DOI:10.16016/j.1000-5404.202106046

金雀异黄酮对去势大鼠分离培养的成骨细胞增殖及分化的影响

谢艳芳[1],游丽娟[2],张菊林[1],胡秦妮[1],张 涛[1],李 娟[1],高玉海[3] 730050 兰州,中国人民解放军联勤保障部队第940医院:检验科[1],基础医学实验室[3];730050 兰州,甘肃省妇幼保健院健康管理中心[2]

[摘要] **目的** 研究金雀异黄酮(Genistein,GEN)对去势大鼠分离培养的成骨细胞增殖及分化的影响。**方法** 选取3月龄SD雌性大鼠30只,分为假手术组(Sham)、切除卵巢模型组(OVX)和GEN治疗组(OVX+GEN)。双能X射线骨密度仪检测大鼠全身骨密度。各组选取3只最接近其骨密度均值的大鼠麻醉后处死,无菌分离培养成骨细胞。CCK-8检测细胞增殖能力,化学法检测碱性磷酸酶(ALP)活性,RT-PCR检测各组成骨细胞中骨形成相关基因*Runx*-2、*BMP*-2的表达情况;钙化结节染色观察钙化结节阳性克隆数并计算钙化面积。**结果** 全身骨密度检测结果显示,OVX组全身骨密度显著低于Sham组,而OVX+GEN组全身骨密度显著高于OVX组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。细胞增殖、ALP活性检测、RT-qPCR检测成骨性基因的表达以及钙化结节面积结果均表明,OVX组与Sham组相比均显著降低($P<0.01$),而OVX+GEN组与OVX组相比均显著增加($P<0.01$)。**结论** GEN提高去卵巢大鼠骨密度可能与其促进成骨细胞增殖和成熟矿化能力有关。

[关键词] 金雀异黄酮;骨密度;成骨细胞;骨形成
[中图法分类号] R282.71; R322.71; R329.28 [文献标志码] A

Effect of genistein on proliferation and differentiation of osteoblasts isolated and cultured from ovariectomized rats

XIE Yanfang[1], YOU Lijuan[2], ZHANG Julin[1], HU Qinni[1], ZHANG Tao[1], LI Juan[1], GAO Yuhai[3] [1]Department of Clinical Laboratory, [3]Laboratory of Basic Medical Scineces, No. 940 Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese PLA, Lanzhou, Gansu Province, 730050; [2]Health Management Center, Gansu Provincial Hospital of Maternal and Child Health, Lanzhou, Gansu Province, 730050, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of genistein (GEN) on the proliferation and differentiation of osteoblasts isolated and cultured from ovariectomized rats. **Methods** Thirty 3-month-old female SD rats were divided into sham operation group (Sham), ovariectomy model group (OVX) and Gen treatment group (OVX+GEN). Their bone mineral density of whole body of was measured by dual energy X-ray absorptiometry. Three rats out of each group with bone mineral density closest to the mean value were killed after anesthesia, and osteoblasts were isolated and cultured aseptically. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay, alkaline phosphatase (ALP) activity was detected by chemical method, and the expression of bone formation related genes *Runx*-2 and *BMP*-2 in the obtained osteoblasts was detected by RT-PCR. The number of positive clones of calcified nodules was observed after staining and the calcified area was calculated. **Results** The results of whole-body bone mineral density showed that the whole-body bone mineral density was significantly lower in the OVX group than the sham group, while that in the OVX+GEN group was significantly higher than that in the OVX group ($P<0.01$). The OVX group had significantly lower cell proliferation, ALP activity, expression levels of Runx-2 and BMP-2 and calcified nodule area when compared

[基金项目] 联勤保障部队第940医院民用项目(2021yxky050);甘肃省青年科技基金计划项目(20JR5RA589)
[通信作者] 高玉海,E-mail:gyh1389@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议( )

with the sham group ($P<0.01$), while the OVX +GEN group had obviously higher results of above tests than the OVX group ($P<0.01$). **Conclusion** Gen can improve the bone mineral density of osteoporosis in OVX rats, which may be related to its ability to promote osteoblast proliferation, maturation and mineralization.

