

骨质疏松动物模型的复制与评价

王晓 综述 梅其炳 刘莉 商澎 审校

据统计,我国60岁以上人群骨质疏松发病率约为59.89%,如果并发骨折,约有20%的患者在1年内死亡,50%终身致残。随着人口老龄化日趋明显和人们对生活质量要求的提高,骨质疏松及其并发症,已成为一个社会性的健康问题而备受医学界关注。多年来研究人员为深入研究成骨与破骨平衡生理生化原理、骨丢失的病理生理机制,筛选防治骨丢失的药物,复制了许多动物模型,常见到国内外有关骨质疏松动物模型的文献报道。由于不同动物与人类在解剖生理方面存在着不同程度的差异,因此目前的骨质疏松动物模型在病因、发病机制及微结构改变等方面只能部分地模拟人类骨的病理变化。笔者就国内外近年来在骨质疏松动物模型复制领域的新进展,对各种模型动物的骨代谢特征、各模型的适用范围及评价指标作一综述。对研究者选择合适的动物模型,使之更贴近人体实际,更好地指导骨质疏松发病机理的探究和新药的研发提供帮助。

1 骨质疏松模型动物骨代谢特征

1.1 大鼠

常选用的品种有Wistar、Holtzman、Fischer 344、SD等。大鼠自然寿命约3年,2~3月龄时性成熟。未孕产的雌性大鼠3~6月龄时骨生长活跃,为研究峰值骨量影响因素的最佳时机;6~7月龄骨骺开始封闭,骨代谢相对稳定,主要表现为内在力学结构的调整,为研究预防骨丢失措施的最佳时期;10月龄末骨膜扩展停止,峰值骨量出现;12月龄时骨生物力学效能达峰值,此后开始出现骨质丢失,12~16月龄为一快速丢失阶段,适合于峰值骨量后骨丢失的治疗策略研究;18月龄后丢失减缓,密度维持稳定,可能与存在代偿性骨形成增加有关,但力学性能并没有改善,是复制老年大鼠骨质疏松模型的适当

时期;21~24月龄后,乳腺肿瘤发病率上升,已不适用于骨代谢的研究。另外,过早经历妊娠和哺乳期的大鼠,因为体内钙供不应求,多伴有骨骼生长发育迟缓,到10~12个月时才达到峰值骨量,与未经孕产鼠相比差异较大,不宜用于预防性研究,但可用于研究增加骨软化骨骼骨量的试验。雄鼠骨发育相对晚于雌鼠,胫骨骨骺在7~8个月之间开始闭合^[1],小梁骨在12月龄仍有增加,骨峰值年龄尚不明确,腰椎最大抗压力出现在12月龄,股骨最大抗弯力出现在18月龄。

大鼠具有品种多、易饲养等优点,已成为骨质疏松研究领域的常用动物。然而大鼠骨皮质重建活性低,不宜用于评价有望促进哈氏重建作用的药物。另外大鼠体格小,不易进行骨移植研究,也不易大量采集骨活检标本和血标本,不便于生化指标的动态检测,这给骨质疏松的长期研究带来了诸多不便。

1.2 小白鼠

小白鼠约6周龄时性成熟,性周期与大鼠相似,2~3月龄小鼠骨生长旺盛,主要用于观察药物对骨微量元素吸收和骨有机质形成的影响;4~5月龄小鼠骨代谢相对稳定,宜于研究药物对骨矿物质含量的影响,以及抗骨质疏松药物的筛选^[2]。

一般认为,骨质疏松的发生、发展是由遗传、激素、生活方式及环境4个方面共同决定的。小鼠基因组同人类有着较大的相似性,并且繁殖快、易饲养,人们对其基因组的研究已有多年经验,因此小鼠成为研究峰值骨量及老龄性骨丢失的遗传控制因素的天然动物模型。目前利用转基因及基因敲除等技术建立的数十种基因表达异常致骨代谢异常的小鼠模型^[3],极大地丰富了科学家关于骨代谢分子调节网络的知识,也为新药研发或基因修饰提供了丰富的靶点资源。如剔除Fra-1基因导致活化成骨细胞数增多而培育出的骨硬化小鼠^[4]启示我们,利用功能基因组学的方法来探究Fra-1基因表达产物在成骨细胞分化及活化调节网络中的作用,以指导对因成骨活力下降所致骨质疏松的治疗;又如体外实验中发现 β -arrestin可抑制PTH介导的cAMP生成,进

