

· 论 著 ·

低钙饲料联合地塞米松致大鼠骨质疏松模型的建立

董莹莹 王猛 郭艳 张海军 苏凤艳*

吉林农业大学, 吉林 长春 130118

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 10-1393-06

摘要: **目的** 探讨通过低钙饲料联合肌肉注射地塞米松的方法建立大鼠骨质疏松模型的可行性。**方法** 将 20 只 3 月龄雌性 SD 大鼠随机分为正常对照组(正常饲料+生理盐水)和模型组(低钙饲料+地塞米松), 每组 10 只大鼠。模型组每 3 天注射一次地塞米松, 按照 1 mg/kg 的给药剂量在大鼠的腿部肌肉进行注射, 空白组每 3 天注射一次等量的生理盐水, 持续 6 周。分别在给药 4 周后通过双能 X 线吸收骨密度测量仪对大鼠进行骨密度检测, 第 6 周时再次对大鼠的骨密度进行测量, 并对其骨灰重/干重、骨钙、骨磷、血钙、血磷、骨组织形态学等指标进行进一步的说明。**结果** 第 4 周模型组的骨密度与空白组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 第 6 周模型组的骨密度显著低于空白组($P<0.01$), 第 6 周模型组骨组织中的灰重/干重显著低于空白组($P<0.01$), 第 6 周模型组的骨钙和骨磷含量均显著低于空白组($P<0.01$), 第 6 周模型组血清中的钙浓度显著高于空白组($P<0.01$), 第 6 周模型组血磷的浓度显著低于空白组($P<0.01$), 从第 6 周的病理组织切片中可明显看出模型组的骨小梁不完整, 且存在大量脂肪细胞。**结论** 低钙饲料联合地塞米松的造模方法切实可行, 且能缩短造模时间。

关键词: 骨质疏松; 地塞米松; 低钙饲料; 骨密度

Establishment of a rat model of osteoporosis induced by low calcium diet combined with dexamethasone

DONG Yingying, WANG Meng, GUO Yan, ZHANG Haijun, SU Fengyan*

Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

* Corresponding author; SU Fengyan, Email: sufy110@163.com

Abstract: **Objective** To study the feasibility of establishing a rat osteoporosis model by low calcium diet combined with intramuscular dexamethasone. **Methods** 20 female SD rats of 3 months old were randomly divided into two groups; normal control group (normal feed + normal saline), model group (low calcium feed + dexamethasone), with 10 rats in each group. The model group received dexamethasone every three days, as intramuscular injection at the leg at a dose of 1 mg/kg, and the same amount of normal saline was injected into the blank group. Bone mineral density was measured by a dual energy X-absorption bone densitometer after four weeks of administration. Bone mineral density was measured again in the sixth week, and further evaluated by indicators such as ashes/dry weight, bone calcium, bone phosphorus, blood calcium, blood phosphorus, and bone histomorphology. **Results** There was no significant difference in bone mineral density between the model group and the blank group ($P>0.05$) at the fourth week. Bone density of the model group at the sixth week was significantly lower than that in the blank group ($P<0.01$). The ash weight/dry weight in the bone tissue of the model group was significantly lower than that in the blank group ($P<0.01$). The contents of bone calcium and bone phosphorus in the model group were significantly lower than those in the blank group ($P<0.01$). The serum calcium concentration in the model group was significantly higher than that in the blank group ($P<0.01$). The concentration of phosphorus of the model group was significantly lower than that of the blank group ($P<0.01$). It was evident from the pathological tissue sections that the trabecular bone of the model group was incomplete and there were a large number of fat cells. **Conclusion** Dexamethasone + low calcium feed modeling method is feasible and can shorten the model time. **Key words:** osteoporosis; dexamethasone; low calcium feed; bone mineral density

基金项目: 国家重点研发计划资助(2018YFC1706601); 吉林省医药产业发展引导资金项目(20150311048YY)

* 通信作者: 苏凤艳, Email: sufy110@163.com

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨微结构改变为特征的一种全身性骨骼疾病^[1], 该病多发于绝经后妇女及中老年人, 全球的总患病率

