

EGCG 对去势雌性大鼠骨量丢失的预防作用

干旻峰,宋达玮,邹俊,施勤,罗宗平,杨惠林*

(苏州大学附属第一医院骨科,江苏 苏州 215000)

[摘要] **目的:**研究表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG]早期预防雌性去势大鼠骨量丢失的作用。**方法:**12 周龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠分为 3 组:A 组, 双侧卵巢切除去势术后第 3 天开始连续 12 周以 10 mg/(kg·d) EGCG 腹腔内注射;B 组,仅接受双侧卵巢切除去势术,不接受 EGCG 干预;C 组,假手术组,不接受 EGCG 干预。在实验终点时刻(24 周龄)制作大鼠胫骨和股骨的离体标本用于 micro-CT 扫描,测量骨密度(BMD)和相关骨形态学参数:松质骨组织总量(total bone volume, TV)、骨量(bone volume, BV)、骨体积分数、平均骨小梁厚度、平均骨小梁数量和骨小梁分离度、皮质骨厚度和皮质骨骨体积分数;并对大鼠股骨远端骨组织进行 HE 染色。**结果:**根据 micro-CT 分析,A 组大鼠的 BMD 和骨体积分数显著高于 B 组($P < 0.05$)。A 组松质骨分离度显著低于 B 组($P < 0.05$)。其余骨形态学参数 3 组之间无统计学差异($P > 0.05$)。骨组织学研究显示 C 组松质骨密度较 A 组和 B 组更加致密,A 组松质骨密度则介于 B 组和 C 组之间。**结论:**EGCG 在延缓雌性大鼠骨量丢失方面有积极作用,但是在年轻的雌性大鼠卵巢切除去势后以 10 mg/(kg·d)的剂量预防性腹腔注射 EGCG 并不能完全恢复丢失的骨量。

[关键词] EGCG;骨质疏松;骨量丢失;骨微结构;BMD

[中图分类号] R588

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-475-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150407

Preventive effect of EGCG on bone loss in ovariectomized female rats

Gan Minfeng, Song Dawei, Zou Jun, Shi Qin, Luo Zongping, Yang Huilin*

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Soochow 215000, China)

[Abstract] **Objective:** To study early preventive effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on bone loss in ovariectomized (OVX) female rats. **Method:** Twelve-week-old female Sprague-Dawley rats, were divided into 3 groups: group A received intraperitoneal injection of 10 mg/(kg·d) EGCG 3 days after bilateral ovariectomy for 12 consecutive weeks; group B received bilateral ovariectomy alone; group C, received a sham operation. At the end of the experiment (24 weeks old), the tibias and the femurs were harvested for: ① micro-CT scanning and measurement of bone mineral density (BMD) and bone morphological parameters: trabecular total bone volume (TV), bone volume, (BV), BV/TV, mean trabecular thickness (Tb.Th), mean trabecular number (Tb.N) and trabecular separation (Tb.Sp), cortical thickness, and cortical BV/TV; ② The HE staining of bone tissues from female Sprague-Dawley (SD) rats. **Results:** According to the analysis of Micro-CT, the BMD and BV/TV of group A were significantly higher than the OVX group ($P < 0.05$). The trabecular separation (Tb.Sp) of group A was significantly lower than for group B ($P < 0.05$). There were no significant difference among 3 groups of the rest bone morphological parameters ($P > 0.05$). Bone histological studies indicated that trabecular bone was denser in group C, and the bone morphological status of group A was intermediate between groups A and C. **Conclusion:** EGCG had a positive effect on mitigating bone loss in OVX rats. Early stage supplementation of EGCG at a dose of 10 mg/(kg·d) after the onset of ovariectomy did not entirely eliminate bone loss.

[Key words] EGCG; osteoporosis; bone loss; microarchitecture; BMD

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04):475-479]

[基金项目] 国家自然科学基金(81071451, 81171689, 81301559); 江苏省自然科学基金(BK2011264); 苏州科教兴卫项目(KJXW2012004); 江苏研究生创新计划((CXZZ12-0840); 苏州应用基础研究计划(SYS201211)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yhsuzhou@163.com

随着人口老龄化的不断发展,骨质疏松症已逐渐成为一个全球性的公共健康问题。骨质疏松症的特征有骨密度低、骨质脆性增加和容易发生骨折,尤其是髌部、脊柱和腕部^[1]。绝经后妇女由于缺乏雌激素,往往更容易发生骨质疏松^[2]。尽管目前市场上有各种治疗和预防骨量丢失和骨质疏松的药物,但是进一步开发新的、更经济有效、并发症少的药物仍很迫切。

