

# 不同剂量维甲酸诱导骨质疏松大鼠模型的稳定性

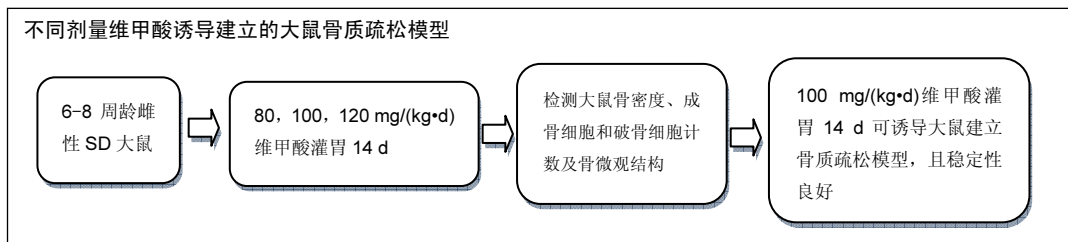
孙世栋<sup>1</sup>, 梁其彬<sup>2</sup>, 范为之<sup>3</sup>, 曾展鹏<sup>1</sup>, 陈柏行<sup>3</sup> (<sup>1</sup>广州中医药大学第一附属医院创伤骨科, 广东省广州市 510405; <sup>2</sup>广州市正骨医院骨科, 广东省广州市 510045; <sup>3</sup>广州中医药大学, 广东省广州市 510006)

引用本文: 孙世栋, 梁其彬, 范为之, 曾展鹏, 陈柏行. 不同剂量维甲酸诱导骨质疏松大鼠模型的稳定性[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(20):3164-3169.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.20.009

ORCID: 0000-0002-9121-5458(曾展鹏)

文章快速阅读:



孙世栋, 男, 1987 年生, 福建省厦门市人, 汉族, 2013 年北京中医药大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事中西医结合骨伤方面的研究。

通讯作者: 曾展鹏, 硕士, 教授, 硕士生导师, 广州中医药大学第一附属医院一骨科, 广东省广州市 510405

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2017)20-03164-06

稿件接受: 2017-05-27

文题释义:

**维甲酸:** 体内维生素 A 代谢的中间产物, 主要影响骨的生长和促进上皮细胞增生、分化、角质溶解等代谢作用。显著的药理活性之一是诱导表皮增生, 使颗粒层和棘细胞层增厚。另一个重要作用是在表皮细胞分化后期通过影响 K1、K10 角蛋白酶解, 影响丝聚蛋白原至丝聚蛋白过程及交联包膜形成促进表皮颗粒层细胞向角质层分化。

**骨质疏松模型:** 建立理想的实验动物模型对骨质疏松的病因和治疗的研究有着重要的意义。文章选用雌性 SD 大鼠, 运用维甲酸实行造模, 方法简单实用, 中等剂量可成功建立稳定的骨质疏松模型。

摘要

**背景:** 骨质疏松严重危害老年人的健康和生活质量, 建立理想的实验动物模型对骨质疏松的病因和治疗的研究有着重要的意义。

**目的:** 通过不同剂量的维甲酸诱导建立大鼠骨质疏松模型, 筛选出理想的造模剂量。

**方法:** 将 80 只雌性 SD 大鼠按体质量随机分为对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组, 各 20 只。低剂量组、中剂量组和高剂量组分别以 80, 100, 120 mg/(kg·d) 维甲酸连续灌胃 14 d。

**结果与结论:** 与对照组相比, 低剂量组大鼠骨密度、成骨细胞和破骨细胞计数及骨微观结构无明显变化, 而中、高剂量组大鼠股骨骨密度、血清钙含量明显下降, 股骨破骨细胞数量增加, 骨微观结构明显发生改变, 其中以中剂量组最为明显。结果说明 100 mg/(kg·d) 维甲酸灌胃 14 d 可诱导大鼠建立骨质疏松模型, 且稳定性良好。

**关键词:**

组织构建; 骨组织工程; 骨软骨损伤与修复动物模型; 骨质疏松; 雌性; 维甲酸; 苏木精-伊红染色; 骨组织形态计量学

**主题词:**

骨质疏松; 维甲酸; 模型; 动物; 组织工程

**基金资助:**

广东省科技计划项目(2014A020212593)

## Different dosages of retinoic acid to establish a rat model of osteoporosis: a stability evaluation

Sun Shi-dong<sup>1</sup>, Liang Qi-bin<sup>2</sup>, Fan Wei-zhi<sup>3</sup>, Zeng Zhan-peng<sup>1</sup>, Chen Bo-xing<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Department of Traumatic Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Department of Orthopedics, Guangzhou Orthopedic Hospital, Guangzhou 510045, Guangdong Province, China; <sup>3</sup>Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China)

**Abstract**

**BACKGROUND:** Osteoporosis is a serious threat to the health and quality of life in the elderly. It is important to establish an ideal experimental animal model to study the etiology and treatment of osteoporosis.

