

骨质疏松动物模型及其评价方法的研究进展 *

郭鱼波¹ 马如风¹ 王丽丽¹ 唐雨晴¹ 李彧² 张东伟^{3*} 牛建昭²

- 1. 北京中医药基础医学院硕士研究生
- 2. 北京中医药大学基础医学院
- 3. 北京中医药大学糖尿病研究中心

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 09-1149-06

摘要: 骨质疏松动物模型,是研究骨质疏松病理和抗骨质疏松药物作用机理的重要依据。本文详细地论述了 4 种骨质疏松动物模型的特点及原理:即(1)激素干预型骨质疏松动物模型,包括去势骨质疏松模型、甲状旁腺切除诱发的骨质疏松模型、下丘脑垂体缺陷诱发的骨质疏松模型、糖皮质激素诱导的骨质疏松模型和布舍瑞林诱发的骨质疏松模型等;(2)废用型骨质疏松动物模型,包括单侧肢体废用性模型、悬吊模型、钢板或螺钉内固定未骨折的骨骼诱发的骨质疏松模型、套筒法诱导大鼠骨质疏松模型和石膏绷带固定诱导骨质疏松模型等;(3)营养型骨质疏松模型,包括低钙饮食诱发的骨质疏松动物模型、低钠诱导的骨质疏松模型;(4)其它类型骨质疏松动物模型,包括维甲酸诱发的骨质疏松模型、链脲佐菌素诱发的骨质疏松模型、基因工程法诱导和联合造模法诱发的骨质疏松模型等。骨质疏松模型常见的评价包括密度测定法、生物化学指标法、骨形态学法和生物力学法等。衡量一种模型成功与否,必须将 4 种不同的指标评价方法结合起来进行综合评价,才能为基础和临床研究提供坚实的科学依据。

关键词: 骨质疏松;动物模型;评价指标

The research progress in animal osteoporotic models and the evaluating methods

GUO Yubo¹, MA Rufeng¹, WANG Lili¹, TANG Yuqing¹, LI Yu¹, ZHANG Dongwei²

- 1. Preclinical Medicine School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029
 - 2. Diabetes Research Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
- Corresponding author: ZHANG Dongwei, Email: zhdw1006@163.com

Abstract: Osteoporotic animal models are the essential tools to study of the pathogenesis of osteoporosis and the pharmacology of osteoporosis drugs. This paper, in detail, discusses 4 types of osteoporotic animal models: (1) hormone intervention-induced osteoporosis animal models, including castrated animal model, parathyroidectomy animal mode, hypothalamic-pituitary defect-induced animal model, glucocorticoid-induced animal model, and buserelin-induced animal model; (2) immobilization-induced osteoporosis animal models, including unilateral limb disuse osteoporosis model, suspension-induced osteoporosis model, limb internal fixation with plate or screw-induced osteoporosis model, steel pipe fixation-induced animal model, and plaster bandage-induced osteoporosis model; (3) dietary intervention-induced osteoporosis models, including low calcium diet-induced osteoporosis model and low sodium diet-induced osteoporosis model; (4) other types of osteoporosis models, including retinoid-induced osteoporosis model, streptozotocin-induced osteoporosis model, gene engineer-induced osteoporosis model, and combined approaches-induced osteoporosis model. The evaluation methods for osteoporosis include the densitometry, biochemistry index, mechanical strength, and bone histomorphometry. To judge whether the animal models is successful or not, we need to comprehensively consider the 4 evaluating indexes, in order to provide a solid base and scientific evidence for preclinical and clinical research.

Key words: Osteoporosis; Animal models; Evaluating index

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (NSFC81273995; NSFC81274140)、教育部和国家外专局高等学校学科创新引智计划资助项目 (B07007);北京中医药大学自主选题项目 (2015-JYB-XS048)

