

淫羊藿低糖苷组分对 UMR-106 细胞及骨质疏松斑马鱼作用的研究

赵冰洁^{1,3}, 章丽², 袁嘉瑞², 汪春飞², 封亮^{2*}, 贾晓斌^{1,2*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

3. 徐州医药高等专科学校, 江苏 徐州 221116

摘要: **目的** 研究淫羊藿低糖苷组分(LGFEH)对 UMR-106 细胞和泼尼松龙诱导的骨质疏松斑马鱼的作用。**方法** 将不同质量浓度的 LGFEH 与 UMR-106 细胞共同培养后, MTT 法测定 LGFEH 对 UMR-106 细胞增殖的影响, 通过测定细胞内外碱性磷酸酶(ALP)活性评价 LGFEH 对细胞分化的影响。将受精后 3 d 的斑马鱼幼鱼分为空白培养基组、0.5% DMSO 溶媒对照组、泼尼松龙组、依替膦酸二钠组、LGFEH (1、2、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$) 组。每天换液至受精后 9 d, 处死, 采用茜素红对各组斑马鱼幼鱼骨骼染色, 并以显微检测、数码成像方法定量分析骨骼染色区域。**结果** LGFEH 不仅可以促进成骨样细胞 UMR-106 细胞的增殖, 促进其合成和分泌 ALP, 而且能够显著增加斑马鱼头部骨骼染色面积(矿化面积)和染色累积吸光度值(骨密度)。**结论** LGFEH 体内及体外具有较好的抗骨质疏松作用。

关键词: 淫羊藿; 低糖苷组分; 骨质疏松; UMR-106 细胞; 斑马鱼; 淫羊藿苷 A; 宝藿苷 I

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)19-3441-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.19.015

Beneficial effects of low glycosides fraction from *Epimedii Herba* on UMR-106 cells and zebrafish with osteoporosis

ZHAO Bing-jie^{1,3}, ZHANG Li², YUAN Jia-rui², WANG Chun-fei², FENG Liang², JIA Xiao-bin^{1,2}

1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Key Laboratory of New Drug Delivery Systems of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. Jiangsu Provincial Xuzhou Pharmaceutical Vocational College, Xuzhou, 221116, China

Abstract: **Objective** To assess the potential effect of the low glycosides fraction from *Epimedii Herba* (LGFEH) on UMR-106 cells and zebrafish model with osteoporosis induced by Prednisolone. **Methods** The MTT assay was used to detect the effect of LGFEH on the proliferation of UMR-106 cells, and at the same time, the influence of LGFEH to the UMR-106 cells differentiation was observed through testing the ALP activity of UMR-106 cells using biochemical assays. Zebrafish larvae at 3 d post fertilization were divided into blank control group, 0.5% DMSO group, Prednisolone group, etidronate disodium group, and LGFEH (1, 2, 4, 8, and 16 $\mu\text{g/mL}$) groups. All groups were incubated in 24-well plates for 9 d until execution, and then zebrafish skeleton was anesthetized and fixed for staining with alizarin red. Quantitative analysis of the stained area was performed by microscopic inspection and digital imaging methods to reflect the amount of bone mineralization. **Results** The LGFEH significantly increased both proliferation and ALP activities of UMR-106 cells. Furthermore, compared with model group, head skeleton mineral area and IOD of the LGFEH groups were significantly increased. **Conclusion** Our results indicate that the LGFEH might be beneficial for treating osteoporosis.

Key words: *Epimedii Herba*; low glycosides fraction; osteoporosis; UMR-106 cells; zebrafish; icariin A; icariside I

骨质疏松是由各种原因引起的代谢性骨病, 其特征是全身性骨量减少、骨组织微观结构退化、骨脆性增加, 易发生骨折^[1]。原发性骨质疏松症是绝经后老年妇女的一种常见病、多发病, 严重影响着

收稿日期: 2016-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81303275, 81573620); 2013 苏州市医疗器械与新医药专项(ZXY2013022)

作者简介: 赵冰洁, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂新剂型研究。E-mail: zhaobingjie90@126.com

