

# 黄芪散对高糖作用下成骨细胞相关功能的影响

王芳<sup>1,2</sup>, 高英<sup>1</sup>, 李卫民<sup>1\*</sup>, 陈璐<sup>3</sup>

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006;  
3. 广东药科大学 生命科学与生物制药学院, 广州 510006)

**[摘要]** **目的:**观察黄芪散含药血清对高糖条件下成骨细胞功能的影响及与糖尿病性骨质疏松发病机制相关基因的影响,探讨黄芪散(HQS)对糖尿病性骨质疏松症的疗效机制。**方法:**选用健康清洁级5周龄Wistar大鼠10只,随机分为正常组和药物组。制备黄芪散含药血清和空白血清,选用健康清洁级新生大鼠乳鼠4只,体外以酶消化法分离培养新生乳鼠颅骨成骨细胞(Ob),行细胞计数(CCK-8)法测定高糖条件下(25.5 mmol·L<sup>-1</sup>)5%,10%,20%,30%含药血清对细胞增殖的影响,选取增殖活性最佳血清浓度,采用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)法检测黄芪散对成骨功能相关基因骨桥蛋白(OPN),骨钙素(OC),碱性磷酸酶(ALP)和胰腺-骨骼相关基因骨保护素(OPG),叉头转录因子1(FoxO1)表达的影响。**结果:**10%和30%血清浓度组细胞增殖较空白组有明显升高( $P < 0.05$ );20%血清浓度组较空白组有显著升高( $P < 0.01$ )。与空白组比较,5%浓度条件下,OPN,OPG mRNA表达明显下调( $P < 0.05$ );10%浓度条件下,OC,ALP,OPN mRNA表达明显上调( $P < 0.05, P < 0.01$ );OPG, FoxO1 mRNA较空白组表达显著下调( $P < 0.01$ )。20%浓度和10%浓度条件差异性一致,OPN,OPG, FoxO1 mRNA影响趋势较10%浓度药物血清组更明显。20%浓度血清条件下,与空白组比较,OC和OPN蛋白表达显著上调( $P < 0.01$ ),OPG蛋白表达显著下调( $P < 0.01$ )。**结论:**黄芪散对糖尿病性骨质疏松的疗效机制可能与其促进高糖作用下成骨细胞增殖作用有关,与下调胰腺-骨骼相关基因OPG, FoxO1表达有关。

**[关键词]** 黄芪散; 成骨细胞; 骨桥蛋白; 骨钙素; 碱性磷酸酶; 骨保护素; 叉头转录因子1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0128-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120128

## Effects of Huangqi San on Osteoblasts Function Under High Glucose

WANG Fang<sup>1,2</sup>, GAO Ying<sup>1</sup>, LI Wei-min<sup>1\*</sup>, CHEN Jun<sup>3</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Huangqi San formula (HQS) drug containing serum on osteoblasts (Ob) functions and related genes of diabetic osteoporosis under the condition of high glucose, and discuss the therapeutic mechanism of HQS on diabetic osteoporosis. **Method:** Ten 5-week-old healthy clean grade Wistar rats were randomly divided into the normal diet group and medicine group. The drug containing serum of HQS and control serum were prepared by serum pharmacology means, four neonatal healthy clean grade SD rats were used for primary culture of Obs. The cells were isolated by enzyme digestion and induced from skull bone of these SD neonatal rats. Cell counting kit (CCK-8) assay was used to detect the effect of drug containing serum (four different concentrations: 5%, 10%, 20% and 30%) on cell proliferation under high glucose condition (25.5 mmol·L<sup>-1</sup>). The serum concentration which was optimal for cells proliferation was then selected. Real-

