DOI:10.16016/j.1000-5404.202103089

去卵巢小鼠股骨微结构的动态变化研究

邱 宇[1],赵月阳[2],龙志敏[2],汪克建[2],徐 凌[1],贺桂琼[2] 401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医院修复科,口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室,重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室[1];400016 重庆,重庆医科大学基础医学院人体解剖学教研室,神经科学研究中心[2]

[摘要] **目的** 探究去卵巢骨质疏松小鼠术后不同时期股骨微结构的动态变化。**方法** 8 周龄 C57 雌性小鼠分为去卵巢组(ovariectomy,OVX)和假手术组(sham ovariectomy, Sham),并根据术后不同时间将每组小鼠又分为 1 周、1 个月及 3 个月组,分别代表绝经早、中、晚期。称质量后取小鼠股骨进行 HE 染色、免疫组织化学染色及 Micro-CT 扫描分析,评估各组股骨远端松质骨、股骨中段皮质骨微结构及成骨相关蛋白水平变化。**结果** 小鼠松质骨形态参数:与 Sham 组相比,OVX 组术后 1 周骨微结构未见明显破坏,术后 1~3 个月骨小梁断裂,骨髓腔增大,CT 骨参数除 Tb.Th 无明显变化外($P>0.05$),BV/TV,Tb.N 和 Tb.Sp 均出现显著改变($P<0.01$);Sham 组中,直到术后 3 个月才出现较 1 周组骨量显著减少的表现($P<0.01$);OVX 各组中骨丢失情况随时间增加而加重($P<0.05$,$P<0.01$)。Runx2 表达水平与 Micro-CT 松质骨分析结果基本一致。皮质骨形态参数:各时段 OVX 组均未出现较 Sham 组的明显差异($P>0.05$)。**结论** 8 周龄 C57 小鼠在 OVX 术后 1 周至 1 个月松质骨微结构明显受损,早于皮质骨变化,可作为骨质疏松病理机制和防治研究的重点阶段。

[关键词] 骨质疏松;骨微结构;卵巢摘除术;动态变化
[中图法分类号] R-332; R681.02; R713.6 [文献标志码] A

Dynamic changes of femur microarchitecture in ovariectomized mice

QIU Yu[1], ZHAO Yueyang[2], LONG Zhimin[2], WANG Kejian[2], XU Ling[1], HE Guiqiong[2] [1]Department of Prosthodontics, Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401147; [2]Department of Human Anatomy, Neuroscience Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the dynamic changes of femur microstructure in ovariectomized osteoporosis mice at different stages. **Methods** Female C57 mice (8 weeks old) were randomly divided into sham-operation (Sham) and ovariectomy (OVX) groups. Each group was subdivided into 1-week, 1-month and 3-month subgroups on the basis of different postoperative time, which representeing early, middle and late menopause, respectively. The femurs were extracted for HE staining, immunohistochemistry and micro-CT analysis, and the changes in the bone microstructure of cancellous bone in the distal femurs, cortical bone in the middle femurs and the levels of osteogenic associated proteins in each group were evaluated. **Results** Compared with the Sham group, the bone microstructure of the OVX group showed no significant destruction at 1 week after operation, trabecula fracture and bone marrow cavity enlargement from 1 month to 3 months after operation, and significant changes in CT bone parameters BV/TV, Tb.N and Tb.Sp ($P<0.01$, $P<0.001$) except Tb.Th ($P>0.05$). In the Sham group, the bone mass was significantly reduced until 3 months after

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81671257);重庆高校创新团队建设计划资助项目(CXTDG201602006)
[通信作者] 贺桂琼,E-mail: guiqionghe@cqmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

operation compared with that in the 1-week group ($P<0.01$). Bone loss in the OVX groups was worsened in a time dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). The expression level of Runx2 by immunohistochemistry was consistent with the results of micro-CT analysis. No significant differences were found in morphologic indices of cortical bone between the Sham subgroups and the OVX subgroups ($P>0.05$). **Conclusion** Trabecular bone microarchitecture is impaired progressively after OVX operation in 8-week-old C57 mice from 1 week to 1 month, prior to cortical bone. This period can be regarded as the key time for studies on pathogenesis and prevention and treatment of osteoporosis.

