

荧光示踪法原位观察大黄蒽醌的骨靶向-抗骨质疏松作用

邓亦峰* 陈艳 许碧莲 刘钰瑜 廖进民
广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室,广东 湛江 524023

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 10-1159-05

摘要: **目的** 探讨游离大黄蒽醌类化合物对糖皮质激素诱导性骨质疏松大鼠的骨靶向抗骨质疏松作用。**方法** 采用荧光示踪法观察游离大黄蒽醌类化合物在糖皮质激素诱导的大鼠骨质疏松模型股骨远端骨骺部位对称剖面的荧光,并将其与同位的骨密度(BMD)和骨矿量(BMC)进行关联分析,4 月龄雌性 SD 大鼠 126 只随机分成泼尼松组(Pred)、泼尼松加大黄蒽醌组(Pred + FAQ)和正常对照组(CON),每个组设 7 个时间点,灌服给药时间最长 13 w。以 pQCT 骨密度仪分别测定各组各时间点大鼠股骨远心端(2 mm)的骨密度和骨矿量,再以荧光显微镜采集 Pred + FAQ 组各时间点骨标本骨骺部位对称剖面的荧光图像。**结果** Pred + FAQ 组股骨远心端的骨密度相对 Pred 组均显著增加($P < 0.05$),但 Pred + FAQ 组各时间点骨标本骨骺部位对称剖面的荧光强度随骨骺“生长-闭合”周期而“上升-消除”,与骨标本的骨密度无显著相关,骨矿量(BMC)也与骨标本的骨密度无显著相关。**结论** 游离大黄蒽醌可以预防糖皮质激素性骨质疏松,具有荧光的游离大黄蒽醌类原型化合物在大鼠股骨中无显著的蓄积现象和骨靶向作用。实验为从骨组织原位药效动力学与药代动力学相关联(pD-pK link)角度探索骨靶向抗骨质疏松成分作了有益的尝试。

关键词: 大黄蒽醌;骨靶向-抗骨质疏松;荧光示踪;大鼠

The observation of bone targeted anti-osteoporosis effect of free rhubarb anthraquinone using fluorescent tracing method

DENG Yifeng, CHENG Yan, XU Bilian, LIU Yuyu, LIAO Jinming

Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

Corresponding author: DENG Yifeng, Email: dengyfgd@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the bone targeted anti-osteoporosis effect of free rhubarb anthraquinone compounds in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. **Methods** Using fluorescent tracing method, the fluorescence in the epiphysis of the distal femurs was observed in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis in situ. It was correlated with bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) at the same location. One hundred and twenty-six 4-month-old female SD rats were randomly divided into prednisone group (Pred), prednisone + free anthraquinones group (Pred + FAQ), and normal control group (CON). Each group was further subdivided into 7 subgroups. The administration period was 13 weeks at the last. BMD and BMC in distal part (2 mm) of the femurs were scanned using pQCT. The photofluorogram of the coronary symmetrical section of the bone samples in Pred + FAQ group was obtained using epifluorescence microscope. **Results** BMD of the distal part of the femur was significantly increased in Pred + FAQ group ($P < 0.05$) compared to those in Pred group. The fluorescence of the epiphysis of bone samples at all time points elevated or eliminated following the epiphyseal “growth-closed” cycle in Pred + FAQ group. It was not significantly correlated with BMD of the bone samples. BMC was not significantly correlated with BMD of the bone samples. **Conclusion** Free rhubarb anthraquinone compounds can prevent bone loss due to glucocorticoid-induced osteoporosis. There is no significant accumulation of fluorescence combined free anthraquinone compounds and bone targeting property. This experiment explores a beneficial research model for investigate bone targeted anti-osteoporosis effective components in bone tissue through pharmacodynamics/pharmacokinetics link perspective.

