

温肾强骨丸治疗脾肾阳虚型骨质疏松症模型大鼠的药效学研究

王雨榕¹, 邓强², 李中锋², 彭冉东², 李军杰¹, 徐浩军¹(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730030; 2. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: **目的** 观察温肾强骨丸对脾肾阳虚型骨质疏松症模型大鼠的影响。**方法** 采用去势(切除大鼠卵巢)+注射氢化可的松+番泻叶灌胃+饮食失节+劳倦过度方法联合制备脾肾阳虚型骨质疏松症大鼠模型, 模型复制成功后给予温肾强骨丸连续灌胃 8 周。给药期间, 观察并记录大鼠一般情况及体质量、肛温的变化; 检测大鼠脾、肾、子宫等脏器指数; 检测大鼠骨密度、骨生物力学; 检测血清中抗酒石酸碱性磷酸酶(TRAP)、大鼠尿 I 型胶原交联 N 末端肽(U-NTX)、骨碱性磷酸酶(BALP)、雌二醇(E2)、尿型胶原交联 C 末端肽(U-CTX)、骨钙蛋白(BGP)等骨转化指标; 观察并分析椎体 HE 染色结果。**结果** 温肾强骨丸能明显改善模型大鼠一般状态, 增加饮水量, 升高体质量、肛温, 明显缓解畏寒、便溏等脾肾阳虚症状; 增加模型组大鼠股骨、脊柱骨密度($P < 0.05$), 增强股骨骨生物力学($P < 0.05$); 增高血清 BALP、E2 水平($P < 0.05$), 降低血清 BGP、TRAP、U-NTX、U-CTX 水平($P < 0.05$); 增加皮质骨面积百分比、骨小梁平均厚度、骨小梁面积、骨小梁体积($P < 0.05$)。**结论** 温肾强骨丸可明显改善大鼠脾肾阳虚症状, 增加大鼠骨密度、骨生物力学, 升高血清 BALP、E2 水平, 降低血清 BGP、TRAP、U-NTX、U-CTX 水平, 增加皮质骨面积百分比、骨小梁平均厚度、骨小梁面积、骨小梁体积, 从而治疗脾肾阳虚型骨质疏松症。

关键词: 温肾强骨丸; 脾肾阳虚; 骨质疏松症; 骨密度; 骨生物力学; 药效学; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)03-0357-08

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2021.03.009

Study on the Pharmacodynamics of Wenshen Qianggu Pills in the Treatment of Osteoporosis Rats with Yang Deficiency of Spleen and Kidney

WANG Yurong¹, DENG Qiang², LI Zhongfeng², PENG Randong², LI Junjie¹, XU Haojun¹(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030 Gansu, China; 2. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050 Gansu, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Wenshen Qianggu pills on osteoporosis model rats with spleen and kidney Yang deficiency. **Methods** Rat models of osteoporosis with spleen and kidney Yang deficiency were prepared by castrating (removing ovaries of rats) + injecting hydrocortisone + lavaging with senna leaves + incontinence of diet + overwork. After the models were established, the Wenshen Qianggu group of rats were treated with the drug by gavage for consecutive 8 days. During administration, the general condition, body weight and anal temperature of the rats were observed and recorded. Indexes of spleen, kidney, uterus and other organs were measured. Bone density and bone biomechanics were also measured. In addition, resistance of tartaric acid in serum alkaline phosphatase (TRAP), the rat urine I type collagen cross-linking N terminal peptide (U-NTX), bone alkaline phosphatase (BALP), estradiol (E2), urine type collagen cross-linking C terminal peptide (U-CTX), osteocalcin (BGP), and other bone transformation indicator were detected. The results of HE staining of vertebral body were observed and analyzed. **Results** Wenshen Qianggu pills can obviously improve the general state of the model rats, increase the amount of food, increase body mass and anus temperature, and obviously relieve the symptoms of

收稿日期: 2020-07-20

作者简介: 王雨榕, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药治疗骨伤科疾病。Email: 1784273606@qq.com。通信作者: 邓强, 男, 主任医师, 研究方向: 中医骨伤。Email: dengqiang11576@sohu.com。

基金项目: 兰州市人才创新创业项目(2017-RC-44); 白求恩·脊柱病理性骨折椎体强化治疗专项基金(BK-JP2018004)。

spleen-kidney Yang deficiency, such as fear of cold and loose stool. Bone density of femur and spine in the model group was increased ($P < 0.05$), and biomechanics of femur was enhanced ($P < 0.05$). Serum BALP and E2 levels were increased ($P < 0.05$), and serum BGP, TRAP, U-NTX and U-CTX levels were decreased ($P < 0.05$). The percentage of cortical bone area, average thickness of trabecular bone, trabecular bone area and trabecular bone volume were increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Wenshen Qianggu pills can obviously improve the symptoms of spleen and kidney Yang deficiency rats, increase the rat bone mineral density, bone biomechanics, elevated serum BALP, E2 levels, reduce serum BGP, TRAP, U-NTX, U-CTX level, increase the percentage of cortical bone area, average thickness of trabecular bone, trabecular bone area and trabecular bone volume, and be used to treat spleen and kidney Yang deficiency type osteoporosis.

