

本文引用: 杨强健, 董克芳, 王凡, 林少如, 黄勇, 李为. 三种补肾方含药血清对衰老骨髓间充质干细胞成骨分化及 Runx2 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(1): 53-58.

## 三种补肾方含药血清对衰老骨髓间充质干细胞成骨分化及 Runx2 表达的影响

杨强健<sup>1</sup>, 董克芳<sup>2\*</sup>, 王凡<sup>2</sup>, 林少如<sup>2</sup>, 黄勇<sup>1</sup>, 李为<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** 探究3种补肾方(健骨二仙丸、六味地黄丸、金匱肾气丸)含药血清对衰老骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化及 Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor2, Runx2)表达的影响,研究3种补肾方治疗骨质疏松症的机制。**方法** 将40只 SPF 级 SD 大鼠随机分为空白对照组(等体积生理盐水)、健骨二仙丸组(75.9 g/kg)、六味地黄丸组(85.8 g/kg)及金匱肾气丸组(89.1 g/kg),每组10只,分别灌胃用于制备含药血清。建立对数增长的 P3 代 BMSCs, 500 μmol/L 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理以建立氧化衰老 BMSCs 模型。cck-8 法检测衰老 BMSCs 代谢活性。衰老 BMSCs 分为模型组、诱导组、空白血清组、健骨二仙丸含药血清组、六味地黄丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组,共6组。在诱导第4、8、12、16天,观察各组细胞形态学变化,Western blot 法检测 Runx2 蛋白表达,RT-PCR 法检测 Runx2 mRNA 相对表达量。**结果** 与正常 BMSCs 比较,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后的 BMSCs 活性显著降低( $P<0.05$ )。对比模型组,诱导组和空白血清组衰老 BMSCs 在分化过程中,茜素红染色增多;对比诱导组及空白血清组,各含药血清组衰老 BMSCs 在分化过程中,茜素红染色增多;且除模型组外,各组随着时间推移,茜素红染色不断增加。在第4、8、12、16天,对比模型组,诱导组、空白血清组 Runx2 mRNA 和蛋白表达水平平均升高( $P<0.05$ );对比诱导组、空白血清组,健骨二仙丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组 Runx2 mRNA 和蛋白表达水平平均升高( $P<0.05$ )。在第4、8、12天,对比诱导组,六味地黄丸含药血清组 Runx2 mRNA 和蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。在第4、12、16天,对比空白血清组,六味地黄丸含药血清组 Runx2 mRNA 和蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。**结论** 健骨二仙丸、六味地黄丸、金匱肾气丸均可促进 Runx2 的表达,并促进衰老 BMSCs 往成骨方向分化。

**[关键词]** 健骨二仙丸;六味地黄丸;金匱肾气丸;衰老骨髓间充质干细胞;成骨分化;Runt 相关转录因子 2

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.01.009

### Effects of serum containing three kidney-tonifying formulas on osteogenic differentiation and Runx2 expression of aging bone marrow mesenchymal stem cells

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

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of serum containing three kidney-tonifying formulas (Jiangu Erxian Pill, Liuwei Dihuang Pill, Jingui Shenqi Pill) on osteoblast differentiation and the expression of Runt-related transcription factor2 (Runx2) of aging bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and to study the mechanism of these three formulas in the treatment of osteoporosis. **Methods** A total of 40 SPF SD rats were randomly divided into blank control group (equal volume normal saline), Jiangu Erxian Pill group (75.9 g/kg), Liuwei Dihuang Pill group (85.8 g/kg) and Jingui Shenqi Pill group (89.1 g/kg),

**[收稿日期]** 2022-06-24

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金——科卫联合项目(2018JJ6113);田心义名中医工作室。