基金项目: 东莞市科技计划资助项目 (DK200911)

* 通讯作者: 邓亦峰, Email: dengyfgd@163.com

Key words: Free rhubarb anthraquinone; Bone targeted anti-osteoporosis; Fluorescent trace; Rat

中药大黄(*Rheum palmatum* L)中的天然蒽醌类化合物与四环素有类似的特性:具有三羰基甲烷环状平面,羰基和羰基交替的结构以及与钙离子络合的能力^[1],是潜在新型四环素类趋骨性或骨靶向抗骨质疏松成分的分子多样性宝库。陈虹等^[2]对游离大黄蒽醌类化合物进行了羟基磷灰石体外吸附试验,证实这类化合物体外具有类似四环素的趋骨性。本实验室的前期研究表明,大黄素有促进成骨细胞分化的作用^[3],大黄素和小剂量己烯雌酚联合应用可预防去卵巢大鼠骨质疏松^[4]。由此,大黄蒽醌类化合物潜在的骨靶向-抗骨质疏松药物前景及其在骨组织中的蓄积作用引人关注。目前“骨靶向”药物一直沿用羟基磷灰石吸附体外模拟实验方法^[5],大黄蒽醌类等骨靶向抗骨质疏松中药活性成分并未在体内得到确认^[6],尚未检索到游离天然大黄蒽醌类化合物在体内的抗骨质疏松活性及其在骨组织中药代谢研究的报道。

本实验提取药用大黄中的蒽醌类化合物并将之转化为游离态蒽醌(Free Anthraquinones, FAQ),采用游离大黄蒽醌给药(以避免大黄蒽醌的泻下作用),构建糖皮质激素诱导的大鼠骨质疏松模型。以骨密度为药效学指标,观察股骨远端在不同给药周期里游离大黄蒽醌对糖皮质激素泼尼松(Pred)所致大鼠骨质疏松的干预作用及其差异;同时利用游离大黄蒽醌类具有荧光的属性,采用荧光示踪法观察游离大黄蒽醌类化合物在骨组织原位的药物代谢行为,并将其与股骨远端的骨密度和骨矿量进行关联分析,从药效动力学与药代动力学相关联(pD-pK link)的角度探索天然大黄蒽醌在体内的骨靶向-抗骨质疏松作用。

1 材料和方法

1.1 动物

雌性 SD 大鼠,4 月龄、体重质量(280 ± 30)g,广东省医学实验动物中心提供。合格证:SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药品与试剂

大黄素,1,8-二羟基蒽醌,大黄酚,芦荟大黄素等对照品购自中国药品生物制品检定所;醋酸泼尼松购自浙江仙琚制药股份有限公司(5 mg 片剂、批号 100702);大黄饮片购自亳州市京皖中药饮片厂(饮片、批号 100101);大黄蒽醌提取溶剂为食品级

乙醇(≥98%),氯仿、硫酸等化学试剂均为分析纯。

1.3 实验仪器

高效液相色谱-质谱联用仪(日本岛津,LCMS-8000α型);pQCT 骨密度仪(德国 Stratec 公司, XCT-Research SA+型);日本 Nikon 自动化图像数字化分析仪包括光镜和荧光显微镜;OM 骨形态计量学测量系统(OsteoMetrics, Inc, USA);美国 Buehler LTD 低速锯。

1.4 游离大黄蒽醌的制备

参考文献^[7]方法,制得药用大黄饮片乙醇提取物浓缩浸膏;浸膏经酸水解-氯仿萃取-碱水反萃取,碱水层再经酸化、沉淀、过滤后得游离大黄蒽醌提取物。

1.5 游离大黄蒽醌提取物的 LC-MS 分析

HPLC 条件: C₁₈ 色谱柱(5 μm, 150 × 2.1 mm, Dikma),流动相 1% 醋酸水溶液: 甲醇 = 25% : 75%,柱温 35 °C,流速 0.2 mL/min,检测波长 254 nm,进样体积 5 μL;质谱条件: m/z 50 ~ 700,电压 -4.0 kV,CDL 温度 250 °C,氮气 4.5 L/min。游离大黄蒽醌提取物的甲醇溶液(约 1.4 mg/mL)的总离子流色谱图如图 1。通过与对照品的 LC-MS 图谱对比分析,确定大黄蒽醌提取物转化成游离蒽醌后其主要成分为芦荟大黄素、大黄素、大黄酚和 1,8-二羟基蒽醌。