* 通讯作者: 张东伟, Email: zhdw1006@163.com

骨质疏松是指全身性骨量减少及骨组织微结构改变,骨密度和骨质量降低,从而引起骨强度下降和骨脆性增加,导致极易发生骨折的一种常见的和全身性的骨代谢疾病。其最常见的症状是疼痛,以腰背痛最为多见,其次是身长缩短、驼背,严重者可见骨折,甚至诱发死亡^[1]。据 WHO 有关统计资料显示,近年来骨质疏松的发病率呈逐年上升的趋势,每年由于骨质疏松诱发的骨折患者高达 890 万人,估计到 2050 年全球骨质疏松诱发的髋骨骨折男性和女性患者将分别增加 310% 和 240%^[2],这给社会和家庭造成严重的医疗负担和经济负担,因此通过骨质疏松模型,研究骨质疏松的发病机理、对于提升骨质疏松预防和治疗具有重要意义。

骨质疏松动物模型,同其他常用动物模型一样,既可以避免实验研究对人体的各种伤害,还能在较短的时间内成功地模拟疾病的病理状态,从而为人类疾病的病理研究和发展创新药物提供了一种重要手段。为了进一步研究骨质疏松的发病机理和治疗药物,科学家们发展了种类丰富的骨质疏松动物模型,这些动物涵盖了大鼠、小鼠、家兔、犬和其他灵长类动物。本文将从动物模型和评价指标等方面,系统地总结了近年来骨质疏松模型的研究进展,旨在为今后对骨质疏松病理研究和抗骨质疏松药物作用机理研究提供理论和实验依据。

1 常用的骨质疏松动物模型

目前研究中常用的骨质疏松动物模型,一般分为 4 大类:激素干预型、废用型、营养型,其它类型等骨质疏松模型(图 1)。下面将分别论述这些模型造

模方法及特点。

1.1 激素干预诱发的骨质疏松动物模型

1.1.1 去势骨质疏松模型:大鼠是目前骨质疏松的基础研究中最常用的动物之一。20 世纪 30 年代 Korenchevsky 等用去势模型大鼠观察 Delta-雄烯二酮和雄烯二醇对体内部分主要脏器质量的影响。其后 Orimo^[3] 和 Schulz^[4] 等用去卵巢大鼠模型观察甲状腺旁素对骨重构的影响,Wink^[5] 等首先发现了阉割大鼠的骨密度发生了改变。迄今为止,用该模型研究骨重构的文章 Pubmed 上可检索到 2300 多篇。该模型常选用 3—9 月龄成年 SD 或 Wistar 大鼠,大鼠月龄越大,其病理表现越接近成年人疾病特点。基本造模方法是手术切除雌性大鼠双侧的卵巢或者雄性大鼠双侧的睾丸,一般大鼠在 2 个月后即可出现骨量和骨密度的下降,3 到 4 个月后这种变化更加明显。雄性大鼠去势后,其身体还表现为贮精囊、前列腺、包皮腺、肝、肾、心质量的减轻和体重的下降,而大鼠的脂肪、下丘脑、肾上腺和胸腺等的质量则增加。雌性大鼠去势后,其身体还表现出子宫及子宫颈、阴道、雌性包皮腺和脂肪等组织质量的减轻,肝、肾上腺、胸腺等组织质量以及体重的增加。目前该模型在抗骨质疏松的新药研究中,特别中医药抗骨质疏松的作用和作用机理方面有很广泛的应用。

也有研究者用小鼠、犬、羊和猪等动物复制去势动物模型。但是这些模型造模时间比较长,一般需要 3 到 4 个月,加上动物的饲养成本也非常高,这也促使研究者在这些模型基础上开发更加经济合理的模型。

