

双侧卵巢切除大鼠不同时间段骨形态计量学参数的观察

刘晓青 崔燎 吴铁

摘要: **目的** 观察去卵巢大鼠骨质疏松模型复制情况并动态观察去卵巢后不同时间段骨丢失情况, 为抗骨质疏松药物研究提供对照依据。 **方法** 4.5 月龄 SD 雌性大鼠, 按体重随机分组, 大鼠摘除双侧卵巢; 在实验的第 0 d(4.5 月龄)、4 w(5.5 月龄)、12 w(7.5 月龄)、18 w(9.5 月龄) 杀死大鼠取材; 采用体内双荧光标记法, 胫骨上段硬组织包埋切片及松质骨形态计量学分析处理, 观察去卵巢后不同时间段骨丢失情况。 **结果** 大鼠去卵巢 4 w 后骨量显著降低, 骨结构变差, 骨形成有增加, 骨吸收增加, 骨吸收大于骨形成, 骨转换增加。去卵巢 12 w 后, 大鼠骨量进一步降低, 骨小梁宽度先变窄(4 w) 后变宽(8、12、18 w), 骨形成和骨吸收均增加, 去卵巢后大鼠在前一个月内(4 w) 骨量(Tb.Ar%) 降低 64.18%, 差异有显著性($P < 0.05$)。 **结论** 大鼠去卵巢 4 w 后骨量降低, 骨结构变差, 骨形成和骨吸收增加, 骨转换增加, 去卵巢 12 w 到 18 w 骨量持续丢失, 但较缓和, 提示去卵巢后骨丢失在前 4 w 最快更明显。因此, 用于药物研究可选择去卵巢后 4 w 时间进行。

关键词: 去卵巢; 不同时间段; 骨形态计量学

Study of bone histomorphometric changes at regular intervals in OVX rats LIU Xiaoqing, CUI Liao, WU Tie. Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Guangdong 524023, China

Abstract: **Objective** To study dynamic changes of the bone histomorphometric parameters at regular intervals in rats after OVX. **Methods** Seventy-two female rats aged 4.5 months were randomly divided into two groups according to the weight. Each group was subdivided into sham and OVX group. The mean weight was (256.3 ± 25.3) g. Tetracycline derivatives and Calcein were administrated to each rat on two separate occasions to label sites of bone formation. Each group were sacrificed at 0, 4 w, 12 w, 18 w. The undecalcified longitudinal proximal tibial metaphyseal sections were cut and stained for quantitative bone histomorphometry. **Results** The cancellous bone volume was relatively stable in sham rats, but decreased in OVX rats at 4 w, 8 w, 12 w and 18 w after ovariectomy. The trabecular bone volume reduced at 4 w after ovariectomy, and then slowly decreased to a constant level from 8 w to 18 w, while the bone mass kept relatively stable; both bone formation and bone resorption increased markedly initially and then reduced slowly and bone turnover increased. The maximal significant increase occurred during the 4 w. **Conclusions** The bone mass at 4.5 M ~ 10 M in sham-rats keeps stable; but the trabecular bone volume in OVX rats decreases quickly during the first month(4 w), and the initial rapid phase of bone loss is coincident with the maximal increase in bone turnover. At later times postovariectomy, trabecular bone mass appears to stabilize as bone turnover declines. These findings emphasize the close temporal relationship between increased bone turnover and the development of osteopenia in OVX rats. The postovariectomy-one-month rats can be chosen for study of the preventive effect of drugs on osteoporosis.

Key words: Ovariectomy; Different time; Bone histomorphometry

去卵巢大鼠骨质疏松模型是最常用模型之一, 其骨质和骨量随时间的推移有一个变化规律, 深入

了解去卵巢大鼠的骨量、骨结构、骨动态参数的变化, 有助于深入研究抗骨质疏松的药物, 为其机制研究提供对照实验依据。对去卵巢大鼠的骨动态变化国外学者已有报道, 但国内尚未见报道, 本实验对此进行了初步的探讨。

基金项目: 湛江市科技攻关计划项目基金资助

作者单位: 524023 湛江, 广东医学院药理教研室

通讯作者: 吴铁, Email: anny.liu@163.net

1 材料和方法

1.1 试剂

四环素(上海新亚制药厂),钙黄绿素、骨组织染料(Masson-Goldner Trichrome; Poncean Fuchsin Stock; Phosotungstic acid-Oragne; Light green)等均为 Sigma. USA 产品。

