

· 基础研究 ·

成骨细胞培养上清液对大鼠糖皮质激素性骨质疏松症的治疗作用

胡新永¹ 耿同超² 王义生³

摘要 目的:研究成骨细胞培养上清液对糖皮质激素性骨质疏松症的治疗作用。方法:36 只糖皮质激素性骨质疏松症大鼠随机分为成骨细胞培养上清液组(A 组)、原始培养液组(B 组)和对照组(C 组),每组 12 只。A 组每周 2 次肌肉注射成骨细胞培养上清液,每次 0.5ml/kg;B 组每周 2 次肌肉注射原始培养液 0.5ml/kg;C 组每周 2 次肌肉注射生理盐水,每次 0.5ml/kg。8 周后对各组大鼠的第 3 腰椎椎骨密度测量及左股骨组织形态计量学分析。结果:A 组第 3 腰椎骨密度值明显高于 B 组($P<0.01$)和 C 组($P<0.01$),B 组和 C 组之间无显著性差异($P>0.05$)。左股骨组织形态计量学分析结果显示:A 组的骨体积、类骨质表面、类骨质宽度和成骨表面均比 B 组($P<0.01$)和 C 组显著增高($P<0.01$)。骨吸收表面三者之间无显著性差异($P>0.05$)。结论:成骨细胞培养上清液可有效治疗糖皮质激素性骨质疏松症。

关键词 成骨细胞;培养上清液;骨质疏松症;地塞米松;骨组织形态计量学分析

中图分类号:R681,R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-09-0796-04

An experimental study on supernate of osteoblast in treatment for glucocorticoid-induced osteoporosis in rats/HU Xinyong, GENG Tongchao, WANG Yisheng//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(9): 796—799

Abstract **Objective:** To study the effectiveness of supernate of osteoblast on treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Method:** Thirty-six male SD rats which was glucocorticoid-induced osteoporosis were randomly divided into 3 groups (12 rats for each group): group A, given supernate of osteoblast 0.5ml/kg twice a week through intramuscular injection; group B, given culture medium RPMI 1640 0.5ml/kg twice a week through intramuscular injection; group C, given 0.9% sodium chloride 0.5ml/kg twice a week through intramuscular injection. The experiment lasted for 8 weeks, then the third lumbar vertebral body of all the rats was managed to do the measurement of bone mineral density, and the bone histomorphometric study of left femur was analyzed. **Result:** The value of bone mineral density in group A was significantly higher than that of group B ($P<0.01$) and group C ($P<0.01$). No significant difference was observed in bone mineral density between group B and group C ($P>0.05$). In the bone histomorphometrical study the average of bone volume, osteoid surface, osteoid thickness, and osteoblast surface of group A were significantly higher than that of group B ($P<0.01$) and group C ($P<0.01$), while no difference was observed in the bone absorption surface of three groups ($P>0.05$). **Conclusion:** Supernate of osteoblast can cure the osteoporosis induced by glucocorticoid.

Author's address Department of Orthopaedic Surgery of Yuquan Hospital of Tsinghua University, Beijing, 100049

Key words osteoblast; supernate; osteoporosis; dexamethasone; bone histomorphometry

糖皮质激素性骨质疏松症是最常见的继发性骨质疏松症,其发病率仅次于绝经后骨质疏松症及老年性骨质疏松症,居第 3 位,应用外源性糖皮质激素一年后其发病率为 0.6%—6%^[1]。由于糖皮质激素良好和独特的药理作用使其在临床上应用广泛,很多患者必须长期、甚至终生使用,同时,糖皮质激素性骨质疏松症引起的骨折常常延迟愈合或不愈合,致残率极高,又缺乏有效的治疗方法,是骨科领域的一项世界性难题,因此,研究糖皮质激素性骨质疏松症的治疗方法具有非常重要的意义。为了观察成骨细胞培养上清液对糖皮质激素性骨质疏松症大鼠骨代谢的影响,本研究采用地塞米松诱导大鼠骨质疏

