

益骨汤对去卵巢骨质疏松大鼠核因子 κ B 受体活化因子配体信号通路的影响

闫坤¹ 陈华² 张瑞坤¹ 王佳鑫¹ 安忠诚² 姚新苗^{1,3△}

[摘要] 目的:观察益骨汤对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织中核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)信号通路的影响,分析益骨汤治疗骨质疏松症的作用机制。方法:取 12 周龄 SD 雌性大鼠 50 只,随机分为正常组、假手术组、模型组、雌激素组和益骨汤组,治疗 1 次/d(12 周后给药),持续 12 周。以双能 X 线骨密度仪测定大鼠股骨骨密度,经 micro-CT 扫描测定骨组织形态参数,免疫组化法和 Western Blot 法检测 OPG、RANK 和 TRAF-6 蛋白表达量,qPCR 法检测相应基因的表达量。结果:与假手术组比较,模型组大鼠的骨密度明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,雌激素组和益骨汤组骨密度均有所升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,益骨汤组和雌激素组大鼠 BV/TV 升高,差异有统计学意义($P<0.05$);Po(tot)下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。与雌激素组比较,益骨汤组 TB.Sp 降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。免疫组化结果:与模型组比较,正常组、假手术组、雌激素组和益骨汤组 OPG 蛋白的积分光密度(IOD)值均升高($P<0.01$),TRAF-6 蛋白的 IOD 值降低,差异有统计学意义($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$)。Western Blot 结果:与模型组比较,雌激素组和益骨汤组 OPG 蛋白的表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);RANK、TRAF-6 蛋白的表达均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。qPCR 结果:与模型组比较,雌激素组和益骨汤组 OPG 基因的表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$);RANK、TRAF-6 基因的表达降低,差异有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$)。结论:益骨汤可提高骨密度和骨微结构,其机制可能与调控 RANKL 通路干预破骨细胞分化相关。

[关键词] 骨质疏松;益骨汤;破骨细胞;核因子 κ B 受体活化因子配体;骨保护素;肿瘤坏死因子受体相关因子 6

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)09-0001-06

Efficacy of Yigu Decoction on the Signal Pathway of Nuclear Factor κ B Receptor Activator Ligand in Ovariectomized Osteoporosis Rats

YAN Kun¹ CHEN Hua² ZHANG Ruikun¹ WANG Jiaxin¹ AN Zhongcheng² YAO Xinmiao^{1,3△}

¹The Third Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

²The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China;

³The Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China.

Abstract Objective: To observe the efficacy of Yigu decoction (YGD) on the signal pathway of nuclear factor κ B receptor activator ligand (RANKL) in bone tissue of ovariectomized osteoporosis rats, and analyze the mechanism of Yigu decoction

in treating osteoporosis. **Methods:** Fifty 12-week-old SD female rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, estrogen group and YGD group. Each group was treated once a day for 12 weeks. Bone mineral density of femur in rats was measured by dual-energy X-ray bone densitometer. The morphological parameters of bone tissue were measured by micro-CT scanning. Immunohistochemistry and Western Blot were used to detect the expression of OPG, RANK and TRAF-6 protein. The expression of corresponding genes was detected by qPCR method.

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY17H270005)

全国名老中医药专家传承工作室建设项目

(国中医药人教发[2014]20 号)

浙江省国医名师建设项目(浙卫发[2018]70 号)

¹ 浙江中医药大学第三临床医学院(杭州,310053)

