

# 淫羊藿-女贞子配伍对糖皮质激素性骨质疏松大鼠 TGF- $\beta_1$ /Smads 通路的影响

杨燕, 年宏蕾, 刘仁慧\*, 王秀娟\*

(首都医科大学 中医药学院, 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069)

**[摘要]** **目的:**观察淫羊藿-女贞子煎剂及其有效成分提取物配伍对糖皮质激素性骨质疏松(GIOP)大鼠转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )/Smads 通路相关蛋白的影响,并探讨其相关的作用机制。**方法:**雄性 SPF 级 SD 大鼠 49 只,随机分为正常组,模型组,淫羊藿-女贞子提取物高、低剂量组(200, 100 mg·kg<sup>-1</sup>),淫羊藿-女贞子水煎剂高、低剂量组(7, 3.5 g·kg<sup>-1</sup>)和钙尔奇组(0.277 3 g·kg<sup>-1</sup>)。除正常组外,大鼠两大腿内侧交替肌肉注射地塞米松(1 mg·kg<sup>-1</sup>)造模,每周 2 次。8 周后,观察大鼠体重变化,取大鼠股骨,称量其湿重、干重以及煅烧后的灰重,计算股骨湿重、干重、灰重和体积的比值,采用免疫荧光法检测大鼠股骨 TGF- $\beta_1$ , 磷酸化 Smad2/3 (p-Smad2/3), Smad4, Smad7 蛋白的表达情况。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠体重和骨量均降低( $P < 0.01$ ),骨组织 TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3 及 Smad4 蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ ), Smad7 蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组体重和骨量均显著增加,各淫羊藿-女贞子煎剂及提取物组大鼠股骨 TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3 及 Smad4 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Smad7 蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ )。**结论:**淫羊藿-女贞子通过上调 TGF- $\beta_1$ /Smads 通路中 TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3 及 Smad4 蛋白表达,下调 Smad7 蛋白表达,增强成骨细胞功能,减少 GIOP 大鼠骨量丢失。

**[关键词]** 骨质疏松; 糖皮质激素; 淫羊藿-女贞子; TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0099-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017090099

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170215.0920.006.html>

**[网络出版时间]** 2017-02-15 9:20

## Effect of Epimedii Folium Combined with Ligustri Lucidi Fructus on TGF- $\beta_1$ /Smads Pathway in Glucocorticoid-induced Osteoporosis Rats

YANG Yan, NIAN Hong-lei, LIU Ren-hui\*, WANG Xiu-juan\*

(School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Collateral Disease Research, Beijing 100069, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects of the decoction and active ingredients of Epimedii Folium combined with Ligustri Lucidi Fructus on transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )/Smads pathway in glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP) rats. **Method:** The 49 male SD rats were randomly divided into 7 groups: the normal group, the model group, the extract of Epimedii Folium combined with Ligustri Lucidi Fructus groups (200, 100 mg·kg<sup>-1</sup>), the decoction groups (7, 3.5 g·kg<sup>-1</sup>) and Caltrate calcium D3 group (0.277 3 g·kg<sup>-1</sup>), with 7 rats in each group. All of the rats were given dexamethasone (1 mg·kg<sup>-1</sup>) through intramuscular injection twice a week to establish osteoporosis model. After eight weeks, the rats were put to death, and left

**[收稿日期]** 20161209(020)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373814);北京市教育委员会科技计划面上项目(KM201510025012);北京中医药薪火传承“3+3”工程二室一站建设项目(2012-SZ-C-42)