**[第一作者]** 杨强健,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。

with 10 rats in each group. All the groups received intragastric administration of the corresponding materials respectively to prepare drug-containing serum. The P3 generation BMSCs with logarithmic growth were prepared and were further treated with 500  $\mu\text{mol/L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  to establish the model of oxidative aging BMSCs. The metabolic activity of aging BMSCs was detected by cck-8 method. The aging BMSCs were divided into 6 groups: model group, induction group, blank serum group, serum containing Jiangu Erxian Pill drug group, serum containing Liuwei Dihuang Pill group and serum containing Jingui Shenqi Pill group. On the 4th, 8th, 12th and 16th days of induction, the morphological changes of cells in each group were observed. The expressions of Runx2 protein were detected by Western blot and the relative expressions of Runx2 mRNA were detected by RT-PCR. **Results** Compared with normal BMSCs, the activity of BMSCs treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  was significantly lower ( $P<0.05$ ). Compared with model group, alizarin red staining increased during the differentiation of aging BMSCs in induction group and blank serum group. Compared with induction group and blank serum group, alizarin red staining increased during the differentiation of aging BMSCs in drug-containing serum groups. Alizarin red staining increased with time in all groups except model group. On the 4th, 8th, 12th and 16th days, Runx2 mRNA and protein expression levels increased in induction group and blank serum group in comparison to model group ( $P<0.05$ ). Compared with induction group and blank serum group, mRNA Runx2 and protein expression levels in serum containing Jiangu Erxian Pill group and serum containing Jingui Shenqi Pill group increased ( $P<0.05$ ). On the 4th, 8th and 12th days Runx2 mRNA and protein expression levels in serum containing Liuwei Dihuang Pill group were higher ( $P<0.05$ ) than those in induction group. On the 4th, 12th and 16th days, Runx2 mRNA and protein expression levels in serum containing Liuwei Dihuang Pill group were higher ( $P<0.05$ ) than those of the blank serum group. **Conclusion** Jiangu Erxian Pill, Liuwei Dihuang Pill and Jingui Shenqi Pill can all promote the expression of Runx2 and the osteogenic differentiation of aging BMSCs.

[**Keywords**] Jiangu Erxian Pill; Liuwei Dihuang Pill; Jingui Shenqi Pill; aging bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; Runt-associated transcription factor 2

骨质疏松症是一种常见的代谢性骨病,严重危害公众的健康,其特点主要是骨量减少、微结构破坏,是老年人骨折常见的根本原因<sup>[1-2]</sup>。骨转换失衡是骨质疏松症发病的基本病理机制之一,而导致这一病理过程的原因可能与骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的成骨、成脂分化能力的失衡直接相关<sup>[3]</sup>。BMSCs 存在于许多组织中,可以分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、神经细胞和心肌细胞等<sup>[4]</sup>。随着人们年龄的增长,机体逐渐衰老,骨重建逐渐处于负平衡状态,人体的骨骼成分丢失,从而引起骨质疏松症的发生<sup>[5]</sup>。因此,探寻促进成骨分化进而诱导衰老 BMSCs 向成骨方向分化,是防治骨质疏松症的重要研究方向。目前,在临床上治疗骨质疏松症的药物品种繁多,作用机制各异,但都存在潜在的不良反应<sup>[6-7]</sup>,中医药防治骨质疏松症有独特的优势,近年来,包括中药在内的食物疗法防治骨质疏松症开始引起人们的关注。与传统化学合成药物相比,有着几千年用药经验的中药以不良反应较少、长期使用效果更明显等特点而得到认可<sup>[8]</sup>。健骨二仙丸是岭南伤科萧劲夫教授针对骨质疏松症的多年临床验方,由明代王三才《医便·卷一·龟鹿二仙胶》中龟鹿二仙胶加续断、山药组成,并有研究证实,健骨二仙丸能有效促进成骨细胞

分化而调控骨转化失衡<sup>[9]</sup>。金匱肾气丸出自东汉末年张仲景《金匱要略·消渴小便不利淋病脉证并治》,六味地黄丸出自宋代钱乙所著《小儿药证直诀》,均是温肾补精的经典方剂,能有效防治骨质疏松症等疾病<sup>[10-11]</sup>。因此,本实验采用健骨二仙丸、六味地黄丸和金匱肾气丸含药血清干预衰老 BMSCs,研究 3 种补肾方对衰老 BMSCs 成骨分化过程中细胞形态变化和 Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor2, Runx2)表达的影响,以探究其防治骨质疏松症的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SYXK(湘)2019-0004,鼠龄 3~4 周,体质量(100 $\pm$ 10) g,自由取食涉水,饲养在温度 20~22  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 40%~70%的环境下。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 药物、试剂及仪器

健骨二仙丸(由龟甲、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);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);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)。上述中药超微饮品均由湖南中医药大学第二附属医院提供。