Keywords: Wenshen Qianggu pills; spleen-kidney Yang deficiency; osteoporosis; bone density; bone biomechanics; pharmacodynamics; rats

骨质疏松症是目前老年性人群主要罹患的疾病之一,可直接引起骨折,严重影响老年人的生活质量。本病属中医学“骨痿”“骨枯”等概念范畴,主要与肾、肝、脾三脏功能有关,其中肾精亏虚是其发病的基本病机。西医学治疗方法较为单一,中医药防治骨质疏松症具有独特的优势,近年多数医家从温补脾肾入手治疗本病取得了良好的疗效^[1-2]。

温肾强骨丸为甘肃省中医院脊柱骨二科经验方药,由淫羊藿、骨碎补、枸杞子和丹参等中药组成,具有温肾强骨、活血通络之功效。骨质疏松症和脾肾阳虚中医证型的模型复制方法种类多样。骨质疏松症的模型复制方法主要有去势型、药物诱导型、失用诱导型、饮食诱导型、基因敲除型、自然退变型等^[3],其中,去势法具有模型稳定、可操作性强、可信度高、经济适用等特点,被广泛应用。肾阳虚的模型复制方法有注射氢化可的松、灌胃腺嘌呤、切除性腺等^[4];脾阳虚的复制方法则主要包括番泻叶或大黄灌胃、饮食失节、劳倦过度等^[5]。本研究采用去势(切除大鼠卵巢)+注射氢化可的松+番泻叶灌胃+饮食失节+劳倦过度法联合制备脾肾阳虚型骨质疏松症大鼠模型^[6-9],通过观察各组实验大鼠一般情况、体质量、肛温、脏器指数、骨密度、骨生物学及骨转化指标等的变化,研究温肾强骨丸对脾肾阳虚型骨质疏松症大鼠的防治作用,为其临床广泛应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 SD大鼠,雌性,SPF级,7周龄,体质量(220±20)g,甘肃中医药大学 SPF 级实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(甘)2015-0005。动物饲养于甘肃中医药大学动物实验中心(SPF级)。普通大

鼠颗粒饲料喂养,饮用水为高压灭菌的自来水,环境温度控制为 19℃~27℃,光照时间为 7:00 AM~7:00 PM,暗室时间为 7:00 PM~7:00 AM,空气湿度为 45%~65%之间。本实验遵守国家健康与医学研究委员会(NHNR)动物道德准则,并经甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 番泻叶,购自甘肃省中医院中药药房,在甘肃中医药大学中药前处理实验室制备为 100%水煎液。温肾强骨丸,组方为:当归、川芎、白术、牛膝、香附、羌活、党参、煅牡蛎、熟地黄、杜仲、没药、红花、淫羊藿、甘草、续断、骨碎补、桂枝,为甘肃省中医院院内制剂,批号:Z20200442000。阿仑膦酸钠,杭州默沙东制药有限公司,国药准字:J20130085;氢化可的松注射液(2 mL:10 mg),紫光古汉集团衡阳制药有限公司,国药准字:H43021210;甘蓝、精炼猪油自备,蒸馏水、生理盐水、10%水合氯醛、4%多聚甲醛、苦味酸等,均由甘肃中医药大学实验中心提供。抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)试剂盒、大鼠尿 I 型胶原交联 N 末端肽(U-NTX)试剂盒、骨碱性磷酸酶(BALP)试剂盒、雌二醇(E2)试剂盒、尿型胶原交联 C 末端肽(U-CTX)试剂盒、骨钙蛋白(BGP)试剂盒、均购自江苏菲亚生物科技有限公司,批号:1907R。

1.3 仪器 L600 型台式离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;Benchmark aaPlus 连续波长酶标仪,美国 BIO-RAD 公司;Q5000 紫外分光光度计,北京鼎国昌盛生物技术有限公司;DK-S26 电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;NW10VF 超纯水系统,力康生物医疗科技控股有限公司;Prodigy 双能 X 线骨密度检测仪,美国 GE 公司;AG-X 系列台式电子万能试验机,日本岛津公司;

SP1600 硬组织切片机, 德国 LEICA 公司。

1.4 分组、模型复制及给药方法

1.4.1 分组及模型复制 本实验将大鼠适应性饲养后随机分为空白对照组, 假手术组, 模型组, 温肾强骨丸高、中、低剂量组, 西药组。

除空白对照组和假手术组外, 其余各组大鼠采取: 去势法(切除雌性 SD 大鼠双侧卵巢)+注射氢化可的松+番泻叶灌胃+饮食失节+劳倦过度, 进行模型复制。大鼠禁食 12 h 后腹腔注射 10 %水合氯醛($0.3 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$), 麻醉起效后剔除两侧腹部皮毛, 用 75 %酒精消毒, 在双侧肋下 1~1.5 cm 处纵形切开入腹, 结扎双侧卵巢动脉, 切除双侧卵巢及周围脂肪, 逐层缝合^[10]。假手术组只暴露双侧卵巢, 不做切除。去势术后第 2 天, 每日上午 9:00 用 100%番泻叶水煎液灌胃(每只 2 mL), 空白对照组与假手术组给予等量生理盐水灌胃; 每日下午 3:00, 将大鼠置于 38 ℃ 恒温水浴中游泳至疲劳(疲劳标准为全身下沉至没颈, 不能坚持游泳); 单日每只喂饲甘蓝 10 g, 双日每只喂精猪脂 2 mL, 空白对照组与假手术组予以普通鼠粮, 期间各组均自由饮水^[11]。大鼠术后第 1 周开始肌肉注射氢化可的松注射液 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 空白对照组与假手术组肌注等量生理盐水, 每周 4 次, 共 8 周。

1.4.2 模型复制成功的标志 病证结合动物模型, 指的是以中医学理论为指导, 根据现代学科理论和相关实验动物科学知识, 利用现代医学复制疾病到动物身上, 再利用病因等因素复制中医的“证”到动物模型上^[12]。现代医学“病”的模型的诊断标准依据经典的实验室评价指标, 比较成熟客观; 在中医“证”层面上的评价方法及指标, 目前主要采取四诊信息、方证相应、实验室指标 3 个方面对模型“证”进行评价^[13]。四诊信息包括问诊、望诊、闻诊、切诊, 将从理论研究和临床研究中总结到的能体现“证”的特点的指标, 嫁接到病证结合动物模型评价上面, 并参考诸如动物脱毛、心跳、易怒等四诊信息来进行评定。方证相应是通过结合病因、证候及中药反佐证明的方法评定所建立的病“证”结合动物模型是否成功。当前病证结合动物模型的评定多为病理学、免疫学及生化指标等方面^[14]。

