

I型胶原N末端肽和定量CT骨密度早期测定实验性骨不连

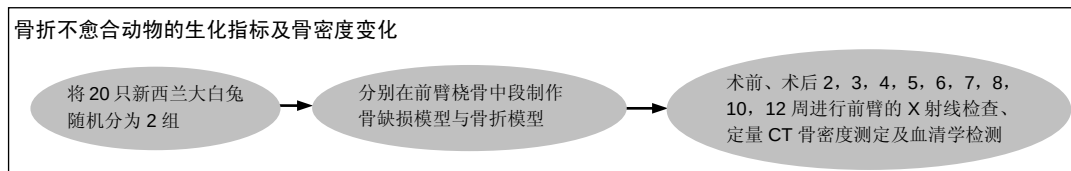
林坚平^{1,2}, 沈宁江¹, 史占军², 王健², 肖军², 吴多能¹, 张武¹ (¹海南省人民医院关节外科, 海南省海口市 570311; ²南方医科大学南方医院关节外科, 广东省广州市 510515)

引用本文: 林坚平, 沈宁江, 史占军, 王健, 肖军, 吴多能, 张武. I型胶原N末端肽和定量CT骨密度早期测定实验性骨不连[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(2):162-166.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.02.002

ORCID: 0000-0002-6059-6390(林坚平)

文章快速阅读:



林坚平, 男, 1971年生, 海南省儋州市人, 汉族, 在读博士, 布加勒斯特大学医院访问学者, 主任医师, 主要从事骨愈合, 生物骨, 人工关节研究。

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)02-00162-05

稿件接受: 2015-11-11

http://www.crter.org

文题释义:

定量CT测量法:利用CT的较高密度分辨率测量骨密度,以骨旁肌肉和脂肪组织做为内参考标准,去除了对外部体模的需求,去除了因人工制造的外部体模的非均一性及体模与被测体相对位置变化对测量结果的影响,改进了测量的准确度和精确性。

定量CT检测的优势:在测量骨密度的同时可以观测骨的微结构,包括骨容积率、骨表面积率、骨小梁厚度、骨小梁间隔、骨小梁长度、连接密度、结构模型参数等。

摘要

背景:目前主要通过传统的X射线诊断骨折不愈合,这种方法仅依赖于临床医师的经验和骨折愈合中骨痂的矿化程度,易受投照、冲洗条件及主观因素影响,精确度欠佳。

目的:建立骨折不愈合动物模型,检测其生化指标及骨密度变化规律。

方法:将20只新西兰大白兔随机均分为2组,分别在前臂桡骨中段制作骨缺损模型与骨折模型,分别于术前、术后2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12周进行前臂的X射线检查、定量CT骨密度测定及血清学检测。

结果与结论:X射线显示,骨缺损组中3只兔于术后第2周有少许骨痂形成,但5周后骨痂情况稳定,术后8周仍无愈合;骨折组术后2周开始骨折线模糊,术后6-8周骨痂大量生长。骨缺损组术后5周开始骨密度值明显下降,与骨折组比较差异显著。血清学检测显示,骨缺损组术后骨特异性碱性磷酸酶活性升高,第4周达到高峰,第5周时出现下降,第6周以后数值基本稳定;骨缺损组术后抗酒石酸酸性磷酸酶5b活性升高,在第4周出现峰值,然后下降,基本稳定;骨缺损组I型胶原N末端肽在术后5周出现明显下降,术后6周以后基本稳定。说明系统性监测骨密度及生化指标如骨特异性碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶5b和I型胶原N末端肽的变化可能有助于反映兔骨折不愈合早期进程。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 骨不连; 生物标志物; 抗酒石酸酸性磷酸酶5b; I型胶原N末端肽; 骨特异性碱性磷酸酶; ELISA; 海南省自然科学基金

主题词:

模型, 动物; 碱性磷酸酶; 骨密度; 组织工程

基金资助:

海南省自然科学基金资助课题(808212)

Lin Jian-ping^{1,2}, Shen Ning-jiang¹, Shi Zhan-jun², Wang Jian², Xiao Jun², Wu Duo-neng¹, Zhang Wu¹ (¹Department of Joint Surgery, Hainan General Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China; ²Department of Joint Surgery, Nanfang Hospital of South Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China)

Early diagnosis of experimental bone nonunion: measurement of N-terminal telopeptide of type I collagen and quantitative CT determination of bone mineral density

Abstract

BACKGROUND: Currently, X-ray examination is mainly used for diagnosis of nonunion. However, this method that relies only on the clinician's experience and degree of callus mineralization has less accuracy because it is vulnerable to projection, processing conditions and subjective factors.

