

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.12.008

GSK-3 $\beta$  在高糖环境下足细胞转分化效应中的作用杨莉莉<sup>1</sup>, 刘章锁<sup>2</sup>

(1. 郑州市儿童医院肾脏风湿科, 河南郑州 450053; 2. 郑州大学第一附属医院肾脏内科, 河南郑州 450052)

**[摘要]** **目的** 探讨糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )在高糖环境下足细胞转分化效应中的作用。**方法** 用含不同浓度葡萄糖的 1640 培养基处理足细胞 36 h, 采用 Western blot 与间接免疫荧光的方法检测足细胞表面标记蛋白 nephrin、podocin 和间充质细胞表型标志物  $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、Fibronectin 的表达; 用 Transwell 小室检测不同处理组足细胞清蛋白流入量的变化。用 GSK-3 $\beta$  激酶检测试剂盒检测高糖环境下足细胞 GSK-3 $\beta$  表达量及活性的变化; 应用 GSK-3 $\beta$  siRNA 干扰高糖组 GSK-3 $\beta$  后检测足细胞表型及功能变化。**结果** 足细胞标记蛋白 nephrin、podocin 的蛋白表达水平随葡萄糖浓度的升高呈剂量依赖性下调( $P < 0.05$ ), 间充质标记蛋白  $\alpha$ -SMA 的表达水平随葡萄糖浓度的升高呈剂量依赖性上调( $P < 0.05$ ); 清蛋白流入量随葡萄糖浓度的升高呈剂量依赖性上调( $P < 0.05$ )。高糖组足细胞 GSK-3 $\beta$  表达量增多( $P < 0.05$ )。GSK-3 $\beta$  siRNA 处理组与对照组相比足细胞表面标记蛋白 nephrin、podocin 表达量增多, 间充质标记蛋白  $\alpha$ -SMA 表达减少。**结论** 足细胞在高糖环境下发生表型改变与功能受损; GSK-3 $\beta$  参与高糖环境下足细胞的转分化过程。

**[关键词]** 足细胞; 糖原合成酶激酶 3 $\beta$ ; 细胞转分化; 转染**[中图分类号]** R696.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)12-1609-04Role of GSK-3 $\beta$  in podocyte transdifferentiation effect under high glucose conditionYang Lili<sup>1</sup>, Liu Zhangsuo<sup>2</sup>

(1. Department of Nephrology and Rheumatism, Zhengzhou Municipal Children's Hospital, Zhengzhou, Henan 450053, China; 2. Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the action of GSK-3 $\beta$  in podocyte transdifferentiation effect under the high glucose condition. **Methods** Podocytes were treated in RPMI-1640 medium with different concentrations of glucose for 36 h. The expressions of nephrin, podocin,  $\alpha$ -SMA and Fibronectin were detected by both Western blot and indirect immunofluorescence analysis. At the same time, the change of albumin inflow amount of podocytes in different treatment groups was detected by using the Transwell chamber. The changes of expression amount and activity of GSK-3 $\beta$  in high glucose condition were detected by using the GSK-3 activity assay kit. The phenotypic and functional changes of podocytes were detected after disturbing GSK-3 $\beta$  by GSK-3 $\beta$  siRNA in the high glucose group. **Results** The expression levels of nephrin and podocin protein were down-regulated with the increase of the glucose concentration in a dose-dependent manner( $P < 0.05$ ), and the expression level of  $\alpha$ -SMA was up-regulated with the increase of the glucose concentration in a dose-dependent manner( $P < 0.05$ ); the albumin inflow amount of podocytes was up-regulated with the increase of the glucose concentration in a dose-dependent manner( $P < 0.05$ ). The expression amount of GSK-3 $\beta$  in the high glucose group was increased( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the expression amount of nephrin and podocin after high glucose treatment in the GSK-3 $\beta$  siRNA treatment group was increased, while the expression of  $\alpha$ -SMA was decreased. **Conclusion** The high glucose condition could induce the phenotypic change and functional impairment of mice podocytes; GSK-3 $\beta$  participates in the epithelial-mesenchymal transdifferentiation process of podocyte under the high glucose condition.

