

本文引用:黄 勇,董克芳,王 凡,杨强健. 三种补肾方含药血清对衰老骨髓间充质干细胞中 COL I 和 ALP 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022,42(7): 1082-1086.

## 三种补肾方含药血清对衰老骨髓间充质 干细胞中 COL I 和 ALP 的影响

黄 勇<sup>1</sup>,董克芳<sup>1,2\*</sup>,王 凡<sup>2</sup>,杨强健<sup>1</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第二附属医院,湖南 长沙 410005)

**〔摘要〕**目的 研究健骨二仙丸、金匱肾气丸和六味地黄丸含药血清对衰老骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化过程中 I 型胶原蛋白(collagen type I, COL I)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)表达的影响,探讨 3 种补肾方治疗骨质疏松症的机制。**方法** 将 40 只 SD 大鼠分为健骨二仙丸组、金匱肾气丸组、六味地黄丸组、空白对照组,每组 10 只。分别灌胃 75.9 g/kg 健骨二仙丸、89.1 g/kg 金匱肾气丸、85.8 g/kg 六味地黄丸和等体积生理盐水,每天定时灌胃 2 次,连续 7 d,制备含药血清。用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 将 P3 代 BMSCs 处理成衰老细胞,采用 β-半乳糖苷酶染色进行观察。衰老 BMSCs 分为 6 组:模型组、诱导组、健骨二仙丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组、六味地黄丸含药血清组、空白血清组,于诱导第 4、8、12、16 天采用 Real-time PCR 法和 Western blot 法检测 COL I mRNA 及蛋白表达水平,并在第 4、8 天时收集细胞上清液检测 ALP 活性。**结果** 衰老 BMSCs 被 β-半乳糖苷酶染色成深蓝色,而正常细胞颜色无明显改变。在第 4、8、12、16 天,与模型组比较,诱导组、空白血清组 COL I 表达水平平均升高( $P<0.05$ );与诱导组、空白血清组比较,健骨二仙丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组 COL I 表达水平平均升高( $P<0.05$ )。在第 4、12 天,与诱导组相比较,六味地黄丸含药血清组 COL I 表达水平升高( $P<0.05$ )。在第 4、8 天,与模型组比较,诱导组、空白血清组 ALP 活性表达均明显升高( $P<0.05$ )。与诱导组、空白血清组比较,健骨二仙丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组、六味地黄丸含药血清组 ALP 活性表达明显升高( $P<0.05$ )。**结论** 健骨二仙丸、金匱肾气丸和六味地黄丸均能增加衰老 BMSCs 成骨分化过程中 COL I 的表达和 ALP 活性。

**〔关键词〕** 健骨二仙丸;金匱肾气丸;六味地黄丸;衰老骨髓间充质干细胞;成骨分化;I 型胶原蛋白;碱性磷酸酶

**〔中图分类号〕**R285.5

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.005

### Effects of containing serum of three kinds of kidney tonifying prescriptions on COL I and ALP in aging bone marrow mesenchymal stem cells

HUANG Yong<sup>1</sup>, DONG Kefang<sup>1,2\*</sup>, WANG Fan<sup>2</sup>, YANG Qiangjian<sup>1</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Affiliated

Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

**〔Abstract〕 Objective** To study the effects of Jiangu Erxian Pill, Jinkui Shenqi Pill and Liuwei Dihuang Pill on the expression of collagen type I (COL I) and alkaline phosphatase (ALP) during the osteogenic differentiation of aging bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), and to explore the mechanism of three kinds of kidney tonifying prescriptions in the treatment of osteoporosis. **Methods** Forty SD rats were divided into Jiangu Erxian Pill group, Jinkui Shenqi Pill group, Liuwei Dihuang Pill group and blank control group, with 10 rats in each group. They were given 75.9 g/kg Jiangu Erxian Pill, 89.1 g/kg

