素-伊红(HE)染色、Runx2 免疫组织化学以及 micro-CT 扫描。**结果** 中、高剂量芍药苷干预组可以促进 MC3T3-E1 细胞 ALP 的活性($P<0.05$);高剂量芍药苷能够促进 MC3T3-E1 细胞的矿化能力($P<0.01$);同时中、高剂量能够促进 OPG、Runx2 蛋白的表达($P<0.05$),抑制 RANKL 的表达($P<0.05$)。与假手术组比较,OVX 组骨微结构破坏明显,Runx2 蛋白表达显著减少($P<0.01$);芍药苷干预后骨质疏松模型小鼠骨小梁数量以及厚度显著增加($P<0.01$),骨小梁间隔减少明显($P<0.01$),Runx2 蛋白提升明显($P<0.01$)。**结论** 芍药苷能够促进成骨细胞的分化,上调成骨分化基因,改善骨质疏松模型小鼠的骨微结构,具有抗骨质疏松治疗的潜在价值。

关键词: 芍药苷;MC3T3-E1 细胞;成骨分化;卵巢摘除术

Experimental study on the effect of paeoniflorin in promoting osteogenic differentiation and anti-osteoporosis in mice

YANG liyu, GUO ran, MU Shuai, ZHANG yiqi, YANG liqing, FU Qin*

Department of Orthopaedic, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, China

* Corresponding author: FU Qin, Email: fuqincmu@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of paeoniflorin on osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 and osteoporosis in mice. **Methods** In vitro experiments cells were divided into control group and different concentrations of paeoniflorin intervention groups. CCK-8 method was used to detect the effect of paeoniflorin on the activity of MC3T3-E1 osteoblasts. Alkaline phosphatase (ALP) staining and activity detection of paeoniflorin effects on the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 were utilized. Alizarin red staining was used to detect the effect of paeoniflorin on the mineralization capacity of MC3T3-E1. MRNA and related proteins such as Runx2, OPG, RANKL, Col1 α 1 were detected by quantitative fluorescence PCR and Western blot. Twenty-four 8-week-old C57BL/6 mice were randomly divided into three groups, namely Sham group, OVX model group and OVX+Pa model intervention group. After 2 months of intervention, the left distal femur and proximal tibia regions of each mouse were selected for hematoxylin-eosin (HE) staining, Runx2 immunohistochemistry, and micro-CT scanning. **Results** Compared with the control group, medium and high dose paeoniflorin group could promote the activity and expression of ALP in MC3T3-E1 cells ($P<0.05$). High dose paeoniflorin could promote the mineralization ability of MC3T3-E1 cells ($P<0.01$). Meanwhile, paeoniflorin could promote the expression of osteogenic differentiation genes OPG and Runx2 ($P<0.05$), and inhibited the expression of RANKL gene and protein ($P<0.05$). In vivo, **Results** showed that OVX group induced significant bone microstructure destruction and significantly decreased Runx2 protein expression compared with Sham group ($P<0.01$). The number and thickness of bone trabeculae were significantly attenuated in the paeoniflorin group ($P<0.01$), the bone trabeculae space was significantly decreased ($P<0.01$), and the expression of Runx2 protein was increased compared with the osteoporotic mice ($P<0.01$). **Conclusion** Paeoniflorin can promote the differentiation of osteoblasts, elevate the expression of related bone formation genes, improve the bone microstructure of

基金项目: 辽宁省自然科学基金指导计划(2019-ZD-0761);辽宁省教育厅科学研究课题(JC2019016)

* 通信作者: 付勤, Email: fuqincmu@126.com

osteoporosis model mice. It has the potential value of anti-osteoporosis treatment.

Key words: paeoniflorin; MC3T3-E1 cells; osteogenic differentiation; ovariectomy

骨质疏松症(osteoporosis, OP)作为影响广大老龄患者尤其是绝经后人群的重要疾病之一,已经愈发得到现代医学的关注。骨质疏松症是以钙含量减低、骨微结构遭到破坏、骨骼强度、韧性衰减为特点,最终导致骨骼质量下降,发生脆性骨折的全身骨代谢疾病^[1-2]。目前临床上抗骨质疏松治疗主要以抗骨吸收药物为代表,如双膦酸盐类、降钙素类,这类药物虽可显著减缓骨密度下降的程度,但是用药同时抑制骨形成活动,用药后脆性骨折再发率仍较高,存在下颌骨坏死等弊端^[3]。而现有的一些促进骨形成药物亦存在着潜在的致癌风险^[4]。相比之下,传统中医药则具备温和安全、双向调控等优点,愈发引起现代医学研究的关注。

芍药苷(paeoniflorin, Pa)作为传统中药白芍总苷的主要成分之一,在中医传统处方中起着抗炎、利尿的作用^[5]。目前研究发现芍药苷除了以上功能作用之外,还具备抗氧化、免疫调节、抗肿瘤等作用^[6-7]。在骨质疏松治疗方面,有研究^[8]表明芍药苷可以抑制 NF- κ B 信号通路来降低破骨细胞的分化功能、缓解类风湿关节炎患者骨丢失的症状^[9-10]。但是芍药苷对成骨分化的作用影响仍缺乏相关实验研究,本研究的目的是探讨芍药苷对成骨细胞成骨分化的干预作用,并观察其对骨质疏松小鼠模型的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:8 周龄 C57BL/6 小鼠 24 只(北京华阜康生物科技公司,中国)。随机将小鼠分为三组,假手术组(Sham 组)、骨质疏松模型组(OVX 组)、芍药苷干预组(OVX+Pa 组)。给予 Sham 组仅开腹后便缝合腹膜,而 OVX 与 OVX+Pa 组则行双侧卵巢摘除术。术后一周开始各组对应干预,OVX+Pa 组每日进行芍药苷(50 mg/kg)腹腔注射,而 Sham 组与 OVX 组则给予等体积盐水注射,干预 12 周后取材。

