

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.24.002 [http://www.crter.org]

陈国仙, 王国荣, 林宗锦, 李国山, 郭春仙, 罗元标, 曾清东, 陈伟义. 核因子κB受体活化因子配体诱导形成的成熟破骨细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(24): 4380-4385.

核因子κB受体活化因子配体诱导形成的成熟破骨细胞***

陈国仙, 王国荣, 林宗锦, 李国山, 郭春仙, 罗元标, 曾清东, 陈伟义

莆田市第一医院骨科, 福建省莆田市 351100

文章亮点:

- 1 先前国内外对破骨细胞的获取一般采用基质细胞诱导培养或共培养, 或运用核因子κB受体活化因子配体和巨噬细胞集落刺激因子共同诱导形成成熟的破骨细胞, 近来有研究单用核因子κB受体活化因子配体诱导培养 RAW264.7 细胞向成熟破骨细胞分化。
- 2 实验单用核因子κB受体活化因子配体诱导 RAW264.7 细胞 7 d 后观察抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果, 以鬼笔环肽荧光染色观察纤维性肌动蛋白环, 甲苯胺蓝染色观察牛骨片表面的吸收陷窝情况。
- 3 结果显示单独运用核因子κB受体活化因子配体诱导 RAW264.7 细胞分化成熟, 减少了巨噬细胞集落刺激因子的应用, 使培养体系更加简单, 易于操作, 诱导出的细胞纯度高, 适合于破骨细胞的生物学和生化研究。

关键词:

组织构建; 骨组织构建; 破骨细胞; 核因子κB受体活化因子; 配体; RAW264.7 细胞; 细胞分化; 诱导; 鉴定; 纤维性肌动蛋白; 骨吸收; 省级基金

摘要

背景: 破骨细胞作为一种终末细胞, 获取困难, 而且没有成熟破骨细胞株等因素限制了其应用。先前国内外对破骨细胞的获取一般采用基质细胞诱导培养或共培养, 或运用核因子κB受体活化因子配体和巨噬细胞集落刺激因子共同作用诱导形成成熟的破骨细胞。

目的: 观察小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的一般生物学特征, 分析其在核因子κB受体活化因子配体诱导下形成成熟破骨细胞的可行性。

方法: 培养 RAW264.7 后, 用核因子κB受体活化因子配体诱导 RAW264.7 细胞 7 d 后观察抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果, 以抗酒石酸酸性磷酸酶染色阳性, 细胞核≥3 个为破骨细胞。以鬼笔环肽荧光染色观察纤维性肌动蛋白环, 甲苯胺蓝染色观察牛骨片表面的吸收陷窝情况。

结果与结论: 核因子κB受体活化因子配体可诱导 RAW264.7 细胞形成抗酒石酸酸性磷酸酶染色阳性的多核细胞, 形成纤维性肌动蛋白环, 电镜下可见骨片上圆形或椭圆形的吸收陷窝。提示 RAW264.7 是一种较好的破骨前体细胞模型, 可用于破骨细胞分化研究。单用核因子κB受体活化因子配体诱导 RAW264.7 细胞分化成熟, 减少了巨噬细胞集落刺激因子的应用, 使培养体系更加简单, 易于操作, 诱导出的细胞纯度高, 适合于破骨细胞的生物学和生化研究。

Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand-induced mature osteoclasts

Chen Guo-xian, Wang Guo-rong, Lin Zong-jin, Li Guo-shan, Guo Chun-xian, Luo Yuan-biao, Zeng Qing-dong, Chen Wei-yi

Department of Orthopedics, the First Hospital of Putian City, Putian 351100, Fujian Province, China

Abstract

BACKGROUND: Osteoclast as a terminal cell is difficult to obtain, and the shortage of mature osteoclast

陈国仙★, 男, 1982年生, 福建省莆田市人, 汉族, 2008年福建医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨质疏松及关节置换后松动研究。
cosain2000@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)24-04380-06

收稿日期: 2012-10-13
修回日期: 2012-11-10
(20120704002/G·C)

Chen Guo-xian★, Master,
Attending physician,
Department of Orthopedics, the
First Hospital of Putian City,
Putian 351100, Fujian
Province, China
cosain2000@163.com

Supported by: Youth
Foundation of Fujian Provincial
Health Bureau, No. 2011-2-49*;
Project of Putian Science and
Technology Bureau, No.
2011D02*

Received: 2012-10-13
Accepted: 2012-11-10

strains limits its application. Previous studies have shown that stromal cell culture or co-culture is commonly used to obtain the osteoclasts, and the receptor activator of nuclear factor κ B ligand and macrophage colony-stimulating factor can be used in combination in order to obtain the mature osteoclasts.

