

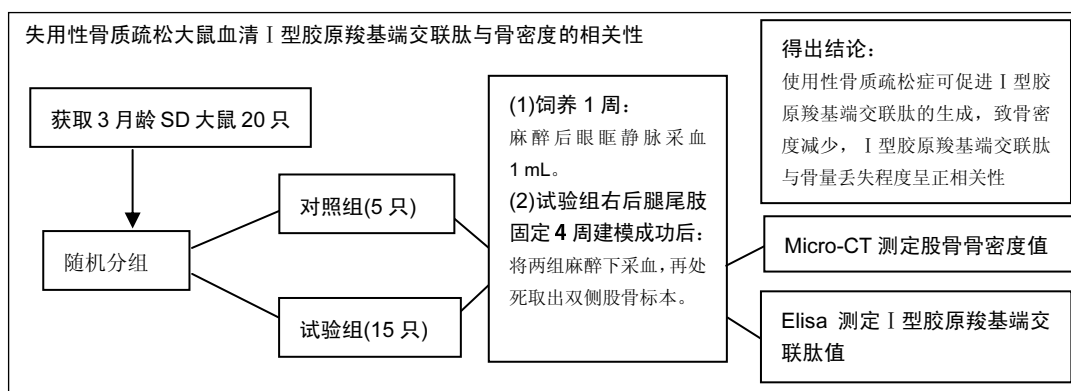
失用性骨质疏松模型大鼠血清 I 型胶原羧基端交联肽与骨密度的相关性

易开君, 王莲朋, 丁慧勇, 孔丹, 韩亚军, 马风华, 段蔚楠, 周高晋, 李国华(新疆医科大学第二附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0205

ORCID: 0000-0002-6456-5161(易开君)

文章快速阅读:



易开君, 男, 1990 年生, 重庆市人, 汉族, 新疆医科大学在读硕士, 医师, 主要从事骨质疏松的研究。

通讯作者: 李国华, 硕士, 副教授, 主任医师, 新疆医科大学第二附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

中图分类号:R318

文献标识码:B

稿件接受: 2018-02-24

文题释义:

腿尾固定: 是目前建立失用性骨质疏松症最常见的方法之一, 这种建模方法可排除绝经状态下雌激素减少的干扰, 选择了体质量相近、饲养条件相同, 排除了其他处理因素对实验结果的干扰; 它是将某一后肢及尾部近端采用医用钢丝穿过后肢踝部固定于大鼠尾部近端 1.0-2.0 cm 处。

I 型胶原羧基端交联肽: 是重要骨吸收标志物之一, 含有特异性表位的多肽片段, 为骨 I 型胶原蛋白的降解产物, 反映骨吸收和破骨细胞活性的特异性指标。

摘要

背景: I 型胶原羧基端交联肽和 I 型胶原氨基端前肽是目前敏感性较好的骨代谢标记物, 能够反映骨形成和骨吸收的状态。

目的: 分析 I 型胶原羧基端交联肽与失用性骨质疏松症的关系。

方法: 雄性 SD 大鼠, 体质量 180-220 g, 随机分成对照组和失用性骨质疏松症组。大鼠采用踝尾固定法将右后肢固定 4 周, 建立失用性骨质疏松症大鼠模型; 其余大鼠为对照组, 麻醉后不做任何处理。造模前后行腹腔静脉采血, 再取出股骨, 检测 SD 大鼠血清 I 型胶原羧基端交联肽和两侧股骨骨密度值。

结果与结论: ①造模前, 两组大鼠血清 I 型胶原羧基端交联肽水平相近($P > 0.05$); 造模 4 周后, 失用性骨质疏松症组血清 I 型胶原羧基端交联肽水平显著高于造模前和对照组($P < 0.01$); 对照组 2 个时间点血清 I 型胶原羧基端交联肽浓度比较差异无显著性意义($P > 0.05$); ②失用性骨质疏松症组造模前后血清 I 型胶原羧基端交联肽差值与两侧股骨骨密度差值呈正相关性($r=0.426, P < 0.01$); ③失用性骨质疏松症组左股骨骨密度高于右股骨骨密度($P < 0.01$), 对照组两侧股骨骨密度比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 失用性骨质疏松症组右股骨骨密度显著低于对照组($P < 0.01$); ④结果说明, 踝尾固定建立失用性骨质疏松症模型切实可行; 失用性骨质疏松症可促进 I 型胶原羧基端交联肽的生成, 致骨密度减少, I 型胶原羧基端交联肽与骨量丢失程度呈正相关, 可用于骨质疏松的疗效评价和诊断。