1.2 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,计算机和骨形态计量学测量程序“KSS”体视学软件(USA)。

1.3 动物与分组

72 只 4.5 月龄 SD 雌性大鼠(广东医学院实验动物中心提供),体重(256.3 ± 25.3) g,普通级。按体重随机分组,均用蒸馏水灌胃。所有动物均在 24 ~ 28 ℃,通风良好,湿度在 60% ~ 70% 的条件下饲养,自由摄水、摄食,每周称重 1 次;实验第 0、4、12 和 18 w 各实验时间段结束后处死大鼠,分次取右侧胫骨、子宫供测定用。

1.4 骨组织形态计量学测量

各年龄段大鼠在处死前第 14、13 d 和第 4、3 d 两次分别给予四环素和 Calcein 标记,以在骨组织形

成双荧光标记。各实验时间段结束后大鼠处死,分离左右侧胫骨,除尽肌肉和附着组织,用低速锯将其纵剖开,固定于 10% PBS 福尔马林液 12 h,按硬组织切片法^[1]用塑料包埋不脱钙骨,并切成 4 μm 薄片和 8 μm 厚片,薄片进行 Masson-Goldner 染色,厚片进行 AgNO₃ 染色,骨片在距断线 1 mm 处至远端 4 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告^[2]。骨组织形态计量学静态参数包括:反映骨量的参数—骨小梁面积百分数(% Tb.Ar);反映骨结构的参数—骨小梁宽度(Tb.Wi),骨小梁数量(Tb.N)骨小梁分离度(Tb.Sp)。动态参数包括骨形成参数—荧光标记周长百分数(L.Pm%),矿化沉积率(MAR),单位骨小梁周长骨形成率(BFR/BS),单位骨小梁面积骨形成率(BFR/BV);骨吸收参数—单位骨小梁面积上的破骨细胞数(Oc.N),破骨细胞周长百分率(% Oc.Pm)。

1.5 统计学处理

数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间用单因素 *F* 分析, *P* < 0.05 有差异, *P* < 0.01 差异有显著性。

2 结果

2.1 去卵巢大鼠体重的变化见表 1。

表 1 去卵巢后各时间段大鼠体重的变化表

组别	体重(g)					
	0 w	2 w	4 w	8 w	12 w	18 w
Basal	256.7 ± 14.7					
Sham	248.1 ± 24.0	260.0 ± 23.0	272.5 ± 28.8	268.9 ± 15.3	275.0 ± 26.1	340.0 ± 30.0
Ovx	258.8 ± 22.6	285.6 ± 26.9	308.8 ± 20.0 [*]	341.3 ± 29.0 [#]	356.9 ± 31.4 [#]	450.0 ± 25.5 [#]

注:与对照组比较^{*} *P* < 0.05, [#] *P* < 0.01

由表 1 可见,每一时间段去卵巢组大鼠的体重均比假手术组大鼠体重增加,且在去卵巢 4 w 后大鼠体重增加差异有显著性,提示去卵巢后大鼠体重增加;Ovx 12、18 w 组高于 Oxv 4 w 组,提示去卵巢大鼠的体重与正常大鼠一样随时间增加而增重。

2.2 骨计量学静态参数的变化见表 2。

表 2 去卵巢后不同时间段大鼠骨计量学静态参数的变化

鼠龄月	Tb.Ar (%)	Tb.Wi (μm)	Tb.N (#/mm)	Tb.Sp (μm)
4.5	28.2 ± 3.1	54.9 ± 1.7	5.1 ± 0.4	141.1 ± 16.6
5.5	11.24 ± 3.33 [#]	49.86 ± 5.06	2.25 ± 0.61 [#]	420.65 ± 120.15 [#]
7.5	8.64 ± 2.62 ^{#△}	58.37 ± 6.50	1.48 ± 0.41 ^{#△}	661.36 ± 196.18 ^{#△}
9.5	7.75 ± 4.1 [#]	58.7 ± 5.2	1.15 ± 0.5 [#]	664.0 ± 27.3 [#]

