

大鼠骨生物学指标的月龄特征

高建军 周轶 顾淑珠 金慰芳 王洪复

【摘要】 目的 观察大鼠骨密度、骨生物力学和骨矿元素含量的月龄特征和变化规律。方法 采用固体物理密度测试方法测量大鼠股骨和腰椎标本骨密度和体积,三点弯曲试验和压缩试验分别测试股骨最大抗弯载荷和腰椎最大抗压载荷,自动生化分析仪测试骨组织浸出液中钙、磷和镁含量,计算单位体积含量。结果 骨密度峰值区间为7~12月龄,股骨平均密度峰值为1.429(雌性)和1.399 g/cm³(雄性),腰椎平均密度峰值为1.207(雌性)和1.204 g/cm³(雄性)。随后开始减低,12~16月龄阶段股骨密度减低明显,而腰椎出现在16~18月龄,18月龄以后骨密度变化不大。股骨抗弯强度雌性大鼠增加至12月龄(198.29N),而雄性大鼠可持续至18月龄(323.2N),随后逐渐减低至24月龄的211和157N。腰椎抗压能力增强至12月龄的252~263N后逐渐减低,24月龄时维持138~149N。股骨和腰椎中Ca和P的含量呈7月龄为峰值的双相变化,高龄阶段Ca含量小幅减低。镁含量随年龄变化不大。结论 骨生物学指标呈阶段性特征,7~12月龄阶段骨量相对稳定,而力学性能不断改善。12月龄后骨量开始丢失,并可能存在一个短暂快速丢失期。18月龄以后丢失减缓,骨量相对稳定。

【关键词】 骨密度; 骨生物力学; 骨矿元素; 增龄

Age-related changes of bone biological indices in rats GAO Jianjun, ZHOU Yi, GU Shuzhu, et al. Department of Bone Metabolism, Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective To study the age-related changes in density, biomechanics and mineral contents of rat femur and lumbar vertebrae. **Methods** The density and volume of rat femur and lumbar vertebrae (L₄) were measured by Archimedes principle. The mechanical property of femur and vertebrae were evaluated by the three-point bending test and the compression test separately. Ca, Mg and P levels in bone extract were analyzed and calculated by biochemical methods. **Results** The bone density increased with age, and the peaks appeared in 7-12 months of age, followed by a rapid decrease at 12-16 months of age for femur and after 16 months of age for lumbar vertebrae. The mechanical strength increased to 252-263 and 198N at the age of 12 months for lumbar vertebrae and femur of females, respectively, then slowed down. The levels of Ca and P showed diphasetransition with age, and the peak appeared at 7 months of age, while the Mg level was constant. **Conclusion** The biological indices of skeleton vary diphasically with age. The bone density is stabilized of 7-12 months of age with improvement of its mechanical property; thereafter, the bone loss occurs possibly in a rapid and transient way at beginning, and slows down after 18 months of age.

【Key words】 Bone density; Biomechanics; Bone mineral elements; Age-related change

骨组织功能衰退是增龄过程中骨形成和骨吸收逐渐失衡的最终结果,月龄的选择直接影响到以大鼠为对象的骨代谢实验研究的结果和细胞学机制的分析判断。目前国内对大鼠骨生物学参数增龄变化的研究较少,骨衰退病理机制研究、药物整体和细胞药效研究中阶段选择尚缺乏有效可靠的依据,为

此本文作者分别以大鼠股骨和腰椎为代表观察其骨密度、生物力学和矿盐含量等的增龄变化,以对实验研究的阶段选择提供参考。

材料和方法

1. 动物分组;按月龄划分为8组:1,3,7,12,16,18,20和24月龄组。3及其以上各月龄组由3月龄健康SD大鼠随机选取,每组雌雄各5只,清洁级饲养至所需月龄。1月龄SD大鼠实验时随机选取(复

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170439)