² 浙江中医药大学附属第二医院

³ 浙江中医药大学附属第三医院

△通信作者 E-mail:yxmtcm@aliyun.com

Results: Compared with sham operation group, the bone mineral density (BMD) of model group rats was significantly lower ($P < 0.01$). Compared with the model group, the BMD in estrogen group and YGD group was higher ($P < 0.01$). Compared with the model group, BV/TV was higher ($P < 0.05$) and Po (tot) was lower ($P < 0.05$). Compared with estrogen group, TB. Sp in YGD group was lower ($P < 0.05$). Immunohistochemical results showed that compared with the model group, the integrated optical density (IOD) value of OPG protein in normal group, sham operation group, estrogen group and YGD group was higher ($P < 0.01$), while the IOD value of TRAF-6 protein was lower ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$). Western Blot results showed that compared with the model group, the expression of OPG protein in estrogen group and YGD group was higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression of RANK and TRAF-6 protein was lower ($P < 0.05$). qPCR results showed that compared with the model group, the expression of OPG gene in estrogen group and YGD group was higher ($P < 0.05$), and the expression of RANK and TRAF-6 gene was lower ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Yigu decoction can improve bone density and bone microstructure parameters, and its mechanism may be related to inhibition of RANKL signaling pathway.

Keywords: osteoporosis; Yigu decoction; osteoclast; receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; osteoprotegerin; TNF receptor associated factor 6

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是成骨细胞-破骨细胞平衡被打破所引起的全身退行性骨代谢疾病,其病理特征是骨量降低、骨骼脆化和微结构退化^[1-2]。最新研究表明,RANKL通路在调节破骨细胞的分化中具有重要作用,许多细胞因子和激素通过调节骨髓微环境中的OPG/RANKL比率来影响骨代谢^[3]。益骨汤是姚新苗教授根据补肾活血法创制的骨质疏松症验方,研究发现益骨汤能促进成骨细胞的增殖分化,提高骨强度及生物力学性能,从而达到治疗骨质疏松症的目的^[4-5]。故本研究通过建立去势大鼠模型探究益骨汤对骨质疏松症大鼠骨组织中RANKL信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

12周龄SPF级雌性SD大鼠50只,体重为180~200 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,在浙江中医药大学实验动物中心饲养(实验动物使用许可证号为SYXK(浙)2018-0012),饲养期间环境温度为20~22℃,12 h光暗循环,自由饮水,给予标准颗粒饲料。

1.2 主要药物

益骨汤水提液由浙江中医药大学中药标准化研究实验室完成,方由补骨脂10 g、骨碎补15 g、生地15 g、仙灵脾15 g、山药15 g、丹参30 g组成,含生药2.0 g/mL。

红丽来结合雌激素片(国药准字H20090172),水溶液浓度为6.25 μ g/mL。

1.3 主要试剂和仪器

Trizol试剂盒(Ambion, 15596026)、逆转录试剂盒(日本TaKaRa, RR047A)、特超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天, P0018AS)、抗OPG抗体(Abcam, ab203061)、抗RANK抗体(Novus Biologicals, NB100-56508)、抗TRAF-6抗体(Abcam, ab33915)、抗 β -actin抗体(Abcam, ab20272)、山羊抗兔抗体(Abcam, 货号为ab97200)、实时荧光定量PCR

(qRT-PCR)仪、DPX-L型双能X线骨密度仪、电泳凝胶成像分体系统。

1.4 实验分组和骨质疏松模型的建立

将大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、雌激素组和益骨汤组,每组10只。正常组大鼠不作任何处理,其余各组大鼠在腹腔注射10%戊巴比妥钠(3.3 mL/kg)麻醉条件下,选择背侧切口,假手术组找到双侧卵巢后即结束手术,逐层缝合;模型组、雌激素组和益骨汤组大鼠均手术去除双侧卵巢,术后3 d腹腔注射青霉素预防感染。

1.5 干预方法

造模术后的大鼠从第13周起开始每天给药,模型组以双蒸水灌胃,雌激素组以浓度为9.4 μ g/mL的红丽来水溶液灌胃,益骨汤组以益骨汤水提液灌胃,各组剂量均为10 mL/kg,1次/d。药物干预3个月后处死大鼠,取双侧股骨,-80℃冰箱保存。