以上述评价方法为基础, 本实验通过一般活动, 体质量、肛温, 脾、肾、子宫等脏器指数, 骨密度、骨生物力学, 骨代谢指标及椎体 HE 染色来评价骨质疏松症模型复制是否成功。模型复制成功后,

大鼠会出现毛发无泽、掉毛, 喜扎堆, 食少便溏, 体质量减轻, 肛温下降等脾肾阳虚现象; 病理学表现为: 脾、肾等脏器水肿, 骨密度下降, 骨生物力学降低, BALP、E2 等骨形成指标均增高, BGP、TRAP、U-NTX、U-CTX 等骨代谢指标含量均下降。

1.4.3 给药方法 模型复制 8 周, 各组确定骨质疏松动物模型成功后分组进行灌胃给药治疗。温肾强骨丸高、中、低剂量组按人、鼠体型系数折算为成人等效剂量, 生药含量分别为 1.72 、 0.86 、 $0.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 并以每千克体质量 20 mL 的蒸馏水稀释, 制成混悬液予相应组灌胃, 每日 1 次; 空白对照组、假手术组和模型对照组以等剂量生理盐水灌胃; 西药组按人、鼠等效剂量给予阿仑膦酸钠, 每周 1 次, 每次 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 持续灌胃 8 周。

1.5 大鼠的一般状态及体质量和肛温变化 每日观察各组大鼠的一般状态, 并纪录大鼠形态、毛发、爪甲颜色、生活习性、进食饮水量、粪便状态等变化。模型复制的第 1、2、3、4、5、6、7 周, 各组大鼠称体质量、测肛温。

1.6 大鼠脏器指数及血清骨代谢指标检测 所有动物用药干预 8 周后, 禁食水 12 h, 腹腔麻醉后心脏取血 4 mL, 离心后收集血清; 取大鼠脾脏、右侧肾脏和子宫等脏器, 称质量计算脏器指数。脏器指数=脏器质量(mg)/动物体质量(g)×100%。按照试剂盒说明书, 运用酶联免疫吸附法检测大鼠血清中 TRAP、U-NTX、BALP、E2、U-CTX、BGP 等骨转化指标, 其质量浓度按说明制作各自标准曲线, 计算出样品中的含量。

1.7 大鼠骨密度、骨生物力学检测 将大鼠麻醉后置于双能 X 线骨密度仪下, 分别检测股骨及脊柱骨密度。将大鼠麻醉后取大鼠右侧股骨, 剥离周围肌肉组织, 用生理盐水纱布包裹后冻存于 -20°C 冰箱。应用万能材料试验机, 分别进行股骨三点弯曲试验: 将冻存的右股骨自然解冻后置于 AG-IS 生物力学万能试验机上, 跨距 14 mm, 加载速度 $10 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$, 计算机记录载荷变形曲线及最大载荷、弹性模量。

1.8 椎体 HE 染色 将第 5 腰椎于 4 %多聚甲醛中固定 24 h 后, 在 10 %的 EDTA 溶液中脱钙 4 周, 平行于椎板, 将椎体切成两半, 并进行石蜡包埋, 获得 $4 \mu\text{m}$ 厚的切片。将其固定在聚赖氨酸处理的抗脱落载玻片上, 脱蜡并用苏木精和伊红(HE)染色, 然后在光学显微镜下观察^[15]。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS 26.0 统计软件处

理, 计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况 模型复制期间, 第 1~3 周, 各组大鼠一般状态基本无差异; 第 4 周, 模型组大鼠活动较空白对照组及假手术组减少, 开始出现毛发无光泽、掉毛现象, 爪甲颜色变浅, 大便较稀软; 第 5 周, 模型组大鼠出现大便清稀, 甚者如水状, 爪甲颜色变淡, 毛发枯萎无华, 尾巴凉, 弓背倦怠, 喜扎堆; 第 6~8 周, 模型组大鼠上述状态较第 5 周更甚, 且饮食、饮水量明显低于空白对照组, 游泳持续时间为空白对照组 1/2, 表明模型组大鼠的体力、能量代谢较正常大鼠及假手术大鼠降低。

温肾强骨丸干预后, 第 1~2 周, 与模型组比较, 温肾强骨丸各剂量组基本无明显差异; 第 3~4 周, 温肾强骨丸各剂量组活动较模型组比较明显增多, 掉毛明显减少, 扎堆现象有所改善, 大便仍清稀; 第 4~6 周, 温肾强骨丸各组大鼠无扎堆现象, 毛发色泽明显改善, 尾巴温度恢复正常, 大便稀软但成形, 大便量较多; 第 7~8 周, 与模型组比

较, 温肾强骨丸各组大便质地恢复, 无便溏症状, 饮食、饮水量恢复正常, 活动明显增多, 脾肾阳虚症状明显改善。

2.2 体质量及肛温变化 从给药后第 2 周开始, 与空白对照组比较, 模型组大鼠体质量减轻($P < 0.05$), 差异有统计学意义; 与假手术组比较, 模型组体质量减轻($P < 0.05$), 差异有统计学意义。温肾强骨丸干预后, 与模型组比较, 从给药后第 2 周开始, 温肾强骨丸各剂量组与西药组体质量明显增加($P < 0.05$), 差异有统计学意义。与低剂量组比较, 温肾强骨丸高剂量组体质量增加不明显($P > .05$), 差异无统计学意义。见表 1。

与空白对照组比较, 模型组大鼠肛温明显下降($P < 0.05$), 差异有统计学意义。与假手术组比较, 模型组大鼠肛温明显下降($P < 0.05$), 差异有统计学意义。温肾强骨丸干预后, 与模型组比较, 温肾强骨丸各组与西药组大鼠肛温明显回升($P < 0.05$), 差异有统计学意义。与低剂量组比较, 温肾强骨丸高剂量组肛温升高明显($P < 0.05$), 差异有统计学意义。见表 2。

