三种大鼠骨质疏松模型的比较研究

刘 康 季 晖 李绍平 于 冰 李耐三

摘要 用维A酸、摘除卵巢及糖皮质激素诱导大鼠骨质疏松症，以血清碱性磷酸酶(s-ALP)，血清钙(s-Ca)、磷(s-P)，尿钙/肌酐(u-Ca/Cr)及羟脯氨酸/肌酐(u-Hop/Cr)等为指标，引入骨表观线密度(W/L)、面密度(W/L_φ)两个新的骨指数，对该三种较常用的大鼠骨质疏松模型进行了比较研究。结果显示大剂量维A酸组(90、100、120mg/kg)及摘除卵巢组骨重(W)减轻，W/L、W/L_φ明显降低($P<0.01$，$P<0.05$)，形成典型的大鼠骨质疏松症；糖皮质激素组s-ALP、u-Ca/Cr及u-Hop/Cr显著升高($P<0.01$，$P<0.01$)，但W/L、W/L_φ没有明显差异。

关键词 骨质疏松 维A酸 卵巢摘除 骨表观线密度 骨表观面密度

Comparison study on three osteoporotic rats models

Liu Kang, Ji Hui, Li Shaoping and Li Naisan

Department of pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Retinoic acid(RA), ovariectomy and glucocorticoid(GC) were used to induce osteoporosis in rats. The markers included serum alkaline phosphatase (s-ALP), serum calcium(s-Ca), and urine-hydroxyproline/creatinine(u-Hop/Cr). Bone apparent line density(W/L) and bone apparent area density(W/L_φ) were regarded as two new bone indexes, which were also used to compare these three osteoporosis models in rats. The results indicated that higher doses of RA(90, 100, 120mg/kg) and ovariectomy could decrease bone mass, W/L and W/L_φ apparently($P<0.01$, $P<0.05$), which formed the two typical models. S-ALP、u-Ca/Cr and u-Hop/Cr in rats treated with GC improved obviously($P<0.01$, $P<0.05$), but W/L_φ had no changes.

Key words Osteoporosis Retinoic acid Ovariectomy Bone apparent line density Bone apparent area density

骨质疏松症(Osteoporosis，OP)是老年人常见病之一，随着社会人口逐渐趋于老龄化，其日益成为人们关注的热点。鉴于目前尚无理想的治疗药物，且对骨质疏松症的发病机制也亟待深入研究，因此对骨质疏松模型及测定指标的规范化提出了更高要求。大鼠因其骨变化与人类有许多相似之处，而被公认为是研究骨质疏松较为理想的实验动物。本实验复制及改进

作者简介：刘康，女，25岁，中国药科大学95届中药药理专业毕业，同年考入中国药科大学药理专业硕士研究生，师从季晖副教授，三年期间，在导师精心指导和严格要求下主要进行骨质疏松症动物模型及防治药物研究，毕业后留校，任教于中药药理教研室。

本课题系江苏省科委应用基础基金资助项目

作者单位：210009，中国药科大学药理学教研室，季晖为本项课题负责人

了维A酸、摘除卵巢及糖皮质激素三种大鼠骨质疏松模型，引入两个新的骨指标，对该三种模型进行了比较研究。

1 实验材料

1.1 动物 SD大鼠，购自中国药科大学动物房，饲养一周后开始实验。

1.2 药品与试剂

维A酸(Retinoic acid，RA，批号：920003，上海第六制药厂)；醋酸泼尼松龙注射液(Prednisolone acetate injection，PA，批号：960502，上海第九制药厂)；西黄芪胶粉(Tragacanth，批号：9200424，L.P.C进口分装，上海化学试剂站分装)；钙试剂盒(Ca reagent kit，批号：960702，上海荣盛生物技术有限公司)；无机磷试剂盒(Pi reagent kit，批号：960901，上海荣盛生物技术有限公司)；血清碱性磷酸酶试剂盒(Alkaline phosphatase，ALP，批号：960201，上海荣盛生物技术有限公司)；L-羟脯氨酸(L-Hydroxyproline，Hop，批号：950421，上海伯奥生物科技公司)；肌酐(Creatinine，Cr，E. Merck公司进口分装)；其余试剂均为市售分析纯。

