

补肾填精中药对骨质疏松症模型大鼠股骨中 Smurf1 信号转导蛋白表达影响的实验研究

邓洋洋 郑洪新 林庶茹 蒋宁 孙鑫

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)04-0307-06

摘要: 目的 通过观察去卵巢骨质疏松症模型大鼠股骨中 Smurf1 的表达变化,探索骨质疏松症的发病机理。方法 实验采用切除大鼠双侧卵巢的方法复制骨质疏松症模型,同时应用补肾填精作用的纳米钙补肾填精中药低、高剂量组,对模型大鼠给药干预 12 周,用骨质疏松康颗粒剂、盖天力作为阳性对照组,以及正常对照组、假手术对照组和模型空白组,并与补脾中药补中益气汤作比较;免疫组化 SABC 法检测股骨中的 Smurf1 蛋白活性表达。结果 与正常组相比较,模型组 Smurf1 阳性表达显著下降, $P < 0.01$;用药 12 周后,与模型组相比较,各用药组均可上调其表达情况, $P < 0.01$ 。结论 骨组织中 Smurf1 阳性表达降低可能是骨质疏松症发生的机制之一,补肾填精中药可能通过改善和调控股骨中 Smurf1 的表达,而起到防治骨质疏松症的作用。

关键词: 骨质疏松症;免疫组化法; Smurf1

Experimental study of effect of invigorating kidney for consolidating semen Chinese medicine on expression of Smurf1 signal transduction protein in the femur of osteoporotic rats DENG Yangyang, ZHENG Hongxin, LIN Shuru, et al. Liaoning Chinese Medicine University, Shenyang 110847, China
Corresponding author: ZHENG Hongxin, Email: zhenghx2002@126.com

Abstract: **Objective** To explore the pathogenesis of osteoporosis by observation of the alteration of Smurf1 expression in rat femurs of ovariectomized osteoporosis model. **Methods** The osteoporosis rat model was established using ovariectomy method. The Nano-calcium Chinese medicine that has invigorating kidney for consolidation semen function (high and low dose) was administered to modeled rats for 12 weeks. Gushukang granule and Gaitianli tablets groups were as positive control. Normal control group, sham operation group, and model control group were used. Buzhong yiqi decoction to invigorating spleen group was for comparison. The expression of Smurf1 proteins was measured using IHC method. **Results** Smurf1 protein positive expression in rats of model group decreased significantly, compared to that of normal control group ($P < 0.01$). Smurf1 protein expression in all dose groups increased, compared to that of the model control group after a 12-week drug use ($P < 0.01$). **Conclusion** The decreasing of Smurf1 protein expression in the bone tissue may be one of the mechanisms of osteoporosis pathogenesis. The invigorating kidney for consolidation semen Chinese medicine may prevent and treat osteoporosis by improving and regulating the expression of Smurf1 protein.

Key words: Osteoporosis; Immunohistochemical method; Smurf1

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种全身性骨代谢性疾病,以骨量减少、骨显微结构退化为特征,骨皮质和骨小梁变薄变小,骨脆性增加,易于发生骨

折。骨质疏松症是老年人致残和致死的常见疾病,其并发症包括骨折、骨畸形和慢性疼痛^[1]。从目前的研究来看,有多种因素容易引发此病,具体的机理还有待于更加充分的研究,本研究从泛素蛋白水解酶复合体通路入手,选取通路中 Smurf1 作为观察指标,来探究其与骨代谢的相关性,为阐明泛素蛋白水解酶复合体通路在骨质疏松症中的发病机制提供实验依据。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672570)

作者单位: 110847 沈阳,辽宁中医药大学基础医学院中医基础教研室

通讯作者: 郑洪新, Email: zhenghx2002@126.com

1 实验材料

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠, 雌性, 169 只, 4~5 月龄, 购于中国医学科学院实验动物中心。动物合格证书号: SCSK 京 2005-0013。

