

• 综述 •

骨质疏松症研究中动物模型的选择与应用

丁桂芝 周 勇

骨质疏松症(简称OP)研究中动物模型选择的合适与否,不仅关系到实验研究的成败,更重要的是这一模型动物是否能模拟出类似人类骨代谢过程中的各项变化,从而为人类OP的防治研究提供确切可靠的指标。要想回答“那种骨质疏松症动物模型最好”并非容易之事,实验前必须明确实验设计上想要了解或研究的内容,研究者也需了解不同动物种属与人类骨的生物代谢特征,以及疾病对人体的影响等,当你对这些情况了解的越透彻,OP动物模型成功的机率越大。

1 选择骨质疏松症动物模型应注意的因素

1. 骨生长期或成年期:应明确实验动物是处于生长期(干骺端未闭合),还是成年期,如实验目的是研究成年人疾病的过程,使用生长期动物模型,虽然能观察到快速和显著的代谢变化数据,但由于骨代谢状态不同,得到的结果意义不大。

2. 骨成形与重建:骨成形或塑型(modeling)是指动物成熟期前骨的形状和结构的生长变化,许多因素例如骨折的修复过程和生物机械性压力的改变均可影响骨成形。骨重建(remodeling)指的是骨组织中的基本单位新骨取代旧骨的吸收与重建过程,并无骨形状的改变。骨重建包括松质骨的重建和皮质骨的重建。使用大动物模型,采用组织形态学检测方法可比较清楚的观察到这一过程。

3. 骨的几何形状和外膜:虽然动物骨骼与人类骨骼名称相同,但骨的形态,骨密度以及皮质骨与松质骨的成份比例并不完全相同。例如

人类股骨颈骨膜并不完整,因此在动物实验中能显著促进骨膜成骨的药物,用于防治人的股骨颈失骨或骨折时就可能无效。

4. 月经周期与动情期:有人认为有月经周期及雌二醇高峰的人类是遭受雌激素缺乏而引起失骨的典型受害者。无固定月经周期和雌二醇高峰的动物可能只有少量的骨合成(或丢失)与雌激素相关,当雌激素减少时,动物并无明显失骨。目前已知,女性 E_2 水平每月升高1~2天;猴的动情期与人类相似,但其 E_2 水平约为人类的1/2;大鼠每4天 E_2 升高约18小时;狗的 E_2 高峰水平和出现频率均为人类的1/6。

5. 自然绝经期:大多数女性的自然绝经期(绝经过渡期)约持续2~7年。少数女性经历手术后突然绝经,如保留了卵巢功能或采用了雌激素替代治疗,手术或自然绝经者的骨骼改变并无明显差别。成年女性由于绝经而引起的雌激素缺乏导致的快速失骨可持续5~8年。在这个期间内,可见多部位的失骨加速,以后丢失率渐渐减少并进入一个半平台期(semiplateau phase),这些变化主要发生在松质骨和皮质骨内表面^[1]。这种失骨伴随着骨转化的增加和明显的一过性的负钙平衡。

6. 实验结果的判定应慎重:人类某些疾病尤其是骨病的变化时间可达数年或数十年不等,但使用动物模型则可在数周或数月内模仿出类似变化,这些改变是否能真正反映出人类疾病的病变特征仍有待进一步研究,尤其是在观察某种药物的防治作用时更应慎重。

7. 动物模型应符合国家有关主管部门的要求:美国食品与医药管理局(FDA)已颁布了关于治疗OP药物的动物模型标准^[2],基于雌激素缺乏是人类OP的主要原因,FDA规定需

作者单位:美国洛马林达大学,国内工作单位:430022 武汉,同济医科大学附属协和医院

使用卵巢切除后失骨或骨质疏松的动物模型。至少有大鼠和一种大动物的数据结果。所有大鼠实验时间不得少于12个月;其它种属动物则不得少于16个月(约等于人类用药4年的时间)。并要求有组织学检查结果。对实验动物不仅需要检测骨密度和骨转换(骨代谢)生化指标,而且要求同时检测骨骼的生物力学强度。我国目前虽尚未见到主管部门的具体规定,但对新药研制使用的动物模型亦有一定要求,应加以注意。