OBJECTIVE: To observe the biological characteristics of mouse monocyte macrophage RAW264.7, and to analyze the feasibility of receptor activator of nuclear factor κ B ligand-mediated differentiation of monocyte macrophage RAW264.7 into osteoclasts.

METHODS: The RAW264.7 cells were cultured, and then the RAW264.7 cells were induced with receptor activator of nuclear factor κ B ligand for 7 days to observe the tartrate-resistant acid phosphatase staining results. The positive tartrate-resistant acid phosphatase staining and nucleus ≥ 3 were considered as the osteoclasts. Phalloidin staining was used to observe fibrous actin ring, and toluidine blue staining was used to observe the resorption pits on the surface of bovine bone slice.

RESULTS AND CONCLUSION: RAW264.7 cells could be induced into tartrate-resistant acid phosphatase-positive multinuclear cells with receptor activator of nuclear factor κ B ligand, and formed fibrous actin rings; round or ellipse bone resorption pits were found in bone slice surface by microscope. RAW264.7 cells were considered as a good preosteoclast model that used for research of osteoclast differentiation. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand can induce the differentiation and maturation of RAW264.7 cells, reduce the application of macrophage colony-stimulating factor and make the training system simpler and easier to operate, and the induced cells have the high purity suitable for biological and biochemical studies of osteoclasts.

Key Words: tissue construction; bone tissue construction; osteoclasts; receptor activator of nuclear factor kappa B; ligand; RAW264.7 cells; cell differentiation; induce; identification; fibrous actin; bone resorption; provincial grants-supported paper

Chen GX, Wang GR, Lin ZJ, Li GS, Guo CX, Luo YB, Zeng QD, Chen WY. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand-induced mature osteoclasts. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(24): 4380-4385.

0 引言

骨重建是人类的调节骨结构完整性的重要机制,它是由一对作用相拮抗的细胞,成骨细胞和破骨细胞控制和调节的,成骨细胞合成并沉积胶原(I型胶原),增加骨量,而破骨细胞负责不断吸收骨组织^[1]。在骨发育和重建过程中破骨细胞是惟一有吸收功能的细胞。破骨细胞数量和活性的改变可导致多种代谢性骨病发生,一直是研究的热点和重点。但因破骨细胞属于终末细胞,不能分化传代,分离纯化困难,限制了破骨细胞功能的深入研究。本实验旨在观察小鼠单核巨噬细胞RAW264.7细胞在核因子 κ B受体活化因子配体的诱导下生成有骨吸收能力破骨细胞的可行性,以期为进一步研究破骨细胞相关骨疾病奠定基础。

1 材料和方法

设计: 细胞学对比观察实验。

时间及地点: 于2011年1月至2012年5月在南方医科大学南方医院实验中心完成。

材料:

RAW264.7细胞诱导分化为破骨细胞实验的主要试剂及仪器:

Main reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养基和胎牛血清	Gibco 公司
抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒	Sigma 公司
小鼠核因子 κ B 受体活化因子配体	Peptrotech 公司
RAW264.7 细胞株	ATCC, Manassas, USA
FITC-Phalloidin	Enzo 公司
核因子 κ B 受体活化因子配体	R&D
PI 染液	Keygen

方法:

RAW264.7细胞培养: 从液氮中取出装有RAW264.7细胞的冷冻管, 快速37 °C水浴直到解冻后, 离心弃上清, 培养液重悬, 隔天换液, 细胞约长满后, 用0.25% 胰酶+0.02% EDTA将RAW264.7细胞消化下传代培养, 用倒置显微镜观察RAW264.7细胞的形态特征。