**OBJECTIVE:** To establish a rat model of osteoporosis induced by different dosages of retinoic acid, thus selecting the optimal dosage.

Sun Shi-dong, Master, Physician, Department of Traumatic Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zeng Zhan-peng, Master, Professor, Master's supervisor, Department of Traumatic Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

**METHODS:** Eighty female Sprague-Dawley rats were randomly divided into control, low-, middle- and high-dosage groups based on body mass ( $n=20$  per group). The rats in the latter three groups were induced with 80, 100, and 120 mg/(kg·d) retinoic acid *via* gastric lavage for 14 days.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the control group, the bone mineral density, number of osteoblasts and osteoclasts, and bone microarchitecture in the low-dosage group showed no significant changes, while there were significant decrease in the serum level of calcium and bone mineral density of femur, significant increase in the number of osteoclasts at the femur and significant changes in the femoral microarchitecture in the middle- and high-dosage groups, especially in the middle-dose group. To conclude, 120 mg/(kg·d) retinoic acid *via* gastric lavage for 14 days can induce a stable osteoporosis model in rats.

**Subject headings:** Osteoporosis; Tretinoin; Animals, Model; Tissue Engineering

**Funding:** the Science and Technology Program of Guangdong Province, No. 2014A020212593

**Cite this article:** Sun SD, Liang QB, Fan WZ, Zeng ZP, Chen BX. Different dosages of retinoic acid to establish a rat model of osteoporosis: a stability evaluation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(20):3164-3169.

## 0 引言 Introduction

骨质疏松是以骨密度和骨质量下降以及骨折风险增加为特点的骨骼系统疾病<sup>[1-11]</sup>, 该病会导致骨的微观结构退化, 脆性增加, 主要临床表现为骨骼疼痛、身材变矮和脆性骨折<sup>[12-13]</sup>, 严重危害老年人的健康和生活质量。目前全世界患骨质疏松的总人数已超过2亿<sup>[14-16]</sup>, 是高居第6位的常见病、多发病<sup>[17]</sup>。因此对骨质疏松症防治的研究已成为当前迫切需要解决的问题, 而建立理想的实验动物模型对骨质疏松的病因和治疗的研究有着重要的意义。

维甲酸是维生素A的衍生物, 与其有着相似的药理作用, 是治疗皮肤和肿瘤等疾病的常用药物<sup>[18-19]</sup>, 但在使用的同时常并发骨质疏松的情况<sup>[20-24]</sup>。自1989年起, 就有利用维甲酸诱导进行大鼠骨质疏松造模的报道<sup>[25]</sup>, 但在相关报道中, 维甲酸的使用剂量范围跨度较大, 为70-120 mg/(kg·d)<sup>[26]</sup>, 其中低剂量[80 mg/(kg·d)]维甲酸对大鼠进行造模效果欠佳<sup>[23, 27]</sup>, 故作者拟对不同剂量维甲酸诱导建立骨质疏松大鼠模型的情况进行比较。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年1至2月在广州中医药大学实验动物中心完成。

1.3 材料

**实验动物:** SPF级雌性SD大鼠80只, 鼠龄6-8周, 体质量280-300 g, 由广州中医药大学实验中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2013-0020。饲养于广州中医药大学实验动物中心, 环境温度: (22±2) °C, 光照: 150-200 lx, 12 h/12 h明暗交替, 相对湿度: 50%-60%, 噪声< 50 db, 自由饮食。实验动物分笼饲养, 每笼5只。本实验相关的各项操作符合广州中医药大学试验动物伦理委员会(批准号: 2016050)规定的试验伦理守则。

**主要试剂和仪器:** 乌拉坦购自国药集团化学试剂有限公司(批号: 20150723); 维甲酸购自山西森佛试剂有限公司(批号: 20150325); 水合氯醛(批号: 20150325)购自国药集团化学试剂有限公司; 12 cm手术用剪、10 cm眼用有齿镊购自上海金钟医疗手术器械厂; XR-36双能X射线骨密

度测量仪、YB-6D型生物组织石蜡包埋机购自湖北孝感市亚光医用电子技术研究所、全自动生化仪购自美国Beckman公司; 45角式系列台式低速离心机购自上海医疗器械有限公司手术器械厂; 自动化图像数字化分析仪、YT-6C型生物组织摊烤片机购自湖北孝感市亚光医用电子技术有限公司; 电子天平购自北京金志业仪器设备有限公司; YTG-5E型生物组织处理多用机购自湖北省孝感市亚光医用电子技术研究所; 光学显微镜购自成都光学仪器厂; 硬组织切片机购自广州医药工业研究所。

