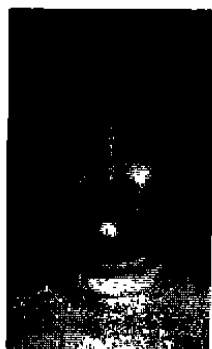


建立骨质疏松山羊模型初探

李 良 陈槐卿 陈孟诗 谭建三 吴文超 翁玲玲 郑 虎



摘要 为了建立一个方便、经济、有效的绝经后骨质疏松大动物模型,本文选用了雌性成都山羊 10 只,5 只为对照组,5 只被切除双侧卵巢(OVX);动态观察术后 60 天,120 天和 180 天髂骨骨活检组织的病理形态学变化;术后 90 天、180 天血清骨钙素(BGP)的变化,以及术后 180 天长骨的骨密度、长骨整体骨弯曲结构力学性能和皮质骨骨试件的弯曲、压缩、拉伸材料力学性能的改变。结果显示:在整个研究过程中,对照组的骨组织结构维持相对稳定,而 OVX 组在术后 60 天即出现轻度骨小梁减少,术后 120 天到 180 天,骨小梁数量进一步减少,宽度变薄,骨小梁间距扩大,呈典型的骨量减少病理学改变。在 OVX 组中,血清 BGP 术前术后无显著性差异($P>0.05$)。术后 180 天相应各长骨的骨密度、断端骨组织厚度、整体骨弯曲破坏荷载与弹性模量明显低于对照组($P<0.05$);除股骨外,各长骨整体骨的弯曲极限强度以及骨试件的弯曲、压缩、拉伸的极限强度和弹性模量明显低于对照组($P<0.05$)。本实验结果提示切除双侧卵巢雌性山羊可能是研究绝经后骨质疏松的经济而有效的大动物模型。

关键词 山羊 卵巢切除术 骨质疏松 生物力学 大动物模型

目前有关女性绝经后骨质疏松的病因学,发病机理仍不十分清楚,因此对该病亦无十分有效的监测手段和防治措施。为了对绝经后骨质疏松症的发病机理进行深入研究,为了研制治疗和预防骨质疏松的新药,为了进行骨质疏松性骨折后的骨置换手术研究等均需要一种合适的骨质疏松大动物模型。Newman 等^[1]提出绵羊作为绝经后骨质疏松动物模型具有其独特优势。但未见有山羊作为骨质疏松动物模型报道。本文采用雌性成都山羊,切除双侧卵巢,尝试建立较符合停经后骨质疏松特征的动物模型,以期对绝经后骨质疏松的防治研究,提供一种合适、有效、结果稳定可靠、经济方便的骨质

疏松大动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物:选用 1.5 岁左右健康雌性成都山羊 10 只,平均体重 22kg。随机分为两组:①对照组:5 只,不作任何手术处理;②双侧卵巢切除组(OVX):5 只,在无菌条件下用动物专用麻药 846(中国人民解放军农牧大学军事兽医研究所出品)肌注麻醉,经腹腔切除双侧卵巢。术后用青霉素肌注预防感染。两组动物均在相同环境中饲养 180 天,自由摄水摄食。饲料由华西医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验方法:两组动物于术前、术后 90 天、180 天抽取颈静脉血液作骨钙素(BGP)测定。并分别于术前,术后 60 天、120 天、180 天在消毒麻醉条件下取髂前上嵴骨组织活检,作骨组织病理形态学观察。术后 180 天处死动物,分别取出双侧股、胫、跖、肱、挠、掌骨作骨生物力学指标,骨密度和骨几何参数测定。

本文为国家自然科学基金重点课题

作者单位:610041 成都,华西医科大学生物医学工程研究室(李良 陈槐卿 吴文超);四川联合大学生物力学研究所(陈孟诗);华西医科大学公共卫生学院病理教研室(谭建三);华西医科大学药学院(郑虎 翁玲玲)