1.6 指标检测

1.6.1 骨密度测定 DPX-L型双能X线骨密度仪测定各组大鼠股骨上端干骺端骨密度(BMD)。

1.6.2 骨显微结构测定 取各组大鼠股骨进行定量micro-CT分析骨显微结构改变,使用10 μ mol/L分辨率的micro-CT扫描仪(VivaCT40, Scanco Medical AG, Bsaaersdorf, 瑞士)。胫骨以高分辨率扫描,层厚为10 μ m。3D形态计量参数包括骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁密度(Tb.Th)、骨小梁间距(Tb.Sp)、孔隙总体积Po.V(tot)和孔隙率Po(tot)等。

1.6.3 免疫组化法检测蛋白OPG、RANK、TRAF-6的表达 切片机制备4 μ m厚的石蜡切片,60℃烘箱中烤片2.5 h,脱蜡20 min,三个5 min梯度无水乙醇水化,PBS冲洗片5 min \times 3次,室温封闭30 min,一抗4℃孵育过夜。复温45 min,二抗室温避光孵育2 h,DAB显色,晾干,封片。显微镜下观察,随机选取3个

视野,图像分析后测定积分光密度(Integral Optical Density,IOD),以 IOD 值代表蛋白表达量。

1.6.4 Western Blot 法检测蛋白 OPG、RANK、TRAF-6 含量 各组大鼠的右股骨标本经液氮研磨后加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液,BCA 蛋白质测定方法测蛋白浓度。制备电泳凝胶,SDS-PAGE 电泳(80 V 0.5 h,150 V 1.0 h),半干转印 20 min,室温封闭 1 h,一抗 4 ℃ 孵育过夜,二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,ECL 曝光,Image J 软件统计出各条带的灰度值,计算目的蛋白灰度值与 β -actin 灰度值的比值。

1.6.5 qPCR 法检测 OPG、RANK、TRAF-6 mRNA 的基因表达 取 -80℃ 冻存的股骨 0.1 g,按 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取股骨的总 RNA。运用 qPCR 和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 OPG、RANK、TRAF-6 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

基因	序列	产物长度 /bp
OPG	F GCAGCAGAGAAGCACCTAGCAC	84
	R CACAGCACAGCCACTTGTTTCATTG	
RANK	F CAAGGGACGACGGAATCAGATGTG	109
	R TGAAGAGGAGCAGGACGATGAGAC	
TRAF-6	F CGAGGACAAAGTTGCCGAGATGG	127
	R TCCAGGGCTATGAATGACCACAGG	
β -actin	F CAGGAGTCGTCTGAGTTGGA	111
	R CAAGAGATTTGGCTGGAACA	

1.7 统计学方法

采用 SPSS26.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,多组比较采用单因素方差分析,用

GraphPad Prism 7 生成数据统计柱状图, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠骨密度比较

与正常组、假手术组比较,模型组大鼠骨密度明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$),表明骨质疏松模型建立成功。与模型组比较,雌激素组和益骨汤组骨密度均有所升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。雌激素组和益骨汤组骨密度比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明服用益骨汤和补充雌激素均可以不同程度地提高骨质疏松大鼠的骨密度(见表 2)。