关键词:

失用性骨质疏松症; I 型胶原羧基端交联肽; 骨密度; 骨吸收; 组织构建

主题词:

骨质疏松; 肽类; 骨密度; 组织工程

基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金(2015211C102)

缩略语:

I 型胶原羧基端交联肽, type I collagen cross-linked C-telopeptide, CTX

Correlation of serum C-telopeptide cross-linked collagen type I with bone mineral density in a rat model of disuse osteoporosis

Yi Kai-jun, Wang Lian-peng, Ding Hui-yong, Kong Dan, Han Ya-jun, Ma Feng-hua, Duan Wei-nan, Zhou Gao-jin, Li Guo-hua (Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi

Yi Kai-jun, Master candidate, Physician, Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Li Guo-hua, Master, Associate professor, Chief physician, Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China



830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: C-telopeptide and N-telopeptide cross-linked collagen type I (CTx and NTx, respectively) are specific biochemical bone markers that can reflect bone formation and resorption.

OBJECTIVE: To analyze the association of CTx with disuse osteoporosis.

METHODS: Male Sprague-Dawley rats, weighing 180–220 g, were randomly divided into control and disuse osteoporosis groups. Right hind limbs of the rats in the disuse osteoporosis group were immobilized for 4 weeks by ankle-tail fixation to establish the rat model of disuse osteoporosis. Peritoneal venous blood was collected before and after modeling, and the femur was then removed to measure the serum CTx level and bone mineral density of the bilateral femurs.

RESULTS AND CONCLUSION: The serum CTx level did not differ significantly between groups before modeling ($P > 0.05$). At 4 weeks after modeling, the serum CTx level in the disuse osteoporosis group was significantly higher than that in the control group and at baseline ($P < 0.01$). The serum CTx level showed no significant change in the control group before and after modeling ($P > 0.05$). The increment of serum CTx in the disuse osteoporosis group exhibited a negative correlation with the bone mineral density of the bilateral femurs ($r = -0.426$, $P < 0.01$). The bone mineral density of the right femur in the disuse osteoporosis group was significantly lower than that of the left one in the disuse osteoporosis group and the right one in the control group ($P < 0.01$), and there was no significant difference in the bone mineral density between left and right femurs in the control group ($P > 0.05$). These results imply that the model of disuse osteoporosis by ankle-tail fixation is established successfully. Disuse osteoporosis can promote the production of CTx further reducing bone mineral density; CTx is positively correlated with the degree of bone loss, so it can be used for therapeutic assessment and diagnosis of osteoporosis.

Subject headings: Osteoporosis; Peptides; Bone Density; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2015211C102

0 引言 Introduction

失用性骨质疏松症是指长期制动、卧床、失重、肌肉不活动或者负重减少，导致对骨的机械应力减少，使局部或全身的骨量丢失继发性局部或全身的骨质疏松^[1]。在正常机械应力的刺激下，骨组织可促进骨形成，维持骨质量，而在长期缺乏正常机械应力刺激下使体内骨形成和骨吸收平衡被破坏，破骨介导的骨吸收增强，成骨介导的骨形成减少，导致全身性或局部的骨量减少，最终导致失用性骨质疏松症的形成^[2-4]。它可引起一些较为常见的并发症，如：增加肾结石、异位骨化、肢体畸形以及病理性骨折发病率等，已受人们广泛关注^[5]。近年来，骨代谢标志物在骨质疏松的诊疗中为新兴指标，其中 I 型胶原羧基端交联肽 (type I collagen cross-linked C-telopeptide, CTx) 和 I 型胶原氨基端前肽是目前敏感性较好的骨代谢标记物，能够反映骨形成和骨吸收的状态^[6-7]。

失用性骨质疏松症为继发性骨质疏松症，是因肢体局部或全身制动，或失重导致的骨质疏松症。本实验通过踝尾固定法建立雄性 SD 大鼠失用性骨质疏松症模型，采用双能 X 射线骨密度仪测量大鼠股骨骨密度确定建模成功，检测大鼠血清 CTx 水平，评价肢体失用对大鼠骨质量的影响程度及骨转换的影响，分析 CTx 与失用性骨质疏松症之间的关系，从而探讨失用性骨质疏松症机制。