为 6.6%~19.3%^[2],其中在中国调查显示其发病率高达 25%^[3]。预计到 2025 年,中国患骨质疏松症或骨密度低的患者将达到 2.12 亿^[4]。研究发现,骨质疏松症主要由骨代谢紊乱引起,其中骨形成和骨吸收之间的不平衡起主要作用。新骨形成主要由成骨细胞介导,而骨吸收主要取决于破骨细胞的功能。因此,在正常骨重建的过程中,无论是促进成骨细胞增殖或诱导成骨细胞分化均可增强骨形成^[5-6]。

地塞米松(dexamethasone, Dex)是一种人工合成的长效糖皮质激素,由地塞米松所引起的骨质疏松被称为糖皮质激素性骨质疏松(glucocorticoid induced osteoporosis, GIOP)。GIOP 属于继发性骨质疏松,其发病率仅次于原发性骨质疏松,长期高剂量的注射地塞米松会导致成骨细胞和骨细胞凋亡,因此 GIOP 引起了人们的关注^[7]。本研究以低钙饲料联合地塞米松致大鼠骨质疏松的模型为研究对象,以骨密度(bone mineral density, BMD)、骨组织形态学作为主要评价指标,考察造模情况,以期获得一种耗时短、节约成本且效果更佳的骨质疏松动物模型建模方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:3 月龄雌性 SD 大鼠 20 只,由辽宁长生生物技术有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(辽)2015-0003,体重(310±10)g。

1.1.2 药品:地塞米松磷酸钠注射液(国药准字 H137021969,辰欣药业股份有限公司),甲醛,生理盐水,乙醚。

1.1.3 饲料:正常饲料(北京科奥协力饲料有限公司),钙离子含量为 1.22%;低钙饲料,配方见表 1。

表 1 低钙饲料配方(Ca²⁺含量 0.04%)

Table 1 Low calcium feed formula (Ca²⁺ content 0.04%)

成分	百分含量/%
酪蛋白	10.0
黄豆粉	15.0
小麦面粉	54.0
玉米油或花生油	4.0
纤维素	2.0
混合盐	2.6
混合维生素	1.0
氯化胆碱	0.2
D1-蛋氨酸	0.2
淀粉	11.0

1.1.4 仪器:OSTEOCORE-3 型锥状二维快闪式全数字双能 X 线(DEXA)骨密度仪(法国 MEDILINK

公司,中日联谊医院骨科提供),LEICA RM2235 切片机(德国,上海聚慕医疗器械),760CRT 双光束紫外可见分光光度计(中国,北京京科瑞达科技有限公司),显微镜及显微拍摄系统(德国,Leica),火焰原子吸收光谱仪(德国,耶拿公司),马福炉(中国,上海博讯实业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及处理:将 SD 大鼠随机分为空白对照组(正常饲料+生理盐水)和模型组(低钙饲料+地塞米松),每组 10 只,在无菌条件下进行封闭式饲养。饲养期间允许动物自由采食、饮水,室内相对温度为 19℃~23℃,相对湿度为(40±10)%。模型组每 3 天注射一次地塞米松,按照 1 mg/kg 的给药剂量对大鼠腿部进行肌肉注射,空白组每 3 天注射一次等量的生理盐水,共 6 周。

1.2.2 骨密度的测量:分别于给药第 4 周处死 4 只大鼠、第 6 周处死 6 只大鼠,取其股骨组织,通过骨密度仪对其进行骨密度测量。

1.2.3 骨灰分及钙、磷含量的测定:第 6 周处死大鼠后将其骨组织放入马福炉高温加热 6 h,测定灰分含量。取少量烧好的组织加入 10 mL 高氯酸浓硫酸混合液(1:5),之后经高温消化 4 h,将消化好的溶液定容到 25 mL 容量瓶中备用。通过紫外分光光度进行磷的测定,通过火焰原子吸收分光光度进行钙含量的测定。

1.2.4 血清指标的检测:取 200 μL 血清,在血清中加入 10 mL 高氯酸浓硫酸混合液(1:5),之后高温消化 4 h,将消化好的溶液定容到 25 mL 容量瓶中备用。通过紫外分光光度进行血清中磷浓度的测定,通过火焰原子吸收分光光度进行血清中钙含量的测定。