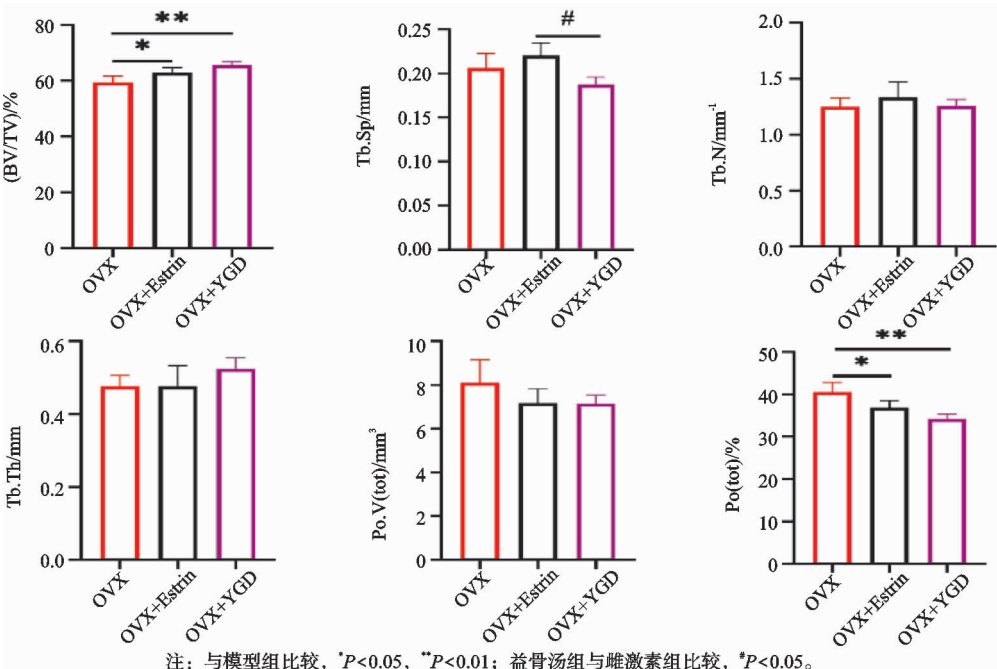
表 2 各组大鼠骨密度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数/只	股骨 BMD/(g·cm ⁻³)
正常组	10	0.237±0.008
假手术组	10	0.224±0.012
模型组	10	0.159±0.007 ¹⁾²⁾
益骨汤组	10	0.204±0.007 ³⁾⁴⁾
雌激素组	10	0.203±0.008 ³⁾⁴⁾

注:与正常组、假手术组比较,1) $P<0.05$,2) $P<0.01$;与模型组比较,3) $P<0.05$,4) $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠股骨骨微结构测定比较

骨组织形态计量学方面,与模型组(OVX)比较,益骨汤组(OVX+YGD)和雌激素组(OVX+Estrin)大鼠 BV/TV 升高,差异有统计学意义($P<0.05$);Po(tot)下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。与雌激素组比较,益骨汤组 Tb.Sp 差异有统计学意义($P<0.05$),表明益骨汤和雌激素均能改变骨微结构,且益骨汤在 Tb.Sp 等骨小梁的变化指标方面有治疗优势(见图 1)。



注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;益骨汤组与雌激素组比较,* $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠骨组织形态指标变化的比较

2.3 免疫组化法检测通路相关蛋白的定性表达

与模型组(OVX)比较,正常组(Normal)、假手术组(Sham)、雌激素组(OVX + Estrin)和益骨汤组(OVX+YGD) OPG 蛋白的 IOD 值升高,差异有统计
学意义($P<0.01$),TRAF-6 蛋白的 IOD 值降低,差异

有统计学意义($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$)。四组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),表明益骨汤组和雌激素组均能改变骨组织 OPG、TRAF-6
蛋白的表达(见图 2)。