松症模型,根据骨密度和组织形态计量学结果,旨在为临床治疗糖皮质激素性骨质疏松症提供一种新的有效方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 新生大鼠,健康 6 月龄 SD 雄性大鼠,郑州

1 清华大学玉泉医院骨科,北京,100049

2 清华大学玉泉医院神经内科

3 郑州大学第一附属医院骨科

作者简介:胡新永,男,硕士,主治医师

收稿日期:2006-04-26

大学实验动物中心提供。

1.2 实验药物和试剂

地塞米松磷酸钠注射液 (江苏涟水制药有限公司、产品批号 E030725); RPMI Medium 1640 (美国 Invitrogen 公司); II 型胶原酶 (美国 Sigma 公司); 细胞碱性磷酸酶染液 (南京建成生物工程研究所); 胎牛血清 (美国 Invitrogen 公司); 盐酸四环素 (美国 Sigma 公司产品)。

1.3 实验器材和仪器

25cm² 培养瓶 (美国 Costar 公司); CO₂ 培养箱 (美国 Forme 公司); 超净工作台 (北京半导体设备一厂); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.4 糖皮质激素性骨质疏松症模型制备

取健康 6 月龄 SD 雄性大鼠 36 只, 体重 0.45±0.02kg, 自由摄食精制大鼠标准饲料, 自由饮水。每周 2 次肌肉注射地塞米松, 每次 2.5mg/kg, 连续用药 8 周后, 根据李月白等^[2]实验方法和结果, 制备糖皮质激素性骨质疏松症模型。

1.5 实验动物分组及给药方法

采用随机数字表法将 36 只大鼠分为成骨细胞培养上清液组 (A 组)、原始培养液组 (B 组) 和对照组 (C 组), 每组 12 只。A 组每周 2 次肌肉注射成骨细胞培养上清液, 每次 0.5ml/kg; B 组每周 2 次肌肉注射原始培养液 0.5ml/kg; C 组每周 2 次肌肉注射生理盐水, 每次 0.5ml/kg; 连续用药 8 周后, 对各组大鼠的第 3 腰椎行骨密度测量以及左股骨组织形态计量学分析。在处死前第 3、11d 分别在大鼠皮下注射盐酸四环素 30mg/kg, 进行活体四环素荧光标记, 四环素因其螯合钙自动发出荧光并主要沉积在新形成骨基质钙化的部位, 分两次注射能使骨表面形成双层荧光, 反映两次注射四环素期间骨形成的情况^[3]。

1.6 分离和培养成骨细胞^[4]

处死新生 SD 大鼠后, 放入 75% 酒精中消毒 5min, 取颅盖骨, 剥离骨膜, 用 PBS 反复冲洗, 将骨剪成 1mm³ 的小块, 放入 0.1% II 型胶原酶和 0.25% 胰蛋白酶 (1:1, V/V) 混合消化液中, 在 37℃ 条件下消化 20min, 用 100μm 的不锈钢网滤出骨块, 收集滤液, 将骨块放入 0.1% II 型胶原酶中 37℃ 条件下消化 90min, 用吸管反复吹打骨块, 滤出骨块, 收集滤液, 两次收集的滤液离心 (1000r/min) 10min, 吸去上清液, 用培养液悬浮沉淀细胞, 再离心 1 次, 10min。用原始培养液 (RPMI Medium 1640, 添加 15% 胎牛血清、10 万 IU/L 青霉素和 100mg/L 链霉素, pH7.2) 悬浮沉淀细胞, 放入 37℃、5% 二氧化碳培养箱中, 利用差速黏附法除去成纤维细胞, 成纤维细胞

在 5—10min 内贴壁, 而成骨细胞贴壁较慢, 培养 10min 后, 取上清液, 放入另一个培养瓶, 再培养 10min, 然后取上清液, 得到纯化的成骨细胞。纯化的原代成骨细胞 1×10⁶ 个/ml 密度种植于 25cm² 培养瓶中, 每 48h 换液一次, 取成骨细胞快速增长期 (培养 96h) 的上清液, 用于糖皮质激素性骨质疏松症大鼠的治疗。