1.2.1 血液 BGP 测定:抽取血液,分离血清,采用放射免疫法测定血中 BGP 含量,药盒由北京东亚免疫技术研究所提供。

1.2.2 骨组织病理形态学观察:骨活检组织采用常规甲醛固定,脱水,脱钙,石蜡包埋,切片(片厚 $3\mu\text{m}$),HE 染色,在光镜下作骨组织病理形态学观察。

1.2.3 骨生物力学参数测定:分别取各长骨整体骨和密质骨试件,在国产小型万能实验机上进行整体骨三点弯曲试验和骨试件三点弯曲、拉伸和压缩试验;采用函数记录仪记录荷载—跨中挠度曲线,并根据应力—应变公式,计算出相应的力学参数:

$$\sigma_{\max} = M/W, \sigma_c = P/A;$$

$$\sigma_T = P/A, E = \sigma_b/\epsilon;$$

式中 $\sigma_{\max}$ —弯曲极限强度, M —弯矩, W —截面抵抗矩, σ_c —压缩极限强度, P —压力(拉力), A —面积, σ_T —拉伸极限强度, E —弹性模量, σ_b —弹性极限, ϵ —应变。

1.2.3 骨几何参数与骨密度测定:采用游标卡尺测定长骨中份周径、冠状面和矢状面直径;以及断端(一般在中份断裂)密质骨厚度。采用阿基米德原理测定骨密度。

1.3 统计学处理:各项测定指标均采用均数±标准差表示($\bar{x} \pm s$),组间差异行 t 检验,选用 $P < 0.05$ 为统计学显著性界值。

2 结果

2.1 血液 BGP 变化

术前 OVX 组血液 BGP 为 3.1787 ± 2.3826 (ng/ml),而对照组 BGP 为 4.1 ± 1.8621 (ng/ml),两者相比无显著性差异($P > 0.05$)。OVX 组术后 90 天, BGP 为 2.878 ± 1.5187 (ng/ml);术后 180 天 OVX 组 BGP 为 2.14 ± 1.0816 (ng/ml);两者分别与对照组 BGP 和 OVX 组术前 BGP 相比,无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 卵巢切除后不同时段骨组织病理形态学变化

对照组山羊骨活检组织的骨结构形态在各个实验阶段表现相似,骨小梁丰富,相互连接成网,见图 1。在术前,OVX 组骨组织结构形态与对照组相似。术后 60 天,可见骨小梁数量轻度减少,相互连接分离,如图 2 所示。术后 120 天到 180 天,骨小梁进一步减少,骨髓腔扩大,在 180 天出现钮扣样变,见图 3,4。



图 1 切除卵巢前。髂前上嵴骨组织中骨小梁丰富,相互交连成网。HE 10×4



图 2 切除卵巢后 60 天。骨小梁数量轻度减少,相互连接分离。HE 10×4

2.3 长骨几何参数与骨密度的变化

术后 180 天,OVX 组各长骨的冠状径、骨厚度和骨密度均明显低于对照组($P < 0.05$);



图3 切除卵巢后120天。骨小梁变细,数量进一步减少,骨髓腔扩大。HE 10×4



图4 切除卵巢后180天。骨小梁数量显著减少,骨小梁间距增宽,呈典型的骨量减少病理改变。HE 10×4

而矢状径无明显变化,见表1。

2.4 骨生物力学参数的变化

术后180天,OVX组长骨的整体弯曲破坏荷载,弹性模量和弯曲极限强度明显低于对照组($P<0.05$)。除股骨外,OVX组其余各长骨密质骨试件的弯曲极限强度、弹性模量、压缩

极限强度均明显低于对照组($P<0.05$)。而肱骨和桡骨的压缩弹性模量无明显变化,其余各长骨压缩弹性模量则明显低于对照组($P<0.05$)。在拉伸实验中,仅有跖骨,肱骨和掌骨极限强度明显比对照组降低($P<0.05$),其他各长骨拉伸极限强度无明显变化,见表2,3。

表1 骨几何参数($\bar{x}\pm s$)

