

右归饮联合盐酸雷洛昔芬给药治疗小鼠骨质疏松症

齐晓宇^{1,2}, 赵磊³, 毕冬冬², 郝廷⁴, 张葆鑫⁴, 王兴国^{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 观察右归饮和盐酸雷洛昔芬联合给药对骨质疏松模型小鼠的治疗作用,并研究其作用机制。方法 将C57BL/6雌性小鼠切除卵巢制备骨质疏松模型,手术12周后将小鼠随机分为4组:模型组、右归饮(0.1 g/只)组、盐酸雷洛昔芬(10 mg/kg)组和联合给药(右归饮0.1 g/只与盐酸雷洛昔芬10 mg/kg联合给药)组,另设假手术组,连续7周每天ig给药1次。给药结束后,将动物处死,Micro-CT测定骨密度和骨组织微形态,并测定骨形态计量指标——骨体积分数(BV/TV)、骨表面积/骨体积(BS/BV)、骨小梁的平均厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁分离度(Tb.Sp);试剂盒法测定血清中I型胶原氨基端(P1NP)、胶原羧基端(CTX)水平;分离并培养骨髓间充质干细胞,体外培养7 d, CCK-8法测定细胞增殖率,试剂盒法检测分化相关指标碱性磷酸酶(ALP)水平。结果 与模型组比较,右归饮组、盐酸雷洛昔芬组和联合给药组的骨密度、BV/TV、Tb.Th、Tb.N显著升高,BS/BV和Tb.Sp显著降低($P<0.05$);与盐酸雷洛昔芬组比较,联合给药组的BV/TV、Tb.Th、Tb.N显著升高,BS/BV和Tb.Sp显著降低($P<0.05$)。联合给药组P1NP水平、细胞增殖率均显著高于其他各组($P<0.05$ 、 0.01)。ALP水平显著高于假手术组、模型组、盐酸雷洛昔芬组,显著低于右归饮组($P<0.01$)。结论 在给药时间相同的前提下,右归饮和盐酸雷洛昔芬联合给药比单独给药更有效地抑制小鼠骨丢失,通过促进细胞的增殖和分化提高骨形成能力,达到增加骨密度、治疗骨质疏松的效果。

关键词: 右归饮; 盐酸雷洛昔芬; 骨髓间充质干细胞; 骨丢失; 骨质疏松; 细胞增殖; 分化

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)02-0194-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.02.004

Effect of Yougui Drink and raloxifene hydrochloride combined administration on mice with osteoporosis

QI Xiaoyu^{1,2}, ZHAO Lei³, BI Dongdong², HAO Ting⁴, ZHANG Baoxin⁴, WANG Xingguo⁴

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

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

3. Life Sciences and Environmental Sciences Center, Harbin university of commerce, Harbin 150076, China

4. Department of Trauma, the Second Hospital Affiliated to Inner Mongolia Medical University, Hohhot 10030, China

Abstract: Objective To observe the effect of Yougui Drink (YGD) and raloxifene hydrochloride (RH) combined administration on mice with osteoporosis for investigating the mechanisms, so as to provide experimental basis for the treatment of osteoporosis.

Methods The osteoporosis models were simulated by removal of the ovary in C57BL/6 mice. The mice were randomly divide into four groups after 12 weeks of surgery: model, YGD (0.1 g/per mouse), RH (10 mg/kg) and combined administration (YGD 0.1 g/per mouse and RH 10 mg/kg), and sham-operated group. All the mice were killed after 7 weeks of daily ig administration. Bone mineral density (BMD) and the bone microtomographic histomorphometry were assessed by Micro-CT, and the bone histomorphometry index:

收稿日期: 2017-09-1

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81460734)

第一作者: 齐晓宇(1992—),女,汉族,黑龙江黑河人,在读硕士,专业方向为中药药剂学。Tel: 18545627231 E-mail: qxy616787751@163.com

