

小鼠骨组织形态学特征及泼尼松对骨量及骨钙的影响

刘晓青 崔燎 吴铁 刘玉瑜 李青南

【摘要】 目的 探讨小鼠骨组织形态学和小鼠骨钙含量的研究方法,并观察不同剂量的泼尼松对小鼠骨形态学及骨钙含量的影响。方法 24只昆明种♀小鼠,随机分为4组:正常对照组,泼尼松低、中、高剂量组,对照组给予生理盐水,其余3组分别按泼尼松 $0.75, 1.5, 6.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃给药,实验21 d后,眼眶放血,取右胫骨进行硬组织包埋切片,作骨组织形态计量学检测,取右股骨测骨钙含量。结果 小鼠骨形态学与大鼠相似,但松质骨骨量个体差异大。形态学中骨量与骨钙含量有正相关($P < 0.05$)。对不同剂量泼尼松作用的检测表明:低、高两剂量泼尼松对骨钙含量无明显影响,中剂量可增加骨钙含量($P < 0.05$);骨形态计量学观察可见低、中剂量的泼尼松有增加骨量的趋势,中剂量差异有显著性($P < 0.05$),高剂量泼尼松有减少骨量的趋势。中剂量增加松质骨表面双荧光强度($P < 0.05$)。结论 小鼠骨形态学特征和骨钙含量有低的相关关系,泼尼松低的剂量可增加小鼠的骨钙含量、骨量和骨小梁表面荧光,当剂量增加时却有减少骨量和骨表面荧光的作用。提示测定药物对骨钙含量影响在一定程度上反映形态学中骨量的变化,提示若用高剂量泼尼松可致小鼠骨量减少模型。

【关键词】 骨组织形态计量学; 骨钙含量; 荧光标记; 小鼠; 醋酸泼尼松

Histomorphometric characteristics of bone and effects of prednisone on bone mass and bone calcium content in mice LIU Xiaqing, CUI Liao, WU Tie, et al. Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

【Abstract】 **Objective** To study the bone histomorphometry and evaluate the effects of prednisone on bone mass and bone calcium content in mice. **Methods** Twenty-four female Kunming mice at two months of age were randomly divided into four groups: the control group was treated with a vehicle, and the other three groups were given orally prednisone acetate (Pred) at doses of $0.75, 1.5, 6.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively. At the end of the study, the right proximal tibiae were processed to undecalcified sections at $4 \mu\text{m}$ and $8 \mu\text{m}$ for bone histomorphometric analysis; the right femurs were collected to determine the net bone weight and bone calcium content which were assayed by atomic absorption spectrometry. The mice received *in vivo* twice fluorochrome labeling before sacrifice. **Results** Bone mass and fluorochrome labeling intensity in histomorphometry of the mice varied. In comparison with control group, low dose of Pred did not affect, while intermediate dose of Pred increased, the bone mass, bone calcium and bone labeling intensity in the mice ($P < 0.05$). However, high dose of Pred had a tendency to decrease bone mass. There was a correlation between the bone calcium content and bone mass. **Conclusion** A variation in histomorphometry of mice was observed in this study. A proper dose of prednisone increases bone mass and bone calcium content, while high dose has a tendency to decrease the bone mass of mice. There is a correlation between bone calcium content and bone mass.

【Key words】 Bone histomorphometry; Bone calcium content; Fluorochrome labeling; Mice; Prednisone acetate

临床前筛选和研究抗骨质疏松新药需建立稳定、合理的实验动物模型,骨组织形态计量学能科学地反映药物对骨组织作用的结果和机制^[1],但大鼠、

基金项目:湛江市 988 科技兴湛重点攻关课题
作者单位:524023 湛江,广东医学院药理教研室(刘晓青、崔燎、吴铁、刘玉瑜);广东医学院骨生物实验室(李青南)

猴等大动物需耗时长、费用高,不易大规模用于初筛实验,而小鼠易得,给药时间短,是快速研究抗骨质疏松药物的动物模型。但小鼠骨质较少,要制作骨片十分不易,用小鼠进行骨组织形态计量学观察药物作用目前国内尚未见报道。本研究目的是观察小鼠胫骨组织形态学特征,同时测定小鼠股骨骨钙含量,比较两者之间的关系;并观察不同剂量的泼尼松对小鼠骨形态学及骨钙含量的影响,寻找由糖皮质激素所致小鼠骨质疏松模型的最佳剂量,为建立用小鼠作为模型初筛抗骨质疏松药物作用提供依据。