### 1.4 方法

1.4.1 动物分组 80只SD大鼠按体质量随机分为4组, 对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 各20只。

1.4.2 骨质疏松模型建立 每日上午对照组给予蒸馏水10 mL/kg, 低剂量组给予维甲酸80 mg/(kg·d), 中剂量组给予维甲酸100 mg/(kg·d), 高剂量组给予维甲酸120 mg/(kg·d), 对大鼠连续灌胃14 d<sup>[28-30]</sup>。

1.4.3 荧光标记所有雌性SD大鼠于造模前在右后肢股骨近端皮下注射盐酸四环素(50 mg/kg), 1次/d, 连续2 d<sup>[31-32]</sup>。

1.4.4 体质量测定 分别于造模前后对用电子天平各组大鼠进行体质量测定。

1.4.5 骨密度测量 灌胃14 d后, 大鼠禁食禁水, 称体质量, 行腹腔麻醉(5%水合氯醛+12.5%乌拉坦1:1混合溶液, 5 mL/kg<sup>[33]</sup>), 取仰卧位, 四肢展平固定在双能X射线骨密度测量仪上, 测量大鼠右后肢股骨的骨密度。

1.4.6 血清钙水平测定 大鼠麻醉后, 眼球摘除法取血, 分离血清-20 °C保存待用, 用全自动生化仪测定血清钙的水平。

1.4.7 苏木精-伊红染色 分离大鼠右侧股骨, 剥净软组织, 选取中段长约1 cm的骨段, 将骨段置于40 g/L多聚甲醛溶液4 °C下固定24 h, 后再将其置于10%的EDTA-2Na溶液脱钙(每两到三天更换1次脱钙液)。待骨质松软, 针刺无明显阻力后表示脱钙完成。以骨段纵轴为中心剖开骨段, 经系列乙醇脱水、透明、浸蜡, 低熔点石蜡包埋。用全自动切片机切成厚度约5 μm的蜡片, 将蜡片分别展于载玻片上, 做好标记, 置于干燥箱中, 42 °C烤片48 h。石蜡切片经2次二甲苯脱蜡, 梯度乙醇下浸洗, Harris苏木精溶液染色15 min后水

洗, 蓝化, 入1%伊红水溶液1 min, 体积分数95%乙醇分色并上行至无水乙醇、二甲苯后, 中性树胶封固。制作完成后用200倍光学显微镜, 每个标本随机取个不重复视野, 分别数出各种细胞的数目, 取平均值代表该切片倍视野下的平均细胞数目, 采用BI 2000 医学图像分析系统协助进行骨形态计量学分析观察成骨细胞及破骨细胞数量<sup>[34-36]</sup>。

**1.4.8 骨组织形态计量学分析** 分离大鼠左侧股骨, 剥净软组织, 选取中段长约1 cm的骨段, 固定后逐级脱水, 浸入3:7的甲基丙烯酸甲酯中24 h[真空负压651.88 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)], 然后以半聚合甲基丙烯酸甲酯包埋制成实验标本。采用硬组织切片机, 每个标本连续切6张10 μm和4张5 μm厚的不脱钙骨切片, 其中5 μm薄片采用甲苯胺蓝染色检测<sup>[37]</sup>, 以普通光学显微镜进行观察, 10 μm厚片用于荧光显微镜下观察测量, 记录骨小梁的数目(mm<sup>-1</sup>); 骨小梁的厚度(μm); 骨小梁的分离度(μm)。

**1.5 主要观察指标** 不同维甲酸浓度下大鼠体质量、血清钙水平、骨密度以及骨组织形态。

**1.6 统计学分析** 使用SPSS18.0软件包进行数据处理, 实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量** 观察分析80只建模大鼠, 于造模结束时, 共存活74只, 实验期间未予补充样本量。其中6只死亡大鼠均来自高剂量组, 组内存活14只, 死亡原因初步考虑为维甲酸过量。

**2.2 大体观察** 对照组、低剂量组及中剂量组大鼠均精神活动良好, 反应敏捷, 毛发有光泽、柔顺, 活动量正常。高剂量组大鼠造模3 d后发现大鼠精神一般, 毛发粗糙, 脾气暴躁; 造模9 d后出现2只大鼠死亡, 8只大鼠皮肤受损, 将皮肤受损大鼠分笼喂养, 造模9-14 d期间先后又有4只大鼠死亡, 其余大鼠脾气火爆, 打架频繁。

