

女贞子对去卵巢大鼠抗骨质疏松作用及其对 GH/IGF-1 信号通路的影响

贾强强, 陈贝贝, 朱如愿, 李蕊, 田恽淼, 王丽丽, 高思华, 张东伟*

北京中医药大学中医学院 糖尿病研究中心, 北京 100029

摘要:目的 探讨女贞子抗骨质疏松的作用与生长激素 (GH)/胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 信号通路的关系。方法 去卵巢大鼠给予女贞子水提液干预 14 周后, 分别用苏木素-伊红 (HE) 染色和番红 O/固绿染色评价股骨骨微结构的变化, micro-CT 扫描测定骨组织形态计量学参数和骨密度 (BMD), ELISA 法测定血清 GH 水平, Western blotting 和免疫组织化学染色法测定肝脏和骨中 IGF-1 蛋白表达水平。结果 女贞子能防止去卵巢诱发的大鼠股骨骨小梁形态破坏, 抑制大鼠 BMD 和股骨糖胺聚糖含量的降低。同时, 女贞子可明显抑制去卵巢大鼠血清 GH 水平的下降, 提高 IGF-1 蛋白在去卵巢大鼠肝脏和骨中的表达。结论 女贞子可能是通过调节 GH/IGF-1 信号通路抑制骨量丢失和改善骨微结构, 从而发挥抗骨质疏松的作用。

关键词: 女贞子; 骨质疏松; 去卵巢; 骨微结构; 生长激素; 胰岛素样生长因子 1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)16-3852-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.017

Antiosteoporosis effect of *Ligustrum lucidum* on ovariectomized rats and its effect on GH/IGF-1 signaling pathway

JIA Qiang-qiang, CHEN Bei-bei, ZHU Ru-yuan, LI Rui, TIAN Yi-miao, WANG Li-li, GAO Si-hua, ZHANG Dong-wei

Diabetes Research Center, Traditional Chinese Medicine School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the anti-osteoporotic effect of *Ligustrum lucidum* and the growth hormone (GH)/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) signaling pathways. **Methods** *L. lucidum* aqueous extract was orally administrated to ovariectomized (OVX) rats for 14 weeks. Then the femurs were removed and stained with hematoxylin & eosin (HE) and Safranin O/Fast Green staining, respectively, to evaluate the change of bone microstructure. The histomorphological parameters and bone mineral density (BMD) of the femurs were measured by micro-CT. Furthermore, rat serum GH level was determined by ELISA assay, and IGF-1 protein expression in liver and bone was determined by Western blotting and immunohistochemical staining. **Results** *L. lucidum* prevented the disorganized femoral trabeculae and inhibited the decrease in BMD and glycosaminoglycan content in OVX rats. In addition, *L. lucidum* significantly inhibited the decrease of serum GH levels and improved IGF-1 protein expression of liver and bone in OVX rats. **Conclusion** *L. lucidum* may prevent against osteoporosis through inhibition of bone loss and improvement of bone microstructure via regulating GH/IGF-1 signaling pathway.

Key words: *Ligustrum lucidum* Ait.; osteoporosis; ovariectomized; bone microstructure; growth hormone; insulin-like growth factor 1

骨质疏松 (OP) 是一种全身性骨代谢性疾病, 以骨量减少和 (或) 骨组织微结构遭到破坏, 导致骨强度下降、骨脆性增加为主要病理特征^[1]。其主要临床表现是胸背部和下腰部骨骼疼痛, 身长缩短, 驼背, 易骨折, 以椎体、髌骨、股骨、桡骨远端为主要受损区。该病多发于老年人, 尤多见于绝经后

妇女。OP 最早由欧洲病理学家 Pommer 于 1885 年发现, 其发病与遗传、激素、细胞因子和免疫因子、营养、生活习惯、运动、衰老等多种因素相关^[2]。研究发现, 生长激素 (GH) 在骨骼的生长发育过程中具有重要作用, 其可通过激活靶细胞上生长激素受体和诱导靶细胞产生胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)

收稿日期: 2019-04-08

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目: 基于 Wnt/ β -Catenin 研究女贞子对去卵巢骨质疏松大鼠的作用机理和物质基础 (7172126); 国家自然科学基金面上项目: 基于 Sema3A/Nrp1/PlexinA1 信号通路探讨女贞子抗骨质疏松的分子机制和物质基础 (81874373)