作者单位:200032 上海,复旦大学放射医学研究所骨代谢研究室

旦大学动物科学实验部提供)。

2. 标本采集与测试:取实验大鼠,以11%乌拉坦(1 ml/100 g 体重)腹腔麻醉后颈动脉放血处死,即取双侧股骨和第4腰椎,置4℃生理盐水(NS)中。取右侧股骨和腰椎椎体(L₄),剔除周围肌肉及结缔组织,冲洗髓腔后,4℃冰箱置48 h,于固体物理密度仪(Metter Toledo AG204 型,瑞士)上测量密度与重量,计算体积。取左侧股骨和L₄标本,置NS中4℃浸泡过夜,于单柱生物力学测试仪(Instron 5543 型,美国)分别进行股骨三点弯曲载荷试验和腰椎压缩载荷试验。之后将右侧股骨和L₄标本,置10%三氯乙酸中室温浸泡5 d,取上清液稀释后于自动生化分析仪(日立7170A 型)测试Ca(邻甲酸肽比色法)、Mg(二甲苯胺蓝比色法)和P(磷钼酸比色法),结果换算为单位体积含量。所用仪器按要求定期标定,以确保每次测试结果稳定。

3. 统计学处理:数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异采用 one-way ANOVA ($\alpha = 0.05$) 方法进行统计分析。

结 果

1. 骨密度和骨体积变化:随着月龄增加,雌性

大鼠股骨和腰椎体积增加至12月龄以后开始减缓甚至有减低趋势($P > 0.05$),而雄性大鼠生长减缓发生在18月龄后(图1)。股骨和腰椎密度的峰值区间为7~12月龄,腰椎平均峰值约为股骨的85%(表1)。7月龄前骨密度持续增加,尤其是1~3月龄增加迅速,股骨密度平均每月增加0.25(雌)和0.24(雄)g/cm³,为3~7月龄增幅的5~7倍。经7~12月龄的峰值阶段(平均峰值雌性1.429和雄性1.399 g/cm³)后骨密度开始降低,并以12~16月龄阶段减低明显,其中股骨密度平均每月丢失0.0178(雌)和0.0115(雄)g/cm³,约为峰值骨量的1.2%和0.8%。16月龄以后丢失不明显。同样腰椎密度经1~3月龄迅速增加(雌雄平均每月增加0.196和0.104 g/cm³)和3~7月龄缓慢增加(每月增加0.0213和0.0215 g/cm³)后,达到7~12月龄的峰值(1.207和1.204 g/cm³)。12月龄后骨量丢失,并以16~18月龄丢失明显,雌雄大鼠分别每月丢失0.031和0.063 g/cm³,约为峰值骨量的2.6%和5.2%。雌性股骨密度峰值高于雄性,而18月龄密度低于雄性($P < 0.05$)。腰椎密度性别差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 大鼠股骨和腰椎标本骨密度测量结果

时间 (月)	股骨(g/cm ³)		腰椎(g/cm ³)	
	雌性	雄性	雌性	雄性
1	0.758 ± 0.071***	0.707 ± 0.015***	0.925 ± 0.163***	0.875 ± 0.072***
3	1.267 ± 0.076***	1.190 ± 0.076***	1.131 ± 0.045	1.083 ± 0.087**
7	1.418 ± 0.018*	1.371 ± 0.039	1.216 ± 0.031	1.169 ± 0.034
12	1.437 ± 0.019	1.426 ± 0.020	1.198 ± 0.051	1.239 ± 0.038
16	1.366 ± 0.044	1.380 ± 0.190	1.221 ± 0.087	1.191 ± 0.080
18	1.357 ± 0.029*#	1.382 ± 0.024	1.159 ± 0.108	1.065 ± 0.006**
20	1.375 ± 0.044	1.376 ± 0.038	1.152 ± 0.023	1.115 ± 0.034*
24	1.388 ± 0.081	1.375 ± 0.031	1.170 ± 0.099	1.105 ± 0.049*

注:与12月龄比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 同月龄组性别比较# $P < 0.05$

