

· 论 著 ·

链脲佐菌素诱导 SD 大鼠 1 型糖尿病性骨质疏松模型的建立

何佳^{1,2} 祁珊珊^{1,2*} 郑红星² 江海² 陈琛²

1. 陕西理工大学维生素 D 生理与应用研究所, 陕西 汉中 723000

2. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000

中图分类号: R578.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 12-1716-05

摘要: 目的 通过链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导建立 1 型糖尿病性骨质疏松(diabetic osteoporosis, DOP)SD 大鼠动物模型。方法 20 只健康雌性 SD 大鼠,随机分为正常组和模型组,每组 10 只。模型组采用单次左下空腹腹腔注射法,注射 STZ 60 mg/kg 建立 1 型 DOP 动物模型。实验期间观察并记录大鼠行为学、体质量、饮水量、进食量变化,检测随机血糖。造模 8 周后处死大鼠,收集血清检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活力,采集胰腺组织和股骨组织进行组织病理学观察,并对股骨组织进行形态计量学测定。结果 模型组大鼠与正常组相比,血糖显著升高($P < 0.01$),进食量与饮水量亦明显升高,而体质量显著降低,胰岛细胞形状不规则、边界模糊、体积缩小,股骨骨小梁变得稀疏,出现不同程度的断层,骨小梁厚度、骨小梁面积百分率显著降低($P < 0.05$),骨小梁间距显著增加($P < 0.05$),血清中 ALP 活力极显著上升($P < 0.01$)。该模型符合 1 型 DOP 成模动物诊断标准。结论 腹腔一次性快速注射 STZ 60 mg/kg 8 周后可成功构建 1 型 DOP 动物模型。

关键词: 糖尿病性骨质疏松;链脲佐菌素;动物模型;骨形态

Establishment of type 1 diabetic osteoporosis model induced by streptozotocin in SD rats

HE Jia^{1,2}, QI Shanshan^{1,2*}, ZHENG Hongxing², JIANG Hai², CHEN Chen²

1. Vitamin D Research Institute, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China

2. School of Biological Science & Department of Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China

* Corresponding author: QI Shanshan, Email: qishanshan101@126.com

Abstract: **Objective** To establish an animal model of type 1 diabetic osteoporosis (DOP) in SD rats by streptozotocin (STZ). **Methods** Twenty healthy female SD rats were randomly divided into normal group and model group, with 10 rats in each group. The model group was treated with fasting intraperitoneal injection and a single left lower abdominal cavity injection of STZ (60 mg/kg) to establish a type 1 DOP animal model. Rat behavior, body mass, water intake, and food intake were observed and recorded during the test. Random blood glucose was detected. After 8 weeks of modeling, the rats were sacrificed. The serum was collected for ALP activity examination. The pancreatic tissue and the femur were collected for histopathological examination. The femoral tissue morphology was measured and analyzed. **Results** The blood glucose of the model group was significantly higher than that of the normal group ($P < 0.01$). The food intake and water drinking increased significantly, and the body weight decreased significantly. The shape of islet cells was irregular, the boundary was blurred, and the volume was reduced. The trabecular bone of the femur became sparse, and there were different degrees of faults. The thickness of trabecular bone and the area of trabecular bone decreased significantly ($P < 0.05$), but the trabecular bone spacing increased significantly ($P < 0.05$). The serum ALP activity increased significantly ($P < 0.01$). This model meets the diagnostic criteria for type 1 diabetic osteoporosis animal model. **Conclusion** The animal model of type 1 DOP can be successfully constructed with one-time rapid injection of 60 mg/kg of STZ in the abdominal cavity after 8 weeks.

Key words: diabetic osteoporosis; streptozotocin; animal model; bone morphology

基金项目: 陕西理工大学博士后项目(SLGBH16-03);陕西省教育厅项目(19JC012);陕西省科技厅农业攻关项目(2017NY-082)

* 通信作者: 祁珊珊, Email: qishanshan101@126.com

糖尿病性骨质疏松(diabetic osteoporosis, DOP)是一种以高血糖为特征的代谢异常性疾病引起的继发性骨质疏松症^[1]。其发病机制可能与胰岛素相

对不足或缺乏、血糖升高导致钙稳态失衡^[2]、持续性高血糖引起氧化应激反应增加^[3]及雌激素水平下降等因素有关,这些因素直接或间接影响骨的形成和转换,造成患者骨骼质量降低和骨微结构损伤,导致 DOP 的发生。