作者简介: 贾强强 (1994—), 男, 在读硕士研究生。E-mail: jiaqiangqiang1234@163.com

*通信作者 张东伟, 博士研究生导师, 研究方向为内分泌代谢性疾病的发病机制及中药防治作用研究。E-mail: zhdw1006@163.com

发挥其生物学效应,影响 OP 的发生发展^[3]。同时发现 IGF-1 在骨质疏松动物体内表达下降,本课题组前期研究也证明,骨组织中 IGF-1 的表达增加能抑制骨质疏松模型动物的骨质量下降^[4-6],这提示 IGF-1 对骨质疏松有潜在的防治作用。

女贞子作为一种常用中药,近年来大量文献报道其具有抗 OP 的作用^[7-9]。研究发现,女贞子能够增加去卵巢(OVX)大鼠对钙的吸收,减少尿钙含量,提高骨钙水平^[10],抑制 OVX 大鼠骨的高转化状态,降低骨组织胶原降解,促进软骨胶原基质的矿化,增加细胞外的钙、磷沉积^[11]。但女贞子发挥抗 OP 的作用是否与调节 GH/IGF-1 信号通路有关,尚未见相关报道。因此,本实验拟观察女贞子对 OVX 大鼠 GH 和 IGF-1 表达的影响,并探讨这种改变与其发挥抗 OP 作用的关系。

1 材料

1.1 主要仪器

FLUO star Omega 多功能酶标仪,德国 BMG Labtech 公司;电泳和转膜装置,美国 Bio-Rad 公司;Azure c500 凝胶成像仪,美国 Azure Biosystems 公司;Olympus BX53 倒置荧光显微镜,日本奥林巴斯有限公司;EG 1150 H 徕卡包埋机、EG 1150 C 徕卡冰冻机、RM 2255 徕卡轮转式切片机,德国 Leica 公司;PerkinElmer Quantum GX-micro-CT 小动物活体断层扫描仪,美国 Perkin Elmer 公司。

1.2 药品与试剂

女贞子,购于北京同仁堂药店,经北京中医药大学中药博物馆马泽新教授鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实;乙二胺四乙酸(EDTA),北京市化学试剂公司;骨组织蛋白提取试剂盒(Best Bio BB-3161-100),上海贝博生物技术有限公司;骨组织抗原修复液(SBT10013),上海舜百生物科技有限公司;大鼠 GH ELISA 试剂盒(MB-694A),江苏科特生物科技有限公司;IGF-1 抗体(A11985)武汉爱博泰克生物科技有限公司;DAB 显色液(K166913B),购自中杉金桥生物科技有限公司;ECL 发光液(P1010),北京普利莱基因技术有限公司;苏木素染液、伊红染液、番红 O 染液和固绿染液均购自北京索莱宝生物科技有限公司;实验用水为去离子水。

1.3 实验动物

SD 雌性大鼠,SPF 级,体质量(220±20)g,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供,许

可证号 SCXK(京)2011-0004,饲养于北京中医药大学科研实验中心清洁级动物实验室[合格证号 SCXK(京)2011-0024],室温(22±2)℃,相对湿度(55±5)%,光暗周期 12 h/12 h。动物分笼饲养,实验期间大鼠自由饮水、取食。

2 方法

2.1 女贞子水提物的制备

参照郭鱼波等^[12]提供的方法制备女贞子水提液:药物打粉后准确称取 100 g 置于 1 000 mL 去离子水中,于 4℃低温环境下在磁力搅拌器上旋转混匀 48 h,离心除去沉淀,取上清液在 60℃低压环境下进行旋转蒸发,然后冷冻干燥得到干浸膏,实验时稀释最终得到含生药 0.35 g/mL 的女贞子水提液(经 HPLC-MS 分析,女贞子水提液中含红景天苷 0.718 mg/g^[13])。

2.2 OVX 大鼠模型制备

大鼠适应性喂养 1 周后,ip 1%戊巴比妥钠(4 mL/kg)麻醉后,参照郭鱼波等^[12]方法造模。其中,假手术组大鼠仅切除卵巢旁边相同大小的脂肪组织。造模 1 周后,取造模成功大鼠 20 只,按体质量随机分为 2 组,分别为模型组、女贞子组。其中女贞子组大鼠 ig 给予 3.5 g/kg(本实验室前期研究结果已表明该剂量下女贞子抗骨质疏松作用比较明显^[12])女贞子水提液,假手术组和模型组大鼠 ig 给予等量的蒸馏水,每日 1 次,连续 14 周。实验期间,每周称体质量 1 次。实验结束时,分别取各组大鼠的血液、股骨和胫骨进行实验。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色和番红 O/固绿染色

