

· 论著 ·

应用原子力显微镜观察脉冲电磁场对大鼠骨质疏松的治疗后骨组织表面超微结构的变化

邓紫婷 何红晨 肖登*

重庆医科大学附属康复医院, 重庆 400050

中图分类号: R454 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 01-0016-06

摘要: 目的 观察实验性大鼠骨质疏松模型股骨颈超微结构的变化特点, 并探讨利用原子力显微镜观察的可行性。方法 清洁级雌性SD大鼠(鼠龄3个月)60只, 体重(200±20)g。随机将其分成对照组(Sham组)、去卵巢组(OVX组)、阿仑膦酸钠治疗组(ALN组)、PEMFs治疗组(PEMFs组), 每组大鼠15只。除Sham组外, 对其他各组行双侧卵巢切除术, 造模后第30天开始分组干预。ALN组给予阿仑膦酸钠灌胃, PEMFs组给予脉冲电磁场治疗。Sham组和OVX组手术后正常喂养, 不予任何处理。治疗后30d取大鼠股骨头切片, 通过AFM观察大鼠股骨颈的表面超微结构。结果 Sham组原子力显微镜扫描可显示骨组织的骨陷窝、骨小管及其表面的钙磷晶体沉积, 骨组织表面粗糙度为(2.59±0.645)μm。OVX组可见骨陷窝的大小变化及其钙磷晶体的排列紊乱, 模型组骨组织表面粗糙度明显高于对照组($P < 0.01$), 提示造模成功; ALN组表面粗糙度明显低于OVX组($P < 0.05$), PEMFs组的表面粗糙度与OVX组相比, 有明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而PEMFs组与ALN组比较, 其表面粗糙度无明显差异($P > 0.05$)。结论 通过原子力显微镜能清晰观察到脉冲电磁场对大鼠骨质疏松治疗后的骨组织表面超微结构的变化, 其疗效与阿仑膦酸钠相当, 为脉冲电磁场治疗骨质疏松提供了一定的理论依据。

关键词: 原子力显微镜; 脉冲电磁场; 骨质疏松; 超微结构

The ultrastructure change of the of bone surface after the treatment of osteoporosis with pulse electromagnetic field in rats by atomic force microscopy observation

DENG Ziting, HE Hongchen, XIAO Deng*

The Affiliated Rehabilitation Hospital of CQMU, Chongqing 400050, China

Corresponding author: XIAO Deng, E-mail: 151686484@qq.com

Abstract: Objective To observe changes of the ultrastructure characteristics of the femoral neck in the experimental rat model of osteoporosis, and to discuss the feasibility of using atomic force microscopy. **Methods** Sixty 3-month-old clean class female SD rats (200±20g) were randomly divided into control group (Sham group), ovariectomy group (OVX group), alendronate sodium phosphate drug therapy group (group OVX + ALN), and PEMFs treatment group (OVX + PEMFs group), with 15 rats in each group. Rats in OVX group and PEMFs group were ovariectomized. After 30 days of the operation, rats in ALN group received alendronate sodium phosphate intragastrically, and rats in PEMFs group received pulse electromagnetic field therapy. Rats in Sham group and OVX group were normally fed. The rat femoral head section was collected 30 days after treatment and the ultrastructure was observed with the microscope. **Results** Under the atomic force microscope, the lacunae bone and bone calcium phosphate crystals deposited on the surface of the small officer were displayed in Sham group. The bone tissue surface roughness was 2.59±0.645 μm. In OVX group, the change of the size of the pit and its bone calcium phosphate crystal were in disordered arrangement, and the bone tissue surface roughness was obviously higher than that in control group ($P < 0.01$), suggesting the success of OVX model. The surface roughness in OVX + ALN group was obviously lower than that in OVX group ($P < 0.05$). The surface roughness in PEMFs group was lower than that in OVX group, with statistically significance ($P < 0.05$), while it was not obviously different between OVX + PEMFs group and OVX + ALN group ($P > 0.05$). **Conclusion** By means of atomic force microscope the surface ultrastructure change can be observed clearly after PEMFs treatment in osteoporotic rat. The effect is comparable with that of alendronate sodium phosphate. The results provides certain theory basis for treatment of osteoporosis with PEMFs.