[**Key words**] osteoporosis; bone microarchitecture; ovariectomy; dynamic change

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81671257) and the Construction Program of Innovative Research Groups of Chongqing Colleges and Universities (CXTDG201602006). Corresponding author: HE Guiqiong, E-mail: guiqionghe@cqmu.edu.cn

骨质疏松症是一种以骨量降低,骨组织微结构退化、功能减弱为特征,导致骨强度下降,骨折风险增加的一种慢性系统性骨骼疾病[1]。随着人口老龄化进程加快,骨质疏松症的防治成为一项繁重的公共卫生健康工作,且患病率随着年龄增长而增加,尤其在绝经后的妇女中升高,1/3 的女性和 1/5 的男性在 50 岁后会遭受骨质疏松性骨折,这将带给全社会巨大的卫生和经济负担[2-3]。

动物模型在骨质疏松症的病理生理改变、探究新型药物和诊疗方法中扮演着必不可少的角色[4]。目前国际社会较多采用的是成本低、实验周期短、模型成熟和伦理影响更小的去卵巢啮齿类动物作为绝经后骨质疏松模型。小鼠虽然体型较小,存在样本量少的弊端,但越来越多的研究确立了小鼠在绝经后骨质流失方面的巨大价值,且小鼠遗传背景明确,基因组结构与人类非常一致,用转基因和突变小鼠研究某些特异性基因在骨生物力学中的作用具有良好前景。这一点相较于大鼠更具优势[5-8]。目前研究显示,不同小鼠骨质疏松模型构建时机在 4~9 周龄之间,且在去卵巢术后 4 周至 3 个月不同时间点均可观察到股骨近远端和胫骨近端骨微结构变化,但骨丢失的程度和进展变化尚未统一[9-13]。C57 小鼠相比于其他小鼠在同月龄术后骨量丢失最明显,且进一步证明在 C57 小鼠 8 周龄时是造模的适宜时机,此时骨量变化最显著[14]。但是小鼠卵巢摘除后骨质不同时期的动态变化情况目前尚不清楚。

本研究以 C57 小鼠为实验动物,通过双侧卵巢摘除术诱导骨质疏松模型,模拟绝经后不同时期,应用 micro-CT 扫描和骨组织切片染色技术,观察术后不同时间点的骨量和骨组织形态学变化,旨在发现小鼠绝经后骨质动态变化规律,为骨质疏松疾病模型观察提供参考,也可以为筛选疾病防治的最佳阶段提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

7 周龄未孕雌性 C57 小鼠(SPF 级),购自重庆医科大学实验动物中心,分笼后继续于该中心在标准条件下饲养(相对湿度 50%~60%,环境温度(20±2)℃,光/暗周期 12 h),自由饮水及进食。适应性喂养 1 周后,分为去卵巢组(ovariectomy, OVX)和假手术组(sham ovariectomy, Sham)。所有小鼠采用腹腔注射 3.5%水合氯醛麻醉后,以两个背外侧皮肤切口入路,根据分组摘除双侧卵巢或只去除卵巢周围部分脂肪组织作为对照。两组小鼠分别在术后 1 周、1 个月和 3 个月时(分别代表绝经后早期、中期和晚期)处死取材,即 6 个亚组:OVX 1 周,Sham 1 周,OVX 1 个月,Sham 1 个月,OVX 3 个月和 Sham 3 个月组,每组 6~8 只小鼠。各组小鼠称重后处死,剥离双侧股骨并用 4%多聚甲醛固定。右侧股骨用于 Micro-CT 扫描,左侧股骨进行苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining,HE)及免疫组织化学染色。

1.2 组织形态学分析

取小鼠左股骨,剥离周围软组织,用 4%多聚甲醛固定 24~48 h 后用 EDTA 脱钙液(索莱宝,北京)脱钙,直至大头针能轻松插入骨组织内,脱钙完成后进行组织梯度脱水,根据实验所需摆放好标本位置,石蜡包埋,切片(切片厚度 5 μm),然后进行 HE 染色,光镜下观察小梁微结构改变并拍照(DMi8,莱卡,德国)。

1.3 Micro-CT 分析

每组均取 6 只右侧股骨样本进行 Micro-CT 扫描(Scanco,瑞士),以股骨远端生长板近端 0~100 层横切面为评估骨小梁结构的感兴趣区域,股骨中段约 1 mm 长度(100 层横切面)为评估皮质骨感兴趣区域。用 Scanco 分析软件进行三维重建。分析骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV),骨小梁数目

(trabecular number, Tb. N),骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)和骨小梁间隙(trabecular spacing, Tb. Sp),皮质骨面积(bone area, B. Area),皮质骨体积分数(cortical bone volume/total volume, Ct. BV/TV),皮质骨密度(bone mineral density, BMD),皮质骨厚度(cortical bone thickness, Ct. Th)等骨形态参数。