1.2.5 组织病理学观察:将大鼠股骨组织用 4%多聚甲醛液固定 2 d,用 5%~10%的浓硝酸溶液将骨组织脱钙 12~24 h,按常规脱水、透明、包埋、石蜡切片,厚 4~5 μm,常规 HE 染色,用显微镜在 400 倍镜下观察骨组织形态学变化。

1.3 统计学处理

采用 Execl 2016 和 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析 and 处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 健康指标

从实验开始,每日早上 8:00 对各组大鼠进行称重,观察大鼠的各项生命体征,并且每周称取两次摄

水、摄食量,观察并记录大鼠基础健康指标的变化情况。空白组大鼠毛发光洁,活动体态正常,模型组大鼠毛色无光泽、稀疏,四肢爪部常有断裂。大鼠体重实验结果显示(图1),整个饲养期间模型组的体重在前3周处于下降的趋势,之后趋于平稳。由于注射地塞米松的原因,导致模型组体内营养成分流失加速,致使体重下降,空白组的体重一直保持着持续上升的状态;大鼠饮水实验结果显示(图2),模型组的摄水量从第2周开始下降,从第3周之后趋于平稳,由于模型组注射地塞米松的原因使大鼠的饮水量增加,因此模型组的摄水量显著高于空白组。

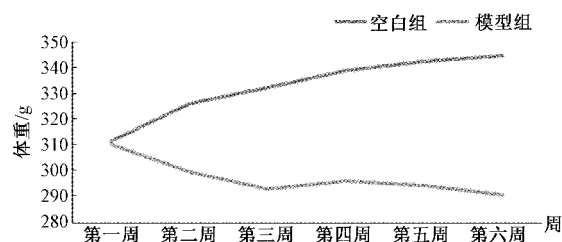


图1 地塞米松+低钙饲料对大鼠体重的影响

Fig.1 Effect of dexamethasone + low calcium diet on body weight of rats

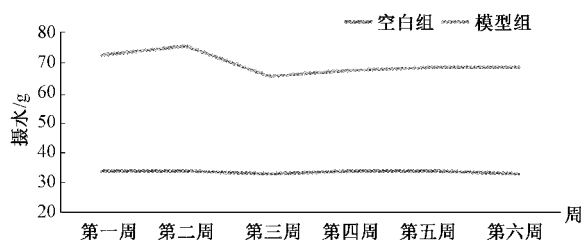


图2 地塞米松+低钙饲料对大鼠饮水的影响

Fig.2 Effect of dexamethasone + low calcium feed on water intake in rats

2.2 骨指标

2.2.1 骨密度:第4周大鼠骨密度实验结果显示(图3),模型组大鼠股骨上段和下段与空白组相比,差异无统计学意义,只有空白组股骨中段的骨密度高于模型组,且差异显著($P < 0.05$),不能证明造模成功;第6周大鼠骨密度实验结果显示(图4),模型组大鼠股骨上段、中段、下段的骨密度均显著低于空白组($P < 0.01$),从骨密度的结果可以初步确定造模成功。

2.2.2 骨组织干重和灰重比:第6周大鼠骨组织灰分及灰重/干重实验结果显示(表2),模型组的灰分显著低于空白组($P < 0.01$),且模型组灰重/干重极显著低于空白组($P < 0.01$)。

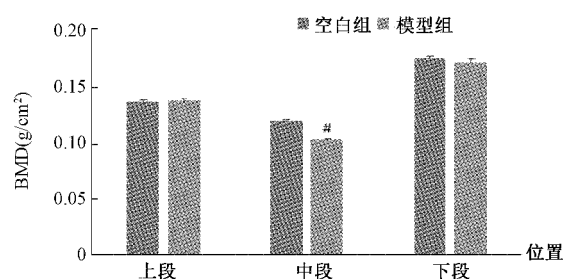


图3 地塞米松+低钙饲料对大鼠4周骨密度的影响

Fig.3 Effect of dexamethasone + low calcium diet on bone mineral density of rats at four weeks

