

仙灵骨葆对骨质疏松大鼠 OPG/RANK/RANKL 表达的影响 *

冯建书 付 强[△] 闫世杰 张乐明 王江泳 周晓彬 王海涛

(石家庄市第三医院骨科 河北 石家庄 050011)

摘要 目的:观察仙灵骨葆治疗骨质疏松模型大鼠后,对大鼠体内 OPG/RANKL/RANK 表达的影响。方法:卵巢摘除法建立 SD 大鼠骨质疏松模型,设立假手术组、对照组(单纯去卵巢组)、雌激素组(给予 17 β -雌二醇)和治疗组(给予仙灵骨葆)。术后 1 周开始给药,给药 12 周后检测各组大鼠股骨骨密度,ELISA 法检测血清中 OPG/RANKL 含量,RT-PCR 检测骨组织中 OPG/RANK/RANKL mRNA 表达,免疫组化检测骨组织中 RANK 的表达。结果:对照组大鼠骨密度显著低于假手术组,治疗组和雌激素组大鼠 OPG 表达显著高于对照组,RANK 及 RANKL 的表达显著低于对照组。结论:采用卵巢摘除法成功建立大鼠骨质疏松模型,仙灵骨葆可促进骨质疏松大鼠 OPG 的表达,并抑制 RANK 及 RANKL 的表达,对骨质疏松模型大鼠有治疗作用。

关键词:骨质疏松;仙灵骨葆;OPG;RANK;RANKL

中图分类号: Q95-3 R68 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2012)23-4438-04

Effect of Xianlinggubao on the Expression of OPG/RANK/RANKL in Osteoporotic Rats*

FENG Jian-shu, FU Qiang[△], YAN Shi-jie, ZHANG Le-ming, WANG Jiang-yong, ZHOU Xiao-bin, WANG Hai-tao

(Department of orthopaedic, the Third People's Hospital of Shijiazhuang city, Shijiazhuang, Hebei, 050011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the impact of Xianlinggubao treatment on OPG/RANKL/RANK expression in osteoporosis rats. **Methods:** SD rat model of osteoporosis was established by ovariectomy and divided into four groups: the sham operation group, the control group (OVX simply), the estrogen group (given 17 β -estradiol) and treatment group (given Xianlinggubao). The rats were administered one week after surgery. After 12 weeks dosing, all rats had their bone mineral density detected. The OPG/RANKL content in serum were detected by ELISA, and the OPG/RANKL/RANK mRNA expression in bone tissue were detected by RT-PCR, and the RANK expression in bone tissue were detected by immunohistochemical assay. **Results:** The bone mineral density in control group was significantly lower than the sham operation group; The OPG expression in treatment/estrogen group were significantly higher than the control group; The RANK and RANKL expression in treatment/estrogen group were significantly lower than the control group. **Conclusion:** A rat model of osteoporosis was successfully established by the ovariectomy method; Xianlinggubao can promote the expression of OPG and inhibit the expression of RANK/RANKL in osteoporosis rats. It has a therapeutic role in the rat model of osteoporosis.

Key words: Osteoporosis; Xianlinggubao; OPG; RANK; RANKL

Chinese Library Classification: Q95-3, R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)23-4438-04

前言

骨质疏松(osteoporosis, OP)是多种原因引起的,以单位体积内骨组织量减少为特点的代谢性骨病变。以骨骼疼痛、易于骨折为特征,病理解剖可见骨小梁变细、断裂、稀疏萎缩,骨皮质多孔、变薄^[1-3]。如今,骨质疏松症已经成为一种多发病和常见病,尤其是在老年人群中,严重影响他们的健康和生活质量。我国作为世界人口大国,是老年人口最多的国家,同时也是骨质疏松和潜在骨质疏松症患者最多的国家,因此研究和防治骨质疏松对我国有着非同寻常的意义^[4]。仙灵骨葆是由淫羊藿、续断、补骨脂、知母、丹参等组成的补肾壮骨的中成药,临床上

用来治疗骨质疏松取得了一定的疗效^[5],但对其具体的作用机制尚无完整的认识,为此,本研究拟探讨仙灵骨葆治疗骨质疏松模型大鼠后,对大鼠体内骨质疏松致病相关分子^[6] 护骨素(osteoprotegerin, OPG)、核因子 κ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)以及核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)表达的影响,为明确仙灵骨葆治疗骨质疏松的机制提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及药材

* 基金项目:石家庄市科技局(0512038)