诱导破骨细胞形成及抗酒石酸酸性磷酸酶染色实验: 6孔板内每孔放置消毒准备好玻片(大小约为1 cm×1 cm), 将RAW264.7细胞以 $3\times 10^5/\text{cm}^2$ 的浓度传代于6孔培养板, 置于培养箱内(37 °C、体积分数5%CO₂)培养7 d, 对照组和诱导组各3孔; 其中3孔加入核因子 κ B受体活化因子配体进行诱导培养, 并调节成终浓度为50 $\mu\text{g}/\text{L}$, 定期换液, 并保持核因子 κ B受体活化因子配体终浓度不变, 观察细胞形态特征变化。在培养第7天时取出盖玻片按抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒说明书进行抗酒石酸酸性磷酸酶染色实验。以抗酒石酸酸性磷酸酶染色阳性, 细胞核 ≥ 3 个为破骨细胞。

细胞骨架纤维性肌动蛋白荧光染色和细胞核PI染色: 同样将RAW264.7细胞以 $3\times 10^5/\text{cm}^2$ 的浓度传代于6孔培养板, 对照组和诱导组各3孔, 诱导培养方法同前; 在培养第4天时去除培养液, PBS清洗细胞2次, 40 g/L多聚甲醛室温固定10 min, PBS再次清洗细胞3次后, 再用FITC-Phalloidin工作液(5 mg/L)并置于密闭的湿盒中室温染色50 min, PBS清洗3次, 加入PI染液染色10 min后PBS清洗细胞3次, 封固, 荧光显微镜下观察。

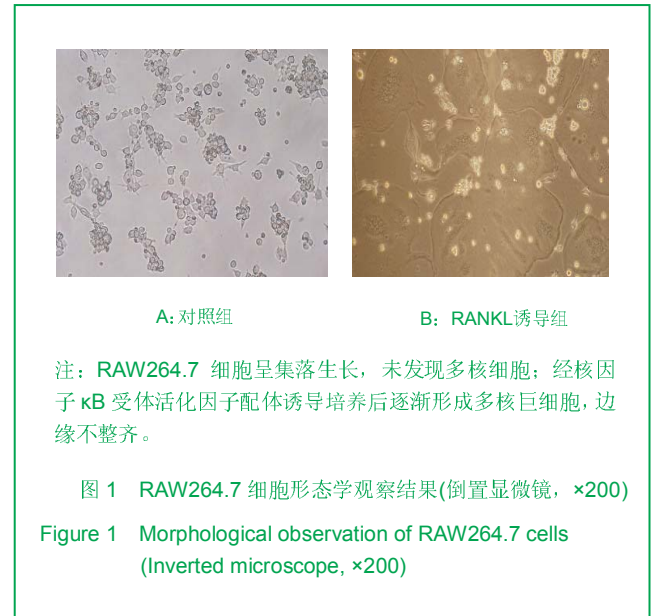
骨吸收陷窝检测: 同样将RAW264.7细胞以 $3\times 10^5/\text{cm}^2$ 的浓度传代于6孔板中, 对照组和诱导组各3孔, 6孔板内每孔放置消毒准备好牛骨皮质片(大小约为1 cm×1 cm), 诱导培养方法同前; 在培养10 d后弃培养液, PBS清洗细胞2次, 骨片采用2.5%戊二醛固定液固定5 min, 在0.25 mol/L氢氧化铵中超声清洗3次, 然后系列乙醇脱水, 最后1%甲苯胺蓝室温染色4 min, 三蒸水漂洗后, 倒置显微镜下观察。

主要观察指标: RAW264.7破骨细胞形态学特征, 抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果及免疫荧光及骨吸收陷窝检测结果。