作者单位:710032 西安,第四军医大学药理学教研室(王晓、梅其炳、刘莉),西北工业大学生命科学院(商澎);中国人民解放军第62医院

通讯作者:梅其炳,Email: qbmei@fmmu.edu.cn

而抑制 PTH 引起的骨转换。而剔除 β -arrestin 基因的小鼠,在同等注射 PTH(80 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)1 个月的条件下,其骨量却要比野生型小鼠低 15%,其间骨组织计量学检测发现这种小鼠体内成骨细胞的活性和数目同野生小鼠差异无统计学意义,而破骨细胞数量及破骨面积显著下降,这就提示 β -arrestin 是通过限制 PTH 促破骨活性而发挥其调节作用^[5],同时也预示了 β -arrestin 及其类似物在治疗诸如绝经或维甲酸引起的骨质疏松方面的开发前景。

1.3 绵羊

绵羊来源方便、温驯易饲养,便于进行大规模研究,体形大,能多次取骨活检标本和大量的血标本,容易进行生化及细胞形态学分析,也便于进行移植骨研究,可与大鼠骨质疏松模型互相弥补不足。绵羊秋冬季发情,发情期 14~21d,激素分泌情况与女性相似,可很好地模拟绝经后骨的病理变化。因此成为近年来骨质疏松动物模型研发的热点。因其骨量与生化指标存在昼夜及季节节律:一天之中,凌晨时骨转换最为活跃;一年之中,冬天骨量最少,故研究时限最好以年为单位^[6]。值得注意的是,绵羊为反刍动物,如进行口服药物吸收试验时须作皱胃(第四胃)瘘管或在喂药同时刺激其口咽部,以避免微绒毛对药物代谢的影响。另外还有一些问题需要进一步探究,如卵巢切除手术何时(在发情期还是其他时节)进行可使骨丢失最快?各种方法对皮质骨有何影响?以及骨重建最活跃的部位及时期也还不明确。明确这些问题将会缩短研究时间,提高该模型使用的效率。

1.4 非人灵长类

非人灵长类与人类的遗传物质有 75%~98.5% 的同源性,对建立基因显性特征的研究很有帮助,其骨骼解剖、内分泌、月经周期乃至病理生理特性上都同人类有极大的相似之处。结合啮齿类和灵长类的遗传性研究,可以通过多种途径去了解控制峰值骨量的遗传因素,这对人类骨代谢及遗传控制因素的应用研究具有重要意义^[7]。目前骨质疏松研究中以恒河猴和狒狒的应用为多,两者峰值骨量 10~11 岁出现,15~24 岁自然绝经,寿命约 25~30 年。目前用于研究的灵长类大多是从野外捕获而来,是潜在的动物源性病毒感染源,并且灵长类攻击性很强,需要训练有素的技术人员来饲养。

1.5 小猎犬

8~12 月龄时性成熟,成年后皮质骨与松质骨的比例与人骨相似,具有丰富的哈氏系统且哈氏重

建与松质骨重建速度都较快,故被广泛用于评价药物对松、皮质骨重建的影响。小猎犬性情温顺,体格较大,也是研究废用性骨折的一个优良模型。须注意的是,小猎犬每次发情期约为 8~14 d,其间雌二醇水平较高,其他时候则很低,这种情况下却并不出现骨质丢失,切除卵巢或绝经后,骨代谢变化也不大,早期还有一个骨形成活跃期,提示犬与人骨骼对雌激素的反应机理不同,不可用于绝经后骨质疏松的研究。另外,小猎犬易发生甲状旁腺和甲状腺内分泌异常,在骨代谢研究中应先作甲状旁腺和甲状腺扫描。

1.6 小型猪

48 月龄时性成熟,有连续的性周期,与人相似(每次 18~21 d),2.5~3 年骨量达峰值。有板层骨且骨小梁和骨皮质的重建部位也与人类相同,可自发产生椎骨骨折,体格较大,可反复接受骨活检,也容易得到大量的血液标本。鉴于这些特点小型猪常用于骨活性药物疗效的评价。不足之处是小型猪子宫血管易破裂,卵巢切除手术难度较高。

