

右归饮对去势雌性小鼠骨质疏松的治疗作用

齐晓宇^{1,2}, 赵磊³, 毕冬冬², 王兴国⁴, 张葆鑫⁴, 郝廷^{4*}

1. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部实验室, 北京 100193

3. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

4. 内蒙古医科大学第二附属医院 创伤骨科, 内蒙古 呼和浩特 010030

摘要: **目的** 探讨右归饮对去势雌性小鼠骨质疏松的影响, 并对其作用机制进行研究。 **方法** 将 C57BL/6 雌性小鼠去卵巢手术模拟骨质疏松症, 饲养 12 周后, 分别分为假手术组、模型组、雷洛昔芬组、右归饮组, 每组各 9 只, 模型组、假手术组 ig 生理盐水, 右归饮组 ig 右归饮溶液。雷洛昔芬组 ig 盐酸雷洛昔芬溶液 10 mg/kg。每天每只均给药 0.2 mL, 连续给药 5 周, 眼球取血, 测定血清中生化指标和钙、磷水平; 将动物处死, 测定骨形态计量指标和做 Micro-CT。分离并培养骨内间充质干细胞, 测定细胞的增殖和分化。 **结果** 与模型组比较, 右归饮组的骨密度、骨体积分数、骨小梁平均厚度、骨小梁数量均显著升高, 骨表面积/骨体积和骨小梁分离度均显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。右归饮组 I 型胶原氨基端前肽 (PINP) 水平较模型组显著升高 ($P < 0.05$), 胶原羧基端 (CTX) 水平比模型组略高一点, 差异均无统计学意义。右归饮组钙、磷水平与模型组各指标之间的差异均无统计学意义。与模型组比较, 右归饮组细胞呈增长趋势, 但增长率较其他组相对较低 ($P < 0.01$), 倍数变化显著升高 ($P < 0.01$)。 **结论** 右归饮对去势雌性小鼠骨质疏松有治疗作用, 可能是通过促进间充质干细胞分化成成骨细胞, 从而刺激骨形成, 达到有效抑制小鼠骨的丢失。

关键词: 右归饮; 盐酸雷洛昔芬; 骨质疏松; 间充质干细胞; Micro-CT

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)11-2072-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.11.004

Therapeutic effect of Yougui Drink on osteoporosis in ovariectomized female mice

QI Xiao-yu^{1,2}, ZHAO Lei³, BI Dong-dong², WANG Xing-guo⁴, ZHANG Bao-xin⁴, HAO Ting⁴

1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. The Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

3. Life Sciences and Environmental Sciences Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

4. Department of Trauma, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect of Yougui Drink on osteoporosis in ovariectomized female mice and study its mechanisms. **Methods** The osteoporosis was mimicked by excising the ovary of C57BL/6 mice. After 12 weeks, random allocation was taken to averagely divide into Sham, model, raloxifene, and Yougui Drink e groups, and each group had 9 mice. Rats in the control group and model group were given the same volume of normal saline. Rats in Yougui Drink group were given Yougui Drink. Rats in raloxifene group were ig administered with Raloxifene Hydrochloride 10 mg/kg. All animals were given the volume 0.2 mL, 1 time/d, and treated for 5 weeks. The blood samples were taken from the eyeball, and serum biochemical indexes and levels of calcium and phosphorus were assessed. Mice were killed, and bone histomorphometry were assessed by Micro-CT. Bone mesenchymal stem cells were isolated and cultured and cell proliferation and ability of osteogenic differentiation were assessed. **Results** Compared with model group, systemic manifestations score, bone mineral density, bone volume fraction, the mean trabecular thickness, trabecular number in the Yougui Drink group were significantly increased, but bone surface area / bone volume

收稿日期: 2017-07-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460734)

作者简介: 齐晓宇 (1992—), 女, 黑龙江黑河人, 硕士研究生, 专业方向为中药药剂学。Tel: 18545627231 E-mail: qxy616787751@163.com