Key words: Atomic force microscope; PEMFs; Osteoporosis; Ultrastructure

*通讯作者: 肖登, E-mail: 151686484@qq.com

骨质疏松症在世界多发病中列第6位,是发达国家最重要的健康问题之一,也是发展中国家一个日益突出的问题。2001年发表的美国国立卫生研究院关于骨质疏松的预防、诊断和治疗共识^[1],认为本病的特征是骨强度损害,骨折的危险增加。骨强度主要反映骨密度(BMD)和骨质量的完整性^[2],骨质量包括骨结构、骨转换、骨损伤的积累(比如微骨折)、骨矿化和骨材料的特性。目前治疗骨质疏松的药物繁多,但是因为治疗周期长且副作用多,患者多难以坚持,由此脉冲电磁场物理治疗骨质疏松,因其效果明显,无明显副作用从而得到患者认可。但是临床虽然观察到脉冲电磁场治疗骨质疏松有效,却并无明确治疗骨质疏松的治疗机制,为此进行了其治疗机制的研究。

而原子显微镜由于探针的针尖尺寸只有原子大小,因而其分辨率可以达到纳米级^[3],能对从原子到分子尺寸的结构进行三维成像和测量,这是扫描电子显微镜很难达到的^[4]。因此我们利用原子力显微镜对骨组织进行观察,研究其生物力学性能^[5],阐明脉冲电磁场治疗骨质疏松时骨组织的表面超微结构变化。

1 材料和方法

1.1 动物和药品

清洁级SD大鼠60只(由重庆医科大学实验动物中心提供),雌性,体重(200±20)g,鼠龄3个月。饲养环境室温(20~25)℃,相对湿度50%左右,日照12h,室内通风良好,饲料和饮水均由动物中心提供,大鼠饮食及饮水自由。所有实验大鼠均采用笼养管理。

1.2 试剂和仪器

阿伦膦酸钠:石药集团欧意药业有限公司,70mg/盒,批号:H20061303;脉冲电磁场治疗仪:苏州好博公司,型号:HB 320;原子力显微镜:由中科院智能研究中心提供,型号:Bruker/Dimension edge。

1.3 分组和造模

按SPSS软件产生的随机数字表将其分成对照组(Sham组)、去卵巢组(OVX组)、阿伦膦酸钠治疗组(ALN组)、PEMFs治疗组(PEMFs组),每组大鼠15只。骨质疏松模型的建立采用去双侧卵巢法。除Sham组外对其他各组行双侧卵巢切除术,手术方法如下^[6]:5%水合氯醛按0.6mL/100g腹腔注射麻醉,麻醉完毕后,将SD大鼠俯卧位固定于手术台上,背部常规备皮,常规消毒、铺巾,经腰背部切口进

入腹腔,切除两侧卵巢,仔细止血,冲洗后逐层缝合肌肉、皮下组织、皮肤,对合皮肤,用75%酒精、碘酒消毒皮肤。术后每天青霉素4万U肌注,共5天。Sham组仅切除卵巢部分周围脂肪。

1.4 给药方法

造模结束后第30天开始分组干预,依据Meeh-Rubner公式计算大鼠的等效给药剂量,用电子称称取所需量的阿伦膦酸钠,用生理盐水配置成相应浓度,置于酒精灯上加热溶解后,冷却备用。ALN组给予阿伦膦酸钠灌胃,剂量2mg/(kg·d),1次/d,治疗30d。PEMFs组的脉冲电磁场治疗仪治疗,治疗参数为:3.8mT,8Hz,每天治疗2次,每次40min,治疗30d。Sham组和OVX组手术后正常喂养,不予任何处理。

