

· 药物研究 ·

AN04-2 治疗骨质疏松的成药性评价

宋燕* 许元生 张时群 吴才梅 汤宇晴

广州领晟医疗科技有限公司, 广东 广州 10667

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 03-0409-05

摘要: 目的 考察 AN04-2 对骨质疏松的治疗作用和安全性, 对其成药性进行评价。方法 人成骨细胞 hFOB1.19 加入不同浓度的 AN04-2 处理 7 d, 检测碱性磷酸酶 (ALP) 的表达; 野生型 AB 品系斑马鱼, 以泼尼松诱导建立骨质疏松症模型, 分别注射给予不同剂量的 AN04-2 处理, 测定斑马鱼脊椎骨荧光强度; 雌性 SD 大鼠行双侧卵巢切除手术 (OVX), 建立大鼠骨质疏松模型, 给予不同剂量的 AN04-2 治疗 12 周, 测量腰椎 L₅ 及右股骨的骨密度; SD 大鼠单次静脉注射给予生理盐水及不同剂量的 AN04-2, 观察动物的急性毒性反应。结果 0.3~10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 AN04-2 可显著促进人成骨细胞 hFOB1.1 的 ALP 的表达; 剂量为 15、50 ng/尾的 AN04-2 治疗可显著增加斑马鱼脊椎骨荧光强度 ($P < 0.001$); 1 周 1 次皮下注射不同剂量的 AN04-2, OVX 大鼠的第五腰椎和右股骨的 BMD 有升高的趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。大鼠单次静脉注射 AN04-2 高至 100 mg/kg, 未见明显不良反应。结论 AN04-2 体内对骨质疏松均有一定的治疗作用, 且安全性良好, 具有较好的成药性。

关键词: AN04-2; 成药性; 骨质疏松; 安全性评价

The medicinal property of AN04-2 in the treatment of osteoporosis

SONG Yan*, XU Yuansheng, ZHANG Shiqun, WU Caimei, TANG Yuqing

The Link Health Group, Guangzhou 510700, China

* Corresponding author: SONG Yan, Email: y.song@healthlink.com

Abstract: **Objective** To investigate the therapeutic effect and safety of AN04-2 on osteoporosis, and to evaluate its medicinal property. **Methods** Human osteoblast hFOB1.19 cells were treated with different concentration of AN04-2 for 7 days. The expression of ALP was detected. The zebrafish model of osteoporosis was established by inducing with prednisone. Model zebrafish was injected with different doses of AN04-2. The fluorescence intensity of zebrafish vertebrae was analyzed and counted. Female SD rats were performed bilateral ovariectomy (OVX) to establish osteoporosis model. Different doses of AN04-2 were given on the second day after operation for 12 weeks. The BMD of L₅ of lumbar vertebrae and the right femur were measured after treatment. The rats received saline and different doses of AN04-2 intravenously. The acute toxic reaction of the animals was observed. **Results** The ALP expression of human osteoblasts hFOB1.1 at the concentration of 0.3~10 $\mu\text{mol/L}$ of AN04-2 was significantly promote. The fluorescence intensity of zebrafish spine increased significantly when treated with 15ng or 50ng/fish of AN04-2 ($P < 0.001$). BMD of the L₅ lumbar vertebra and the right femur in the AN04-2 treatment group increased, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). AN04-2 was well tolerated following single intravenous dose up to 100 mg/kg in rats. **Conclusion** AN04-2 has a certain effect on osteoporosis *in vitro* and *in vivo*. The safety of AN04-2 is well. AN04-2 has a good medicinal property.

Key words: AN04-2; medicinal property; osteoporosis; safety evaluation

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以骨量减少和骨微结构破坏为特征, 导致骨强度下降, 脆性增加和易于骨折的代谢性骨病^[1]。伴随人口老龄化, 骨质疏松已成为全世界关注的老年疾病之一。研究表明, 2016 年中国 60 岁以上的老年人骨质疏松症

患病率为 36%, 其中男性为 23%, 女性为 49%, 骨质疏松症已成为我国面临的重要公共卫生问题^[2]。骨质疏松患者骨折发生率高, 可引起和加重心脑血管疾病等, 对患者的生理、心理健康危害极大, 并大大降低生活质量, 也给社会带来了严重经济负担^[3]。

