

# 刺老苞根皮黄酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MC3T3-E1 成骨细胞损伤改善

裴凌鹏<sup>1</sup>, 尹霞<sup>2</sup>, 崔箭<sup>1</sup>, 李莉<sup>2</sup>, 朱嘉<sup>2</sup>

(1. 中央民族大学中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081)  
(2. 中国中医科学院望京医院骨科研究所, 北京 100070)

[摘要] 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫下, 研究刺老苞根皮 (*Aralia echinocalis*) 黄酮增强 MC3T3-E1 成骨细胞抗自由基损伤的作用. 为此用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 MC3T3-E1 成骨细胞, 建立自由基损伤细胞模型. 培养的成骨细胞分为对照组、模型组、刺老苞根皮黄酮低剂量组 (1 × 10<sup>-8</sup> mol/L)、刺老苞根皮黄酮中剂量组 (1 × 10<sup>-7</sup> mol/L) 和刺老苞根皮黄酮高剂量组 (1 × 10<sup>-6</sup> mol/L). 测定不同处理组细胞活力、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、活性自由基 (reactive oxygen species, ROS) 含量、脂质过氧化物 (lipid oxygen, LPO) 含量, 同时利用荧光偏振法测定细胞膜流动性. 结果显示与模型组相比, 刺老苞根皮黄酮组细胞活力、SOD 活性、细胞膜流动性均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 ROS 含量、LPO 含量则显著降低 ( $P < 0.01$ ), 并呈现一定的量效关系. 可以认为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 摄入会导致 MC3T3-E1 成骨细胞的氧化损伤, 而刺老苞根皮黄酮可以预防或降低此类损伤对细胞的影响.

[关键词] MC3T3-E1 成骨细胞; 自由基; 刺老苞根皮; 黄酮类化合物  
[中图分类号] R 291.9 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)01-0107-05

## Improvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induced MC3T3-E1 Osteoblast Damage by *Aralia echinocalis* Hand Mazz Flavonoids

Pei Lingpeng<sup>1</sup>, Yin Xia<sup>2</sup>, Cui Jian<sup>1</sup>, Li Li<sup>2</sup>, Zhu Jia<sup>2</sup>

(1. Central MNZU University, Institute of Minority Traditional Medicine Research, Beijing 100081, China)  
(2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Wangjing Hospital, Institute of Orthopaedics and Traumatology, Beijing 100070, China)

**Abstract:** Objective to investigate the effect of *Aralia echinocalis* Hand Mazz flavonoids on enhances the function of anti-oxidative damage in MC3T3-E1 osteoblast. Methods MC3T3-E1 osteoblasts were randomly divided in five groups, including control group, model group, *Aralia echinocalis* Hand Mazz flavonoids group [low dose (1 × 10<sup>-8</sup> mol/L), middle dose (1 × 10<sup>-7</sup> mol/L), high dose (1 × 10<sup>-6</sup> mol/L)], whose activity of cells, superoxide dismutase (SOD), the content of reactive oxygen species (ROS), lipid oxygen (LPO) and membrane fluidity were tested and compared. Results compared with model group, the activity of cells, SOD activity and membrane fluidity in *Aralia echinocalis* Hand Mazz flavonoids groups were significantly raised ( $P < 0.01$ ). However, the content of ROS and LPO were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Conclusion H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can cause oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblasts, but *Aralia echinocalis* Hand Mazz flavonoids can prevent and decrease its influence.

**Key words:** MC3T3-E1 osteoblast, free radical, *Aralia echinocalis* Hand Mazz, flavonoids

刺老苞根皮为五加科木属植物槲木 (*Aralia echinocalis* Hand Mazz) 及其变种白背叶木 (Var. *nuda* Nakai) 的根皮或茎皮, 始载于《本草拾遗》<sup>[1]</sup>. 原植物槲木主要分布于华北、华中、华东、华南和西南各省区, 生于山地林缘、林中或路旁灌木丛中, 药材块片状或槽状, 气微香, 嚼之带粘液性, 味辛, 性平. 归胃、肝、肾经, 功能滋阴健肾, 祛风湿, 壮筋骨, 散瘀血, 消肿毒, 可用于风湿痹痛、跌打损伤、骨折等治疗<sup>[2]</sup>, 但其骨伤药理基础研究报道较少, 故本实验拟通过刺老苞根皮黄酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤鼠成骨细胞 MC3T3-E1 模型的