*通信作者 封亮 E-mail: wenmoxiushi@163.com

贾晓斌, 教授, 研究员, 博士生导师。Tel: (025)85608672 E-mail: jiaxiaobin2015@163.com

老年人的生活质量^[2]。随着世界人口老龄化的发展,骨质疏松发病率也呈上升趋势,为此,WHO 已将其列为3大老年性疾病之一。

淫羊藿是中医临床常用的抗骨质疏松症较为有效的中药。研究表明,淫羊藿中主要有效成分为黄酮类化合物^[3-5],根据所连糖基数量分为三糖苷、二糖苷、单糖苷和苷元。陈彦等^[6-7]分别用Caco-2模型和大鼠肠灌流模型研究了淫羊藿中主要黄酮在肠内的吸收和代谢。结果表明,淫羊藿黄酮的吸收性随着所连糖基数量的增多而降低,三糖苷和二糖苷首先需要在肠道内经过水解脱糖后才能被吸收,而单糖苷则可以被肠道直接吸收。本实验室前期研究表明,纤维素酶可以在体外水解淫羊藿中的多糖苷成分,使其脱去一个或多个糖基而生成次级糖苷^[8]。基于以上前期研究,本实验制备了包含8种单糖苷或二糖苷的淫羊藿低糖苷组分(LGFEH),在细胞水平研究LGFEH对大鼠成骨样细胞UMR-106的作用,同时采用斑马鱼骨质疏松模型评价其治疗骨质疏松的体内活性,为淫羊藿临床用于治疗骨质疏松提供依据,为明确淫羊藿的物质基础提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司,Agilent 1100 色谱工作站,DAD 二极管阵列检测器);CO₂细胞培养箱(HERA CELL 500, Thermo Forma 公司产品,美国);全自动酶标仪(Thermo, 美国);ZW-A 型微量振荡器(常州国华电器有限公司);SPX-80 生化培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂);IX73 荧光倒置显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 试剂与药物

0.25%胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基;MTT 购自Sigma公司;碱性磷酸酶(ALP)试剂盒;胎牛血清;多聚甲醛;茜素红;波尼松龙;依替磷酸二钠(上海江莱生物科技有限公司,批号JL150812011);乙腈为色谱纯,水为高纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞与动物

大鼠成骨样肉瘤细胞UMR-106,购自上海奥陆生物科技有限公司;斑马鱼成鱼来自德国tubingen

品系,由南京大学模式动物研究所提供。

2 方法与结果

2.1 LGFEH 的制备

淫羊藿药材购自河北楚风中药饮片有限公司(批号B407291),经中国医学科学院药用植物研究所郭宝林教授鉴定为朝鲜淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim., 留样(YYHXY-2014)保存于中国中医科学院江苏分院-江苏省中医药研究院。取淫羊藿药材1.0 kg,第1次加入18倍量50%乙醇,第2次加入15倍量50%乙醇,加热回流提取2次,每次1 h,合并滤液,滤过后减压浓缩后蒸干,得固体物215.7 g^[9]。取固体物100 g,加入一定量的纤维素酶酶解使淫羊藿多糖苷转化为低糖苷,然后经AB-8大孔树脂分离纯化得到LGFEH,储存于江苏省中医药研究院。所得LGFEH经HPLC测定,此组分包含淫羊藿苷A、大花淫羊藿苷F、宝藿苷II、箭藿苷A、箭藿苷B、鼠李糖基淫羊藿次苷、7-O-rhamnosyl icaraside II及宝藿苷I等化合物,质量分数分别为3.87%、4.11%、4.19%、8.14%、32.77%、9.74%、4.11%、6.29%。

2.2 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 11.5 软件进行统计学处理,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

2.3 LGFEH 对 UMR-106 细胞的作用

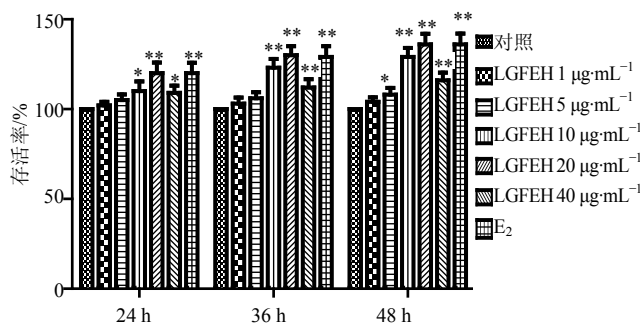
2.3.1 细胞培养 UMR-106 细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖完全培养基中,置于37℃、5% CO₂的孵箱中培养,2~3 d传代1次,取对数生长期细胞用于以下实验。