**[Key words]** podocytes; glycogen synthase kinase 3; cell transdifferentiation; transfection.

目前中国糖尿病患者人数已超过 9 200 万<sup>[1]</sup>, 30%~40% 的糖尿病患者可能会发展为糖尿病肾病<sup>[2]</sup>。蛋白尿是糖尿病肾病最常见的临床表现之一, 尿蛋白水平与疾病的严重程度及病情进展密切相关。足细胞作为肾小球滤过屏障的重要组成部分, 其结构和功能改变在糖尿病肾病蛋白尿发生、发展的过程中起到了关键的作用<sup>[3]</sup>。上皮间充质转分化(EMT)是指上皮细胞在某些条件下通过特定程序转化为间充质细胞的过程, 在胚胎发育、组织重建、癌症转移和多种纤维性疾病中发挥重要作用。足细胞作为一种终末分化的上皮细胞, 在某些条件的刺激下也会发生 EMT, 表现为其上皮细胞样表型标志物如 P-cadherin、nephrin、podocin、zonula occludens-1(ZO-1)等的表达减少或消失, 而表达间充质细胞样表型标志物, 如  $\alpha$ 平滑肌肌

动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、fibronectin、I 型胶原蛋白(collagen I)等<sup>[4]</sup>。有研究发现, 在高糖环境下, 小鼠肾小管上皮细胞可发生转分化, 进而引起肾脏间质纤维化<sup>[5]</sup>, 但高糖环境下足细胞是否发生转分化尚不明确。有研究认为, integrin/ILK、TGF- $\beta$ /smad 和 Wnt/ $\beta$ -catenin 等 3 条信号通路<sup>[6]</sup>参与介导了足细胞 EMT, 而广泛存在于真核生物体内的糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )是以上 3 条信号通路的参与者<sup>[7]</sup>, 有文献报道其参与高糖环境下肾小管上皮细胞转分化<sup>[8]</sup>, 但是否参与高糖环境下足细胞的转分化过程尚不明确。本文旨在通过研究 GSK-3 $\beta$  在高糖环境下足细胞转分化中的作用, 从而为糖尿病肾病蛋白尿的发生及治疗提供

新的理论依据。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 主要试剂: RPMI1640 培养基(美国, GIBCO); 胎牛血清(杭州四季青); 小鼠抗小鼠 GSK-3 $\beta$  单克隆抗体(ab93926)、兔抗小鼠 pTyr216GSK-3 $\beta$  多克隆抗体(ab75745)、兔抗小鼠 Podocin 多克隆抗体(ab0339)、兔抗小鼠 Nephrin 多克隆抗体(ab58968)、兔抗小鼠  $\alpha$ -SMA 多克隆抗体(ab5694)、兔抗小鼠 Fibronectin(ab2413)均购自 Abcam 公司; GSK-3 $\beta$  活性检测试剂盒(Genmed Scientific, 美国), 兔抗小鼠 pSer9GSK-3 $\beta$  单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司; 小鼠抗小鼠  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自中衫金桥生物工程公司; 碱性磷酸酶标记马抗小鼠二抗、碱性磷酸酶标记山羊抗兔二抗购自北京鼎国昌盛生物技术公司; 荧光二抗(Alexa Fluor 488 goat antirabbit IgG)来自美国 Invitrogen 公司; BCIP/NBT 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与干预** 条件永生小鼠足细胞使用 RPMI1640+10%FBS 培养基, 在 37  $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  条件下生长。细胞长至 80%融合时进行消化, 调节细胞密度至  $1 \times 10^6$  个/mL 接种到 6 孔板。待细胞生长至 70%~80%融合时进行后续干预实验。

