

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.016

钛颗粒对小鼠颅骨 OPG/RANKL mRNA 及蛋白表达的影响 *

孙 闯 吴 垠 季 锋 廉永云 逯代峰

(哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:观察钛颗粒对小鼠颅骨中 OPG/RANKL mRNA 及其蛋白表达的影响,探讨关节置换术后骨溶解的发生机制。**方法:**取成年 BALB/C 小鼠 40 只,随机分为假手术组、钛颗粒低剂量组、钛颗粒中剂量组及高剂量组,每组 10 只。除假手术组外,其余各组分别将钛颗粒 15、30、60 mg 涂抹于小鼠颅骨表面后缝合切口。8 周后取颅骨组织及外周血,运用 real-time PCR 及 ELISA 技术测定 OPG/RANKL 基因及蛋白表达情况。**结果:**与假手术组相比,钛颗粒低剂量组外周血中 OPG 蛋白表达及颅骨组织中 OPG mRNA 的表达均显著上升($P<0.01$),外周血中 RANKL 蛋白表达降低,但无统计学差异,颅骨组织中 RANKL mRNA 表达无显著差异;中剂量组及高剂量组外周血中 OPG 蛋白表达显著降低($P<0.01$),RANKL 蛋白表达显著升高($P<0.01$),OPG mRNA 表达显著降低($P<0.01$),RANKL mRNA 表达显著升高($P<0.01$)。低中高三种不同剂量钛颗粒组间相比,外周血中 OPG、RANKL 蛋白及颅骨组织中其 mRNA 表达均存在明显差异($P<0.01$),高剂量组对 OPG、RANKL 蛋白及 mRNA 表达的影响更显著。**结论:**钛颗粒可以改变 OPG/RANKL 的 mRNA 及蛋白表达量,这可能是其导致关节置换术后体骨溶解进而产生松动的原因之一。

关键词:骨保护素;RANKL;骨溶解;关节置换;钛颗粒

中图分类号:Q95.3,R68,R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)05-862-04

Effect of Titanium Particles on the Mouse Skull OPG/RANKL mRNA and Protein Expression*

SUN Chuang, WU Yin, JI Feng, LIAN Yong-yun, LU Dai-feng

(The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To study the influence of titanium particles on the mouse skull OPG/RANKL mRNA and protein expression, and explore the osteolysis mechanisms after joint replacement surgery. **Methods:** 40 adult BALB/C mouse were randomly divided into the sham operation group, low-dose titanium particles group, middle dose group and high dose group, (10 mice in each group). In addition to the sham group, the rest groups were smeared titanium particles 15 mg, 30 mg, 60 mg on the surface of the skull, then suture incision. 8 weeks later, the skull tissue and peripheral blood were taken. Real-time PCR and ELISA techniques were used to determine the OPG/RANKL mRNA and protein expression. **Results:** Compared with the sham group, OPG protein expression in the peripheral blood and OPG mRNA expression in skull tissues of low dose titanium particles group were significantly increased ($P<0.01$), RANKL protein expression in peripheral blood decreased, but no significant difference was found. RANKL mRNA expression in skull tissues was also had no significant difference. OPG protein expression in the peripheral blood of middle dose group and high dose group were significantly decreased ($P<0.01$), RANKL OPG protein expression in the peripheral blood were significantly increased ($P<0.01$), OPG mRNA expression were significantly decreased ($P<0.01$), RANKL mRNA expression were significantly increased ($P<0.01$). OPG/RANKL protein expression in peripheral blood and mRNA expression in skull tissue were significantly different ($P<0.01$), the effect of high dose group on the expression of OPG/RANKL protein and mRNA was more significant. **Conclusion:** Titanium particles could change the OPG/RANKL mRNA and protein expression, which may be one of the cause of osteolysis after joint replacement surgery.

Key words: OPG; RANKL; Osteolysis; Arthroplasty; Titanium particles

Chinese Library Classification(CLC): Q95.3, R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)05-862-04

前言

人工关节置换术后假体周围骨溶解致假体无菌性松动是人工关节使用寿命降低的主要原因,关节磨损与磨损颗粒所产生的生物学因素是诱发假体无菌性松动的重要因素^[1]。RAN-

KL/RANK/OPG 是人工关节置换术后磨损粒子引发骨溶解的主要信号通道^[2]。本实验旨在研究钛颗粒对 RANKL/RANK/OPG 的影响,阐明金属颗粒导致假体无菌性松动的机制。

1 材料与方法

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(GC09C412-3)

