

· 论 著 ·

八子补肾胶囊对衰老小鼠骨质量的保护作用及其对 SIRT6/NF- κ B/cathepsin K 通路的影响

李蕊^{1#} 李琳^{1#} 田恽森¹ 朱如愿¹ 陈贝贝¹ 张浩¹ 夏兵可¹ 张东伟^{1*} 王丽丽^{2*}

1.北京中医药大学中医学院,北京 100029

2.北京中医药大学中药学院,北京 100029

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 03-0313-07

摘要: **目的** 探讨八子补肾胶囊(BZBS)对 D-半乳糖(D-gal)和亚硝酸钠(NaNO₂)诱导的衰老小鼠的骨保护作用及可能的作用机制。**方法** ICR 雄性小鼠连续腹腔注射 D-gal 和 NaNO₂ 三个月造成衰老小鼠模型,并于造模第 25 天开始用 BZBS 干预,连续干预 65 d。然后收集股骨,分别用 HE 染色评价骨微结构的变化,三点弯曲实验评估骨生物力学性能,Micro-CT 扫描观察骨组织形态计量学参数,红外光谱法分析骨材料特性,免疫组织化学染色法测定骨组织中的 SIRT6、NF- κ B 和 cathepsin K 蛋白表达水平。**结果** BZBS 能明显抑制 D-gal 和 NaNO₂ 诱导的衰老小鼠的骨形态破坏,提高骨组织矿物质含量。此外,BZBS 能上调衰老小鼠血清中的 T-AOC、SOD、GSH、GSH/GSSG 水平,降低 MDA 水平,提高骨组织中 SIRT6 的表达,抑制 NF- κ B 乙酰化,降低 cathepsin K 的表达。**结论** BZBS 能提高衰老小鼠的骨质量,这种作用可能与调节氧化还原平衡进而调控 SIRT6/NF- κ B/cathepsin K 信号通路有关。

关键词: 八子补肾胶囊;衰老;老年性骨质疏松;SIRT6/NF- κ B/cathepsin K 信号通路

Bazi Bushen capsules improves bone quality and regulates SIRT6/NF- κ B/cathepsin K pathway in aged mice

LI Rui^{1#}, LI Lin^{1#}, TIAN Yimiao¹, ZHU Ruyuan¹, CHEN Beibei¹, ZHANG Hao¹, XIA Bingke¹, ZHANG Dongwei^{1*}, WANG Lili^{2*}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

* Corresponding author: ZHANG Dongwei, Email: zhdw1006@163.com; WANG Lili, Email: liliw0108@163.com

Abstract: Objective To explore the protective effect of Bazi Bushen (BZBS) capsules on the bone quality of aged mice induced by D-galactose (D-gal) and sodium nitrite (NaNO₂) and the potential underlying mechanism involved in this process. **Methods** Male ICR mice were intraperitoneally injected with D-gal and NaNO₂ continuously for 3 months to induce aged mice model and treated with BZBS from the 25th day for 65 days. Then the femurs were collected, and the changes of bone microstructure were observed with HE staining. The biomechanical properties of the bone were evaluated with three-point bending experiment. Bone material properties were analyzed by FTIR. The morphometric parameters of the bone tissue were observed with micro-CT. SIRT6, NF- κ B, and cathepsin K protein expressions in the bone tissue were determined with immunohistochemical staining. **Results** BZBS significantly protected the bone morphology from destruction in aged mice induced by D-gal and NaNO₂, and increased the mineral content of the bone tissue. In addition, BZBS increased the levels of T-AOC, SOD, GSH, and GSH/GSSG in aged mice and decreased MDA. The expression of SIRT6 in the bone increased, the acetylation of NF- κ B decreased, and the expression of cathepsin K decreased. **Conclusion** BZBS may regulate the SIRT6/NF- κ B/cathepsin K signaling pathway by restoring the redox balance, thereby improving the bone quality of aged mice.

Key words: Bazi Bushen(BZBS) capsules; aging; senile osteoporosis; SIRT6/NF- κ B/cathepsin K signaling pathway

基金项目: 国家自然科学基金项目(NSFC81874373,82074235)

