

淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞的形成、分化和骨吸收功能

郭元晖¹, 薛黎明¹, 聂燕², 汪滢², 赵璐², 秦路平¹, 张巧艳¹, 俞媛¹ (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108)

[摘要] 目的 研究淫羊藿苷和仙茅苷配伍抑制破骨细胞形成、分化和骨吸收的相互作用关系。方法 用 1, 25-(OH)₂Vitamin D₃ 和地塞米松; 或人巨噬细胞集落刺激因子(MCSF)和核因子κB受体活化因子配体(RANKL)诱导骨髓单核细胞使其分化为破骨细胞抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色进行阳性破骨细胞鉴定; 磷酸苯二钠法测定抗酒石酸性磷酸酶活性; 将破骨细胞和骨片共同培养, 以计算机图像分析测定骨吸收陷窝的面积; 以Hoechst 33258和罗丹明-鬼笔环肽染色、激光共聚焦显微镜观察破骨细胞肌动蛋白环(F-actin Ring)的形态; 用Western-blot分析细胞骨架相关蛋白的表达。结果 淫羊藿苷和仙茅苷在 1 × 10⁻⁶ mol/L 浓度下可协同抑制破骨细胞的形成、降低抗酒石酸性磷酸酶的活性, 减少破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝面积, 抑制破骨细胞骨架 F-actin 环的构建及其调控因子 Rho GTPases 和灶性黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK)的表达。结论 淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞性的骨吸收, 为药对淫羊藿仙茅的配伍提供了实验依据。

[关键词] 淫羊藿苷; 仙茅苷; 破骨细胞; 细胞骨架; 协同作用

[中图分类号] R282.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)04-0262-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.04.006

Effect of icariin and curculigoside on inhibition of osteoclastic formation, differentiation and bone absorption

GUO Yuan-hui¹, XUE Li-ming¹, NIE Yan², WANG Ying², ZHAO Lu², QIN Lu-Ping¹, ZHANG Qiao-yan¹, YU Yuan¹ (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the interaction relationship of icariin and curculigoside on the osteoclastic formation, differentiation and bone resorbing. **Methods** Multinucleated osteoclasts were induced by 1, 25-dihydroxyvitamine D₃ and dexamethasone from bone marrow cells with the presence of primary osteoblastic cells, or induced with RANKL and MCSF. The activity of TRAP was measured by p-nitrophenyl sodium phosphate assay. The bone absorption pit area on the bone slices formed by osteoclast was measured by computer image processing. The F-actin ring were stained with Hoechst 33 258 and rhodamine-phalloidin, and then observed under the confocal scanning laser microscopy. The Western-blot was used to analysis the expression of protein which was related to the cytoskeleton of osteoclasts. **Results** Icariin and curculigoside at the concentration of 1 × 10⁻⁶ mol/L synergistically inhibited the osteoclastic formation, decreased the activity of TRAP, and reduced the area of bone resorption pit on bone slices, inhibited the organization of F-actin ring and the expression of FAK and Rho GTPases. **Conclusions** Icariin and curculigoside synergistically inhibited the osteoclastic bone resorption, which provided scientific basis for the theory of the compatibility of traditional Chinese medicine Epimedium Folium and Curculiginis Rhizoma.

[Key words] icariin; curculigoside; osteoclasts; cytoskeleton; synergism

1 前言

骨质疏松症是老年人以及绝经后妇女的常见病。中医理论认为“肾主骨, 肾虚则骨萎”, 骨质疏松的发生主要由肾虚所致^[1]。淫羊藿仙茅是中医临床常用

的温补肾阳的药对^[2]。淫羊藿为小檗科多年生草本植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim 及同属多种植物的干燥地上部分, 具有温肾壮阳, 强筋骨, 祛风湿的功效。仙茅为石蒜科多年生草本植物仙茅 *Curculigo orchoides* Gaertn. 的干燥根茎, 具有补肾助阳, 益精血, 强筋骨和行血消肿的作用。淫羊藿和仙茅配伍, 相须为用, 相得益彰, 补肾壮阳, 强筋健骨, 祛风除湿功力增强。在临床上, 该药对常用于肾阳亏虚、命门火衰之阳痿、不孕, 绝经前后诸症(如更年期综合症、骨质疏松症等)及肾阳虚之风寒痹痛等方面。防

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173191); 第二军医大学大学生创新基金项目(ZD2010024)。

[作者简介] 郭元晖(1990-), 男, 本科在读。

[作者简介] 俞媛. Tel: (021) 81871289, E-mail: pharmyuu@163.com.

