

青娥方对骨质疏松骨关节炎模型鼠早期软骨下骨基质金属蛋白酶 3 和骨桥蛋白表达的影响

戴燚^{1△} 范彦博² 赵雅靓³ 李彦锦¹ 徐平¹ 唐崇曦¹

[摘要] 目的:探讨中药复方青娥方对骨质疏松骨关节炎模型鼠早期软骨下骨组织形态以及基质金属蛋白酶 3 和骨桥蛋白表达的影响。方法:30 只大鼠随机分为正常组(A 组)、青娥方组(B 组)、骨质疏松模型(C 组)、骨质疏松骨关节炎模型(D 组)和骨关节炎模型(E 组),每组 6 只。其中 B、C 和 D 组进行骨质疏松模型制备,1 个月后 B、D 和 E 组进行骨关节炎造模,接着术后第 2 天,B 组灌服青娥方药液,其余各组灌服等量的生理盐水,1 次/d,连续 4 周。结果:病理切片可见 D 组的各个时期均可见软骨下骨板逐渐增厚,软骨细胞四层结构不易分辨,可见双重潮线。软骨下骨板逐渐断裂至钙化软骨层内,软骨下骨骨小梁逐步紊乱、稀疏、断裂。B 组干预后第 1 周软骨下骨板部分碎裂,潮标线不清晰,干预后第 2 周潮标线部分显示,可见少量增生血管。干预后第 4 周可观察到潮线结构基本完整,软骨下骨板下方的骨小梁结构欠规则,内可见增生的血管。软骨下骨骨组织在中药复方干预后第 4 周时各组软骨下骨骨小梁体积分数、骨小梁数量、骨小梁分离度和骨小梁厚度(Tb. Th)与 A 组差异无统计学意义($P > 0.05$),与 D 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。胫骨髌骨组织中正常组 MMP3 和 OPN 基因维持在相对稳定的水平;B 组 MMP3 和 OPN 基因上调表达维持在相对稳定的水平;与 D 组相比,B 组 MMP3 和 OPN 在治疗后第 2 周和第 4 周差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:中药青娥方可以改变关节软骨和软骨下骨镜下表现,调节软骨下骨组织骨小梁各项指标以及 MMP3 和 OPN 表达水平,改善骨代谢,延缓早期软骨下骨骨丢失,防治骨质疏松骨性关节炎。

[关键词] 骨质疏松骨关节炎;基质金属蛋白酶 3;骨桥蛋白;软骨下骨;青娥方

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)10-0001-05

Effect of Qing'e Decoction on the Expression of MMP3 and OPN in Subchondral Bone of Osteoarthritis Model Rats

DAI Yi^{1△} FANG Yanbo² LI Yaliang³ LI Yanjin¹ XU Ping¹ TANG Chongxi¹

¹Orthopaedics Department, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430051, China;

²Laboratory of Pharmacology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430051, China;

³Preventive Medicine Department, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430051, China.

Abstract Objective: To investigate the effect of Qing'e decoction on the expression of MMP3 and OPN in the early subchondral bone of osteoarthritis model rats. **Methods:** 30 rats were randomly divided into A (normal group), B (Qing'e decoction group), C (osteoporosis group), D (osteoporosis osteoarthritis group) and E (osteoarthritis group). The osteoporotic model was made in group B, C and D. One month later the osteoarthritis model was made in group B, D and E. Gavage administration was carried out with Qing'e decoction in group B. The other groups were given the same amount of saline

with once a day for 4 weeks. **Results:** In group of different period, the subchondral bone plate became thickened gradually, and the four layers of chondrocytes were indistinguishable. The subchondral bone plate gradually ruptured into the calcified cartilage layer. The trabecula of subchondral bone was gradually disordered, sparse and broken. In the Qing'e decoction group, the subchondral bone plate was partly broken, and the tide mark was not clear after one week of intervention, and a small amount of hyperplastic vessels were

基金项目:全国中医药创新骨干人才培养项目(国中医人教函 2019-128 号)

湖北省自然科学基金项目(2017CFB485)

武汉市黄鹤英才计划入选人才(武人才办 2017-2 号)

¹ 武汉市中医医院骨伤科(武汉, 430051)