取各组大鼠左股骨,分离附着肌肉组织,先置于 10%中性福尔马林中固定 72 h,放入 10% EDTA(pH 7.4)溶液脱钙,脱钙液每周更换 1 次,连续 3 个月。脱钙完成后冲水 24 h,酒精逐级脱水,二甲苯透明,进行石蜡包埋。片厚 5 μm 切片,捞片后 60℃烘干,4℃保存备用。

按照文献方法^[14],进行股骨石蜡切片常规 HE 染色,中性树胶封片后置于 Olympus BX53 倒置显微镜下观察病理变化并拍照。

参照文献方法^[6]进行番红 O/固绿染色,依次烤片、脱蜡、苏木素染色等,中性树胶封片后拍照,用 Image Pro Plus 6.0 分析软件进行软骨表达量分析,测定累计吸光度值。

2.4 Micro-CT 扫描

取各组大鼠右股骨,分离附着肌肉,用

PerkinElmer Quantum GX-micro-CT 小动物活体断层扫描仪扫描股骨骨髓端上方 0.5 cm 处, 设置条件为电流 88 μ A, 电压 90 kV, 成像视野 36 mm $\times$ 20 mm, 扫描模式为 4 min 高分辨率, 分析扫描结果计算骨微结构的骨体积分数 (BV/TV)、骨表面积组织体积比 (BS/TV)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁分离度 (TB.SP) 等结构指数和骨密度 (BMD) 参数。

2.5 GH 浓度测定

腹主动脉取血, 静置后离心 (3 500 r/min, 15 min), 然后收集上层血清, 按相应试剂盒说明书, 用 ELISA 法测定血清中 GH 的浓度。

2.6 Western blotting 分析

在低温条件下, 将肝脏和胫骨分别研磨破碎, 然后加 RIPA 裂解液用超声法提取组织蛋白, BCA 法测定蛋白质量浓度。将 80 μ g 变性蛋白溶液, 加到 15% 的 SDS-PAGE 电泳胶上进行电泳分离, 然后转印至硝酸纤维素膜, 用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h, 分别将膜与 IGF-1 (1:1 000) 和 β -actin (1:5 000) 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日, 将膜与相应的二抗室温孵育 1 h, 然后用 ECL 超敏发光液显色, Azurec500 化学发光成像系统拍照, 以相应的 β -actin 作为内参。用 Image-J 图像分析软件对结果进行半定量分析, 计算各目标条带的灰度值。

2.7 免疫组织化学染色

取肝组织石蜡切片和股骨石蜡切片, 先烤片 2 h, 切片常规脱蜡至水后, 分别加常规抗原修复液和骨组织抗原修复液进行抗原修复, 然后用 3% H_2O_2 室温孵育 30 min, 用 10% 山羊血清封闭 30 min, 分别滴加 TBS 稀释的一抗 IGF-1 (1:100), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日滴加辣根过氧化物酶标记的二抗, DAB 显色, 苏木精复染, 常规脱水、透明、封片, 显微镜下观察、拍照。用 Image Pro Plus 6.0 分析软件进行图像分析, 测定累计吸光度值。