由大鼠一般状况、体质量及肛温变化可见, 温肾强骨丸能够明显升高大鼠肛温, 并能改善大鼠脾虚

表 1 各组大鼠体质量变化表($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Weight changes of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	体质量/g						
	给药后 1 周	给药后 2 周	给药后 3 周	给药后 4 周	给药后 5 周	给药后 6 周	给药后 7 周
空白对照组	294.84 $\pm$ 12.29	297.35 $\pm$ 9.85	302.35 $\pm$ 7.44	303.88 $\pm$ 4+66	312.16 $\pm$ 8.42	312.16 $\pm$ 8.42	301.21 $\pm$ 12.09
模型组	277.56 $\pm$ 16.36	273.84 $\pm$ 15.5**	281.81 $\pm$ 19.1**	282.76 $\pm$ 19.48**	289.84 $\pm$ 18.85**	288.18 $\pm$ 18.83**	261.79 $\pm$ 23.97**
假手术组	299.11 $\pm$ 27.89	283.7 $\pm$ 27.68	298.21 $\pm$ 29.52	300.68 $\pm$ 31.39	308.99 $\pm$ 34.43	284.29 $\pm$ 35.81	279.33 $\pm$ 41.39
温肾强骨丸高剂量组	285.88 $\pm$ 26.9	293.46 $\pm$ 27.46 $^{\Delta}$	300.76 $\pm$ 32.01 $^{\Delta}$	303.28 $\pm$ 32.72 $^{\Delta}$	311.8 $\pm$ 32.53 $^{\Delta}$	300.71 $\pm$ 30.82 $^{\Delta}$	292.81 $\pm$ 24.14 $^{\Delta}$
温肾强骨丸中剂量组	292 $\pm$ 22.01	304.94 $\pm$ 30.2 $^{\Delta}$	317.45 $\pm$ 31.83 $^{\Delta}$	320.91 $\pm$ 33.59 $^{\Delta}$	332.34 $\pm$ 34.08 $^{\Delta}$	306.43 $\pm$ 28.6 $^{\Delta}$	321.15 $\pm$ 27.14 $^{\Delta}$
温肾强骨丸低剂量组	296.25 $\pm$ 16.77	294.65 $\pm$ 20.86 $^{\Delta}$	306.83 $\pm$ 29.09 $^{\Delta}$	309.08 $\pm$ 25.54 $^{\Delta}$	318.05 $\pm$ 27.02 $^{\Delta}$	299.4 $\pm$ 22.08 $^{\Delta}$	314.35 $\pm$ 23.83 $^{\Delta}$
西药组	297.44 $\pm$ 9.18	312.84 $\pm$ 19.23 $^{\Delta}$	324.74 $\pm$ 19.7 $^{\Delta}$	325.29 $\pm$ 20.24 $^{\Delta}$	332.34 $\pm$ 22.35 $^{\Delta}$	320.31 $\pm$ 20.97 $^{\Delta}$	329.56 $\pm$ 21.13 $^{\Delta}$

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, ** $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

表 2 各组大鼠肛温变化表($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Changes of anal temperature of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	肛温/ $^{\circ}\text{C}$						
	给药后 1 周	给药后 2 周	给药后 3 周	给药后 4 周	给药后 5 周	给药后 6 周	给药后 7 周
空白对照组	37.18 $\pm$ 0.35	37.79 $\pm$ 0.63	38.30 $\pm$ 1.15	37.14 $\pm$ 0.35	37.05 $\pm$ 0.34	37.11 $\pm$ 0.15	37.31 $\pm$ 0.37
模型组	36.64 $\pm$ 0.46**	35.99 $\pm$ 0.71**	37.46 $\pm$ 0.43**	36.33 $\pm$ 0.56**	36.75 $\pm$ 0.50**	36.31 $\pm$ 1.21**	35.84 $\pm$ 0.92**
假手术组	36.74 $\pm$ 0.55	36.84 $\pm$ 0.73	37.53 $\pm$ 0.77	37.04 $\pm$ 0.50	37.51 $\pm$ 0.39	36.90 $\pm$ 0.37	36.79 $\pm$ 0.51
温肾强骨丸高剂量组	37.91 $\pm$ 0.67 $^{\Delta\Delta}$	37.21 $\pm$ 0.80 $^{\Delta\Delta}$	37.63 $\pm$ 0.49 $^{\Delta\Delta}$	37.36 $\pm$ 0.69 $^{\Delta\Delta}$	36.94 $\pm$ 0.39 $^{\Delta\Delta}$	37.05 $\pm$ 0.48 $^{\Delta\Delta}$	37.40 $\pm$ 0.43 $^{\Delta\Delta}$
温肾强骨丸中剂量组	37.23 $\pm$ 0.15 $^{\Delta}$	37.01 $\pm$ 0.56 $^{\Delta}$	37.69 $\pm$ 0.57 $^{\Delta}$	37.58 $\pm$ 0.34 $^{\Delta}$	37.59 $\pm$ 0.49 $^{\Delta}$	36.59 $\pm$ 0.40 $^{\Delta}$	37.05 $\pm$ 0.33 $^{\Delta}$
温肾强骨丸低剂量组	36.75 $\pm$ 1.15 $^{\Delta}$	37.00 $\pm$ 0.94 $^{\Delta}$	37.61 $\pm$ 0.68 $^{\Delta}$	37.28 $\pm$ 0.61 $^{\Delta}$	36.80 $\pm$ 0.43 $^{\Delta}$	36.89 $\pm$ 0.38 $^{\Delta}$	37.29 $\pm$ 0.59 $^{\Delta}$
西药组	36.70 $\pm$ 0.76 $^{\Delta}$	37.15 $\pm$ 0.56 $^{\Delta}$	36.73 $\pm$ 0.43 $^{\Delta}$	36.95 $\pm$ 0.26 $^{\Delta}$	36.70 $\pm$ 0.91 $^{\Delta}$	36.66 $\pm$ 0.60 $^{\Delta}$	36.86 $\pm$ 0.49 $^{\Delta}$