² 武汉市中医医院中药药理学三级实验室

³ 武汉市中医医院治未病科

△通信作者 E-mail: daiyiw@163.com

revealed in the tide mark after two weeks' of intervention. At the 4th week after the intervention, the structure of tidal line was basically complete, the trabecular structure under the subchondral bone plate was irregular, and new proliferative vessels were found in it. There was no significant difference in the volume fraction, the number, the separation degree and the thickness of trabecula (Tb, Th) at 4 weeks after the intervention of traditional Chinese medicine as compared with group A ($P < 0.05$), and significant statistic difference was found between the B and D group ($P > 0.05$). In the tibial condyle, the MMP3 and OPN genes in the normal group were maintained at a relatively stable level, the up-regulated expression of MMP3 and OPN genes in the Qing'e decoction group was maintained at a relatively stable level. As compared with the osteoporosis osteoarthritis group, the MMP3 and OPN in the Qing'e decoction group were significantly different at 2 and 4 weeks after treatment ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qing'e decoction can change the microscopic manifestations of articular cartilage and subchondral bone. It can regulate the indexes of bone trabecula, the expression level of MMP3 and OPN, improve bone metabolism, delay the early loss of subchondral bone and prevent osteoarthritis.

Keywords: osteoporosis osteoarthritis; matrix metalloproteinase 3; osteopontin; subchondral bone; Qing'e decoction

绝经后骨质疏松性膝骨关节炎是严重威胁中老年女性健康的重要疾病,过去认为其病理表现仅仅是关节软骨退变,但是目前发现早期病理基础还包括软骨下骨代谢性骨丢失,而且更加重要^[1]。如何有效抑制破骨细胞骨吸收和增强成骨细胞骨形成,从而抑制软骨下骨骨丢失成为防治的关键环节。国内外研究表明,基质金属蛋白酶3特异性结合骨桥蛋白,形成结合态分子结构,提高靶细胞的动能^[2],促进骨髓干细胞和成骨前体细胞的远处迁移和组织重建^[3-4]。临床发现药物可以通过调节血清MMP3和OPN的表达水平而改善绝经后膝骨关节炎患者的症状^[5-6]。青娥方为《太平惠民和剂局方》中记载的名方,以“肾主骨生髓,肝主筋通络”的理论为指导,具有益肾温阳、强腰护骨作用。临床观察发现^[7-9],本方加减能够明显改善骨代谢指标,改善关节软骨下骨转换状态,防治绝经后骨质疏松骨性关节炎的发生。本研究运用青娥方干预骨质疏松骨性关节炎模型鼠早期软骨下骨代谢,观察其组织结构和MMP3及OPN表达水平变化,探讨两者在骨丢失中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雌性SD大鼠30只,体质量(160 ± 10)g,购于三峡大学实验动物中心,许可证号为SCXK(鄂)2017-0012,实验动物质量合格证号为42010200001057。实验操作完成在武汉市中医医院实验动物中心,许可证号为SYXK(鄂)2016-0056。允许所有接受试验大鼠自由饮水和进食,采用大鼠标准饲料喂养,饲料及垫料由武汉市中医医院实验动物中心提供。

1.2 主要实验用品

1.2.1 主要试剂 TRAP酶染色试剂盒(Sigma Diagnostic,美国);胰蛋白酶(Trypsin from beef pancreas, BDH Chemicals, 美国);四氮唑蓝(MTT)、DNA Marker、碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)、Rnase酶、TNF- α (Sigma公司,美国);Tag酶和dNTP(晶美生

物工程有限公司,中国);RNA酶抑制剂(华美生物制品公司,中国);寡核苷酸引物(上海博亚生物技术公司,中国);Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo公司,美国)。

1.2.2 主要仪器设备 RKI-100B CO₂培养箱(RIKA-KOGYO, 日本);冷冻离心机(SORVAL Centrifuges, Beckmam);微型涡旋振荡器(上海沪西分析仪器厂,中国);水浴箱(Precisison Scientific);PCR仪(ABI PRISM 7000 Sequence Detection System)和SYBR® Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, 美国)。