**[第一作者]** 杨燕,在读硕士,从事中药及复方的药效及作用机制研究, Tel: 13520387682, E-mail: yangyan801@126.com

**[通讯作者]** \*刘仁慧,副教授,硕士生导师,从事中药配伍及药效学研究, Tel: 010-83911630, E-mail: liurenhui995@163.com;

\*王秀娟,教授,博士生导师,从中药药效与作用机制研究, Tel: 010-83911624, E-mail: wxj0517@sina.com

femurs were collected to measure weight, calculate the ratio of wet weight, dry weight and ash weight to bone volume. The protein expressions of TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3, Smad4, Smad7 were observed by immunofluorescence staining. **Result:** Body weight, bone mass and the expressions of TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3 and Smad4 in model group were lower than those in normal group ( $P < 0.01$ ), the protein levels of TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3 and Smad4 significantly decreased ( $P < 0.01$ ), while Smad7 protein expression were higher in femurs ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the body weight and bone mass increased significantly in each administration group, the protein levels of TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3 and Smad4 were increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and Smad7 protein expression was decreased in all Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus treatment groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The mechanism of the combination of Epimedii Folium and Fructus Ligustri Lucidi in treating GIOP may be related to the up-regulation on the expressions of TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3 and Smad4, down-regulation on the expression of Smad7, and strengthening of the function of osteoblasts, and reduction of bone loss in GIOP rats.

**[Key words]** osteoporosis; glucocorticoid; Epimedii Folium-Ligustri Lucidi Fructus; transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) /Smads pathway

糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 因其高效的抗炎及免疫调节作用被广泛应用于临床,但长期服用会导致诸多不良反应<sup>[1]</sup>。糖皮质激素性骨质疏松症 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 是应用 GC 治疗疾病过程中最严重的并发症之一,也是医源性骨质疏松常见的原因,其发病率高达 50%<sup>[2-3]</sup>。GC 引起骨量丢失的程度与其累积剂量和持续应用时间有关,GC 剂量越大、疗程越长,自发性骨折的发生率越高<sup>[4]</sup>。目前,GIOP 缺乏有效的治疗方法。中医认为,“肾虚精亏,阴阳两虚”为 GIOP 发病的核心机制,治宜补肾填精壮骨之法。课题组前期实验研究发现,“平补阴阳,益精壮骨”之淫羊藿-女贞子配伍对应用 GC 导致的大鼠骨代谢生化指标异常具有良好的保护作用<sup>[5-6]</sup>,但其作用机制尚未明确。转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 及介导其转录的 Smads 蛋白家族调节因子在骨重建中发挥着重要的作用,该信号转导通路的异常可抑制骨形成,加速骨破坏,使骨代谢处于紊乱的病理状态<sup>[7]</sup>。本文以 TGF- $\beta_1$ /Smads 通路为切入点,探讨淫羊藿-女贞子煎剂及其提取物防治 GIOP 的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 3 月龄 SPF 级雄性健康 SD 大鼠 49 只,体重 (200 ± 20) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号 SCXK (京) 2012-0001。SPF 级动物环境,自由饮水、摄食。本研究获得首都医科大学实验动物伦理委员会批准。

**1.2 药物及试剂** 淫羊藿总黄酮类提取物 (上海一林生物科技有限公司,批号 20150419,总黄酮质量分数以淫羊藿苷计为 80%,提取率约 2.5%),

女贞子黄酮合萜类提取物 (上海一林生物科技有限公司,批号 20150221,含量分别以齐墩果酸和芦丁计,总质量分数 > 80%,提取率约 5%);淫羊藿、女贞子中药材 (北京同仁堂药店,经首都医科大学中药鉴定学专业罗容教授鉴定,均符合 2015 版《中国药典》项下规定);地塞米松磷酸钠注射液 (国药集团容生制药有限公司,批号 1501408-C22),钙尔奇碳酸钙 D<sub>3</sub> 片 (惠氏制药有限公司,批号 20141218),抗荧光衰减封片剂 (中国 Solarbio 公司,批号 20160302);FITC 标记山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG),TRITC 标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 ZF-0311, ZF-0313);TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3, Smad7 抗体 (美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-146, sc-11769, sc-11392);Smad 4 抗体 (英国 Abcam 公司,批号 ab40759)。

**1.3 仪器** ECLIPSE 80i 型生物显微镜及 NIS-Elements 型 BR 3.2 图像分析软件 (北京锐驰恒业仪器科技有限公司);ASP30 型全自动脱水机,EG1150H 型包埋机及 RM2235 型切片机 (德国 Leica 公司);DH4000A 型电热恒温培养箱及 SX-2.5-10 型马弗炉 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组** SD 大鼠适应性喂养 1 周,按随机数字表法分为 7 组,即正常组、模型组、淫羊藿-女贞子提取物高、低剂量组,淫羊藿-女贞子水煎剂高、低剂量组和钙尔奇组,每组 7 只。