[**Key words**] genistin; bone mineral density; osteoblast; bone formation

Supported by the Civilian Project of No. 940 Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese PLA (2021yxky050) and the Project of Youth Science and Technology Foundation of Gansu Province (20JR5RA589). Corresponding author: GAO Yuhai, E-mail: gyh1389@126.com

骨质疏松症(osteoporosis,OP)是一种因骨密度降低、骨量减少而导致骨折危险性增加的全身性骨骼疾病,然而目前尚无疗效显著、不良反应少、价格低廉的药物[1-2]。雌激素类药物治疗骨质疏松效果显著,但其会引起子宫内膜癌、乳腺癌、心血管疾病发生等一系列不良反应[3]。黄酮类化合物又被称为植物雌激素,具有很好的促进骨形成、抑制骨吸收的活性,是未来骨质疏松症替代疗法的首选药物之一。金雀异黄酮(Genistein,GEN)又称大豆异黄酮,具有预防绝经后骨质疏松的雌激素样活性作用[4-6]。本课题组前期体内实验表明GEN能够显著提高大鼠峰值骨量和抑制去卵巢大鼠骨丢失[7-8]。但是,对于其是如何提高大鼠骨密度,抑制去卵巢大鼠骨丢失的分子机理还不清楚。基于药物在体内代谢过程是一个含有成骨细胞、骨髓间充质细胞、破骨细胞和骨细胞的一个复合群体。我们假设,GEN抑制去卵巢大鼠骨丢失是通过提高其成骨细胞的增殖和成熟矿化能力来实现的。因此,本实验通过GEN体内实验的大鼠分离提取成骨细胞进行体外培养来研究其抗骨质疏松的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级2月龄健康雌性SD大鼠30只,购自甘肃中医药大学SPF级动物实验中心,许可证号SCXK(甘)2015-2002,所有的动物实验遵照国家实验动物饲养和使用指南。

1.2 试剂与仪器

GEN购自中国药品生物制品检定所(纯度>98%);α-MEM培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清FBS购自美国HyClone公司;Ⅰ型胶原(Collagen Ⅰ,Col Ⅰ)酶、胰蛋白酶购自美国Sigma公司;CCK-8细胞增殖检测试剂盒购自日本Dojindo Laboratories公司。碱性磷酸酶活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;RNAiso Reagent、反转录试剂盒、*Taq* DNA聚合酶、Easy Dilution稀释液均购自TaKaRa公司,引物由TaKaRa公司设计合成;茜素红购自Sigma公司;双能X射线骨密度仪购自美国GE公司;CO_2细胞培养箱购自美国Thermo Revco公司;台式高速冷冻离心机购自德国Heraeus公司;紫外分光光度计购自美国Bio-Rad公司;实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司;酶标仪购自Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组、造模及药物处理 按照体质量均值将30只SD大鼠分为假手术(Sham)组、双侧卵巢切除(OVX)组和去卵巢+GEN(OVX+GEN)组,每组10只。各组大鼠腹腔注射3 mL/kg的10%水合氯醛进行麻醉。Sham组大鼠行卵巢周围少许脂肪组织切除,模型组大鼠切除双侧卵巢。抗炎症处理1周后,给予OVX+GEN组大鼠每日灌服25 mg/kg GEN,Sham组和OVX组灌服相应体积的蒸馏水。药物处理8周后进行后续实验操作。

1.3.2 大鼠全身骨密度测定 大鼠腹腔注射3 mL/kg的10%水合氯醛进行麻醉,置于双能X射线骨密度仪检测全身骨密度,骨密度结果利用每平方厘米的骨质量来表示(单位为g/cm^2)。

1.3.3 成骨细胞的分离与培养 选取3只最接近各组骨密度平均值的大鼠麻醉后脱臼处死,置于75%酒精中浸泡消毒25 min后在超净工作台中,剔除肌肉和结缔组织后迅速剥离出股骨,并用磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.8)清洗3次;将股骨剪碎大小约1 mm×1 mm×1 mm并转移至培养瓶中,后续实验步骤参照谢艳芳等[9]大鼠颅骨成骨细胞的分离培养方法。