1.2.3 主要药物 中药青娥方药液参考文献[10]方法,按照《中国药典(2015版)》中青娥方主要药物组成:杜仲480 g,补骨脂240 g,核桃仁150 g和大蒜120 g,加水煎3次,纱布过滤取汁合并在一起,然后加乙醇沉淀1次,滤纸过滤,并回收乙醇至尽,继续加热浓缩成每毫升含1 g生药的药液,1%活性碳脱色3次,精滤,分装,灭菌,密封备用。灌胃使用时,按体表面积折算动物的等效10倍剂量,再用生理盐水配成4 mL/d剂量。均由武汉市中医医院中药药理学三级实验室研制提供。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 抽签法随机分为正常组(A组)、青娥方组(B组)、骨质疏松模型组(C组)、骨质疏松骨关节炎模型组(D组)和骨关节炎模型(E组),每组6只。所有实验大鼠均每周称量体质量,重新计算具体给药剂量,并观察行为活动、毛发、进食情况等。

1.3.2 实验动物模型制备 第一步,将C组、D组和E组动物按照骨质疏松模型制备方法^[11]操作,其余各组动物仅行背部切口并缝合伤口,术后处理相同。

第二步,骨质疏松模型制作1个月后,将B组和D组以及E组动物按照骨关节炎制备方法^[12]操作,其余各组仅行膝关节切口打开关节腔并缝合伤口,术后处理相同。

第三步,骨关节炎造模术后第2天,B组动物灌服配置好的青娥方药液。其余各组灌服等量的生理盐

水。每天 1 次,连续 4 周。

1.3.3 标本采集及处理 在灌服药液或生理盐水周期全部完成后第 1 周、第 2 周和第 4 周,分别选取各组 2 只大鼠,用 100 g/L 的水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉动物,将左侧后肢股骨髁和胫骨髁取下后采用腹主动脉彻底抽血处死全部大鼠。

1.3.4 膝关节标本光镜观察并评分 标本 HE 染色显微镜下观察形态。同时选取左胫骨近端干髓端的 1~3 mm 区域的松质骨组织行定量分析测定骨小梁体积分数(Bone Volume Fraction,BV/TV)、骨小梁厚度(Trabecular Thickness,Tb. Th)、骨小梁数量(Trabecular Number,Tb. N)和骨小梁分离度(Trabecular Separation,Tb. Sp)。

1.3.5 软骨下骨组织中 MMP3 和 OPN 的 mRNA 表达的测定

1.3.5.1 引物设计及合成 引物由 Gene bank 数据库中获 得基因序列,采用 Primer Expression 5.0 软件进行计算机辅助设计,由 Invitrogen 公司合成,引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物	
基因	引物序列
MMP3	正向 5' ATGCAGGAGGAGAGGGTGGG 3'
	逆转 5' CAACCTCCCAGGCACAAGGG 3'
OPN	正向 5' GAGGCTATCAAGGTCATCCCAG 3'
	逆转 5' TGTGAAACTCGTGGCTCTGTATG 3'
GAPDH	正向 5' GCGGGGCTCTCCAGAACATC 3'
	逆转 5' ACTGACACGTTGGCAGTGGG 3'

1.3.5.2 骨组织总 RNA 提取以及 MMP3 和 OPN 的 RNA 测定 将胫骨髁(约 150 mg)周围软组织剔除,然后置于盛有液氮的研钵内,快速研成粉末状;迅速将粉末移入玻璃匀浆器,加入 Trizol(100 mg 组织+2 mL 以上 Trizol),冷冻匀浆,按照标准流程处理,样品分装 3 管,立即进行相关检测和逆转录或者-80 ℃ 保存备用,避免 RNA 降解。接着进行反转录 DNA 提取,扩增 RNA,测定相关表达数值。

1.4 统计学方法

所有资料用 SPSS13.0 软件包进行统计分析,结果用表示。对数据进行单因素方差分析、协方差分析。对不符合正态分布的数据在分析前先进行自然对数转换,但在结果中仍然以原型表示。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 关节软骨和软骨下骨切片光镜观察

A 组:细胞排列规则有序,干预后第 1 周和第 4 周标本均可见软骨表面光滑,四层结构清晰可辨,潮标线完整。钙化软骨区与软骨下骨板的粘合线完整,软骨下骨板下方的骨小梁排列规则,见图 1。