类 别	对照组(n=5)				实验组(n=5)			
	矢状径(mm)	冠状径(mm)	骨厚度(mm)	骨密度(g/cm ³)	矢状径(mm)	冠状径(mm)	骨厚度(mm)	骨密度(g/cm ³)
股	15.8250±1.632	18.3500±1.426	3.4143±0.140	2.0953±0.027	15.3250±3.858	16.8250*±0.708	1.7188*±0.433	1.9709**±0.019
胫	14.3780±0.819	15.7750±0.761	3.0319±0.134	2.0802±0.053	17.8500±0.536	15.4800*±0.608	2.3594**±0.205	1.9860**±0.021
跖	11.1725±0.770	12.6500±0.726	2.5028±0.165	2.0500±0.048	10.9000±0.434	11.5000*±0.500	1.7719**±0.355	1.8775**±0.036
肱	17.0000±0.707	19.8875±1.337	2.4469±0.138	2.0257±0.075	15.8500±0.641*	17.5625*±0.304	1.7913*±0.356	1.9198**±0.040
桡	10.9375±0.538	18.6500±0.972	2.5998±0.181	2.0372±0.033	10.6250±1.603	16.2125**±0.281	2.0741*±0.364	1.9508**±0.021
掌	10.4375±0.524	15.9375±1.225	2.5094±0.101	2.0115±0.013	10.7000±0.316	14.0867*±0.675	1.6942**±0.199	1.8531**±0.056

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$,均与对照组相应骨比较

表2 整体骨弯曲力学性能参数($\bar{x}\pm s$)

类别	对照组(n=5)			实验组(n=5)		
	破坏荷载(kg)	极限强度(MPa)	弹性模量(Gpa)	破坏荷载(kg)	极限强度(MPa)	弹性模量(Gpa)
股	258.8611±38.9243	142.2475±36.4718	16.8651±5.1043	147.4745*±53.4647	114.1425*±39.8373	7.2530**±1.8855
胫	271.3125±15.8341	162.4825±28.9585	15.5097±3.9286	166.8750*±25.9468	123.7113*±9.6539	6.6685**±0.6759
跖	209.3750±51.2955	288.1762±20.56466	14.2907±1.2607	123.7500*±21.3600	200.1969*±32.1872	8.1794**±1.8141
肱	290.6250±19.1293	124.3569±6.6753	12.1380±3.8835	154.5313**±45.9234	100.1071*±11.8966	5.9803*±0.8310
桡	257.9688±38.0067	230.4298±13.5039	11.9750±2.8582	146.7188**±22.6982	172.9330*±18.1418	7.4321*±1.0567
掌	229.3750±33.7395	260.0817±12.3171	12.7679±1.2853	115.6250**±16.4689	170.5157*±25.4420	6.8254**±0.7133

注:与对照组相应骨比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表3 密质骨骨试件弯曲、压缩、拉伸力学参数变化($\bar{x} \pm s$)

类别	对照组(n=5)					实验组(n=5)				
	弯曲		压缩		拉伸	弯曲		压缩		拉伸
	σ_{max} (MPa)	E (GPa)	σ_{max} (MPa)	E (GPa)	σ_{max} (MPa)	σ_{max} (MPa)	E (GPa)	σ_{max} (MPa)	E (GPa)	σ_{max} (MPa)
股	193.328 ± 19.71	5.692 ± 4.15	129.173 ± 21.97	7.782 ± 1.44	92.843 ± 21.71	178.984 ± 23.67	15.639 ± 1.73	109.823 ± 12.62	5.548* ± 1.26	81.735 ± 17.94
胫	248.545 ± 16.87	17.108 ± 1.19	144.950 ± 11.73	8.204 ± 0.39	126.858 ± 24.70	206.142* ± 26.36	13.898* ± 2.35	122.060* ± 99.38	6.349* ± 1.00	114.746 ± 14.38
距	241.172 ± 34.24	15.926 ± 3.30	138.814 ± 7.999	7.585 ± 1.12	137.700 ± 29.19	168.087* ± 34.81	11.545* ± 1.87	104.977* ± 19.13	4.698* ± 1.15	96.178* ± 23.71
趾	216.406 ± 26.17	18.338 ± 3.40	135.890 ± 9.882	6.946 ± 1.52	105.722 ± 11.34	166.733* ± 21.79	14.446* ± 2.04	118.834* ± 9.612	6.610 ± 1.77	81.916 ± 10.99
掌	244.828 ± 20.45	11.940 ± 2.75	130.870 ± 5.702	6.404 ± 1.24	132.858 ± 21.58	176.028* ± 37.77	10.098* ± 2.06	110.643* ± 12.55	5.627 ± 1.65	112.886 ± 25.81
掌	249.125 ± 19.95	14.020 ± 1.53	143.143 ± 12.35	8.095 ± 2.43	136.873 ± 27.19	172.579* ± 46.37	10.589* ± 1.43	109.283* ± 21.22	4.204* ± 1.32	92.383* ± 22.35

