

小鼠不同周龄与骨密度的关系

严雪铭 张振德

【摘要】 目的 采用 pQCT 设备,以整体小鼠胫骨为检测对象,了解不同周龄骨密度含量以及不同组分面积,为进行小鼠骨代谢研究提供参考。**方法** 4~12 周龄昆明种小鼠 30 只,雌性,每 6 只为 1 组。用戊巴比妥钠麻醉后,固定于检测台上,以右后肢为被测对象,采用德国产动物用 pQCT 设备,分别对胫骨近端骨髓线 1.4 mm 和 4.0 mm 处进行测定。**结果** 小鼠 4~12 周龄,体重增长很快,周龄与体重的相关性 $r = 0.963$, $P < 0.001$;此阶段胫骨总骨密度、皮质骨密度随着周龄的增长而增加,呈非常显著的正相关;周龄与骨小梁的骨密度无明显相关性;8 周龄时胫骨小梁面积最大。**结论** pQCT 能灵敏、精确的测定整体小鼠胫骨,有效地区分各个不同组分,可以动态的观察骨骼的变化,以 8~10 周龄的小鼠适宜造模型。

【关键词】 pQCT; 骨密度; 胫骨; 小鼠

Age-related changes in bone mineral density and cross-sectional area in mice YNA Xueming, ZHANG Zhende. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

【Abstract】 Objective Age-related changes in bone mineral density (BMD), cross-sectional area of the tibia *in vivo* were measured by peripheral quantitative computed tomography (pQCT), and the correlation was analyzed, providing the reference for the research on bone metabolism in mice. **Methods** Thirty female mice were divided into age groups of 4, 6, 8, 10 and 12 weeks, 6 each. The mice were fixed with holder under anesthesia. BMD and cross-sectional area were measured by pQCT (Stratec, XCT, Research SA) at 1.4 and 4.0 mm from the proximal epiphysis of tibia. **Results** The body weight of female mice increased quickly during 4-12 weeks of age, and showed age dependency with significant correlation ($r = 0.963$, $P < 0.001$); the total and cortical BMD have increased at 4-12 weeks as well as cross-sectional area, and they were correlated significantly. But trabecular BMD increased slowly without correlation during the period, and the maximal trabecular area appeared at 8 weeks of age. **Conclusion** The pQCT precisely determines various regions of mouse tibia *in vivo*. Therefore, measurement *in vivo* is useful for the monitoring of skeletal changes in mice. Mice at the ages of 8-10 weeks are suitable for development of osteoporosis models.

【Key words】 pQCT; Bone mineral density; Tibia; Mouse

骨质疏松症的研究在我国虽然起步较晚,但是选择合适的骨质疏松动物模型是进行骨质疏松药物筛选的基础,同时必须有灵敏、精确的检测手段,才能事半功倍。

pQCT(peripheral quantitative computed tomography)外周骨定量计算机断层扫描是非侵入性的检测方法,检测对象可从实验小动物到人类骨骼,可对骨样品的皮质骨和松质骨分别进行测定,检测的准确度和精确度均高于 DEXA^[1,2],在国外的临床和动物实验中被广泛地应用于骨质疏松的诊断和治疗效果的评价。国内对 pQCT 的使用及有关的报道很少,尤其

未见到小鼠的检测数据。本研究采用 pQCT 设备,以 4~12 周龄整体小鼠胫骨为检测对象进行比较,旨在为进行有关小鼠骨代谢的研究提供参考。

材料和方法

1. 方法:30 只昆明种小鼠,雌性,体重 16~40 g, (上海实验动物中心提供),分别为 4, 6, 8, 10, 12 周龄,每组 6 只,经 1 d 适应性饲养,用戊巴比妥钠麻醉,途径 ip, 剂量 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 动物麻醉后固定于特制的检测台上,以右后肢为被测对象。

2. 仪器和检测:pQCT(peripheral quantitative computed tomography), XCT Research SA (德国 Stratec 公司生产),检测时先纵向扫描,显示右后肢胫骨近端的