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, ** $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与温肾强骨丸低剂量组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

症状, 增加大鼠体质量, 说明温肾强骨丸能明显改善大鼠脾肾阳虚症状。

2.3 脏器指数比较结果 见表 3。与空白对照组比较, 模型组脾、肾质量指数由于水肿而均明显升高 ($P < 0.05$), 子宫质量指数由于切除卵巢后萎缩而明显降低 ($P < 0.05$)。与假手术组比, 模型组大鼠脾、肾质量指数均明显升高, 子宫质量指数降低 ($P < 0.05$), 差异均有统计学意义。经药物干预后, 与模型组比较, 温肾强骨丸各组与西药组脾的质量指数均明显降低 ($P < 0.05$); 温肾强骨丸各组肾的质量指数也均明显降低 ($P < 0.05$); 西药组肾的质量指数也有所降低, 但下降不明显 ($P > 0.05$), 差异无统计学意义; 温肾强骨丸高剂量组的子宫质量指数上升明显 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。与低剂量组比较, 温肾强骨丸高剂量组能明显降低脾和肾的质量指数 ($P < 0.05$)。上述结果说明温肾强骨丸能明显改善大鼠脾和肾的水肿程度, 能明显缓解大鼠脾肾阳虚症状。

表 3 各组大鼠脏器质量指数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 3 Comparison of viscera indexes in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	脾/%	肾/%	子宫/%
空白对照组	0.15 ± 0.02	0.33 ± 0.04	0.18 ± 0.04
模型组	0.38 ± 0.57**	0.40 ± 0.07**	0.03 ± 0.01**
假手术组	0.18 ± 0.02	0.35 ± 0.09	0.25 ± 0.06
温肾强骨丸高剂量组	0.17 ± 0.03 ^{△▲}	0.29 ± 0.03 ^{△▲}	0.04 ± 0.01 [△]
温肾强骨丸中剂量组	0.19 ± 0.06 [△]	0.30 ± 0.06 [△]	0.03 ± 0.09
温肾强骨丸低剂量组	0.21 ± 0.05 [△]	0.37 ± 0.07 [△]	0.02 ± 0.01
西药组	0.23 ± 0.04 [△]	0.45 ± 0.02	0.02 ± 0.01

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, ** $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与温肾强骨丸低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

2.4 骨密度检测结果 见表 4。与空白对照组比较, 模型组大鼠股骨与脊柱骨密度均降低 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义; 与假手术组比, 模型组大鼠股骨与脊柱骨密度均降低 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义; 说明该模型复制方法可以导致大鼠骨量的流失。给予药物干预后, 温肾强骨丸高、中、低剂量组与模型组比, 其股骨、脊柱骨密度均有所升高 ($P < 0.05$); 且高剂量组与低剂量组比较, 股骨、脊柱骨密度明显增高 ($P < 0.05$); 说明温肾强骨丸高剂量对模型大鼠骨密度有较好的提升作用。

2.5 股骨三点弯曲骨生物力学检测结果 见表 5。与空白对照组比较, 模型组弹性模量、最大载荷、断裂点载荷均明显下降 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。

表 4 各组大鼠股骨与脊柱骨密度比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 4 Comparison of bone mineral density between femur and spine in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	股骨骨密度/($\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	脊柱骨密度/($\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)
空白对照组	0.136 ± 0.010	0.208 ± 0.008
模型组	0.116 ± 0.007**	0.194 ± 0.012**
假手术组	0.134 ± 0.009	0.206 ± 0.015 [△]
温肾强骨丸高剂量组	0.143 ± 0.011 ^{△▲}	0.218 ± 0.016 ^{△▲}
温肾强骨丸中剂量组	0.127 ± 0.009 [△]	0.202 ± 0.008 [△]
温肾强骨丸低剂量组	0.130 ± 0.011 [△]	0.197 ± 0.011 [△]
西药组	0.135 ± 0.010 [△]	0.193 ± 0.007 [△]

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与假手术组比较, ** $P < 0.05$; 与温肾强骨丸低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

义。与假手术组相比, 模型组弹性模量、最大载荷、断裂点载荷均明显下降 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。温肾强骨丸干预后, 与模型组比较, 温肾强骨丸高剂量组与西药阿仑膦酸钠组弹性模量、最大载荷值与断裂点载荷均有明显增高 ($P < 0.05$); 温肾强骨丸中、低剂量组与模型组比较, 弹性模量也有增高 ($P < 0.05$), 最大载荷值与断裂点载荷虽有所上升, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与低剂量组比较, 温肾强骨丸高剂量组的弹性模量、最大载荷、断裂点载荷均明显增高 ($P < 0.05$), 说明温肾强骨丸高剂量可以对抗骨量的丢失, 增强大鼠骨生物力学, 且其作用优于温肾强骨丸低剂量组。

表 5 各组大鼠股骨生物力学指标比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 5 Comparison of biomechanical indexes of femur in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	弹性模量/mPa	最大载荷/N	断裂点载荷/N
空白对照组	19 638.45 ± 2 437.29	171.18 ± 16.28	171.18 ± 16.28
模型组	16 164.46 ± 3 856.57**	140.20 ± 8.33**	139.16 ± 7.97**
假手术组	21 727.92 ± 1 726.75	160.35 ± 4.51	156.56 ± 9.93
温肾强骨丸高剂量组	42 247.61 ± 63 530.63 ^{△▲}	171.42 ± 9.46 ^{△▲}	165.95 ± 16.40 ^{△▲}
温肾强骨丸中剂量组	19 330.83 ± 1 675.11 [△]	141.65 ± 8.04	140.58 ± 8.81
温肾强骨丸低剂量组	19 684.68 ± 646.02 [△]	143.03 ± 12.48	142.20 ± 10.36
西药组	27 879.67 ± 9 723.32 [△]	156.84 ± 20.17 [△]	155.96 ± 19.96 [△]

