

密骨方对去卵巢大鼠骨折免疫炎症因子的影响

周丹丹¹ 张梓瑞² 李强³ 杜原瑗⁴ 汪学红^{1△}

[摘要] 目的:切除 Wistar 大鼠卵巢后致其股骨骨折,行内固定术建立动物模型,探讨密骨方对骨质疏松后骨折免疫炎症因子的影响。方法:将 45 只雌性 Wistar 大鼠随机分为假手术对照组(Sham)、骨质疏松骨折模型组(OVX)、骨质疏松骨折密骨方组(MGF)。模型组及密骨方组行卵巢摘除术,并在 5 个月骨折造模。密骨方组按 100 mg/(kg·d)剂量的密骨方汤剂灌胃给药,对照组和模型组给予同体积的生理盐水,1 次/d,分别在第 14,28,42 天各取 5 只断头取材,ELISA 法测定血清 TNF- α 和 Tracp 的含量,SABC 法检测骨折端 IL-6 的表达。结果:OVX 组 TNF- α ,IL-6 及 Tracp 在时间的变化上呈显著升高趋势,差异有统计学意义($P<0.05$);密骨方组中 TNF- α ,IL-6 及 Tracp 在时间的变化上呈显著下降趋势,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:中药密骨方能显著降低大鼠血清中炎症因子 TNF- α 的含量和骨折端炎症因子 IL-6 的表达,诱导 Tracp 在血清中的含量下降,促进骨质疏松后骨折愈合。

[关键词] 密骨方;骨质疏松后骨折;免疫炎症因子

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)06-0006-04

Effect of Migufang on Immune Inflammatory Cytokines in Fractures of Ovariectomized Rats

ZHOU Dandan¹ ZHANG Zirui² LI Qiang³ DU Yuanyuan⁴ WANG Xuehong^{1△}

¹ Wuhan Institute of Physical Education, Wuhan 430079, China;

² West China Medical College of Sichuan University, Chengdu 610041, China;

³ Taihe Hospital in Shiyang, Shiyang 442000, Hubei China;

⁴ Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China.

Abstract Objective: To establish the animal model of ovariectomy induced femoral fractures for internal fixation in the Wistar rats, and to explore the effect of Migufang on immune inflammatory cytokines in osteoporotic fractures. **Methods:** All 45 female Wistar rats were randomly divided into the sham operation group (sham), the osteoporotic fractures model group (OVX) and the osteoporotic fractures Migufang group (MGF). The rats of OVX group and MGF group were ovariectomized and the fractures models were established after 5 months. The rats of MGF group were given an intragastric dose of 100 mg/(kg·d) Migufang, and the sham group and OVX group were given the same volume of saline, once a day. Five rats from each group were decapitated to take material at 14 th, 28 th, and 42 th days, respectively. The levels of TNF- α and Tracp in serum were measured by ELISA methods, and the expression of IL-6 in the fractures was detected by SABC method. **Results:** The levels of TNF- α , IL-6, and Tracp in OVX group were significantly increased in the change of time ($P<0.05$), while the levels of TNF- α , IL-6, and Tracp in MGF group were significantly decreased in the change of time ($P<0.05$). **Conclusion:** MGF can significantly reduce the content of inflammatory cytokines TNF- α in the serum and the expression of inflammatory factor IL-6 in the fractures of rats, and induce the decrease of the content of Tracp in the serum to promote osteoporotic fracture healing.

Keywords: migufang; osteoporotic fractures; immune inflammatory cytokines

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2011CDB312)

武汉体育学院青年教师科研基金资助项目
(2014QZ09)

¹ 武汉体育学院(武汉,430079)

² 四川大学华西医学院

³ 十堰市太和医院

⁴ 湖北省肿瘤医院

[△]通信作者 E-mail:287615517@qq.com

骨质疏松症的严重后果是骨折,骨质疏松性骨折(Osteoporotic Fracture, OPF)存在不愈合或延迟愈合的危险,严重影响患者的身体健康与生活质量。关于促进 OPF 愈合的药物,现在临床应用和在研的促骨形成药物(甲状旁腺素片段、锶盐、甲状旁腺素相关蛋白和骨硬化素抗体)在治疗骨质疏松症的同时,具有已

