

# 哈蟆油蛋白对骨质疏松预防及 ALP, Osteocalcin, Runx-2 基因表达的调节作用

李晓华, 陈锡俊, 李娜, 石晓征, 韩冬, 黄晓巍, 曲晓波\*  
(长春中医药大学, 长春 130117)

**[摘要]** **目的:**观察哈蟆油蛋白(ROP)的抗骨质疏松作用,并探讨其对骨生长相关基因的调节作用。**方法:**采用去势法建立大鼠骨质疏松模型,随机分为空白组,模型组,戊酸雌二醇组,ROP高、中、低剂量组(0.15,0.075,0.0375 g·kg<sup>-1</sup>);利用X射线技术测量股骨和腰椎骨密度(BMD);利用骨骼强度仪检测股骨的最大载荷量;应用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)技术检测骨生长相关基因的表达。**结果:**与空白组比较,模型组股骨、腰椎骨密度明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP),Osteocalcin,Runx-2基因表达均显著下调( $P < 0.01$ );与模型组比较,ROP高、中剂量组腰椎BMD均有显著增加( $P < 0.01$ ),ROP高剂量组ALP,Osteocalcin,Runx-2基因表达显著上调( $P < 0.01$ )。**结论:**ROP能显著提高大鼠BMD和最大载荷量;ROP可能通过上调ALP,Osteocalcin,Runx-2基因的mRNA表达,促进成骨分化,调节骨代谢平衡,从而发挥防治骨质疏松的作用。

**[关键词]** 哈蟆油蛋白;骨质疏松;碱性磷酸酶;Osteocalcin;Runx-2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0138-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200138

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1021.020.html>

**[网络出版时间]** 2017-07-31 10:21

## Effect of Ranae Oviductus Protein in Preventing Osteoporosis and Regulating ALP, Osteocalcin and Runx-2 Gene Expression

LI Xiao-hua, CHEN Xi-jun, LI Na, SHI Xiao-zheng, HAN Dong, HUANG Xiao-wei, QU Xiao-bo\*  
(Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the anti-osteoporosis effect of Ranae Oviductus protein (ROP), and the regulatory effect on bone growth related genes. **Method:** The osteoporosis model of rats were established by castration method, and randomly divided into 6 groups, namely blank group, model group, Estradiol valerate group, and high-does, medium-does and low-does (0.15, 0.075, 0.0375 g · kg<sup>-1</sup>) ROP groups. The bone mineral densities of femur and lumbar were measured by X-ray technique. The maximum load of femur was measured by bone strength instrument. Quantitative analysis was made for the expressions of key genes of bone growth by Real-time PCR. **Result:** Compared with the blank group, the BMD of femur and lumbar in the model group decreased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the expressions of alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin and Runx-2 gene decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the BMD of lumbar vertebrae in high and middle-dose groups increased significantly ( $P < 0.01$ ), the expressions of ALP, Osteocalcin and Runx-2 gene in the high-dose group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** ROP can significantly improve bone mineral density and maximum load in rats, improve the mRNA expressions of ALP,

**[收稿日期]** 20170612(024)

**[基金项目]** 吉林省科技发展计划项目(20150309008YY);吉林省中医药科技项目(2017002)

**[第一作者]** 李晓华, 硕士, 助理实验师, 从事中药学及分子药理学研究, Tel:13894847910, E-mail:xiaohua130319@163.com

**[通讯作者]** \* 曲晓波, 博士, 教授, 从事中药复方及其分子作用机制研究, Tel:0431-86763808, E-mail:quxiaobo0504@hotmail.com

Osteocalcin and Runx-2 gene, promote the osteoblast differentiation, and regulate the bone substitute balance, so as to play a role in preventing and treating osteoporosis.