**2.3 体质量** 造模前4组体质量差异无显著性意义, 造模14 d后低、中、高剂量组大鼠体质量均低于对照组( $P < 0.05$ ), 其中中剂量组大鼠体质量下降最为明显, 低、中、高剂量组大鼠体质量差异无显著性意义(表1)。

表1 不同剂量维甲酸对大鼠体质量的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , g)  
Table 1 Effect of different dosages of retinoic acid on the rat body mass

| 组别   | 造模前       | 造模后                    |
|------|-----------|------------------------|
| 对照组  | 289.7±2.5 | 320.3±1.1              |
| 低剂量组 | 292.3±1.2 | 274.2±1.8 <sup>a</sup> |
| 中剂量组 | 287.5±1.3 | 248.9±2.6 <sup>a</sup> |
| 高剂量组 | 290.8±2.6 | 260.7±2.9 <sup>a</sup> |

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 骨密度** 造模14 d后, 中、高剂量组大鼠右后肢股骨骨密度低于对照组( $P < 0.05$ ), 且其中中剂量组骨密度下降

较为明显(表2)。

表2 不同剂量维甲酸对大鼠右后肢股骨骨密度的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , g/cm<sup>3</sup>)  
Table 2 Effect of different dosages of retinoic acid on the femoral bone mineral density of the rat hind limbs

| 组别   | 骨密度(g/cm <sup>3</sup> )  |
|------|--------------------------|
| 对照组  | 0.216±0.001              |
| 低剂量组 | 0.199±0.002              |
| 中剂量组 | 0.174±0.003 <sup>a</sup> |
| 高剂量组 | 0.187±0.002 <sup>a</sup> |

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

**2.5 血清钙含量** 造模14 d后, 低、中、高剂量组大鼠血清钙含量明显低于对照组( $P < 0.05$ ), 其中中剂量组血清钙含量最低(表3)。

表3 不同剂量维甲酸对大鼠血清钙的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , mmol/L)  
Table 3 Effect of different dosages of retinoic acid on the serum level of calcium in rats

| 组别   | 血清钙水平                  |
|------|------------------------|
| 对照组  | 2.01±0.25              |
| 低剂量组 | 1.87±0.21 <sup>a</sup> |
| 中剂量组 | 1.16±0.37 <sup>a</sup> |
| 高剂量组 | 1.64±0.35 <sup>a</sup> |

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

**2.6 成骨细胞及破骨细胞数量** 造模14 d后, 各组大鼠股骨成骨细胞数量接近( $P > 0.05$ ), 而中、高剂量组大鼠股骨破骨细胞数量明显高于对照组( $P < 0.05$ ), 且其中中剂量组破骨细胞数量最高(表4, 图1)。

表4 不同剂量维甲酸对大鼠股骨成骨细胞及破骨细胞数量的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n/200 倍视野)  
Table 4 Effect of different dosages of retinoic acid on the number of osteoblasts and osteoclasts in the rat femur

| 组别   | 成骨细胞      | 破骨细胞                    |
|------|-----------|-------------------------|
| 对照组  | 0.18±0.02 | 19.56±1.34              |
| 低剂量组 | 0.16±0.05 | 21.82±2.94              |
| 中剂量组 | 0.11±0.09 | 40.60±1.38 <sup>a</sup> |
| 高剂量组 | 0.13±0.06 | 25.87±2.01 <sup>a</sup> |

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

**2.7 骨组织形态计量学结果** 见表5, 图2。

表5 不同剂量维甲酸对大鼠股骨骨组织形态的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 5 Effect of different dosages of retinoic acid on the histomorphology of the rat femur

| 组别   | 骨小梁数目(mm <sup>-1</sup> ) | 骨小梁厚度(μm)  | 骨小梁分离度(μm)                   |
|------|--------------------------|------------|------------------------------|
| 对照组  | 1.31±0.21                | 62.32±3.46 | 1 057.64±164.46              |
| 低剂量组 | 1.24±0.24                | 61.32±3.46 | 1 077.72±163.46              |
| 中剂量组 | 0.62±0.16                | 47.24±7.55 | 2 419.81±210.38 <sup>a</sup> |
| 高剂量组 | 1.16±0.23                | 59.98±4.28 | 1 154.58±248.63 <sup>a</sup> |

