

不同剂量蛇床子素对 OPG 基因敲除小鼠和去卵巢骨质疏松大鼠作用疗效的比较研究

赵永见^{1,2} 唐德志^{2*} 程少丹³ 郑为超¹ 施杞² 王拥军²

1. 安徽理工大学医学院,安徽 淮南 232001
2. 上海中医药大学脊柱病研究所,上海 200032
3. 上海市光华中西医结合医院,上海 200052

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 02-0147-05

摘要: 目的 观察不同剂量蛇床子素对 OPG 基因敲除小鼠和去卵巢骨质疏松大鼠的影响。方法 选择3种不同剂量的蛇床子素作用于 OPG 基因敲除小鼠和去卵巢骨质疏松大鼠,以双能 X 骨密度仪检测动物全身骨密度的变化;将动物腰椎做硬组织切片,并进行骨形态计量学分析其骨小梁的变化。结果 对于 OPG 基因敲除小鼠,蛇床子素能提高其全身 BMD,以中剂量(10 mg/(kg·d))组提高最为明显,低剂量(5 mg/(kg·d))次之,而高剂量(15 mg/(kg·d))组效果最差。蛇床子素能提高 OPG 基因敲除小鼠腰椎骨小梁体积分数,增加骨小梁数目,增加骨小梁厚度,降低骨小梁分离度,其中以 5 mg/(kg·d)组作用最明显,其次为 10 mg/(kg·d)组,而 15 mg/(kg·d)组则效果最差;对于去卵巢骨质疏松大鼠,不同剂量的蛇床子素均能显著提高大鼠全身 BMD,其中以中剂量(100 mg/(kg·d))组为最佳。蛇床子素能显著提高大鼠腰椎骨小梁体积分数,以 100 mg/(kg·d)组最明显。显著增加大鼠腰椎骨小梁数目,以 75 mg/(kg·d)组最明显。蛇床子素 100 mg/(kg·d)组能增加大鼠腰椎骨小梁厚度。不同剂量的蛇床子素均能显著降低大鼠腰椎骨小梁分离度,其中以 75 mg/(kg·d)组和 100 mg/(kg·d)组最明显。结论 蛇床子素能促进骨形成,抑制骨吸收,从而起到抗骨质疏松的作用,其疗效与给药剂量密切相关。

关键词: 蛇床子素;骨质疏松;去卵巢;OPG 基因敲除;剂量;对比研究

Comparison study of the effect of different doses of osthole on OPG knockout mice and OVX rats

ZHAO Yongjian^{1,2}, TANG Dezhi², CHENG Shaodan³, ZHENG Weichao¹, SHI Qi², WANG Yongjun²

1. Medical School, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China
2. Spine Research Institute, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
3. Guanghua Hospital of Shanghai, Shanghai 200052, China

Corresponding author: TANG Dezhi, Email: dztang702@126.com

Abstract: Objective To observe the therapeutic effect of osthole with different doses on OPG knockout mice and ovariectomy-induced osteoporotic rats. **Methods** Three doses of osthole were used to treat OPG knockout mice and ovariectomized rats. BMD of the total body was measured using dual energy X-ray absorptiometry (DXA). The lumbar vertebrae were sliced without decalcification and histomorphometric analysis was performed. **Results** In OPG knockout mice, osthole increased BMD of the total body. The effect with the middle dose (10 mg/(kg·d)) of osthole was the most significant, then the low dose (5 mg/(kg·d)) and the high dose (15 mg/(kg·d)). Osthole increased the volume ratio, number, thickness, and the separation of the trabeculae. The effect with the low dose was the most significant, then the middle and the high dose. In OVX rats, osthole of all the doses increased BMD of the total body. The effect with the middle dose (100 mg/(kg·d)) of osthole was the most significant. Osthole significantly increased the volume score of the trabeculae with a dose of 100 mg/(kg·d). Osthole significantly increased the number of the trabeculae with a dose of 75 mg/(kg·d). Osthole significantly increased the thickness of the trabeculae with a dose of 100 mg/(kg·d). Different doses of osthole decreased the separation of the trabeculae, and the most effect achieved with the doses

基金项目: 教育部创新团队发展计划项目(IRT1270);国家自然科学基金青年基金(81102604);上海市卫生系统新优青培养计划项目(XYQ2013085);上海高校实验技术队伍建设计划项目(lh0124001)

* 通讯作者: 唐德志, Email: dztang702@126.com

of 75 mg/(kg·d) and 100 mg/(kg·d). **Conclusion** Osthole can enhance bone formation and inhibit bone resorption. Its anti-osteoporosis effect is closely associated with the dose of the drug.