DMEM/F12 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 Gibco 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);多功能酶标分析仪(深圳市会松科技发展有限公司,型号:MB-530)。

## 2 方法

### 2.1 含药血清的制备

40 只大鼠适应性喂养 1 周后,随机分成 4 组,制备含药血清<sup>[12]</sup>,分别为空白血清组、健骨二仙丸组、六味地黄丸组和金匱肾气丸组,每组 10 只。给药剂量按体表面积方法换算<sup>[13]</sup>,含药血清组分别按照 75.9、85.8、89.1 g/kg 剂量灌胃给药,每天 2 次,连续 7 d,最后 1 天给药结束后 1 h 腹主动脉取血,置无菌管中。所采集的血液在室温下静置 2 h 后,3500 r/min 离心 15 min(离心半径 10 cm),吸取上清,0.22 μm 一次性滤过器过滤除菌,56 °C 水浴锅灭活 30 min,-80 °C 超低温冷冻冰箱储存备用。

### 2.2 BMSCs 培养

将 BMSCs 细胞株培养于含 10% FBS+1% 双抗的 DMEM/F-12 培养基中,37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养。

### 2.3 衰老 BMSCs 制备及分组

参照相关文献<sup>[14]</sup>方法,将培养好的第 3 代 BMSCs 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。将其分为 6 组:模型组、诱导组、空白血清组、健骨二仙丸含药血清组、六味地黄丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组。

### 2.4 衰老 BMSCs 成骨诱导

分组完成后,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,将培养基更换为成骨培养基、含药血清、空白血清,分别进行诱导,诱导条件分别为:(1)模型组,DMEM/F12 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健骨二仙丸含药血清、金匱肾气丸含药血清、六味地黄丸含药血清和空白血清,培养 2 周,每隔 3 天更换 1 次培养液。

### 2.5 指标检测

2.5.1 衰老 BMSCs 代谢活力检测 500 μmol/L 的 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分别处理 24 h,采用 CCK-8 法<sup>[15]</sup>进行检测。取对数增长的 BMSCs,以 1×10<sup>4</sup> 个细胞/孔密度接种于 96 孔板内,每孔 100 μL,各组均设 5 个复孔。细胞贴壁后,按照如上方法处理相应的时间后,加入 10 μL/孔的 CCK-8,用完全培养基配制 CCK-8 溶液,去除含药培养基,每孔加入 100 μL 含有 CCK-8 的培养基。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 继续孵育 4 h 后于多功能酶标分析仪分析,450 nm 处测定细胞吸光度(OD)值。

2.5.2 细胞形态学的观察 将制备好的衰老 BMSCs 诱导相应时间后,PBS 清洗细胞 2 遍,加 4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 清洗 2 遍,加入茜素红染液,室温染色 30 min,PBS 清洗 3 遍后于显微镜下拍照。分别于培养后第 4、8、12、16 天通过倒置显微镜数字摄像系统采集图像,观察并采集各孔中细胞的形态学和组织学变化图像。

2.5.3 Western blot 法检测 Runx2 蛋白表达 冰冷 PBS 洗涤细胞,加入裂解液,收集悬液,超声破碎,裂解后,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min(离心半径 10 cm)。根据 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明测定蛋白浓度。制胶,电泳,转膜切胶;转膜后封闭(1×PBST 配制 5% 脱脂牛奶);一抗孵育(Runx2 稀释比例 1:1000);二抗孵育(鼠抗稀释比例 1:5000);孵育 1×PBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min;ECL 显色曝光成像。

2.5.4 RT-PCR 检测 Runx2 mRNA 相对表达量 Trizol 提取总 RNA,RNA 反转录,NCBI 上搜索目的基因序列,运用 primer 5 软件设计引物,由上海生工合成引物,引物名称及序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Runx2	正向:5'-CCACCCAGTAGCAAACCGAA-3'	173
	反向:5'-GCATCAGACAAACACACGGAC-3'	
	正向:5'-ACATCCGTAAGACCTCTATGCC-3'	223
β-actin	反向:5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'	

## 2.6 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析,结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。如数据符合正态分布及方差齐性,多组均数间比较采用 *one-way ANOVA* 检验,组间比较采用 *LSD* 法检验;如数据不满足正态分布,使用非参数检验进行分析。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 BMSCs 代谢活力比较