骨质疏松治疗药物有很多, 但绝大多数为骨吸收抑制剂 (如雌激素受体调节剂^[4]、双膦酸盐^[5]、

基金项目: 2017 年广州市开发区创业领军人才项目

* 通信作者: 宋燕, Email: y.song@healthlink.com。

RANKL 抑制剂^[6]、降钙素^[7]等),而骨形成促进剂(如甲状旁腺素类似物^[8]、阿巴帕肽^[9]等)的种类却非常少。从药物的治疗效果来看,局限在改善症状,延缓病情发展的水平,尚未达到疾病改善甚至治愈的效果,故而现有治疗方式并不能满足临床需求。

AN04-2 是新型的骨质疏松治疗药物,为骨关节炎治疗多肽 LH021 与人血白蛋白(HSA)的融合蛋白,具有促进骨形成和抑制骨吸收的双重作用,有可能用于骨质疏松的治疗。本研究的目的是评价 AN04-2 治疗骨质疏松的成药性,为进入临床前研究提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

野生型 AB 系斑马鱼,年龄为受精后 3 d(3 dpf),委托浙江杭州环特生物公司进行 AN04-2 治疗斑马鱼骨质疏松的研究;12 周龄 SD 大鼠,雌性,购自上海吉辉实验动物饲养有限公司,委托澎立生物医药技术(上海)有限公司进行 AN04-2 治疗大鼠骨质疏松的研究。8 周龄 SD 大鼠雌雄各半,体重 180~220 g,购自中山大学试验动物中心,委托广州易沃路科技有限公司进行 AN04-2 单次给药毒性研究。

1.2 试剂与药品

重组人 BMP-2 蛋白购自 R&D 公司,货号为 355-BM/CF;碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒,购自碧云天生物,货号为 P0321;泼尼松,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为 A1508012;钙黄绿素(Calcein),购自美国 sigma 公司,批号为 C0875-5G;盐酸依替膦酸二钠水合物(简称依替膦酸二钠),批号为 MFCD00152567,由东京化成工业株式会社生产。特立帕肽注射液(PTH),批号 C879391D,生产厂家为法国 Lilly,规格为 2.4 mL/支。

1.3 AN04-2 体外对人成骨细胞 ALP 表达的影响

方法参考文献[10-11]并有所改变:人成骨细胞 hFOB1.19 复苏后,加入 MEM 培养基,于 5% CO₂、37℃、饱和湿度下培养至对数生长期。取对数生长期的 hFOB1.19 细胞,计数,调整细胞浓度为 1×10⁵ 个/mL,培养于 96 孔板,每孔 100 μL,加入终浓度为 0.1、0.3、1、3、10 μmol/L 的 AN04-2 进行处理,以同体积的 PBS 作为阴性对照,40 ng/mL 的骨形态发生蛋白 2(BMP-2)作为阳性对照,处理 7 d 后,以碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒检测各组的 ALP 的表达。

1.4 AN04-2 对斑马鱼骨质疏松模型的治疗作用

方法参考文献[12-14]并有所改变:随机选取受精后 3 d 正常野生型 AB 品系斑马鱼于六孔板中,每组 30 尾,用泼尼松诱导斑马鱼建立骨质疏松症模型,分别注射给予不同剂量的 AN04-2(5、15、50 ng/尾),注射体积为 10 nL。同时设置正常对照组(即未经泼尼松诱导的斑马鱼)、模型对照组、阳性对照组,正常对照组与模型对照组均注射同体积的生理盐水,阳性对照组水体给予 150 μg/mL 的依替膦酸二钠,28℃培养箱孵育 96 h 后,用 0.2% 钙黄绿素进行染色,染色后进行拍照并采集数据,分析统计斑马鱼脊椎骨荧光强度,以有统计学意义评价供试品对泼尼松诱导的斑马鱼骨质疏松症的治疗作用。