1.3.4 HE染色和Col Ⅰ的免疫组化染色 将P1代细胞进行爬片培养后分别进行成骨细胞HE染色和Col Ⅰ的免疫组化染色。①HE染色:向爬片滴加1 mL苏木精染液进行初染,10 min后流水冲洗,滴加盐酸酒精封化液封化1 s,将爬片立刻放入流水冲洗15 min。再加入1 mL伊红染液进行复染,5 min后依次经过低浓度到高浓度的酒精溶液进行脱水,每次2 min,最后于二甲苯溶液中浸泡2 min后封片。②Col Ⅰ免疫组织化学染色:滴加山羊血清工作液,37 ℃孵育15~20 min后倾去勿洗,加入Col Ⅰ抗体(1∶500)并放置4 ℃过夜,PBS漂洗3次,每次3 min,之后滴加相应的二抗工作液,37 ℃孵育60 min,PBS漂洗3次,每次3 min,最后利用DAB显色剂进行显色,流水冲洗后封片,分别正置荧光显微镜观察细胞的形态。

1.3.5 CCK-8检测细胞增殖 将Sham组、OVX组和OVX+GEN组分离培养的成骨细胞以3×10^5/mL接

种于96孔板中,向每孔中加入200 μL。分别培养3、6 d后,加入含有CCK-8试剂(6 μL/孔)的培养基,37 ℃孵育4 h之后用酶标仪测定波长450 nm处光密度值[D(450)]。

1.3.6　碱性磷酸酶活性检测　　将Sham组、OVX组和OVX+GEN组分离培养的成骨细胞以5×10^5/mL分别接种于6孔板中[10],分别培养3、6 d后,弃去培养基,用PBS漂洗2次,按照ALP活性测定剂盒说明书检测胞内ALP活性,每孔蛋白浓度用BCA法进行测定,ALP活性根据每毫克蛋白催化生成酚的量来换算为nmol·15 min^{-1}·mg^{-1}。

1.3.7　RT-qPCR检测　　将Sham组、OVX组和OVX+GEN组分离培养的成骨细胞以5×10^5/mL接种于6孔板中[5],培养24 h后,用TRIzol提取细胞总RNA,紫外分光光度计检测浓度,并用1%甲醛变性琼脂糖电泳检测其完整性。按照PCR扩增体系及反应条件说明书进行PCR扩增;分别利用*BMP*-2、*Runx*-2引物进行PCR反应制备标准曲线,经内参校正,分别求得目的基因的相对表达量。RT-qPCR数据分析采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法,所用引物根据TaKaRa所发布的序列设计并合成(表1)。

表1　Real Time RT-qPCR引物序列

基因	Genbank序列	引物序列	产物长度/bp
BMP-2	NM_017178	上游:5′-ACCGTGCTCAGCTTCCATCAC-3′	249
		下游:5′-TTCCTGCATTTGTTCCCGAAA-3′	
Runx-2	NM-053470.1	上游:5′-GCACCCAGCCCATAATAGA-3′	165
		下游:5′-TTGGAGCAAGGAGAACCC-3′	
GAPDH	NM-017008.3	上游:5′-TATCGGACGCCTGGTTAC-3′	140
		下游:5′-CTGTGCCGTTGAACTTGC-3′	

1.3.8　钙化结节染色　　将Sham组、OVX组和OVX+GEN组分离培养的成骨细胞以3×10^5/mL接种于6 cm培养皿中,待细胞融合后更换成骨诱导培养液培养12 d后,弃去培养基,PBS清洗3次后,加入pH=8.9、0.1%的茜素红染色液,37 ℃水浴1 h,流水冲洗,换固定液照相记录结果,照相后采用Ipp(Image-Pro Plus 6.0)灰度分析软件,对各组钙化结节的面积进行统计。