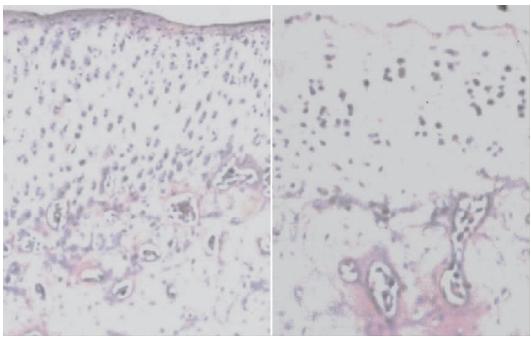


图 1 A 组光镜图片(150×),从左至右依次为生理盐水干预后第 1 周和第 4 周

B 组:干预后第 1 周软骨表面裂隙明显,出现软骨细胞簇集,软骨下骨板部分碎裂,潮标线不清晰。干预后第 4 周,软骨表面有表浅裂隙,软骨细胞排列接近柱状,可观察到潮线结构基本完整,软骨下骨板下方的骨小梁结构欠规则,内可见增生的血管,见图 2。

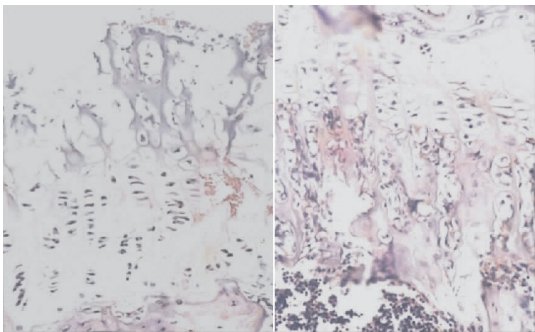


图 2 B 组光镜图片(150×),从左至右依次为药液干预后第 1 周和第 4 周

C 组:干预后第 1 周和第 4 周软骨剥落逐步加重,形成缺损区,深层逐渐出现簇积现象,四层结构不易分辨。干预后第 4 周可观察到软骨下骨板全层断裂,纵向位置达钙化软骨层。同时可观察到潮线结构模糊、不完整,钙化层与软骨下骨板有分离现象,软骨下骨板下方的骨小梁结构紊乱,见图 3。

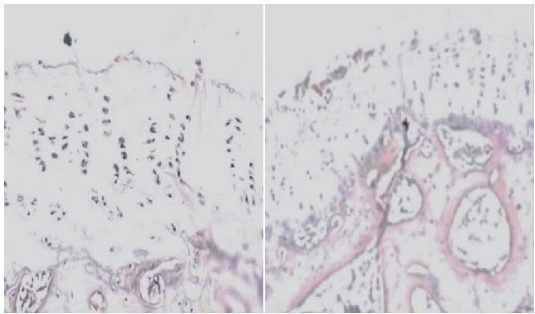


图 3 C 组光镜图片(150×),从左至右依次为生理盐水干预后第 1 周和第 4 周

D 组:干预后第 1 周和第 4 周均可见软骨剥落,形成缺损区,空隙窝数目增多,软骨细胞消失,深层出现软骨细胞簇积现象,软骨下骨板逐渐增厚,软骨细胞四层结构不易分辨,可见双重潮线。钙化软骨层与软骨下骨板逐渐出现分层,软骨下骨板的完整性消失,或软

骨下骨板逐渐断裂至钙化软骨层内。软骨下骨骨小梁逐步紊乱、稀疏、断裂,见图4。

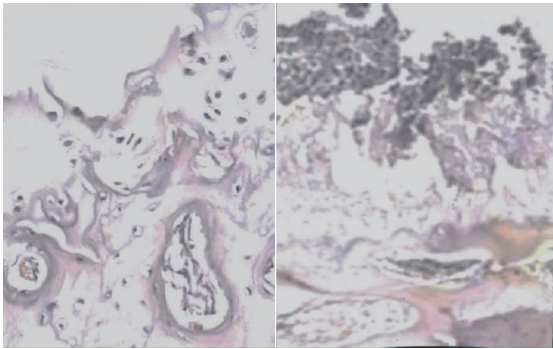


图4 D组光镜图片(150×),从左至右依次为生理盐水干预后第1周和第4周

E组:软骨表面各周均欠平整,出现裂隙,深入到辐射层,软骨囊性变,局部剥脱,最终整个软骨细胞排列紊乱,四层结构不易分辨,出现潮线不完整,局部软骨下骨板逐渐出现裂痕,见图5。

