

· 研究论文 ·

淫羊藿苷对铁超载模型小鼠骨代谢的影响

何玉琼¹, 赵璐¹, 沈焱², 韩婷¹, 张建花³, 辛海量^{1*}, 张巧艳^{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 350122;
3. 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 探讨淫羊藿苷对铁超载致骨质疏松小鼠骨代谢的影响。采用腹腔注射右旋糖酐铁复制铁超载小鼠模型, 将 60 只 2 月龄雄性 C57/BL6 小鼠按体重随机分为正常对照组、模型组、*N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetyl-*L*-cysteine, NAC) 组及淫羊藿苷 (icariin, ICA) 低、中、高剂量 (50、100、200 mg·kg⁻¹) 组。除正常对照组外, 其余各组小鼠每周注射 1 次右旋糖酐铁 (100 mg·kg⁻¹) 以建立铁超载模型, 将 NAC 和 ICA 分别混悬于 0.5% CMC-Na 溶液中, 按照体重给药, 体积为 10 mL·kg⁻¹, 每周给药 6 天。3 个月后, 用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清的生化指标, 微计算机断层扫描技术 (micro computed tomography, Micro-CT) 分析股骨远端骨密度和骨小梁微结构的变化, 万能力学分析仪检测股骨的生物力学参数。与正常对照组相比, 铁超载降低小鼠的骨密度, 使小鼠骨组织的微结构和骨生物力学性能退化, 增加小鼠血清铁和磷的含量, 及抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase-5b, TRACP-5b) 的活性, 降低小鼠血清骨钙素 (osteocalcin, OCN) 的水平, 降低小鼠肝脏组织中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性, 增加脂质过氧化物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量。淫羊藿苷可增加铁超载小鼠的骨密度, 改善骨小梁微结构的退化, 提高股骨的力学性能, 降低铁超载小鼠血清铁、磷含量及 TRACP-5b 和肝组织 MDA 活性, 增加血清 OCN 的水平。以上结果提示淫羊藿苷通过抗氧化调控铁超载小鼠的骨代谢, 减少骨丢失, 改善骨组织微结构和生物力学性能。

关键词: 淫羊藿苷; 铁超载; 骨代谢; 右旋糖酐铁

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 07-1100-07

Effects of icariin on bone metabolism in iron overload mice

HE Yu-qiong¹, ZHAO Lu¹, SHEN Yi², HAN Ting¹, ZHANG Jian-hua³,
XIN Hai-liang^{1*}, ZHANG Qiao-yan^{1*}

(1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. Department of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

3. Department of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

Abstract: This study was designed to investigate the effects of icariin on bone metabolism in osteoporotic mice induced by iron overload, the model of iron overload mice was established by intraperitoneal injection of iron dextran (100 mg·kg⁻¹). Sixty 2-month-old C57/BL6 male mice were randomly divided into six groups, including normal control group, model group, *N*-acetyl-*L*-cysteine (NAC)-treated group, icariin (50, 100 and 200 mg·kg⁻¹)-treated group. Except for the mice in control group, the mice were intraperitoneal injected weekly with iron dextran (100 mg·kg⁻¹) to establish the model of iron overload mice. The NAC and icariin were suspended in 0.5% CMC-Na solution, and administered orally for six times one week according to body weight. The mice in normal group and model group were given the same volume of 0.5% CMC-Na solution. Three

收稿日期: 2018-01-05; 修回日期: 2018-02-03.

基金项目: 国家自然科学基金联合基金重点项目 (U1505226).

*通讯作者 Tel: 86-21-81871303, E-mail: zqy1965@163.com; hailiangxin@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0024

months later, the organs, serum and femurs of mice were collected. Serum biochemical parameters were detected with an ELISA kit, the distal femur bone density and trabecular bone microstructure were analyzed by Micro-CT, and the mechanical properties of femur were measured by universal mechanical analyzer. Compared with the normal control group, iron overload decreased the bone mineral density and deteriorated the micro-architecture structure and bone mechanical properties in femur of mice, increased the level of iron, phosphorus and activity of tartrate resistant acid phosphatase-5b (TRACP-5b), reduced the level of osteocalcin (OCN) in serum, decreased the activity of superoxide dismutase (SOD) of liver tissues, increased the content of malondialdehyde (MDA) of liver tissues. Icariin increased bone mineral density, improved the micro-architecture and mechanical properties of bone tissue, reduced the levels of iron and phosphorus, decreased the activity of TRACP-5b and enhanced the levels of OCN in serum, and also decreased the activity of MDA in liver tissue of iron overload mice. These results suggest that icariin is able to reduce bone loss and improve bone microstructure and mechanical properties in iron overload mice through regulation of bone metabolism *via* anti-oxidation.