OBJECTIVE: To establish an animal model of nonunion and to detect the variation of biochemical markers and bone mineral density.

METHODS: Twenty New Zealand white rabbits were randomly divided into two groups, and bone defect and fracture models were made in the midshaft of the forearm radius, respectively. X-ray examination of the forearm, quantitative CT measurement of bone mineral density and serological test were carried out before and at 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 weeks after surgery.

Lin Jian-ping, Studying for doctorate, Chief physician, Department of Joint Surgery, Hainan General Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China; Department of Joint Surgery, Nanfang Hospital of South Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Subject headings: Models, Animal; Alkaline Phosphatase; Bone Density; Tissue Engineering
Funding: the Natural Science Foundation of Hainan Province, No. 808212

RESULTS AND CONCLUSION: Postoperative X-ray films showed that the in the bone defect group, a little callus formed in three rabbits at 2 weeks, the callus formed stably at 5 weeks, but there was still no healing at 8 weeks; in the fracture group, the fracture line was blurred at 2 weeks and a large number of calluses formed at 6–8 weeks. Compared with the fracture group, the value of bone mineral density in the bone defect group began to decrease significantly at 5 weeks after surgery. Results from the serological test showed that in the bone defect group, the activity of bone-specific alkaline phosphatase increased after surgery, reached peak at 4 weeks, began to decrease at 5 weeks and became stable at 6 weeks; the activity of tartrate-resistant acid phosphatase 5b increased after surgery, peaked at 4 weeks, then decreased and stabilized basically; the expression of N-terminal telopeptide of type I collagen decreased significantly at 5 weeks after surgery and became stable at 6 weeks. These findings indicate that the systematic monitoring of changes in bone mineral density and biochemical indicators such as bone-specific alkaline phosphatase, tartrate-resistant acid phosphatase 5b and type I collagen N-terminal telopeptides may help to reflect the early progress of rabbit nonunion.

Cite this article: Lin JP, Shen NJ, Shi ZJ, Wang J, Xiao J, Wu DN, Zhang W. Early diagnosis of experimental bone nonunion: measurement of N-terminal telopeptide of type I collagen and quantitative CT determination of bone mineral density. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(2):162-166.

0 引言 Introduction

骨折不愈合的诊治研究一直是骨科学长盛不衰的研究课题,然而当前其诊断和随访仍主要由传统的X射线来完成,这种方法仅仅依赖于临床医师的经验和骨折愈合中骨痂的矿化程度,易受投照、冲洗条件及主观因素影响,精确度欠佳,如果骨盐含量变化低于25%,X射线就失去了分辨的价值,所以探索新的监测骨愈合过程可行性方法势在必行。关于B超、振动响应、机械阻抗分析及人工神经网络对骨整体功能、力学状态和变化的影响已有广泛的研究^[1-3],但生物因子联合定量CT骨密度测定监测骨折愈合的资料目前在国内外少见报道。骨代谢异常先于形态学变化,生物标志物测量骨量变化时间应该早于骨密度监测。为了丰富骨折愈合诊断标准在分子生物学水平上的具体内容,解决其早期诊断和预测,进一步对促骨生长药物的疗效评定提供客观依据,本实验借助于骨折不愈合时骨转换平衡破坏学说,通过骨吸收-形成偶联与胶原代谢、生长因子、血管介导及成骨细胞的关系,选择反映骨转换的特异标志物并检测其在骨折愈合过程中不同时期的浓度,与形态学标准(X射线)和定量CT骨密度测定相比较,动态观察和探讨两者的相关性,希望由此发现某些特定生物因子是骨折愈合或不愈合的标志物。本实验参考相关文献^[4-6],建立骨折不愈合的动物(兔)模型,术后进行X射线、定量CT骨密度测定和生物标志物定期监测,探讨生物标志物和定量CT骨密度测定在早期诊断骨不愈合的临床价值,发现实验性骨折不愈合的早期生物标志物变化规律。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 造模动物及材料

