

鹿骨多肽对地塞米松诱导的骨质疏松大鼠骨微结构的影响

安丽萍¹, 任广凯², 石力强¹, 杜培革¹, 吴丹凯², 苑广信^{1*}

1. 北华大学药学院 微生物与生化药学教研室, 吉林 吉林 132013

2. 吉林大学白求恩医科大学第二附属医院 骨科, 吉林 长春 130021

摘要: **目的** 探讨鹿骨多肽对地塞米松诱导的骨质疏松模型大鼠骨微结构的影响。**方法** 以 im 地塞米松诱导糖皮质激素性骨质疏松 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 模型。同时 ig 不同剂量 (250、125、62.5 mg/kg) 的鹿骨多肽, 连续 75 d。检测血清生化指标; 采用 microCT 方法对胫骨近端骨小梁结构进行三维分析; HE 染色观察股骨远端组织病理形态。**结果** 鹿骨多肽可以增加 GIOP 模型大鼠血清 Ca^{2+} 、骨钙素 (BGP) 水平, 使血清 P^{3+} 、碱性磷酸酶 (ALP) 和甲状旁腺激素 (PTH) 水平下降。鹿骨多肽虽有降低 GIOP 模型大鼠血清降钙素 (CT) 的趋势, 但与模型组比较没有统计学意义。GIOP 大鼠骨小梁变细, 中断、游离端增多, 数量减少, 间隙增宽, 空间结构破坏增加, 而鹿骨多肽的干预能明显改善上述骨显微结构指标。**结论** 鹿骨多肽能够抑制地塞米松诱导的钙磷代谢失衡, 降低 ALP, 升高 BGP, 抑制骨吸收和促进骨形成, 并且改善 GIOP 大鼠病理学改变和显微结构, 对骨质疏松大鼠具有保护作用。

关键词: 鹿骨多肽; 骨质疏松; 糖皮质激素; 地塞米松; 骨微结构; 骨钙素; 碱性磷酸酶; 甲状旁腺素

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)22-4030-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.22.016

Effect of deer bone polypeptides on bone microarchitecture of dexamethasone-induced osteoporosis rats

AN Li-ping¹, REN Guang-kai², SHI Li-qiang¹, DU Pei-ge¹, WU Dan-kai², YUAN Guang-xin¹

1. Department of Microbial and Biochemical Pharmacy, College of Pharmacy, Beihua University, Jilin 132013, China

2. Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Bethune Medical University, Jilin University, Changchun 130021, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of deer bone polypeptides on bone microarchitecture of dexamethasone-induced osteoporosis (GIOP) rats. **Methods** The rats were im given dexamethasone for establishing a rat GIOP model. The rats were ig given deer bone polypeptide with different doses for 75 d. The serum biochemical indexes were classic detection. The three-dimensional analysis of the trabecular structure of proximal tibia was conducted by microCT method; The pathological changes in the morphology of distal femur were observed by hematoxylin. **Results** Deer bone polypeptides could increase serum Ca^{2+} and bone-gla-protein (BGP), decrease serum P^{3+} , alkaline phosphatase (ALP), and parathyroid (PTH) in rats with GIOP. Deer bone polypeptide showed a tendency to reduce the serum CT in rats with GIOP, but the decreasing tendency was not statistically significant compared with the blank control group. The trabecula was thin and ruptured, its free ends increased, its number decreased, its spaces were widened, and the destructed space structures increased in rats with GIOP, while the intervention with deer bone polypeptides could significantly improve the above indexes to evaluate the bone microstructure. **Conclusion** Deer bone polypeptides can inhibit the glucocorticoids-induced metabolism imbalance of calcium and phosphorus, reduce the serum ALP, increase the serum BGP, and inhibit the bone resorption and bone formation in rats with GIOP. Moreover, deer bone polypeptides can improve pathological changes in the microstructure and protect osteoporosis rats.

