

补肾健脾活血方对去卵巢大鼠 BMP2/Smad 信号通路的影响

柴爽¹, 王吉利¹, 黄佳纯¹, 黄宏兴^{2*}, 万雷², 刘少津¹, 汪悦东¹, 胡仕畅¹

(1. 广州中医药大学 岭南医学研究中心中医骨伤科学实验室, 广州 510006;

2. 广州中医药大学 附属骨伤科医院, 广州 510405)

[摘要] **目的:**研究补肾健脾活血方对去卵巢大鼠骨形态发生蛋白2(BMP2)/Smad 信号通路的影响。**方法:**72只6月龄雌性SD大鼠,随机分为假手术组(24只),手术组(48只),双侧卵巢切除法造模,术后3个月两组各随机选取12只检测骨密度验证造模成功。手术组剩余的36只大鼠随机分为双侧卵巢切除模型组(OVX),补肾健脾活血方组(BSJPHX,给药剂量 $2.979\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),阿仑膦酸钠维D₃片(Ⅱ)组(ALN,给药剂量 $1.02\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),假手术组,OVX组给与等体积生理盐水灌胃。12周后处死各组大鼠,双能X射线法检测大鼠全身骨密度,生物力学试验进行胫骨三点弯曲试验,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测BMP2,Smad1,Runx2,OPG基因的表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测BMP2,p-Smad1,Runx2,OPG蛋白的表达。**结果:**造模3个月后,与假手术组比较,OVX组大鼠骨密度明显降低,最大载荷及刚度均降低,BMP2,Smad1,Runx2,OPG基因和蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);给药3个月后,与OVX组比较,BSJPHX组,ALN组骨密度均明显增高,最大载荷及刚度均增加,能显著提高BMP2,Smad1,Runx2,OPG基因和蛋白表达水平($P < 0.05$)。**结论:**补肾健脾活血方既能通过调控BMP2/Smad通路的信号转导,又能上调OPG的表达,这可能是补肾健脾活血方防治绝经后骨质疏松症的机制之一。

[关键词] 补肾健脾活血方;去卵巢大鼠;骨形态发生蛋白2(BMP2)/Smad信号通路;绝经后骨质疏松症;骨保护素

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0129-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182038

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180727.0914.003.html>

[网络出版时间] 2018-07-30 15:27

Effect of Bushen Jianpi Huoxue Recipe on BMP2/Smad Signaling Pathway in Ovariectomized Rats

CHAI Shuang¹, WANG Ji-li¹, HUANG Jia-chun¹, HUANG Hong-xing^{2*},

WAN Lei², LIU Shao-jin¹, WANG Yue-dong¹, HU Shi-chang¹

(1. Laboratory of Orthopaedics and Traumatology of Chinese Medicine of Lingnan Medical Research

Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Bushen Jianpi Huoxue recipe (BSJPHX) on bone morphogenetic protein2 (BMP2) /Smad signaling pathway in ovariectomized rats. **Method:** Seventy-two female SD rats aged 6 months were randomly divided into sham group (24) and operation group (48). The rats were ovariectomized to reproduce the model of osteoporosis. After 3 months, 12 rats were randomly selected to measure bone mineral density, so as to verify successful modeling in each group. The remaining 36 rats in the operation group were randomly divided into ovariectomized (OVX) group, BSJPHX ($2.979\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group and alendronate

[收稿日期] 20180418(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81674004,81673786);广东省科技计划项目(2016A020216024,2016ZC0096)