收稿日期: 2009-04-06  
基金项目: 教育部“长江学者与创新团队”计划 (In0871)、国家自然科学基金 (30902011).  
通讯联系人: 裴凌鹏, 博士, 讲师, 研究方向: 民族医药与临床学. E-mail: lpei@hotmail.com

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、活性自由氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量、脂质过氧化物 (lipid oxygen, LPO) 含量以及细胞膜流动性的测定, 并与模型组进行比较来研究此类化合物对增强成骨细胞对抗  $H_2O_2$  氧化能力的影响.

# 1 材料与方 法

## 1.1 主要仪器和试剂

Labconco 冰冻真空干燥仪, 752 分光光度计, AE100 电子天平, 电热三用水箱, 960 型荧光分光光度计, J2-SH 高速冰冻离心机, KA-1000 型台式离心机, C18 柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m 美国 Waters 公司), HPLC (Waters 600E 溶剂输送系统, PDA-2996 二极管阵列检测器 Waters),  $CO_2$  细胞培养箱 (Precision Scientific 公司), 倒置相差显微镜 (OLYMPUS), MDA、SOD 测定试剂盒 (购自南京建成生物工程研究所), 刺老苞根皮 (购自湖北恩施医药公司), 乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚 (MTBE) (迪马公司), 无水乙醇 (北京化学试剂公司), 大孔吸附树脂 (天津农业股份公司), MEM、胰蛋白酶、胎牛血清为 Gibco 公司产品, 1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯 (DPH)、二氯荧光素 (DCF)、四氢呋喃 (THF)、芦丁标准品购自 Sigma 公司.

## 1.2 刺老苞根皮黄酮制备

### 1.2.1 索氏提取法提取流程

1 000 g 刺老苞根皮晒干后研磨, 60  $^{\circ}C$  烘干, 过 60 目筛备用. 70% 乙醇 60 mL 回流提取, 提取 4 h 离心过滤. 大孔吸附树脂柱分离. 水洗脱. 乙醇洗脱. 减压浓缩. 冰冻真空干燥, 制成干粉.

### 1.2.2 刺老苞根皮黄酮定性定量分析

利用芦丁标准品配制成一定浓度梯度的系列溶液, 通过紫外可见吸收光谱测定溶液黄酮含量, 绘制浓度-含量标准曲线, 再将制备的刺老苞根黄酮提取液进行定量分析, 并根据其 HPLC 的特征峰、保留时间与芦丁标准品比对进行定性分析.

## 1.3 成骨细胞实验

### 1.3.1 成骨细胞培养

将 MC3T3-E1 成骨细胞 (购自美国 ATCC 细胞库) 复苏后, 用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液重悬吹打均匀后, 以每孔  $1 \times 10^5$  个 /mL 细胞的密度接种于培养瓶中. 在 37  $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  条件下培养, 隔日换液, 以后每隔 2 d 换液 1 次, 细胞融合后, 用 0.25 g/L 胰蛋白酶消化、传代, 相差显微镜下观察成骨细胞形态.

复苏后培养的成骨细胞贴壁生长正常, 细胞形态多呈三角形、多边形、长梭形等, 有粗细不均的胞浆突破, 且呈集成集落样生长, 无接触抑制, 可相互重叠成复层生长, 有伪足伸出, 胞液透亮, 核圆形, 位于胞体一侧 (图 1).