随着全球经济的高速发展,不健康的生活方式如高热量饮食和运动不足,加速了糖尿病的蔓延。2017 年,全球约有 4.5 亿(18~99 岁)糖尿病患者,据 IDF 预测,2045 年糖尿病患者人数将增加至 6.93 亿,由糖尿病导致的骨质疏松发病率也随之升高^[4]。DOP 不仅给患者带来烦渴、多食、夜尿症等困扰,还易引起骨骼疼痛以及骨折等危害发生,严重影响患者的生活质量,给患者家庭及社会带来沉重的经济负担。因此进一步建立稳定有效的 DOP 疾病动物模型是寻找治疗 DOP 新药的重要保证。

本实验选取 SD 大鼠作为实验动物,采用一次性左下腹腔快速注射 STZ 的方法,构建 1 型 DOP 动物模型,通过血糖检测、胰腺病理形态学观察、股骨干骺端组织病理形态学观察以及骨组织形态计量学参数测定,探讨糖尿病对骨组织形态的影响,为 DOP 的发病机制研究和药物治疗提供简便可靠的实验动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料

选取 20 只 8 周龄健康 SPF 级雌性 SD 大鼠,体重(230±10)g,由成都达硕实验动物有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(川)2015-030。大鼠随机分笼,自由饮水,标准饲料喂养,并保持饲养室通风良好、环境清洁、光照充足、湿度适宜。实验仪器和试剂:三诺 GA-3 型血糖仪及配套血糖试纸(三诺生物传感股份有限公司);VME2 型小动物麻醉机(美国 MATRX 公司);YLS-16 A 型小动物骨骼测定仪(上海欣软信息科技有限公司);RM23335CWEU 型石蜡组织切片机(德国 Leica 公司);DM3000 显微镜(德国 Leica 公司);STZ(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);ALP 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病性骨质疏松模型建立:SPF 级健康雌性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为正常组和模型组,每组 10 只。大鼠禁食(不禁水)12 h,模型组一次性左下腹腔注射 STZ 60 mg/kg(STZ 用预冷的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液以 2% 浓度溶解)建立 1

型糖尿病动物模型,正常组给予等体重剂量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。造模 72 h 后,于大鼠尾静脉取血,使用血糖仪及配套血糖试纸进行随机血糖检测。当血糖 ≥ 16.7 mmol/L,并出现多饮多食多尿症状时,符合糖尿病诊断标准,判定为糖尿病大鼠。造模成功后,每日观察大鼠状态变化,记录其进食量和饮水量,每周测量体重,每 2 周测定血糖一次。

1.2.2 标本采集:血清标本:造模成功 8 周后,采用 CO₂ 法处死大鼠,采集血液,离心后收集血清,-80℃ 冰箱冻存备用;胰腺组织取样:造模成功 8 周动物取血后,采集大鼠胰腺置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h;骨组织标本:胰腺采集完成后,分离大鼠肱骨和左下股骨组织进行相应处理。

1.2.3 骨强度测定:实验采集的肱骨,剔除周边软组织,使用动物骨骼测定仪测定肱骨骨强度。

1.2.4 胰腺病理形态学观察:固定后的胰腺组织经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋等步骤后,制成厚度为 5 μ m 的组织切片,切片经脱蜡、浸水、苏木素-伊红染色、脱水、透明、封片等常规操作后,进行组织病理学形态观察。

1.2.5 股骨病理形态学检测:固定的大鼠左下股骨组织,于 10% 乙二胺四乙酸溶液中脱钙 4 周,随后经组织包埋流程制成 5 μ m 厚的病理切片,切片染色流程与胰腺组织相同。在光学显微镜下进行股骨组织病理学形态观察,并使用尼康拍照系统进行图像采集。应用 Image-Pro Plus 显微测量系统分别对总组织面积(T.Ar)、骨小梁面积(Tb.Ar)及骨小梁周长(Tb.Pm)进行形态学测量,并根据校正公式计算骨小梁面积百分率(% Tb.Ar)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁间距(Tb.Sp)^[5]。

1.2.6 血清 ALP 含量测定:按 ALP 试剂盒说明书,采用磷酸苯二钠法测定法检测大鼠血清 ALP 活力。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 对实验所得数据进行方差分析及差异显著性检验,结果均用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 时,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠外观变化

