

密骨颗粒对去卵巢大鼠 TGF- β 1 表达的影响

任艳玲 郑洪新 杜松

【摘要】 目的 观察密骨颗粒对去卵巢大鼠 TGF- β 1 表达的影响,探讨其对绝经后骨质疏松症的预防机制。**方法** 运用切除大鼠双侧卵巢方法建立骨质疏松症模型,应用中药密骨颗粒防治 12 周,采用双能 X 线骨密度测定法、Elisa、免疫组化 SABC 法、反转录聚合酶链方法,分别观察其对实验鼠离体骨密度、血清 TGF- β 1 活性及其在骨组织中的蛋白和 mRNA 表达的影响。**结果** 中药密骨颗粒可以显著升高骨密度,提高血清 TGF- β 1 活性,上调其在骨组织中的 mRNA 和蛋白表达水平,其蛋白广泛表达于胫骨干骺端。**结论** 中药密骨颗粒可通过调节 TGF- β 1 活性及其 mRNA 表达水平而对去卵巢大鼠骨质疏松有预防或延缓发生的作用。

【关键词】 骨质疏松症; 转化生长因子- β ; 益气生精

Effects of Mi Gu granule on expression of TGF- β 1 in OVX osteoporotic rat REN Yanling, ZHENG Hongxin, DU Song. Liaoning college of traditional Chinese Medicine. Shenyang 110032, China

【Abstract】 Objective To study the effects of Chinese herbal preparation Mi Gu granule on expression of TGF- β 1 in OVX rats, and the mechanism of the Chinese medicine in preventing and treating menopausal osteoporosis. **Methods** Rat model of primary osteoporosis was developed by ovariectomy. After the rats were administered Mi Gu granule for 12 weeks, the bone mineral density (BMD) of the rat femur, the activity of the TGF- β 1 in the rat serum, and the expression of TGF- β 1 in the bone tissue were determined by DEXA, ELISA, immunohistochemistry, and RT-PCR, respectively. **Results** Mi Gu increased the BMD dramatically, stimulated the activity of TGF- β 1 in the serum, promoted the expression of TGF- β 1 mRNA in the bone tissue, and its protein expression was located mainly at the epiphysis of the bone. **Conclusion** Mi Gu prevents and delays the osteoporosis in OVX rats by regulating the activity of TGF- β 1 and the expression level of the TGF- β 1 mRNA.

【Key words】 Osteoporosis; Transforming growth factor- β 1; Mi Gu granule

转化生长因子- β (TGF- β)是一种对骨有强大调节作用的生长因子,其在骨基质中的含量为 0.1 mg/kg 干重,是骨中含量最丰富的生长因子^[1]。TGF- β 对骨形成具有明显促进作用,是骨形成、骨重建过程中的关键调节因子。以往研究证实,补肾健脾,益气生精中药对绝经后骨质疏松症有明显的防治作用^[2],本实验采用卵巢切除所致骨质疏松大鼠模型为观察对象,通过对益气生精中药密骨颗粒调控 TGF- β 1 表达的研究,阐明 TGF- β 1 在密骨颗粒防治原发性骨质疏松症中的作用,对揭示益气生精中药防治原发性骨质疏松症的作用机制有重要意义。

材料和方法

1. 材料

(1)实验动物

清洁级雌性 SD 大鼠 84 只(体重 260 ~ 300 g, 4.5 月龄,未曾交配),购于上海西普尔-必凯实验动物中心(沪动合证字 152 号)。

(2)主要试剂和药品

益气生精、补肾壮骨方药即密骨颗粒剂(辽宁省中药新药研制开发中心制剂室批号:200108);骨质疏松康颗粒剂(东港市康辰制药有限公司,批号:020305),TGF- β 1 E_{max}® ImmunoAssay System 试剂盒(Promeg 公司),兔抗大鼠 TGF- β 1 一抗(Santa Cruz 公司),即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(博士德公司),DAB 显色试剂盒(博士德公司)TRIzol(Gibco BRL 公司),TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver.2.1 试