**[收稿日期]** 20160118(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81473439)

**[第一作者]** 王芳,在读博士,讲师,从事中药新药研究与开发, Tel:020-39352169, E-mail:fangzisunny@126.com

**[通讯作者]** \*李卫民,博士,教授,从事中药新药研究与开发, Tel:020-39358290, E-mail:liweimin@gzucm.edu.cn

time PCR and Western blot assay were used to detect the effects of HQS drug containing serum on the expression levels of osteogenic genes osteopontin (OPN), osteocalcin (OC), alkaline phosphatase (ALP), pancrease-bone related gene osteoprotegrin (OPG), and Fork transcription factor 1 (FoxO1). **Result:** In cell proliferation experiments, 10% and 30% serum concentration groups had significant higher results as compared with their blank serum groups ( $P < 0.05$ ), and 20% serum concentration group also had significant higher results ( $P < 0.01$ ). In the Real-time PCR results, 5% serum concentration group could significantly down-regulate OPN and OPG mRNA expression levels as compared with the blank control group ( $P < 0.05$ ). 10% serum concentration groups could significantly up-regulate OC and ALP mRNA expression levels ( $P < 0.05$ ), and also significantly increase OPN mRNA expression ( $P < 0.01$ ), but significantly down-regulate the OPG and FoxO1 mRNA expression levels as compared with the blank serum groups ( $P < 0.01$ ). Under 20% serum concentration, the differences were identical with those under 10% serum concentration, especially the differences in OPN, OPG and FoxO1 mRNA expression levels were more significant under 20% serum concentration. 20% serum concentration group could significantly up-regulate OC and OPN protein expression levels as compared with the blank control serum group ( $P < 0.01$ ), while OPG protein expression was significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The therapeutic mechanism of HQS may be related to its proliferation effects on osteoblasts under high glucose condition and its regulatory effects on the expression levels of OPG and FoxO1.

[**Key words**] Huangqi San; osteoblasts; osteogenic genes osteopontin; osteocalcin; alkaline phosphatase; pancrease-bone related gene osteoprotegrin; Fork transcription factor 1

糖尿病性骨质疏松(DOP)是在血糖控制较差状况下引起的主要骨代谢疾病,表现为骨量减少,骨折发生率上升。糖尿病(DM)引起的骨质疏松发病率为 20% ~ 60%<sup>[1-2]</sup>,骨折发病率为 2% ~ 12%<sup>[3]</sup>。黄芪散源自北宋《圣济总录》,全方由葛根、黄芪、桑白皮组成,其主治三消渴疾,肌肤瘦弱、饮水不休,小便不止。课题组前期动物实验表明,黄芪散能显著改善糖尿病大鼠的血中胰岛素水平,降低胰岛素抵抗指数及血脂相关指标<sup>[4-6]</sup>,对糖尿病大鼠股骨的骨生物力学有显著影响<sup>[7]</sup>。

随着对胰腺与骨骼之间内分泌代谢平衡的深入研究,人们发现了骨更多在机体中的作用。Lee 等<sup>[8]</sup>发现骨在糖代谢平衡中起到重要作用。相关研究通过对成骨细胞上胰岛素受体缺失小鼠(OB-ΔIR),成骨细胞上参与糖脂代谢的人类翼状螺旋/叉头转录因子 Fox 家族的 O 亚族, Forkhead 转录因子(FoxO1)缺失小鼠(FoxO1osb + / -)的研究,提出了“骨-胰环”的存在<sup>[9-10]</sup>。在“骨-胰环”学说中,骨除了承担机体负重的作用之外,更重要的是作为一个真实存在的内分泌器官参与调节机体能量的转化与代谢。研究表明胰腺可以分泌胰岛素信号,作用于成骨细胞,促进成骨细胞分化及出生后的骨量获得,而成骨细胞又表达一个功能性的胰岛素受体,该受体降低骨桥蛋白(OPG)表达<sup>[11]</sup>,使得 OPG/核转录因子-κB 受体活化因子配体(RANKL)比例下降,

FoxO1 表达抑制,从而导致破骨细胞上激活骨胞外基质的羧化骨钙素(OC)分子表达增加,促进外周组织胰岛素敏感性,刺激胰腺 β 细胞胰岛素分泌和葡萄糖代谢正常化,在骨骼与胰腺之间形成一个环状平衡。本次实验首次从“骨-胰环”的角度研究黄芪散对糖尿病状态下胰腺及骨骼之间的影响,观察黄芪散方对高糖条件下成骨细胞的作用,并从对胰腺-骨骼相关主要基因的影响来探讨其作用机制。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 黄芪散组方 3 种药材购自广州中医药大学大药房有限公司。经广州中医药大学新药中心高英教授鉴定,黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 的干燥根;葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* 的干燥根;桑白皮为桑科植物桑 *Moraceae Morus* 除去栓皮的干燥根皮。原方配比为黄芪-葛根-桑白皮(1:2:1),提取物制备方法参见文献[7]。DMEM 培养液(Gibco 公司,批号 8005316);胎牛血清(Hyclone 公司,批号 NWJ0473);0.25% EDTA-胰蛋白酶溶液(Salario 公司,批号 20150701);细胞计数法(CCK-8)试剂盒(碧云天生物技术研究所,批号 BB-4202-2);碱性磷酸酶(ALP)兔单克隆抗体,骨保护素(OPG)兔多克隆抗体, Twist2 兔多克隆抗体(GeneTex 公司,批号分别为 GTX62596, GTX-127948, GTX50850);OC 兔多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号