治骨质疏松的中药复方,如二仙汤、黄芪三仙汤等都含有药对淫羊藿仙茅。淫羊藿苷为淫羊藿的主要活性成分,能特异性地提高下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素的表达,发挥下丘脑作为调控中心调节神经内分泌免疫网络功能的作用,能增加骨形成,抑制骨吸收,减少骨质的丢失^[3]。仙茅苷为仙茅的主要活性成分,能够增加成骨细胞的增殖和碱性磷酸酶活性,降低破骨细胞的形成分化、抗酒石酸酸性磷酸酶的活性和骨吸收作用^[4]。本课题以由骨髓单核细胞诱导的破骨细胞为模型,通过观察淫羊藿苷、仙茅苷及其组合对破骨细胞形成、分化、细胞骨架构建和相关蛋白表达的影响,探讨二者协同抑制破骨细胞骨吸收和细胞骨架构建的作用及机制,为药对淫羊藿和仙茅配伍防治骨质疏松症和中医“补肾健骨”理论提供了实验依据。

2 材料和仪器

2.1 实验药物与试剂 胰蛋白酶、II型胶原酶、特级胎牛血清、 α -MEM培养基均为美国Gibco公司产品;1, 25-(OH)₂Vitamin D₃、地塞米松、萘酚 AS-BI磷酸钠、六偶氮副品红、Hoechst 33258、罗丹明-鬼笔环肽均购自美国Sigma公司;M-CSF和RANKL购自美国Pepro Tech EC Ltd.公司;Triton X-100、甲苯胺蓝为生工生物工程(上海)有限公司产品;对硝基苯酚磷酸二钠、对硝基苯酚、乙二醇单甲醚、酒石酸钾钠等均为国产分析纯试剂。Rho GTPases和FAK抗体购于Santa Cruz公司(美国)。淫羊藿苷(110737-200413)和仙茅苷(110771-200904)购自中国药品生物制品鉴定所。

2.2 仪器 双人单面净化工作台(SW-CJ-2FD),苏州净化有限公司;CO₂恒温培养箱(MCO-15AC),日本Sanyo生物医学电器公司;倒置相差显微镜(CKX41),日本Olympus公司;96孔培养板,美国Costar公司。

2.3 动物 新生2~3 d的SD大鼠,由第二军医大学实验动物中心提供。

3 方法

3.1 破骨细胞的培养及鉴定 与成骨细胞共培养诱导骨髓细胞分化为破骨细胞:参照刘祖德等的方法^[5],分离培养新生大鼠颅盖骨成骨细胞。选取3~4 d的新生SD大鼠,脱颈椎处死,75%的乙醇浸泡5 min,在无菌条件下分离胫骨,用含 1×10^{-8} mol/L 1, 25-(OH)₂-VD₃、 1×10^{-7} mol/L地塞米松及10%胎牛血清的 α -MEM培养基冲洗骨髓腔,将骨髓内的细胞冲出,用PBS缓冲液洗细胞2次,即

得新鲜的骨髓细胞^[6,7]。将新生大鼠颅盖骨成骨细胞和骨髓细胞共同悬浮于含 1×10^{-8} mol/L的1, 25-(OH)₂-VD₃、 1×10^{-7} mol/L地塞米松和10%胎牛血清的 α -MEM培养基中,使成骨细胞的浓度为 1×10^5 细胞/ml,骨髓单核细胞的浓度为 1×10^6 细胞/ml,将细胞悬液接种于预先放置灭菌的玻片或骨片的96孔培养板中,每孔100 μ l,于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中培养,每3 d换液一次,8 d后,破骨细胞分化成熟。