1.3 主要仪器

TG-328A型电光分析天平(上海天平仪器厂)；752型可见-紫外分光光度计；游标卡尺；螺旋测微器。

2 方法与结果

2.1 维A酸骨质疏松模型

1)分组及造模 四批雄性SD大鼠，各批大鼠皆按体重随机分为正常对照组及病理模型组。第一批(set 1，约2月龄)大鼠分别ig 1.5%西黄芪胶液及70 mg/kg RA西黄芪胶混悬液，连续15 d。停药后，摘除眼球取血，分离血清，处死部分大鼠，取双侧股骨、胫骨，110℃干燥1h。其余大鼠继续饲养15 d后收集12 h空腹尿液，次日股动脉取血并处死大鼠，取双侧股、胫骨，同上述方法处理。第二、三、四批(set 2，约2.5月龄；set3，约2.8月龄；set4，约3月龄)大鼠模型组分别ig 90、100、120 mg/kg RA混悬液，除中期(d15)不剖杀大鼠外，其余处理均同第一批大鼠。将120 mg/kg组及其对照组的干燥股骨置于600℃马福炉8h，得骨灰(bone ash)称量骨灰重(W_{ash})，并以骨重(W)减掉W_{ash}得骨基质重(W_{matrix})。

2)指标测定 血清生化指标：s-Ca、s-P、s-ALP，按试剂盒方法测定；尿生化指标：u-Ca按试剂盒方法测定，u-Cr、u-Hop分别采用碱性苦味酸法及改良氯胺-T法测定[1,2]；骨指标：以分析天平、游标卡尺及螺旋测微器测量骨重(W)、骨长(L)及骨直径(φ)，计算W/L，W/L_{φ}。

3)结果 体重：由表1看出，实验中期四个不同剂量的RA模型组体重皆有所下降，90、100、120 mg/kg三个剂量组有显著性差异，且120 mg/kg体重下降幅度最大。实验末期90、100、120mg/kg组体重与对照组比较仍有显著差异。

表1 RA对大鼠体重的影响($\bar{x}\pm s$)

批号	组别	剂量(mg/kg)	数	体重(g)	
				d15	d30
1	对照组	—	8	231±19	259±20
	RA	70	8	216±19	239±31
2	对照组		9	259±19	261±19
	RA	90	9	229±22*	229±23*
3	对照组	—	8	300±32	330±35
	RA	100	8	272±33*	293±26*
4	对照组	—	8	337±17	346±20
	RA	120	8	255±22**	302±31*

注：与对照组相比 * $P<0.05$，** $P<0.01$

血、尿生化指标：给予RA15d后，70、120 mg/kg组s-ALP显著升高，末期各组均无明显变化。S-Ca、S-P在d15和d30各剂量组皆变化不大，仅120 mg/kg组d30时s-P显著升高。所测两批大鼠u-Ca/Cr、u-Hop/Cr有升高趋势，但未见显著性差异。见表2、3。

表2 RA对给药15天大鼠血清生化指标的影响($\bar{x}\pm s$)

批号	组别	剂量(mg/kg)	s-ALP(u)	s-Ca(mmol/L)	s-P(mmol/L)
1	对照组	—	342±186	2.679±0.339	2.553±0.440
	RA	70	556±154***	2.482±0.328	2.648±0.258
3	对照组	—	573±151	3.610±0.718	3.513±0.296
	RA	100	561±137	3.605±0.710	3.748±0.112
4	对照组	—	444±125	2.498±0.131	2.684±0.309
	RA	120	723±125**	2.534±0.110	2.763±0.396