1.7 兔

4~5 月龄时性成熟,此后不久骺板闭合,提示兔骨发育成熟。成年兔有明显的哈氏重建活性,骨转换快,约为人的 3 倍,故短期内即可观察到骨组织的改变,适用于合成代谢促进药物对松质骨及哈氏重建作用的研究。

由于目前还没有非常有代表性的骨质疏松动物模型,故美国 FDA 规定:骨质疏松药物的临床前研究结果中,至少要有大鼠和一种大动物的组织学、骨密度和骨转换(骨代谢)生化指标,骨骼的生物力学强度的检测数据。大鼠实验时间不得少于 12 个月,其他种属动物则不得少于 16 个月(相当于人类用药 4 年的时间)。

2 骨质疏松动物模型的复制

骨质疏松症可分为 3 大类:①原发性骨质疏松症,又可分为绝经后骨质疏松症和老年性骨质疏松症;②继发性骨质疏松症;③特发性骨质疏松症。第 3 类因其发生率低且造模难度大,研究中较少涉及。笔者主要讨论前两类骨质疏松动物模型的成模机理、动物选择、制作方法、适用范围及评价指标。

2.1 原发性骨质疏松症模型

2.1.1 绝经后骨质疏松症模型:①去势法:切除雌鼠双侧卵巢(OVX)3 个月后,可观察到雌激素水平下降,促黄体素和促卵泡素水平上升,破骨细胞活动

加速,成骨细胞功能代偿性增强,为高转换型骨代谢,造成松质骨骨量明显减少、微结构退化、强度下降。另外,尚可见到子宫明显萎缩,椎间盘有不同程度的退变;如同时给予雌激素替代疗法或应用一些药物(如二膦酸盐、降钙素等)均可阻碍上述变化。这些都与人的绝经后骨质疏松症十分相似。故1969年由Saville建立后,现已成为研究绝经后骨质疏松的经典动物模型。Liu等^[8]观察到大鼠OVX后前4周骨丢失最快最明显,故而欲用此模型研究药物的抗骨质疏松活性,应选取OVX 1个月后的大鼠。因为此时大鼠各骨形态计量学参数变化趋于稳定,便于观察药效。绵羊OVX 10周后开始出现骨质丢失^[6];山羊约需13周方出现骨小梁数目轻度减少^[9],厚度变薄,骨密度降低,骨生物力学参数值减小,提示绝经后骨质疏松的动物模型建立成功^[10];Fang等^[11]曾利用5月龄新西兰兔制作去势兔骨质疏松模型,术后半年模型基本建立;灵长类动物虽有自然绝经,但因其后生存期过短,一般采用卵巢切除法建模,术后骨量及强度变化与绝经妇女相似,但对雌激素替代疗法无明显反应。术后出现骨丢失的具体时间尚未确定,亦少见对皮质骨的观察资料,需慎用于绝经后骨质疏松的研究。

②给药法:给予抑制动物雌激素分泌的药物,而不摘除其卵巢,经过一定时间后,也可以造成动物的骨丢失。常用于制备此种模型的药物:一是促黄体素分泌激素受体激动剂,有降低血清雌二醇(E_2)含量的作用;二是非甾体类雄激素拮抗剂,可使体内雌二醇耗竭。给药法优点在于不激发动物应激反应,不产生干扰指标检测的负氮平衡、电解质紊乱等情况。但因所用药物存在副作用,且易与抗骨质疏松药物发生相互作用,从而降低实验结果的可信度,应用价值有限。

2.1.2 老年性骨质疏松症模型:SAM(Senescence accelerated mouse)小鼠是日本开发的系列快速老化动物模型,分为快速老化的P品系(Penile 2 Prone)和正常老化的R品系(Penile 2 Resistant)。SAMP 6小鼠成骨细胞数目少、活力低、骨髓中肥大细胞数目显著增多^[12]。4~5月龄骨量达峰,其峰值骨量低于正常品系,随年龄的增长其骨量逐渐降低,并有自发性骨折倾向,是目前惟一被证实可随增龄出现脆性骨折的动物模型。近年来开发的雄性C57BL/6J小鼠骨代谢同SAMP 6小鼠有一定的相似之处,也可作为研究老年性骨质疏松症的一个候选模型^[13];目前尚无老年性骨质疏松的大鼠模型,老年狒狒和恒河猴多有严重的骨性关节炎,该病变影响着老年