1.6 模型制备及给药

4 月龄未交配雌性 SD 大鼠共 126 只,体重调整达到 287.7 ± 16.3 g。大鼠随机分为 3 组(每组 42 只):正常对照(Con)组、泼尼松(Pred)组、泼尼松 + 游离大黄蒽醌(Pred + FAQ)组;每个实验组随机分成 1、3、5、7、9、11、13w 等 7 个时间点(每个时间点 6 只)。Pred 组、Pred + FAQ 组下午以醋酸泼尼松 3.5 mg/(kg·d)灌胃;Pred + FAQ 组上午以 70 mg/(kg·d)的游离大黄蒽醌提取物-水混悬液灌胃;Con 组只灌服溶剂空白溶液。连续给药 13w,每周称体重 1 次,并按体重变化调整给药量,期间自由摄取标准饲料和水。每个时间点到期,大鼠麻醉后心脏抽血至尽处死,采集大鼠四肢骨。大鼠四肢骨用生理盐水纱布包裹后再覆锡纸包裹、标记,置 -20 °C 冰箱冷冻保存、备测。

1.7 荧光示踪法原位观察骨组织中的大黄蒽醌

制备泼尼松诱导骨质疏松模型大鼠“泼尼松 + 大黄蒽醌”组给药 1 ~ 13w7 个时间点的左股骨远心

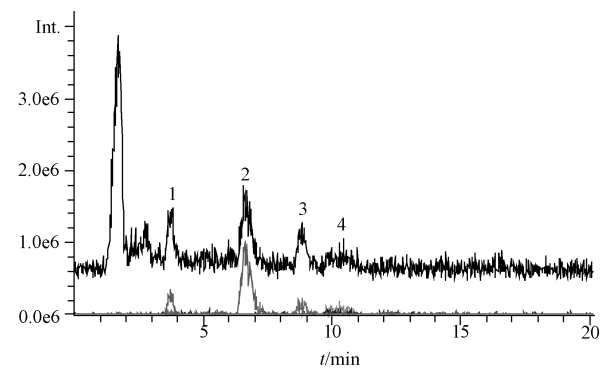


图 1 游离大黄蒽醌提取物总离子流色谱图
1. 芦荟大黄素;2. 大黄素;3. 大黄酚;4. 1,8-二羟基蒽醌
Fig. 1 TIC of free anthraquinones in extracts
1. Aloe-emodin; 2. Emodin; 3. Chrysophanol;
4. 1,8-dihydroxyanthraquinone

端骨片,以水润滑低速锯制取左股骨远心端冠状对称剖面,骨片厚度 1 mm;骨片冷冻干燥后在 Leica DMLB 型荧光显微镜下进行落射荧光检测(蓝光、倍数 10 × 2.5),以 OM 骨形态计量学测量系统(OsteoMetrics, Inc, USA)采集荧光图像。由于游离大黄蒽醌类具有荧光,通过骨片的荧光分布与强度变化对股骨远心端骨骺部位的游离大黄蒽醌进行示踪观察。

1.8 骨密度测定方法

取剔除软组织的大鼠右侧股骨,以 pQCT 骨密度仪扫描股骨远心端(2mm),获得所测部位骨密度值(BMD)、面积(Area),并计算出骨矿量(BMC)。

1.9 统计学处理

数据采用 mean ± s 格式表示,数据统计使用 SPSS 18 软件中的方差分析(Univariate ANOVA)进行检验。

2 结果

2.1 泼尼松及游离大黄蒽醌对大鼠股骨骨密度和骨矿化度的影响

BMD 和 BMC 检测结果表明,Pred 组大鼠股骨远端的 BMD 和 BMC 对比 Con 组均显著下降($P < 0.05$),提示造模成功;与 Pred 组比较,Pred + FAQ 组股骨远心端的骨密度(BMD)和骨矿量(BMC)均显著增加($P < 0.05$)。实验结果提示游离大黄蒽醌可以预防泼尼松所致的股骨骨密度和骨矿量的丢失,如表 1 所示。