**2.2 造模与给药** 参考文献 [8],除正常组外,各组大鼠分别给予两大腿内侧交替肌肉注射地塞米松 1 mg · kg<sup>-1</sup> 体重造模,每周 2 次,共计 8 周,正常组

大鼠注射等体积的生理盐水。造模同时各组动物灌胃相应的药物,淫羊藿-女贞子提取物高剂量组  $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,低剂量组  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (淫羊藿-女贞子有效成分提取物配比 2:3);淫羊藿-女贞子水煎剂高剂量组  $7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,低剂量组  $3.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (淫羊藿-女贞子煎剂配比 4:3);钙尔奇组灌胃钙尔奇碳酸钙  $\text{D}_3$  片  $0.2773 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;正常组、模型组,灌服等体积的生理盐水,每日 1 次。

**2.3 取材及检测** 大鼠腹腔麻醉,完整分离大鼠左、右两侧股骨。大鼠一般情况观察:每周 2 次称体重,观察大鼠体重、精神情况、毛发光泽度、二便情况等的变化。骨量检测:右侧股骨称取其湿重; $200^\circ\text{C}$  烘干 12 h,称取干重;马氟炉  $800^\circ\text{C}$  灰化 6 h,称取灰重,用阿基米德原理测定股骨体积,计算股骨湿重、干重、灰重和体积的比值。免疫荧光法检测  $\text{TGF-}\beta_1/\text{Smads}$  信号通路相关蛋白表达:左侧股骨以 4% 多聚甲醛溶液固定 2 周,10% EDTA 溶液脱钙 4 周,常规石蜡包埋,切片厚度  $3 \mu\text{m}$ ,行免疫荧光染色。组织切片常规脱蜡、水化,柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 微波修复 20 min,10% 山羊血清封闭 60 min 后,加入一抗  $50 \mu\text{L}$  ( $\text{TGF-}\beta_1$  抗体稀释比例 1:50, p-Smad2/3 抗体稀释比例 1:50, Smad4 抗体稀释比例 1:100, Smad7 抗体稀释比例 1:50),  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。常规洗涤后,加入二抗 TRITC 标记山羊抗兔 IgG, FITC 标记山羊抗兔 IgG (抗体稀释比例均为 1:200) 室温孵育 2 h,抗荧光衰减封片剂封片。光学显微镜下观察。每个骨组织切片随机选取 3 个不重叠的视野,分析每个视野的阳性表达,并用 NIS-Elements BR 3.2 软件测定积分光密度值,进行统计学分析。

**2.4 统计学分析** 数据统计采用 SPSS 17.0 软件包完成,采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差齐性

检验及单因素方差分析,根据方差齐性检验结果选择 LSD (方差齐) 或 Tamhane's  $T_2$  (方差不齐),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠一般情况的观察** 地塞米松造模过程中,模型组大鼠逐渐出现体重增长缓慢,懒动少食,毛被稀疏无光泽,弓腰塌背,喜蜷缩聚堆,便软或有便溏等现象;各给药组情况较模型组均有所改善。实验前后大鼠体重结果显示,实验开始时各组大鼠体重均无差异;实验结束时,模型组大鼠体重较正常组显著下降 ( $P < 0.01$ ),而各用药组大鼠体重均较模型组显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 淫羊藿-女贞子对 GIOP 大鼠体重的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Table 1 Effect of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus on body weight in GIOP rats ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	实验前	实验结束
正常	-	$249.86 \pm 9.14$	$506.47 \pm 15.20$
模型	-	$250.43 \pm 8.26$	$340.59 \pm 9.39^{1)}$
淫羊藿-女贞子提取物	0.1	$253.86 \pm 9.69$	$385.49 \pm 11.14^{3)}$
	0.2	$253.00 \pm 10.46$	$402.57 \pm 17.44^{3)}$
淫羊藿-女贞子水煎剂	3.5	$250.29 \pm 8.75$	$392.40 \pm 17.41^{3)}$
	7.0	$247.86 \pm 8.28$	$407.26 \pm 28.05^{3)}$
钙尔奇	0.2773	$250.57 \pm 6.19$	$366.71 \pm 7.06^{3)}$