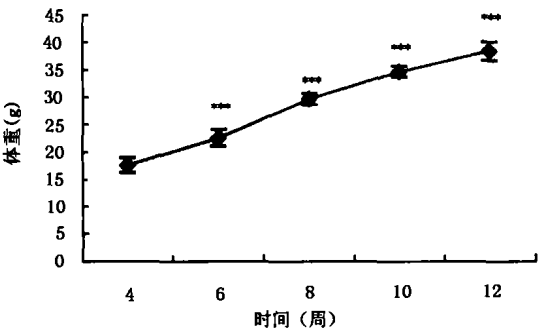
形态,以骨髓线为参照线向下 1.4 mm 和 4.0 mm 处作断层测定。计算指标为骨密度(mg/cm^3)和面积(mm^2)。

3. 统计学处理

每组结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验进行两组间比较,应用 Microsoft Excel 2000 将获得的数据进行双方差线性 pearson 相关分析。

结 果

1. 小鼠 4~12 周龄是体重增长较快的时期,随着周龄的增长体重明显增加 $r = 0.963, P < 0.001$), 见图 1。



注:与前组比较*** $P < 0.001, n = 6, \bar{x} \pm s$
图 1 正常雌性小鼠 4~12 周龄体重比较

2. 胫骨被测部位不同,其骨密度有异同,在 1.4 mm 处,总骨密度和皮质骨密度随着周龄的增长逐渐增加,呈正相关,分别是 $r = 0.614, P < 0.01$ 和 $r = 0.631, P < 0.001$;在 4.0 mm 结果也相似, $r = 0.770, P < 0.001$ 和 $r = 0.790, P < 0.001$,相关性比前者更好。骨小梁骨密度两断层数据与周龄无相关性,分别为 $r = 0.056, P > 0.05$ 和 $r = 0.289, P > 0.05$ 。但是前者明显高于后者,并处于相对稳定状态,见表 1。

表 1 不同周龄小鼠胫骨骨密度的关系(mg/cm^3)

胫骨近端	周龄	鼠数(只)	总骨密度	小梁骨密度	皮质骨密度
1.4mm	4	6	451 $\pm$ 32	306 $\pm$ 27	787 $\pm$ 19
	6	4	176 $\pm$ 18	300 $\pm$ 31	804 $\pm$ 16
	8	5	479 $\pm$ 47	381 $\pm$ 41	808 $\pm$ 25
	10	5	544 $\pm$ 36	325 $\pm$ 62	852 $\pm$ 12
	12	5	587 $\pm$ 54	332 $\pm$ 67	919 $\pm$ 62
4.0mm	4	6	534 $\pm$ 31	215 $\pm$ 10	889 $\pm$ 33
	6	5	576 $\pm$ 24	213 $\pm$ 8	934 $\pm$ 25
	8	6	603 $\pm$ 47	222 $\pm$ 11	974 $\pm$ 39
	10	5	726 $\pm$ 45	236 $\pm$ 18	1099 $\pm$ 44
	12	4	730 $\pm$ 29	263 $\pm$ 62	1103 $\pm$ 53

3. 被测胫骨部位不同,其组成的面积也有差

异,总面积和皮质面积随着动物周龄的增长逐渐增大,但是小梁面积以 8 周龄为最大值,见表 2。

表 2 不同周龄小鼠胫骨内各组分面积的变化(mm^2)