实验动物及处理: 选取五六月龄纯种新西兰大白兔20只,雌雄各半,体质量2.5–3.0 kg,由海南省人民医院实验动物中心提供。将20只兔随机均分为2组,骨缺损组在前臂桡骨中段截除1.5 cm(包括骨膜),骨断端用骨蜡封闭髓腔;骨折组只是在前臂桡骨中段造成骨折,不行内固定,术后兔放入笼中,单兔单笼,自由活动。遵照国际实验动物伦理和管理条例对实验动物进行研究。

检测仪器: 消毒游标卡尺, X射线机。

实验用药品: 动物用阿莫西林粉剂, 3%戊巴比妥钠, 氯胺酮, 络合碘, 石灰水。

1.2 造模方法 将实验兔采用体积分数3%戊巴比妥钠以20 mg/kg耳缘静脉注射,以及氯胺酮以50 mg/kg肌肉注射麻醉,麻醉成功后,将兔固定于手术台后,均取兔右侧前肢,剪去兔毛,络合碘消毒术区,铺无菌孔巾,取前肢桡骨中段之纵形皮肤切口,长2.5–3.0 cm。逐层切开后,显露桡骨中段,骨缺损组切除骨膜,以桡骨中段处曲度最大处为标点向桡骨中远段骨干处以锋利小骨刀截取15 mm桡骨干,以游标卡尺量长,长度误差控制在0.1 mm,以小咬骨钳修整断端使其尽量平整,同时尽量使截取部位均位于桡骨中远段,骨断端用骨蜡封闭髓腔;骨折组只是在前臂桡骨中段造成骨折(锋利骨刀凿断)。两组均不固定骨折部位,1号丝线分别缝合皮肤、皮下,术后络合碘消毒切口皮肤2次/d,术后12 d拆线。术后给予阿莫西林1周。

1.3 造模成功的检测标准 术后通过X射线检查判定骨缺损与骨折造模成功。

1.4 标本采集与处理 两组分别于术前、术后2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12周进行前臂的放射学检查(摄X射线片,观察桡骨缺损区愈合情况)、定量CT骨密度测定,以及抽取2 mL血清存于–80 °C。

1.5 主要观察指标及评价方法

定量CT骨密度测定: CT使用美国GE Hispeed NX/1 PROCT及ADW4.2后处理工作站,扫描参数120 kV、80 mA、矩阵512×512,准直宽度64 mm×0.625 mm扫描一层,扫描数据重组为层厚10 mm、间隔10 mm的横断面图像。

图像后处理及原理: 在GE ADW4.2工作站,测量缺损处和健侧兔子的每立方厘米的矿物质含量的平均质即X质,算出T质(正常组织的峰质)和Z质(同正常组织的对比质)。原理:每立方厘米的矿物质含量的差异来判断(以mg/cm³表示)。

骨形成特异标志物检测: 采用生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法检测骨特异性碱性磷酸酶及骨吸收特异标志物包括I型胶原N末端肽、抗酒石酸酸性磷酸酶5b)。

检测方法: 以检测I型胶原N末端肽为例,向预先包埋

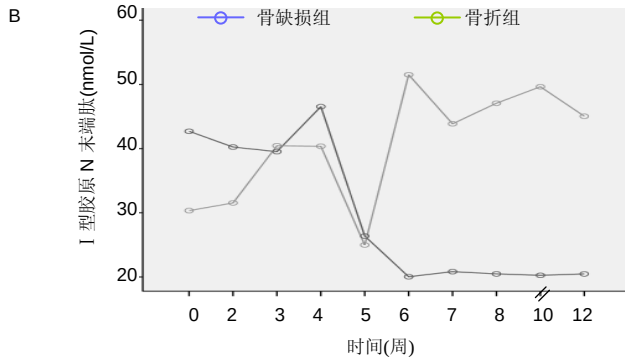
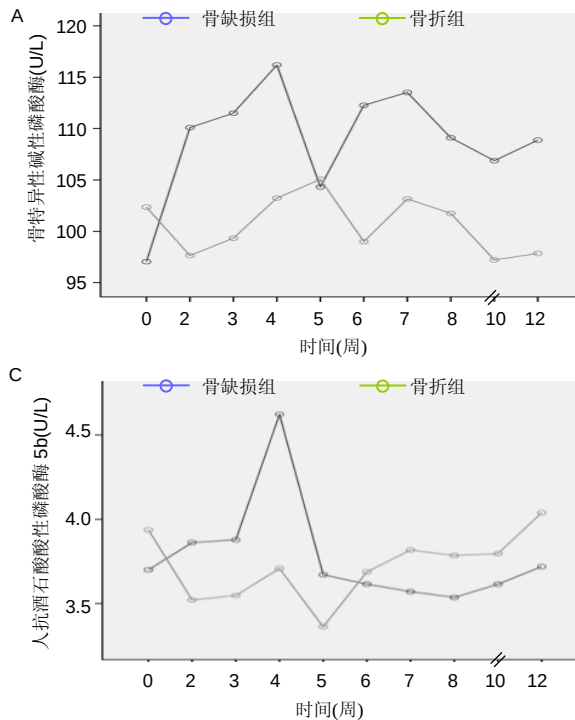