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 2,3 同)。

**3.2 对 GIOP 大鼠骨量的影响** 与正常组比较,模型组大鼠股骨湿重/体积、干重/体积、灰重/体积均显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠股骨湿重/体积、干重/体积、灰重/体积均明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 淫羊藿-女贞子对 GIOP 大鼠骨量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Table 2 Effect of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus on bone mass in GIOP rats ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	湿重/体积	干重/体积	灰重/体积
正常	-	$1.395 \pm 0.083$	$0.930 \pm 0.074$	$0.601 \pm 0.055$
模型	-	$1.248 \pm 0.050^{1)}$	$0.786 \pm 0.059^{1)}$	$0.464 \pm 0.049^{1)}$
淫羊藿-女贞子提取物	0.1	$1.322 \pm 0.052^{2)}$	$0.865 \pm 0.079^{2)}$	$0.535 \pm 0.032^{2)}$
	0.2	$1.398 \pm 0.053^{3)}$	$0.943 \pm 0.047^{3)}$	$0.610 \pm 0.037^{3)}$
淫羊藿-女贞子水煎剂	3.5	$1.339 \pm 0.028^{2)}$	$0.876 \pm 0.049^{2)}$	$0.549 \pm 0.037^{3)}$
	7.0	$1.409 \pm 0.087^{3)}$	$0.952 \pm 0.105^{3)}$	$0.623 \pm 0.088^{3)}$
钙尔奇	0.2773	$1.320 \pm 0.076^{2)}$	$0.867 \pm 0.057^{2)}$	$0.529 \pm 0.041^{2)}$

**3.3 对 GIOP 大鼠骨组织  $\text{TGF-}\beta_1$  及 Smads 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠骨组织

$\text{TGF-}\beta_1$ , p-Smad 2/3 及 Smad4 蛋白阳性表达均显著减少 ( $P < 0.01$ ), Smad7 蛋白阳性表达显著增加 ( $P$

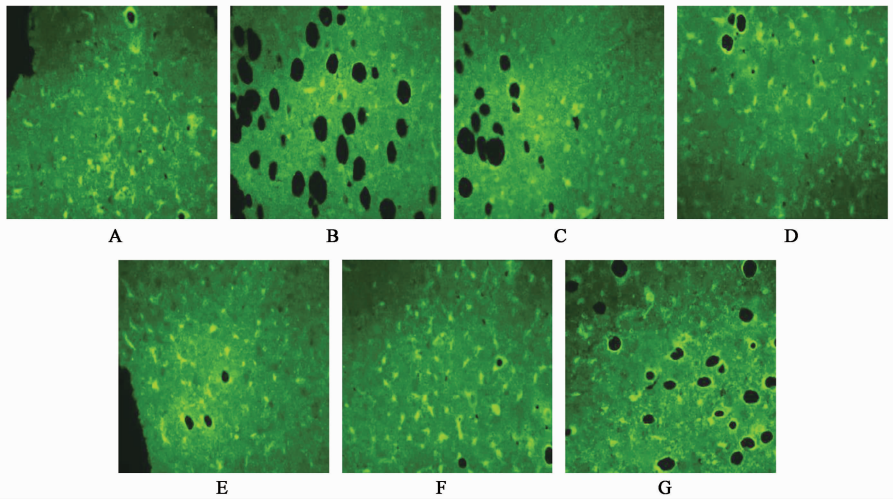
< 0.01); 与模型组比较, 各淫羊藿-女贞子煎剂及提取物组大鼠骨组织 TGF- $\beta_1$ , p-Smad 2/3 及 Smad4 蛋白阳性表达显著增加 ( $P < 0.01$ ), Smad7 蛋白阳性