1.1.2 甲状腺腺切除诱发的骨质疏松模型:该模型操作较为麻烦,易损伤喉返神经。大鼠一般手术后

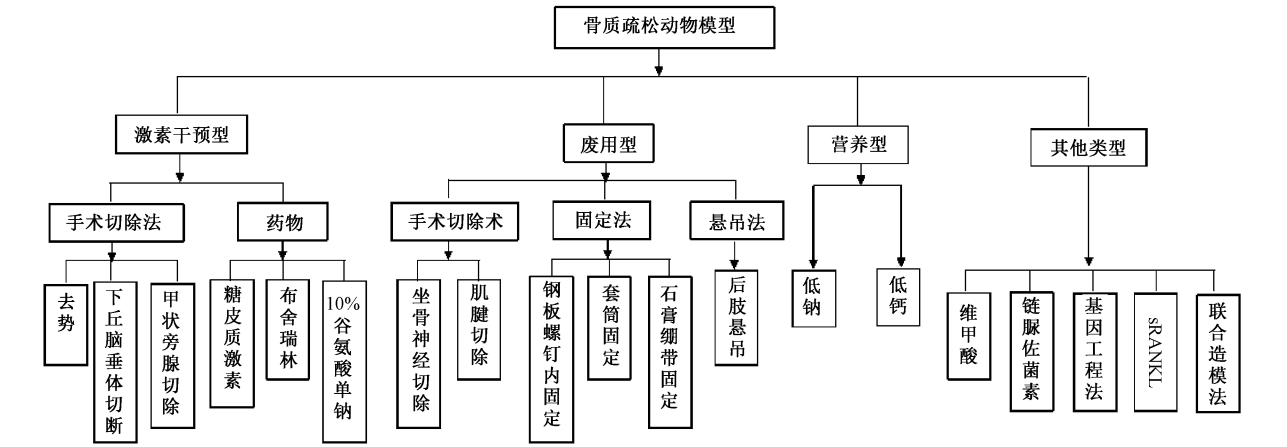


图 1 常见的骨质疏松动物模型造模方法

Fig. 1 The common types of animal osteoporosis models

3 个月可出现股骨皮质骨指数的明显降低^[6]。目前认为:甲状旁腺切除后,可以引起甲状旁腺素的缺乏,进而使体内的 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 合成减少,影响肠道对食物中钙、磷的吸收^[7],从而导致骨质疏松。该模型目前应用较少。

1.1.3 下丘脑垂体缺陷诱发的骨质疏松模型:研究发现给大鼠皮下注射 10% 谷氨酸单钠 (MSG, 4 g/kg)^[8],可以选择性损毁大鼠下丘脑弓状核神经元,导致神经内分泌调节功能紊乱,进而诱发骨小梁面积百分数和骨小梁厚度以及数量的减少,这表明骨量显著减少,骨结构明显退变,发生明显骨质疏松。此模型可重复性和稳定性高,适合于研究由于脑部功能缺陷诱发的骨质类结构改变的作用机理,以及相关药物的治疗效果。

其它的脑源性骨质疏松模型:下丘脑-垂体断开术 (Hypothalamic-Pituitary Disconnection) 和松果体切除术 (Pinealectomy)。Pogoda^[9] 研究团队首先发明了 下丘脑-垂体断开术绵羊模型,该模型也适合于研究牙骨质的病理变化。而松果体切除术^[10]主要通过阻断褪黑激素的作用影响骨代谢。以上这两种模型造模周期从 8 周到 24 月不等,更接近于人类骨质疏松的病变过程,也适合于研究中枢神经系统在骨骼系统生长和发育中的作用。

1.1.4 糖皮质激素诱导的骨质疏松模型:KENDALL^[11]等发现临床上长时间使用糖皮质激素可以诱发骨质疏松。其后发现大鼠^[12]、小鼠^[13]、家兔^[14]和小型猪^[15]等给予不同剂量的糖皮质激素后均可出现骨质疏松症状。目前常用的诱导途径有灌胃、肌肉注射等,造模时间 5 周到 26 周不等。一般认为其病理机制主要在于糖皮质激素能通过氧化还原的途径影响破骨细胞和成骨细胞的分化和寿命,激活 RANKL/RANK 和 WNT/ β -Catenin 途径,从而抑制成骨细胞分化、促进骨吸收和局部细胞凋亡,诱发骨质疏松症^[16]。该模型在评价中医药治疗骨质疏松的作用方面应用也非常广泛^[17]。

1.1.5 布舍瑞林诱发的骨质疏松模型:布舍瑞林 (Buserelin) 是一种促性腺激素释放激素的激动剂,它可以抑制垂体释放促黄体生成激素 (LH) 和卵泡刺激素 (FSH),能够模拟妇女绝经后的症状,从而诱发骨质疏松模型^[18]。大鼠每天给予 0.2 ml (皮下注射) 布舍瑞林,连续 4 周即可出现骨密度和血清中雌二醇含量的下降。