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与假手术组比较, ** $P < 0.05$; 与温肾强骨丸低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

2.6 血清骨代谢指标检测 见表 6。与空白对照组比, 模型组大鼠 BALP、E2 含量明显降低 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义; BGP、TRAP、U-NTX、U-CTX 含量明显升高 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。与假手术组比, 模型组大鼠 BALP、E2 含量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); BGP、TRAP、

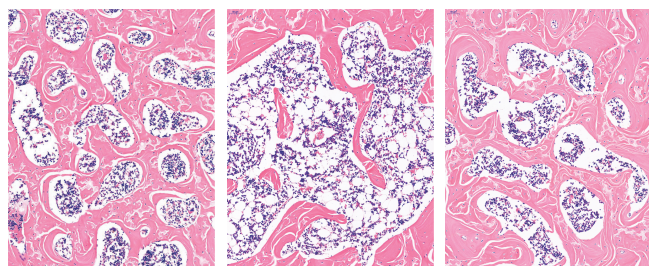
表 6 各组大鼠全身骨代谢指标比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 6 Comparison of whole-body bone metabolism indexes in each group($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	BGP/(ng·L ⁻¹)	TRAP/(pg·mL ⁻¹)	U-NTX/(nmol·L ⁻¹)	U-CTX/(μg·L ⁻¹)	BALP/(μg·L ⁻¹)	E2/(ng·L ⁻¹)
空白对照组	194.59 ± 14.91	625.07 ± 158.43	3.95 ± 0.56	0.28 ± 0.62	4.02 ± 2.91	19.61 ± 0.52
模型组	231.50 ± 40.25**	933.72 ± 53.09**	4.86 ± 0.71**	0.41 ± 0.22**	1.91 ± 1.41**	16.72 ± 1.78**
假手术组	168.68 ± 17.06	703.40 ± 244.26	4.31 ± 0.95	0.34 ± 0.20	3.53 ± 2.57	17.57 ± 2.97
温肾强骨丸高剂量组	179.42 ± 19.27 ^{△▲}	828.38 ± 58.16 ^{△▲}	3.71 ± 0.88 ^{△▲}	0.34 ± 0.20 ^{△▲}	2.40 ± 1.52 ^{△▲}	21.32 ± 1.19 ^{△▲}
温肾强骨丸中剂量组	186.69 ± 21.38 [△]	830.61 ± 52.49 [△]	4.40 ± 1.82 [△]	0.40 ± 0.10 [△]	2.51 ± 1.34 [△]	19.90 ± 1.82 [△]
温肾强骨丸低剂量组	181.46 ± 16.20 [△]	819.60 ± 52.49 [△]	3.97 ± 1.44 [△]	0.32 ± 0.20 [△]	2.90 ± 0.49 [△]	17.31 ± 1.39 [△]
西药组	173.63 ± 31.48 [△]	824.28 ± 62.89 [△]	3.90 ± 0.89 [△]	0.39 ± 0.70 [△]	2.10 ± 0.54 [△]	25.19 ± 1.95 [△]

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, ** $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与温肾强骨丸低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

U-NTX、U-CTX 含量明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。给予药物干预后, 与模型组比较, 西药阿仑膦酸钠组和温肾强骨丸方各组 BALP、E2 均升高($P < 0.05$), BGP、TRAP、U-NTX、U-CTX 含量均下降($P < 0.05$), 差异有统计学意义。

2.7 椎体 HE 染色结果 见图 1, 椎体骨组织 HE 染色, 骨组织呈粉红色, 椎体内网状结构为骨小梁。与空白对照组比较, 模型组松质骨骨小梁间隙增大, 数量减少, 排列稀疏不规则。与模型组比较, 温肾强骨丸高剂量组大鼠的骨组织形态有一定程度的改善, 可见松质骨骨小梁增多, 变粗, 排列比较整齐。



A. 空白对照组 B. 模型组 C. 温肾强骨丸高剂量组

图 1 各组椎体 HE 染色结果比较($\times 20$)Figure 1 Comparison of HE staining results of vertebral bodies in each group($\times 20$)表 7 各组大鼠骨组织形态学比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 7 Comparison of bone histomorphology of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	皮质骨面积百分比/%	骨小梁平均厚度/ μm	骨小梁面积/ mm^2	骨小梁体积(骨小梁面积百分比)/%
空白对照组	65.73 ± 2.94	62.93 ± 5.14	0.17 ± 0.04	46.83 ± 2.93
模型组	53.24 ± 3.57**	54.92 ± 4.21**	0.09 ± 0.01**	31.54 ± 3.47**
假手术组	60.91 ± 4.54	61.25 ± 4.76	0.16 ± 0.01	44.36 ± 3.88
温肾强骨丸高剂量组	64.58 ± 3.09 ^{△▲}	63.20 ± 2.23 ^{△▲}	0.16 ± 0.01 ^{△▲}	45.72 ± 3.45 ^{△▲}
温肾强骨丸中剂量组	61.52 ± 2.29 [△]	62.19 ± 4.40 [△]	0.15 ± 0.09 [△]	44.27 ± 2.04 [△]
温肾强骨丸低剂量组	60.83 ± 5.51 [△]	59.82 ± 2.21 [△]	0.14 ± 0.01 [△]	40.85 ± 4.12 [△]
西药组	65.24 ± 3.47 [△]	63.36 ± 2.24 [△]	0.16 ± 0.01 [△]	44.99 ± 3.24 [△]

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, ** $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与温肾强骨丸低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