Key words: deer bone polypeptide; osteoporosis; glucocorticoids; dexamethasone; bone microarchitecture; bone-Gla-protein; alkaline phosphatase; parathyroid hormone

收稿日期: 2016-07-26

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20130727008YY); 长白山药用动植物活性多肽研究与开发国家地方联合工程实验室 (发改高技 2015-3173 号)

作者简介: 安丽萍 (1973—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为长白山药用动植物活性多肽。Tel: (0432)64608281 E-mail: alp960@126.com

*通信作者 苑广信 (1981—), 男, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为药物分析。Tel: (0432)64608281 E-mail: yuanguangxin2007@163.com

糖皮质激素广泛应用于慢性阻塞性肺病、哮喘、风湿免疫性疾病、炎性肠病等多种疾患及器官移植后的治疗^[1-2]。除了直接减少成骨细胞的数量和活性以外,糖皮质激素还可减少钙在胃肠道的吸收,加速钙由肾脏排泄,通过减少性激素分泌,抑制胰岛素样生长因子和前列腺素,产生及影响甲状旁腺激素等环节导致骨量减少^[3-4]。随着糖皮质激素广泛用于临床,糖皮质激素性骨质疏松症(glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP)发病率剧增,仅次于绝经后及老年性骨质疏松症^[5-6]。因此,如何对GIOP进行有效防治已成为临床医生和科研工作者亟待解决的重要课题,其发病机制也越来越得到重视。

鹿骨是常用的中药之一,有着人们所不熟知的一些特殊的功效,鹿骨中含有大量蛋白质、骨胶原、磷脂质、软骨素和磷蛋白,有益于骨形成,促进体内胶原蛋白及弹性蛋白的更新,延缓骨吸收,促进软骨内骨化等过程^[7-8]。此外,鹿骨中亦含有大量矿物质,如钙、镁、铁、锌、钾、铜、磷、硒等,以维持血清中钙、磷、镁等离子的浓度和比例,为骨的再生提供一个适宜的微环境^[8]。骨提取物中主要成分骨多肽具有水溶性强、活性高的特点而备受关注。本研究通过建立地塞米松诱导的大鼠骨质疏松模型,观察鹿骨多肽对大鼠骨质疏松模型预防及治疗作用,利用血清学和组织形态学指标来评价其治疗效果,预期鹿骨多肽能够延缓骨吸收、促进骨形成,起到预防及治疗GIOP的作用。

1 材料

1.1 实验动物

Wistar大鼠,雄性,2个半月龄,体质量(350±20)g,清洁级,由吉林大学亿斯实验动物中心提供,实验动物许可证号SCXK-(吉)20140003。

1.2 药品与试剂

梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 鹿骨(批号201505,经吉林市食品药品检验所王维礼主任药师鉴定)购于吉林市龙潭山鹿业有限责任公司;地塞米松(批号1501212111)为辰欣药业股份有限公司生产;复方鹿茸健骨胶囊(批号14110131)为白求恩医科大学制药厂生产;骨钙素(BGP)、甲状旁腺激素(PTH)、碱性磷酸酶(ALP)、降钙素(CT)、钙(Ca^{2+}) ELISA检测试剂盒,均为基尔顿生物科技(上海)有限公司产品;其他化学试剂均为分析纯。

1.3 实验仪器

microCT μ 100扫描仪,瑞士Scanco公司;酶标

仪,芬兰Labsystems Multiskan MS公司;URIT-8021A生化自动分析仪,优利特电子集团有限公司。

2 方法

2.1 鹿骨多肽的制备

新鲜鹿骨股骨称质量后,清洗剃除毛和脂肪,60℃整骨烘干后,将骨打碎成3~5cm小块,取500g加1000mL蒸馏水浸泡2h,置于压力蒸汽灭菌器中,于121℃提取1h。后用滤布滤过,滤液冷却除脂,收取滤液。滤渣按上述条件再提取1次,合并2次滤液浓缩至500mL。浓缩液于4℃下静置12h,去除上层油脂,滤过,先用胃蛋白酶以酶与底物1:50(质量体积比)在37℃pH2的条件下酶解5h,然后再用胰蛋白酶以酶与底物1:50(质量体积比)在37℃pH8的条件下再次酶解5h后得鹿骨多肽,酶解液经喷雾干燥得鹿骨多肽干粉48.2g,经测定鹿骨多肽干粉中含蛋白质为58.6%,水解度为13.9%。