1.4 免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡后用3% H_2O_2 于室温下孵育20 min,漂洗后按照试剂盒说明书操作。滴加一抗并4 ℃下孵育过夜,复温漂洗,滴加二抗,37 ℃孵育30 min,漂洗结束后加入显色液,冲洗,苏木精复染切片,封片。显微镜下(Olympus, Shinjuko, Japan)观察拍照。使用Image J(NIH Image J system, Bethesda, MD, USA)软件进行半定量分析。

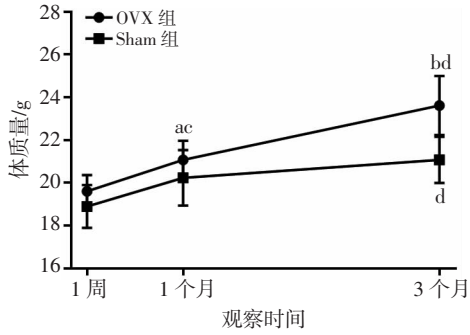
1.5 统计学分析

采用GraphPad Prism 5统计软件进行分析。各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间差异比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 去卵巢术后不同时段小鼠体质量变化

随术后时间增加,OVX各组和Sham各组小鼠在术后1、3个月时均较1周时体质量有所增长($P<0.05$, $P<0.01$)。同时间段OVX组和Sham组比较,OVX组术后1周较Sham组体质量略有升高,但差异无统计学意义,术后1、3个月组小鼠体质量均较同期Sham组显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$,图1)。结果提示去卵巢术后雌激素骤降使小鼠体内成脂能力明显增强。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与同期Sham组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与同组别1周组比较

图1 去卵巢小鼠不同时段体质量变化

2.2 去卵巢术后不同时段小鼠股骨远端组织形态学变化

股骨切片HE染色组织学观察结果显示,OVX组从术后1周到3个月,小梁排列逐渐丧失规则,小梁数量减少间隙变大,OVX 3个月组骨质丢失最严重,OVX 1个月组中可见明显的脂滴形成;同期OVX组与Sham组相比,1周组小梁排列较整齐连续;OVX 1、3个月组比同期Sham组小梁断裂增多,且脂滴也较Sham组略有增加(图2)。

2.3 去卵巢术后不同时段小鼠股骨Micro-CT分析及三维重建

如图3显示,在同期OVX组与Sham组比较中,OVX 1、3个月组BV/TV、Tb. N较Sham组明显降低,Tb. Sp较Sham组明显升高,且差异有统计学意义($P<0.01$);1周组中二者BV/TV、Tb. Sp、Tb. N差异无统计学意义;Tb. Th在各时期均未见显著改变($P>0.05$)。Sham各组从术后1周至3个月,BV/TV、Tb. N和Tb. Sp