1.7 成骨细胞鉴定

分离的成骨细胞 24h 后贴壁生长, 显微镜下形态观察呈上皮样, 梭形或多边形, 胞浆丰富、清晰, 并伸出多个细而短的突起与周围细胞相连, 细胞核大而清晰, 圆形或卵圆形, 含 1 个明显的核仁, 成骨细胞长满瓶底后, 原代培养的细胞有规律排列, 可呈同心圆样向周围放射性生长^[5]。细胞合成的碱性磷酸酶重氮盐法 (改良 Kaplow 法) 染色呈黑色颗粒 (图 1, 见后置彩色插页 1), 细胞阳性率 100%。用 PBS 代替底物的阴性对照细胞内无黑色颗粒。碱性磷酸酶是成骨细胞的标记物, 代表成骨细胞成熟程度的一种因子^[6-7]。通过形态学观察和碱性磷酸酶细胞化学染色, 证明培养的细胞具有成骨细胞的形态特征和分泌碱性磷酸酶的生物学行为。

1.8 第三腰椎骨密度测定

先将大鼠腹腔注射 5% 盐酸氯胺酮 100mg/kg, 当大鼠呈现稳定的昏睡状态持续 5min 以上时, 使用 Norland 双能 X 射线骨密度仪 (郑州大学一附院动物分析软件) 测定大鼠第 3 腰椎的骨密度值^[8-9]。

1.9 左股骨组织形态计量分析

取左侧股骨, 固定后逐级脱水, 浸入 3:7 的甲基丙烯酸丁酯和甲酯中^[10], 然后以 3:7 的半聚合甲基丙烯酸丁酯和甲酯包埋实验标本^[11], 采用 JungK 型重型切骨机, 每个标本连续切四张 7μm 厚的不脱钙切片, 分别进行 Gemisa、von Kossa 染色, 测量区域包括骺板下 1mm 内的骨小梁, 选择内、中、外 3 个点行计算机摄像, 每一标本均行组织学观察 (Gemisa 染色, 普通光源)、类骨质观察 (von Kossa 染色, 普通光源) 和四环素标记观察 (荧光显微镜), 每种观察方法选用 3 个图像, 然后用 MPIAS-500 彩色病理图文分析仪 (同济医科大学清平影像公司) 进行骨组织形态计量学分析^[12]。

1.10 统计学分析

数据均以均数±标准差表示, 采用 SPSS10.0 软件包进行统计学处理, 各组间比较采用单因素方差分析, 样本均数间的两两比较采用 LSD-t 检验, 以 P<0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 第三腰椎骨密度

由表 1 结果可见, A 组大鼠第 3 腰椎骨密度明显高于 B 组, 两者之间差异有非常显著性 ($P<0.01$), 表明成骨细胞培养上清液可促进糖皮质激素性骨质疏松症大鼠骨密度增高。A 组大鼠第 3 腰椎骨密度明显高于 C 组, 两者之间差异有非常显著性 ($P<0.01$)。B 组和 C 组比较差异无显著性 ($P>0.05$)。

表 1 各组骨密度测量结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	骨密度 (g/cm^2)
A 组	12	0.2232 ± 0.0106^{①}
B 组	12	0.1916 ± 0.0153
C 组	12	0.1913 ± 0.0122^{②}

与 B 组比较① $P<0.01$; 与 A 组比较② $P<0.01$

2.2 左股骨显微结构观察结果

A 组骨小梁结构排列紧密, 小梁间的连接呈网状, 而且排列有序, 厚度一致, 骨小梁结构成熟, 骨小梁表面有大量类骨质 (图 2, 见后置彩色插页 1), 荧

光显微镜下骨小梁有大量四环素标记线, 而且四环素双标记线明显 (图 3, 见后置彩色插页 1), 骨生成和改建活跃。B 组骨小梁稀疏, 细小, 厚度变薄, 排列紊乱, 骨小梁表面有少量类骨质 (图 4, 见后置彩色插页 1), 荧光显微镜下骨小梁有少量的四环素标记线 (图 5, 见后置彩色插页 1), 骨生成和改建低下; C 组骨小梁稀疏, 细小, 厚度变薄, 排列紊乱, 骨小梁表面有少量类骨质 (图 6, 见后置彩色插页 1), 荧光显微镜下骨小梁有少量四环素标记线 (图 7, 见后置彩色插页 1), 显示骨生成和改建较少。