2.2 动物分组及处理

将48只Wistar雄性大鼠随机分为6组:对照组,模型组,鹿骨多肽高、中、低剂量(250、125、62.5mg/kg)组,阳性药复方鹿茸健骨胶囊组,每组各8只大鼠。除对照组外,其他5组大鼠im地塞米松2.5mg/kg,每周2次,对照组im等体积的生理盐水。造模同时,鹿骨多肽各组分别ig给予鹿骨多肽250、125、62.5mg/kg,阳性药组ig复方鹿茸健骨胶囊(胶囊内容物以双蒸水溶解)540mg/kg,对照组和模型组ig等量生理盐水,各组均每天给药1次,连续75d。

2.3 血清生化指标的检测

末次给药后采用大鼠麻醉后腹主动脉取血法,所取全血静置后,经2000r/min离心10min后取血清,-20℃冰冻保存备用。测定前置室温复融均匀,取上清测定。利用酶联免疫法,按照试剂盒说明书操作步骤检测大鼠血清中 Ca^{2+} 、CT、BGP、PTH、ALP水平;利用生化自动分析仪检测血清磷(P^{3+})水平。

2.4 microCT检测

各组大鼠处死后迅速取出右侧胫骨,去除附着的软组织,然后将骨组织置于4%多聚甲醛溶液中固定。将标本放入样品杯中并固定好,在相同条件(扫描电压70kV,扫描电流200 μ A,层距14.80 μ m,平面分辨率300ms,连续扫描约808层)下扫描。

扫描完成后,选取胫骨膨大处及骨干区域作为感兴趣区,设定三维重建阈值后对各标本感兴趣区行三维重建,分析总体积(TV)、骨体积(BV)、骨体积/总体积(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.Sp)、骨表面积/骨体积(BS/BV)。

2.5 HE 染色

给药结束后,将各组大鼠处死,取左股骨远端 1/3,除净周围附着的组织,然后将骨组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,包埋,切片、染色,制作不脱钙骨切片。

2.6 统计学分析

数据采用 SPSS Statistics V21.0 统计软件进行方差分析及检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对 GIOP 模型大鼠一般状态及体质量的影响

在实验期间,模型组大鼠逐渐出现毛色无光泽、懒动、少食等现象,而对照组和鹿骨多肽高、中剂量组大鼠皮毛光泽较好,活动如常;与对照组相比,模型组大鼠体质量明显降低($P < 0.05$);与模型组大鼠相比,鹿骨多肽中、高剂量组大鼠体质量明显恢复($P < 0.05$),见表 1。

3.2 对 GIOP 模型大鼠血清 Ca^{2+} 、 P^{3+} 、ALP 的影响

模型组大鼠血清 Ca^{2+} 下降,而 P^{3+} 、ALP 明显

表 1 鹿骨多肽对 GIOP 模型大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of deer bone polypeptides on body weight of rats with GIOP ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g
对照	—	522.2 ± 13.6
模型	—	380.4 ± 30.5*
鹿骨多肽	250	447.5 ± 22.8 [#]
	125	443.2 ± 32.2 [#]
	62.5	389.0 ± 26.2
复方鹿茸健骨胶囊	540	390.7 ± 28.5

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, 下表同

* $P < 0.05$ vs control groups; [#] $P < 0.05$ vs model group, following tables are same

增高,与对照组比较差异显著($P < 0.05$);鹿骨多肽高剂量组和阳性药物组血清 Ca^{2+} 有不同程度的增加, P^{3+} 明显下降,与模型组比较差异显著($P < 0.05$),而鹿骨多肽高剂量组血清 ALP 明显下降($P < 0.05$),见表 2。

3.3 对 GIOP 模型大鼠血清 PTH、BGP、CT 的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清 PTH 水平显著升高($P < 0.05$),BGP 水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,鹿骨多肽高、中剂量组大鼠血清 PTH 水平明显降低($P < 0.05$),血清 BGP 水平显著升高($P < 0.05$);鹿骨多肽组虽有降低血清 CT 的趋势,但与模型组比较未见统计学意义。见表 3。

