

## • 研究论文 •

## 肾阳虚骨质疏松大鼠动物模型的建立

李媛<sup>1,2</sup>, 许红涛<sup>1,2</sup>, 李华强<sup>3</sup>, 蒙雄裕<sup>4</sup>, 王亮<sup>1</sup>, 张宏<sup>1\*</sup>, 秦路平<sup>1\*</sup>

1. 上海第二军医大学药学院生药教研室, 上海 200433
2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108
3. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234
4. 宁夏医科大学药学院, 宁夏 银川 750004

**摘要:** **目的** 建立肾阳虚骨质疏松大鼠病证结合动物模型。**方法** 大鼠按体质量随机分为3组, 分别为实验组16只、去卵巢组16只及假手术组16只。实验组大鼠采用双侧去卵巢并im氢化可的松的方法进行造模。造模期间对大鼠一般情况进行观察及对生理状态量化检测。3个月后, 采用ELISA法检测大鼠血清环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、雌二醇(E<sub>2</sub>)、睾酮(T)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、三碘甲状腺原氨酸(T<sub>3</sub>)、四碘甲状腺原氨酸(T<sub>4</sub>)水平。用电子天平称肾上腺, 甲状腺及胸腺湿质量, 并取股骨进行骨密度和骨矿含量的检测。**结果** 给药造模2周后, 实验组大鼠出现毛发干枯、畏寒喜暖、卷缩弓背、小便清长等症状, 体质量增长明显迟缓, 血清cAMP水平较假手术组显著下降。3个月后, 实验组大鼠自发活动次数明显减少, 血清cAMP、E<sub>2</sub>、ACTH、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>水平明显下降, 骨密度、骨矿含量显著降低, 肾上腺及甲状腺系数明显低于假手术组。**结论** 去势并im氢化可的松建立肾阳虚骨质疏松大鼠动物模型是一种可行的方法。

**关键词:** 肾阳虚; 骨质疏松; 去势; 氢化可的松

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)02-0135-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.02.004

## Establishment of animal model of osteoporosis with kidney yang deficiency syndrome in rats

LI Yuan<sup>1,2</sup>, XU Hong-tao<sup>1,2</sup>, LI Hua-qiang<sup>3</sup>, MENG Xiong-yu<sup>4</sup>, WANG Liang<sup>1</sup>, ZHANG Hong<sup>1</sup>, QIN Lu-ping<sup>1</sup>

1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China
3. College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China
4. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

**Abstract: Objective** To establish an animal model of osteoporosis with kidney yang deficiency syndrome in rats. **Methods** Rats were randomly divided into three groups by body weight, They were experimental, ovariectomized, and Sham operation groups (16 in each group). In the experimental group, rats were subjected to bilateral ovarian resection followed by im injection of hydrocortisone. The general conditions and physiological conditions were observed and measured during the period of the experiment. After three months, the serum levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), estrogen (E<sub>2</sub>), testosterone (T), adrenocorticotropic hormone (ACTH), three typical thyroid original acid (T<sub>3</sub>), and four typical thyroid original acid (T<sub>4</sub>) were determined by ELISA method. The fresh weights of adrenal, thymus, and thyroid were collected by using electronic balance. In addition, the bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were detected. **Results** Two weeks after hydrocortisone treatment, it was observed that the rats in the experimental group displayed kidney yang deficiency syndrome such as dry hairs, chills, back arched, and clear abundant urine. Correspondingly, the body weight increased slowly. The level of cAMP was significantly lower than that of rats in the Sham operation group. Three months later, spontaneous activities of rats in the experimental

收稿日期: 2014-12-26

基金项目: 国家科技部 863 计划: 抗骨质疏松海洋中药制剂—资骨胶囊的研究 (2013AA093003)

作者简介: 李媛 (1988—), 女, 福建南平, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学研究。Tel: (021)81871305 E-mail: yuanli1988816@126.com

\*通信作者 张宏 E-mail: zhanghong@smmu.edu.cn

秦路平 Tel: (021)81871200 E-mail: lpqin@smmu.edu.cn

group markedly decreased, the content of cAMP, E<sub>2</sub>, ACTH, T<sub>3</sub>, and T<sub>4</sub> significantly decreased when compared with the rats in the Sham operation group. The BMD and BMC decreased obviously, showing a notable statistic difference between the experimental group and Sham operation group. The coefficient of adrenal and thyroid was lower than that of rats in the Sham operation group. **Conclusion** Bilateral ovarian resection followed by im injection of hydrocortisone may be a credible method for establishing the animal model of osteoporosis with kidney yang deficiency syndrome.