作者简介:冯建书,副主任医师,研究方向:肢体创伤与修复、周围神经再生机制, E-mail: fjs_hand@sina.com

[△]通讯作者:付强

(收稿日期:2012-03-15 接受日期:2012-04-10)

健康 12 周龄雌性 SD 大鼠 40 只,体重(260± 15)g,由河北医学大学实验动物中心提供。随机分为假手术组(A 组)、卵巢切除对照组(B 组)、仙灵骨葆治疗组(C 组)以及雌激素治疗组(D 组),每组 10 只。仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司);17β-雌二醇(Sigma 公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 主要仪器和试剂 Reverse Transcription System A3500 (Promega 公司),Trizol Reagent (Promega 公司),Taq DNA Polymerase (TaKaRa 公司),大鼠核因子 κ B 受体活化因子配基 (RANKL)及大鼠骨保护素(OPG)ELISA 试剂盒(R&D 公司),兔抗大鼠 RANK 单克隆抗体(R&D 公司),ABC 免疫组化试剂盒(Bioscience 公司)。

PCR 仪 BIO-RAD mylcyder(BIO-RAD 公司),凝胶电泳仪 dyy-10c (北京六一),G-BOX 凝胶成像系统 (Gene 公司);BIO-RAD imark 酶标仪 (BIO-RAD 公司),OLYMPUS bx53 显微镜 (OLYMPUS 公司),Norland-XR 36 双能 X 线骨密度测量仪(DEXA 公司)。

1.2.2 实验方法 所有 SD 大鼠在 1%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉后,按以下方案处理,A 组:沿大鼠背侧后方髂骨嵴上 2 cm、脊柱旁 1cm 处做长约 1cm 的纵行切口,暴露腹腔,轻轻提起卵巢后放回原位,然后逐层关闭伤口,B、C、D 组:同样方法暴露腹腔并切除双侧卵巢,丝线结扎残端。各组大鼠术后,每只给予青霉素钠盐 5 万单位/天,连续 3 天,术后正常喂养 2

周,一般情况良好后开始给药。给药方案:A 组、B 组每日给予 2 mL 双蒸水灌胃,C 组根据人鼠剂量换算标准,每日按仙灵骨葆 250 mg/kg,溶于 2 mL 双蒸水形成悬浊液后灌胃,D 组将 17β-雌二醇溶于无水乙醇中,按 30 μg/kg 用微量注射器皮下注射,每日一次。

连续给药 12 周后,麻醉下心脏取血,收集血清,-70℃保存备用;处死各组大鼠,无菌采集左侧股骨头抽提总 RNA;另取右侧完整股骨标本,生理盐水冲洗后置 10% 中性甲醛固定,4℃保存备用。

1.2.3 指标测定 骨密度测定:取各组股骨标本应用双能 X 线骨密度测量仪,采用小物体扫描模式测定股骨全长骨密度(total femur bone mineral density,μBMD)。

组织学观察:将 A、B 组股骨标本节段用 10%中性甲醛缓冲固定液在 4℃下固定 48 h,10% EDTANA₂ 缓冲液脱钙,梯度乙醇脱水,二甲苯透明化,纵向石蜡包埋,5 μm 连续切片后 HE 染色,封片,镜下观察。

mRNA 表达检测:将采集到的股骨头标本钳碎,置于盛有 1mL Trizol 的研磨器中仔细研碎,孵育 5 min 后按常规方法抽提组织中的总 RNA,按照 A3500 试剂盒说明将 RNA 逆转录为 cDNA,已得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增引物见表 1。扩增后通过凝胶成像,以 β-actin 的 mRNA 为参照,计算 OPG/RANK/RANKL mRNA 的相对表达量。

表 1 OPG/RANK/RANKL PCR 引物序列及相应产物长度

Table 1 The PCR primers of OPG/RANK/RANKL and the length of corresponding products

Primers	Sequence	Amplification fragment length
OPG (+)	5'- TCCTGGCACCTACCTAATACAGCA -3'	117bp
OPG (-)	5'- CTACACTCTCGGCATTCACCTTTGG -3'	
RANK (+)	5'- ACGTGGACCCCTTGCCCCAGT -3'	161bp
RANK (-)	5'- ACTGGCCACCAGGGGAGCTT -3'	
RANKL (+)	5'- AGCCTTTCAAGGGGCGGTGC -3'	104bp
RANKL (-)	5'- GGGCCACATCGAGCCACGAA -3'	
β-actin (+)	5'-CGGGAAATCGTGC GTGACAT-3'	310bp
β-actin (-)	5'-GAAC TTTGGGGGATGCTCGC-3'	