1.5 观察指标

每周各取大鼠股骨头部分进行石蜡包埋后均匀切成厚约5mm左右切片,将脱钙脱蜡切片保存于60%~70%酒精玻璃缸,用AFM分别观察各组骨组织的骨陷窝、骨小管及钙磷晶体,并计算其表面粗糙度,进行统计分析。

1.6 AFM扫描方式

采用AFM观察,扫描速率512Hz。采用8nm长、弹性系数k为40N/m的Si₃N₄微悬臂,扫描范围5μm×5μm至1μm×1μm,以轻敲模式(tapping mode)在大气和室温下直接观察标本。用倒置相差显微镜观察股骨颈情况并选择合适的扫描区域,每组随机选择3个标本进行扫描,每个标本分别随机选择3个不同的部位进行5μm×5μm范围的扫描;每个部位选择1个区域进行1μm×1μm扫描。当扫描范围为5μm×5μm时,图像采集为恒力模式(height mode);扫描范围为1μm×1μm时,图像采集为相位模式(phase mode)及恒力模式(height mode)。

骨组织表面粗糙度分析方法是随机选择每组的图像(1μm)各9张,且每张图像随机选取3个不同部位,应用分析软件(Version5.12R2; Digital Instruments)进行分析。并应用系统软件对1μm的图像进行三维结构的立体重建。所有采集图像均通过自动平滑(flatten auto)处理以消除慢扫描方向的低频噪音。

1.7 统计学处理

应用SPSS 13.0统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 骨组织的 AFM 超微结构像

当扫描范围为 $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ 时, AFM 可以显示, 对照组 (Sham 组) 组织表面形态和超微结构示: 钙磷晶体呈小柱状排列, 骨小管沟通骨陷窝, 骨陷窝

为不规则椭圆形结构, 长轴直径为 $0.3 \sim 1.2\ \mu\text{m}$, 每个骨陷窝有 $10 \sim 60$ 条骨小管与其交通, 相邻之间的骨陷窝间隔为 $0.2 \sim 0.5\ \mu\text{m}$, 钙磷晶体排列呈小柱状, 环绕着哈佛系统排列, 单个晶体大小为 $0.06 \sim 0.2\ \mu\text{m}$, 但仍有少数晶体大小为 $0.04\ \mu\text{m}$ (图 1)。当扫描范围缩小至 $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ 时, 组织表面变得