基金项目:国家中医药管理局科研项目(2000-J-P-08),沈阳市科委自然科学基金(1022045-1-04)

作者单位:110032 沈阳,辽宁中医学院基础部

剂盒 (TaKaRa 公司), 100 bp DNA Ladder Marker (TaKaRa 公司), TGF- β 1、 β -actin 引物 (由 TaKaRa 公司合成), 余为进口或国产分析纯。

(3) 主要仪器

XR-36 型双能 X 线骨密度仪 (美国, Norland), 550 型微孔板酶标仪 (美国, BIO-RAD) 9700 型, PCR 扩增仪 (美国, PE Applied Biosystems), DU640 核酸蛋白分析仪 (美国, Beckman), MODEL 250 电泳仪 (美国, GIBCO BRL), GIS-700D 数码凝胶图像处理系统 (上海, 天能) 等。

2. 方法

(1) 实验动物的饲养

动物购进后, 饲养于环境温度 (20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 每日 12 h 光照 (7 am ~ 7 pm), 12 h 黑暗 (7 pm ~ 7 am) 的 SPF 级实验室, 自由进食大鼠无菌全价颗粒饲料 (沈阳市于洪区前民饲料厂), 饮用高压消毒的自来水。适应环境 4 d, 进入实验状态。按体重分层随机分组, 正常组 12 只, 余者进行造模处理。

(2) 骨质疏松大鼠模型的建立方法

除正常对照组外, 大鼠以 20% 氨基甲酸乙酯 (乌拉坦) 肌肉注射麻醉, 0.3 ml/100 g 体重, 从大鼠腰背部脊柱两侧入路切除大鼠双侧卵巢。术后给与青霉素肌肉注射, 0.1 ml/只 (2 万单位)。

(3) 动物分组及给药方法

术后 7 d 将卵巢切除组存活者按体重分层随机分为 6 组, 并开始给药, 即模型空白组、密骨颗粒小剂量组、密骨颗粒中剂量组、密骨颗粒大剂量组、骨质疏松康对照组。其中骨质疏松康对照组给药剂量为 6 g/kg 体重; 密骨颗粒组 (小剂量) 给药量 3 g/kg 体重; 密骨颗粒组 (中剂量) 为 6 g/kg 体重; 密骨颗粒组 (大剂量) 给药量 12 g/kg 体重; 中药组 1 次/d, 灌胃; 正常组、模型空白组每天灌胃等体积的生理盐水, 每天上午给药, 连续给药 12 周。存活动物在最后一次给药后 24 h, 处死并采集标本进行测定分析。

(4) 大鼠离体股骨骨密度检测

取左后肢股骨, 剔除肌肉及筋膜, 生理盐水冲洗后, 用塑料保鲜袋装好, 置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。应用 XR-36 型双能 X 线骨密度仪及其所附的 "The Small Subject Scout Scan" 软件测量。扫描宽 15 cm, 长度可任意调节, 扫描速度 80 mm/sec, 分辨率为 3.0 $\times$ 3.0 mm。据文献 [3] 确定股骨兴趣区, 对股骨整体、股骨近端 (为股骨近侧干骺端 1/3), 股骨远端 (为股骨远侧干骺端 1/4) 进行骨密度分析, 批内 CV 在 0.82% ~ 1.24。

(5) 大鼠血清 TGF- β 1 活性的检测

防治用药 12 周后, 以 20% 乌拉坦肌肉麻醉, 0.3 ml/100 g 体重, 腹主动脉取血。室温静置 4 h, 然后 3000 r/min, 离心 30 min, 取血清, 分装, -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 采用 ELISA 方法检测。

(6) 大鼠骨组织 TGF- β 1 免疫组化的检测

取右后肢胫骨上端骨髓部分, 仔细剥离附着肌肉、结缔组织, 放入 4% 多聚甲醛/0.1 mol 磷酸盐缓冲液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h 后, 放入 10% EDTA 脱钙液中, 脱钙数周, 每周换脱钙液 1 次, 至可以用大头针能轻轻刺进为度, 采用免疫组化 SABC 法检测。PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。取各组免疫组化染色的片子 2 张, 每张片子随机取 10 个高倍视野, CoolSnapfx/AX70 数码相机照相, Meta Morph 显微图像分析系统进行灰度分析。