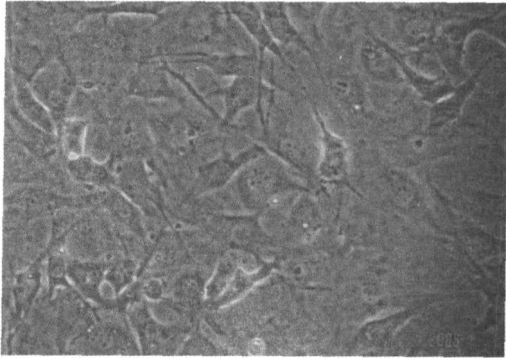


图 1 培养 48h 的 MC3T3-E1 成骨细胞形态  
Fig.1 MC3T3-E1 osteoblast with 48 h cultured (SP $\times$ 400)

### 1.3.2 成骨细胞分组处理

将细胞计数后分成 5 个处理组, 其中对照组和损伤模型组使用正常培养液进行培养, 而高、中、低不同剂量刺老苞根皮黄酮组分别用含有  $1 \times 10^{-6}$  mol/L、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L、 $1 \times 10^{-8}$  mol/L 的刺老苞根皮黄酮培养液培养. 培养 48 h 后除对照组外其余各组均用  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 的  $H_2O_2$  进行损伤处理 5 min, 离心去掉上清液备用.

## 1.4 观测指标与方法

### 1.4.1 细胞活力测定

以 MEM 为培养液, 细胞浓度  $1 \times 10^5$  个 /mL. 收集处理后的细胞, 台盼蓝染色观察细胞存活率. MEM 洗涤 2 次后重悬细胞, 加入 10% Alamar Blue. 37  $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  培养 4 h 用酶标仪分别于 540 nm 和 620 nm 测定吸光度, 并计算还原率.

$$\text{还原率 \%} = (A_{540} - A_{620} \times R) \times 100;$$

$$R = (A_{A540} - A_{R540}) / (A_{A620} - A_{R620});$$

$A_{A540}$ :波长 540 nm 时 A lamar B lue 对照的吸光度;

$A_{R540}$ :波长 540 nm 时 MEM 对照的吸光度;

$A_{A620}$ :波长 620 nm 时 A lamar B lue 对照的吸光度;

$A_{R620}$ :波长 620 nm 时 MEM 对照的吸光度;

$A_{540}$ :波长 540 nm 时样品的吸光度;

$A_{620}$ :波长 620 nm 时样品的吸光度.

#### 1.4.2 ROS测定

以 PBS 调节细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个 /mL 左右,加入  $5 \mu\text{mol/L}$  二氯荧光素 (DCF) 预处理细胞 1 h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 染毒后,荧光分光光度计激发光 485 nm、狭缝 5 nm、发射光 530 nm、狭缝 10 nm,测定各组细胞悬液及无细胞对照组中 DCF 的荧光强度.

#### 1.4.3 SOD 活性及 LPO 测定

收集处理后的细胞, PBS 洗涤 2 次, -70 反复冻融 3 次,  $4 \sim 10\,000$  r/min 离心 20 min, 取上清. Nitrite 法测定 SOD 活性. TBA 荧光法测定 LPO. 考马斯亮蓝 G250 测定蛋白质水平校正 SOD 及 LPO 值.

#### 1.4.4 成骨细胞膜分离

成骨细胞溶于 pH7.4 的  $10\text{ mmol/L}$  Tris-HCl 低渗缓冲液中,  $4 \sim 10\,000$  r/min 离心 20 min, 将沉淀物再置于低渗缓冲液中,  $10\,000$  r/min 离心 15 min, 得到白色的细胞膜组织. 封闭影泡制备: 白色细胞膜悬浮于少量等渗磷酸缓冲溶液中静置于冰箱中过夜. 最后用 Lowry 法测定蛋白, 调整膜蛋白浓度为  $500 \sim 800 \mu\text{g/mL}$ .

#### 1.4.5 细胞膜的流动性测定 (荧光偏振法)

DPH 荧光探针标记: 溶于四氢呋喃, 用时取一定量溶液用 pH7.4 的含盐的等渗磷酸缓冲液稀释至终浓度为  $0.004\text{ mmol/L}$ , 激烈震荡 15 min, 吸收 DPH 应用液与等体积预先制备的细胞膜样品混匀,  $37^\circ\text{C}$  温育 10 min.

荧光测定条件: 室温测定荧光强度和加偏振片以后不同光路方向的荧光, DPH 使用激发波长  $362\text{ nm}$ , 发射波长  $432\text{ nm}$ , 在荧光分光光度计测定荧光, 计算荧光偏振度、微黏度、各向异性和膜脂流动性. 在测定中主要参考因子  $A_{vh}$ 、 $A_{vv}$ 、 $A_{hh}$ 、 $A_{hv}$ .