2.3.2 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞,用0.25%的胰酶消化后加入DMEM高糖培养基调整细胞悬液的浓度为 3.5×10^4 个/mL,接种于96孔板,每孔100 μ L^[10]。实验分组如下:对照组(不加药物),不同质量浓度(1、5、10、20、40 μ g/mL)的LGFEH组,阳性对照雌二醇(E₂,10 nmol/L)组^[11]。细胞完全贴壁后,分别加入上述不同药物,每组设6个复孔。分别培养24、36、48 h后,每孔加入10 μ L的MTT,继续培养4 h后,吸出培养基,每孔加入100 μ L的DMSO,震荡10 min后,用酶标仪测定各孔在630 nm(参比波长)和570 nm(测定波长)的吸光度(A)值,计算各给药组在不同时间下细胞的存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{570} \text{ 给药组} - A_{630} \text{ 给药组}) / (A_{570} \text{ 对照组} - A_{630} \text{ 对照组})$$

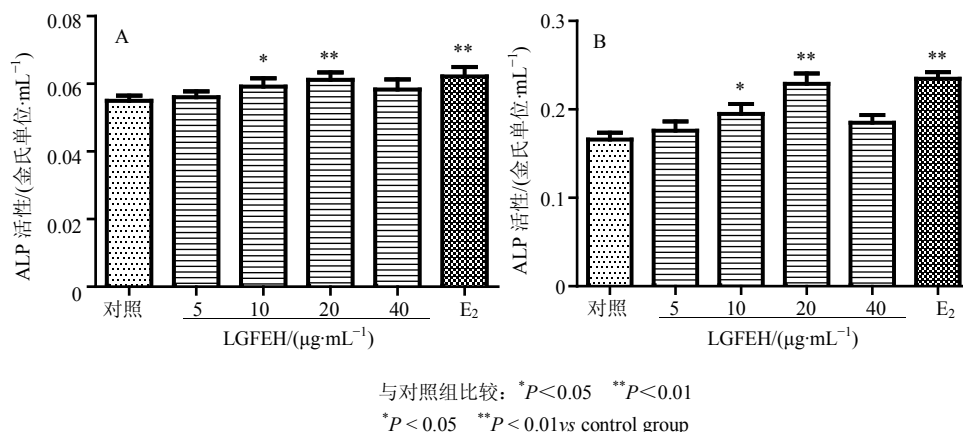
不同质量浓度的 LGFEH 在不同时间下细胞的存活率见图 1。可知, 与对照组相比, LGFEH 对 UMR-106 细胞具有一定的增殖促进作用, 在质量浓度为 1~20 $\mu\text{g/mL}$ 内, 随着质量浓度的增加, 对细胞的增殖促进作用增强, 但当质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对细胞的增殖促进作用又有所减弱。且在 24~48 h 内, 随着时间的延长, 各组细胞的存活率增加。当 LGFEH 质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$, 时间为 48 h 时促细胞增殖作用最为明显。

2.3.3 LGFEH 对 UMR-106 细胞内、外 ALP 活性的影响 取对数生长期的细胞, 0.25% 胰酶消化后加 DMEM 培养基调整细胞悬液的浓度为 3.5×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL 。细胞完全贴壁后, 设置如下分组: 对照组 (只有细胞, 不加药物), 不同质量浓度 (5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 的 LGFEH 组, 阳性对照雌二醇 (E_2 , 10 nmol/L) 组。细胞完全贴壁



与同时时间点对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group at same time point

图 1 淫羊藿低糖苷组分对 UMR-106 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Fig. 1 Effect of LGFEH on proliferation of UMR-106 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 2 LGFEH 对 UMR-106 细胞外 (A) 及细胞内 (B) ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Fig. 2 Effects of LGFEH on extracellular (A) and intracellular (B) ALP activities of UMR106 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

后, 分别加入上述不同药物, 每组设 6 个复孔。继续培养 48 h 后, 取上层培养基按照试剂盒说明书测定细胞外 ALP 的活性。用 PBS 洗 2 次, 每孔加入 20 μL Nonidet P-40 细胞裂解液, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续孵育 40 min, 在显微镜下观察细胞完全破碎后, 每孔加入 80 μL 的无血清培养基。吸取裂解后的细胞, 离心 (1 000 r/min, 10 min), 吸取上清液, 按照试剂盒说明书测定细胞内 ALP 的活性。