图2 骨缺损组与骨折组手术前后的血清学检测结果

Figure 2 Results of postoperative serological test in the bone defect and fracture groups

图注: 图中 A-C 分别为骨特异性碱性磷酸酶、I 型胶原 N 末端肽、人抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 的检测结果。



图1 骨缺损组与骨折组术后 X 射线观察

Figure 1 Postoperative X-ray observation of the bone defect and fracture groups

图注: 图中 A 为骨缺损组, 术后 8 周未见愈合; B 为骨折组, 术后 8 周骨痂大量生长。

了 I 型胶原 N 末端肽单克隆抗体的酶标孔中加入 I 型胶原 N 末端肽, 温育; 温育后, 加入生物素标记的抗 I 型胶原氨基末端肽抗体, 再与链霉亲和素-HRP 结合, 形成免疫复合物, 再经过温育和洗涤, 去除未结合的酶, 然后加入底物 A、B, 产生蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅与样品中 I 型胶原 N 末端肽的浓度呈正相关。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料都采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用重复测量方差分析、单因素方差分析, 组间基线不一致时采用协方差分析, 得出均数估计。组间效应比较、组内(重复)效应及交互效应比较, 以及组间多重比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 造模成功动物数量 骨缺损组和骨折组 20 只兔均造模成功, 全部进入结果分析。

图3 骨缺损组与骨折组手术前后的定量 CT 骨密度测定结果

Figure 3 Quantitative CT measurement of bone mineral density in the bone defect and fracture groups before and after surgery

图注: 骨缺损组骨密度值在术后 5 周开始出现明显下降, 与同时间骨折组、术前对照值比较差异均有显著性意义, 术后 6 周以后测得的骨密度值总体差异不大。

2.2 模型稳定性 实验通过术后 X 射线检测证实 15 mm 长度骨缺损组骨缺损端均为纤维组织连接, 骨断端髓腔封闭。实验兔骨折愈合时间一般为 6 周, 12 周未愈合视为骨不连, 本实验观察时间达术后 12 周, 15 mm 长度骨缺损组均未愈合, 确定骨不连模型制作成功。模型比较稳定, 易于操作和重复。

2.3 X 射线检查结果 骨缺损组中 3 只兔于术后第 2 周有少许骨痂形成, 但 5 周后骨痂情况稳定, 术后 8 周仍未愈合; 骨折组术后 2 周开始骨折线模糊, 术后 6-8 周骨痂大量生长(图 1)。

2.4 血清生物标志物测定结果 两组间的总体骨特异性碱性磷酸酶、I 型胶原 N 末端肽水平比较差异有显著性意义(I 型胶原 N 末端肽, $F=187.512$, $P < 0.001$; 骨特异性碱性磷酸酶, $F=16.051$, $P=0.001$)。骨缺损组术后骨特异性碱性磷酸酶活性升高, 第 4 周达到高峰, 第 5 周时出现下降, 第 6 周以后数值基本稳定(图 2A); 骨缺损组 I 型胶原 N