Key words: Osthole; Osteoporosis; OVX; OPG^{-/-}; Dosage; Comparison study

蛇床子为伞形科植物蛇床的成熟果实,具有温肾助阳之功效。蛇床子素又名甲氧基欧芹酚(Osthol, Ost),系从蛇床子中提取的一种香豆素类化合物,其化学名称为7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素。近年来研究发现^[1-3],蛇床子素具有多方的药理作用,包括抗心律失常、抗免疫变态反应、抗炎、抗癌变以及抗骨质疏松等,但这些作用是否依赖剂量效应尚不明确。本实验利用 OPG 基因敲除小鼠和去卵巢大鼠两种骨质疏松模式动物,进一步比较研究不同剂量的蛇床子素影响骨代谢的异同,为蛇床子素用于临床治疗骨质疏松症提供全面、可靠的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

OPG 基因敲除纯合子和野生型小鼠均由上海南方模式生物研究中心提供;6月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠购买于中科院动物研究所。

1.2 实验药物

蛇床子素由西安绿泉生物技术有限公司提供,纯度超过 90%;密盖息为 Novartis Phamma AG 产品;盐酸氯胺酮注射液,批准文号:国药准字 H32022820,江苏恒瑞医药股份有限公司生产;生理盐水,批准文号:国药准字 H51022439,四川美大康佳乐药业有限公司生产。

1.3 实验器材

Discovery 双能 X 线骨密度仪,LEICA SM 1600 硬组织切片机,CMISA-99B 图像分析管理系统,SANYO-MDF-J281AT-80℃ 超低温冰箱,LE-80K 超速离心机,日本岛津万能材料试验机,精密电子分析天平等。

1.4 动物分组及处理方法

选择 14 周龄 OPG 基因敲除小鼠 50 只随机分为 5 组,每组 10 只,分别为蛇床子素高剂量(15 mg/(kg·d))组、蛇床子素中剂量(10 mg/(kg·d))组、蛇床子素低剂量(5 mg/(kg·d))组、密盖息组和空白对照组。另外,选用 10 只相同周龄的野生型小鼠作为阴性对照组。给药方法采取皮下注射,每天 1 次,连续治疗 30 d。其中,阴性对照组小鼠和空白对照组小鼠则给予等体积的生理盐水皮下注射,每

天 1 次,连续注射 30 d。

选择 6 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 60 只,随机均分为 6 组,每组 10 只,分别为蛇床子素高剂量(150 mg/(kg·d))组、蛇床子素中剂量(100 mg/(kg·d))组、蛇床子素低剂量(75 mg/(kg·d))组、密盖息组、模型组和假手术组。造模方法采用氯胺酮(0.1 g/kg)腹腔麻醉大鼠,取俯卧位,肋弓下第 3~4 腰椎处,剔净鼠毛,碘伏消毒,无菌操作下经腰背侧正中入路进入,钝性分开腰部筋膜、肌肉,切开腹膜,分离暴露卵巢,结扎输卵管和周围血管后,摘除卵巢。然后,按相同的方法摘除对侧卵巢。在确保摘除双侧卵巢后,逐层缝合腹膜至皮肤,庆大霉素注射伤口。假手术组不摘除卵巢,仅摘除双侧卵巢旁边少许脂肪组织。于造模 4 个月后开始给药,蛇床子素组采取灌胃的方法,密盖息组采用皮下注射的方法,每天 1 次,连续治疗 30d。假手术组和模型组给予等体积的生理盐水灌胃,每天 1 次,连续灌胃 30 d。