2.2 给药时间对大鼠股骨远端骨密度和骨矿量的影响

给药时间对骨密度的影响:除各组时间点 1 之外,Pred + FAQ 组各时间点的骨密度均值对比 Con 和 Pred 组相应时间点的骨密度均值均有显著增加($P < 0.05$);Pred + FAQ 组内,Pred + FAQ 组时间点 1 的骨密度均值均显著低于该组其余各时间点的骨密度均值($P < 0.05$),时间点 7 的骨密度最大。

给药时间对骨矿量的影响:除各组时间点 1 之外,Pred 组时间点 4、5、6、7 的骨矿量均值与 Pred + FAQ 组和 CON 组各时间点的骨矿量均值均有显著差异($P < 0.05$);Pred + FAQ 组的骨矿量均值与 Con 组骨矿量均值无显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 冠状剖面荧光图

将给药 1 ~ 13w7 个时间点的 42 张 Pred + FAQ 组左股骨远心端冠状剖面荧光图依时间排成点阵,可清晰观察到期间股骨远心端骨骺生长与闭合时游离大黄蒽醌的荧光踪迹,如图 2。图中纵向排列依次为 1、3、5、7、9、11、13w 等 1 ~ 7 个时间点,横向排列为每个时间点的 6 个平行样,每个荧光照片的左半部为同一空白对照骨片(用以控制曝光和色度)。实验结果显示 Pred + FAQ 组各时间点骨标本骨骺部位对称剖面的荧光强度与给药时间无相关性。

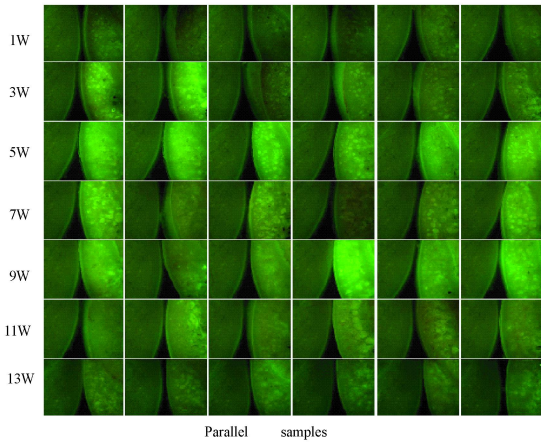


图 2 左股骨远端冠状剖面荧光图点阵
Fig. 2 The lattice of the photofluorogram of the coronary section of the left distal femur

2.4 给药时间与荧光强度、BMD 及 BMC 的关联

Pred + FAQ 组的 BMD 随给药时间延长有增加的趋势;BMC 与给药时间无显著相关性,也无显著的变化;骨标本骨骺部位对称剖面的荧光强度在给药 1 ~ 13 w 里经历了一个“上升-下降”的过程,与 BMD 与 BMC 均无显著相关。考虑到骨骺的“生长-闭合”周期^[8]为 1 ~ 13 w,推测大鼠股骨远心端游离大黄蒽醌类化合物随着骨骺的“生长-闭合”周期

表 1 泼尼松及游离大黄蒽醌对大鼠股骨骨密度和骨矿化度的影响 (n = 6)

Table 1 The effects of Pred and FAQ on BMD and BMC in the rat femurs (n = 6)