1.2 局部废用性骨质丢失动物模型

1.2.1 单侧肢体废用性模型:其造模方法是通过单

侧肌腱或坐骨神经切除术,人为地造成动物该侧肢体的运动障碍,同时选取另一侧肢体作为对照^[19]。一般大鼠在 3 周左右就表现出骨密度和骨矿物含量的下降。如果同时给大鼠以低钙饲料,10 天左右即出现骨质疏松症状^[20]。该模型类似于成人运动不便造成的骨质疏松模型。

1.2.2 悬吊模型:通过悬吊动物躯体的一部分,人为地造成动物失重或模拟失重状态,使骨矿化水平降低,钙磷代谢负平衡,导致骨质丢失。如:采用悬尾部使大鼠后肢悬空、头低位,后肢处于人工失重状态,3~4 周大鼠出现骨密度下降的症状^[21-22]。

1.2.3 钢板或螺钉内固定未骨折的骨骼诱发的骨质疏松模型:该模型常选择用犬或家兔的胫骨。造模时,将特制的钢板固定于胫骨上。放置钢板时需统一螺钉的扭矩,动物术后能自由活动。在规定时间内取出内固定物,动物的胫骨又恢复了常态,因此该模型为骨质疏松可逆转模型^[23]。内固定置入后不影响动物肢体的外观,实验动物可自由活动,从而减少其他肢体因非生理状态的活动或活动减少而发生的骨量的变化。

1.2.4 套筒法诱导大鼠骨质疏松模型:具体造模方法为^[24]:用一定厚度铜片制成铜圈,套在大鼠腰部。然后将大鼠左后肢装入长 8 cm 的喇叭型套筒套内,套筒的上端固定在腰部铜圈的左侧,再用长 2 cm 的喇叭型套筒在大鼠右后肢根部,套筒的上端固定在腰部铜圈的右侧。4 周后骨矿物质含量的下降,骨小梁体积变小,骨髓腔体积增大。该模型类似临床常见的局部废用性骨质疏松,而且动物还可以做自身对照和药物对照研究。

1.2.5 石膏绷带固定诱导骨质疏松模型:具体造模方法为:将家兔的一侧后肢用高分子树脂石膏绷带固定至股骨上端,作为实验侧,另一侧作为自身对照不做任何处理^[25]。家兔一般在 6 周左右即出现骨生物力学的改变和骨小梁骨量和骨小梁宽度的改变。该模型适合于体型较大的动物,而且该模型还可以作自身对照和药物对照研究。另外,绷带捆扎法也可诱发骨质疏松动物模型。

1.3 营养缺陷诱发的骨质疏松动物模型

1.3.1 低钙饮食诱发的骨质疏松动物模型:Agata 等研究发现给去卵巢大鼠低钙 (0.01% Ca) 饲料 8 周后,大鼠胫骨和脊椎骨 (L3-L6) 的骨密度和骨强度明显降低,血清中骨碱性磷酸酶 (BAP) 和抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 的含量明显升高^[26]。Gao 等的研究也发现,去卵巢大鼠配以低钙饲料在 4 周即

出现脊椎骨密度的下降^[27]。这种低钙饲料造成的骨质疏松模型,如果和去势造模方法结合起来,将缩短骨质疏松的造模时间,提高模型的成模率。

1.3.2 低钠诱导的骨质疏松模型:该模型的造模方法为:将 6 周的 SD 大鼠每天通过等渗泵皮下滴注去氨加压素(5 ng/h),同时每天大鼠给付 70 mL/d (1.0 kcal/mL)的溶液和去离子水,连续 3 个月^[28]。造模大鼠可出现骨密度降低、骨小梁和皮质骨下降等骨质疏松症状。该模型可用于评价药物对于老年性低钠血症病人并发的骨质疏松的作用效果。给动物慢性过度饮酒诱发的骨质疏松模型^[29]。