Key words: icariin; iron overload; bone metabolism; iron dextran

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨的微观结构退化, 致使骨的脆性增加, 及易于发生骨折的代谢性疾病, 其发生与雌激素缺失和衰老导致的氧化应激紧密相关^[1]。近年有证据表明体内铁蓄积可引起骨丢失, 进而导致骨质疏松症的发生。如体内铁超载的绝经后妇女骨丢失更为严重^[2], 去卵巢骨质疏松大鼠血清铁的含量较高, 去除过量铁可缓解大鼠的骨丢失^[3]。大多数患有地中海贫血的儿童和青少年血清铁的水平较高, 但其骨密度降低, 骨质厚度增加, 骨矿化作用减弱^[4]。铁超载对骨代谢的影响是由于其增加了活性氧的产生, 使机体处于高氧化应激状态^[5]。活性氧降低骨代谢中成骨细胞的活性和骨矿化作用^[6], 增加破骨细胞的形成、分化和骨吸收作用^[7], 进而导致骨丢失。

中药淫羊藿是小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的干燥叶, 具有补肾健骨的作用, 常用于预防和治疗骨质疏松症。淫羊藿黄酮为抗骨质疏松的有效成分, 其代表性化合物为淫羊藿苷。中国药典规定淫羊藿中淫羊藿苷的含量不得少于 0.5%。淫羊藿苷具有植物雌激素和抗氧化的作用, 能够减少去卵巢骨质疏松大鼠的骨丢失, 促进成骨细胞的增殖、分化及骨矿化作用, 抑制破骨细胞的形成和骨吸收作用^[8-10]。然而, 淫羊藿苷对铁超载骨质疏松小鼠骨代谢的影响尚不清楚。本研究应用右旋糖酐铁复制小鼠铁超载模型, 观察淫羊藿苷对铁超载小鼠骨代谢的作用, 为中药淫羊藿及其有效成分淫羊藿苷的应用提供科学依据。

材料与方 法

仪器 ELx800 型连续波长酶标仪 (美国 Bio-TEK 公司); 小动物 Micro-CT 扫描仪 (美国 GE 公司,

eXplore Locus SP); 万能力学分析仪 (日本岛津公司, AGS-X); 5415R 型高速冷冻离心机、移液枪 (德国 Eppendorf 公司)。

药品和试剂 淫羊藿苷 (上海源叶生物科技有限公司, 纯度 98.8%); *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetyl-L-cysteine, NAC) 和右旋糖酐铁 (美国 Sigma 公司); 血清铁、钙和磷测定试剂盒 (上海创烨生物有限公司); 血清骨钙素 (osteocalcin, OCN)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase-5b, TRACP-5b) ELISA 试剂盒, 多聚甲醛固定液、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

动物 8 周龄, 体重 25~30 g 的雄性 C57/BL6 小鼠, 购买于上海斯莱克动物有限责任公司, 许可证号: SCXK (沪) 2012-0005, 饲养于第二军医大学实验动物中心。饲养条件为室温 22~25 °C, 湿度 45%~50%, 小鼠自由获取灭菌水和食物。本研究中所有实验动物的使用严格按照第二军医大学实验指南进行。

铁超载骨质疏松小鼠模型的建立及药物干预 C57/BL6 小鼠随机分成 6 组, 每组 10 只, 各组分笼单独喂养。① 正常对照组: 0.5% CMC-Na; ② 模型组: 右旋糖酐铁 (100 mg·kg⁻¹); ③ NAC 组: 右旋糖酐铁 (100 mg·kg⁻¹) + NAC (100 mg·kg⁻¹); ④ ICA-50: 右旋糖酐铁 (100 mg·kg⁻¹) + ICA (50 mg·kg⁻¹); ⑤ ICA-100: 右旋糖酐铁 (100 mg·kg⁻¹) + ICA (100 mg·kg⁻¹); ⑥ ICA-200: 右旋糖酐铁 (100 mg·kg⁻¹) + ICA (200 mg·kg⁻¹)。第 2~6 组小鼠每周腹腔注射右旋糖酐铁 1 次, 剂量为 100 mg·kg⁻¹。同时各组小鼠灌胃给药, 阳性药对照药 NAC 及受试药物 ICA 分别混悬于 0.5% CMC-Na 溶液中, 按照 10 mL·kg⁻¹ 体重对小鼠给药, 每周 6 天, 正常对照组和模型组小鼠给予相同体积的