材料和方法

1. 药物和主要试剂:泼尼松:浙江医药股份有限公司-仙居制药厂(批号:990171);甲基丙烯酸甲酯:北京化工厂生产(批号:940117);Calcein-骨组织染料(Masson-Goldner Trichrome; Ponceau Fuchsin Stock; Phosotungstic acid-Orange; Light green)均为Sigma-USA产品。四环素:上海新亚制药厂产品。

2. 主要仪器:低速锯(Buehler LTD. USA);半自动图像数字化分析仪,包括光学显微镜和荧光显微镜(Nikon,日本),数字化板,计算机和骨形态学测量程序“KSS”体视学软件(USA);原子吸收分光光度计(WFX-1D,北京第二光学仪器厂)。

3. 动物及给药

3月龄昆明种♀小鼠(本院实验动物中心提供,批准文号:99A404)平均体重为 (20 ± 2) g;动物随机分为4组,每组6只小鼠,对照组(control)生理盐水灌胃,其余3组(泼尼松低、中、高剂量组)分别给予泼尼松 $0.75, 1.5, 6.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (前两个剂量据成人用量换算,最后的剂量据我们以前实验的大鼠用量换算)灌胃,共给药21 d,动物在 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度67%环境下自由饮水、摄食,每3 d称重1次。

4. 骨组织形态学测量

小鼠在处死前10 d和3 d两次分别给予四环素 30 mg/kg 和Calcein(USA的Sigma公司出品,以 8 mg/kg)标记,以在骨组织形成双荧光标记。给药21 d后小鼠眼球放血处死,(取软组织称重)分离左右侧胫骨,固定于10%PBS福尔马林液12 h,右侧胫骨按硬组织切片法^[2],其中 $4 \mu\text{m}$ 薄片用Masson-Goldner染色^[2], $8 \mu\text{m}$ 薄片用于荧光观察,骨片在距骺线 0.25 mm 处至远端 2.5 mm 范围内进行骨组织形态参数测量。测量方法、计算公式按以前的报道^[3]。静态参数包括测量参数:骨组织面积(T.Ar),骨小梁

面积(Tb.Ar),皮质骨面积(Ct.Ar)。计算参数:骨小梁面积百分数(%Tb.Ar),骨小梁宽度(Tb.Wi),骨小梁数量(Tb.N),骨小梁分离度(Tb.SP),皮质骨面积百分数(%Ct.Ar)和总骨量面积(%Bone)其中%Ct.Ar和%Bone为本实验新增参数, $\% \text{ Ct.Ar} = (\text{Ct.Ar} / \text{T.Ar} + \text{Ct.Ar}) \times 100\%$,而 $\% \text{ Bone} = (\text{Tb.Ar} + \text{Ct.Ar}) / (\text{T.Ar} + \text{Ct.Ar}) \times 100\%$;小鼠骨小梁表面及内皮质骨表面(endocortical surface)的双荧光标记强度按分级记录:±:很弱;+:弱;+:强;+:很强。

5. 右股骨骨钙含量测定

取右侧股骨,除净附着组织,恒温干燥箱(80°C)脱水烤干约72 h至恒重,称取骨干重。然后用 2 ml HNO_3 溶解骨组织,400倍稀释后于原子吸收分光光度计下测定 Ca^{2+} 浓度,然后换算为骨钙含量计算公式:骨Ca含量=所测 Ca^{2+} 浓度($\mu\text{g/ml}$) $\times 400$ 。

6. 统计学处理

数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间用 t 检验,质反应计数资料(荧光强度)用秩和 t 检验, $P < 0.05$ 差异有显著性。