1.2 实验药品

实验药品: 补肾填精中药(牡蛎、鹿茸)。

对照药物: 骨疏康颗粒(辽宁康辰药业有限公司, 国药准字 Z20033255, 产品批号 060907); 盖天力片(牡蛎碳酸钙咀嚼片, 东盛科技启动盖天力制药股份有限公司, 国药准字 H32025396, 产品批号 FD041); 补中益气汤(黄芪、人参、当归、白术、陈皮、升麻、柴胡、炙甘草, 由辽宁中医药大学附属医院药房提供), 实验药品: 补肾填精、补钙壮骨中药(牡蛎、鹿茸)。

1.3 主要试剂

兔抗大鼠 Smurf1 一抗 SC-25510(美国 SANTA CRUZ 公司), 抗体稀释液(武汉博士德公司), 即用型 SABC 免疫组化试剂盒 SA1022(武汉博士德公司), 即用型 SABC 免疫组化试剂盒 SA1028(武汉博士德公司), DAB 显色试剂盒 AR1022(武汉博士德公司), 多聚赖氨酸(武汉博士德公司), 0.1MPBS 缓冲液(武汉博士德公司), 枸橼酸盐(武汉博士德公司), 免疫组化笔(北京中衫金桥生物技术有限公司), 水合氯醛注射液(上海中西制药有限公司), 过氧化氢、甲醇、蔗糖、二甲苯、无水乙醇、EDTA 等均均为国产分析纯。

1.4 主要仪器设备

Milli-Q Biocel 超纯水机(法国, MILLIPORE), VXE380 超低温冰箱(法国, Jouan), EG-1150H 包埋机(德国, LEICA), SM-2000R 石蜡滑动式切片机(德国, LEICA), 1110H 展片机(德国, LEICA), 1120H 烘片机(德国, LEICA), BX51 反射光荧光观察显微镜(日本, OLYMPUS, DP70), BI2000 数字图像分析系统(成都泰盟公司)。DHG-9071A 电热鼓风干燥器(上海精宏实验设备有限公司), 101-1 电热鼓风干燥器(英骅市航天仪器厂), DYM-20A 电脑压力蒸汽灭菌器(沈阳盛达生物电子公司), P2 微量加样器(法国, 吉尔森)。

2 实验方法

2.1 实验动物模型的建立及分组

除正常组 A 外, 大鼠经氯胺酮(100g/2ml)肌肉

注射麻醉, 0.1ml/100g 体重。麻醉后的大鼠从腰背部脊柱两侧做纵行切口切开皮肤及肌肉, 见到呈深粉红色卵巢组织, 提起后丝线结扎其周围相连组织, 将其完整切除, 摘除两侧卵巢组织后逐层缝合, 关闭创口。其中假手术组 B 只行切口切开, 并不摘除卵巢组织, 然后逐层缝合。术后给与青霉素肌肉注射, 连续注射 3 天。

术后 6 天将存活大鼠按体重分层随机分为 6 组, 即模型空白组 C、补肾中药低剂量组 D、补肾中药高剂量组 E、骨疏康组 F、盖天力组 G、补脾组 H。

大鼠 169 只, 在手术造模时, 麻醉致死 2 只, 术后因创口感染死亡 2 只, 不明原因死亡 1 只。至分组前共有 164 只, 按体重分层随机进行分组前称量体重, 剔除体重较大 2 只, 最小 1 只。灌胃 12 周的过程中, 灌胃致死 7 只, 不明原因死亡 1 只。标本采集前共 153 只。大鼠共死亡 13 只, 均未列入统计范畴。

