

# 梓醇对成骨细胞-破骨细胞共育体系中破骨细胞活性、凋亡的影响及其机制研究<sup>△</sup>

赖满香<sup>1\*</sup>, 陈侠<sup>1</sup>, 冯娟<sup>1</sup>, 何丽霞<sup>2</sup>, 杨丽<sup>2#</sup> (1. 广东食品药品职业学院, 广州 510520; 2. 暨南大学药学院, 广州 510560)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1318-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.07

**摘要** 目的: 研究中药单体梓醇在成骨细胞(OB)-破骨细胞(OC)共育体系中对OC活性、凋亡的影响及其作用机制。方法: 分别选用1~3 d龄和5~7 d龄SD乳鼠分离培养OB和OC, 建立OB-OC共育体系。通过倒置显微镜观察0(空白对照)、0.05、0.5、5、50、100 mg/L梓醇培养48、72、96 h后OC的骨吸收陷窝数目, 以反映OC活性; 以0(空白对照)、0.05 mg/L梓醇培养细胞48、72、96 h, 检测OC中抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)活性, 计算OC的凋亡率; 以0(空白对照)、0.05 mg/L梓醇培养细胞并检测OB中骨保护素(OPG) mRNA的表达。结果: 在OB-OC共育体系中, 0.05~50 mg/L梓醇作用下所形成骨吸收陷窝数目显著低于空白对照( $P < 0.01$ ), 表明梓醇可抑制OC活性, 其中质量浓度为0.05 mg/L时作用最明显。与空白对照比较, 0.05 mg/L梓醇作用后OC中TRACP的活性降低、OC的凋亡率升高( $P < 0.05$ ); OB的OPG mRNA表达上调( $P < 0.01$ )。结论: 在OB-OC共育体系中, 梓醇可抑制OC活性、诱导OC凋亡, 其机制可能与上调OB的OPG mRNA表达有关。

**关键词** 梓醇; 成骨细胞; 破骨细胞; 共育体系; 活性; 凋亡

## Effect of Catalpol on the Activity and Apoptosis of Osteoclast in the Osteoblasts-osteoclasts Co-culture System and Its Mechanism Study

LAI Manxiang<sup>1</sup>, CHEN Xia<sup>1</sup>, FENG Juan<sup>1</sup>, HE Lixia<sup>2</sup>, YANG Li<sup>2</sup> (1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China; 2. Pharmacy College of Jinan University, Guangzhou 510560, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effect of catalpol on the activity and apoptosis of osteoclasts (OC) in the osteoblasts (OB)-OC co-culture system and its mechanism. METHODS: OB and OC were isolated respectively from the SD rats of 1-3 days and 5-7 days old to establish OB-OC co-culture system. After treated with 0 (blank control), 0.05, 0.5, 5, 50 and 100 mg/L catalpol for 48, 72 and 96 h, the number of bone absorption lacuna for OC was observed by inverted microscope to reflect OC activity. After treated with 0 (blank control) and 0.05 mg/L catalpol for 48, 72 and 96 h, the activity of tartrate resistant acid phosphatase (TRACP) in OC was detected, and the apoptosis rate of OC was calculated. After treated with 0 (blank control) and 0.05 mg/L catalpol, mRNA expression of osteoprotegerin (OPG) in OB was detected. RESULTS: In OB-OC co-culture system, the number of bone absorption lacuna in 0.05-50 mg/L catalpol groups was significantly lower than blank control group ( $P < 0.01$ ), indicating catalpol could inhibit OC activity, especially 0.05 mg/L catalpol. Compared with blank control, 0.05 mg/L catalpol lowered the activity of TRACP but increased the apoptosis rate of OC ( $P < 0.05$ ); mRNA expression of OPG was up-regulated in OB ( $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: In OB-OC co-culture system, catalpol can inhibit the activity of OC and induce the apoptosis of OC, and its mechanism may be associated with the mRNA expression up-regulation of OPG in OB.

**KEYWORDS** Catalpol; Osteoblasts; Osteoclasts; Co-culture system; Acitivity; Apoptosis

[5] Shi A, Hu X, Li R, *et al.* Determination of piperphen-tonamine and metabolites M1 and M6 in human plasma and urine by LC/MS/MS and its application in a pharmacokinetics study in Chinese healthy volunteers[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.09.031.