注:与对照组相应骨比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 讨论

目前对于绝经后骨质疏松的发病机理尚未完全清楚。深入地进行此病的发病机理研究,尤其是在细胞分子水平上进行这种研究,是当前该领域基础研究的重要课题;研制治疗和预防骨质疏松新药,首先必须在动物身上进行药物疗效试验;研究骨置换手术治疗骨质疏松骨折,也要先进行动物实验,这些均需建立绝经后骨质疏松动物模型^[2]。至今国内外有关绝经后骨质疏松研究大多采用大鼠模型。由于骨质疏松是一种退行性疾病,药物疗效试验需要数年的观察,在整个观察过程中需要经常抽取血液标本和采取骨组织活检标本。而大鼠由于体积太小,不能多次取血和骨标本,另外鼠骨皮质缺乏Haversian系统,不适合于卵巢切除后对皮质骨影响的研究^[1]。美国、日本都规定凡治疗骨质疏松的新药,在临床应用前均要有在切除卵巢的大鼠和切除卵巢的大动物模型上疗效肯定的评定报告^[4,5]。近年来国外已有报道采用狗、猪、非人灵长类作大动物模型。Newman^[1]等指出,从多方面因素看,绵羊是一种极具潜力的骨质疏松模型动物。绵羊温顺,容易处置和圈养,相对较便宜,能大量购到,能取大量血尿标本,反复骨活检没有困难,并且绵羊的髂嵴骨组织结构与人的相似。秋季冬季多次发情,自发性排卵,

激素分泌情况与人相似。Turner^[6]采用母绵羊建立去卵巢骨质疏松模型,发现在双侧卵巢切除后6个月髂骨骨小梁容量(BV/TV,%),骨小梁厚度明显低于手术前($P < 0.01$);骨小梁间距则明显高于手术前($P < 0.01$)。因此他们认为与其它动物如狗、猪、非人灵长类相比,绵羊可能是一种更具有实用价值,更经济的大动物模型。

山羊在种属上与绵羊十分接近。本文所用的山羊就产在成都附近,易于购得,价格相对便宜;因此我们选用雌性成都山羊,切除双侧卵巢,建立骨质疏松模型。本实验结果与Turner等的结果相符合。这说明雌性山羊切除双侧卵巢后由于雌激素水平降低或缺乏,导致骨质疏松,与妇女绝经后雌激素缺乏引起的骨质疏松具有一致性;山羊亦可能是一种研究绝经后骨质疏松的经济而有效的大动物模型。

本实验是初步探索,检测指标并不十分完善,为了进一步证实该模型的有效性,需要深入观察与骨代谢有关的血液生化指标,骨组织形态计量学指标和用双能X线吸收法(DXA)测定的骨密度等指标,同时亦应考虑季节、年龄等因素对所测指标的影响。有关这方面的工作,目前正在进行之中。