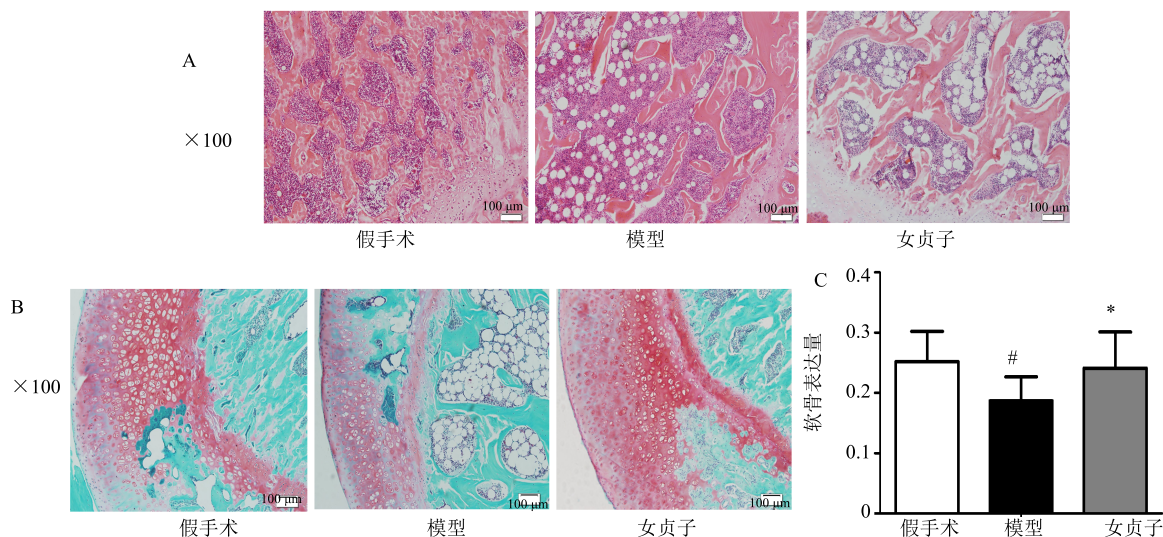
2.8 统计学分析

所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 采用 SAS 9.4 软件进行数据分析, 满足正态分布且方差齐时采用单因素方差分析 (ANOVA); 方差不齐时使用近似 F 检验。不满足正态分布时, 则使用非参数检验。

3 结果

3.1 对 OVX 大鼠股骨病理形态的影响

股骨组织切片 HE 染色结果见图 1-A, 光镜 ($\times 100$) 下观察发现, 与假手术组比较, 模型组大鼠股骨头部位脂滴明显增多, 骨小梁稀疏, 变细、断裂, 结构紊乱, 表明骨质疏松造模成功。与模型组比较, 女贞子组大鼠骨小梁增粗、排列整齐, 骨组织结构有明显改善, 脂滴也明显减少, 但与假手术组比较, 女贞子组大鼠股骨组织病理改变尚未恢复为正常状态。



A-各组大鼠股骨 HE 染色 B、C-各组大鼠股骨番红 O/固绿染色及其结果分析, 与假手术组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$, 下同
A-The H&E staining of femurs of each group B, C-Safranin O/Fast Green staining of rat femurs in each group and its results analysis, $^{\#}P < 0.05$ vs Sham group; $^{*}P < 0.05$ vs model group, same as below

图 1 女贞子对 OVX 大鼠骨组织病理和软骨表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of *L. lucidum* on pathology of bone tissue and expression of cartilage in OVX rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

股骨组织切片番红 O/固绿染色结果和软骨表达量结果见图 1-B、C，嗜碱性的软骨糖胺聚糖与碱性染料番红 O 结合呈现红色。与假手术比较，模型组大鼠股骨头中软骨表达量明显减少 ($P < 0.05$)，提示 OVX 大鼠的骨形成速率低于假手术组大鼠。与模型组比较，女贞子组大鼠的软骨表达量显著增加 ($P < 0.05$)，接近于假手术组大鼠的软骨含量。

3.2 对 OVX 大鼠股骨的 BMD 及骨微结构的影响

股骨 micro-CT 扫描得到信息分析结果见图

2。与假手术组比较，大鼠去卵巢 14 周后股骨的 BMD 显著下降 ($P < 0.05$)；与模型组比较，女贞子干预 14 周后，OVX 大鼠股骨 BMD 显著升高 ($P < 0.05$)。骨组织形态计量学参数方面，与假手术比较，模型组大鼠股骨的 BV/TV、BS/TV、Tb.Th、Tb.N 降低 ($P < 0.05$)，TB.SP 升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，女贞子干预 OVX 大鼠 14 周后，BV/TV、BS/TV、Tb.N 显著升高 ($P < 0.05$)，Tb.Th 亦有明显升高趋势，TB.SP 显著下降 ($P < 0.05$)。