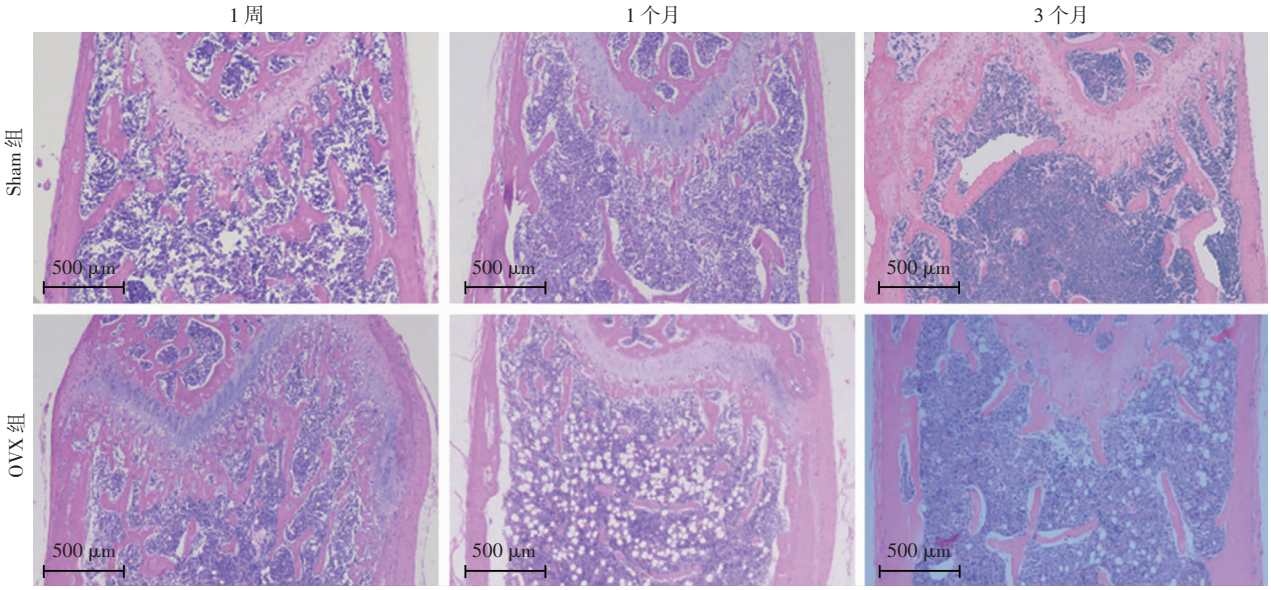
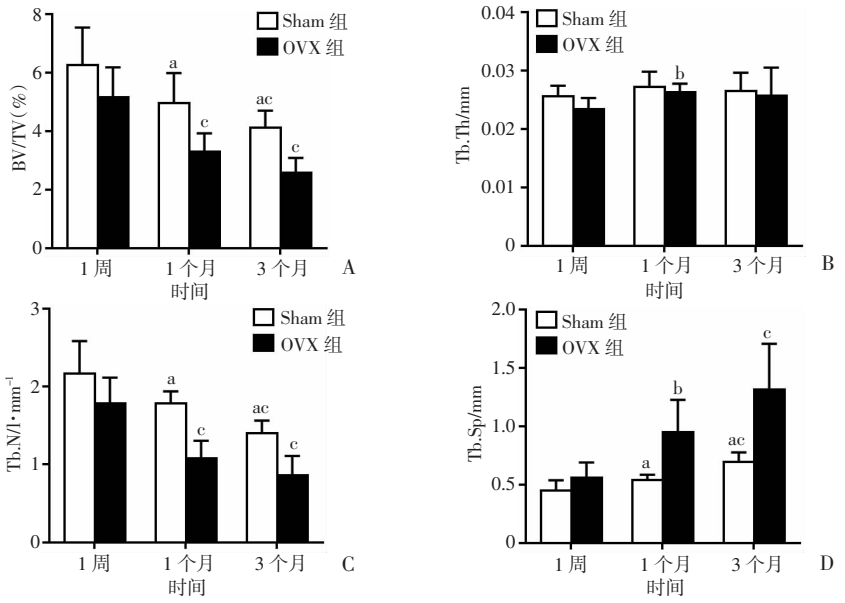


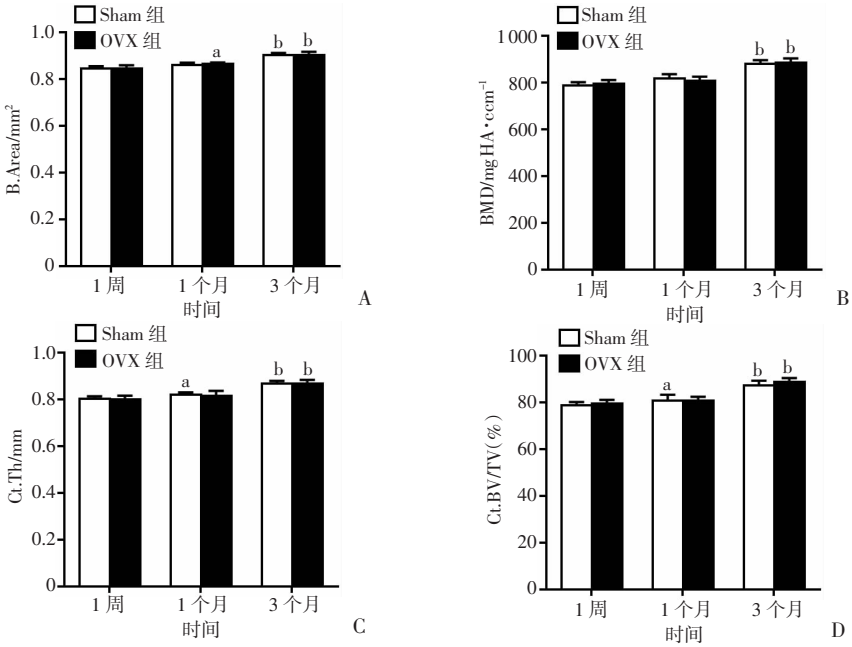
图2 HE染色观察去卵巢术后不同时段小鼠股骨远端病理学变化

有增加或减少趋势,但 1 个月组较 1 周组差异均无统计学意义,3 个月组 BV/TV 和 Tb. N 较 1 周组有所减小而 Tb. Sp 明显增大,差异有统计学意义($P<0.01$)。OVX 各组从术后 1 周至 3 个月 BV/TV、Tb. N 和 Tb. Sp 有显著增加或减少趋势,1、3 个月组较 1 周组差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。Tb. Th 除 OVX 1 个月组较 1 周组略有增加以外($P<0.05$),其余时段均较 1 周组无显著改变。而在皮质骨的各参数变化中(图 4),各时段同期 Sham 组与 OVX 组比较均未发现有明显差异,且 Sham 组和 OVX 组都呈现出随时间增加而各项参数增大趋势,在 Sham 各组中,除 Ct. Th 和 Ct. BV/TV 在 1 个月组较 1 周组有所增加($P<0.05$)以外,其余参数均在 3 个月时出现较 1 周组的显著改变($P<0.01$)。OVX 各组仅发现 B. Area 在 1 个月时较 1 周组有所增大,其他参数也均在 OVX 3 个月时出现较 1 周组的明显改变($P<0.01$)。