注：对照组相比 **$P<0.01$，***$P<0.001$

表3 RA对给药30天大鼠血清和尿生化指标的影响($\bar{x}\pm s$)

批号	组别	剂量(mg/kg)	s-ALP(u)	s-Ca(mmol/l)	s-P(mmol/l)	u-Ca/Cr	u-Hop/Cr
1	对照组	—	329±112	2.513±0.045	2.678±0.293	0.213±0.079	0.0599±0.0207
	RA	70	473±195	2.558±0.283	2.917±0.514	0.266±0.172	0.0648±0.0223
2	对照组	—	300±130	3.208±0.154	2.206±0.150	—	—
	RA	90	316±102	3.078±0.190	2.211±0.073	—	—
3	对照组	—	318±90	3.310±0.230	1.770±0.162	—	—
	RA	100	424±116	3.537±0.292	1.931±0.143	—	—
4	对照组	—	329±112	2.565±0.291	2.881±0.411	0.184±0.065	—
	RA	120	357±88	2.750±0.260	3.752±0.741**	0.232±0.105	—

注：对照组相比 **$P<0.01$

骨指标：实验中期70 mg/kg剂量组股骨、胫骨重量及直径均明显下降，末期除股骨直径显著减小外，其余指标已无显著差异(表4)。其余三批动物中，模型组胫骨W、W/L、W/L_φ皆明显下降，直径有所减小，但仅100mg/kg剂量组与对照组相比有显著性差异(表5)；而股骨W、φ、W/L、W/L_φ与对照组相比均显著下降(表6)。从W/L_φ来看几个剂量组胫骨的骨丢失一般都大于股骨的骨丢失，股骨的W/L_φ以120 mg/kg剂量组骨丢失最明显。120 mg/kg剂量组股骨经马福炉处理后所得的W_{ash}、W_{ash}/L、W_{ash}/L_φ、W_{matrix}、W_{matrix}/L皆较对照组明显下降(表7)。

2.2 摘除卵巢致骨质疏松模型

1)造模 雌性SD大鼠，按体重随机分为二组，ip 35mg/kg戊巴比妥钠麻醉，俯位固定，在背部脊柱两侧切口，于无菌条件下摘除模型组双侧卵巢，对照组切除双侧一小块脂肪作为假手术组。严格控制大鼠食耗量，饲养三个月后同上述方法取血、尿及骨样。

2)测定指标 同上测血清、尿生化指标及骨指标。

3)结果 手术组大鼠体重明显增加，子宫系数明显降低(手术组0.363±0.086，对照组2.412±0.486，$P<0.001$)，s-ALP、s-P显著升高，u-Ca/Cr、u-Hop/Cr有升高趋势，但与对照

组比较无显著差异(表8),W/L、W/L_e 与对照组相比显著降低(表9)。

表4 70mg/kg RA 对大鼠生化指标的影响($\bar{x}\pm s$)

天数	组别	W_{femur} (g)	φ_{femur} (cm)	L_{femur} (cm)	W_{tibia} (g)	φ_{tibia} (cm)	L_{tibia} (cm)
15	对照组	0.539±0.040	0.342±0.018	3.344±0.053	0.450±0.040	0.222±0.012	3.761±0.069
	RA	0.406±0.024**	0.312±0.017*	3.339±0.087	0.344±0.018***	0.204±0.009*	3.707±0.104
30	对照组	0.587±0.071	0.373±0.016	3.497±0.139	0.452±0.074	0.230±0.016	3.827±0.104
	RA	0.550±0.045	0.350±0.014*	3.395±0.145	0.405±0.059	0.227±0.007	3.726±0.129

注:与对照组相比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, femur(股骨), tibia(胫骨)

表5 RA 对给药30天大鼠胫骨指标的影响($\bar{x}\pm s$)