**1.2.2 检测不同浓度葡萄糖对足细胞表型的影响** 用含不同浓度葡萄糖(12.5、25.0、50.0 mmol/L)的 RPMI1640 培养基处理足细胞 36 h, 并设正常对照组(NG 组, 5.6 mmol/L 葡萄糖)和高渗对照组(NG+M 组, 5.6 mmol/L 葡萄糖+44.4 mmol/L 甘露醇), 采用 Western blot 与间接免疫荧光的方法检测足细胞表面标记蛋白 nephrin、podocin 和间充质细胞表型标志物  $\alpha$ -SMA、Fibronectin 的表达。

**1.2.3 不同浓度葡萄糖刺激足细胞 36 h 后观察清蛋白流入量的变化** 将分化成熟的足细胞以一定密度( $5 \times 10^3$ )接种于 Transwell (Corning, 美国)小室上层的聚酯纤维膜上, 待细胞融合后, 换无血清培养基饥饿 8 h, 然后使用含不同浓度葡萄糖(5.6、12.5、25.0、50.0 mmol/L)的 RPMI1640 培养基处理足细胞 36 h, 36 h 后使用灭菌 PBS 洗涤细胞 2 次, 然后给 Transwell 滤过膜的上部换上 0.3 mL 的 RPMI1640 培养基, 下部充满 1 mL 含 40 mg/mL FBS 的 RPMI1640 培养基, 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 取上层培养液, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定滤过膜上部培养基的清蛋白浓度, 即清蛋白流入量。

**1.2.4 高糖环境下足细胞 GSK-3 $\beta$  活性的变化** 足细胞按上述浓度分组培养 36 h 后, 按照 GSK-3 $\beta$  活性检测试剂盒说明书处理足细胞, 依次加入各种试剂, 于分光光度计上检测各组样品的 OD 值, 按试剂盒说明书中的公式计算 GSK-3 $\beta$  的活性。

**1.2.5 Western blot 印记** 冰上裂解小鼠足细胞后抽提总蛋

白, 用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。取变性的蛋白 20  $\mu$ L/孔, 用相应的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法进行电泳。恒压将蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜, 5%脱脂牛奶封闭 30 min, 分别加入稀释的一抗, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h 或 4  $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗膜 3 次后, 用相应二抗 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 再次 TBST 缓冲液洗膜, 用显色试剂盒显色试剂盒 5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐/氯化硝基四氮唑兰(BCIP/NBT)显色。

**1.2.6 间接免疫荧光** 将分化成熟的足细胞消化后以一定密度接种于 24 孔中, 长至 80%融合后, 换用无血清培养基饥饿 8 h, 然后按上述分组给予相应的培养基培养 24 h。然后用 4%多聚甲醛固定 30 min, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 1 min, 再用 3%BSA 封闭 30 min, 孵育相应抗体如 podocin, nephrin、 $\alpha$ -SMA 和 Fibronectin 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 然后用相应的荧光二抗按相应浓度稀释后于 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后在荧光显微镜(Olympus, 日本)下观察。