LGFEH 对细胞外和细胞内 ALP 活性的影响结果见图 2。可以看出, 与对照组相比, E_2 组能够显著增强细胞外 ALP 活性 ($P < 0.01$), LGFEH 组, 随着质量浓度的增加, 细胞内、外 ALP 活性随之增加, 与对照组相比, 10、20 $\mu\text{g/mL}$ LGFEH 能够显著升高 ALP 活性 ($P < 0.05$ 、0.01), 但是, 40 $\mu\text{g/mL}$ LGFEH 却不能显著调高 ALP 活性。实验结果表明, 20 $\mu\text{g/mL}$ 为 LGFEH 促进 UMR-106 细胞分化的最佳质量浓度。

2.4 LGFEH 对斑马鱼的作用

2.4.1 斑马鱼的饲养和繁殖 饲养温度控制在 (28.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 光照/黑暗周期 14/10 h, 产卵前的雌、雄斑马鱼分缸饲养。实验前 1 晚将斑马鱼按雌雄 1:1 的比例放入交配缸, 用隔板将雌雄分开。次日晨抽去隔板使其自然交配。采集 60 min 内受精卵, 放入盛有培养基 (5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.33 mmol/L CaCl_2 、0.33 mmol/L MgSO_4 , 5%~10% 亚甲基蓝) [12] 的培养皿中置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中孵化 3 d 后待用。

2.4.2 药物溶液的配制 (1) 泼尼松龙溶液: 精密称取泼尼松龙 9.011 mg, 加入 DMSO 1.5 mL, 用培养基稀释并定容至 10 mL, 即得 2 500 $\mu\text{mol/L}$ 的

泼尼松龙储备液。临用前加入适量 DMSO 并用培养基稀释成含 0.5% DMSO 的 25 $\mu\text{mol/L}$ 的泼尼松龙溶液。(2) 含 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙的依替膦酸二钠溶液: 精密称取依替膦酸二钠 15 mg, 用培养基稀释并定容至 10 mL, 即得 1 500 $\mu\text{g/mL}$ 依替膦酸二钠储备液。取 1 500 $\mu\text{g/mL}$ 依替膦酸二钠储备液 1 mL 和 2 500 $\mu\text{mol/L}$ 的泼尼松龙储备液 0.5 mL, 并加入适量 DMSO, 用培养基稀释并定容至 50 mL, 即得含 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙的 30 $\mu\text{g/mL}$ 依替膦酸二钠溶液。(3) 含 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙的 LGFEH 溶液: 精密称取 LGFEH 4.0 mg, 加入少量 DMSO 使溶解并用培养基定容至 50 mL, 配成 80 $\mu\text{g/mL}$ 的 LGFEH 的储备液。精密量取适量 LGFEH 储备液, 分别加入 2 500 $\mu\text{mol/L}$ 的泼尼松龙储备液 0.5 mL 和适量 DMSO, 用培养基稀释并定容至 50 mL, 得含 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙的 1、2、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ LGFEH 的 0.5% DMSO 溶液。

2.4.3 分组与给药 挑选受精后第 3 天已破膜孵出的斑马鱼幼鱼, 分成 8 组置 24 孔板, 每组 2 孔, 每孔 8 条幼鱼。每孔加入 2 mL 用新鲜培养基配制的不同药物, 分别为 0.5% DMSO 阴性对照组, 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙模型组, 30 mg/L 依替膦酸二钠溶液 (含 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙) 阳性药物组和 1、2、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ LGFEH (含 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙) 组。每天用移液枪将每孔药液吸出 1 mL, 然后加入等量的新鲜药液。在 $(28.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养至受精后 9 d, 斑马鱼幼鱼体内卵黄囊含丰富的营养可供培养 9~10 d, 无需喂食。

2.4.4 斑马鱼骨骼的茜素红染色 将培养至受精后 9

d 斑马鱼用间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐 (MS-222) 麻醉处死, 4%多聚甲醛固定 2 h, 加入新鲜配制的含有 1.5% H_2O_2 和 1% KOH 的漂白剂将斑马鱼眼漂白至透明, 去除漂白剂后置于 50%乙醇中脱水 10 min, 然后用 0.5% KOH 配制的茜素红染液染色过夜, 随后分别置于不同比例的 0.5% KOH 和甘油 (比例分别为 3:1、1:1、1:3) 中, 将鱼体进行透化, 最后将幼鱼保存于纯甘油中用于拍照观察。