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 2015 年 12 月至 2017 年 1 月在新疆医科大学实验动物研究中心完成。

1.3 材料 分笼饲养 3 月龄雄性 SD 大鼠 (新疆医科大学实验动物研究中心提供) 20 只，体质量为 180–220 g。随机分为 2 组，空白对照组，失用性骨质疏松症组。饲养在普通动物房，室温在 22–26 °C，每日人工照明 12 h，自由饮水，

统一喂养颗粒饲料。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组处理

对照组: SD 雄性大鼠 5 只，大鼠两侧肢体均不做任何处理，实验前在大鼠眼眶静脉采血，离心后保存在 -80 °C 冰箱。目的是论证未经处理的对照组大鼠与实验组大鼠健侧肢体骨胶原含量基线相同。喂养 4 周后，在全身麻醉状态下行腹腔静脉采血，离心分离血清后用 Elisa 检测血清 CTx 值；全身麻醉状态下处死后，取一侧股骨标本，采用双能 X 射线骨密度仪测定大鼠双侧股骨骨密度制定基线资料，排除术前存在差别，剔除混杂因素。

失用性骨质疏松症组: SD 雄性大鼠 15 只，实验前在大鼠眼眶静脉采血，离心后保存在 -80 °C 冰箱，右侧后肢体固定 4 周后，在全身麻醉状态下行腹腔静脉采血，离心后分离血清，用 Elisa 检测血清 CTx 含量；处死后，取一侧股骨标本，处死后取双侧股骨标本，采用双能 X 射线骨密度仪测定大鼠双侧股骨骨密度。

1.4.2 失用性骨质疏松大鼠动物模型建立 选 3 月龄雄性 SD 大鼠，饲养 1 周后，失用性骨质疏松症组大鼠在 100 g/L 的水合氯醛溶液按 3 μL/g 腹腔注射麻醉下，碘伏消毒大鼠右后肢及尾部并铺巾，用高温压力锅消毒，用 1.0 mm 的医用钢丝穿过右后肢踝部固定于大鼠尾部近端 1.0–2.0 cm 处，松紧度适宜。腿尾固定结束后将大鼠放置于大鼠饲养笼中，常规饲养 4 周，饲养条件同前，每天碘伏消毒固定部位，观察大鼠的活动及固定情况。对照组同样麻醉方法，而麻醉后不做任何处理。

1.5 主要观察指标

1.5.1 骨密度测定 常规饲养 5 周后，对照组和失用性骨质疏松症组 SD 大鼠采用 100 g/L 的水合氯醛溶液按 3 μL/g 腹腔注射麻醉后取出双侧股骨于双能 X 射线骨密度仪上，采用法国 OSTEOCORE-3 锥束闪光高清成像骨密度仪 (精

精度1%, 准确度0.5%)测量SD大鼠两侧股骨骨密度。

1.5.2 采血及血清CTX测定 ①眼眶静脉采血: 饲养1周后, 对照组和失用性骨质疏松组大鼠在100 g/L的水合氯醛溶液按3 μL/g腹腔注射麻醉下, 眼眶静脉采血1 mL置于EP管中, 采血处涂抹红霉素眼膏预防感染, 采血后静置2 h, 高速离心机以4 000 r/min转速离心10min后, 利用移液枪取上清液, 放置在-80 °C冰箱条件下保存; ②腹腔静脉采血: 大鼠两侧股骨骨密度测量后, 腹腔静脉采血5mL, 采血后静置2 h, 高速离心机以4 000 r/min转速离心10 min后, 利用移液枪取上清液, 放置在-80 °C冰箱保存; ③CTX水平测定: 采用Elisa方法分别测定两组大鼠固定前及固定后4周血清CTX水平。

1.6 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件对数据进行处理, SD大鼠固定前后的CTX值采用配对t 检验, 失用性骨质疏松组或对照组两侧股骨骨密度比较采用配对t 检验, 失用性骨质疏松组和对照组肢体骨密度之间的比较采用独立样本t 检验, 失用性骨质疏松组固定前后血清CTX浓度差和双侧股骨骨密度差值之间的关系采用线性回归分析; 以P < 0.05为差异有显著性意义, 计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠20只, 随机分为2组, 实验过程无脱落, 全部进入结果分析。