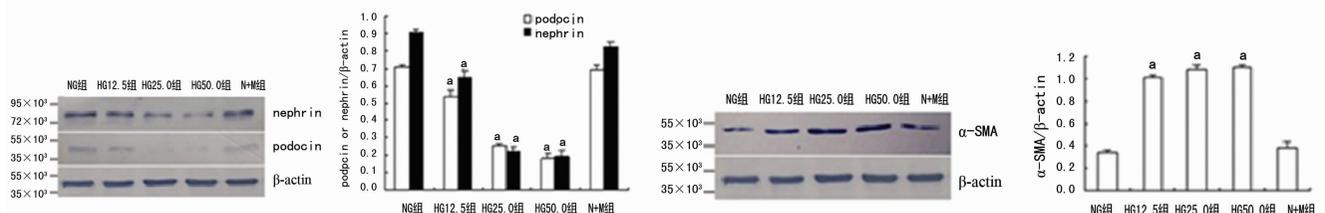
**1.2.7 应用 siRNA 干扰 GSK-3 $\beta$  后检测足细胞表型及功能** 根据 Gene Bank 数据库提供的小鼠的 GSK-3 $\beta$  全长基因(Gene Bank NO. NM-019827.6)由上海吉凯基因化学技术有限公司设计的靶序列 mRNA 为: 5'-CCA CTC AAG AAC TGT CAA GTA-3', 阴性对照的 siRNA 正义链序列为: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'。应用转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000(Invitrogen, 美国)将 GSK-3 $\beta$  siRNA 以 30 nmol 的浓度转染足细胞 36 h 后检测各组足细胞 nephrin, podocin,  $\alpha$ -SMA 表达量的变化; 同时应用 Transwell 检测各组的清蛋白流入量以评估足细胞的单层屏障功能。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 然后用 LSD 法进行两两比较, 检验水准  $\alpha=0.05$ , 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 高糖环境下足细胞表型发生改变** Western blot 结果和间接免疫荧光结果显示: NG 组与各高渗对照组比较, nephrin、podocin 和  $\alpha$ -SMA 在蛋白水平的表达量差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 而高糖刺激下 nephrin、podocin 蛋白表达水平较 NG、NG+M 组降低, 且随葡萄糖浓度的升高, 蛋白表达量减少, 呈剂量依赖性下调( $P<0.05$ ); 与 NG、NG+M 组比较, 各 HG 组  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平升高, 且随糖浓度升高呈剂量依赖性上调( $P<0.05$ ), 见图 1、2。

**2.2 高糖环境下足细胞单层屏障功能受损** 用 Transwell 小室检测清蛋白流入量以评估足细胞的单层屏障功能。发现 HG12.5 组、HG25.0 组较 NG 组清蛋白流入量增大(图 3), 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 说明足细胞发生表型改变后单层屏障功能受损。



<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与 NG 组比较。

图 1 各组 nephrin、podocin 及  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平比较

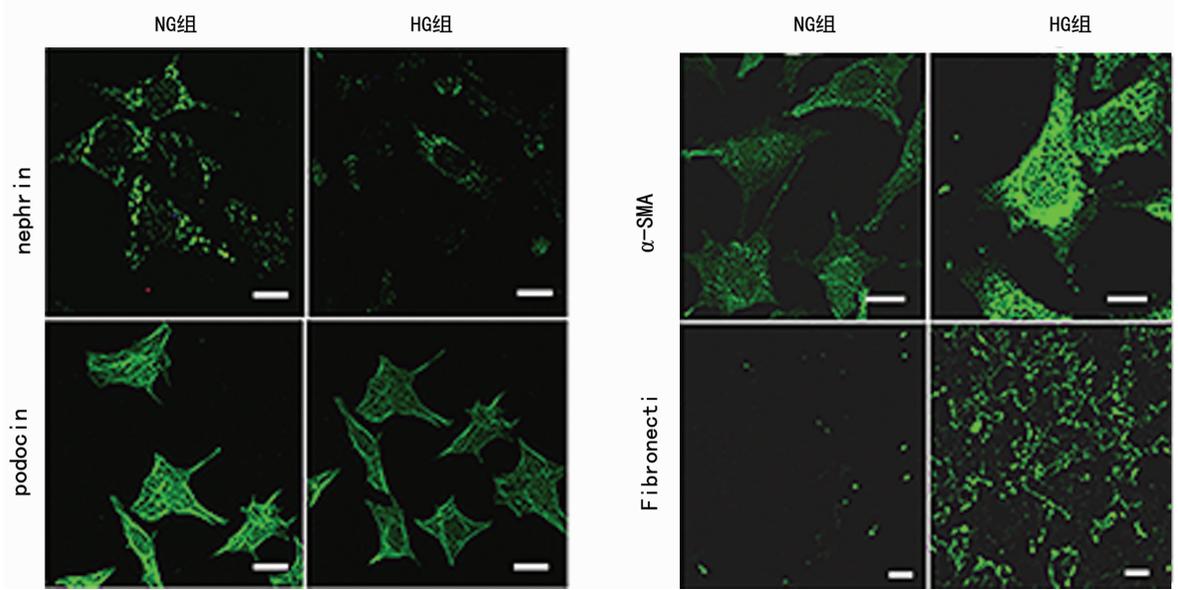
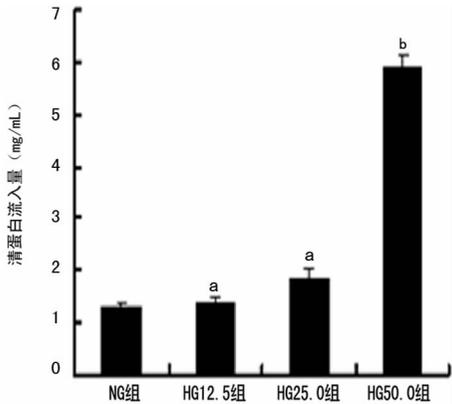