**Key words:** kidney yang deficiency; osteoporosis; ovariectomy; hydrocortisone

骨质疏松是以骨强度下降, 骨折风险增加为特征的骨骼系统疾病, 多发于绝经后妇女、老人和多种慢性病患者。随着人类寿命的延长和老龄化社会的到来, 骨质疏松的发病率逐年攀升, 目前已经跃居世界各种常见病的第7位<sup>[1]</sup>。骨质疏松症相当于中医学中的“骨痿”。中医理论认为, 肾虚是骨质疏松的主要病机, 而肾虚证分型与骨质疏松程度之间存在着一定联系, 骨质疏松程度以肾阳虚较为严重<sup>[2]</sup>。而目前没有理想的肾阳虚骨质疏松病证结合动物模型, 本实验拟建立肾阳虚骨质疏松大鼠模型, 为更好地对肾阳虚骨质疏松本质进行探讨, 以及对温补肾阳药进行药效评价、新药开发等提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

清洁级雌性SD大鼠48只, 体质量(220±20)g, 由中国人民解放军第二军医大学实验动物中心提供, 许可证号SCXK(沪)2012-0002。

### 1.2 药品及试剂

氢化可的松注射液(天津金耀氨基酸有限公司产品, 批号1305131), 利血平(上海同田生物技术有限公司产品, 批号14010822), 甲状腺素片(上海长城药业有限公司产品, 批号20130601), 水合氯醛(生工生物工程股份有限公司产品, 批号ZY1017B4013J), 注射用青霉素钠(山东鲁抗医药股份有限公司产品, 批号B140709), 临用前用生理盐水配成所需浓度; 雌二醇(E<sub>2</sub>)、睾酮(T)、环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、大鼠三碘甲状腺原氨酸(T<sub>3</sub>), 四碘甲状腺原氨酸(T<sub>4</sub>)酶联免疫试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司产品, 批号201401)。

### 1.3 主要仪器

JLGY-1 大鼠自发活动测定仪(上海吉星), QDR-4500w 型双能 X 线骨密度测量仪(美国Hologic公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 动物分组及造模** 所有大鼠适应性喂养1周

后, 将大鼠按体质量随机分为3组, 分别为实验组16只, 去卵巢组16只及假手术组16只。ip 10%水合氯醛3 mL/kg麻醉, 固定动物于手术台上。从下腹部正中逐层切开皮肤、肌层, 进入腹腔。除假手术组外, 其他各组大鼠行双侧卵巢切除术, 即先结扎输卵管与伴行血管, 再用弯头手术钳夹分离出“桑葚样”卵巢, 结扎, 剪除。彻底止血后, 逐层缝合。假手术组大鼠切口同实验组, 切除一段肠膜后止血缝合, 用于对照观察单纯的手术是否对肾虚或骨代谢存在影响。大鼠术后每天均im青霉素4万U/mL, 每只注射1 mL/d, 连续3 d常规饲养。

第2周开始, 实验组每天后肢im氢化可的松注射液(5 mg/mL)20 mg/kg<sup>[3]</sup>。假手术组后肢im 0.9%生理盐水4 mL/kg, 连续2周。第4周开始, 至第3个月, 每周给实验组大鼠im氢化可的松注射液2次, 以维持肾阳虚状态, 假手术组则im生理盐水。

### 1.4 观察项目及方法

**1.4.1 大鼠行为学指标观察** 造模期间, 根据《中医虚证辨证参考标准》<sup>[4]</sup>中肾阳虚诊断标准及大鼠自身特点, 通过观察动物的外观表现, 如毛发稀疏度及色泽、精神状况、活动状态、眼神(眼球运动)、饮食、呼吸、睡眠、排便状况等, 来判断其与肾阳虚的符合程度, 同时与假手术组大鼠进行对比, 确定模型是否成功。

**1.4.2 一般生理状态的检测** 每2周取各组大鼠称1次体质量, 测量时间为9:00—10:00时。在给药造模3个月后, 采用多功能大鼠自主活动记录仪测定各组大鼠自发活动次数, 各组尽量平行测定, 每只大鼠先适应5 min, 再测定10 min内的自主活动次数。