表 2 鹿骨多肽对 GIOP 模型大鼠血清 Ca^{2+} 、 P^{3+} 、ALP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of deer bone polypeptides on serum Ca^{2+} and P^{3+} levels and ALP activities in rats with GIOP ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Ca^{2+} /(μmol·L ⁻¹)	P^{3+} /(mmol·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)
对照	—	533.98 ± 106.72	1.58 ± 0.36	16.29 ± 3.08
模型	—	292.95 ± 83.48*	2.22 ± 0.05*	23.70 ± 5.45*
鹿骨多肽	250	417.35 ± 88.74 [#]	1.66 ± 0.29 [#]	15.99 ± 2.53 [#]
	125	396.24 ± 92.34 [#]	1.81 ± 0.28 [#]	20.12 ± 3.01
	62.5	321.16 ± 90.28	1.95 ± 0.41	23.15 ± 3.10
复方鹿茸健骨胶囊	540	445.69 ± 84.51 [#]	1.83 ± 0.37 [#]	21.75 ± 3.60

表 3 鹿骨多肽对 GIOP 模型大鼠血清 PTH、BGP、CT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of deer bone polypeptides on serum PTH, BGP, and CT levels in rats with GIOP ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PTH/(pg·mL ⁻¹)	BGP/(ng·mL ⁻¹)	CT/(ng·L ⁻¹)
对照	—	64.19 ± 13.77	4.67 ± 0.78	123.50 ± 16.76
模型	—	100.80 ± 10.06*	2.85 ± 0.70*	122.79 ± 13.62
鹿骨多肽	250	73.52 ± 11.35 [#]	5.04 ± 0.26 [#]	114.94 ± 13.40
	125	82.16 ± 14.16 [#]	4.12 ± 0.31 [#]	130.23 ± 18.32
	62.5	92.11 ± 18.24	3.12 ± 0.43	123.56 ± 15.36
复方鹿茸健骨胶囊	540	79.25 ± 17.77	3.97 ± 1.39	125.31 ± 9.98

3.4 对 GIOP 模型大鼠骨微结构的影响

与对照组比较, 模型组大鼠骨微结构指标 Tb.N、BV/TV 显著降低 ($P < 0.05$), 而 Tb.Sp、BS/BV 显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 鹿骨多肽高剂量组胫骨近端的 Tb.N、BV/TV 均明显升高 ($P < 0.05$), Tb.Sp、BS/BV 均明显降低 ($P < 0.05$), 各组 Tb.Th 无明显变化, 见表 4。

3.5 对 GIOP 模型大鼠骨组织形态学的影响

大鼠左股骨远端 1/3 病理切片光镜检查显示, 与对照组比较, 模型组骨小梁数目明显减少, 稀疏断裂, 大部分不能连接成网状, 骨髓腔明显增大, 骨小梁结构出现较大的空白区域, 且可见大量脂肪细胞。而鹿骨多肽组股骨骨小梁明显宽厚, 数目也显著增加, 骨小梁断裂与脂肪细胞少见, 骨小梁光滑, 接近对照组。见图 1。

表 4 鹿骨多肽对 GIOP 大鼠骨微结构的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effects of deer bone polypeptides on bone microstructure in rats with GIOP ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Tb.N/mm ⁻¹	(BV/TV)/%	Tb.Sp/mm	(BS/BV)/m ⁻¹	Tb.Th/mm
对照	—	3.52 ± 0.45	0.33 ± 0.05	0.25 ± 0.03	21.27 ± 3.18	0.07 ± 0.01
模型	—	2.45 ± 0.02*	0.17 ± 0.04*	0.31 ± 0.02*	29.12 ± 4.69*	0.08 ± 0.02
鹿骨多肽	250	3.36 ± 0.38 [#]	0.29 ± 0.06 [#]	0.21 ± 0.04 [#]	21.77 ± 2.40 [#]	0.09 ± 0.01
	125	3.02 ± 0.42 [#]	0.21 ± 0.05	0.24 ± 0.05 [#]	25.96 ± 3.20 [#]	0.08 ± 0.01
	62.5	2.21 ± 0.39	0.19 ± 0.04	0.27 ± 0.03	29.68 ± 4.20	0.11 ± 0.02
复方鹿茸健骨胶囊	540	3.13 ± 0.29	0.23 ± 0.03	0.19 ± 0.03 [#]	27.67 ± 1.30	0.10 ± 0.02

