

不同月龄小鼠骨有机质和矿物质变化的观察

陈方 吴铁 崔燎

【摘要】 目的 观察不同月龄小鼠骨有机质和矿物质的变化,探讨小鼠骨质组成成分随月龄增长而变化的规律,为用小鼠建立骨质疏松模型提供实验数据。方法 分别取 1~5 月龄小鼠,按不同月龄分成 5 组,测体重,取股骨分别测定骨干重、骨横短径,骨矿物质钙、磷、镁、锌、锰、硫及骨有机质羟脯氨酸(B-HOP),进行组间比较。结果 不同月龄小鼠骨干重,骨横短径,骨有机质的主要成分羟脯氨酸(HOP),骨矿物质随着月龄增加有不同程度的增长;但骨微量元素的变化不大,骨 HOP 及骨钙的增加与骨干重的比值密切相关。结论 不同月龄小鼠骨物理指标、骨有机质和矿物质指标均随月龄的增大呈不同程度的改变,骨微量元素改变不大。

【关键词】 骨有机质; 骨矿物质; 骨羟脯氨酸; 骨微量元素; 骨质疏松

Changes of bone organic matter and minerals in different-month-old mice CHEN Fang, WU Tie, CUI Liao. Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

【Abstract】 Objective To observe the changes of bone organic matter and mineral in mice at different months of age, for studying the regularities of the changes with increasing month-age, and providing experimental data for building an osteoporotic mouse model. **Methods** One to five-month-old mice were killed while the body weight(BW), femoral dry weight, bone hydroxyproline, calcium, phosphorus, magnesium, zinc manganese and sulphur of femora were measured and compared between groups. **Results** Compared with the front of each group, femoral dry weight, bone transverse diameter, and bone hydroxyproline content were increased to different degrees along with increasing month-age, and so did the bone mineral, but the bone microelements were increased unremarkably. Bone Ca and phosphorus contents were correlated with the femoral dry weight. **Conclusion** The bone physical indications, bone organic matter and minerals increase with increasing month-age remarkably, but not so do the bone microelements.

【Key words】 Bone organic matter; Bone minerals; Hydroxyproline; Microelements; Osteoporosis

骨质疏松症是一种目前研究很热门的课题,我们曾利用小鼠作为骨质疏松的动物模型进行抗骨质疏松药物筛选的研究,发现小鼠模型确实是一种经济而快捷的研究手段^[1-4]。为了深入探讨小鼠的骨有机质、骨矿物质和骨微量元素随月龄增长而变化的规律和差异,为用小鼠建立骨质疏松模型提供实验数据,本研究观察了 1~5 月龄小鼠的骨干重、股骨长度、骨横短径,骨矿物质钙、磷、镁、锌、锰、硫及骨有机质羟脯氨酸(B-HOP),并进行了分析比较,现报道如下。

材料和方法

1. 仪器与试剂

ICP 等离子性发射光谱仪(IRIS/AP 型,美国 TJA 公司产品);752 紫外光栅分光光度计(上海第三分

析仪器厂产品);AE240 电子天平(梅特勒-托利多仪器公司上海分公司产品);羟脯氨酸检测试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)。

2. 实验方法

(1)动物和骨标本:昆明种小鼠 1 月龄 100 只,普通级,体重(20±2)g,雌雄各半,由广东医学院实验动物中心提供,统一采用广东省医学实验动物中心提供的标准饲料进行饲养。严格按 30 d 为 1 个月,满月龄即处死动物,取左右股骨供测定用。

(2)骨标本的制备和各指标的测定方法:小鼠股骨剖取后,除净附着的软组织,经 80℃烘干至恒重,制成骨标本并进行如下测定。①骨干重测量:用 AE240 电子天平称量,得骨干重,精确到 0.0001 g;②骨长度及骨横径测量:用游标卡尺对股骨长度及横径进行测量,精确到 0.001 cm;③骨矿物质测定:每份骨样本加 6N HCl 5 ml,安瓿封存,在 108℃温度下消化 16 h^[5]后,把消化液过滤,取滤液 1 ml 加蒸馏水至 5 ml(稀释 20 倍)后用 ICP 等离子性发射光谱

仪测定骨钙、磷、镁、锌、锰、硫的含量(本院分析中心协作完成),精确到 0.0001 mg。④骨羟脯氨酸(氯胺 T 法)测定:取上述滤液 0.5 ml 于容量瓶中,用 6N NaOH 调 pH 值至 6,然后,参照文献[6]用 752 紫外光栅分光光度计测定羟脯氨酸的浓度(标准品为 5 $\mu\text{g/ml}$)。