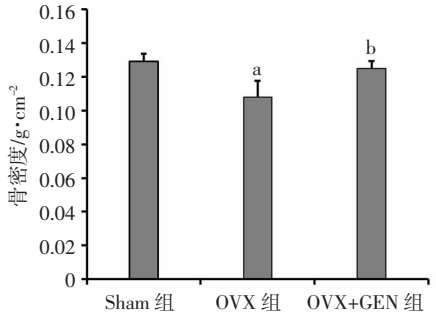
1.4　统计学处理

采用SPSS 20.0软件处理数据,结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用单因素方差分析进行方差齐性检验,方差齐者采用LSD检验,方差不齐者采用Tamhane's检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　大鼠骨密度检测结果

将Sham组、OVX组和OVX+GEN组的大鼠分别连续喂养8周之后,利用双能X射线骨密度仪检测大鼠全身骨密度。如图1所示,与Sham组相比,OVX组骨密度显著降低($P<0.01$)。说明大鼠切除卵巢会导致骨密度降低,进而导致骨质疏松;而当服用25 mg/kg GEN后,OVX+GEN组骨密度显著高于OVX组($P<0.01$)。表明GEN对去卵巢大鼠所致的骨质疏松的骨密度有显著的治疗效果。



a:$P<0.01$,与Sham组比较;b:$P<0.01$,与OVX组比较

图1　大鼠全身骨密度检测结果　($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

2.2　成骨细胞HE染色和ColⅠ的免疫组化染色结果

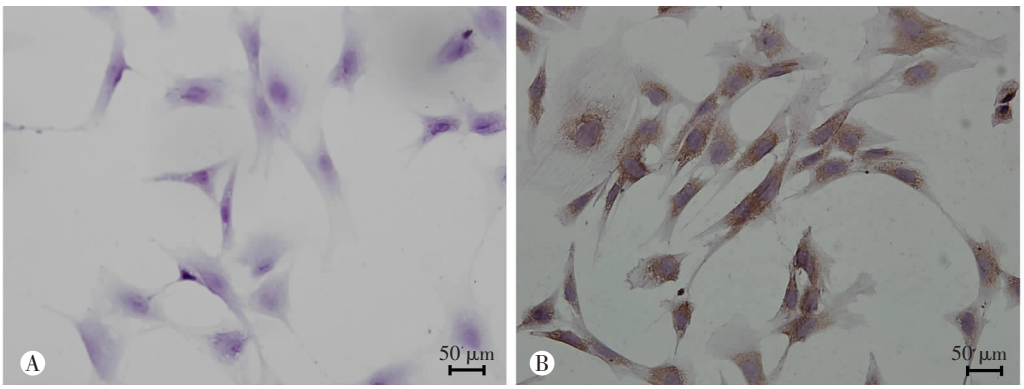
将Sham组、OVX组和OVX+GEN组分离培养的成骨细胞进行爬片处理后,分别进行HE染色和免疫组织化学染色。HE染色结果表明,分离培养的成骨细胞培养48 h在显微镜下形态清晰呈长梭形、三角及成纤维细胞样(图2A)。ColⅠ免疫组织化学染色结果显示,ColⅠ在成骨细胞表面高表达在显微镜下呈深棕黄色(图2B);而ColⅠ和一些非胶原蛋白是成骨细胞分化的标记物,能反映成骨细胞分化表型特征。因此,本实验分离得到较纯的成骨细胞。

2.3　CCK-8细胞增殖检测结果

将Sham组、OVX组和OVX+GEN组分离的成骨细胞分别培养3 d后,通过CCK-8检测各组成骨细胞的增殖情况。结果显示,OVX组成骨细胞增殖能力(0.307±0.015)显著低于Sham组(0.347±0.025,$P<0.01$),说明大鼠切除卵巢会导致其成骨细胞的增殖;而当大鼠服用GEN后,OVX+GEN组成骨细胞增殖能力(0.393±0.011)显著高于OVX($P<0.01$),增幅为28%。说明GEN可促进成骨细胞的增殖。