0.5% CMC-Na 溶液, 每周称量小鼠体重 1 次, 籍以调节给药量。给药 3 个月后, 各组小鼠眼眶取血, 离心, 血清保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 以备血清生化指标测定。处死小鼠后, 取小鼠各脏器及双侧股骨, 迅速称量小鼠的脏器重量。左侧股骨固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 以备 Micro-CT 检测骨密度和骨组织形态计量参数。右侧股骨用 PBS 浸湿的纱布包裹, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于骨生物力学分析。

骨组织的 Micro-CT 和骨生物力学分析 将小鼠左侧股骨放入 Micro-CT 样本杯中, 在相同条件下进行扫描重建, 评价和分析骨密度及骨小梁计量参数。扫描的分辨率: $6\text{ }\mu\text{m}$; 机器的工作条件: 80 kV 和 80 Ma , 每次扫描 400 个片层。扫描完成后, 采用 Micview V2.1.2 三维重建处理软件对每个样本进行三维图像重建, 并用 ABA 专用骨骼分析软件进行数据分析处理。采用万能力学分析仪对小鼠右侧股骨进行三点弯曲实验, 测定弹性模量 (elastic modulus)、弹性载荷

(elastic load)、最大载荷 (maximum load)、最大应力 (maximum stress) 和弹性应力 (elastic stress) 等骨骼生物力学指标。

生化指标检测 按照试剂盒说明书测定血清中铁、钙、磷、TRACP-5b 和 OCN 的含量或活性。将小鼠肝脏匀浆后, $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min , 收集上清液, 按照试剂盒说明书测定组织液中 SOD 的活性及 MDA 的含量。

统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 结果以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析。