灵长类动物脊椎的骨量测定,限制了其在老年骨质疏松研究中的应用。睾丸切除(ORX)成年雄性大鼠常用来研究老年男性骨质疏松。去睾丸28周后,骨质疏松形成,生化检查显示骨形成降低、骨吸收增加。需注意的是,ORX对生长期及成熟期大鼠骨骼的影响不同。生长期大鼠ORX后骨量减少主要是由于峰值骨量的积累减弱,而成熟期大鼠ORX后则出现骨量的净丢失增加,切除睾丸的雄性犬,骨量减少与性激素下降相关,提示可用于研究男性因性功能不全所致的骨质丢失^[14],但该模型的应用性报道较少。

2.2 继发性骨质疏松症模型

2.2.1 废用法/机械制动法:一般用于制作废用性骨质疏松模型,常用的动物有大鼠、小鼠和小猎犬,可模拟长期卧床或截肢患者的骨代谢变化。研究失重状态下的骨丢失机理,最理想的莫过于直接观察太空飞行中各模型动物骨代谢的变化,研究人员也曾利用过恒河猴^[15]、大鼠^[16]、小鼠^[17]做过这方面的探索并得到了满意的结果。然而高昂的费用限制了这种研究方式的推广。目前认为失重状态下骨丢失主要基于两个方面:骨骼受力负荷减小和体液的再分布^[18]。根据这一认识,研究人员利用水浸法^[19]、尾悬吊法及后肢悬吊法在地面上模拟失重状态下骨的变化,也取得了相似结果^[20]。为减少长期悬吊所致的应激反应,近年有人主张可将不锈钢针直接穿过大鼠尾巴^[21],或将双后肢插入两只塑料管内再固定悬吊^[22]。有意思的是,C3H/HeJ系成年小鼠尾吊3周后骨量并没有减少^[23],血生化检测发现反映成骨活性的骨源性碱性磷酸酶(ALP)和骨钙素都有显著的升高,而尿中反映破骨活性的脱氧吡啶啉(D-pyr)并无明显改变^[24]。该系小鼠骨代谢的特征为骨质疏松的研究提供了一个独特的反面模型,对其基因组学和蛋白组学的研究有望成为抗骨质疏松药物开发或骨质疏松症基因治疗的先导。

2.2.2 营养控制法:通过控制动物饮食中钙、磷量而实现,有助于探讨膳食不平衡引起的骨质疏松发病机理。常用的动物有大鼠、绵羊和小型猪^[25],制作骨质疏松模型时以高蛋白饲料为宜。因为单独应用耗时长且成功率低,所以营养控制往往作为一种辅助方法,比如和去势法相结合制作骨质疏松模型^[26]。

2.2.3 药物法:①糖皮质激素法:糖皮质激素可抑制成骨细胞活力,使骨质形成发生障碍。主要采用甲基泼尼松龙和泼尼松龙,诱导途径有灌胃和肌肉

注射。大鼠甲基泼尼松龙 4.5 mg/kg,灌胃,1周2次,共90 d^[27],兔泼尼松龙 0.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹连续注射5个月后观察到松质骨骨量减少,力学强度降低,骨折风险加大。提示糖皮质激素诱导的骨质疏松模型建立成功。该法可用于临床应用激素后继发骨质疏松的研究,但不适用于药物对骨吸收抑制作用的研究。绵羊 OVX 与甲基泼尼松龙肌注^[28]处理相结合12周后观察到大幅度的骨质丢失。停药6~11周后骨密度仅有轻微反弹,很适合绝经后长期应用糖皮质激素并发骨质疏松及骨折的研究^[29]。②维甲酸法 维甲酸可激活破骨细胞,促进骨吸收,但不抑制成骨细胞活性。维甲酸 70 mg/kg 灌胃,半月后就可出现骨松质和皮质骨骨量减少、微结构病理改变。该法因其操作简便,时间短,成功率高的特点,在药品开发研究中被普遍采用,是大鼠急性骨质疏松的常用造模方法。但该模型血清学指标,如血钙、磷、ALP等升高明显,与原发性骨质疏松状态下这些指标基本正常或稍高的事实不合,不宜作为原发性骨质疏松动物模型^[30]。另外,有研究^[31]发现新生大鼠注射28.5%谷氨酸单钠 2 g·kg⁻¹·d⁻¹后100 d,出现明显的骨质疏松。可能是谷氨酸单钠选择性破坏下丘脑弓状核神经胞体,引起下丘脑、垂体、甲状腺、性腺、肾上腺皮质等功能的改变,并可影响白细胞介素2、 γ 干扰素的诱生能力,从而影响全身骨骼生长发育所致。该发现对骨质疏松模型的建立研究以及骨质疏松治疗的意义尚待进一步研究。