**1.4.3 大鼠血清学指标和内脏湿质量的测定** 给药造模2周后, 随机抽取实验组、去卵巢组, 假手术组各6只大鼠, 通过腹主动脉采血5 mL, 将血液静置2 h后, 5 000 r/min离心15 min, 分离血清, 以酶联免疫法测定血中cAMP、cGMP的量, 3个月后,

同法取各组大鼠血清，测定血清中 E<sub>2</sub>、T、ACTH、cAMP、cGMP、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 的水平。采血后，取大鼠肾上腺、胸腺、甲状腺，立即称取质量，并计算每只大鼠所取组织质量同体质量比值，为脏器系数。

**1.4.4 大鼠骨密度和骨矿含量的测定** 3 个月后，取各组大鼠右侧股骨，用生理盐水冲洗后，用生理盐水浸渍的医用纱布包裹，再用预先准备的锡纸包裹，应用双能 X 线骨密度仪对大鼠离体股骨上骨密度及骨矿含量进行检测。

**1.4.5 统计学处理** 采用 SPSS 10.0 软件处理所得数据，选用 ONE-Way ANOVA 进行统计分析，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

**2 结果**

**2.1 大鼠行为学观察**

给药造模 2 周后，实验组大鼠出现毛发竖立、无光泽、卷缩弓背、精神萎靡、怠倦嗜睡、畏寒喜

暖、小便清长、抓取时抵抗力减弱等一系列肾阳虚的表现。第 8 周开始，去卵巢组大鼠也出现了畏寒倦卧、精神萎靡、反应迟钝、大便略稀等肾阳虚症状，但较轻微。相比之下，造模期间，假手术组大鼠毛发光滑，行动活泼，精神状态较好，反应敏捷，大小便均正常。

**2.2 一般生理状态的检测结果**

造模期间大鼠的体质量变化见表 1。实验开始时，各组大鼠体质量无统计学差异，说明分组时遵守组间均衡一致的原则。给药造模后，实验组大鼠的体质量呈缓慢增长的趋势，从第 4 周开始，其体质量与去卵巢组、假手术组大鼠相比具有显著差异。从第 8 周开始，去卵巢组与假手术组体质量相比差异显著。在自发活动方面，实验组大鼠的活动度明显低于假手术组和去卵巢组，去卵巢组大鼠的活动度也低于假手术组，但没有统计学差异（图 1）。

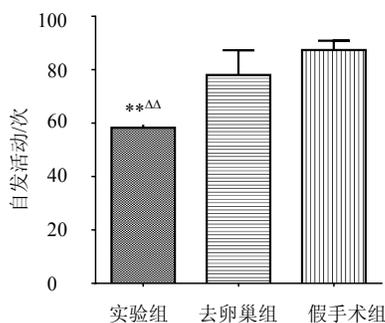
表 1 造模期间各组大鼠体质量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of body weight of rats in each group during modeling ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	体质量/g					
	第 0 周(n=16)	第 2 周(n=16)	第 4 周(n=10)	第 6 周(n=10)	第 8 周(n=10)	第 10 周(n=10)
假手术	233.67±4.73	253.00±6.24	269.00±9.54	303.00±4.58	331.33±5.51	349.60±9.50
去卵巢	241.33±7.55	259.50±9.09	274.00±10.35	292.00±9.63	311.00±9.54*	327.67±4.93*
实验	239.00±8.65	252.67±11.66	250.17±8.18* <sup>△△</sup>	267.17±8.75** <sup>△△</sup>	281.83±8.73** <sup>△△</sup>	305.00±11.10** <sup>△△</sup>

第 0 周指手术前一周；与假手术组比较：\*P<0.05, \*\*P<0.01；与去卵巢组比较：<sup>△△</sup>P<0.01

Week 0 refers to the week before operation; \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs sham operation group; <sup>△△</sup>P<0.01 vs ovariectomy group



与假手术组比较：\*\*P<0.01；与去卵巢组比较：<sup>△△</sup>P<0.01

\*\*P<0.01 vs sham operation group; <sup>△△</sup>P<0.01 vs ovariectomy group

图 1 各组大鼠自发活动次数比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Comparison of locomotor activity of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**2.3 大鼠血清学指标检测结果**

给药造模 2 周后，实验组、去卵巢组、假手术组大鼠血清 cAMP 及 cGMP 水平见表 2。与假手术组相比，实验组大鼠的 cAMP 降低，cGMP 升高，cAMP/cGMP 显著降低，说明肾阳虚模型基本建立。