结果

1 淫羊藿苷对铁超载小鼠骨密度和骨组织形态结构参数的影响

图 1A 和 B 所示, 铁超载小鼠股骨的骨组织结构显著退化, 骨小梁厚度降低, 间隙增大, NAC 和淫羊

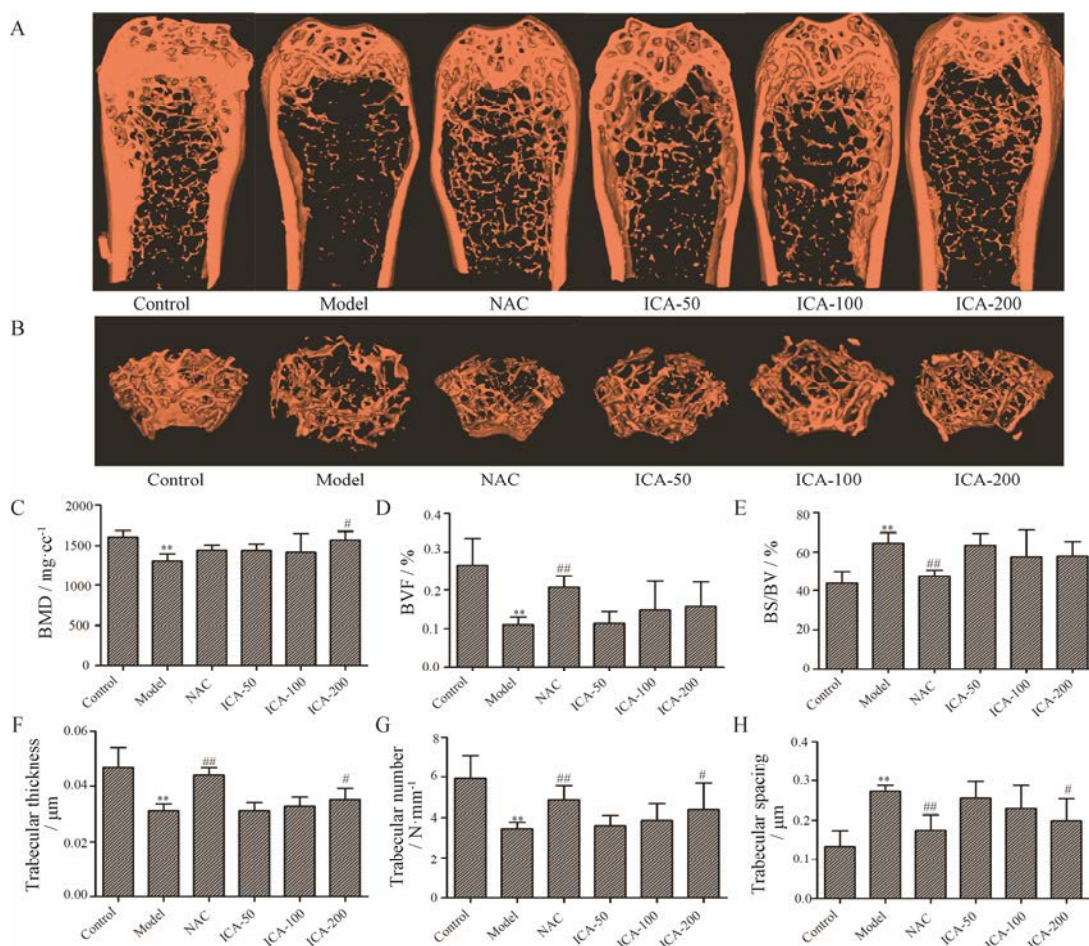


Figure 1 Effects of icariin (ICA) on bone micro-architecture of femur in iron overload mice. Representative three-dimensional reconstructed images derived by micro-CT of femurs (A and B), bone mineral density (BMD) (C), bone volume fraction (BV/TV) (D), the ratio of bone surface to bone volume (BS/BV) (E), trabecular thickness (F), trabecular number (G), trabecular spacing (H). The data are expressed as $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs model group. NAC: N-Acetyl-L-cysteine; ICA-50: Icariin-50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; ICA-100: Icariin-100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; ICA-200: Icariin-200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

藿苷能够对抗铁超载引起的小鼠股骨骨小梁的结构退化。从骨组织结构参数的测定结果来看(图 1C~H), 铁超载小鼠的骨密度、骨体积分数、骨小梁厚度和数目显著降低, 骨表面积和体积的比值及骨小梁分离度显著增加, NAC 可显著改善铁超载小鼠的骨组织形态结构参数, 减缓骨小梁结构的退化。淫羊藿苷可增加铁超载小鼠的骨密度、骨小梁数目和骨小梁厚度, 降低骨小梁间隙, 并在高剂量 (200 mg·kg⁻¹) 下, 与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2 淫羊藿苷对铁超载小鼠股骨生物力学性能的影响

图 2A~E 所示, 铁超载显著降低小鼠股骨的弹

性模量、弹性载荷、弹性应力、最大载荷和最大应力等生物力学指标。NAC 和淫羊藿苷可以增加铁超载小鼠股骨的生物力学参数, 淫羊藿苷在高剂量 (200 mg·kg⁻¹) 下对铁超载小鼠股骨的生物力学参数均有显著的增加作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 淫羊藿苷对铁超载小鼠血清生化指标的影响

图 3A~C 所示, 铁超载对小鼠血清中钙的含量无显著性影响, 但可显著增加小鼠血清无机磷及铁的含量 ($P < 0.01$), NAC 可降低铁超载小鼠血清中无机磷和铁的含量 ($P < 0.01$), 淫羊藿苷在 50~200 mg·kg⁻¹ 内可剂量依赖地降低铁超载小鼠血清中无机