M-CSF和RANKL诱导骨髓细胞分化为破骨细胞:取新鲜骨髓细胞,用含5 ng/ml M-CSF和10%胎牛血清的 α -MEM培养基悬浮、培养,16~24 h后收集未贴壁细胞,用含50 ng/ml的M-CSF的培养基进行培养,3 d后换含50 ng/ml M-CSF和100 ng/ml RANKL的 α -MEM培养基培养6 d,骨髓单核细胞分化为成熟破骨细胞。以抗酒石酸酸性磷酸酶染色和骨吸收陷窝形成对破骨细胞进行鉴定。

3.2 玻片与骨片的制备和处理 将盖玻片用玻璃刀分切成0.5 cm \times 0.5 cm大小,浸酸过夜,自来水冲洗10次,蒸馏水洗3遍,烤箱烘干,高压消毒灭菌后备用。用锯齿切割机将象牙骨切成40 μ m厚的骨片,再修剪成0.5 cm \times 0.5 cm大小,浸泡于75%乙醇中4 $^{\circ}$ C保存。临用前,超声处理30 min,蒸馏水清洗10次,置于75%乙醇浸泡24 h,无菌条件下晾干,用前放于96孔板中紫外线照射消毒。

3.3 破骨细胞TRAP染色 将成骨细胞和骨髓细胞悬液接种于放有盖玻片的96孔培养板上培养10 d,进行TRAP染色。方法如下:将96孔板内细胞用2.5%戊二醛4 $^{\circ}$ C固定30 min,蒸馏水漂洗3次后放入TRAP染色液(0.2 mol/L醋酸缓冲液18 ml,与1 ml六偶氮副品红溶液混合,调pH值为5.0,再加1 ml萘酚 AS-BI磷酸盐,加入酒石酸钾钠282.22 mg,过滤备用),37 $^{\circ}$ C孵育60 min,蒸馏水冲洗3次,经乙醇梯度脱水,二甲苯透化,甘油明胶封片,光学显微镜下观察。

3.4 成熟的破骨细胞计数 将成骨细胞和新鲜收集的骨髓细胞共同悬浮于含 1×10^{-8} mol/L的1, 25-(OH)₂-VD₃、 1×10^{-7} mol/L地塞米松和10%胎牛血清的 α -MEM培养基中,使成骨细胞的浓度为 1×10^5 细胞/ml,骨髓单核细胞为 1×10^6 细胞/ml,接种于放有无菌玻片的96孔板内,每孔100 μ l,于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中培养,24 h后,换加药物:阴性对照组加不含药物的破骨细胞诱导培养基,其余各组分别加入终浓度为 1×10^{-6} mol/L的含药培养基(淫羊藿苷,仙茅苷乙,淫羊藿苷+仙茅苷),每3 d换液一次。培养10 d后光镜下观察,并以细胞核 \geq

3个作为破骨细胞标志,对成熟的多核破骨细胞进行计数。

3.5 破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 的活性测定 将成骨细胞和新鲜收集的骨髓细胞共同悬浮于含 1×10^{-8} mol/L 的 $1,25-(OH)_2-VD_3$ 、 1×10^{-7} mol/L 地塞米松和 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基中,使成骨细胞的浓度为 1×10^5 细胞/ml,骨髓单核细胞为 1×10^6 细胞/ml,接种于 96 孔板内,每孔 100 μ l,于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱中培养,24 h 后换新鲜的破骨细胞诱导培养基,以后每 3 d 换液一次,培养 8 d 后破骨细胞分化成熟,换加药物:阴性对照组加不含药物的破骨细胞诱导培养基,其余各组分别加入终浓度为 1×10^{-6} mol/L 的含药培养基(淫羊藿苷,仙茅苷,淫羊藿苷 + 仙茅苷),培养 48 h 后测定 TRAP 的活性,以对硝基苯酚溶液作标准曲线,TRAP 活性用每孔的破骨细胞生成的对硝基苯酚的 nmol 数表示。