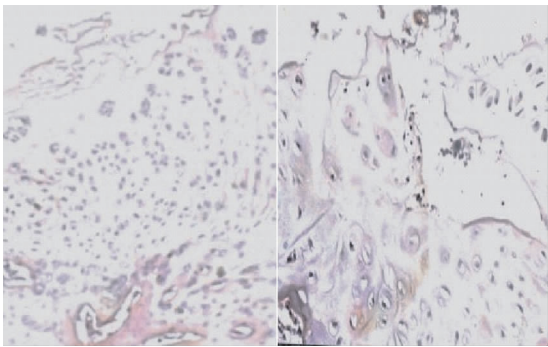


图5 E组光镜图片(150×),从左至右依次为生理盐水干预后第1周和第4周

2.2 软骨下骨骨组织定量评分

药液或生理盐水灌服期完成(干预)后第4周时各组软骨下骨骨小梁体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁分离度(Tb. Sp)、骨小梁厚度(Tb. Th)比较,发现B组与A组差异无统计学意义($P>0.05$),与D组差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 骨组织定量评分结果(±s)

组别	(BV/TV)/%	Tb. N/mm ⁻¹	Tb. Sp/μm	Tb. Th/μm
A组	50.18±6.31	6.21±0.49	80.42±10.46	96.21±13.12
B组	46.27±5.37 ¹⁾²⁾	5.41±0.26 ¹⁾²⁾	83.08±10.27 ¹⁾²⁾	95.36±14.21 ¹⁾²⁾
C组	30.13±3.42	3.49±0.29	143.91±20.53	75.21±11.32
D组	28.22±3.61	2.93±0.47	147.64±20.21	74.32±10.09
E组	33.67±4.28	4.44±0.36	95.33±10.56	79.71±15.02

注:1)B组与A组四个指标比较,t值从左至右依次为6.32,10.57,5.42,4.21,P值从左至右依次为0.975,0.724,0.991,0.998。
2)B组与D组BV/TV,Tb. N,Tb. Sp和Tb. Th指标比较,t值从左至右依次为43.79,51.74,54.22,35.05,P值从左至右依次为0.040 1,0.039 5,0.038 9,0.048 5。

2.3 软骨下骨定量分析

通过RT-qPCR法检测胫骨组织中基因OPN,MMP3的表达,GAPDH设为内参,将正常组第1周的OPN,MMP3表达设定为1,对B组、C组、D组及E组的目的基因相对表达量进行分析,实验结果均用 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。

ΔCt =目的基因平均Ct值-管家基因平均Ct值;
 $\Delta\Delta Ct$ =实验组 ΔCt -对照组 ΔCt ;相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

2.3.1 软骨下骨 OPN 基因表达结果 正常组 OPN 基因维持在相对稳定的水平;B 组 OPN 基因上调表达维持在相对稳定的水平;C 组随着时间由第 1 周推移至第 2 周,OPN 基因上调表达维持在相对稳定的水平,第 4 周 OPN 基因显著上调;D 组三个时间点 OPN 基因均显著上调表达,并在第 2 周到达最高点,维持至第 4 周;E 组三个时间点 OPN 基因均显著上调表达,并在第 2 周到达最高点,维持至第 4 周。C 组、D 组和 E 组 OPN 表达水平明显高于同时间点 B 组。与 D 组相比,B 组 OPN 在治疗后第 2 周和第 4 周差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.3.2 软骨下骨 MMP3 基因表达结果 A 组 MMP3 基因均维持在相对稳定的水平;B 组 MMP3 基

表3 各组软骨下骨骨组织 OPN mRNA(2^{-ΔΔCt})结果(±s)

组别	第1周	第2周	第4周
A组	1.00±0.00	1.31±0.19	1.32±0.06
B组	2.37±0.27	2.21±0.16 ¹⁾	1.98±0.29 ¹⁾
C组	2.43±0.45	2.49±0.16	3.90±0.23
D组	3.22±0.10	5.93±0.40	5.64±0.11
E组	2.67±0.21	3.44±0.32	3.33±0.36