Time (Week)	大鼠股骨远端 Femur distal part (2 mm)					
	Con		Pred		Pred + FAQ	
	BMD(g/cm^2)	BMC(g)	BMD(g/cm^2)	BMC(g)	BMD(g/cm^2)	BMC(g)
1	0.1445 $\pm$ 0.0254	0.0222 $\pm$ 0.0024	0.1322 $\pm$ 0.0036 *	0.0216 $\pm$ 0.0012	0.1411 $\pm$ 0.0080 $\triangle$	0.0237 $\pm$ 0.0016
3	0.1479 $\pm$ 0.0058	0.0248 $\pm$ 0.0015	0.1443 $\pm$ 0.0103 *	0.0247 $\pm$ 0.0028 $\blacktriangledown$	0.1825 $\pm$ 0.0079 $\triangle$	0.0252 $\pm$ 0.0023
5	0.1472 $\pm$ 0.0054	0.0251 $\pm$ 0.0021	0.1436 $\pm$ 0.0050 *	0.0249 $\pm$ 0.0012 $\blacktriangledown$	0.1860 $\pm$ 0.0087 $\triangle$	0.0254 $\pm$ 0.0009
7	0.1480 $\pm$ 0.0082	0.0256 $\pm$ 0.0020	0.1419 $\pm$ 0.0085 *	0.0243 $\pm$ 0.0018 $\blacktriangledown$	0.1735 $\pm$ 0.0095 $\triangle$	0.0236 $\pm$ 0.0025
9	0.1424 $\pm$ 0.0084	0.0246 $\pm$ 0.0012	0.1361 $\pm$ 0.0132 *	0.0224 $\pm$ 0.0030 $\blacktriangledown$	0.1826 $\pm$ 0.0127 $\triangle$	0.0248 $\pm$ 0.0028
11	0.1415 $\pm$ 0.0056	0.0240 $\pm$ 0.0014	0.1369 $\pm$ 0.0046 *	0.0223 $\pm$ 0.0008 $\blacktriangledown$	0.1801 $\pm$ 0.0133 $\triangle$	0.0249 $\pm$ 0.0021
13	0.1484 $\pm$ 0.0070	0.0256 $\pm$ 0.0018	0.1375 $\pm$ 0.0031 *	0.0237 $\pm$ 0.0008 $\blacktriangledown$	0.1939 $\pm$ 0.0062 $\triangle$	0.0282 $\pm$ 0.0023

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与模型对照组比较, $\triangle P < 0.05$;与模型对照组或空白对照组比较, $\blacktriangledown P < 0.05$

Note: * $P < 0.05$ vs Con; $\triangle P < 0.05$ vs Pred; $\blacktriangledown P < 0.05$ vs CON or Pred + FAQ

而“分布-消除”。骨密度与荧光强度随时间的变化曲线如图 3 所示。

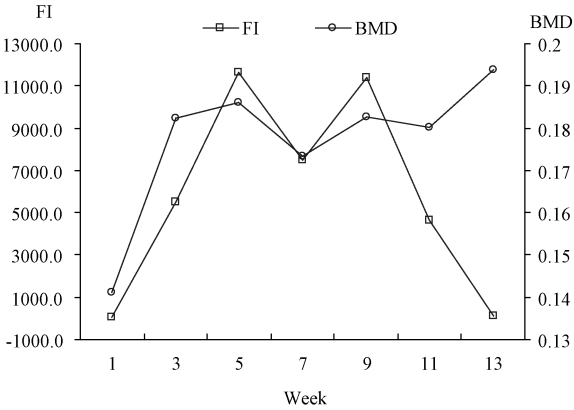


图 3 骨密度(BMD)与荧光强度(FI)随给药时间曲线

Fig. 3 The curve of bone mineral density (BMD) and fluorescence intensity (FI) vs time of drug administration)

3 讨论

骨靶向抗骨质疏松症药物可避免全身给药给患者其它器官带来不必要的伤害,这对骨质疏松症这样的慢性病的防治和患者生活质量的提高意义十分显著,寻找高效、安全、低毒的骨靶向抗骨质疏松症药物已经成为业界的热点。