批号	组别	剂量 (mg/kg)	W (g)	L (cm)	φ (cm)	W/L (g/cm)	W/L_e (g/cm²)
2	对照组	—	0.393±0.033	3.881±0.087	0.313±0.015	0.099±0.005	0.325±0.013
	RA	90	0.344±0.026**	3.881±0.072	0.306±0.012	0.089±0.005**	0.294±0.011***
3	对照组	—	0.485±0.048	4.046±0.118	0.236±0.008	0.120±0.008	0.507±0.025
	RA	100	0.404±0.034**	3.941±0.080	0.218±0.009***	0.102±0.007***	0.471±0.016**
4	对照组	—	0.541±0.031	4.121±0.118	0.236±0.009	0.131±0.006	0.558±0.024
	RA	120	0.469±0.045**	3.988±0.162	0.229±0.013	0.117±0.008**	0.513±0.023**

注:与对照组相比 ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

表6 RA 对给药30天大鼠股骨指标的影响($\bar{x}\pm s$)

批号	组别	剂量 (mg/kg)	W (g)	L (cm)	φ (cm)	W/L (g/cm)	W/L_φ (g/cm²)
2	对照组	—	0.504±0.021	3.501±0.021	0.388±0.005	0.144±0.005	0.374±0.015
	RA	90	0.410±0.024***	3.470±0.025	0.334±0.015***	0.122±0.009**	0.355±0.012*
3	对照组	—	0.575±0.054	3.582±0.092	0.392±0.021	0.160±0.012	0.420±0.007
	RA	100	0.498±0.051***	3.581±0.078	0.339±0.024***	0.139±0.011**	0.403±0.016*
4	对照组	—	0.707±0.042	3.780±0.073	0.321±0.013	0.187±0.009	0.583±0.021
	RA	120	0.609±0.051***	3.670±0.158	0.308±0.009*	0.166±0.008**	0.538±0.027**

注:与对照组相比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

表7 120mg/kg RA 对大鼠股骨灰和基质指标的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	W (g)	W_{matrix} (g)	W_{ash}/L (g/cm)	W_{ash}/L_φ (cm)	W_{matrix}/L (g/cm²)	W_{matrix}/L_φ (g/cm²)
对照组	0.424±0.025	0.283±0.018	0.112±0.005	0.349±0.014	0.075±0.004	0.233±0.009
RA	0.358±0.035***	0.251±0.017**	0.098±0.006***	0.316±0.018**	0.068±0.003**	0.222±0.011

注:与对照组相比 ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

2.3 糖皮质激素致骨质疏松模型

1)造模 雄性 SD 大鼠按体重随机分为正常对照组及模型组,分别隔天 im 生理盐水及醋酸泼尼松龙10mg/kg,一个月后同上法取血、

尿、骨样。

2)测定指标 同上。

3)结果 糖皮质激素组大鼠体重明显下降，s-ALP、u-Ca/Cr、u-Hop/Cr 显著升高(表8)，骨重有下降趋势，但未见显著差异，骨 W/L、W/L_φ 均未见下降(表9)。

表8 卵巢摘除和 PA 对大鼠体重及血清和尿生化指标的影响($n=8$，$\bar{x}\pm s$)

组别	体重(g)	s-ALP(u)	s-Ca(mmol/L)	s-P(mmol/l)	u-Ca/Cr	u-Hop/Cr
对照组	257±22	169±80	2.401±0.210	2.162±0.281	0.067±0.059	3.656±1.239
卵巢摘除	284±20*	342±149*	2.256±0.167	2.678±0.398***	0.099±0.089	3.383±1.920
对照组	296±22	304±85	2.478±0.195	1.741±0.607	0.097±0.098	0.036±0.016
PA	241±16***	571±147**	2.607±0.316	1.857±0.193	0.716±0.219**	0.162±0.108*

注：与对照组相比 * $P<0.05$，** $P<0.01$，*** $P<0.001$

表9 卵巢摘除和 PA 对大鼠股骨指标的影响($n=8$，$\bar{x}\pm s$)