A:骨体积分数(BV/TV);B:骨小梁厚度(Tb. Th);C:骨小梁数(Tb. N);D:骨小梁间隙(Tb. Sp);a: $P<0.01$, 与同期 Sham 组比较;b: $P<0.05$, c: $P<0.01$,与同组别 1 周组比较

图 3 骨小梁形态参数结果分析



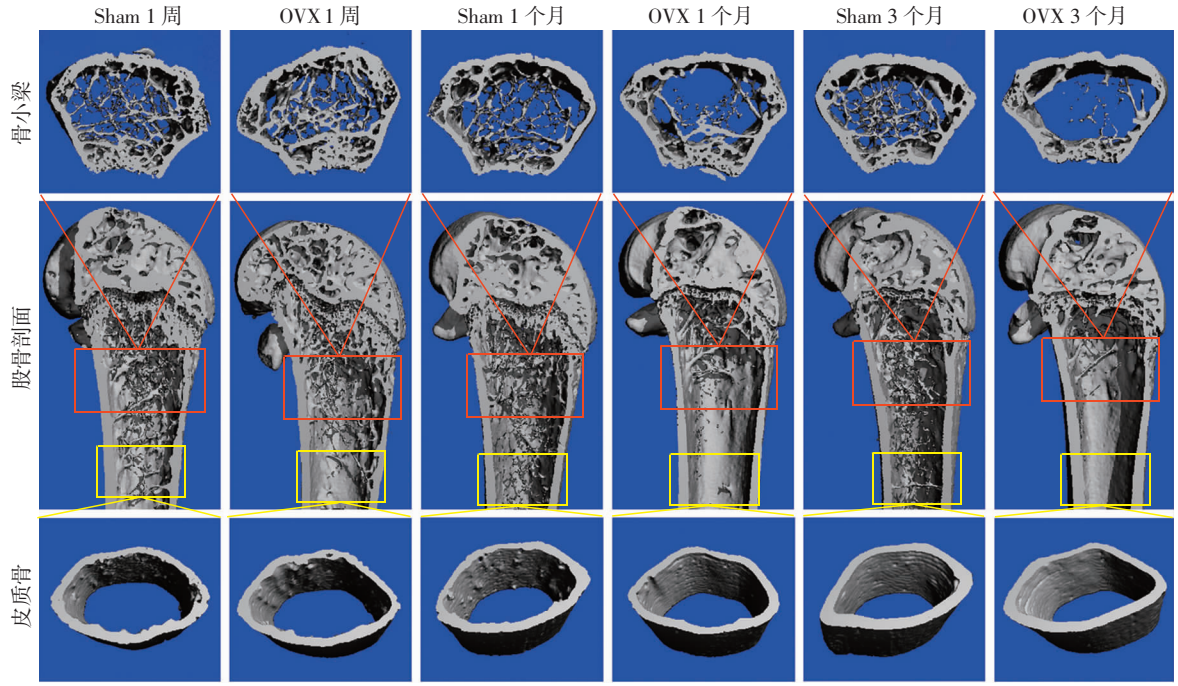
A:皮质骨面积(B. Area);B:皮质骨体积分数(Ct. BV/TV);C:皮质骨密度(BMD);D:皮质骨厚度(Ct. Th)
a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与同组别 1 周组比较

图 4 皮质骨形态参数结果分析

三维重建结果显示在术后 1 周时,骨小梁数量、密度及髓腔空隙未见明显变化;OVX 1、3 个月组较同期 Sham 组骨小梁更加稀疏,且髓腔空隙较 OVX 1 周组进一步增大;Sham 各组从 1 周至 3 个月,随着时间增加,小鼠股骨远端小梁数目和髓腔空隙未见有明显变化,皮质骨未见有明显差异(图 5)。提示去卵巢小鼠至少在术后 1 个月即发生了显著的松质骨丧失。