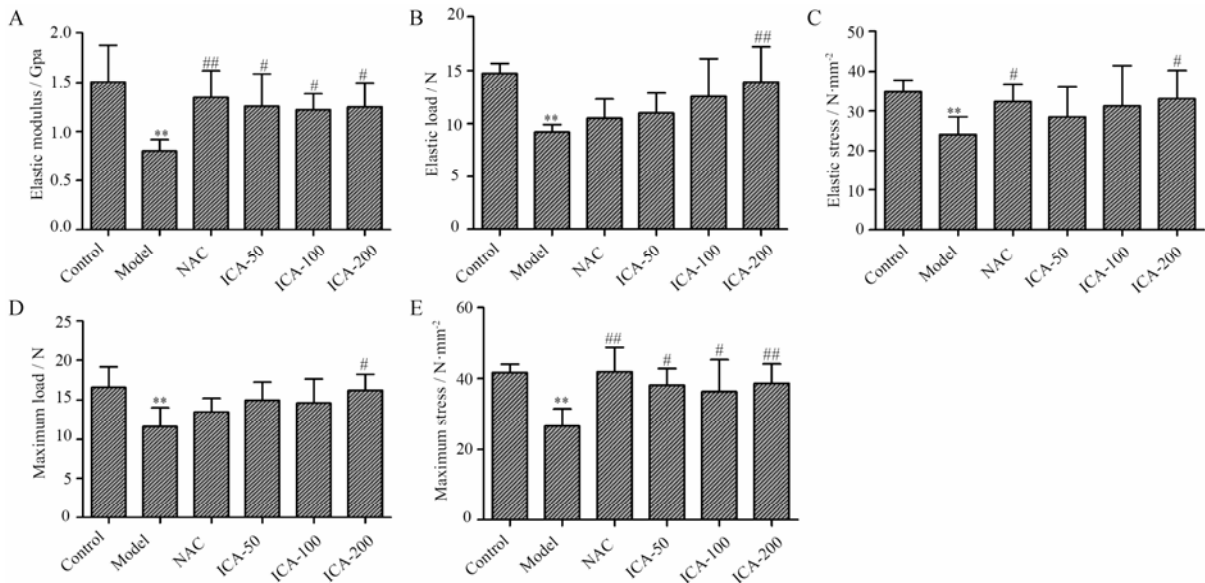


Figure 2 Effects of ICA on mechanical properties of the femurs in iron overload mice. Elastic modulus (A), elastic load (B), elastic stress (C), maximum load (D) and maximum stress (E) of the femurs were derived from the three-point bending test. Results are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

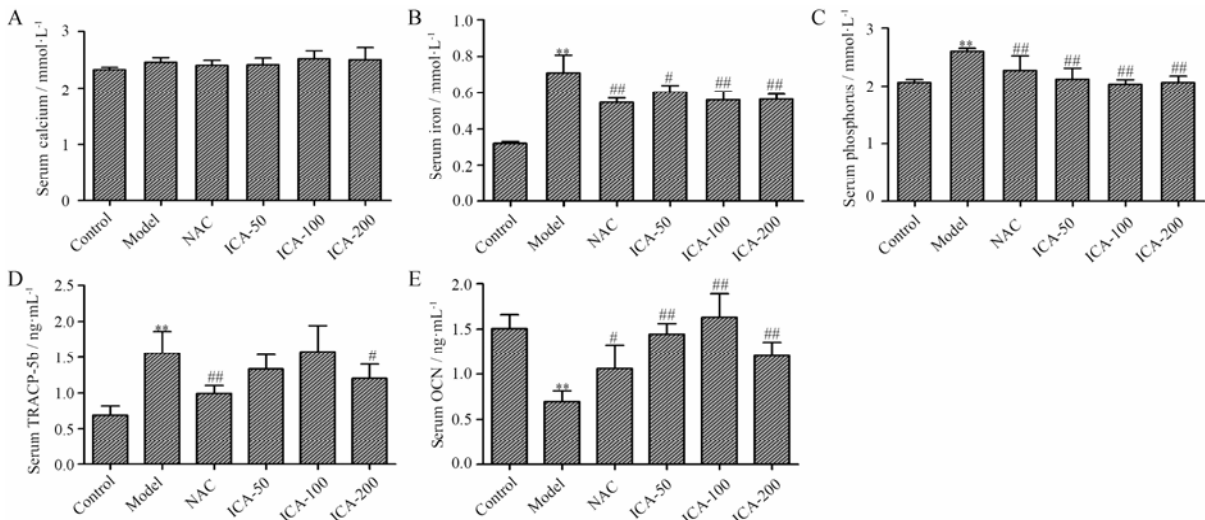


Figure 3 Effect of ICA on the serum levels of calcium (A), iron (B), phosphorus (C), TRACP-5b (D) and OCN (E) in iron overload mice. Results are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group. TRACP-5b: Tartrate resistant acid phosphatase-5b; OCN: Osteocalcin

磷和铁的含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。图 3D 和 E 所示, 铁超载显著增加小鼠血清 TRACP-5b 的活性, 降低 OCN 的含量 ($P < 0.01$); NAC 显著降低铁超载小鼠血清 TRACP-5b 的活性, 显著增加血清 OCN 的含量 ($P < 0.01$)。淫羊藿苷在高剂量 ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 下显著降低铁超载小鼠血清 TRACP-5b 的活性, 在 $50 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下显著增加血清 OCN 的含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但在 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下对小鼠血清 OCN 的作用最为显著。

