

补肾中药醇提活性部位预防卵巢摘除小鼠的骨丢失

陈亚琼 杨海燕 黄艳红 辛晓燕 吴曙光

【摘要】 目的 研究补肾中药醇提活性部位(AS-RKCH)对卵巢切除小鼠骨丢失的预防作用。**方法** 2月龄雌性昆明小鼠60只随机分为6组并进行相应的处理:假手术组和去卵巢组用溶剂灌胃,去卵巢+AS-RKCH低、中、高剂量组分别按100 mg, 200 mg, 400 mg·d⁻¹给药,去卵巢+雌二醇组用17 β -雌二醇10 μ g·d⁻¹给药。实验4周后,观察股骨的骨密度和骨生物力学性能及血的骨生化指标的变化。**结果** AS-RKCH处理4周后,低、中、高3个剂量组与去卵巢组相比,使股骨总骨密度分别增加了50%、47.2%、43.3% ($P < 0.05$), AS-RKCH中剂量组的结构力学性能有显著提高 ($P < 0.05$),中剂量组和高剂量组的最大载荷、最大挠度增加 ($P < 0.05$); AS-RKCH阻止了因卵巢切除导致的血清碱性磷酸酶和骨钙素水平升高 ($P < 0.05$)。**结论** AS-RKCH具有预防卵巢切除诱导的骨丢失作用。

【关键词】 补肾中药; 小鼠卵巢摘除; 骨密度; 碱性磷酸酶; 骨钙素

Active site from kidney-reinforcing Chinese herbal remedy prevents bone loss in ovariectomized mice
CHEN Yaqiong, YANG Haiyan, HUANG Yanhong, et al. Department of Obstetrics & Gynecology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To study active site from kidney-reinforcing Chinese herbs(AS-RKCH) as a preventive remedy against bone loss in ovariectomized mice. **Methods** Female Kunming mice ($n = 60$, 2 months old) were either sham-operated (sham, $n = 10$) or ovariectomized (OVX, $n = 50$). OVX mice were randomly assigned to 5 groups of 10 each: OVX + E₂ (17 β estradiol 10 μ g·d⁻¹), and the other groups were given AS-RKCH at the dose of 100, 200, 400 mg·d⁻¹ by oral gavages for 4 weeks, respectively. The sham + V and the OVX + V groups received vehicle. At the end of the study, the bone mineral density (BMD) of the left femur, the bone biomechanics of the right femur, and serum alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin were measured. **Results** The total BMD of left femur was increased in 3 AS-RKCH groups (+50%, +47.2% and 43.3% respectively vs. OVX group, $P < 0.05$). The structural behavior of bone was increased in OVX + E₂ group and AS-RKCH 200 mg group (vs. OVX group, $P < 0.05$). The peak load and the peak deflection were increased in AS-RKCH 200 mg and 400 mg groups (vs. OVX group, $P < 0.05$). The serum ALP and osteocalcin were significantly decreased in AS-RKCH groups (vs. OVX group, respectively, $P < 0.05$). **Conclusion** AS-RKCH may prevent bone loss in OVX mice.

【Key words】 Chinese herbal medicine; Kidney-reinforcing; Mice, ovariectomized; Bone loss; Alkaline phosphatase; Osteocalcin

绝经后骨质疏松是一种随绝经年龄增长,卵巢功能衰竭,而出现的全身骨量减少,病理性骨折发生危险性增高的代谢性骨病,属于原发性骨质疏松。随着人口老龄化,骨质疏松逐渐成为危害老年妇女健康的主要疾病之一。雌激素替代治疗是防治绝经后骨质疏松的有效手段,但长期使用雌激素可使患乳腺癌、子宫内膜癌危险性增高。因而寻找有效、副

作用少的治疗方法及药物具有重要的意义。长期临床实践及研究中发现一些具有补肾作用的中药在防治绝经后骨质疏松方面具有良好的作用,而副作用较少的优点。中医认为绝经后骨质疏松与“肾虚”有密切关系,通过补肾可使骨质疏松症状缓解,骨折发生减少,但其机理如何,值得深入研究。本实验观察了补肾中药醇提活性部位(AS-RKCH)对卵巢摘除小鼠骨密度、骨代谢指标和骨生物力学性能的变化,为中药防治绝经后骨质疏松提供实验依据。