1.4 其他类型的骨质疏松动物模型

1.4.1 维甲酸诱发的骨质疏松模型:维甲酸(Retinoids)是治疗恶性肿瘤的药物,其副作用是诱发骨质疏松^[30]。研究发现维甲酸连续注射两周,动物即可出现严重的骨质疏松表现:骨量丢失,骨生物力学性能下降等。目前常用的模型动物为大鼠(80 mg/Kg/d)^[31]、小鼠(10 mg/kg/d)^[32]等。同时,在维甲酸造模过程中,大鼠极易出现感染,而且会发生由于厌食而造成的体重减轻。一般认为其作用机理主要是维甲酸通过激活体内的维甲酸受体相关的孤儿受体(ROR)^[33]进而影响骨代谢,既可以促进骨形成,又可以促进骨吸收,但骨吸收占优势,从而诱发骨质疏松。

1.4.2 链脲佐菌素诱发的骨质疏松模型:链脲佐菌素(Streptozocin)是诱发糖尿病模型常用试剂,研究发现给大鼠注射链脲佐菌素(60 mg/kg)21 天后^[34],大鼠骨干和骨骺端的碱性磷酸酶的活性降低,钙离子含量下降,4 周后大鼠的骨小梁结构发生改变^[35]。该模型常用于评价治疗糖尿病的药物对糖代谢异常诱发的骨质结构改变的调节作用。

1.4.3 基因工程法诱导的骨质疏松模型:该模型是模拟人体由于某一或某些基因突变或异常表达而导致的机体骨质疏松病变,其主要通过精确的失活或增强修复某些基因在动物体内的表达,来研究这些基因在发病过程中作用及作用机理,这将有助于骨质疏松的诊断和治疗。目前已经研究表明至少 100 多种目的基因参与到骨质疏松的发生或者发展过程中,这些基因包括 OPG、RANK、RANKL、RUNX2、TGF- β 1、VEGF 等等,感兴趣读者可以阅读 Xu^[36]和 Liu^[37]等发表的相关综述。

1.4.4 可溶性的 RANKL(sRANKL)诱发的骨质疏松模型:Yuan 等^[38]研究发现,给大鼠皮下连续 28 天注射人源性 RANKL(175 ug/kg/day)后,发现骨

密度和骨小梁的完整性显著下降,股骨皮质骨的体积和胫骨骨小梁的体积分数明显降低,皮质骨和骨小梁的生物力学参数发生明显改变。这表明,在评价骨转化指标方面,该模型与去势模型大鼠有一定相似性,因此也可以用于抗骨质疏松药物的药效学评价。但 RANKL 的价格相对昂贵,所以该实验的成本相对较高。

1.4.5 联合造模法诱发的骨质疏松动物模型:骨质疏松的发病机制是复杂的多因素诱发的代谢性疾病,因此在研究过程,研究者除了用单一因素造成骨质疏松模型外,还采用多种因素叠加作用诱发骨质疏松模型,如去卵巢辅以脊髓半横断术、去卵巢辅以坐骨神经切断术,部分肢体辅以去卵巢,去势法联合低钙饮食,糖皮质激素法联合低钙饮食,以及去势法联合糖皮质激素法等,链脲佐菌素和去卵巢等方法联合使用造模,这不仅缩短造模周期,而且也较好地模拟了人类骨质疏松的发病机制,更适合骨质疏松的诊断和治疗研究,感兴趣的读者可以参阅张月峰等^[39]发表的综述。

研究表明,人体不断增加的哈弗氏重构(Haversian remodeling)是机体发生骨质疏松的主要原因。大鼠和小鼠均不具备哈弗氏重构系统,所以与人类的病理过程有一定的差异,但是大鼠和小鼠的价格相对便宜,而且易于标准化饲养,所以目前应用非常广泛。小鼠自然寿命较短,18~30 月龄可用作老年性骨质疏松的模型。但骨骼太小、可取血清少。大鼠去卵巢后不易发生脆性骨折,不适合于观察卵巢切除术对皮质骨影响。同小鼠一样,不能多次取骨活检标本和大量采血。

家兔、羊和小型猪都具有完整的哈弗氏重构系统,所以与人类的发病过程基本类似。家兔模型可以进行反复血液标本采集,但是家兔骨质骨含量少,双侧卵巢切除引起明显的骨密度减低的时间需要超过 16 周,不易诱发骨质疏松。去势犬的骨量变化不很规律,同时部分犬缺乏子宫和卵巢,所以去势造模法并不能成为犬造模的首选方法。小型猪的骨骼较大,可接受人工装置的植入,可多次取血、活检,但其价格昂贵,而且子宫的血管很容易破裂,所以卵巢子宫切除手术比较困难。