被证明的或潜在的促骨折愈合作用,但使用上的不便、昂贵的价格以及其他方面的副作用,限制了其在临床上的长期使用^[1]。中医中药在促进 OPF 愈合方面的进展逐渐为医药研究者所重视^[2]。祖国传统医学认为,“肾藏精,精生髓,髓养骨”。在中医理论中,骨骼的生长发育、新陈代谢与中医的“肾”的关系非常密切。中药能在早期促进骨折处血肿机化吸收、软骨钙化、骨痂生长及外骨痂桥接,后期能促进骨痂改建,使板层骨提早出现和髓腔再通^[3]。已有研究证明灌服中药密骨方(Migufang, MGF)汤剂可提高雌激素水平以及调节其他相关因子促进骨形成,抑制骨吸收来调节骨代谢平衡^[2],该中药密骨方由华中科技大学同济医学院老年医药学研究所制备,在十多年的临床治疗中取得一定疗效。本研究模拟绝经后妇女骨质疏松后骨折,探讨密骨方对骨质疏松后骨折免疫炎症因子是否有影响,从而为日后骨质疏松性骨折在免疫机制方面的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级别 Wistar 大鼠 45 只,3 月龄雌性,体质量 260~300 g,所用动物由湖北省实验动物研究中心提供,动物合格证号 SCXK(鄂)2008-0005。

1.2 实验药物及试剂

药物密骨方:淫羊藿 15 g,杜仲 20 g,补骨脂 20 g,续断 20 g,自然铜 6 g,黄芪 30 g,天花粉 5 g,牛膝 15 g。上述中药从武汉刘有徐药店购得,以水煮醇沉法制成 1:1 浓缩药液,4℃ 冰箱保存备用(由武汉体育学院医院制剂室制备)。ELISA Rat IL-6 试剂盒(EK382-20150605),ELISA Rat TNF- α 试剂盒(EK382-20150605)及 ELISA Rat Tracp 试剂盒(p0332)均采购自联科生物技术有限公司。

1.3 实验仪器

Multiskan Mk3 型酶标仪,赛默飞世尔上海仪器有限公司;EP 管、枪头、移液枪均购自武汉鼎国生物技术有限公司;医用缝合针、线、克氏针,武汉金凯瑞生物有限公司;Olympus BX41 型显微镜,日本 Olympus 公司。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 骨质疏松骨折密骨方组(MGF 组)和骨质疏松骨折模型组(OVX 组)大鼠用 10%水合氯醛(4 mL/kg)腹腔麻醉后,在无菌条件下完整摘除双侧卵巢,参照文献^[4]中的卵巢摘除术进行制备;MGF 组和 OVX 组大鼠于卵巢切除后 5 个月均用横行开放性骨折致其右侧股骨上 1/3 处骨折,大鼠股骨干横行骨折模型。骨折模型建立:使用 10%水合氯醛对大鼠进行腹腔麻醉,切开皮肤及皮下组织,沿股外侧肌间隔钝性分离,暴露股骨干。用 5 mL 的注射器针头自股骨髁间凹插入

髓腔扩髓,然后取出注射针,以直径 1 mm 克氏针逆行插入骨折近端,用手术刀片将股骨中段至少 3 个截面切 3 个至少 1 mm 的切口,用止血钳固定靠切口的股骨近端,术者用右手拇指与食指捏住靠近切口的股骨远端,术者右手突然发力听见股骨断裂的声音,说明操作成功。然后对骨折行复位术,将克氏针顺行插入骨折远端,作者体会在开放截骨制作过程中向骨折远端插入克氏针时感觉有阻力时再向远端插入 3~5 mm,可获得相对可靠的固定。固定可靠后,剪除克氏针的多余部分,再逐层闭合切口。造模后,第 2 天继续对大鼠进行麻醉,摄患肢正侧位 X 线片(见图 1),选取骨折类型为股骨中段横行及短斜形骨折的大鼠作为实验对象。造模不合格的剔除并及时补充。