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

造模14 d后, 与对照组相比, 高、中剂量组大鼠股骨

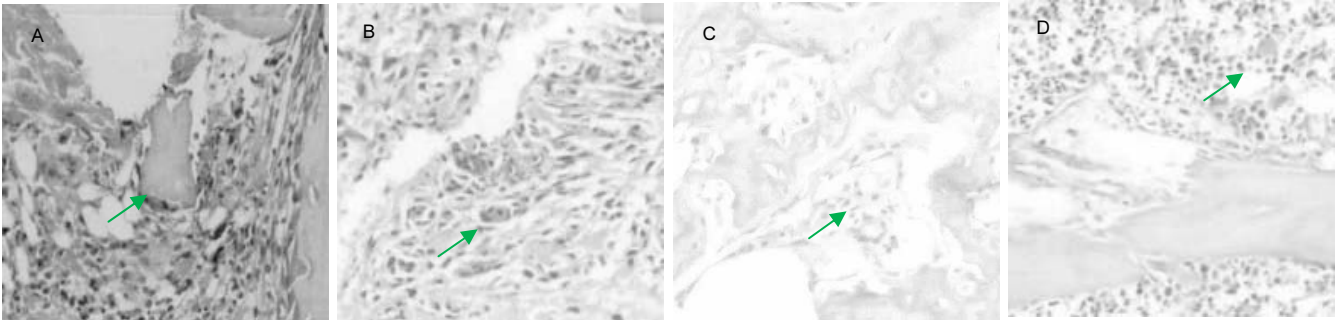


图 1 不同剂量维甲酸对大鼠股骨成骨细胞及破骨细胞数量的影响(苏木精-伊红染色,  $\times 200$ )

Figure 1 Effect of different dosages of retinoic acid on the number of osteoblasts and osteoclasts in the rat femur (hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ )

图注: 图中 A 为对照组, 间充质细胞相对较少, 未见破骨细胞, 箭头指示成骨细胞; B 为低剂量组, 可见大量红细胞与间充质细胞, 箭头指示骨细胞; C 为中剂量组, 可见大量间充质细胞, 且破骨细胞(箭头)数量大幅增加; D 为高剂量组, 破骨细胞(箭头)少量增殖。

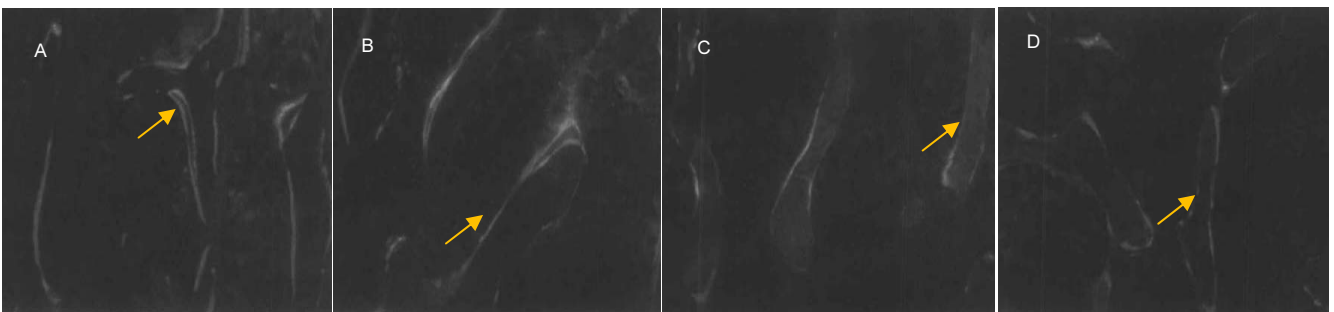


图 2 不同剂量维甲酸对大鼠股骨骨组织形态的影响(甲苯胺蓝染色,  $\times 100$ )

Figure 2 Effect of different dosages of retinoic acid on the histomorphology of the rat femur (toluidine blue staining,  $\times 100$ )

图注: 图中 A 为对照组, 显示骨小梁表面双荧光标记, 黄色为四环素荧光标记, 绿色为 Calcein 荧光标记; B 为低剂量组, 两组骨组织表面荧光强度未见明显减少, 可见大量红细胞与间充质细胞, 显示骨小梁表面双荧光标记; C 为中剂量组, 骨小梁表面荧光强度减少, 只有单荧光, 骨小梁变细; D 为高剂量组, 骨小梁表面荧光强度明显减少, 排列稀疏, 不整齐, 部分断裂, 只有单荧光。箭头指示骨小梁。

骨小梁数目及骨小梁厚度明显减小, 骨小梁分离度明显增加( $P < 0.05$ ), 其中以中剂量组在骨组织形态计量上变化最明显。

### 3 讨论 Discussion

骨质疏松的发生、发展和骨的代谢密切相关, 虽然临床上通过合理的药物干预, 可以适当减缓疾病的发展进程, 但该疾病的发病机制尚未完全阐明, 治疗上也未能有效根除, 故对该疾病的基础研究仍十分有意义。而骨质疏松模型的建立, 是研究骨质疏松症发病机制及相关治疗方案的前提基础。目前国内外骨质疏松动物造模的方法种类繁多, 但并无统一的标准造模方案。文献阅读中, 在筛选无创造模且具有一定理论基础的前提下, 笔者通过对比多种骨质疏松动物造模方法, 发现使用维甲酸造模诱导大鼠形成骨质疏松模型的方法较为简单易行, 但相关文献对于维甲酸的使用剂量范围跨度较大<sup>[38-56]</sup>, 而在预实验中使用多数文献提及的所谓常规造模剂量 $[80 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$ 维甲酸对大鼠进行诱导造模时又出现造模失败的情况, 故作者采用不同剂量维甲酸对 SD 大鼠实施造模, 并直接采用临床观测指标进行观察评价,