作者简介:孙闯(1967-),男,硕士,教授,主任医师,硕士生导师;主要研究领域:关节、手显微外科,

电话:15046060571, E-mail: ydsysc@126.com

(收稿日期:2013-09-12 接受日期:2013-10-10)

1.1 材料

1.1.1 实验动物 BALB/C 小鼠购自哈尔滨医科大学动物实验中心,6 月龄雄性,体重 33-40 g,清洁级。

1.1.2 主要仪器与试剂 SK-1 型快速混匀器(江苏金坛医疗仪器厂);钛颗粒(上海水田材料科技有限公司,平均直径 5 μm)电子精密天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);myCycler PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司);荧光定量 PCR 仪(广州中山公司);TGL-16M 高速台式冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);水平电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);Trizol(Invitrogen 公司);OPG/RANKL/GAPDH 的 PCR 引物(上海生工生物工程技术有限公司);逆转录酶(Fermentas 公司)RNA 保存液及 DNA 聚合酶(康为世纪公司);荧光染料(Applied Biosystems 公司)。

1.2 方法

1.2.1 钛颗粒的制备 首先用 75 %酒精将钛颗粒浸泡并放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床 48 h,而后高压蒸汽消毒 30 min,37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱烘干以去除内毒素。经显色基质试剂盒检测,颗粒内毒素 <0.25 Eu/mL。将钛颗粒按每份 15 mg、30 mg、60 mg 分装备用。

1.2.2 分组与手术方式 将 40 只小鼠按随机数字法分为假手术组和钛颗粒低、中、高剂量组,每组 10 只。除假手术组外,其余各组均以 4 %水合氯醛腹腔麻醉(1 mL/100 g)后,去除颅顶被毛,碘伏消毒后,做颅骨正中切口,仔细分离皮下组织至颅骨表面,刮出骨膜后,将不同重量的钛颗粒分别均匀涂抹于对应钛颗粒组小鼠颅骨表面后,全层缝合。假手术组经相同手术方法,但不植入钛颗粒。实验期间,自由食水,饲养房湿度 60~80 %,温度 24 $^{\circ}\text{C}$ ~28 $^{\circ}\text{C}$,通风、采光条件良好。

1.2.3 血清细胞因子的检测 以 4 %水合氯醛腹腔麻醉(1 mL/100 g)后,颈动脉取血,置标本于 3500 rpm 离心机中离心 10 min 得上清液,收集上清液,按照 OPG/RANKL ELISA 试剂盒方法测定各样本 OD 值,每个样本重复三次,取平均值。应用 CurveExpert 1.40 软件绘制标准曲线,换算出各样本蛋白浓度。

1.2.4 骨组织总 RNA 的提取 无菌取出小鼠颅骨,仔细剔除骨膜及周围软组织,按照文献^[3]改良 TRIZOL 法方法提取骨组织中 RNA。

1.2.5 RNA 纯度及完整性检测 用分光光度计测定 RNA 样品 A260/A280 比值进行质量鉴定(A260 / A230 比值约为 2.0,说明 RNA 纯度较高)。用 1 %甲醛变性琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 的完整性。在紫外灯下观察结果,激光密度扫描仪扫描 28 s 和 18 s 条带,计算密度比值,评估 RNA 完整(紫外灯下 28 s 和 18 s 条带清晰可见,密度比值约为 2 : 1,提示 RNA 完整)。

1.2.6 逆转录及 real-time PCR 按照 Fermentas 逆转录试剂盒方法进行逆转录,取 2 μL cDNA,分别加入特定引物(引物序列见表 1),其中 GAPDH 为内参照,OPG、RANKL 为观察的目的基因。反应条件:GAPDH:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,扩增 33 个循环;OPG:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,扩增 33 个循环;RANKL:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,扩增 33 个循环。应用荧光定量 PCR 仪测得个样本 CT 值,每个样本每个基因重复三次,取平均值。计算各样本 ΔCT 值(目的基因 CT 值 -GAPDH CT 值)。

表 1 Real-time PCR 中应用的引物序列

Table 1 Real-time PCR Primers Sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences	产物大小 Product size
OPG	上游 5'TGGCTGAGTGTTTGGTGGAC 3'	430 bp
	下游 5'TGACAGTTTGGGAAAGTGCGGATG 3'	
RANKL	上游 5'TGATGAAAGGAGGAGCAGCA 3'	214 bp
	下游 5'GCTAATGTCCACGAAATGAGTCT 3'	
GAPDH	上游 5'GGTGAAGGTCGGAGTCAACGG 3'	200 bp
	下游 5' CCTGGAAGATGGTGATGGGATT 3'	