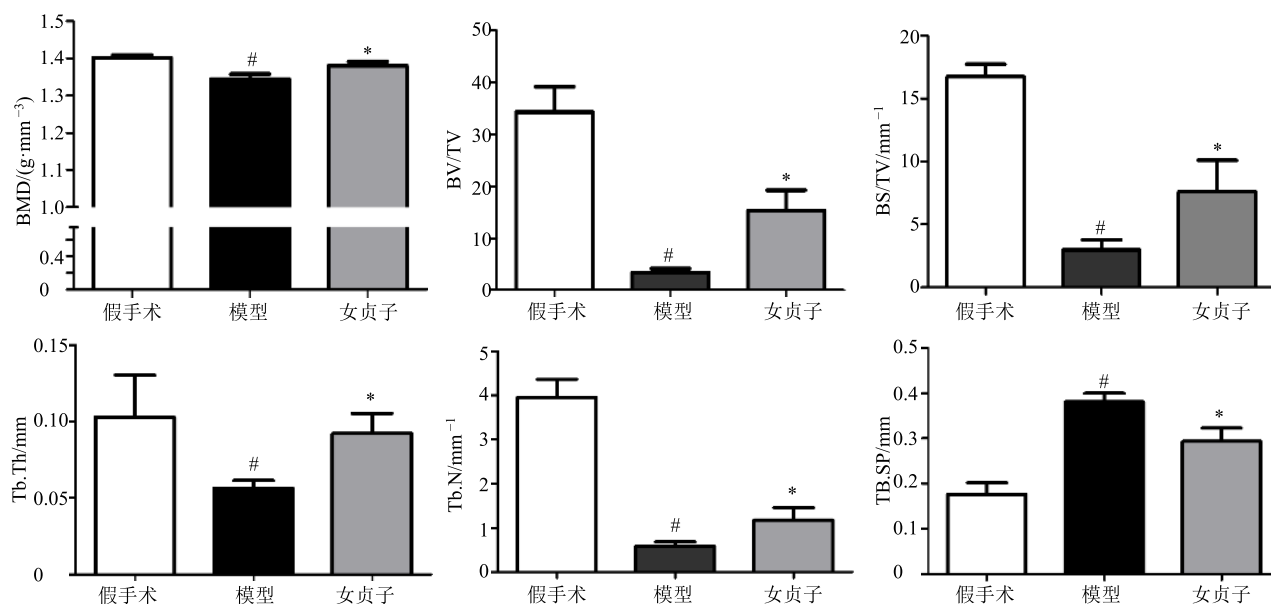


图 2 女贞子对 OVX 大鼠 BMD 和骨微结构指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of *L. lucidum* on bone mineral density and bone microstructure in ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.3 对 OVX 大鼠血清中 GH 水平的影响

各组大鼠血清中 GH 水平测定结果见图 3。可知，模型组大鼠血清中 GH 水平显著低于假手术组 ($P < 0.05$)。女贞子干预 14 周后，OVX 大鼠血清中 GH 水平明显升高 ($P < 0.05$)。

3.4 对 OVX 大鼠肝脏 IGF-1 蛋白表达的影响

肝组织切片免疫组织化学结果与分析见图 4，IGF-1 在模型大鼠肝脏中的表达明显低于假手术组 ($P < 0.05$)，女贞子干预 OVX 大鼠 14 周后其表达水平明显上升 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果 (图 4) 也显示，与假手术组比较，模型组大鼠肝脏 IGF-1 蛋白表达量下降 ($P < 0.05$)，而女贞子组大鼠肝脏 IGF-1 蛋白表达量明显回调 ($P < 0.05$)。

3.5 对 OVX 大鼠骨组织 IGF-1 蛋白表达的影响

IGF-1 在骨组织的表达分布情况结果见图 5，

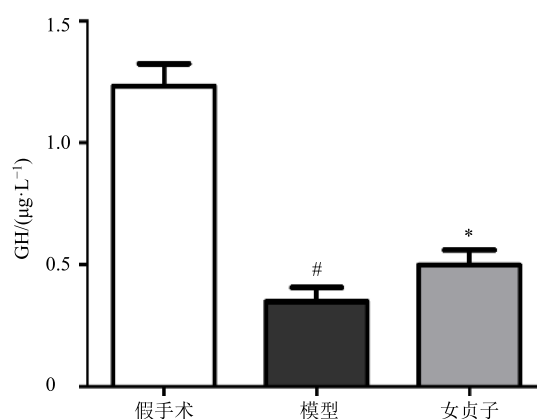


图 3 女贞子对 OVX 大鼠血清中 GH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of *L. lucidum* on GH levels in serum of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