2 骨质疏松动物模型评价指标

2.1 密度测定法

双能 X 射线吸收法(DEXA)能测定骨密度和矿物盐含量常用来检测骨质疏松动物的骨健康情

况^[40]。但是 DEXA 测量的骨密度的变化只能反映骨强度变化的 60% - 70%, 因为 DEXA 结果代表骨的生长和大小, 并不是真正的骨密度的变化。外周定量计算机断层扫描 (pQCT) 技术能够从三维结构测定松质骨和皮质骨的变化, 以及股质量的变化^[41]。同 DEXA 一样, pQCT 的结果也必须和骨的形态学指标结合起来综合分析。

微计算机辅助断层扫描法 (μCT) 也是一种三维研究骨质量的手段。它不仅可以对骨局部甚至骨小梁单元进行分析, 同时还可以对骨连接性和弹性, 以及骨的组织形态学进行分析^[42]。

磁共振显微术 (Magnetic resonance microscopy) 是一种非侵入性非离子的放射技术^[43]。这种技术能够评价骨髓水分和脂肪的变化, 反映骨小梁结构的改变。

2.2 骨组织形态学观察

同密度测定法相比, 骨组织形态学分析法是从二维的角度对骨的质量和结构进行高分辨率的分析。该方法能准确地分析骨结构和骨脆性, 以及破骨细胞和成骨细胞的数目, 骨小梁的厚度和数目等。骨形成参数和免疫荧光标记法也可以评价骨组织形态学变化。但是形态学观察组织部位比较局限, 需要对大量的样本进行分析, 需要同骨密度结果结合起来进行分析。

2.3 生物化学指标

检测的标本来自血液、尿液和骨组织等。钙和磷的测定主要来自血液和尿液。骨形成的指标 (如碱性磷酸酶和骨钙素等) 和骨吸收相关指标 (如抗酒石酸酸性磷酸酶和 I 型胶原氨基端交联肽等) 是骨质疏松病理进程的相关指标。

2.4 骨生物力学指标

骨生物力学特性可以通过测定骨强度、硬度和韧性等之间的关系, 用于骨质疏松模型建立及药物治疗效果的评价。常见骨生物力学试验包括长骨 3 点弯曲、4 点弯曲和旋转实验, 以及椎体骨抗压强度及破坏载荷等等。

3 小结

骨质疏松动物模型, 为较为合理和科学地认识骨质疏松的病理和药物的作用效果提供一种手段和方法。随着人类对其病理认识的深入, 必将有更加科学的模型应用于研究。但是动物模型可能只侧重于表现疾病的某一方面, 间接复制疾病。必须选择适合的动物和造模方法, 并通过多种指标分析作出

综合判断。同时对抗骨质疏松药物的药效的判断, 必须采用至少两种以上的造模方法和不同种属的动物进行评价。对骨质疏松的病理学和药效学评价, 也必须将密度学方法, 生物化学方法、生物力学方法和骨形态学指标结合起来进行综合分析。