图 2 各组 nephrin、podocin、 $\alpha$ -SMA 及 Fibronectin 蛋白间接免疫荧光结果



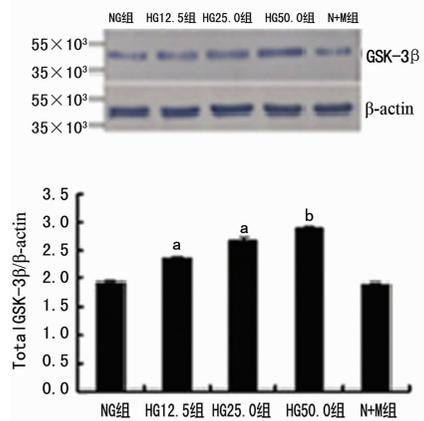
a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与 NG 组比较。

图 3 不同浓度葡萄糖处理组足细胞清蛋白流入量比较

2.3 不同浓度葡萄糖处理组细胞 GSK-3 $\beta$  表达量比较 高糖环境下足细胞 GSK-3 $\beta$  表达量增多, HG 组与 NG、NG+M 组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

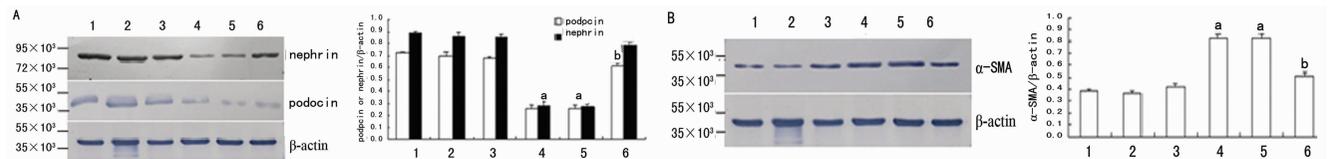
2.4 应用 siRNA 干扰 GSK-3 $\beta$  后足细胞表型改变 结果发现用 30 nm GSK-3 $\beta$  siRNA 干扰足细胞 36 h 时干扰效率最高。发现经高糖 (25.0 mmol/L) 处理的足细胞, HG+GSK-3 $\beta$  siR-

NA 组与 HG+Scrambled siRNA 组比较, 足细胞表面标记蛋白 nephrin、podocin 表达量增多 (图 5A), 间充质标记蛋白  $\alpha$ -SMA 表达减少 (图 5B); 正常糖浓度下干扰与非干扰组比较, 足细胞表面蛋白表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



a:  $P < 0.05$ , 与 NG、NG+M 组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 NG 组比较。