旨在寻找方法简单, 成模周期短, 且可靠稳定的造模方法。

在本次实验造模过程中发现, 高剂量组 $[120 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$ 大鼠在造模期间精神一般, 毛发粗糙, 脾气暴躁, 打架频繁, 并先后发现 6 只大鼠死亡, 死亡率为 30%。而其余组别大鼠均未见死亡, 且精神活动良好, 反应敏捷, 毛发有光泽、柔顺, 活动量正常。因为实验大鼠均为同批购入, 相同环境条件喂养, 由相同实验人员进行灌胃, 仅在灌胃维甲酸浓度上存在区别, 故考虑行为异常和死亡的原因可能为维甲酸过量。但由于实验受限, 未能行死亡标本病例样本采集检查。经上述观察, 虽然无法查明大鼠确切死因, 但结果出现的高死亡率及大鼠的行为异常使作者认为 $120 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的维甲酸并非造模安全剂量范围。

在后续的研究中发现, 造模 14 d 后低剂量组大鼠在骨密度、成骨细胞和破骨细胞计数及骨小梁数目、厚度、分离度上的变化与对照组大鼠相比, 差异无显著性意义, 仅在体质量和血清钙水平的下降方面差异有显著性意义。即在低剂量诱导下, 模型组大鼠的实际骨量缺失与正常大鼠并无明显区别, 说明 $80 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的所谓常规剂量无法进行大鼠骨质疏松诱导造模。综合这 2 项观察, 推翻了既往研

究中宽泛的70-120 mg/(kg·d)的维甲酸使用范围及80 mg/(kg·d)的维甲酸所谓常规造模剂量的说法<sup>[57-60]</sup>。

作者发现中剂量组和高剂量组大鼠股骨骨密度、血清钙含量、股骨破骨细胞数量以及骨微观结构方面均与对照组大鼠差异有显著性意义,认为这2种剂量组的维甲酸均可诱导骨指疏松造模成功。但中剂量组大鼠血清钙含量、成骨细胞和破骨细胞数量、骨小梁数目以及骨小梁厚度变化更为明显,且骨小梁分离度指标变化尤为突出。由于高剂量组大鼠死亡率较高,稳定性较差,造模成功率较低,故作者推荐以100 mg/(kg·d)的维甲酸为建立理想的骨质疏松大鼠造模剂量。

通过本次实验观察,中剂量组与对照组大鼠在股骨成骨细胞数量上的变化比破骨细胞数量变化差异小,说明维甲酸对破骨细胞的促进作用明显于对成骨细胞的抑制作用,导致骨的吸收明显,破坏了大鼠的骨形成与骨吸收偶联平衡。在骨组织微观结构病理改变上,骨小梁厚度及数量的明显下降和骨小梁分离度明显上升,最终导致骨量丢失造成骨质疏松。这些特点都与人类原发性骨质疏松症相类似<sup>[38, 61-62]</sup>,说明该法的造模大鼠可以更好的模拟人的骨质疏松模型,且本法操作简单、造模周期短、成模率高、稳定性好,是理想的骨质疏松实验动物模型。

**作者贡献:** 实验设计为曾展鹏和孙世栋,实验实施为孙世栋和梁其彬,实验评估为曾展鹏,资料收集为范为之和陈柏行。孙世栋成文,曾展鹏审核。

**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:** 实验方案经广州中医药大学试验动物伦理委员会批准,批准号为2016050。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

**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:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者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。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,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。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1994;843:1-129.

[2] Phetfong J, Sanvoranart T, Nartprayut K, et al. Osteoporosis: the current status of mesenchymal stem cell-based therapy. Cell Mol Biol Lett. 2016;21:12.

[3] Tell-Lebanon O, Rotman-Pikielny P. Osteoporosis and diabetes - in which way are they related? Harefuah. 2016; 155(11):697-701.

[4] Grover M, Bachrach LK. Osteoporosis in Children with Chronic Illnesses: Diagnosis, Monitoring, and Treatment. Curr Osteoporos Rep. 2017. in press.

[5] Kuo TR, Chen CH. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. Biomark Res. 2017;5:18.

[6] Fukumoto S, Matsumoto T. Recent advances in the management of osteoporosis. F1000Res. 2017;6:625.

[7] Soleyman-Jahi S, Yousefian A, Maheronnaghsh R, et al. Evidence-based prevention and treatment of osteoporosis after spinal cord injury: a systematic review. Eur Spine J. 2017. in press.