基金项目:陕西省99自然科学基金资助项目

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院妇产科(陈亚琼、黄艳红、辛晓燕);武警总队医院妇产科(杨海燕);第一军医大学西京医院妇产科(吴曙光)

材料和方法

1. 实验药品、试剂及仪器: AS-RKCH 是将补肾中药复方(主要由刺五加、熟地、淫羊藿等组成)经乙醇萃取, 50℃溶解离心, 取上清液得到含有活性部位(AS-RKCH)的浸膏, 实验前用溶剂(2%乙醇+98%生理盐水)配制成相当于所需含生药浓度。其他试剂和试剂盒有 17β -雌二醇(Sigma)、血清总胆固醇试剂盒和血清碱性磷酸酶试剂盒(台湾标佳公司)、血清骨钙素放免试剂盒(北京原子能研究院同位素研究所)。实验仪器主要有双能 X 线骨密度仪(Lunar 公司)、1195 万能压力测试机(Instron 公司)、1275y 计数仪(LKB 公司)。

2. 动物饲养条件与处理: 雌性昆明小鼠购于本校实验动物中心, 饲养温度 22℃, 12 h 光照, 12 h 黑暗, 容许自由饮水及摄食。成年雌性昆明小鼠 60 只, 出生后 60 d, 质量(37 ± 2) g, 随机分为 6 组, 每组 10 只, 适应性饲养 5 d 后开始实验。

3. 卵巢摘除模型复制: 动物以 1% 戊巴比妥钠(0.1 g/kg)经腹腔麻醉后, 取背部下方横行切口, 剪除长毛, 切开皮肤 1 cm, 分别在脊柱两侧切开背肌 1 cm, 切口视野中可见一乳白色脂肪团, 用小镊子将脂肪团拉出切口外, 分离脂肪团, 见到粉红色卵巢, 摘除卵巢, 同法摘除另一侧的卵巢, 缝合伤口。假手术组小鼠仅去除卵巢周围少量脂肪组织。术后第 3 天开始阴道细胞涂片, 如连续 4 d 出现阴道上皮角化细胞证明造模成功。术后第 8 天开始药物灌胃。

4. 给药剂量及方法: 所有药物均用溶剂(2%乙醇+98%生理盐水)配制为所需的浓度, 每只小鼠灌胃 0.5 ml, 每日一次, 连续给药 28 d。AS-RKCH 按成人的每日用药量($0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 换算成每日每只小鼠用药剂量并分组如下: 卵巢摘除+溶剂(OVX+V, 0.5 ml)、假手术+溶剂(Sham+V, 0.5 ml)、卵巢摘除+雌二醇(OVX+E₂, 10 μg)、卵巢摘除+活性部位 1 组(OVX+AS-L, 100 mg)、OVX+AS-M(200 mg)、OVX+AS-H(400 mg)。全部动物在最后一次喂药(第 28 天)后 24 h, 处死并采集以下标本进行测定分析。

5. 骨密度(bone mineral density, BMD)测定^[3]: 左股骨取出后立即置入生理盐水, 4℃保存(不超过 24 h), 测定时取出, 在双能 X 线骨密度仪(DEXA)上测定左股骨骨密度。分析数据时, 将左股骨均分为 3 个部分: 股骨近段(proximal)、股骨中段(middle)、股

骨远段(distal), 分别测定股骨 3 个部分及总骨密度。

6. 骨生物力学测试^[4]: 动物处死后取出右侧股骨, 用生理盐水纱布包裹后置入 -20℃保存, 测定时取出放入生理盐水中, 室温(20℃)下浸泡复温 3~4 h, 采用 3 点弯曲试验方法。应用 INSTRON-1195 型万能材料试验机进行测试。置右侧股骨于距为 10 mm 的支架上, 以 1 mm/min 的速度下压股骨中段, 记录载荷-变形曲线, 并测量股骨中段的内外径。