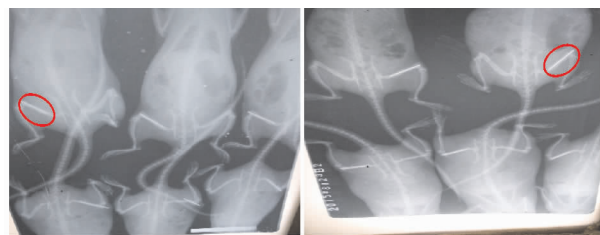


图 1 大鼠股骨骨折 X 线片

1.4.2 分组方法 45 只 3 月龄雌性 Wistar 大鼠体质量范围在 260~300 g 之间,随机分为 3 组,假手术对照组(Sham)15 只,骨质疏松骨折模型组(OVX)15 只,骨质疏松骨折密骨方组(MGF)15 只。

1.4.3 药物干预 密骨方组按 100 mg/(kg·d)剂量的中药灌胃,每周 6 次,Sham 组和 OVX 组给予同量的生理盐水,疗程为 2,4 及 6 周,术后次日开始灌药。大鼠分笼饲养,自由活动,自由摄食喂养,室温为(25±2)℃。

1.5 实验指标测定

术后第 14,28,42 天,每组随机选取 5 只大鼠,经水合氯醛麻醉后,剪尾取静脉血,离心,取血清备检。大鼠血清中炎症因子 TNF- α 含量检测采用 ELISA 法,骨折端的炎症因子 IL-6 检测采用 SABC 法,Tracp 含量检测采用 ELISA 法。

1.6 统计学方法

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS16.0 统计软件和 SAS 统计软件分析。实验前后用配对样本 t 检验,组间采用方差分析进行两两比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血清中 TNF- α 含量变化

模型组大鼠血清 TNF- α 浓度在第 4 及第 6 周均呈升高趋势,对照组大鼠血清 TNF- α 浓度在第 4 及第 6 周均呈升高趋势,密骨方组大鼠血清 TNF- α 浓度呈降低趋势,在第 2 周时密骨方组大鼠血清 TNF- α 浓度达

最高,在第 4 及第 6 周时间段总体比较是密骨方组<对照组<模型组,密骨方组与模型组在第 4 及第 6 周时间段比较差异有统计学意义,对照组和模型组在各个相同时间段比较差异有统计学意义。具体含量见表 1。

表 1 各组大鼠血清 TNF-α 含量比较 (x±s,ng/mL)

组别	鼠数	第 2 周	第 4 周	第 6 周
模型组	15	32.11±2.31	34.83±2.77	35.16±2.19
对照组	15	29.29±1.62	33.46±2.49	34.84±2.01
密骨方组	15	32.28±0.84	25.76±1.51 ¹⁾	20.46±2.20 ¹⁾

注:与同期 OVX 组比较;1) $P<0.01$;第 2 周时,Sham 组与同期 OVX 组比较 $P=0.06$, $t=2.24$,MGF 组与同期 OVX 组比较 $P=0.88$, $t=0.16$,差异均无统计学意义;第 4 周时,Sham 组与同期 OVX 组比较 $P=0.44$, $t=0.82$,差异无统计学意义,MGF 组与同期 OVX 组比较 $P=0.006$, $t=4.23$,差异有统计学意义;第 6 周时,Sham 组与同期 OVX 组比较 $P=0.82$, $t=0.24$,差异无统计学意义,MGF 组与同期 OVX 组比较 $P=0.001$, $t=6.44$,差异有统计学意义。

2.2 大鼠血清中 Tracp 含量变化

模型组和对照组大鼠血清 Tracp 浓度在第 4 及第 6 周均有先升高后降低趋势,而密骨方组均有下降趋势。各个相同时间段对照组、密骨方组与模型组大鼠血清 Tracp 浓度比较:第 2 周时,对照组与模型组比较差异有统计学意义;第 4 周时密骨方组与模型组比较差异有统计学意义;第 6 周时,密骨方组、对照组与模型组比较差异有统计学意义。具体含量见表 2。

表 2 各组大鼠血清中 Tracp 含量比较 (x±s,pg/L)

