

去势法兔骨质疏松模型建立的探讨

方忠 杨琴 李锋 段军 敦先礼

摘要: **目的** 探讨采用去势法建立兔骨质疏松症模型的可行性。**方法** 将20只5月龄新西兰雌兔随机分成手术组(OVX)与假手术组(SHAM),手术组行双侧卵巢切除。两组分别于术前、术后4、8、12、24w进行全身骨密度(BMD)检测;术前、术后12w和术后24w行骨代谢指标检测:骨特异性碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(BGP)、抗酒石酸酸性磷酸酶-5b(TRAP-5b);于术后12w和24w各处死10只兔,取其右侧股骨行生物力学测定及取腰椎,制成不脱钙的骨切片,行骨组织形态计量学分析。**结果** 去势6m后,OVX组全身BMD明显低于SHAM($P<0.01$);在骨代谢指标TRAP-5b、BALP及BGP,OVX组均明显高于SHAM组($P<0.01$);生物力学检测中的弯曲强度、比例载荷、最大挠度和弯曲破坏载荷OVX组均较SHAM组明显下降($P<0.01$)。骨组织形态计量学显示,OVX组的骨质丢失明显增加(BV/TV%下降,Tb.N减少,Tb.Sp变宽),骨小梁形成明显减少(OS/BS及MAR均增多),骨吸收明显升高(ES/BS、Oc.No/Tb.Pm升高),这些指标与SHAM组比较有明显性差异($P<0.01$)。**结论** 去势法建立兔骨质疏松症模型切实可行,5月龄雌兔,造模6月。本模型为探明原发性骨质疏松发病机理、评价药物疗效及临床骨质疏松性假体松动研究提供重要的基础。

关键词: 去势法;骨质疏松症;动物模型

Establishment of rabbit osteoporosis model by ovariectomy FANG Zhong, YANG Qin, LI Feng, et al. Department of Orthopedic Surgery, Tongji Hospital Affiliated Tongji Medical College of Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective To investigate the establishment of rabbit osteoporotic model by ovariectomy. **Methods** Twenty New Zealand rabbits were divided into two groups equally: operation group (OVX) and shame operation group (SHAM). The bilateral ovaries of the OVX were ectomized, while those of the SHAM were not. The BMD was measured before and 4, 8, 12, 16 and 24 weeks after the operation. The BALP, BGP and TRAP-5b, indicators, bone metabolism indicators, were observed before and 12 and 24 weeks after operation. Ten rabbits were sacrificed at 12 and 24 weeks post-operation respectively and specimens of right femurs were sectioned for biomechanical test and the third lumbar vertebra for the histomorphometry. **Results** After six months of the operation, the BMD in the OVX group was lower than that of the SHAM's ($P<0.01$). While the levels BALP, BGP and TRAP-5b were higher ($P<0.01$). All the biomechanics markers, such as winding destroy, proportion load, maximum deflection and winging strength, in the OVX showed less strength than the SHAM's ($P<0.01$). More increased bone loss, significantly reduced remodeling of trabecular and bone resorption was shown in the OVX group ($P<0.01$). **Conclusions** Ovariectomy is a good way to establish New Zealand rabbit model of osteoporosis. The rabbits should be five months old and the whole procedures takes six months. This study makes it possible for further study of osteoporosis.

Key words: Ovariectomy; Osteoporosis; Animal model

随着社会人口老龄化,骨质疏松症发病率也随之增高,但对于骨质疏松症,尤其对绝经后骨质疏

松症的病因、发病机制、治疗及预防等目前还没有完全了解清楚,还有待进一步研究;同时,随着骨质疏松性骨折发病率增加,骨折内固定物植入和假体置换增多,则相关一些研究对实验动物要求更高、更合理。对骨质疏松症动物模型报道中,选

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科(方忠、李锋、段军、敦先礼);三峡大学医学院病理教研室(杨琴)