注:与空白组比较, # $P < 0.05$ 。

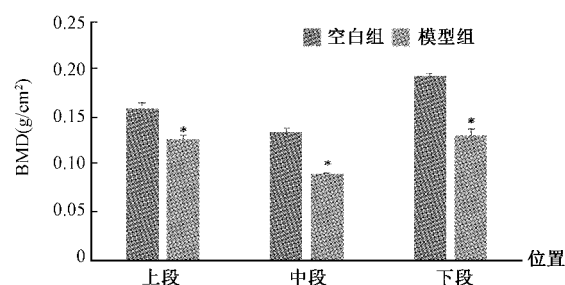


图4 地塞米松+低钙饲料对6周大鼠骨密度的影响

Fig.4 Effect of dexamethasone + low calcium diet on bone mineral density of rats at six weeks

注:与空白组比较, * $P < 0.01$ 。

表2 两组大鼠骨组织灰重、干重

Table 2 Bone tissue gray weight / dry weight of two groups rats

分组	鲜重/g	干重/g	灰重/g	灰重/干重/%
空白组	1.8251	1.3449	0.8727	64.88±1.37
模型组	1.6249	1.1849*	0.6070*	51.93±2.54*

注:与空白组比较, * $P < 0.01$ 。

2.2.3 骨组织中钙、磷的含量:第6周时骨组织钙、磷含量实验结果显示(图5),模型组钙的含量显著低于空白组($P < 0.01$),模型组磷的含量显著低于空白组($P < 0.01$)。

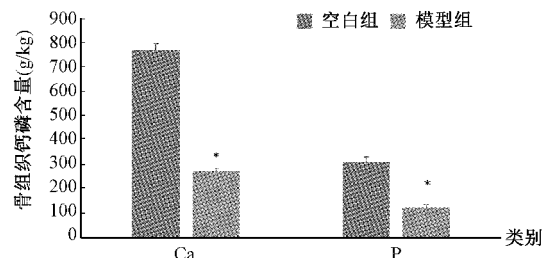


图5 地塞米松+低钙饲料对大鼠骨钙磷的影响

Fig.5 Effects of dexamethasone + low calcium feed on bone calcium and phosphorus in rats

注:与空白组比较, * $P < 0.01$ 。

2.3 血清指标

由图 6 和图 7 可见,造模 6 周时,模型组血清钙浓度显著高于空白组 ($P<0.01$);模型组血清磷浓度显著低于空白组 ($P<0.01$)。

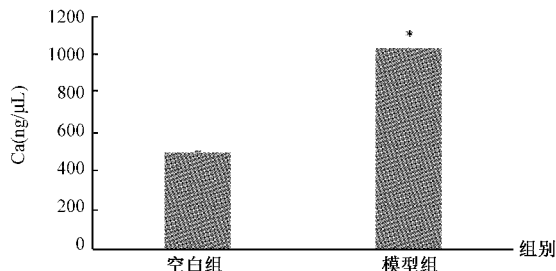


图 6 地塞米松+低钙饲料对大鼠血钙的影响

Fig.6 Effect of dexamethasone + low calcium diet on serum calcium in rats

注:与空白组比较, * $P<0.01$ 。

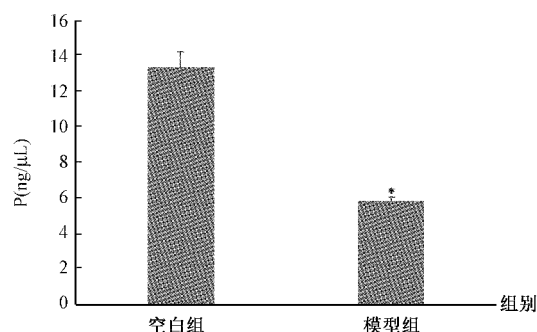


图 7 地塞米松+低钙饲料对大鼠血磷的影响

Fig.7 Effect of dexamethasone + low calcium diet on blood phosphorus in rats

注:与空白组比较, * $P<0.01$ 。

2.4 H&E 染色

从大鼠的骨组织形态学可看出(图 8),空白组的骨小梁完整;模型组的骨小梁多已断裂,无完整的骨小梁,出现大量的脂肪细胞。

3 讨论

近年来我国骨质疏松症的发病率迅速上升,已经成为社会关注的焦点。骨质疏松被人们称为“无声杀手”,因为它是在人们未察觉的情况下产生的,且这一疾病没有根治的方法,只能通过长期服用药物来延缓病情的发展。美国骨质疏松治疗费用每年已经达到上百亿美元,并且由于其高昂的防治费用及患者对家庭成员的依赖,给社会造成了沉重的负担。骨质疏松是当今社会中老年人及妇女的多发病,目前全球发病的人数已经达到 2 亿人^[8]。骨质