$A_{vv}$ : 起偏与测偏器的方向均平行于样品杯方向的荧光;

$A_{vh}$ : 起偏平行于样品杯的高度方向, 测偏器的方向垂直于样品杯的高度方向荧光;

$A_{hh}$ : 起偏与测偏器的方向均垂直于样品杯的高度方向荧光;

$A_{hv}$ : 起偏垂直于样品杯的高度方向, 测偏器的方向平行于样品杯的高度方向荧光.

在描述膜流动性过程参考的数值:

$$\text{荧光偏振度 } P = (A_{vv} - B) / (A_{vv} + B) B = A_{hv} / A_{hh};$$

$$\text{微黏度 } = 2P / (0.46 - 0.92P);$$

$$\text{各向异性 } = 2P / (3 - P);$$

$$\text{膜脂质流动性 } LFU = (P_{\max} - P_r) - (P_r \times P_r);$$

$P_{\max}$  为 0.5,  $P_r$  为所测荧光偏振度.

#### 1.5 统计处理

数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 或均值 ( $\bar{x}$ ) 表示, 利用 SPSS10.0 统计软件进行统计, 组间差异比较用单因素方差分析. \*  $P < 0.05$  为有差异, \*\*  $P < 0.01$  为有显著差异.

## 2 结果与讨论

### 2.1 刺老苞根皮黄酮定性定量分析

通过方法部分 1.2.1, 刺老苞根皮黄酮制备收率为 8.7%. 参照芦丁标准品, 经 HPLC 及其光谱特征峰鉴定, 纯度为 95%, 其中主要为黄酮和双黄酮.

2.2 细胞活力测定

1 ×10<sup>-6</sup> mol/L、1 ×10<sup>-7</sup> mol/L、1 ×10<sup>-8</sup> mol/L 3个浓度的刺老苞根皮黄酮处理 1 ×10<sup>-5</sup> mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 染毒成骨细胞活力结果可看出:与模型组相比,刺老苞根皮黄酮组和对照组的细胞活力较模型组有显著增加 (P < 0. 01),且刺老苞根皮黄酮组处理的细胞活性随剂量升高而增强 (表 1)。

2.3 ROS、LPO 含量和 SOD 活性测定

1 ×10<sup>-6</sup> mol/L、1 ×10<sup>-7</sup> mol/L、1 ×10<sup>-8</sup> mol/L 3个浓度的刺老苞根皮黄酮预处理后,再由 1 ×10<sup>-5</sup> mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的成骨细胞 ROS、LPO 含量和 SOD 活性结果表明:与模型组相比,刺老苞根皮黄酮组和对照组的 ROS和 LPO 含量显著减少 (P < 0. 01),而 SOD活性显著增强 (P < 0. 01),且呈现一定量效关系 (表 2)。

表 1 不同浓度刺老苞根皮黄酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 染毒细胞活力影响 (  $\bar{x}$ , n = 6)

Table 1 The activity of osteoblast under different concentration of Aralia echinocaulis Hand Mazz flavonoids (  $\bar{x}$ , n = 6)

组别	A lamar B lue / %
模型组	44 %
对照组	63 %
刺老苞根皮黄酮低剂量 (1 ×10 <sup>-8</sup> mol/L)	52 %
刺老苞根皮黄酮中剂量 (1 ×10 <sup>-7</sup> mol/L)	57 %
刺老苞根皮黄酮高剂量 (1 ×10 <sup>-6</sup> mol/L)	60 %

表 2 不同浓度刺老苞根皮黄酮对细胞 ROS、LPO 含量和 SOD 活性的影响 (  $\bar{x}$ 或  $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

Table 2 The content of ROS、LPO and activity of SOD under different concentration of Aralia echinocaulis Hand Mazz flavonoids (  $\bar{x}$  or  $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