3.6 骨吸收陷窝染色 将成骨细胞和新鲜收集的骨髓细胞共同悬浮于含 1×10^{-8} mol/L 的 $1,25-(OH)_2-VD_3$ 、 1×10^{-7} mol/L 地塞米松和 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基中,使成骨细胞的浓度为 1×10^5 细胞/ml,骨髓单核细胞为 1×10^6 细胞/ml,接种于放有无菌骨片的 96 孔板内,每孔 100 μ l,于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱中培养,24 h 后,换加药物:阴性对照组加不含药物的破骨细胞诱导培养基,其余各组分别加入终浓度为 1×10^{-6} mol/L 的含药培养基(淫羊藿苷,仙茅苷,淫羊藿苷 + 仙茅苷),每 3 d 换液一次。培养 12 d 后对骨片的骨吸收陷窝进行甲苯胺蓝染色:弃上清,PBS 清洗 3 遍,用 2.5% 戊二醛固定 7 min,0.25 mol/L 氢氧化氨中超声清洗 5 min \times 3 次,系列酒精脱水,自然晾干,1% 甲苯胺蓝染液室温染色 10 min,蒸馏水清洗后,中性树脂胶封片,光镜 100 倍下观察,同时采集骨片的骨吸收陷窝图像。计算机图像处理系统测定每个骨片上 20 个随机视野内骨吸收陷窝的面积。

3.7 肌动蛋白环 (F-actin Ring) 染色及细胞骨架相关蛋白表达的分析 M-CSF 和 RANKL 诱导骨髓单核细胞,6 d 后分化为成熟破骨细胞。分别加入终浓度为 1×10^{-6} mol/L 的含药培养基(淫羊藿苷,仙茅苷,淫羊藿苷 + 仙茅苷)处理破骨细胞 4 h,以罗丹明-鬼笔环肽和 Hoechst 33258 对 F-actin 环和细胞核进行染色,激光共聚焦显微镜进行观察。用 1×10^{-6} mol/L 的淫羊藿苷、仙茅苷及其组合物处理破骨细胞 24 h,以 Western-blot 分析破骨细胞骨架构建相关蛋白 Rho GTPases 和 FAK 的表达。

3.8 统计学分析 所有实验均重复 3 次,每种浓度

的药物各设 6 个复孔。采用单因素方差分析,组间差异采用 LSD-t 法进行比较,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。根据金氏公式评估淫羊藿苷和仙茅苷间的相互作用,按照 $q = E_{A+B}/E_A + E_B - E_A \times E_B$,计算 q 值,q 值在 1.15 ~ 20 时,表示两药间为相互协同作用。

4 结果

4.1 淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞的形成

破骨细胞的数目和活性与其骨吸收作用直接相关。正常破骨细胞形态均一,为大而圆的多核细胞,胞浆中有大小不等的空泡,细胞分布均匀、致密,轮廓清晰。经淫羊藿苷、仙茅苷处理后,破骨细胞的数目减少,细胞液泡、核等结构不太清晰。淫羊藿苷和仙茅苷共同处理后,细胞数目显著减少,形态皱缩,大小不一,无破骨细胞的形态特征。阳性破骨细胞计数结果表明, 1×10^{-6} mol/L 淫羊藿苷、仙茅苷及其组合物处理 10 d 后,破骨细胞的数目分别是对照的 63.5%、67.8% 和 28%,二者的相互作用指数 q 值为 1.26,表明二者可协同抑制破骨细胞的形成。结果见图 1。

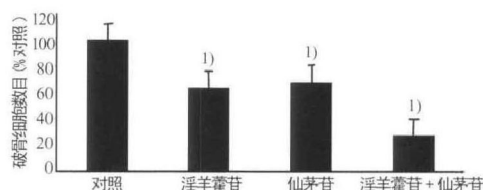


图 1 淫羊藿苷、仙茅苷及其组合物对破骨细胞形成的影响 ($n=6$) 与对照相比较 ($^{11}P < 0.001$)