实验期间正常组大鼠精神状态较好,反应灵敏,毛发光亮整洁。与正常组相比,模型组精神萎靡,行动迟缓,毛色发黄,失去光泽,体形消瘦,弓背严重。

2.2 大鼠血糖变化

实验期间,正常组大鼠随机血糖平稳。与正常

组相比,模型组大鼠随机血糖于造模 72 h 后显著升高($P<0.01$),并在后续饲养中血糖一直维持在 26 mmol/L 以上的稳定状态。见图 1。

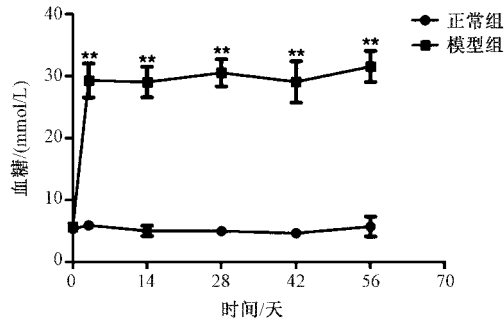


图 1 大鼠不同时间血糖变化曲线(与正常组比较,** $P<0.01$)

Fig.1 Blood glucose curve of rats at different times

表 1 不同时间各组大鼠体重、进食量、饮水量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of changes in body weight, food intake, and drinking water in rats between each group($\bar{x}\pm s$)

时间/周	体重/g		进食量/g		饮水量/mL	
	正常组	模型组	正常组	模型组	正常组	模型组
0	235.46 $\pm$ 11.92	230.55 $\pm$ 8.86	18.61 $\pm$ 2.11	18.39 $\pm$ 0.78	33.33 $\pm$ 2.00	27.41 $\pm$ 1.95
1	252.24 $\pm$ 12.98	210.81 $\pm$ 9.11	18.65 $\pm$ 2.07	25.07 $\pm$ 3.23	32.22 $\pm$ 9.85	137.60 $\pm$ 8.02
2	262.09 $\pm$ 31.90	209.72 $\pm$ 17.91	18.20 $\pm$ 2.78	34.36 $\pm$ 6.34	23.56 $\pm$ 3.45	182.44 $\pm$ 16.95 *
3	273.94 $\pm$ 25.50	235.28 $\pm$ 13.15 *	19.75 $\pm$ 2.63	37.60 $\pm$ 2.32	23.47 $\pm$ 6.47	187.03 $\pm$ 18.14 *
4	289.43 $\pm$ 29.32	246.63 $\pm$ 16.03	17.87 $\pm$ 3.74	39.08 $\pm$ 4.37	28.70 $\pm$ 4.63	200.28 $\pm$ 19.33 **
5	300.13 $\pm$ 29.89	244.38 $\pm$ 24.57 *	19.57 $\pm$ 0.46	44.64 $\pm$ 0.49	32.00 $\pm$ 4.04	221.00 $\pm$ 24.96 **
6	308.78 $\pm$ 30.95	257.41 $\pm$ 17.76	19.27 $\pm$ 1.21	40.19 $\pm$ 2.08	31.11 $\pm$ 3.14	214.79 $\pm$ 32.20 **
7	317.88 $\pm$ 29.30	255.85 $\pm$ 14.83 *	17.43 $\pm$ 1.76	39.33 $\pm$ 2.04	29.26 $\pm$ 3.35	190.00 $\pm$ 16.53 **
8	322.07 $\pm$ 32.36	255.93 $\pm$ 15.00 *	18.09 $\pm$ 1.77	42.00 $\pm$ 3.45	27.41 $\pm$ 3.27	195.52 $\pm$ 12.33 **

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

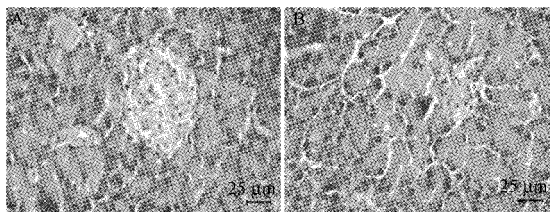


图 2 大鼠胰腺组织结构(HE 染色)A:正常组胰腺组织(400 $\times$);B:模型组胰腺组织(400 $\times$)。

Fig.2 Structure of the pancreatic tissue of each group (HE staining)