[**Key words**] Ranae Oviductus protein (ROP); osteoporosis; alkaline phosphatase (ALP); Osteocalcin; Runx-2

哈蟆油 (*Ranae Oviductus*, RO) 是蛙科动物中国林蛙雌蛙输卵管干燥品, 为东北地区道地药材。RO 具有“补肾益精、化精添髓”之功效。现代研究表明 RO 具有抗骨质疏松<sup>[1]</sup>、抗氧化<sup>[2-3]</sup>、抗疲劳<sup>[4-5]</sup>、润肺镇咳<sup>[6]</sup>、提高机体免疫力<sup>[7]</sup>等药理作用。RO 主要化学成分为蛋白质、多肽, 高达 50%, 同时还含有多种其他生物活性成分, 是一种名贵药食同源的中药。

骨质疏松是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征, 导致骨质脆性增加和易于骨折的全身性骨骼代谢失调疾病<sup>[8-9]</sup>, 常见于老年患者, 其中以绝经后的妇女人群为主, 严重时能危及患者生命。近年来, 国内外在预防、治疗骨质疏松取得了较好的成效, 西医临床抗骨质疏松药主要有钙剂和维生素 D 联合应用、双膦酸盐、锶、甲状旁腺激素、雌激素、狄诺塞麦、组织蛋白酶 K 等。中药治疗骨质疏松主要集中在解表类药、活血化瘀类药、补肾类药及其他类中药。单味中药有淫羊藿、蛇床子、黄芪、山茱萸、大黄、黄柏、知母、丹参、骨碎补、鹿茸、芦荟<sup>[10]</sup>、玉竹<sup>[11]</sup>、人参<sup>[12]</sup>、穿心莲<sup>[13]</sup>等; 中药复方有六味地黄丸<sup>[14]</sup>、左归丸、右归丸及二至丸等。体内骨代谢平衡是通过调节成骨细胞的骨形成和破骨细胞的再吸收之间的平衡实现。碱性磷酸酶 (ALP), Osteocalcin 和 Runx-2 与成骨细胞分化密切相关, 它们参与骨代谢变化、成骨细胞的分化以及促进骨愈合, 从而发挥抗骨质疏松作用。本课题首次开展哈蟆油蛋白 (ROP) 通过调节 ALP, Osteocalcin 和 Runx-2 活性, 调节骨代谢, 从而进一步探讨 ROP 防治绝经期后骨质疏松症作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 SD 雌性大鼠 60 只, 体重 (220 ± 10)g, 购于长春市忆斯实验动物技术有限责任公司, 合格证号 SCXK (吉) 2011-0004。动物实验的开展取得了长春中医药大学实验动物伦理委员会的批准 (编号 ACCUCM-2016-178)

**1.2 药物** ROP 由长春中医药大学分子药理实验室制备。哈蟆油药材产地为吉林省白山市靖宇县三道湖镇浆源林蛙养殖厂, 经长春中医药大学资源与鉴定教研室姜大成教授鉴定为蛙科动物中国林蛙

*Rana temporaria chensinensis* 雌蛙输卵管干燥品。戊酸雌二醇 (拜耳医药保健有限公司, 批号 J20150009, 0.5 mg/片)。

**1.3 试剂** trizol (美国 Invitrogen 公司, 批号 15596026); DNA Maker, BioTeke super RT Kit, 2 × SYBR Real-time PCR premixture Kit (北京百泰克公司, 批号分别为 PR3001, PR1731, PR6101); 溴化乙锭 (EB), 10 × loading buffer (日本 Takara 公司, 批号分别为 160909, 161013); 焦碳酸二乙酯 (DEPC, 北京鼎国公司, 批号 724c027); β-肌动蛋白 (β-actin, 山东博奥克生物科技有限公司, 批号 bak001)。引物由安徽通用生物系统有限公司合成。

**1.4 仪器** BT125D 型分析天平 (德国 Sartorius 公司); 5430R 型冷冻离心机, Mastercycler 型 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); Min-Sub 型核酸电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); FHB100 型制冰机 (上海比朗公司); Omega Lum C 型凝胶成像仪 (美国 Aplegen 公司); Colibei 型超微量紫外分光光度计 (德国伯赫公司)。