2 可用于人类OP研究的动物模型

常用的动物包括鸟类、小鼠、大鼠、兔类、狗、猪、羊、猴和狒狒。

1. 鸟类:鸟有生长期和成熟期骨骼,成年雌鸟的每日产卵周期,相当于松质骨的储存与吸收周期,当雌二醇升高时成骨增强,下降时则表现为破骨,对雄鸟给予雌二醇治疗也可引起松质骨的增加。鸟做为动物模型价廉、方便,但由于鸟类无法模拟人类OP的特征性变化,而使其使用明显受限。

2. 小鼠:用小鼠做为OP动物模型研究的报道较少,仅有的几篇报道证实,小鼠卵巢切除后骨骼的变化与大鼠相似,松质骨丢失明显,而无明显的皮质骨丢失^[1]。遗传性卵巢功能低下的雌鼠表现为低骨量^[4],雌激素缺乏性失骨可通过雌激素的替代治疗而得到预防。不同种系的小白鼠骨骼的表现可不一样,最近的研究证实C57BL/6J的小鼠峰值骨量低,而C3H/HeJ小白鼠的峰值骨量高;SAM—P/6(衰老型)小鼠则具有低峰值骨量和中、老年时易发生骨折的特点^[5,6],是目前唯一证实可随增龄出现脆性骨折的动物。如果SAM—P/6小鼠不存在像纤维骨硬化症(Osteogenesis imperfecta)那样的胶原异常,则可能是研究低峰值骨量引起老年性骨折增加的实用动物模型,但这一点目前仍有待进一步研究。

小鼠由于来源方便,价廉,再加上小鼠基因易于调控,近来渐渐受到研究者的青睐,目前认为SAM—P/6、C57BL/6J、和C3H/HeJ小鼠是OP研究的较理想模型,原因不仅在于其峰值

骨量方面的差异特点,更重要的是可借助分子生物学知识和技术,对其基因进行研究,以便找到决定峰值骨量的基因,为在大动物包括人类的研究方面提供有益的经验。但小鼠也存在着可供研究用血清较少,动情期不受下丘脑—垂体轴调节等因素影响。

3. 大鼠:使用大鼠进行OP研究已有很长的时间,第一个提示破骨细胞可以吸收骨的实验数据即由大鼠实验中获得。但由于成年雄性大鼠30个月时骨干骺端仍持续生长,因此使用雄性大鼠的实验研究结果不易被学者广泛接受。对雌性大鼠的研究发现,其骨干骺端闭合明显早于雄性,雌鼠骨长度的增加一般在6~9个月时停止,一般10个月时达峰值骨量^[7]。成年雌鼠由于E₂的周期变化,每四天有一个动情期。1岁以后的雌鼠虽然并未达到绝经期,但已可观察到动情期的逐渐减少和松质骨的丢失。卵巢切除后可见明显松质骨失骨和骨强度降低,并伴有骨转换率增加^[8]。这些变化与人类切除卵巢或自然绝经时的变化十分相似。卵巢切除后的大鼠给予适当的雌激素替代治疗时无明显骨转换增加和失骨^[9],这也与绝经后女性接受雌激素替代治疗时的反应相同。抑制人骨转换的药物如双磷酸盐类和降钙素也同样可以抑制大鼠的骨转换和失骨^[10]。

有些研究者因为价廉,喜欢选用“退休”(产仔后)雌鼠来进行实验,由于大鼠在骨骼未完全成熟前(3~4个月龄时),即可以受孕产仔,到6~7个月龄时,一般已产仔2~3窝,由于孕期和哺乳期对钙的过度需求,抑制了骨骼的正常生长发育,这些大鼠多伴有骨骼生长发育迟缓,后续生长期常使这些鼠在10~12个月时才达到峰值骨量。因此这些“退休”(产仔后)雌鼠的骨骼与未经孕产鼠相比差异较大,如选用这类大鼠来观察促进骨生成或预防骨折药物的作用,常常容易造成错误。