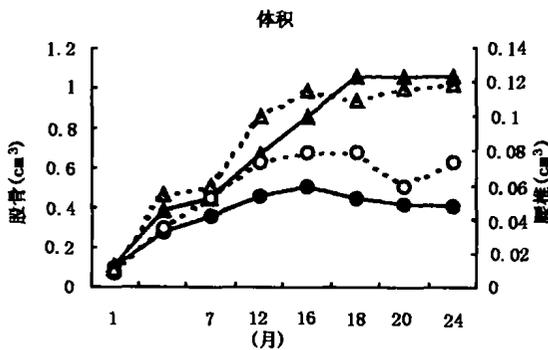


图1 大鼠股骨和腰椎椎体体积的增龄变化

2. 骨生物力学指标变化:股骨三点弯载荷试验结果表明,随着月龄的增加雄性大鼠股骨最大抗弯载荷持续增强至18月龄(323.2 N)后开始下降,各月龄组间比较差异有非常显著性($P < 0.001 \sim 0.01$)。雌性大鼠呈类似变化,但峰值处于12月龄,最大抗弯载荷为198.29 N。雌性股骨抗弯力低于雄性,差异有显著性($P < 0.05$)。峰值后雄性大鼠股骨抗弯力连续下降,平均每月减低18 N,至24月龄为211 N。雌性大鼠股骨抗弯力经16月龄的一度减低为157 N后变化不大,24月龄仍保持150 N左右。腰椎压缩载荷试验结果表明,腰椎最大抗压载荷随月龄增大增强至12月龄的252~263 N后逐

渐降低,24月龄时维持138~149 N。雌性在早期阶段(12~18月龄)下降幅度较大(约10 N/月),而雄

性在晚期阶段(18~20月龄)下降幅度较明显(约30 N/月),但性别差异无显著性。

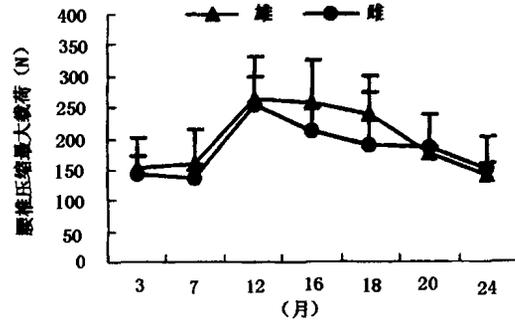
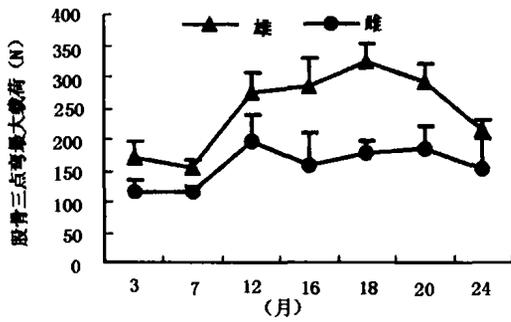


图2 股骨三点弯最大载荷和腰椎压缩最大载荷的增龄变化

3. Ca、Mg 和 P 含量变化:大鼠股骨 Ca 含量随月龄逐渐增加,7月龄最高达0.2165(雌)和0.1578(雄)mg/mm³,7~12月龄阶段下降明显,平均月减少8.5%(雌)和8.7%(雄),以后雌性维持在0.11~0.13 mg/mm³,而雄性继续减低。P 含量变化趋势与Ca一致($r = 0.97002$),其7~12月龄为明显下降阶段,平均月减少11%(雌)和13%(雄),以后阶段略有回升($P > 0.05$),并维持至24月龄的0.0451和0.0159 mg/mm³。同月龄大鼠股骨Ca和P含量雌性略高于雄性(表2)。腰椎Ca含量的7月龄的峰值为0.2959~0.3511 mg/mm³,随后持续减低至24月

龄的0.2005~0.2034 mg/mm³($P < 0.001$),平均月减少1.8%~2.5%。P含量变化幅度缩小,16~24月龄含量维持在0.0793~0.0930 mg/mm³之间,下降趋势不明显(表3)。股骨中Ca/P比值分别由1月龄的2.28(雌)和2.3(雄)逐渐上升至16月龄的3.17(雌)和12月龄的4.7(雄)后逐渐回落至24月龄时为2.4(雌)和2.8(雄)。腰椎中Ca/P比值为2.1~2.7,变化不大。骨组织Mg含量变化除1月龄腰椎中呈高水平外(分别为3月龄的3.5和3.2倍),随月龄呈持续小幅减低,但差异无统计学意义。