胫骨近端	周龄	鼠数(只)	总面积	小梁面积	皮质面积
1.4mm	4	6	4.04 $\pm$ 0.45	1.97 $\pm$ 0.29	0.55 $\pm$ 0.31
	6	4	4.73 $\pm$ 0.29	2.24 $\pm$ 0.27	0.82 $\pm$ 0.14
	8	5	4.82 $\pm$ 0.35	2.32 $\pm$ 0.31	0.91 $\pm$ 0.33
	10	5	5.37 $\pm$ 0.91	2.13 $\pm$ 0.32	1.66 $\pm$ 0.32
	12	5	5.66 $\pm$ 0.56	2.05 $\pm$ 0.51	1.94 $\pm$ 0.37
4.0mm	4	6	1.85 $\pm$ 0.17	0.67 $\pm$ 0.08	0.65 $\pm$ 0.11
	6	5	2.33 $\pm$ 0.19	0.80 $\pm$ 0.11	0.94 $\pm$ 0.12
	8	6	2.62 $\pm$ 0.24	0.90 $\pm$ 0.13	1.11 $\pm$ 0.17
	10	5	2.70 $\pm$ 0.27	0.73 $\pm$ 0.17	1.34 $\pm$ 0.14
	12	4	2.87 $\pm$ 0.28	0.79 $\pm$ 0.16	1.40 $\pm$ 0.08

讨 论

随着社会进入老龄化,骨质疏松患者日益增多,对骨质疏松症的研究越来越深入。目前,检测设备日趋高灵敏度、高精度度以及快捷、方便、安全。pQCT(外周骨定量计算机断层扫描)已具备了这些条件^[3],在国外的临床和动物实验中已广泛应用于骨质疏松的诊断和治疗效果的评价。在基础研究方面选择大鼠进行抗骨质疏松药物文献报道较多,但是大鼠作为整体模型具有成本高、周期长、用药量大等缺点,不利于筛选新药的研究和开发。

小鼠来源方便、经济,是实验室常用的一种动物,性成熟为 40~50 d。本研究选择了国内最常用的昆明种雌性小鼠,4~12 周龄,此时的动物生长最旺盛,一般的动物饲养中心都能及时供应。图 1 表明,小鼠 4~12 周龄与体重呈正相关 $r = 0.963, P < 0.001$ 。

整体动物骨骼检测,虽然条件的控制与离体样品比较难度要大,但是可以节约成本、减少实验误差,可以动态的观察实验动物的各种变化,评价药物作用等有利因素,更易被人们接受。

本研究经预初的 pQCT 对小鼠的检测,选择了胫骨近端骨髓线 1.4 mm 和 4.0 mm 处作断层测定,因为前者以松质骨为主,后者密质骨相对较多,见表 1。结果证实距骨髓线越远密质骨越多,总骨密度也越高。随着小鼠周龄增加,其骨密度值也相应提高,4~12 周龄与其胫骨总骨密度、皮质骨密度有显著的相关性,而 4.0 mm 处($r = 0.770, P < 0.001$ 和 $r = 0.790, P < 0.001$)相关性比 1.4 mm($r = .614, P < 0.01$ 和 $r = 0.631, P < 0.001$)更好。因此通过骨密

(下转第 283 页)

胞质,在核周聚集明显。定量检测中免疫细胞化学和 Western blot 结果一致,发现均匀双轴机械刺激在各时段 COX-2 的表达不同,当均匀双轴机械刺激为 2 h 时,即使最大强度的刺激(200 000 microstrain)也不足以引起成骨细胞 COX-2 蛋白表达发生明显的增加,而当机械刺激的时间超过 4 h 以上(包括 8 h 组)时即使最小的刺激强度(20 000 microstrain)也能促进成骨细胞 COX-2 蛋白的表达,提示了导致成骨细胞 COX-2 表达的增高,机械刺激必需要维持一定的时间,即有一个机械刺激的时间阈值。同时还发现刺激 4 h 组成骨细胞 COX-2 的表达随均匀双轴机械刺激强度的增加而逐渐升高,提示了成骨细胞 COX-2 表达的高低与机械刺激的强度也是密切相关的,即存在一个机械刺激的强度阈值。然而机械刺激作用 8 h 时,成骨细胞 COX-2 的表达与对照组相比虽然有明显的增高,但是随机械刺激的增加而降低,与 4 h 时的趋势正好相反,分析原因可能是因为机械刺激的作用超出生理性的阈值,反而中断了成骨细胞内机械刺激的信号传导通路,不能使成骨细胞 COX-2 的表达继续上调。以上结果揭示了成骨细胞 COX-2 蛋白的表达与均匀双轴机械刺激的强度和作用的时间都有关,并且只有机械刺激的强度(20 000 ~ 200 000 microstrain)和时间(2 ~ 8 h)在适当的范围时才会促进成骨细胞 COX-2 的表达。