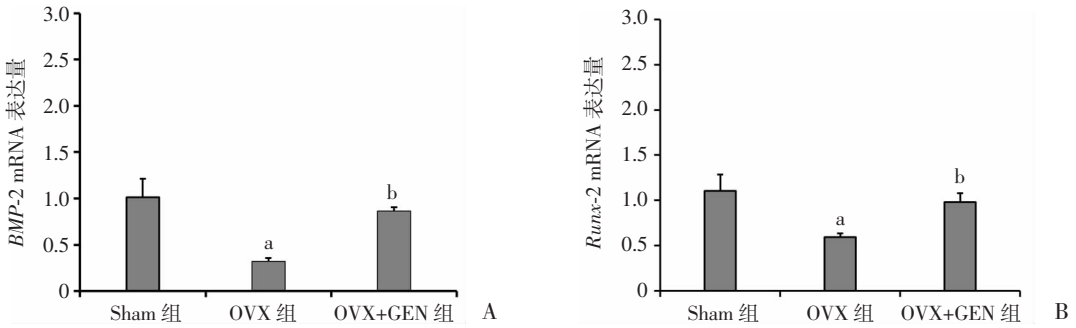
2.4　ALP活性检测结果

将Sham组、OVX组和OVX+GEN组分离培养的成骨细胞分别培养3、6 d后,通过ALP检测试剂盒分别检测各组成骨细胞ALP活性。结果显示,OVX组分离得到的成骨细胞ALP活性显著低于Sham组($P<0.01$,表2),当服用GEN后,OVX+GEN组ALP活性显著高于OVX组($P<0.01$,表2),3、6 d的增幅分别为18.7%和41.1%。说明GEN可增加成骨细胞ALP的活性。



A:成骨细胞 HE 染色;B:成骨细胞中 Col Ⅰ免疫组织化学染色

图 2 成骨细胞 HE 染色和 Col I 的免疫组化染色



A:成骨性相关因子 Runx-2 的表达;B:成骨性相关因子 BMP-2 的表达 a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 OVX 组比较

图 3 成骨细胞骨形成因子 Runx-2 和 BMP-2 mRNA 表达结果 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

表 2 药物处理后成骨细胞 ALP 活性检测结果

(nmol · 15 min^{-1} · mg^{-1}, $\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	3 d	6 d
Sham 组	18.236±0.384	22.002 47±1.864
OVX 组	16.143±0.197[a]	18.238 08±1.140[a]
OVX+GEN 组	19.169±0.437[b]	25.736 02±0.728[b]

a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 OVX 组比较

2.5 RT-qPCR 检测结果

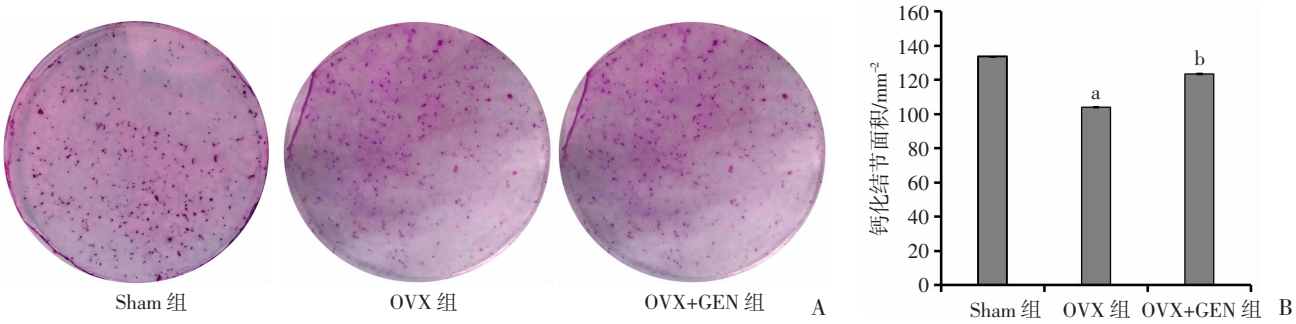
将 Sham 组、OVX 组和 OVX+GEN 组分离的成骨细胞培养 24 h 后,通过 RT-qPCR 法检测成骨性相关因子 *Runx*-2 和 *BMP*-2 的基因表达情况。结果表明,OVX 组成骨细胞的成骨性因子 *Runx*-2 和 *BMP*-2 基因表达显著低于 Sham 组($P<0.01$,图 3)。说明大鼠切除卵巢会抑制其成骨性相关因子 *Runx*-2 和 *BMP*-2 的基因表达;当服用 GEN 后,OVX+GEN 组成骨细胞 *Runx*-2 和 *BMP*-2 基因表达量显著高于 OVX 组($P<0.01$,图 3)。说明 GEN 可显著促进去卵巢大鼠的成骨细胞成骨性因子 *Runx*-2 和 *BMP*-2 基因的表达。