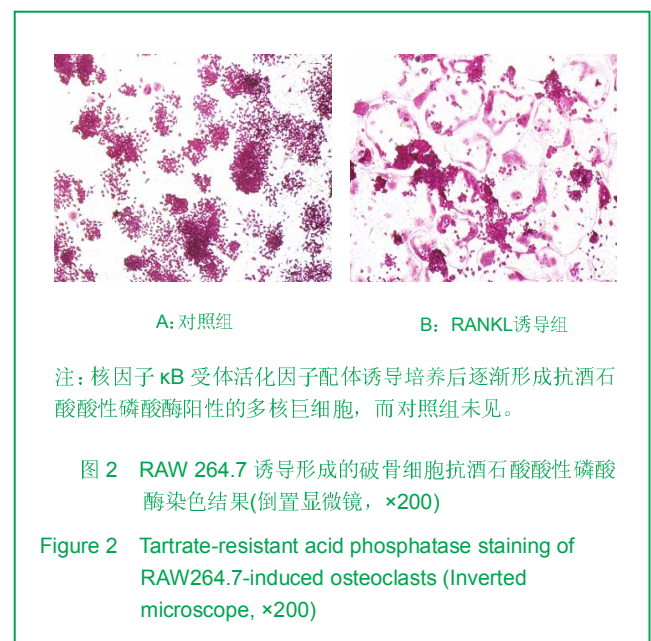
2 结果

2.1 RAW264.7细胞形态学观察结果 复苏后的RAW264.7细胞贴壁快, 一般2 h, 贴壁后细胞呈类圆形, 并有较长突触, 多为单核, 极少数有2个核。培养2 d后细胞呈集落式生长, 之后集落迅速增多扩大融合; 加入

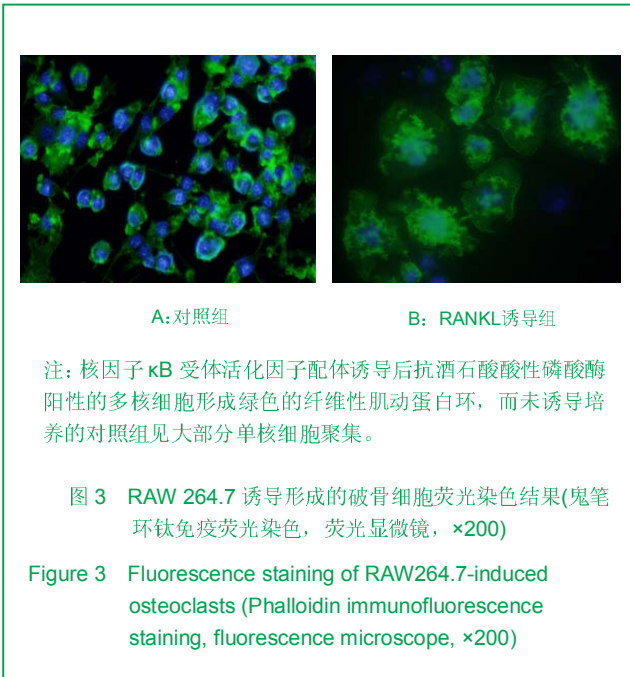
核因子 κ B受体活化因子配体诱导培养后RAW264.7细胞质内空泡逐渐增多, 且随培养时间的延长胞体逐渐增大, 边缘不整齐, 周围有刷状缘(褶皱), 有伪足, 多核巨细胞的数目逐渐增多, 见图1。



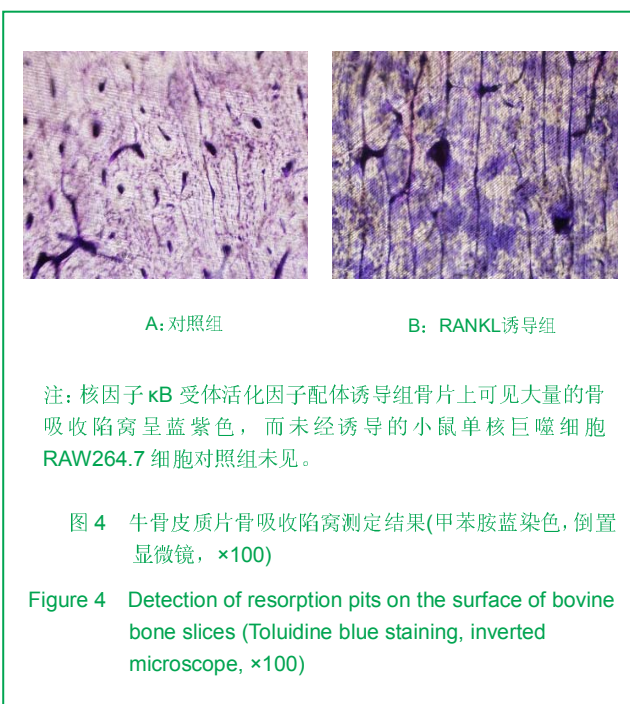
2.2 RAW 264.7诱导形成的破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果 核因子 κ B受体活化因子配体诱导培养7 d后可见较多抗酒石酸酸性磷酸酶染色阳性多核细胞(核 ≥ 3 个), 细胞核染成紫色, 胞浆染成淡红色, 呈空泡状, 细胞膜边界不清, 可见有伪足和褶皱, 而未诱导培养的RAW 264.7细胞大部分是苏木精紫染的单核细胞, 见图2。