(3)统计学处理:实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料用 t 检验进行组间比较。

结 果

1. 不同月龄小鼠骨物理指标的变化

不同月龄小鼠骨重、股骨长度及横径的变化见表 1。

从表 1 可见,2 月龄和 3 月龄小鼠在体重、骨重、股骨长度及横径等方面增长显著,与前一月龄组比较统计学上差异有显著性($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$,雄性尤为明显),而 4 月龄和 5 月龄组以上各指标虽然有增加,但与前一月龄组比较统计学上差异无显著性。提示 2 月龄和 3 月龄小鼠生长旺盛,骨物理指标变化显著;4 月龄和 5 月龄小鼠增长趋

缓,骨物理指标变化相对稳定。

2. 不同月龄小鼠骨有机质和骨矿物质指标的变化

不同月龄小鼠骨有机质和骨矿物质指标与单位骨重量比值的变化见表 2、3。

从表 2 可见,2 月龄和 3 月龄小鼠在骨羟脯氨酸、骨钙、骨磷、骨镁等方面增长显著,与前一月龄组比较统计学上有显著性差异($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$,雄性尤为明显),而 4 月龄和 5 月龄组以上各指标仍有增加,但与前一月龄组比较统计学上差异不显著,但有随月龄增长而增加的趋势。从表 3 可见,各月龄组小鼠在骨羟脯氨酸含量与骨重的比值是相对稳定的,而在骨钙和骨磷方面与骨重的比值则以 2 月龄和 3 月龄 6 小鼠增长显著($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$),4 月龄和 5 月龄增长相对稳定。提示 2 月龄和 3 月龄小鼠生长旺盛,骨有机质指标变化显著;4 月龄和 5 月龄小鼠骨有机质指标变化相对稳定,但骨钙、骨磷和骨镁仍有随月龄增长而增加的趋势。

3. 不同月龄小鼠骨微量元素指标的变化

表 1 不同月龄小鼠物理指标的变化

分组		体重(g)	骨重(g)	股骨长度(mm)	股骨横径(mm)
1 月龄	M(<i>n</i> = 11)	21.3 ± 2.9	0.026 ± 0.003	12.48 ± 0.53	1.51 ± 0.09
	F(<i>n</i> = 9)	20.2 ± 2.1	0.027 ± 0.004	12.72 ± 0.35	1.50 ± 0.13
2 月龄	M(<i>n</i> = 10)	31.4 ± 2.1***	0.044 ± 0.001***	15.79 ± 0.50***	1.76 ± 0.08***
	F(<i>n</i> = 10)	32.1 ± 3.4***	0.049 ± 0.004***	15.85 ± 0.59***	1.85 ± 0.12***
3 月龄	M(<i>n</i> = 10)	43.2 ± 3.3***	0.058 ± 0.006***	16.67 ± 0.65**	1.88 ± 0.12**
	F(<i>n</i> = 10)	35.1 ± 3.6***	0.050 ± 0.006	16.11 ± 0.40	1.64 ± 0.09***
4 月龄	M(<i>n</i> = 10)	42.3 ± 4.1	0.062 ± 0.007	16.64 ± 0.59	1.92 ± 0.12
	F(<i>n</i> = 10)	35.0 ± 4.4	0.052 ± 0.008	16.19 ± 0.67	1.67 ± 0.14
5 月龄	M(<i>n</i> = 10)	44.9 ± 4.3	0.064 ± 0.007	17.03 ± 0.61	1.89 ± 0.13
	F(<i>n</i> = 10)	36.2 ± 6.1	0.056 ± 0.008	16.68 ± 0.45	1.63 ± 0.14

注:与前一组比较:** $P < 0.01$;*** $P < 0.001$

表 2 不同月龄小鼠骨有机质和骨矿物质指标的变化

分组		骨重(g)	骨羟脯氨酸(mg)	骨钙(mg)	骨磷(mg)	骨镁(mg)
1 月龄	M(n = 11)	0.026 ± 0.003	0.479 ± 0.058	4.11 ± 0.55	2.025 ± 0.294	0.099 ± 0.015
	F(n = 9)	0.027 ± 0.004	0.494 ± 0.076	4.48 ± 0.54	2.270 ± 0.382	0.106 ± 0.019
2 月龄	M(n = 10)	0.044 ± 0.001 ***	0.806 ± 0.071 ***	7.51 ± 0.22 ***	3.909 ± 0.148 ***	0.178 ± 0.009 ***
	F(n = 10)	0.049 ± 0.004 ***	0.886 ± 0.080 ***	11.8 ± 3.72 **	4.674 ± 0.377 ***	0.211 ± 0.020 ***
3 月龄	M(n = 10)	0.058 ± 0.006 ***	1.234 ± 0.152 ***	16.1 ± 3.85 ***	5.436 ± 0.509 ***	0.252 ± 0.045 ***
	F(n = 10)	0.050 ± 0.006	0.876 ± 0.099	14.3 ± 3.73	4.753 ± 0.545	0.213 ± 0.030
4 月龄	M(n = 10)	0.062 ± 0.007	1.101 ± 0.160 **	18.4 ± 2.64	5.978 ± 0.678 *	0.253 ± 0.056
	F(n = 10)	0.052 ± 0.008	0.915 ± 0.116	15.8 ± 4.48	5.531 ± 0.803 **	0.240 ± 0.038 *
5 月龄	M(n = 10)	0.064 ± 0.007	1.188 ± 0.154	20.4 ± 2.21 *	6.415 ± 0.678	0.271 ± 0.037
	F(n = 10)	0.056 ± 0.008	0.929 ± 0.155	17.7 ± 3.81	5.771 ± 0.754	0.244 ± 0.044