2.3 左股骨组织形态计量学测量结果

如表 2 所示, A 组和 B 组相比, A 组和 C 组相比, 骨体积、类骨质表面、类骨质宽度、成骨表面差异均有非常显著性 ($P<0.01$), 但骨吸收表面、矿化率、纠正矿化率、矿化时间和骨重建时间在三组之间差异均无显著性 ($P>0.05$)。

表 2 左股骨组织形态计量学测量结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	骨体积 (%)	类骨质表面 (%)	类骨质宽度 (μm)	成骨表面 (%)	吸收表面 (%)	矿化率 ($\mu\text{m}/\text{d}$)	纠正矿化率 ($\mu\text{m}/\text{d}$)	矿化时间 (d)	骨重建时间 (d)
A 组	47.09 ± 1.03^{①}	10.52 ± 1.17^{①}	3.61 ± 0.29^{①}	10.69 ± 0.99^{①}	6.06 ± 0.84	0.94 ± 0.07	2.30 ± 0.32	3.69 ± 0.29	8.61 ± 0.47
B 组	42.73 ± 1.81	7.66 ± 0.66	2.56 ± 0.38	7.35 ± 0.71	6.65 ± 0.58	0.97 ± 0.09	2.28 ± 0.64	3.81 ± 0.38	8.84 ± 0.41
C 组	43.33 ± 2.19^{②}	8.24 ± 0.98^{②}	2.73 ± 0.28^{②}	7.90 ± 0.86^{②}	6.22 ± 0.87	0.92 ± 0.08	2.53 ± 0.34	3.74 ± 0.22	8.57 ± 0.56

与 B 组比较① $P<0.01$; 与 A 组比较② $P<0.01$

3 讨论

在骨重建时, 生理浓度的糖皮质激素发挥的是一种允许作用, 有益于成骨细胞, 它能促进骨和骨胶质的生成, 促进人类骨髓干细胞分化为成骨细胞, 同时抑制单核细胞转化为破骨细胞, 杨林等^[13]实验研究结果发现 $1\times 10^{-8}\text{mol/L}$ 的地塞米松对体外培养的成人成骨细胞的增殖和分化有明显的促进作用, 而超生理量的糖皮质激素抑制成骨细胞前身细胞的分化和成熟成骨细胞的功能, 促进成骨细胞和骨细胞凋亡, 使骨细胞数目减少^[14], 同时还抑制 I 型胶原合成。超生理剂量 (每日服用泼尼松 7.5mg 或长期治疗) 的糖皮质激素将引起骨骼四方面的症状: ①骨生长抑制; ②骨折延迟愈合; ③骨坏死; ④糖皮质激素性骨质疏松症。临床症状可单独或几种同时存在, 其中尤以糖皮质激素性骨质疏松症最常见。

从细胞水平看, 成骨细胞是糖皮质激素作用于骨的主要位点, 成骨细胞对糖皮质激素有特异性受体^[15-16]及高度亲和性, 糖皮质激素正是通过与其特异性受体结合而抑制成骨细胞的增殖、分化和功能, 减少新生骨形成^[17]。

长期大剂量使用糖皮质激素不仅可抑制成骨细胞增殖, 促进其凋亡, 减少骨骼中活性成骨细胞成分, 导致骨生成能力下降, 而且可使成骨细胞不能正

常募集到骨侵蚀表面, 使得被破骨细胞吸收的骨面未能及时被修复, 造成骨质的丢失, 导致骨质疏松症^[18]。由于糖皮质激素所致的骨量丢失主要是抑制骨的形成为主, 因此, 为遏制糖皮质激素引起的骨质丢失、对抗其造成的骨质疏松症, 关键在于刺激骨形成、促进骨量增加^[19]。