1.1.2 实验细胞:采用小鼠成骨前体细胞系 MC3T3-E1(来源于中国科学院上海研究院细胞库)。

1.1.3 实验药物:芍药苷(Sigma-Aldrich,美国)。

1.1.4 实验试剂: α -MEM 培养基、胰酶-EDTA、进

口胎牛血清、PBS 溶液(Biological Industries,以色列);OPG、RANKL 抗体(万类试剂,中国);Runx2 抗体(Abcam,美国); β -actin 抗体、碱性磷酸酶染色试剂盒、碱性磷酸酶测定试剂盒(碧云天,中国);免疫组化二抗(中杉金桥,中国);抗原修复液(博士德生物科技,中国);DAB 染色试剂盒(迈新生物,中国);HE 染色液、茜素红染色液(索莱宝,中国)。EDTA 脱钙液、引物(上海生工,中国);荧光定量 PCR 试剂盒(Takara,日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养:将 MC3T3-E1 细胞接种于 α -MEM 培养基中,其中含 10 % 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 的链霉素。孵箱培养条件设定为温度 37 $^{\circ}$ C、气体条件为 5 % CO_2 ,每 48 h 进行换液,添加不同浓度的芍药苷进行干预。

1.2.2 CCK-8 细胞增殖实验:将 MC3T3-E1 细胞在 96 孔板中以 5 000 cell/ mm^2 的密度铺板,每个实验组设置 5 个复孔,每孔中培养基的体积为 100 μ L。24 h 后,加入不同浓度的芍药苷干预血清,48 h 后,每个复孔加入 90 μ L 含血清培养基之外,再加入 10 μ L CCK-8 检测液,37 $^{\circ}$ C 孵箱内进行孵育 2 h,酶标仪(美国 Biotek)在 450 nm 处测量吸光度值。

1.2.3 ALP 活性、染色实验:将 MC3T3-E1 细胞铺设于 6 孔板中,分别向每孔中加入 3 mL 药物干预血清,对照组则加入相同浓度的成骨诱导剂(Vitamin C 50 μ g/mL、Dexamethasone 100 mmol/L 和 β -sodium glycerophosphate 10 mmol/L 的混合液),每 48 h 换液一次,连续培养一周。采用 150 μ L 的 Ripa 裂解液裂解细胞,离心后收集上清液作为样品。96 孔板中加入 50 μ L 底物、30 μ L 缓冲液和 20 μ L 样品,总体积共 100 μ L。充分混匀后,37 $^{\circ}$ C 温育 15 min,酶标仪测吸光度值。ALP 染色则吸除原有培养基,PBS 轻柔清洗孔底细胞 2~3 遍,4 % 多聚甲醛室温下固定 10 min,洗涤后加入 300 μ L 显色液。室温避光孵育 2 h 后,PBS 轻柔洗涤,光学显微镜(Eclipse Ci-L)(日本 Nikon 公司)观察并照相。

1.2.4 茜素红染色实验:6 孔板中,每孔加入不同浓度的芍药苷干预血清和相同浓度的成骨诱导剂,培养 2 周,每 48 h 换液一次。染色步骤同 ALP 染色,确认染色良好后,进行光镜下观察并照相。紧接着进行半定量检测,每孔加入 1 mL 10 % 十六烷基

吡啶,轻微振荡洗脱染料后,吸取 200 μL 上清液加入 96 孔板中,每组 3 个复孔,采用酶标仪 540 nm 测吸光度值,与标准曲线对应出相对浓度。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (RT-PCR):提取总 RNA 后进行纯度以及浓度检测。确认无误后采用试剂盒进行反转录,合成 cDNA。于 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min,同温度下变性 20 s,于 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 30 s,如此反复扩增 40 个循环。采用荧光定量 PCR 仪(7500 fast,美国)进行检测,采用 β -actin 作为内参进行定量分析,每组设 3 个平行复孔,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers for quantitative real time PCR

基因	引物	引物序列 (5'~3')
β -actin	上游	GGCTCTATTCCCTCCATCC
	下游	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Runx2	上游	CCAACCGAGTCATTTAAGGCT
	下游	GCTCACGTCGCTCATCTTG
Col-A1	上游	TCGTGGTGAGACTGGTCCTG
	下游	TGTCACCTTGTTCCGCTGTC
OPG	上游	ACCCAGAACTGGTCATCAGC
	下游	CTGCAATACACACTCATCACT
RANKL	上游	CGTGCAGAAGGAAGTCAAC
	下游	GCATTGATGGTGAGGTGTGC