表达较模型组显著减少 ( $P < 0.01$ ), 钙尔奇组大鼠骨组织 TGF- $\beta_1$  和 p-Smad2/3 蛋白阳性表达均明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 3, 图 1~4。

表 3 淫羊藿-女贞子对 GIOP 大鼠骨组织 TGF- $\beta_1$  及 Smads 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus on protein expressions of TGF- $\beta_1$  and Smads in GIOP rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TGF- $\beta_1$	p-Smad2/3	Smad4	Smad7
正常	-	624.49 ± 55.50	176.21 ± 16.75	332.23 ± 37.25	306.18 ± 39.96
模型	-	221.06 ± 20.10 <sup>1)</sup>	98.84 ± 10.74 <sup>1)</sup>	175.82 ± 24.77 <sup>1)</sup>	556.97 ± 55.95 <sup>1)</sup>
淫羊藿-女贞子提取物	0.1	417.25 ± 37.57 <sup>3)</sup>	144.40 ± 13.67 <sup>3)</sup>	263.46 ± 26.32 <sup>3)</sup>	434.53 ± 32.46 <sup>3)</sup>
	0.2	590.80 ± 52.45 <sup>3)</sup>	164.62 ± 15.16 <sup>3)</sup>	338.70 ± 32.35 <sup>3)</sup>	338.72 ± 33.46 <sup>3)</sup>
淫羊藿-女贞子水煎剂	3.5	454.11 ± 52.22 <sup>3)</sup>	152.92 ± 11.15 <sup>3)</sup>	272.52 ± 29.25 <sup>3)</sup>	403.56 ± 30.04 <sup>3)</sup>
	7.0	653.35 ± 37.15 <sup>3)</sup>	187.22 ± 14.73 <sup>3)</sup>	345.77 ± 31.60 <sup>3)</sup>	296.88 ± 39.01 <sup>3)</sup>
钙尔奇	0.277 3	293.85 ± 49.17 <sup>2)</sup>	128.57 ± 9.12 <sup>3)</sup>	211.46 ± 9.69	508.59 ± 30.89



A. 正常组; B. 模型组; C. 淫羊藿-女贞子提取物 100 mg·kg<sup>-1</sup>组; D. 淫羊藿-女贞子提取物 200 mg·kg<sup>-1</sup>组; E. 淫羊藿-女贞子水煎剂 3.5 g·kg<sup>-1</sup>组; F. 淫羊藿-女贞子水煎剂 7 g·kg<sup>-1</sup>组; G. 钙尔奇组(图 2~4 同)

图 1 淫羊藿-女贞子对大鼠骨组织 TGF- $\beta_1$  蛋白表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 1 Effect of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus on protein expressions of TGF- $\beta_1$  in GIOP rats (IF, ×200)

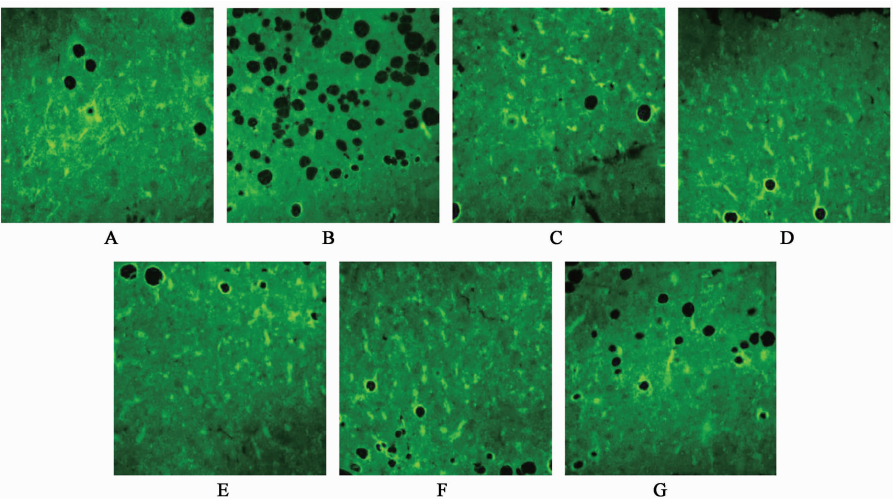


图 2 淫羊藿-女贞子对大鼠骨组织 p-Smad2/3 蛋白表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 2 Effect of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus on protein expressions of p-Smad2/3 in GIOP rats (IF, ×200)