2.2 给药, 方法

术后 7d 开始给药, 每日上午灌胃一次, 上述 CDEFGH 组每只大鼠每日用药量按成人每日用药量的 6.3 倍计算, 容积为 0.875ml/100g 体重。D 组给药量为 1.31g/(kg·d)(鹿茸 0.79g/(kg·d), 牡蛎钙 0.525g/(kg·d)), E 组给药量为 2.11g/(kg·d)(鹿茸 1.58g/(kg·d), 牡蛎钙 0.525g/(kg·d)), F 组: 给药剂量为 2.1g/(kg·d), G 组: 给药剂量为 0.04725g/(kg·d), H 组: 给药剂量为 8.4g/(kg·d)。ABC 组以等量的生理盐水灌胃, 连续 12 周。实验期间, 各组大鼠每周称重 1 次, 并根据体重变化调整给药剂量。

2.3 实验标本制备

实验大鼠在最后一次灌胃后, 禁食 24 h, 麻醉后用消毒手术部位, 采集标本。

股骨: 右后肢股骨头部分, 剔除附着的肌肉筋膜, 保留骨膜, 置于 4% 多聚甲醛/0.01MPBS 缓冲液中固定 48 h 后, 放入 10% EDTA 脱钙液中, 每日更换脱钙液, 至大头针可轻轻刺进, 约 3 周, 制作成厚度为 5μm 的石蜡切片待免疫组化检测用。

2.4 Smurf1 在股骨中的免疫组化的检测

①石蜡切片按常规经二甲苯 I、II 和梯度乙醇脱蜡。②组织切片置于装有新鲜配置的 3% 过氧化氢溶液的玻璃容器中, 于 24℃ 10 min 以灭活内源性酶。③热修复抗原: 将附有组织切片的载玻片浸入 0.01M 枸橼酸盐抗原修复工作液的玻璃容器内, 迅速加热至沸腾, 行抗原热修复 5 min 后取出, 待自然

冷却至室温后(约 50 min),取出载玻片,PBS 洗涤 2 次。④滴加 5% BSA 封闭液,24℃ 20 min,甩去多余液体,不洗。⑤滴加稀释后的兔抗大鼠 Smurf1 一抗,稀释度为 1:50,放入湿盒内,4℃ 冰箱孵育过夜,次日取出,PBS 洗 2 min × 3 次,吸去组织切片旁多余缓冲液。⑥滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 20 min,PBS 洗 2 min × 3 次,吸去组织切片旁多余缓冲液。⑦滴加试剂 SABC,37℃ 20 min,PBS 洗 5 min × 4 次,吸去组织切片旁多余缓冲液。DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒。室温显色 10 min,蒸馏水洗涤 2 次。⑧脱水梯度乙醇,每一级 5 min。透明,二甲苯 I、II 各 10 min,中性树胶封片。显微镜观察。其中阴性对照用 PBS 代替一抗。其他步骤相同。

取各组免疫组化的片子 2 张,随机取 15 个视野,BX51 反射荧光观察显微镜拍照,BI-2000 数字图像分析系统进行灰度值分析(注:灰度值与阳性染色程度成反比)。

3 实验结果

3.1 各组大鼠股骨中的 Smurf1 免疫组化结果

3.1.1 光镜下观察结果:正常组和假手术组 Smurf1 主要表达在大量的软骨细胞、骨细胞、骨基质,其胞质核均有阳性染色,呈深棕黄色弥漫成片(见图 1、2),与正常组比较,模空组 Smurf1 主要表达在骨小梁周围的软骨细胞,偶见骨小梁周围的骨细胞,其中软骨细胞染色程度下降(见图 3)。用药 12 周后,与模空组比较,实验低、高剂量组及各阳性对照组,Smurf1 主要表达在软骨细胞、骨细胞、骨基质中,其中软骨细胞染色增强(见图 4~8)。阴性对照组未见棕黄色颗粒(见图 9)。

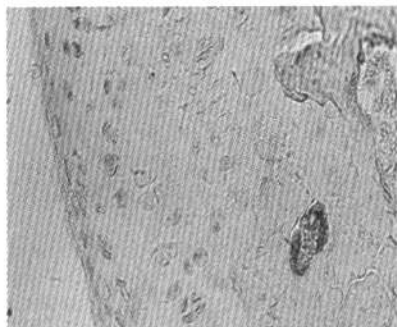


图 1 正常组股骨头 Smurf1 IHC(×40)