3 骨质疏松动物模型的评价指标

常选用动物后肢骨和腰椎骨作为全身四肢骨与中轴骨的代表进行分析。需综合骨量、微结构、力学特性和生化代谢状况4方面的信息才能得到较为准确的判断。由于测量值受环境、仪器状况、操作人员、测量方法、测量部位等诸多因素的影响。整个检测应统一规则,全过程尽量由一人完成,以减少人为误差,保证结果的可靠性和一致性。

3.1 骨密度

骨密度指骨骼单位面积中矿物质的含量。测量方法包括两大类:非创伤性测量:采用单光子(SPA)和双光子吸收法(DPA),双能X线吸收法(DEXA),定量CT(pQCT)等测量,这些手段主要利用骨组织对能量吸收的差异,来间接评估体内骨矿含量,SPA与DPA是传统的骨量测量办法,操作简单,费用低,但无法测量软组织变异较大的部位,如中轴骨、髋关节等,DEXA可排除软组织的干扰,很大程度上提高了

测量的灵敏度与精确度,近十年来得到了广泛的应用;pQCT精确度最高,可定量测出骨重吸收与形成的比值^[32],并可对骨三维结构进行在体实时监测,与DEXA相比可大大缩短研究时间^[33]。有创测量:通过取材直接测量标本的物理密度,由待测骨标本的质量和体积计算获得,该方法快捷、经济,且测量结果与DEXA数据有高度相关性,与骨生物力学功能改变吻合良好,在骨质疏松模型及药效评价中具有一定应用价值。

3.2 微结构

骨组织形态计量学技术(Histomorphometry)是利用激光扫描共聚焦显微镜对骨切面进行扫描,后用相应图像分析软件进行分析,从而获得骨小梁数目、间隔、厚度、面积百分率、骨形成率等方面的资料的一种方法。该技术可以准确地反映骨量和微结构的变化,并能客观地记录经过治疗后骨组织的变化,如与荧光标记法结合,可通过观察染料在骨中的存留时间及骨细胞、成骨细胞数目变化来间接推断所选切面骨形成和重吸收状况。缺点在于此法仅为二维形态观察,取样有限,整体改变情况难以观察。

骨组织微损伤指骨组织经碱性品红或醋酸铀铅染色后在光学显微镜下或扫描电镜下所观察到的骨基质的损害。该指标反映出随着动物老化,骨组织中微小破裂逐渐增加,骨结构性能逐渐减退的状况,同骨质疏松性骨折的风险直接相关^[34]。由于骨质疏松主要防治目标即是防治骨质疏松性骨折,故该指标在评价骨结构性能改变时有很大的实际应用价值。

3.3 力学特性

与人类不同,各模型动物均不易自然发生骨量减少引起的脆性骨折。但可通过分析骨的力学特性,来间接反映骨骼的骨矿盐的分布、骨小梁的空间结构等结构形态学特性,进而评价发生骨折的风险。目前市场上有许多生物力学测试系统可供选用。常用的测量指标有骨干中段3点弯曲最大载荷、抗扭转强度、椎体骨的抗压强度及破坏荷载等。

3.4 生化代谢

骨代谢生化指标分为骨形成标志物和骨吸收标志物2类:骨形成标志物是成骨细胞在其不同发育阶段的直接或间接的表达产物,反映成骨细胞功能和骨形成状况,主要包括:骨源性碱性磷酸酶、骨连接蛋白、骨钙素、I型胶原氨基前肽、I型胶原羧基前肽等。这些指标都是在血清或者血浆中检测;骨吸收标志物主要包括:血抗酒石酸酸性磷酸酶、尿吡