注:1)与D组相比,B组在治疗后第2周和第4周的t值分别为79.64和87.21,P值分别为0.031 2和0.027 4。

因在第1周至第2周呈弱上调表达并维持在相对稳定的水平,推移至第4周又有明显下降;C组MMP3基因上调表达维持在相对稳定的水平;D组MMP3基因上调表达,并呈逐渐上升趋势;E组随着时间由第1周推移至第2周,MMP3基因上调表达维持在相对稳定的水平,第4周MMP3基因显著上调。C组、D组和E组MMP3表达水平明显高于同时间点B组。与D组相比,B组MMP3在治疗后第2周和第4周差异有统计学意义($P<0.05$),见表4。

3 讨论

近年来研究表明,动物Hulth结合去卵巢完全可以建立骨关节炎合并骨质疏松的体内模型,并模拟绝经后骨关节炎发生、发展的病理过程,同时软骨损伤程度也

表 4 各骨组织 MMP3 mRNA(2^{-△△Ct})结果(±s)

组别	1 周	2 周	4 周
A 组	1.00±0.00	1.12±0.02	1.22±0.08
B 组	1.92±0.02	1.77±0.25 ¹⁾	1.16±0.12 ¹⁾
C 组	2.23±0.12	2.08±0.32	2.55±0.33
D 组	2.13±0.27	3.34±0.23	6.93±0.24
E 组	1.96±0.22	1.81±0.12	3.55±0.13

注:1)与 D 组相比,B 组在治疗后第 2 周和第 4 周的 *t* 值分别为 41.25 和 74.26,*P* 值分别为 0.042 7 和 0.030 1。

比单纯的骨关节炎与骨质疏松症动物模型严重^[13-15],本研究因而采用这种模型。本实验中骨质疏松-骨关节炎组软骨细胞数目减少,基质染色不均匀,软骨表层破坏或缺失,裂隙增宽,表明软骨严重受损;同时软骨下骨组织中 BV/TV 和 Tb.N 值较正常组明显降低,而 Tb.Sp 值显著增高,提示骨组织疏松造模成功。

关节软骨下骨是一种特殊的结缔组织,MMP3 在骨重建过程中通过降解骨基质启动骨吸收与骨形成,当成骨细胞受到促骨吸收因子的刺激时,分泌 MMP3,降解成骨细胞下的 I 型胶原,从而激活破骨细胞,启动骨吸收^[16]。本实验中骨质疏松骨关节炎组软骨下骨 MMP3 表达在各个时期均处于高水平,明显不同于其他组。骨桥蛋白(OPN)对于破骨细胞(OC)的生理功能非常重要,它可促进 OC 与骨基质的黏附,诱导 OC 的破骨过程,可能是骨质疏松症发病机制中的重要环节^[2],本实验中 OPN 在骨质疏松组和骨质疏松骨关节炎组处于高表达水平,与软骨下骨组织测定各项指标表达处于同步水平,表明在骨质疏松骨关节炎模型中 OPN 处于重要环节。研究表明基质金属蛋白酶家族(MMP3 是其成员)与小整合素结合配体 N 端联接糖蛋白家族(OPN 是其成员)具有高度的亲和力,前者特异性的结合和激活后者,形成复合体,在骨组织矿化中发挥重要作用^[17],同时改变骨基质,激活破骨细胞,启动骨吸收,继而推动成骨细胞移行成活,促进骨形成,导致骨转换率迅速升高^[18]。本研究同时发现骨质疏松骨关节炎组伴随着 MMP3 和 OPN 表达水平的不断提高,表明关节软骨下骨破坏日益加重通过 MMP3-OPN 途径来实现。国外研究表明 OPN 能够被异源信号激活的机制涉及细胞内蛋白激酶或磷酸化酶的影响,从而激活信号网络,MMP3 就是其中一种,这也符合笔者研究的发现。