* 通信作者: 张东伟,Email:zhdw1006@163.com;王丽丽,Email:liliw0108@163.com

#第一作者: 李蕊,Email:bucmlirui@163.com;李琳,Email:lilin19930901@163.com

老年性骨质疏松 (senile osteoporosis, SOP) 是一种随着年龄增加诱发的骨代谢性疾病^[1], 其主要病因是骨吸收大于骨形成而诱发的骨强度下降、骨脆性增加和骨质量降低, 具有高致残率和高死亡率的特点。流行病学研究发现, 在 2010 年至 2016 年间, 中国 30 个省、自治区 SOP 患病率已达 36 %^[2]。据全国第六次人口普查数据显示, 截至 2010 年, 我国高于 60 周岁的老年人口已达到全国总人口的 13.26 %。随着社会人口老龄化趋势加剧, SOP 的发病率也逐年增高, 已严重影响老年人的生活质量。目前临床上用于治疗 SOP 的药物主要有双膦酸盐、维生素 D 和补充钙剂等, 然而这些药物可能会带来消化道反应、血管疾病风险增加等不良反应。因此, 临床亟需研发更有效和更安全的抗 SOP 药物。近年来, 中药在抗骨质疏松方面的显著疗效已逐渐引起研究者的兴趣, 也被临床患者认可和接受^[3]。

SIRT6 是 sirtuin (SIRT1-SIRT7) 家族中的一种 NAD⁺ 依赖性组蛋白去乙酰化酶, 其通过调节 NF- κ B 介导的炎症微环境对 SOP 患者发挥骨保护作用^[4-5]。Zhang 等^[6]发现 SIRT6 敲除小鼠骨吸收作用增强, 骨形成作用下降, 其骨量明显降低。而 SIRT6 过表达可以降低 NF- κ B 介导的炎症反应, 通过延缓软骨细胞的衰老, 进而抑制骨关节炎的发展^[7]。此外, 随着年龄增长, 体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的积累可导致 SIRT6 表达下降^[8], 进而激活 NF- κ B/cathepsin K 信号通路, 从而诱发骨质量的下降。因此, 改善体内的氧化应激状态, 调节 SIRT6 的表达, 可能是 SOP 防治的新策略之一。

BZBS 是由菟丝子、枸杞子、肉苁蓉等中药组成, 具有补肾温阳的功效。中医将 SOP 纳入“骨痿”、“骨枯”范畴, 其病因为精髓不足, 肾虚失养^[9]。BZBS 中菟丝子、蛇床子等可温补肾阳, 枸杞子、五味子等滋补肾阴, 从而达到补肾健骨的目的, 这提示该复方可能具有抗骨质疏松的作用。研究^[10]表明, BZBS 可以上调去势大鼠雄激素水平, 临床上也常被用于治疗腰膝酸软等肾虚症状, 但其对 SOP 的骨代谢和骨微结构是否具有调节作用目前尚无相关研究。因此, 本研究拟 *D-gal* 和 NaNO₂ 诱导的衰老小鼠为研究对象, 观察 BZBS 的骨保护作用, 以及探讨这种作用的潜在机制, 为其临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器: PerkinElmer Quantum GX-micro-

CT 小动物活体断层扫描仪 (Perkin Elmer 公司, 美国); Olympus BX53 倒置荧光显微镜 (Olympus 有限公司, 日本); FLUO star Omega 多功能酶标仪 (BMG Labtech 公司, 德国); Leica EG 1150 H 包埋机、EG1150 C 冰冻机、RM 2 255 轮转式切片机 (Leica Biosystem 有限公司, 德国); 博勒飞质谱仪 CT3 (BRROKFIELD 公司, 美国); 傅里叶红外光谱仪 (Perkin Elmer 公司, 美国)。

1.1.2 药物与试剂: BZBS 由石家庄以岭药业股份有限公司提供, 批号: 130201。 *D-gal* (G0750) 和 NaNO₂ (31443) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 骨组织抗原修复液 (SBT10013) 购自上海舜百生物科技有限公司; 总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD)、脂质过氧化产物丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 和还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽 (GSH/GSSG) 测定检测试剂盒均购自江苏南京建成生物工程研究所; Sirt6 (ab62739)、NF- κ B Lys310 (ab16502) 和 cathepsin K (ab19027) 抗体购自美国 Abcam 公司; 兔二步法试剂盒和 DAB 显色液购自中杉金桥生物科技有限公司; 苏木精和伊红染液购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.1.3 实验动物: SPF 级 ICR 雄性小鼠, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 购于斯贝福 (北京) 实验动物科技有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2017-0002, 饲养于北京中医药大学科研实验中心清洁级动物实验室, 合格证号: SYXK (京) 2017-0038, 室温恒温 (22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (50 $\pm$ 5) %, 光暗循环周期 12 h/12 h。实验期间, 各组动物自由饮水和摄食, 并定期更换垫料和笼具。动物实验方案经北京中医药大学动物实验伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及药物处理: ICR 雄性小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为正常组、模型组、维生素 E (VE) 组和 BZBS 组, 每组 10 只。根据参考文献 [11] 的方法: 模型组、VE 组和 BZBS 组小鼠腹腔注射 *D-gal* [120 mg/(kg $\cdot$ d)] 和 NaNO₂ [90 mg/(kg $\cdot$ d)], 连续注射 3 个月, 以造成衰老模型。正常组腹腔注射等体积的生理盐水。并于造模第 25 天起, VE 组和 BZBS 组小鼠分别给予 VE [100 mg/(kg $\cdot$ d)] 和 BZBS 溶液 [1.4 g/(kg $\cdot$ d)], 对照组和模型组小鼠灌胃给予等体积的 0.1 % Tween 80, 连续干预 65 d。