3 个月后，各组大鼠的血清 cAMP、cGMP、E<sub>2</sub>、T、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 的测定结果见表 3。与假手术组和去卵巢组大鼠相比，实验组大鼠的 cAMP 下降，cGMP 上升，cAMP/cGMP 比值明显下降，符合肾阳虚的指征。同时，该组大鼠血清 E<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、ACTH 水平均显著低于假手术组，T 值较去卵巢组升高，但与假手术组相比没有统计学差异。去卵巢组大鼠血清中 cAMP、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 均较假手术组大鼠显著下降，血清 cGMP、E<sub>2</sub>、T 和 ACTH 水平则未见明显差异。

表 2 造模 2 周后大鼠血清 cAMP、cGMP 及 cAMP/cGMP 比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Comparison on cAMP, cGMP, and cAMP/cGMP levels in serum of rats in each group after two weeks of modeling ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	cAMP/(nmol·L <sup>-1</sup> )	cGMP/(nmol·L <sup>-1</sup> )	cAMP/cGMP
假手术	8.35±0.45	21.05±1.42	0.39±0.04
去卵巢	8.42±0.44	22.82±1.63	0.37±0.01
实验	7.10±0.26*	30.94±2.17**	0.23±0.02**

与假手术组比较：\*\*P<0.01

\*\*P<0.01 vs sham operation group

表3 3个月后各组大鼠血清cAMP、cGMP、cAMP/cGMP、E<sub>2</sub>、T、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、ACTH比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 3 Comparison on cAMP, cGMP, cAMP/cGMP, E<sub>2</sub>, T, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, and ACTH levels in serum of rats in each group three month later ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	cAMP/(nmol·L <sup>-1</sup> )	cGMP/(nmol·L <sup>-1</sup> )	cAMP/cGMP	E <sub>2</sub> /(ng·L <sup>-1</sup> )	T/(ng·mL <sup>-1</sup> )	T <sub>3</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> )	T <sub>4</sub> /(nmol·L <sup>-1</sup> )	ACTH/(ng·L <sup>-1</sup> )
假手术	8.03±0.44	18.98±1.55	0.43±0.06	57.56±1.69	2.16±0.18	63.67±7.05	78.92±1.26	65.79±3.70
去卵巢	7.37±0.32*	18.78±1.24	0.39±0.04	55.30±1.83	1.81±0.24	48.02±7.85*	68.61±5.03*	69.60±3.58
实验	6.74±0.47* <sup>△</sup>	20.31±1.46	0.33±0.03* <sup>△</sup>	49.71±4.08* <sup>△</sup>	2.28±0.22 <sup>△</sup>	42.1±4.82**	69.95±4.33*	54.03±3.38** <sup>△△</sup>

与假手术组比较: \**P*<0.05, \*\**P*<0.01; 与去卵巢组比较: <sup>△</sup>*P*<0.05, <sup>△△</sup>*P*<0.01

\**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs sham operation group; <sup>△</sup>*P*<0.05, <sup>△△</sup>*P*<0.01 vs ovariectomy group

## 2.4 脏器系数结果比较

实验组、去卵巢组大鼠的肾上腺系数及甲状腺系数均显著低于假手术组相应系数, 胸腺系数亦有降低的趋势, 但没有显著性差异。实验组与去卵巢组大鼠比较差异无统计学意义。见表4。

## 2.5 各组大鼠股骨骨密度及骨矿含量的比较分析

3个月造模结束后, 实验组大鼠的骨密度和骨矿含量均显著低于假手术组, 且骨矿含量低于去卵巢组, 见表5。

表4 各组大鼠的脏器系数比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 4 Comparison on organ coefficient of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	肾上腺系数	胸腺系数	甲状腺系数
假手术	0.027 4±0.004 4	0.053 0±0.015 0	0.006 7±0.000 6
去卵巢	0.019 7±0.005 4*	0.049 3±0.028 2	0.004 1±0.001 2**
实验	0.014 9±0.002 4**	0.045 4±0.009 6	0.003 9±0.000 9**

与假手术组比较: \**P*<0.05, \*\**P*<0.01

\**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs sham operation group

表5 各组大鼠骨密度及骨矿含量比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 5 Comparison on BMD and BMC of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	骨密度/(g·cm <sup>-2</sup> )	骨矿/g
假手术	0.175 3±0.005 7	1.643 0±0.337 1
去卵巢	0.141 8±0.014 3**	1.132 0±0.180 7*
实验	0.141 8±0.013 4**	1.066 0±0.147 6* <sup>△</sup>

