

雌激素对健康小鼠体内骨保护素及相关生化指标的影响

田菁菁,王 敏[△],李先平

(中南大学湘雅二医院检验科,湖南长沙 410011)

摘要:目的 通过检测注射过雌激素的正常美国癌症研究所(ICR)雌鼠血清中骨保护素(OPG)含量和相关生化指标变化及相关性来研究雌激素对骨代谢的影响作用。方法 取 42 只 4~6 周龄的 ICR 小鼠,分成 A、B、C、D、E、F、G 组,每组 6 只。G 组为对照组,其余 6 组小鼠在同一天注射等量雌激素。A、B、C、D、E、F 组小鼠分别在注射雌激素的第 1、3、4、7、14 和 21 天行颈椎脱臼法处死,眼球取血法收集血清。利用双抗夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定血清中 OPG 值的含量,并使用雅培 C8000 全自动生化仪分别测定血清中谷氨酰转肽酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)、丙转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、尿酸(UA)、钙(Ca)、磷(P)和镁(Mg)表达水平,且对其中指标进行相关性分析。结果 与对照组相比,注射过雌激素的小鼠血清中 GGT 水平明显升高,差异有统计学意义($P=0.000$);A、B、C 组 ALP 水平与对照组比较差异有统计学意义($P=0.036, 0.008, 0.022$)。而 ALT、AST、CREA、UA、Ca、P 和 Mg 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。ELISA 结果显示 A、B 和 C 组小鼠的 OPG 水平显著升高,差异有统计学意义($P=0.000, 0.000, 0.017$);D、E、F 组 OPG 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。后期相关性分析结果表明 OPG 水平与 ALP 具有良好的相关性。结论 实验组健康小鼠在注射雌激素后短期内血清中 OPG、GGT、ALP 水平明显升高,提示小鼠可能发生了骨性变化且该变化具有时间相关性。

关键词:骨保护素; 骨代谢; 骨密度; 雌激素; 生化指标

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.06.001

中图法分类号:R580

文章编号:1673-4130(2019)06-0641-05

文献标识码:A

The effect of estrogen on osteoprotegerin and other related biochemical indexes in healthy mice

TIAN Jingjing, WANG Min[△], LI Xianping

(Department of Clinical Laboratory, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hu'nan 410011, China)

Abstract: **Objective** To detect serum osteoprotegerin (OPG) level on estrogen-injected mice and other related biochemical indexes to judge the effect of estrogen on bone metabolism. **Methods** 42 normal female ICR mice of 4—6 weeks were divided into seven groups from A to G, six in each group. Group G was the control group, and the rest six groups of mice were injected with estrogen on the first day. Eye blood from mice in group A were collected on the day of injection, and separated serum were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for preservation. Mice from group B, C, D, E and F were executed in the same way on the third, fourth, seventh, fourteenth and twenty-first days for serum, respectively. ELISA test was performed to determine the OPG value of all groups. Afterwards, related biochemical indexes were measured by using Abott C8000 Analyser, including serum ammonia acyl transpeptidase (GGT), alkaline phosphatase (ALP) transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CREA), uric acid (UA), calcium (Ca), phosphorus (P) and magnesium (Mg) level. Correlation analysis was also performed on significantly changed indexes. **Results** The level of serum ammonia acyl transpeptidase (GGT) and alkaline phosphatase (ALP) was significantly higher than the control group, with a significant difference ($P<0.05$). Between which, GGT was significantly different between each experimental group and control group ($P=0.000$), while ALP level was significantly different between control group and group A, B and C ($P=0.036, 0.008, 0.022$, respectively). However, other indexes including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CREA), uric acid (UA), calcium (Ca), phosphorus (P) and magnesium (Mg)

作者简介:田菁菁,女,技师,主要从事临床检验诊断学研究。 [△] 通信作者, E-mail: wangmin0000@csu.edu.cn.

本文引用格式:田菁菁,王敏,李先平. 雌激素对健康小鼠体内骨保护素及相关生化指标的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(6): 641-644.

showed no significant difference ($P>0.05$). The ELISA test showed that OPG level from group A, B and C were significantly elevated ($P=0.000, 0.000, 0.017$) with the other groups showing no obvious difference. Correlation analysis revealed a good correlation between OPG and ALP. **Conclusion** The serum OPG, GGT and ALP level are elevated in a short period of time after estrogen injection, indicating a change in bone metabolism in normal mice.