1.2.6 Western blot 检测:取不同浓度芍药苷干预 72 h 的细胞,Ripa 裂解液冰上裂解 15 min,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。根据蛋白样品浓度,用蛋白上样缓冲液稀释每组蛋白样品至 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,在电泳孔道中,每组加入 10 μL ,而后冰水浴中转移至 PVDF 膜上,5 % 的脱脂牛奶封闭,一抗溶液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日室温条件下二抗溶液中孵育 2 h。轻柔加入显影剂,采用化学发光成像系统(C300,美国 Azure)使蛋白条带显影,应用 Image J 软件对蛋白条带进行密度分析。

1.2.7 HE 染色和免疫组织化学检测:应用石蜡切片机(Microm HM 340E,美国)对标本进行 3 μm 厚度切片。二甲苯脱蜡后,不同浓度乙醇褪去二甲苯。苏木素染色、自来水返蓝后伊红染色,蒸馏水洗去附着的染色液。显微镜下观察颜色结构良好后,脱水,二甲苯透明封片。光学显微镜下观察干骺端附近骨小梁厚度以及结构。免疫组织化学染色步骤:脱蜡后采用抗原修复液覆盖标本区域 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,而后室温下阻断内源性过氧化物酶,一抗抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。室温下二抗孵育 30 min,与链霉素过氧化物酶室温孵育 20 min。滴加新鲜配制的 DAB 显色液,苏木素复染,自来水返蓝,脱水封片。应用

Image-Pro Plus 软件进行统计分析。

1.2.8 micro-CT 分析:颈椎脱位法后取小鼠左侧胫骨,4 % 多聚甲醛固定 72 h,采用 micro-CT (Cheetah EVO, YXLON, 德国) 进行扫描,扫描厚度为 6~7 μm ,源电压 80 kV,源电流 35 μA ,曝光时间选择为 720 ms。采用系统自带的分析软件对获取图像进行定量分析,主要参数有骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁宽度 (Tb.Th)、骨小梁间隔 (Tb.Sp) 以及骨小梁体积 (BV) 和扫描组织体积 (TV)。

1.3 统计学处理

结果数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计计算,全部计量数据以均数 $\pm$ 标准差 (SD) 表示,各组间比较采用 *t* 检验方式,以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度芍药苷对体外 MC3T3-E1 细胞活力的影响

与对照组相比,芍药苷对体外 MC3T3-E1 细胞活力无明显影响 ($P > 0.05$),见图 1。

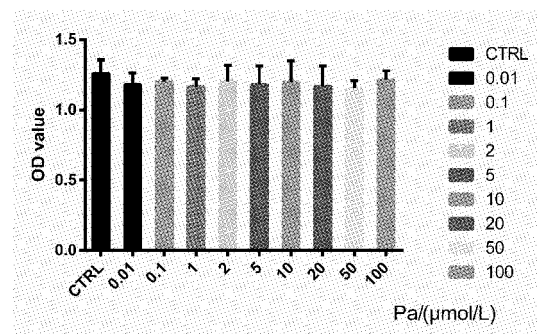


图 1 芍药苷对 MC3T3-E1 细胞活力的影响

Fig.1 Effect of paeoniflorin on the viability of MC3T3-E1 cells

2.2 芍药苷促进体外 MC3T3-E1 细胞的成骨分化

中、高剂量芍药苷能够明显提升 MC3T3-E1 细胞 ALP 的表达,且高剂量干预组 (20 $\mu\text{mol/L}$) 效果显著 ($P < 0.01$)。成骨分化诱导剂干预 14 d 后,高剂量组钙结节的数量与密度明显高于对照组,结果显示给予芍药苷干预能够明显促进 MC3T3-E1 细胞的矿化能力 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 芍药苷对体外 MC3T3-E1 细胞的成骨分化基因的影响

中、高剂量芍药苷干预组显著提升了成骨分化基因 OPG、Runx2 以及 Col α 1 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$),降低了破骨分化相关基因 RANKL 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$),差异有统计学意义,见图 3。