图 4 各组细胞 GSK-3 $\beta$  表达量比较



A: 足细胞表面标记蛋白 nephrin、podocin 表达量; B: 间充质标记蛋白  $\alpha$ -SMA 表达量; 1: NG 组; 2: NG+Scrambled siRNA 组; 3: NG+GSK-3 $\beta$  siRNA 组; 4: HG 组; 5: HG+Scrambled siRNA 组; 6: HG+GSK-3 $\beta$  siRNA 组。a:  $P < 0.05$ , 与 NG 组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 HG (25 mmol/L) 组及 HG+Scrambled siRNA 组比较。

图 5 应用 siRNA 干预 GSK-3 $\beta$  的表达后足细胞表型

### 3 讨论

足细胞是贴附于肾小球基底膜表面的脏层上皮细胞。由细胞体、主突和次级足突组成, 两相邻足突之间有直径为 30~40 nm 的裂隙称为裂孔, 裂孔上附着的一层拉链状蛋白结构称为裂孔隔膜, 裂孔隔膜上有多种足细胞标记蛋白及骨架蛋白, 相互联系共同组成血浆蛋白滤过的最终屏障<sup>[9]</sup>。有研究表明,

足细胞的损伤是多种肾脏疾病发生、发展的重要环节<sup>[10]</sup>。

有学者提出, 在某些损伤刺激下, 足细胞会丧失上皮细胞特异性的蛋白标志物, 而表达间充质细胞的标志物<sup>[8]</sup>, 即足细胞向间充质细胞发生转分化。发生转分化的足细胞功能紊乱, 进而导致蛋白尿的形成。nephrin、podocin 均是足细胞裂孔膜上的跨膜蛋白, 分别由 NPHS1、NPHS2 基因编码, 可与细胞骨

架蛋白等其他裂孔膜成份相互作用,共同维持足细胞足突的完整性及裂孔膜的正常功能。有学者认为 nephrin、podocin 的减少参与了糖尿病肾病蛋白尿的发生<sup>[11]</sup>。而  $\alpha$ -SMA 和 Fibronectin 是间充质细胞的特异性表型标志蛋白,非平滑肌细胞表达  $\alpha$ -SMA 是细胞激活、转分化的重要依据。其过高表达常标志着间充质转分化过程的发生。

Transwell 小室检测经不同浓度葡萄糖处理的足细胞清蛋白流入量的变化,提示高糖环境下足细胞单层屏障功能受损。提示高糖刺激可以诱导足细胞发生间充质转分化,造成维持其上皮细胞表型的功能蛋白丢失,进而破坏裂孔隔膜的完整性,导致肾小球滤过功能异常,可能是糖尿病肾病蛋白尿形成的主要机制之一,但仍需进一步的体内实验来证实。

GSK-3 $\beta$  是一种遗传保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可以调控基因转录、细胞周期代谢、细胞凋亡、肿瘤发生等,但其调控机制仍不清楚<sup>[12]</sup>。有关高糖刺激对 GSK-3 $\beta$  表达及活性的影响目前研究的尚不多,有文献报道,GSK-3 $\beta$  在高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化的过程中活性增强;也有文献报道,GSK-3 $\beta$  在高糖诱导肾脏系膜细胞凋亡的过程中,活性也增强<sup>[13]</sup>。GSK-3 $\beta$  在细胞内作为众多信号转导通路的主要调控酶之一,可以影响多种细胞的生长及凋亡<sup>[14]</sup>,研究证明,其表达量的过度增高及活性过度增强会引起细胞的凋亡、分化等。但也有研究证明,持续的 GSK-3 $\beta$  抑制是肿瘤发生的一个标志,GSK-3 $\beta$  活性抑制可能是肿瘤细胞化学耐药的一种机制<sup>[15]</sup>。因此,GSK-3 $\beta$  在体内的作用有利有弊。在病理或一定条件下 GSK-3 $\beta$  的过度激活会引起机体的病理改变;过度抑制 GSK-3 $\beta$  的活性及表达量同样会产生负面影响。