[第一作者] 柴爽,在读博士,从事中医药防治骨质疏松症研究,Tel:020-22292888,E-mail:chaishuang2013@163.com

[通信作者] *黄宏兴,博士,教授,从事中医药防治骨质疏松症研究,Tel:020-22292888,E-mail:gzhhx@126.com

sodium and vitamin D₃ tablets (ALN, 1.02 mg·kg⁻¹) group. After 12 weeks, bone mineral density in lumbar vertebrae was measured by dual energy X-ray. Biomechanical test was performed to tibia. Expressions of BMP2, Smad1, Runt related transcription factor 2 (Runx2), and osteoprotegerin (OPG) genes were detected by Real-time PCR. Expressions of BMP2, p-Smad1, Runx2, OPG protein was detected by Western blot. **Result:** After 3 months of modeling, compared with sham group, the BMD of rats in OVX group was significantly lower, both the maximum load and rigidity reduced ($P < 0.05$); after 3 months of administration, compared with OVX group, the bone mineral density of BSJPHX and ALN groups was significantly higher, both the maximum load and rigidity increased, and expression levels of BMP2, Smad1, Runx2, and OPG genes significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** BSJPHX can not only regulate BMP2/Smad pathway, but also up-regulate the expression of OPG, which may be one of the mechanisms of BSJPHX in prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis.

[Key words] Bushen Jianpi Huoxue recipe; ovariectomized rats; bone morphogenetic protein 2 (BMP2) /Smad signaling pathway; postmenopausal osteoporosis (PMOP); osteoprotegerin (OPG)

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是最常见的原发性骨质疏松症, 据统计, 妇女绝经后 5 年内骨量会快速流失, 是绝经前丢失量的 2~3 倍, 约 38.89% 的绝经后女性将出现骨质疏松^[1-2], 60~90 岁女性的患病率更可达 50%~70%^[3]。PMOP 所引起的疼痛、骨折等问题已严重影响患者的生活质量。补肾健脾活血方由右归饮(《景岳全书》)合苁蓉汤(《圣济总录》)加减化裁, 由补骨脂、淫羊藿、肉苁蓉、熟地黄、白芍、黄芪、菟丝子、丹参、当归、大枣共 10 味中药组成, 前期临床研究发现补肾健脾活血方可明显缓解老年女性骨质疏松症患者的疼痛症状, 降低骨质疏松性椎体压缩骨折术后椎体再骨折的风险^[4-5]; 前期实验研究发现补肾健脾活血方含药血清可上调 MG63^[6] 和 UMR106^[7] 成骨细胞株骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 的表达。研究发现 BMP2 在骨形成中起重要作用^[8-9], BMP2/Smad 信号通路是参与成骨细胞分化及细胞外基质合成的重要通路^[10-11]。因此, 本研究采用去卵巢大鼠绝经后骨质疏松症模型, 观察补肾健脾活血方对骨密度和生物力学性能的影响, 并从调控 BMP2/Smad 信号通路的角度探讨补肾健脾活血方对绝经后骨质疏松症的防治作用机制。

1 材料

1.1 动物 6 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 72 只, 体重 (321 ± 70) g 购自广州中医药大学实验动物中心, 合格证号 SCXK(粤)2013-0034。本实验的开展取得了广州中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准编号 S2016046)。实验在广州中医药大学实验动物中心屏障环境动物实验室进行, 许可证号 SYXK(粤)2013-0001, 动物实验设施使用证号 00166758。

1.2 药物与试剂 补肾健脾活血方由广州中医药大学附属骨伤科医院药剂科提供, 所有药材经广州中医药大学附属骨伤科医院吴雪茹主任中药师鉴定为正品, 含生药量 1.43 g·mL⁻¹; 阿仑膦酸钠维 D₃ 片(II)(杭州默沙东制药有限公司, 批号 N010878); trizol(美国 Invitrogen 公司, 批号 127803); PrimeScript™ RT Master Mix, TB Green Premix Ex Taq™ II(日本 Takara 公司, 批号分别为 AK5402, AHG0495A); BMP2, 磷酸化-Smad1(p-Smad1)抗体(北京四正柏生物科技有限公司, 批号分别为 4AK201716F, 4AI281720F); Runt 相关转录因子 2(Runx2), 骨保护素(OPG)抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为 GR3189819-2, GR257622-14); 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔(美国 CST 公司, 批号 27); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司, 批号 0074430102)。