注:与前一组比较:* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

表 3 不同月龄小鼠骨有机质或骨矿物质与单位骨重量比值的变化

分组	骨重(g)	骨 HOP/BW(mg/g)	骨 Ca/BW(mg/g)	骨 P/BW(mg/g)	骨 Mn/BW(mg/g)
1 月龄 M(n=11)	0.026 ± 0.003	18.52 ± 1.36	158.59 ± 10.37	78.02 ± 5.24	3.80 ± 0.28
F(n=9)	0.027 ± 0.004	18.06 ± 1.74	164.19 ± 8.78	82.81 ± 6.22	3.86 ± 0.34
2 月龄 M(n=10)	0.044 ± 0.001***	18.36 ± 1.53	170.99 ± 5.92**	89.03 ± 3.06***	4.06 ± 0.24*
F(n=10)	0.049 ± 0.004***	18.01 ± 0.87	236.46 ± 61.44**	95.06 ± 3.85***	4.29 ± 0.22*
3 月龄 M(n=10)	0.058 ± 0.006***	21.46 ± 3.31**	275.51 ± 52.49***	94.01 ± 3.88**	4.34 ± 0.48
F(n=10)	0.050 ± 0.006	17.51 ± 0.74	281.62 ± 53.64*	95.23 ± 7.80	4.25 ± 0.35
4 月龄 M(n=10)	0.062 ± 0.007	17.84 ± 1.14**	299.23 ± 19.50	95.54 ± 5.57	4.09 ± 0.63
F(n=10)	0.052 ± 0.008	17.53 ± 0.96	299.90 ± 80.01	106.47 ± 16.03*	4.64 ± 0.70
5 月龄 M(n=10)	0.064 ± 0.007	18.42 ± 0.91	317.09 ± 18.79*	99.80 ± 5.99	4.22 ± 0.50
F(n=10)	0.056 ± 0.008	16.63 ± 1.49	313.36 ± 44.68	103.48 ± 3.03	4.38 ± 0.45

注:与前一组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$;

不同月龄小鼠骨微量元素指标及其与单位骨重量比值的变化见表 4、5。

表 4 不同月龄小鼠骨微量元素指标的变化

分组	骨重(g)	骨锰(μ g)	骨硫(mg)	骨锌(mg)
1 月龄 M(n=11)	0.026 ± 0.003	0.231 ± 0.122	0.110 ± 0.016	0.011 ± 0.006
F(n=9)	0.027 ± 0.004	0.379 ± 0.292	0.120 ± 0.013	0.016 ± 0.011
2 月龄 M(n=10)	0.044 ± 0.001***	0.310 ± 0.195	0.167 ± 0.028***	0.018 ± 0.008
F(n=10)	0.049 ± 0.004***	0.347 ± 0.216	0.165 ± 0.031	0.018 ± 0.008
3 月龄 M(n=10)	0.058 ± 0.006***	0.239 ± 0.069	0.181 ± 0.023	0.017 ± 0.004
F(n=10)	0.050 ± 0.006	0.300 ± 0.227	0.164 ± 0.028	0.014 ± 0.005
4 月龄 M(n=10)	0.062 ± 0.007	0.319 ± 0.244	0.206 ± 0.035	0.017 ± 0.002
F(n=10)	0.052 ± 0.008	0.289 ± 0.216	0.158 ± 0.013	0.016 ± 0.004
5 月龄 M(n=10)	0.064 ± 0.007	0.379 ± 0.268	0.202 ± 0.025	0.016 ± 0.001
F(n=10)	0.056 ± 0.008	0.460 ± 0.223*	0.146 ± 0.018	0.016 ± 0.002