*通信作者 郝廷 (1979—), 男, 内蒙古包头人, 博士, 主要从事骨质疏松方向。Tel: 18686016696 E-mail: 543732588@qq.com

and trabecular separation were significantly decreased ($P < 0.05$). The levels of P1NP in the Yougui Drink group were significantly increased ($P < 0.05$), but the CTx levels were slightly higher than those in the model group, the differences were not statistically significant. There were no significant differences on levels of calcium and phosphorus between the Yougui Drink group and the model group. Compared with the model group, the cells in the Yougui Drink group were increased, but the growth rates were lower than those in the other groups ($P < 0.01$), and the changes of multiples were significantly higher ($P < 0.01$). **Conclusion** Yougui Drink can treat osteoporosis in ovariectomized female mice, which may promote the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts, thereby stimulate bone formation, and effectively inhibit bone loss in mice.

Key words: Yougui Drink; raloxifene hydrochloride; osteoporosis; bone mesenchymal stem cells; Micro-CT

骨质疏松症为全身性骨骼疾病,其特征为骨量降低和骨组织微结构退化,从而导致骨脆性增加,且易于发生骨折^[1-2]。随着平均寿命的延长,骨质疏松症已经是一种常见病,多发病。中医理论认为“肾主骨生髓”,骨质疏松症属于“骨萎”或“骨痹”的范畴,是由肾精亏虚、骨骼失养所致,以肾虚为其主要病机,故通过补肾来治疗骨质疏松症可能有显著的疗效^[3-4]。右归饮是传统中药中的经典复方,在《景岳全书》中记载,主要功效是温补肾阳。右归饮对肾阳虚型小鼠有治疗作用^[5-6]。本实验采用右归饮治疗具有骨质疏松症特征的小鼠,抑制小鼠的骨丢失,并探讨右归饮对骨的影响及其作用机制。

1 仪器与材料

Mettler Toledo AL204 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);U3000 高效液相色谱仪(戴安有限公司);KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);PURELAB Classic 综合纯水仪(英国 Elga 公司);RJ-TGL-16C 型高速台式离心机(无锡市瑞江分析仪器有限公司);CO₂ 孵育箱(三洋);CKX31 型倒置显微镜[奥林巴斯(中国)投资有限公司];Tecan M1000 多功能连续波长酶标仪(瑞士)。

盐酸雷洛昔芬(武汉顶辉化工有限公司,批号 16070901,质量分数 99.2%),水为去离子水,其余试剂均为分析纯。 α -MEM 培养基(美国 Hyclone 公司,货号 AC10248328),胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号 1688857),青链霉素双抗(北京索莱宝科技有限公司,批号 20170417),Triton X-100(Sigma 公司,货号 SLBP3359V),碱性磷酸酶测试盒(酶标仪法)(南京建成生物工程研究所,批号 20161115),CCK-8(日本同仁化学,货号 KN658), β -GP 甘油-2-磷酸(Sigma 公司,货号 SLBN8622V),L-抗坏血酸(Sigma 公司,质量分数 $\geq 95\%$,货号 SLBR8316V),地塞米松(Sigma 公司,质量分数 $\geq 97\%$,货号 WXBC0965V),96 孔无菌培养板和 6

孔无菌培养板(美国 Corning 公司)。I 型胶原氨基端前肽(P1NP)试剂盒(ELISA 公司,货号 L161201258),胶原羧基端(CTx)试剂盒(ELISA 公司,货号 L161228043),总蛋白试剂盒(Thermo 公司,货号 23227)。

右归饮全方由熟地 30 g、山药 6 g、山茱萸 3 g、杜仲 6 g、枸杞 6 g、甘草 4.5 g、肉桂 4.5 g 和制附子 6 g 组成,肉桂先提取挥发油,其余药物按照传统方法煎煮,再加入肉桂挥发油,最终含生药 0.5 g/mL,由北京同仁堂药店提供。

雌性 C57BL/6 小鼠 36 只,体质量(20 $\pm$ 1)g,购自军事医学科学院实验动物中心,批准号 SLXD-2016081019,实验动物使用许可证号 CYXK(京)2017-0020。