1.5 检测指标

1.5.1 全身骨密度(BMD)测定:动物在处死前分别在麻醉下,以 DISCOVERY 双能 X 线骨密度仪测定全身 BMD,保存结果。

1.5.2 骨组织形态计量学分析:动物处死后立即取出下段腰椎,去除附件及附着的软组织,放入 10% 福尔马林溶液中固定 24 h 以上,然后乙醇逐级脱水,二甲苯透明,最后甲基丙烯酸甲酯包埋。在硬组织切片机上,沿椎体中部矢状面切成约 100 μm 厚的切片,切片过程中以水降温。切好后粘片,干燥 24 h 后,磨片,磨到 60 μm,之后用氢氧化铝抛光粉在绒布上抛光,然后行苦味酸-品红染色观察。用 Olympus 倒置显微镜采集完整的腰椎图像,再借助半自动分析软件测定出骨组织面积(T.Ar)、骨小梁面积(Tb.Ar)、骨小梁周长(Tb.Pm),然后用计算公式^[4]换算出骨小梁体积分数(Tb.Ar%)、骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)和骨小梁分离度(Tb.Sp),即

$$\text{Tb.Ar}(\%) = \text{Tb.Ar} / \text{T.Ar} \times 100;$$

$$\text{Tb.N}(\text{个}/\text{mm}) = (1199/2) \times (\text{Tb.Pm} / \text{T.Ar});$$

$$\text{Tb.Th}(\mu\text{m}) = (2/1.199) \times (\text{Tb.Ar} / \text{Tb.Pm});$$

$$\text{Tb.Sp}(\mu\text{m}) = (2/1.199) \times (\text{T.Ar} - \text{Tb.Ar}) / \text{Tb.Pm}.$$

1.6 统计学处理

计数指标以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。借助 SPSS11.0 软件包, 多样本之间进行 One-Way ANOVA 分析, 两两样本之间进行 *t* 检验。检验水准取双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同剂量蛇床子素对 OPG 基因敲除小鼠全身 BMD 的影响

结果显示(见表1), 与空白对照组纯合子小鼠比较, 阴性对照组野生型小鼠骨密度明显升高, 有极其显著性差异 ($P < 0.01$), 表明小鼠 OPG 基因敲除后出现明显的骨质疏松; 阳性对照药密盖息亦能明显提高 OPG 基因敲除小鼠全身 BMD ($P < 0.05$), 提高了 23.1%; 蛇床子素各剂量均能提高 OPG 基因敲除小鼠全身 BMD, 以中剂量 (10 mg/(kg·d)) 组提高最为明显, 提高了 7.67%, 但无统计学意义; 而低剂量 (5 mg/(kg·d)) 次之, 提高了 3%, 但无统计学意义。

2.2 不同剂量蛇床子素对 OPG 基因敲除小鼠腰椎骨组织形态计量学的影响

结果显示(见表2), 与野生型比较, OPG 基因敲

表2 不同剂量蛇床子素对 OPG 基因敲除小鼠腰椎骨组织形态计量学参数的比较

Table 2 Comparison of histomorphometry parameters of the lumbar vertebrae among different doses of osthole in OPG knockout mice

组别	骨小梁体积 分数 (%)	骨小梁数目 (N/mm)	骨小梁厚度 (μm)	骨小梁分离度 (μm)
空白对照组	7.83 ± 2.023	11.26 ± 3.943	4.24 ± 0.538	54.55 ± 18.507
阴性对照组	22.16 ± 10.863*	26.84 ± 2.942*	8.05 ± 3.101	29.52 ± 7.071*
密盖息组	13.83 ± 6.641	15.03 ± 3.191	8.97 ± 2.805*	60.35 ± 18.021
蛇床子素 15 mg/(kg·d) 组	8.17 ± 3.34	14.53 ± 5.921	3.38 ± 0.375	42.86 ± 16.294
蛇床子素 10 mg/(kg·d) 组	9.16 ± 2.872	16.54 ± 3.697	5.57 ± 1.357	57.35 ± 13.186
蛇床子素 5 mg/(kg·d) 组	17.29 ± 8.008	27.19 ± 5.896*	6.0 ± 1.644	32.6 ± 10.015

注: * $P < 0.05$, 与空白对照组比较有显著性差异; * $P < 0.01$, 与空白对照组比较有非常显著性差异

2.3 不同剂量蛇床子素对去卵巢骨质疏松大鼠全身 BMD 的影响

结果显示(见表3), 不同剂量的蛇床子素均能显著提高大鼠全身 BMD ($P < 0.05$), 其中以中剂量 (100 mg/(kg·d)) 组为佳, 提高了 7.73%; 阳性对照密盖息组与模型组比较亦有显著性差异 ($P < 0.05$), 提高了 6.62%。