*通信作者: 王兴国(1979—),男,蒙古族,内蒙古人,硕士,主要从事骨质疏松方向。Tel: 15947713201 E-mail: 1416882863@qq.com

bone volume/total volume (BV/TV), bone surface area/bone volume (BS/BV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), and trabecular separation (Tb.Sp) were detected. Next, the levels of P1NP and CTx in serum were assessed. Finally, the isolated bone mesenchymal stem cells (BMSCs) were cultured for 7 d *in vitro* for assessing the cell proliferation by CCK-8 method and the ability of osteogenic differentiation by quantitative analysis of alkaline phosphatase (ALP). **Results** Compared with model group, BMD, BV/TV, Tb.Th and Tb.N of YGD group, RH group and combined administration group significantly increased, BS/BV and Tb.Sp decreased significantly ($P < 0.05$); Compared with RH group, BV/TV, Tb.Th, Tb.N in combined treatment group increased significantly, BS/BV and Tb.Sp decreased significantly ($P < 0.05$). The P1NP level and cell proliferation rate of the combined drug group were much higher than those in the other groups ($P < 0.05, 0.01$). The ALP level was much higher than that in sham group, model group and RH group, but much lower than that of YGD group ($P < 0.01$). **Conclusion** YGD combined with RH were more effective to attenuate bone loss of the mice than single dose of YGD and RH, by promoting cell proliferation and differentiation to improve the ability of bone formation, thus increasing the bone density and the treatment effect of osteoporosis.

Key words: Yougui Drink; raloxifene hydrochloride; bone mesenchymal stem cells; bone loss; osteoporosis; cell proliferation; differentiation

骨质疏松症是由于骨密度降低和骨组织微结构退化使骨脆性增加,从而导致骨折的一种骨骼疾病^[1-2]。骨质疏松症是一种多因素疾病,是常见病、多发病。研究表明,在未来50年,骨质疏松患者的数量大约会增加3~4倍^[3]。而在2012年,国际骨质疏松基金会指出,平均每3秒在全世界会发生1例由于骨质疏松而导致的骨折^[4]。近年来,中医药治疗骨质疏松症临床及实验研究是一个普遍情况,右归饮是记载在《景岳全书》中的传统中药复方。右归饮在多个临床研究中被证实抑制骨丢失,缓解症状,对骨质疏松症有良好的疗效^[5-8],但是传统的中药见效比较慢^[9]。研究表明,盐酸雷洛昔芬也可以治疗骨质疏松症^[10]。基于前期研究成果,本课题拟通过右归饮和盐酸雷洛昔芬联合给药抑制骨丢失,提高治疗骨质疏松症的疗效;并通过体外实验探索其作用机制。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

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,由北京同仁堂制备。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%); α -MEM培养基(美国Hyclone公司);胎牛血清、青链霉素双抗(美国Gibco公司); β -甘油-2-磷酸(β -GP)、Triton™ X-100、L-抗坏血酸、地塞米松(Sigma);碱性磷酸酶(ALP)测试盒(酶标仪法,南京建成生物工程研究所);CCK-8(同仁化学,日本);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)、胶原羧基端(CTx)

试剂盒(ELISA公司)。

1.2 主要仪器

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 M 1 000 多功能连续波长酶标仪(瑞士)。

1.3 动物

4周龄C57BL/6雌性小鼠45只,体质量(20±1)g,购自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 盐酸雷洛昔芬溶液的配制

取盐酸雷洛昔芬溶于DMSO中,再与吐温80混合,随后加入生理盐水将其稀释,最终使其成为澄清透明的溶液,在此过程中用超声辅助溶解(配置的溶液中DMSO的含量少于0.1%)。

2.2 建立骨质疏松模型

在无菌条件下,取出36只小鼠的双侧卵巢,将去卵巢的小鼠放在笼内,术后一周sc给予小鼠青霉素钠,所有动物在实验室同等条件下饲养12周。随机将小鼠分为5组,每组9只:假手术组,小鼠未取卵巢,ig生理盐水;模型组,ig生理盐水;右归饮组,ig右归饮0.2 mL(生药量0.5 g/mL,给药量相当于生药0.1 g/只,剂量设置依据文献^[11]);盐酸雷洛昔芬组,ig盐酸雷洛昔芬溶液(10 mg/kg)^[12]。