PB0074); OPN 兔单克隆抗体 (Abcam 公司, 批号 ab91655); FoxO1 兔单克隆抗体 (碧云天生物技术有限公司, 批号 AF603); 引物合成由上海捷瑞生物工程有限公司合成; TRIGene 总 RNA 提取试剂 (广州安邦生物科技有限公司, 批号 P118-05); Bioopure 小 RNA 提取试剂盒 (北京宜科思源科技有限公司, 批号 125-96-87); 逆转录试剂盒, qPCR Master Mix 检测试剂盒 (Thermo fisher 公司, 货号分别为 Fermentas K1622, Fermentas K0223)。

**1.2 动物** 健康清洁级新生雄性 SD 大鼠, 购自广州中医药大学实验动物中心, 许可证号 SYXK(粤)2013-0085, 用于培养成骨细胞。健康清洁级两月龄雄性 Wistar 大鼠 10 只, 购自广州中医药大学实验动物中心, 许可证号 SYXK(粤)2013-0020, 用于制备含药血清。

**1.3 主要仪器** ABI Stepone Plus 型 Real-time PCR 仪 (美国应用生物系统公司), TGL-16R 型冷冻高速离心机 (中国珠海黑马医学仪器有限公司), BIO-RAD 型垂直电泳系统 (美国伯乐公司), Uvipro 型凝胶成像系统 (英国 Uvi 公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备** 10 只雄性 Wistar 大鼠分为黄芪散组, 空白组, 各 5 只。黄芪散组以生药 6 g·kg<sup>-1</sup> (成人剂量 2 倍) 连续 ig 7 d, 空白组予等体积蒸馏水。末次给药后 1 h, 大鼠麻醉后进行腹主动脉取血, 静置 30 min, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 分离上层血清, 56 °C 水浴下灭活抗体 30 min, 0.22 μm 滤膜除菌, -20 °C 保存备用。

**2.2 成骨细胞培养**<sup>[12]</sup> 取 24 h 内出生的 SD 大鼠乳鼠 4 只, 予 75% 的乙醇中浸泡 15 min 处死。分离头盖骨, 置于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 仔细刮去表面骨膜、血管等组织至头盖骨发白。剪碎至 1 mm<sup>2</sup> 大小, 加入胰酶消化除去纤维组织。加入质量浓度为 1 g·L<sup>-1</sup> 胶原酶 I 消化液, 孵箱中消化 60 min, 终止消化, 1 200 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, 细胞制成细胞悬浮液, 置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱进行培养。P2 代细胞开始用诱导培养基 (10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养基诱导, 使其向成骨细胞转化。取 P3, P5 代细胞用于实验。

**2.3 CCK-8 测定细胞增殖** 细胞以 2.5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 接种于 96 孔培养板内, 每孔 100 μL, 置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h。细胞贴壁后弃去原培养基, 参照文献[9, 13], 分别给予高糖条件下 (25.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 不同浓度 (5%, 10%, 20%, 30%) 含药血

清培养基 100 μL, 每组平行做 8 孔, 置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 48 h 后, 加入 CCK-8 10 μL, 37 °C 孵育 2 h 后, 在酶标仪 470 nm 波长处测定吸光度 A。

**2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 测定相关基因表达** Trizol 法提取总 RNA, 按照试剂盒说明书进行 cDNA 合成。以反转录产物为模板, 进行 Real-time PCR 反应。反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 ~ 72 °C 30 s, 循环 40 次。结果以 C<sub>t</sub> 值表示, 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法对目地基因进行相对定量分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