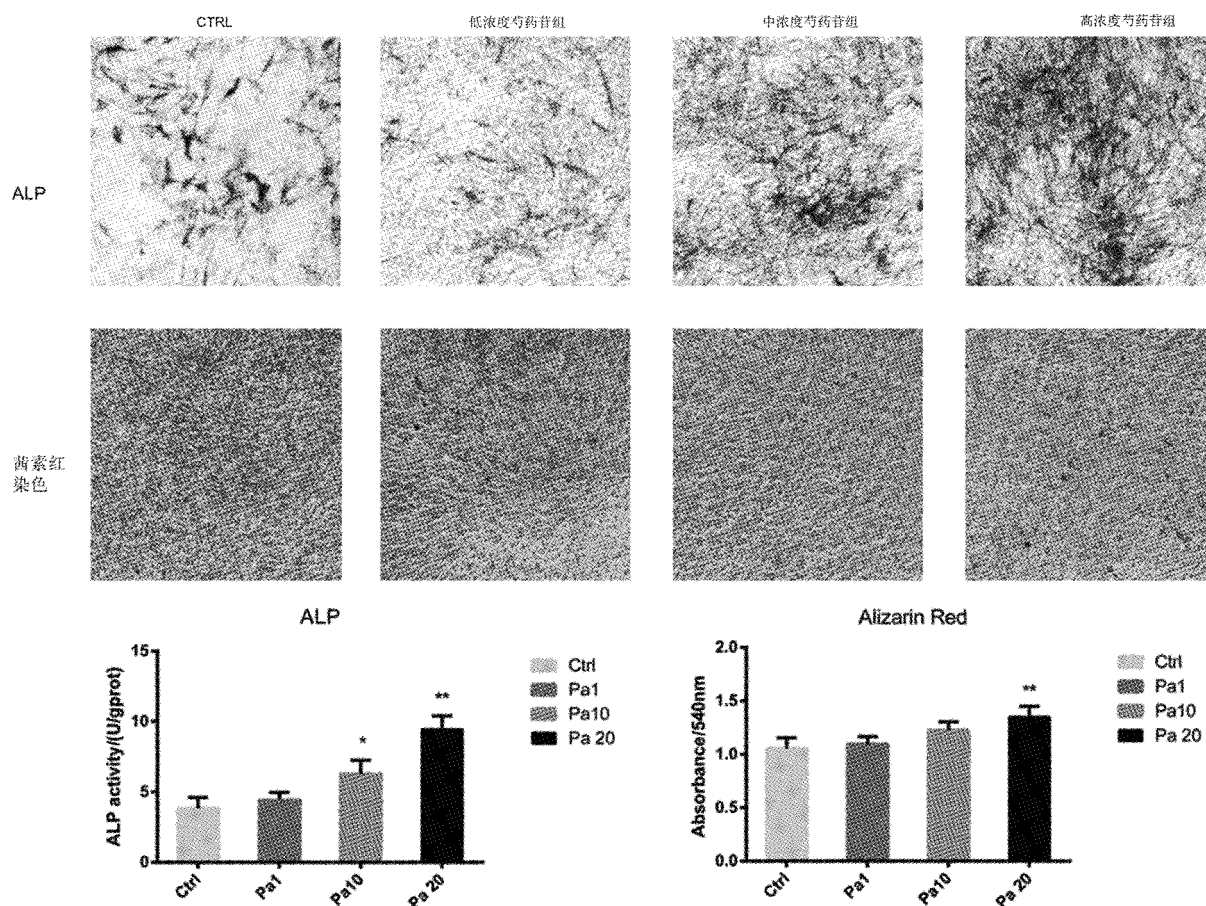


图2 芍药苷对 MC3T3-E1 成骨分化能力的影响 (光镜下 100 倍放大)

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Fig.2 Effect of paeoniflorin on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 (Scale bar: 100× magnification)

2.4 不同浓度芍药苷干预后相关蛋白表达情况

高剂量芍药苷干预组能够显著提升 MC3T3-E1 成骨分化蛋白 OPG、Runx2 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 降低破骨分化蛋白 RANKL 蛋白的分泌 ($P < 0.01$), 见图 4。这一结果与 RT-PCR 结果相符合。

2.5 HE 染色和免疫组织化学分析结果

与 Sham 组相比, OVX 组骨小梁间隔明显增大, 骨小梁变得细短而且排列稀疏; OVX+Pa 组较 OVX 组骨小梁数量以及厚度有所增加。免疫组织化学结果显示, Sham 组中 Runx2 蛋白主要分布于骨小梁的表面成骨细胞内以及干骺端附近的骨细胞陷窝中, 而 OVX 组表达较少, OVX+Pa 组有所恢复。半定量分析显示, OVX 组与 OVX+Pa 组较 Sham 组 Runx2 蛋白表达均显著下降 ($P < 0.01$), 但芍药苷组下降程度更少, 与 OVX 组比较芍药苷明显提升骨质疏松小鼠体内的 Runx2 蛋白表达 ($P < 0.01$)。见图 5。

2.6 芍药苷对小鼠骨微结构的影响

与 Sham 组相比, OVX 组在 BV/TV (骨小梁体积比)、Tb.N (骨小梁数量)、Tb.Th (骨小梁厚度) 都显著下降 ($P < 0.01$), 而 Tb.Sp (骨小梁间隔) 显著加宽 ($P < 0.01$)。而 OVX+Pa 组, Tb.Sp、Tb.Th 未见明显差异 ($P > 0.05$), BV/TV 以及 Tb.N 较 Sham 组下降明显 ($P < 0.01$); 同时 OVX+Pa 组与 OVX 组相比较, 显著提升了 BV/TV (骨小梁体积比)、Tb.N (骨小梁数量) 和 Tb.Th (骨小梁厚度), 有效降低了 Tb.Sp (骨小梁间隔) ($P < 0.01$)。见图 6。

3 讨论

骨形成与骨吸收活动失衡, 是骨质疏松症发生发展的重要原因。成骨细胞构造骨组织形成活动, 而破骨细胞拆解钙离子以及胶原组织形成骨吸收活动^[11]。成骨分化活动主要是由成骨细胞前体细胞的增殖与分化来调节^[12], 而 Runx2 和 Osterix 这两种转化因子起到重要促进的作用, 表现为骨基质蛋