2.6 钙化结节染色结果

将 Sham 组、OVX 组和 OVX+GEN 组分离的成骨细胞进行成骨性诱导培养 12 d 后,通过茜素红染色法对成骨细胞进行钙化结节染色。如图 4A 所示,肉眼所见 OVX 组钙化结节染色面积和数量较 Sham 组少,而 OVX+GEN 组钙化结节面积和数量较 OVX 组明显增多。说明大鼠切除卵巢会抑制其成骨细胞成熟矿化的能力;图 4B 为钙化结节面积的量化结果,OVX 组钙化结节面积显著低于 Sham 组($P<0.01$),OVX+GEN 组钙化结节面积显著高于 OVX 组($P<0.01$)。说明 GEN 可显著提高去卵巢大鼠成骨细胞成熟矿化的能力。

3 讨论

OP 是一种潜在的、渐进性的全身性骨骼疾病。据报道,在所有绝经后妇女所患疾病中,与骨质疏松症相关的疾病就占了一半[11]。补充雌激素治疗骨质疏松是常见的治疗手段,但长期服用会引发严重的毒副作用。植物雌激素作为一类杂环多酚类化合物,其主要来自于天然中草药植物的提取,却无明显的毒副作用。目前发现的具有活性单体的中药主要有黄酮类、香豆素类、二苯乙烯类和木脂素类四大类,因其结构和功能与人体雌激素 17-β-雌二醇(E2)类似,可直接或间接作用于雌激素信号通路,以较低的亲和度与雌激素受



A:茜素红染色观察各组成骨细胞的钙化结节;B:各组钙化结节面积分析 a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 OVX 组比较

图 4 成骨细胞形成钙化结节的结果 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

体结合而发挥雌激素的作用,从而大大减少了雌激素在使用过程中带来的副作用,成为当前激素研究开发领域关注的热点[12-13]。

GEN 又称染料木素,是大豆异黄酮的一种,具有抑制肿瘤生长、抗氧化、抑制血管生成及抗骨质疏松症等功效。研究报道,染料木素一种雌激素受体(ER)选择性结合的植物雌激素,与 ERβ 具有更大的亲和力。对骨细胞具有双重作用,能够抑制破骨细胞的骨吸收活性,刺激骨髓基质祖细胞(BMSCs)和成骨细胞的成骨分化和成熟[14-16]。韩桂秋等[17]研究报道,GEN 能够促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖,并促进其向成骨细胞分化。成魁等[18]报道,GEN 能够提高青年大鼠的峰值骨量,并能够抑制去卵巢大鼠的骨丢失。因此本研究设想,GEN 提高青年大鼠的峰值骨量,抑制去卵巢大鼠的骨丢失,是由于 GEN 能够促进大鼠体内成骨细胞的增殖和分化,促进成骨细胞的矿化成熟而发挥作用的。

本实验通过检测大鼠全身骨密度后发现,去除卵巢后大鼠的骨密度与 Sham 组相比,骨密度显著降低;而灌胃 GEN 后,大鼠骨密度显著升高。说明 GEN 对治疗骨质疏松有显著效果,前期大量实验也证实了这一点[19]。ALP 是成骨性分化的标志性指标,因此本实验以 ALP 作为一个衡量指标。结果表明,与 Sham 组相比,骨质疏松模型组的成骨细胞 ALP 活性明显降低,而当大鼠灌胃 GEN 后,其 ALP 活性显著增强。同时,*Runx*-2 作为一个重要的成骨的转录因子,在骨代谢活性中起着很重要的作用,*BMP*-2 也作为骨代谢活性的重要活性因子[20-21],因此,通过对其基因的表达来研究 GEN 对去卵巢大鼠成骨细胞成骨性分化的影响,结果与 ALP 活性变化一致。因此,我们推测 GEN 能够提高去卵巢大鼠骨密度是通过促进其成骨细胞成熟矿化的能力。