大鼠由于卵巢切除后松质骨的变化和给予雌激素替代治疗后的反应与人类相似,并有足够的健康生存时间供实验研究之用。尽管大鼠存在着哈佛氏单位重建不明显影响了观察皮质

骨的情况,但这并不影响使用大鼠来进行松质骨生成和预防其骨丢失的药物效果观察。骨生物力学测定亦可弥补大鼠缺乏脆性骨折的不足。目前大鼠已成为OP研究中使用最多的动物模型。实验用动物最好选用6~10个月龄的未孕产雌性大鼠,可进行生化检测、组织形态学、骨密度和骨生物力学等多项目的观察研究。

4. 狗:成年狗无论从代谢特点,还是结构特征方面都与人类骨骼相似。狗的皮质骨与松质骨比值与人类接近。哈佛氏单位和松质骨重建与人的形态相似,但狗的重建更快。成年狗对类固醇激素、尿毒症、双磷酸盐、甲状旁腺激素以及制动后的反应也与成年人反应相似。但有关狗卵巢切除后的骨反应报道不一,似乎与人卵巢切除后的反应不一致。目前认为除卵巢切除外,狗是用于OP研究的很好动物模型,优于其他小动物之处在于狗有哈佛氏单位的重建,可用作了解对促进松质骨形成有效药物对哈佛氏单位是否也有相似影响的观察。

5. 猪:猪存在生长期和成年期的骨骼,并有规律性动情期,猪的峰值骨量约在2~3岁时达到,猪曾成功的用于氟化物和运动对骨骼影响的研究^[11]。但由于切除卵巢的猪骨骼变化情况不一,限制了将其做为雌激素缺乏性动物模型的应用。

6. 羊:羊为反刍动物,影响口服药物的药代动力学观察。氟对羊成年骨骼的作用与人类的研究相似,即骨形成增加,骨矿化延迟,氟化钠(5mg/kg·日)时成骨细胞的活性下降^[12]。类固醇性激素引起羊的骨变化与在人类和其他动物模型所见亦相似。但仍需更多的研究结果来判断羊的峰值骨量期,以及是否能做为OP动物模型。如果选用羊来做实验,建议选用8岁以上的。

7. 灵长类动物(猴、狒狒):灵长类动物具有生长期和成年期骨骼,猴与狒狒一般在9~10岁时达到峰值骨量^[13]。其月经周期为28天,与人类相同,自然绝经期约20岁左右。灵长类动物的组织形态学与人类极其相似,也同样出

现增龄性和制动性的失骨^[14,15],灵长类也同时具有松质骨与哈佛氏单位的重建与人类骨骼所见相同。以往关于灵长类动物卵巢切除后骨骼变化的研究,报道不一,可能与选用的动物尚处于骨生长期,结果不能完全反映真实的情况有关^[16]。

目前认为在人工饲养环境下,把灵长类动物和小鼠结合起来进行基因研究是最佳选择,可从不同种属来理解基因是如何调控峰值骨量,从而将这一研究成果应用于人类。由于饲养、来源等多方面的因素,灵长类动物在OP研究其他领域的应用受到一定限制。

8. 其他动物:豚鼠、兔、猫和白鼬等动物用于OP研究方面的报道较少。最近有报道,使用白鼬进行OP研究,具有许多啮齿类动物的优点,如体积小、价廉、易饲养,实验用药量少,见效快等。切除7月龄白鼬的卵巢,3个月后双能X线检测(DXA)显示BMD下降,并有哈佛氏单位的重建。使用甲状旁腺激素治疗后获得了预期的骨重建和骨体积的变化。在对白鼬的研究中发现缩短日照或光照时间,可诱导出与卵巢切除相似的失骨,这一发现有可能使白鼬成为不使用手术方法而获得相似研究结果的动物模型。兔可选择性用于类固醇性OP的研究中。OP动物模型与人类的比较见附表。