【参 考 文 献】

- [1] Nazrun AS, Tzar MN, Mokhtar SA, Mohamed IN. A systematic review of the outcomes of osteoporotic fracture patients after hospital discharge: morbidity, subsequent fractures, and mortality, Ther Clin Risk Manag, 2014, 10, 937-948.
- [2] Http:// www. Iofbonehealth. Org Facts-statistics.
- [3] Orimo H, Fujita T, Yoshikawa M. Increased sensitivity of bone to parathyroid hormone in ovariectomized rats, Endocrinology, 1972, 90(3), 760-763.
- [4] Schulz A, Sommer E, Delling G. The antagonistic effect of parathyroid hormone (PTH) and estrogens on bone remodelling in ovariectomized rats, Acta Endocrinol Suppl (Copenh), 1973, 173, 166.
- [5] Wink CS, Felts WJ. Effects of castration on the bone structure of male rats: a model of osteoporosis, Calcif Tissue Int, 1980, 32 (1): 77-82.
- [6] Hong ZY, Liu AP. A new osteoporosis model by parathyroidectomy. Shanghai Laboratory Animal Science, 1996 (02): 21-22. (in Chinese)
- [7] Berdud I, Martin-Malo A, Almaden Y, Aljama P, Rodriguez M, Felsenfeld AJ. The PTH-calcium relationship during a range of infused PTH doses in the parathyroidectomized rat, Calcif Tissue Int, 1998, 62(5): 457-461.
- [8] Liu XY, Liu HY. An animal model of osteoporosis of brain origin. Chinese Journal of Osteoporosis, 2008 (03), 143-147 (in Chinese).
- [9] Oheim R, Beil FT, Krause M, Bindl R, Ignatius A, Pogoda P. Mandibular bone loss in ewe induced by hypothalamic-pituitary disconnection, Clin Oral Implants Res, 2014, 25 (11): 1239-1244.
- [10] Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Staszewicz P, Szapska B, Strzelczyk J. The influence of pinealectomy and melatonin administration on the dynamic pattern of biochemical markers of bone metabolism in experimental osteoporosis in the rat, Neuro Endocrinol Lett, 2002, 23 Suppl 1, 104-109.
- [11] KENDALL PH. Steroid osteoporosis, Proc R Soc Med, 1960, 53, 206-207.
- [12] Naghavi M, Mesgarzadeh DD. On the attempt to establish a model on steroid-induced osteoporosis in bones of rats, Acta Med Iran, 1975, 18(3-4): 175-193.
- [13] Silbermann M, Kleinhaus U, Livne E, Kedar T. Retardation of bone growth in triamcinolone-treated mice, J Anat, 1976, 121 (Pt 3): 515-535.
- [14] Lindgren JU, DeLuca HF, Mazess RB. Effects of 1, 25 (OH)₂D₃ on bone tissue in the rabbit: studies on fracture