表2 股骨和第4腰椎Ca、P和Mg含量

时间 (月)	Ca($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)		P($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)		Mg($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	
	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性
股骨 1	150 ± 18	143 ± 21**	65.7 ± 8.6**	61.8 ± 7.9**	5.1 ± 0.3	4.9 ± 0.2
3	177 ± 52**	147 ± 28***	78.5 ± 25***	54 ± 9.5***	3.5 ± 1*	3.1 ± 0.5
7	217 ± 10***	158 ± 13***	89.8 ± 6.6***	51.4 ± 11.6***	4.4 ± 0.2***	3.4 ± 0.3*
12	124 ± 27*	90 ± 8	39.9 ± 13	18.9 ± 2.5	2.9 ± 0.4*	2.1 ± 0.2
16	116 ± 14*	73 ± 13	36.5 ± 5.1***	16.4 ± 3.5	2.6 ± 0.3*	1.7 ± 0.3
18	131 ± 18**	50 ± 8	43.6 ± 10.1*	14.4 ± 3.6	2.8 ± 0.3	1.4 ± 4.3
20	124 ± 5	47 ± 8	43.9 ± 1.4	15.2 ± 30.5	3 ± 0.2	2.2 ± 13
24	110 ± 11	45 ± 25	45.1 ± 10	15.9 ± 20.6	3 ± 0.4	1.3 ± 0.4
腰椎 1	129 ± 42.1**	154 ± 42.9	72.1 ± 25	87.6 ± 21.7	16.6 ± 8.9***	14.7 ± 5.8***
3	232 ± 32.4	244 ± 47.8*	86.8 ± 12.3	93.7 ± 19.8	4.7 ± 2.7	4.6 ± 4.1
7	351 ± 67.4***	296 ± 34.6***	133.2 ± 26.2***	111.9 ± 13.6*	7 ± 3.8	5.2 ± 2.4
12	292 ± 48.1	257 ± 24.3	108.7 ± 17.3	103.5 ± 8.8*	4.7 ± 2	3.1 ± 0.9
16	234 ± 16.8	206 ± 22.5	85.9 ± 6	79.7 ± 9.1	3.7 ± 1.5	3 ± 0.4
18	255 ± 43.8	232 ± 17.2*	93 ± 15.7	93 ± 9.2	4.6 ± 1.5	2.8 ± 0.8
20	221 ± 19.6	210 ± 18.5	89.5 ± 9.4	93.3 ± 9.3	4.2 ± 1.3	2.5 ± 0.8
24	201 ± 17.0	203 ± 13.0	79.3 ± 1.1	96.5 ± 1.4	23.8 ± 1.2	2.3 ± 1.0

注:与16月龄比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;同月龄组性别比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

讨 论

通过骨建造(Modeling)和骨重建(Remodeling)活动,骨组织处于不断调整和更新状态,使骨骼体积、

形状、骨量和内在结构等骨生物学方面,尤其骨量和骨微结构等呈现年龄差异,特别是在老年时期出现骨衰退的一系列改变^[1,2]。由于与人类骨代谢变化的相似性,以SD大鼠为对象的实验研究成为骨生

物学研究、老年时期骨衰退机制研究和防治药物研究的重要手段^[3]。实验动物月龄、评价指标和考察部位等的选择直接影响到实验结果和细胞学机制的分析判断以及实验数据的参考价值。

骨量峰值和骨量丢失月龄的确定是动物月龄选择的关键,目前对此仍存在争议。如对SD雄性大鼠的研究结果表明,腰椎BMD等指标在4月龄可达到平台,13月龄后开始降低,而股骨9月龄开始降低,同时9月龄骨生长停止、腰椎皮质变薄,故认为雄性SD大鼠骨量丢失开始于9月龄^[4]。然而有研究发现小梁骨在12月龄后仍有增加^[5]。本文结果也显示大鼠股骨和腰椎生长(体积增大)分别可持续到12月龄(雌性)和18月龄(雄性)。骨密度峰值位于7~12月龄,与文献报道皮质骨峰值区间6~12月龄接近,处于小梁骨密度峰值的6~21月龄范围内^[5]。16月龄后腰椎骨量明显丢失,晚于股骨骨量丢失的12月龄,并以早期的快速丢失为特征,18月龄以后骨密度变化不大。腰椎最大抗压力出现在12月龄,股骨最大抗弯力出现在12月龄(雌性)和18月龄(雄性),略滞后于骨量峰值月龄,反映力学结构调整和骨体积变化对生物力学功能的影响。12月龄后小幅减低(与密度一致),而P含量相对维持稳定,股骨中Ca/P比值增加,其原因有待研究。镁含量随年龄变化不大,1月龄大鼠腰椎Mg含量高水平可能与其尚未矿化有关。