4 淫羊藿苷对铁超载小鼠体重和脏器重量的影响

图 4A 所示, 长期的铁超载处理使小鼠体重显著下降, NAC 和淫羊藿苷对铁超载小鼠的体重没有显著的影响。与正常对照组相比, 铁超载小鼠肝脏、脾脏及肾脏重量显著增加 ($P < 0.01$), NAC 和淫羊藿苷可显著降低铁超载小鼠肝脏和脾脏重量 ($P < 0.01$), 但对肾脏重量没有显著的影响 (图 4B~D)。铁超载对小鼠肺脏和心脏重量没有显著的影响, NAC 和淫羊藿苷对铁超载小鼠肺脏和心脏重量也没有明显的影响 (图 4E 和 F)。

5 淫羊藿苷对铁超载小鼠肝组织 SOD 活性和 MDA 含量的影响

铁超载显著降低小鼠肝组织中 SOD 的活性 ($P < 0.01$), NAC 可显著升高铁超载小鼠肝组织中 SOD 活性 ($P < 0.01$), 淫羊藿苷可增加铁超载小鼠肝组织 SOD 的活性, 但与模型组相比, 没有显著性差异 (图 5A)。铁超载可显著增加肝组织 MDA 的含量 ($P < 0.01$), 淫羊藿苷在 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下, 显著降低铁超载小鼠肝组织 MDA 的含量 ($P < 0.05$, 图 5B)。

讨论

本研究通过腹腔注射右旋糖酐铁复制小鼠铁超载模型, 观察铁超载对骨代谢的影响及淫羊藿苷的调控作用。结果表明铁超载小鼠机体抗氧化能力降低, 骨吸收作用增强, 骨形成能力减弱, 骨密度降低, 骨组织微结构和生物力学性能退化。淫羊藿苷在高剂量 ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 下能有效改善铁超载小鼠的机体高氧化应激状态, 抑制骨吸收, 增加骨形成和骨密度, 改善骨组织微结构和生物力学性能。

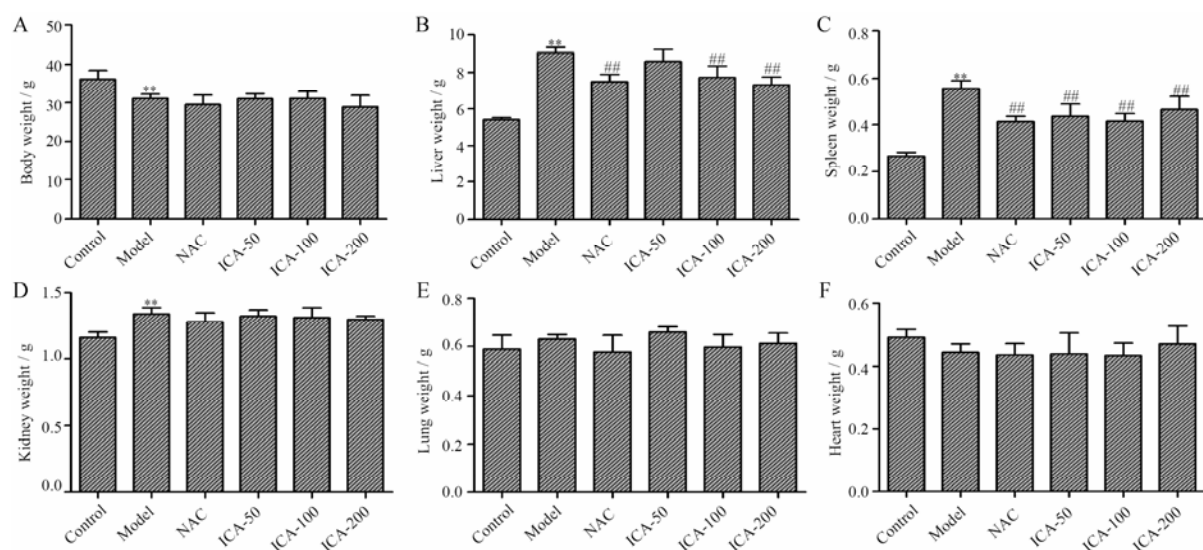


Figure 4 Effects of ICA on body weight (A), liver weight (B), spleen weight (C), kidney weight (D), lung weight (E) and heart weight (F) in iron overload mice. Results are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs model group

