

绝经后骨质疏松的动物模型

陈槐卿 李 良 郑 虎

老年性骨质疏松症是中老年人的常见病,严重威胁着中老年人的健康,使他们的生活质量下降。随着我国经济的发展,人民生活水平不断提高,我国居民平均寿命延长,到 21 世纪,我国将进入老龄化社会,老年性骨质疏松,尤其是妇女绝经后骨质疏松症的防治将是医药学界,科学界面临的重要任务之一。妇女绝经后骨质疏松是主要的老年性骨质疏松,表现为骨量减少,骨组织显微结构改变和骨折的危险度增高。但该疾病的机理尚未阐明。为了更好地阐明该疾病的发病机理,探讨防治措施以及探讨药物作用机理等等,必须建立绝经后骨质疏松症动物模型。本文综述绝经后骨质疏松动物模型的研究现状,供有关科技人员参考。

绝经后骨质疏松症动物模型是动物由于卵巢激素不足引起的自发或诱发的骨质疏松,骨量丢失的特征及其后果在某些方面与绝经期妇女相似。动物模型有 3 个特点^[1]:①方便性(Convenience);动物购来容易,并且价格便宜,实验操作易行;②关联性(Relevance);与人体条件比较有关联,得到的信息能转化为人体的规律;③适合性(Appropriateness);为研究某一特殊问题,最好使用某种动物来模拟人体。研究者应知道每一种动物模型的优点和限制,才能更好地设计和进行动物实验,以揭示卵巢功能停止后的骨质疏松机理。

1 啮齿类动物

实验用大鼠有远交和近交系两种,远交系包括 Wistar, Sprague-Dawley, Long-Evans,

Holtzman 等品种。近交系包括 ACI, Brown-Norway, Fischer 344, Lewis, Wistar-Furth 等品种。常用 Wistar, Holtzman, Fischer 344, SD 大鼠来作骨质疏松模型。切除大鼠双侧卵巢引起骨量丢失,造成骨质疏松,可以在成年大鼠或老龄大鼠上进行。根据福田俊^[2]对雌、雄大鼠连续 30 个月的观察发现两种性别大鼠股骨的钙含量和断裂强度在 1~3 个月龄增长很快,3~12 个月龄增长变慢,12~27 个月基本不变。30 个月龄开始下降,而矿物沉降速率,血清磷浓度,血清碱性磷酸酶活性在 1~9 月龄迅速下降,9~30 月龄维持在低水平基本不变。因此在选择模型动物的年龄时,根据需要决定,若要复制成年大鼠骨质疏松模型最好选择 6~12 月龄大鼠;若要复制老年性骨质疏松模型最好选择 18~24 个月龄大鼠^[3]。鼠类骨质疏松症模型的优缺点分析:优点为鼠类成本低;容易喂养、管理;遗传种系清楚;它们的生命短暂(3~4 年),有利于老年性变化的研究;血清钙、磷水平已有报道,平均血清磷水平为 $5.75 \pm 2.58 \text{ mg\%}$;也有人报导为 $7.08 \pm 1.19 \text{ mg\%}$,血钙在 $10 \sim 13 \text{ mg\%}$ (平均 11.75 ± 0.89)。缺点为鼠骨皮质缺乏 Haversian 系统,不适于卵巢切除术对皮质骨影响的研究;体重不能作为年龄的标志,不同种系有不同的生长曲线;身体太小,生命期短,血量少,不能多次取活检标本和大量取血;它们的药代动力学与人体也不同。

2 狗

狗常用来研究卵巢切除后引起的骨量丢失,只有目的杂交系(Purpose bred)的 Beagle 狗才适用于此目的,而随意杂交系(Random-bred)不适用,因为不知其背景,不适用于骨代

谢研究。

Beagle 狗作为骨质疏松动物模型有许多优点:狗的骨皮质具有 Haversian 系统,体内重建活性与人相似。它们的钙、磷代谢已有文献资料可查,可以在狗的髂骨上作多次骨活检;身体大小适中,性格温顺,容易管理;是杂食动物,胃肠系统与人类相似。