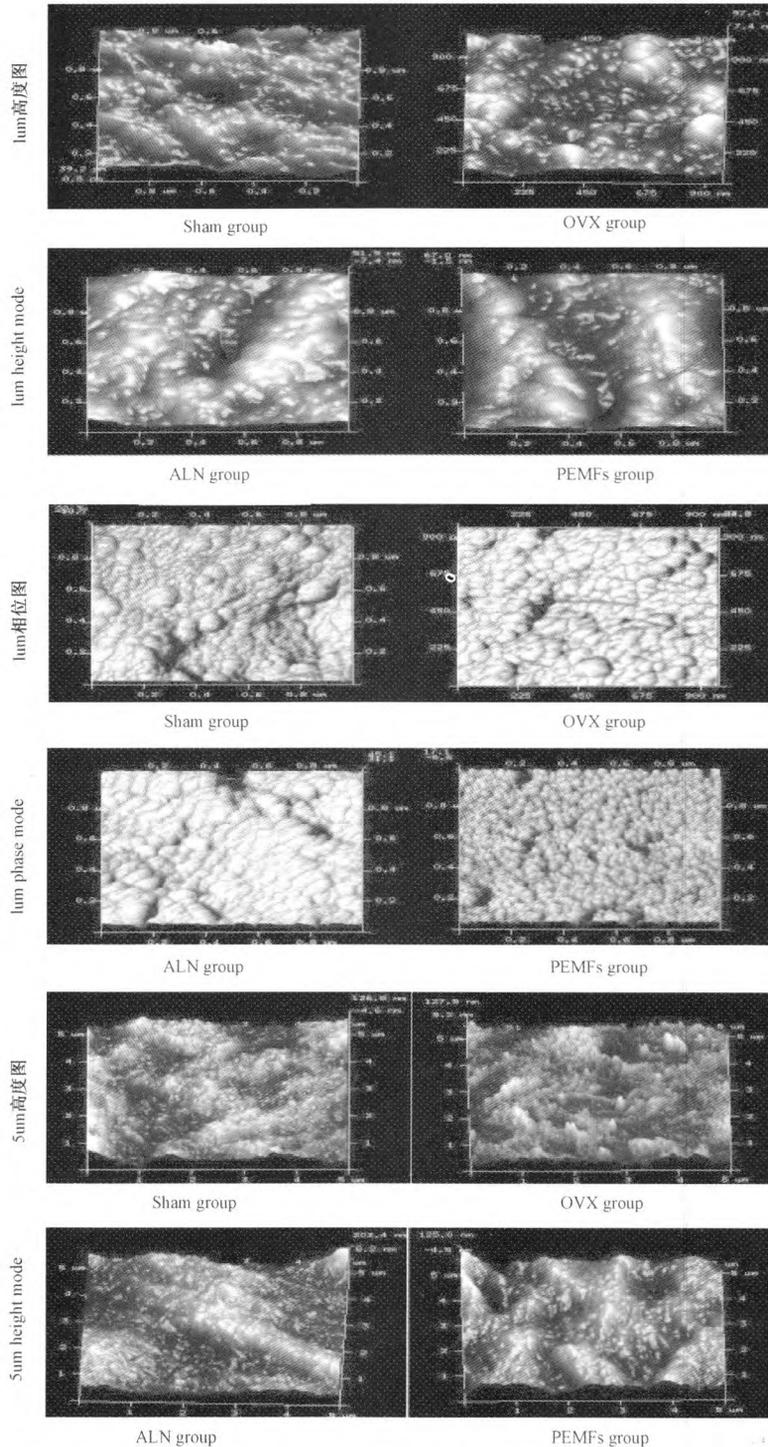


图 1 骨组织的 AFM 超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of bone tissue by using atomic force microscopy

凹凸不平,其中可见许多颗粒状物质,呈柱状排列,部分融合呈片状,可见大小不等的凹陷结构域(图1)。

去卵巢组(OVX组)可见骨小管直径大小不一,骨陷窝数量明显增加,成不规则椭圆形结构,大部分融合为一体。钙磷晶体大小不等,排列紊乱,部分呈团状排列,单个晶体大小为0.03~0.15 μm(图1)。

阿伦磷酸钠药物治疗组(ALN组)可见钙磷晶体环绕着哈佛系统较为规律的排列,骨陷窝数量有所增多,成不规则椭圆形结构,少部分有融合现象,每个骨陷窝有骨小管与其交通,排列不规则(图1)。

PEMFs治疗组(PEMFs组)钙磷晶体部分呈小柱状排列,有部分呈团状分布,大小不等;部分骨小管沟通骨陷窝,骨陷窝为不规则椭圆形结构,数量增多,长轴直径为0.5~2.2 μm,骨陷窝排列紊乱,部分融合成片(图1)。

2.2 骨组织表面粗糙度

模型组骨组织表面粗糙度明显高于对照组($P < 0.01$),提示造模成功,ALN组表面粗糙度明显低于OVX组($P < 0.05$),PEMFs组的表面粗糙度与OVX组相比,有明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而PEMFs组与ALN组比较,其表面粗糙度无明显差异($P > 0.05$)(表1、图2)。

表1 各组大鼠骨组织表面粗糙度(Rq)分析(μm, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Analysis of bone surface roughness (Rq) of rats in each group(μm, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Mankin's 评分
Sham组	9	2.59 ± 0.645
OVX组	9	7.24 ± 1.697 ^a
ALN组	9	4.05 ± 0.748 ^{bd}
PEMFs组	9	4.68 ± 1.560 ^{cef}