Key words: osteoprotegerin; bone metabolism; bone density; estrogen; biochemical indexes

绝经后骨质疏松(PMO)是骨质疏松最常见的类型,骨保护素(OPG)又称破骨细胞形成抑制因子^[1-2]。雌激素可通过增加骨中 OPG 的表达,抑制破骨性骨吸收,对去卵巢的骨质疏松有明显的治疗作用。以往针对雌激素抗骨质疏松情况的研究绝大多数以去卵巢小鼠为实验对象^[3-5],而少以健康小鼠作为研究对象。本实验旨在统计注射雌激素后小鼠体内 OPG 及骨代谢相关生化指标的变化情况及其相关性,以探讨其在骨质疏松中的意义,为骨质疏松的诊治提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2018 年 3—4 月 42 只无特定病原体(SPF)级美国癌症研究所(ICR)雌鼠,均购自湖南农业大学实验动物中心[SCXK(湘)2014-0001],6 周龄,平均体重(22±2)克。实验前全部小鼠于 SPF 级环境分笼内,室内温度控制在 20~25℃,相对湿度 60%左右,照明 12 h 明亮,12 h 黑暗,换气次数每小时 18 次,动物饲养笼具、饮水瓶定期消毒,所用垫料高压灭菌,饲养房内定期紫外灯消毒。喂食普通饮食,成分为 6.5%脂肪、56%碳水化合物(2.5%糖)。

1.2 仪器与试剂 应用雅培 C8000 全自动生化分析仪由雅培贸易(上海)有限公司提供;小鼠 OPG ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,产品编号:EK0481。苯甲酸雌二醇注射液购自天津金耀氨基酸有限公司,国药准字 H12020529,规格为 1 mL:1 mg。

1.3 方法

1.3.1 动物处理 取 42 只 6 周龄的 ICR 小鼠,分成 A、B、C、D、E、F、G 组,每组 6 只。实验前全部小鼠饲养与 SPF 级环境内。除 G 组(对照组)外,其余实验组(A~F 组)小鼠每只注射 0.5 mL 的雌激素。分别在注射雌激素的第 1、3、4、7、14 和 21 天使用颈椎脱臼法处死,第 1 天即为当天;于注射雌激素前 1 天使用颈椎脱臼法处死 G 组小鼠。

1.3.2 血清收集 A 组小鼠在注射雌激素的当天行眼球取血,将采好的血于在 37℃温箱保存 2 h 后在 4℃冰箱内放置 1 h,2 500×g 离心 10 min,分离并收集血清,储存于-20℃。B、C、D、E、F 组分别在动物处死当天采用同样方法进行处理。G 组于注射雌激素前 1 天收集血清并于-20℃保存。

1.3.3 血清 OPG 的测定 室温溶解冻存血清,所有血清样本均使用样本稀释液对倍稀释;采用双抗夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定血清 OPG;以吸光度值作为纵坐标,以浓度作为横坐标,使用各水平标准品(6 000、3 000、1 500、750、375、187.5、93.8 pg/mL),绘制标准曲线图,并根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件完成统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA);OPG、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)及 ALP 之间相关性采用直线相关和回归分析进行评估, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OPG 浓度标准曲线的制作 由 ELISA 法测出的标准浓度的数值用 Excel 做出标准曲线,所得曲线方程为 $Y=0.0004X+0.1641$,相关系数为 0.9612,其中 X 为 OPG 的浓度,Y 为测得的吸光度值。见图 1。