[8] Schweser KM, Crist BD. Osteoporosis: a discussion on the past 5 years. Curr Rev Musculoskelet Med. 2017;10(2): 265-274.

[9] Asadipooya K, Graves L, Greene LW. Transient osteoporosis of the hip: review of the literature. Osteoporos Int. 2017;28(6): 1805-1816.

[10] Sözen T, Özişik L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. Eur J Rheumatol. 2017;4(1): 46-56.

[11] Hanley DA, McClung MR, Davison KS, et al. Western Osteoporosis Alliance Clinical Practice Series: Evaluating the Balance of Benefits and Risks of Long-Term Osteoporosis Therapies. Am J Med. 2017;130(7):862.e1-862.e7.

[12] 王秀玲. 骨质疏松症几种相关基因的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(5):367-370.

[13] 梁芝萍. 骨质疏松患者与补钙[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(14):1949.

[14] 乔芳, 常静. 骨质疏松流行病学调查分析[J]. 中国实用医药, 2012, 7(30):271-272.

[15] 胡军, 张华, 牟青. 骨质疏松症的流行病学趋势与防治进展[J]. 临床荟萃, 2011, 26(8):729-731.

[16] 王伟, 李春雯, 史晓林. 中国杭州骨质疏松性髋部骨折的流行病学研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(5):15-17.

[17] 贺丽英, 孙蕴, 要文娟, 等. 2010-2016年中国老年人骨质疏松症患病率Meta分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(12):1590-1596.

[18] 孙宇强, 王雪, 关兴芳, 等. 维甲酸及其受体与肿瘤关系的研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(3):295-301.

[19] 杨娟, 张锡宝. 维甲酸受体及其作用机制研究进展[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2014(5):423-426.

[20] 贾经汉, 邱新建, 陈志坚. 骨质疏松动物模型的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(8):765-768.

[21] 王冰, 徐又佳, 郝彦明, 等. 去卵巢和激素致骨质疏松模型中骨密度与血清指标的比较[J]. 苏州大学学报:医学版, 2008, 28(1):10-13.

[22] Allen SP, Maden M, Price JS. A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers. Dev Biol. 2002; 251(2):409-23.

[23] 徐洪璋, 余斌. 骨质疏松症动物模型研究现状[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(1):47-50.

[24] 潘理平, 曹茜. 治疗骨质疏松症药物及其不良反应[J]. 药学实践杂志, 2006, 24(6):328-330.

[25] 邵金莺, 尹钟株, 许哲. 龙牡壮骨药对大鼠实验性骨质疏松的影响[J]. 中药药理与临床, 1989(5):25-27.