## 2 方法

**2.1 骨质疏松模型建立<sup>[14]</sup>及动物分组** 将 60 只 SD 雌性大鼠, 随机分为 6 组, 空白组, 模型组, 戊酸雌二醇组, ROP 高、中、低剂量组。适应性饲养 7 d 后, 除空白组外, 其余大鼠均进行双侧摘卵巢手术。其中空白组和模型组灌胃给药等量生理盐水, 阳性组灌胃给予 0.05 mg · kg<sup>-1</sup> 戊酸雌二醇治疗<sup>[15]</sup>, 高、中、低剂量组分别给予 0.15, 0.075, 0.037 5 g · kg<sup>-1</sup> (相当于原药材) ROP 治疗, 每周给药 6 d (每周日停药 1 d), 连续给药 8 周。

**2.2 骨密度 (BMD) 测定** 给药前和治疗结束后立即用 X 射线骨密度仪检测各组大鼠的腰骨和股骨的 BMD, 观察治疗前后大鼠 BMD 变化。

**2.3 最大载荷量测定** 各组大鼠解剖后, 剔除股骨上的组织, 将左侧股骨固定在生物力学测定仪基座上。启动仪器至自动挤压股骨断裂, 记录数值。

**2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 测定 ALP, Osteocalcin, Runx-2 表达**

**2.4.1 引物设计** 根据引物设计基本原则, 应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件, 设计 PCR 引物,

尽量使 PCR 扩增产物长度 <300 bp,同时结合 Oligo 软件分析评价引物设计的合理性,确保引物的反应特异性强,PCR 扩增效率高(表 1)。

表 1 Real-time PCR 引物碱基序列

Table 1 Real-time PCR primer base sequence

基因	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
ALP	上游 CCCACAAGAGCCACAAT	163
	下游 AACGGCAGAGCCAGGAAT	
Osteocalcin	上游 ACTTGTGCTGGGTGCTCT	181
	下游 CAATACGCAGTGGCATTAA	
Runx-2	上游 GCACCCAGCCATAATAGA	229
	下游 TTGGAGCAAGGAGAACCC	
$\beta$ -actin	上游 ACGTTGACATCCGTAAGAC	264
	下游 GAAGGTGGACAGTGAGGC	

**2.4.2 股骨总 RNA 提取** 将研钵浸入液氮中预冷数分钟。精确称量大鼠股骨 0.5 g,在液氮保护下,迅速研磨至细粉,加入 trizol 裂解液 10 mL。转移裂解液至去 RNase 离心管中,静置裂解 10 min。在离心管中加入三氯甲烷 280  $\mu$ L,混匀、震荡,静置 1 ~ 2 min,12 000  $r \cdot \min^{-1}$  离心 10 min。转移上层水相至新的去 RNase 离心管中,依次加入氯化钠溶液(5 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)100  $\mu$ L,三氯甲烷试剂 170  $\mu$ L,混匀、震荡,静置 1 ~ 2 min,12 000  $r \cdot \min^{-1}$  离心 10 min。取上层水相,重复步骤三氯甲烷萃取 2 ~ 3 次。然后加入异丙醇试剂 300  $\mu$ L,在 -20  $^{\circ}$ C 环境下,沉淀 30 min,同样条件下离心 15 min。弃上清液,依次用 75% 乙醇、无水乙醇洗涤沉淀,挥干乙醇溶液,室温放置 2 ~ 3 min,沉淀即为 RNA。加入 DEPC 水 10 ~ 20  $\mu$ L 溶解 RNA。

**2.4.3 琼脂糖电泳检测总 RNA** 配制 10% 的琼脂糖电泳,加入 EB 染料 2 ~ 3  $\mu$ L。取 RNA 溶液 5  $\mu$ L 转移到上样孔中。在 120 V,17 min 条件下进行电泳。将胶片在凝胶成像仪成像,采集照片,比较 28 S 和 18 S 含量。取 RNA 溶液 1  $\mu$ L 于微量分光光度计检测 RNA 浓度,同时记录观察吸光度  $A_{260}/A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{230}$ ,确保 RNA 未降解。取适量 RNA 进行反转录实验,其余加入无水乙醇 1 mL 混匀,置于 -80  $^{\circ}$ C 冰柜保存。