**〔收稿日期〕**2021-08-02

**〔基金项目〕**湖南省自然科学基金——科卫联合项目(2018JJ6113)。

**〔第一作者〕**黄 勇,男,硕士研究生,研究方向:骨与关节疾病。

**〔通信作者〕**\* 董克芳,男,硕士,副主任医师,硕士研究生导师,E-mail:dongkefang2008@163.com。

Jinkui Shenqi Pill, 85.8 g/kg Liuwei Dihuang Pill and equal volume of normal saline by gavage twice a day for 7 d to prepare drug containing serum. P3 generation BMSCs were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into senescent cells, β-galactosidase staining was used for observation. Aging BMSCs were divided into six groups: model group, induction group, Jiangu Erxian Pill containing serum group, Jinkui Shenqi Pill containing serum group, Liuwei Dihuang Pill containing serum group and blank serum group. On the 4th, 8th, 12th and 16th days of induction, the expression levels of COL I mRNA and protein were detected by Real-time PCR and Western blot, and the cell supernatant was collected on the 4th and 8th days to detect ALP activity. **Results** Aging BMSCs were stained with β-galactosidase in dark blue, but the color of normal cells did not change significantly. On the 4th, 8th, 12th and 16th days, compared with the model group, the expression level of COL I in the induction group and blank serum group increased ( $P<0.05$ ). Compared with the induction group and blank serum group, the expression level of COL I in Jiangu Erxian Pill containing serum group and Jinkui Shenqi Pill containing serum group increased ( $P<0.05$ ). On the 4th and 12th days, compared with the induction group, the expression level of COL I in Liuwei Dihuang Pill containing serum group increased ( $P<0.05$ ). On the 4th and 8th days, compared with the model group, the expression of ALP activity in the induction group and blank serum group increased significantly ( $P<0.05$ ). Compared with the induction group and blank serum group, the expression of ALP activity in Jiangu Erxian Pill containing serum group, Jinkui Shenqi Pill containing serum group and Liuwei Dihuang Pill containing serum group increased significantly ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Jiangu Erxian Pill, Jinkui Shenqi Pill and Liuwei Dihuang Pill can increase the expression of COL I and ALP activity during osteogenic differentiation of aging BMSCs.

[**Keywords**] Jiangu Erxian Pill; Jinkui Shenqi Pill; Liuwei Dihuang Pill; aging bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; type I collagen; alkaline phosphatase

骨质疏松症是一种常见的慢性骨骼疾病,主要表现为骨量降低、骨小梁结构破坏、骨脆性增高,从而导致全身多处骨折<sup>[1]</sup>。其机制主要是成骨分化减少和破骨分化增加,引起骨量的流失<sup>[2]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)可分化为成骨细胞,促进其成骨分化,提高骨量,是防治骨质疏松症的关键因素<sup>[3]</sup>。骨质疏松症患者以老年人居多,机体的衰老在体内表现为细胞的衰老,导致细胞增殖和分化能力衰退。因此,寻找可以促进成骨分化的方法诱导衰老 BMSCs 向成骨细胞分化,是治疗骨质疏松症的重要研究方向。临床上,与西药相比,中医药具有疗效好、安全性高和不良反应少等优势<sup>[4]</sup>。健骨二仙丸是萧劲夫教授根据骨质疏松症的病因病机以及多年的临床经验创制,是由龟鹿二仙胶加续断、山药组成的经验方,并有研究证实,健骨二仙丸能有效促进成骨细胞增殖和分化,防止成骨细胞凋亡<sup>[5]</sup>。而金匱肾气丸、六味地黄丸均是温补肾精的经典方剂,在治疗骨质疏松症等疾病方面具有显著的临床疗效<sup>[6-7]</sup>。故本实验采用健骨二仙丸、金匱肾气丸和六味地黄丸体外干预衰老 BMSCs,研究其对衰老 BMSCs 成骨分化过程中 I 型胶原蛋白(collagen type I, COL I)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)表达的影响,以期探讨 3 种补肾方治疗骨质疏松症的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只,体质量(100±10) g,由湖南中医药大学动物实验中心提供,动物生产许可证号:SYXK(湘)2019-0004,实验操作均在湖南中医药大学动物实验中心完成,动物使用许可证号:SYXK(湘)2019-0009。

### 1.2 主要药物、试剂与仪器

健骨二仙丸由龟板、鹿角胶、党参、枸杞子、续断、山药按 1:1:3:6:6:6 比例组成,共 345 g;金匱肾气丸由干地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮、桂枝、附子按 8:4:4:4:3:3:1:1 比例组成,共 81 g;六味地黄丸由熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮按 8:4:4:4:3:3 比例组成,共 78 g。超微饮品均由湖南中医药大学第二附属医院提供。

DMEM/F-12 培养基(赛默飞世尔科技有限公司,批号:ZQ1318);大鼠 BMSCs(武汉普诺赛生命有限公司,批号:CP-R131);胰酶消化液、双抗(青链霉素)(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0201/SV30010);胎牛血清(美国 Gibico 公司,批号:10099141)。