(7) 大鼠骨组织 TGF- β 1 mRNA 表达的检测

总 RNA 的提取: 取右后肢股骨干骺端, 仔细剥离附着肌肉、结缔组织, 用 0.1% DEPC 水处理的铝箔纸包好, 做好标记, 立即放入液氮罐中, 置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。用 TRIzol 提取骨组织总 RNA, 核酸蛋白分析仪测定总 RNA 浓度和纯度, 重复测定 3 次, A260 nm 和 A280 nm 之比值应在 1.8 ~ 2.1 之间, 计算样品总 RNA 浓度, 根据测定值调整 RNA 标本浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

反转录反应: 将骨组织总 RNA 逆转录为 cDNA, 20 μl 反应体系中含有 25 mmol MgCl_2 4 μl , 10 $\times$ RNA PCR Buffer 2 μl , Rnase Free dH_2O 8.5 μl , 各 10 mM dNTP Mixture 2 μl , 40 U/ μl Rnase Inhibitor 0.5 μl , 5 U/ μl Reverse Transcriptase 1 μl , 2.5 pmol/ μl OligodT-Adaptor Primer 1 μl , 1 μg total RNA sample 1 μl , 按以下条件进行反转录反应: 30 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 最后降至 4 $^{\circ}\text{C}$ 取出, 进行 PCR 反应。PCR 反应: TGF- β 1 物设计参照 Genbank: NM 021578 挪威大鼠 TGF- β 1 基因编码区 cDNA 序列, 利用 primer3 软件设计, 其上游引物为: 5'-CCAAGGAGACGGAA-TACAGG-3'; 下游引物为: 5'-GTGTTGTTGTAGAGGGCAAG-3'; 扩增片段长 412 bp (1039-1450)。以 β -actin 基因作为 PCR 的内参照, 其上游引物为: 5'-CCAAG-GAGACGGAATACAGG-3'; 下游引物为: 5'-GTGTTG-TTGTTAGAGGGCAAG-3'; 扩增片段长 535 bp。以 cDNA 为模板按以下条件 PCR 反应扩增 TGF- β 1 片段, 25 μl , PCR 反应体系中含有: 25 mM MgCl_2 15 μl , 10 $\times$ RNA PCR Buffer 2 μl , 5 U/ μl TaKaRa Taq $^{\text{TM}}$ 0.15 μl , 20 pmol Downstream Primer 0.5 μl , 20 pmol Upstream

Primer 0.5 μ l, RT 反应液 5 μ l, 灭菌蒸馏水 15.35 μ l; 按以下条件扩增: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s 的循环, 共 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应完成后取 10 μ l PCR 反应液, 经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 并以 100 bp DNA Ladder 的 PCR Marker 为分子量标准, 以 β -Actin 为内参照, 应用 GIS-700D 数码凝胶图像处理系统进行半定量分析, 即以 TGF- β 1/ β -Actin 的密度比值表示 TGF- β 1mRNA 的相对表达水平。

(8)统计方法: 计量数据采用 SPSS10.0 软件处理, 用 ONE-Way ANOVA 进行分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

结 果

1. 实验大鼠离体股骨骨密度的比较

与正常组比较, 各组大鼠离体股骨整体、股骨近端、股骨远端的骨密度显著下降, $P < 0.01$; 给药 12 周后, 与模型空白组比较, 密骨颗粒各剂量组、骨疏康对照组骨密度均明显增加, $P < 0.05$; 各用药组间差异无显著性, $P > 0.05$ (表 1)。