3.1.2 免疫组化图像灰度值分析结果

BI-2000 数字图像分析系统分析切片灰度值,数据采用 SPSS10.0 统计软件进行处理,多样本均数比
万方数据

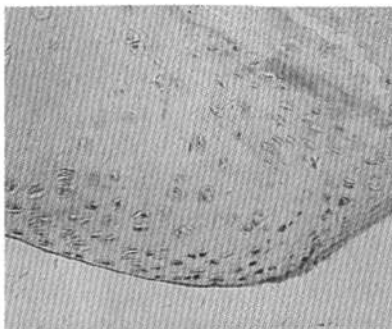


图 2 假手术组股骨头 Smurf1 IHC(×40)

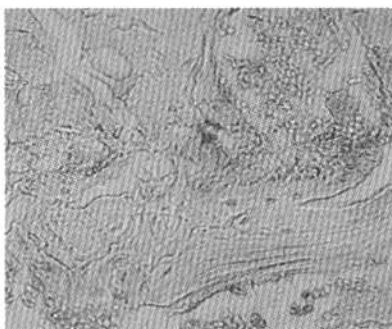


图 3 模型组股骨头 Smurf1 IHC(×40)



图 4 低剂量股骨头 Smurf1 IHC(×40)

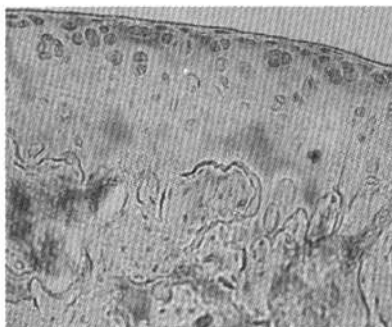


图 5 高剂量股骨头 Smurf1 IHC(×40)

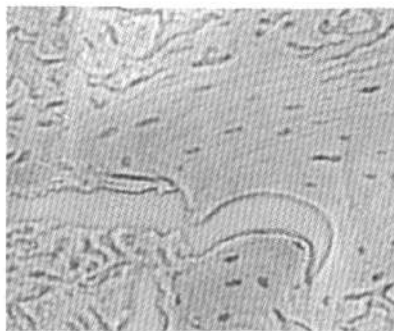


图 6 骨疏康股骨头 Smurf1 IHC (×40)



图 7 盖天力组股骨头 Smurf1 IHC (×40)



图 8 补脾组股骨头 Smurf1 IHC (×40)

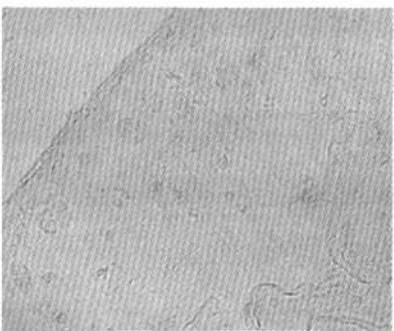


图 9 阴性对照股骨头 Smurf1 IHC (×40)

较采用单因素 ONE-WAY ANOVA (方差分析) 进行分析, 实验结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 1 Smurf1 在股骨中表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	视野数	平均灰度
正常组	15	122.4217 $\pm$ 7.3614 **
假手术组	15	123.3444 $\pm$ 5.9208 **
模型空白组	15	134.2619 $\pm$ 5.9217 ***
低剂量组	15	124.0272 $\pm$ 7.3935 **
高剂量组	15	123.6538 $\pm$ 6.8472 **
骨疏康组	15	128.2795 $\pm$ 5.9864
盖天力组	15	124.9231 $\pm$ 7.1892 *
补脾组	15	124.1839 $\pm$ 5.5599 **

注: 与模型空白组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与正常组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与假手术组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