2.4 不同剂量蛇床子素对去卵巢骨质疏松大鼠腰椎骨组织形态计量学的影响

结果显示(见表4), 与模型组比较, 蛇床子素能显著提高大鼠腰椎骨小梁体积分数, 其中以

除小鼠腰椎骨小梁体积分数显著降低 ($P < 0.05$), 骨小梁数目明显减少 ($P < 0.01$), 骨小梁厚度变小 ($P > 0.05$), 骨小梁分离度显著增加 ($P < 0.05$); 蛇床子素能提高 OPG 基因敲除小鼠腰椎骨小梁体积分数, 增加骨小梁数目, 增加骨小梁厚度, 降低骨小梁分离度, 其中以 5 mg/(kg·d) 组作用最明显, 其次为 10 mg/(kg·d) 组, 而 15 mg/(kg·d) 组则效果最差。此外, 密盖息能明显提高 OPG 基因敲除小鼠腰椎骨小梁厚度 ($P < 0.01$), 增加骨小梁体积分数和骨小梁数目, 但无统计学意义。

表1 不同剂量蛇床子素治疗后 OPG 基因敲除小鼠全身 BMD 改变 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 BMD changes after the treatment of different doses of osthole in OPG knockout mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	骨密度 (g/cm^2)
阴性对照组	0.08525 ± 0.00166*
空白对照组	0.06925 ± 0.00125
密盖息组	0.07620 ± 0.00315*
蛇床子素 15 mg/(kg·d) 组	0.06960 ± 0.00140
蛇床子素 10 mg/(kg·d) 组	0.07456 ± 0.00136
蛇床子素 5 mg/(kg·d) 组	0.07133 ± 0.001027

注: * $P < 0.05$, 与空白对照组比较有显著性差异; * $P < 0.01$, 与空白对照组比较有极其显著性差异

表3 治疗后去卵巢大鼠全身 BMD 改变

Table 3 BMD of the total body after the treatment in OVX rats

组别	全身 BMD ($\bar{x} \pm s$)
假手术组	0.176 ± 0.01042*
模型组	0.1631 ± 0.00867
蛇床子素 (150 mg/(kg·d)) 组	0.1734 ± 0.0045*
蛇床子素 (100 mg/(kg·d)) 组	0.1757 ± 0.00769*
蛇床子素 (75 mg/(kg·d)) 组	0.173 ± 0.00751*
密盖息组	0.1769 ± 0.00631*

注: * $P < 0.05$, 与模型组比较有显著性差异; * $P < 0.01$, 与模型组比较有非常显著性差异

100 mg/(kg·d) 组最明显 ($P < 0.01$), 提高了 63.28%。阳性对照密盖息组与模型组比较亦能明显提高大鼠腰椎骨小梁体积分数 ($P < 0.01$), 提高了 63.38%;

与模型组比较, 蛇床子素能显著增加大鼠腰椎骨小梁数目, 其中以 75 mg/(kg·d) 组最明显 ($P < 0.01$), 提高了 41.89%。密盖息能增加大鼠腰椎骨小梁数, 分别提高了 27.34%, 但无统计学意义。

与假手术组比较, 模型组骨小梁厚度明显降低

表 4 不同剂量蛇床子素对去卵巢骨质疏松大鼠腰椎骨组织形态计量学参数的比较

Table 4 Comparison of histomorphometry parameters of the lumbar vertebrae among different doses of osthole in OVX rats

组别	骨小梁体积 分数 (%)	骨小梁数目 (N/mm)	骨小梁厚度 (μm)	骨小梁分离度 (μm)
假手术组	20.84 ± 4.261*	15.27 ± 3.554	13.65 ± 2.229*	54.75 ± 13.494*
治疗模型组	10.54 ± 1.938	12.81 ± 2.514	8.27 ± 0.807	72.18 ± 14.662
蛇床子素 (150 mg/(kg·d)) 组	14.3 ± 3.913	15.27 ± 1.972	9.15 ± 1.81	57.39 ± 11.265*
蛇床子素 (100 mg/(kg·d)) 组	17.21 ± 3.271*	15.64 ± 2.792	11.26 ± 2.734*	54.22 ± 8.657*
蛇床子素 (75 mg/(kg·d)) 组	14.74 ± 5.894	18.56 ± 4.737*	7.72 ± 2.523	48.36 ± 11.317*
密盖息组	17.22 ± 3.594*	16.33 ± 2.231	10.55 ± 1.626	51.84 ± 10.294*