7. 血清分析: 小鼠摘除眼球取血 1~1.5 ml, 血标本置 4℃冰箱内冷藏静置 24 h 后经 15 000 rpm 离心 15 min, 分离血清。血清碱性磷酸酶(ALP)测定使用对硝基苯磷酸盐法, 血清骨钙素(OC)水平测定采用放免分析法。

8. 统计学方法: 全部数据用 mean $\pm$ SEM 表示, 使用 SPSS 8.0 统计软件, *t* 检验比较各组间的差异。

结 果

1. 对骨密度的影响

OVX+AS-L、OVX+AS-M 及 OVX+AS-H 组小鼠去卵巢后 4 周股骨总骨密度增加(见图 1), 分别为 +50%、+47.2% 及 43.3% (vs. Sham+V, $P < 0.05$), 与 E₂ 作用一致(+60%)。卵巢摘除后, 左侧股骨近段、中段及远段 3 个部分的骨密度显著下降, 分别下降 28.67%、33.6% 和 34.3% (vs. Sham+V, $P < 0.05$)。与 OVX+V 比较, AS-RKCH 的低、中、高 3 个剂量组增加左侧股骨近段的骨密度值分别为 +101.04%、+61.02% 及 +111.11% ($P < 0.05$); OVX+AS-M 组使股骨中段的骨密度增加 45.86% ($P < 0.05$), 而 OVX+AS-L 及 OVX+AS-H 组无明显变化($P > 0.05$); OVX+AS-L 和 OVX+AS-M 组可使股骨远段骨密度分别增加 23.96% 和 +27.86% ($P < 0.05$), 而 OVX+AS-H 组无统计学意义($P > 0.05$)。

2. 对骨生物力学指标的影响

各组小鼠右侧股骨 3 点弯曲实验骨的结构力学和材料力学测试指标结果见表 1。在加载速度为 1 mm/min 的条件下, OVX 小鼠右侧股骨的最大载荷(ultimate load, UL)、弹性载荷(elastic load, EL)、最大挠度(ultimate deformation, UD)和弹性挠度(elastic deformation, ED)均比 Sham+V 组明显降低($P < 0.05$)。AS-RKCH 的 3 个剂量处理组中, OVX+AS-M 组的骨的结构力学性能有显著改善($P < 0.05$), OVX+AS-M 组和 OVX+AS-H 组的最大载荷、最大挠度

增加($P < 0.05$)。E₂可显著增强骨的结构力学性能($P < 0.05$)。

3. 对骨转换指标的影响(表2)

对血清 ALP 的影响:小鼠去卵巢后 4 周血清 ALP 水平显著升高(+26.89%)(vs. Sham + V, $P < 0.05$),OVX + AS - L、OVX + AS - M 及 OVX + AS - H 组均显著降低血清 ALP 水平,分别下降 22%、14%、8%;OVX + AS - M 组的 ALP 水平显著高于 Sham + V 组,低于 OVX + V 组。对血清 OC 的影响:小鼠去卵巢后 4 周血清 OC 水平显著升高(+74.39%)(vs. Sham + V, $P < 0.05$),同样 OVX + AS - L、OVX + AS - M 及 OVX + AS - H 组可分别使去卵巢小鼠血清 OC 下降 17%、22% 和 27%(vs. OVX + V, $P < 0.05$),但这种下降幅度明显小于 E₂ 的作用,AS 各组与 E₂ 组比较有显著性差异。OVX + AS - M 组的 OC 水平显著高于 Sham 组,低于 OVX + V 组。