2.4 Western Blot 检测通路相关蛋白的定量表达

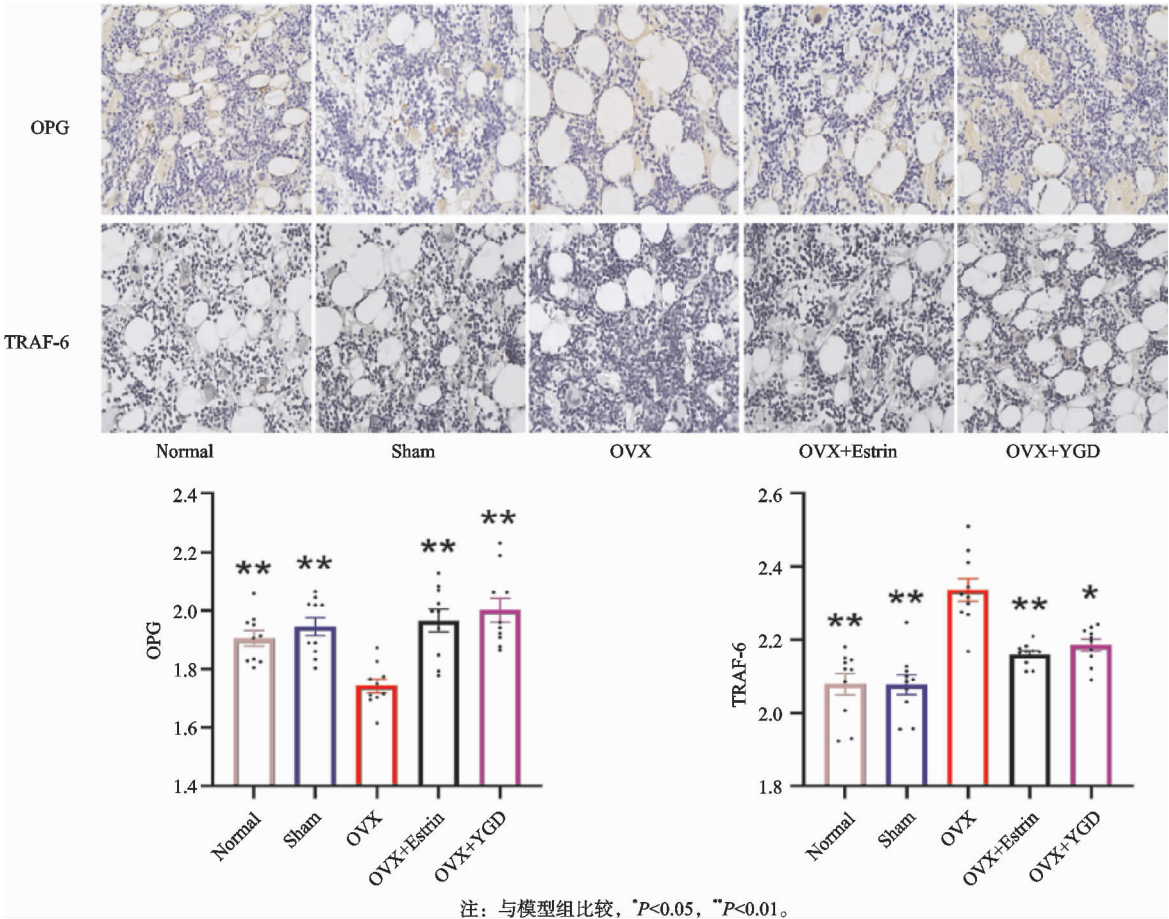


图 2 各组大鼠股骨骨组织中 OPG、TRAF-6 蛋白的定性表达比较

与假手术组比较,模型组 OPG 蛋白的表达降低, RANK、TRAF-6 蛋白的表达升高,差异有统计
学意义($P<0.01$, $P<0.05$)。与模型组比较,雌激素组和益骨汤组 OPG 蛋白的表达升高,差异有统计
学意义($P<0.05$, $P<0.01$);RANK、TRAF-6 蛋白的表达降低,差异有统计
学意义($P<0.05$);四组间比较差异无

统计学意义($P>0.05$),表明益骨汤组和雌激素组均
能改变骨组织 OPG、RANK、TRAF-6 蛋白的表达(见
表 3 及图 3)。

2.5 qPCR 法检测各组股骨组织蛋白基因的相对表
达量

与模型组比较,雌激素组和益骨汤组 OPG 基因

表 3 各组股骨组织 OPG、RANK、TRAF-6 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	OPG	RANK	TRAF-6
正常组	10	1.36±0.28	0.59±0.25 ²⁾	0.81±0.43 ¹⁾
假手术组	10	1.35±0.56	0.58±0.30 ²⁾	0.78±0.33 ¹⁾
模型组	10	0.59±0.28	1.40±0.27	1.38±0.46
益骨汤组	10	1.88±0.76 ²⁾	0.67±0.05 ²⁾	0.58±0.11 ²⁾
雌激素组	10	0.56±0.27 ²⁾	0.71±0.16 ²⁾	0.55±0.22 ²⁾