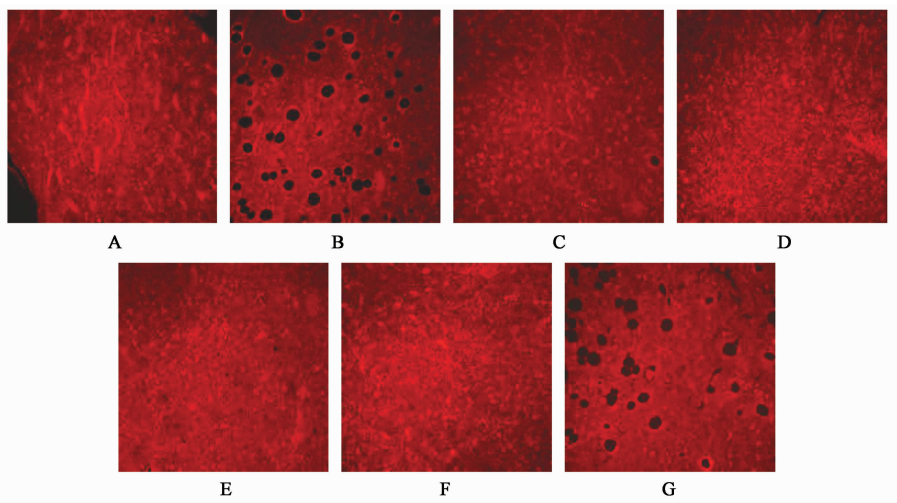


图 3 淫羊藿-女贞子对大鼠骨组织 Smad4 蛋白表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 3 Effect of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus on protein expressions of Smad 4 in GIOP rats(IF, ×200)

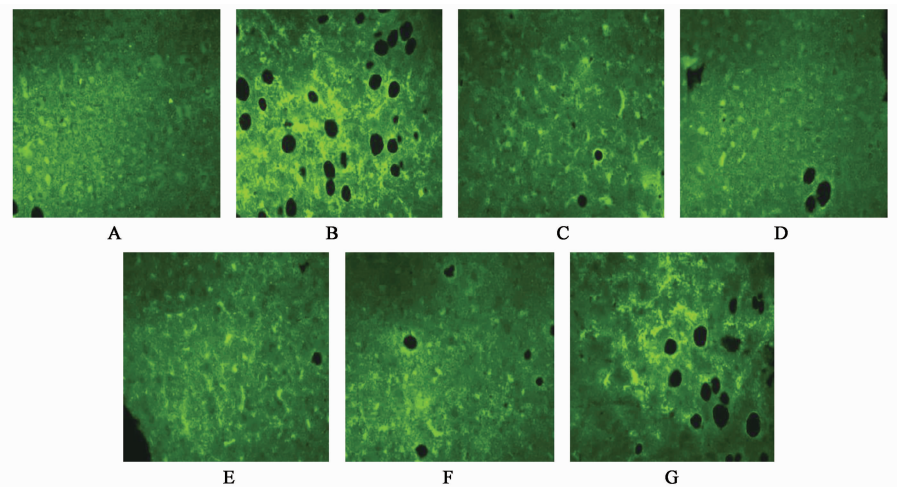


图 4 淫羊藿-女贞子对大鼠骨组织 Smad7 蛋白表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 4 Effect of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus on protein expressions of Smad7 in GIOP rats(IF, ×200)