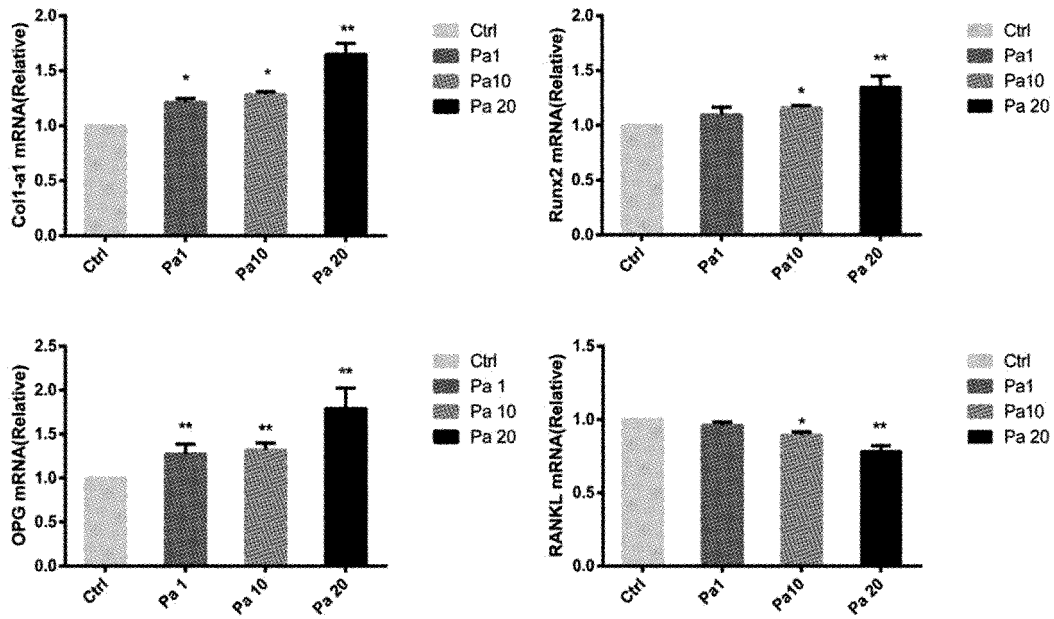


图3 芍药苷对 MC3T3-E1 细胞成骨分化相关基因的影响

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Fig.3 Effects of paeoniflorin on genes related to osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells

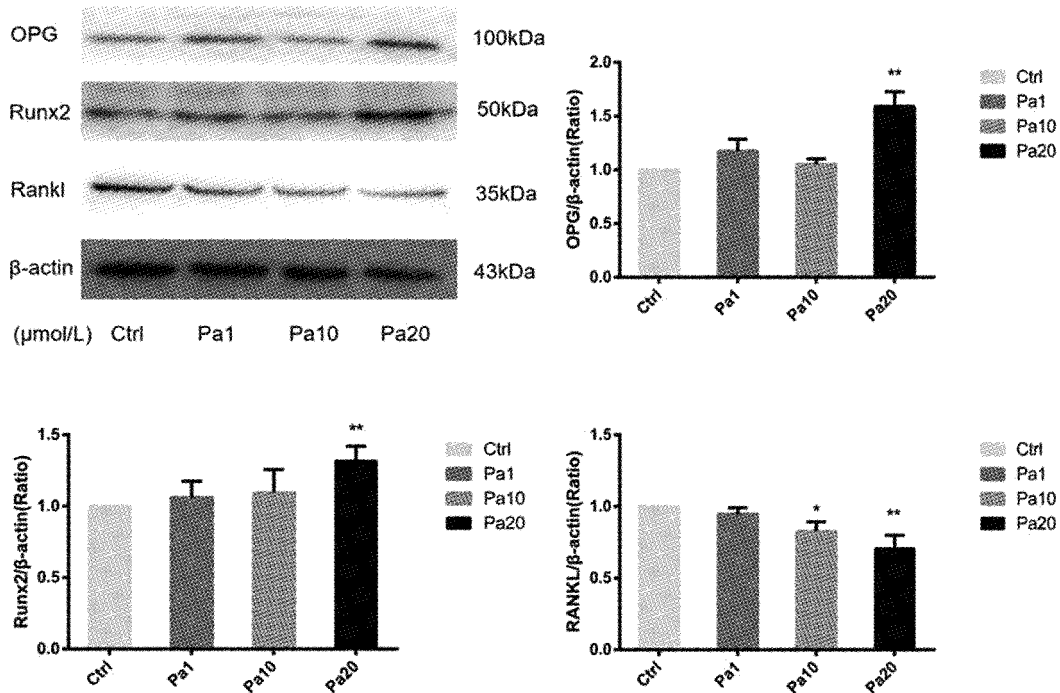


图4 芍药苷干预后成骨分化相关蛋白表达情况

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Fig.4 Expression of osteogenic differentiation related proteins after paeoniflorin intervention

白的分泌增加,碱性磷酸酶(ALP)、I型胶原纤维表达量(Colα1)升高(如图3),这些微观的改变进一步促进骨组织钙盐的沉积以及骨小梁的形成^[13]。成骨分化通常分为两个阶段,在早期阶段碱性磷酸酶

作为关键标志物起到作用,可以促进相关成骨分化基因 Colα1、OPN(骨桥蛋白)的表达;而在成骨分化的晚期阶段特点是骨细胞外基质的形成,表现为钙盐沉积在骨小梁网状结构中^[14-15]。本研究表明芍