2.2 大鼠的一般情况 实验过程中, 两组的SD大鼠健康生长, 失用性骨质疏松组大鼠固定部位无感染, 两组大鼠在观察期间内体质量增长正常。失用性骨质疏松组的SD大鼠右后肢固定后, 都可以用其余3只正常肢体行走活动及觅食。

2.3 SD大鼠股骨骨密度 结果表明, 对照组两侧股骨骨密度差异无显著性意义(P > 0.05), 失用性骨质疏松组左侧股骨骨密度高于右侧股骨骨密度(P < 0.01), 对照组与实验组左侧股骨骨密度, 差异无显著性意义(P > 0.05), 对照组右侧股骨骨密度高于失用性骨质疏松组右侧股骨骨密度(P < 0.01)。见表1。

表1 两组大鼠股骨骨密度值测定 ($\bar{x}\pm s, \times 10^{-2} \text{g/cm}^2$)
Table 1 Bone mineral density of the rat femur in each group

组别	n	左侧股骨	右侧股骨	t 值	P 值
对照组	5	285.60±43.84	278.20±35.96	0.98	0.38
失用性骨质疏松组	15	273.60±29.33	211.67±19.30	11.99	< 0.001
t 值		0.70	5.36		
P 值		0.49	< 0.001		

2.4 SD大鼠固定前后血清CTX水平的比较 两组固定前血清CTX水平比较差异无显著性意义(P > 0.05), 对照组固定前后血清CTX水平比较差异无显著性意义(P > 0.05), 失

用性骨质疏松组固定后血清CTX水平明显高于固定前, 差异有显著性意义(P < 0.01), 失用性骨质疏松组固定后血清CTX水平高于对照组, 差异有显著性意义(P < 0.01)。见表2。

表2 两组大鼠固定前后 I 型胶原羧基端交联肽值的关系($\bar{x}\pm s, \text{ng/L}$)
Table 2 Serum C-telopeptide cross-linked collagen type I level of rats in each group before and after fixation

组别	n	造模前	造模后4周	t 值	P 值
对照组	5	364.22±69.81	411.35±58.15	-1.77	0.14
失用性骨质疏松组	15	323.05±61.91	790.87±125.20	-18.53	< 0.001
t 值		1.25	-6.46		
P 值		0.227	< 0.001		

2.5 血清CTX水平变化与骨密度变化的相关性 SD大鼠血清CTX固定前后浓度差的变化与两侧股骨骨密度值的变化量成正相关($r=0.426, F=13.37, P=0.02$), 两者之间具有良好的相关性(P < 0.05), 得出: CTX浓度增量与骨丢失量呈正比。见图1。

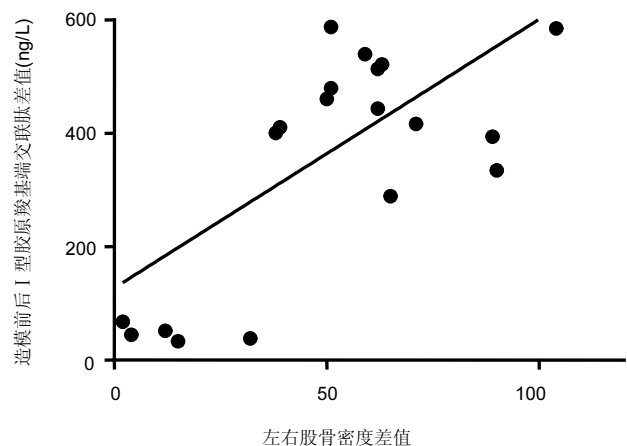


图1 失用性骨质疏松组造模前后 I 型胶原羧基端交联肽变化与骨密度变化的相关性

Figure 1 Correlation of serum C-telopeptide cross-linked collagen type I with bone mineral density in the disuse osteoporosis group before and after modeling