OPG/ RANKL 蛋白表达检测:参照相关 ELISA 试剂盒说明操作,每份血清都设复孔。

RANK 蛋白表达检测:取脱钙后大鼠股骨石蜡切片,脱蜡,抗原修复后,按照免疫组化试剂盒的说明操作,结果判定标准按照即阳性细胞数比例分为级,最终结果记录将中阳性及强阳性标本记录为 MRP 蛋白表达阳性,计算阳性率。

1.3 统计学分析

所得计量数据均采用均数± 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示,用 SPSS17.0 软件处理数据,多组间均数比较采用方差分析,检验水准 α=0.05,当 P<0.05 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 骨密度及组织学切片结果

各组股骨全长骨密度检测结果见表 1,以卵巢切除对照组所测得的骨密度值最低,且与假手术组的差异具有统计学意义。雌激素治疗组所测得的骨密度值最高,但是与假手术组的差异无统计学意义,仙灵骨葆治疗组所得骨密度与假手术组和雌激素治疗组均无统计学差异。

假手术组及卵巢切除对照组股骨组织切片 HE 染色结果见图 1,假手术组骨小梁结构正常(图 1A),骨皮质致密均一(图 1B),卵巢切除对照组骨小梁结构紊乱(图 1C),骨皮质变薄,结构疏松(图 1D),以上结果提示去卵巢大鼠骨质疏松模型构建成功。

2.2 仙灵骨葆对 OPG/RANK/RANKL mRNA 表达的影响

各组股骨组织中 OPG/RANK/RANKL mRNA 的表达情况(表 3)。与假手术组相比较,卵巢切除对照组的 OPG 表达降

低、RANKL 表达增加,差异具有统计学意义,仙灵骨葆治疗组的 OPG 表达低于假手术组但高于卵巢切除对照组,RANKL 的表达高于假手术组但低于卵巢切除对照组,差异均有统计学

意义。其变化趋势与雌激素治疗组一致且仙灵骨葆治疗组与雌激素治疗组之间差异无统计学意义,RANK 的 mRNA 表达在各组之间无统计学差异。

表 2 各组给药治疗的骨密度
Table 2 The bone mineral density of each group

Groups	N	Tbmd
The sham operation group(A)	10	0.198± 0.009
The control group (OVX simply)(B)	10	0.191 ± 0.005*
Treatment group (given XLGB)(C)	10	0.196 ± 0.008
The estrogen group (given 17β-estradiol)(D)	10	0.202± 0.005

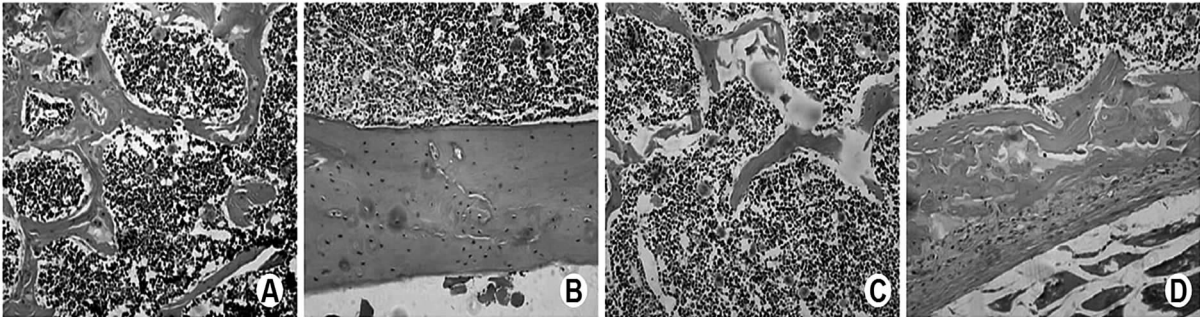


图 1 股骨石蜡切片 HE 染色结果图
Fig.1 HE staining results of femur paraffin sections

表 3 各组 OPG/RANK/RANKL 的 mRNA 表达
Table 3 The mRNA expression of OPG/RANK/RANKL in the four groups

Groups	N	OPG	RANK	RANKL
The sham operation group(A)	10	0.698± 0.013	0.368± 0.010	0.770± 0.024
The control group (OVX simply)(B)	10	0.401± 0.012*	0.416± 0.021	0.997± 0.031*
Treatment group (given XLGB)(C)	10	0.592± 0.009*#	0.389± 0.017	0.879± 0.018*#
The estrogen group (given 17β-estradiol)(D)	10	0.624± 0.005*#	0.373± 0.024	0.853± 0.025*#

注: *P<0.05 与 A 组比较 #P<0.05 与 B 组比较。
Note: *P<0.05,vs group A;#P<0.05,vs group B.