2.4.5 矿化骨骼的定量分析 将幼鱼置于载玻片上摆好位置, IX73 荧光倒置显微镜观察茜素红染色的斑马鱼头骨腹面, 用 cellsens Standard 软件采集图像, 所有的图像均采用相同的光强度和曝光设置。用专业图像分析软件 Image pro plus 6.0 计算茜素红染色区域的面积和累积吸光度, 以分别反映骨矿化量和骨密度。

受精后 9 d 的各组斑马鱼腹面头骨茜素红染色的显微成像见图 3, 图像分析软件计算的斑马鱼头骨矿化面积和骨密度见图 4。与空白培养基相比, DMSO 组无显著性差异, 与 DMSO 组比较, 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙模型组的矿化面积和骨密度值极显著降低 ($P < 0.001$), 提示泼尼松龙成功诱导斑马鱼骨质疏松。与泼尼松龙模型组比较, LGFEH 质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时, 矿化面积和骨密度值均无明显差异, LGFEH 质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 时, 矿化面积和骨密度值显著增加 ($P < 0.05$), 而当 LGFEH 质量浓度为 4~16 $\mu\text{g/mL}$ 时, 矿化面积和骨密度值非常显著增加 ($P < 0.01$), 提示 LGFEH 可对抗泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松, 且呈一定的量效关系。

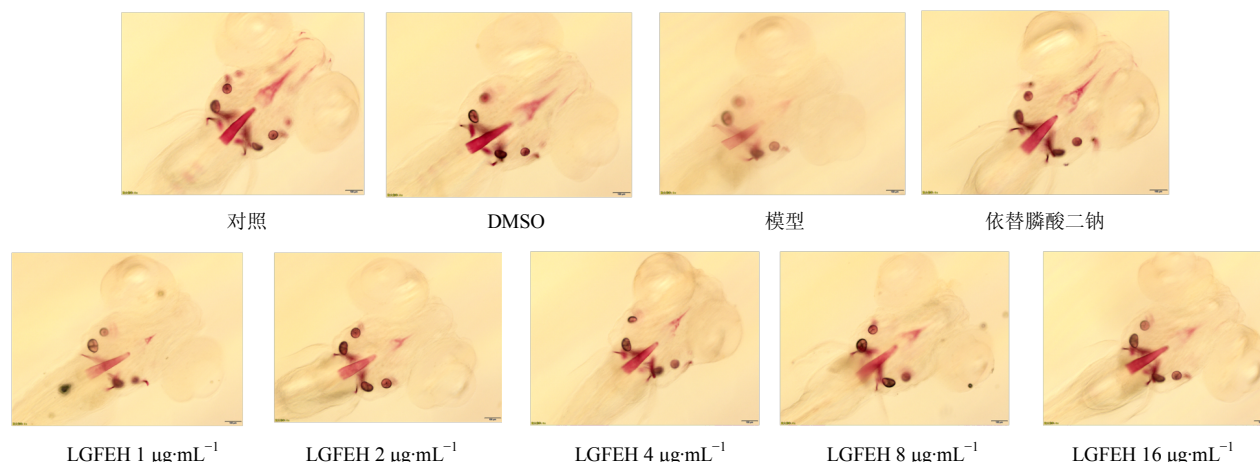


图 3 各组受精后 9 d 斑马鱼幼鱼的腹面头骨茜素红染色的显微成像图

Fig. 3 Zebrafish larvae at 9 d after fertilization by ventral view of alizarin red whole-mount preparations in each group