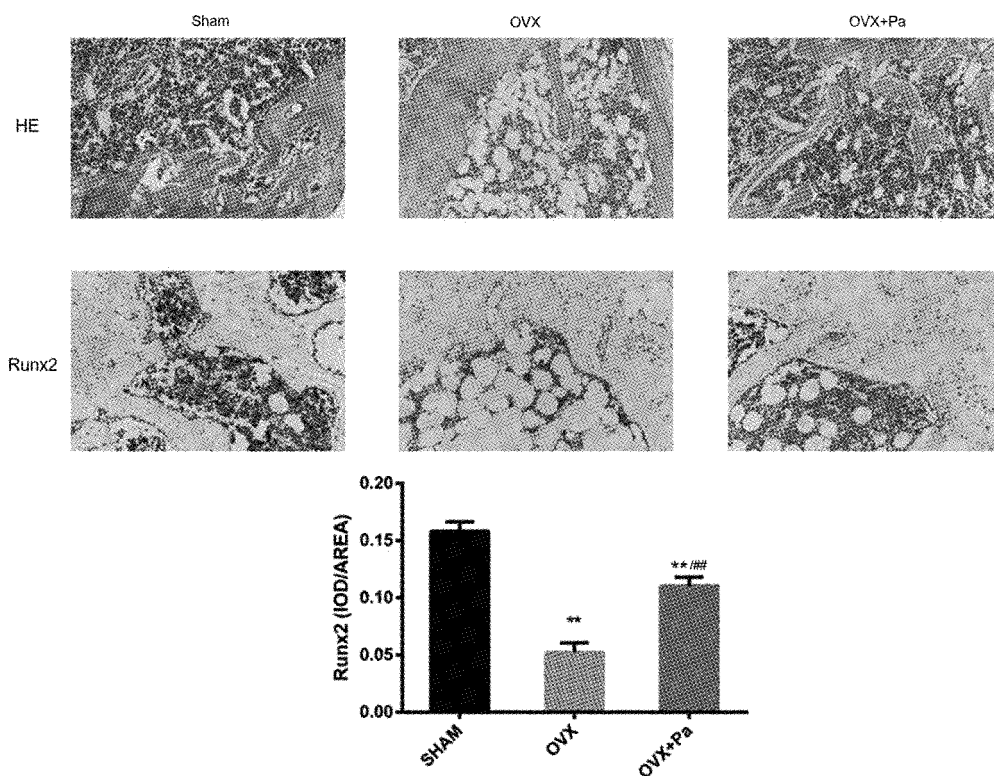


图5 小鼠股骨远端干骺端附近骨小梁 HE 染色以及 Runx2 蛋白免疫组织化学染色情况(光镜下 200 倍放大)

注:与 Sham 组比较, ** $P < 0.01$; 与 OVX 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Fig.5 HE staining of trabecular bone near metaphyseal of distal femur and immunohistochemical staining of Runx2 protein (Scale bar: 200× magnification)

药昔可以有效地促进碱性磷酸酶以及成骨分化因子的分泌,进一步增强成骨细胞的矿化活动(见图 2~图 4),说明芍药昔在成骨分化的早期以及晚期均起到了促进作用。

破骨细胞分化的进程受到了成骨细胞所分泌的两种重要因子-骨保护素(OPG)以及核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL)的影响。核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL)通过与核因子 κB 受体活化因子(RANK)受体结合激活并调节破骨细胞分化的进程^[16]。而成骨细胞分泌的 OPG 可以阻止 RANKL 与 RANK 的结合,从而达到抑制破骨细胞增殖分化的作用。故 OPG 与 RANKL 表达比在观察骨吸收与骨形成活动时是一个重要的指标^[17],通常在骨质疏松症发生发展时,即骨吸收增强、骨形成减弱时,这一比例大大降低;而治疗的目的是增强骨形成,降低骨吸收,提高 OPG 与 RANKL 这一比值。通过本研究发现,芍药昔可以提高 MC3T3-E1 细胞 OPG 的 mRNA 与蛋白的表达,并减少 RANKL 的表达(见图 3、图 4),改善并提高了 OPG/RANKL 的比

值关系,在促进成骨分化的基础上一定程度地抑制了破骨细胞的分化。

为了进一步验证芍药昔的抗骨质疏松作用,本次研究进行了骨质疏松模型小鼠体内验证。卵巢摘除模型小鼠是作为模拟原发性骨质疏松最为可靠的模型之一^[18],能够最大程度的反映绝经后女性有关的临床与生理变化,有研究^[19]表明,当卵巢摘除后低雌激素水平改变了骨细胞外的微环境,打破了既有的骨吸收/骨形成平衡,增加了骨转换的程度,即增加破骨分化以及成骨细胞凋亡。笔者通过骨组织切片和组织免疫化学发现,芍药昔可以改善骨小梁的厚度,增加干骺端附近 Runx2 蛋白的表达(见图 5),说明芍药昔不但在体外实验中可以促进成骨细胞的分化,同样在体内实验中得到了确认。为了进一步定量、微观分析,笔者进行了 micro-CT 检测。结果显示,芍药昔增加了检测区域内的骨小梁数量,厚度,并降低骨小梁之间的间隙(见图 6)。