注:与前一组比较:* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$

表 5 不同月龄小鼠骨微量元素与单位骨重量比值的变化

分组	骨重(g)	骨 Mn/BW(μ g/g)	骨 S/BW(mg/g)	骨 Zinc/BW(mg/g)
1 月龄 M(n=11)	0.026 ± 0.003	8.78 ± 4.33	4.26 ± 0.63	0.45 ± 0.29
F(n=9)	0.027 ± 0.004	13.90 ± 10.69	4.35 ± 0.35	0.55 ± 0.32
2 月龄 M(n=10)	0.044 ± 0.001***	7.04 ± 4.35	3.81 ± 0.70	0.42 ± 0.18
F(n=10)	0.049 ± 0.004***	6.98 ± 4.13	3.33 ± 0.44	0.36 ± 0.16
3 月龄 M(n=10)	0.058 ± 0.006***	4.14 ± 1.21	3.16 ± 0.51	0.30 ± 0.09
F(n=10)	0.050 ± 0.006	5.99 ± 4.53	3.31 ± 0.71	0.29 ± 0.11
4 月龄 M(n=10)	0.062 ± 0.007	5.21 ± 4.03	3.29 ± 0.51	0.27 ± 0.03
F(n=10)	0.052 ± 0.008	5.80 ± 4.74	3.07 ± 0.43	0.32 ± 0.09
5 月龄 M(n=10)	0.064 ± 0.007	5.77 ± 3.77	3.15 ± 0.28	0.25 ± 0.02
F(n=10)	0.056 ± 0.008	8.03 ± 3.96	2.65 ± 0.45	0.29 ± 0.03

注:与前一组比较:*** $P < 0.001$

从表 4 可见,各月龄组小鼠在骨锰和骨锌方面 增长不显著,与前一月龄组比较统计学上差异无显

著性,而骨硫也仅有 2 月龄组雄性小鼠与前一月龄组比较统计学差异有显著性($P < 0.001$),其他各月龄组骨硫变化均相对稳定。从表 5 可见,各月龄组小鼠在骨锰、骨硫和骨锌含量与骨重的比值是相对稳定的。提示各月龄小鼠骨微量元素指标变化不显著,无随月龄增长而显著增加的趋势而有减少的趋势。

讨 论

骨质疏松症已成为人类多种慢性疾病的并发症,其危害亦日益受到社会的关注^[7]。对于患骨质疏松症时骨代谢生化指标改变的研究,在基础研究方面多使用大白鼠进行抗骨质疏松药物的筛选研究,但大白鼠抗骨质疏松模型有成本高、周期过长等缺点,不利于进行大规模的抗骨质疏松药物的筛选研究^[8]。本文通过测定不同月龄小鼠(100 例)的股骨干重、骨羟脯氨酸,骨钙、磷、镁、锌、锰及硫含量,并进行股骨的长度和横径的测定,测定结果表明:2 月龄和 3 月龄小鼠生长旺盛,骨物理指标、骨有机质和骨矿物质指标等均显著增加,4 月龄和 5 月龄小鼠骨有机质和矿物质指标变化相对稳定,但有随月龄增长而增加的趋势,而各月龄小鼠骨微量元素指标变化不显著,几乎无随月龄增长而显著增加的趋势。此外,在单位质量骨骼所含的上述指标里,骨有机质指标(骨 HOP/骨重)和骨微量元素指标(骨锰、

骨硫和骨锌含量与骨重的比值)有一定的相对均衡值,但骨钙、骨磷和骨镁含量与骨重的比值仍有随月龄增长而增加的趋势。因此,利用小鼠作为骨质疏松的动物模型进行抗骨质疏松药物筛选实验的研究,若以观察药物对骨有机质和骨微量元素^[5]的影响为主要目的时,应以选用 2 或 3 月龄的小鼠为宜;若以观察药物对骨矿物质的影响时,还可以选用 4 或 5 月龄的小鼠。本实验结果对于研究抗骨质疏松症药物时作为动物模型的小鼠选用具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- 1 邹丽宜,吴铁.小鼠肝硬化导致骨丢失及人参茎叶皂苷的防治作用.药学报,2001,36:886-890.
- 2 刘晓青,崔燎,吴铁.小鼠骨组织形态学特征及泼尼松对骨量及骨钙的影响.中国骨质疏松杂志,2001,7:210-215.
- 3 吴铁,刘钰瑜,崔燎.红参对抗环磷酰胺致小鼠骨质疏松作用研究.现代康复,2000,4:1682.
- 4 刘钰瑜,吴铁.环磷酰胺对小鼠骨代谢的影响及人参的防治作用探讨.时珍国医国药,2001,12:678-680.
- 5 马克昌,高子范,张灵菊.骨碎补对大白鼠骨质疏松模型的影响.中医正骨,1992,4(4):3-4.
- 6 张均田.现代药理实验方法(下册).北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998.1363.
- 7 刘忠厚,主编.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998.505-509.
- 8 孙丽萍,孙承琳,张丽,等.骨质疏松动物模型的探讨.中国骨质疏松杂志,1997,3(3):24-26.

(收稿日期:2002-04-29)