用的动物多为大鼠^[1,2],而大鼠的骨体积小、骨量较少,骨的生理特征和人类也有差异,所以我们选用兔作模型,但有关兔的骨质疏松症模型报道较少,本文拟探索以期证明去势兔骨质疏松动物模型建立的可行性,这对深入开展内植物骨质疏松性骨内的骨反应、骨质疏松性假体松动等方面进行研究提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

新西兰单纯种大白兔,由华中科技大学同济医学院动物中心提供,雌性,5月龄,体重2.0~2.5 kg。

1.1.2 主要试剂

骨碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(BGP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP-5b)试剂盒均由武汉博士得生物公司生产,荧光四环素(上海华美生物公司提供)及常用化学试剂(分析纯)。

1.1.3 主要仪器设备

双能X-线骨密度仪(XR-36 DEXA 美国Norland公司),日本津岛DSC-25T力学万能试验机(华中科技大学机械系实验室提供),硬组织刀片机(德国Leica SP-1600)及骨形态计量学分析系统(上海第九人民医院骨科实验室提供)。

1.2 方法

1.2.1 分组及手术

将20只新西兰雌兔随机分为手术组(OVX)与假手术组(SHAM),每组10只。以0.2~0.3 ml/kg速眠灵(长春市军需大学兽医研究所)肌注麻醉,在无菌条件下由正中切开腹腔,手术组切除双侧卵巢,关闭腹腔;假手术组打开腹腔找到卵巢后即关闭腹腔。术后安置在饲养温度20~25℃,相对湿度为40%~70%环境中。术后3d内肌注庆大霉素1万U/kg,每天2次。术后兔定量喂食(50 g/d),自由饮水。

1.2.2 全身骨密度测定

分别于术前、术后4、8、12、16、20、24w进行全身BMD(XR-36 DEXA)检测。

1.2.3 骨代谢指标检测

分别于术前、术后12w和24w进行检测反映成骨细胞功能活性的骨特异性碱性磷酸酶(B-ALP)利血清骨钙素(BGP)。反映破骨细胞活性的抗酒石

酸酸性磷酸酶(TRAP-5b)。采取兔血清为样本,均采用酶联免疫法(ELISA)检测。

1.2.4 生物力学检测

分别于术后12w和24w各处死10只兔,取出右侧股骨,剥离骨上软组织,作三点弯曲试验测定:测量弯曲强度(δ_{max})、比例载荷(P_0)、弯曲破坏载荷(P_b)和最大挠度(δ_b)的变化。

1.2.5 骨组织形态计量学分析

分别于术后12w和24w各处死10只兔,且于处死前第10d和第3天,以25 mg/kg四环素耳缘静脉注射。处死后取第三腰椎,去除附着的软组织,取1 cm骨组织,立即放入Millonig's液中固定24 h。乙醇逐级脱水,每次24 h,最后二甲苯透明4 h,甲基丙烯酸甲酯包埋。固化后用硬组织刀片机分别切薄片(5 μ m)和厚片(10 μ m)。厚片用中性树胶封片直接在荧光显微镜下行荧光观察。薄片用乙二醇乙醚乙酸酯脱塑,2%甲苯胺蓝染色,用HPIAS-1000图像分析系统进行形态学测量及计算:代表骨量及细微结构静态指标:骨体积(BV/TV%)、骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁间隙(Tb.Sp);代表骨形成指标:类骨质表面积(OS/BS)、骨矿化沉积率MAR;代表骨吸收指标:单位骨小梁周长的破骨细胞数目(Oc.No/Tb.Pm),侵蚀表面积(ES/BS)。

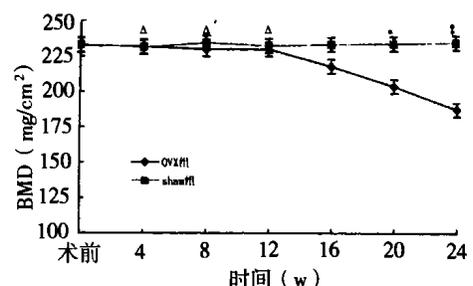
1.3 统计学方法

采用SPSS/PC统计软件,组间均数比较用 t 检验,治疗前后均数比较用配对 t 检验,率比较用卡方检验。

2 结果

2.1 全身BMD检测结果

如图1所示,OVX组BMD于术后12w内与SHAM组比较没有显著性差异($P>0.05$);而到术后20w,OVX组BMD明显下降,到24w,



注:与Sham组比较, $\Delta P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图1 全身BMD的变化