1.3 统计学分析

应用 SPSS16.0 对各组数据进行统计学分析。数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间采用单因素方差分析,两两比较

采用 SNK-q 检验,以 $P<0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

表 2 各组小鼠血清 OPG 及 RANKL 蛋白检测结果比较($\bar{x}\pm s$,n=10)

Table 2 Comparison of the serum OPG and RANKL protein contents between different groups($\bar{x}\pm s$,n=10)

组别 Group	OPG 蛋白浓度(pg/ml) OPG protein concentration(pg/ml)	RANKL 蛋白浓度(pg/ml) RANKL protein concentration(pg/ml)
假手术组 Sham-operated group	5.4183 $\pm$ 0.1008	4.9734 $\pm$ 0.3480
钛颗粒高剂量组 Ti particles high-dose group	4.9425 $\pm$ 0.4573*	5.9354 $\pm$ 0.1762*
钛颗粒中剂量组 Ti particles middle-dose group	5.0421 $\pm$ 0.0657*	5.6926 $\pm$ 0.1383*
钛颗粒低剂量组 Ti particles low-dose group	5.6613 $\pm$ 0.08529*	5.0896 $\pm$ 0.2681

注:*与假手术组比较, $P<0.01$ 。

Note: *compare with the sham group, $P<0.01$.

2.1 钛颗粒对小鼠外周血中 OPG 及 RANKL 蛋白表达的影响

与假手术组相比,钛颗粒低剂量组外周血中 OPG 蛋白表达显著上升($P<0.01$),RANKL 蛋白表达降低,但无统计学差异;中剂量组及高剂量组 OPG 表达显著降低 ($P<0.01$),RANKL 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。

2.2 钛颗粒对颅骨组织 OPG 及 RANKL mRNA 表达的影响

与假手术组相比,钛颗粒低剂量组颅骨组织中 OPG mRNA 表达显著上升($P<0.01$),RANKL mRNA 表达无显著差异;中剂量组及高剂量组 OPG mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$),RANKL mRNA 表达显著升高($P<0.01$)。

表 3 各组小鼠颅骨组织 OPG 及 RANKL mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Comparison of the OPG and RANKL mRNA expressions in skull tissue between different groups($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别 Group	OPG Δ CT 值 OPG Δ CT value	RANKL Δ CT 值 RANKL Δ CT value
假手术组 Sham-operated group	3.4230 $\pm$ 4.7208	-1.8440 $\pm$ 6.8028
钛颗粒高剂量组 Ti particles high-dose group	4.7266 $\pm$ 3.7415*	-5.5889 $\pm$ 3.1584*
钛颗粒中剂量组 Ti particles middle-dose group	2.7240 $\pm$ 7.8703*	-3.7806 $\pm$ 5.5352*
钛颗粒低剂量组 Ti particles low-dose group	2.4568 $\pm$ 3.8676*	-1.4207 $\pm$ 3.8371

注:* 与假手术组比较 $P<0.01$ 。

Note: *compare with the sham group, $P<0.01$.

3 讨论

假体置换术后的无菌性松动是目前人工关节使用年限降低的主要因素,其发生机制广受关注。研究认为假体被人体长时间运动磨损产生的磨损颗粒产生生物化学反应,继而形成界膜^[4],界膜上的破骨细胞由于磨损颗粒刺激机体产生活化因子而分化和被激活,进而使骨质产生减少,导致假体周围的骨发生溶解,这在无菌性松动发生的过程中至关重要^[5-7]。OPG/RANK/RANKL 是近年来被发现的参与骨溶解过程的核心信号转导系统,骨保护素(osteoprotegerin, OPG)属于肿瘤坏死因子受体超家族,是一种分泌可溶性蛋白,OPG 在细胞内以单体合成,在 N-端解离掉 21 个氨基酸后以二聚体的形式分泌到细胞外。单体半衰期较长,二聚体较短,二聚体具有比单体更强的生物活性^[8]。NF- κ B 受体活化因子配体(ligand of receptor activator of NF- κ B, RANKL) 是肿瘤坏死因子超家族的成员之一,属 II 型跨膜蛋白。RANKL 包含 3 种亚型,分别为含有 316 个氨基酸的 RANKL1, 含有 287 个氨基酸的 RANKL2 以及含有 199 个氨基酸的 RANKL3^[9]。RANKL1 和 RANKL2 同为膜结合型 RANKL(membrane-bound RANKL, mRANKL), RANKL3 又称游离型 RANKL (soluble RANKL, sRANKL), sRANKL 是在金属蛋白酶的催化下从 mRANKL 上裂解出来的细胞膜外部分^[9]。sRANKL 较 mRANKL 的生理功能强^[10,11]。该系统发挥生理作用的具体过程为,通过成骨细胞分泌产生 RANKL,与破骨细胞表面的 RANK 相结合并促使破骨细胞的成熟与分化,以提升骨吸收的活性,且能有效抑制破骨细胞消亡,发挥信号转导的作用^[12,13]。成骨细胞所分泌的 OPG 是 RANK 的诱饵受体,能达到阻止骨吸收的效果,因其能同 RANKL 竞争相结合并阻止其与 RANK 结合,从而阻断信号传导。此外,OPG 在干扰基质细胞与破骨细胞相互作用的过程中,可导致破骨细胞凋亡^[14-16]。而由于磨损颗粒的影响,RANKL 和 OPG 表达失衡,进一步使破骨细胞活性加强,发生骨溶解^[17]。