表 4 各组血清中 OPG/RANKL 蛋白的表达
Table 4 The serum expression of OPG/RANKL in the four groups

Groups	N	OPG(ng/mL)	RANKL(pg/mL)
The sham operation group(A)	10	1.54± 0.41	12.05± 6.21
The control group (OVX simply)(B)	10	0.36± 0.35*	83.01± 14.54*
Treatment group (given XLGB)(C)	10	1.59± 0.91#	26.32± 9.18*#
The estrogen group (given 17β -estradiol)(D)	10	1.64± 1.05#	25.81± 7.74*#

注: *P<0.05 与 A 组比较 #P<0.05 与 B 组比较。
Note: *P<0.05,vs group A;#P<0.05, vs group B.

2.3 仙灵骨葆对 OPG/RANK/RANKL 蛋白表达的影响

各组血清中 OPG/RANKL 的表达情况见表 4。与假手术组相比较,卵巢切除对照组血清中的 OPG 含量降低、RANKL 含量增加,差异具有统计学意义,仙灵骨葆治疗组血清中的 OPG

含量显著高于卵巢切除对照组,与假手术组、雌激素治疗组无统计学差异,仙灵骨葆治疗组血清中的 RANKL 含量高于假手术组但低于卵巢切除对照组,差异均有统计学意义,其变化趋势与雌激素治疗组一致。

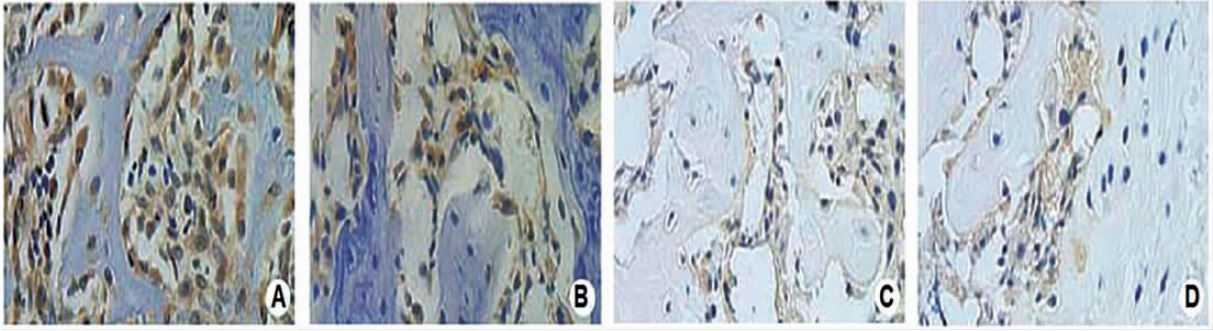


图 2 免疫组化检测 RANK 蛋白表达结果 × 400

Fig. 2 The immunohistochemical results of RANK × 400

各组骨组织中 RANK 的免疫组化检测结果见图 2。假手术组中 RANK 阳性细胞率最高(图 1A),仙灵骨葆治疗组 RANK 阳性细胞率最低(图 1C),但其差异与卵巢切除对照组(图 1B)以及雌激素治疗组(图 1D)之间无统计学差异。

3 讨论

骨质疏松的发生是一个复杂的过程,已有的研究证实,有多种刺激因素的作用和众多调节因子的参与骨质疏松的发病机制,在这些因素的相互作用和共同影响下最终导致骨质疏松的发生^[7-10]。OPG/RANKL/RANK 系统是近年来发现的与骨质疏松发生密切相关的调节系统,OPG/RANKL/RANK 系统可影响破骨细胞的功能,特别是 OPG/RANKL 比率的变化可以直接影响破骨细胞的增殖和分化,从而进一步影响骨代谢^[11-14]。OPG 的增加可抑制破骨细胞的分化,而 RANKL 的增加则会促使破骨细胞的增殖分化,且两者都通过与 RANK 结合后发挥相应生物学效应。OPG/RANKL 比率的变化是显示破骨细胞活化增殖的最直接指标,当其比率下降时则会促进破骨细胞的增殖分化,从而导致骨质疏松的发生^[15-17]。