2.5 骨强度变化

与正常组相比,注射 STZ 8 周后,模型组大鼠骨骼强度有所下降($P>0.05$),见图 3。

2.6 股骨干骺端组织病理形态学观察

在光镜下观察股骨组织形态结构,结果显示正常组的骨小梁形态结构相对完整,骨小梁较密集,互相连接成网状,骨髓腔清晰,形状规整;而模型组中

2.3 大鼠体重、进食量和饮水量变化

正常组在实验期间进食量和饮水量平稳,体重持续增加。对比发现,模型组的进食量、饮水量、尿量在造模前与正常组相比无显著性差异($P>0.05$);在注射 STZ 后,模型组大鼠摄食量与饮水量大幅度升高,对比鼠笼垫料干湿度发现,模型组排尿量亦明显增多,呈现出糖尿病的典型症状,而体重随生长周期增长缓慢,明显低于正常对照组,见表 1。

2.4 胰脏病理组织学变化

在 40 $\times$ 10 倍镜下观察胰腺组织形态,可以看出正常组胰岛细胞分布较多,形状规则,界限清晰,呈现类圆形,胞浆丰富。模型组与正常组相比胰岛细胞数目明显减少,形状不规则,边界模糊,体积缩小。见图 2。

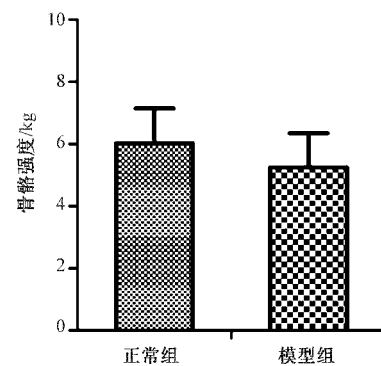


图 3 大鼠骨骼强度

Fig.3 Bone strength of the rats

骨小梁形态结构完整性较差,骨小梁变得稀疏,出现不同程度的断层,骨髓腔明显增大,形状不规则,见图 4。

2.7 骨组织形态计量学参数测定结果

股骨形态计量学测量结果如表 2 所示,与正常

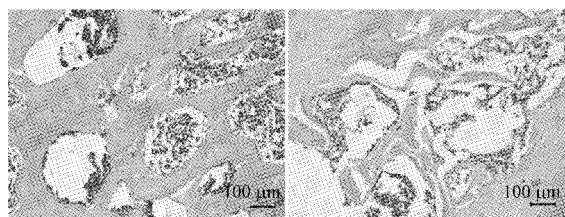


图 4 各组大鼠股骨组织结构(HE 染色)A:正常组股骨组织(100×);B:模型组股骨组织(100×)。

Fig.4 Structure of the femur in each group (HE staining)

组相比,模型组 Tb.Th 和 % Tb.Ar 显著降低 ($P < 0.05$),而 Tb.Sp 显著增加 ($P < 0.05$)。这些结果显示 STZ 诱导的高血糖代谢异常性疾病可引起股骨微结构受损。

表 2 各组大鼠股骨干骺端形态计量学参数比较

Table 2 Comparison of morphometric parameters of femoral metaphysis between each group

组别	Tb.Th/ μm	Tb.Sp/ μm	Tb.Ar/%
正常对照组	81.18 $\pm$ 18.69	135.47 $\pm$ 38.20	48.70 $\pm$ 4.89
模型组	50.80 $\pm$ 14.60*	182.96 $\pm$ 29.87*	28.72 $\pm$ 9.41*

注:与正常组比较,* $P < 0.05$ 。

2.8 血清 ALP 检测结果

模型组血清 ALP 活力与正常组相比较显著升高 ($P < 0.01$),见图 5。

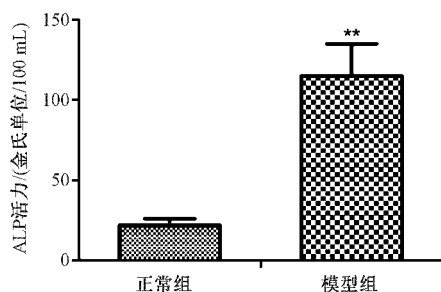


图 5 大鼠血清 ALP 活力(与正常组比较,** $P < 0.01$)