表 1 各组大鼠股骨离体骨密度(BMD)的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数 (只)	股骨整体 (g/cm ²)	股骨近端 (g/cm ²)	股骨远端 (g/cm ²)
正常组	12	0.1158 $\pm$ 0.0094**	0.1148 $\pm$ 0.0063**	0.1211 $\pm$ 0.0048**
模型空白组	13	0.1024 $\pm$ 0.0043 $\Delta\Delta$	0.1029 $\pm$ 0.0062 $\Delta\Delta$	0.1053 $\pm$ 0.0074 $\Delta\Delta$
密骨小剂量组	13	0.1192 $\pm$ 0.0036**	0.1103 $\pm$ 0.0033*	0.1167 $\pm$ 0.0036**
密骨中剂量组	12	0.1203 $\pm$ 0.0063**	0.1178 $\pm$ 0.0072**	0.1172 $\pm$ 0.0066**
密骨大剂量组	12	0.1183 $\pm$ 0.0073**	0.1203 $\pm$ 0.0096**	0.1183 $\pm$ 0.0044**
骨疏康对照组	13	0.1182 $\pm$ 0.0073**	0.1186 $\pm$ 0.0137**	0.1168 $\pm$ 0.0043**

注: 与模型组比较* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 与正常组比较 Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

05, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

2. 实验大鼠血清 TGF- β 1 活性的比较

与正常组比较, 模型空白组血清中 TGF- β 1 活性显著下降, 差异显著, $P < 0.01$; 与模型空白组比较, 密骨颗粒各剂量组、骨疏康对照组防治用药 12 周后, 可显著提高血清中 TGF- β 1 活性, 差异有显著性, $P < 0.05$ (表 2)。

表 2 实验动物 Elisa 检测血清 TGF- β 1 活性的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	TGF- β 1 浓度(n/ml)
正常组	12	4.1260 $\pm$ 0.2371**
模型空白组	13	3.5425 $\pm$ 0.3391 $\Delta\Delta$
密骨小剂量组	13	4.0500 $\pm$ 0.2958*
密骨中剂量组	12	4.7250 $\pm$ 0.6661**
密骨大剂量组	12	4.6310 $\pm$ 0.6130**
骨疏康对照组	13	4.4750 $\pm$ 0.4852**

注: 与模型组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与正常组比较 Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

3. 实验大鼠 TGF- β 1 在骨组织中的免疫组化结果比较

光镜下见正常组 TGF- β 1 主要表达于骨小梁周围的成骨细胞、骨基质。在胞体突起较多的成骨细胞染色较深, 其胞质、胞核均有阳性染色, 呈棕黄色弥漫成片(图 1-①); 与正常组比较, 模型空白组 TGF- β 1 的表达范围未变, 但其中成骨细胞染色程度明显下降(图 1-②); 与模型空白组比较, 密骨颗粒剂各组及骨疏康对照组在防治用药 12 周后, TGF- β 1 染色明显增强, 呈融合状(图 1-③、图 1-④)。阴性对照组未见棕黄色着色。

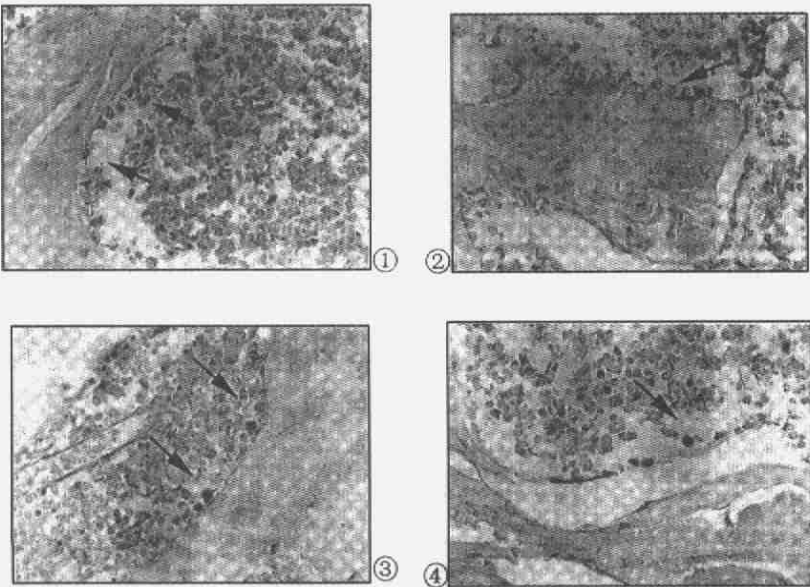
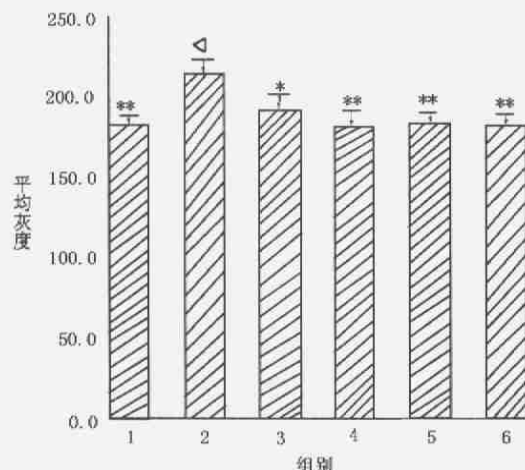