既有的研究已表明芍药昔可以通过抑制骨吸收活动达到抗骨质疏松的作用^[8],本研究则通过体内

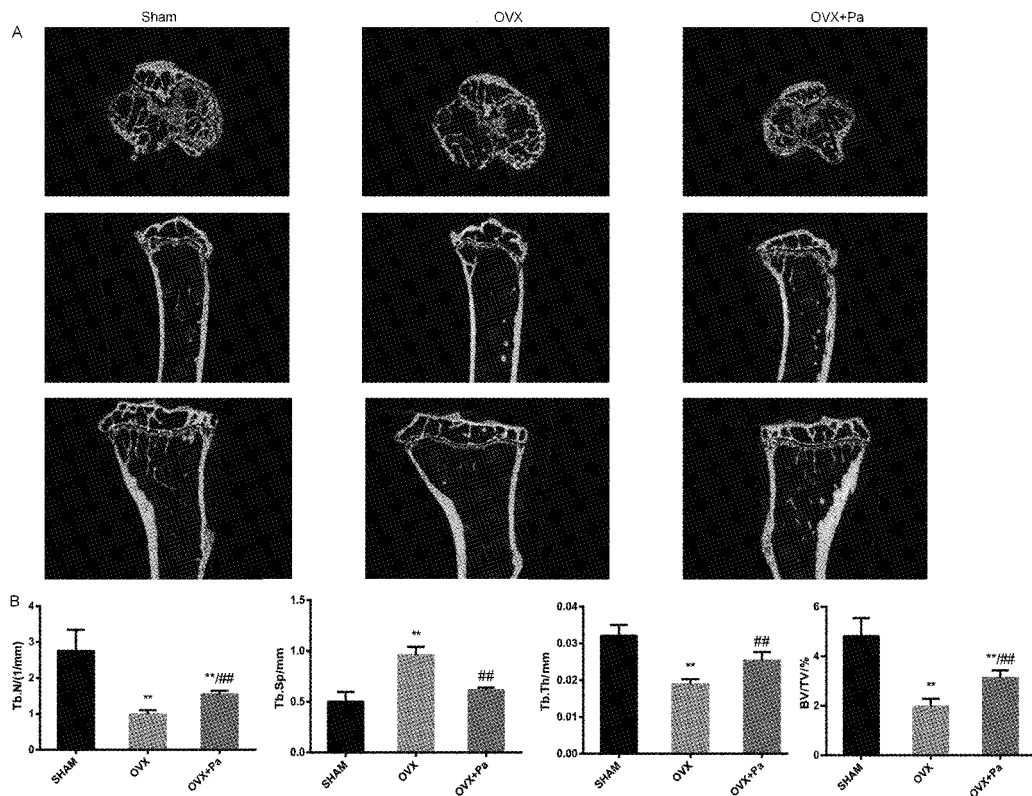


图 6 Sham 组、OVX 组和 OVX+Pa 组胫骨近端干骺端 micro-CT 分析

A: 各组典型的 micro-CT 影像; B: 各组 Tb.N、Tb.Sp、Tb.Th、BV/TV 的统计学分析结果。注: 与 Sham 组比较, ** $P < 0.01$; 与 OVX 组比较, ## $P < 0.01$ 。各组 $n = 8$ 。

Fig.6 Micro-CT analysis of proximal tibial metaphyseal in the Sham group, OVX group and OVX+Pa group

A: Typical micro-CT images of each group; B: Statistical analysis results of Tb.N, Tb.Sp, Tb.Th and BV/TV in each group.

与体外实验进一步说明芍药苷具有双向调节作用,在抑制骨吸收的同时,直接作用于成骨细胞增加骨形成活动,进一步证明了芍药苷的抗骨质疏松作用。而最新的相关文章^[11]表明,NF- κ B 信号通路起到了关键作用,芍药苷可通过抑制 NF- κ B 信号通路减少破骨细胞的分化,而当使用 TNF- α 干预成骨细胞上调 NF- κ B 信号通路时,成骨分化活动受到明显抑制,给予芍药苷可以缓解 NF- κ B 信号通路的抑制作用。说明 NF- κ B 信号通路可能是芍药苷的重要作用信号通路,其抗骨质疏松的具体作用靶点以及分子机制,需要进一步的深入研究。

【 参 考 文 献 】

- [1] Siris ES, Adler R, Bilezikian J, et al. The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group [J]. Osteoporos Int, 2014, 25 (5): 1439-1443.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊治指南(2011 年)[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(1): 2-17.
- [3] H Bone. Future directions in osteoporosis therapeutics [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2012, 41(3): 655-661.
- [4] Liu J, Curtis EM, Cooper C, et al. State of the art in osteoporosis risk assessment and treatment[J]. J Endocrinol Invest, 2019, 42 (10): 1149-1164.
- [5] Zhou J, Wang J, Li W, et al. Paeoniflorin attenuates the neuroinflammatory response in a rat model of chronic constriction injury[J]. Molecular medicine reports, 2017, 15(5): 3179-3185.
- [6] Zhang MH, Feng L, Zhu MM, et al. Antioxidative and anti-inflammatory activities of paeoniflorin and oxypaeoniflora on AGEs-induced mesangial cell damage[J]. Planta medica, 2013, 79(14): 1319-1323.
- [7] Hung JY, Yang CJ, Tsai YM, et al. Antiproliferative activity of paeoniflorin is through cell cycle arrest and the Fas/Fas ligand-mediated apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. Clinical and experimental pharmacology & physiology, 2008, 35(2): 141-147.
- [8] Xu H, Cal L, Zhang L, et al. Paeoniflorin ameliorates collagen-induced arthritis via suppressing nuclear factor-kappaB signalling pathway in osteoclast differentiation[J]. Immunology, 2018, 154 (4): 593-603.