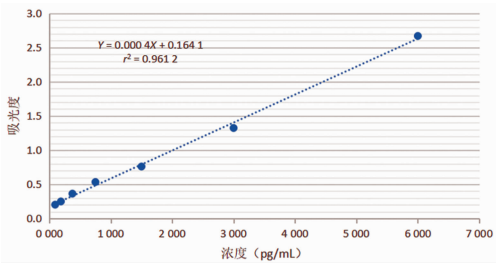


图 1 OPG 浓度标准曲线图

2.2 血清 OPG 含量比较 由得到的标准方程计算出各实验小鼠血清中的 OPG 浓度,其中对照组小鼠(G 组)OPG 水平为(3.540±0.65)ng/mL($P=1.000$)。与健康小鼠相比,注射过雌激素的小鼠在刚注射雌激素后 4 d 内所取血清中 OPG 含量有明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);第 4 天以后的含量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。实验组 A~F 组分别对应注射雌激素后第 1、3、4、7、14 和 21 天小鼠的 OPG 水平分别为(7.903±1.94)ng/mL($P=0.000$)、(8.629±1.57)ng/mL($P=0.000$)、(6.299±1.09)ng/mL($P=0.017$)、(5.460±1.49)ng/mL($P=0.075$)、(5.080±2.81)ng/mL($P=0.149$)及(3.951±1.38)ng/mL($P=0.709$)。每组小鼠与健康小鼠比均有增高,在第 3 天达到最高值。

2.3 注射雌激素后各生化指标比较 与健康小鼠比较,各实验组小鼠血清中 GGT 含量和 A、B、C 组 ALP 含量明显升高,其中各实验组小鼠与对照组小鼠 GGT 比较,差异有统计学意义($P=0.000$);而 A、B、C 组 ALP 水平与对照组比较,差异有统计学意义($P=0.036, 0.008, 0.002$)。D、E、F 组的 ALP 谷丙转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酐(CREA)、尿酸(UA)、钙(CA)、磷(P)和镁(MG)的水平变化比较差异无统计学意义($P>0.05$)。而各实验组间比较结果表明,除了 A 组与 D 组的 ALT 比较差异有统计学意义($P=0.033$)外,其他组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 OPG、 γ -GT 及 ALP 的相关性分析 由图 2~4 可知,OPG、 γ -GT 和 ALP 之间存在正相关的趋势,故本实验采用 SPSS13.0 对这 3 个指标进行相关分析。结果显示 OPG 与 ALP 的相关系数为 0.99,差异有统计学意义($P=0.000$),OPG 的含量和 GGT 的相关系数为 0.498,差异无统计学意义($P=0.255$),GGT 与 ALP 的相关系数为 0.528,差异无统计学意义($P=0.223$),见表 1。

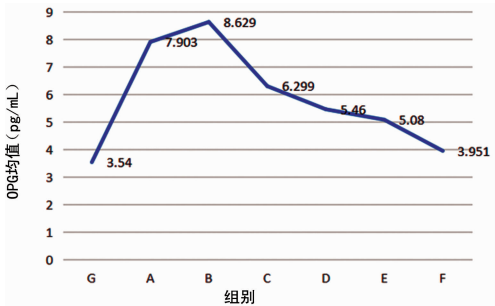


图 2 各组 OPG 的均值曲线

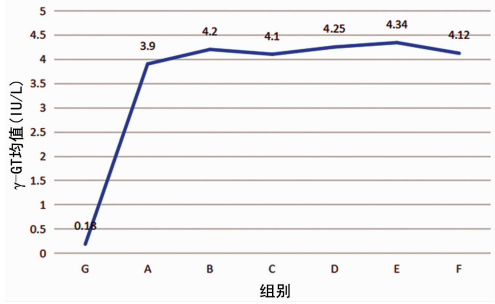


图 3 各组 γ -GT 的均值曲线

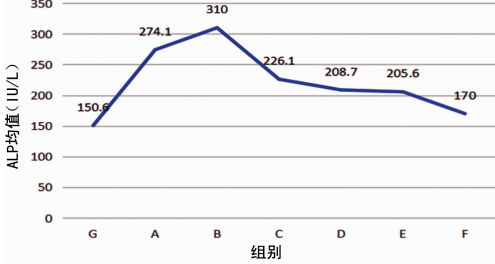


图 4 各组 ALP 的均值曲线

表 1 各实验小组的 OPG、 γ -GT、ALP 相关性分析			
项目	OPG	GGT	ALP
OPG			
Pearson 相关性	1	0.498	0.993 **
显著性(双侧)	—	0.255	0.000
GGT			
Pearson 相关性	0.498	1	0.528
显著性(双侧)	0.255	—	0.223
ALP			
Pearson 相关性	0.993 **	0.528	1
显著性(双侧)	0.000	0.223	—