3 讨论 Discussion

3.1 踝尾固定法与失用性骨质疏松症 在生理状况下骨代谢的本质为骨结构的代谢, 生物力学因素是影响骨结构代谢的最基本的因素, 骨质疏松症是骨结构的退变, 是空间力学结构定向的、有序的一种退变过程^[8]。肢体在长期缺乏正常机械应力刺激下, 局部或全身的骨量丢失, 最终形成失用性骨质疏松症, 它最见于长期卧床患者。失用性骨质疏松症的发病机制目前尚不明确。根据国际卫生组织使用双能X射线骨密度仪测量骨密度是诊断骨质疏松症的金标准^[9], 但其是从宏观上反映骨量丢失的程度, 本研究

通过踝尾固定法建立失用性骨质疏松症模型,探讨分子生物学水平的变化与骨量丢失的程度的相关性来探讨失用性骨质疏松症发病机制。

建立失用性骨质疏松症模型的方法众多,如:用弹力绷带将大鼠右后肢固定于腹部^[10]、跟腱切除^[11]、坐骨神经切除^[12]、尾部悬吊^[11]、腿尾固定等^[13],其中腿尾固定是目前最为常用的失用性骨质疏松症造模方法。踝尾固定法建立失用性骨质疏松症模型与上述几种方法比较,本模型骨质疏松形成的速度和程度均比上述几种模型快。在研究过程中发现,踝尾固定4周可致固定侧肢体的肌肉萎缩,且固定4周后,固定侧股骨的骨密度比对侧肢体下降了22.6%,下降速度明显大于采用坐骨神经切除所致的骨密度9%下降速度^[12]。本研究采用雄性SD大鼠,排除绝经状态下雌激素减少的干扰,选择了体质量相近、饲养条件相同,排除了其他处理因素对实验结果的干扰。

3.2 骨矿物质密度与失用性骨质疏松症 本研究纳入骨密度检测值作为大鼠骨量变化的主要评价指标,间接评价骨量健康情况和骨强度,是诊断骨质疏松症的金标准^[14-15]。本实验主要是论证:未经处理的对照组大鼠与失用性骨质疏松症组大鼠左侧股骨骨密度基线相同,失用性骨质疏松症组的SD大鼠左侧股骨骨密度值与对照组左侧股骨骨密度值差异无统计学意义($P > 0.05$),说明失用性骨质疏松症组右后肢踝尾固定作为处理因素对大鼠全身骨密度无明显影响,从而进行失用性骨质疏松症组自身左右股骨骨密度对照研究。本研究不仅利用同一失用性骨质疏松症组对侧肢体作为自身对照,而且也利用失用性骨质疏松症组与对照组间的对照,因此失用性骨质疏松症组SD大鼠右后肢腿尾固定4周,右侧股骨骨密度明显低于左侧股骨和对照组双侧股骨骨密度($P < 0.01$),即3月龄SD雄性大鼠腿尾固定4周后确定骨质疏松造模成功。失用性骨质疏松症组左侧股骨骨密度与对照组左侧股骨骨密度比较,有减低趋势,但两者之间差异无显著性意义($P > 0.05$),说明踝尾固定法造模主要对局部骨量影响较大,间接说明踝尾固定法对大鼠的正常活动影响尚不明显^[8, 16]。

3.3 血清CTX与失用性骨质疏松症 骨基质由有机成分和无机成分组成,有机成分主要是胶原蛋白,糖蛋白和蛋白多糖,无机成分主要是磷酸钙和碳酸钙。其中,胶原蛋白占总体骨基质的90%以上,I型胶原蛋白占有机成分的80%-90%,对维持骨结构的完整及骨生物力学特性很重要^[17-18]。在骨吸收过程中,CTX为骨I型胶原蛋白的降解产物,反映骨吸收的特异性指标,也可反映破骨细胞的活性^[16, 19]。在骨质疏松形成过程中,骨细胞转换平衡破坏,骨量减少、骨微细结构被破坏,使骨脆性增加^[20],同时血清骨代谢标志物浓度也发生了变化^[18, 21]。当骨吸收与骨形成偶联时,CTX可反映骨转换的指标,当骨吸收与骨形成脱耦联时,CTX可反映骨吸收的特异性指标^[22]。因失用性骨质疏松症为继发性骨质疏松症,CTX在失用性骨质疏松