1.5 AN04-2 对大鼠骨质疏松模型的治疗作用

方法参考文献^[15-18]并有所改变:12 周龄雌性 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只。动物以 1.5%~3.0% 异氟烷麻醉后,碘伏消毒皮肤,在下腹中线作纵行切口,钝性分离皮下组织暴露腹正中中线,在腹白线切开腹膜,钝性游离出一侧卵巢,沿卵巢底部钳夹骨盆漏斗韧带血管、系膜及卵巢固有韧带,完整切除卵巢,交叉贯穿缝合残端,同样的方式切除另一侧卵巢。检查有无活动出血,无出血,连续缝合创面,关闭腹腔。假手术组不切除卵巢,以卵巢周围部分脂肪替代,其他操作相同。所有动物术后连续 3 d 给予一定量的镇痛剂痛立定,每日一次。所有动物手术结束后给予一定量的抗生素。麻醉恢复期动物允许自由的活动及完全负重,动物实验人员在麻醉恢复期须密切监控所有动物。

手术后第 2 天开始给药治疗,AN04-2 低、中、高剂量组分别给予 0.06、0.6、6 mg/kg 的 AN04-2,假手术组与模型对照组给予生理盐水,给药体积为 1 mL/kg,给药方式为每周 1 次皮下注射;阳性对照组给予市售的特立帕肽注射液(PTH, Lilly),剂量为 10 μg/kg,给药方式为每日 1 次皮下注射。

分别于实验开始前、实验中每周 1 次,及实验结束时测量记录称重。治疗 12 周后,处死动物,取材腰椎 L5 及右股骨,采用 DXA 骨密度仪(Hologic Discovery Wi, USA; Hologic APEX 3.1.2 软件)检测松质骨面积骨密度(BMD)。

1.6 安全性初步评价

180~220 g 的 SD 大鼠 30 只,按体重随机分为 3 组,每组 10 只,雌雄各半,分别为溶媒对照组、AN04-2 低、高剂量组。AN04-2 低、高剂量组分别给予 50、100 mg/kg 的 AN04-2,给药方式为静脉单次

注射,给药体积为 5 mL/kg,溶媒对照组给予相同体积的生理盐水。给药后持续观察动物的反应情况,给药后第 1、3、5、7、14 天分别称重 1 次,连续观察 14 d,记录一般状态及体重等^[19]。

给药后立即观察动物的反应情况,并持续观察 12 h,观察内容包括动物体重、饮食、外观、行为、分泌物、排泄物等变化,记录动物的死亡情况、中毒症状及中毒反应的起始时间、严重程度、持续时间等。

给药后第 14 天,麻醉动物并安乐死,进行大体解剖检查,肉眼观察各器官和组织的变化,并记录出现异常的组织 and 器官。

1.7 统计学处理

利用 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) 进行数据分析。采用单因素方差分析法分析组间平均值。若差异较大,则采用 Dunnett's 校验法进一步分析。当 $P < 0.05$ 时为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AN04-2 体外对人成骨细胞的作用

与模型对照组(生理盐水)相比,0.3 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 AN04-2 可显著促进人成骨细胞 HFOB1.1 的 ALP 的表达($P < 0.01$),且量效关系明显(图 1),提示 AN04-2 具有促进成骨的作用。

2.2 AN04-2 对斑马鱼骨质疏松模型的治疗作用

泼尼松龙诱导,建立斑马鱼骨质疏松模型。与正常对照相比,模型对照组斑马鱼脊椎骨荧光强度显著下降($P < 0.001$),表明模型构建成功。与模型对照组相比,阳性对照组斑马鱼脊椎骨荧光强度显著升高($P < 0.001$),表明试验系统成立,可用于评价药物对骨质疏松的治疗作用。

与模型对照组相比,剂量为 15、50 ng/尾的 AN04-2 治疗,斑马鱼脊椎骨荧光强度显著升高($P < 0.001$),骨密度分别比模型对照组增加 74.58 % 和