1.2.2 Micro-CT 扫描: 于给药后第 65 天, 取各组小鼠右侧股骨, 剔除附着的肌肉组织, 根据文献 [12]

提供的方法,使用 PerkinElmer Quantum GX-micro-CT 小动物活体断层扫描仪分析扫描骨骺端上方 0.5 cm 处,并计算骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁分离度 (TB.SP)、骨体积分数 (BV/TV)、骨表面积组织体积比 (BS/TV) 以及骨总表面积 (Tt.Ar) 结构指数。

1.2.3 骨生物力学和骨材料检测:参照王丽丽等^[13]提供的方法,利用质构仪对右侧股骨进行三点弯曲实验,以测定骨生物力学性能,分析计算出弹性模量、极限载荷以及最大应力等骨生物力学参数。

参照 Liu 等^[14]的方法,利用傅里叶红外光谱分析仪分析上述实验后小鼠的右侧股骨的骨材料特性,并计算各组股骨的胶原成熟度、结晶度、酸性磷酸盐取代和矿物质含量。

1.2.4 氧化应激指标测定:腹主动脉取血,静置 30 min,3 500 r/min 离心 15 min,吸取上层血清,然后按照试剂盒相应的说明书测定 T-AOC、SOD、MDA GSH 和 GSH/GSSG 的水平。

1.2.5 免疫组织化学 (IHC) 染色:将股骨石蜡切片常规脱蜡至水,依次用骨组织抗原修复液进行抗原修复,用 3 % 的过氧化物酶阻断剂室温孵育 30 min,然后用 10 % 的山羊血清封闭 30 min,分别滴加 SIRT6 (1:200)、NF- κ B (Lys310) (1:100) 以及 cathepsin K (1:100),4 °C 孵育过夜。次日滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,DAB 避光显色,苏木精复

染,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。置于显微镜下观察、拍照。每组选取股骨切片中 7 个互不重叠的视野,采用 Image Pro Plus6.0 软件进行分析统计,测定阳性细胞的累计吸光值,即为蛋白阳性表达的强度。

1.3 统计学处理

所有数据均采用 GraphPad prism 6.0 软件进行统计分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间数据满足正态分布且方差齐,采用单因素方差分析 (ANOVA);否则使用近似 F 检验。不满足正态分布,则使用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BZBS 能抑制衰老小鼠股骨微结构的破坏

Micro-CT 结果显示 (图 1),与正常组相比,模型组小鼠股骨的 Tb.N、Tb.Th、BV/TV、BS/TV、Tt.Ar 明显降低 ($P < 0.05$),TB.SP 明显升高 ($P < 0.05$),说明 D -gal 和 NaNO_2 诱导的衰老小鼠骨微结构发生破坏;与模型组相比,VE 组和 BZBS 组的小鼠,其 Tb.N、Tb.Th、BV/TV、BS/TV、Tt.Ar 显著升高 ($P < 0.05$),TB.SP 显著下降 ($P < 0.05$)。这说明 BZBS 能改善 D -gal 和 NaNO_2 诱导的衰老小鼠的骨微结构,从而提高其骨质量。