超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司,型号:YT-CJ-2NB);直热式 CO<sub>2</sub> 培养箱(上海三腾仪器有限公司,型号:DH-1601);倒置生物显微镜(北

京中显恒业仪器仪表有限公司,型号:DSZ2000X);低速离心机(上海知信实验仪器技术有限公司,型号:SL02)。

### 1.3 含药血清制备

将40只SD大鼠随机分为4组,即空白血清组、健骨二仙丸组、金匱肾气丸组和六味地黄丸组,每组10只;根据体表面积法换算剂量<sup>[8]</sup>,用药组按照健骨二仙丸75.9 g/kg、金匱肾气丸89.1 g/kg和六味地黄丸85.8 g/kg分别灌胃,空白血清组给予相同体积生理盐水灌胃,均每天定时灌胃2次,连续7 d。于末次给药1 h后,腹主动脉取血,置于无菌管中,分离血清上清液,0.22 μm一次性滤过器过滤除菌,56℃水浴锅灭活30 min,-80℃超低温冷冻冰箱储存备用。

### 1.4 衰老BMSCs制备及分组

将BMSCs细胞株培养于含10% FBS+1%双抗的DMEM/F-12培养基中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养。取P3代用于实验,将P3代细胞以5×10<sup>3</sup>个细胞/孔种植于96孔板中,用浓度为500 μmol/L的30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分别处理24 h,制备衰老BMSCs。并将其分为6组:模型组、诱导组、健骨二仙丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组、六味地黄丸含药血清组、空白血清组。

### 1.5 衰老BMSCs成骨分化诱导

细胞分组完毕后,以2.0×10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>的浓度接种于6孔板中,每孔加2 mL含10% FBS的L-DMEM培养液。当细胞贴壁生长达到60%~70%融合时,将培养基更换为2 mL成骨培养基(0.25 mmol/L维生素C、10 mmol/L β-磷酸甘油和200 nmol/L地塞米松的培养液)和0.2 mL含药血清、0.2 mL空白血清进行诱导,即诱导条件分别为:(1)模型组,DMEM/F-12培养基;(2)诱导组,成骨培养基;(3)血清组,成骨培养基中分别加入金匱肾气丸含药血清、六味地黄丸含药血清、健骨二仙丸含药血清和空白血清。培养2周,每3天更换培养液1次。

### 1.6 指标检测

1.6.1 形态学检测 采用β-半乳糖苷酶染色法镜下观察衰老和正常BMSCs,具体步骤如下:(1)吸除细胞培养液,用PBS洗涤1次,加入1 mL β-半乳糖苷酶染色固定液,室温固定15 min;(2)吸除细胞固定液,用PBS洗涤细胞3次,每次3 min;(3)吸除

PBS,加入β-半乳糖苷酶染色液;(4)37℃温箱孵育过夜,用封口膜封住6孔板防止蒸发;(5)普通光学显微镜下观察,拍照。

1.6.2 Real-time PCR法检测 在美国国立生物技术信息中心搜索目的基因的序列,运用Primer 5软件设计引物,COL I引物序列为:上游5'-TGAGCCAGCA-GATTGAGAAC-3',下游5'-CCAGTGTCCAATGTCGCA-GA-3';β-actin引物序列为:上游5'-GCTATTTG-GCGCTGGACTT-3',下游5'-GCGGCTCGTAGCTCT-TCTC-3'。Trizol提取细胞总RNA,测浓度与纯度,逆转录cDNA,再行PCR检测。

1.6.3 Western blot法检测 提取细胞蛋白:用冰预冷PBS洗涤细胞1次,收集悬液,加入200 μL RIPA裂解液,4℃、12 000 r/min离心15 min(离心半径10 cm);采用BCA法测定蛋白浓度,经凝胶电泳,转膜,5%脱脂牛奶室温下脱色,摇床上封闭2 h;加入一抗(COL I稀释比例为1:2000)、二抗(鼠抗稀释比例为1:5000)孵育后,用PBST缓冲液漂洗3次,每次10 min;最后采用ECL显色曝光成像。

1.6.4 ALP测定 于诱导衰老BMSCs第4、8天时,收集细胞上清液,按ALP测试盒说明书进行磷酸苯二钠比色法测定其ALP活性。

### 1.7 统计学方法

采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析,结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,数据符合正态分布及方差齐性时,多组均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法。数据不满足正态性时,使用非参数检验进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 β-半乳糖苷酶染色结果