注:Sham组与OVX组比较,^a $P < 0.01$; Sham组与ALN组比较,^b $P > 0.05$; Sham组与PEMFs组比较,^c $P > 0.05$; ALN与OVX组比较,^d $P < 0.01$; PEMFs与OVX组比较,^e $P < 0.05$; PEMFs与ALN组比较,^f $P > 0.05$

3 讨论

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨量减少,骨微结构破坏,导致骨骼脆性增加,容易发生骨折为特征的全身性骨病。目前我国60岁以上老龄人口估计有1.73亿,是世界上老年人口绝对数量最多的国家。据我国大规模流行病学调查显示:50岁以上人群以椎体和股骨颈骨密度值为基础的骨质疏松症总患病率女性为20.7%,男性为14.4%,60

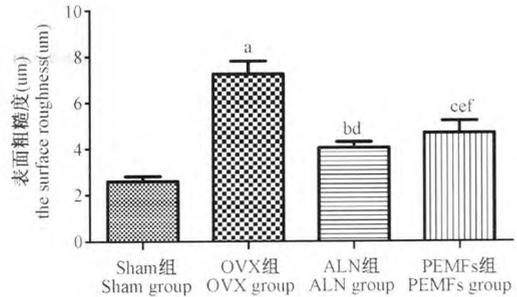


图2 各组大鼠骨组织表面粗糙度
Fig. 2 Bone surface roughness of rats in each group

Sham组与OVX组比较,^a $P < 0.01$; Sham组与ALN组比较,^b $P > 0.05$; Sham组与PEMFs组比较,^c $P > 0.05$; ALN与OVX组比较,^d $P < 0.01$; PEMFs与OVX组比较,^e $P < 0.05$; PEMFs与ALN组比较,^f $P > 0.05$

岁以上人群中骨质疏松症的患病率明显增高,女性尤为突出^[7]。骨质疏松的发病率逐渐上升,使骨质疏松成为了我国的公共健康问题。

目前治疗骨质疏松的药物颇多,但其副作用及治疗费用使许多患者无法长期坚持治疗,而脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMFs)是由电流通过赫尔姆兹线圈所产生的具有脉冲间歇的磁场效应,最早用来治疗骨折延迟愈合及骨不连等,用于骨质疏松的治疗起源于Bassett,他总结了20多年PEMFs治疗的实验研究,并用Wolff定律归纳其机理,认为生物电在骨的代谢和重建中具有十分重要的意义,预言PEMFs治疗骨质疏松具有良好的应用前景^[8]。其具有安全无创伤、副作用少、治疗便捷、依从性好等多个优点。经过大量的动物实验研究及临床应用,人们对脉冲电磁场的作用有了更加深入的认识。

在临床研究中,刘颖等^[9]通过40例患者观察低频脉冲电磁场与阿仑磷酸钠治疗绝经后骨质疏松症的疗效比较发现,与阿仑磷酸钠治疗比较,短期内脉冲治疗在缓解疼痛,提高骨质量和增加肌力方面具有与阿仑磷酸钠相同的效应,尤其是提高腰背肌肌力优于阿仑磷酸钠。刘勇华等^[10]通过对120例患者进行脉冲电磁场治疗骨质疏松,发现脉冲电磁场可缓解原发性骨质疏松症的骨痛,效果较为显著,能够明显改善患者的日常生活活动能力,可提高骨密度。