注: ** 表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关;—表示无数据

3 讨 论

骨为肌肉收缩提供附着并保护内脏,是重要的生命器官。一般认为骨在细胞水平的代谢不活跃,然而事实上骨细胞在不停地进行代谢,不仅骨细胞之间存在相互作用,骨髓中的红细胞生成细胞及基质细胞通过相互作用所构建的骨骼微环境,也是机体赖以进行骨的改建和重建的重要基础^[6]。骨质疏松的发生发展是一个复杂的过程,近年来研究认为骨质疏松与衰老、雌激素下降、营养失调、疾病、药物和遗传基因等因素有关^[7],这些因素影响骨量的丢失与骨重建这一过程,当骨吸收大于骨形成时即导致骨质疏松^[8]。绝经后骨质疏松是由于绝经女性的卵功能衰退,合成和分泌雌激素的功能下降,从而影响骨钙吸收,骨量大幅度下降而导致骨质疏松^[9-10]。

骨量的维持由骨形成作用和骨吸收作用间的动态耦联和平衡完成。除骨细胞本身以外,许多激素及生长因子、细胞因子均参与这些过程的调控。骨量的丢失与否则取决于骨局部微环境中的细胞因子和生长因子的浓度及活性。尽管多种细胞因子或激素可以调控破骨细胞的分化成熟,但研究发现肿瘤坏死因子(TNF)超级家族的成员核因子 κ B 受体活化因子配基(RANKL)和多集落刺激因子(M-CSF)为其决定因素^[11]。在存在 M-CSF 的情况下,破骨细胞的前体细胞表达的核因子 κ B 受体活化因子(RANK)可以和成骨细胞和基质细胞表达的 RANKL 配体结合,诱导破骨细胞前体细胞分化成破骨细胞;同时成熟的破骨细胞也表达 RANK,它也可以与 RANKL 结合调节成熟破骨细胞的骨吸收活性。成骨细胞系的多种细胞分泌表达 OPG,它与 RANKL 竞争性结合,阻止 RANKL 与 RANK 的结合,从而阻止破骨细胞活化及抑制骨吸收^[12-13]。因此 OPG 对于骨代谢起着非常重要的作用。部分研究表明,体内各种激素和细胞因子包括 rhIGF-1^[14]和 MT3T3-E1^[15]等,均可通过影响破骨细胞上的 OPG 配体进而影响成骨细胞和骨髓基

质细胞,调控破骨细胞水平,也从侧面反映了 OPG 的骨代谢调节作用。OPG 作为骨代谢调控的终末因素,缺乏或者受到破坏时,可以出现各种骨代谢方面的异常。

另一方面,大量的基础研究已肯定了雌激素对骨质疏松的保护作用。体外实验表明,雌激素可刺激成骨细胞株 OPG 的分泌,阻断破骨细胞骨吸收信号的传递,从而拮抗去卵巢大鼠介导的骨质疏松^[3]。在雌激素对抗骨质疏松相关机制的研究中,基于 OPG 的 OPG/RANK/RANKL 系统受到关注。国内外研究表明 OPG 具有抑制破骨细胞形成、分化、存活、活化并诱导破骨细胞凋亡的功能,其功能与 RANKL 密切相关,因为 RANKL 是 OPG 的配体,OPG 与 RANKL 结合抑制破骨细胞形成和活化,发挥抗破骨作用^[16-17]。另外有研究表明,雌激素受体 β 沉默可通过 ApoE 影响 RANKL 通路和 OPG 水平,从而影响骨代谢水平^[18];成骨细胞中的雌激素 β 受体可通过调控 IL-6 及 TGF- β 从而影响 RANKL/RANK/OPG 通路^[19],无不验证了雌激素水平与 OPG 水平的相关性。而绝经妇女体内雌激素缺乏导致骨中 OPG 表达量下降,外源性雌激素的应用则可阻止这种变化,将是未来治疗老年性骨质疏松的发展方向。以往研究大多以敲除卵巢或已患骨质疏松的动物为实验对象研究雌激素对骨代谢的影响作用,而鲜少将健康小鼠作为实验对象。