参 考 文 献

1 Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep

- for the study osteopenia, Current status and comparison with other animal models. *Bone*, 1995, 16(4), suppl: 2775-2845.
- 2 Rodgers JB, Faugere M-CM, Malluch H. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone*, 1993, 14: 369-377.
 - 3 Food and Drug Administration, Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of metabolism and endocrine drug products. Draft, April, 1994.
 - 4 日本厚生省. 关于骨质疏松症治疗药物临床评价方法的指导原则. 平成 7 年, 1995.
 - 5 Turner AS, Park RD, Aberman HM, et al. Effects of age and ovariectomy on trabecular bone of the proximal femur and iliac crest in sheep. Proceeding of the 39th annual meeting at the orthopedic research society. San Francisco, CA, 1993: 584.
 - 6 Kimmel DB. Animal model for in vivo experimentation in osteoporosis research. In: Osteoporosis, edited by Marcus R, Feldman D and Kelsey J. 1996. Academic Press: 671-696.

单能 X 线骨密度仪测量骨质疏松性骨折病人的骨密度

杨肖红 李亚伟 郑有光 刘 瑜

我们收集了 1997 年 5 月至 12 月, 门诊及住院骨质疏松(OP)骨折病人 46 例, 男 16 例, 女 30 例, 年龄 40~81 岁, 平均年龄 60.5 岁。男性 40~49 岁 1 例、50~59 岁 2 例、60~69 岁 4 例、70~79 岁 7 例、大于 80 岁 2 例。女性依次为 4 例、12 例、8 例、4 例、2 例。病例排除了外伤和其它慢性疾病所引起的继发性 OP。非骨折组 60 例, 男、女各 30 例, 年龄 40~70 岁, 平均年龄 55 岁, 选择正常体检者做骨密度(BMD), 无骨折史。

骨折的部位男 16 例, 颈椎 4 例, 股骨颈 5 例。桡骨远端 3 例, 胫、腓骨 4 例。女性 30 例, 依次为 18 例、7 例、3 例、2 例。女性骨折以颈椎压缩性骨折的发病率最高。

我们使用美国 Dove 骨密度扫描仪, 单能 X 线骨密度仪(SXA-2000 型), 测量的部位跟骨, 准确度 1%。分析 BMD 和 BMD 占正常年青人的百分比, 数据分析用 *t* 检验。男性非骨折组 BMD $455.39 \pm 47.53 \text{mg/cm}^2$, 骨折组 BMD $326.87 \pm 59.09 \text{mg/cm}^2$, $P < 0.01$ 。BMD 占正常年青人的百分比, 非骨折组 93.78 ± 9.36 , 骨

折组 67.38 ± 12.21 , $P < 0.01$ 。女性非骨折组 BMD $406.07 \pm 50.18 \text{mg/cm}^2$, 骨折组 $272.33 \pm 54.41 \text{mg/m}^2$, $P < 0.01$ 。BMD 占正常年青人的百分比, 非骨折组 91.21 ± 14.51 , 骨折组 64.64 ± 12.70 , $P < 0.01$ 。

骨折, 是指外力作用于骨骼使骨的连续性遭到破坏, 当骨的强度变得非常脆弱时, 即使很小的外力亦可造成骨折。OP 的病理改变正是骨量减少, 骨基质和骨矿物比例的减少, 所以说 OP 是造成骨强度下降, 骨折发生率增加的根源。本文骨折组与非骨折组的 BMD 相比, 二组有显著差异($P < 0.01$), OP 骨折组 BMD 明显低于非骨折组。女性颈椎骨折占骨折人数的 60%, 男性颈椎骨折占骨折人数的 25%。Aaron JE 认为, 女性松质骨的主要病理改变是局部骨小梁结构的完全消失, 男性则以骨小梁的均匀变细、变薄为显著特征。提出男、女两性在老化过程中, 骨量丢失的差异在于骨重建方式的不同, 女性以骨吸收增加为主, 男性以骨形成减少为主。一项流行病学调查证实, 男性颈椎骨折的发生率为 0.75‰, 女性达 1.45‰, 可能是 OP 男性 BMD 峰值较高, 无内分泌突然的骨量损失有关。