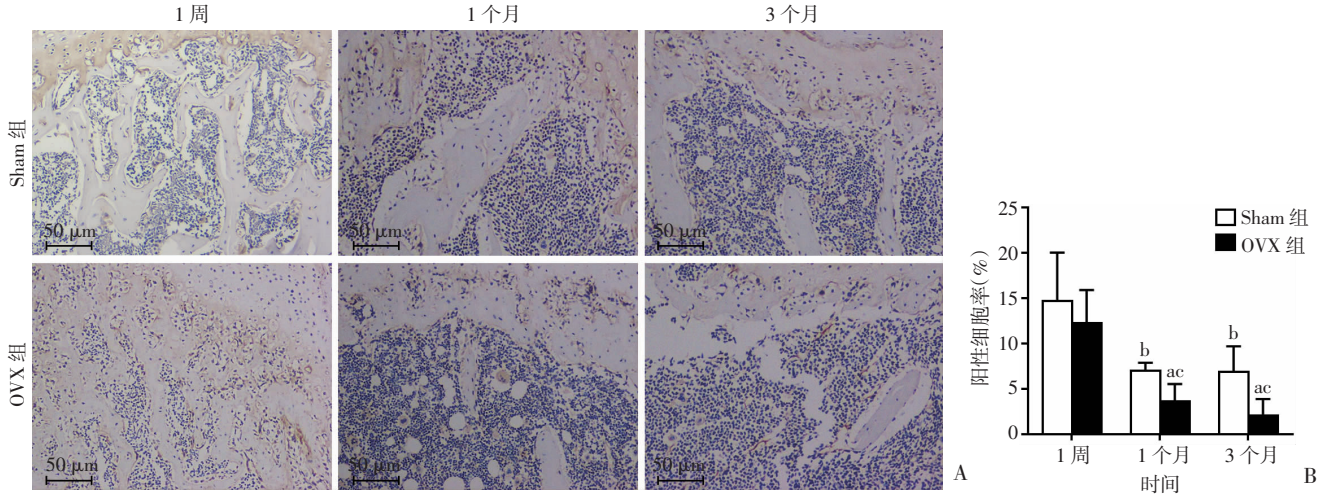
2.4　去卵巢术后不同时段小鼠股骨远端成骨转录因子 Runx2 表达变化

图 6 结果表明,在术后 1 周,OVX 组 Runx2 的表达水平较 Sham 组有所下降,但差异无统计学意义;术后 1 个月及 3 个月,OVX 组较 Sham 组 Runx2 表达出现明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。OVX 各组中,1 个月及 3 个月组 Runx2 表达均较 1 周组有显著下降($P<0.01$);Sham 各组中 Runx2 蛋白表达水平同样随时间下降趋势,但降低程度不及 OVX 组($P<0.05$)。结果说明从去卵巢术后 1 个月开始,成骨相关蛋白 Runx2 出现与骨量减少相一致的表达水平降低。



红框表示骨小梁感兴趣区域;黄框表示皮质骨感兴趣区域

图 5　股骨远端骨小梁及骨皮质 3D 重建



A:免疫组织化学染色标记 Runx2 蛋白;B:Runx2 阳性表达水平结果统计　a:$P<0.05$,与同期 Sham 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与同组别 1 周组比较

图 6　去卵巢术后不同时段小鼠股骨远端 Runx2 表达变化

3 讨论

啮齿类动物卵巢切除后即刻到2周内相当于人类绝经后6个月内,此为绝经早期,卵巢切除3周以后即为绝经中晚期[15]。本实验根据切除卵巢后的不同观察时间点分别模拟人类绝经早期、中期和晚期,假手术组中小鼠体质量随时间自然增长,而去卵巢组小鼠体质量在1、3个月时体质量均比假手术组有明显增加,这与卵巢摘除后体内雌激素撤退,成脂能力增强相关[16]。

Micro-CT分析和HE染色结果说明经去卵巢术后,可成功制备绝经后骨质疏松模型,用于骨质疏松相关疾病的病理机制及药物开发研究。不同的研究由于采用的小鼠种系、周龄大小及观察时间不同,所观察到的骨质疏松表型并非完全一致:WONG等[9]采用4周龄C57小鼠制备去卵巢骨质疏松模型后8周,分析股骨远端、胫骨近端及第一腰椎骨微结构时,虽在股骨远端小梁骨密度、股骨远端及胫骨近端小梁横截面积出现明显减少,但第一腰椎未出现明显改变;YANG等[10]报道9周龄昆明小鼠在摘除双侧卵巢3个月后右侧股骨远端干骺端骨量减少,骨微结构出现明显破坏。8周龄是目前报告较多的模型制备时机,但术后观察时间各有不同。LIANG等[11]观察到8周龄BALB/c小鼠在术后2个月时股骨骨小梁相比于假手术组有明显减少。当对8周龄C57小鼠在术后3个月取材分析股骨近端干骺端骨小梁骨形态参数时也证实其出现了骨丢失[12]。而JANG等[13]同样采用8周龄C57BL/6J小鼠进行实验但将观察时间提前,发现术后4周便出现股骨小梁微结构的显著变化。