[6] 王庆利, 王海学, 马磊. 急性毒性试验的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(21): 2 024.

△ 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(No. B2015063); 广东食品药品职业学院自然科学基金项目(No. 2014YZ003)

\* 副教授, 硕士。研究方向: 药理学。电话: 020-28854972。E-mail: 76702876@qq.com

# 通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 临床中药学。电话: 020-38374505。E-mail: doctormonkey@126.com

[7] 孙世明, 何林, 吴正中, 等. 注射用阿克拉霉素A固体脂质纳米粒小鼠体内抗肝癌活性及急性毒性研究[J]. 中国药房, 2005, 16(18): 1 371.

[8] 王京霞, 张琦, 陈琳. 复方大青颗粒急性毒性实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 6(24): 496.

[9] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 201-206.

[10] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 383-389.

[11] 李茹冰, 李健, 吴新荣, 等. 盐酸椒苯酮胺致畸敏感期毒性试验[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(22): 5 610.

[12] 陈阳述, 李茹冰, 李健, 等. 盐酸椒苯酮胺致突变实验[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(19): 4 747.

(收稿日期: 2015-07-17 修回日期: 2015-10-19)

(编辑: 刘 萍)

梓醇(Catalpol)是玄参科植物地黄的主要活性成分之一。现代研究表明,其具有延缓骨质疏松、保护心血管、抗肿瘤、抗衰老、降血糖等作用<sup>[1]</sup>。本课题组前期实验研究发现,梓醇在成骨细胞(Osteoblasts, OB)-破骨细胞(Osteoclasts, OC)共育体系中能够刺激OB的增殖、提高OB成骨分化能力,同时对OC有明显抑制作用,但其抑制OC的作用机制尚不清楚<sup>[2]</sup>。武密山等<sup>[3]</sup>研究报道,OB可分泌并释放骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)来调节OC的骨吸收活性和凋亡。故笔者推测梓醇可能也是通过促进OB分泌OPG,从而调节OC活性。因此,本实验选择骨代谢微环境的OB-OC共育体系作为平台,来研究梓醇对OC活性、凋亡的影响及其可能的作用途径,为梓醇抑制OC活性的机制研究提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

3111系列CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo Forma公司);TS100-F倒置显微镜、BX51TF荧光显微镜(日本Olympus公司);PE7000全自动荧光定量PCR仪(美国PkinElmer公司);3-16PK离心机(美国Sigma公司);TU-1810DPC紫外-可见分光光度计(北京普西公司)。

### 1.2 药品、试剂与引物

梓醇标准品(广州市药品检验所,批号:110808-201210,纯度:>96%);低糖DMEM培养基(广州展晨生物科技有限公司,批号:CM9130118);胎牛血清(奥地利PAA公司,批号:A15-101);0.25%胰蛋白酶(批号:T1300-100)、II型胶原酶(批号:C6882)(美国Sigma公司);抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)酶联免疫检测试剂盒(南京建成生物工程有限公司,批号:KB2946);逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测试剂盒(上海玉博生物科技有限公司,批号:BYX2618C);OPG引物由北京赛百盛基因技术公司合成。

### 1.3 动物

普通级1~3 d龄和5~7 d龄新生SD乳鼠各10只,由暨南大学实验动物中心提供(合格证号:粤检证字第2014B006号)。

## 2 方法

### 2.1 OB的分离、培养及形态观察<sup>[4]</sup>

取1~3 d龄SD乳鼠10只,消毒,取出头颅骨,置D-Hanks缓冲液中,反复冲洗至颅骨变白色,在0.25%胰蛋白酶消化液内将头颅骨剪碎,37℃条件下恒温消化20 min,再用0.1% II型胶原酶37℃条件下消化60 min,收集上清,以离心半径6.8 cm、1 000 r/min离心10 min,弃上清,白色沉淀物即为OB。在OB中加入低糖DMEM培养基,调节细胞密度至 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 后将细胞接种于培养瓶中,放入5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,第2天换液,以后每2~3天换1次液。同时,在倒置显微镜下观察OB的形态和变化。