现代医学研究发现,青娥方中的补骨脂有抑制破骨细胞增殖分化的作用,杜仲有促性激素的作用,同时中医“肾主骨”物质基础包括肾脏羟化酶系统对骨的形成作用,骨对钙磷代谢的调节作用,垂体、甲状腺、甲状旁腺及性腺对骨形成的影响。本方既抑制骨吸收,也促进骨形成,达到“标本兼治”。它是对机体整体状态进行调整的过程,可以作用于不同靶点,使机体多环节

失衡的因素得以纠正,从而发挥抗骨质疏松的作用^[19-20]。笔者前期发现,本方加减(益肾护骨方)能够明显降低血清 MMP3 的水平,改善骨代谢指标的水平,从而恢复成骨细胞的活性,抑制破骨细胞的功能,改善关节软骨下骨转换状态,着重于整体调节,调动内因;疗效好,不但能使骨修复,而且还能提高骨量及骨的生物力学性能,缓解或消除症状;防治绝经后骨质疏松骨性关节炎的发生。本研究中青娥方组关节软骨病理切片观察和评分以及软骨下骨微观结构和骨小梁四项评分,明显不同于骨质疏松骨关节炎组,接近于正常组。因此,青娥方可以改善关节软骨下骨代谢的水平,防止骨丢失,促进关节软骨修复。

总之,本实验中去卵巢骨质疏松骨关节炎软骨下骨组织中 MMP3 和 OPN 的基因表达均明显提高,因此,MMP3 和 OPN 的表达增加可能与关节软骨下骨丢失过程中偶联失衡的发生有关。而青娥方可以抑制去卵巢后骨质疏松骨关节炎软骨下骨组织 MMP3 和 OPN 的基因表达,防止骨丢失,但其机理尚不清楚,需要进一步进行体外研究。

参考文献

[1] NELSON A E. Osteoarthritis year in review 2017:clinical[J]. Osteoarthritis Cartilage,2018,26(3):319-325.

[2] TARQUINI C,MATTERA R,MASTRANGELI F,et al. Comparison of tissue transglutaminase 2 and bone biological markers osteocalcin,osteopontin and sclerostin expression in human osteoporosis and osteoarthritis[J]. Amino Acids,2017,49(3):683-693.

[3] WEI Q,HUANG L,TAN X,et al. Serum osteopontin levels in relation to bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women[J]. Scand J Clin Lab Invest,2016,76(3):33-39.

[4] MARKUS J,JENS H. Diagnostic and prognostic use of bone turnover markers[J]. Prevention of Bone Metastases,2012,192(3):197-223.

[5] 戴焱,杨欢. 金天格胶囊对绝经后膝骨关节炎 OPN 和 MMP3 表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,20(12):1464-1467.

[6] 戴焱,杨欢,张汉庆,等. 盐酸氨基葡萄糖联合降钙素对绝经后膝骨关节炎基质金属蛋白酶 3 和骨桥蛋白表达的影响[J]. 华西医学,2012,27(12):1772-1775.

[7] 戴焱,范彦博,甘宁. 青娥丸含药血清对体外诱导成骨细胞 MMP3/OPN 通路蛋白水平以及骨重建的作用[J]. 中成药,2016,38(7):1621-1625.

[8] 戴焱,刘军,范彦博,等. 青娥丸对去势鼠成骨细胞增殖以及 MMP3-OPN-MAPK 通路蛋白表达的影响[J]. 时珍国医国药,2016,27(4):836-838.

绝经后女性骨质疏松或骨质疏松骨折的可供参考的治疗用药。

参考文献

- [1] 罗令,孙晓峰,皮丕喆,等.近 10 年来我国中老年人骨质疏松症患病率的荟萃分析[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(11):1415-1420.
- [2] 孙亚奇,卞艳芳,周春娜,等.中药治疗骨质疏松症研究进展[J].中国临床医学,2018,25(2):307-313.
- [3] 汪学红,姜婷,夏家红,等.密骨方对去势大鼠骨质疏松后骨折愈合的影响[J].中华实验外科杂志,2010,27(9):1328-1330.
- [4] 周丹丹,张梓瑞,李强,等.密骨方对去卵巢大鼠骨折免疫炎症因子的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2017,25(6):6-9.
- [5] 黄晋,李建国,谢兴文,等.中药复方治疗绝经后骨质疏松症的临床研究概况[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(2):277-280.
- [6] 张禄锴,马剑雄,匡明杰,等.淫羊藿治疗骨质疏松的研究进展[J].中国中西医结合急救杂志,2017,24(4):445-448.
- [7] 罗伟,王亚芹,冯晗,等.杜仲抗骨质疏松及其机制研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2016,21(12):1434-1440.
- [8] ZHANG W,XUE K,GAO Y,et al. Systems pharmacology dissection of action mechanisms of Dipsaci Radix for osteoporosis[J]. Life Sciences,2019,235:116820.
- [9] 赵根华,翁泽斌,高倩倩,等.自然铜炮制前后促进骨折愈合作用及机制研究[J].中药新药与临床药理,2015,26