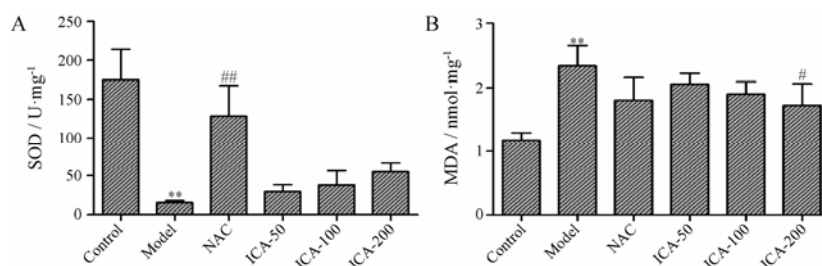


Figure 5 Effects of ICA on the levels of superoxide dismutase (SOD, A) and malondialdehyde (MDA, B) in the liver tissues of iron overload mice. Results are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs model group

在铁超载状态下,铁在肝脏中不断积累,引起氧化应激,造成肝组织损伤。在前期预实验过程中,根据文献^[11],每周1次给小鼠注射 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 右旋糖酐铁诱导骨丢失,结果发现右旋糖酐铁在 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下,使小鼠的肝组织肿大,造成部分小鼠死亡;右旋糖酐铁在 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下作用2个月时,小鼠的骨量有所下降,但与正常对照组比较没有显著性差异。研究延长至3个月时,铁超载小鼠的骨量丢失与正常组比较有显著差异,因此,每周1次注射右旋糖酐铁 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,3个月后可成功建立铁超载小鼠的骨丢失模型。本研究也发现长期的铁超载显著降低小鼠体重,增加小鼠肝脏、脾脏及肾脏的重量。NAC和淫羊藿苷能降低铁超载小鼠肝脏和脾脏重量,减轻铁超载对肝、脾脏的毒性损伤。

骨密度和骨组织形态结构参数是表征骨骼性能的重要指标。在注射右旋糖酐铁复制的铁超载小鼠模型中,小鼠骨密度降低,骨组织微结构明显退化^[12]。本研究发现正常小鼠股骨骨小梁分布整齐,结构状态良好,铁超载小鼠的股骨骨小梁数目减少、厚度降低,骨小梁间隙增加,连结度降低。NAC和淫羊藿苷可显著增加铁超载小鼠骨密度,增加骨小梁数目和厚度,降低骨小梁分离度,改善骨组织的微结构。骨骼的生物力学性能也是评价骨骼质量的重要因素。铁超载小鼠股骨三点弯曲实验中弹性模量、弹性载荷、最大载荷、弹性应力和最大应力显著降低,表明铁超载小鼠股骨的生物力学性能退化,NAC和淫羊藿苷($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)可显著改善铁超载小鼠股骨的生物力学性能,增强骨骼的承载能力。

近年研究表明铁超载影响骨代谢,增加骨丢失。在铁超载联合切除卵巢(ovariectomized, OVX)大鼠模型中,铁超载能增加血清的TRACP-5b的含量,增强OVX大鼠的骨吸收,抑制OVX大鼠的骨形成,最终导致OVX大鼠的骨量减少和骨质疏松症^[13]。铁超载表现为铁在体内的蓄积,使得血清中铁含量显著升高,NAC和淫羊藿苷在一定程度上降低血清铁的含量,减缓铁超载对机体的损伤和对骨代谢的影响。TRACP在血液循环中以TRACP-5b和TRACP-5a两种形式存在,TRACP-5b来源于破骨细胞,为骨吸收的关键酶,可表征破骨细胞的骨吸收活性^[14]。铁超载小鼠血清中TRACP-5b的水平显著升高,表明其破骨细胞性的骨吸收活性增强。NAC和淫羊藿苷显著降低铁超载小鼠血清TRACP-5b的活性,降低破骨细胞的活性和骨吸收作用。OCN是由成骨细胞产生,参与成骨细胞分化和骨基质的矿化^[15]。铁超载降低小

鼠血清中OCN的水平,抑制成骨细胞的骨形成和骨基质矿化。NAC及淫羊藿苷可以有效增加小鼠血清OCN的水平,增加骨形成。综上,铁超载显著增加小鼠的骨吸收,减少骨形成,淫羊藿苷能够对抗铁超载对小鼠骨代谢的影响,减少骨量的丢失。