1.3 仪器 Discovery A 型双能 X 射线骨密度仪小动物专用扫描和分析软件(美国 Hologic 公司); MTS-858 miniBionix 型生物材料力学试验机, CFX96™ 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)扩增仪, Mini-protein tetra 小型垂直电泳仪/转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 72 只 SD 大鼠随机分为假手术组、手术组, 分别为 24 只和 48 只。采用背侧入路双侧卵巢切除法进行造模^[12]。假手术组切除卵巢旁约等卵巢体积的脂肪组织。术后单笼饲养并给予青霉素肌肉注射 8 万单位/d, 连续 1 周。术后 3 个月两组各随机选取 12 只进行骨密度测定以验证造模成功。手术组剩余的 36 只大鼠随机分为

模型组(OVX),补肾健脾活血方组(BSJPHX),阿仑膦酸钠维 D₃ 片(Ⅱ)组(ALN),分别进行药物干预。根据人与大鼠间药物剂量换算方法计算给药量,BSJPHX 组按 2.979 g·kg⁻¹灌胃给药,ALN 组按 1.02 mg·kg⁻¹灌胃给药,假手术组和 OVX 组给予等体积的生理盐水,每日 1 次,连续 3 个月。

2.2 骨密度检测 腹腔注射水合氯醛麻醉后取俯卧位,采用双能 X 射线测定大鼠骨密度。

2.3 骨生物力学检测 处死大鼠后,完整分离左侧胫骨,剔除周围附着的软组织,生理盐水湿纱布包裹,-20℃保存备用。检测前室温解冻,于 MTS 上进行胫骨三点弯曲试验。

2.4 Real-time PCR 检测 BMP2, Smad1, Runx2, OPG mRNA 的相对表达量 取胫骨近端骨组织,液氮研磨后 trizol 法提取总 RNA,按照 PrimeScript RT Master Mix 说明书进行逆转录反应。Real-time PCR 反应体系为 2×SYBR Premix Ex Taq II 7.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,cDNA 2 μL,dH₂O 补平体积 15 μL;反应条件为 95℃预变性 30 s,95℃5 s,60℃30 s,42 个循环;熔解曲线分析条件为 95℃10 s,65℃5 s。以 2^{-ΔΔC_t}计算对应 mRNA 的相对表达量。实验重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列	片段长度 /bp
BMP-2	上游 5'-TGC GG TCT CCT AA AGG TCG -3'	179
	下游 5'-ACT CAA ACT CG CT GAG GAC G -3'	
Smad1	上游 5'-TCA ATAG AGG AG ATGT TCA AGC AGT -3'	133
	下游 5'-AA ACC ATCC ACC AA CAC GCT -3'	
Runx2	上游 5'-TCT CCAG GAG CAC GA AGG -3'	98
	下游 5'-TTG CAG CCT TAA ATG ACT CG GT -3'	
OPG	上游 5'-GTG GAAT AG ATGT CACC CTGT GC -3'	165
	下游 5'-TTT GCT CT TGC GAG CTGT GT -3'	

表 3 补肾健脾活血方对 OVX 大鼠骨密度和生物力学的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Bushen Jianpi Huoxue recipe on bone mineral density and biomechanical indexes in OVX rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	骨密度/g·cm ⁻²	刚度/N·mm ⁻¹	最大载荷/N
假手术	-	9	0.177 8 ± 0.007 6	506.38 ± 59.42	124.59 ± 19.36
OVX	-	11	0.161 9 ± 0.002 1 ¹⁾	340.08 ± 3.57 ¹⁾	73.85 ± 20.08 ¹⁾
BSJPHX	2.979	10	0.169 6 ± 0.005 1 ²⁾	485.22 ± 35.23 ²⁾	119.46 ± 13.59 ²⁾
ALN	1.02 × 10 ⁻³	12	0.173 5 ± 0.007 3 ²⁾	508.37 ± 64.88 ²⁾	116.33 ± 8.31 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾P < 0.05;与 OVX 组比较²⁾P < 0.05(表 4,5 同)。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 BMP2, p-Smad1, Runx2, OPG 蛋白表达量 取胫骨近端骨组织,液氮研磨后使用全细胞裂解液(加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂)冰上裂解 30 min,4℃15 000 r·min⁻¹离心 15 min 取上清提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,计算上样量 50 μg,加入适量 5×上样缓冲液,进行 10% 的 SDS-PAGE 电泳,将蛋白湿转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,TBST 洗膜,分别加入 BMP2, p-Smad1, Runx2, OPG (1:1 000 稀释)一抗 4℃孵育过夜,HRP 偶联二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,采用 ECL 法显影,Image J 图像处理软件分析各条带的灰度值。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计分析软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动物数量分析 实验过程中,因麻醉意外、术后护理不当、灌胃不当致死 6 只,最终纳入研究的实验动物数量为 66 只。