结 果

1. 右股骨骨钙含量变化

泼尼松对骨钙含量有剂量依赖性,低高剂量无作用,中剂量可增加骨钙/骨干重比值,与正常对照组比较差异有显著性($P < 0.05$),见表1。

表1 泼尼松对骨钙含量的影响

组别	动物(只)	骨干重(mg)	骨钙量(mg)	骨钙/骨干重
正常对照组	6	22.83 ± 3.85	3.06 ± 0.62	0.13 ± 0.01
低剂量组	6	22.80 ± 2.86	3.19 ± 0.60	0.14 ± 0.01
中剂量组	6	23.28 ± 2.53	3.49 ± 0.44	$0.15 \pm 0.02^*$
高剂量组	6	23.94 ± 2.27	3.51 ± 0.54	0.14 ± 0.01

注:与正常对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2. 骨组织形态计量学指标变化

正常小鼠骨组织形态个体差别较大,对照组即显现较大的标准差(表3),松质骨差异比皮质骨明显。与对照组比较,泼尼松小、中剂量组有增加松质骨和皮质骨量的趋势;中剂量更明显,使松质骨量和骨小梁数目增加趋于一致性,降低骨小梁分离度,在总骨量上增加有显著性($P < 0.05$),大剂量泼尼松不能增加骨量而且有减少骨量和骨的显微结构变差的趋势(表2)。

表 2 泼尼松对骨静态参数的影响

组别	动物 (只)	骨小梁面积 %	骨小梁宽度 (μm)	骨小梁数量 (个/ μm)	骨小梁分离度 (μm)	皮质骨面积 %	总骨面积 %
正常对照组	6	12.3 $\pm$ 5.8	34.4 $\pm$ 5.1	3.5 $\pm$ 1.2	282.1 $\pm$ 108.6	21.6 $\pm$ 3.5	31.3 $\pm$ 3.9
低剂量组	6	14.2 $\pm$ 7.6	33.5 $\pm$ 7.7	4.0 $\pm$ 1.8	277.2 $\pm$ 180.6	26.6 $\pm$ 3.7	36.9 $\pm$ 7.5
中剂量组	6	18.9 $\pm$ 8.5	35.8 $\pm$ 5.2	5.1 $\pm$ 1.6	177.9 $\pm$ 75.8	24.6 $\pm$ 3.2	38.7 $\pm$ 8.4*
高剂量组	6	10.7 $\pm$ 4.9	32.5 $\pm$ 5.4	3.2 $\pm$ 1.1	315.6 $\pm$ 126.1	21.7 $\pm$ 6.1	30.2 $\pm$ 5.7

注:与正常对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

正常对照组小鼠骨表面荧光分布中等强,个体差异大,如有强荧光的,也有弱荧光的。不同浓度泼尼松分别与正常组作秩和 t 检验,可见泼尼松中剂量组可增强骨表面荧光,使荧光个体分布更均匀,说明此剂量可促进骨矿形成,与形态学观察到的骨量增加相吻合,低剂量和当浓度大于一定剂量(高剂量)时,并不增加骨矿的形成(表 3)。

表 3 泼尼松对骨双荧光的影响

组别	动物 (只)	荧光强度				t 值
		$\pm$	+	++	+++	
正常	6	2	2	1	1	
泼尼松低剂量组	6	0	3	1	2	32
泼尼松中剂量组	6	0	0	3	3	27*
泼尼松高剂量组	6	1	1	3	1	30.5

注:与正常对照比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3. 正常小鼠骨静态参数与骨钙含量的比较

从相关关系分析比较中,形态学参数与骨钙含量有一定相关关系,其中骨钙含量与%Tb.Ar,钙量/骨重与%Bone有直线相关(表 4)。

表 4 正常小鼠骨静态参数与骨钙含量相关系数(r)

指标	%Tb.Ar	%Bone
骨干重	0.75	0.30
骨钙含量	0.83*	0.51
钙量/骨重	0.72	0.85*

注:* $P < 0.05$

讨 论

1. 小鼠胫骨骨形态学特征

从形态计量学看,小鼠胫骨上段松质骨的个体差异大,骨小梁面积百分数(%Tb.Ar)从 9%到 20%不等,如果以总骨量面积(%Bone 松质骨与皮质骨之和)作为小鼠骨静态指标,标准差减少,较全面反映小鼠骨量变化,因此我们认为小鼠骨形态学观察