组别	ROS	LPO / (mmol/mg)	SOD / (NU /mg)
模型组	421	0. 47 ±0. 08	5. 8 ±0. 5
对照组	324 * *	0. 20 ±0. 03 * *	10. 5 ±1. 2 * *
刺老苞根皮黄酮低剂量 (1 ×10 <sup>-8</sup> mol/L)	411 * *	0. 55 ±0. 07 * *	6. 6 ±0. 6 * *
刺老苞根皮黄酮中剂量 (1 ×10 <sup>-7</sup> mol/L)	392 * *	0. 37 ±0. 05 * *	7. 3 ±0. 6 * *
刺老苞根皮黄酮高剂量 (1 ×10 <sup>-6</sup> mol/L)	339 * *	0. 29 ±0. 04 * *	9. 1 ±0. 7 * *

注:与模型组比较 \* P < 0. 05, \* \* P < 0. 01

2.4 细胞膜的流动性测定

1 ×10<sup>-6</sup> mol/L、1 ×10<sup>-7</sup> mol/L、1 ×10<sup>-8</sup> mol/L 3个浓度的刺老苞根皮黄酮预处理后,1 ×10<sup>-5</sup> mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理成骨细胞膜流动性结果表明:与模型组相比,刺老苞根皮黄酮组和对照组的各流性参数显著差异 (P < 0. 01),且刺老苞根皮黄酮处理的细胞流动性随剂量升高而增强 (表 3)。

表 3 不同浓度刺老苞根皮黄酮对成骨细胞膜的流动性的影响 (DPH 标记) (  $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

Table 3 The membrane fluidity of osteoblast under different concentration of Aralia echinocaulis Hand Mazz flavonoids (  $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

组别	偏振度	各向异性	微黏度	膜脂流动性
模型组	0. 52 ±0. 12	0. 34 ±0. 10	7. 19 ±1. 12	2. 17 ±0. 22
对照组	0. 43 ±0. 11 *	0. 28 ±0. 09 *	6. 90 ±1. 08 *	2. 95 ±0. 27 * *
刺老苞根皮黄酮低剂量 (1 ×10 <sup>-8</sup> mol/L)	0. 46 ±0. 11 *	0. 33 ±0. 08 *	6. 98 ±1. 08 *	2. 22 ±0. 26 * *
刺老苞根皮黄酮中剂量 (1 ×10 <sup>-7</sup> mol/L)	0. 45 ±0. 11 *	0. 31 ±0. 10 *	6. 95 ±1. 07 *	2. 31 ±0. 27 * *
刺老苞根皮黄酮高剂量 (1 ×10 <sup>-6</sup> mol/L)	0. 44 ±0. 10 *	0. 30 ±0. 10 *	6. 93 ±1. 08 *	2. 69 ±0. 29 * *

注:与模型组比较 \* P < 0. 05, \* \* P < 0. 01

3 结论

活性氧对成骨细胞具有细胞毒性作用. 虽然研究表明成骨细胞表面存在类谷胱甘肽过氧化物酶作用的硒蛋白,能够保护成骨细胞免受骨改建过程中破骨细胞产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 自由损伤,但这种抗氧化作用十分有限. 活性氧的产生会导致成骨细胞的死亡、减少成骨细胞的数量. 研究发现,活性氧对成骨细胞的影响可能是由于活性氧特别是 OH 攻击细胞增殖期的 DNA 及合成 DNA 所需的酶,使 DNA 发生链的断裂,并损害碱基,影响 DNA-DNA、DNA 蛋白质交联,受损的 DNA 转录复制功能减弱,细胞分裂繁殖发生障碍,成骨

细胞产生减少,而严重的 DNA 损伤则导致成骨细胞凋亡.同时活性氧也能作为一种骨组织局部调节因子,直接或间接影响着成骨细胞产生、发展的各个阶段<sup>[3,4]</sup>.