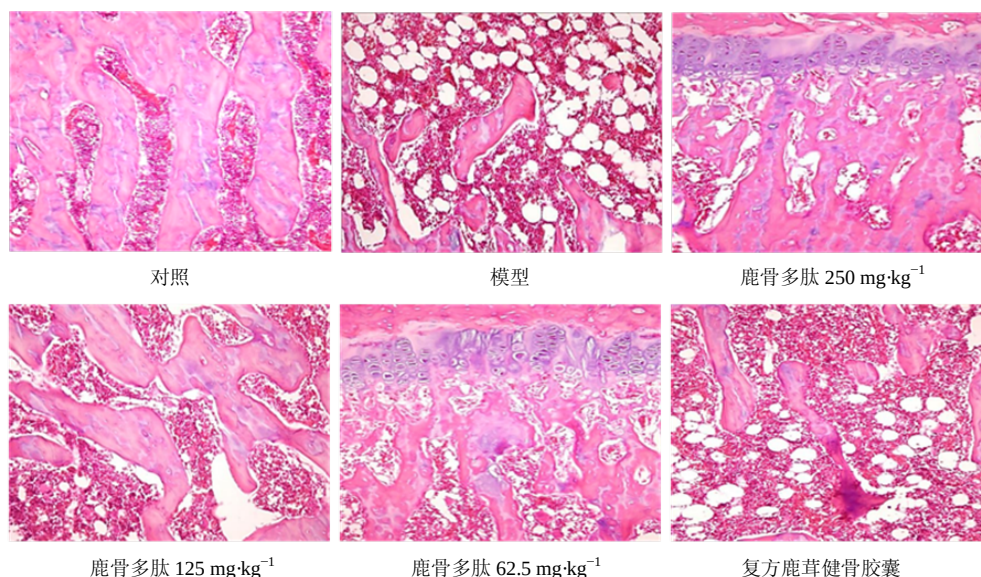


图 1 各组大鼠骨组织 HE 染色

Fig. 1 HE staining of bone tissue of rats in each group

4 讨论

长期大剂量使用糖皮质激素不仅可抑制成骨细胞增殖, 促进其凋亡, 减少骨骼中活性成骨细胞成分, 导致骨生成能力下降, 而且可使成骨细胞不能正常募集到骨侵蚀表面, 使得被破骨细胞吸收的骨面未能及时被修复, 造成骨质丢失, 导致骨质疏松。由于激素所致骨量丢失主要是抑制骨形成为主, 因此, 遏制激素引起的骨质丢失, 关键在于刺激骨形成、促进骨量增加^[9-10]。

本研究利用地塞米松 im 大鼠 75 d 后, 模型组

大鼠血清 BGP 明显降低, 骨矿物质分解, 钙从骨骼流失增加, 骨代谢紊乱。病理结果显示骨小梁稀疏变薄、断裂, 骨髓腔扩大, 脂肪细胞增加, 骨密度降低, 说明 GIOP 大鼠模型已复制成功。血清学评价结果提示, 模型组血清 Ca²⁺明显下降, 是由于短时间内应用较大剂量糖皮质激素, 抑制不同胃肠道部位的钙离子吸收。尤其在十二指肠, 糖皮质激素抑制钙离子的跨细胞转运, 降低钙结合蛋白合成, 进而使肠内钙离子的吸收减少。并且糖皮质激素抑制肾小管对钙离子的重吸收并产生高钙尿症,

导致尿中钙排泄的增加。这种负钙平衡引起代偿性增加血清 P^{3+} 和 PTH 水平^[11]。若造模同时给予鹿骨多肽, 血清生化检查各指标有所改善, 即血清 Ca^{2+} 有不同程度的提高, 血清 P^{3+} 和 PTH 则有明显下降。这些结果表明鹿骨多肽能够抑制地塞米松引起的钙磷代谢失衡。