见表 7。与空白对照组比较, 模型组大鼠皮质骨面积百分比、骨小梁平均厚度、骨小梁面积、骨小梁体积均明显减少($P < 0.05$), 差异有统计学意义。与假手术组比较, 模型组大鼠皮质骨面积百分比、骨小梁平均厚度、骨小梁面积、骨小梁体积均明显减少($P < 0.05$), 差异有统计学意义。给予药物干预后, 与模型组比较, 温肾强骨丸各剂量组与西药组大鼠皮质骨面积百分比、骨小梁平均厚度、骨小梁面积、骨小梁体积均明显增加($P < 0.05$), 差异有统计学意义。与温肾强骨丸低剂量组比较, 温肾强骨丸高剂量组大鼠皮质骨面积百分比、骨小梁平均厚度、骨小梁面积、骨小梁体积均明显增加($P < 0.05$), 差异有统计学意义。

3 讨论

骨质疏松症的治疗, 临床常用的药物主要有抗骨吸收药物和促骨形成药物两类, 但因其长期用药有副作用较大、患者经济压力大等缺点, 中医药治疗骨质疏松症的独特优势成为研究热点。近年来, 随着分子生物学的发展, 从基因调控水平证实中医药治疗骨质疏松症的作用机制, 可为中医药靶向治疗提供科学依据。

中医藏象理论认为,肾“主骨生髓”主人体的生长发育,为“先天之本”,受“后天之本”脾脏运化的水谷精微来充养,因此人体骨骼的生长发育与脾肾密切相关,且在骨质疏松症的中医证型研究中,有学者也发现脾肾阳虚证是骨质疏松症的主要证型^[16]。临床研究也证实补肾健脾方药治疗脾肾阳虚型的骨质疏松症有明显疗效,如潘永苗^[17]用补肾健脾通络汤治疗骨质疏松症患者,发现补肾健脾通络汤能提高患者骨密度,减轻患者症状;王岩等^[18]在口服钙尔奇(碳酸钙 D3)片、罗钙全(骨化三醇丸)的基础治疗上加服用补肾健脾益气方(茯苓 9 g,白术 9 g,陈皮 9 g,人参 6 g,生地 6 g,枸杞子 30 g,麦门冬 15 g)治疗脾肾气虚型老年性骨质疏松症取得了良好的临床疗效;黄琳玲^[19]采用自拟益肾健脾化痰方治疗绝经后脾肾阳虚型骨质疏松症,同样发现该方可以改善临床症状,提高了患者骨密度。

骨密度反映 70 % 的骨强度,骨密度的测量对骨质疏松症的诊断、治疗及随访均有重要的意义^[20]。本研究通过对大鼠股骨及脊柱的骨密度进行检测后发现,温肾强骨丸高剂量组大鼠的骨密度有了一定的改善,证实温肾强骨丸对脾肾阳虚型骨质疏松有一定防治作用。

骨生物力学是骨量和骨结构的综合反映,通过机械试验的方法来测量骨骼的强度和刚度,可以直接反映骨组织的抗骨折能力,因此,骨生物力学的检测也是评价骨质量不可缺少的指标^[21]。本实验中,股骨三点弯曲试验结果都表明了温肾强骨丸高剂量组大鼠股骨的最大载荷、弹性模量和断裂点载荷均有明显提高,说明温肾强骨丸可以改善骨骼的强度和韧性,对防治骨质疏松症有良好的疗效。

BALP 是成骨细胞的一种细胞外酶, BALP 的增殖、分化和成熟与骨骼的正常生长发育密切相关,骨骼矿化受阻时,成骨细胞合成大量碱性磷酸酶,使血清 BALP 明显升高。骨特异性碱性磷酸酶参与骨形成过程,在血清中稳定,是成骨细胞成熟和具有活性的标志^[22]。BALP 被认为是最精确的骨形成标志物之一。血清 BALP 定量测定及动态观察对骨代谢疾病,特别是对骨质疏松症的早期诊断、治疗效果的监测、病情预后的判断等可提供有效的依据^[23]。BGP 是反映骨形成的特异性生化指标,不仅参与骨吸收的调节,更重要的是参与基质的矿化过程及成骨细胞分化,与骨转换相关,能够维持骨的正常矿化速率,抑制软骨的矿化速率,并抑制骨异常的羟

磷灰石结晶形成^[24]。因此, BGP 通常被认为是反映骨形成的生化指标^[25-26]。TRAP 作为第 2 代骨吸收标志物,是一个有特异和高敏感度的骨吸收指标^[27]。在骨的有机质中, 90% 为 I 型胶原, NTX 与 CTXI 水平均能反映破骨细胞骨吸收活性^[28], 是骨吸收的重要生化标志物^[29], 其升高程度与破骨细胞活性增高的程度相一致,可灵敏地反映骨代谢的变化,是评价骨形态计量学骨吸收的重要参数^[30]。研究^[31]发现, NTX 与 CTX 是骨代谢的敏感指标,与骨密度的改变、骨折的发生具有良好的相关性,其增加可提示骨关节炎患者骨量的减少。

骨组织切片的 HE 染色可以清楚观察到骨组织中骨小梁的形态、厚度及间隔,是一种经典的染色方法,能更好地反映大鼠骨质疏松程度。本实验结果显示温肾强骨丸高剂量增加了椎体骨组织中骨小梁的厚度、增加了骨小梁之间的间距,使骨组织中骨小梁数量增加,改善骨组织质量。

本实验将病症相结合,制备出更接近人类发病机制的脾肾阳虚型骨质疏松症模型。实验结果显示,温肾强骨丸干预后,能明显改善脾肾阳虚型大鼠的一般状况、增加体质量和升高肛温,改善脏器质量指数,说明温肾强骨丸能明显缓解脾肾阳虚型症状。并且,温肾强骨丸能明显改善模型组大鼠骨密度及骨生物力学,升高 BALP、E2 等骨生成指标含量,降低 BGP、TRAP、U-NTX、U-CTX 等骨破坏指标含量,明显改善大鼠骨质。