### 2.2 OC的分离、培养及形态观察<sup>[5]</sup>

取5~7 d龄SD乳鼠10只,消毒,分离四肢股骨和胫骨,在冷D-Hanks缓冲液中清除长骨上附着的软组织,然后置于冷DMEM分离液内并用解剖刀将骨干纵行剖开,轻轻刮骨髓腔内表面,反复吹打2~3 min,直至骨内表面变白,静置1~2 min。用DMEM培养液调节OC细胞密度为 $4 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ ,将细胞接种到含有骨片的培养板孔内,置37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培

养,1 h后更换培养液继续培养,以后每2~3天换1次液。同时,采用HE染色法在倒置显微镜下观察OC的形态和变化。

### 2.3 OB-OC共育体系的建立

对12孔细胞培养板进行改装,用打孔器在培养板上距每个孔底部2 mm处打1小孔,直径约为4 mm,使相邻的4孔间相通。将剪好的0.45 μm微孔滤膜置于培养板间隔处,将培养板分成OB培养室与OC培养室,并用吸管吸取已融化的琼脂凝胶,滴于隔膜与培养板相接触处,使之固定并密封,然后消毒,备用。将第2代OB以 $3 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种到OB培养室内,3 h后将新分离的OC以 $3 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种到OC培养室内,每20 min观察1次OB、OC贴壁情况,并同时观察是否有细胞透过隔膜进入另一侧培养室。

### 2.4 倒置显微镜观察OB-OC共育体系中OC骨吸收陷窝数目

在OB-OC共育体系中,将第2代OB和新分离的OC分别以 $3 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种于OB培养室和含有骨片的OC培养室,待细胞贴壁后,在OB、OC培养室内添加DMEM完全培养液至两室细胞上清液完全相通,每4 h来回振荡5次,以促进上清液之间的“交流”。24 h后换入无血清培养液,使细胞周期同步化,24 h后再更换DMEM完全培养液。在OC培养室中分别加入0(空白对照)、0.05、0.5、5、50、100 mg/L的梓醇,2~3 d换液1次。分别培养24、48、72 h后,将OC培养室所有骨片取出,经固定、超声清洗、乙醇脱水、自然晾干后,放入甲苯胺蓝染液中染色5 min,蒸馏水清洗。倒置显微镜观察骨片上的吸收陷窝并进行计数和拍照。

### 2.5 酶联免疫吸附法检测OB-OC共育体系中OC的TRACP活性

细胞的接种、培养同“2.4”项下。OB-OC共育体系中,在OC培养室分别加入0(空白对照)、0.05 mg/L梓醇,分别培养细胞24、48、72 h,收集各组培养不同时间的OC培养室上清液,按TRACP试剂盒说明书进行TRACP活性的检测。

### 2.6 荧光显微镜观察OB-OC共育体系中OC的凋亡情况

细胞的接种、培养同“2.4”项下。OB-OC共育体系中,0(空白对照)、0.05 mg/L梓醇分别培养细胞24、48、72 h后,进行吖啶橙染色,荧光显微镜下观察OC凋亡情况。

### 2.7 RT-PCR法检测OB-OC共育体系中OB的OPG mRNA表达

细胞接种、密度的设置同“2.4”项下,每组6个复孔,2~3 d换液1次。当细胞铺满孔底时,提取OB总RNA,并用焦碳酸二乙酯处理水溶解,−80℃保存,备用。取4 μl RNA样品与1 μl上样缓冲液和1 μl荧光染料混匀,置2%凝胶样品中,电泳40 min,切断电源后取出胶,置紫外灯下观察并摄取图像,每个样品在紫外分光光度计上测定260、280 nm波长处的吸光度(OD)值。取2 μl RNA模板做逆转录反应,按RT-PCR试剂盒说明书合成cDNA,−20℃保存,备用。PCR扩增cDNA引物系列如下:OPG引物序列,上游:5'-GCAGCATCGCTCTGTT-CCTGTA-3',下游:5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3';β-actin引物序列,上游:5'-CGTAGCCATCCAGGCTGTGT-3',下游:5'-CCAGTGGTACGACCAGAGGC-3'。按照QLAquick Gcl Extraction Kit说明书添加PCR反应体系,反应条件为:93℃、2 min;93℃、1 min;55℃、1 min;72℃、1 min,共35个