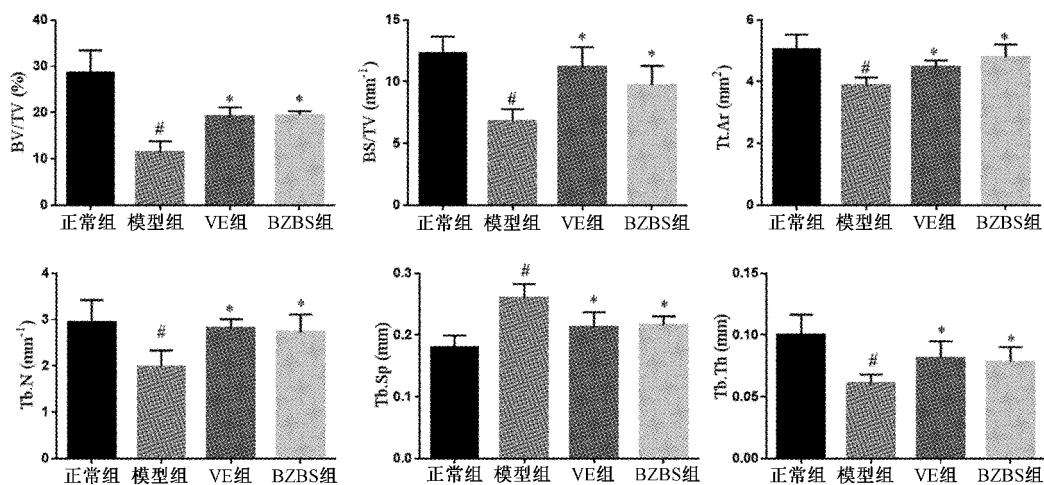


图 1 八子补肾胶囊对衰老小鼠的骨微结构指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig.1 Effect of Bazi Bushen capsules on bone microstructure in aged mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

2.2 BZBS 能提高衰老小鼠骨强度和改善骨材料构成

骨生物力学参数检测结果显示 (图 2),与正常

组相比,模型组小鼠的弹性模量、极限载荷、最大应力明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比,VE 组和 BZBS 组的小鼠,其骨生物力学相关指标显著升高

($P < 0.05$)。这说明 BZBS 能抑制 *D-gal* 和 NaNO_2 诱导的衰老小鼠骨强度下降。

各组小鼠的股骨材料成分变化分析结果显示(表1),与正常组相比,模型组小鼠的胶原成熟度和结晶度明显升高($P < 0.05$),矿物质含量和酸性磷酸

盐取代明显降低($P < 0.05$);与模型组相比,VE 组和 BZBS 组小鼠的胶原成熟度和结晶度降低($P < 0.05$),矿物质含量和酸性磷酸盐取代显著升高。这说明 BZBS 能够通过调节骨材料成分的构成而改善衰老小鼠的骨质量。

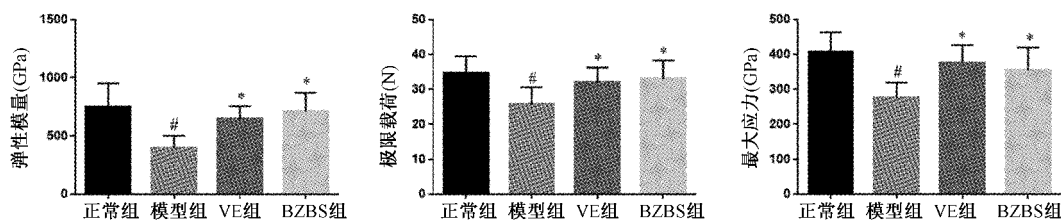


图2 八子补肾胶囊对衰老小鼠的骨强度影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig.2 Effect of Bazi Bushen capsules on bone strength in aged mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表1 八子补肾胶囊对衰老小鼠的骨材料特性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Bazi Bushen capsules on the bone material properties in aged mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	胶原成熟度	矿物质含量	结晶度	酸性磷酸盐取代
正常组	1.0782 $\pm$ 0.0157	3.8381 $\pm$ 0.1372	1.0128 $\pm$ 0.0058	0.8878 $\pm$ 0.0193
模型组	1.1187 $\pm$ 0.0104 [#]	3.2966 $\pm$ 0.1582 [#]	1.0246 $\pm$ 0.0040 [#]	0.8529 $\pm$ 0.0180 [#]
VE 组	1.0650 $\pm$ 0.0244 [*]	3.4414 $\pm$ 0.2393	1.0104 $\pm$ 0.0244 [*]	0.8866 $\pm$ 0.0227 [*]
BZBS 组	1.0740 $\pm$ 0.0143 [*]	3.7280 $\pm$ 0.0659 [*]	1.0131 $\pm$ 0.0029 [*]	0.8815 $\pm$ 0.0142 [*]

注:与正常组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.3 BZBS 能改善衰老小鼠股骨的病理微结构

股骨组织 HE 染色显示(图3),正常组小鼠骨组织的骨显微结构完整,网状排列整齐。与正常组相比,模型组小鼠骨小梁变细、断裂,结构稍紊乱;与模型组小鼠相比,VE 组和 BZBS 组小鼠的骨组织结

构有明显改善,骨小梁增粗,排列相对整齐,但尚未恢复至对照组骨微结构的形态。这说明 BZBS 能明显改善 *D-gal* 和 NaNO_2 诱发的衰老小鼠骨显微结构。