末端肽在术后5周开始出现明显下降, 术后5周与术前、术后各个时间比较差异均有显著性意义, 术后7周、8周、10周、12周均与术后3周、4周、5周比较差异有显著性意义, 术后6周以后 I 型胶原 N 末端肽水平基本稳定, 与骨折组术后6-12周对应时间点比较差异有显著性意义(图2B); 骨缺损组术后抗酒石酸酸性磷酸酶5b活性升高, 在第4周出现明显的峰值, 然后下降, 基本稳定(图2C)。

2.5 定量CT骨密度测定 骨缺损组骨密度值在术后5周开始出现明显下降, 与同时间骨折组、术前对照值比较差异均有显著性意义, 术后6周以后测得的骨密度值总体差异不大, 术后2周与术后3周、术后3周与术后4周骨密度值比较差异无显著性意义, 术后5周、术后6周分别与术后7周、术后8周、术后10周、术后12周骨密度值比较差异无显著性意义, 其他各个术前、术后数据之间比较差异均有显著性意义(图3)。

3 讨论 Discussion

目前临床上常用的骨密度检测方法是双能X射线吸收仪, 但此种检测方法容易受到骨形态大小的影响^[7-9]。X射线平片法可观察骨皮质厚薄及骨小梁形态, 但缺点是它只是一个粗略的判断, 不能做定量分析。双光子法是用不同能量的光电子对骨质进行发射, 测量骨密度, 虽然可以做定量分析, 但它的测量值不仅包括骨质, 还包括周围组织。骨密度CT测量法能排除周围组织及骨皮质对测量结果的影响, 提高了骨密度测量的敏感性和准确性。

此次实验采用的定量CT测量法(无专用体模法)是利用CT的较高密度分辨率测量骨密度, 以骨旁肌肉和脂肪组织做为内参考标准, 去除了对外部体模的需求, 从而去除了因人工制造的外部体模的非均一性及体模与被测体相对位置变化对测量结果的影响, 改进了测量的准确度和精确性。定量CT在测量骨密度的同时可以观测骨的微结构, 包括骨容积率、骨表面积率、骨小梁厚度、骨小梁间隔、骨小梁长度、连接密度、结构模型参数等^[10-12]。定量CT检测可以单独测定骨转化率较高、代谢反应敏感的骨质, 且测定的是三维空间的体积骨密度-即单位体积骨组织内矿物质的含量。定量CT检测提供了骨横断面的分析图像, 也可以选择性地测量骨密度, 从而较早地反映体内骨量的变化。

在此次实验中发现, 骨缺损组术后即出现骨密度值下降, 2-4周基本平稳, 术后5周骨密度值明显下降, 和同时间骨折组、术前对照值比较差异均有显著性意义, 6周以后测得的骨密度值总体差异不大。骨密度值下降则提示有骨组织被吸收分解, 但这并不说明此时的骨组织钙化不好、骨代谢减慢, 而有可能提示骨折愈合进入到了一个骨改建阶段, 骨组织结构变得更加有序、更加高效。

骨代谢生化指标具有无创性和可重复检测, 因而成为人们认识和进一步研究骨不连的有力手段。骨形成、骨吸收和静止3个阶段构成了骨的重建过程, 骨转换的过程即是

破骨细胞不断清除旧骨, 成骨细胞形成类骨质并进行矿化的过程, 这两个过程在时间和空间上紧密耦联并发生在同一重建单位中。整个骨吸收-骨重建过程受成骨细胞调控。骨量的多少取决于同一骨重建单位中骨形成与骨吸收的平衡^[12-13]。当这一平衡被破坏, 骨吸收大于骨形成时就导致了骨折不愈合的发生。骨转换过程可以通过生化标志物反映出来, 间接显示成骨细胞与破骨细胞的活性。近些年来研究者更多的采用骨特异性碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶、I 型胶原 N 末端肽等这些敏感性、特异性强的骨代谢生化指标, 用于骨丢失率监测、骨折风险程度预测、监测药物治疗反应及代谢性骨病的鉴别诊断中, 这些指标是否比骨密度测量更能早期反映骨量变化令人期待。