注:与 4.5 月龄比较^{*} *P* < 0.05, [#] *P* < 0.01; 与 5.5 月龄比较[△] *P* < 0.05

静态参数的变化:由表 2 可见,去卵巢 4 w(5.5 月龄)、12 w(7.5 月龄)和 18 w(9.5 月龄)组大鼠与实验开始时基础骨量比较,Tb.Ar% 降低,Tb.Wi、Tb.N 降低,Tb.Sp 增加,差异有显著性(*P* < 0.01)。去卵巢 12 w(7.5 月龄)和 18 w(9.5 月龄)组大鼠与 4 w(5.5 月龄)组大鼠骨量比较,Tb.Ar% 降低,Tb.Wi、Tb.N 降低,Tb.Sp 增加,差异有显著性(*P* < 0.05)。去卵巢 12 w(7.5 月龄)大鼠与 18 w(9.5 月龄)组大鼠骨量比较,Tb.Ar% 降低,Tb.N 降低,Tb.Sp 增加,差异无显著性(*P* > 0.05)。提示去卵巢后随着时间推移,大鼠骨量逐步降低,骨小梁数量减少,骨小梁宽度有先变窄(4 w)后增宽(12 w)的趋势。其中去卵巢前 4 w 时间内骨量降低最多,随后速度减慢。

2.3 骨计量学动态参数的变化见表 3、表 4。

表 3 去卵巢后大鼠不同时间段骨形成参数的变化

鼠龄 (m)	L.Pm% (%)	MAR (mcm/d)	BFR/BS (mcm/d [*] 100)	BFR/BV (%/year)
4.5	12.7 ± 3.4	1.3 ± 0.1	16.7 ± 5.4	183.9 ± 59.8
5.5	21.09 ± 6.68 [*]	1.50 ± 0.19	31.60 ± 11.38 [#]	392.33 ± 156.49 [#]
7.5	27.06 ± 6.06 [*]	1.39 ± 0.26	37.25 ± 9.34 [*]	387.59 ± 81.15 [*]
9.5	28.3 ± 2.8 [*]	1.13 ± 0.2	38.4 ± 5.1 [*]	396.7 ± 52.4c [*]

注:与 4.5 月龄比较^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

表 4 去卵巢后大鼠不同时间段骨吸收参数的变化($\bar{x} \pm s$)

鼠龄 (m)	手术时间 (w)	Oc.N (#/mm ²)	Oc.Pm (%)
4.5	0	3.5 ± 1.0	0.76 ± 0.27
5.5	4	17.67 ± 3.99 [*]	2.44 ± 0.70 [#]
7.5	12	19.55 ± 5.87 [*]	2.06 ± 0.52 [*]
9.5	18	18.5 ± 0.3 [*]	2.48 ± 0.13 [*]

注:与 4.5 月龄比较^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

由表 3、表 4 可见,去卵巢 4 w(5.5 月龄)、12 w(7.5 月龄)和 18 w(9.5 月龄)组大鼠与实验开始时基础骨动态参数比较,反映骨形成的参数都升高,反映骨吸收的参数都升高,差异有显著性($P < 0.01$),提示去卵巢后前 4 w 内,骨形成和骨吸收都增加,形成骨高转换,骨量丢失快;去卵巢 12 w(7.5 月龄)和 18 w(9.5 月龄)组大鼠与 4 w(5.5 月龄)组大鼠骨动态参数比较,骨转换有变慢趋势,但差异无显著性($P > 0.05$)。去卵巢 12 w(7.5 月龄)组大鼠与 18 w(9.5 月龄)组大鼠动态参数比较,骨转换有变慢趋势且差异无显著性($P > 0.05$)。随着时间推移,去卵巢大鼠的骨形成和骨吸收活跃程度降低。

3 讨论

从体重结果可见,大鼠去卵巢后不论 4、8、12 w 还是 18 w,体重都增加,提示去卵巢可使大鼠增重。有文献报道,与正常大鼠比较,大鼠去卵巢后 3 w 体重就会增加,以后体重也会继续增加^[3]。许多学者也观察到这一现象^[4,5]。这与大鼠去卵巢后,雌激素的降低有关。本实验大鼠去卵巢后随时间推移其体重持续增加,其结果再次证明了这一点。