而基础研究中人们发现低频脉冲电磁场对于细胞的分化增殖具有促进作用。Chen等^[11]研究发现PEMFs通过促进成骨细胞的增殖,而非增强成骨细

胞分化来促进骨形成。周君等^[12]通过脉冲电磁场联合电针疗法对去卵巢大鼠骨质疏松实验研究发现,脉冲电磁场在增加腰椎椎体骨密度,改善腰椎椎体骨生物力学性能方面优于脉冲电磁场或电针疗法单独使用。谢肇等^[13]发现脉冲电磁场对去卵巢骨质疏松症大鼠成骨细胞活性增强,没有出现明显的凋亡情况,但是使破骨细胞的活性减弱,而且可以见到明显凋亡现象。并探讨了治疗骨质疏松症的机制。宋昆等^[14]发现脉冲电磁场可促进成骨细胞的增殖、分化和钙盐分泌,从而加速伤骨愈合、加快骨组织代谢,同时应用表面增强拉曼光谱技术探索了电磁场对成骨细胞的作用机制。Querido等^[15]的研究结果发现经过脉冲电磁场刺激后,聚集在成骨细胞的矿化增加,再通过利用扫描电子显微镜、原子力显微镜以及透射电子显微镜的观察发现成骨细胞矿化结节的特点为低结晶羟基磷灰石。

目前已经对脉冲电磁场治疗骨质疏松的机制进行了多方面探讨,已经取得进展,其中包括对其进行宏观生物力学的研究,证明脉冲电磁场对于骨质疏松大鼠的生物力学性能有明显疗效。据研究发现,通过观察骨组织中超微结构可以获得其对骨的力学和生理性能的影响,从而提高对骨质疏松及骨折风险预测的准确性^[16]。研究表明,微计算机断层扫描技术(micro-computed tomography, micro-CT)已能准确获得骨细观结构参数,但无法完全获得骨表面的微观结构形态^[17]。扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)则被证实能有效地观察到骨表面的活性状态,并确定骨结构的完整性^[18]。而为了获得骨结构的微观表征,研究者又将原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)应用于骨的各种研究中^[19-22]。Milovanovic等^[21]使用AFM观测到老年女性股骨颈松质骨的矿物颗粒尺寸要大于年轻女性,从而导致老年女性松质骨的弹性降低,骨折发生率增加。Zhang等^[24]通过间歇性高频率低载荷的全身振动对大鼠后肢废用导致的骨质疏松进行试验,试验发现骨宏观力学性能的差异主要是由其微观结构的变化而引起,并非是因为骨材料本身发生了变化。而间歇7天的高频率低载荷全身振动能有效地改善了骨的宏观生物力学特性和微观结构。Lin等^[25]通过AFM可清晰观察到牛的密质骨的微观结构,清晰显示了骨陷窝-骨小管网络结构在纵向、横向的大小尺寸。而陈斌等通过AFM对新鲜人尸体肱骨的观察发现,在AFM下,骨组织中钙磷晶体呈柱状排列,骨小管沟通骨陷窝,骨小管直径100~300 nm,骨陷窝为椭圆

圆形结构,长轴直径4.1~10.5 μm ,在矿化区胶原蛋白纤维增厚,呈小盘叠加形态。

本实验通过原子力显微镜观察大鼠骨组织,根据三维高度图及相位图显示,Sham组可见骨小梁中骨陷窝规律排列,骨小管与之相沟通,形成稳定的网络结构,在骨陷窝及骨小管周围有大量钙磷晶体呈柱状排列,骨陷窝及骨小管围绕哈弗管呈同心圆排列,起稳定骨细胞及营养支持作用,这与Lin、Zhang等观察到的相一致。而在OVX组可明显观察到骨陷窝形态大小变化,而其表面粗糙度与Sham组比较具有显著差异($P < 0.01$),即造模成功,表明经去卵巢手术后,由于雌激素水平低下,改变了大鼠的股骨颈骨组织表面超微结构,从而改变了骨组织的力学性能,为骨质疏松的形成奠定了一定理论基础。PEMFs组与OVX组比较,PEMFs组可见骨陷窝呈不规则椭圆形,分布不规则,且钙磷晶体排列较为紊乱,两组之间的表面粗糙度差异具有统计学意义($P < 0.05$),从力学特性角度反应脉冲电磁场治疗组大鼠相对于骨质疏松组大鼠的骨重建速度较快^[26],即脉冲电磁场对于骨质疏松的治疗是有效的。而ALN组与PEMFs组的骨组织在三维高度图及相位图下均可见不同程度骨陷窝形态大小变化,两组表面粗糙度对比差异无统计学意义($P > 0.05$),即脉冲电磁场相对于阿仑膦酸钠治疗骨质疏松的疗效没有确切差异性。