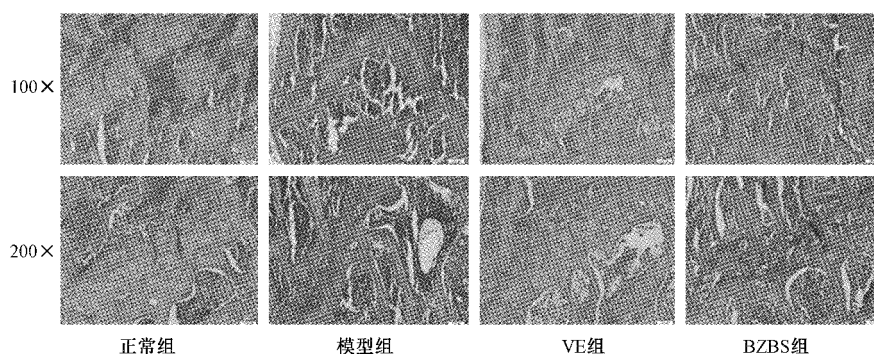


图3 八子补肾胶囊对衰老小鼠的骨组织病理微结构的影响

Fig.3 Effect of Bazi Bushen capsules on the microarchitecture of bone tissue in aged mice

2.4 BZBS 能促进衰老小鼠体内氧化还原的平衡

各组小鼠血清中氧化应激指标检测结果显示(表2),与正常组相比,模型组小鼠的 MDA 水平明显升高($P < 0.05$),T-AOC、SOD、GSH 和 GSH/GSSG 明显低于正常组($P < 0.05$);与模型组相比,VE 和

BZBS 组小鼠,其体内的 MDA 水平明显下降($P < 0.05$),T-AOC、SOD、GSH 和 GSH/GSSG 水平明显升高($P < 0.05$)。这说明 BZBS 能调节体内的氧化还原平衡,改善衰老小鼠体内氧化应激状态。

表 2 八子补肾胶囊对衰老小鼠血清中氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 2 Effect of Bazi Bushen capsules on serum oxidative stress level in aged mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Group	T-AOC/(mmol/L)	SOD/(U/mL)	MDA/(μ mol/L)	GSH/(μ mol/L)	GSH/GSSG
正常组	0.54 $\pm$ 0.03	248.22 $\pm$ 40.49	7.39 $\pm$ 2.20	15.93 $\pm$ 3.22	2.17 $\pm$ 0.44
模型组	0.42 $\pm$ 0.07 [#]	170.85 $\pm$ 7.35 [#]	14.60 $\pm$ 2.06 [#]	9.33 $\pm$ 2.44 [#]	0.84 $\pm$ 0.22 [#]
VE 组	0.52 $\pm$ 0.03 [*]	241.85 $\pm$ 41.21 [*]	7.54 $\pm$ 1.63 [*]	16.17 $\pm$ 2.08 [*]	2.04 $\pm$ 0.26 [*]
BZBS 组	0.50 $\pm$ 0.05 [*]	239.72 $\pm$ 19.41 [*]	10.08 $\pm$ 1.43 [*]	15.14 $\pm$ 3.76 [*]	1.78 $\pm$ 0.44 [*]

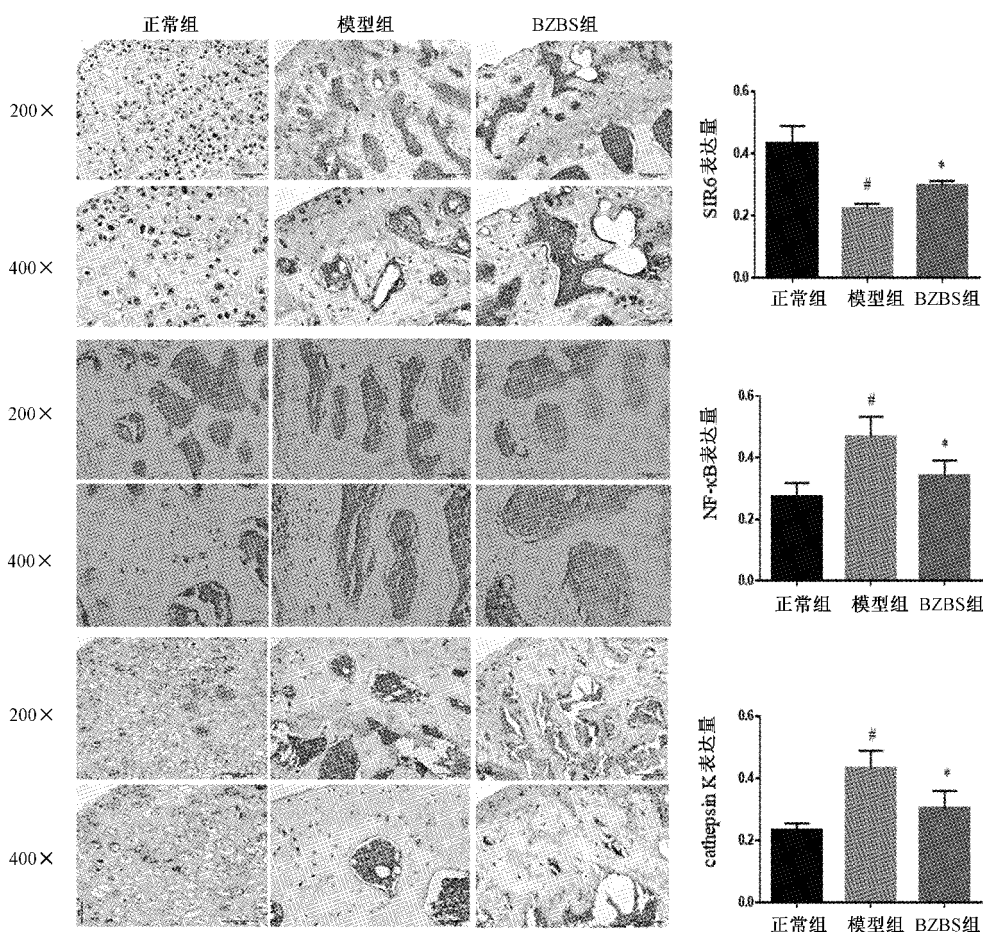
注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