Fig.5 Serum ALP activity of the rats

3 讨论

DOP 被认为是糖尿病在骨骼系统的慢性并发症,其发病率在糖尿病患者中高达 40%~60%^[6-7],随着近年来全球糖尿病患者不断增加,其已成为越来越多科研者研究的热点。为了研究 DOP 的发病机制,寻找治疗 DOP 的安全有效药物,必须提供一种类似于人类 DOP 发病过程的简便可靠的实验动物模型。目前,建立糖尿病实验性动物模型的方法有 STZ 诱导、四氧嘧啶诱导、胰腺切除、

胰腺切除加诱导联用等方法^[8-9]。其中,STZ 诱导法成模率高、重复性强、毒性相对较少,操作简便,且病理改变与临床较为相似,是复制糖尿病大鼠模型的首选方法。

STZ 是一种从链霉菌中提取的抗生素,可特异性破坏胰岛 β 细胞,引发胰岛的自身免疫性炎症损伤和凋亡,胰岛 β 细胞受损导致胰岛素分泌迅速减少而血糖大幅度升高,出现糖尿病的表现^[10]。有研究报道,如果一次大剂量注射 STZ,则直接损伤胰岛细胞,倾向于 1 型糖尿病的表现特点^[11]。因此本次实验采用一次性快速注射 60 mg/kg STZ 的方法建立 1 型 DOP 模型,实验期间对各项指标的稳定性进行检测,实验 8 周后通过胰腺组织的病理学观察比较发现,模型组较正常组胰岛细胞数目明显减少,形状不规则,边界模糊,体积缩小;且模型组随机血糖于注射 STZ 72 h 后极显著上升 ($P < 0.01$),并在后续饲养中血糖一直维持在较高水平,稳定性良好;模型组进食量和饮水量与正常组相比大幅度升高,排尿量亦明显增多,而体重随生长周期增长缓慢,明显低于正常组。实验结果表明,采用一次性大剂量 STZ 注射的方法建立大鼠模型出现高血糖、多食、多饮、多尿等症状,符合的糖尿病的病理生理改变,该结果与文献报道一致。

胰岛素缺乏,可能会影响成骨细胞表面的胰岛素受体与之结合,不利于成骨细胞对胶原的合成,从而打破破骨细胞骨质吸收和成骨细胞骨形成的动态平衡,引起骨代谢异常^[12]。再者,长期高血糖引发渗透性利尿,尿液中 Ca、Mg、P 排泄增加,高血糖阻滞肾小管对 Ca、Mg、P 的重吸收,加重骨盐流失^[12]。本实验选择与人类骨骼的病理生理相似的 8 周龄骨成熟 SD 大鼠进行模型构建,实验发现,注射 STZ 8 周后,模型组骨骼强度有所下降,通过病理形态学观察发现模型组骨小梁形态结构完整性较差,骨小梁变得稀疏,出现不同程度的断层,骨髓腔明显增大,形状不规则。骨形态计量学结果发现,模型组 Tb.Th 和 % Tb.Ar 与正常组相比显著降低 ($P < 0.05$),Tb.Sp 明显增加 ($P < 0.05$)。建模 8 周后,模型组血清 ALP 水平极显著升高 ($P < 0.01$),这可能是破骨细胞与成骨细胞功能活性明显增加导致骨转换率增高,并伴随骨吸收亢进而出现的代偿性骨形成增强所致。这些结果显示 STZ 诱导的高血糖代谢异常性疾病可影响骨代谢,进而影响骨的形成和转换,引起股骨微结构受损,呈现出典型的骨质疏松状态。

综上所述,本次实验选用 8 周龄骨成熟 SD 大

鼠,采用空腹腹腔单次快速注射 STZ 60 mg/kg 的方法建立 1 型 DOP 模型。该模型出现高血糖、多饮、多食及骨强度下降,股骨形态学检查及计量结果呈骨微结构受损的特点,表明 DOP 模型构建成功。该模型的成功构建为 DOP 的发病机制研究和药物治疗提供了坚实的基础。