表 1 AS-RKCH 对骨质疏松小鼠右侧股骨结构力学性能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	最大负荷 (kg)	弹性负荷 (kg)	最大挠度 (mm)	弹性挠度 (mm)
OVX + V	18.2 ± 0.6	13.3 ± 1.8	0.019 ± 0.002	0.024 ± 0.002
Sham + V	23.1 ± 1.5*	21.0 ± 1.2*	0.024 ± 0.004*	0.035 ± 0.004*
OVX + AS - L	21.8 ± 2.1*	16.7 ± 2.8	0.016 ± 0.005	0.026 ± 0.007
OVX + AS - M	21.9 ± 2.7*	18.3 ± 1.9*	0.022 ± 0.003*	0.035 ± 0.004*
OVX + AS - H	16.7 ± 2.0	13.0 ± 1.4	0.023 ± 0.007	0.034 ± 0.006*
OVX + E ₂	22.0 ± 3.1*	18.2 ± 2.0*	0.023 ± 0.003*	0.032 ± 0.004*

注: $n = 6$, 与 OVX + V 组比, * $P < 0.05$

表 2 AS-RKCH 对去卵巢小鼠血清碱性磷酸酶和骨钙素的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 天/鼠	ALP (U·L ⁻¹)	OC (ng·ml ⁻¹)
OVX	-	161 ± 41	89 ± 31
Sham + V	-	121 ± 19*	51 ± 19*
Sham + AS - M	200 mg	140 ± 14* ^b	65 ± 12* ^b
OVX + AS - L	100 mg	126 ± 21*	74 ± 17* ^b
OVX + AS - M	200 mg	138 ± 28*	69 ± 18* ^b
OVX + AS - H	400 mg	148 ± 27*	65 ± 21* ^b
OVX + E ₂	10 μg	123 ± 25*	40 ± 11*

注: $n = 6$, 与 OVX + V 组比 * $P < 0.05$; 与假手术组相比, ^b $P < 0.05$

讨 论

1. 肾虚与骨质疏松^[6-13]

妇女绝经或卵巢切除术后,由于体内雌激素水平的降低,而使骨代谢呈负平衡,骨吸收增强,骨量

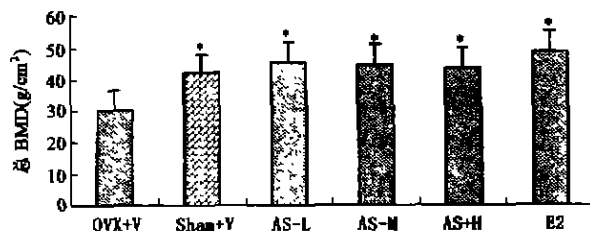


图 1 AS-RKCH 不同剂量对去卵巢小鼠左侧股骨总 BMD 的影响

注: 与 OVX + V 组相比 * $P < 0.05$

逐步丧失,即破骨细胞性骨吸收增加,成骨细胞性骨形成相对减弱,机体每完成一个骨重建周期将会损失部分骨量,在若干周期后就形成了骨质疏松。中医将绝经后骨质疏松的原因主要归结为肾虚。从现代中西医结合的研究资料看,中医的“肾”涉及到内分泌、神经、免疫、代谢等多种系统及功能,对全身的生理功能起调节、整合作用,特别对人的生长发育、繁衍后代及衰老有重要调控作用。根据中医“肾主骨”的理论,肾精不足,肾气虚衰是导致绝经后骨质疏松发生的重要原因。这一理论与现代医学对骨质疏松的认识一致,即骨质疏松不仅仅是骨代谢的改变,而且是全身性改变,即内分泌、代谢系统的功能衰退在骨骼系统中的反映。现代研究证实,肾虚证是以下丘脑-垂体-多个靶腺系统功能紊乱,全身生理机能减退为特征的一种机体反应状态。绝经后骨质疏松当属肾虚范畴。近年来采用补肾法治疗绝经后骨质疏松已取得显著疗效。补肾中药临床使用效果与实验研究相似,与其他治疗药物相比,最独具特色和显著优势表现为迅速改善软弱无力、腰膝酸软等肾虚症状,许多患者在骨指标无明显改善时,临床症状已消失,治疗的顺从性较好。目前认为,补肾中药既有全身作用,也有局部调节;既能促进骨生成,也可抑制骨吸收,是通过多靶点多环节的综合作用达到防治绝经后骨质疏松的目的。