与正常BMSCs细胞相比,500 μmol/L的30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理24 h后的BMSCs细胞被染成深蓝色,为染色阳性结果,可见经H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后的BMSCs活性降低。详见图1。

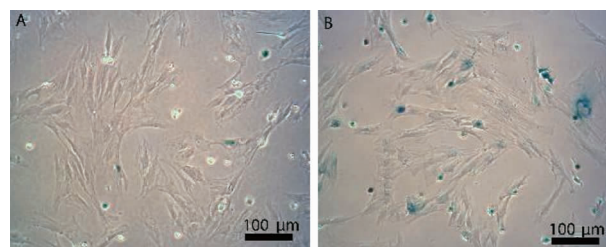


图1 β-半乳糖苷酶染色结果(×100)  
注:A.正常BMSCs细胞;B.染色BMSCs细胞。



## 2.2 各组衰老 BMSCs 中 COL I mRNA 和蛋白表达水平比较

在第 4、8、12、16 天,与模型组相比较,诱导组、空白血清组 COL I mRNA 和蛋白表达水平均升高 ( $P<0.05$ );与诱导组、空白血清组比较,健骨二仙丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组 COL I mRNA 和蛋白表达水平均升高 ( $P<0.05$ )。在第 4、12 天,与诱导组比较,六味地黄丸含药血清组 COL I mRNA 和蛋白表达水平升高 ( $P<0.05$ )。详见表 1、图 2-3。

表 1 各组衰老 BMSCs 中 COL I mRNA 相对表达量 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	第 4 天	第 8 天	第 12 天	第 16 天
模型组	1.01±0.13	1.43±0.13	1.70±0.11	1.94±0.11
诱导组	3.03±0.39*	4.11±1.28*	6.08±0.28*	7.80±1.62*
空白血清组	3.31±0.72*	4.53±0.85*	7.00±0.60*	8.21±0.35*
健骨二仙丸含药血清组	6.79±1.03* <sup>#</sup>	8.16±1.05* <sup>#</sup>	10.98±0.87* <sup>#</sup>	15.57±2.82* <sup>#</sup>
金匱肾气丸含药血清组	5.01±0.24* <sup>#</sup>	7.29±0.82* <sup>#</sup>	8.90±0.42* <sup>#</sup>	11.88±1.14* <sup>#</sup>
六味地黄丸含药血清组	4.19±0.25* <sup>#</sup>	5.46±0.43*	7.28±0.63* <sup>#</sup>	9.95±0.91*

注:与模型组相比,\* $P<0.05$ ;与诱导组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与空白血清组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

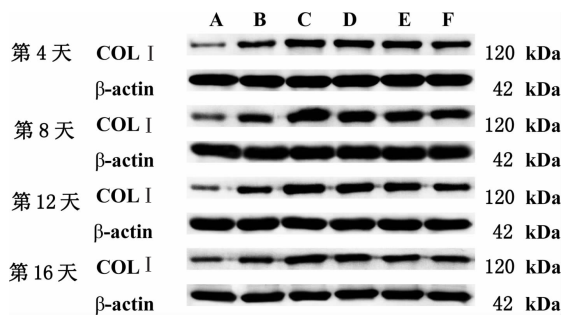


图 2 各组衰老 BMSCs 中 COL I 电泳图

注:A.模型组;B.诱导组;C.健骨二仙丸含药血清组;D.金匱肾气丸含药血清组;E.六味地黄丸含药血清组;F.空白血清组。

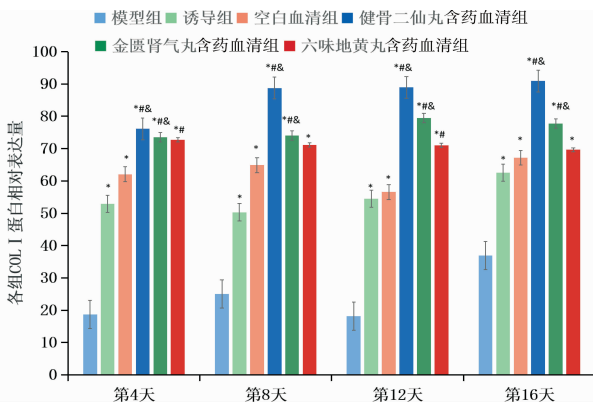


图 3 各组衰老 BMSCs 中 COL I 蛋白表达水平

注:与模型组相比,\* $P<0.05$ ;与诱导组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与空白血清组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