仙灵骨葆主要由淫羊藿、补骨脂、续断、地黄等成分组成,已有的研究证实其对绝经后所引起的骨质疏松症有一定疗效^[5],同时有研究显示淫羊藿甙可以上调 OPG 的基因表达^[18],但仙灵骨葆对骨质疏松模型大鼠 OPG/RANKL/RANK 系统的全面影响尚未见报道。我们的结果显示:仙灵骨葆对骨质疏松模型大鼠具有显著的治疗效果,可在 mRNA 水平和蛋白水平促进 OPG 的表达,同时抑制 RANKL 的表达,去卵巢骨质疏松模型大鼠采用仙灵骨葆治疗后,其 OPG/RANKL/RANK 系统表达的改变与雌激素治疗组无统计学差异。

我们的结果还显示,本次研究中采用去卵巢的方法成功构建了骨质疏松大鼠模型,该方法确立较早,结果明确^[19]。除此方法之外,构建骨质疏松大鼠模型还可采用糖皮质激素造模法、维 A 酸造模法、制动造模法、甲状旁腺切除造模法等方式。本研究中所探讨的仙灵骨葆对骨质疏松的治疗作用,临床主要是应用于治疗绝经后出现骨质疏松妇女,因而选择去卵巢造模的方式更为合理。

综上,仙灵骨葆在去卵巢骨质疏松模型大鼠中具有确切的治疗作用,这种效应可能是通过改变该模型大鼠 OPG/RANKL 的表达而实现的,但仙灵骨葆调控 OPG/RANKL 表达的具体机制尚需要深入探讨。

参考文献(References)

- [1] Kanis J, Black D, Cooper C, et al. A new approach to the development of assessment guidelines for osteoporosis [J]. Osteoporosis International, 2002, 13(7): 527-536
- [2] Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis [J]. The New England journal of medicine, 1995, 332(5): 305
- [3] Kanis JA, Melton III LJ, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 1994, 9(8): 1137-1141
- [4] 王娟, 牛银波, 孔祥鹤, 等. 双膦酸盐对抗骨质疏松的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(16): 3131-3133
Wang Juan, Niu Yin-bo, Kong Xiang-he, et al. Bisphosphonates osteoporosis treatment research progress [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(16): 3131-3133
- [5] 张秀珍, 韩峻峰, 钱国峰, 等. 仙灵骨葆对 PMO 骨密度及 IL-6, TNF- α , IGF-I 的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(2): 90-93
Zhang Xiu-zhen, Han Jun-feng, Qian Guo-feng, et al. Effects of Xianling Gubao capsule on bone mineral density and cytokines in postmenopausal osteoporotic Patients [J]. Chin J Osteoporosis, 2004, 10(2): 90-93
- [6] Khosla S. Minireview: The opg/rankl/rank system [J]. Endocrinology, 2001, 142(12): 5050-5055
- [7] Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin [J]. Arthritis Research and Therapy, 2007, 9(1): 1
- [8] Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling [J]. Archives of biochemistry and biophysics, 2008, 473(2): 139-146
- [9] Simonet W, Lacey D, Dunstan C, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [J]. Cell, 1997, 89(2): 309-319
- [10] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2000, 15(1): 2-12
- [11] 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, 139(3): 1329-1337

(下转第 4437 页)