4.2 淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶的活性

抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 是破骨细胞的标志酶,其活性强弱反映了破骨细胞的骨吸收能力。如图 2 所示, 1×10^{-6} mol/L 淫羊藿苷、仙茅苷及其组合物处理成熟破骨细胞 48 h,其抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 的活性分别降低为对照的 89.4%、81.9% 和 62.5%,淫羊藿苷和仙茅苷的相互作用指数 q 值为 1.35,表明二者可协同抑制破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶的活性。

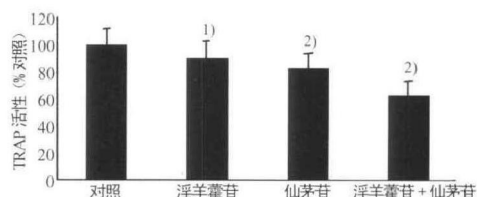


图 2 淫羊藿苷、仙茅苷及其组合物对破骨细胞分化的影响 ($n=6$) 与对照相比较 ($^{11}P < 0.01$, $^{21}P < 0.001$)

4.3 淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞的骨吸收作用 如图 3 所示,将破骨细胞和骨片共同培养,破骨细胞通过骨吸收作用,在骨片上形成吸收陷窝。用 1×10^{-6} mol/L 淫羊藿苷、仙茅苷及其组合物处理破骨细胞 12 d,破骨细胞在骨片上形成的吸收陷窝面积显著减少,分别降低为对照的 65.2%、62.4% 和 23.5%,淫羊藿苷和仙茅苷的相互作用指数为 1.29。表明淫羊藿苷和仙茅苷可协同抑制破骨细胞的骨吸收作用。

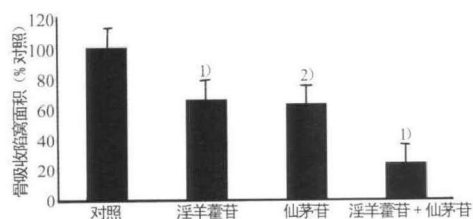


图 3 淫羊藿苷、仙茅苷及其组合物对破骨细胞骨吸收陷窝形成的影响 ($n=6$) 与对照相比较 ($^{1)} P < 0.01, ^{2)} P < 0.001$)

4.4 淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞骨架 F-actin 环的形成 如图 4 所示,RANKL 和 MCSF 诱导骨髓单核细胞形成的破骨细胞具有破骨细胞的典型特征,呈圆形或类圆形,具有多个细胞核、足体和 F-actin 环。淫羊藿苷和仙茅苷单独处理 4 h 后,破骨细胞伪足消失,F-actin 环变细;二者共同作用后,破骨细胞核皱缩,足体消失,F-actin 环变细或不明显,显示出明显的凋亡特征。

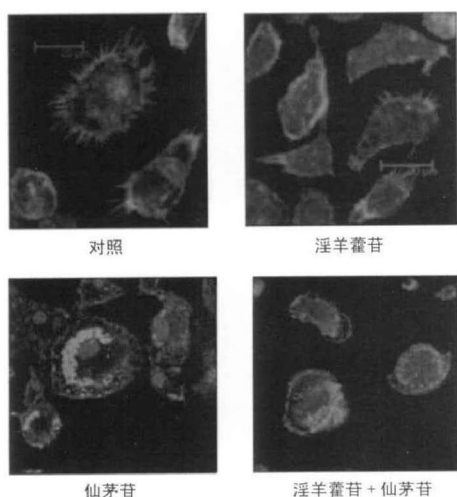


图 4 淫羊藿苷、仙茅苷及其组合物对破骨细胞 F-actin 环形成的影响

4.5 淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞骨架相关蛋白的表达 破骨细胞足体和 F-actin 环的形成

受 Rho GTPases 和 FAK 蛋白的调控。如图 5 所示,淫羊藿苷和仙茅苷单独作用可在一定程度上降低破骨细胞 FAK 的表达,但不影响 Rho GTPases 的表达。淫羊藿苷和仙茅苷共同作用后,FAK 和 Rho GTPases 的表达均显著降低,表明淫羊藿苷和仙茅苷通过调控 FAK 和 Rho GTPases 的表达,协同抑制破骨细胞骨架 F-actin 环的形成。