2.5 BZBS 对衰老小鼠骨组织的影响

BZBS 能提高衰老小鼠骨组织中 SIRT6 表达,抑制 NF- κ B(Lys310)和 cathepsin K 的表达。

免疫组化结果显示(图 4),与正常组相比,衰老模型小鼠骨组织中 SIRT6 的表达明显降低,NF- κ B 的乙酰化水平和 cathepsin K 水平明显增高($P<$

0.05);与模型组相比,BZBS 组小鼠骨组织中 SIRT6 显著升高($P<0.05$),而乙酰化的 NF- κ B 和 cathepsin K 的表达明显下降($P<0.05$)。这说明 BZBS 可能通过上调 SIRT6,抑制 NF- κ B 和 cathepsin K 蛋白的表达,进而抑制骨吸收作用,从而提高衰老小鼠的骨质量。

图 4 八子补肾胶囊对衰老小鼠骨组织中 SIRT6、NF- κ B 和 cathepsin K 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Fig.4 Effect of Bazi Bushen capsules on the expression of SIRT6, NF- κ B, and cathepsin K protein in bone tissue of aged mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3 讨论

本研究发现,BZBS 能明显抑制衰老小鼠骨微

结构的破坏和骨强度的下降,改善骨材料构成,提高血清中的 T-AOC、SOD 和 GSH 水平,降低 MDA 水平,进而恢复氧化还原平衡状态,升高 SIRT6 表达水

平,抑制 NF- κ B/cathepsin K 的蛋白表达,从而改善衰老小鼠的骨质量。

BZBS 由菟丝子、枸杞子、五味子、蛇床子、金樱子、覆盆子、韭菜子、川楝子、淫羊藿、巴戟天、肉苁蓉、地黄、川牛膝、人参、鹿茸、海马等组成。本研究通过 micro-CT、HE 染色、FTIR 和三点弯曲实验检测,发现 BZBS 对骨量、骨微结构、骨材料特性和骨强度有明显的改善作用。其他团队研究也表明,菟丝子^[16]能提高去卵巢大鼠的骨密度,改善骨质疏松症状;枸杞子^[17]有改善骨微结构的作用;蛇床子^[18]能够调节去卵巢大鼠雌激素分泌从而有一定的防治骨质疏松作用,淫羊藿、巴戟天和地黄均有相关实验证明对骨质疏松模型大鼠有改善骨质量的作用^[19-21]。这提示,这些药物可能是 BZBS 发挥骨保护作用的物质基础。

ROS 的积累是衰老相关组织退化的一种潜在机制,年龄相关或者卵巢切除的骨量丢失小鼠体内常表现升高的氧化应激水平^[22-23]。本研究发现,BZBS 能明显降低 MDA 水平,升高 T-AOC、SOD、GSH/GSSG 水平,改善氧化应激状态,提示 BZBS 具有抗氧化作用。吴石磊^[24]研究发现淫羊藿对 NOX4 介导的 ROS 有明显的抑制作用,对成骨细胞的增殖活力有明显的保护作用;张秀丽^[25]也发现地黄的主要成分梓醇可以提高内源性抗氧化酶活力,降低 MDA 含量,从而对 *D-gal* 诱导的衰老小鼠有保护作用。以上研究结果提示,BZBS 对衰老小鼠有骨保护作用,可能与改善体内氧化应激水平有关。