从干燥的山茶花植物叶子中提取出的绿茶是一种在世界上倍受欢迎的饮品^[3]。茶多酚的抗氧化特性已经被广泛认可,同时它还具备防止癌症、心血管疾病,改善骨结构和增加大鼠空间认知学习能力等作用^[4-5]。流行病学研究报告指出,茶多酚能够在绝经妇女中调节因雌激素缺乏而导致的骨量丢失^[4-5]。儿茶素包含有超过80%的绿茶多酚,其中最为重要的有表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酯(ECG)和其中含有量超过50%的表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)^[6]。在体外试验的支持下^[3,7],关于EGCG对雌性大鼠骨质疏松模型骨微结构退变的治疗作用的体内实验已有报道,他们发现,EGCG能够延缓卵巢切除后雌性大鼠骨量丢失的状况,但是和假手术组相比并没有观测到骨量的完全恢复^[8]。EGCG在去势雌性大鼠模型中的早期应用,是否能够使骨量或骨微结构维持在一个与正常同龄雌性大鼠相似的水平,值得进一步研究。因此,本研究用EGCG早期干预卵巢切除后的雌性大鼠,来评估其在预防骨微结构退变和骨量丢失方面的效果。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级 Sprague-Dawley(SD)大鼠(苏州格瑞斯威生物科技有限公司);EGCG(杭州怡倍嘉茶叶科技有限公司),经高效液相色谱法(HPLC)检测纯度为99%。

1.2 方法

1.2.1 实验分组和设计

选取3月龄雌性未怀孕和无怀孕史的清洁级SD大鼠35只,所有大鼠均饲养于苏州大学实验动物中心(23±1)℃的恒温房内。整个实验过程中,大鼠自由摄食饮水,不限活动。为期1周的适应性饲养后,大鼠称重并分成体重相近的3组,其中A组15只,双侧卵巢切除去势术后第3天开始连续12周以10 mg/(kg·d)的剂量腹腔内注射EGCG,标记

为OVX+EGCG/IP;B组10只,仅接受双侧卵巢切除去势术,不接受EGCG干预,于去势手术后第3天开始以等剂量的生理盐水腹腔注射,标记为OVX;C组10只,为假手术组,即不行双侧卵巢切除术,仅取出与双侧卵巢相似大小的腹膜脂肪组织,于假手术后第3天开始以等剂量的生理盐水腹腔注射,标记为SHAM。每周称重,根据体重及时调整给药剂量。本研究通过苏州大学伦理委员会批准。

1.2.2 去势手术步骤和过程

大鼠以每100 g体重0.3ml的剂量经腹腔注射10%水合氯醛溶液进行麻醉,显露腹腔,用无菌手术缝线,在卵巢与子宫连接的根部行结扎,然后切除卵巢。用同样的方法在对侧行卵巢切除术。术后常规使用青霉素4万U/ml(0.1 ml/只)1次,然后恢复性饲养3 d,并每天观察其存活情况,如有死亡及时处理并记录。接受假手术的大鼠手术暴露过程与去势大鼠相同,但是需保留双侧卵巢,并切除和两侧卵巢体积相似的双侧腹膜后脂肪团块。术后处理同去势组。

1.2.3 检测标本的制备

实验进行12周后,各组大鼠按100g体重腹腔注射0.6 ml 10%水合氯醛溶液进行麻醉处死,称量和记录体重。取出双侧股骨,分离周围肌肉组织等相连软组织。右侧股骨标本保存在4%多聚甲醛溶液中用作组织学评估,左侧股骨标本保存在10%的4℃磷酸盐缓冲液(PBS)中,用作Micro-CT相关骨形态学参数检测。

1.2.4 Micro-CT分析

采用苏州大学骨科研究所的Skyscan 1176型(Skyscan, Antwerp, 比利时)Micro CT机进行扫描,电压50 kV,电流200 mA,层间距设置为18 μm,数据通过相关图形工作站软件采用CT analyzers(Version:1.10.11.0)软件分析。分析时,首先将扫描的原始图像按照标准冠状矢状和横断位置进行重新排列,然后选取中间层面的标准冠状位图作为定位图,从股骨最远端逐层向近端移动,在横断位图上观察股骨远端生长板的出现和消失。将股骨远端生长板消失的最后一层的下一层作为起始层面,在这基础之上,向近端移动50层作为起点,连续分析100层松质骨。之后再向近端移动200层,分析100层皮质骨。因为股骨生长板是一个更为精确的定位层面,由此测量出的股骨形态学参数相比由胫骨测量出的参数更有可比性,同时相关文献支持也采用股骨生长板作为定位层面进行Micro-CT扫描^[11]。分析时