然而,GEN 对去卵巢大鼠骨吸收是否具有抑制作用、对体外破骨细胞的培养是否也有作用,尚未可知。虽然周建等[21]研究报道,GEN 能够抑制体外培养大鼠股骨组织的骨骺端和骨干吸收活性和促进其代谢活性。但分离培养 GEN 干预后的去势大鼠中的破骨细胞,检测其体外骨相关因子的变化,是否也可从骨吸收方面去阐释 GEN 治疗骨质疏松模型大鼠的作用机制,仍需去进一步探索。

参考文献:

[1] ROZENBERG S, AL-DAGHRI N, AUBERTIN-LEHEUDRE M, *et al*. Is there a role for menopausal hormone therapy in the management of postmenopausal osteoporosis? [J]. Osteoporos Int, 2020, 31(12): 2271-2286. DOI: 10.1007/s00198-020-05497-8.

[2] SLEEMAN A, CLEMENTS J N. Abaloparatide: a new pharmacological option for osteoporosis [J]. Am J Heal Syst Pharm, 2019, 76(3): 130-135. DOI: 10.1093/ajhp/zxy022.

[3] MARTINIAKOVA M, BABIKOVA M, OMELKA R. Pharmacological agents and natural compounds: available treatments for osteoporosis [J]. J Physiol Pharmacol, 2020, 71(3). DOI: 10.26402/jpp.2020.3.01.

[4] JAISWALN, AKHTAR J, SINGH S P, *et al*. An overview on genistein and its various formulations [J]. Drug Res (Stuttg), 2019, 69(6): 305-313. DOI: 10.1055/a-0797-3657.

[5] YE C F, PAN Y M, ZHOU H. Regulation of vitamin D receptor andGenistein on bone metabolism in mouse osteoblasts and the molecular mechanism of osteoporosis [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2018, 32(3): 497-505.

[6] AZBOYi, ÖZKAYA M, DEMIR T, *et al*. Biomechanical properties of osteoporotic rat femurs after different hormonal treatments: genistein, estradiol, and estradiol/progesterone [J]. SICOT J, 2016, 2: 24. DOI: 10.1051/sicotj/2016016.

[7] 陈洪燕, 汪何畏, 熊军, 等. 金雀异黄酮酊对去卵巢骨质疏松大鼠 OPG/RANKL/RANK 通路的影响[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(3): 363-368. DOI:10.3969/j.issn.1004-

2407.2019.03.018.
CHEN H Y, WANG H W, XIONG J, *et al*. Effects of Genistein Tincture on OPG/RANKL/RANK pathway in ovariectomized osteoporotic rats[J]. Northwest Pharm J, 2019, 34(3): 363-368. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2407.2019.03.018.

[8] 成魁, 陈克明, 葛宝丰, 等. 淫羊藿苷与金雀异黄酮骨保护作用的比较研究[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(9): 1315-1319.
CHENG K, CHEN K M, GE B F, *et al*. Effect of icariin and genistein on bone protection[J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(9): 1315-1319.

[9] 谢艳芳, 陈克明, 马小妮, 等. 大鼠颅骨成骨细胞和骨细胞的分离纯化与比较研究[J]. 解放军医药杂志, 2015, 27(3): 1-5. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2015.03.001.
XIE Y F, CHEN K M, MA X N, *et al*. Isolation and identification and comparative study of calvarial osteoblasts and osteocytes of rats[J]. Med Pharm J Chin PLA, 2015, 27(3): 1-5. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2015.03.001.