培养的成骨细胞增殖分化过程中合成多种细胞因子弥散至培养上清液中。我们前期试验中, 成骨细胞培养 96h 后, 通过 RT-PCR 方法发现: 地塞米松显著抑制成骨细胞骨钙素 mRNA 的表达, 不受干预的情况下成骨细胞骨钙素 mRNA 的表达呈现高水平。骨钙素是成骨细胞合成分泌的一种非胶原蛋白, 是反映成骨细胞分化成熟的指标, 能准确表示成骨细胞的活性, 在几乎所有的实验中, 糖皮质激素与骨钙素均呈密切的负相关关系, 当骨形成和骨吸收偶联时, 骨钙素的主要生理作用是反映骨转换的指标, 当骨形成和骨吸收解偶联时, 骨钙素是反映骨形成的特异指标, 它能准确反映成骨细胞的成骨功能。本实验发现成骨细胞培养上清液可使糖皮质激素性骨质疏松症大鼠的骨密度明显增加。A 组第三腰椎骨密度较 B 组明显升高 ($P<0.01$), 骨密度值增加 16%; A 组骨密度与 C 组相比明显增加 ($P<0.01$), 骨密度值增加 17%。世界卫生组织关于骨质疏松症的

诊断标准就是基于骨密度测量提出的, 骨密度可准确表示骨量的大小。

在本实验中, 左股骨组织形态计量学分析结果显示: A 组与 B 组相比, 骨体积增加了 10%, 类骨质表面增加了 37%, 类骨质宽度增加了 41%, 成骨表面增加了 45%。A 组与 C 组相比, 骨体积增加了 9%, 类骨质表面增加了 28%, 类骨质宽度增加了 32%, 成骨表面增加了 35%。B 组和 C 组相比, 成骨表面、类骨质宽度、类骨质表面和骨体积无显著差异。表明成骨细胞培养上清液中含有成骨细胞分泌的成骨因子, A 组应用成骨细胞培养上清液后, 成骨细胞功能活跃, 成骨表面增加尤为显著, 最终产生的骨量明显增加。由此可见, 成骨细胞培养上清液具有促进糖皮质激素性骨质疏松症大鼠骨生成的作用。

在本实验中, 骨吸收表面在三组之间无显著性差异, 表明成骨细胞培养上清液、原始培养液和生理盐水对大鼠破骨细胞功能无明显影响。超生理剂量的糖皮质激素可与破骨细胞糖皮质激素受体结合并以受体介导的方式促进大鼠破骨细胞的凋亡, 使破骨细胞数目减少, 从而抑制骨吸收^[20]。Silverstrini 等^[21]研究认为糖皮质激素能诱导破骨细胞凋亡, 但不如促进成骨细胞凋亡那样显著。上述结果表明, 糖皮质激素性骨质疏松症的治疗不是因抑制骨吸收造成的, 而主要是骨形成增加引起的。

在本实验中, 矿化率、纠正矿化率、矿化时间和骨重建时间在三组之间均无显著差异 ($P>0.05$), 表明成骨细胞培养上清液不影响大鼠骨矿化速度。这与糖皮质激素不影响大鼠血清钙、磷浓度有关^[22]。骨形成的过程包括类骨质的合成及矿化两个阶段, 无机盐占干骨重的 65%—70%, 其中 95% 是钙磷固体。细胞外液中钙、磷离子处于相对平衡状态, 矿化局部的钙、磷浓度可被骨形成表面成骨细胞层的膜样作用所控制, 钙被成骨细胞的细胞器特别是线粒体摄取, 钙及磷酸盐被覆以膜形成小泡, 在细胞外基质开始矿化, 一旦矿化开始, 进展迅速, 在 6—12h 内, 60%—70% 的矿盐被沉积, 经过初级矿化和次级矿化, 类骨质转变为骨质。