在本研究中与同龄小鼠相比,小鼠在绝经早期未出现明显的骨丧失,而随时间延长,到绝经中晚期,可观察到小鼠股骨远端明显的松质骨微结构破坏,骨髓腔隙增大,脂肪细胞增多。假手术组小鼠从术后1周到1个月之间骨微结构并未出现显著变化,假手术组3个月骨量出现轻微下降;去卵巢各组则是从绝经早中期后即发生大量明显的松质骨微结构受损。实验室小鼠通常活2~3年,骨量在4~8个月时达到峰值,随后出现与年龄相关的下降[17-18]。本实验小鼠为8周龄至5月龄大小,小鼠在8周龄时进入体成熟期,激素代谢平稳,可进行实验。但皮质骨形态参数变化似乎整体晚于松质骨变化,Sham组和OVX组都呈现出随时间增加而各项骨参数增大趋势,同时段组二者暂未出现差异。这可能是皮质骨内细胞数明显低于松质骨,雌激素受体ER阳性表达量极低而较少或较晚受到雌激素降低影响的原因[19]。

Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2,Runx2)与骨代谢和骨发育过程密切相关。Runx2作为一种重要的成骨转录因子,负责骨髓基质干细胞向成骨细胞谱分化和成骨细胞成熟[20],在骨质疏松症的病理机制探索及防治中有重大意义。免疫组化染色提示,术后1周左右小鼠Runx2成骨转录因子表达水平较高,说明此时小鼠成骨处于活跃阶段。Runx2可上调前成骨细胞和软骨细胞中的多种矿化相关蛋白基因如Ⅰ型胶原、骨钙素、骨桥蛋白等转录,在成骨分化早期起决定性作用[21-22]。当进入术后1个月时,无论是去卵巢组还是假手术组,Runx2表达均较1周组有明显下降,而假手术3个月和1个月两组间Runx2蛋白水平未见明显差异。表明正常生理状态下即使小鼠骨量仍在增加,可能其成骨活性已趋于平缓。

去卵巢后1周相当于人类绝经早期,此时小鼠未出现明显骨量下降,从术后1周到1个月,骨微结构变化显著,成骨转录活性也在此时期有明显下降,因此该阶段应作为研究骨质疏松病理生理机制改变的重点阶段,而在考虑抗骨质疏松药物筛选时,应该把干预时间尽量安排在术后1个月之内甚至1周之前。

本实验进一步证明了8周龄小鼠骨量稳定,成骨转录活性较高,是适宜的骨质疏松动物模型,去卵巢手术后可以观察到明显的松质骨骨量改变,尤其在术后1个月内,而同时期Sham组骨微结构未出现明显改变。但由于小鼠皮质骨变化并不明显,若是仅仅通过卵巢摘除手术而观察骨量变化,皮质骨并不适宜于和松质骨同期观察。因此,骨质疏松的防治研究可将术后1个月左右作为观察重点阶段,检测小鼠的松质骨各项指标变化,而皮质骨改变可能会受后期衰老等多种因素的影响。但由于小鼠的遗传背景优势,去卵巢小鼠不失为一种探讨受雌激素降低作用而导致包含骨质疏松在内的多疾病交互影响的可供参考的模型。

参考文献:

[1] COMPSTON J E, MCCLUNG M R, LESLIE W D. Osteoporosis[J]. Lancet, 2019, 393(10169): 364-376. DOI:10.1016/S0140-6736(18)32112-3.

[2] YU F, XIA W B. The epidemiology of osteoporosis, associated fragility fractures, and management gap in China[J]. Arch Osteoporos, 2019, 14(1): 1-20. DOI:10.1007/s11657-018-0549-y.

[3] AZIZIYEH R, MO A, HABIB M, *et al*. The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina[J]. J Med Econ, 2019, 22(7): 638-644. DOI:10.1080/13696998.2019.1590843.

[4] BONUCCI E, BALLANTI P. Osteoporosis-bone remodeling and animal models[J]. Toxicol Pathol, 2014, 42(6): 957-969. DOI:10.1177/0192623313512428.

[5] CONSORTIUM M G S, WATERSTON R H, LINDBLAD-TOH K, *et al*. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome[J]. Nature, 2002, 420(6915): 520-562. DOI:10.1038/nature01262.