2.3 RAW 264.7诱导形成的破骨细胞荧光染色结果 核因子 κ B受体活化因子配体诱导后多核细胞形成绿色的纤维性肌动蛋白环, 细胞核蓝染, 边聚, 细胞膜边界不清, 可见有伪足和褶皱。而未诱导培养的对照组见大部分单核细胞聚集, 但不融合, 见图3。



2.4 骨吸收陷窝的测定结果 核因子 κ B受体活化因子配体诱导培养 10 d 后, 骨片甲苯胺蓝染色上有大片的虫蚀状的蓝紫色异染, 而对照未诱导培养组骨片没有蓝染, 见图4。



3 讨论

骨重建是一个骨组织自我更新的过程, 破骨细胞不断吸收旧骨, 成骨细胞则不断形成新骨补充骨吸收部分。当骨骼成熟后, 破骨细胞在骨重建过程中维持骨量稳定发挥重要作用。骨吸收和合成过程被一些列相关细胞因子和激素所调控^[2-6], 以维持骨结构及骨强度的完整性。破骨细胞的骨吸收和成骨细胞的骨形成能力之间的平衡是维持正常骨重建的基础^[7], 破骨细胞数量和活性的改变是导致各种骨骼系统疾病^[8], 如类风湿性关节炎、骨质疏松、转移性骨肿瘤和关节置换后假体松动等发生的主要原因之一; 临床上常见置换关节松动的主要原因: 关节假体的磨损颗粒作用于假体周围组织产生炎症递质, 诱使破骨细胞生成、活化, 导致假体周围骨溶解, 引起置换关节松动^[9]。

破骨细胞起源于造血干细胞, 在多种基因调控作用下增殖、分化为多核的成熟破骨细胞, 并可活化成有骨吸收能力的破骨细胞^[10]。对破骨细胞生物学特性的探索是最近的研究热点, 然而破骨细胞作为一种终末细胞, 获取困难, 而且没有成熟破骨细胞株等因素限制了对破骨细胞的研究。众多研究开始采用基质细胞或成骨细胞与骨髓或脾细胞混合共培养或分层共培养来获取破骨细胞, 但该方法存在着培养体系细胞不纯等问题, 不适合基因转染的研究^[11]。

目前较为理想的方法是将破骨细胞前体定向诱导分化成破骨细胞。曾有多种破骨前体细胞系(如FDPC、TCM16、HL-60细胞、C7细胞和FLG29.1等)用于破骨细胞的研究^[12-15]。

RAW264.7细胞是目前一种常用的破骨细胞前体细胞, RAW264.7细胞是小鼠源性破骨前体细胞, 其最初来自Abelson小鼠白血病病毒所致的肿瘤^[16], 该细胞可表达成熟破骨细胞表型标志的基因, 因此认为RAW264.7细胞是晚期分化阶段的破骨前体细胞^[17]。

核因子 κ B受体活化因子配体属于肿瘤坏死因子配体家族, 人类核因子 κ B受体活化因子配体基因主要表达于骨、骨髓及淋巴组织。核因子 κ B受体活化因子配体通过与其受体结合而发挥其生理作用。人类核因子 κ B受体活化因子编码的蛋白在体内有2种存在方式, 第一为跨