目前大多数研究金属颗粒对 OPG/RANK/RANK 系统影响的实验均为体外实验,均是金属颗粒对单一成骨细胞或者破骨细胞的影响^[18-20],这些研究存在一定的缺陷,因为在正常体内

中,骨质周围存在的各种细胞因子以及成骨-破骨体系可相互影响,保持动态平衡。而大多数体外实验无法模拟这种生理环境,仅研究金属颗粒对单一细胞的影响,没有模拟细胞周围的正常生理环境,不能体现金属颗粒在体内对 OPG/RANK/RANK 系统的真实影响,失去了成骨-破骨体系的作用,可能导致 OPG/RANK/RANK 系统更易受到外界刺激因素影响而导致失衡。

本实验为体内试验,选用小鼠颅骨作为试验对象,具有解剖表浅、周围无重要脏器组织器官、不影响小鼠日常活动、局部内环境稳定等优点,造模时未破坏骨质周围的细胞环境,完全在生理环境下研究钛颗粒对小鼠颅骨 OPG/RANK/RANK 系统的影响,考虑到了成骨-破骨体系因素及体内各个细胞因子如 IL-2/TGF 对骨代谢的影响,模拟正常骨溶解的发生过程。因 OPG/RANKL 蛋白均为细胞内合成,分泌到细胞外形成二聚体/游离单体后发挥生物活性,如采用检测提取颅骨组织中的蛋白含量作为实验结果,则最后测得蛋白浓度为细胞内外蛋白浓度的总和,并非能产生生物活性的蛋白浓度,存在一定误差,为研究钛颗粒对 OPG/RANKL/RANK 系统的影响的真实结果产生干扰,故本实验采用外周血中分离出的 OPG 二聚体及 sRANKL 蛋白浓度作为检测结果,可以避免上述误差,使实验结果更准确。研究结果显示低剂量组并未引起 OPG 基因及蛋白表达的下降,RANKL 基因及蛋白表达的上升,考虑因为本实验为体内试验,存在成骨-破骨体系的作用,OPG/RANK/RANK 系统较体外实验能在一定程度上缓冲钛颗粒对其产生的影响,该剂量的钛颗粒并不能使 OPG/RANK/RANK 系统失衡,作者认为钛颗粒首先对 OPG/RANKL 产生影响,使 OPG 基因及蛋白表达下降,之后该系统通过自身负反馈调节,使 OPG 基因及蛋白表达上升,重新达到了平衡状态,从而避免骨溶解的发生。中剂量及高剂量组可以使 OPG/RANK/RANK 系统失衡,结果显示钛颗粒可以增加 RANKL 的表达,降低 OPG 的表达,并且高剂量组对 OPG 基因及蛋白表达的抑制,对 RANKL 基因及蛋白表达的促进作用更显著。这可能是其导致骨溶解的发生和进展的重要机制,为解释金属颗粒导致假体无菌性松动提供了新的理论依据。今