啉、血 I 型胶原羧基交联肽、血 I 型胶原氨基交联肽、尿脱氧吡啶啉等。血中 I 型胶原羧基交联肽 (CTX) 在骨质疏松治疗前后变化率较大,而长期个体内变异又较小,稳定而又灵敏,是评判治疗效果的首选指标。而尿液标本中分子长度的变化以及肌酐校正可能对结果产生影响,使得尿中 CTX 指标长期个体内变异较大,可重复性较血中指标差^[35]。联合应用骨源性碱性磷酸酶和 I 型胶原羧基交联肽检测,可以全面反映骨转化状况、监测骨丢失进程并进行药物疗效评价^[36]。缺点是无法确定变化发生在皮质骨还是松质骨,对处于生长期或发生重度骨丢失动物实验所得数据解释时更须慎重。

4 结语

随着老龄化社会的到来,降低骨丢失速度,提高生活质量,已成为老年医学急需解决的重大课题。要解决这一问题,首先得找到合适的动物模型,而在目前开发的众多模型中,没有一种可全面精确地模拟人类骨质疏松的变化。另外,开发中还存在着重雌轻雄,重研究松质骨变化而轻视对皮质骨观测的现象。随着人们对老年男性骨质疏松日益重视,这种片面性在今后动物模型开发中需要加以克服。在现有动物模型的应用过程中,应深入了解各种模型的优缺点所在,以便选用不同动物模型的最佳组合,从不同侧面反映出人类骨质疏松的病变特征,为骨质疏松发病机理、防治药物及骨置换术的全面研究提供坚实的基础。

【 参 考 文 献 】

[1] Martin EA, Ritman EL, Turner RT. Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. *Bone*, 2003, 33(3): 261-267.

[2] Yan XM, Zhang ZD. Age-related changes in bone mineral density and cross-sectional area in mice. *Chin J Osteoporos*, 2004, 10(3): 288-289 (in Chinese).

[3] Davey RA, MacLean HE, McManus JF, et al. Genetically modified animal models as tools for studying bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(6): 882-892.

[4] Roschger P, Matsuo K, Misof BM, et al. Normal mineralization and nanostructure of sclerotic bone in mice overexpressing Fra-1. *Bone*, 2004, 34(5): 776-782.

[5] Ferrari SL, Pierroz DD, Glatt V, et al. Bone response to intermittent parathyroid hormone is altered in mice null for β -Arrestin2. *Endocrinol*, 2005, 146(4): 1854-1862.

[6] Turner AS. The sheep as a model for osteoporosis in humans. *Vet J*, 2002, 163(3): 232-239.

[7] Archer DF. Role of the nonhuman primate for research related to women's health. *ILAR J*, 2004, 45(2): 212-219.

[8] Liu XQ, Cui L, Wu T. Study of bone histomorphometric changes at regular intervals in OVX rats. *Chin J Osteoporos*, 2005, 11(4): 427-429 (in Chinese).

[9] Siu WS, Qin L, Cheung WH. A study of trabecular bones in ovariectomized goats with micro-computed tomography and peripheral quantitative computed tomography. *Bone*, 2004, 35(1): 21-26.

[10] Liu HJ, Du JY, Liu H, et al. Establishment and significance of a goat model of postmenopausal osteoporosis. *Chin J Experim Surg*, 2005, 22(10): 1266-1267 (in Chinese).

[11] Fang Z, Yang Q, Li F, et al. Establishment of rabbit osteoporosis model by ovariectomy. *Chin J Osteoporos*, 2005, 11(2): 202-205 (in Chinese).

[12] Chen H, Shoumura S, Emura S. Ultrastructural changes in bones of the senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis. *Histol Histopathol*, 2004, 19(3): 677-685.

[13] Ferguson VL, Ayers RA, Bateman TA, et al. Bone development and age-related bone loss in male C57BL/6J mice. *Bone*, 2003, 33(3): 387-398.

[14] Fukuda S, Iida H. Effects of orchidectomy on bone metabolism in beagle dogs. *J Vet Med Sci*, 2000, 62(1): 69-73.

[15] Zerath E, Grynopas M, Holy X, et al. Spaceflight affects bone formation in rhesus monkeys: a histological and cell culture study. *J Appl Physiol*, 2002, 93(3): 1047-1056.

[16] Vajda EG, Wronski TJ, Halloran BP, et al. Spaceflight alters bone mechanics and modeling drifts in growing rats. *Aviat Space Environ Med*, 2001, 72(8): 720-726.