注:与模型组比较,1) $P<0.05$,2) $P<0.01$ 。

的表达均升高($P<0.05$),RANK、TRAF-6 基因的表
达降低($P<0.01$, $P<0.05$),三组间比较差异无统计
学意义($P>0.05$),见表 4。

3 讨论

骨质疏松症作为一种老年人中多见的疾病,与之
相关的特征性病理变化时常被忽视,直至发生骨折或

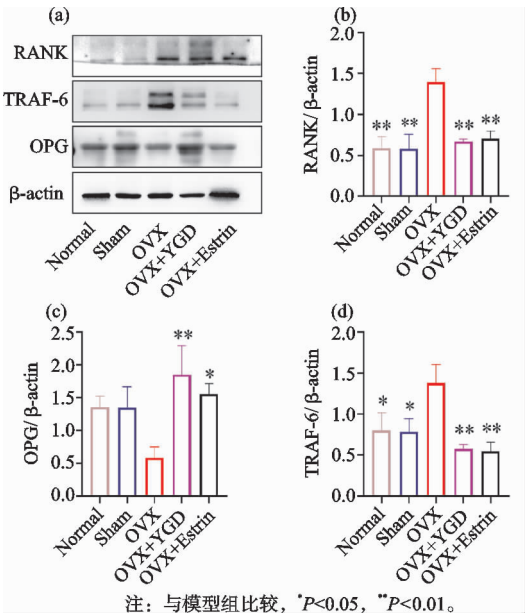


图 3 各组股骨组织 OPG、RANK、TRAF-6 蛋白表达

表 4 各组股骨组织 OPG、RANK、TRAF-6 mRNA 相对表达量比较(±s)

组别	鼠数/只	OPG	RANK	TRAF-6
假手术组	10	0.94±0.27	0.25±0.28 ¹⁾	0.75±0.38
模型组	10	0.59±0.25	1.06±0.76	1.08±0.45
益骨汤组	10	1.40±0.60 ¹⁾	0.08±0.09 ¹⁾	0.46±0.18 ²⁾
雌激素组	10	1.57±0.57 ¹⁾	0.08±0.07 ¹⁾	0.45±0.21 ²⁾

注：与模型组比较，1) $P<0.01$ ，2) $P<0.05$ 。

了破骨细胞的活性^[11]；仙灵脾可以显著增加 OPG 蛋白的表达，提高生物力学强度和骨质量^[12]；可见益骨汤可改善骨质疏松症状，其作用机制仍需进一步探索完善。

3.1 益骨汤可改善骨质疏松症模型大鼠骨密度,调节骨代谢水平

卵巢摘除模型是使用有效可靠且用于研究最多的骨质疏松症动物模型，也是美国食品药品监督管理局和欧盟药品局审批通过的新药临床前药效评价模型^[13]，骨密度是临床检测骨质疏松变化的重要指标。在本研究中，OVX 组较假手术组大鼠的 BMD 数值下降，这符合早期绝经后女性的生理特点：卵巢功能衰退，雌激素水平下降，造成骨重建障碍，骨显微结构改变^[14]。同时也说明 OVX 模型对去卵巢后雌激素减少所引起的骨密度下降非常敏感^[15]。益骨汤组 BMD 较 OVX 组显著提高，与雌激素组差异不大；与 OVX 组相比，两治疗组的骨体积分数和骨小梁相关参数均得到改善，且益骨汤在骨小梁间距方面较雌激素组有治疗优势。由此可见，益骨汤能提高大鼠骨密度，改善骨组织的数量和质量，与课题组前期研究结果一致。