与正常 BMSCs 相比, $H_2O_2$  处理后的 BMSCs 细胞 OD 均值明显降低( $P < 0.05$ ),可见经  $H_2O_2$  处理后的 BMSCs 细胞活性降低。详见图 1。

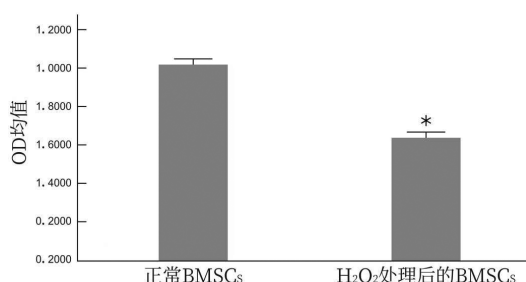


图 1 BMSCs 经  $H_2O_2$  处理后细胞活性情况  
注:与正常 BMSCs 比较,\* $P < 0.05$ 。

### 3.2 各组细胞形态学观察

对比模型组,诱导组和空白血清组衰老 BMSCs 在分化过程中,茜素红染色增多,即钙离子增多,成骨分化增多;对比诱导组及空白血清组,各含药血清组衰老 BMSCs 在分化过程中,茜素红染色增多,即钙离子增多,成骨分化增多;且除模型组外,各组随着时间推移,茜素红染色不断增加,即钙离子增多,成骨分化增多。详见图 2。

### 3.3 各组 Runx2 mRNA 和蛋白表达比较

在第 4、8、12、16 天,对比模型组,诱导组、空白血清组 Runx2 mRNA 和蛋白表达水平均升高( $P < 0.05$ );对比诱导组、空白血清组,健骨二仙丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组 Runx2 mRNA 和蛋白表达水平均升高( $P < 0.05$ )。在第 4、8、16 天,对比诱导组,六味地黄丸含药血清组 Runx2 mRNA 和蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ )。在第 4、12、16 天,对比空白血清组,六味地黄丸含药血清组 Runx2 mRNA 和蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ )。详见表 2、图 3~4。