本实验中对对照组的 DNA 自发性损伤均较低,随着  $H_2O_2$  浓度的增加,DNA 氧化损伤情况均有所加重.这主要是由于  $H_2O_2$  是 DNA 诱导剂,它能很容易地穿透细胞膜自由进入细胞,如不被酶解可直接进入细胞核.在细胞核内,可能在有结合与 DNA 上的金属离子如铁、铜等的催化下转变成具有高活性的或由  $H_2O_2$  诱发的氧化反应引起细胞内 DNA 储藏位点的释放,从而造成 DNA 链的断裂, $H_2O_2$  不但可以造成 DNA 链的断裂,而且抑制 DNA 的修复.实验结果表明随着  $H_2O_2$  浓度的增加,其诱导的成骨细胞 DNA 损伤逐渐增大,SOD 抗氧化酶活性降低,LPO 含量和细胞体内的总 ROS 含量增加,导致细胞增殖活力受到抑制.相比之下,刺老苞根皮黄酮组对  $H_2O_2$  诱导的成骨细胞氧化损伤有明显的保护作用且各项生化指标与损伤对照组均存在明显统计学差异 ( $P < 0.01$ ),说明刺老苞根皮黄酮可有效地降低  $H_2O_2$  对成骨细胞造成的伤害.

细胞是构成生命的基本单位,行使着多种生物学功能.细胞膜的液态镶嵌模型中脂双层可以看作具有流动性质的基质,其中镶嵌着可以活动的蛋白质.脂分子和蛋白质分子都在膜上不停地运动,构成膜的流动性.膜脂分子在膜上扩散系数较大,而蛋白质分子由于区域性限制,运动型有限,故扩散系数较小,所以一般所说的膜流动性主要是指膜脂的流动性<sup>[5]</sup>.

DPH 是一种刚性分子,在亲水介质中以顺式结构存在,几乎没有荧光,但它一旦进入疏水的环境中,则介质黏度变大,成为全反式结构而发出强烈的荧光,DPH 分子的长轴接近与脂肪链分子长轴平行,故荧光偏振度可以较好地反映膜脂区的流动特征.

荧光偏振法研究细胞膜流动性原理是指细胞膜和 DPH 荧光物质共同温育,荧光探针很容易插入膜脂双层中,和磷脂分子平行排列,而黄酮类化合物的不饱和链式分子结构易于与脂双层疏水区结合.若烃链不活动,则 DPH 排列整齐.用一束偏振光去激发后,能发出的荧光也将是偏振的;若烃链活动性很大,从吸收荧光到发射荧光这段时间内,DPH 将随着磷脂分子的活动而有不同程度的倾斜或转动,以至发出的荧光其偏振度减小.荧光偏振度越大,说明膜脂的流动性越小;微黏度越大,膜脂流动性越小;各向异性越大,分子排列越规则,流动性越小<sup>[6]</sup>.

本实验结果表明,在体系中,随着成骨细胞膜被氧化,细胞膜脂的流动性呈现下降趋势.细胞在  $H_2O_2$  作用下发生的自由基损伤导致膜的物理改变,流动性的下降便是一个重要指标.而刺老苞根皮黄酮防止成骨细胞膜脂质过氧化实验结果表明,添加一定量的刺老苞根皮黄酮可以部分修复羟自由基引发的膜损伤.从实验数据可以发现,受到氧化损伤后表征膜的流动性的几个参考量均发生变化,而经不同浓度的刺老苞根皮黄酮处理后,这些量逐步得到恢复.

综上所述,刺老苞根皮黄酮可以有效地防御与降低  $H_2O_2$  对 MC3T3-E1 成骨细胞的氧化损伤,进而通过淬灭自由基保护成骨细胞增殖,促进骨形成过程.

## [参考文献]

- [1] 邵兴,赵敬华. 浅析自然地理环境与土家族医药学的关系[J]. 中国民族民间医药, 2007, 11(3): 58-60.
- [2] 方志先,赵晖,赵敬华. 土家族药物志[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2007: 830-835.
- [3] Kim L. Lycopene Effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells[J]. J Med Food, 2003, 6(2): 79-86.
- [4] Jacobson A. Vitamin A differentially regulates RANKL and OPG expression in human osteoblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(1): 162-167.
- [5] Reiter R. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in human[J]. J Pineal Res, 1995, 18: 1-11.
- [6] Chan T Y. Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer[J]. J Pineal Res, 1996, 20: 187-191.

[责任编辑:孙德泉]