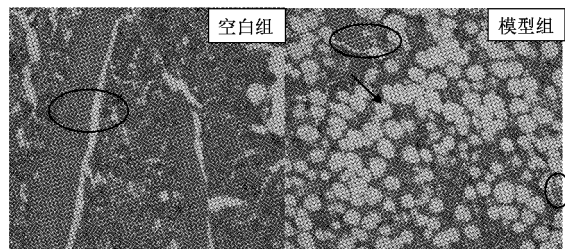


图 8 各组光镜下观察($\times 400$,椭圆处为骨小梁,箭头处为脂肪细胞)

Fig.8 Each group under light microscope observation ($\times 400$), blank group diagram arrow indicates intact trabecular bone, model group diagram arrow indicates fat cell

疏松主要分为原发性骨质疏松、继发性骨质疏松、特发性骨质疏松,原发性骨质疏松主要是由于人们增长到一定年龄而自然产生的,继发性骨质疏松则是由一些外力影响所产生的,如药物、长期卧床等^[9],特发性骨质疏松的原因尚不明确。

目前建造骨质疏松的动物实验中多选用 3 月龄大鼠,常用的方法主要是去势、维甲酸诱导法和糖皮质激素诱导法,还有采用长期饲喂低钙饲料来诱导骨质疏松模型。但这些方法均存在缺点,大鼠去势的方法操作困难,对环境手法等要求较高;维甲酸给药剂量为 80 mg/kg,造模时间为 21 d^[10],维甲酸虽然造模时间短但价格昂贵;传统的糖皮质激素建模大概需要 60 d^[11],造模时间较长;单纯的低钙饲料造模时间需 20 周^[12],造模时间更长。因此本研究从节省成本、节约时间等多方面考虑采用低钙饲料联合地塞米松进行造模。刘和娣等^[13]亦采用地带米松+低钙饲料法造模,但时间较长。本研究采用地塞米松+低钙饲料(钙含量 0.004%),造模时间缩短两周,且操作简单、价格低廉。

Dex 广泛用于自身免疫性疾病和炎症治疗^[14],长期使用 Dex 会增加骨质疏松症甚至股骨头坏死的风险^[15],Dex 能增加脂肪细胞的生成,减少成骨细胞^[16];低钙饲料的食用可致使动物体内的钙含量降低,最终形成骨质疏松。Dex 是一种人工合成的长效糖皮质激素,通过直接抑制骨细胞、成骨细胞活性和增加破骨细胞骨吸收两个阶段影响骨代谢,导致骨质疏松^[17]。

本研究通过评估骨密度来判定是否造模成功,通过骨组织灰重和干重比、骨钙离子和磷离子的含量、血清 Ca、P 浓度和骨组织形态学等指标来进一步确定大鼠的造模情况。

骨密度全称骨骼矿物质密度,是评价骨骼强度及骨质量的一个重要指标,可以反映骨质疏松程度,是预测骨折危险性的重要依据,也是判定骨质疏松的关键因素^[18]。结果发现,第4周模型组股骨上、中、下段骨密度与空白组相比,差异无统计学意义($P \geq 0.05$),说明造模未成功;第6周模型组大鼠股骨上、中、下段骨密度与空白组相比,差异有统计学意义($P \leq 0.05$),说明造模成功。