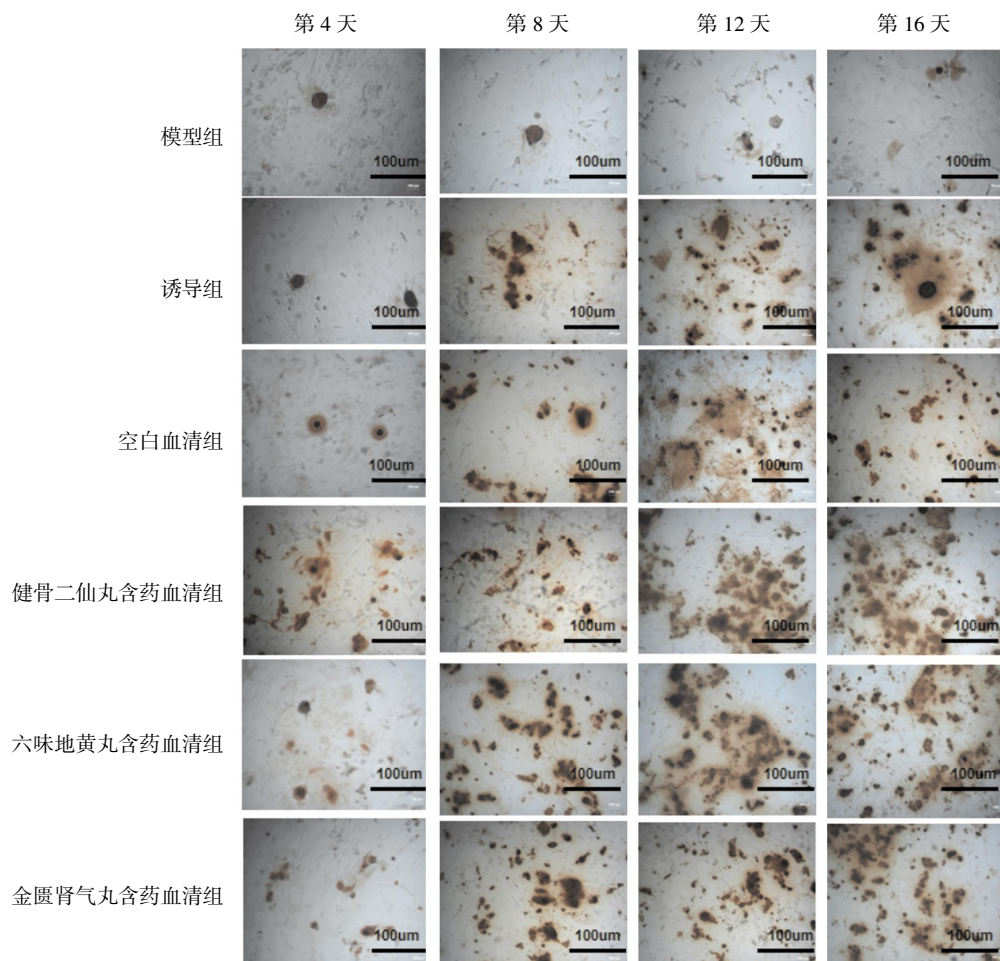


图 2 各组不同时间衰老 BMSCs 茜素红染色图( $\times 100$ )

表2 各组衰老 BMSCs 中 Runx2 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±0.16	1.11±0.17	1.23±0.07	1.32±0.11
诱导组	1.52±0.18 <sup>▲</sup>	2.18±0.17 <sup>▲</sup>	2.90±0.08 <sup>▲</sup>	3.02±0.32 <sup>▲</sup>
空白血清组	1.70±0.21 <sup>▲</sup>	2.36±0.43 <sup>▲</sup>	2.65±0.16 <sup>▲</sup>	3.12±0.41 <sup>▲</sup>
健骨二仙丸含药血清组	3.27±0.32 <sup>▲■</sup>	3.86±0.49 <sup>▲■</sup>	4.33±0.47 <sup>▲■</sup>	4.93±0.50 <sup>▲■</sup>
金匱肾气丸含药血清组	2.93±0.10 <sup>▲■</sup>	3.64±0.66 <sup>▲■</sup>	3.91±0.16 <sup>▲■</sup>	4.56±0.61 <sup>▲■</sup>
六味地黄丸含药血清组	2.61±0.62 <sup>▲■</sup>	2.86±0.28 <sup>▲</sup>	3.17±1.04 <sup>▲■</sup>	4.09±0.65 <sup>▲■</sup>