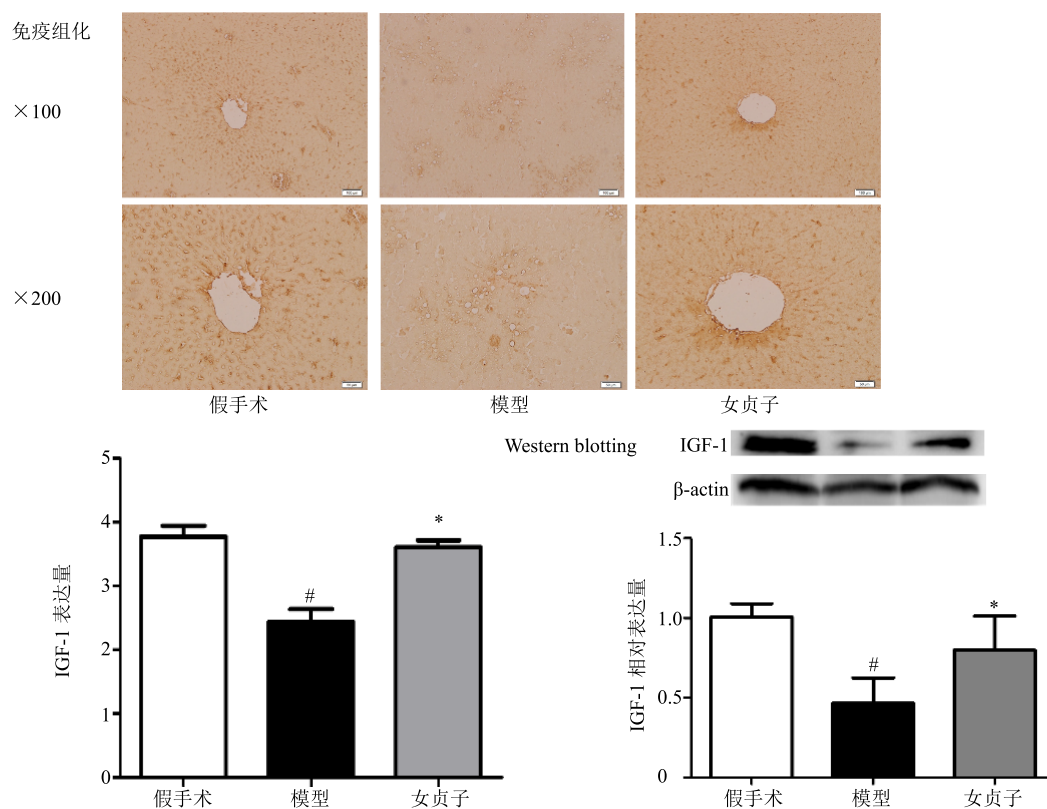


图 4 女贞子对 OVX 大鼠肝组织 IGF-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of *L. lucidum* on IGF-1 expression in livers of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

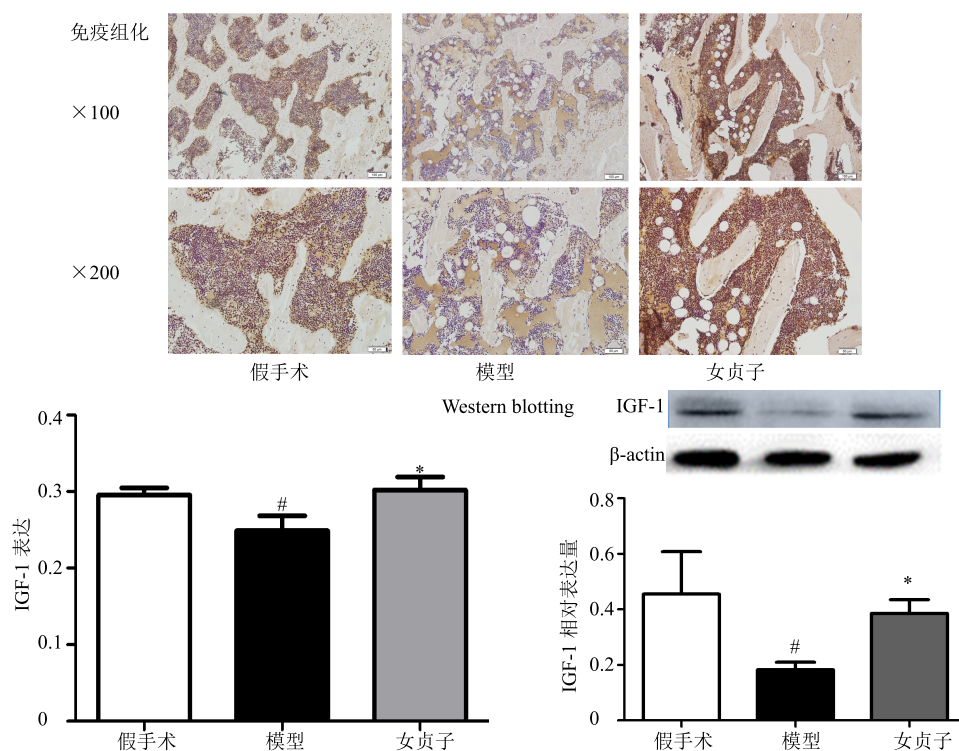


图 5 女贞子对骨组织 IGF-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Effect of *L. lucidum* on IGF-1 expression in bone tissue of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