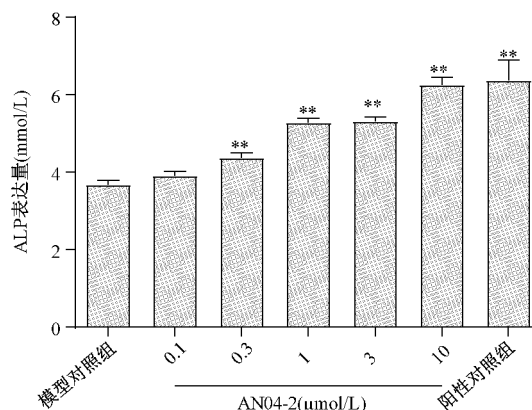


图 1 AN04-2 对人成骨细胞 ALP 表达的影响

Fig. 1 Effect of AN04-2 on ALP expression in human osteoblasts

62.88 %,剂量为 5 ng/尾的 AN04-2 治疗,斑马鱼脊椎骨荧光强度则没有明显的升高($P > 0.05$)(表 1、图 3),提示 AN04-2 对泼尼松诱导的斑马鱼骨质疏松具有剂量依赖的治疗作用。

表 1 AN04-2 对斑马鱼骨质疏松模型的治疗作用($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Therapeutic effect of AN04-2 on zebrafish osteoporosis model($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	n	荧光强度	骨密度增加/(%)
假手术组	10	691626±21067***	NA
模型对照组	10	401560±32266	NA
AN04-2 低剂量组	10	403012±42733	0.36
AN04-2 中剂量组	10	701056±17254***	74.58
AN04-2 高剂量组	10	654078±34121***	62.88
阳性对照组	10	667542±36580***	66.24

注:与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

2.3 AN04-2 对大鼠骨质疏松模型的治疗作用

治疗 12 周后,与假手术组相比,模型对照组第五腰椎(L₅)和右股骨的 BMD 明显降低($P < 0.01$),显示模型构建成功。与模型对照组相比,阳性对照组(PTH 治疗)第五腰椎和右股骨的 BMD 明显升高($P < 0.01$),提示试验系统成立,可以用于评价药物

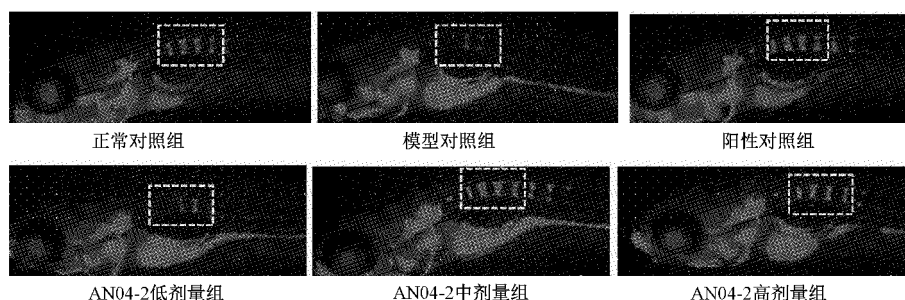


图 2 AN04-2 对斑马鱼骨质疏松模型的治疗作用(拍照)

Fig. 2 Therapeutic effect of AN04-2 on zebrafish osteoporosis model

对骨质疏松的治疗作用。

与模型对照组相比,1 周 1 次皮下注射不同剂量的 AN04-2,治疗组第五腰椎和右股骨的 BMD 有升高的趋势(表 2),但差异并没有统计学意义($P>0.05$),显示 1 周 1 次皮下注射 AN04-2 对于骨质疏松虽有一定的治疗作用,但治疗作用较弱,与每日 1 次皮下注射的市售阳性药物(PTH)相比,并没有明显的治疗优势,可能提示 AN04-2 的半衰期不能支持 1 周 1 次的给药周期。

2.4 安全性初步评价

给药治疗期间,各组大鼠均活动正常、毛发光滑,体重呈正常增长,未见明显异常反应,各组动物

均无死亡。体重变化如表 4 所示。

表 2 AN04-2 对大鼠骨质疏松模型的治疗作用($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Therapeutic effect of AN04-2 on rat osteoporosis model($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	n	L ₅	右股骨
假手术组	10	0.2755±0.0160**	0.2949±0.0121**
模型对照组	10	0.2552±0.0122	0.2749±0.0114
阳性对照组	10	0.3030±0.0150**	0.3135±0.0124**
AN04-2 低剂量组	10	0.2616±0.0190	0.2721±0.0151
AN04-2 中剂量组	10	0.2622±0.0298	0.2770±0.0203
AN04-2 高剂量组	10	0.2770±0.0105	0.2809±0.0072