- healing, disuse osteoporosis, and prednisone osteoporosis, *Calcif Tissue Int*, 1984, 36(5): 591-595.
- [15] Ikeda S, Morishita Y, Tsutsumi H, Ito M, Shiraishi A, Arita S, Akahoshi S, Narusawa K, Nakamura T. Reductions in bone turnover, mineral, and structure associated with mechanical properties of lumbar vertebra and femur in glucocorticoid-treated growing minipigs, *Bone*, 2003, 33(5): 779-787.
 - [16] Manolagas SC. Steroids and osteoporosis: the quest for mechanisms, *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 1919-1921.
 - [17] He X, Wang J, Li M, Hao D, Yang Y, Zhang C, He R, Tao R. *Eucommia ulmoides* Oliv.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine, *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 78-92.
 - [18] Goulding A, Gold E. Buserelin-mediated osteoporosis: effects of restoring estrogen on bone resorption and whole body calcium content in the rat. *Calcif Tissue Int*. 1990, 46(1):14-9.
 - [19] Weinreb M, Rodan GA, Thompson DD. Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decreased bone formation, *Bone*, 1989, 10(3): 187-194.
 - [21] Wang ZH, Zhao JN, Wang R. Progress in research on animal models of osteoporosis, *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2012 (07), 656-662 (in Chinese).
 - [22] Fiorentino S, Melillo G, Fedele G, Clavenna G, D'Agostino C, Mainetti E, Caselli GF. Ketoprofen lysine salt inhibits disuse-induced osteopenia in a new non-traumatic immobilization model in the rat, *Pharmacol Res*, 1996, 33(4-5): 277-281.
 - [23] Dai KR, Qiu SJ, Zhu ZN, Wang Y. Quantitative study on the organization of regional osteoporosis after rigid plate removal reversal learning, *Shanghai Medical Journal*, 1991 (01), 30-33 (in Chinese).
 - [24] Zhou YF, Yin BG, Li ZL, Guo JS. Making rat model of osteoporosis by the sleeve method, *Anatomy Research*, 2000 (01): 78-79 (in Chinese).
 - [25] Zhang Yuan, establishment and evaluation of disuse animal osteoporosis models, [Master Dissertation], Medical University Of Tianjin, 2004 (in Chinese).
 - [26] Agata U, Park JH, Hattori S, Iimura Y, Ezawa I, Akimoto T, Omi N. The effect of different amounts of calcium intake on bone metabolism and arterial calcification in ovariectomized rats, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2013, 59(1): 29-36.
 - [27] Gao X, Ma W, Dong H, Yong Z, Su R. , Establishing a rapid animal model of osteoporosis with ovariectomy plus low calcium diet in rats, *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(8): 5123-5128.
 - [28] Verbalis JG, Barsony J, Sugimura Y, Tian Y, Adams DJ, Carter EA, Resnick HE. Hyponatremia-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(3): 554-63.
 - [29] Abukhadir SS, Mohamed N, Mohamed N. Pathogenesis of alcohol-induced osteoporosis and its treatment: a review, *Curr Drug Targets*, 2013, 14(13): 1601-1610.
 - [30] McGuire J, Lawson JP. Skeletal changes associated with chronic isotretinoin and etretinate administration, *Dermatologica*, 1987, 175 Suppl 1, 169-481.
 - [31] Oršolić N, Goluža E, Dikić D, Lisičić D, Sašilo K, Rođak E, Jeleč Z, Lazarus MV, Orci T. Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat, *Eur J Nutr*, 2014, 53(5): 1217-1227.
 - [32] Broulík PD1, Raška I, Broulíková K. Prolonged overdose of all-trans retinoic acid enhances bone sensitivity in castrated mice, *Nutrition*, 2013, 29(9): 1166-1169.
 - [33] Ranhotra HS. . The interplay between retinoic acid receptor-related orphan receptors and human diseases, *J Recept Signal Transduct Res*, 2012, 32(4): 181-189.
 - [34] Yamaguchi M, Uchiyama S. Preventive effect of zinc acexamate administration in streptozotocin-diabetic rats: Restoration of bone loss, *Int J Mol Med*, 2003, 12(5): 755-761.
 - [35] Tsuchida T, Sato K, Miyakoshi N, Abe T, Kudo T, Tamura Y, Kasukawa Y, Suzuki K. Histomorphometric evaluation of the recovering effect of human parathyroid hormone (1-34) on bone structure and turnover in streptozotocin-induced diabetics, *Calcif Tissue Int*, 2000, 66(3): 229-233.
 - [36] Xu XH, Dong SS, Guo Y, Yang TL, Lei SF, Papasian CJ, Zhao M, Deng HW. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update, *Endocr Rev*, 2010, 31(4): 447-505.
 - [37] Liu, Y J, Zhang L, Papasian, C J, Deng, H W. Genome-wide Association Studies for Osteoporosis: A 2013 Update, *J Bone Metab*, 2014, 21(2): 99-116.
 - [38] Yuan YY, Kostenuik PJ, Ominsky MS, Morony S, Adamu S, Simionescu DT, Basalyga DM, Asuncion FJ, Bateman TA. Skeletal deterioration induced by RANKL infusion: a model for high-turnover bone disease, *Osteoporos Int*, 2008, 19(5): 625-635.
 - [39] Zhang YF, Han JX, progress in research on animal model of osteoporosis, *Progress In Veterinary Medicine*, 2005 (03), 8-11 (in Chinese).
 - [40] Shanbhogue VV, Hansen S, Jørgensen NR, Brixen K, Grayholt CH. Bone geometry, volumetric density, microarchitecture, and estimated bone strength assessed by HR-pQCT in Klinefelter syndrome, *J Bone Miner Res*, 2014, 29(11): 2474-2482.
 - [41] de Bakker CM, Altman AR, Tseng WJ, Tribble MB, Li C, Chandra A, Qin L, Liu XS. , muCT-Based In Vivo Dynamic Bone Histomorphometry Allows 3D Evaluation of the Early Responses of Bone Resorption and Formation to PTH and Alendronate Combination Therapy, *Bone*, 2014.
 - [42] Cowles EA, Kovar JL, Curtis ET, Xu H, Othman SF. Near-infrared optical imaging for monitoring the regeneration of osteogenic tissue-engineered constructs, *Biores Open Access*, 2013, 2(3): 186-191.
 - [43] Hopper TA1, Meder R, Pope JM. Comparison of high-resolution MRI, optical microscopy and SEM for quantitation of trabecular architecture in the rat femur. *Magn Reson Imaging*. 2004, 22(7): 953-61.