骨组织切片免疫组织化学结果可见,与假手术组比较,模型组大鼠股骨中 IGF-1 的表达明显下降 ($P < 0.05$),女贞子干预后其表达明显提高 ($P < 0.05$)。

Western blotting 分析结果表明,IGF-1 在 OVX 大鼠胫骨的表达量显著低于假手术组 ($P < 0.05$),而女贞子干预后其在胫骨中的表达明显增加 ($P < 0.05$)。

4 讨论

本实验采用经典的双侧去卵巢术复制 OP 动物模型,发现去卵巢后大鼠骨量减少,骨微结构遭到严重破坏,BMD 下降,呈现出明显的 OP 症状。给予女贞子水提液干预去卵巢大鼠 14 周后,能明显抑制其骨量的丢失和骨微结构的破坏。

女贞子是一种补益肝肾的中药,基础研究发现其可通过多种途径发挥骨保护作用^[15],临床上也常配伍其他中药应用于 OP 的治疗^[16]。本实验通过 ELISA 方法检测大鼠去卵巢后血清中 GH 变化,发现去卵巢大鼠的血清 GH 水平较假手术组显著下降,该结果与 Mustafa 等^[17]和 Suliman 等^[18]的研究结果一致。而女贞子干预明显抑制了 OVX 大鼠血清中 GH 的下降,提示女贞子发挥抗 OP 作用与升高 GH 含量相关。

GH 在体内发挥作用部分是通过促进 IGF-1 的分泌和表达,进而促进骨代谢的平衡^[19]。而 IGF-1 基因敲除小鼠出现骨骼畸形、骨矿化延迟、软骨细胞增殖减少甚至凋亡^[20]。有研究表明,IGF-1 在全身维持一定浓度有助于皮质骨的完整性,而局部 IGF-1 的浓度维持在一定水平对骨小梁的完整性至关重要^[21]。体内血液循环中 IGF-1 大部分源于肝脏分泌^[22],其他多种组织细胞也可分泌少量 IGF-1^[23],通过自分泌和旁分泌的形式发挥作用^[24]。本实验测定了肝脏、股骨和胫骨中 IGF-1 的表达情况。结果显示,去卵巢后 14 周大鼠肝脏、股骨和胫骨中 IGF-1 表达水平较假手术组大鼠均下降,说明大鼠去卵巢后全身及骨骼局部的 IGF-1 表达均下降,这种变化可能与去卵巢导致的 GH 分泌减少有关。而女贞子干预 OVX 大鼠 14 周后,Western blotting 和免疫组织化学结果均表明女贞子能够明显促进肝脏和骨中 IGF-1 的表达,抑制去卵巢导致的骨量丢失,该结果与 Chen 等^[25]的研究结果一致。

综上所述,本实验研究表明女贞子能改善去卵巢诱发的骨微结构破坏,促进骨形成,其发挥抗 OP 的作用机制之一可能是通过调节体内 GH/IGF-1 信号通路,进而实现骨吸收和骨形成的动态平衡。