尽管羟基磷灰石吸附体外模拟实验方法筛选骨靶向药物成分直观而简捷,但 20 多年来在体内获得确证的骨靶向药物并不多,表明其作用机制远不同于药物在体内骨组织的药效动力学和药代动力学作用机制。如何在体内辨识骨靶向抗骨质疏松中药有效成分一直是困扰业界的一个难题^[9]。

大鼠股骨远端对药物反应敏感、药物可以直达该部位^[10],它既反映了骨重建部位的药效状况、又记录下了骨靶向药物的浓度和随时间变化等药代动

力学信息,药效和药代同位发生 (*in situ*),为体内骨靶向-抗骨质疏松药物的药效动力学与药代动力学相关联 (pD-pK link) 研究提供了良好的观察窗口。可惜多年来骨标本经过包埋切片的脱水、脱脂、脱钙流程后,骨中只剩下四环素、钙黄绿素这些与骨钙发生不可逆结合的成分,大量亲骨性或骨靶向药物信息都被除掉了。

本实验室在前期研究的基础上,以股骨远端骨髓部位的骨密度和骨矿量及它们随给药时间变化为药效指标,同时以骨片的荧光分布与强度变化观察具有荧光的游离大黄蒽醌类化合物在骨髓原位的药物代谢行为,并将二者进行关联分析,从药效动力学与药代动力学相关联 (pD-pK link) 角度研究游离大黄蒽醌类化合物对糖皮质激素诱导的大鼠骨质疏松模型的体内骨靶向-抗骨质疏松作用,以期探索体内探索骨靶向抗骨质疏松药物的实验模式。

本实验进一步证实游离大黄蒽醌类化合物在体内可以预防泼尼松所致的股骨骨量丢失;同时观察到 Pred + FAQ 组各时间点骨标本骨髓部位对称剖面的荧光强度随骨髓“生长-闭合”周期而“上升-消除”,而与 Pred 组的骨密度无显著相关;骨矿量没有出现随时间显著蓄积的趋势,也未观察到类似四环素或钙黄绿素那样的荧光标记。上述结果表明,游离大黄蒽醌类原型化合物没有显著的骨靶向性或亲骨性。骨中是否存在大黄蒽醌类化合物以非原型形式与骨组织结合的可能尚需进一步研究。

该实验采用骨组织原位药效动力学与药代动力学相关联 (pD-pK link) 的试验方法观察大黄蒽醌类化合物的骨靶向抗骨质疏松作用,为体内辨识骨靶向抗骨质疏松有效成分作了有益的尝试。

(下转第 1211 页)

上锻炼和维持下肢相应肌群的肌力。3 个指标不仅在评估中起到了定量分析的作用,而且在治疗性运动训练时也发挥了其相应的功效,因此我们在日后的临床康复工作中应该注重研究其内在的规律。

【 参 考 文 献 】

[1] Giannotti S, Bottai V, Dell’osso G, et al. Disuse osteoporosis of the upper limb: assessment of thirty patients. Clin Cases Miner Bone Metab, 2013, 10(2):129-132.

[2] Lee JK, Lee CH, Choi CH. QCT bone mineral density responses to 1 year of oral bisphosphonate after total knee replacement for knee osteoarthritis. Osteoporos Int, 2013, 24(1):287-292.

[3] Nakai T, Tamaki M, Nakamura T, et al. Controlling pain after total knee arthroplasty using a multimodal protocol with local periarticular injections. J Orthop, 2013, 10(2):92-94.