引物	序列	长度/ bp
β-actin	上游 5'-GGGAAATCGTGCCTGACATTA-3'	109
	下游 5'-TTGCCGATAGTGATGACCTGA-3'	
FoxO1	上游 5'-TTTACAAGTGCCTCTGTCCCA-3'	92
	下游 5'-CACCCATCCTACCATAGCCAT-3'	
OPG	上游 5'-GATGTACGCACTCAAGCACTT-3'	100
	下游 5'-GTACATGGTGAAGCTGTGCAA-3'	
OC	上游 5'-TAAGGTGGTGAATAGACTCCGG-3'	122
	下游 5'-CTAGCTCGTCACAATTGGGGTT-3'	
OPN	上游 5'-GTGTCTCTGAAGAAACGGATG-3'	143
	下游 5'-TCATCCGAGTTCACAGAATCCT-3'	
ALP	上游 5'-GGACTGCTACTCGGACAATGA-3'	96
	下游 5'-TCGATGCTCCTTGATGTGTGC-3'	

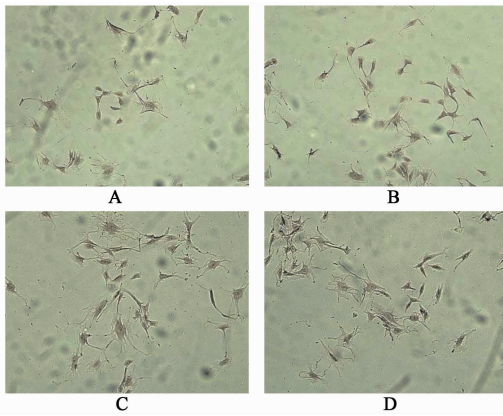
**2.5 免疫印迹法 (Western blot) 测定相关蛋白表达** 细胞总蛋白提取, 测定浓度, 上样, 变性, 绘制标准曲线。根据标准曲线, 换算样品的蛋白浓度。变形蛋白进行凝胶电泳分离, 转膜, 洗膜, 封闭, 加入一抗 (1:1 000), 4 °C 过夜, 洗膜, 加入二抗 (1:1 000) 孵育 1 h, 凝胶成像系统扫描, IPP6.0 软件分析, 以目的蛋白条带/β-actin 条带表示目的蛋白相对表达水平。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 软件, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用单因素方差分析进行组间比较, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 成骨细胞的鉴定** 24 h 后贴壁细胞呈不规则状, 多呈三角形或卵圆形。采用碱性磷酸酶 (改良钙钴法) 染色, 成骨细胞应为硫化钴的棕色沉淀。见图 1。

**3.2 黄芪散对成骨细胞增殖的影响** 高糖条件下 5% ~ 20% 黄芪散组 A 均高于空白组, 其中 10%, 20%, 30% 黄芪散组较空白组明显升高 (P < 0.05,

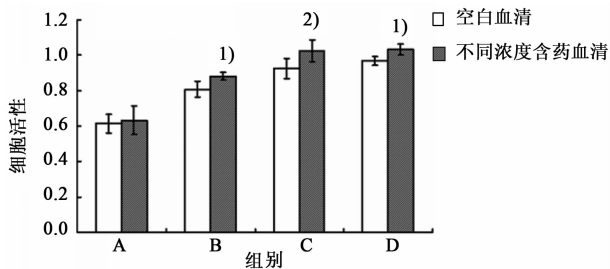


A. 空白组; B~D. 5%, 10%, 20% 黄芪散组

图 1 成骨细胞鉴定(钙钴法染色,  $\times 100$ )

Fig. 1 Effects of HQS drug containing serum on osteoblasts morphology (calcium cobalt staining,  $\times 100$ )

$P < 0.01$ )。5%, 10%, 20% 黄芪散组促增殖作用与含药血清浓度呈强线性相关( $r = 0.947$ ), 30% 黄芪散组较 5%, 10% 浓度黄芪散组升高明显。见图 2。



A~D. 5%, 10%, 20%, 30% 黄芪散组。与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