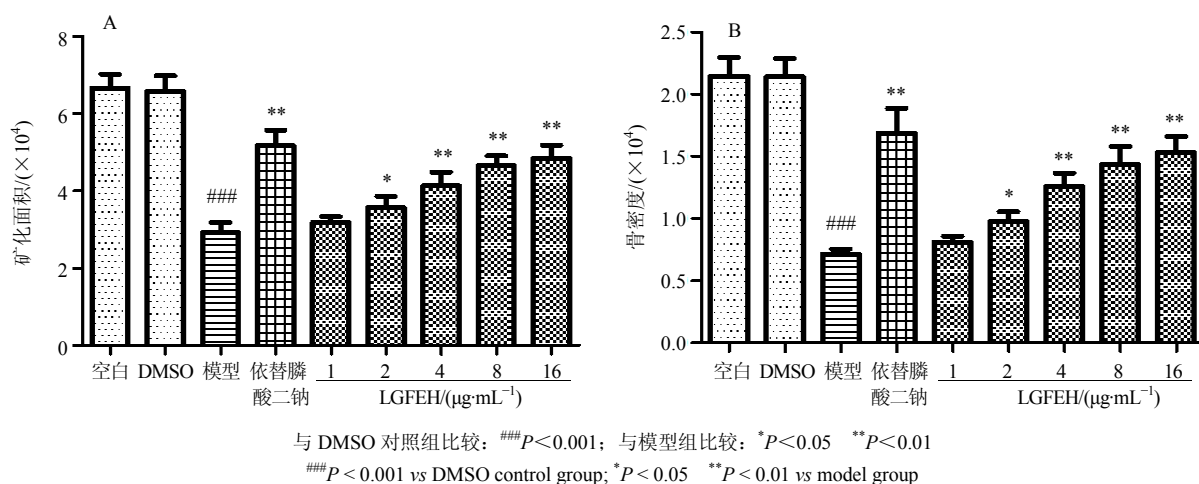


图 4 LGFEH 对斑马鱼幼鱼头矿化面积 (A) 及骨密度 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of LGFEH on alizarin red staining area (A) and bone density (B) of zebrafish larvae skull ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

越来越多的研究表明,淫羊藿中的黄酮类成分对于治疗骨质疏松具有较好的作用^[13-15]。但黄酮类成分在体内的吸收性随着糖基数量的减少而增加,即单糖苷(如宝霍苷 I) > 二糖苷(如淫羊藿苷) > 三糖苷(如朝藿定 A、B、C)^[7]。本实验室前期研究表明,纤维素酶可以使淫羊藿中的黄酮水解脱去一个或两个糖而生成次级糖苷。本研究以淫羊藿 50%乙醇提取物为原料^[16],通过酶解、分离纯化工工艺制备出了 LGFEH,此组分包含了 8 种化合物,它们均为单糖苷或二糖苷,具有较好的吸收性。

成骨细胞是骨的形成、骨骼发育与生长的重要细胞,其主要作用是促进并调节骨的矿化。大鼠成骨样细胞 UMR-106 从形态和性质上都较好地保留了成骨细胞独有的特征,并且具有稳定、均一、纯度高、易于培养的优点,因此成为国际公认的可以用来代替成骨细胞的细胞系^[10-11,17-18]。ALP 是碱性环境中水解磷酸酯的一组酶类,是成骨细胞典型的标志酶,可作为成骨细胞早期分化的指标^[19]。本实验以成骨样细胞 UMR-106 的增殖和细胞内外 ALP 的活性为指标,结果证实, LGFEH 和 E_2 能够促进 UMR-106 细胞增殖,增强细胞内外的 ALP 活性,表明 LGFEH 能够促进成骨样细胞合成和分泌 ALP,提示其具有促进成骨细胞增殖和分化的作用。

斑马鱼幼鱼头骨发育包含骨形成和骨吸收的较完整体系,在国外,斑马鱼骨质疏松模型已经成为一个日渐成熟的动物模型用于药物的抗骨质疏松作用的评价^[20]。近年来,本实验室以骨质疏松斑马鱼为模型进行壮骨药物的筛选,均取得的较好的

效果^[21-23],证实了该模型用于评价药物抗骨质疏松作用的合理性与可行性。本实验在课题组前期研究的基础上,以 25 $\mu\text{mol/L}$ 的泼尼松龙成功建立了斑马鱼骨质疏松模型,用茜素红染液对各组斑马鱼头部矿化骨骼进行染色,随后用图像分析软件对染色部分进行定量分析,并以累积吸光度值反映骨密度的大小,从而利于统计分析^[24]。实验结果表明:给予 LGFEH 的各组斑马鱼组头部骨骼染色面积和累积吸光度值均有不同程度的增加,且呈一定的量效关系。