**2.4.4 cDNA 合成** 将空白组、模型组、戊酸雌二醇组及 ROP 各剂量组中 RNA 浓度稀释至同一浓度。按照 BioTeke super RT Kit 说明书配制反转录反应液。设置程序 ① 45  $^{\circ}$ C,50 min; ② 70  $^{\circ}$ C,10 min。反应结束后冰浴,4  $^{\circ}$ C 保存备用。反应结束

后,用超微量紫外分光光度计检测将反转录液中 DNA 浓度(表 2)。

表 2 反转录反应液

Table 2 Reverse transcription reaction solution

试剂名称	体积/ $\mu$ L
Total RNA	1
Oligo dT or Radnom Peimer	1
dNTP Mixture	1
5 $\times$ first-strand Buffer	4
M-Mul V Reverse Transcriptase	1
Rnase Inhibitor	1
Rnase Free H <sub>2</sub> O	Up to 20

**2.4.5 Real-time PCR 实验** 按照 2  $\times$  SYBR real-time PCR premixture Kit 说明书配制反转录反应液。采用“三步法”进行 Real-time PCR 实验,设置反应程序:95  $^{\circ}$ C,起始模板预变性。① 95  $^{\circ}$ C,20 s; ② 65  $^{\circ}$ C,10 s; ③ 72  $^{\circ}$ C,30 s,循环次数为 40。采集各组目的基因的扩增曲线和融解曲线。以  $\beta$ -actin 为内参基因,采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法统计分析各组目的基因的相对表达量,进行差异比较(表 3)。

表 3 Real-time PCR 反应液

Table 3 Real-time PCR reaction solution

试剂名称	体积/ $\mu$ L
2 $\times$ SYBR Primex	10
上游 Primer	0.8
下游 Primer	0.8
模板	2
Rnase Free H <sub>2</sub> O	Up to 20

**2.5 统计学方法** 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 SPSS 13.0 软件进行统计学检验,采用 Student's *t* 检验和 One-way ANOVA 检验不同组别间的差异,当  $P < 0.05$  时为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 ROP 对大鼠体重的影响** 模型组与空白组比较,体重增加值无统计学差异;戊酸雌二醇组及各给药组与模型组比较,体重增加值无统计学差异。因此,分析 ROP 在治疗骨质疏松症期间,对大鼠体重增长影响作用不明显(表 4)。

**3.2 ROP 对 BMD 的影响** 与空白组比较,模型组股骨 BMD 显著降低( $P < 0.01$ ),腰椎 BMD 明显减低( $P < 0.05$ ),证实模型组成功造成骨质疏松模型,同时出现低骨量和骨组织微结构破坏现象。与模型

表 4 ROP 对大鼠体重、股骨、腰椎 BMD 及最大载荷量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effects of ROP on body weight, femur, lumbar BMD and maximum load in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

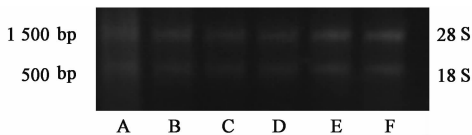
组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	体重 /g	股骨 BMD /mg·cm <sup>-1</sup>	腰椎 BMD /mg·cm <sup>-1</sup>	最大载荷 /N
空白	-	178.01 ± 30.57	246.08 ± 30.07	207.99 ± 17.27	97.24 ± 0.06
模型	-	184.71 ± 15.03	194.54 ± 13.36 <sup>1)</sup>	180.16 ± 24.33 <sup>2)</sup>	81.01 ± 0.98 <sup>1)</sup>
戊酸雌二醇	0.05	185.93 ± 21.35	253.64 ± 24.52 <sup>3)</sup>	210.01 ± 24.30 <sup>4)</sup>	91.71 ± 0.02
ROP	150	196.05 ± 35.97	239.49 ± 27.88	204.78 ± 24.30 <sup>4)</sup>	99.91 ± 0.76 <sup>4)</sup>
	75	206.48 ± 27.43	223.54 ± 32.49	196.98 ± 34.45	96.59 ± 0.66 <sup>3)</sup>
	37.5	176.40 ± 29.60	219.54 ± 37.67	191.13 ± 14.41	92.88 ± 0.27