需选择相应的感兴趣区 (region of interest, ROI), 先后以松质骨区域和皮质骨区域作为 ROI 进行分析。然后校正 CT 值。最后开始分析骨密度(BMD)和相关骨形态学参数:松质骨包括骨组织总量(total bone volume, TV)、骨量 (bone volume, BV)、骨体积分数 (BV/TV)、平均骨小梁厚度 (Tb.Th)、平均骨小梁数量 (Tb.N) 和骨小梁分离度 (Tb.Sp), 皮质骨包括皮质骨厚度和皮质骨 BV/TV。皮质骨厚度测量方法为:在选取的皮质骨 ROI 区域的远端起点开始, 即生长板上方 350 层开始, 分析该横断层面的 4 个 4 分位点, 记录数据, 然后向近端移动 100 层, 再分析该层面对应的 4 个 4 分位点, 最后再向近端移动 100 层, 再分析该层面对应的 4 个 4 分位点, 记录总共 12 个点的皮质骨厚度数据, 计算平均值。最后应用 Mimics10.01 软件对图像进行三维重建, 更加直观地表现各组的形态学特征。

1.2.5 骨组织学观察

EDTA 脱钙液: NaOH 11 g, Na₂HPO₄ 2.9 g, NaCl 8.5 g, NaH₂PO₄ 0.29 g 和 EDTA·Na₂ 100 g, 去离子水定容至 1 000 ml, pH 7.2~7.4。

大鼠右侧股骨远端标本经 4% 多聚甲醛溶液固定后, 用 EDTA 脱钙液连续脱钙 6 周, 并每隔 3 d 更换 1 次脱钙液。脱钙成功后的骨组织切片被包埋于石蜡中, 制作成切片, 每层切片厚度为 5 μm, HE 染色, 电子显微镜观察。

1.3 统计学方法

所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 SPSS19.0 软件分析。对于连续性变量, 使用正态性检验和 95% 可信区间 (confidence interval, CI), $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。多组间比较使用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 并进行方差齐性检验。若方差齐性, 则使用 LSD 检验进行两两比较, 若方差不齐, 则使用 Dunnett's T3 检验进行两两比较。

2 结果

2.1 大鼠体重

卵巢切除去势手术以及假手术之前, 各组之间大鼠体重无统计学差异。在实验终点时刻, 即实验大鼠 24 周龄时, B 组大鼠体重大于 C 组。A 组和 B 组之间大鼠体重差异无统计学意义 (表 1), 说明 EGCG 的干预并没有降低去势大鼠的体重。

2.2 骨形态学参数

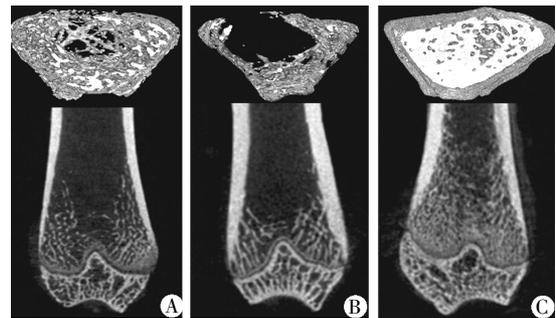
图 1 为大鼠股骨远端 Micro-CT 三维重建图形。由 SD 大鼠股骨远端测得的骨形态学参数显示, C

表 1 干预前后大鼠体重

Table 1 Changes of body weight before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | 干预前 | 干预后 | 差值 |
|-----|----------------|-----------------------------|----------------------------|
| A 组 | 241.83 ± 10.43 | 352.92 ± 14.69 [#] | 111.08 ± 9.89 [*] |
| B 组 | 237.20 ± 9.51 | 361.67 ± 16.39 [#] | 124.44 ± 8.71 [#] |
| C 组 | 239.20 ± 9.74 | 311.10 ± 11.49 [*] | 71.90 ± 9.48 [*] |

与 B 组相比, ^{*} $P < 0.01$; 与 C 组相比, [#] $P < 0.01$ 。



每组均包含 2 张图像, 上方为分析区域的松质骨形态, 下方为 Micro-CT 扫描图像。图中所示松质骨区域均根据大鼠股骨生长板定位, 为生长板向近端消失之后的第 50~150 层。A: A 组; B: B 组; C: C 组。B 组可见骨小梁明显稀疏, 骨小梁数量明显少于 C 组。A 组骨小梁稀疏程度以及骨小梁数目介于 B 组与 C 组之间。