膜蛋白, 表达于破骨细胞前体细胞膜表面, 与核因子 κ B受体活化因子配体结合后促进破骨细胞分化成熟; 另一种存在循环血液中, 称为可溶性, 可溶性核因子 κ B受体活化因子虽然也能与核因子 κ B受体活化因子配体结合, 但不能介导破骨细胞分化, 反而起抑制作用; 骨保护素和核因子 κ B受体活化因子相互竞争与核因子 κ B受体活化因子配体结合, 若骨保护素与核因子 κ B受体活化因子配体结合则抑制破骨细胞分化。因此骨保护素/核因子 κ B受体活化因子/核因子 κ B受体活化因子配体调节轴在破骨细胞分化及骨重建偶联中发挥重要的作用。

众多研究证明核因子 κ B受体活化因子配体是破骨细胞增殖、分化和存活所必需的调节因子^[18-23]; 起初有研究表明用核因子 κ B受体活化因子配体和巨噬细胞集落刺激因子诱导RAW264.7细胞可获得抗酒石酸性磷酸酶阳性的多核细胞^[24], 然而近来有研究者发现RAW264.7细胞不需要巨噬细胞集落刺激因子仅核因子 κ B受体活化因子配体即可诱导成熟的破骨细胞^[25-26], 本实验单用核因子 κ B受体活化因子配体诱导RAW264.7细胞, 实验结果也证实单用核因子 κ B受体活化因子配体即可诱导RAW264.7细胞成为成熟的破骨细胞, 这因为RAW264.7不仅表达巨噬细胞集落刺激因子, 还表达核因子 κ B受体活化因子。

实验过程中发现, 核因子 κ B受体活化因子配体诱导4 d后出现较多抗酒石酸性磷酸酶染色阳性(破骨细胞特征性标志物)的多核细胞, 免疫荧光染色可见纤维性肌动蛋白环, 这是成熟破骨细胞被激活后骨吸收活性的标志; 在诱导培养10 d后可见骨片上有较多骨吸收陷窝, 这是RAW264.7细胞在体外诱导分化为成熟破骨细胞最可靠的鉴别指标^[27-31]。

实验单用核因子 κ B受体活化因子配体诱导RAW264.7细胞分化成熟, 减少了巨噬细胞集落刺激因子的应用, 使培养体系更加简单, 易于操作, 诱导出的细胞纯度高, 适合于破骨细胞的生物学和生化研究, 为进一步研究破骨细胞相关骨疾病奠定了基础。

致谢: 感谢南方医科大学南方医院实验中心提供实验设备。

基金资助: 福建省卫生厅青年基金资助项目(2011-2-49); 福建莆田市科技局资助项目(2011D02)。

作者贡献: 所有作者均参与本次研究, 采用盲法评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*. 2004;292(4):490-495.
- [2] Brad B, Victoria S, Paul JK, et al. Osteoprotegerin, an endogenous antiosteoclast factor for protecting bone in rheumatoid arthritis. *Athritis Rheum*. 2002;46(12):3121-3135.
- [3] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph node organogenesis. *Nature*. 1999;39(7):315-323.
- [4] Soysa NS, Alles N. NF- κ B functions in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378(1):1-5.
- [5] Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2): 139-146.
- [6] Naoko Y, Tohru T, Haruyasu U, et al. Down-regulation of osteoprotegerin production in bone marrow macrophages by macrophage colony stimulating factor. *Cytokine*. 2005;31(28):288-297.
- [7] Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science (Washington DC)*. 2000; 289(5484): 1504-1508.
- [8] Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*. 2000; 289(5484): 1508-1514.
- [9] Cheng T, Dai M, Fan HX, et al. *Zhonghua Shiyian Waikexue*. 2007;24(1):113.
程涛, 戴闽, 范红先, 等. 氧化铝陶瓷和高分子聚乙烯颗粒诱导体内生物学效应和细胞凋亡的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(1):113.
- [10] Battaglini R, Kim D, Fu J, et al. c-myc is required for osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2002;17(5):763-773.
- [11] Kieslinger M, Folberth S, Dobreva G, et al. EBF2 regulates osteoblast dependent differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2005; 9(6): 757-767.
- [12] Tsubaki M, Kato C, Manno M, et al. Macrophage inflammatory protein-1 α enhances a receptor activator of nuclear factor kappa B ligand RANKL expression in mouse bone marrow stromal cells and osteoblasts through MAPK and PI3K/Akt pathways. *Mol Cell Biochem*. 2007;304(1-2):53-60.
- [13] Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *Bone Miner Res*. 2000;15(8):1477-1488.
- [14] Monici M, Fusi F, Paglierani M, et al. Modeled gravitational unloading triggers differentiation and apoptosis in preosteoclastic cells. *Cell Biochem*. 2006;98(1):65-80.