注:与模型对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 3 各组体重变化及死亡情况($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Weight change and death in each treatment group($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	性别	给药时间				死亡数/总数
		0 d	3 d	7 d	14 d	
溶媒对照组	雌性	194.00±8.60	200.60±7.13	210.20±10.62	219.20±13.44	0/5
	雄性	225.60±11.26	240.20±12.03	268.40±14.26	295.00±17.42	0/5
AN04-2 低剂量组	雌性	192.40±12.12	196.80±6.72	208.60±6.91	222.00±7.48	0/5
	雄性	219.60±14.99	235.20±16.42	266.60±14.83	297.80±16.15	0/5
AN04-2 高剂量组	雌性	194.80±12.93	199.20±11.71	211.80±10.18	220.20±15.27	0/5
	雄性	224.40±9.84	238.20±9.88	274.20±19.04	308.60±21.50	0/5

注:与溶媒对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

AN04-2 处理 14 d 后,处死各组大鼠,进行大体剖检。各组大鼠脏器形态、重量均正常,未见明显异常。

SD 大鼠静脉注射给予 AN04-2 高至 100 mg/kg,未见明显不良反应。静脉注射的最大耐受剂量(MTD)为 100 mg/kg。

3 讨论

AN04-2 是新型的拟用于治疗骨质疏松的融合蛋白药物,本文对其治疗骨质疏松的成药性进行评价,以推动其尽快进入临床前开发。

众所周知,骨质疏松目前的治疗药物很多,但绝大多数为骨吸收抑制剂(如雌激素受体调节剂、双膦酸盐、RANKL 抑制剂、降钙素等),而骨形成促进剂(如甲状旁腺素类似物、阿巴帕肽等)的种类却非常少。在体内外试验中,AN04-2 可以显著的促进成骨细胞 ALP 的表达,显著提高斑马鱼脊椎骨的骨密度,属于新型的骨形成促进剂,这是该药物独特的作用特点。

AN04-2 对大鼠骨质疏松模型的治疗作用则较弱,药效不及市售药物 PTH。但需要注意的是,AN04-2 为每周注射 1 次,而 PTH 为每日注射,

AN04-2 的给药频率远远低于 PTH,这可能影响了 AN04-2 的药效作用。后续有必要考察 AN04-2 每周 2 次或者每日 1 次与 PTH 的药效比较。

AN04-2 的安全性非常好,大鼠静脉注射高至 100 mg/kg,无任何毒性反应。良好的安全性,有利于保证其临床应用。

综上所述,AN04-2 可显著提高骨质疏松模型的骨密度,同时安全性好,具有较好的成药性,后续优化其给药周期,则有希望开发为治疗骨质疏松的新型药物。

【参考文献】

- [1] Bijlsma AY, Meskers CG, Westendorp RG, et al. Chronology of age-related disease definitions: osteoporosis and sarcopenia[J]. Ageing Res Rev, 2012, 11(2): 320-324.
- [2] 贺丽英,孙蕴,要文娟,等. 2010-2016 年中国老年人骨质疏松患病率 Meta 分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(12): 1590-1596.
- [3] Si L, Winzenberg TM, Jiang Q, et al. Projection of osteoporosis related fractures and costs in China: 2010-2050[J]. Osteoporos Int, 2015, 26(7): 1929-1937.

(下转第 439 页)

- commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation [J]. *Nature*, 2013, 504(7480):451-455.
- [38] 宋学文,黄晋,李宁,等. 肠道菌群代谢产物及酶对骨代谢的影响机制初探[J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31(10):1227-1231.
- [39] Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism [J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(3):189-200.
- [40] Reichardt N, Duncan SH, Young P, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota [J]. *ISME J*, 2014, 8(6):1323-1335.
- [41] Tyagi AM, Yu M, Darby TM, et al. The microbial metabolite butyrate stimulates bone formation via T regulatory cell-mediated regulation of WNT10B expression [J]. *Immunity*, 2018, 49(6):1116-1131.
- [42] Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, et al. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure [J]. *J Nutr*, 2007, 137(3 Suppl 2):838S-846S.
- [43] Rodrigues FC, Castro AS, Rodrigues VC, et al. Yacon flour and *Bifidobacterium longum* modulate bone health in rats [J]. *J Med Food*, 2012, 15(7):664-670.
- [44] 刘露,张雁,邓媛元,等. 肠道益生菌利用山药低聚糖体外发酵产短链脂肪酸的研究[C]. 中国食品科学技术学会(Chinese Institute of Food Science and Technology).中国食品科学技术学会第十五届年会论文摘要集,2018:164-165.
- [45] 李路娇,李梅. 肠道菌群与骨骼代谢[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2018, 11(3):317-322.
- [46] 刘小杰,赵允,童纪峰. 菊粉与骨健康的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2008(S1):151-153.
- [47] Zafar TA, Weaver CM, Zhao Y, et al. Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats [J]. *J Nutr*, 2004, 134(2):399-402.
- [48] Weaver CM, Martin BR, Nakatsu CH, et al. Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(12):6501-6510.
- [49] Parvaneh K, Ebrahimi M, Sabran MR, et al. Probiotics (*Bifidobacterium longum*) Increase Bone Mass Density and Upregulate Sparc and Bmp-2 Genes in Rats with Bone Loss Resulting from Ovariectomy [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:897639.

(收稿日期: 2020-04-03;修回日期: 2020-06-29)

(上接第 412 页)

- [4] Thiebaud D, Seclerc RJ. Selective estrogen receptor modulators: mechanism of action and clinical experience. Focus on raloxifene [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2001, 13(4):331-336.
- [5] McClung M, Harris ST, Miller PD, et al. Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday [J]. *Am J Med*, 2013, 126(1):13-20.
- [6] Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease [J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(2):155-192.
- [7] Inzerillo AM, Zaidi M, Huang CL. Calcitonin: physiological actions and clinical applications [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2004, 17(7):931-940.
- [8] Tashjian AH Jr, Gagel RF. Teriparatide [human PTH(1-34)]: 2.5 years of experience on the use and safety of the drug for the treatment of osteoporosis [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(3):354-365.
- [9] Miller PD, Hattersley G, Riis BJ, et al. Effect of abaloparatide vs placebo on new vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2016, 316(7):722-733.
- [10] Zhao Guoyang, Zhao Liping, He Yinfeng, et al. A comparison of the biological activities of human osteoblast hFOB1.19 between iron excess and iron deficiency [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2012, 150(1-3):487-495.
- [11] 付殷,孙贵才,欧阳玉龙,等. 氯化锂联合淫羊藿苷对成骨细胞增殖分化的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(9):1221-1225.
- [12] 王长梅,景莉君,韦英杰,等. 利用斑马鱼模型评价川续断皂苷 V 和 VI 的抗骨质疏松活性 [J]. *中国药科大学学报*, 2014, 45(1):88-91.
- [13] 杨国柱,段涛,卢丽,等. 桃红四物汤对泼尼松诱导斑马鱼骨质疏松的治疗作用 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(8):1007-1021.
- [14] He Hanliang, Wang Chunqing, Tang Qifeng, et al. Possible mechanisms of prednisolone-induced osteoporosis in zebrafish larva [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101:981-987.
- [15] 穆树林,张柳,田发明,等. 甲状旁腺激素 1-34、阿仑膦酸钠、辛伐他汀治疗大鼠骨质疏松效果的比较 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(46):6854-6860.
- [16] Xie Zhongjie, Weng Sheji, Li Hang, et al. Teriparatide promotes healing of critical size femur defect through accelerating angiogenesis and degradation of β -TCP in OVX osteoporotic rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96:960-967.
- [17] 张文韬,陈勋,宋涛,等. 缺氧诱导因子抑制剂对去卵巢大鼠骨质疏松症治疗效果的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(12):1601-1605.
- [18] Liu Feixiang, Feng Tana, Tong Weiwei, et al. Effect of Zuoguiwan on osteoporosis in ovariectomized rats through RANKL/OPG pathway mediated by β 2AR [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103:1052-1060.
- [19] 药物单次给药毒性研究技术指导原则 [S]. <http://www.cde.org.cn/zdzyz.do?method=largePage&id=189>.

(收稿日期: 2020-05-08;修回日期: 2020-06-24)