[17] Milstead JR, Simske SJ, Bateman TA. Spaceflight and hindlimb suspension disuse models in mice. *Biomed Sci Instrum*, 2004, 40: 105-110.

[18] Oganov VS. Modern analysis of bone loss mechanisms in microgravity. *J Gravit Physiol*, 2004, 11(2): 143-146.

[19] Korolkov VI, Krokotov VP, Gordeev YV, et al. Physiological reactions of primates to 9-D immersion and head-down tilt. *J Gravit Physiol*, 2004, 11(2): 29-30.

[20] Emily R, Morey H, Ruth K. Hind limb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol*, 2002, 92: 1367-1377.

[21] Knox M, Fluckey JD, Bennett P, et al. Hind limb unloading in adult rats using an alternative tail harness design. *Aviat Space Environ Med*, 2004, 75(8): 692-696.

[22] Damrongrungruang T, Kuroda S, Kondo H, et al. A simple murine model for immobilization osteopenia. *Clin Orthop Relat Res*, 2004, 425(8): 244-251.

[23] Amblard D, Lafage-Proust MH, Laib A, et al. Tail suspension induces bone loss in skeletally mature mice in the C57BL/6J strain but not in the C3H/HeJ strain. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(3): 561-569.

[24] Zhong N, Garman RA, Squire ME, et al. Gene expression patterns in bone after 4 days of hind-limb unloading in two inbred strains of mice. *Aviat Space Environ Med*, 2005, 76(6): 530-535.

[25] Boyce RW, Ebert DC, Youngs TA, et al. Unbiased estimation of vertebral trabecular connectivity in calcium-restricted ovariectomized minipigs. *Bone*, 1995, 16: 637-642. (下转第 133 页)

(上接第 145 页)

- [26] Kubo T , Shiga T , Hashimoto J , et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol* , 1999 , 68(5-6) : 197-202.
- [27] Liao JM , Li QN , Wu T , et al. Effects of prednisone on bone mineral density and biomechanical characteristics of the femora and lumbar vertebrae in rats. *J First Milit Med Univ* , 2003 , 23(2) : 97-100(in Chinese).
- [28] Schorlemmer S , Gohl C , Iwabu S , et al. Glucocorticoid treatment of ovariectomized sheep affects mineral density , structure , and mechanical properties of cancellous bone. *J Bone Miner Res* , 2003 , 18(11) : 2010-2015.
- [29] Goldhahn J , Jenet A , Schneider E , et al. Slow rebound of cancellous bone after mainly steroid-induced osteoporosis in ovariectomized sheep. *J Orthop Traum* , 2005 , 19(1) : 23-28.
- [30] Liu HD , Li XH , Tong XX , et al. Comparison of osteoporosis model of rats induced by dexamethasone and retinoic acid. *Chin J Pathophysiol* , 2004 , 20(4) : 697-699(in Chinese).
- [31] Liu HY , Liu XY. Effects of mono sodium glutamate administered

- neonataly on growth and development of bone in rat. *Chin J Osteoporos* , 2000 , 6(4) : 10-12(in Chinese).
- [32] McHugh NA , Vercesi HM , Egan RW , et al. *In vivo* rat assay of bone remodeling and steroid effects on juvenile bone by pQCT quantification in 7 days. *Am J Physiol Endocrinol Metab* , 2003 , 284(1) : E70-E75.
- [33] Horton JA , Murray GM , Spadaro JA , et al. Precision and accuracy of DXA and pQCT for densitometry of the rat femur. *J Clin Densitom* , 2003 , 6(4) : 381-390.
- [34] Dai RC , Yao XF , Liu MR , et al. Do ultra-trabeculae exist ? -SEM observations on bone microcracking and microcallus. *Chin J Osteoporos* , 2005 , 11(4) : 434-436(in Chinese).
- [35] Legrand JJ , Fisch C , Guillaumat PO , et al. Use of biochemical makers to monitor changes in bone turnover in cynomolgus monkeys. *Biomarkers* , 2003 , 8(1) : 63-77.
- [36] Hao YJ , Tang Y , Gao K , et al. Application of the biochemical indexes of bone metabolism in rats with osteoporosis. *Chin J Clin Rehabil* , 2005 , 9(31) : 172-174(in Chinese).

(收稿日期 2006-04-11)