2. 肾虚与动物模型^[13-18]

妇女绝经或人为去除卵巢后骨骼的改变中,主要以松质骨的丢失明显,而皮质骨丢失较少,骨密度下降和骨形成指标 ALP、OC 大大升高等为特点。在对绝经后骨质疏松的研究中,通过摘除卵巢可以制造成功理想的骨质疏松动物模型。多数研究选择大鼠作为研究对象,因为去卵巢大鼠动物模型几乎完整地再现了绝经后骨质疏松的发展过程。同时,去卵巢动物也是中医界认可的研究肾主骨良好模型,特别在摘除卵巢后早期阶段,动物常表现出一系列

典型的肾阳虚症状,用补肾药物治疗可使这些症状缓解或消失,证明此模型的可靠性。近年来随着转基因和基因敲除动物的大量涌现,部分学者认为小鼠也可作为研究骨质疏松的理想模型,但目前关于这方面的研究报道还较少。本实验中我们采用摘除雌性昆明小鼠卵巢作为研究对象,发现成年小鼠在去卵巢4周后,出现股骨骨密度降低,骨形成指标ALP、OC升高,骨的生物力学性能降低等变化,这些改变与妇女绝经后骨质疏松的改变类似,我们的实验证明,去卵巢小鼠既是较理想的骨质疏松动物模型,也是理想的肾虚模型,而且还具有来源方便、价廉等优点。

3. AS-RKCH对骨形成指标的影响^[18-21]

成骨细胞是骨代谢的重要功能细胞。成骨细胞内含有大量的ALP,血中ALP的40%~50%来源于骨,ALP的活性可反映成骨细胞,特别是新形成的成骨细胞的活性及状态。雌激素减少或缺乏使其对破骨作用的抑制解除,骨吸收显著增加,随之骨形成也增加,即高转换型骨质疏松,使得ALP值也升高。另外,高转换型骨质疏松的主要生化特征之一,是OC的增高。OC是由成骨细胞合成和分泌的特异性非胶原蛋白,代表骨的形成状况。当骨的形成与骨的吸收偶联时,OC值代表了骨转换速率的快慢,而当骨形成与骨吸收脱偶联时,则反映骨形成的情况。本实验中小鼠卵巢摘除后骨密度降低,骨丢失增多,反映骨形成的指标ALP、OC也明显增高,符合绝经后骨质疏松症的病理特点,表明去卵巢后骨吸收增加与骨形成增加同时存在。AS-RKCH阻止去卵巢小鼠血清ALP、OC的升高,显示使其降低骨转换的作用,虽然降低血清ALP和OC的作用远远低于雌激素,但增加骨密度的作用则与雌激素的效果相同。我们认为这可能是AS-RKCH纠正了因雌激素水平低下导致骨转换率增加,改善骨吸收与骨形成偶联失衡状况,同时促进了骨的形成,只有这样才有可能使骨密度增加。

4. 对骨生物力学的影响^[4,13,22-26]

骨质量包括骨的结构、骨量和骨的强度3个方面,只有动物实验能提供可能性来直接检测骨的这3个方面的参数。对小鼠骨生物力学测试以弯曲试验最适用,常用的为3点弯曲试验。测定骨组织在外力作用下的力学特性和骨在受力后的生物学效应,是对骨质量进行评定的一种可靠方法。本实验中小鼠去卵巢后4周,其结构力学参数明显下降,表

明去卵巢后骨抵抗变形和破坏的能力下降,雌激素可显著阻止骨结构力学性能的下降。骨质疏松模型小鼠用AS-RKCH后其最大载荷、弹性载荷、挠度及变形挠度等结构力学参数都有提高,表明AS-RKCH可提高骨骼抵抗外力冲击的能力。其他关于补肾中药对去卵巢动物模型骨生物力学性能研究有限的报道与本实验一致,表明补肾中药可提高去卵巢骨质疏松模型动物骨生物力学性能,增加骨组织的承载能力,提高骨骼抵抗外力冲击的能力,可有效地防治去卵巢后引起的骨质疏松,减少骨折的发生。