#### 4 讨论

中医认为“肾藏精主骨生髓”，肾精充实则骨髓化生有源，骨得其养则坚固有力。GC 乃外源性“纯阳”、“邪热”之品，GC 使用初期阳邪伤阴，以肾阴虚为主；GC 长期应用，阴伤更甚，阴损及阳，阴阳失衡形成肾阴阳两虚之证，肾精亏虚无以充实骨骼，骨失濡养引发骨质疏松<sup>[9]</sup>。本实验研究发现，模型组大鼠逐渐出现体重增长缓慢，懒动少食，毛被稀疏无光泽，弓腰塌背，喜蜷缩聚堆，便软或有便溏等证候，且骨量显著降低，表明 GC 的长期应用可致大鼠阴阳失衡，肾精亏虚，骨量丢失。针对 GIOP“肾虚精亏，阴阳两虚”的中医病机，国家级名老中医李世增教授经 50 多年临床经验精选具有“平补阴阳，益精壮骨”之功效的淫羊藿-女贞子药对，用于 GIOP 的防治，并取得良好的疗效。中药淫羊藿温补肾阳、强筋骨，

为补阳药；女贞子滋补肝肾阴精、强腰膝，为补阴药，二药配伍，有“阴阳相济”之妙用。前期实验结果表明，淫羊藿-女贞子配伍可有效改善 GIOP 大鼠骨代谢生化指标异常情况<sup>[5-6]</sup>。淫羊藿总黄酮为淫羊藿抗骨质疏松作用的主要成分<sup>[10-11]</sup>，女贞子中五环三萜类、环烯醚萜类化合物为其抗骨质疏松作用的物质基础<sup>[12-13]</sup>。研究证实，淫羊藿-女贞子有效成分提取物配伍抑制维甲酸诱导的骨质疏松大鼠骨细胞凋亡，减缓骨质疏松的发展进程<sup>[14]</sup>。实验发现各淫羊藿-女贞子给药组大鼠生物学表征情况较模型组均有所改善，体重显著增加，骨量显著增加。提示二药有效成分提取物配伍和煎剂配伍均可明显缓解 GIOP 大鼠肾虚情况，增加骨量。

TGF- $\beta$ /Smads 通路在骨重建中发挥着重要的作用<sup>[15]</sup>。TGF- $\beta$  是由成骨细胞分泌，并对骨有强大

调节作用的细胞因子,其中 TGF- $\beta_1$  亚型在骨中的比例最高,具有促进成骨细胞增殖、分化,抑制破骨细胞活性的作用,是骨形成和骨吸收之间的重要偶联因子<sup>[16]</sup>。Smads 蛋白家族是已知胞质内唯一的 TGF- $\beta_1$  信号转导分子<sup>[17]</sup>。TGF- $\beta_1$  可活化下游 Smad2/3 蛋白,p-Smad2/3 与 Smad4 分子结合,形成异源二聚体后进入细胞核,调控靶基因的转录表达。Smad7 是 TGF- $\beta$ /Smads 通路上的抑制蛋白,可抑制 Smad2/3 蛋白磷酸化,从而阻止 TGF- $\beta_1$  信号传导<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,模型组大鼠骨组织 TGF- $\beta_1$ ,p-Smad2/3 及 Smad4 蛋白表达量均较正常组显著减少,Smad7 蛋白表达量显著增加,提示地塞米松诱导骨质疏松发病的机制与 TGF- $\beta_1$ /Smads 通路转导因子的异常表达有关。各淫羊藿-女贞子煎剂及提取物组大鼠骨组织 TGF- $\beta_1$ ,p-Smad 2/3 及 Smad4 蛋白表达量显著高于模型组,Smad7 蛋白表达量较模型组显著减少,提示淫羊藿-女贞子及其黄酮合萜类提取物配伍组可通过上调 TGF- $\beta_1$ ,p-Smad2/3 和 Smad4 蛋白表达水平,下调 Smad7 蛋白表达水平,促进骨形成,改善 GIOP 大鼠骨代谢失衡状态,其防治 GIOP 的作用机制可能与其调控 TGF- $\beta_1$ /Smads 通路转导因子的表达有关。

【参考文献】

[ 1 ] Whittier X, Saag K G. Glucocorticoid-induced osteoporosis [ J ]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2016, 42 ( 1 ): 177-189.