[10] 王晓辉, 杨志华, 谢艳芳, 等. 不同途径移植人脐带间充质干细胞对创伤性脑损伤大鼠的治疗效果[J]. 西北国防医学杂志, 2020, 41(8): 483-488. DOI: 10.16021/j.cnki.1007-8622.2020.08.006.
WANG X H, YANG Z H, XIE Y F, *et al*. Therapeutic effects of different transplantation routes of human umbilical cord mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats[J]. Med J Natl Defending Forces Northwest China, 2020, 41(8): 483-488. DOI: 10.16021/j.cnki.1007-8622.2020.08.006.

[11] VON WOWERN N. General and oral aspects of osteoporosis: a review[J]. Clin Oral Investig, 2001, 5(2): 71-82. DOI: 10.1007/s007840100105.

[12] 李从文, 魏云林. 植物雌激素的特性及其应用研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(3): 1264-1269. DOI: 10.13417/j.gab.039.001264.
LI C W, WEI Y L. Advances in studies on the characteristics and application of phytoestrogens[J]. Genom Appl Biol, 2020, 39(3): 1264-1269. DOI: 10.13417/j.gab.039.001264.

[13] 张百红, 岳红云. 植物雌激素的激素样作用机制研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(9): 1444-1446.
ZHANG B H, YUE H Y. Hormone-like properties of phytoestrogens[J]. J Mod Oncol, 2018, 26(9): 1444-1446.

[14] MING L G, CHEN K M, XIAN C J. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(3): 513-521. DOI: 10.1002/jcp.24158.

[15] 邵佳乐, 周建, 李志忠, 等. 雌激素受体信号通路与骨质疏松症相关性的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(8): 956-960. DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.003133.
SHAO J L, ZHOU J, LI Z Z, *et al*. Progress in research on correlation of estrogen receptor signaling pathway with osteoporosis[J]. Chin J Biol, 2020, 33(8): 956-960. DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.003133.

[16] FILIPOVIĆ B, ŠOŠIĆ-JURJEVIĆ B, AJDŽANOVIĆ V, *et al*. The phytoestrogen genistein prevents trabecular bone loss and affects thyroid follicular cells in a male rat model of osteoporosis[J]. J Anat, 2018, 233(2): 204-212. DOI: 10.1111/joa.12828.

[17] 韩桂秋, 葛宝丰, 陈克明, 等. 金雀异黄酮对体外培养缺氧大鼠骨髓间充质干细胞增殖与成骨分化的影响[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(16): 1248-1253.
HAN G Q, GE B F, CHEN K M, *et al*. Effect of genistein on proliferation and differentiation of rat bone mesenchymal stem cells treated with hypoxia *in vitro*[J]. Chin Pharm J, 2011, 46(16): 1248-1253.

[18] 成魁, 葛宝丰, 甄平, 等. 淫羊藿苷与金雀异黄酮对大鼠峰值骨量的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2013, 35(5): 542-546. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.05.011.
CHENG K, GE B F, ZHEN P, *et al*. Effects of icariin and genistein on peak bone mass in rats[J]. Acta Acad Med Sin, 2013, 35(5): 542-546. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.05.011.

[19] SUN J, LI J Y, LI C C, *et al*. Role of bone morphogenetic protein-2 in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3): 4230-4237. DOI: 10.3892/mmr.2015.3954.

[20] RUIZP L M, HANDAN B A, DE MOURA C F G, *et al*. Protective effect of grape or apple juices in bone tissue of rats exposed to cadmium: role of RUNX-2 and RANK/L expression[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(16): 15785-15792. DOI: 10.1007/s11356-018-1778-8.

[21] 周建, 陈克明, 葛宝丰, 等. 金雀异黄酮促进体外培养的大鼠股骨组织代谢和抑制骨吸收[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(17): 1460-1464. DOI: 10.13286/j.cnki.chinhosppharmacyj.2014.17.09.
ZHOU J, CHEN K M, GE B F, *et al*. Genistein promoted metabolism and inhibited resorption of rats' femur tissue *in vitro*[J]. Chin J Hosp Pharm, 2014, 34(17): 1460-1464. DOI: 10.13286/j.cnki.chinhosppharmacyj.2014.17.09.

(**收稿**:2021-06-06;**修回**:2021-08-30)
(编辑 汪勤俭)