5. AS-RKCH作用的物质基础^[24-26]

中药复方是在中医理论指导下,根据“君臣佐使”的组成原则,有多种单味药构成的统一体。而中药复方长期临床应用有效的物质基础正是其中的化学成分。从研究有效的化学成分的角度出发,可以把中药复方看成为以下3种状态:(1)复方中药的有效成分是每味中药的有效成分的总和,其药理作用是每个有效成分的加和、协同、或互补。(2)复方中药的有效成分不仅是每味中药有效成分的总和,还在复方中药在制成制剂时各种成分的相互作用,这些相互作用有简单的物理变化,也有复杂的化学变化,各种成分的相互作用可以改变各种成分的溶出性质和凝集状态,也可以在发生化学反应后产生新的物质。(3)复方中药的复杂成分最终要被体内吸收进入血液,从而发挥药理作用。因此可以暂时不考虑复方中药到底有多少成分,而只考虑在血液中发挥生理效应的哪些成分。这些成分部分以游离状态存在,部分与大分子结合的状态存在。因此,研究复方制剂在血液中的可检测成分及其相应的药理作用,可以直接了解复方中药真正起作用的化学物质。AS-RKCH是从临床有效的经典补肾复方中经一定工艺提取而来。原方在临床应用中发现治疗更年期综合症有好的疗效,表现出部分雌激素样效应,动物实验也证实有弱雌激素样作用,因此推测,此复方中应该含有能与雌激素(ER)受体结合或起作用的物质。

有关植物雌激素的研究成果给予我们很好的启示。植物雌激素是存在于植物药之中,具有能与ER结合、诱导产生雌激素样作用的一类化学物质。自1926年首次报道植物提取物具有雌激素样活性以来,已发现有数百种植物含有雌激素样活性成分。研究较清楚的主要有异黄酮(isoflavone)、木脂素(lignan)和香豆雌酚(coumestrol)。由于异黄酮的结

构和分子与 E_2 类似,能与 ER 竞争性结合,但其活性仅为 E_2 的 1/1000,因此表现出弱雌激素活性或抗雌激素活性,被认为是防治绝经相关疾病的天然药物而成为人们关注的热点。人体试验也初步证明植物雌激素及其类似物可使绝经后老年骨质疏松患者储备和骨密度改善,骨代谢指标变化;抑制绝经前、围绝经期妇女的骨密度和骨量的丢失,有效地预防绝经后骨质疏松。异黄酮的作用类似于选择性雌激素受体调节剂,对子宫无明显刺激作用,可预防和降低乳腺癌的发病率。异黄酮的弱雌激素作用在减少围绝经期潮热和阴道干涩症状,预防心血管疾病等方面显现出良好的前景。

总之,本实验为中医“肾主骨”理论提供了实验证据,证明补肾中药对防止去卵巢后雌激素缺乏引起的骨质丢失有良好的作用,植物雌激素的研究进展为阐明中药复方的复杂作用机制中的部分通路提供了可参考的依据。根据已有的资料显示,补肾中药复方组成的方药中含有异黄酮、 β -谷甾醇等植物雌激素成分^[27-31],有理由推测,AS-RKCH 表现出的雌激素样作用与其组成中的异黄酮成分有关,但详尽的作用机理还有待于进一步的深入研究。