当然,用 Beagle 狗作骨质疏松模型也有不足之处,Beagle 狗价格昂贵,尤其在我国动物来源有困难;并且在 1 年中,狗只有二次发情期(春,秋天),与人类生殖生理学相差甚远;有 2 对血供不同的甲状旁腺,在一些年老动物,可发生甲状旁腺和甲状腺内分泌异常,在骨代谢研究中所有狗要作甲状旁腺扫描;狗对钙的每日需要量比人高,为 120mg/kg/天,每日磷需要量 90mg/kg/天,摄入钙/磷之比为(1.2~1.4):1,狗对钙的小肠吸收低于人类;更值得注意的是卵巢和子宫切除并不足以引起明显的骨丢失,不能促使骨质疏松发生。雌激素耗竭和 PTH 的刺激对于卵巢子宫切除后的狗骨量无明显影响;骨组织形态学、骨量和生化参数等变化不明显,就限制了狗作为骨质疏松模型的利用。

3 猪

两类猪都可以用来作生物医学实验研究,一类是商用农家猪,成年猪体重近 150kg 左右;另一类是小型猪,成年猪体重很少超过 60kg;小型猪有不同品种如 Sinclair, Hanford, Hormel, Yucatan, Vietnamese-Pot-Bellied, 中国的贵州小型猪等。因为农家猪太大,管理和饲养困难,不适于医学研究。用来作骨质疏松模型都采用小型猪。猪作为骨质疏松模型有如下优点:①猪有连续的发情周期,与人相似,每次 18~21 天。②猪有层状骨,骨小梁和骨皮质重建与人相似,其骨量重,骨小梁网比人致密。③骨骼大,足以能接受人工装置的植入,可以多次采活检,多次取血标本。④杂食动物,是人体消化道功能最佳模型。不足之处是:①小型猪昂贵,

有些地区买不到。②卵巢子宫切除手术比狗更困难,因为到子宫的血管更容易破裂。

4 绵羊

至今只有很少的研究以绵羊作为骨质疏松的动物模型^[3]。但是使用绵羊作动物模型有很多优点^[4]:绵羊温顺,容易处置和圈养;相对较便宜,能大量购到;能取大量的血、尿标本,反复骨活检没有困难,并且绵羊的髂嵴与人的有相似性。便于安装人工植入体。秋冬季多发情,发情期 14~21 天,自发性排卵,激素分泌情况与女人相似。

用绵羊作骨质疏松模型最明显的缺点是该动物为反刍类,如要进行口服药物吸收实验,需作皱胃(第四胃)外科瘘管。维生素代谢和矿物质需要量与人相差较大,磷代谢也与人相差较大;绵羊尿中磷排除较人低,消化道是绵羊磷排除的主要渠道。另外,绵羊没有自然性停经。近来的研究发现^[5],年轻的绵羊(小于 3~4 岁)皮质骨是丛样骨,而年老的绵羊(7~9 岁)可见到 Haversian 系统的重建,首先在股骨的尾部,其次在肱骨和桡骨的骨干部分发现这种重建。用放射免疫法测定骨钙素(Osteocalcin),发现 7 岁绵羊血清骨钙素水平增高,与 65 岁老妇相似。

已经证明绵羊是研究骨质疏松的合适的动物模型,但有不少问题需要解决。如①尚未搞清股骨的那个部位骨重建最活跃;②骨密度、生化指标、髂嵴的组织形态学等指标有季节性和日节律性波动;此外,经产、妊娠、子代的数量和哺乳也能使这些指标波动,这就要求研究者采用双能 X-线骨密度仪(DEXA)对骨矿密度(BMD)进行无损伤测定;绵羊的脊椎骨和四肢骨均可采用此法测定骨密度^[6];③哪些外界的因素可能混淆卵巢激素不足引起的骨丢失,这些因素包括繁殖,喂食(Ca, P 比值),接受阳光的程度;④在一年的哪个季节进行卵巢切除术引起骨丢失最迅速。

5 灵长类(非人类)