3 不同类型的骨质疏松症动物模型的制作

1. 骨吸收增加为主的模型

常用的方法包括:卵巢切除,限制钙或维生素D的摄入,给予高磷饮食,妊娠或哺乳,制动等,也有将卵巢切除与其他方法结合应用以加快失骨的报道。

限制钙摄入是仅次于卵巢切除而使用较多的模型方法,其优于卵巢切除之处在于可以同时诱导松质骨和皮质骨的失骨变化^[17]。关于限制钙摄入可致椎体松质骨形成增加,作者认为与轻度低钙情况下,维生素D₃和继发性甲状旁腺素分泌增加,促进椎体松质骨成骨有关,但甲状旁腺素的分解代谢加强作用是这一实验失骨的主要原因。

附表 OP 动物模型与人类的比较

	人	猴	狗	羊	猪	大鼠	小鼠	鸟类
生长期与成年期	有	有	有	有	有	有	有	有
月经、动情期	28天	21—28天	205天	21天季节性	21天	4—5天 inducible 诱发	每天	每天
自然绝经	有	有	无	?	?	有	有	无
雌激素缺乏性失骨	有	有	±	弱	弱	有	可能有	?
对雌激素治疗反应	骨转换↓	骨转换↓	±	?	?	骨转换↓	骨形成↑	骨形成↑
OP 性骨折	有	无	无	?	?	无	无	无
骨质量重建	有	有	有	有	有	部分	无	无
哈佛氏单位重建	有	有	有	有	有	不明显	无	无
峰值骨年龄	25—30岁	9—10岁	?	?	2—3岁	10月	4月	?

使用某些药物如甲状旁腺激素,甲状腺素和维生素 A(维甲酸)也可致失骨。

制动所致失骨模型的建立已有许多方法,如双侧或单侧 后肢的悬吊,吊尾,切除股神经或大的肌腱切除术等,制动可通过抑制骨形成和促进骨吸收导致松质骨失骨^[14],亦可通过抑制骨外膜成骨和促进骨内膜的重建导致皮质骨失骨^[19]。这种模型的骨大小与假手术对照组无差异,均表现为骨皮质变薄和骨生物力学强度下降。目前认为悬吊大鼠后肢的方法优于神经或肌腱切除,是长期研究中较合适的制动模型。制动与限制钙摄入结合应用可加速失骨^[20]。

2. 骨生成减少为主的模型

骨生成减少的模型将有助于理解低峰值骨量,低骨转化率,积蓄性骨显微结构受损及骨折危险性增加等概念,并可用于筛选对低转换型,骨生物力学强度受损 OP 患者的有效防治药物。人们希望能从更接近于人类实际骨代谢状态下去观察促进骨生成药物的作用,而不希望用切除卵巢大鼠引起失骨加速,同时成骨也加速(约比正常情况快 5 倍)的模型来代替。目前虽有一些动物模型如使用成骨细胞抑制剂——肾上腺皮质激素治疗等可模拟出骨生成减少的变化,但均不够理想。动物真正的骨生成减少比较少见,即使是老年的动物,尽管其骨转换率低于“青年”动物,但也远比老年人快。老年人的骨重建周期可长至数年。人们希望利用早老型动物(实际年龄小,但生物年龄已进入衰老状态的动物),以及采用将卵巢切除和制动方法联合应用的途径,制成骨生成减少的动物模型,模拟出老年 OP 患者骨重建的变化。