联合给药组: ig 右归饮和盐酸雷洛昔芬溶液, 剂量同单给药组。每天给药 1 次, 连续 7 周。

2.3 小鼠股骨与胫骨的取材及骨髓间充质干细胞的分离培养

连续给药 7 周后, 眼球取血, 脱颈处死小鼠, 剔除毛和肌肉, 分离出双侧股骨、胫骨。将其中一侧胫骨和股骨, 用 10% 福尔马林固定, 做 Micro-CT, 测定骨形态计量指标: 骨体积分数 (bone volume/total volume, BV/TV)、骨表面积/骨体积 (bone surface area/bone volume, BS/BV)、骨小梁的平均厚度 (trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁数量 (trabecular number, Tb.N)、骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb.Sp)。另一侧胫骨和股骨, 用 75% 的酒精浸泡后, 无菌操作, 剪除双侧骨端, 用 1 mL 的注射器吸取 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, 用含 20% FBS 的 α -MEM 培养基, 置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱内培养 24 h, 第 2 天给细胞换液弃除非贴壁细胞, 而后隔天换液^[13]。每日在倒置显微镜下观察细胞生长状况和形态变化。

将通过眼球取出的血放在装有肝素钠的 EP 管中, 5 000 r/min 离心 5 min, 取离心后的上清, 放在 -80 °C 冻存, 每组 9 只小鼠的血清使用试剂盒测定血清中 P1NP 和 CTx 的水平, 每个样本平行测定 3 次。

2.4 CCK-8 增殖实验

当细胞生长至对数期, 以每孔 2 000 个铺到 96 孔板中, 最外面一圈孔里, 每孔加入 200 μ L 磷酸缓

冲液 (PBS)。接种当天记为第 0 天, 取 0、1、2、3、4、5、6、7 d 中相同的时间点, 每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂。在细胞培养箱内孵育 2.5 h 后, 置于 450 nm 读取 A 值, 计算细胞增殖率, 绘制增殖曲线。

增殖率 = (每天测定 A 值 - 第 0 天测定 A 值) / 第 0 天测定 A 值

2.5 ALP 定量

当细胞生长至对数期, 以每孔 8×10^5 个铺到 6 孔板中, 使用含有 10 mmol/L β -GP、0.05 mol/L L-抗坏血酸和 10 nmol/L 地塞米松的 α -MEM 培养基, 隔天换液。每日在倒置显微镜下观察细胞生长状况和形态变化。7 d 后, 将 6 孔板中的培养基移除, PBS 洗 3 次, 每孔加入 200 μ L 的 100 % tritonX100 并在室温下放置 10 min, 用细胞刮将每孔的细胞刮下, 并分别将每孔的细胞悬液放在 1.5 mL 的 EP 管中, 将细胞破碎后, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 离心后的上清移至 EP 管中并放在冰上。用试剂盒测定总蛋白 (BCA) 浓度、进行 ALP 定量。

2.6 统计学方法

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间结果采用 SPSS 17.0 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 Micro-CT 及骨形态计量测定结果