循环;最后是72℃、7 min延伸。待反应结束后,运用PE7000全自动荧光定量PCR仪,由电脑自动分析并计算每一样品和其内参对照的相对含量;以每1 μl cDNA所含基因拷贝数与每1 μl cDNA所含β-actin拷贝数的比值进行半定量比较。

### 2.8 统计学方法

运用SPSS 17.0统计软件处理实验数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间两两比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 OB的形态观察结果

倒置显微镜下,刚接种的OB呈球形,24 h后细胞逐渐伸展开来,呈现不规则形态,多呈梭形、三角形或多角形。随着培养时间延长,细胞伪足逐渐伸出并相互搭连,汇合成片。约5~9 d后细胞汇合时呈铺路石状,并可见重叠生长。培养OB 2 d时的形态观察结果见图1。

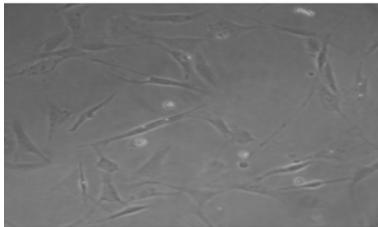


图1 培养OB 2 d时的形态观察结果(×100)

Fig 1 Morphology of OB after treated for 2 days(×100)

### 3.2 OC的形态观察结果

倒置相差显微镜下,刚接种的OC呈球形悬浮于培养液中,约30 min左右即贴壁,2~3 h后细胞形态清晰,呈油煎蛋形、漏斗形或不规则形等。HE染色可见多数为油煎蛋形,有伪足和丝状突起,胞体大、多核,胞质色淡,符合OC形态。OC形态观察结果见图2。



图2 OC形态观察结果(HE, ×400)

Fig 2 Morphology of OC (HE, ×400)

### 3.3 梓醇对OB-OC共育体系中OC骨吸收陷窝数目的影响

镜下可见骨片上有骨吸收陷窝,边界清晰,呈椭圆形、圆形或不规则型。随着培养时间的延长,梓醇各质量浓度OC的骨吸收陷窝数目在不断增加,其中0.05~50 mg/L梓醇在培养72、96 h时与空白对照比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),组内各质量浓度通过两两比较差异也有统计学意义( $P < 0.01$ )。OB-OC共育体系中OC骨吸收陷窝数目的测定结果见表1。

### 3.4 梓醇对OB-OC共育体系中OC细胞TRACP活性的影响

TRACP活性随着培养时间的延长不断降低,0.05 mg/L梓醇组培养细胞48 h时OC细胞TRACP活性与空白对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而在培养72、96 h时显著低于空白对照组( $P < 0.05$ )。OB-OC共育体系OC中TRACP活性的测定结果见表2。

表1 OB-OC共育体系中OC骨吸收陷窝数目的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Determination results of the number of bone absorption lacuna in OC of OB-OC co-culture system ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

梓醇质量浓度,mg/L	不同时间的骨吸收陷窝数目		
	48 h	72 h	96 h
0(空白对照)	42.21 ± 2.11	54.24 ± 2.24	65.23 ± 4.35
0.05	19.26 ± 1.52	29.15 ± 2.31*	39.53 ± 5.06*
0.5	22.31 ± 2.61	35.23 ± 3.52*	42.10 ± 3.84*
5	25.45 ± 6.42	39.51 ± 3.02*	48.31 ± 2.41*
50	30.64 ± 3.92	40.32 ± 2.65*	50.60 ± 4.31*
100	35.32 ± 2.13	48.18 ± 3.72	56.44 ± 5.13

注:与空白对照比较,\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control, \* $P < 0.01$

表2 OB-OC共育体系OC中TRACP活性的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6, U/L$ )

Tab 2 Determination results of TRACP activity in OC of OB-OC co-culture system ( $\bar{x} \pm s, n=6, U/L$ )