图 1 实验终点雌性 SD 大鼠股骨远端的 Micro-CT 扫描及三维重建图像

Figure 1 Micro-CT analysis and 3D reconstruction image of the distal femur of female SD rats

组的骨密度显著高于 A 组和 B 组 ($P < 0.01$), 且 A 组大鼠的骨密度显著高于 B 组 ($P < 0.05$, 表 2)。在松质骨形态学参数方面, C 组大鼠相比于 B 组有更高的 BV/TV、Tb.Th 和较低的 Tb.Sp ($P < 0.01$), 同时, A 组的 BV/TV 要高于 B 组, 且 A 组 Tb.Sp 低于 B 组 ($P < 0.05$)。Tb.N 在各组之间差异无统计学意义。在皮质骨形态学参数方面, C 组相比于 A 组和 B 组有更高的 BV/TV ($P < 0.05$), 同时, A 组和 B 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在皮质骨厚度方面, 3 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 3)。

2.3 组织学观察

通过对 HE 染色的雌性 SD 大鼠股骨远端骨组织切片进行观察, C 组的松质骨分布以及密度较 A 组和 B 组更加致密。同时, A 组的松质骨分布以及密度优于 B 组 (图 2)。

3 讨论

骨质疏松动物模型包括去势模型、糖皮质激素诱导模型、低钙饲养模型、维甲酸诱导模型和废用型动物模型。其中, 卵巢切除雌性大鼠去势模型已被公认为模拟绝经后妇女骨质疏松症或绝经后骨

表 2 SD 大鼠股骨远端松质骨形态学参数

Table 2 Bone morphological parameters in the trabecular bone of the distal femur in female SD rats

| 分组 | BMD | BV/TV (%) | Tb.Th(mm) | Tb.N(/mm) | Tb.Sp(mm) |
|-----|------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------|----------------------------|
| A 组 | 0.081 ± 0.030 ^{###} | 40.11 ± 10.01 ^{###} | 0.19 ± 0.02 ^{##} | 2.14 ± 0.39 | 0.41 ± 0.12 ^{###} |
| B 组 | 0.046 ± 0.026 ^{##} | 28.93 ± 7.60 ^{##} | 0.17 ± 0.01 ^{##} | 1.70 ± 0.41 | 0.57 ± 0.18 ^{##} |
| C 组 | 0.192 ± 0.034 ^{**} | 81.53 ± 9.17 ^{**} | 0.27 ± 0.05 ^{**} | 2.08 ± 1.63 | 0.13 ± 0.02 ^{**} |

与 B 组相比, *P < 0.05, **P < 0.01; 与 C 组相比, #P < 0.01。

表 3 SD 大鼠股骨远端的皮质骨形态学参数

Table 3 Bone morphological parameters in the cortical bone of the distal femur in female SD rats

| 分组 | BV/TV (%) | 皮质骨厚度 (mm) |
|-----|----------------------------|---------------|
| A 组 | 55.39 ± 3.50 ^{##} | 0.629 ± 0.023 |
| B 组 | 57.51 ± 1.89 [#] | 0.626 ± 0.034 |
| C 组 | 62.86 ± 3.46 [*] | 0.634 ± 0.010 |

与 B 组相比, *P < 0.05; 与 C 组相比, #P < 0.05, ##P < 0.01。

量减少的合适模型。本实验选取 3 月龄雌性未怀孕和无怀孕史的清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 因为: ①本研究主要聚焦于模拟绝经后妇女雌激素减少的状况, 而怀孕哺乳会对骨结构产生影响^[9]; ②卵巢切除雌性大鼠模型能够模拟绝经后妇女雌激素缺乏的状态, 同时这个模型也是在当前被广泛接受, 并用于模拟绝经后妇女骨质疏松状态的模型^[10]。