骨密度、生物力学和Ca含量的性别差异主要表现在股骨,可能与性激素差异和骨建造位点的分布有关。文献报道3月龄大鼠椎骨的骨建造位点为17.1%,而胫骨为61.6%^[6]。发育期雌性骨量增加

早于雄性^[7]。因此,性激素差异可能造成骨建造水平的不同,如骨建造活动启动时间、强弱、延续时间等,这些差异在皮质骨中表现的更明显。

由以上研究可以认为,大鼠骨骼系统尤其是腰椎等中轴骨在7月龄时已基本完成塑形,7~12月龄主要表现为内在力学结构的调整,密度相对恒定,矿盐含量略有减低而力学特性进一步改善。12月龄以后出现骨量丢失,12~16月龄可能为一度快速丢失阶段。18月龄以后丢失减缓,同时可能存在代偿性骨形成增加,密度维持稳定,而力学性能未得到改善。

参 考 文 献

- 1 Martin B. Aging and strength of bone as a structural material. *Calcif Tissue Int*, 1993, 53(Suppl): S34-40.
- 2 吴小涛,戴克戎,袁世静.老年与青年股骨头内松质骨组织形态计量学比较研究. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6: 26-28.
- 3 Banu J, Kalu DN. Effects of cerivastatin and parathyroid hormone on the lumbar vertebra of aging male Sprague-Dawley rats. *Bone*, 2002, 31: 173-179.
- 4 Wang L, Banu J, McMahan CA, et al. Male rodent model of age-related bone loss in men. *Bone*, 2001, 29: 141-148.
- 5 Iida H, Fukuda S. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and strength at different skeletal sites in male rats. *J Vet Med Sci*, 2002, 64: 29-34.
- 6 Erben RG. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec*, 1996, 246: 39-46.
- 7 Wang L, McMahan CA, Banu J, et al. Rodent model for investigating the effects of estrogen on bone and muscle relationship during growth. *Calcif Tissue Int*, 2003, 72: 151-155.

(收稿日期:2003-08-28)

(上接第151页)

总之,本实验研究认为,适宜的缺氧环境有利于成骨细胞VEGF mRNA的表达和VEGF的分泌,过度的缺氧环境抑制成骨细胞VEGF mRNA的表达和VEGF的合成。本实验通过缺氧的损伤环境模拟临床相关骨科疾病的缺氧过程,探讨体外培养成骨细胞表达VEGF mRNA的规律及部分影响因素,了解临床上相关疾病的发生机理,为今后选择治疗时机和利用有利因素(缺氧)提供参考,并为实现骨缺血、缺氧性疾病的临床VEGF基因治疗打下理论基础。

参 考 文 献

- 1 Burchardt A, Burchardt T, Chen MW, et al. Expression of messenger ri-

bonucleic acid splice variants for vascular endothelial growth factor in the penis of adult rats and humans. *Biol Reprod* 1999, 60: 398-404.

- 2 Yeh LCC, Lee JC. Osteogenic pron-1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cells. *Molecular and Cellular Endocrinol*, 1999, 153: 113-124.
- 3 Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, et al. Pericyte differentiation. *Clin Othop*, 1995, 313: 81-91.
- 4 Jason A, Babak J, Joshua A, et al. Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. *AJP-Cell Physiology*, 2000, 280: C72-C80.
- 5 Douglas S, Steinbrech MD, Babak J, et al. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg*, 1999, 104: 738-747.

(收稿日期:2003-06-20)