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (图 4 同)。

组比较,戊酸雌二醇组、高剂量组股骨 BMD 明显高于模型组 ( $P < 0.01$ ),戊酸雌二醇组腰椎 BMD 明显升高 ( $P < 0.05$ ),各治疗组股骨、腰椎 BMD 均有上升的趋势。故 ROP 能够提高大鼠的股骨、腰椎的 BMD,对绝经后骨质疏松症有一定预防作用(表 4)。

**3.3 ROP 对最大载荷量的影响** 与空白组相比,模型组骨最大载荷量明显减低,证实骨质疏松模型组的大鼠股骨中大量钙流失,出现骨质脆性增加现象;戊酸雌二醇组及各给药剂量组与模型组比较,ROP 高、中剂量组最大载荷量值明显高于模型组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。故 ROP 可以提高骨质疏松患者的骨韧性,能有效的预防绝经后妇女骨折性疾病(表 4)。

**3.4 大鼠股骨总 RNA 的提取及质量评价** 分别从空白组、模型组、戊酸雌二醇组、各治疗组大鼠大腿骨股中提取总 RNA,通过超微量紫外分光光度计检测,各组 RNA 浓度及  $A_{260}/A_{280}, A_{260}/A_{230}$ ;经 1% 琼脂糖电泳检测,各组 RNA 的 28 S,18 S 条带均清晰。结合电泳结果(图 1)和超微量紫外分光光度计检测结果,各组样品总 RNA 均未降解,满足荧光定量 PCR 实验要求(表 5)。



A. 空白组;B. 模型组;C. 戊酸雌二醇组;D-F. ROP 高、中、低质量浓度组

图 1 总 RNA 核酸电泳

Fig.1 Total RNA nucleic acid electrophoresis

**3.5 反转录 cDNA 浓度及质量评价** 调整各组 RNA 浓度至同一水平,按反转录试剂盒说明书操作,合成 cDNA。利用超微量紫外分光光度计检测 cDNA 浓度。通过观察分析各组  $A_{260}/A_{280}, A_{260}/A_{230}$

表 5 总 RNA 超微量分光光度计检测

Table 5 Ultramicro spectrophotometer test results of total RNA

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
空白	-	2 060.00	2.225	1.905
模型	-	1 976.81	2.277	1.984
戊酸雌二醇	0.05	2 950.35	2.411	2.089
ROP	150	1 586.39	2.205	1.722
	75	2 778.44	2.474	1.993
	37.5	2 400.00	2.131	1.976

值,反转录得到的 cDNA 浓度及纯度能满足后续荧光定量 PCR 实验要求(表 6)。

表 6 cDNA 超微量分光光度计检测结果

Table 6 Ultramicro spectrophotometer test results of cDNA

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
空白	-	1 200.10	1.928	1.932
模型	-	1 286.25	1.923	1.862
戊酸雌二醇	0.05	1 554.90	1.958	1.933
ROP	150	1 137.10	1.910	1.702
	75	1 274.85	1.937	1.816
	37.5	1 202.43	1.903	1.876