本实验成功地应用了双侧卵巢切除诱导雌激

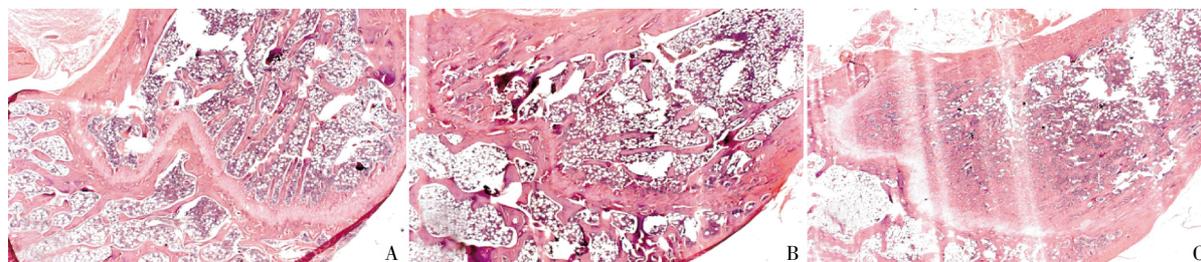


图 2 实验终点雌性 SD 大鼠股骨远端骨组织 HE 染色图像 (×25)
Figure 2 The HE staining of the distal femur of female SD rats (×25)

素缺乏的雌性大鼠模型来评估 EGCG 对于骨微结构骨量丢失的预防作用。正如结果所示, 卵巢切除诱导雌激素缺乏雌性大鼠模型能够对骨骼微结构产生有害影响。实验终点期检测 B 组的松质骨 BMD 和骨体积分数、平均骨小梁厚度和平均骨小梁数量均明显低于 C 组, 而骨小梁分离度高于 C 组, 且差异有统计学意义, 结合 Micro-CT 图像以及组织学观察见 B 组大鼠骨小梁稀疏, 数量减少, 证明卵巢切除诱导的雌激素减少骨质疏松模型成功建立。然而, 在皮质骨形态学参数方面, 皮质骨的骨体积分数以及皮质骨厚度参数在各组之间差异无统计学意义, 但 C 组大鼠皮质骨的骨体积分数以及皮质骨厚度平均值要高于 B 组, 可能由于本实验周期相对较短, 对大鼠皮质骨变化的影响有限。文献报道建立传统的双侧卵巢切除诱导雌激素缺乏模型常使用 12 周龄或者 3 月龄的雌性大鼠^[8,12], 但是也存在文献报道使用小于 12 周龄的雌性大鼠 OVX 模型^[13-14]和年长的约 8 月龄的雌性大鼠卵巢切除去势模型^[15]。当干预性研究纳入了处于生长期的大鼠时, 实验需同

时考虑到大鼠生长对实验结果的影响^[14]。本实验中设置了同龄假手术对照组, 即 C 组, 以及双侧卵巢切除去势组 B 组, 分别作为阴性与阳性对照组, 增强了实验结果的说服力与可信度。

在有关绿茶多酚 (green tea polyphenols, GTP) 的研究方面, Shen 等^[16]发现, 尽管以 0.1% 或 0.5% 的 GTP 溶解于每日饮用水的形式干预 14 月龄大的双侧卵巢切除去势中年雌性大鼠 16 周之后, 大鼠股骨的 BMD 和松质骨以及皮质骨的骨微结构有明显改善, 但是 GTP 干预并没有完全阻止因年龄因素合并雌激素缺乏因素所导致的骨量丢失。与其相似, Chen 等^[8]选取 3 月龄雌性 SD 大鼠, 评估了 0.34、3.4 mg/(kg·d) EGCG 经腹腔注射干预去势大鼠的效果。从造模后 12 周开始连续给药 12 周, 发现 3.4 mg/(kg·d) EGCG 能够延缓去势雌性大鼠的骨量丢失情况, 但是, 在相关骨形态学参数如 BMD、BV/TV、Tb.Th 和 Tb.N 上, 仍然不如假手术组, 相对较晚期的 EGCG 干预不能完全纠正雌性 OVX 大鼠的骨质疏松。

为了获得理想的抗骨质疏松疗效, 对干预对象

采取早期干预是十分重要的,因为早在卵巢切除雌激素缺乏模型建立的最初 3 个月之内,骨结构已经有较为明显的变化,如骨量丢失、骨小梁稀疏等变化^[17]。本实验使用 10 mg/(kg·d) EGCG 来早期干预 3 月龄大的雌性 SD 大鼠,评估 EGCG 对大鼠骨量丢失的早期预防效果和对骨骼质量的保护程度,模拟早期绝经后妇女雌激素减少或缺乏的状态,但不纳入高龄因素^[14,18]。