与人体骨骼相比,非人类灵长类具有其他种类动物所缺乏的突出优势,很多灵长类身体保持直立位,它们的骨生物力学特性与人体极为相似。它们的消化道、内分泌系统、骨代谢最接近人体。更为重要的是有些灵长类象女人一样有动情周期,绝经以及相似的生存期。雌猕猴的月经周期和激素形式接近于女人。雌猴的卵巢切除引起椎体海绵骨体积明显减少,而促性腺激素增强剂处理的雌恒河猴骨矿密度降低,骨丢失速率与经绝期后女人的情况相似^[7]。这些资料表明非人类灵长类和人类在卵巢功能停止后骨的反应是相似的。但是在大多数非人类灵长类不出现自发性停经。

绝经期后的骨质疏松明显地与激素有关。灵长类有一个明显的优点是它们的内分泌系统与人相似。但是要作为绝经期后骨质疏松的模型,雌性灵长类的年龄必须足够大。骨质疏松不仅是骨质迅速丢失,而且达不到足够的骨量峰值。Cynomolgus 猴 9 岁以后才能达到骨量峰值。但是大部分研究采用 4~7 岁的猴作卵巢切除术。因此,骨骼未成熟的灵长类卵巢切除似乎是一种不适当的模型。但是老龄化的雌性灵长类很难找到,并且代价很高。灵长类的管理较困难,训练有素的技术人员才能制服进攻性很强的灵长类,由这类动物传播的动物源性疾病的危险性相对较高。这些疾病包括 Marburg 病毒疾病、Eluda 病毒疾病、病毒性肝炎、猿猴疱疹病毒(β -病毒)和结核。在它们身上抽取少量血标本或者常规健康检查前一定要对动物进行麻醉。猴的营养需要已清楚,生长的恒河猴需要 0.15g 钙/kg 体重和 251U 维生素 D;为了满足此要求,可用半纯化饲料。几种灵长类的血清钙、磷水平已有人报道,如狒狒的血清钙为 $8.4 \pm 1.5\text{mg/dl}$,血磷为 $7.0 \pm 1.5\text{mg/dl}$;猕猴的血清钙为 $9.7 \pm 1.6\text{mg/dl}$,血清磷为 $6.2 \pm 2.0\text{mg/dl}$ 。

6 模型判断指标

骨质疏松动物模型是否复制成功需要有客观指标来判断。现有血和尿的某些生化指标的测定、骨密度的检测、骨组织形态计量学测定、骨生物力学指标测定等方面的判断指标,但这些方法均有一定的局限性,需要对多种指标进行综合分析,才能得到关于骨质疏松情况的全面判断^[7,8]。反映破骨代谢的血液生化指标有血清钙、磷和尿钙含量;反映成骨代谢的指标有骨钙素(Osteocalcin)、血浆骨特异性碱性磷酸酶(Plasma bonespecific alkaline phosphatase)、I 型胶原、骨桥蛋白;反映破骨代谢的指标有抗酒石酸盐酸性磷酸酶(Tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)、尿羟脯氨酸、尿钙/肌酐比值。这些指标只能作为模型判断的辅助指标。另外,模型动物的体重、性腺和其他内分泌腺的重量与形态变化也可以作为模型判断的参数指标^[9]。

骨量的变化是衡量骨质疏松程度的重要指标,可以用单光子或双光子骨矿仪,双能 X 线骨密度仪,定量 CT 等仪器对实验动物的管状骨如股骨、胫骨或椎骨等标本的骨密度进行测定。还可通过 X-光片上骨皮质厚度和骨小梁密度来粗略估算骨量变化。这些方法的优点是无损伤性,简易而快速。也可直接称量处死后动物骨标本的湿重、干重和灰重来反映骨量变化。但用上述方法测量骨量变化灵敏度较低,骨量变化很明显时这些指标才能反映,并且重复性较差。70 年代发展起来的骨组织形态计量学技术,将不脱钙骨组织切片与图形体视学结合起来,直接测量皮质骨厚度,直接观测骨小梁和密质骨组织形态,尤其是骨组织显微结构变化,再结合荧光染料四环素,茜红等进行活体标记,还可观察到新骨生长,新矿化和骨吸收的动态过程,定量地获得骨细胞水平、组织水平的活的信息。该技术不仅可以准确真实地反映骨量和骨形态结构的变化,同时可以定量反映骨代谢的动态过程。将此技术应用来判断骨质疏松动物