参 考 文 献

- 1 Nilas L, Borg J and Christiansen C. Different rates of loss of trabecular and cortical bone after the menopause, in Osteoporosis I (Edited by Christiansen C, Arnaud C.D., Nordin B.E, et al). 1984; 161—163.
- 2 Guidelines for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents Used in the Prevention or Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drug Products, Food and Drug Administration, USA, 1994.
- 3 Edwards M. W., Bam S. D., Bailey M. C et al. 17-β-Estradiol stimulation of endosteal bone formation in the ovariectomized mouse: An animal model for the evaluation of bone targeted estrogens. Bone, 1992; 13: 29—34
- 4 Donahue L. R., Rosen C. J and Beamer W. G. Reduced bone density in hypogonadal mice. J. Bone Miner. Res. 1994; 9 (Suppl. 1) S193.
- 5 Matsushita M, Tsuboyama T, Kasai R, et al. Age-related changes in bone mass in the senescence-accelerated mouse (SAM). SAM-R/3 and SAM-P/6 as new murine models for senile osteoporosis. Am J. Pathol. 1986; 125: 276—283.
- 6 Tsuboyama T, Takahashi K, Matsushita M. et al. Decreased endosteal formation during cortical bone modeling in SAM-P/6 mice with a low peak bone mass. Bone Miner. 1989; 7: 1—12.
- 7 Schapira D, Laton-Miller R, Barzilai D, et al. The rat as a model for studies of the aging skeleton. Cells Mater. 1992; (Suppl. 1): 181—188.
- 8 Wronski T. J., Walsh C. C and Ignaszewski L. A. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. Bone. 1986; 7: 119—124.
- 9 Wronski T. J., Cutrona M, Doherty A. L. et al. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. Endocrinology. 1988; 123: 681—686.
- 10 Harris S. T., Gertz B. J., Genant H. K, et al. The effect of short term treatment with alendronate on vertebral density and biochemical markers of bone remodeling in early postmenopausal women. J. Clin. Endocr. Metab. 1993; 76: 1399—1406.

- 11 Kragstrup J, Richards A and Fejerskov O. Effects of fluoride on cortical bone remodeling in the growing domestic pig. *Bone*. 1989;10:421-424.
- 12 Chavassieux P. Bone effects of fluoride in animal models *in vivo*. A review and a recent study. *J. Bone Miner. Res.* 1990;5:(Suppl. 1):S95-100.
- 13 Jayo M. J, Jerome C. P, Lees C. J, et al. Bone mass in female cynomolgus macaques; a crosssectional and longitudinal study by age. *Calcif Tiss Int.* 1994;54:231-235.
- 14 Jerome C. P, Carlson C. S, Register T. C, et al. Bone functional changes in intact, ovariectomized, ovariectomized, hormone-supplemented adult cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*) evaluated by serum markers and dynamic histomorphometry *J Bone Miner. Res.* 1994, 9: 527-540.
- 15 Aufdemorte T. B, Fox W. C, Miller D, et al. A non human primate model for the study of osteoporosis and oral bone loss. *Bone*. 1993;14:581-586.
- 16 Jerome C. P, Lees C. J, Register T. C, et al. Bone loss in skeletally mature female monkey fed minimal requirement of calcium is accelerated by ovariectomy. *J. Bone Miner. Res.* 1994;9:(Suppl. 1):S259.
- 17 Shen V, Birchman R, Xu R, et al. Short-term changes in histomorphometric and biochemical turnover markers and bone mineral density in estrogen-and/or dietary calcium-deficient rats. *Bone*. 1995;16:146-156.
- 18 Weinreb M, Rodan G. A, and Thompson D. D. Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decreased bone formation. *Bone*. 1989;10:187-194.
- 19 Bagi C. M, Mecham M, Weiss J, et al. Comparative morphometric changes in rat cortical bone following ovariectomy and/or immobilization. *Bone*. 1993;14:877-883.
- 20 Weinreb M, Rodan G. A and Thompson D. D. Immobilization-related bone loss in the rat is increased by calcium deficiency. *Calcif. Tissue Int.* 1991; 48:93-100.

(上接第 63 页)

- 4 Nefussi JR. PGE2 stimulates bone resorption and formation of bone *in vitro*: Differential responses of the periosteum and the endosteum in fetal rat long bone cultures. *Anatomical Record*. 1985;22:9.
- 5 Brown TJ. Comparison of age and sex related change in cell nuclear estrogen-binding capacity and progesterin receptor induction in the rat brain. *Endocrinology* 1990, 126(6), 2856.