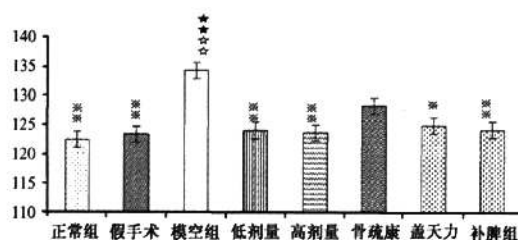


图 10 Smurf1 在股骨中的免疫组化平均灰度值比较

4 讨论

4.1 泛素-蛋白水解酶复合体通路系统

泛素-蛋白水解酶复合体通路 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 是 ATP 依赖性的特异降解胞内短命调控蛋白的主要途径, 主要由三部分组成: 泛素 (ubiquitin)、泛素连接酶 (ubiquitin-protein ligases) 和 26S 蛋白水解酶复合体 (proteasome)。UPP 对蛋白稳定性的调控被认为是调节细胞众多生理事件的一种重要机制, 如信号传导、细胞周期调控等。UPP 对靶蛋白的降解分为两个相对独立的过程: 靶蛋白的泛素化修饰, 26S 蛋白水解酶复合体识别并降解多聚泛素化标记的靶蛋白。

本次实验研究的是泛素连接酶中的 Smurf1。在双杂交实验发现非洲爪蟾中与 Smad1 直接结合的泛素连接酶, 命名为 Smurf1 (Smad ubiquitination regulatory factor 1), 具 HECT 结构域, 是泛素连接酶 Hect 家族新成员。Hect 家族是泛素连接酶的一个主要的亚家族, 靠近羧基端 Hect 结构域有一个保守

的半胱氨酸残基,它可与泛素形成硫酯键。Hect 家族的另一个结构域是 WW 结构域,因在一个大约 30 个氨基酸残基的区域中含有两个高度保守的色氨酸和一个保守的脯氨酸残基而得名。WW 结构域优先与底物蛋白富含脯氨酸的 PPXY 结构域结合,不同的 WW 结构域有着不同的底物结合特异性。爪蟾与人的 Smurf1 之间有 91% 同源性,优先与 Smad1、5 接头区域的 PPXY 结构域结合,并独立地诱导 Smad1、5 泛素化和降解^[2]。

4.2 TGF- β /Smad 通路 with 骨质疏松症

骨质疏松症的发生和骨代谢过程的异常密切相关,骨代谢的过程与两方面有关,即骨形成和骨吸收,这一过程受众多细胞因子的调控,其中 TGF 超家族中 TGF- β 是一种对骨有强大调节作用的生长因子,能刺激骨细胞中 DNA 表达和重组,能刺激胶原的合成,具有多种细胞活性和多种促细胞生长作用,同时可抑制破骨细胞生成和成熟破骨细胞的活性,从而抑制骨吸收的作用。本课题组任艳玲等实验研究结果表明:去卵巢肾虚骨质疏松大鼠骨组织中 TGF- β 1 的 mRNA、蛋白表达水平的下调,以及成骨细胞对其反应性降低可能是肾虚骨质疏松症发生的重要机制之一^[3]。

目前公认 Smad 通路是介导 TGF 超家族细胞内反应的主要通路。TGF- β /Smad 通路 (Smad pathway) 是将 TGF 超家族胞外信号从跨膜受体传递到核内的重要通路。Smad 蛋白的名称来源于 *Drosophila* mothers against dpp (Mad) 和 *C. elegans* Sma 的融合。根据 Smad 蛋白的结构和在信号转导中的作用,可以分成三类: R-Smads (receptor-regulated Smads), 包括介导 BMP 信号的 Smad1、5、8 和介导 TGF- β s/activins 信号的 Smad2、3; Co-Smads (common-mediator-Smads), 为 Smad4; I-Smads (inhibitory 或 antagonistic Smads), 包括 Smad6、7。Smad 通路分以下几个步骤进行:活化的 I 型受体磷酸化胞内 R-Smads C-端的丝氨酸残基,磷酸化的 R-Smads 从受体上的解离,与 Co-Smads 结合形成异源二聚体,该复合物移位入核,与靶基因特定 DNA 序列结合,并激活基因转录^[4]。