**3.6 Real-time PCR 分析骨生长相关目的基因差异表达** 将目的基因进行 Real-time PCR 实验检测,扩增产物进行核酸电泳检测,电泳结果(图 2)显示各组目的基因均为单一条带,碱基数与引物扩增产物长度相吻合。

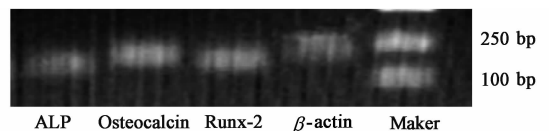


图 2 PCR 扩增产物电泳

Fig.2 PCR amplification product electrophoresis

通过溶解曲线分析可得,目的基因 ALP, Osteocalcin, Runx-2,  $\beta$ -actin 均出现单一主峰,表明引

物设计合理,均为特异性扩增。

采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法统计各组 ALP, Osteocalcin, Runx-2 mRNA 表达量(图 3)。与空白组相比较,模型组 ALP, Osteocalcin, Runx-2 mRNA 相对表达量均显著性下调( $P < 0.01$ );与模型组相比较,阳性组和高剂量

ALP, Osteocalcin, Runx-2 mRNA 相对表达量均显著显著性上调( $P < 0.01$ ),其他剂量组 ALP, Osteocalcin, Runx-2 mRNA 相对表达量均有明显增加趋势( $P < 0.05, P < 0.01$ )。故证实 ROP 在预防骨质疏松症中对 ALP, Osteocalcin, Runx-2 均表达上调。

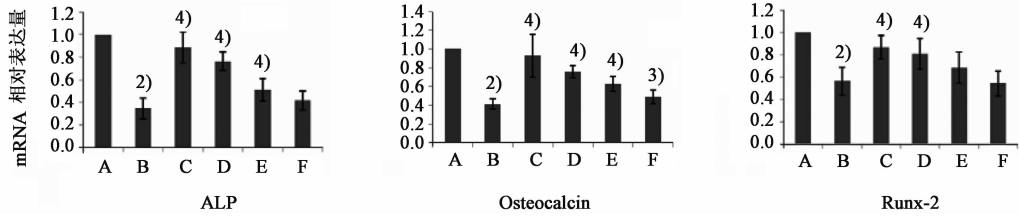


图 3 ROP 对 ALP, Osteocalcin, Runx-2 mRNA 表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of ROP on ALP, Osteocalcin, Runx-2 mRNA expression( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

脆性骨折和骨密度低下是临床诊断骨质疏松症的通用指标, BMD 或骨矿含量则是临床诊断和评估病情的量化指标。本研究中, ROP 对大鼠体重的影响作用不明显;而在提高骨密度和股骨最大载荷量方面,作用显著, ROP 可能对绝经后妇女的脆性骨折有较好的防治作用。

骨中 ALP 和骨的钙化作用密切相关, 并且 ALP 作为骨形成的重要 Maker, 是评估骨形成和骨转化的主要指标。提高 ALP 的活性能够促进成骨细胞的分化, 从而发挥抗骨质疏松作用<sup>[16]</sup>。Osteocalcin 由成骨合成和分泌的维生素 K 依赖性钙结合蛋白, 大部分沉积于骨基质。它不仅是反映骨更新的生化指标, 也能反映机体骨形成、骨代谢变化以及骨细胞的功能状况<sup>[17]</sup> 以及反映骨骼生长发育<sup>[18]</sup>。Runx-2 基因对糖尿病并发症骨质疏松患者成骨细胞分化和软骨细胞成熟起促进作用<sup>[19]</sup>, 同时在成骨分化的信号途径中 Runx-2 起核心作用, 能诱导干细胞成骨分化和促进骨愈合<sup>[20]</sup>。在骨形成过程中, 成骨细胞会表达多种 Maker, 如, ALP, Osteocalcin 以及各种细胞因子(激素)等。本研究证实了高剂量的 ROP 能够明显上调骨质疏松模型大鼠的 ALP, Osteocalcin, Runx-2 基因 mRNA 的表达。ROP 可能通过促进磷酸化后的 Smad1/5 与 Smad4 结合, 形成一种复合物, 进入细胞核, 并作用成骨细胞表面的 ALP, Osteocalcin, Runx-2 等一系列转录因子, 参与大鼠体内骨代谢平衡。促进成骨分化, 从而发挥抗骨质疏松作用。为进一步证明这一假说, 后续将开展并验证 ROP 是通过转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )/BMPs 信号通路发挥抗骨质疏松作用工作, 从去势骨质疏松模型大鼠中分离培养原代成骨细胞, 结合基因敲除或