骨特异性碱性磷酸酶是成骨细胞的胞外酶, 能排除肝、肾、肠等疾病的影响, 是反映成骨细胞活性和骨形成的特异及敏感指标, 成骨细胞活性增强则骨特异性碱性磷酸酶分泌增加。有些专家进行调查研究发现, 骨特异性碱性磷酸酶可以作为一种敏感的标志物来测定骨转换率。Southwood等^[14]发现在兔股骨缺损试验中, 术后0-4周血清骨特异性碱性磷酸酶减少, 在8周达到高峰, 然后减少。Moghaddam等^[15]在248例长骨骨折外科治疗病例中, 选取萎缩性不愈合15例对比15例正常骨愈合, 术后1, 2, 4, 8, 12, 52周的生物因子检测发现: 骨特异性碱性磷酸酶和PINP水平在1周内升高后减少, 但两组在愈合过程中绝对值和相对值无明显差异。本实验中, 骨缺损组术后骨特异性碱性磷酸酶升高, 第4周达到高峰, 第5周时出现下降, 第6周以后数值基本稳定。两组的骨特异性碱性磷酸酶比较差异有显著性意义, 与Southwood^[14]、Moghaddam等^[15]的结果一样, 骨缺损刺激骨的形成, 术后骨特异性碱性磷酸酶出现升高现象。动态分析骨特异性碱性磷酸酶的变化, 对兔实验性骨折愈合过程的监测有一定帮助。

抗酒石酸酸性磷酸酶是6种酸性磷酸酶同工酶之一, 即第5型, 主要由破骨细胞释放, 检测血清中抗酒石酸酸性磷酸酶的水平可以反映体内破骨细胞活性和骨吸收状态。正常人血清中会有2种几乎等量的5型抗酒石酸酸性磷酸酶, 即5a和5b, 5a可以在唾液酸酶作用下转变为5b, 纯化的人破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶是5b。由于抗酒石酸酸性磷酸酶5b特异性高, 结果不受昼夜变化、饮食、肝、肾疾病的影响, 已成为第二代骨吸收的生化标志物, 具有早期监测骨质、降低骨折风险的作用。Moghaddam等^[15]在外科治疗病例的生物因子检测中发现, 术后在4周和8周的抗酒石酸酸性磷酸酶5b相对值明显减少, 但骨缺损组与骨折组愈合过程中的绝对值和相对值无明显差异。本实验中, 骨缺损组术后抗酒石酸酸性磷酸酶5b升高, 在第4周出现明显的峰值, 然后下降, 基本稳定; 术后抗酒石酸酸性磷酸酶5b有绝对值的升高, 提示骨缺损后骨吸收会增强, 系统性抗酒石酸酸性磷酸酶5b的变化能反映成功骨折愈合早期进程, 有可能可临床监测愈合过程。

I型胶原N末端肽是含有吡啶啉和脱氧吡啶啉的低分子肽,其结构是通过吡啶啉和脱氧吡啶啉分别连接两条链末端肽,是I型胶原交联末端肽,为总的N端交联物。吡啶啉主要存在于骨中,占成熟胶原的21%;脱氧吡啶啉存在于软骨与骨中,是成熟胶原的主要成分^[16-18]。吡啶啉和脱氧吡啶啉在破骨细胞骨吸收过程中从骨基质中释放出来,以游离氨基酸形式或肽结合形式(即I型胶原N末端肽)从尿中排出,是骨降解后尿中出现的一种稳定最终产物。从理论上讲I型胶原N末端肽的骨组织特异性很强,与骨吸收密切相关。Garcia Perez等^[13]的研究发现,I型胶原N末端肽用于监测骨吸收变化方面是最敏感的指标。Rosen等^[19]研究发现,I型胶原N末端肽和骨密度呈负相关。本实验中,骨缺损组I型胶原N末端肽在第5周出现明显降低,从第6周开始出现平稳的水平,与骨折组有明显差异。

分析手术前后骨代谢指标的变化发现,骨缺损组术后骨特异性碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶5b均有波动,至少说明骨缺损组骨转换维持在较高水平,多个血清生化指标的检测有益于骨折愈合过程的临床评估。骨缺损组中I型胶原N末端肽术后第5周下降最明显,是否可以说明I型胶原N末端肽能敏感地反映体内骨转换的状态,能快速随骨吸收的被抑制迅速降低?本实验中凑巧的是,与I型胶原N末端肽相同的变化,骨缺损组术后5周骨密度值也出现明显下降,有统计学意义,是否可以解释为:术后5周以后,由I型胶原N末端肽代表的骨吸收明显减弱,然后稳定在一定程度上,骨吸收和骨生成达到一定的平衡,这种变化体现在骨密度值明显下降然后很快稳定在一定的水平。在排除其他干扰因素情况下,术后5周,I型胶原N末端肽和骨密度值同时下降是否可以作为反映骨转换情况、早期诊断兔的骨不连,有待于进一步研究。