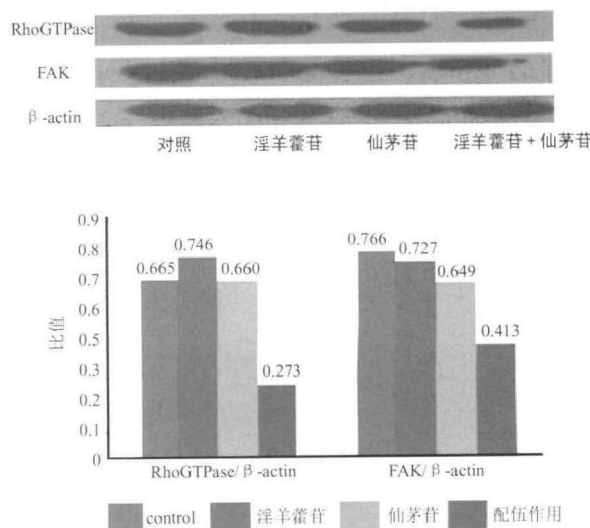


图 5 淫羊藿苷、仙茅式及其组合物对破骨细胞骨架形成相关蛋白表达的影响

5 讨论

本研究结果显示淫羊藿苷和仙茅苷可协同减少破骨细胞的数目、降低抗酒石酸酸性磷酸酶的活性,减少破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝的数目和面积,抑制破骨细胞 F-actin 环的构建及其调控蛋白 FAK 和 Rho GTPases 的表达,这些为药对淫羊藿仙茅防治骨质疏松症的作用提供了科学依据。

破骨细胞 (osteoclast, OC) 是负责骨吸收的一种特殊类型的多核巨细胞,来源于骨髓造血系统中的单核-巨噬细胞系。在骨髓微环境内,单核的破骨细胞前体细胞融合成多核细胞,分化成有骨吸收功能的破骨细胞⁸。破骨细胞通过足体和细胞骨架 F-actin 环附着在骨的表面,细胞膜褶皱化,分泌酸性物质,为各种酶类降解骨基质提供酸性环境。破骨细胞具有极性,可移行,在与骨片共同培养时,在其表面形成大小不等、形状各异的吸收陷窝。吸收陷窝的数目和面积直接反映破骨细胞骨吸收的能力。观察吸收陷窝的形态、大小、数目和面积可以反映药物对破骨细胞的作用程度^{8,11}。研究表明,在 1×10^{-6} mol/L 的浓度的淫羊藿苷和仙茅苷共同作用下破骨细胞在骨片上形成的吸

收陷窝的面积减少为对照的 23.5%, 显示出显著的协同抑制骨吸收作用。

破骨细胞有丰富的胞浆内酶系统, 在前体细胞向成熟破骨细胞分化的过程中, 产生一系列的标志蛋白参与骨骼的吸收。抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 是酸性磷酸酶的同工酶, 为破骨细胞所特有, 位于微粒体中, 被认为是破骨细胞的标志酶, 参与骨基质中磷灰石底物的降解, 其活性直接反映破骨细胞的骨吸收能力^[8]。本实验利用成骨细胞和新生 2~3 d 的大鼠长骨骨髓细胞培养诱导破骨细胞, 采用 TRAP 染色和活性测定观察药物对破骨细胞形成和分化的影响, 结果表明淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞的形成和分化。

破骨细胞通过形成足体进行粘附、迁移及骨质吸收。足体由聚合肌动蛋白 (F-actin) 致密区和肌动蛋白云组成。破骨细胞进行骨吸收时, 形成一个富含 F-actin 的缝合区锚定在骨上, 分泌质子和蛋白酶, 溶解和降解骨基质^[9]。因此, 抑制聚合肌动蛋白 F-actin 的构建, 可以减弱破骨细胞与骨组织的锚定和在骨组织表面的附着, 减少骨吸收。本研究发现淫羊藿苷或仙茅苷单独作用破骨细胞后, 破骨细胞的 F-actin 环萎缩, 伪足变细或者消失; 二者联合作用时, 破骨细胞 F-actin 环和足体消失, 显示出协同抑制破骨细胞骨架聚合肌动蛋白环 (F-actin 环) 构建的作用。