因此本实验利用给健康小鼠注射雌激素后测得血清中 OPG 的含量和骨代谢的一些生化指标质的变化情况,以期探讨雌激素对抗骨质疏松的作用。各实验组血清中 OPG 含量变化情况表明,与对照组比较,注射过雌激素的小鼠在刚注射后 4 d 内取的血清 OPG 的含量会明显升高,第 3 天达到峰值。在第 3 天以后 OPG 含量呈缓慢下降趋势,到达第 21 天时基本与正常水平持平。引起这种结果的原因与小鼠的个体差异和雌激素的药代动力学有关。从本实验原始数据可知小鼠间的个体差异较大。人体雌激素代谢时间为 7~10 d^[20],研究者推断注射的雌激素在小鼠体内有类似或更短的作用时间,即随着雌激素的代谢,会出现 OPG 水平的下降。

除了测定上述 OPG 的结果以外,本实验同时测定了实验小鼠的肝肾功能和骨代谢的相关生化指标。本实验结果显示,与对照组相比,血清中骨代谢指标 GGT、ALP 水平明显升高。而其他肝肾功能的指标水平变化不明显,即排除是由于肝肾功能变化所致;健康人群的血清或血浆中测得的总 ALP 几乎全部来自肝脏和骨骼系统^[20]。血清总 ALP 不能完全代表其来源,因此常用 γ -GT 来鉴别 ALP 的来源^[1]。本实验测定虽为血清总 ALP,但由于已排除由肝肾功能变化

所致,故可推测本实验所测得的 ALP 升高为骨源性升高。

相关性分析结果显示 OPG、 γ -GT、ALP 的含量均明显增高且呈正向相关,进一步说明健康小鼠注射雌激素以后通过影响 OPG 水平使骨代谢产生变化。本实验选取健康小鼠而非去卵巢作为实验对象,更真实地模拟了一般情况下雌激素水平对骨代谢的影响;且短时间后 OPG 水平的下降也从侧面证明其与雌激素代谢时间的相关性。后续试验将继续就健康小鼠中雌激素水平导致 OPG 水平改变的机制进行研究及验证。本研究证明雌激素可以通过升高 OPG 水平从而抑制骨吸收,实现抗骨质疏松作用。

4 结 论

本研究结果发现,注射雌激素能在短期内使健康 ICR 雌鼠血清中的 OPG、ALP、GGT 等骨代谢相关指标升高。雌激素对 OPG 有促进作用,可以通过升高 OPG 水平从而抑制骨吸收,实现抗骨质疏松作用。

参考文献

- [1] 郭盖,卜淑敏,韩天雨. 不同干预方法对去卵巢骨质疏松大鼠子宫 GSK-3 β 蛋白表达的影响[J]. 中国实验动物学报,2014,20(5):53-58.
- [2] HOFBAUER L C, KHOSLA S, DUNST A C, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption[J]. Bone and Miner Res,2000,15(1):2-12.
- [3] UDAGAWA N, TAKAHASHI N, YASUDA H, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function[J]. Endocrinology,2000,141(9):3478-3484.
- [4] 祁珊珊. 去卵巢对骨质疏松大鼠皮肤衰老的影响[J]. 中国实验动物学报,2017,22(3):325-328.
- [5] 苏欣,廖二元. OPG、OPGL 及其相关因子的骨代谢调节作用[J]. 国外医学(内分泌学分册),2001,21(2):91-94.
- [6] 姜晓洪. 骨质疏松的研究进展及雌激素抗骨质疏松的新机制[J]. 临床内科杂志,2002,4(19):18-19.
- [7] 张胜利,王金平. 雌激素在 I 型原发性骨质疏松症发病机制中作用的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,1999,20(5):87.
- [8] 李晓佳,安振梅,魏松全. OCIF/OPG 的研究进展[J]. 国外医学(内分泌学分册),2000,20(1):1-4.
- [9] 张晔,吴小涛. OPG/OCIF 的结构、表达及功能[M]. 国外医学(分子生物学分册),2001,23(1):27-29.
- [10] VILLARREAL E, BERMDDEZ A. Polymorphisms of ApoE in colombian women with osteoporosis: correlation with clinical and social risk variable[J]. Bio Med,2004,24(1):50-55.
- [11] 周波,王晓红,王松涛,等. 老年人载体脂蛋白 E 基因多态性、骨密度和股丢失[J]. 沈阳医学院学报,2007,22(9):155-156.