骨灰重/干重是反映骨矿含量的重要指标,比值越低,骨无机质的含量越低;此次研究结果显示,模型组的灰重/干重显著低于空白组($P \leq 0.05$),说明长期塞米松+低钙饲料能降低骨中无机物质的含量,使骨代谢水平发生了改变;钙磷代谢是影响骨代谢的重要指标,当骨中钙含量不足时则会使血液中的钙转化为骨钙磷来维持骨中的钙磷^[19-20];血液中的钙磷离子还保持着一定的数量关系,当其数量不在规定的范围内则会引发骨骼疾病。本次研究结果发现第6周的血清指标中,模型组Ca的含量显著高于空白组($P \leq 0.05$),模型组P的含量显著低于空白组($P \leq 0.05$),说明骨吸收增加;模型组骨组织中Ca、P的含量均显著低于空白组,说明长期的地塞米松+低钙饲料能增强破骨细胞的形成,且能抑制成骨细胞的增殖、分化,降低成骨细胞活性,并使成骨细胞凋亡;从生化指标和骨钙磷含量可以明显看出模型组的骨吸收大于骨形成,说明地塞米松+低钙饲料造模效果显著。人骨髓间质干细胞是具有多向分化能力的细胞,在成人体内主要分化为成骨和脂肪细胞,伴随着脂肪组织在骨髓中的含量增加,成骨细胞在骨髓中的含量会明显减少^[21]。从大鼠胫骨组织形态学可见,模型组骨小梁多已断裂,几乎无完整的骨小梁,且出现大量的脂肪细胞,说明体内成骨细胞减少,表明地塞米松+低钙饲料已使骨组织显微结构发生了改变,呈现出骨质疏松的状态。

综上所述,利用低钙饲料联合地塞米松肌肉注射方法建立大鼠骨质疏松模型切实可行,低钙饲料联合地塞米松的使用可以进一步加速骨丢失。此法操作简单、周期短、费用低廉且建模效果好,是一种较好的建立骨质疏松实验动物模型的方法。

【参 考 文 献】

[1] Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HA, et al. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility[J]. Sports Med, 2014, 44(1): 37-53.
[2] Bégin MJ, Stémarie LG, Coupal L, et al. Hypomagnesemia during teriparatide treatment in osteoporosis: incidence and

determinants[J]. Journal of Bone & Mineral Research, 2018, 33(8): 1444-1449.
[3] Jiang Y, Zhang P, Tu L, et al. Prevalence of comorbidities and evaluation of screening in Chinese patients with spondyloarthritis[J]. Clinical Rheumatology, 2018, 37(2): 423-428.
[4] Lin X, Xiong D, Peng Y Q, et al. Epidemiology and management of osteoporosis in the People's Republic of China: current perspectives[J]. Clinical Interventions in Aging, 2015, 10: 1017-1033.
[5] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance [J]. Science, 2000, 289(5484): 1501-1504.
[6] Lane NE, Kelman A. A review of anabolic therapies for osteoporosis[J]. Arthritis Res Ther, 2003, 5(5): 214-222.
[7] Fan S, Gao X, Chen P, et al. Myricetin ameliorates glucocorticoid-induced osteoporosis through the ERK signaling pathway[J]. Life Sciences, 2018, 207: 205-211.
[8] Chen Q, Shou P, Zhang L, et al. An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2014, 32(2): 327-337.
[9] Xu D, Gao Y, Hu N, et al. miR-365 Ameliorates Dexamethasone-Induced Suppression of Osteogenesis in MC3T3-E1 Cells by Targeting HDAC4 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(5): E977.
[10] 雒志恒. 葛根素、丹参酮ⅡA 分别联合 VitD3 对维甲酸诱导骨质疏松大鼠的治疗作用[D]. 汉中: 陕西理工大学, 2018.
[11] Chen Z, Xue J, Shen T, et al. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis by protecting osteoblasts from apoptosis in vivo and in vitro [J]. Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology, 2016, 43(2): 268-276.
[12] 乔伟伟, 许兰文. 低蛋白低钙饲料对大鼠骨骼的影响[J]. 实验动物与比较医学, 1998, 3: 173-175.
[13] 刘和娣, 李恩, 佟晓旭, 等. 钙剂对实验性骨质疏松大鼠多指标的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 1997, 13(3): 61-63.
[14] Yuasa M, Yamada T, Taniyama T, et al. Dexamethasone Enhances Osteogenic Differentiation of Bone Marrow- and Muscle-Derived Stromal Cells and Augments Ectopic Bone Formation Induced by Bone Morphogenetic Protein-2[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0116462.
[15] Hu H, Li ZH, Lu M, et al. Osteoactivin inhibits dexamethasone-induced osteoporosis through up-regulating integrin $\beta 1$ and activate ERK pathway [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 105: 66-72.
[16] Florine EM, Miller RE, Porter RM, et al. Effects of dexamethasone on mesenchymal stromal cell chondrogenesis and aggrecanase activity: comparison of agarose and self-assembling peptide scaffolds. Cartilage, 2013, 4(1): 63-74.
[17] Bitto A, Polito F, Burnett B, et al. Protective effect of genistein aglycone on the development of osteonecrosis of the femoral head and secondary osteoporosis induced by methylprednisolone in rats [J]. J Endocrinol, 2009, 201(3): 321-328.