3.2 OVX 对大鼠骨密度的影响 造模 3 个月后进行骨密度检测,与假手术组相比,手术组骨密度明显降低(P < 0.05),说明绝经后骨质疏松模型建立成功。见表 2。

表 2 去卵巢对大鼠骨密度的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

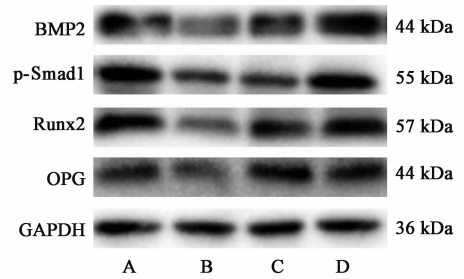
Table 2 Effect of ovariectomy on BMD in rats($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	骨密度/g·cm ⁻²
假手术	0.184 9 ± 0.004 9
OVX	0.169 1 ± 0.010 5 ¹⁾

注:与假手术组比较¹⁾P < 0.05。

3.3 对 OVX 大鼠骨密度及生物力学情况的影响 药物干预 3 个月,与假手术组比较,OVX 组骨密度、刚度和最大载荷均明显降低(P < 0.05);与 OVX 组比较,BSJPHX 组和 ALN 组骨密度、刚度和最大载荷均明显升高(P < 0.05)。见表 3。

3.4 对 OVX 大鼠骨组织 BMP2, Smad1, Runx2, OPG mRNA 和蛋白表达的影响 与假手术组比较, OVX 组 BMP2, Smad1, Runx2, OPG mRNA 水平均降低 ($P < 0.05$)。与 OVX 组比较, BSJPHX 组和 ALN 组 BMP2, Smad1, Runx2, OPG mRNA 和蛋白水平均升高 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, OVX 组 BMP2, p-Smad1, Runx2, OPG 蛋白水平均降低 ($P < 0.05$)。与 OVX 组比较, BSJPHX 组和 ALN 组 BMP2, p-Smad1, Runx2, OPG 蛋白水平均升高 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 4, 5。



A. 假手术组; B. OVX 组; C. BSJPHX 组; D. ALN 组

图 1 BMP2/Smad 信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 1 Expression of BMP2/Smad signaling pathway related proteins by electrophoresis

表 4 补肾健脾活血方对 OVX 大鼠 BMP2, Smad1, Runx2, OPG mRNA 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Bushen Jianpi Huoxue recipe on BMP2, Smad1, Runx2, OPG mRNA in OVX rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BMP2	Smad1	Runx2	OPG
假手术	-	1.01 ± 0.18	1.03 ± 0.16	1.01 ± 0.12	1.03 ± 0.25
OVX	-	0.32 ± 0.03 ¹⁾	0.48 ± 0.04 ¹⁾	0.28 ± 0.03 ¹⁾	0.51 ± 0.03 ¹⁾
BSJPHX	2.979	2.78 ± 0.96 ²⁾	2.74 ± 0.95 ²⁾	1.76 ± 0.59 ²⁾	3.02 ± 0.75 ²⁾
ALN	1.02 × 10 ⁻³	3.06 ± 1.24 ²⁾	2.67 ± 1.03 ²⁾	2.03 ± 0.31 ²⁾	2.98 ± 0.67 ²⁾