[4] Jibo F, Sha L, Xiaogang D, et al. Correlational analysis among bone mineral content of the lumbar vertebrae and the hip joint and osteocalcin in senile patients with osteoporosis. [J] Chinese Journal of Osteoporosis, 2013. 19 (8):927-929. (in Chinese)

[5] Xiaogang D, Yong Q, Jianshe E, et al. Research and evaluation of the effect of flavonoids drynaria fortunei on serum osteocalcin

and bone mineral density in senile osteoporotic patients. [J] Chinese Journal of Osteoporosis, 2013. 19 (5): 519-521. (in Chinese)

[6] Jibo F, Xiaosong T, Lei Y, et al. Rehabilitation treatment and clinical research of the knee joint function after total knee arthroplasty (TKA) about the elders. [J] The Journal of Cervicodynia and Lumbodynia. DOI: 10.3969/j. issn. 1005-7234. 2013. 02. 000. (in Chinese)

[7] Jibo F, Yong Q, Sha L, et al. Clinical study of the effect rhizome drynaria flavonoid treatment by iontophoresis on the bone mineral density of the lumbar vertebrae in osteoporosis patients. [J] Chinese Journal of Osteoporosis. 2013. 19 (12):1256-1258. (in Chinese)

[8] Fuqiang G, Zijian L, Ke K, et al. Impact factors for limb swelling after primary total knee arthroplasty. [J] Orthopedic Journal of China. 2011. 19(9)724-727.

[9] Wonglertsiri S, Uthairatratsame C, Comparison of fixed bearing and mobile bearing total knee arthroplasty using identical femoral component. [J] Med Assoc Thai, 2013, 96 (2):203-208.

(收稿日期: 2014-01-28;修回日期:2014-03-24)

(上接第 1162 页)

【 参 考 文 献 】

[1] Wang Y, Chen H, Wan ZM, et al. Synthesis of a New Series of Bone Affinity Compounds [J]. Chinese Chem Lett, 2006, 17 (3):310-312 (in Chinese).

[2] Zhang Li, Cui Ying, Li Ling-Zhi. Research on absorbance ability of radix anthraquinone compounds by hydroxyapatite [J]. Acta Academiae Medicinae CPAF. 2008, 17 (12): 1048-1050 (in Chinese).

[3] Liu Yu-Yu, Cui Liao, Wu Tie, et al. Effects of emodin on adipogenesis of marrow stromal cells in vitro [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2005, 21(7):842-847 (in Chinese).

[4] Liu Yu-Yu, Cui Liao, Wu Tie, et al. Combination of emodin with low dose estrogen showed synergetic effect on ovariectomy induced osteopenia in rats [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2006, 12 (1):66-69 (in Chinese).

[5] Luhmann T, Germershaus O, Groll J, et al. Bone targeting for the treatment of osteoporosis [J]. J Control Release, 2012, 161

(2):198-213.

[6] Yang Lian (Supervisor Weng Ling-ling). Experimental pharmacology exploratory study of bone target drugs [D]. Sichuan University, 2006 (in Chinese).

[7] Liu Cui-Zhe, Liu Xi-Gang, Wang Ru-Xing, et al. Advances in extracting technology of total anthraquinones in rehmannia [J]. Acta Academiae Medicinae CPAF, 2002, 111 (12): 76-77 (in Chinese).

[8] Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen [J]. Endocrine Rev, 1994, 15(3):275-300 (in Chinese).

[9] Nian Hua, Xu Ling-Ling, Ma Ming-Hua, et al. Research status on anti-osteoporosis Chinese materia medica [J]. Acta Universitatis Traditionis Medicalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai. 2008, 22 (4):90-93.

[10] Li QN, Wu T, Li CY, et al. The study of experiment on osteopenia-Bone histomorphometry [M]. Chengdu: Sichuan University Press, 2001:44-45 (in Chinese).

(收稿日期: 2013-10-23;修回日期:2013-12-10)

荧光示踪法原位观察大黄蒽醌的骨靶向-抗骨质疏松作用

作者: [邓亦峰](#), [陈艳](#), [许碧莲](#), [刘钰瑜](#), [廖进民](#), [DENG Yifeng](#), [CHENG Yan](#), [XU Bilian](#), [LIU Yuyu](#), [LIAO Jinming](#)

作者单位: [广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东湛江, 524023](#)

刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期): 2014(10)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201410004.aspx