Micro-CT 图片结果见图 1, 定量数据见表 1, 结果显示, 模型组的骨密度较假手术组显著降低,

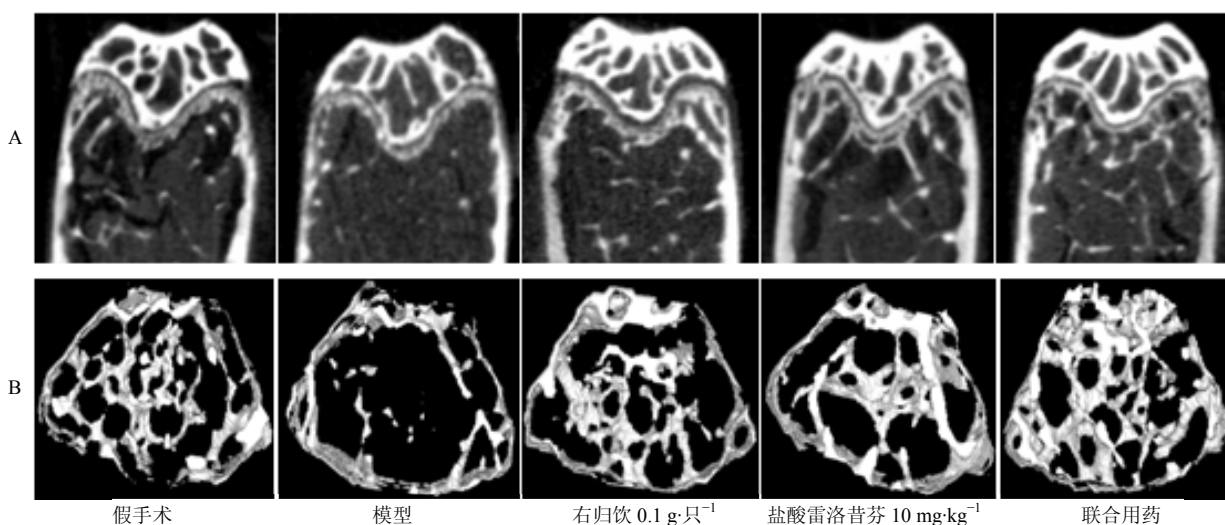


图 1 各组骨的冠状面 (A) 和骨的横截面立体图 (B)

Fig. 1 Coronal plane of tibias microarchitecture (A); free-space diagram of tibias microarchitecture of in transverse plane (B) in five groups

表1 各组之间骨相关参数测定指标 ($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 1 Related parameters of bone among groups ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量	骨密度/(g·cm ⁻³)	BV/TV/%	BS/BV/mm ⁻¹	Tb.Th/mm ⁻¹	Tb.N/mm ⁻¹	Tb.Sp/mm
假手术	—	1.191±0.015	0.103±0.008	69.09±0.629	0.029±0.001	3.563±0.310	0.253±0.023
模型	—	1.109±0.016*	0.046±0.019*	82.50±11.78*	0.023±0.003*	2.335±0.288*	0.407±0.057*
右归饮	0.1 g·只 ⁻¹	1.195±0.030 [#]	0.110±0.013 [#]	62.56±3.045 [#]	0.032±0.002 [#]	3.700±0.287 [#]	0.236±0.021 [#]
盐酸雷洛昔芬	10 mg·kg ⁻¹	1.188±0.035 [#]	0.096±0.037 [#]	73.16±5.045	0.028±0.003 [#]	2.939±0.630	0.297±0.072 [#]
联合给药	0.1 g·只 ⁻¹ + 10 mg·kg ⁻¹	1.208±0.044 [#]	0.141±0.013 ^{*#&}	54.08±4.628 ^{*#&}	0.034±0.002 ^{*#&}	4.115±0.118 ^{#&}	0.209±0.009 ^{#&}

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与盐酸雷洛昔芬组比较: [&] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs sham group; [#] $P<0.05$ vs model group; [&] $P<0.05$ vs RH group

差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。右归饮组、盐酸雷洛昔芬组和联合给药组的骨密度与模型组比较均显著升高 ($P<0.05$)，其他各组之间骨密度差异均无统计学意义。

模型组的骨形态计量测定的各项指标(BV/TV、BS/BV、Tb.Th、Tb.N 和 Tb.Sp) 与假手术组比较均差异显著 ($P<0.05$)。联合给药组的 BV/TV、Tb.Th 较假手术组、模型组和盐酸雷洛昔芬组显著升高，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；联合给药组的 Tb.N 与模型组和盐酸雷洛昔芬组比较显著升高 ($P<0.05$)。而对于 BS/BV 和 Tb.Sp 测量指标，联合给药组与模型组和盐酸雷洛昔芬组比较显著降低，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。此外，联合给药组的 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 参数略高于右归饮组，而 BS/BV 和 Tb.Sp 则略低于右归饮组，但是两组间差异无统计学意义。结果见表 1。

3.2 血清的测定结果

假手术组、右归饮组、盐酸雷洛昔芬组和联合给药组血清中 P1NP 水平均较模型组显著升高，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。联合给药组血清中 P1NP 水平较假手术组、右归饮组和盐酸雷洛昔芬组升高，显著差异 ($P<0.05$)。此外，右归饮组血清中 P1NP 水平与盐酸雷洛昔芬组比较明显升高，差异显著 ($P<0.05$)。

假手术组、右归饮组、盐酸雷洛昔芬组和联合给药组血清中 CTx 水平均较模型组明显降低，差异显著 ($P<0.05$)。但是联合给药组血清中 CTx 水平较假手术组、右归饮组和盐酸雷洛昔芬组升高，差异显著 ($P<0.05$)。此外，右归饮组血清中 CTx 水平与盐酸雷洛昔芬组比较升高，差异显著 ($P<0.05$)。结果见表 2。