从骨形成计量学静态结果可见,大鼠去卵巢后 4、12 w 还是 18 w,与相应假手术组比较,骨量都降低,形态结构上表现为骨小梁数量减少,分离度增加;去卵巢 12 w 与 4 w 比较,骨量略减少,这主要是由于骨小梁数量减少,虽然同时宽度增宽,但这种增宽不能补偿数量的减少对骨量的影响。大鼠去卵巢后随着时间推移,骨量逐步降低,骨小梁数量减少,骨小梁宽度有先变窄(4 w)后增宽(12 w)的趋势;其中去卵巢前 4 w 时间内骨量降低最快。

从骨形态计量学动态参数观察反映骨转换的动态指标包括 L.Pm% (荧光标记周长百分数), MAR (骨矿化沉积率), BFR/BS (单位长度骨小梁表面上骨形成率), BFR/BV (单位骨小梁面积骨形成率), 这些指标均能反映骨形成活力; Oc.N (单位骨小梁面积上破骨细胞数量)和 % Oc.Pm (单位骨小梁面积上破骨细胞周长百分数)能反映骨吸收的活跃程度,骨形成增加,骨吸收增强,表示骨转换快。Tanizawa 等^[6]报道,大鼠去卵巢 2 周骨转换就增加并一直维持到 30d。Wronski 等^[7,8]研究报道在大鼠去卵巢后 14d 即可见骨转换指标升高,去卵巢后 35d 达高峰,之后逐渐降低。从我们的实验结果可见,大鼠去卵巢后不同时间段与假手术组比, L.Pm%、MAR、BFR/BS、BFR/BV、Oc.N 和 % Oc.Pm 均有不同程度的增加,即骨形成和骨吸收都有增加,呈骨高转化状态。结合静态参数推测,大鼠去卵巢后骨吸收多于骨形成,从而导致骨量降低、骨小梁数量减少、分离度增加;尤其是在去卵巢早期(4 w)较稍后期(12 w)更为明显,此结果与以往的研究结果一致^[8,9]。说明大鼠去卵巢后骨吸收活跃,继而偶联骨形成明显增加,形成骨高转换,骨量丢失;随时间推移,去卵巢大鼠的骨形成和骨活跃程度降低,提示去卵巢后的骨形成和骨吸收的变化也受到月龄的影响,随月龄增加,骨形成和骨吸收活跃程度降低。

大鼠去卵巢后由于雌激素不足,骨吸收超过骨形成,出现高转换型的骨质疏松,去卵巢模型是最常用的模拟妇女绝经后骨质疏松的动物模型,被广泛用于药物防治骨质疏松效果等领域的研究,这种模型可以稳定的引起大鼠骨量的丢失,骨吸收、骨形成的增加。从我们的实验结果来看,我们用此模型研究骨质疏松药物最好是选取去卵巢 1 个月后的大鼠,此时的大鼠各骨形态计量学参数变化趋于稳定,以便于我们更好地观察药物的药效。

【参 考 文 献】

[1] Baron RA, Vignery A, Neff L, et al. Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: Recker RR, ed. Bone Histomorphometry: Techniques and interpretation. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1983.

[2] Jee WSS, Inoue J, Jee KW, et al. Histomorphometric assay of the growing lone bones. In: Takasaki H, ed. Handbook of bone morphology. Niigata City, Japan: Nishimura, 1983. 101-103.

[3] Hu SC, Chou YC, Liu JY. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. Life Sci, 1999, 64: 2299-2306.

(上接第 429 页)

- [4] 邹移海,主编.中医实验动物学.暨南大学出版社,1999.100-102.
- [5] 军事医学科学院实验动物中心,译.实验用动物管理与使用指南.北京:原子能出版社,1993.366-369.
- [6] Tanizawa T, Yamaguchi A, Uchiyama Y. Reduction in bone formation and elevated bone resorption in ovariectomized rats with special reference to acute inflammation. Bone, 2000, 26: 43-53.
- [7] Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, et al. Long-term effects of

ovariectomy and aging on the rat skeleton. Calcif Tissue Int, 1989, 45: 360-366.

- [8] Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA, et al. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. Bone, 1986, 7: 119-123.
- [9] Whitfield JF, Morley P, Willick GE. Stimulation of femoral trabecular bone growth in ovariectomized rats by human parathyroid hormone (hPTH)-(1-30)NH(2). Calcif Tissue Int, 1999, 65: 143-147.

(收稿日期:2004-08-01)