2 方法

2.1 建立骨质疏松模型^[4]

清洁级 4 周龄 C57BL/6 小鼠 36 只在无菌条件下,用 5%氯胺酮注射液腹腔麻醉后,取腹侧入路,将双侧卵巢切除后关腹,放在电热毯上。小鼠苏醒后,随机放在笼内,在切除卵巢手术后连续 1 周用青霉素钠给小鼠进行肌肉注射。所有动物在实验室同等条件下饲养 12 周。

2.2 动物分组和给药

小鼠去卵巢手术饲养 12 周后,分别分为假手术组、模型组、雷洛昔芬组、右归饮组,每组各 9 只,模型组、假手术组 ig 生理盐水。右归饮组 ig 右归饮溶液(根据前期摸索和实验情况,给药量相当于生药 0.1 g/只)。雷洛昔芬组 ig 盐酸雷洛昔芬溶液(取 3 g 盐酸雷洛昔芬溶于 10 μ L DMSO 中,再与 0.5 mL 聚山梨酯 80 混合,超声辅助溶解,加入生理盐水稀释到 10 mL,得澄清透明溶液)10 mg/kg^[7]。每天每只均给药 0.2 mL,连续给药 5 周。

2.3 骨形态和生化指标测定

小鼠连续给药 5 周后眼球取血,脱颈处死,剔除毛和肌肉,分离出双侧股骨、胫骨。取出每只小

鼠其中一侧胫骨和股骨,用 10%福尔马林浸泡固定,测定骨形态计量指标和做 Micro-CT (德国西门子公司 Inveon MM system)。

将通过眼球取出的血放在装有肝素钠的 EP 管中,在 5 000 r/min 离心 5 min,取离心后的上清,放在-80 ℃条件下冻存,使用试剂盒测试血清中 PINP 和 CTx 水平,采用 iCAP 6000 等离子体发射光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司)测定血清中钙磷水平。

2.4 骨髓缘性间充质干细胞的分离培养

小鼠连续给药 5 周后,脱颈处死,剔除腿部的毛和肌肉,分离出双侧股骨、胫骨。取每只小鼠另一侧胫骨和股骨,剪除双侧骨端,用 1 mL 注射器吸取 α -MEM 培养基冲洗髓腔,将骨内的细胞吹到直径为 35 mm 的平皿中,从两端反复吹 4~5 次,至骨组织变白。用含 20% FBS 的 α -MEM 培养基,置 37 ℃,5% CO₂、饱和湿度培养箱内培养 24 h,第 2 天细胞换液,弃除非贴壁细胞,然后隔天换液。每天在倒置显微镜下观察细胞生长状况。

2.5 体外细胞增殖

当细胞生长到对数期时,将取出的间充质干细胞铺到 96 孔板中,每孔加入含 2 000 个细胞的细胞悬液 100 μ L,在 96 孔板最外面一圈孔里,每孔加入 PBS 200 μ L。取 0、1、2、3、4、5、6、7 d 中相同的时间点,每天检测前,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L。在细胞培养箱内孵育 2.5 h。在 450 nm 测定吸光度(A)值。根据每天获得的数据绘制细胞增殖曲线,计算增长率。

增长率=(每天测定 A 值-0 d 测定 A 值)/0 d 测定 A 值

2.6 体外细胞分化

当细胞生长到对数期时,将取出的间充质干细胞铺到 6 孔板中,每孔含有 8×10^5 个细胞。使用的 α -MEM 培养基中有 10 mmol/L β -GP, 0.05 mol/L L-抗坏血酸和 10 nmol/L 地塞米松,然后隔天换液。每天在倒置显微镜下观察细胞生长状况和形态变化。在 7 d 后,将 6 孔板中的培养基移除,用 PBS 洗 3 次,每孔加入 200 μ L 的 100% Triton X100 并在室温下放置 10 min,用细胞刮刮下每孔的细胞,并分别将每孔的细胞悬液放在 1.5 mL EP 管中,将细胞破碎后在 4 ℃的温度下 12 000 r/min 离心 30 min,将离心后的上清移置新的 1.5 mL EP 管中,并放在冰上。用试剂盒测定总蛋白浓度,并进行 ALP 定量。