组别	W(g)	L(cm)	φ(cm)	W/L(g/cm)	W/L_φ(g/cm²)
对照组	0.5640±0.0216	3.560±0.062	0.296±0.009	0.160±0.004	0.536±0.024
卵巢摘除	0.5337±0.0417	3.584±0.148	0.307±0.011	0.149±0.011*	0.485±0.035*
对照组	0.641±0.054	3.784±0.138	0.305±0.014	0.169±0.009	0.555±0.020
PA	0.613±0.032	3.706±0.069	0.294±0.010	0.165±0.008	0.564±0.030

注：与对照组相比 * $P<0.05$

3 讨 论

骨质疏松以骨量减少、骨微观结构退化为特征[3]。临床上一般通过骨密度测量结合血、尿生化指标进行诊断，动物体多通过骨重、骨密度、骨强度、骨形态学分析及血、尿生化指标综合判断，尤以骨密度及骨形态计量学作为判断的主要依据，但由于骨密度测量和形态计量学分析需特定的仪器设备，一般实验室不易实现。本实验参照临床骨线密度、面密度测量法引入二个骨指数：W/L 和 W/L_φ，在另一实验中(待发表)我们采用双能 X 线骨密度测量仪进行骨密度测量，将所得的骨密度值与 W/L_φ 作相关分析并进行回归显著性检验，结果 $r=0.65$($P<0.01$)，表明以 W/L_φ 作为观测指标之一在动物体不仅简便易行，且具有一定的科学性和可信性。

RA 模型中，90、100、120 mg/kg 剂量组皆能形成稳定的骨质疏松症，由结果可以看出，胫骨骨丢失大于股骨的骨丢失。病理变化表现为骨矿质及基质重量下降，W/L 和 W/L_φ 降低，个别大鼠甚至出现骨折、骨畸形，从一定程度上反映出模型大鼠骨脆性增大，骨折危险度提高。有报道 RA 模型松质骨骨小梁密度下降、间隙增大，密质骨百分数降低，骨皮质变薄，说明松质骨、密质骨皆发生了骨质疏松[4]。体外实验中，RA 降低成骨样细胞活性并抑制其增殖，表现为 ALP 活性下降，也可刺激破骨细胞生成，抑制胶原形成。本实验尚可看出，总体上 RA 大剂量(120 mg/kg)组骨丢失最严重，似乎用于造模效果更好，但实验过程中发现，给药期间大鼠出现竖毛、体重下降、食欲不振的毒性反映，100、120 mg/kg 剂量组部分大鼠口、鼻发炎，有血性物粘附，甚至出现死亡，故剂量过大并不理想。多篇文献中采用70 mg/kg 剂量造模[4~6]，但在本实验中70 mg/kg 显然造模不成功，而90 mg/kg 较为理想，其原因除了可能与动物种属和年龄有关外，还可能与饲料中钙含量有关。大鼠对摄入钙的吸收率为90%以上，远较人类(一般低于40%)高，本实验所用的大鼠饲料含有丰

富的钙(约1.2%),大鼠很可能在被诱导骨丢失的同时,已利用饲料进行一定的钙补充而减轻了骨丢失的程度,故在本实验中表现为低剂量的RA(70 mg/kg)造模不成功,而高剂量RA(90、100、120 mg/kg)骨丢失程度大于饲料中钙的补偿作用,故能形成较稳定的骨质疏松症模型。因此,以RA造模时不仅应对大鼠年龄予以注意,饲料中的钙含量也是一个关键因素。一般认为,采用成年雄性大鼠复制模型较为理想。由于RA模型所需时间短,在国内中药开发研究中已被普遍采用,但这种模型与人类骨质疏松症的关系尚需深入研究。