OVX组BMD下降了去势前的近1/4,与对照组比较,有显著性差异($P<0.01$)。

2.2 骨代谢指标检测结果

如表1所示,OVX组与SHAM组比较,在术

后12w各代谢指标变化已较明显($P<0.05$);到术后6m,两组间更为明显($P<0.01$)。在OVX组内,术后12w及术后6m与术前比较,各骨代谢指标变化有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表1 骨代谢指标结果($\bar{x}\pm s$)

骨代谢指标	OVX组			Sham组		
	术前	术后12w	术后24w	术前	术后12w	术后24w
BGP ($\mu\text{g/L}$)	28.30 \pm 2.03	36.54 \pm 1.93 ^{*△}	39.21 \pm 2.15 ^{**△△}	28.13 \pm 1.85	27.95 \pm 2.07	28.61 \pm 1.94
B-ALP (U/L)	10.3 \pm 1.35	15.2 \pm 1.65 ^{*△}	18.4 \pm 1.04 ^{**△△}	10.8 \pm 0.94	11.2 \pm 1.23	10.4 \pm 1.15
TRAP-5b (U/L)	4.1 \pm 0.18	6.5 \pm 0.24 ^{*△}	8.6 \pm 0.19 ^{**△△}	4.5 \pm 0.25	4.2 \pm 0.27	4.3 \pm 0.18

注:与Sham组比较^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;OVX组内与术前比较[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

2.3 生物力学检测结果

如表2所示,在12w时,OVX组与Sham组比较,所有的生物力学指标变化没有显著性差异

($P>0.05$);但于术后6m,两组比较,这些生物力学指标差异显著($P<0.01$)。

表2 生物力学检测结果($\bar{x}\pm s$)

生物力学指标	OVX组		Sham组	
	术后12w	术后24w	术后12w	术后24w
比例载荷 P_0 (kg)	20.26 \pm 1.15 [#]	11.07 \pm 0.67 ^{**△△}	21.04 \pm 1.2	20.12 \pm 1.18
弯曲强度 δ_{max} (kg/mm ²)	14.96 \pm 0.74 [#]	10.12 \pm 0.58 ^{**△△}	15.43 \pm 0.83	15.81 \pm 0.76
最大挠度 δ_b (mm)	4.8 \pm 0.21 [#]	3.1 \pm 0.16 ^{**△△}	4.9 \pm 0.24	4.9 \pm 0.23
弯曲破坏载荷 P_b (kg)	35.89 \pm 2.03 [#]	29.84 \pm 1.46 ^{**△△}	36.28 \pm 3.19	36.45 \pm 2.51

注:与Sham组比较[#] $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;OVX组内与术前比较[△] $P<0.05$;术后12w与Sham组比较[#] $P>0.05$

2.4 骨组织形态计量学分析结果

如表3所示:OVX组与SHAM组比较,术后3月反映骨吸收及骨量丢失的指标变化不明显($P>0.05$);而术后6m,OVX组的骨质丢失明显增加(BV/TV%下降,Tb.N减少,Tb.Sp变宽),骨小梁形

成明显减少(OS/BS及MAR均增多),骨吸收明显增加(ES/BS、Oc.No/Tb.Pm升高)。多项指标有显著性差异($P<0.01$)。且术后24w的腰椎骨组织镜下观察可见,手术组较假手术组皮质变薄,骨小梁数目明显减少,髓腔相对扩大,破骨陷窝增多(图2、图3)。