3.2 益骨汤调节骨质疏松症模型大鼠骨代谢平衡可能与 RANKL 信号通路调控有关

过度的 OC 活性会损害骨稳态，导致骨质疏松症

体检进行骨密度测试才被发现^[6-7]。姚新苗教授基于“亏瘀致痿”理论拟定的益骨汤由补骨脂、骨碎补、生地黄、仙灵脾、山药、丹参六味中药配伍而成。君药为补骨脂、骨碎补，温肾助阳、补肾强骨；仙灵脾补肾阳，通痹痛，强筋骨，淮山药益肾气，健脾胃，共为臣药；佐以生地补肾益精养阴，丹参活血化瘀止痛；纵观全方，方药虽少但精，阴阳同调，先后天同养，具有补肾强骨活血之效。笔者前期的研究表明益骨汤能促进成骨细胞的增殖分化，提高血清 BGP、血清 Ca 水平，改善骨生物力学性能，促进成骨细胞 BMP 的表达，从而减轻骨质疏松症状^[8-9]。在现代药理学研究中，益骨汤中药物的有效成分也被证实可以在抑制骨吸收方面发挥作用。其中补骨脂素、补骨脂查尔酮可以增加成骨细胞释放的 OPG 表达，抑制 RANKL 的表达而抑制 OC 的分化和成熟^[10]；骨碎补总黄酮可通过上调成骨细胞的 OPG 活性，抑制 RANKL 的表达进而降低

等溶骨性疾病。本实验是从 OC 角度探究益骨汤的抗骨质疏松机理。多种信号通路均能影响 OC 的分化和成熟，如 M-CSF 通路、RANKL 通路、ITAM 通路等^[16]。RANKL 通路在调节 OC 的分化中具有重要作用，由成骨细胞分泌的 OPG 是 RANKL 的一个可溶性诱导受体，能够阻碍 RANKL 与 RANK 的结合^[17]。RANKL 是一种由成骨细胞以及免疫细胞和肿瘤细胞分泌的同三聚体跨膜蛋白，可刺激骨中 OC 的分化和未成熟祖细胞释放到循环中，是三种因子的联系枢纽^[18]。RANKL/RANK 结合控制 OC 的活性和形成，是不同病理情况下骨转换的关键因素^[19]。本实验发现 OVX 组骨组织中 OPG 水平显著低于 Sham 组，RANK 水平显著升高，这表明 OC 正处于快速分化和成熟阶段。此外，益骨汤的干预增加了 OPG 含量，降低了 RANKL 的含量。RANKL 与 RANK 结合后促使 RANK 形成三聚体并募集衔接蛋白分子—肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF Receptor Associated Factor, TRAF)，从而启动下游信号的级联放大反应。其中 TRAF-6 与 OC 的生成密切相关^[20]，对 TRAF-6 缺陷小鼠的研究表明，TRAF-6 是负责介导由 RANKL 激活的信号级联反应的主要衔接蛋白^[21]，本实验的实验结果与其一致。结果表明益骨汤可以改善血清 OPG 值，阻碍 RANKL 与 RANK 的结合，降低

骨 RANKL 基因和蛋白表达,减少 TRAF-6 因子的募集,来发挥抑制骨质疏松大鼠的骨吸收作用。

综上所述,本研究结果证实益骨汤可通过影响 RANKL 通路抑制骨吸收,改善骨密度和骨微观结构,这可能是益骨汤抗骨质疏松的作用机制之一,从分子生物学水平上丰富了补肾活血法代表方益骨汤治疗原发性骨质疏松症的理论基础。激活 OC 的分化过程中涉及多条信号通路,后续研究将涉及其他的信号通路,进而丰富益骨汤的药用依据。