注:与模型组相比,▲ $P<0.05$ ;与诱导组相比,\* $P<0.05$ ;与空白血清组相比,■ $P<0.05$ 。

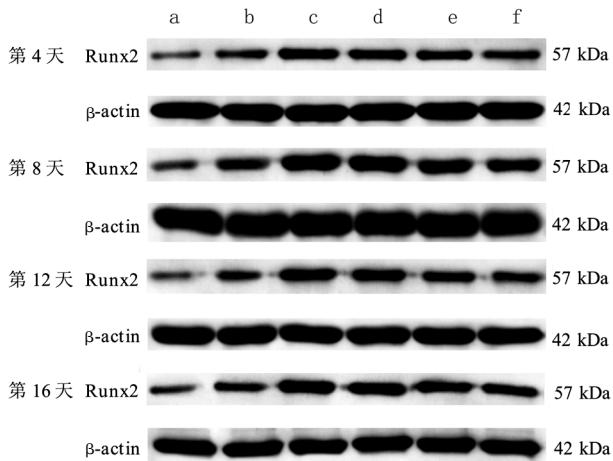


图3 各组衰老 BMSCs 中 Runx2 蛋白电泳图

注:a、b、c、d、e、f 分别为模型组、诱导组、空白血清组、健骨二仙丸含药血清组、六味地黄丸含药血清组、金匱肾气丸含药血清组。

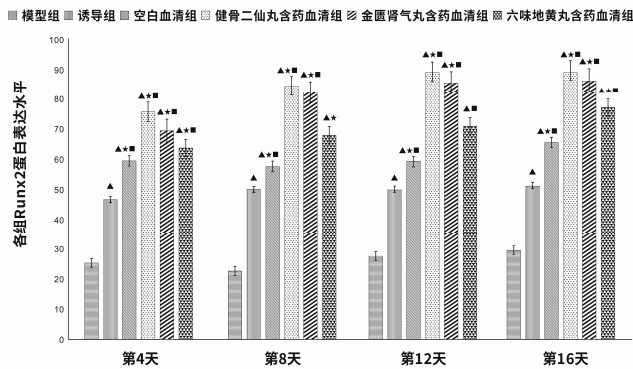


图4 各组衰老 BMSCs 中 Runx2 蛋白表达水平

注:与模型组相比,▲ $P<0.05$ ;与诱导组相比,\* $P<0.05$ ;与空白血清组相比,■ $P<0.05$ 。

## 4 讨论

骨质疏松症是一种全身性、炎症性的骨骼疾病,患者即使在轻微外力作用下即可发生脆性骨折,进而造成创伤<sup>[6]</sup>。其发病机制与 Runx2、Wnt/ $\beta$ -catenin、PI3K/Akt 等多种影响骨代谢的信号通路有关<sup>[17-18]</sup>。Runx2 是骨发育过程中重要的转录因子,对成骨细胞的分化、软骨细胞成熟、破骨细胞的分化及细胞外基质的分泌都有重要的调控作用。因此,研究

Runx2 基因的表达调控、传导通路,对治疗骨代谢疾病具有重要意义<sup>[19]</sup>。BMSCs 是成骨细胞的起源,具有自我更新及多向分化的潜能,在一定条件下可通过成骨分化促进骨生成<sup>[20]</sup>,随着人们年龄的增长,机体最终逐渐衰老,各器官功能逐渐减退,衰老 BMSCs 趋向成脂分化而非成骨分化。因此,治疗骨质疏松症及其骨折等并发症可通过促进 BMSCs 成骨分化来实现<sup>[21]</sup>。

中医学无骨质疏松症明确命名,多将其归类为“骨痿”“骨枯”等范畴,认为骨质疏松症是先天遗传、饮食劳倦、年老体衰、六淫、情志等原因所致,病位在肾,与肝、脾有关,病机为肝肾亏虚。大量研究表明,各种补肾单药或合方可促进 BMSCs 成骨分化,如 LIN 等<sup>[22]</sup>发现牛膝多糖可以显著促进 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化,使成骨基因 Runx2、成骨细胞特异性转录因子(Osterix, Osx)的 mRNA 表达量有所提高。Runx2、Osx 可以调节骨桥蛋白、唾液蛋白和骨钙素的表达,从而促进骨形成的发生。健骨二仙丸是由《医方考》中龟鹿二仙胶加续断、山药组成的经验方,主要作用是补肾填髓。徐卫峰等<sup>[23]</sup>的研究表明,龟鹿二仙胶可以通过逆转骨形成/骨吸收的不平衡来预防骨质疏松症。六味地黄丸方剂源自宋代《小儿药证直决》,是治疗肾阴虚证的常用、有效方剂。研究表明,六味地黄丸可提高临床患者骨密度<sup>[24]</sup>、改善临床症状<sup>[25]</sup>,对钙的吸收和骨的重建有益。金匱肾气丸由干地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮、附子、桂枝组成,具有温补肾阳、化气行水之功效。张倩等<sup>[26]</sup>研究显示,金匱肾气丸通过影响碱性磷酸酶、白细胞介素-6、骨保护素的表达抑制破骨细胞活性,促进骨形成,改善骨组织微结构,提高骨密度,以改善骨质疏松症。因此,本实验探究 3 种补肾中药对衰老 BMSCs 成骨分化及 Runx2 的影响,对于防止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、六味地黄丸含药血清组在衰老

BMSCs 分化过程中,均可使茜素红染色增多,即钙离子增多,成骨分化增多。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 Runx2 的表达,对比诱导组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而六味地黄丸含药血清亦能促进 Runx2 的表达,但对比诱导组,仅在第 4、8、16 天差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),对比空白血清组,仅在第 4、12、16 天差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

综上所述,使用 3 种补肾方含药血清对衰老 BMSCs 进行干预,可增加钙离子而使茜素红染色增多,促进 Runx2 表达,促进其成骨分化,增加骨量生成。今后将进一步加强其机制研究,为临床使用补肾方药防治骨质疏松症提供理论依据。