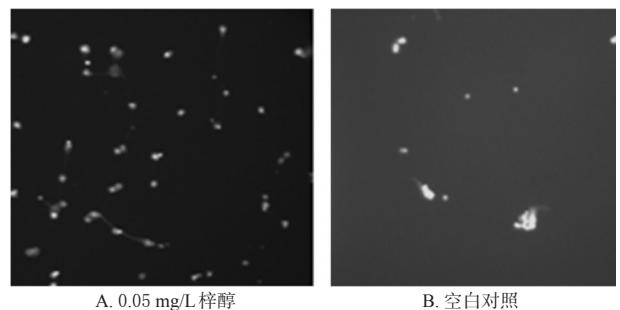
组别	梓醇质量浓度,mg/L	48 h	72 h	96 h
空白对照组	0	1.78 ± 0.05	0.76 ± 0.10	0.58 ± 0.13
梓醇组	0.05	1.16 ± 0.23	0.69 ± 0.24*	0.45 ± 0.32*

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$

### 3.5 梓醇对OB-OC共育体系中OC凋亡的影响

荧光显微镜下,0(空白对照)、0.05 mg/L梓醇培养后均可见到凋亡小体,呈现不规则的黄绿色碎片。0.05 mg/L梓醇组与空白对照组比较,凋亡细胞数目显著增加。镜下观察OC的凋亡数发现,48~96 h内,随着时间的延长,OC的凋亡率越来越高,0.05 mg/L梓醇组在相同时间段OC的凋亡数目明显大于空白对照组( $P < 0.01$ )。细胞凋亡荧光染色结果见图3;OB-OC共育体系中OC凋亡率的测定结果见表3。



A. 0.05 mg/L梓醇 B. 空白对照

图3 细胞凋亡荧光染色结果(×100)

Fig 3 Fluorescent staining of cell apoptosis(×100)

表3 OB-OC共育体系中OC凋亡率的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6, \%$ )

Tab 3 Determination results of apoptosis rate of OC in OB-OC co-culture system ( $\bar{x} \pm s, n=6, \%$ )

组别	梓醇质量浓度,mg/L	培养时间		
		48 h	72 h	96 h
空白对照组	0	9.46 ± 0.121	20.65 ± 0.06	30.28 ± 3.11
梓醇组	0.05	20.59 ± 2.43*	32.78 ± 2.19*	48.23 ± 3.06*

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$

### 3.6 梓醇对OB-OC共育体系中OB的OPG mRNA表达的影响

梓醇组和空白对照组经RT-PCR扩增均有目的基因的条带,片段大小和预期产物相近。经半定量分析,梓醇组OPG mRNA的表达显著高于空白对照组( $P < 0.01$ ),说明梓醇在共育体系中可以上调OPG mRNA的表达。OB-OC共育体系中OB的OPG mRNA表达的测定结果见表4。

表4 OB-OC共育体系中OB的OPG mRNA表达的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig 4 Determination results of mRNA expression of OPG in OB of OB-OC co-culture system( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	梓醇质量浓度,mg/L	OPG/ $\beta$ -actin
空白对照组	0	3.335 0 $\pm$ 0.985 4
梓醇组	0.05	8.256 7 $\pm$ 0.111 8*

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.01$

## 4 讨论

骨组织的代谢依赖OB与OC两种细胞的相互作用:OB主要参与骨基质的形成和类骨质的合成分泌及钙化,从而介导新骨的形成;OC则通过与OB的相互作用将信号传导至原始OC,使其成为活性OC,从而产生骨吸收<sup>[6]</sup>。骨形成和骨吸收之间的动态平衡是维持正常骨代谢的关键,当骨形成慢于骨吸收时,骨代谢失衡,骨密度降低,骨量丢失,从而导致骨质疏松。本试验选用OB-OC共育体系,使两种细胞间液可以相互“交流”,为OB与OC之间的“信息交流”提供了条件,这种细胞培养体系更符合体内代谢环境。