ALP 是一种磷酸单酯酶, 骨骼中的 ALP 由成骨细胞分泌, 主要集中在骨化部位, 即在骨髓线和骨膜下^[12]。BGP 来源于骨组织, 由成骨细胞合成并分泌到骨中, 是骨组织中非胶原性蛋白的主要成分, 约占骨质蛋白的 3%, 其作用是调节和维持骨钙。BGP 2/3 与羟磷灰石结晶结合, 沉积于骨基质, 1/3 进入血液循环。因此, 血清中 BGP 浓度可特异性地反映它的“母体”成骨细胞的活性^[13]。由于在骨吸收过程中, 基质中的 BGP 又可释放到血液, 所以综合来讲, BGP 是评价骨形成和骨转换率的特异性指标。ALP、BGP 均为骨形成生化指标, ALP、BGP 水平反映了骨形成水平。CT 主要由甲状腺 C 细胞合成和分泌的一种激素, 对骨代谢有重要的调节作用, 通过受体介导作用能抑制破骨细胞的活性^[14]。本实验用 ELISA 法检测了各组大鼠血清中 ALP、BGP 和 CT 的量, 鹿骨多肽组血清 ALP 降低, BGP 升高, 同时也有降低 CT 的趋势, 提示鹿骨多肽具有抑制骨吸收, 降低骨转化率, 使骨形成加强, 进而减少骨量丢失的作用。

骨组织显微结构退化是骨质疏松症的重要特征。骨小梁的数量、密度和空间构象等显微结构影响着骨的生物力学特性, 因此骨显微结构的改变可以更直接地反映骨质疏松的情况。骨组织病理学检测是反映骨显微结构变化的最直接的依据, 评价骨显微结构的金标准^[15]。而 MicroCT 是一种体外无损测量技术, 适用于药物治疗后骨小梁结构的三维分析。本研究同时采用组织病理学检测和 MicroCT 分析, 发现模型组大鼠骨小梁变细、中断、游离端增多, 数量减少, 间隙增宽, 空间结构破坏增加, 而鹿骨多肽的干预能明显改善上述骨显微结构指标, 提示鹿骨多肽对改善显微结构具有一定的疗效。

以上实验均证明了鹿骨多肽可抑制骨吸收和促进骨形成, 具有防治 GIOP 的作用。鹿骨多肽能够抑制糖皮质激素诱导的钙磷代谢失衡, 降低 ALP, 升高 BGP, 抑制骨吸收和促进骨形成。并且改善 GIOP 大鼠病理学改变和显微结构, 发挥对骨的保护作用。

参考文献

- [1] Buttgerit F, Burmester G R, Lipworth B J. Optimised glucocorticoid therapy: the sharpening of an old spear [J]. *Lancet*, 2005, 365(9461): 801-803.
- [2] den Uyl D, Bultink I E, Lems W F. Advances in glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2011, 13(3): 233-240.
- [3] Hallberg I, Bachrach-Lindström M, Hammerby S, et al. Health-related quality of life after vertebral or hip fracture: a seven-year follow-up study [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2009, doi: 10.1186/1471-2474-10-135.
- [4] Kok C, Sambrook P N. Secondary osteoporosis in patients with an osteoporotic fracture [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2009, 23(6): 769-779.
- [5] Cauley J A, Thompson D E, Ensrud K C, et al. Risk of mortality following clinical fractures [J]. *Osteoporos Int*, 2000, 11(7): 556-561.
- [6] Briot K, Roux C. Glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *RMD Open*, 2015, 1(1): e000014.
- [7] 张鹤, 赵雨, 徐云凤, 等. 鹿骨胶原蛋白对去卵巢所致骨质疏松大鼠的治疗作用 [J]. *中药药理与临床*, 2011, 27(5): 76-79.
- [8] 王权, 毛颖, 马春晖, 等. 鹿骨粉治疗大鼠卵巢摘除后所致的骨质疏松 [J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(17): 2861-2864.
- [9] Chen Z, Xue J, Shen T, et al. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis by protecting osteoblasts from apoptosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43(2): 268-276.
- [10] Chen Z G, Xue J Q, Shen T, et al. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(2): 329-338.
- [11] Whittier X, Saag K G. Glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2016, 42(1): 177-189.
- [12] Lindgren J U, Johnell O, DeLuca H F. Studies of bone tissue in rats treated by prednisolone and 1,25-(OH) 2D3 [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1983, 181: 264-268.
- [13] Krasselt M, Baerwald C. An update on glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2016, 141(5): 352-357.
- [14] Modi A, Siris E S, Tang J, et al. Gastrointestinal events and association with initiation of treatment for osteoporosis [J]. *Clinicoecon Outcomes Res*, 2015, 7: 603-613.
- [15] Ritman E L. Micro-computed tomography-current status and developments [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2004, 6: 185-208.