综上所述, LGFEH 对于骨质疏松的治疗具有较好的作用,不仅能够促进成骨细胞的增殖和分化,而且能够显著增加骨质疏松斑马鱼骨骼矿化面积及骨密度,有望开发成为治疗骨质疏松的新型药物。

参考文献

- [1] 刘忠厚. 骨质疏松症 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1997.
- [2] Li X F, Xu H, Zhao Y J, et al. Icariin augments bone formation and reverses the phenotypes of osteoprotegerin-deficient mice through the activation of Wnt/ β -Catenin-BMP signaling [J]. *Evid Based Complement Alterned Med*, 2013, 2013: 652317.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 甘井山, 马 艳, 王宗艳, 等. 淫羊藿中化学成分的上层/TOF-MS 分析 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(4): 349-352.
- [5] Jiang J, Zhao B J, Song J, et al. Pharmacology and clinical application of plants in *Epimedium* L. [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(1): 12-23.
- [6] 陈 彦, 贾晓斌, Hu M, 等. 淫羊藿苷在 Caco-2 细胞单

- 层模型中的吸收机制 [J]. 中国中药杂志, 2008, 339(10): 1164-1167.
- [7] 陈彦, 贾晓斌, Hu M, 等. Caco-2 细胞单层研究淫羊藿黄酮类成分的吸收转运 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 220-224.
- [8] 丁冬梅, 贾晓斌. 淫羊藿抗骨质疏松组分的制备及其缓释制剂研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2014.
- [9] 蒋艳荣, 张振海, 孙娥, 等. 酶解淫羊藿总黄酮制备宝藿苷 I [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(4): 261-263.
- [10] Pang W Y, Wang X L, Mok S K, *et al.* Naringin improves bone properties in ovariectomized mice and exerts oestrogen-like activities in rat osteoblast-like (UMR-106) cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 159(8): 1693-1703.
- [11] Mok S K, Chen W F, Lai W P, *et al.* Icaritin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR 106 cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 159(4): 941-949.
- [12] Brand M, Granato M, Nüsslein-Volhard C. Keeping and raising zebrafish [J]. *Zebrafish*, 2002, 261: 7-37.
- [13] 陈柏龄, 谢登辉, 王宗伟, 等. 淫羊藿总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 OPG、OPG mRNA 表达的影响 [J]. 中国骨伤, 2009, 22(4): 271-273.
- [14] Zhang G, Qin L, Shi Y. Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22: 1072-1079.
- [15] 季晖, 刘康, 龚晓健, 等. 淫羊藿总黄酮对摘除卵巢大鼠骨质疏松症的防治作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(1): 8-12.
- [16] 赵冰洁, 宋捷, 章丽, 等. 淫羊藿醇提物对去卵巢大鼠骨质疏松治疗作用及机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1919-1925.
- [17] Xie F, Wu C F, Lai W P, *et al.* The osteoprotective effect of *Herba Epimedii* (HEP) extract *in vivo* [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2005, 2(3): 353-356.
- [18] Sandoval-Usme M C, Umana-Perez A, Guerra B. Simvastatin impairs growth hormone-activated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway in UMR-106 osteosarcoma cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87769.
- [19] Wright K R, Story B, Hedges D E, *et al.* Standard morphology is more sensitive than TUNEL for identification of apoptotic osteoclasts [J]. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: S324.
- [20] Kim S N, Bae S J, Kwak H B, *et al.* *In vitro* and *in vivo* osteogenic activity of licochalcone A [J]. *Amino Acids*, 2012, 42(4): 1455-1465.
- [21] 王丹丹, 韦英杰, 景莉君, 等. 基于斑马鱼毒/效联合评价的强骨胶囊抗骨质疏松活性与安全性研究 [J]. 中成药, 2015, 37(5): 938-943.
- [22] 詹扬, 韦英杰, 孙娥, 等. 基于斑马鱼模型的朝鲜淫羊藿抗骨质疏松活性部位筛选 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2036-2041.
- [23] 詹扬, 韦英杰, 王长梅, 等. 基于斑马鱼模型评价微量淫羊藿苷和朝藿定 B 的抗骨质疏松活性 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(1): 30-35.
- [24] 韦英杰, 王长梅, 蔡雪婷, 等. 地塞米松影响骨骼发育的斑马鱼模型的建立 [J]. 药学报, 2013, 48(2): 255-260.