总之本实验利用AFM显示,脉冲电磁场治疗大鼠骨质疏松症与阿仑膦酸钠治疗骨质疏松症的疗效相当,而AFM作为一种简单方便的研究方案可以为脉冲电磁场的治疗骨质疏松时骨组织的超微形态学变化提供可靠的依据。

【参 考 文 献】

- [1] Beaupre L A, Majumdar S R, Dieleman S, et al. Diagnosis and treatment of osteoporosis before and after admission to long-term care institutions. *Osteoporosis International*, 2012, 23(2): 573-580.
- [2] Kapus O, Gaba A, Svoboda Z, et al. Relationship between body composition and bone mineral density of the lumbar spine and proximal femur influence of years since menopause. *Modern Rheumatology*, 2014, 24: 505-510.
- [3] 张德添,何昆,张飒,等.原子力显微镜发展近况及其应用.现代仪器,2002,8(3):6-9.
Zhang DT, He K, Zhang S, et al. The development and application of atomic force microscopy. *Modern Instruments*, 2002, 8(3): 6-9. (in Chinese)
- [4] 姚球.扫描隧道与扫描力显微镜分析原理.天津:天津大学出版社,2009:1-5.

- Yao B. Scanning tunneling and scanning force microscopy analysis principle. Tianjin: Tianjin University Press, 2009:1-5. (in Chinese)
- [5] 丁燕怀,蒋旭,任虎鸣,等.原子力显微镜用于微尺度材料力学性能表征的研究进展.材料导报,2012,26(7):118-123.
Ding YH, Jiang X, Ren HM, et al. Atomic force microscope is used to performance characterization of microscale mechanics of materials is reviewed. Materials Review, 2012, 26 (7): 118-123. (in Chinese)
- [6] 王春生,苏峰,宗治国,等.骨质疏松模型建立的研究进展.中国骨质疏松杂志,2015, 21(9):1143-1149.
Wang CS, Su F, Zong ZG, et al. The research progress of osteoporosis model. Chin J Osteoporos., 2015, 21 (9): 1143-1149. (in Chinese)
- [7] 蒋建发,孙爱军.老年女性骨质疏松症的防治.中国实用妇科与产科杂志,2014, 30 (5):323-327.
Jiang JF, Sun AJ. Older women osteoporosis prevention. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2014, 30(5): 323-327. (in Chinese)
- [8] Bassett CA. Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields. Crit Rev Biomed Eng, 1989, 17 (5): 451-529.
- [9] 刘颖,王春燕,刘慧芳,等.低频脉冲电磁场与阿仑膦酸钠治疗绝经后骨质疏松症的疗效比较.华西医学 2014, 29(1): 67-72.
Liu Y, Wang CY, Liu HF, et al. Electromagnetic field with low frequency pulse Allen phosphonic acid sodium compared the curative effect of treatment of postmenopausal osteoporosis. Huaxi Medical, 2014, 29 (1): 67-72. (in Chinese)
- [10] 刘勇华,涂萍,吴和平.脉冲电磁场辅助治疗原发性骨质疏松症疗效分析,中国骨质疏松杂志. 2014,20(3):275-279.
Liu YH, Tu P, Wu HP, Pulse electromagnetic field auxiliary treatment of primary osteoporosis curative effect analysis, Chin J Osteoporosi. 2014, 20 (3): 275-279. (in Chinese)
- [11] Chen LT, Chang WH, Sun JS, et al. Effect of pulsed-burst electromagnetic on osteoblast cell activities. Bioelectromagnetics, 2004, 25(6): 457-465.
- [12] 周君,何红晨,肖登,等.脉冲电磁场联合电针疗法对去卵巢大鼠骨质疏松的影响.中南医学科学杂志, 2014,42(4):331-336.
Zhou J, He HC, Xiao D, et al. Pulse electromagnetic field joint cupping therapy affect to ovary osteoporosis rats. Zhongnan Medical Science Journal, 2014, 42 (4): 331-336. (in Chinese)
- [13] 谢肇,李起鸿,许建中,等.脉冲电磁场对去卵巢骨质疏松症大鼠成骨细胞和破骨细胞凋亡的影响.中华物理医学与康复杂志, 2007,29(1):8-12
Xie Z, Li QH, Xu JZ, et al. Pulse electromagnetic field on to ovary osteoporosis rat osteoblast and osteoclast apoptosis. Chinese Journal of Physical Medicine and Rehabilitation, 2007, 29 (1): 8-12. (in Chinese)