GSK-3 $\beta$  表达量与活性的改变对足细胞功能的影响,还需进行体内实验等更深入研究,以进一步明确 GSK-3 $\beta$ 、转分化及糖尿病肾病蛋白尿形成之间的关系,为寻找糖尿病肾病新的治疗靶点提供理论依据。

## 参考文献

- [1] Zhao D,Zhao F,Li Y, et al. Projected and observed diabetes epidemics in China and beyond[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2012, 14(1):106-111.
- [2] Choudhury D,Tuncel M,Levi M. Diabetic nephropathy-a multifaceted target of new therapies[J]. *Disc Med*, 2010, 10(54):406-415.
- [3] 李金红,陶建瓴,李航. 足细胞损伤与糖尿病肾病的研究现状[J]. *中国医学科学院学报*, 2010, 32(5):590-596.
- [4] Li Y, Kang YS, Dai C, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dys-

function and proteinuria[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(8): 299-308.

- [5] Mariappan MM, Shetty M, Sataranatarajan K, et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is a novel regulator of high glucose-and high insulin-induced extracellular matrix protein synthesis in renal proximal tubular epithelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(45):30566-30575.
- [6] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(2):212-222.
- [7] Campa VM, Kypta RM. Issues associated with the use of phosphospecific antibodies to localise active and inactive pools of GSK-3 in cells[J]. *Biol Direct*, 2011, 6(3):236-165
- [8] Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(32):577-595.
- [9] Fukasawa H, Bornheimer S, Kudlicka K, et al. Slit diaphragms contain tight junction proteins [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(7):1491-1053.
- [10] Leeuwis JW, Nguyen TQ, Dendooven A, et al. Targeting podocyte-associated diseases [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(14):1325-1336.
- [11] Billing H, Muller D, Ruf R, et al. NPHS2 mutation associated with recurrence of proteinuria after transplantation [J]. *Pediatr Nephrol*, 2004, 19(5):561-564.
- [12] 杨俊. 糖原合酶激酶 3 $\beta$  调控前列腺癌细胞死亡的机制研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2010.
- [13] Lin CL, Wang JY, Huang, YT, et al. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(8):2812-2820.
- [14] Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, et al. Deregulated GSK3 $\beta$  activity in colorectal cancer; its association with tumor cell survival and proliferation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(4):1365-1373.
- [15] Beurel E, Kornprobst M, Blivet-Van Eqqelpol MJ, et al. GSK-3 $\beta$  inhibition by lithium confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis through the repression of CD95 (Fas/APO-1) expression [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 300(2):354-364.

(收稿日期:2014-08-18 修回日期:2015-01-10)

(上接第 1608 页)

- et al. Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis[J]. *Eur Spine J*, 2009, 18(2):244-253.
- [10] Goldhahn J, Jenet A, Schneider E, et al. Slow rebound of cancellous bone after mainly steroid-induced osteoporosis in ovariectomized sheep[J]. *J Orthop Trauma*, 2005, 19(1):23-28.
- [11] Zarrinkalam MR, Schultz CG, Parkinson IH, et al. Osteoporotic characteristics persist in the spine of ovariectomized sheep after withdrawal of corticosteroid administration[J]. *J Osteoporos*, 2012(2012):1825-1829.

- [12] 屈波,潘显明,权毅,等. 成都地区老年人骨质疏松性骨折发病特点分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14(10):733-735.
- [13] 郝永强,郝光亮,戴魁戎. 上海地区骨质疏松性骨折的发病特点研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13(3):197-200.
- [14] Anastassopoulos G, Panteliou S, Christopoulou G, et al. Vibrational bone characteristics versus bone density for the assessment of osteoporosis in ovariectomized rats[J]. *J Med Eng Technol*, 2010, 34(1):35-42.

(收稿日期:2014-07-08 修回日期:2015-01-15)