[6] CAPECCHI M R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century[J]. Nat Rev Genet,2005 ,6(6):507-512. DOI: 10.1038/nrg1619.

[7] HAN S K, KIM D, LEE H, *et al*. Divergence of noncoding regulatory elements explains gene-phenotype differences between human and mouse orthologous genes[J]. Mol Biol Evol, 2018, 35(7): 1653-1667. DOI:10.1093/molbev/msy056.

[8] MAYNARD R D, ACKERT-BICKNELL C L. Mouse models and online resources for functional analysis of osteoporosis genome-wide association studies[J]. Front Endocrinol, 2019, 10: 277. DOI:10.3389/fendo.2019.00277.

[9] WONG K C, PANG W Y, WANG X L, *et al*. Drynaria fortunei-derived total flavonoid fraction and isolated compounds exert oestrogen-like protective effects in bone[J]. Br J Nutr, 2013, 110(3): 475-485. DOI: 10.1017/S0007114512005405.

[10] YANG L L, ZHANG B, LIU J J,*et al*. Protective effect of acteoside on ovariectomy-induced bone loss in mice[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 2974. DOI: 10.3390/ijms20122974.

[11] LIANG X X, HOU Z Q, XIE Y L, *et al*. Icariin promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells and prevents bone loss in OVX mice *via* activating autophagy[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 13121-13132. DOI: 10.1002/jcb.28585.

[12] DING Y, JIANG H J, MENG B Y, *et al*. Sweroside-mediated mTORC1 hyperactivation in bone marrow mesenchymal stem cells promotes osteogenic differentiation[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 16025-16036. DOI: 10.1002/jcb.28882.

[13] JANG S A, HWANG Y H, KIM T,*et al*. Anti-osteoporotic and anti-adipogenic effects of the water extract of Drynaria Roosii Nakaike in ovariectomized mice fed a high-fat diet[J]. Molecules, 2019, 24(17): 3051. DOI: 10.3390/molecules24173051.

[14] ZHOU S, WANG G H, QIAO L, *et al*. Age-dependent variations of cancellous bone in response to ovariectomy in C57BL/6J mice[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(4): 3623-3632. DOI:10.3892/etm.2018.5839.

[15] WANG J M, HOU X, ADEOSUN S, *et al*. A dominant negative ERβ splice variant determines the effectiveness of early or late estrogen therapy after ovariectomy in rats[J]. PLoS ONE, 2012, 7(3): e33493. DOI: 10.1371/journal.pone.0033493.

[16] DANIELSEN C C, MOSEKILDE L, SVENSTRUP B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution[J]. Calcif Tissue Int, 1993, 52(1): 26-33. DOI:10.1007/BF00675623.

[17] CAO J, VENTON L, SAKATA T, *et al*. Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice[J]. J Bone Miner Res,2003 ,18(2): 270-277. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.2.270.

[18] BERGMAN R J, GAZIT D, KAHN A J, *et al*. Age-related changes in osteogenic stem cells in mice[J]. J Bone Miner Res, 1996, 11(5): 568-577. DOI: 10.1002/jbmr.5650110504.

[19] 商敏. 雌激素受体α及β亚型与绝经后骨质疏松的关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(4): 295-299. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2010.04.016.
SHANG M. The relationship between ERα, ERβ and postmenopausal osteoporosis[J]. Chin J Osteoporos, 2010, 16(4): 295-299. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2010.04.016.

[20] 陈伟健, 晋大祥, 谢炜星, 等. Runx2基因参与骨代谢相关通路的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(4): 557-560. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2018.04.028.
CHEN W J, JIN D X, XIE W X, *et al*. Advance in the research of Runx2 gene in bone metabolism-related pathway[J]. Chin J Osteoporos, 2018, 24(4): 557-560. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2018.04.028.

[21] 周年, 林鑫, 陆杨. SIRT1通过β-catenin信号调控干细胞成软骨与成骨分化[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(13): 1308-1314. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202002213.
ZHOU N, LIN X, LU Y. SIRT1 regulates osteogenic and chondrogenic differentiation of stem cells by β-catenin signal[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(13): 1308-1314. DOI:10.16016/j.1000-5404.202002213.

[22] HUANG R L, YUAN Y, TU J, *et al*. Opposing TNF-α/IL-1β- and BMP-2-activated MAPK signaling pathways converge on Runx2 to regulate BMP-2-induced osteoblastic differentiation[J]. Cell Death Dis, 2014 ,5(4): e1187. DOI: 10.1038/cddis.2014.101.

(**收稿**:2021-03-10;**修回**:2021-05-03)

(编辑 王 红)