结果显示,在 B 组中大鼠的股骨远端通过 Micro-CT 观察到 BMD、BV/TV、Tb.Th 的减少以及 Tb.Sp 的增加。相比于 B 组,EGCG 早期干预的雌激素缺乏大鼠(A 组)中表现出骨量丢失的延缓。但是,与 C 组相比,A 组大鼠仍有相对较低的 BMD、BV/TV 和更高的 Tb.Sp。尽管 A 组大鼠的 Tb.Th 和 Tb.N 的平均值要高于 B 组,但两者之间并没有统计学差异。Shen 等^[16]使用 GTP 早期干预接受卵巢切除去势手术后 2 周的中年雌性大鼠,没有观测到骨量丢失的完全恢复。本研究结果与之相似。本研究在皮质骨形态学参数方面以及各组之间的皮质骨厚度参数方面差异无统计学意义,可能由于本实验为早期干预实验,总体实验周期相对较短,对大鼠皮质骨的影响有限。

因此,EGCG 在延缓雌性大鼠骨量丢失方面有积极作用,但是在年轻的雌性大鼠卵巢切除去势后立刻以 10 mg/(kg·d) 的剂量预防性腹腔注射 EGCG 并不能够完全缓解骨量丢失。今后需要进一步探索 EGCG 对延缓骨量丢失的相关作用机制、不同干预剂量,以及在中年大鼠模型中的效果。

[参考文献]

[1] NIH. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy [J]. JAMA, 2001, 285(6):785-795

[2] Saika M, Inoue D, Kido S, et al. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha [J]. Endocrinology, 2001, 142(6):2205-2212

[3] Chen CH, Ho ML, Chang JK, et al. Green tea catechin enhances osteogenesis in a bone marrow mesenchymal stem cell line [J]. Osteoporos Int, 2005, 16(12):2039-2045

[4] Hegarty VM, May HM, Khaw KT. Tea drinking and bone mineral density in older women [J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(4):1003-1007

[5] Shen CL, Wang P, Guerrieri J, et al. Protective effect of green tea polyphenols on bone loss in middle-aged female rats [J]. Osteoporos Int, 2008, 19(7):979-990

[6] Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. Epigallocatechin-3-gal-

late (EGCG): chemical and biomedical perspectives [J]. Phytochemistry, 2006, 67(17):1849-1855

[7] Lin RW, Chen CH, Wang YH, et al. (-)-Epigallocatechin gallate inhibition of osteoclastic differentiation via NF-kappaB [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(4):1033-1037

[8] Chen CH, Kang L, Lin RW, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate improves bone microarchitecture in ovariectomized rats [J]. Menopause, 2013, 20(6):687-694

[9] Bowman BM, Siska CC, Miller SC. Greatly increased cancellous bone formation with rapid improvements in bone structure in the rat maternal skeleton after lactation [J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(11):1954-1960

[10] Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss [J]. Endocrinology, 1989, 124(1):7-16

[11] Shen CL, Yeh JK, Samathanam C, et al. Protective actions of green tea polyphenols and alfacalcidol on bone microstructure in female rats with chronic inflammation [J]. J Nutr Biochem, 2011, 22(7):673-680

[12] Zhang ZG, Bai D, Liu MJ, et al. Therapeutic effect of aqueous extract from Ecliptae herba on bone metabolism of ovariectomized rats [J]. Menopause, 2013, 20(2):232-240

[13] Tantikanlayaporn D, Wicht P, Weerachayaphorn J, et al. Bone sparing effect of a novel phytoestrogen diarylheptanoid from Curcuma comosa Roxb. in ovariectomized rats [J]. PLoS One, 2013, 8(11):e78739

[14] Perilli E, Le V, Ma B, et al. Detecting early bone changes using *in vivo* micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats [J]. Osteoporos Int, 2010, 21(8):1371-1382

[15] Ammann P, Bourrin S, Bonjour JP, et al. The new selective estrogen receptor modulator MDL 103,323 increases bone mineral density and bone strength in adult ovariectomized rats [J]. Osteoporos Int, 1999, 10(5):369-376

[16] Shen CL, Yeh JK, Stoecker BJ, et al. Green tea polyphenols mitigate deterioration of bone microarchitecture in middle-aged female rats [J]. Bone, 2009, 44(4):684-690

[17] Boyd SK, Davison P, Muller R, et al. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by *in vivo* micro-computed tomography [J]. Bone, 2006, 39(4):854-862

[18] Lane NE, Haupt D, Kimmel DB, et al. Early estrogen replacement therapy reverses the rapid loss of trabecular bone volume and prevents further deterioration of connectivity in the rat [J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(2):206-214

[收稿日期] 2014-11-28