组别	鼠数	第 2 周	第 4 周	第 6 周
模型组	15	2 394.91±111.94	2 462.99±92.26	2 360.03±108.06
对照组	15	2 225.30±100.17 ¹⁾	2 359.21±157.49	2 137.57±100.13 ¹⁾
密骨方组	15	2 504.10±303.08	1 235.44±149.53 ²⁾	949.03±114.86 ²⁾

注:Sham 组、MGF 组与 OVX 组比较;1) $P<0.05$,2) $P<0.01$;第 2 周时,Sham 组与同期 OVX 组比较 $P=0.036$, $t=2.525$,差异有统计学意义,MGF 组与同期 OVX 组比较 $P=0.471$, $t=0.756$,差异无统计学意义;第 4 周时,Sham 组与同期 OVX 组比较 $P=0.239$, $t=1.271$,差异无统计学意义,MGF 组与同期 OVX 组比较 $P=0.001$, $t=13.623$,差异有统计学意义;第 6 周时,Sham 组与同期 OVX 组比较 $P=0.01$, $t=3.377$,差异有统计学意义,MGF 组与同期 OVX 组比较 $P=0.000$, $t=18.006$,差异有统计学意义。

2.3 大鼠骨折端 IL-6 表达的检测结果

对照组和密骨方组在时间的变化上呈显著减弱趋势($P>0.05$),模型组 IL-6 骨折端的表达在时间的变化上呈显著升高趋势($P<0.05$);第 4 周和第 6 周时,密骨方组与模型组、对照组比较差异有统计学意义。具体内容见表 3 及图 2~7。

表 3 骨折后不同时间 IL-6 免疫组化图像分析阳性细胞 IOD 值

组别	鼠数	第 2 周	第 4 周	第 6 周
模型组	15	0.266 2±0.048 97	0.277 5±0.044 06 ¹⁾	0.288 1±0.024 84 ¹⁾
对照组	15	0.281 6±0.041 13 ²⁾	0.281 1±0.040 62	0.268 2±0.048 23 ¹⁾
密骨方组	15	0.287 5±0.008 52 ²⁾	0.271 1±0.047 39 ¹⁾²⁾	0.255 7±0.050 29 ¹⁾²⁾

注:1)组内比较, $P<0.05$;2)组间比较, $P<0.05$;密骨方组三个阶段, $F=452.590$, $P<0.01$,差异有统计学意义;模型组三个阶段, $F=3.782$, $P=0.023$,差异有统计学意义;第 2 周时,Sham 组与同期 OVX 组比较 $P=0.04$, $t=2.942$,差异有统计学意义,MGF 组与同期 OVX 组比较 $P=0.032$, $t=3.128$,差异有统计学意义;第 4 周时,MGF 组与同期 OVX 组比较 $P=0.046$, $t=1.271$,差异有统计学意义;第 6 周时,MGF 组与同期 OVX 组比较 $P=0.0256$, $t=1.142$,差异有统计学意义。

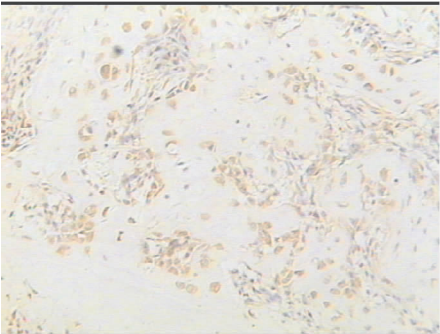
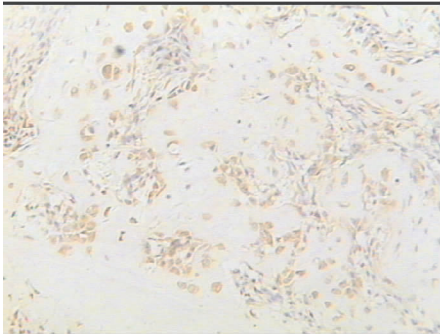
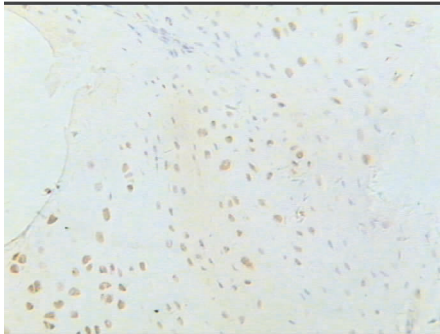