成骨细胞培养上清液不影响糖皮质激素性骨质疏松症大鼠骨矿化速度和骨吸收表面, 只增加骨体积、类骨质表面、类骨质宽度和成骨表面, 因而骨密度和骨量增加, 由此可见成骨细胞培养上清液治疗糖皮质激素性骨质疏松症的机制在于促进骨形成。

本实验表明, 成骨细胞培养上清液可有效治疗糖皮质激素性骨质疏松症, 在生物医学组织工程中纯化相关因子并基因克隆, 为将来的临床康复治疗提供了有力的证据。

参考文献

- [1] 廖二元, 谭利华主编. 代谢性骨病学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.1052—1058.
- [2] 李月白, 胡新永, 王卫东. 一氧化氮在糖皮质激素性骨质疏松发病中的作用和辛伐他汀对骨代谢的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(2): 144—146.
- [3] 廖二元, 超楚生主编. 内分泌学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.320—326.
- [4] 章静波, 张世馥, 黄东阳主编. 组织和细胞培养技术[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.96—98.
- [5] 苏欣, 廖二元, 罗湘杭. 人成骨细胞体外培养、鉴定及护骨素表达的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(4): 283—286.
- [6] Dost P, Ten Cate WJ, Wiemann M. Osteoblast-like cell cultures from human stapes[J]. Acta Otolaryngol, 2002, 122(8): 836—840.
- [7] Vaes BL, Dechering KJ, Feijen A, et al. Comprehensive microarray analysis of bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation resulting in the identification of novel markers for bone development[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(12): 2106—2118.
- [8] Berruti A, Dogliotti L, Osella G, et al. Evaluation by dual energy X-ray absorptiometry of changed bone density in metastatic bone sites as a consequence of systemic treatment[J]. Oncol Rep, 2000, 7(4): 777—781.
- [9] Fischer S, Milinarsky A, Giadrosich V, et al. X-ray absorptiometry of bone in obese and entrophic children from Valparaiso, Chile[J]. J Rheumatol, 2000, 27(5): 1294—1296.
- [10] Barger Lux MJ, Recker RR. Bone microstructure in osteoporosis: transilial biopsy and histomorphometry[J]. Top Magn Reson Imaging, 2002, 13(5): 297—305.
- [11] Hutcheon GA, Messiou C, Wyre RM, et al. Water absorption and surface properties of novel poly(ethylmethacrylate) polymer systems for use in bone and cartilage repair[J]. Biomaterials, 2001, 22(7): 667—676.
- [12] Banse X, Devogelaer JP, Grynepas M, et al. Patient-specific microarchitecture of vertebral cancellous bone: a peripheral quantitative computed tomographic and histological study[J]. Bone, 2002, 30(6): 829—835.
- [13] 扬林, 陶天遵, 刘枫晨, 等. 地塞米松对成人成骨细胞增殖和分化影响的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 2001, 21(8): 493—497.
- [14] Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone[J]. J Clin Invest, 1998, 102(2): 274—282.
- [15] Beavan S, Horner A, Bord S, et al. Colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in human bone[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(8): 1496—1504.
- [16] Abu EO, Horner A, Kusec V, et al. The localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(2): 883—889.
- [17] Kim CH, Cheng SL, Kim GS, et al. Effect of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoids-induced bone loss[J]. J Endocrinol, 1999, 162(3): 371—379.
- [18] 邹丽宜, 吴铁. 糖皮质激素与骨质疏松[J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(2): 177—181.
- [19] 郭世绂, 罗先正, 邱贵兴主编. 骨质疏松基础与临床[M]. 第 1 版. 天津: 天津科学技术出版社, 2001.384—390.
- [20] Dempster DW, Moonga BS, Stein LS, et al. Glucocorticoids inhibit bone resorption by isolated rat osteoclasts by enhancing apoptosis[J]. J Endocrinol, 1997, 154(3): 397—406.
- [21] Silverstrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, et al. Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone[J]. Bone, 2000, 26(1): 33—42.
- [22] 胡新永, 王义生. 辛伐他汀预防激素性骨质疏松实验研究的初步报告[J]. 河南医学研究, 2004, 13(4): 305—308.