- [26] Liao EY, Luo XH, Wang WB, et al. Effects of different nylestriol/levonorgestrel dosages on bone metabolism in female Sprague-Dawley rats with retinoic acid-induced osteoporosis. *Endocr Res*. 2003;29(1):23-42.
- [27] 胡彬,李青南,李朝阳,等.维甲酸致雌性大鼠骨代谢变化的实验研究[J].中国骨质疏松杂志,1997,3(3):12-14.
- [28] Oršolić N, Goluža E, Dikić D, et al. 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.
- [29] Ranhotra HS. The interplay between retinoic acid receptor-related orphan receptors and human diseases. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012;32(4):181-189.
- [30] 尚庆,刘宗超,鲁晓波.骨质疏松动物模型特点的综述[J].中国实用医药,2008,3(13):193-195.
- [31] 吕荣,徐新智,王军.介绍一种骨磨片荧光显微镜观察四环素的改进方法[J].临床与实验病理学杂志,2000,16(3):183.
- [32] 梁克玉,张全祥,魏玉玲.四环素标记、荧光显微镜观察中药对实验性骨折愈合的影响[C]//跨世纪骨伤杰出人才科技成果荟萃,2004.
- [33] Mori T, Singtripop T, Kawashima S. Animal model of uterine adenomyosis: is prolactin a potent inducer of adenomyosis in mice? *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165(1):232-234.
- [34] 刘钰瑜,崔燎,姚卫民,等.前列腺素衍生物对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗作用[J].中国药理学通报,2009,25(10):1327-1330. [20] 夏维波,孟迅吾,邢小平,等.戊酸雌二醇对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗作用[J].中华妇产科杂志,2001,36(10):606-609.
- [35] 许碧莲,崔燎,陈文双,等.维甲酸致大鼠骨质疏松模型探讨及丹参骨宝的预防作用[J].中国药理学通报,2010,26(4):539-543.
- [36] 成令忠.现代组织学[M].上海:上海科学技术文献出版社,2003.
- [37] 陈方,吴铁,崔燎.维甲酸致小鼠骨质疏松模型的量效关系及骨药理作用探讨[J].中国药理学通报,2002,18(6):681-684.
- [38] Lei YX, Zhao JJ, Hu AL, et al. Organic gallium improves tretinoin-induced osteoporosis in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2007;27(9):1361-1364.
- [39] Zhao S, Niu F, Xu CY, et al. Diosgenin prevents bone loss on retinoic acid-induced osteoporosis in rats. *Ir J Med Sci*. 2016;185(3):581-587.
- [40] Chen Q, Liu D, Xiong YM, et al. The Effects of Gallium Chloride on Apoptosis Osteoporosis Model of Rats Caused by Tretinoin Acid. *Value Health*. 2014;17(7):A771-772.
- [41] Xu G, Sun N, Zhao MJ, et al. Study on decoction's effect of different processed rhizomes of *Cibotium barometz* on retinoic acid induced male rats osteoporosis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2014;39(6):1011-1015.
- [42] Yang J, Wu N, Peng J, et al. Prevention of retinoic acid-induced osteoporosis in mice by isoflavone-enriched soy protein. *J Sci Food Agric*. 2016;96(1):331-338.
- [43] Kang X, Li Z, Zhang WH, et al. Study on effect of combination of *Epimedii Folium* and *Ligustri Lucidi Fructus* on osteoporosis rats induced by retinoic acid. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2013;38(23):4124-4128.
- [44] Broulik PD, Raška I, Brouliková K. Prolonged overdose of all-trans retinoic acid enhances bone sensitivity in castrated mice. *Nutrition*. 2013;29(9):1166-1169.
- [45] Zhou Y, Liu Y, Gao Y. Effect of tanshitone on prevention and treatment of retinoic acid induced osteoporosis in mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2010;35(21):2923-2926.
- [46] Zhang H, Zhao Y, Li YQ, et al. Effects of deer tendons collagen on osteoporosis rats induced by retinoic acid. *Zhong Yao Cai*. 2010;33(3):411-414.
- [47] Li Y, Zhao Y, Sun X, et al. Prevention and therapeutic effects of sika deer velvet collagen hydrolysate on osteoporosis in rats by retinoic acid. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2010;35(6):759-762.
- [48] Xu B, Cui L, Chen W, et al. Effects of DanShenGuBao on biomechanical properties and bone mineral density of femur induced by retinoic acid in rats. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2010;27(2):307-310.
- [49] Lei YX, Zhao JJ, Hu AL, et al. Organic gallium improves tretinoin-induced osteoporosis in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2007;27(9):1361-1364.
- [50] Hotchkiss CE, Latendresse J, Ferguson SA. Oral treatment with retinoic acid decreases bone mass in rats. *Comp Med*. 2006;56(6):502-511.
- [51] Liao EY, Luo XH, Wang WB, et al. Effects of different nylestriol/levonorgestrel dosages on bone metabolism in female Sprague-Dawley rats with retinoic acid-induced osteoporosis. *Endocr Res*. 2003;29(1):23-42.
- [52] Wu B, Xu B, Huang TY. Effect of kanggusong in prevention and treatment of retinoic acid induced osteoporosis in rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 1996;16(1):32-36.
- [53] Wu B, Xu B, Huang TY, et al. A model of osteoporosis induced by retinoic acid in male Wistar rats. *Yao Xue Xue Bao*. 1996;31(4):241-245.
- [54] Li N, Wang HM, Lin X, et al. Effect of Bugu Mixture on all-trans retinoic acid-induced apoptosis of bone marrow stromal cells. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2004;2(5):367-371.
- [55] Wei M, Yang Z, Li P, et al. Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model. *Am J Chin Med*. 2007;35(4):663-667.
- [56] Chen L, Chen LW, Chen H, et al. Skeletal biomechanical effectiveness of retinoic acid on induction of osteoporotic rats treated by alendronate and qianggu capsules. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009;89(27):1930-1933.
- [57] Dai XX, Xiong YM, Guo X, et al. Dynamic effects of gallium chloride on osteoporotic rat model induced by tretinoin. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2006;35(2):175-178.
- [58] Xu P, Hu WB, Guo X, et al. Therapeutic effect of dietary boron supplement on retinoic acid-induced osteoporosis in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2006;26(12):1785-1788.
- [59] Xu P, Guo X, Zhang YG, et al. The effect of retinoic acid on induction of osteoporotic model rats and the possible mechanism. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2005;36(2):229-232.
- [60] 吴波,徐冰,黄添友,等.维甲酸致大鼠骨质疏松模型与机理研究[J].药学学报,1996,31(4):241-245.
- [61] 谈志龙,任海龙,白人骏,等.骨质疏松症与骨代谢生化测定指标[J].中国骨质疏松杂志,2006,12(1):89-93.
- [62] 朱虎虎,孙炜,孙建新,等.维甲酸诱导雌性大鼠骨质疏松模型建立的效果观察[J].当代医学,2013,19(14):24-26.