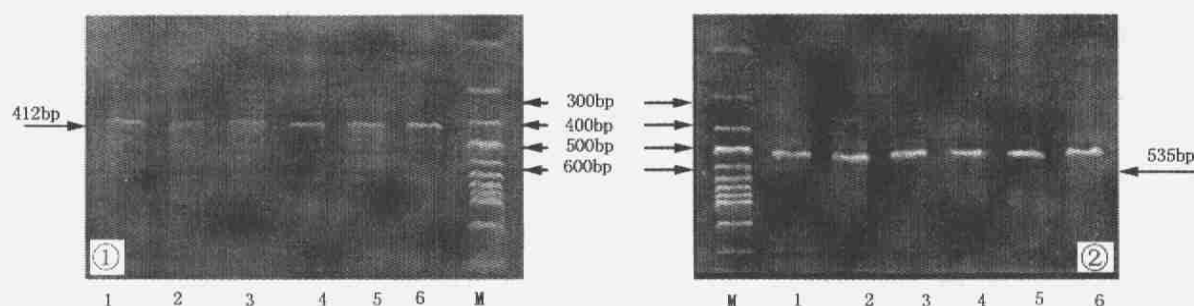
图 1 TGF- β 1 在骨组织中的免疫组化结果①为正常组;②为模型空白组;③为密骨颗粒剂④为骨疏康对照组。免疫组化染色 $\times 400$

Meta Morph 显微图像分析系统分析结果表明:与正常组比较,模型空白组平均灰度值显著升高, $P < 0.05$; 密骨颗粒各剂量组及骨疏康对照组用药 12 w 后, 平均灰度值显著下降, $P < 0.05$ (图 2)。



1 为正常组;2 为模型空白组;3 为密骨颗粒小剂量组;4 为密骨颗粒中剂量组;5 为密骨颗粒大剂量组;6 为骨疏康组。与模型空白组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与正常组比较 Δ $P < 0.01$

图 2 TGF-β1 在骨组织中的免疫组化灰度值比较



1 为正常组;2 为模型空白组;3 为密骨颗粒小剂量组;4 为密骨颗粒中剂量组;5 为密骨颗粒大剂量组;6 为骨疏康组 M-100bp DNA Ladder Marker

图 3 大鼠骨组织 TGF-β1、β-actin 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

式调节其自身的增殖、分化及代谢。在成骨细胞分泌的 TGF-β 中, TGF-β1 占大多数, 并且主要存在于骨基质中。在成骨细胞的区带中存在有 TGF-β 及其受体, 它的数量与细胞增殖的活性、增殖细胞的核抗原和骨密度有关^[4], 在转基因小鼠中发现, TGF-β 增加成骨细胞分化, 增加骨髓基质中骨细胞的浓度; TGF-β 诱导成骨细胞分化, 刺激破骨细胞的活性改变, 引起骨吸收改变^[5]。