## 参考文献

- [1] POURESMAEILI F, KAMALIDEHGHAN B, KAMAREHEI M, et al. A comprehensive overview on osteoporosis and its risk factors[J]. Therapeutics and Clinical Risk Management, 2018, 14(103): 2029–2049.
- [2] ENGSTR M A. Associations between dietary cadmium exposure and bone mineral density and risk of osteoporosis and fractures among women[J]. Bone, 2012, 50(6): 1372–1378.
- [3] 陈文辉,蒋云霞,李双蕾,等.壮骨方煮散对脾肾两虚夹瘀型绝经后低骨量人群的防治疗效评价[J].中华中医药杂志,2021,36(3): 1556–1559.
- [4] ZHU L H, DAI C Y. Study on the anti-osteoporosis of the southern medicine Daguorong[J]. Guangdong Chemical Industry, 2020, 47(10): 61–62.
- [5] 戴靖榕,李 婕,何 旭,等.慢性疾病稳定期老年患者发生骨质疏松症的影响因素研究[J].中国全科医学,2022,25(18):2194–2200.
- [6] LIU Y B, LI B. A review of collagen peptides in preventing osteoporosis and its mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(9): 373–381.
- [7] TANG H F, YAO X S, QI X N. Analysis of the mechanism of invigorating the kidney and spleen Chinese medicines to improve the intestinal flora in the treatment of osteoporosis [J]. Journal of Practical Chinese Internal Medicine, 2021, 35(3): 1–4.
- [8] 张 鹏,罗 伟.老年性骨质疏松症中医证型与骨代谢指标的相关性研究[J].山东中医杂志,2020,39(3):265–267,276.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 王 凯,黄 凯,董 平,等.活血定眩胶囊含药血清对氧糖剥夺条件下 b End.3 细胞的保护作用[J].中国临床药理学杂志,2022,38(15):1796–1799.
- [13] 王力倩,李仪奎,符胜光,等.血清药理学方法研究探索[J].中药药理与临床,1997,13(3):29–31.
- [14] 徐 飞,郑泽航,徐汉青,等.过氧化氢诱导小鼠骨髓间充质干细胞衰老细胞模型的建立[J].中南医学科学杂志,2021,49(2):129–132.
- [15] 周倍伊,吴亚娜,周 围,等.大鼠骨髓间充质干细胞培养鉴定及复方扶芳藤合剂含药血清对细胞增殖的影响[J].广西中医药, 2020,43(2):56–61.
- [16] 王海龙,李 龙,伊力哈木·托合提,等.miR-106b-5p 调控老年骨质疏松性骨折的分子网络[J].中国组织工程研究,2022,26(2): 239–244.
- [17] 赵金龙,曾令烽,梁桂洪,等.基于信号通路的中药有效成分治疗骨质疏松机制研究进展[J].中草药,2020,51(23):6084–6094.
- [18] 刘金勇,王和鸣,林 坚,等.龟鹿补骨方辨治绝经后骨质疏松症患者 Th17/Treg 细胞因子的调节作用[J].中国实验方剂学杂志, 2020,26(24):116–121.
- [19] 李 娜,代晓霞.Runx2 在骨形成中的作用及调控[J].国外医学(医学地理分册),2018,39(4):353–356.
- [20] NIEDERMAIR T, LUKAS C, LI S S, et al. Influence of extracellular vesicles isolated from osteoblasts of patients with cox-arthrosis and/or osteoporosis on metabolism and osteogenic differentiation of BMSCs[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8(13): 5520–5525.
- [21] 姜朝阳,谢兴文,徐世红,等.骨髓间充质干细胞成骨分化相关信号通路[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2020,13(5):473–478.
- [22] LIN Z Z, et al. Structural characterization and in vitro osteogenic activity of ABPB-4, a heteropolysaccharide from the rhizome of *Achyranthes bidentata* [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 259: 117553.
- [23] 徐卫峰,朱旭祥,何 丹,等.基于 TGF- $\beta$ /Smad 与 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨龟鹿二仙胶对去势大鼠骨质疏松的保护作用[J].中国现代应用药学,2022,39(13):1661–1667.
- [24] 于雪冰,马建强,汪 栋,等.六味地黄丸治疗绝经后骨质疏松症肾阴虚证对骨钙素、骨密度及 JAK/STAT 信号通路的影响[J].中药材,2020,43(3):734–737.
- [25] 杨 旭,王花欣,张 倩,等.六味地黄丸联合密固达对骨质疏松症的临床疗效及生活质量的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2022,28(14):115–120.
- [26] 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.

(本文编辑 周 旦)