## 2.3 各组 ALP 活性比较

在第 4、8 天,与模型组比较,诱导组、空白血清组 ALP 活性表达均明显升高 ( $P<0.05$ )。与诱导组、空白血清组比较,健骨二仙丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组、六味地黄丸含药血清组 ALP 活性表达明显升高 ( $P<0.05$ )。详见表 2。

表 2 各组 ALP 活性 (U/L,  $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	第 4 天	第 8 天
模型组	30.46±2.39	36.83±1.34
诱导组	61.28±0.88*	67.74±0.38*
空白血清组	60.89±3.07*	72.15±1.97* <sup>#</sup>
健骨二仙丸含药血清组	96.28±1.21* <sup>#</sup>	107.34±0.58* <sup>#</sup>
金匱肾气丸含药血清组	101.03±0.85* <sup>#</sup>	115.45±1.54* <sup>#</sup>
六味地黄丸含药血清组	91.79±0.76* <sup>#</sup>	100.73±1.63* <sup>#</sup>

注:与模型组相比,\* $P<0.05$ ;与诱导组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与空白血清组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

## 3 讨论

骨质疏松症是一种全身代谢性疾病,与年龄有相关性,在老年人中发病率高且骨折风险增加<sup>[9]</sup>。中医学将之归属为“骨痿”“骨痹”,以肾精亏虚为主要病机<sup>[10]</sup>。肾藏精,主骨生髓,为先天之本;肾精肾气充盈,骨髓则化生有源,筋骨得以濡养而强健有力<sup>[11]</sup>;若肾精亏虚,濡养乏源,则筋骨痿弱失用,表现为腰腿疼痛、酸软乏力<sup>[12]</sup>。有研究<sup>[13]</sup>表明,补肾中药可以有效促进 BMSCs 增殖和成骨分化,抑制破骨细胞生成,防止或减少骨量的丢失,起到治疗骨质疏松症的作用。龟鹿二仙胶为中医名方,方中含鹿角胶、龟板、人参、枸杞子 4 味药,具有生精、补气、养血的功效;研究证实,龟鹿二仙胶能促进 COL I 的合成、促进成骨细胞的增殖<sup>[14]</sup>。而健骨二仙丸则是在龟鹿二仙胶的基础上加续断、山药,诸药合用,共奏补肾填精、滋阴补阳、壮骨强筋、续筋骨、健脾之功。金匱肾气丸<sup>[15]</sup>、六味地黄丸<sup>[16]</sup>分别为温补肾阳、滋阴补肾的经典代表方,广泛应用于临床,且疗效确切,均能促进成骨细胞分化或抑制破骨活性、促进骨形成、改善骨组织微结构、提高骨密度,以改善骨质疏松。

BMSCs 是一种具有多向分化潜能的干细胞,可分化为成骨细胞、成脂细胞和软骨细胞<sup>[17]</sup>。研究证明,BMSCs 在骨质疏松症等骨病中起到积极的治疗作用,与中医理论“肾主骨”具有相似性<sup>[18-19]</sup>。随着年龄的增长,机体内的细胞出现衰老,其增殖分化能力

逐渐丧失,继之出现机体的退行性病变<sup>[20]</sup>。而衰老 BMSCs 成骨分化能力降低更倾向于成脂分化,与年龄具有相关性<sup>[21]</sup>,用于探讨补肾中药治疗骨质疏松症具有重要意义。

本研究结果显示,健骨二仙丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组在各个时间点均能促进 COL I 的表达,且与诱导组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而六味地黄丸含药血清组亦能促进 COL I 的表达,但与诱导组比较,仅在第 4、12 天差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。ALP 是存在于骨组织中的骨形成标志物,是评价成骨能力的指标<sup>[22]</sup>,本研究显示在第 4、8 天,健骨二仙丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组、六味地黄丸含药血清组与其余各组相比较,ALP 活性表达明显升高( $P < 0.05$ )。

综上所述,健骨二仙丸、金匱肾气丸和六味地黄丸含药血清在诱导衰老 BMSCs 成骨分化过程中能够上调 COL I 和 ALP 表达、促进细胞成骨分化、提高成骨能力。今后将进一步加强其机制研究,为临床应用补肾法治骨质疏松症提供理论依据。