- Bone, 2007, 41(3):393-399.
- [12] Matsuzaki M, Pant R, Kulkarni B, et al. Comparison of bone mineral density between urban and rural areas: Systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0132239.
- [13] Myong JP, Kim HR, Choi SE, et al. The effect of socioeconomic position on bone health among Koreans by gender and menopausal status[J]. Calcif Tissue Int, 2012, 90(6):488-495.
- [14] Navarro MC, Sosa M, Saavedra P, et al. Poverty is a risk factor for osteoporotic fractures [J]. Osteoporos Int, 2009, 20(3):393-398.
- [15] Wu XP, Liao EY, Dai RC, et al. Comparison of spine and femur reference data in native Chinese women from different regions of China[J]. Osteoporos Int, 2005, 16(10):1215-1224.
- [16] Zhang ZQ, Ho SC, Chen ZQ, et al. Reference values of bone mineral density and prevalence of osteoporosis in Chinese adults [J]. Osteoporos Int, 2014, 25(2):497-507.
- [17] Cheng XG, Yang DZ, Zhou Q, et al. Age-related bone mineral density, bone loss rate, prevalence of osteoporosis, and reference database of women at multiple centers in China [J]. J Clin Densitom, 2007, 10(3):276-284.
- [18] Kelly TL. Study protocol QDR reference databases[Z]. Hologic, Inc., Bedford, MA, 1992.
- [19] 程晓光,杨定焯,周琦,等. 中国女性的年龄相关骨密度、骨丢失率、骨质疏松发生率及参考数据库—多中心合作项目 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(4):221-228.
- [20] Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis[J]. J Bone Miner Res, 1994, 9(8):1137-1141.
- [21] Liao EY, Wu XP, Liao HJ, et al. Effects of skeletal size of the lumbar spine on areal bone density, volumetric bone density, and the diagnosis of osteoporosis in postmenopausal women in China [J]. J Bone Miner Metab, 2004, 22(3):270-277.
- [22] Wu XP, Liao EY, Liu SP, et al. Relationship of body surface area with bone density and its risk of osteoporosis at various skeletal regions in women of mainland China [J]. Osteoporos Int, 2004, 15(9):751-759.
- [23] Ross PD, He Y, Yates AJ, et al. Body size accounts for most differences in bone density between Asian and Caucasian women [J]. Calcif Tissue Int, 1996, 59(5):339-343.
- [24] Varenna M, Binelli L, Zucchi F, et al. Prevalence of osteoporosis and fractures in a migrant population from southern to northern Italy: a cross-sectional, comparative study [J]. Osteoporos Int, 2003, 14(9):734-740.
- (收稿日期: 2018-08-31;修回日期: 2018-10-08)

(上接第 1397 页)

- [18] Kumaki D, Nakamura Y, Sakai N, et al. Efficacy of denosumab for glucocorticoid-induced osteoporosis in an adolescent patient with duchenne muscular dystrophy: a case report[J]. JBJS Case Connector, 2018, 8(2):e22.
- [19] De Salvo KB, Olson R, Casavale KO. Dietary guidelines for Americans[J]. JAMA, 2016, 315(5):457-458.
- [20] Palacios C, Martin BR, McCabe GP, et al. Dietary calcium requirements do not differ between Mexican-American boys and girls[J]. Journal of Nutrition, 2014, 144(8):1167-1173.
- [21] Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, et al. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures[J]. Bone & Mineral, 1992, 17(102, Pt 2):341-351.
- (收稿日期: 2018-09-28;修回日期: 2018-10-17)