3.3 细胞增殖与分化的测定结果

CCK-8 细胞增殖实验结果显示，从第 2 天开始，

表2 各组之间血清测定指标 ($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 2 Biochemical markers in serum among groups ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量	P1NP/ (ng·mL ⁻¹)	CTx/ (ng·mL ⁻¹)
假手术	—	146.80±25.32	1.195±0.017
模型	—	44.73±7.46*	1.388±0.067*
盐酸雷洛昔芬	10 mg·kg ⁻¹	101.60±21.34 ^{*#}	1.108±0.016 [#]
右归饮	0.1 g·只 ⁻¹	189.60±24.89 ^{*#&}	1.124±0.027 ^{*#&}
联合给药	0.1 g·只 ⁻¹ + 10 mg·kg ⁻¹	241.10±19.54 ^{*#Y&}	1.289±0.035 ^{*#Y&}

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与右归饮组比较: ^Y $P<0.05$; 与盐酸雷洛昔芬组比较: [&] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs sham group; [#] $P<0.05$ vs model group; ^Y $P<0.05$ vs YGY group; [&] $P<0.05$ vs RH group

部分组别之间细胞增殖率差异显著 (图中仅标注第 7 天的显著性差异)。与假手术组比较，模型组增殖率显著降低 ($P<0.01$)；联合给药组的细胞增殖率较其他各组 (假手术组、模型组、右归饮组和盐酸雷洛昔芬组) 均显著增加，差异有统计学意义 ($P<0.01$)。此外，与其他各组比较，右归饮组的间充质干细胞增长缓慢 ($P<0.01$)，仅是略微增长 (图 2A)。

ALP 的定量结果可以表明细胞的分化情况。结果显示，模型组较假手术组显著降低，差异有统计学意义 ($P<0.01$)；联合给药组与模型组、盐酸雷洛昔芬组比较，明显升高，差异显著 ($P<0.01$)；但是和右归饮组比较，联合给药组显著降低，差异有统计学意义 ($P<0.01$) (图 2B)。

4 讨论

骨质疏松症通常被认为是由年龄、激素、免疫、营养等诸多因素交互影响的复杂结果；由于早期并没有明显的症状，被称为“无声无息的流行病”，在中老年人中发病是比较普遍的^[14]。

研究表明，右归饮可以促进去势大鼠的成骨能

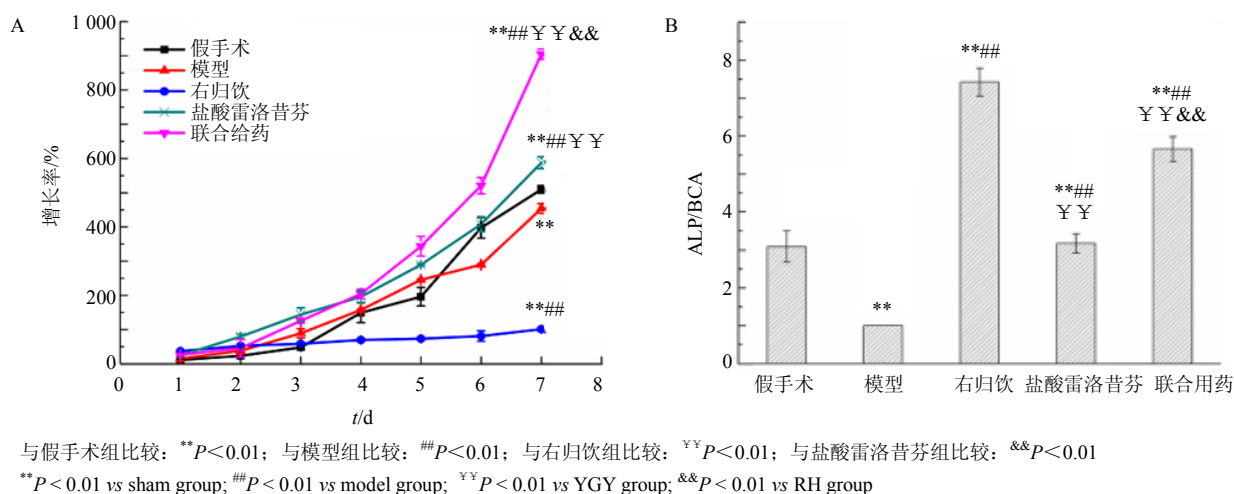


图2 各组间充质干细胞增殖情况 (A); 各组成骨细胞分化 (ALP/BCA) 情况 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 2 Conditions of cell proliferation (A); osteogenic differentiation (ALP/BCA) (B) of BMSCs among groups ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