倍数变化=(各组 ALP 活性/总蛋白的数值)/(模型组 ALP 活性/总蛋白的数值)

2.7 统计学分析

结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均使用 SPSS 20.0 统计学软件的单因素方差分析进行显著性差异比较。

3 结果

3.1 右归饮对骨质疏松小鼠的骨形态计量和 Micro-CT 的影响

与假手术组比较,模型组的骨密度均显著降低($P < 0.05$),说明将小鼠切除卵巢后,小鼠有骨丢失的情况发生,符合骨质疏松患者的特征。右归饮组和雷洛昔芬组的骨密度较模型组均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,右归饮组的骨形态计量指标骨体积分数、骨小梁平均厚度、骨小梁数量均显著升高,骨表面积/骨体积和骨小梁分离度均显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 右归饮对骨质疏松小鼠的骨密度和骨形态计量指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 1 Effect of Yougui Drink on bone mineral density and bone histomorphometry index of osteoporosis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	剂量	骨密度/(g·cm ⁻³)	骨体积分数/%	骨表面积/骨体积/(mm ⁻¹)	骨小梁平均厚度/mm	骨小梁数量/(mm ⁻¹)	骨小梁分离度/mm
假手术	—	1.189±0.016	0.115±0.01	65.859±1.85	0.030±0.001	3.770±0.223	0.236±0.016
模型	—	1.135±0.031 [*]	0.054±0.025 [*]	88.001±14.28 [*]	0.023±0.004 [*]	2.222±0.749 [*]	0.475±0.200 [*]
雷洛昔芬	10 mg·kg ⁻¹	1.187±0.06 [#]	0.096±0.07 [#]	70.522±8.57 [#]	0.029±0.03 [#]	3.291±0.51 [#]	0.283±0.010 [#]
右归饮	0.1 g	1.207±0.014 [#]	0.119±0.017 [#]	61.384±2.724 [#]	0.032±0.002 [#]	3.648±0.28 [#]	0.243±0.024 [#]

与假手术组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group

在骨的冠状面中,可以清楚看到模型组中的骨量明显较其他组少,右归饮组的骨量较模型组有所增加。由于小鼠的骨较小,所以采用小鼠骨横截面

构建三维立体图形,模型组中的骨量同样较少,右归饮组的骨量有所增加,与从骨的冠状面看到的结果相一致,见图 1。

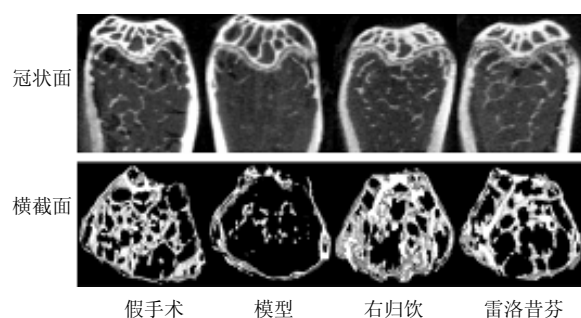


图 1 各组大鼠骨的冠状面和横截面立体图

Fig.1 Coronal and cross-sectional stereogram of the bones in each group of rats

3.2 右归饮对骨质疏松小鼠骨形成和再吸收影响

血清中对于骨形成和骨再吸收的测定是通过测定 P1NP 和 CTx 水平来评估。模型组的 P1NP 水平较假手术组显著下降, 差异具有显著性 ($P < 0.05$); 右归饮组、雷洛昔芬组的 P1NP 水平较模型组显著升高 ($P < 0.05$)。模型组中血清 CTx 水平较假手术组略有升高, 右归饮组的 CTx 比模型组略高一点, 而雷洛昔芬组较模型组略低一些, 各组间差异均无统计学意义。结果见表 2。