4.3 泛素-蛋白水解酶复合体通路中 Smurf1 对 Smad 通路的调节

1999 年,发现了降解 R-Smads 的泛素连接酶,揭示了泛素-蛋白水解酶复合体通路具有调控 Smads 降解的功能,从而证明 Smad 通路的关闭和调节可以通过 UPP 实现^[5]。已知 TGF- β /Smad 通路

在骨代谢过程中有重要的调节信号转导作用,而 UPP 又可以调节 TGF- β /Smad 通路,所以 UPP 对 TGF- β /Smad 通路的异常介导必然会对骨代谢有着重要影响,所以本次实验主要研究 UPP 中的泛素连接酶 Smurf1。

本次实验结果表明,正常雌性大鼠股骨有 Smurf1 表达。摘除卵巢后可影响股骨中 Smurf1 的表达,其表达水平均下降,从而导致了 TGF- β /Smad 通路的异常,进而影响了骨代谢,发生了骨质疏松症。

4.4 骨质疏松症动物模型的建立

绝经后骨质疏松的动物模型于 1969 年首先由 Saville 用大鼠建立,后经反复证实,现在去势雌鼠骨质疏松模型已成为标准化的公认的绝经后骨质疏松症经典病理模型。此模型常选用雌性动物去除双侧卵巢建立。这种模型有很多优点,如作用因素单一,模型确认好,重复性好,实验结果可信度高,适用范围广,有方便性、关联性、适应性三个特点,能很好的模拟为绝经后所表现出来的骨量丢失与骨结构的一系列变化,故美国国立卫生研究院、世界卫生组织都推荐用此模型来作为研究骨质疏松的最佳模型^[6]。本次实验即采用去除雌性大鼠卵巢来复制骨质疏松症模型。

4.5 补肾填精法治疗骨质疏松症的疗效及作用

“补肾填精,补钙壮骨”之法防治骨质疏松症,是郑洪新教授在中医“肾藏精,精生髓,髓生骨”的理论指导、并基于临床研究实践而创立。

方中主药为鹿茸,取马鹿尚未骨化的幼角,具有补肾生精,养血益阳,强筋健骨的作用。现代研究发现,鹿茸具有增强机体免疫、抗衰老、加速创伤愈合、促进骨质修补等功能。牡蛎归经于肝肾,据《海药本草》记载:牡蛎“主男子遗精,虚劳乏损,补肾正气,止盗汗,去烦热,能补养安神”。现代研究发现,其成分主要含碳酸钙、磷酸钙及硫酸钙,并含有钙、铁、锌等微量元素及多种氨基酸^[7]。将牡蛎应用纳米技术研制成纳米微粒,并将鹿茸微粉与之混合,形成具有补肾填精、补钙壮骨功效的纳米钙补肾中药复方。

采用补肾填精法对骨质疏松症大鼠进行 12 周防治,实验结果表明,该中药复方能上调 Smurf1 在大鼠股骨中的表达,可能是通过调控 UPP-Smad 蛋白信号网络调节机制,从而起到有效防治骨质疏松症的作用。

(下转第 295 页)