力, 并且与 omega3 多不饱和脂肪酸联合应用可以抑制去卵巢大鼠骨丢失^[15-16]。盐酸雷洛昔芬可以提高绝经后骨质疏松妇女腰椎和髋部的骨密度, 并降低骨转化和总胆固醇与低密度脂蛋白胆固醇^[17]。既往研究表明, 右归饮和盐酸雷洛昔芬单独使用治疗骨质疏松是有效的, 本研究将二者联合给药治疗骨质疏松症, 结果表明, 联合给药可以有效地增加去势小鼠的骨密度, 抑制其骨丢失。

本实验通过去除卵巢的方法建立了雌激素缺乏型骨质疏松的小鼠模型, Micro-CT 和骨形态计量指标测定结果表明, 模型组和假手术组间差异均有统计学意义; 右归饮组和盐酸雷洛昔芬组的骨密度、骨形态计量指标与模型组比较也有显著性差异, 表明骨质疏松造模成功。

联合给药提高骨密度并有效地抑制去势小鼠的骨丢失, 为探讨其作用机理, 本研究对每组给药 7 周小鼠的血清和提取的间充质干细胞进行体外实验。骨重建和骨吸收之间骨转换生化标志为骨质疏松症及骨折危险性的预测提供重要信息, 提高骨形成或抑制骨吸收可以减少骨量下降, 有效的预防骨质疏松症并降低骨折风险^[18-19]。血清中 P1NP 和 CTx 分别是骨形成和骨吸收的标志^[20]。本研究结果显示, 右归饮组主要在骨形成方面占优势, 且右归饮并不能很好的抑制骨吸收, 表明右归饮主要是通过骨形成途径来增加骨密度, 与之前的研究一致^[21]。此外, 文献表明^[22], 盐酸雷洛昔芬组通过抑制骨吸收的途径治疗骨质疏松症, 与本研究结果一致。然

而, 本研究结果显示, 联合给药组增加骨密度的方式主要通过骨形成途径, 在抑制骨吸收上并没有什么效果。

骨髓间充质干细胞体外培养、在适当诱导条件下, 可以分化为成骨细胞, 有很强的成骨能力, 常作为研究骨组织的种子细胞^[23]。本研究于给药 7 周的小鼠分离并培养间充质干细胞, 测定各组细胞的增殖及分化能力。ALP 从不成熟的成骨细胞中分泌, 是成骨细胞的标志酶之一, 主要作用是水解有机磷酸酶, 被认为是成骨早期分化的标志^[24-26]。结果显示, 右归饮组的细胞有所增长, 但是和其他给药组比较增长缓慢, ALP 表达量最高, 表明右归饮通过提高细胞的分化促进骨形成。此外, 联合给药组的细胞增长速度最快, 且在细胞分化方面也有一定的促进作用, 表明联合给药组从细胞的增殖和分化两方面促进骨形成。