图 2 黄芪散含药血清对成骨细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

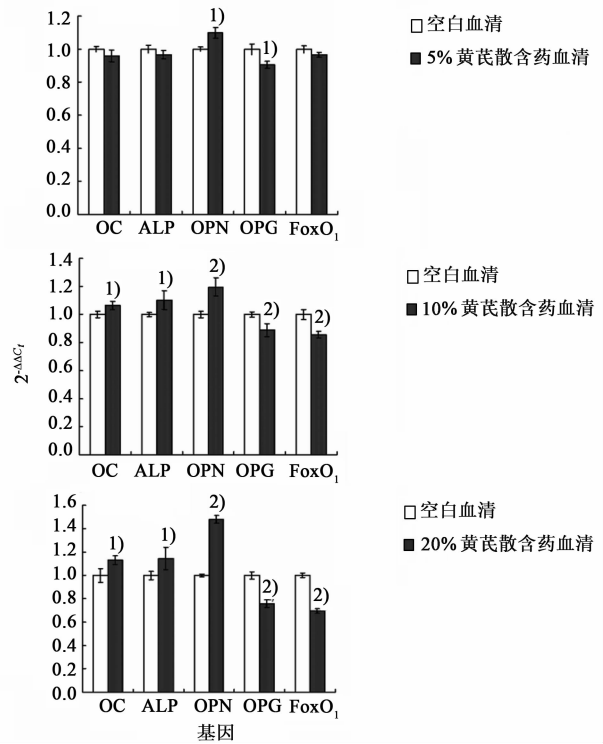
Fig. 2 Effects of HQS drug containing serum on Obs cells proliferation ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**3.3 黄芪散对 OC, ALP, 骨桥蛋白(OPN), OPG, FoxO1 mRNA 的影响** 5% 浓度条件下, 与空白组比较, OPN mRNA 表达明显上调( $P < 0.05$ ); OPG mRNA 表达显著下调( $P < 0.05$ )。10% 浓度条件下, OC, ALP, OPN mRNA 表达明显上调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); OPG, FoxO1 mRNA 较空白组表达显著下调( $P < 0.01$ )。20% 和 10% 浓度条件差异性一致, OPN, OPG, FoxO1 mRNA 影响趋势较 10% 黄芪散组更明显。见图 3。

**3.4 黄芪散对成骨细胞 OC, ALP, OPN, OPG, FoxO1 蛋白表达的影响** 与空白组比较, 20% 黄芪散组 OC, OPN, OPG 蛋白表达显著下调( $P < 0.01$ )。见图 4。

#### 4 讨论

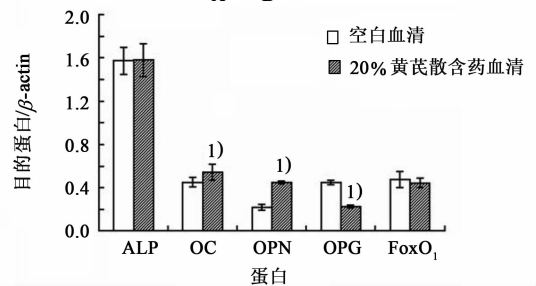
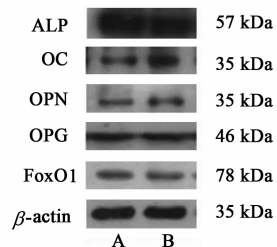
本实验采用新生乳鼠颅骨酶消化法制备成骨细胞, 是因为糖尿病性骨质疏松是继发性骨质疏松, 其



与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

图 3 黄芪散含药血清对 OC, ALP, OPN, OPG, FoxO1 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effects of HQS drug containing serum on OC, ALP, OPN, OPG, FoxO1 mRNA expression levels( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



A. 空白组; B. 黄芪散组; 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$

图 4 黄芪散含药血清对 OC, ALP, OPN, OPG, FoxO1 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Effects of HQS drug containing serum on OC, ALP, OPN, OPG and FoxO1 protein expression levels( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

模型复制时间较长, 常需 3~4 个月才可达到效果<sup>[14]</sup>。这时的骨髓间充质干细胞活性不强, 经常导致诱导转化为成骨细胞失败。

实验结果显示,黄芪散含药血清在 5% ~ 20% 浓度范围内,对成骨细胞增殖的影响呈现浓度依赖性,在 30% 浓度时,促增殖作用不再增加,这可能是由于达到 20% 浓度时黄芪散的促增殖作用已达较高水平,大部分细胞的增殖作用已被促进,血清对其作用达到平台期。ALP 是成骨细胞分化的特异性指标之一<sup>[15]</sup>。ALP 的含量变化可预示骨细胞增殖的程度。研究认为骨钙素的主要功能是维持骨的正常矿化速率,是反映骨转换的一项生化指标<sup>[16]</sup>。成骨细胞还可大量表达骨桥蛋白 OPN,OPN 在骨骼中及成骨细胞外基质中参与骨的正常矿化作用,在骨重建作用中非常重要<sup>[17]</sup>。OPN 被称为成骨细胞活动的特异性产物,被看作是成骨细胞在基质形成和成熟阶段的特征性标志物<sup>[18]</sup>。本实验中,ALP 表达在 10% ,20% 浓度含药血清条件下都有明显提高。OPN 在 3 个浓度血清下都有明显提高,蛋白表达也显著提高。实验证实黄芪散能显著上调 ALP,OC,OPN mRNA 和蛋白表达水平,表明黄芪散含药血清对成骨功能的促进可能更多表现在基质矿化期而不是基质形成期。黄芪散含药血清在 10% ,20% 浓度时都可抑制 OPG,FoxO1 mRNA 表达,以 20% 浓度最为明显;20% 浓度含药血清可明显促进 OC,OPN 的蛋白表达,明显抑制 OPG 的蛋白表达。说明药物有利于促进胰岛素与成骨细胞之间的平衡稳定。