注: * $P < 0.05$, 与模型组比较有显著性差异; * $P < 0.01$, 与模型组比较有非常显著性差异

3 讨论

研究骨质疏松症的治疗首先必须建立一个理想的骨质疏松实验动物模型。雌性大鼠去卵巢后骨量丢失的病变过程、转归与妇女绝经后骨质疏松非常相似, 以雌性去卵巢大鼠为绝经后骨质疏松动物模型已得到公认而广泛采用^[5]。大鼠去卵巢后由于雌激素不足, 骨吸收超过骨形成, 出现高转换型骨质疏松。通过本实验亦证实大鼠去卵巢后表现为严重的骨质疏松, 蛇床子素能提高去卵巢骨质疏松大鼠的全身骨密度, 并发现这与给药剂量存在着一定关系, 其中以低剂量 (75 mg/(kg·d)) 和中剂量 (100 mg/(kg·d)) 效果明显, 而高剂量 (150 mg/(kg·d)) 作用不佳。

OPG 属于肿瘤坏死因子受体 (tumor necrotic factor receptor, TNFR) 超家族成员之一。由成骨/基质细胞以旁分泌方式发挥作用, 作为一个“诱饵”受体, 竞争性与 RANKL 结合, 封闭 RANKL 与 RANK 的结合, 抑制破骨细胞形成、增殖、分化并诱导其凋亡^[6]。因此, RANKL/OPG 浓度比是调节破骨细胞分化、成熟的决定性因素。OPG 基因表达下降或基因缺失, 将不能抑制 RANKL 与 RANK 的结合, 最终导致破骨细胞生成过多而发生骨质疏松。OPG 基因敲除后的小鼠出现骨密度明显降低和严重的皮质骨和小梁骨孔状结构, 表现为明显的骨质疏松^[7-9],

($P < 0.01$), 下降了 41.1%。与模型组比较, 蛇床子素 100 mg/(kg·d) 组能增加大鼠腰椎骨小梁厚度 ($P < 0.05$), 提高了 36.15%。

与模型组比较, 不同剂量的蛇床子素均能显著降低骨小梁分离度, 其中以 75 mg/(kg·d) 组和 100 mg/(kg·d) 组最明显 ($P < 0.01$), 分别下降了 33% 和 24.88%。密盖息亦能明显降低骨小梁分离度 ($P < 0.01$), 下降了 28.18%。

为优良的骨质疏松动物模型。本实验亦发现 OPG 基因敲除小鼠骨密度显著下降, 骨小梁结构明显疏松。蛇床子素能提高 OPG 基因敲除小鼠的全身骨密度, 并发现这与给药剂量存在着一定关系, 其中以低剂量 (5 mg/(kg·d)) 和中剂量 (10 mg/(kg·d)) 效果明显, 而高剂量 (15 mg/(kg·d)) 作用不佳。

骨组织形态计量学是目前评价骨转换与骨矿化最常用、有效的实验手段。骨小梁体积分数反映骨量的多少, 是评价骨量变化最重要的指标。骨小梁数目和骨小梁厚度反映骨小梁形态结构, 解释骨量的变化。骨小梁分离度反映骨小梁形态结构, 分离度越大, 骨就越疏松^[4]。本实验发现蛇床子素能提高 OPG 基因敲除小鼠和去卵巢大鼠的骨小梁体积分数, 增加两种动物模型的骨小梁数目和骨小梁厚度, 降低骨小梁分离度, 从而改善骨结构, 并发现这与给药剂量存在着一定关系, 其中大部分指标以低剂量和中剂量改善效果明显, 而高剂量作用不佳。

本研究利用两种不同动物模型进一步证实, 蛇床子素能促进骨形成, 抑制骨吸收, 增加骨量, 从而起到抗骨质疏松的作用, 其疗效与给药剂量密切相关, 不能给予过高的剂量, 否则反而会影响提高骨量的效果。