而且, 发现骨质疏松病人 TGF-β1 基因变异率明显高于正常人, TGF-β1 基因变异者表现为骨转换加快、明显骨量丢失^[6]。多态性研究发现, TGF-β1 基因 T/C 多态性决定了骨的质量, T 等位基因对于绝经的妇女来说是一种高危因子, 比较腰椎的骨密度 (BMD), CC 基因型人群 BMD 较 TC、TT 基因型人群明显增高; 比较血清中 TGF-β1 浓度也得出同样结

4. 实验大鼠骨组织 TGF-β1 mRNA 的表达

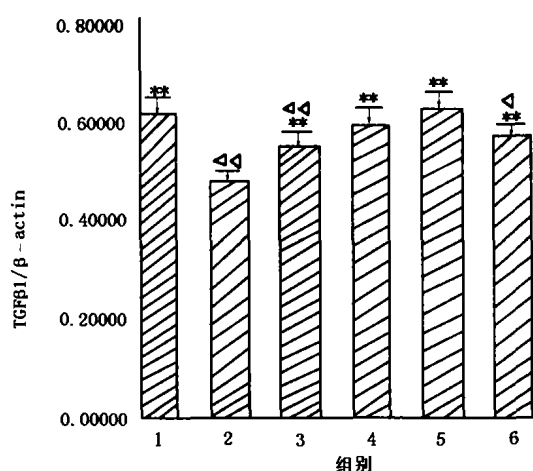
PCR 产物经琼脂糖电泳后, 可分别于 412 bp (TGF-β1)、535bp (β-actin) 见到扩增的条带, (图 3-①, 图 3-②), 与设计引物相符, 半定量 RT-PCR 显示 (图 4), 与正常组比较, 模型空白组 TGF-β1 基因表达水平明显下降, $P < 0.01$, 差异有显著性; 密骨颗粒各剂量组及骨疏康对照组用药后 12 周, 与模型空白组比较, 可明显上调 TGF-β1 mRNA 表达水平, 差异显著, $P < 0.05$; 但密骨颗粒组小、中剂量组及骨疏康组仍未达到正常水平, 差异有显著性, $P < 0.05$ 。

讨 论

转化生长因子-β (TGF-β) 是一族具有多种功能的蛋白多肽, 广泛存在于动物正常组织细胞以及转化细胞中, 以骨组织和血小板中含量最为丰富, 被认为是成骨细胞与破骨细胞之间相互偶联的因子。成骨细胞是骨组织中合成 TGF-β 的主要细胞, 是骨组织中 TGF-β 的主要来源, 成骨细胞又以自分泌的方

果^[7,8]。

本实验采用免疫组化方法发现, 正常大鼠骨组织有 TGF-β1 的表达, 主要分布于骨小梁周围的成骨细胞, 骨基质, 在胞体突起较多的成骨细胞染色较深; RT-PCR 检测正常大鼠股骨干骺端有 TGF-β1 mRNA 的表达; Elisa 方法检测到正常大鼠血清中 TGF-β 浓度达到 $(4.1260 \pm 0.2371) \text{ ng/ml}$ 。本研究通过采用切除双侧卵巢的方法成功复制大鼠绝经后骨质疏松症模型, 免疫组化结果表明, 模型大鼠骨组织中 TGF-β1 的表达, 分布范围虽未改变, 但强度明显减弱, RT-PCR 检测大鼠股骨干骺端的 TGF-β1 mRNA 表达明显下调, 与此同时, 血清 Elisa 检测的 TGF-β1 浓度也明显降至 $(3.5425 \pm 0.3391) \text{ ng/ml}$ 。结果提示绝经后骨质疏松症大鼠与系统或局部 TGF-β1 表达减少以及成骨细胞对 TGF-β1 的反应性降低有关。



1 为正常组;2—模型空白组;3 为密骨颗粒小剂量组;4 为密骨颗粒中剂量组;5 为密骨颗粒大剂量组;6 为骨质疏松组。与模型空白组比较 * $P < 0.01$; 与正常组比较 $\Delta P < 0.01$