(下转第 648 页)

资源,而且对 HPV16、HPV18 感染者的快速检测和治疗将具有重要的实际应用价值。

4 结 论

成功制备抗 HPV16E6、18E6 单克隆抗体,该抗体效价高,特异度好,为建立血清学诊断方法打下了基础。

参考文献

[1] DAS M. Cervical cancer vaccine controversy in India[J]. Lancet Oncology, 2018, 19(2): 84.

[2] WALBOOMERS J M, JACOBS M V, MANOS M M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19.

[3] WU Y P, CHEN Y L, LI L Y, et al. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China[J]. J Clin Virology, 2006, 35(3): 264-269.

[4] SMOTKIN D, WETTSTEIN F O. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and cancer-derived cell lines and identification of E7 protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(1): 4680-4684.

[5] ANDROPHY E J, HUBBER N L, SCHILLER J T, et al. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines[J]. Embo J, 1987, 6(4): 989-992.

[6] WERNESS B A, LEVINE A J, HOWLEY P M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53[J]. Science, 1990, 248(1): 76-79.

[7] HUIBREGTSE J M, SCHEFFNER M, HOWLEY P M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6

oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18[J]. EMBO J, 1991, 10(1): 4129-4135.

[8] HUBBERT N L, SEDMAN S A, SCHILLER J T. Human papilomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes[J]. Virol, 1992, 66(1): 6237-6241.

[9] CHEN W, ZHANG X, MOLIJN A, et al. Human papillomavirus type-distribution in cervical cancer in China: the importance of HPV 16 and 18[J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(9): 1705-1713.

[10] CANFELL K, SHI J F, LEW J B, et al. Prevention of cervical cancer in rural China: Evaluation of HPV vaccination and primary HPV screening strategies[J]. Vaccine, 2011, 29(13): 2487-2494.

[11] KEDZIA W, OLEJNIK A, SCHMIDT M, et al. The level of antibody against E6 HPV 16 oncoprotein in blood sera of women with chronic HPV 16 infection and cervical cancer[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2006, 27(1): 65-68.

[12] KHAN M J, CASTLE P E, LORINCZ A T, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(14): 1072-1079.

[13] COTTINGHAM I R, MILLAR A, EMSLIE E, et al. A method for the amidation of recombinant peptides expressed as intein fusion proteins in Escherichia coli[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(10): 974-977.

(收稿日期: 2018-09-20 修回日期: 2018-12-28)

(上接第 644 页)

[12] WONG S Y, LAU E M, LI M, et al. The prevalence of Apo E4 genotype and its relationship to bone mineral density in Hong Kong Chinese[J]. J Bone Miner Metab, 2005, 23(3): 261-265.

[13] ZAULI G, RIMONDI E, NICONLIN V, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRALT) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL plus M-CSF [J]. blood, 2004, 104(1): 2044-2050.

[14] BOYCE B F, XING L P. The RANKL/RANK/OPG pathway[J]. Curr Osteoporos Rep, 2007, 5(3): 98-104.

[15] TAKAHASHI N, VDAGAWA N, SUBA T. A new member of tumor necrosis factor ligand family OOF/OPGL/TRANSE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and faction[J]. Biochem Biophys Res commun, 1999, 256(1): 449-455.

[16] PEACOCK M, TURNER C H, ECONS M J, et al. Genetics of osteoporosis[J]. Endocrine Rev, 2002, 23(1): 303-326.

[17] 薛月华, 谢匡成, 许翔, 等. 绝经期冠心病妇女血脂水平与骨密度的研究[J]. 中国骨质疏松杂志. 2008, 14(1): 389-390.

[18] JOHN A, KANISA F B, NIKLAS Z, et al. Intervention thresholds for osteoporosis in the UK[J]. Bone, 2005, 36(1): 22-32.

[19] 韩志钧, 黄志锋, 卢业成, 等. 临床化学常用项目自动分析法[M]. 3 版. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2005: 726-730.

[20] 束怀德, 曹霖. 雌激素代谢研究的进展[J]. 生殖与避孕, 1984, 22(2): 9-15.

(收稿日期: 2018-09-11 修回日期: 2018-11-28)