(下转第 1759 页)

对评估 CKD-MBD 的其他检测方法和指标进行进一步的探讨。

【参 考 文 献】

- [1] Delanaye P, Souberbielle JC, Lafage-Proust MH, et al. Can we use circulating biomarkers to monitor bone turnover in CKD haemodialysis patients? Hypotheses and facts [J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2014, 29(5):997-1004.
- [2] Goldenstein PT, Jamal SA, Moyses RMA. Fractures in chronic kidney disease: pursuing the best screening and management. [J]. Current opinion in nephrology and hypertension, 2015, 24(4):317-323.
- [3] Kim SM, Long J, Montez-Rath M, et al. Hip fracture in patients with non-dialysis-requiring chronic kidney disease [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2016, 31(10):1803-1809.
- [4] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Update Work Group. KDIGO 2017 clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) [J]. Kidney International Supplements, 2017, 7(1):1-59.
- [5] Khairallah P, Nickolas TL. Management of osteoporosis in CKD [J]. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2018, 13(6):962-969.
- [6] Jassal SK, von Muhlen D, Barrett-Connor E. Measures of renal function, BMD, bone loss, and osteoporotic fracture in older adults: the rancho bernardo study [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2007, 22(2):203-210.
- [7] Bucur RC, Panjwani DD, Turner L, et al. Low bone mineral density and fractures in stages 3-5 CKD: an updated systematic review and meta-analysis [J]. Osteoporosis International, 2015, 26(2):449-458.
- [8] Bezerra De Carvalho KS, Vasco RFV, Custodio MR, et al. Chronic kidney disease is associated with low BMD at the hip but not at the spine [J]. Osteoporosis International, 2019, 30(5):1015-1023.
- [9] Cruzado JM, Moreno P, Torregrosa JV, et al. A randomized study comparing parathyroidectomy with cinacalcet for treating hypercalcemia in kidney allograft recipients with hyperparathyroidism [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2016, 27(8):2487-2494.
- [10] Carrillo-López N, Panizo S, Alonso-Montes C, et al. Direct inhibition of osteoblastic Wnt pathway by fibroblast growth factor 23 contributes to bone loss in chronic kidney disease [J]. Kidney International, 2016, 90(1):77-89.
- [11] Nickolas TL, Cremers S, Zhang A, et al. Discriminants of prevalent fractures in chronic kidney disease [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2011, 22(8):1560-1572.
- [12] Lertdumrongluk P, Lau WL, Park J, et al. Impact of age on survival predictability of bone turnover markers in hemodialysis patients [J]. Nephrology, dialysis, transplantation, 2013, 28(10):2535-2545.
- [13] Fishbane S, Hazzan AD, Jhaveri KD, et al. Bone parameters and risk of hip and femur fractures in patients on hemodialysis [J]. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2016, 11(6):1063-1072.
- [14] Malluche HH, Monier-Faugere MC, Blomquist G, et al. Two-year cortical and trabecular bone loss in CKD-5D: biochemical and clinical predictors [J]. Osteoporosis International, 2018, 29(1):125-134.

(收稿日期: 2020-04-02; 修回日期: 2020-05-23)

(上接第 1748 页)

- [9] Li Z, Li D, Chen X. Paeoniflorin inhibits receptor activator for nuclear factor κ B (RANK) ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and particle-induced osteolysis in vivo [J]. Med Sci Monit, 2018, 24:1044-1053.
- [10] Chen CW, Fan TY, Li YM, et al. Total glucosides of paeony prevents juxta-articular bone loss in experimental arthritis [J]. BMC Complement Alter Med, 2013, 13(1):186.
- [11] Wang Y, Dai J, Zhu Y, et al. Paeoniflorin regulates osteoclastogenesis and osteoblastogenesis via manipulating NF- κ B signaling pathway both *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncotarget, 2017, 9(7):7372-7388.
- [12] Tasadduq R, Gordon J, Al-Ghanim KA, et al. Ethanol Extract of cissus quadrangularis enhances osteoblast differentiation and mineralization of murine pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. J Cell Physiol, 2017, 232(3):540-547.
- [13] 汤贤春, 涂雪芹, 张天霞, 等. 骨质疏松小鼠模型骨髓间充质干细胞特性的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(12):1669-1675.
- [14] Lee HS, Jung EY, Bae SH, et al. Stimulation of osteoblastic differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells by yeast hydrolysate [J]. Phytother Res, 2011, 25:716-723.
- [15] Klumpers DD, Zhao X, Mooney DJ, et al. Cell mediated contraction in 3D cell-matrix constructs leads to spatially regulated osteogenic differentiation [J]. Integr Biol (Camb), 2013, 5(9):1174-1183.
- [16] Wang Z, Ding L, Zhang S, et al. Effects of icariin on the regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1 β -stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2014, 34(6):1720-1726.
- [17] 王斌, 张莉, 刘芬芬, 等. 慢性间歇性缺氧对大鼠骨代谢及 OPG, RANKL 基因表达的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(8):1012-1015.
- [18] Wang Z, Ding L, Zhang S, et al. Effects of icariin on the regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1 β -stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(6):1720-1726.
- [19] Li H, Chen B, Pang G, et al. Anti-osteoporotic activity of puerarin 6"-O-xyloside on ovariectomized mice and its potential mechanism [J]. Pharm Biol, 2016, 54:111-117.
- [20] Zhang F, Xie J, Wang G, et al. Anti-osteoporosis activity of Sanguinarine in preosteoblast MC3T3-E1 cells and an ovariectomized rat model [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(6):4626-4633.

(收稿日期: 2020-03-08; 修回日期: 2020-05-24)