参考文献

- [1] 马远征,王以朋,刘 强,等. 中国老年骨质疏松症诊疗指南 (2018) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(12): 1541-1567.
- [2] 尚德阳. 肾虚骨质疏松症大鼠骨、肾、下丘脑组织 BMP6/BMP7、Smurf1/Smurf2 的 mRNA 及其蛋白表达的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2008.
- [3] Locatelli V, Bianchi V E. Effect of GH/IGF-1 on bone metabolism and osteoporosis [J]. *Int J Endocrinol*, 2014, doi: 10.1155/2014/235060.
- [4] Liu C, Zhu R, Liu H, et al. Aqueous extract of *Mori Folium* exerts bone protective effect through regulation of calcium and redox homeostasis via PTH/VDR/CaBP and AGEs/RAGE/Nox4/NF- κ B signaling in diabetic rats [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01239.
- [5] Liu H, Zhu R, Wang L L, et al. *Radix Salviae Miltiorrhizae* improves bone microstructure and strength through Wnt/beta-catenin and osteoprotegerin/receptor activator for nuclear factor-kappa B ligand/cathepsin K signaling in ovariectomized rats [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(12): 2487-2500.
- [6] Ma R F, Wang L L, Zhao B, et al. Diabetes perturbs bone microarchitecture and bone strength through regulation of sema3A/IGF-1/beta-catenin in rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(1): 55-66.
- [7] 程 敏,王庆伟,刘雪英,等. 女贞子治疗去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 229-233.
- [8] 李晓曦,陈宇恒,唐秀凤,等. 淫羊藿、女贞子单用及配伍对绝经后骨质疏松症大鼠骨量及内分泌器官的影响 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(35): 12-16.
- [9] 张明发,沈雅琴. 女贞子及其活性成分抗骨质疏松症的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 566-571.
- [10] Zhang Y, Lai W P, Leung P C, et al. Effects of *Fructus Ligustri Lucidi* extract on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(2): 291-296.
- [11] Zhang Y, Leung P, Che C, et al. Improvement of bone properties and enhancement of mineralization by ethanol extract of *Fructus Ligustri Lucidi* [J]. *Br J Nutr*, 2008, 99(3): 494-502.
- [12] 郭鱼波,王丽丽,马如风,等. 女贞子水提液对去卵巢大鼠骨结构和骨代谢的影响研究 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1155-1162.
- [13] Wang L L, Ma R F, Guo Y B, et al. Antioxidant effect of *Fructus Ligustri Lucidi* aqueous extract in ovariectomized rats is mediated through Nox4-ROS-NF- κ B pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00266.

- [14] Guo Y B, Wang L L, Ma R F, *et al.* JiangTang XiaoKe granule attenuates cathepsin K expression and improves IGF-I expression in the bone of high fat diet induced KK-Ay diabetic mice [J]. *Life Sci*, 2016, 148: 24-30.
- [15] Chen B B, Wang L L, Li L, *et al.* *Fructus Ligustri Lucidi* in osteoporosis: A review of its pharmacology, phytochemistry, pharmacokinetics and safety [J]. *Molecules*, 2017, 22(9): 1469.
- [16] 郭鱼波, 马如风, 王丽丽, 等. 女贞子治疗骨质疏松作用及其机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(5): 851-856.
- [17] Mustafa A, Bogdanovic N, Nyberg F, *et al.* Effects of long-term ovariectomy and ovarian steroids on somatogenic binding sites in rat brain and liver [J]. *Neurosci Lett*, 1995, 194(3): 193-196.
- [18] Suliman I A, KEI-Bakri N, Adem A, *et al.* The effect of ovariectomy and ovarian steroid treatment on growth hormone and insulin-like growth factor-I levels in the rat femur [J]. *J Orthop Res*, 2001, 19(6): 1008-1012.
- [19] 曾永芬, 黄义德. 胰岛素样生长因子 1 及其在组织和器官生长发育中的作用 [J]. *生命科学研究*, 2015, 19(2): 165-168.
- [20] Laviola L, Natalicchio A, Perrini S, *et al.* Abnormalities of IGF-I signaling in the pathogenesis of diseases of the bone, brain, and fetoplacental unit in humans [J]. *Am J Physiol-Endocrinol Metabol*, 2008, 295(5): E991-E999.
- [21] Zhang M, Xuan S, Bouxsein M L, *et al.* Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 44005-44012.
- [22] Sjogren K, Liu J L, Blad K, *et al.* Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(12): 7088-7092.
- [23] Conti F G, Striker L J, Elliot S J, *et al.* Synthesis and release of insulinlike growth factor I by mesangial cells in culture [J]. *Am J Physiol*, 1988, 255(6Pt2): F1214-F1219.
- [24] Jiang J, Lichtler A C, Gronowicz G A, *et al.* Transgenic mice with osteoblast-targeted insulin-like growth factor-I show increased bone remodeling [J]. *Bone*, 2006, 39(3): 494-504.
- [25] Chen Y, Li X, Tang X, *et al.* Combined extracts of *Herba Epimedii* and *Fructus Ligustri Lucidi* rebalance bone remodeling in ovariectomized rats [J]. *Evidence-Based Compl Altern Med*, 2019, doi: 10.1155/2019/1596951.