- [14] 宋昆,苏纪勇,何烁杰,等.低频弱脉冲电磁场作用下成骨细胞的实时表面增强拉曼光谱研究.中国组织工程研究与临床康复,2007,11(40):8090-8094.
Song K, Su JY, He SJ, et al. Weak low frequency pulse electromagnetic field under the action of osteoblast real-time surface enhanced Raman spectroscopy. Tissue Engineering Research and Clinical Rehabilitation, 2007, 11 (40): 8090-8094. (in Chinese)
- [15] Querido W, Abraçado L G, Rossi A L, et al. Ultrastructural and mineral phase characterization of the bone-like matrix assembled in F-OST osteoblast cultures. Calcified Tissue International, 2011, 89(5): 358-371.
- [16] Stauber M, Rapillard L, van Lenthe GH, et al. Importance of individual rods and plates in the assessment of bone quality and their contribution to bone stiffness. Journal of Bone and Mineral Research, 2006, 21: 586-595.
- [17] Hildebrand T, Laib A, Müller R, et al. Direct three-dimensional orphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliaccrest, and calcaneus. Journal of Bone and Mineral Research, 1999, 14:1167-1174.
- [18] Banse X, Devogelaer JP, Holmyard D, et al. Vertebral cancellous bone turn-over; microcallus and bridges in backscatter electron microscopy. Micron, 2005, 36:710-714.
- [19] McElderry JDP, Zhu PZ, Mroue KH, et al. Crystallinity and compositional changes in carbonated apatites: Evidence from P-31 solid-state NMR, Raman, and AFM analysis. Journal of Solid State Chemistry, 2013, 206: 192-198.
- [20] Hassenkam T, Jørgensen HL, Lauritzen JB. Mapping the imprint of bone remodeling by atomic force microscopy. The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2006, 288:1087-1094.
- [21] Milovanovic P, Potocnik J, Stojkovic M, et al. Nanostructure and mineral composition of trabecular bone in the lateral femoral neck: implications for bone fragility in elderly women. Acta Biomaterialia, 2011, 7: 3446-3451.
- [22] Thurner PJ, Oroudjev E, Jungmann R, et al. Imaging of bone ultrastructure using atomic force microscopy [J]. In: Méndez-Vilas A, Díaz J, editors. Modern research and Educational Topics in Microscopy. Badajoz: Formatex, 2007:37-48.
- [23] Kapus O, Gaba A, Svoboda Z, et al. Relationship between body composition and bone mineral density of the lumbar spine and proximal femur influence of years since menopause. Modern Rheumatology, 2014, 24: 505-510.
- [24] Zhang Rui, Gong He, Zhu Dong, et al. Seven day insertion rest in whole body vibration improves multi-level bone quality in tail suspension rats. PLoS One, 2014, 9(3): e92312.
- [25] Lin Y, Xu S. AFM analysis of the lacunar-canalicular network in demineralized compact bone. Journal of Microscopy, 2011:291-302.
- [26] Milovanovic P, Potocnik J, Djonic D, et al. Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level: nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM. Experimental Gerontology, 2012, 47(2):154-159.

(收稿日期:2016-06-10;修回日期:2016-07-31)