表 5 补肾健脾活血方对 BMP2/smad 信号通路相关蛋白的相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Bushen Jianpi Huoxue recipe on relative expression of BMP2/smad signaling pathway related proteins ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BMP2/GAPDH	p-Smad1/GAPDH	Runx2/GAPDH	OPG/GAPDH
假手术	-	1.33 ± 0.34	1.15 ± 0.43	1.30 ± 0.13	1.39 ± 0.21
OVX	-	0.63 ± 0.03 ¹⁾	0.80 ± 0.03 ¹⁾	0.77 ± 0.05 ¹⁾	0.91 ± 0.04 ¹⁾
补肾健脾活血方	2.979	1.12 ± 0.35 ²⁾	1.40 ± 0.81 ²⁾	1.59 ± 0.39 ²⁾	1.10 ± 0.06 ²⁾
ALN	1.02 × 10 ⁻³	1.09 ± 0.12 ²⁾	1.30 ± 0.42 ²⁾	1.72 ± 0.57 ²⁾	1.71 ± 0.33 ²⁾

4 讨论

中医对骨质疏松的认识多归于“骨痿”,认为肾虚是骨质疏松发生的根本^[13]。本课题组认为肾虚为本,脾虚是骨质疏松的促进因素,血瘀是骨质疏松形成的病理机制。补肾健脾活血方以补骨脂为君药,臣以淫羊藿、肉苁蓉、菟丝子补肾助阳强骨,佐以熟地、白芍滋阴以“阴中求阳”,使“阳得阴助而生化无穷”。配合丹参、当归活血通络,黄芪益气,大枣合中,共奏补肾壮骨、健脾益气、活血通络之功。前期体内外研究表明补肾健脾活血方可改善去卵巢大鼠的骨密度和血清雌激素水平^[14],通过调控 DKK-1/Sost/Wnt 信号通路影响成骨细胞的代谢^[15]。本研究发现补肾健脾活血方可改善去卵巢大鼠胫骨生物力学性能,提高胫骨刚度和最大载荷。

BMP2/Smad 信号通路能调控成骨细胞的全部过程,其功能障碍可引起骨量降低及骨形成减少,导致骨质疏松症。BMP2 具有促骨形成和异位成骨的

生物特征,是经典 BMPs/Smad 通路的重要配体^[16], BMP2 与细胞表面的受体 BMPR I, BMPR II 结合形成复合物,II 型受体自身磷酸化激活后,再激活 I 型受体,活化的 I 型受体与 Smad1,5,8 结合使其磷酸化,p-Smad1,5,8 再与 Smad4 相结合形成三聚体复合物入核,结合到靶基因上从而调控靶基因的转录和表达^[17-18]。研究发现在成骨细胞中 BMP2/Smad 信号通路可上调 Runx2, Osterix 的表达进而影响成骨分化^[19-20]。不同研究表明转化生长因子-β₁ (TGF-β₁)/Smads 通路可能是绝经后骨质疏松症和糖皮质激素性骨质疏松症发生的重要机制之一^[21-22]。本研究发现,去卵巢大鼠的 BMP2, p-Smad1 蛋白表达明显降低,说明 BMP2/Smad 通路的信号转导显著减弱,导致 Runx2 蛋白的表达减少影响成骨分化进而影响骨密度和生物力学性能。补肾健脾活血方既能上调 BMP2 基因和蛋白的表达,又能上调 Smad1 基因和活性形式的 p-Smad1 蛋白的表达,说明补肾

健脾活血方可从 BMP2, Smad1 两个靶点调控 BMPs/Smad 信号通路及下游 Runx2 的表达。OPG 是成骨细胞分泌的, 与核因子 κ B 受体活化因子(RANK) 竞争性结合 RANK 配体(RANKL), 阻止 RANKL 与 RANK 之间的结合, 抑制破骨细胞的分化。本研究发现, 去卵巢可下调 OPG 的表达, 补肾健脾活血方能提高 OPG mRNA 和蛋白水平。

综上所述, 补肾健脾活血方既能通过调控 BMP2/Smad 通路的信号转导上调 Runx2 基因的表达促进成骨细胞分化, 又能通过上调 OPG 的表达抑制破骨细胞分化。这可能是补肾健脾活血方防治绝经后骨质疏松症的机制之一。

[参考文献]

[1] 邓静. 钙摄入、体力活动与围绝经期骨丢失关系的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2010.