- paradigm in the treatment of osteoporosis. *J Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2004, 94(6):260-270.
- [3] Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *J N Engl J Med*, 2001, 344:1434-1441.
- [4] Maria GS, Dimitrios A, Xiao L, et al. Endogenous FGF-2 is critically important in PTH anabolic effects bone. *J Cell Physiol*, 2009, 219(1):143-151.
- [5] Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, et al. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest*, 1999, 104:439-446.
- [6] Billiard J, Grewal SS, Lukaesko L, et al. Hormonal control of insulin Like growth factor I gene transcription in human osteoblast; dual action Of cAMP-dependent protein kinase on CCAAT/enhancer binding protein delta. *J Biol Chem*, 2001, 296:31238-31246.
- [7] Nakashima K, Xin Z, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *J Cell*, 2002, 108(1):17-29.
- [8] Ohyama Y, Nifuji A, Maeda Y, et al. Spatiotemporal association and bone morphogenetic protein regulation of sclerostin and osterix expression during embryonic osteogenesis. *J Endocrinology*, 2004, 145(10):4685-4692.
- [9] Ducy P, Zhang R, Geoffroy A, et al. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *J Cell*, 1997, 89(5):747-754.
- [10] Liu M, Mo ZH, Hu PA, et al. The Expression of Osterix and Cbfa1 in osteoblasts Differentiation. *J Chinese General Practice*, 2008, 11(12B):2226-2229.
- [11] Wang BL, Dai CL, Quan JX, et al. Parathyroid hormone regulates Osterix and Runx2 mRNA expression predominantly through protein Kinase A signaling in osteoblast-like cells. *J Endocrinol Invest*, 2006, 29(2):101-108.
- [12] Shibing Yu, Renny T, Franceschi, et al. Critical Role of Activating Transcription Factor 4 in the Anabolic Actions of Parathyroid Hormone in Bone, 2009, *PLoS ONE* 4(10): e7583.
- [13] Celil AB, Hollinger JO. *Osx* transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem*, 2005, 95(3):518-528.
- [14] Vander Horst G, Karperien M. Multiple mechanisms are involved in inhibition of osteoblast differentiation by PTHrP and PTH in KS483 Cells. *J Bone Mine Res*, 2005, 20(12):2233-2244.
- [15] Hong SH, Lu X. Regulation of osterix (*Osx*, *Sp7*) and the *Osx* promoter by parathyroid hormone in osteoblasts. *J Mol Endocrinol*, 2009, 43(5):197-207.

(收稿日期: 2010-11-15)

(上接第311页)

【参考文献】

- [1] 刘忠厚. 骨矿与临床. 中国科学技术出版社, 2006:634.
- [2] 林海燕, 王红梅, 祝诚. 泛素-蛋白水解酶复合体通路对 Smad 通路的调节. 国外医学分子生物学分册, 2003, 25(4):203-204.
- [3] 任艳玲, 郑洪新, 杜松. 密骨颗粒对去卵巢大鼠 TGF- β 1 表达的影响. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(2):221-225.
- [4] Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF- β /BMP Singaling. *J Cell Physiol*, 2001:187:265-276.
- [5] Zhu H, Kavsak P, Abdouah S, et al. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 1999, 400(6745):687.
- [6] Guidelines for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents Used in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drug Products; Food and Drug Administration, USA, 1994.
- [7] 高学敏. 中药学. 北京: 中国中医药出版社, 2002:9.

(收稿日期: 2010-11-15)

补肾填精中药对骨质疏松症模型大鼠股骨中Smurf1信号转导蛋白表达影响的实验研究

作者：[邓洋洋](#)，[郑洪新](#)，[林庶茹](#)，[蒋宁](#)，[孙鑫](#)
作者单位：[辽宁中医药大学基础医学院中医基础教研室, 沈阳, 110847](#)
刊名：[中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名：[CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)
年，卷(期)：2011, 17(4)

参考文献(7条)

1. [高学敏 中药学](#) 2002
2. [Guidelines for Preclinical and Clinical Evalution of Agents Used in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis](#) 1994
3. [Zhu H;Kavsak P;Abdouah S A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation](#) 1999(6745)
4. [Miyazono K;Kusanagi K;Inoue H Divergence and convergence of TGF-beta/BMP Singaling](#)[外文期刊] 2001
5. [任艳玲;郑洪新;杜松 密骨颗粒对去卵巢大鼠TGF-131表达的影响](#) 2004(02)
6. [林海燕;王红梅;祝诚 泛素-蛋白水解酶复合体通路对Smad 通路的调节](#) 2003(04)
7. [刘忠厚 骨矿与临床](#) 2006

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201104006.aspx