铁超载对机体的损伤作用主要是高铁诱导产生活性氧,引起脂质过氧化,导致蛋白质结构的变化和核酸损伤^[16]。对骨骼系统的影响在于铁超载诱导的活性氧可增加成骨细胞的凋亡,抑制成骨细胞的分化和骨基质的矿化^[17],并促进破骨细胞的形成、分化和骨吸收活性^[18]。肝脏是铁的主要储存器官,机体依靠肝脏巨噬细胞清除体内过多的铁。本研究发现铁超载小鼠肝脏组织中SOD的活性显著降低,MDA的含量显著增加,表明铁超载降低了肝脏组织的抗氧化能力。NAC和淫羊藿苷均显示出一定程度的增加铁超载小鼠肝脏组织抗氧化能力的作用,因此,这些药物减少铁超载小鼠骨丢失的作用可能与其增强机体的抗氧化能力,减缓机体的氧化损伤有关。

文献报道淫羊藿苷具有抗氧化作用,在氧化损伤的成骨细胞中能增加SOD的活性,减少活性氧和脂质过氧化物的产生,抑制成骨细胞的凋亡,增加成骨细胞的分化和骨矿化结节形成^[19]。本研究以抗氧化剂NAC作为对照药物,观察淫羊藿苷对铁超载小鼠骨代谢的影响,结果显示淫羊藿苷与抗氧化剂NAC相似,能够减缓铁超载小鼠的氧化应激状态,增加骨形成,减少骨吸收,改善骨组织的微结构和生物力学性能。因此,在铁超载小鼠模型中,淫羊藿苷调节骨代谢,减少骨丢失的作用与其抗氧化活性有关。

References

- [1] Lin J, Zhu J, Wang Y, et al. Chinese single herbs and active ingredients for postmenopausal osteoporosis: from preclinical evidence to action mechanism [J]. *Biosci Trends*, 2017, 11: 496-506.
- [2] Cheng Q, Zhang XF, Jiang J, et al. Postmenopausal iron overload exacerbated bone loss by promoting the degradation of type I collagen [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 5: 1-9.
- [3] Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, et al. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 1174-1194.
- [4] Mahachoklertwattana P, Sirikulchayanonta V, Chuansumrit C, et al. Bone histomorphometry in children and adolescents

- with β -thalassemia disease: iron-associated focal osteomalacia [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 3966–3972.
- [5] Yarjanli Z, Ghaedi K, Esmaceli A, et al. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation [J]. *BMC Neurosci*, 2017, 18: 51.
- [6] Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease [J]. *Toxicology*, 2011, 283: 65–87.
- [7] Zhao GY, Di DH, Wang B, et al. Effects of mouse hepcidin 1 treatment on osteoclast differentiation and intracellular iron concentration [J]. *Inflammation*, 2015, 38: 718–727.
- [8] Song LG, Zhao JS, Zhang XZ, et al. Icarin induces osteoblast proliferation, differentiation and mineralization through estrogen receptor-mediated ERK and JNK signal activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 714: 15–22.
- [9] Chen GG, Wang CP, Wang JF, et al. Antiosteoporotic effect of icaritin in ovariectomized rats is mediated *via* the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12: 279–287.
- [10] Yang QX, Liu YQ, Wang L, et al. Screening of bioactive components in *Epimedium* for osteoporosis treatment by model population analysis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 9: 1205–1209.
- [11] Tsay J, Yang ZW, Ross FP, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress [J]. *Blood*, 2010, 116: 2582–2589.
- [12] Zhao L, Wang Y, Wang ZJ, et al. Effects of dietary resveratrol on excess-iron-induced bone loss *via* antioxidative character [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26: 1174–1182.
- [13] Isomura H, Fujie K, Shibata K, et al. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload [J]. *Toxicology*, 2004, 197: 93–100.
- [14] Lee S, Kumagai T, Hashimoto J, et al. A change of osteocalcin (OC) and tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRACP-5b) with the menstrual cycle [J]. *Horm Metab Res*, 2012, 44: 699–703.
- [15] Song SH, Wang D, Mo YY, et al. Antiosteoporotic effects of naringenin on ovariectomy-induced osteoporosis in rat [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 154–161.
- [16] Tian Q, Wu SL, Dai ZP, et al. Iron overload induced death of osteoblasts *in vitro*: involvement of the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Peer J*, 2016, 4: 2611.
- [17] Yamasaki K, Hagiwara H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 191: 211–215.
- [18] Wang X, Fei BB, Shen GS, et al. Iron overload increases osteoclastogenesis and aggravates the effects of ovariectomy on bone mass [J]. *J Endocrinol*, 2015, 226: 121–134.
- [19] Ma HP, Ma XN, Ge BF, et al. Icaritin attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in osteoblasts and preserves their osteogenic differentiation potential *in vitro* [J]. *Cell Prolif*, 2014, 47: 527–539.