TRACP是OC释放并直接参与OC骨吸收过程的主要物质之一,其标志着OC的活性大小,并在一定程度上反映了骨吸收状况<sup>[7]</sup>。本试验结果显示,随着培养时间的延长,梓醇组和空白对照组TRACP活性均有所降低;但在相同的时间段,梓醇组TRACP活性均低于空白对照组。OC有很强的溶骨能力,可在骨表面形成较多的陷窝和腔隙,当OC功能过度活跃时,骨吸收陷窝数增加。因此,骨片上陷窝数量、大小和深度直接反映了OC的骨吸收能力<sup>[8]</sup>。本试验结果显示,在OB-OC共育体系中梓醇组OC骨吸收陷窝数目显著低于空白对照组。这一结果提示梓醇能抑制OC分泌TRACP,减少骨吸收陷窝数。

据目前研究报道,OPG是OB影响OC分化、成熟和骨吸收的重要传导通路<sup>[7]</sup>。OPG属于肿瘤坏死因子受体超家族成员,又称OC形成抑制因子,是一种可溶性分泌型糖蛋白<sup>[9]</sup>。OPG可作为一种诱饵受体,结合OC分化因子,减少前体OC的分化及降低成熟OC的活性,诱导OC凋亡,进而抑制OC骨吸收活性<sup>[10]</sup>。OPG在骨髓基质细胞、成骨细胞、成纤维细胞和成骨肉

瘤细胞等多种组织中均有表达,在骨组织中,OPG则主要由OB分泌<sup>[11]</sup>。研究表明,OPG配体OPGL可直接作用于OC祖细胞,促进其分化生成成熟OC,OB在分化成熟时OPG mRNA表达增加,而未成熟OB OPG mRNA表达较少<sup>[12]</sup>。由此可见,OPG是OC产生的促进因子,OPG调节在OB介导OC分化成熟过程中必不可少。本试验结果表明,0.05 mg/L梓醇能显著提高OB-OC共育体系中OB OPG mRNA的表达。这一结果提示梓醇能通过促进OB表达OPG mRNA,以阻断OPGL过度表达或关闭其功能,从而抑制OC骨吸收、促进骨形成。由此可见,通过促进OB分泌OPG是梓醇影响OC活性的作用机制之一。

## 参考文献

- [1] 董焯,陈长勋.梓醇药理作用的研究进展[J].中成藥,2013,35(5):1 047.
- [2] 赖满香,杨丽,张荣华.梓醇对OB-OC共育体系中OB、OC活性及OB ER $\alpha$ 、 $\beta$  mRNA表达的影响[J].中国病理生理杂志,2015,31(7):1 242.
- [3] 武密山,赵素芝,李恩,等.地黄活性成分梓醇对小鼠成骨细胞MC3T3-E1增殖、分化和矿化的影响[J].中国药理学通报,2010,26(4):509.
- [4] 廖乃顺,陈文列,黄云梅,等.成骨细胞与破骨细胞共培养及其应用研究进展[J].中国骨伤,2013,4(26):349.
- [5] 李忠武,章明放.白细胞介素对破骨细胞分化与功能调控研究的进展[J].中国骨质疏松杂志,2003,9(1):76.
- [6] 梅陵宣.骨吸收机理研究的分子生物学进展[J].国外医学口腔医学分册,2001,28(1):40.
- [7] Shidara K, Inaba M. Bone metabolic marker for osteoporosis[J]. *Nihon Rinsho*, 2009,67(5):927.
- [8] 刘建,宋晖.骨保护素对破骨细胞的影响程度分析[J].中国生化药物杂志,2015,3(35):65.
- [9] 陈晓虎,孙瑜隆,蹇爱荣,等.破骨细胞形成和活化研究进展[J].中国细胞生物学报,2014,40(2):258.
- [10] 陈伟荣.抗骨质疏松药物的临床应用进展[J].中国药房,2008,19(32):2 456.
- [11] Tuysuz B, Mizumoto S, Sugahara K, et al. Omani-type spondyloepiphyseal dysplasia with cardiac involvement caused by a missense mutation in CHST3[J]. *Clin Genet*, 2009,75(4):375.
- [12] 王鸿艳,尹国武.雌激素抗骨质疏松机制研究进展[J].医学信息,2002,15(10):609.

(收稿日期:2015-08-27 修回日期:2015-10-24)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