摘除卵巢模型是绝经后骨质疏松症的经典模型,本实验中表现为W/L、W/L_4显著下降,s-ALP、s-P明显升高。另有报道s-骨钙素及抗酒石酸酸性磷酸酶显著升高,s-降钙素明显下降[7,8],形态学上出现髓腔明显增大,皮质变薄,以松质骨丢失为主,为高转换型的骨质疏松症[9],与临床绝经后骨质疏松极为相似。目前认为其机制除与雌激素减少关系密切外,尚与细胞因子、淋巴因子等有关[10]。此模型成功率高,稳定可靠,适用范围广,为最常用模型,已被美国FDA规定为治疗绝经后骨质疏松的临床前研究模型[11]。此模型需要特别注意的是大鼠年龄,一般以6～12月龄最好[12]。与RA模型相比较,摘除卵巢模型的不足之处为创伤性且所需时间稍长(通常需3个月以上)。

糖皮质激素骨质疏松症临床表现为低转换型,即骨形成、骨吸收皆抑制,而骨吸收大于骨形成。动物模型中,骨形成受抑制[3],抑制程度可通过s-骨钙素水平来反映。但在本实验中,s-ALP及u-Ca/Cr皆显著升高,表现出高转换型的趋势,其原因可能有两点:(1)s-ALP不仅源于骨组织,也源于肝、肾等非骨组织。(2)给予糖皮质激素的剂量及时间不同,对骨的影响也不一致。谢华等人报道,在骨形态计量学分析中,糖皮质激素抑制类骨质分泌,降低矿化沉积速率[4]。目前研究发现由于糖皮质激素可致肌肉、结缔组织、淋巴组织退化,使动物体重迅速降低,适用范围相对较小,而在体育锻炼与骨质疏松关系的研究中能获得满意结果[15]。

综上所述,三种大鼠骨质疏松模型各有其优缺点,实际应用中应根据需要和条件选择合适的模型及测定指标。

参 考 文 献

1 戈水佳,宋善俊,郑岳臣,等.尿中肌酐测定-碱性苦味酸法.临床医师手册检验分册.上海科技出版社.1991,12,24.9

2 郑少雄,蔡文仪,邱明才,等.血尿羟脯氨酸测定的方法改进.中华医学检验杂志,1983,6(3):133～136.

3 刘忠厚,潘子昂,王石麟.原发性骨质疏松症诊断标准的探讨.中国骨质疏松杂志,1997,3(1):1.

4 吴波,徐冰,黄添友,等.维A酸致大鼠骨质疏松模型与机理研究.药学学报,1996,31(4):241～245.

5 邵金莺,尹钟桂,许哲,等.龙牡壮骨药对大鼠实验性骨质疏松影响.中药药理与临床,1989,5:25.

6 谭正怀,雷王兰,张白嘉,等.补天生力胶囊治疗老年骨质疏松的药理研究.中成药,1996,18(1):29～31.

7 薛延.骨质疏松症的生化诊断.中国骨质疏松杂志,1995,1(1):58.

8 Dike N. Kalu Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. Endocrinology 1984,115:507～512.

9 李朝阳,吴铁,李青南,等.蛇床子对去卵巢大鼠近侧胫骨代谢影响的定量研究.药学学报,1996,31(5):327～332.

10 Riko Kitazawa, Robert B Kimble, James L Vannice, et al. Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. J Clin Invest, 1994,2397～2406.

11 James F, Whitfield, Paul Morley. Small Bone-building fragments of parathyroid hormone: new therapeutic agents for osteoporosis. Tips, 1995,16:382～285.

12 Dike N Kalu, Chung-ching Liu, Robert R Hardin, et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. Endocrinology, 1989,24:7～16.

13 Iwao Yamazoki, Akio Shino, Yasuyoshi Shimizu, et al. Effect of ipriflavone on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. Life Sciences, 1986,38:951～958.

14 谢华,李青南,黄连芳,等.蛇床子总香豆素对类固醇性骨质疏松的作用.中国药理学报,1994(4):371.

15 乔伟伟,许兰文.骨质疏松症大鼠模型.上海实验动物科学,1997,17(3):174～176.