综上所述,黄芪散经机体吸收、代谢后对高糖条件下成骨细胞有一定的促成骨作用,其治疗糖尿病骨质疏松的机制可能与促成骨功能基因 OC,ALP,OPN,抑制成骨细胞上 OPG,FoxO1 表达有关,本实验为糖尿病骨代谢疾病利用“骨-胰环学说”寻找新的靶点药物,提供一定的实验依据和理论基础。

#### [参考文献]

[ 1 ] Danaei G,Finucane M M,Lu Y,et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants [ J ]. Lancet,2011,378(9785) :31-40.

[ 2 ] Schwartz A V, Sellmeyer D E, Strotmeyer E S, et al. Diabetes and bone loss at the hip in older black and white adults [ J ]. J Bone Miner Res, 2005, 20 ( 4 ) : 596-603.

[ 3 ] Hamann C, Kirschner S, Günther K P, et al. Bone, sweet bone-osteoporotic fractures in diabetes mellitus [ J ]. Nat Rev Endocrinol,2012,8(5) :297-305.

[ 4 ] 罗娇艳,高英,王春怡,等. 黄芪散及黄芪葛根汤调脂作用研究 [ J ]. 中药新药与临床药理,2013,24(3) : 221-226.

[ 5 ] 王春怡,李卫民,高英. 黄芪葛根汤对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5) :152-155.

[ 6 ] 王春怡,陈艳芬,李卫民,等. 黄芪葛根汤对实验性糖尿病及胰岛素抵抗的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16) :144-149.

[ 7 ] 罗娇艳,王芳,张娟,等. 黄芪散对糖脂代谢和骨生物力学指标影响的实验研究 [ J ]. 广东药学院学报, 2014,31(1) :75-78.

[ 8 ] Lee N K,Sowa H,Hinoi E,et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton [ J ]. Cell,2007,130(3) :456-469.

[ 9 ] Fulzele K, Riddle R C, DiGirolamo D J, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition [ J ]. Cell,2010,142(2) :309-319.

[ 10 ] Ferron M,Wei J,Yoshizawa T,et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism [ J ]. Cell,2010,142(2) :296-308.

[ 11 ] Karsenty G,Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology [ J ]. Nature, 2012, 481 ( 7381 ) : 314-320.

[ 12 ] 陈珺,刘家剑,卢丽,等. 血清药理学研究车前子对成骨细胞功能的影响 [ J ]. 中药材,2012,35(11) : 111-115.

[ 13 ] 方颖,袁林,任广立,等. 胰岛素样生长因子 I 对高糖条件下成骨细胞骨形成的影响 [ J ]. 实用口腔医学杂志,2010,26(3) :315-321.

[ 14 ] Yang G Z,Nie H G,Lu L,et al. Estrogen regulates the expression and activity of epithelial sodium channel in mouse osteoblasts [ J ]. Cell Mol Biol, 2011, 57: 1480-1486.

[ 15 ] Fei Y,Zhang M,Li M,et al. Element analysis in femur of diabetic osteoporosis model by SRXRF microprobe [ J ]. Micron,2007,38(6) :637-642.

[ 16 ] Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence [ J ]. Nutr Rev, 1996, 54 ( 10 ) : 332-333.

[ 17 ] Choi S T, Kim J H, Kang E J, et al. Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis [ J ]. Rheumatology, 2008, 47 ( 12 ) :1775-1779.

[ 18 ] Giachelli C M,Steitz S. Osteopontin: versatile regulator of inflammation and Biomineralization [ J ]. Matrix Biol, 2000,19(7) :615-622.

[责任编辑 张丰丰]