本研究初步探讨了均匀双轴机械刺激与成骨细胞 COX-2 表达的关系,发现了一定时间和强度的均

匀双轴机械刺激可以促进体外成骨细胞 COX-2 的表达,希望能对临床的牵引成骨有理论上的支持与揭示。

参 考 文 献

- 1 Meyer U, Terodde M, Joos U, et al. Mechanical stimulation of osteoblasts in cell culture. Mund Kiefer Gesichtschir, 2001, 5: 166-172.
- 2 Hatton JP, Pooran M, Li CF, et al. A short pulse of mechanical force induces gene expression and growth in MC3T3-E1 osteoblasts via an Eax 1/2 pathway. J Bone Miner Res, 2003, 18: 58-66.
- 3 Wadhwa S, Choudhary S, Voznesensky M, et al. Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 297: 46-51.
- 4 Kaspar D, Seidl W, Neidlinger Wilke C, et al. Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. J Biomech, 2002, 35: 873-880.
- 5 Sonia K, David JB, William Lau KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation. Bone, 2003, 32: 241-251.
- 6 Ramires PA, Romito A, Cosentino F, et al. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on *in vitro* osteoblasts behaviour. Biomaterials, 2001, 22: 1467-1474.
- 7 Rayond ND, Steven BA, Leslie C, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB, 1998, 12: 1063-1073.
- 8 Nauman EA, Satcher RL, Keaveny TM, et al. Osteoblasts respond to pulsatile fluid flow with short-term increases in PGE2 but no change in mineralization. J Appl Physiol, 2001, 90: 1849-1854.
- 9 Kaspar D, Seidl W, Neidlinger Wilke C, et al. Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. J Biomech, 2002, 35: 873-880.

(收稿日期: 2004-04-15)

(上接第 289 页)

度的变化,可以了解、评价药物以及其他因素对骨代谢的作用;骨质疏松是以骨量减少,骨的微结构退化为特征,其微结构的变化从形态学观察主要是由于骨小梁变薄、变细,甚至断裂,因此骨小梁的变化与是否是非常重要的指标。本实验的测定结果显示,小鼠 4 ~ 12 周龄,骨小梁骨密度虽然随着周龄的增长略有提高,但无明显相关性;而且胫骨近端 1.4 mm 处骨密度明显高于 4.0 mm 的部位,并且相对较稳定,证明该部位主要有松质骨组成,此处是了解骨小梁变化的重要部位。检测结果发现(见表 2),骨小梁面积以 8 周龄时为最大,以后逐渐减小,可能与骨有机质和矿物质代谢有关^[4],这有待进一步的研究证

实。

根据上述结果,结合对小鼠进行双侧卵巢切除手术以及手术存活鼠的观察和测定,认为选择 8 ~ 10 周龄的小鼠适宜作为骨质疏松的筛选模型。

参 考 文 献

- 1 Gasser JA. Assessing bone quantity by pQCT. Bone, 1995, 17: 145-154.
- 2 张戈,秦岭, Hong VWY, 等. 成年卵巢切除大鼠模型股骨近端 pQCT 和 DEXA 的相关分析. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8: 135-137.
- 3 贾军宏,刘忠厚. QCT 与 pQCT 在骨质疏松诊断中的临床应用. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9: 172-176.
- 4 陈方,吴铁,崔燎. 不同月龄小鼠骨有机质的矿物质变化的观察. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8: 296-299.

(收稿日期: 2004-03-22)