## 参考文献

- [1] SHEVROJA E, CAFARELLI F P, GUGLIELMI G, et al. DXA parameters, Trabecular Bone Score (TBS) and Bone Mineral Density (BMD), in fracture risk prediction in endocrine-mediated secondary osteoporosis[J]. *Endocrine*, 2021, 74(1): 20-28.
- [2] CENTER J, EISMAN J. The epidemiology and pathogenesis of osteoporosis[J]. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1997, 11(1): 23-62.
- [3] 吴 铭,张 岩.调控骨髓间充质干细胞成骨分化的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路及相关因素[J].*中国组织工程研究*,2021,25(1):116-122.
- [4] 梁伟乔,钟 诚,李宇明.骨质疏松症的中医病因病机认识与治疗进展[J].*中国骨质疏松杂志*,2020,26(1):135-139.
- [5] 程志安.健骨二仙丸防治骨质疏松的实验研究[D].广州:广州中医药大学,2001.
- [6] 葛继荣,王和鸣,郑洪新,等.中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2020)[J].*中国骨质疏松杂志*,2020,26(12):1717-1725.
- [7] 张冰彬,董克芳.两种补肾方药对骨质疏松症患者骨密度及疼痛评分影响的 Meta 分析[J].*中医临床研究*,2020,12(2):139-143.
- [8] 吴沅皞,刘 维,赵文甲.血清药理学方法对药理、药效学和新药研发的贡献[J].*中国组织工程研究*,2018,22(24):3914-3920.
- [9] STEPAN J J, HRUSKOVA H, KVERKA M. Update on menopausal

- hormone therapy for fracture prevention[J]. *Current Osteoporosis Reports*, 2019, 17(6): 465-473.
- [10] 王大伟.基于 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号通路探究补肾益气活血方对绝经后骨质疏松症疗效机制研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2019.
  - [11] 吴克亮,吴小绸,冯文俊,等.基于脾肾相关论治老年性骨质疏松症[J].*广州中医药大学学报*,2021,38(2):411-415.
  - [12] 余丽娟,罗毅文,熊云谱,等.补肾活血汤含药血清对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].*广州中医药大学学报*,2021,38(2):346-351.
  - [13] 郭强强,张晓刚,曹盼举.中医药防治骨质疏松症的实验研究现状[J].*中医药临床杂志*,2020,32(3):577-580.
  - [14] 钱 哲,王建伟,尹 恒,等.龟鹿二仙胶治疗骨质疏松症的机制研究[J].*中华中医药学刊*,2017,35(4):1008-1013.
  - [15] 张 倩,杨 旭,王 媛,等.金匱肾气丸对去势大鼠骨微结构及 ALP、OPG、IL-6 的影响[J].*中国骨质疏松杂志*,2020,26(10):1475-1480.
  - [16] 姜朝阳,谢兴文,徐世红,等.六味地黄丸治疗绝经后骨质疏松症的研究进展[J].*中医正骨*,2020,32(4):38-40,43.
  - [17] CHEN G L, ZHUO Y J, TAO B, et al. Moderate SMFs attenuate bone loss in mice by promoting directional osteogenic differentiation of BMSCs[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2020, 11(1): 1-14.
  - [18] TANG K C, PAN W L, DOSCHAK M R, et al. Increased FoxO3a expression prevents osteoblast differentiation and matrix calcification[J]. *Bone Reports*, 2019, 10: 100206.
  - [19] LI Q, XING W Y, GONG X L, et al. RETRACTED: Astragalus polysaccharide promotes proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells by down-regulation of microRNA-152[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2019, 115: 108927.
  - [20] 崔 直,王珮琳,滕松松,等.蒙花苷消除衰老骨髓间充质干细胞的衰老表型发挥抗衰老作用[J].*现代生物医学进展*,2020,20(18):3407-3412.
  - [21] LIU F, YUAN Y J, BAI L, et al. LRRc17 controls BMSC senescence via mitophagy and inhibits the therapeutic effect of BMSCs on ovariectomy-induced bone loss[J]. *Redox Biology*, 2021, 43: 101963.
  - [22] SAAD M A, ABOELWAF A, ELSAYED E H. Could procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) and bone alkaline phosphatase (B-ALP) be valid alternative diagnostic markers to dual X-ray absorptiometry (DEXA) in elderly females with osteoporosis An Egyptian radiological and laboratory monocentric study[J]. *Egyptian Rheumatology and Rehabilitation*, 2021, 48(1): 1-10.