衰老小鼠体内的 ROS 的积累导致氧化应激,进而激活 NF- κ B 的核转移和乙酰化,以及 cathepsin K 高表达^[26],导致 SOP 的发生。本研究结果显示,衰老小鼠骨组织中的 SIRT6 表达水平下降,NF- κ B 乙酰化和 cathepsin K 的表达水平较正常组均明显升高,这说明 *D-gal* 和 NaNO₂ 诱导的衰老小鼠的骨吸收作用增强。BZBS 干预衰老小鼠 65 d 后,其能明显提高骨组织中 SIRT6 的水平,抑制 NF- κ B 乙酰化和 cathepsin K 的表达,从而抑制骨量丢失。陈洋等^[27]研究发现淫羊藿苷通过上调 SIRT6 酶抑制 NF- κ B 蛋白表达而延缓衰老相关病变;王凯^[28]研究发现与 BZBS 组成相似的益肾胶囊可以通过 SIRT6 抑制 NF- κ B 水平。以上研究结果表明,BZBS 可能是通过上调 SIRT6,抑制 NF- κ B/cathepsin K 信号通路从而降低骨吸收作用有关。

综上所述,本研究表明 BZBS 能够明显改善衰老小鼠的骨强度和骨微结构,其发挥抗骨质疏松的

作用机制之一可能是通过恢复体内氧化还原平衡,进而上调 SIRT6,降低 NF- κ B 乙酰化水平,降低 cathepsin K 的表达,从而改善骨质量。本研究为 BZBS 抗骨质疏松的临床应用奠定了实验基础,也为防治 SOP 提供了新思路。

【参 考 文 献】

- [1] 丁超,孙强.老年性骨质疏松症相关问题研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(3):372-375.
- [2] 潘克侵,贺丽英,孙蕴,等.2010-2016年中国老年人骨质疏松症患病率 Meta 分析[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(12):1590-1596.
- [3] 郭鱼波,王丽丽,马如风,等.骨质疏松的中医病因病机分析及其中医药治疗的前景探讨[J].世界科学技术-中医药现代化,2015,17(4):768-772.
- [4] 王开,荆得宝,于素平,等.炎症微环境对大鼠间充质干细胞增殖及 Sirt6 表达水平的影响[J].口腔颌面外科杂志,2020,30(3):150-155.
- [5] 武壹森.Sirt6 对骨性关节炎的调控作用及其机制研究[D].杭州:浙江大学,2014.
- [6] Zhang DM, Cui DX, Xu RS, et al. Phenotypic research on senile osteoporosis caused by SIRT6 deficiency[J]. Int J Oral Sci, 2016,8(2):84-92.
- [7] Wu Y, Chen L, Wang Y, et al. Overexpression of Sirtuin 6 suppresses cellular senescence and NF- κ B mediated inflammatory responses in osteoarthritis development[J]. Sci Rep, 2015,5:17602.
- [8] Carreira MC, Izquierdo AG, Amil M, et al. Oxidative stress induced by excess of adiposity is related to a downregulation of hepatic SIRT6 expression in obese individuals[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018,2018:6256052.
- [9] 孙荣新,盛炎炎.中医药治疗老年性骨质疏松研究概况[J].中医临床杂志,2017,29(11):1951-1954.
- [10] 雷海燕,李向军.八子补肾胶囊对去势大鼠性功能的影响[J].武警医学,2015,26(10):1036-1038.
- [11] Bagheri SM, Dashti-R MH. Influence of asafetida on prevention and treatment of memory impairment induced by d-galactose and NaNO₂ in mice[J]. Am J Alzheimers Dis Other Dement, 2015,30(6):607-612.
- [12] Li L, Chen B, Zhu R, et al. Fructus Ligustri Lucidi preserves bone quality through the regulation of gut microbiota diversity, oxidative stress, TMAO and Sirt6 levels in aging mice[J]. Aging (Albany NY), 2019,11(21):9348-9368.
- [13] 王丽丽,马如风,刘海霞,等.丹酚酸 B 通过调节 Nox4 信号通路改善高脂饮食小鼠骨代谢的实验研究[J].中国药理学通报,2018,34(1):77-81.
- [14] Liu C, Zhu R, Liu H, et al. Aqueous extract of mori folium exerts bone protective effect through regulation of calcium and redox homeostasis via PTH/VDR/CaBP and AGEs/RAGE/Nox4/NF-kappaB signaling in diabetic rats [J]. Front Pharmacol, 2018,9:1239.

- mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca(2+) channel sulfhydration [J]. *Cell Stem Cell*, 2014,15(1): 66-78.
- [6] Ma Jun, Shi Changgui, Liu Zhongyang, et al. Hydrogen sulfide is a novel regulator implicated in glucocorticoids-inhibited bone formation [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (18): 7537-7552.
- [7] Zhong-Shi Xu, Feng Dai, Ji Chen, et al. Experimental research into the potential therapeutic effect of GYY4137 on Ovariectomy-induced osteoporosis [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018,23: 47.
- [8] Xu Zhong-Shi, Wang Xin-Y, Xiao De-Ming, et al. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50 (10): 1314-1323.
- [9] Yu Y, Shen X, Luo Z, et al. Osteogenesis potential of different titania nanotubes in oxidative stress microenvironment [J]. *Biomaterials*, 2018,167: 44.
- [10] Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis [J]. *Autophagy*, 2014,10(11): 1965-1977.
- [11] Azad MB, Chen Y, Gibson SB. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009,11(4): 777-790.
- [12] Sun Kai, Xie Xuqin, Liu Yan, et al. Autophagy lessens ischemic liver injury by reducing oxidative damage [J]. *Cell Biosci*, 2013,3(1): 26.
- [13] Oh Yoen Kim, Jey Sook Chae, Jean Kyung Paik, et al. Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women [J]. *Age (Dordr)*, 2012,34(2): 415-425.
- [14] Melville KM, Kelly NH, Khan SA, et al. Female mice lacking estrogen receptor-alpha in osteoblasts have compromised bone mass and strength [J]. *J Bone Miner Res*, 2009,24(2): 370-379.
- [15] Haberkant P, Hill BG. Oxidized lipids activate autophagy in a JNK-dependent manner by stimulating the endoplasmic reticulum stress response [J]. *Redox Biol*, 2013,1(1): 56-64.
- [16] Zhang Lishu, Guo Yan-Fang, Liu Yao-Zhong, et al. Pathway-based genome-wide association analysis identified the importance of regulation-of-autophagy pathway for ultradistal radius BMD [J]. *J Bone Miner Res*, 2010,25(7): 1572-1580.

(收稿日期: 2020-03-04;修回日期: 2020-06-18)

(上接第 318 页)

- [15] Guo Y, Wang L, Ma R, et al. JiangTang XiaoKe granule attenuates cathepsin K expression and improves IGF-1 expression in the bone of high fat diet induced KK-Ay diabetic mice [J]. *Life Sci*, 2016,148:24-30.
- [16] 赵素霞, 刘会丽, 江红. 菟丝子黄酮通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路干预去卵巢大鼠骨代谢的机制研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018,17(1):25-28.
- [17] 刘舵, 杨永利, 雷婷, 等. 枸杞子乙酸乙酯提取物急性毒性及对切除卵巢大鼠骨质疏松的防治作用 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016,22(4):396-401.
- [18] 刘元, 王立恒, 伊璠. 基于 BGP、TGF- β 1 的表达探究蛇床子素对去卵巢致骨质疏松大鼠的作用 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2020,18(5):99-101.
- [19] 李小林, 武密山, 朱紫薇, 等. 地黄对去卵巢骨质疏松大鼠腰椎骨组织整合素 β 1 mRNA 表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2015,35(9):2319-2322.
- [20] 胡英勇, 尹耀庭, 刘月平. 巴戟天提取物对去卵巢大鼠骨质疏松症的防治作用 [J]. *湖南中医杂志*, 2019, 35 (11): 139-141.
- [21] 李晓曦, 陈宇恒, 唐秀凤, 等. 基于雌激素作用的淫羊藿女贞子配伍对绝经后骨质疏松症大鼠的影响研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2019,27(9):1-6.
- [22] Almeida M, O'Brien C A. Basic biology of skeletal aging: role of stress response pathways [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2013,68(10):1197-1208.
- [23] Chen JR, Lazarenko OP, Zhao H, et al. Nox4 expression is not required for OVX-induced osteoblast senescence and bone loss in mice [J]. *JBM Plus*, 2020,4(8):e10376.
- [24] 吴石磊. 不同浓度淫羊藿苷对成骨细胞铁过载损伤的保护及机制研究 [D]. 武汉:华中科技大学, 2017.
- [25] 张秀丽. 梓醇对 D-半乳糖衰老小鼠的神经保护作用研究 [D]. 大连:大连理工大学, 2008.
- [26] 王丽丽, 马如风, 于娜, 等. 丹酚酸 B 通过抗氧化作用改善高脂饮食小鼠牙槽骨骨质疏松的实验研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017,23(3):281-285.
- [27] 陈洋, 平键, 张晶, 等. 淫羊藿苷提高 SIRT6 酶活性及抑制小鼠 NF- κ B 炎症信号通路的实验研究 [J]. *老年医学与保健*, 2012,18(6):338-341, 346.
- [28] 王凯. 益肾胶囊对糖尿病肾病大鼠肾组织 SIRT6、podocin 表达的影响 [D]. 太原:山西医科大学, 2020.

(收稿日期: 2020-11-09;修回日期: 2020-12-03)