模型具有很高的准确性。

由于动物模型都不能模拟人类骨质疏松性骨折,美国FDA^[10]还要求动物模型一定要作骨生物力学指标的测定,以决定骨的强度。这些指标包括管状骨长度、直径和厚度的测定;整体骨抗弯强度、抗压强度、抗拉伸强度以及骨试件的弯曲、压缩和拉伸强度;椎体骨的抗压强度测定等等。这些生物力学指标能全面反映骨骼的物理特征和结构特征。对骨质疏松的动物模型,这些参数有明显的变化。

以上这些指标能从各个不同方面定量地反映动物模型的骨质疏松是否出现,以及骨质疏松的程度如何,无论采用哪种动物模型,上述这些指标,尤其是一些主要的重要指标是不可缺少的。

7 结论

建立骨质疏松动物模型在骨质疏松的发病机理研究、探讨防治措施和新药研究中均占有十分重要的地位。无论选择何种动物作实验模型,必须要考虑动物的年龄和它的平均生存期。在选择动物模型时,除了考虑成本以外,也要考虑其他因素,如已经发表的组织形态学正常值、生殖生理、营养饮食情况和胃肠道吸收情况等。虽然常用大鼠作骨质疏松模型,但这种模型有很多缺陷,势必要求建立其他种类动物模型以弥补其不足。

按常规应先用鼠模型作为新药的初筛,观察有无治疗效果,然后在进入临床试验以前,要在其他种类的动物上得以证实^[10,11]。狗被用作雌激素不足引起的骨量丢失模型已有多年,但近来发现切除卵巢不能引起骨质疏松。今后更多的研究将转向用绵羊和猪作为骨质疏松模型。因为它们有很多优点。也将有少数研究者试探着用非人类灵长类作为模型,但它们的使用限制太多,几乎不太现实。各种动物模型均应

按判断标准验证骨质疏松症是否存在和程度如何。

参 考 文 献

- 1 Rodger JB, Faugere M-CM, Malluche H. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone*, 1993, 1: 89-94.
- 2 福田俊, 饭田治三・加齢に伴う雌雄ラットの骨代謝の変化と卵巣, 精巣摘除年齢による影響の差。日骨形态志, 1991, 1: 89-94.
- 3 Newman E., Tyrner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia, Current status and comparison with other animal models. *Bone*, 1995, 16(4)supplement, 277s-284s.
- 4 Hornby SB, Ford SL, Mase CA, et al. Skeletal change on the ovariectomized ewe and subsequent response to treatment with 17 β oestradiol. *Bone*, 1995, 17(4)supplement, 389s-394s.
- 5 Chavassieux P, Pastoureaux P, Chapuy MC, et al. Glucocorticoid-induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewe, A biochemical and histomorphometric study. *Osteoporosis Int.*, 1993, 3, 97-102.
- 6 Kaymakci B, & Wark JD. Precise accurate mineral measurements of excised sheep bones using X-ray densitometry. *Bone and Mineral*, 1994, 25: 231-246.
- 7 Kummel DB. Animal model for in vivo experimentation in osteoporosis research. In *Osteoporosis*, edited by Marcus R., Feldman D. & Kelsey J., 1996, Academic Press, 671-696.
- 8 吴波. 骨质疏松动物模型研究的现状与展望. *药学报*, 1996, 31(4): 316-320.
- 9 Einhorn TA. The bone organ system, Form and function In *Osteoporosis* edited by Marcus R., Feldman D. & Kelsey J., 1996, Academic Press, 3-22.
- 10 Food and Drug Administration. Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopause osteoporosis. Division of metabolism and endocrine drug, products Draft, April, 1994.
- 11 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(草案), 平成7年(1995), 6月30日,