症形成过程中也会发生变化^[23]。

在本研究中发现,随着月龄的增加,对照组大鼠血清CTX水平及两侧股骨骨密度之间比较均无显著性差异($P > 0.05$),得出:对照组大鼠随着月龄的增加,骨吸收和骨形成强度无明显差异,破骨细胞和成骨细胞的数量和活性依然维持相对平衡;失用性骨质疏松症组大鼠右后肢固定4周后,血清CTX水平明显高于固定前和对照组血清CTX水平($P < 0.01$),骨吸收强度相对对照组大鼠骨吸收强度显著增强;同时,图1血清CTX固定前后浓度差的变化与两侧股骨骨密度值变化量的线性相关分析结果提示:大鼠血清CTX浓度的变化水平与骨质疏松程度呈正相关;本实验证实:骨丢失量越多,骨质疏松程度越严重,骨量丢失越多,血清CTX生成越多。

根据Wolff定律,失用性骨质疏松症与缺乏机械刺激有关^[24],但机械刺激通过何种方式来调节破骨细胞和成骨细胞的数量和活性尚未明确。同时在本实验中还发现:失用性骨质疏松症大鼠造模成功后,取股骨标本时右后肢肌肉较左后肢肌肉萎缩。有研究报道骨骼肌能够分泌一些细胞因子等多肽,分泌作用依赖于骨骼肌的收缩,但萎缩的肌肉所分泌的细胞因子是否能够调节破骨细胞和成骨细胞的数量和活性,目前尚未明确^[25]。另外,在运动过程中肌肉可以作为肌肉泵促进血液循环,本实验中大鼠右后肢固定导致肌肉萎缩,肌肉的收缩作用减弱,加之后肢固定,因而右后肢肌肉泵作用明显减弱,也减少了右后肢的血液循环,有研究报道局部血流量减少可导致局部的骨量丢失^[26],因此腿尾固定所致的失用性骨质疏松症不仅与机械刺激缺乏有关,同样与局部血流量减少有关^[27]。后期的进一步实验可对踝尾固定肢体制动后恢复运动或机械刺激进行骨代谢标志物变化或固定前后局部血流情况研究,为进一步探讨失用性骨质疏松症的发病机制奠定理论基础。

本研究所建立起的失用性骨质疏松动物模型有其自身局限性,其与人类失用性骨质疏松之间仍存在差异。腿尾固定法建立失用性骨质疏松模型只是一种间接反映人类失用性骨质疏松症疾病的手段和方法,尚不能完全代表人类失用性骨质疏松症疾病。失用性骨质疏松症是一种病程长的、危害性大的疾病,其动物模型可能只侧重于表现该疾病的某种病因、某一阶段、某些主要症状及某些病理生理变化。目前失用性骨质疏松症动物模型多种多样,各有其特点,研究者根据自己的研究需要建立合适的动物模型。本研究在原有的腿尾固定方法松解固定肢体后,了解骨代谢指标的变化,进一步探讨骨代谢与失用性骨质疏松的关系,为失用性骨质疏松症的诊断和治疗奠定理论基础。

近年来,人们在骨质疏松症相关的生化指标方面取得了一些研究成果,本文所述的反映骨吸收标志物指标,可用于骨密度法诊断失用性骨质疏松症的补充,通过进一步研究,有望成为深层次认识并正确诊断失用性骨质疏松症的一种新方法。

作者贡献: 李国华, 文章通讯作者, 本课题设计者; 易开君, 文章第一作者, 为本课题实施、数据分析及文章撰写者; 王莲朋, 丁慧勇, 孔丹, 韩亚军, 马风华, 段蔚楠, 周高晋均为课题实施者。

经费支持: 该文章接受了“新疆维吾尔自治区自然科学基金(2015211C102)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道, 不存在利益冲突。

伦理问题: 实验方案经新疆医科大学第二附属医院伦理委员会批准。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: 第一作者和通讯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, 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] Takata S, Yasui N. Disuse osteoporosis. J Med Invest. 2001; 48(3-4):147-156.

[2] Zhao LJ, Liu XG, Liu YZ, et al. Genome-wide association study for femoral neck bone geometry. J Bone Miner Res. 2010; 25(2):320-329.

[3] Ziegler R, Scheidt-Nave C, Scharla S. Pathophysiology of osteoporosis: unresolved problems and new insights. J Nutr. 1995;125(7 Suppl):2033s-2037s.