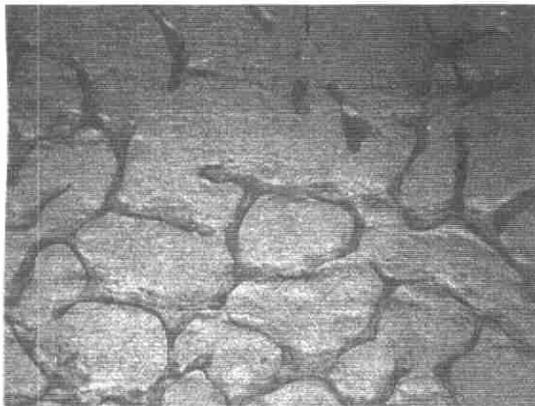


图2 OVX组中,骨小梁稀疏、间隙增大,有断裂骨小梁 $\times 40$

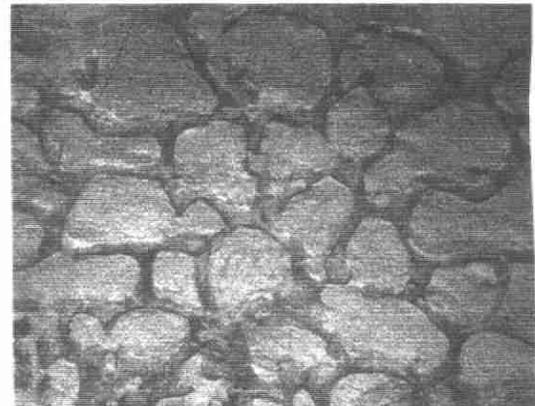


图3 Sham组中,骨小梁丰富、粗大、排列较整齐 $\times 40$

表3 骨形态计量学检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

参数	OVX组		Sham组	
	术后12w	术后24w	术后12w	术后24w
BV/TV (%)	24.90±2.42 [#]	14.59±1.53 ^{**}	25.31±2.31	25.16±2.28 [*]
Tb.N (#/mm)	2.43±0.22 [#]	1.54±0.19 ^{**}	2.48±0.21	2.51±0.18
Tb.Sp (μm)	221.20±22.68 [#]	257.20±26.18 [*]	215.84±18.59	220.15±21.34
MAR (μm/d)	1.97±0.14 [#]	1.08±0.13 ^{**}	2.04±2.0	2.12±0.17
OS/BS (%)	36.19±3.61 [#]	24.95±2.45 ^{**}	37.52±3.27	36.98±2.94
Oc.No/Tb.Pm (#/mm)	0.35±0.08 [#]	0.86±0.05 ^{**}	0.34±0.05	0.35±0.03
ES/BS (%)	17.42±1.78 [#]	26.54±2.31 ^{**}	16.84±1.62	17.17±1.46

注:与Sham比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;术后12w与Sham比较[#] $P > 0.05$

3 讨论

3.1 去势法建立兔骨质疏松症模型的可行性

骨质疏松症动物模型可在整体水平上研究骨质丢失和骨强度的改变。BMD、骨代谢指标、生物力学及病理组织学等方面的变化是评价骨质疏松模型是否建立的重要内容。BMD是骨矿代谢中量化骨量的指标。本实验采用双能X线骨密度仪测定BMD,该仪器精密度高,所得结果准确可靠。本组实验结果表明,去势6m后,全身的BMD明显降低($P < 0.01$)。骨弯曲强度、弯曲破坏载荷、最大挠度是表示骨的重要力学性质,为衡量骨质疏松是否成功建立的有效生物力学指标内容。本实验结果表明,去势后6月,手术组较假手术组所能承受的载荷下降,反映在弯曲强度明显下降($P < 0.01$)。骨代谢指标可以及时动态地反映正在进行的骨重建状况,对骨质疏松症的早期诊断、预测骨丢失具有重要的意义。本组实验结果表明,去势后3月,反映骨吸收指标的TRAP-5b已经有明显的升高($P < 0.05$)。较BMD及生物力学变化明显提前。组织病理学检查是反映骨结构变化的最直接的依据,而不脱钙骨切片的形态计量学分析更能反映骨吸收、骨形成及其重建的微结构变化,本实验组去势6月后,反映骨丢失、骨吸收等多项指标显示明显增多($P < 0.01$)。以上指标综合证实本实验组的5月雌兔,经去势6月后,骨质疏松模型形成。综上所述,用兔作为骨质疏松模型及采用切除双侧卵巢的方法诱导兔骨质疏松症动物模型建立是完全可行的。