图 2 OVX 组第 2 周 低表达(×1 000) 图 3 MGF 组第 2 周 广泛高表达(×1 000) 图 4 OVX 组第 4 周 广泛表达,强度较第 2 周强(×1 000)

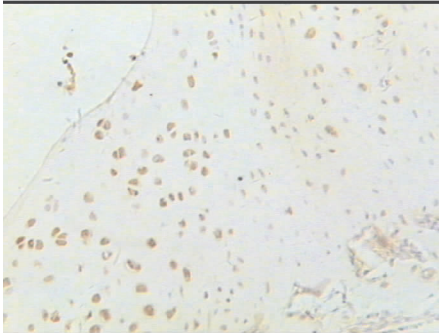


图 5 MGF 组第 2 周 广泛高表达($\times 1\ 000$)

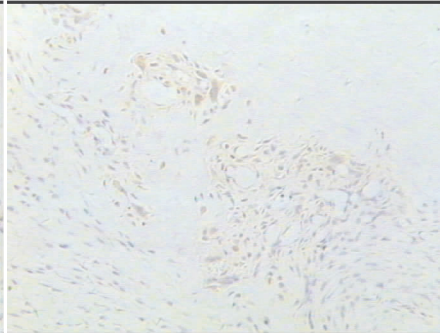


图 6 OVX 组第 6 周 广泛表达,强度较第 4 周强($\times 1\ 000$)

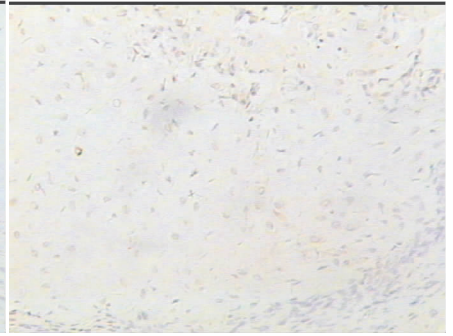


图 7 MGF 组第 6 周 广泛阳性表达($\times 1\ 000$)

3 讨论

骨质疏松是导致老年人发生骨折的主要原因,其发生骨折的部位在很短的时间就会产生炎症反应。骨折可以刺激细胞释放多种因子,如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素-6、白细胞介素-10 等,是老年患者发生髌部骨折以后死亡率高的主要因素^[5]。在此过程中免疫系统的细胞,如 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞或树突细胞,被活化并产生炎症细胞因子,在骨免疫中起重要的介质作用。白介素-6(IL-6)主要由免疫细胞、内皮细胞及纤维母细胞等产生^[6],与肿瘤坏死因子(TNF- α)均属于免疫系统炎症因子。肿瘤坏死因子 α 是由单核-巨噬细胞、内皮细胞及淋巴细胞等产生的细胞因子,具有广泛的生物活性,可以加速骨吸收、促进骨相关细胞凋亡,同时增强破骨细胞的增殖和分化^[7]。IL-6 提高破骨细胞的活性,并抑制其凋亡,通过骨保护素/破骨细胞分化因子系统增强破骨细胞的能力,提高骨丢失量^[8]。TNF- α 和 IL-6 共同提高破骨细胞的活性,加速骨吸收进程,抑制破骨细胞的凋亡,促进成骨细胞的凋亡^[9-11]。也有研究表明,在卵巢切除的小鼠的骨髓中和绝经后妇女的外周血细胞培养基中发现 TNF 水平升高^[12]。有研究表明,髌部骨折患者取其静脉血发现 TNF- α 及 IL-6 大量释放^[5]。抗酒石酸酸性磷酸酶(Tracp)是破骨细胞分化成熟与否的标志性产物,本实验中 MGF 组大鼠血清中的 TNF- α 、Tracp 水平较 OVX 组和 Sham 组均有显著降低趋势;在第 4 周与第 6 周 MGF 组在大鼠骨折端的 IL-6 的表达结果显著低于 OVX 组和 Sham 组。显示此方能够明显降低骨质疏松后骨折愈合期间炎症因子 TNF- α 和 IL-6,通过整体调节免疫系统来降低 Tracp 水平。