致谢: 感谢沈宁江、史占军教授百忙之中给予的试验支持和研究指导性建议,感谢海南省人民医院统计室的高云锁教授协助统计。

作者贡献: 林坚平、吴多能、张武进行实验设计和实验实施,实验评估为肖军,资料收集为王健,林坚平成文,史占军、沈宁江审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 经海南省人民医院医学伦理委员会审核,通过该研究的动物实验方案,符合相关法律规定。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度,文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 林坚平对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. Lancet. 2006;17: 2010-2018.
- [2] 石维强,陆应隆,王连萍,等.B型超声直方图检测骨折愈合的临床价值[J].中华骨科杂志, 1995,15(7):425-428.
- [3] 李峰,欧阳跃平.骨不连临床研究进展[J].国际骨科学杂志, 2007, 28(2):117-119.
- [4] 刘昌戎,沈为栋,彭伟,等.保留骨膜的兔桡骨缺损性骨不连动物模型的制备[J].海南医学院学报,2013,19(6):725-727.
- [5] 王俊,陈一心.骨不连动物模型的研究进展[J].江苏医药,2008, 34(5):509-510.
- [6] 徐晓峰,李阳,钱栋,等.骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子mRNA在股骨骨不连大鼠损伤区域的动态表达[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(40):6857-6860.
- [7] Gamero P, Somay-Rendu E. Biochemical markers of bone loss rate and prevalence of osteoporosis at multiple skeletal sites in Chinese women. Osteoporos Int. 2002;13: 669-676.
- [8] 吴胜用,杨立,祁吉,等.骨质疏松老年妇女腰椎骨密度及结构的多层螺旋CT研究[J].中华放射学杂志,2005,39(11):1165-1170.
- [9] Boden SD, Goodenough DJ, Stockham CD, et al. Precise measurement of vertebral bone density using computed tomography without the use of an external reference phantom. J Digit Imaging. 1989;2(1):B31-38.
- [10] Cortet B, Dubois P, Boutry N, et al. Does high-resolution computed tomography image analysis of the distal radius provide information independent of bone mass? J Clin Densitom. 2000;3(4):339-351.
- [11] Dufresne TE, Chmielewski PA, Manhart MD, et al. Risedronate preserves bone architecture in early postmenopausal women in 1 year as measured by three-dimensional microcomputed tomography. J Calcif Tissue Int. 2003;73(5):B423-432.
- [12] Boyd SK, Davison P, Muller R, et al. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in-vivo microcomputed tomography. Bone. 2006;39(4):854-862.
- [13] Garcia-Perez MA, Moreno-Mercer J, Tarin JJ, et al. Similar efficacy of low and standard doses of transdermal estradiol in controlling bone turnover in postmenopausal women. Gynecol Endocrinol. 2006;22(4):179-184.
- [14] Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, et al. Evaluation of serum biochemical markers of bone metabolism for early diagnosis of nonunion and infected nonunion fractures in rabbits. Am J Vet Res. 2003;64(6):727-735.
- [15] Moghaddam A, Müller U, Roth HJ, et al. TRACP 5b and CTX as osteological markers of delayed fracture healing. Injury. 2011; 42(8):758-764.
- [16] Eastell R, Yergey AL, Vieira NE, et al. Interrelationship among vitamin D metabolism, true calcium absorption, parathyroid function, and age in women: evidence of an age-related intestinal resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D action. J Bone Miner Res. 1991;6(2):125-132.
- [17] Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. Endocrinol Metab Clin North Am. 1990;19(1):1-18.
- [18] Hanson DA, Weis MA, Bollen AM, et al. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. J Bone Miner Res. 1992;7(11):1251-1258.
- [19] Rosen HN, Moses AC, Garber J, et al. Utility of biochemical markers of bone turnover in the follow-up of patients treated with bisphosphonates. Calcif Tissue Int. 1988;63(5):363-368.