与假手术组比较: \**P*<0.05, \*\**P*<0.01; 与去卵巢组比较: <sup>△</sup>*P*<0.05

\**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs Sham operation group; <sup>△</sup>*P*<0.05 vs ovariectomized group

## 3 讨论

骨质疏松症是老年人, 尤其是绝经妇女最常见的一种退行性骨代谢性疾病。研究表明, 绝经后骨质疏松症属于肾虚者高达89.92%<sup>[5]</sup>。临床实践中, 骨质疏松症患者表现为腰膝酸软、畏寒肢冷等肾阳虚证者占大多数<sup>[6]</sup>。然而, 目前却没有理想的肾阳虚骨质疏松病证结合动物模型。为了进一步研究肾

阳虚骨质疏松证本质及相关药物研发, 构建一个理想的病证结合动物模型十分必要。

用一定量的外源性糖皮质激素(氢化可的松)使垂体前叶的ACTH释放受到抑制, 从而使肾上腺皮质分泌类固醇激素减少, 动物出现一系列的“耗竭”现象, 如毛发干枯、畏寒喜暖、大便稀溏、小便清长、卷缩弓背、怠倦嗜睡、自主活动次数减少等肾阳虚症状<sup>[7-8]</sup>, 是较为经典的肾阳虚证动物模型。去势模型包括卵巢切除术和睾丸切除术两种方法, 在多种动物上可观察到明显的性激素水平下降, 骨矿含量降低, 骨小梁稀疏变细等改变, 与临床骨质疏松症状相符, 并具有手术简单, 重复性好, 周期短等特点, 是目前复制绝经后及老年性的骨质疏松的经典方法<sup>[9]</sup>。临床证实, 长期大剂量运用糖皮质激素亦可引起内分泌系统功能紊乱及骨质疏松等严重不良反应。本课题组前期试图采用im氢化可的松的方法建立肾阳虚骨质疏松大鼠模型。结果发现, 每天后肢im氢化可的松注射液(5 mg/mL) 20 mg/kg, 连续给药4周后, 大鼠死亡数量过半, 剩余动物状态极度虚弱。检测骨密度与骨矿含量, 与正常组并无明显差异, 说明该造模方法不可行。采用连续2周每天后肢im氢化可的松注射液(剂量同上)造成阳虚后, 第3周开始, 每周给药2次, 持续3个月, 动物未见死亡。3个月后, 与对照组相比, 第2组大鼠血清cAMP、cAMP/cGMP显著下降, 骨密度和骨矿含量与正常组比较未见显著差异。说明减少给药频次后, 糖皮质激素可维持大鼠的阳虚症状, 但不足以造成骨质疏松。因而本实验试图采用去势联合im氢化可的松的方法建立肾阳虚骨质疏松的病证结合动物模型。

检测指标的选择和测定: 下丘脑-垂体-靶腺轴(肾上腺轴、胸腺轴、甲状腺轴、性腺轴)不同环节、不同程度的功能紊乱是肾阳虚证的主要病理环节<sup>[10-11]</sup>, 反映这几个轴功能改变的指标是肾阳

虚证较为特异的指标<sup>[12]</sup>。ACTH水平、肾上腺系数降低反映了下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的紊乱或抑制<sup>[13-14]</sup>。胸腺系数降低反映了下丘脑-垂体-胸腺轴的功能抑制；血清T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>水平，甲状腺系数的降低反映了下丘脑-垂体-甲状腺轴不同程度的功能紊乱<sup>[16-17]</sup>；E<sub>2</sub>、T则体现了下丘脑-垂体-性腺轴功能的改变<sup>[18]</sup>。

另外，cAMP、cGMP是机体内第二信使物质，是调节生理功能、物质代谢和细胞增殖、分化的重要因子<sup>[19]</sup>。cAMP的配基包括多肽类激素，对机体肾上腺皮质激素、甲状腺激素等内分泌激素有一定调节作用，它们之间的改变具有一定相关性，cAMP、cGMP及其比值是反应肾阳虚或阴虚的特异指标。阳虚时cAMP降低，cGMP升高，cAMP/cGMP比值降低<sup>[15]</sup>。骨密度、骨矿含量等是评判骨质疏松动物模型复制成功与否的主要指标<sup>[20]</sup>。