- (Br),2000,82(5):689-692
- [2] 王子明,王爱民,唐桂阳.兔人工股骨头置换后感染模型的建立及万古霉素-聚甲基丙烯酸甲酯的预防作用[J].中华创伤杂志,2002,18(11):667-670
- Wang Zi-ming, Wang Ai-min, Tang Gui-yang. Establishment of hemiprosthetic hip infection model and role of Vancocin2loaded polymethylmethacrylate in prophylaxis of infections in rabbits[J]. Chin J Traumatol,2002,18(11):667-670
- [3] 吴宇黎,王继芳,卢世璧,等.人工关节假体感染动物模型的建立[J].中华骨科杂志,1999,19:236-238
- Wu Yu-li, Wang Ji-fang, Lu Shi-bi, et al. Establishment of an Animal Model of Infected Prosthesis [J]. Chinese Journal of Orthopaedics, 1999,19:236-238
- [4] Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, et al. Infection in experimental arthroplasties[J]. Clin Orthop,1987,(224):33-36
- [5] 王子明,王爱民,唐桂阳.万古霉素-聚甲基丙烯酸甲酯在兔人工股骨头感染一期翻修中的作用[J].中国修复重建外科杂志,2006,20:634-639
- Wang Zi-ming, Wang Ai-min, Tang Gui-yang. Effect of Vancomycin-Loaded Polymethylmethacrylate on One-Stage Revision Arthroplasty in Treating Experimental Hemiprosthetic Hipinfections of Rabbits[J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery,2006,20:634-639
- [6] M agnan B, Regis D, Biscaglia R, et al. Preformed acrylic bone cement spacer loaded with antibiotics: use of two 2 stage procedure in 10 patients because of infected hips after total replacement[J]. Acta Orthop Scand,2001,72(6):591-594
- [7] Taggart T, Kerry RM, Norman P, et al. The use of vancomycin-impregnated cement beads in the management of infecti- on of prosthetic joints [J]. Bone Jo int Surg (Br),2002,84 (1):70-72
- [8] Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, et al. Infection in experimental arthroplasties[J]. Clin Orthop,1987,(224):33-36
- [9] Cremieux AC, Carbon C. Experimental models of bone and prosthetic joint infections[J]. Clin Infect Dis,1997,25:129-130
- [10] Itasaka T, Kawai A, Sato T, et al. Diagnosis of infection after total hip arthroplasty[J]. Orthop Sci,2001,6(4):320-326
- [11] Gotz F. Staphylococcus and biofilms[J]. Mol Microbiol, 2002,43(6):1367-1378
- [12] Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, et al. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty [J]. Clin Microbiol,1998,36:2932-2939
- [13] Eveillard M, Mertl P, Caliarelli B, et al. Risk of deep infection in first-intention total hip replacement. Evaluation concerning a continuous series of 790 cases[J]. Presse Med,2001,30(38):1868-1871
- [14] Konig DP, Schierholz JM, Hilgers RD, et al. In vitro adherence and accumulation of Staphylococcus epidermidis RP 62 A and taphylococcus epidermidis M7 on four different bone cements. Langenbecks Arch Surg,2001,386:328-332
- [15] Hottiger MO, Dam TN, Nickoloff BJ, et al. Liposome-mediated gene transfer into human basal cell carcinoma [J]. Gene Ther,1999,6(12):1929-1935
- [16] Kaur IP, Garg A, Singla AK, Aggarwal D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview[J]. Int J Pharm,2004,269(1):1-14
- [17] Chohfi M, Langlais F, Fourastier J, et al. Pharmacokinetics, uses, and limitations of vancomycin-loaded bone cement [J]. Int Orthop,1998,22(3):171-177
- [18] Kouri D, Gallou F, Kenzi A, et al. Thereapeutique infection a staphylocoques. [J]. Encycl Med Chir,1998,7:7-10
- [19] Gautier H, Daculsi G, Merle C. Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: in vitro characterization and micro biological activity[J]. Biomaterials,2001,22:2481-2487
- [20] Niskanen RO, Ko rkala O, Pammo H. Serum C2reactive protein levels after total hip and knee arthroplasty [J]. Bone Jo int Surg(Br), 1996,78 (3):431-433

(上接第 4441 页)

- [12] Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling [J]. Cytokine & growth factor reviews,2004,15(6):457-475
- [13] Ohazama A, Courtney JM, Sharpe P. Opg, Rank, and Rankl in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis[J]. Journal of dental research,2004,83(3):241-244
- [14] Dougall WC, Chaisson M. The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases[J]. Cancer and Metastasis Reviews,2006,25(4):541-549
- [15] Kuhn MC, Willenberg HS, Schott M, et al. Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation [J]. Molecular and Cellular Endocrinology,2011,27(6):141-149
- [16] Kuhn MC, Scherbaum WA, Schinner S. Positive effect of human adipocyte-secreted factors on human osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio in vitro [J]. Molecular and Cellular Endocrinology,2010,12 (5):569-573
- [17] Malliga DE, Wagner D, Fahrleitner-Pammer A. The role of osteoprotegerin (OPG) receptor activator for nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in cardiovascular pathology-a review [J]. WMW Wiener Medizinische Wochenschrift,2011,161(23-24):565-570
- [18] 张秀珍,杨黎娟.淫羊藿甙对大鼠成骨细胞护骨素, RANKL 表达的影响[J].中华内分泌代谢杂志,2006,22(3):222-225
- Zhang Xiu-zhen, Yang Li-juan. Icariin on rat osteoblast osteoprotegerin, affect the expression of RANKL [J]. The Chinese Journal of Endocrinology and metabolism,2006,22(3):222-225
- [19] Hodgkinson A, Aaron J, Horsman A, et al. Effect of oophorectomy and calcium deprivation on bone mass in the rat [J]. Clinical science and molecular medicine,1978,54(4):439