参 考 文 献

- 徐淑云,卞如濂,陈修,主编.药理学实验方法学.第2版.北京:人民卫生出版社,1991.1293-1297.
- 施新猷,编著.医学实验动物学.西安:陕西科学技术出版社,1989.352-354.
- 王学姹,戴力明,韩健,等.龟鹿散与钙剂对去卵巢大鼠骨重量、骨密度、骨强度的影响.中国骨质疏松杂志,2000,6(1):74-77.
- 秦岭,梁国德.骨生物力学在防止骨质疏松药物开发药物中的应用基础.中国骨质疏松杂志,2000,6(1):23-25,68.
- Francisco JL. New approaches to the treatment of osteoporosis. Curr Opin Chem Biol, 2000, 4: 383-393.
- NIH Consensus Development Panel. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMM, 2001, 6: 785-795.
- 刘忠厚,主编.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998.529-534.
- 丁桂芝,刘忠厚,周男.中西医结合防治骨质疏松基础与临床研究进展.中国骨质疏松杂志,1997,2:81-84.
- 王文健.肾主骨理论与中西医结合治疗骨质疏松症的临床研究.中国骨质疏松杂志,1998,4(4):42-44.
- 王吕生,许昕,金敬善,等.益肾强骨丸治疗女性骨质疏松症的临床研究.中国骨质疏松杂志,1997,3(4):61-63.
- 沈霖,杜靖远,杨家玉,等.补肾法防治绝经后妇女骨质丢失的临床研究.中国中西医结合杂志,1994,14(9):515-518.
- 卞美瑞,王莹,袁莉云,等.骨松宝在手术绝经后妇女预防和治疗骨质疏松症的初步观察.中国骨质疏松杂志,1998,4(4):56-59.
- 王健智,冯坤,张灵菊,等.中药强骨颗粒对卵巢切除后骨质疏松

- 大鼠骨骼力学性能的影响.中医正骨,1999,11(7):6-7.
- 吕肖峰,叶雪清.补肾中药和雌激素对去势雌性大鼠下丘脑源性阿片肽影响的研究.中医杂志,1988,29(5):58-59.
- 郝永强,戴克戎.去势法建立骨质疏松实验模型的动物选择及评价.中华实验外科杂志,1998,15(3):286-287.
- Ishimi Y, Arni N, Wang X, et al. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 274: 697-701. PMID: 10924338.
- Migliaccio S, Newbold RR, Teti A, et al. Transient estrogen exposure of female mice during early development permanently affects osteoclastogenesis in adulthood. Bone, 2000, 27: 47-52.
- Yamaguchi K, Yada M, Tsuji T, et al. Suppressive effect of norzoanthamine hydrochloride on experimental osteoporosis in ovariectomized mice. Biol Pharm Bull, 1999, 22: 920-924.
- Gundberg CM. Biochemical markers of bone formation (Review). Clin Lab Med, 2000, 20: 489-501.
- Dominguez Cabrera C, Sosa HM, et al. Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. Osteoporosis Int, 1998, 8: 147-151.
- Looker AC, Bauer DC, Chesnut CH, et al. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling: current status and future directions (Review). Osteoporosis Int, 2000, 11: 467-480.
- Turner RT, Haich YF, Muller R, et al. Variation in bone biomechanical properties, microstructure, and density in BXH recombinant inbred mice. J Bone Miner Res, 2001, 16: 206-213.
- Klein RF, Shea M, Guinness ME, et al. Phenotypic characterization of mice bred for high and low peak bone mass. J Bone Miner Res, 2001, 16: 63-71.
- Akhter MP, Iwaniec UT, Covey MA, et al. Genetic variations in bone density, histomorphometry, and strength in mice. Calcif Tissue Int, 2000, 67: 337-344.
- Blizotes M, McLoughlin S, Guinness M, et al. Bone histomorphometric and biomechanical abnormalities in mice homozygous for deletion of the dopamine transporter gene. Bone, 2000, 26: 15-19.
- Janusz T, Jalovaara P, Pent Z, et al. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. Bone, 1998, 23: 155-161.
- Fitzpatrick AL. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens: new therapies for the postmenopausal women. Mayo Clin Proc, 1999, 6: 601-607.
- Vincent A, Fitzpatrick LK. Soy isoflavone: are they useful in menopause? Mayo Clin Proc, 2000, 75: 1174-1184.
- Ishimi Y, Miyaura C, Chumura M. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. Endocrinology, 1999, 4: 1893-1900.
- Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. Osteoporosis Int, 1998, 3: 274-281.
- Picherit C, Benoitau-Pelissier C, Chanteranne B. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. J Nut, 2001, 3: 723-728.