【参 考 文 献】

[1] Tang DZ, Hou W, Zhou Q, et al. Osthole stimulates osteoblast

- differentiation and bone formation by activation of β -catenin-BMP Signaling. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(6):1234-1245.
- [2] Jarzab A, Grabarska A, Kielbus M, et al. Osthole induces apoptosis, suppresses cell-cycle progression and proliferation of cancer cells. *Anticancer Res*, 2014, 34(11):6473-6480.
- [3] Zhai YK, Pan YL, Niu YB, et al. The importance of the prenyl group in the activities of osthole in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption in vitro. *Int J Endocrinol*, 2014, 2014: 921954.
- [4] 陈珺,张豪,杨国柱,等. 骨形态计量学目前应用专家共识. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(9):1031-1038.
Chen J, Zhang H, Yang GZ, et al. Expert consensus about the current application of bone histomorphometry. *Chin J Osteoporos*, 2014, 20(9):1031-1038.
- [5] Li L, Chen X, Lv S, et al. Influence of exercise on bone remodeling-related hormones and cytokines in ovariectomized rats: a model of postmenopausal osteoporosis. *PLoS One*, 2014, 13;9(11):e112845.
- [6] Weitzmann MN. The role of inflammatory cytokines, the RANKL/OPG axis, and the immunoskeletal interface in physiological bone turnover and osteoporosis. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 2013:125705.
- [7] 程少丹,王拥军,唐德志,等. OPG 基因敲除小鼠骨质疏松情况的研究. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(1):16-19.
Cheng SD, Wang YJ, Tang DZ, et al. Osteoporotic study of OPG knockout mice. *Chin J Osteoporos*, 2008, 14(1):16-19.
- [8] Heymann D, Rousselle AV. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine*, 2000, 12: 1455-1468.
- [9] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998, 12:1260-1268.

(收稿日期: 2014-11-19)

(上接第 131 页)

显改善,可能由于骨密度虽是诊断骨质疏松症的敏感指标,但 BMD 的增加需要较长的时间,一般治疗后短时间不会有明显的改变,需要一个长期过程。且有研究表明,单纯采用骨密度评价糖皮质激素性骨质疏松并不全面^[9]。因此,判断骨质疏松治疗效果需要更敏感和更全面的评估标准。

本研究选取 OP 发病相关的 DKK1 基因作为治疗靶点,采用 siRNA 沉默其表达,观察 DKK1-siRNA 对骨质疏松大鼠的治疗效应,结果表明 DKK1-siRNA 能够促进骨形成、抑制骨吸收,能够抑制骨小梁的破坏,可能成为 OP 基因治疗的新靶点。国内外目前关于 siRNA 治疗骨质疏松的剂量和疗程意见并不统一,暂无统一的标准,本研究给予了 8 次 0.2 mg/kg 的 siRNA 进行治疗,并未确立最合适的剂量和疗程,这需要进一步的实验摸索。尽管如此,本实验采用的治疗方案在一定程度上引起了骨代谢指标和骨病理结构的改变,对于治疗有一定的提示意义。

【参 考 文 献】

- [1] Bafico A, Liu G, Yaniv A, et al. Novel mechanism of Wnt signaling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(7): 683-686.
- [2] Nuo Yi, Qiping Liao, Zhenhua Li, et al. RNA interference-mediated targeting of DKK1 gene expression in Ishikawa endometrial carcinoma cells causes increased tumor cell invasion and migration. *Oncol Lett*, 2013, 6(3):756-762.
- [3] Glass DA 2nd, Karsenty G. Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr Top Dev Biol*, 2006, 73:43-84.
- [4] Milat F, Ng KW. Is Wnt signalling the final common pathway leading to bone formation? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 310(1-2): 52-62.
- [5] Joseph S, Joseph M, Butler, et al. Silencing Dkk1 expression rescues dexamethasone-induced suppression of primary human osteoblast differentiation. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2010, 11:210-220.
- [6] Roodman GD. New potential targets for treating myeloma bone disease. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:6270-6273.
- [7] Wang FS, Ko JY, Lin CL, et al. Knocking down dickkopf-1 alleviates estrogen deficiency induction of bone loss. A histomorphological study in ovariectomized rats. *Bone*, 2007, 40(2):485-492.
- [8] Danielle D, Stolina M, Polzer K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature Medicine*, 2007, 13(2): 156-163.
- [9] Graeff C, Marin F, Petto H, et al. High resolution quantitative computed tomography-based assessment of trabecular microstructure and strength estimates by finite-element analysis of the spine, but not DXA, reflects vertebral fracture status in men with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*, 2012, 52(2): 568-577.

(收稿日期: 2014-05-28, 修回日期: 2014-07-20)