表 2 右归饮对骨质疏松小鼠的 P1NP 和 CTx 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 2 Effect of Yougui Drink on P1NP and CTx levels in serum of osteoporosis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	剂量	P1NP/(ng·mL ⁻¹)	CTx/(ng·mL ⁻¹)
假手术	—	240.34 ± 12.59	1.76 ± 0.17
模型	—	96.76 ± 5.43*	1.99 ± 0.14
雷洛昔芬	10 mg·kg ⁻¹	163.64 ± 16.51 [#]	1.70 ± 0.13
右归饮	0.1 g	242.20 ± 20.96 [#]	2.01 ± 0.30

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group

3.3 右归饮对骨质疏松小鼠血生化指标的影响

模型组血清中钙水平与假手术组间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。雷洛昔芬组的钙、磷水平较模型组均显著降低 ($P < 0.05$), 但右归饮组钙、磷水平与模型组各指标之间的差异均无统计学意义, 结果见表 3。

3.4 右归饮对骨质疏松小鼠体外细胞增殖和分化影响

细胞的增殖情况通过 CCK-8 试验来测定, 而分化则是通过对 ALP 定量来表现的。在细胞增殖方面, 与假手术组比较, 模型组细胞增长率差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 右归饮组细

胞呈增长趋势, 但增长率较其他组相对较低 ($P < 0.01$); 雷洛昔芬组细胞增长相对较快。见图 2。

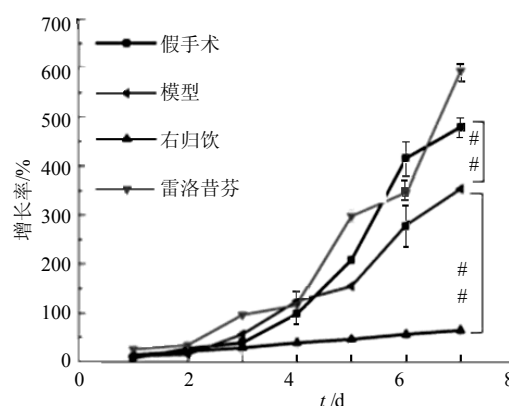
表 3 右归饮对骨质疏松小鼠血生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 3 Effect of Yougui Drink on blood biochemical markers in osteoporosis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	剂量	Ca/(mmol·L ⁻¹)	P/(mmol·L ⁻¹)
假手术	—	3.40 ± 0.17	2.43 ± 0.08
模型	—	3.20 ± 0.03*	2.33 ± 0.08
雷洛昔芬	10 mg·kg ⁻¹	2.99 ± 0.02 [#]	2.02 ± 0.11 [#]
右归饮	0.1 g	3.32 ± 0.06	2.39 ± 0.06

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group



与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs model group

图 2 右归饮对骨质疏松小鼠细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Fig. 2 Effect of Yougui Drink on cell proliferation in osteoporosis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

ALP 定量的测定结果可以看出细胞分化能力。模型组 ALP 活性/总蛋白的数值为 0.002 8, 计算各组倍数变化。与模型组比较, 雷洛昔芬组、右归饮组倍数变化均显著升高 ($P < 0.01$), 见表 4。

表 4 右归饮对骨质疏松小鼠倍数变化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 4 Effect of Yougui Drink on ALP/BCA in osteoporosis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	剂量	倍数变化
假手术	—	1.21 ± 0.19
模型	—	1.00 ± 0.00
雷洛昔芬	10 mg·kg ⁻¹	1.64 ± 0.073 ^{##}
右归饮	0.1 g	3.59 ± 0.147 ^{##}

* $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

右归饮是《景岳全书》中的一个经典传统复方。中医认为“肾主骨生髓”，右归饮的主要功效是温补肾阳。研究表明，右归饮对小鼠肾虚模型有一定治疗作用^[5]。肾功能在骨骼代谢调节中起重要作用，肾功能受损患者的骨密度较肾功能正常人的骨密度有所降低^[8]。