破骨细胞 F-actin 环和足体的形成受 Rho GTPases 和 FAK 蛋白的调控^[10,11]。Rho GTPases 通过调控肌动-肌球蛋白细胞骨架影响细胞移动、细胞基质黏附、基质重塑和细胞迁移^[12]。灶性黏附激酶 FAK 家族是破骨细胞中高度表达的一类蛋白, 在破骨细胞的黏附和运动能力的调控中扮演着重要的角色^[13]。当 FAK 的磷酸化受抑制时, 肌动蛋白环 F-actin 的形成受到抑制^[14], 影响破骨细胞在骨基质表面的附着和破骨细胞的骨吸收作用。本研究结果显示淫羊藿苷或仙茅苷单独作用时, 破骨细胞 Rho GTPases 的表达没有显著的变化, FAK 的表达有所下降; 二者联合作用时, 破骨细胞 Rho GTPases 和 FAK 的表达显著下降, 显示出淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞 Rho GTPases 和 FAK 的表达, 从而抑制骨吸收的作用特点。

在中医药临床实践中, 淫羊藿和仙茅常相须配伍治疗肾阳虚及其引起的骨质疏松症。除了淫羊藿仙茅的主要成分淫羊藿苷和仙茅苷外, 淫羊

藿中尚含有淫羊藿次苷、宝藿苷和朝藿定等多种黄酮类成分, 仙茅中也含有苔黑酚苷类、皂苷类和木脂素类成分, 这些成分有的对骨代谢有一定的调节作用。本课题观察了淫羊藿苷和仙茅苷在抑制骨吸收中的相互作用, 虽然对解释药对淫羊藿仙茅配伍的机制有一定的局限性, 但在一定程度上也说明了药对淫羊藿仙茅配伍的合理性。有关药对淫羊藿仙茅配伍机制的全面、深入阐释则有待于进一步的研究。

【参考文献】

- [1] 林 殷, 郭 华, 林 毅, 等. 命门用药之特点初探 (三) [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(5): 303.
- [2] 徐忠明, 周志昆. 黄芪三仙汤对绝经后妇女骨密度和骨矿含量指标影响的研究 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2009, 19(2): 84.
- [3] 沈自尹. 淫羊藿总黄酮对应一个药靶的探索过程 [J]. 中药新药与临床药理. 2003, 14(5): 293.
- [4] Jiao L, Cao DP, Qin LP, et al. Antiosteoporotic activity of phenolic compounds from *Curculigo orchioide* [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16: 874.
- [5] 刘祖德, 臧鸿声, 欧阳跃平. 新生大鼠颅骨成骨性细胞体外生长过程研究 [J]. 解剖学报, 1995, 26(2): 157.
- [6] Li B, Yu S. Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(6): 780.
- [7] Zhang Q, Qin L, He W, et al. Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity [J]. *Planta Med*, 2007, 73(1): 13.
- [8] 鲍蕾蕾, 秦路平, 卞 俊, 等. 巴戟天甲基异茜草素对破骨细胞性骨吸收的影响 [J]. 解放军药理学学报, 2009, 25(6): 508.
- [9] Stavros CM. Birth and death of bone cells; Basic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis [J]. *Endocrine Reviews*, 2000, 21(2): 115.
- [10] Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 56.
- [11] Ory S, Brazier H, Pawlak G, et al. Rho GTPases in osteoclast: Orchestrators of podosome arrangement [J]. *Eur J Cell Biol*, 2008, 87: 469.
- [12] 姚志红. Rho GTPase 在信号转导和细胞骨架中的作用 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009, 29(1): 20.
- [13] Zhang Z, Neff L, Bothwell ALM, et al. Calcitonin induces dephosphorylation of pyk2 and phosphorylation of focal adhesion kinase in osteoclasts [J]. *Bone*, 2002, 31(3): 359.
- [14] Xiong WC, Feng X. Pyk2 and FAK in osteoclasts [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2003, 8: 1219.

[收稿日期] 2012-03-22

[修回日期] 2012-04-25