综上所述,温肾强骨丸改善了脾肾阳虚型骨质疏松大鼠的脾肾阳虚症状、骨密度、骨生物力学及骨代谢生化指标,这表明它对脾肾阳虚型骨质疏松有一定的防治作用。但是,其药动学仍需进一步研究,并且其作用机制不明确,未来可基于骨质疏松症发生的信号通路进一步深入研究它对骨代谢影响的作用机制,为将来温肾强骨丸的广泛临床应用提供研究基础,推动中药靶向治疗和个体化治疗的发展。

参考文献:

- [1] 鞠大宏,李鸿泓,刘红,等. 补肾健脾方对大鼠脾肾两虚型骨质疏松症的治疗作用[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(12): 3207-3210.
- [2] 董万涛,巩彦龙,宋敏,等. 固本增骨方对卵巢切除模型大鼠骨代谢和骨微结构的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2019, 50(5): 679-683.
- [3] 孙凯,魏戌,朱立国,等. 病证结合模式下骨质疏松症实验动物

- 模型的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(9): 1340-1344.
- [4] 郑圣, 冯倩云, 张学利. 原发性骨质疏松症骨折动物模型的选择和研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(7): 790-794.
- [5] 荀敏奇, 李兰珍. 近10年脾肾阳虚证动物模型研究述评[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(6): 126-129.
- [6] 刘梅洁, 李鸿泓, 王少君, 等. 骨质疏松症脾肾两虚型病证结合动物模型的建立[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(8): 836-844.
- [7] 王晓英, 苗得雨, 裴妙荣. 复合式造大鼠脾肾阳虚模型[J]. 山西中医, 2012, 28(7): 43-49.
- [8] 潘新, 胡昌江, 耿媛媛, 等. 脾肾阳虚泄泻大鼠模型造模方法研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(23): 4658-4663.
- [9] 朱丹, 张怡, 王毅, 等. 大鼠溃疡性结肠炎(脾肾阳虚型)模型试验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(5): 120-123.
- [10] 邢润麟, 王培民, 张农山, 等. 中医“肝肾同源”理论异病同治膝关节关节炎和绝经后骨质疏松症的实验理论基础研究[J]. 中医正骨, 2017, 29(1): 1-10.
- [11] 王晓英, 苗得雨, 裴妙荣. 复合式造大鼠脾肾阳虚模型[J]. 山西中医, 2012, 28(7): 43-49.
- [12] 黄烨, 殷惠军, 陈可冀. 病证结合的基础研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 299-303.
- [13] 夏炳江, 童培建, 肖鲁伟, 等. 大鼠激素性股骨头坏死肾阳虚型病证结合模型构建与评价的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 301-454.
- [14] 孙艳珍, 黄正团. 病证结合动物模型研究的现状及思考[J]. 中医药导报, 2017, 23(23): 8-12.
- [15] 杨芳芳, 蒯慧荣, 高玉海, 等. 丹参酮ⅡA对去卵巢大鼠骨密度及骨形态计量学的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2018, 11(2): 166-171.
- [16] 张连平, 杜兵强, 曾长金, 等. 老年原发性骨质疏松患者危险因素及中医证型分布研究[J]. 新中医, 2019, 51(2): 14-17.
- [17] 王岩, 史传道. 补肾健脾益气方治疗老年性骨质疏松症脾肾气虚证30例[J]. 现代中医药, 2017, 37(5): 51-52.
- [18] 潘永苗, 袁临益, 卢建华. 补肾健脾通络汤对骨质疏松症患者的骨密度、疼痛及中医证候改善分析[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(3): 655-657.
- [19] 黄琳玲, 吴娟, 邓颖辉. 自拟益肾健脾化痰方治疗绝经后脾肾阳虚型骨质疏松症的临床研究[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(5): 497-500.
- [20] 赵成利. 双能X线骨密度测定在老年骨质疏松症筛查中的应用价值探讨[J]. 基层医学论坛, 2019, 23(35): 5117-5118.
- [21] WENDLOVA J. Bone quality. Elasticity and strength[J]. Bratisl Lek Listy, 2008, 109(9): 383-386.
- [22] 张萌萌. 中国老年学会骨质疏松委员会-骨代谢生化指标临床应用专家共识[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(11): 1263-1272.
- [23] 郭爱芹, 雷云静, 夏存华. 骨代谢标志物检测在骨病诊疗中的临床应用价值[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(96): 20-21.
- [24] CHOPIN F, BIVER E, FUNCK-BRENTANO T, et al. Prognostic interest of bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis[J]. Joint Bone Spine, 2012, 79(1): 26-31.
- [25] 黄付伟, 孔西建, 朱静栋. 骨松健骨丸治疗绝经后骨质疏松症的临床疗效观察[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(8): 1116-1122.
- [26] 李玮. 绝经后妇女椎体脆性骨折的双能X线骨密度仪评估及其与血清骨转化、骨代谢指标的关系[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(21): 2530-2534.
- [27] HALLEEN J M. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption[J]. Anticancer Res, 2003, 23(2A): 1027.
- [28] 张智海, 刘忠厚, 石少辉, 等. 中国大陆地区以-2.5SD为诊断的骨质疏松症发病率文献回顾性研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(1): 1-7, 24.
- [29] ZHAO J, XIA W, NIE M, et al. The levels of bone turnover markers in Chinese postmenopausal woman: peking vertebral fracture study[J]. Menopause, 2011, 18(11): 1237-1243.
- [30] CHUBB S A, MANDELT C, VASIKARAN S. Comparison of clinical cut-point and treatment targets for urine NTX and plasma β CTX-1 in osteoporosis[J]. Clin Biochem, 2016, 49(7-8): 529-533.
- [31] NGUYEN L T, SHARMA A R, CHAKRABORTY C, et al. Review of prospects of biomarkers in osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): E601.

(编辑: 修春)