[4] Nabavi N, Khandani A, Camirand A, et al. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. Bone. 2011;49(5): 965-974.

[5] 郭世斌, 失用性骨质疏松症[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2008, 1(2):129-132

[6] Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al. Biochemical markers of bone turnover as predictors of osteoporosis and osteoporotic fractures in men and women: 10-year follow-up of the Taijii cohort. Mod Rheumatol. 2011;21(6):608-620.

[7] Yaşar E, Adigüzel E, Arslan M, et al. Basics of bone metabolism and osteoporosis in common pediatric neuromuscular disabilities. Eur J Paediatr Neurol. 2018; 22(1):17-26.

[8] 王莲朋, 腿尾固定法建立 SD 大鼠失用性骨质疏松症模型的评价[J]. 新疆医科大学学报, 2017. 3(40): 334-336.

[9] Vasikaran SD, Chubb SP, Ebeling PR, et al. Harmonised Australian Reference Intervals for Serum PINP and CTX in Adults. Clin Biochem Rev. 2014;35(4):237-242.

[10] Jee WS, Ma Y. Animal models of immobilization osteopenia. Morphologie. 1999;83(261):25-34.

[11] Hardt AB. Early metabolic responses of bone to immobilization. J Bone Joint Surg Am. 1972;54(1):119-124.

[12] Ding WG, Yan WH, Wei ZX, et al. Difference in intrasosseous blood vessel volume and number in osteoporotic model mice induced by spinal cord injury and sciatic nerve resection. J Bone Miner Metab. 2012; 30(4):400-407.

[13] 唐学阳. 失用性骨质疏松幼龄大鼠骨维生素D受体表达的研究[J]. 四川大学学报:医学版, 2010, 41 (1):106-110.

[14] Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJ, et al. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. Sports Med. 2014;44(1): 37-53.

[15] Sanders S, Geraci SA. Osteoporosis in postmenopausal women: considerations in prevention and treatment: (women's health series). South Med J. 2013;106(12):698-706.

[16] Lumachi F, Santeufemia DA, Del Conte A, et al. Carboxy-terminal telopeptide (CTX) and amino-terminal propeptide (PINP) of type I collagen as markers of bone metastases in patients with non-small cell lung cancer. Anticancer Res. 2013;33(6):2593-2596.

[17] Liebschner MA. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. Biomaterials. 2004;25(9):1697-1714.

[18] Gavala A, Makris K, Korompeli A, et al. Evaluation of Bone Metabolism in Critically Ill Patients Using CTx and PINP. Biomed Res Int. 2016;2016: 1951707.

[19] Nishizawa Y, Ohta H, Miura M, et al. Guidelines for the use of bone metabolic markers in the diagnosis and treatment of osteoporosis (2012 edition). J Bone Miner Metab. 2013;31(1): 1-15.

[20] Lou H, Peng C, Chen Q. [Clinical value of serum total P1NP, beta-CTX and 25(OH)D3 detection in evaluating risks of fragile hip fracture in elderly patients with osteoporosis]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2012;32(9):1346-1349.

[21] Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine position on bone marker standards in osteoporosis. Clin Chem Lab Med. 2011; 49(8): 1271-1274.

[22] Qi W, Yan YB, Lei W, et al. Prevention of disuse osteoporosis in rats by Cordyceps sinensis extract. Osteoporos Int. 2012; 23(9): 2347-2357.

[23] Artuso A, Caimmi C, Tripi G, et al. Longitudinal Evaluation of Bone Mineral Density and Bone Metabolism Markers in Patients with Indolent Systemic Mastocytosis Without Osteoporosis. Calcif Tissue Int. 2017; 100(1):40-46.

[24] Huang Y. Combined treatment of vitamin K and teriparatide on bone metabolism and biomechanics in rats with osteoporosis. Exp Ther Med. 2018;15(1): 315-319.

[25] Pedersen BK. Muscle as a secretory organ. Compr Physiol. 2013;3(3):1337-1362.

[26] Tarantino U, Feola M, Celi M, et al. PTX3: a new mediator of bone metabolism and osteoporosis. Muscles Ligaments Tendons J. 2017;7(1):200-201.

[27] Ramasamy SK, Kusumbe AP, Schiller M, et al. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis. Nat Commun. 2016;7:13601.