图 4 大鼠骨组织 TGF- β 1/ β -actin 密度值的比较

中医理论认为,肾为先天之本、藏精、主骨生髓,骨的生长发育,有赖于肾中精气的充盈,骨与髓均为肾之所主,肾之精气的盛衰关系到骨髓的盈亏及骨功能的状态。本研究对象为绝经后骨质疏松症动物模型,与中医学“七七,任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通”之肾精亏损颇相近似。基于气与精之间存在着相互化生的阴阳互根关系,“精之与气,本自互生”,即“气能生精”、“精能化气”的关系,所以通过“益气生精”之法,从而壮骨生髓,达到防治骨质疏松症目的。本实验研究采用益气生精之中药密骨颗粒(人参、熟地黄、鹿角胶、杜仲等)防治绝经后骨质疏松症,方中人参补气健脾,熟地黄益精填髓,鹿角胶、杜仲补肝肾而强筋健骨,诸药合用具有补肾健脾,益

气生精,强筋健骨之功。本研究发现,在防治用药 12 周后,各给药组均在转录、蛋白及活性等方面,不同程度上调 TGF- β 1 的表达水平,同时明显增强大鼠离体骨骨密度。

以上研究结果提示,通过调节 TGF- β 1 的活性表达可以明显纠正原发性骨质疏松症大鼠骨吸收与骨形成偶联失衡状况,同时促进了骨形成。

参 考 文 献

- 1 Erlebacher A, Dermack R. Increased expression of TGF-beta in osteoblast results an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biology*, 1996, 132: 192-199.
- 2 王玲,李咏高,马建华. 补肾中药对去势大鼠生物力学影响的研究. *辽宁中医杂志*, 2001, 28: 629-630.
- 3 Omi N, Ezawa I. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone*, 1995, 17: 163s-168s.
- 4 Eingartner C, Coerper S, Fritz J, et al. Growth factors in distraction osteogenesis. Immunohistological pattern of TGF-beta1 and IGF-I in human callus induced by distraction osteogenesis. *Int Orthop*, 1999, 23: 253-259.
- 5 Erlebacher A, Ellen H, Filvaroff, et al. Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol Biol Cell*, 1998, 9: 1903-1918.
- 6 Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*, 2000, 57: 2207-2214.
- 7 Langdahl BL, Knudsen JY, Jensen HK, et al. A sequence variation; 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal. *Bone*, 1997, 20: 289-294.
- 8 Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, et al. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 1569-1576.

(收稿日期: 2003-09-01)

(上接第 139 页)

生化指标检测显示骨吸收明显加快。这和女性切除卵巢后骨吸收加快相类似。Murphy 等^[6]认为 65 岁以上男性血清游离睾酮水平与髌部骨密度最为密切。这些均提示睾酮的分泌减少是男性原发性骨质疏松症发病的一个非常重要的因素。国内外的大量资料均证实中老年男性血清睾酮(T)浓度随年龄增高而下降^[1],这与男性原发性骨质疏松症随年龄增高而增多和加重是相吻合的。因此,结合文献和本实验的结果,笔者认为:血清睾酮水平的降低是老年男性骨质疏松症发病的一个非常重要的原因,其是否等同于雌激素在绝经后骨质疏松症发病中所起的决定作用,还有待于进行更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Jackson JA, Riggs MW, Spiekerman AM. Testosterone deficiency as a risk factor for hip fractures in men: a case-control study. *Am J Med Sci*, 1992, 304: 4-8.
- 2 刘忠厚,杨定焯. 中国人骨质疏松症建议诊断标准(第二稿). *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6(2): 1-3.
- 3 苗懿德,刘杰,刘忠厚. 老年男性骨质疏松与相关影响因素的关系. *中国骨质疏松杂志*, 2001, 7: 221-223.
- 4 王颜刚. 老年男性原发性骨质疏松发病机制的研究进展. *国外医学老年医学分册*, 1994, 15(5): 212-214.
- 5 Stepan JL, Lachman M, Zverina J, et al. Castrated men exhibit bone loss: effect of calcitonin on biochemical indices of bone remodeling. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989, 69: 523-527.
- 6 Murphys, Khaw K, Cassidy A, et al. Sex hormones and bone density in elderlyman. *Bone Miner*, 1993, 20: 133-140.

(收稿日期: 2004-01-08)