后,我们可以从 OPG/RANK/RANKL 系统入手,为治疗假体无菌性松动提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] Duffy GP, Berry DJ, Rowland C, et al. Primary uncemented total hip arthroplasty in patients <40 years old: 10 to 14 year results using first generation proximally porous-coated implants [J]. J Arthroplasty, 2001, 16:140-144
- [2] Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system [J]. Endocrinology, 2001, 142(12):5050-5055
- [3] 郑芳,王宝利,张镜宇,等.改良 TRIZOL 法从矿化骨组织中提取总 RNA[J]. 天津医药, 2007, 35(10):753-754
Zheng Fang, Wang Bao-li, Zhang Jing-yu, et al. The modified method of total RAN isolation with TRIZOL reagent from mineralized skeletal tissues [J]. Tianjin: Medical Journal, 2007, 35(10):753-754
- [4] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [J]. Cell, 1997, 89(2):309-319
- [5] 樊新甫,杨凤云,董英海.人工关节置换术后的骨吸收和骨溶解[J]. 临床骨科杂志, 2006, 9(1): 92-94
Fan Xin-pu, Yang Feng-yun, Dong Ying-hai. Bone resorption and osteolysis after joint prosthesis replacement operations [J]. Journal of Clinical Orthopaedics, 2006, 9(1):92-94
- [6] Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function [J]. Nature, 1997, 390:175-179
- [7] Steven RC, Douglas CB. Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture?[J]. JAMA, 2009, 283:3255-3258
- [8] Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, et al. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 314(4):1021-1027
- [9] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease[J]. Trends Mol Med, 2011, 12(1): 17-25
- [10] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro [J]. Endocrinology, 1998, 39:1329-1337
- [11] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation [J]. Cell, 1998, 93:165-176
- [12] Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 253(2):395-400
- [13] Gie GA, Linder L, Ling RS. Impacted cancellous allografts and cement for revision total hip arthroplasty [J]. J Bone Joint Surg Br, 1993, 75(1):14-21
- [14] Morelanel JR, Bernstein ML. Femoral revision hip arthroplasty with uncemented porouscoated stems [J]. Clin Orthop Relat Res, 2001, 319(8):141-150
- [15] Zhang DW, Cheng Y, Wang NL, et al. Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts [J]. Phytomedicine, 2008, 15(1-2):55-61
- [16] He W, Li Z, Yi B, et al. Icaritin upregulated Cbfa1, bone morphogenetic protein 2 and bone morphogenetic protein 4 mRNA expression of rat osteoblasts [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2009, 38(5):59
- [17] Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement [J]. Orthod Craniofac Res, 2009, 12(2):113-119
- [18] Wang CT, Lin YT, Chiang BL, et al. Over-expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty [J]. Biomaterials, 2010, 31(1):77-82
- [19] Yan Ren, Shu-yan Han, Ping-ping Li, et al. Effects of Anastrozole Combined with Shuganjiang Decoction on Osteoblast-like Cell Proliferation, Differentiation and OPG/RANKL mRNA Expression [J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2012, 24(2):151-156. DOI:10.1007/s11670-012-0151-6
- [20] 董伟,戚孟春,邓久鹏,等.阿仑膦酸盐对成骨细胞相关基因 RANKL、OPG 表达的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(12):1695-1698
Dong Wei, Qi Meng-chun, Deng Jiu-peng, et al. Effect of alendronate on expressions of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κ B ligand in mouse osteoblasts [J]. Journal of Southern Medical University, 2012, 32(12):1695-1698
- [21] 徐祥赫,刘钊,王虹,等.杜仲对 MC3T3-E1 成骨细胞及 OPG/RANKL 比值的影响 [J]. 天津医科大学学报, 2013, 19(3):203-205, 217
Xu Xiang-he, Liu Zhao, Wang Hong, et al. Effect of eucommia cortex on the MC3T3-E1 cells and the ratio of OPG/RANKL [J]. Journal of Tianjin Medical University, 2013, 19(3):203-205, 217
- [22] 张兰,孙琳琳,丁岩,等.葡萄糖对人牙周膜成纤维细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响 [J]. 中国美容医学, 2013, 22(1):71-74
Zhang Lan, Sun Lin-lin, Ding Yan, et al. The effects of high glucose on OPG and RANKL expression in human periodontal ligament fibroblasts [J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2013, 22(1): 71-74
- [23] 宋敏,罗晓,李宁,等.淫羊藿总黄酮含药血清对成骨细胞 OPG/OPGL 基因表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4):883-886
Song Min, Luo Xiao, Li Ning, et al. Effects of Drug - containing Serum of Total Flavone of *Epimedium* on Expression of OPG/OPGL Gene Osteoblasts [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2012, 23(4):883-886
- [24] 刘盟,马玉,冯巍,等.新疆马鹿角提取物对 MC3T3-E1 成骨细胞 RANKL/OPG mRNA 表达的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6):605-609
Liu Ming, Ma Yu, Feng Wei, et al. In-vitro Effects of the Extracts from the Xinjiang Cornu Cervi Elaphi on RANKL/OPG mRNA Expression in MC3T3-E1 Osteoblasts [J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2011, 22(6):605-609