- [15] Ishizuka S, Kurihara N, Hiruma Y, et al. 1 α -25-Dihydroxy vitamin D(3)-26,23-lactam analogues function as vitamin D receptor antagonists in human and rodent cells. *Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;110(3-5):269-277.
- [16] Kobayashi Y, Mizoguchi T, Take I, et al. Prostaglandin E2 enhances osteoclastic differentiation of precursor cells through protein kinase A - dependent phosphorylation of TAK1. *Biol Chem.* 2005;280(12):1395-1403.
- [17] Xiao XH, Liao EY, Dong YY. *Nanhua Daxue Xuebao: Yixueban.* 2008;36(3):282-285.
肖新华, 廖二元, 董源媛. 小鼠单核细胞RAW264.7的细胞生物学特征[J]. *南华大学学报: 医学版*, 2008, 36(3):282-285.
- [18] Geng DC, Xu YZ, Yang HL, et al. Cannabinoid receptor-2 selective antagonist negatively regulates receptor activator of nuclear factor kappa B ligand mediated osteoclastogenesis. *Chin Med.* 2011;124(4):586-590.
- [19] Liu C, Walter TS, Huang P, et al. Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. *J Immunol.* 2010;184(12):6910-6919.
- [20] Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K. Role of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Bone Miner Metab.* 2000;12(18):177.
- [21] Lee SW, Kwak HB, Chung WJ, et al. Participation of protein kinase C β in osteoclast differentiation and function. *Bone.* 2003;32(17):217-227.
- [22] Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(18):7260-7264.
- [23] Lee SE, Chung WJ, Kwak HB, et al. Tumor Necrosis Factor- α Supports the Survival of Osteoclasts through the Activation of Akt and ERK. *Biol Chem.* 2001;276(52):49343-49349.
- [24] Takahashi N, Udagawa N, Kobayashi Y, et al. Generation of osteoclasts in vitro and assay of osteoclast activity. *Methods Mol Med.* 2007;135:285-301.
- [25] He X, Andersson G, Lindgren U, et al. Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264.7 cells through inhibition of ROS production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401(3):356-362.
- [26] Hu L, Lind T, Sundqvist A, et al. Retinoic acid increases proliferation of human osteoclast progenitors and inhibits RANKL-stimulated osteoclast differentiation by suppressing RANK. *PLoS One.* 2010;5(10):13305.
- [27] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-342.
- [28] Ferlin A, Pepe A, Faccioli A, et al. Relaxin stimulates osteoclast differentiation and activation. *Bone.* 2010;46(2):504-513.
- [29] Wu HY, Li J, Tang ZG. *Zhongguo Kangfu Yixue Zazhi.* 2005;20(4):248-250.
吴贺勇, 李娟, 唐井钢. 补肾中药对破骨细胞骨吸收功能的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(4):248-250.
- [30] Zhan HS, Shi YY, Zhao YF. *Zhongyao Xinyao yu Linchuang Yaoli.* 2001;12(5):326-328.
詹红生, 石印玉, 赵咏芳. 含补肾益精方的切卵大鼠血清对破骨细胞骨吸收功能的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2001, 12(5):326-328.
- [31] Chen M, Zheng Q, Fang ZH, et al. *Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi.* 2008;16(4):282-284.
陈明, 郑琼, 方真华, 等. 阿伦膦酸钠对骨髓生成破骨细胞骨吸收作用的影响[J]. *中国矫形外科杂志*, 2008, 16(4):282-284.