应以%Bone为佳。从测定小鼠整个股骨骨钙含量来看,其标准差小,个体之间差异缩小,骨钙含量测定在一定程度上反映了骨量的多少。因此,以骨钙/骨干重比值来作为评价骨量的指标有一定的现实意义。小鼠荧光标记的强弱是反映小鼠骨矿形成的一个重要指标,正常小鼠的荧光个体分布也不均匀,有些小鼠显强荧光,有些则只有弱荧光,这与在大鼠所观察到的一致性不同^[4]。由于有些小鼠形成的双荧光较弱,不易定量测量,我们采用了根据荧光强度的半定量方法检测,这样较简便。对小鼠骨钙含量与骨形态学结果进行相关关系分析,提示了骨钙/骨干重比值与%Tb.Ar和%Bone有一定的相关关系,因此可初步认为测定小鼠骨钙含量及观察小鼠骨形态中总骨面积变化是一种快速、有效、科学的初筛新药的实验方法,可应用于药物性、老年性骨质疏松的研究。但对去卵巢引起的骨质疏松模型最好不用小鼠,因为此模型主要为松质骨的丢失,而小鼠的松质骨太少,标准差又大,不易观察。国外有人在用小鼠作骨形态学实验时,先测定其BMD的多少,淘汰一些BMD特别高或特别低的小鼠,选择BMD较一致的小鼠做实验^[5],可避免实验误差较大的影响,这是一个值得推荐的好方法。

2. 不同剂量的泼尼松对小鼠骨量和骨钙的影响

本研究还观察了不同剂量泼尼松对小鼠骨钙及骨量的影响,泼尼松为中效糖皮质激素,在临床上引起继发性药物源性骨质疏松,是糖皮质激素严重并发症之一,用糖皮质激素诱导的骨质疏松模型已被很多学者采用^[6]。但不同种属、不同剂量、不同剂型、不同动物饲料(如含钙高低)会影响动物实验模型的建立^[7]。我们曾用大鼠建立了糖皮质激素骨质疏松模型^[8]。本研究探讨了 3 个剂量对小鼠的作用,结果可见,一定的剂量泼尼松有刺激骨形成,增加骨量的作用,但随剂量增大,泼尼松有可能致骨量

(下转第 215 页)

骨状态的改变,与现有的骨量测定方法有好的相关性,因此,计算机 X-线密度测定法是一种有临床价值的测定方法,具有价廉,非侵入性和广泛易获得的优点,还可能成为筛选骨质疏松和观察治疗前后骨量改变的替代方法。

参 考 文 献

- 1 Yamamoto I, Yuu I, Morita R. Computed X-ray densitometry. Jap J Clin Med; 1994, 52(9):2323-2328.
- 2 Osei-Hyiaman-D, Ueji-M, Toyokawa-S et al. Influence of grip strength on metacarpal bone mineral density in postmenopausal Japanese women: a cross-sectional study. Calcif Tissue Int, 1999, 64(3):263-266.
- 3 Sili Scavalli A, Marini M, Spadaro A et al. Comparison of ultrasound transmission velocity with computed metacarpal radiogrammetry and dual-photon absorptiometry. Eur Radiol, 1996, 6(2):192-195.
- 4 Kabeya JM, Mbuyi Muamba JM, Tozin R et al. Bone mass in Zaïreans: radiogrammetric determination. Clin Rheumatol, 1995, 14(1):87-92.
- 5 Maggio D, Pacifici R, Cherubini A et al. Appendicular cortical bone loss after age 65: sex-dependent event? Calcif Tissue Int, 1995, 56(5):410-414.
- 6 Matsumoto C, Kushida K, Yanazaki K et al. Metacarpal bone mass in normal and osteoporotic Japanese women using computed X-ray densitometry. Calcif Tissue Int, 1994, 55(5):324-329.
- 7 Crespo-R, Revilla-M, Usabiago-J et al. Metacarpal radiogrammetry by computed radiography in postmenopausal women with Colles' fracture and vertebral crush fracture syndrome. Calcif Tissue Int, 1998, 62(5):470-473.
- 8 Iwamoto-J, Takeda-T, Otani-T et al. Age-related changes in cortical bone in women: metacarpal bone mass measurement study. J orthop Sci, 1998, 3(2):90-94.