[2] 覃素娇, 罗颖华, 罗珍玉, 等. 广西南宁市区绝经后女性骨质疏松症流行情况及相关因素研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(7): 942-946.

[3] 李绪贵, 张琦, 熊昌军. 绝经后骨质疏松症的患病情况及相关危险因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(29): 5047-5049.

[4] 万雷, 黄宏兴, 蔡桦, 等. 补肾健脾活血方对老年女性骨质疏松患者疼痛和血清 β -CTx、N-MID、T-PINP 的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(9): 1690-1692.

[5] 李颖, 姜志强, 黄宏兴, 等. 补肾健脾中药复方预防椎体成形术后再骨折的随访研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(5): 667-671.

[6] 王凡, 黄宏兴, 王吉利, 等. 补肾健脾活血方干预过表达 DKK1 骨细胞对细胞活性及 BMP2 的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(6): 711-714.

[7] 柴生颢, 谢平金, 万雷, 等. 补肾健脾活血方含药血清对 UMR106 细胞成骨分化和骨形成相关蛋白的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(3): 361-365.

[8] Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice[J]. Biomaterials, 2007, 28(29): 4240-4250.

[9] Gamer L W, Pregizer S, Gamer J, et al. The role of Bmp2 in the maturation and maintenance of the murine knee joint[J]. J Bone Miner Res, 2018, doi:10.1002/jbmr3441.

[10] 孔祥英, 万蓉, 李莉, 等. 不同治法方药对激素性股骨

头坏死鸡成骨相关因子的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 614-617.

[11] LI H, NIE B, DU Z, et al. Bacitracin promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by stimulating the bone morphogenetic protein-2/Smad axis [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 588-597.

[12] Thompson D D, Simmons H A, Pirie C M, et al. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis [J]. Bone, 1995, 17(S4): 125S-133S.

[13] 许惠娟, 李生强, 陈娟, 等. 绝经后骨质疏松症不同年龄段中医证型分布特点[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 157-161.

[14] 李颖, 黄宏兴, 庄洪, 等. 中药骨康对去势大鼠骨质疏松作用机制的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(2): 160-163.

[15] 王凡. 基于 DKK-1/Sost/Wnt 信号通路研究补肾健脾活血方防治骨质疏松的骨保护机制[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.

[16] CHENG Q, TANG W, Sheu T J, et al. Circulating TGF- β 1 levels are negatively correlated with sclerostin levels in early postmenopausal women [J]. Clin Chim Acta, 2016, 455(2): 87-92.

[17] CHEN H B, SHEN J, Ip Y T, et al. Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway [J]. Genes Dev, 2006, 20(6): 648-653.

[18] Schilling S H, Datto M B, WANG X F. A phosphatase controls the fate of receptor-regulated Smads [J]. Cell, 2006, 125(5): 838-840.

[19] Poon B, Kha T, Tran S, et al. Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls [J]. J Pharm Pharmacol, 2016, 68(2): 139-147.

[20] DONG M, JIAO G, LIU H, et al. Biological silicon stimulates collagen type 1 and osteocalcin synthesis in human osteoblast-like cells through the BMP-2/Smad/RUNX2 signaling pathway [J]. Biol Trace Elem Res, 2016, 173(2): 306-315.

[21] 艾思羽. 左、右归丸及其拆方对去卵巢大鼠骨组织 TGF- β 1/Smads 信号转导通路的影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2017.

[22] 杨燕, 年宏蕾, 刘仁慧, 等. 淫羊藿-女贞子配伍对糖皮质激素性骨质疏松大鼠 TGF- β 1/Smads 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9): 99-104.

[责任编辑 周冰冰]