3.2 建模方法和时间

建立动物骨质疏松症模型的方法很多,有去势法、药物法、低钙饮食法、摘除甲状腺法等,但关于建立兔骨质疏松症的方法报道不多。

药物法建立兔骨质疏松症模型多采用糖皮质激素

类药物^[3,4]。泼尼松龙的用法为2~4 mg/kg,连续肌注4d。醋酸可的松的用法为15~25 mg/kg,连续肌注4d。

去势法^[5]是通过摘除双侧卵巢造成其雌激素缺乏而形成骨质疏松,其机理类似于人类绝经后骨质疏松症。用去势法来建立骨质疏松症模型的新西兰兔应为5月龄,因为该月龄兔相当于人的生长发育成熟期,此时兔的骨骼等已发育成熟^[6]。形成模型所需时间为6~8个月。本实验表明,6个月时即可使兔出现明显的骨质疏松。

3.3 建立兔骨质疏松症模型的优点

用来建立骨质疏松症模型的动物很多^[7,8],有鼠、狗、猫、羊、猪、猴、兔等。猴虽为和人类各方面最为相似的动物,但因为其价格昂贵而难以采用。狗和羊一年只有两次发情期,使得其性激素长期处于极低水平,而摘除卵巢或睾丸后,也不会出现明显的骨丧失,组织学的改变也与卵巢(睾丸)摘除不相一致,两者价格也稍昂贵;另外,狗较凶猛,饲养不便,又和人类关系密切。用鼠建立骨质疏松症模型已很久了,但其不能很好地模拟人类,因为它终身在不断地生长,不能达到真正的骨骼成熟,也缺乏皮质内改建。猫比鼠稍好一些,但需要很长时间才会出现骨质疏松症的显著变化。

与之相比,兔具有以下优点:1.兔为中等大小的动物,骨骼转化快,约为人的3倍,故短期内即可观察到骨组织的改变;从胫骨的病理切片上看,兔的骺板多数钙化并消失,与成年人骺板钙化并消失相似,而大鼠骺板终生存在。因此兔比鼠更接近人。2.性情温顺,易于获取,便于饲养,成本低廉。3.取血方便而利于动态观察。

总之,本研究表明,去势法建立新西兰兔骨质疏松症模型切实可行,所用兔以5月龄为宜,6个月即可建立起骨质疏松症模型。确定造模成功与否

(下转第209页)

治具有重要意义。

【参 考 文 献】

- [1] 马锦富, 杨定焯, 安珍, 等. 成都地区骨峰值的研究. 中国骨质疏松杂志, 2000, 8: 16-18.
- [2] 杨定焯, 尚家芸, 宋文忠, 等. DXA 测量用校准脊柱体模的研制及临床测试. 中国医学科学院学报, 2003, 25: 262-266.
- [3] 余卫, 秦明伟, 徐苓, 等. 正常人腰椎骨密度变化. 中华放射学杂志, 1996, 30: 625-629.
- [4] 王文志, 马锦富, 杨定焯, 等. 成都地区中老年人群骨密度调查. 中国骨质疏松杂志, 2000, 6: 40-43.
- [5] 吴青, 陶国枢, 牟善初, 等. 腰椎前后位骨密度检测结果的正确评价. 中华老年医学杂志, 1998, 17: 83-86.
- [6] 李宁华, 区品中, 朱汉民, 等. 中国多中心健康人群标准化骨密度正常参考值分析. 中国老年学杂志, 2002, 22: 3-5.
- [7] 安珍, 王文志, 杨定焯, 等. 成都地区城乡人群原发性骨质疏松调查. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8: 233-236.
- [8] Zmuda JM, Cauley JA, Glynn NW, et al. Posterior-anterior and lateral dual-energy X-ray absorptiometry for the assessment of vertebral osteoporosis and bone loss among older men. J Bone Miner Res, 2000, 15: 1417-1424.

(收稿日期: 2004-08-01)