(4):481-485.

- [10] 徐德娟.中药黄芪的药理作用及临床应用效果临床价值体会[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(69):189.
- [11] CHEN Y,MIAO Y,HUANG L,et al. Antioxidant activities of saponins extracted from Radix Trichosanthis;an in vivo and in vitro evaluation[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine,2014,14(1):86.
- [12] 郎小琴,高越,周叶,等.牛膝多糖对老年骨质疏松大鼠模型骨代谢及生物力学特征的影响[J].中华全科医学,2019,17(4):547-550.
- [13] OHLSSON C. Novel osteoporosis targets [J]. Nature Reviews Endocrinology,2013,9(2):72-74.
- [14] FUKUDA T,TAKEDA S,XU R,et al. Sema 3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations[J]. Nature,2013,497(7450):490-493.
- [15] YANG K,MIRON R J,BIAN Z,et al. A bone-targeting drug-delivery system based on Semaphorin 3A gene therapy ameliorates bone loss in osteoporotic ovariectomized mice[J]. Bone,2018,114:40-49.
- [16] LI Y,YANG L,HE S,et al. The effect of Semaphorin 3A on fracture healing in osteoporotic rats [J]. Journal of Orthopaedic Science,2015,20(6):1114-1121.
- [17] 张峻,张里程,唐佩福.骨改建中潜在的作用靶点-信号素 Sema 3A 的研究进展[J].解放军医学院学报,2016,37(10):1100-1102.

(收稿日期:2020-03-22)

(上接第 5 页)

- [9] 付俊,戴焱.淫羊藿苷对骨桥蛋白体外调控成骨细胞增殖作用研究[J].华南国防医学杂志,2019,33(9):587-589.
- [10] 帅波,杨功旭,沈霖,等.加味青娥丸对激素性股骨头坏死小鼠局部 1,25(OH)₂D₃/VDR mRNA/RAS 信号转导通路的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2017,25(7):1-5.
- [11] 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.
- [12] 金剑飞,何维英,周钰龙.淫羊藿总黄酮对膝关节骨性关节炎大鼠核因子-κB 通路的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2020,28(3):5-9.
- [13] TERCENIO M C,FERRANDIZ M L,CARCELLER M C,et al. Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2016,79(2):120-128.
- [14] 钟培瑞,廖瑛,廖源,等.去卵巢对大鼠膝关节软骨及软骨下骨的影响[J].风湿病与关节炎,2017,6(11):5-10.
- [15] ZHOU J,ZHONG P R,LIAO Y,et al. Electroacupuncture

ameliorates subchondral bone deterioration and inhibits cartilage degeneration in ovariectomised rats[J]. Acupunct Med,2018,36(1):37-43.

- [16] LONG F. Energy metabolism and bone[J]. Bone,2018,115(10):1.
- [17] LICINI C,VITALE-BROVARONE C,MATTIOLI-BEL-MONTE M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2019,49(10):59-69.
- [18] ZHANG B,DAI J,WANG H,et al. Anti-osteopontin monoclonal antibody prevents ovariectomy-induced osteoporosis in mice by promotion of osteoclast apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun,2014,452(3):795-800.
- [19] 王金蕴,林燕萍.青娥丸治疗绝经后骨质疏松症的研究进展[J].中国中医骨伤科杂志,2013,21(10):70-72.
- [20] 马陈,沈霖,杨艳萍,等.青娥丸对绝经后骨质疏松症患者血清癌胚抗原相关细胞黏附分子 1,β-链蛋白水平及骨密度的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2017,25(2):15-18.

(收稿日期:2020-04-15)