miRNA 等技术进一步阐明 ROP 抗骨质疏松的分子作用机制。

#### [参考文献]

- [1] YIN Y G, HAN Y, HAN Y Z. Puised electric field extraction of polysaccharide from *Rana temporaria chinainensia* David [J]. Int J Pharm, 2006, 312(1/2): 33-36.
- [2] 李妍妍, 郑卫星, 苏秀榕, 等. 林蛙油及其酶解液抗氧化活性的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(11): 619-620.
- [3] 王涵, 赵雨, 张梅. 哈蟆油非水溶性成分抗疲劳保健功能研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(20): 12233-12234.
- [4] 李津明, 宋茜, 孙仁爽, 等. 林蛙油酶解前后抗疲劳作用对比研究 [J]. 黑龙江医药, 2008, 21(2): 30-34.
- [5] 张肃. 蛤士蟆油消除运动性疲劳的作用及其机制 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(12): 2340-2341.
- [6] 王哲. 哈蟆油中镇咳活性成分的化学合成及活性研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2007.
- [7] 刘玉兰, 姜云海, 尤越人, 等. 蛤士蟆油及其提取物对肾虚和正常小鼠的抗疲劳作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14(1): 20-23.
- [8] 秦健. 绝经后妇女血清基质金属蛋白酶-9 和基质金属蛋白酶抑制因子-与骨密度的关系 [D]. 青岛: 青岛大学, 2008.
- [9] 陈对梅, 王峻. 高分辨率磁共振成像评价骨质疏松症骨微结构 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2009, 6(3): 282-285.
- [10] Yutthana P, Harishkumar M, Radha M, et al. Anthraquinone glycoside aloin induces osteogenic initiation of MC3T3-E1 cells: involvement of MAPK Mediated Wnt and Bmp [J]. Biomol Ther, 2016, 24(2): 123-131.
- [11] DU L, NONG M N, ZHAO J M, et al. Polygonatum

- sibiricum polysaccharide inhibits osteoporosis by promoting osteoblast formation and blocking osteoclastogenesis through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 15(2):1-12.
- [12] ZHANG X N, CHEN K, WEI B, et al. Ginsenosides Rg<sub>3</sub> attenuates glucocorticoid-induced osteoporosis through regulating BMP-2/BMPRII/Runx2 signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 25(6):188-197.
- [13] WANG T, LIU Q, ZHOU L, et al. Andrographolide inhibits ovariectomy-induced bone loss via the suppression of RANKL signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11):27470-27481.
- [14] XIA B J, XU B, SUN Y, et al. The effects of Liu Wei Di Huang on canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in osteoporosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 15(3):133-141.
- [15] WANG D H, WU W, TIAN J M. Effect of oviductus ranae and oviductus Ranae eggs on bone metabolism and osteoporosis [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(7):532-538.
- [16] 王石莹, 闫素梅. 碱性磷酸酶在动物骨骼代谢中的研究进展[J]. *饲料博览*, 2009(4):14-17.
- [17] 马维, 张爱民, 周学智, 等. 骨钙蛋白在骨折初期愈合过程中的血清学分析[J]. *河北医科大学学报*, 2001, 22(2):119.
- [18] 马素苓, 皮亚雷, 张会丰. 不同胎龄新生儿骨钙蛋白水平及临床意义[J]. *临床荟萃*, 2010, 25(8):702-703.
- [19] 田琳, 彭跃进, 朱宇. Runx2 基因在糖尿病合并骨质疏松中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(11):2789-2791.
- [20] 周大凯, 李慧宁, 马珊珊, 等. Runx2 基因高表达对脐血间充质干细胞成骨分化相关基因表达的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(9):1444-1449.

[责任编辑 邹晓翠]