【参 考 文 献】

- [1] 苏力坦卡扎·仇曼,何铁英,林海,等.链脲佐菌素建立 1 型糖尿病大鼠模型的最优剂量研究[J].中国普外基础与临床杂志,2016,23(1):84-85.
 - [2] Chen XF, Li XL, Yang M, et al. Osteoprotective effects of salidroside in ovariectomized mice and diabetic mice[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 819:281-288.
 - [3] King GL, Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications[J]. Histochem Cell Biol, 2004, 122(4):333-338.
 - [4] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 138:271-281.
 - [5] Revell PA. Histomorphometry of bone[J]. J Clin Pathol, 1983, 36(12):1323-1331.
 - [6] 高照华,王璐,刘煜.内分泌代谢疾病相关性骨质疏松的研究进展[J].中国实验诊断学,2013,17(3):590-593.
 - [7] 徐园同,卢学超,解其华,等.绝经后 2 型糖尿病患者外周中性粒细胞/淋巴细胞比值与骨密度的关系[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(11):1464-1467.
 - [8] 张贤梅,江波,孙勤国.糖尿病实验动物模型的研究进展[J].中西医结合研究,2017,9(2):101-104.
 - [9] 蒋云霞,李双蕾,陈文辉. 2 型糖尿病性骨质疏松动物模型建立[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015,21(7):894-898.
 - [10] 马泽立.雷公藤对 STZ 诱导的 1 型糖尿病小鼠的疗效研究[D].2016.
 - [11] Wilkinson-Berka JL, Kelly DJ, Koerner SM, et al. ALT-946 and aminoguanidine, inhibitors of advanced glycation, improve severe nephropathy in the diabetic transgenic (mREN-2) 27 rat[J]. Diabetes, 2002, 51(11):3283-3289.
 - [12] 孙琳.糖尿病与骨质疏松研究进展[J].医学综述,2003,9(1):51-52.
- (收稿日期:2018-12-26;修回日期:2019-01-15)
-
- (上接第 1684 页)
- [4] Gao J, Zhang QD, Zhang X, et al. Establishment and evaluation of disuse osteoporosis animal model [J]. Guangdong Medical Journal, 2012, 33(18):2728-2731.
 - [5] Ding ZQ, Zhang XG, Sha M. The research on prevention of disuse osteoporosis with stimulator of bone stress[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2010, 16(2):120-124, 119.
 - [6] Li FF, Ding Y, Chen FL, et al. The preliminary study of mechanical strain on proliferation and differentiation of saos-2 osteoblastic cells[J]. Journal of Oral Science Research, 2012, 28(6):7-12.
 - [7] 朱生根.不同干预方式对失神经大鼠股骨生物力学的影响[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(1):59-62.
 - [8] 杨锋,杨利学,李小群,等.左归丸、右归丸对去卵巢骨质疏松大鼠神经肽 CGRP、SP、VIP、NPY 的影响[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(6):761-765.
 - [9] Dirckx N, Van Hul M, Maes C. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2013, 99(3):170-191.
 - [10] Lee NJ, Nguyen AD, Enriquez RF, et al. Osteoblast specific Y1 receptor deletion enhances bone mass[J]. Bone, 2011, 48(3):461-467.
 - [11] 陈光华,黄贵芝,林颖,等.降钙素基因相关肽对维甲酸致老年骨质疏松大鼠 OPG/RANKL 信号通路的影响及疗效[J].中国老年学杂志,2015,35(19):5446-5448.
 - [12] 朱生根,苏利强,徐明.神经生长因子与被动运动对失神经大鼠骨代谢指标的影响[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(6):606-610.
 - [13] 白晓丽.站立训练对脊髓损伤患者骨质疏松预防的护理效果分析[C]. 第八届北京国际康复论坛,2013.
 - [14] Siris ES, Brenneman SK, Miller PD, et al. Predictive value of low BMD for 1-year fracture outcomes is similar for postmenopausal women ages 50-64 and 65 and older: results from the National Osteoporosis Risk Assessment (NORA) [J]. Bone Miner Res, 2004, 19:1215-1220.
 - [15] 孙小敏,朱生根.外源性神经生长因子对失神经大鼠股骨生物力学的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,42:8243-8246.
 - [16] Arkusz K, Klekiel T, Niezgoda N, et al. The influence of osteoporotic bone structures of the pelvic-hip complex on stress distribution under impact load[J]. Acta Bioeng Biomech, 2018, 20(1):29-38.
 - [17] Pogoda P, Priemel M, Rueger JM, et al. Bone remodeling: new aspects of a key process that controls skeletal maintenance and repair[J]. Osteoporos Int, 2005, 16: S18.
 - [18] Asgharzadeh Shirazi H, Ayatollahi MR, Asnafi A, et al. To reduce the maximum stress and the stress shielding effect around a dental implant-bone interface using radial functionally graded biomaterials [J]. Comput Methods Biomech Biomed Engin, 2017, 20(7):750-759.
- (收稿日期:2019-04-08;修回日期:2019-09-10)