本次实验在右归饮和盐酸雷洛昔芬均在临床上发挥显著效果的基础上, 以两者联合给药观察对骨质疏松小鼠的治疗作用并进一步探讨其作用机制, 以了解其作用途径。结果显示, 联合给药可以增加去势小鼠骨密度, 提高血清中 P1NP 水平, 并促进骨髓间充质干细胞的增殖和成骨细胞的分化。在给药时间相同的前提下, 右归饮和盐酸雷洛昔芬联合给药比单独给药更有效地抑制小鼠骨丢失, 通过促进细胞的增殖和分化提高骨形成能力, 从而达到增加骨密度、治疗骨质疏松的效果, 其具体分子机制。仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Boyanov M, Shinkov A, Psachoulia E, et al. Baseline characteristics and changes in bone mineral density t-scores of bulgarian women with postmenopausal osteoporosis receiving denosumab in routine clinical practice [J]. *Drugs R D*, 2017, 17(1): 125-132.
- [2] 许伟, 谢兴文. 单味中药及其有效成份促进骨折愈合的研究进展 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2010, 8(13): 187-188.
- [3] 姜礼红, 朱秀英, 孟佳, 等. 老年骨质疏松症患者监测 25(oh)d₃ 水平的临床意义 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2012, 18(3): 276-277.
- [4] Akesson K, Marsh D, Mitchell P J, et al. Capture the fracture: A best practice framework and global campaign to break the fragility fracture cycle [J]. *Osteoporos Int*, 2013, 24(8): 2135-2152.
- [5] 李天强. 右归饮治疗骨质疏松症疗效观察 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2006, 16(1): 50.
- [6] 刘志钧, 李俊英, 李仲平, 等. 右归饮加减治疗肾虚型骨质疏松症 [J]. *吉林中医药*, 2014, 34(5): 463-465.
- [7] 王洪雷. 右归饮加减治疗老年性骨质疏松症(肾阳虚型)的临床研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2010.
- [8] 曾杰, 肖亚平, 安尧, 等. 右归饮 HPLC 指纹图谱研究及 9 种成分定量分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(24): 5143-5150.
- [9] Tang W R, Yang S H, Yu C T, et al. Long-term effectiveness of combined treatment with traditional Chinese medicine and western medicine on the prognosis of patients with lung cancer [J]. *J Altern Complement Med*, 2016, 22(3): 212-222.
- [10] Abdelazim I A, Abdelrazak K M, Al-Kadi M, et al. Effect of raloxifene hydrochloride on bone mineral density and bone turnover in kuwaiti postmenopausal women with osteoporosis [J]. *Arch Osteoporos*, 2014, 9: 189. doi: 10.1007/s11657-014-0189-9.
- [11] 齐晓宇, 赵磊, 毕冬冬, 等. 右归饮对去势雌性小鼠骨质疏松的治疗作用 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(11): 2072-2076.
- [12] 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.
- [13] Kar S, Mitra S, Banerjee E R. Isolation and culture of embryonic stem cells, mesenchymal stem cells, and dendritic cells from humans and mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1516: 145-152.
- [14] 张燕燕, 卢春燕, 刘斌, 等. 骨质疏松症的药物治疗 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13(11): 809-813.
- [15] 钱康. Omega3 多不饱和脂肪酸联合右归饮对骨质疏松模型大鼠的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2013, 22(8): 1361-1363.
- [16] 汤小康, 应航, 倪哲吉, 等. 右归饮对模拟人体内应力环境中成骨细胞碱性磷酸酶分泌的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2013, 36(8): 542-545, 549, 578.
- [17] 刘建立, 朱汉民, 黄琪仁, 等. 盐酸雷洛昔芬对绝经后骨质疏松妇女骨密度、骨代谢生化指标和血脂的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(4): 269-273.
- [18] Ishidou Y, Matsuyama K, Sakuma D, et al. Osteoarthritis of the hip joint in elderly patients is most commonly atrophic, with low parameters of acetabular dysplasia and possible involvement of osteoporosis [J]. *Arch Osteoporos*, 2017, 12(1): 30.
- [19] Li Z C, Dai L Y, Jiang L S, et al. Difference in subchondral cancellous bone between postmenopausal women with hip osteoarthritis and osteoporotic fracture: Implication for fatigue microdamage, bone micro architecture, and biomechanical properties [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(12): 3955-3962.
- [20] 周学瀛, 夏维波. 骨转换生化标志物 [J]. *基础医学与临床*, 2007, 27(10): 1093-1100.
- [21] 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.
- [22] Hernandez E, Valera R, Alonzo E, et al. Effects of raloxifene on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal women on chronic hemodialysis [J]. *Kidney Int*, 2003, 63(6): 2269-2274.
- [23] Hoffmann A, Floerkemeier T, Melzer C, et al. Comparison of in vitro-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2016, 28(10): 2565-2581.
- [24] Bancroft G N, Sikavitsas V I, van den Dolder J, et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3d perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(20): 12600-12605.
- [25] Liu Y, Zhang Z, Zhang C, et al. Adipose-derived stem cells undergo spontaneous osteogenic differentiation in vitro when passaged serially or seeded at low density [J]. *Biotech Histochem*, 2016, 91(5): 369-376.
- [26] 王秀玲, 于文涛. 骨愈 1 号药物血清对成骨细胞增殖分化功能的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2007, 25(7): 1408-1409.