为探讨右归饮对骨的作用影响和机制，本研究对去势小鼠给药5周后进行体内外研究。右归饮组的小鼠骨密度及微结构均有改善，显著提高了小鼠血清中P1NP水平，且促进间充质干细胞的分化，表明右归饮可有效抑制骨丢失。

研究结果表明，右归饮组的骨形态计量测定指标骨体积分数、骨小梁平均厚度和骨小梁数量均高于模型组，骨表面积/骨体积和骨小梁分离度均低于模型组，且两组间的差异有统计学意义($P<0.05$)，表明右归饮对小鼠骨丢失有抑制作用。与文献报道结果一致^[9-10]。P1NP和CTX分别是骨形成和骨吸收的标志。右归饮组血清中P1NP水平较模型组显著升高，而CTX的水平也很高，由结果推测右归饮主要是促进骨形成而非抑制骨吸收。周华等^[11]研究表明右归饮通过调节体内激素水平、BMP-2的表达来刺激骨的形成，与实验结果一致，表明右归饮是可以实现促进骨形成。血生化指标钙磷水平的比例过低，对骨生成有不利影响^[12]。右归饮组的钙磷水平较模型组略有升高，但差异无显著性。对于右归饮如何促进骨形成，本研究进行了体外间充质干细胞的增殖和分化实验。ALP是从不成熟的成骨细胞中分泌出来的，被认为是间充质干细胞初期分化成成骨细胞的标志。右归饮组的间充质干细胞有所增长，但是增长的速度较其他组都显著降低，也许是右归饮的浓度较低，使细胞增殖不明显。但是右归饮组的ALP表达显著高于其他组，由结果推测右归饮可能主要是通过促进间充质干细胞分化为成骨细胞来促进骨形成。

综上所述，右归饮可能是通过促进间充质干细

胞分化成成骨细胞，从而刺激骨形成，达到有效抑制小鼠骨丢失的作用效果，对骨质疏松症有一定的治疗作用，为临床治疗提供依据，具有较大的社会经济价值和广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon D H, *et al.* Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025 [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(3): 465-475.
- [2] Silva B C, Bilezikian J P. New approaches to the treatment of osteoporosis [J]. *Annu Rev Med*, 2011, 62: 307-322.
- [3] 胡 静, 郑洪新. 益肾填精壮骨法防治骨质疏松症研究探药 [J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(12): 2628-2630.
- [4] 许 兵, 刘 慧, 金红婷, 等. 经典骨质疏松症模型大鼠的肾虚证研究 [J]. *中国骨伤*, 2012, 25(9): 766-770.
- [5] 王玲珑. 右归饮对肾虚小鼠模型的实验研究 [J]. *内蒙古中医药*, 2010, 29(18): 42.
- [6] 杨 锋, 戴关海, 杨 玲. 右归饮对“阳虚”小鼠模型作用的实验研究 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 1997, 7(4): 212-213.
- [7] Furusyo N, Ogawa E, Sudoh M, *et al.* Raloxifene hydrochloride is an adjuvant antiviral treatment of postmenopausal women with chronic hepatitis C: A randomized trial [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(6): 1186-1192.
- [8] 娄云龙, 罗建民, 赵立来. 右归饮联合富血小板血浆对骨质疏松并发股骨颈骨折患者骨折愈合及股骨头坏死的影响 [J]. *现代实用医学*, 2016, 28(7): 902-903.
- [9] 沈兴潮, 宋才渊, 吕帅洁, 等. 显微CT观察右归饮对鼠激素性股骨头坏死预防作用的实验研究 [J]. *中国骨伤*, 2015, 28(12): 1106-1110.
- [10] 吴风晴. Micro-CT评价右归饮抑制大鼠假体周围骨溶解[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2016.
- [11] 周 华. 右归饮对去势大鼠骨中BMP-2含量及相关因素影响的实验研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(4): 830-831.
- [12] Rothenbacher D, Klenk J, Denkinger M D, *et al.* Prospective evaluation of renal function, serum vitamin D level, and risk of fall and fracture in community-dwelling elderly subjects [J]. *Osteoporos Int*, 2014, 25(3): 923-932.