参考文献

- [1] BLACK D M, ROSEN C J. Clinical practice: postmenopausal osteoporosis[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(3): 254-262.
- [2] REN S, JIAO G, ZHANG L, et al. Bionic tiger-bone powder improves bone microstructure and bone biomechanical strength of ovariectomized rats[J]. *Orthop Surg*, 2021, 13(3): 1111-1118.
- [3] IKEDA K, TAKESHITA S. The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis[J]. *J Biochem*, 2016, 159(1): 1-8.
- [4] 林晓芳, 姚新苗, 李威, 等. 益骨汤对去势大鼠骨组织 Wnt/ β -catenin 经典信号通路的影响[J]. *浙江中医药大学学报*, 2018, 42(2): 97-104.
- [5] 何帮剑, 朱胤晟, 应建伟, 等. 益骨汤含药血清通过经典 Wnt 信号通路促进成骨细胞增殖分化的研究[J]. *新中医*, 2017, 49(3): 10-13.
- [6] RIZZOLI R. Postmenopausal osteoporosis: assessment and management[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2018, 32(5): 739-757.
- [7] ASPRAY T J, HILL T R. Osteoporosis and the ageing skeleton[J]. *Subcell Biochem*, 2019, 91: 453-476.
- [8] 陈华, 陈智能, 姚新苗. 姚新苗教授防治骨质疏松症的学术思想略谈[J]. *浙江中医药大学学报*, 2019, 43(5): 413-417.
- [9] 何帮剑, 朱胤晟, 应建伟, 等. 益骨汤含药血清通过经典 Wnt 信号通路促进成骨细胞增殖分化的研究[J]. *新中医*, 2017, 49(3): 10-13.
- [10] 潘心瑶, 谢欣薇, 周琦, 等. 绝经后骨质疏松症中医药研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(9): 1140-1147.
- [11] 彭斯伟, 宋敏, 范凯, 等. 单味中药治疗肾虚型骨质疏松症机制研究状况[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(1): 76-80.
- [12] ZHAO B J, WANG J, SONG J, et al. Beneficial effects of a flavonoid fraction of herba epimedii on bone metabolism in ovariectomized rats[J]. *Planta Med*, 2016, 82(4): 322-329.
- [13] 高城翰, 刘晓炜, 关雪峰. 补肾法对去卵巢大鼠 OPG/RANK/RANKL 信号通路影响的 Meta 分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(20): 172-179.
- [14] 智信, 陈晓, 苏佳灿. 绝经后骨质疏松症发病机制研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(11): 1510-1513.
- [15] 卢建华, 卢烨超, 金红婷, 等. 红曲对去卵巢大鼠骨质疏松模型血清 ALP, TRAP 及骨组织 TNF- α , RANK 表达的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2017, 25(9): 5-8.
- [16] SHARMA A, SHARMA L, GOYAL R. Molecular signaling pathways and essential metabolic elements in bone remodeling: an implication of therapeutic targets for bone diseases[J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22(1): 77-104.
- [17] UDAGAWA N, KOIDE M, NAKAMURA M, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways[J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1): 19-26.
- [18] ROCHETTE L, MELOUX A, RIGAL E, et al. The role of osteoprotegerin in vascular calcification and bone metabolism: the basis for developing new therapeutics[J]. *Calcif Tissue Int*, 2019, 105(3): 239-251.
- [19] YASUDA H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system[J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1): 2-11.
- [20] TAN E M, LI L, INDRAN I R, et al. Traf6 mediates suppression of osteoclastogenesis and prevention of ovariectomy-induced bone loss by a novel prenylflavonoid[J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32(4): 846-860.
- [21] AMIN N, BOCCARDI V, TAGHIZADEH M, et al. Probiotics and bone disorders: the role of RANKL/RANK/OPG pathway[J]. *Aging Clin Exp Res*, 2020, 32(3): 363-371.

(收稿日期: 2022-01-01)