[ 2 ] Rizzoli R, Adachi J D, Cooper C, et al. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis [ J ]. *Calcif Tissue Int*, 2012, 91 ( 4 ): 225-243.

[ 3 ] Weinstein R S. Clinical Practice: Glucocorticoid-induced bone disease [ J ]. *N Engl J Med*, 2011, 365 ( 1 ): 62-70.

[ 4 ] LIN S, HUANG J P, ZHENG L, et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis in growing rats [ J ]. *Calcif Tissue Int*, 2014, 95 ( 4 ): 362-373.

[ 5 ] 康学,周琦,李焜,等.淫羊藿-女贞子对 GIOP 大鼠骨密度和激素水平的相关性分析 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 ( 23 ): 250-253.

[ 6 ] 刘仁慧,康学,张伟华,等.淫羊藿女贞子配伍对 GIOP 大鼠骨代谢生化指标的影响研究 [ J ]. *世界中医药*, 2013, 8 ( 12 ): 1450-1453.

[ 7 ] CHENG Q, TANG W, Sheu T J, et al. Circulating TGF- $\beta_1$  levels are negatively correlated with sclerostin levels in early postmenopausal women [ J ]. *Clin Chim Acta*, 2016, 562 ( 2 ): 1058-1075.

[ 8 ] 朱辉,郑洪新,林庶如,等.糖皮质激素性骨质疏松症大鼠模型制备及中药的干预作用 [ J ]. *辽宁中医药大学学报*, 2015, 17 ( 8 ): 30-32.

[ 9 ] 崔健超,杨志东,江晓兵,等.糖皮质激素性骨质疏松症的中医证型分布特点 [ J ]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22 ( 2 ): 217-220.

[ 10 ] WANG L L, LI Y, GUO Y B, et al. Herba Epimedii: an ancient Chinese herbal medicine in the prevention and treatment of osteoporosis [ J ]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22 ( 3 ): 328-349.

[ 11 ] Indran I R, LIANG R L, TAN E M, et al. Preclinical studies and clinical evaluation of compounds from the genus Epimedium, for osteoporosis and bone health [ J ]. *Pharmacol Ther*, 2016, 162 ( 3 ): 188-205.

[ 12 ] FENG X, YING L, WU Z H, et al. Fructus ligustri lucidi ethanol extract improves bone mineral density and properties through modulating calcium absorption-related gene expression in kidney and duodenum of growing rats [ J ]. *Calcif Tissue Int*, 2014, 94 ( 4 ): 433-441.

[ 13 ] QIN L, FAN Y S, GAO Z Q, et al. Effect of Fructus Ligustri Lucidi, on osteoblastic like cell-line MC3T3-E1 [ J ]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 170: 88-95.

[ 14 ] 李梅,康学,年宏蕾,等.淫羊藿-女贞子抗维甲酸致大鼠骨质疏松症的作用机制探讨 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 ( 12 ): 81-85.

[ 15 ] Santibanez J F, Kocic J. Transforming growth factor- $\beta$  superfamily, implications in development and differentiation of stem cells [ J ]. *Biomol Concepts*, 2012, 3 ( 5 ): 429-445.

[ 16 ] CHEN M, LV Z Q, JIANG S P. The effects of triptolide on airway remodelling and transforming growth factor- $\beta_1$ /Smad signalling pathway in ovalbumin-sensitized mice [ J ]. *Immunology*, 2011, 132 ( 3 ): 376-384.

[ 17 ] SONG B, Lyons E K M. Smad signaling in skeletal development and regeneration [ J ]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20 ( 5/6 ): 379-88.

[ 18 ] WANG W Z, Olson D, LIANG G, et al. Collagen XXIV ( Col24 $\alpha$ 1 ) promotes osteoblastic differentiation and mineralization through TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway [ J ]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8 ( 10 ): 1310-1322.

[ 19 ] SUN X D, ZHENG C, ZHANG Q Y, et al. Aluminum trichloride inhibits osteoblast mineralization via TGF- $\beta_1$ /Smad signaling pathway [ J ]. *Chem Biol Interact*, 2016, 244: 9-15.

【责任编辑 周冰冰】