中药密骨方是滋阴药与助阳药互伍,肾阴和肾阳兼补。现代药理学研究表明,中药密骨方中大多数中药成分均具有抗骨质疏松、促进骨折愈合的功效。实验研究显示,淫羊藿、骨碎补等中药或其提取物对干细胞具有促进增殖、诱导迁移及向成骨或成血管分化的作用^[13]。动物体内实验研究也初步显示淫羊藿有效部位能够促进实验性骨质疏松性骨折的修复^[13]。张

皓源等^[14]运用中药汤剂治疗骨质疏松性髌部骨折,方药主要以羊藿叶、骨碎补、补骨脂以补肾阳、强筋骨;以黄芪补中益气,黄芪作为补气要药,不仅可以使机体性激素水平提高,也可促进成骨细胞、抑制破骨细胞以及使机体微量元素的含量提高来治疗骨质疏松症^[15]。杜原瑗等研究发现:牛膝竹节参皂苷与杜仲松脂醇二葡萄糖苷联合应用可通过促进骨的形成与转化,增强成骨细胞活性和抑制破骨细胞的分化等机制有利于 OPF 骨折的愈合^[16]。石大玲等研究表明补肾中药密骨方可明显改善骨质疏松性骨折的症状,具有抑制骨丢失、促进骨合成和加速骨折愈合的功能^[2]。本研究表明,中药密骨方能降低 Tracp 水平、调节破骨细胞对骨基质吸收及胶原蛋白的转化来影响破骨细胞的功能,加速骨吸收进程^[17,18],并通过降低炎症因子 IL-6 及 TNF- α 含量从而抑制破骨细胞的活性,促进骨质疏松后骨折愈合,增强机体免疫力,但其具体机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 辛力,林华.促骨形成药物干预骨质疏松性骨折临床研究进展[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2017,10(1):72-78.
- [2] 石大玲,汪学红,姜婷,等.密骨方对去势大鼠所致骨质疏松性骨折白细胞介素-1 的影响[J].中华实验外科杂志,2012,29(7):1254-1256.
- [3] 温晋华.中西医结合治疗创伤骨折的临床效果[J].深圳中西医结合杂志,2016,26(23):24-26.
- [4] 汪学红,周保军.骨质疏松后骨折实验动物模型的建立[J].湖北中医学院学报,2010,12(6):21-23.
- [5] 李铭夫.髌部骨折患者围手术期静脉血 TNF- α 、IL-2 及 IL-6 表达[J].中国民康医学,2015,27(19):66-68.
- [6] Mozzati M, Martinasso G, Maggiora M, et al. Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid[J]. Clin Oral Investig, 2013, 17(4):1259-1266.