实验结果表明，肌注氢化可的松2周后，实验组大鼠出现毛发枯槁、卷缩弓背、怠倦嗜睡、畏寒喜暖、小便清长、消瘦、自发活动次数减少等一系列阳虚症状，与假手术组大鼠形成对比，按照《中医虚证辨证参考标准》<sup>[4]</sup>中肾阳虚诊断标准，符合要求。同时，实验组大鼠cAMP降低、cGMP升高、cAMP/cGMP比值明显降低，提示该模型为肾阳虚模型。3个月后，与假手术组相比，实验组大鼠cAMP、cAMP/cGMP、E<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、ACTH均显著下降，肾上腺系数和甲状腺系数亦显著降低。其中，cAMP、cAMP/cGMP、E<sub>2</sub>、ACTH水平与去卵巢组大鼠相比差异显著。骨密度和骨矿含量显著降低，且骨矿含量较去卵巢组低，说明肾虚在一定程度上加速了骨丢失。而去卵巢组虽然在造模后期呈现出一定的阳虚症状，但是在自发活动次数，cAMP/cGMP、E<sub>2</sub>、T、ACTH等方面的指标与假手术组相比并无显著差异。

综上所述，去势联合im氢化可的松是建立肾阳虚骨质疏松病证结合动物模型较为有效的方法。

#### 参考文献

[1] 周艳, 扶晓明, 贺栋梁, 等. 不同剂量葛根异黄酮联合VitD对去势大鼠骨质疏松的防治[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(23): 3944-3946.

[2] 夏东胜, 郭盛君, 郭志强, 等. 绝经后妇女骨质疏松程度与肾虚证型的关系[J]. 新中医, 2001, 33(9): 14-15.

[3] 肖静, 何立群, 高建东, 等. 腺嘌呤与氢化可的松大

鼠肾阳虚模型造模方法比较[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 77-80.

[4] 沈自尹, 王文健. 中医虚证辨证参考标准[J]. 临床荟萃, 1987, (4): 189.

[5] 李跃华, 董元龙. 老年人骨质疏松患病率与肾虚证型关系的调查[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(6): 366-367.

[6] 胡永红, 李丽春, 梁燕, 等. 中医药治疗肾阳虚型骨质疏松症研究进展[J]. 河北中医学报, 2012, 27(4): 42-43.

[7] 施明珠, 李有贵, 钟石, 等. 北冬虫夏草对氢化可的松诱导的老龄小鼠肾损伤的保护作用[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 160-163.

[8] 周文江, 姚菊芳, 彭秀华, 等. 肾阳虚证大鼠模型的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2007, 27(4): 242-243.

[9] 富灵杰, 汤亭亭, 戴尅戎. 骨质疏松动物模型的建立和应用[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(2): 270-272.

[10] 钟历勇, 沈自尹, 蔡定芳, 等. 补肾健脾活血三类复方对下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴及CRF基因表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(1): 39-41.

[11] 李勇枝. 中医肾虚证研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 1996, 2(5): 59-63.

[12] 陈英华, 欧阳轶强, 孙琪, 等. 肾阳虚证动物模型规范化研究中诊断指标选择的初步探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(10): 26-30.

[13] 郑小伟, 包素珍, 刘明哲, 等. 金匱肾气丸对肾阳虚大鼠垂体ACTH基因表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(3): 238-240.

[14] 沈自尹. 有关证与神经内分泌免疫网络的研究[J]. 中医学刊, 2003, 21(1): 10-11.

[15] 杨裕华, 李震. 肾阳虚动物模型及其诊断指标研究近况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(5): 40-42.

[16] 林燕萍, 李咏高, 王和鸣, 等. 健骨颗粒对骨质疏松模型鼠垂体-甲状腺轴的影响[J]. 中国骨伤, 2002, 15(3): 30-32.

[17] 王建红, 伍庆华, 刘海云, 等. 肾阳虚大鼠垂体-甲状腺轴功能动态分析[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(6): 751-752.

[18] 何成奇, 谢薇, 熊素芳, 等. 女性原发性骨质疏松肾虚三证与性激素变化关系的临床研究[J]. 华西医学, 2003, 18(1): 14-15.

[19] 苏成虎, 杨新波, 黄正明, 等. 水芹提取物对氢化可的松致肾阳虚小鼠的对抗作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(12): 39-42.

[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.