- complication rates for the lateral extensile approach for calcaneal ORIF when the lateral calcaneal artery is patent [J]. *Foot Ankle Int*, 2014, 35(7):650-656.
- [5] Manouk Backes, Tim Schepers M, Suzan H, et al. Wound-infections following open reduction and internal fixation of calcaneal fractures with an extended lateral approach[J]. *Int Orthop*, 2014, 38(4):767-773.
- [6] Veltman ES, Doornberg JN, Stufkens SA, et al. Long-term outcomes of 1730 calcaneal fractures: systematic review of the literature[J]. *Foot Ankle Surg*, 2013, 52(4):486-490.
- [7] Harvey EJ, Grujic L, Early JS, et al. Morbidity associated with ORIF of intra-articular calcaneus fractures using a lateral approach[J]. *Foot Ankle Int*, 2001, 22(11):868-873.
- [8] 申建军, 冯康虎, 王久夏. 外侧横弧形切口与 L 形切口在跟骨粉碎骨折内固定治疗中的疗效比较[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2015, 23(12):25-28.
- [9] 黄国伟, 姜雪峰, 周小建, 等. 改良跟骨钢板经跗骨窦入路治疗 Sanders II、III 型跟骨骨折[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2014, 16(12):1038-1042.
- [10] 祝海炳, 李哲民, 施忠民, 等. 小切口微型锁定钢板与传统切口钢板内固定治疗跟骨关节内骨折的对照研究[J]. *浙江医学*, 2014(1):19-22.
- [11] 李来峰, 王辉, 赵仪云, 等. 跗骨窦切口联合经皮置钉技术微创治疗 Sanders III 型跟骨骨折[J]. *中国矫形外科杂志*, 2015, 23(20):1850-1853.
- [12] 邹剑, 章曄, 张长青, 等. 跟骨骨折切开复位内固定术后伤口并发症的临床分析[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2006, 8(7):647-649.
- [13] 李灿杨, 吴征杰, 潘志雄. 撬拨复位闭合穿针和切开复位钢板固定治疗跟骨骨折的临床研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2013, 21(2):18-20.
- [14] 张志海, 罗毅文, 王斌, 等. 钢板内固定配合中药熏洗治疗跟骨关节内骨折的临床研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2011, 19(5):22-24.
- [15] 朱敏, 尹宏, 余友映, 等. 跟骨钛板配合中医药治疗跟骨距下关节内骨折[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2008, 16(12):39-40.
- [16] 李伯州, 胡牧, 徐向阳, 等. 跗骨窦入路治疗 Sanders III 型跟骨关节内骨折[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2014, 16(12):1043-1048.
- [17] Longino D, Buckley RE. Bone graft in the operative treatment of displaced intraarticular calcaneal fractures: is it helpful? [J]. *Orthop Trauma*, 2001, 15(4):280-286.

(收稿日期:2016-10-08)

(上接第 9 页)

- [7] Qian H, Yuan H, Wang J, et al. A monoclonal antibody ameliorates local inflammation and osteoporosis by targeting TNF- α and RANKL[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(2):370-376.
- [8] Wang Y, Yang C, Xie WL, et al. Puerarin concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL) and interleukin-6 production in human osteoblastic MG-63 cells[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(8-9):1032-1036.
- [9] Vijayan V, Khandelwal M, Manglani K, et al. Homocysteine alters the osteoprotegerin/RANKL system in the osteoblast to promote bone loss: pivotal role of the redox regulator forkhead O1[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 61:72-84.
- [10] Martinez-Calatrava MJ, Prieto-Potin I, Roman-Bias JA, et al. RANKL synthesized by articular chondrocytes contributes to juxta-articular bone loss in chronic arthritis[J]. *Res Ther*, 2012, 14(3):R149.
- [11] Yu H, Herbert BA, Valerio M, et al. FTY720 inhibited proinflammatory cytokine release and osteoclastogenesis induced by aggregatibacter actinomycetemcomitans [J]. *Lipids Health Dis*, 2015, 14(6):66.
- [12] D'amelio P, Grimaldi A, Di Bella S, et al. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis [J]. *Bone*, 2008, 43(1):92-100.
- [13] 庞坚, 王翔, 陈元川, 等. 中药治疗骨质疏松性骨折的组方用药研究[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(1):238-239.
- [14] 张皓源, 杨鹤祥. 中医药防治老年骨质疏松性骨折研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(9):117-119.
- [15] 沈桂英. 保妇康栓防治老年性阴道炎的临床研究[J]. *中医学报*, 2013, 28(3):429-430.
- [16] 杜原瑗, 陈蹇虎, 贾绍辉, 等. 牛膝竹节参皂苷与杜仲松脂醇二葡萄糖苷联合治疗骨质疏松性骨折的实验研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2015, 23(6):9-13.
- [17] Chipoy C, Brounais B, Trichet V, et al. Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53[J]. *Oncogene*, 2007, 26(46):6653-6664.
- [18] Choi J, Choi SY, Lee SY, et al. Caffeine enhances osteoclast differentiation and maturation through p38 MAP kinase/Mitf and DC-STAMP/CtsK and TRAP pathway [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5):1222-1227.

(收稿日期:2016-03-15)