

骨质疏松症模型的动物选择

朱彦昭 综述 史晓林 吴建民 审校

骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 是中老年人的一种常见病, 是以骨量减少及骨组织微观结构退化为特征, 致使骨的脆性增加、以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病^[1]。骨质疏松症是目前世界上发病率、死亡率和医疗保健消耗较大的疾病之一, 严重影响着老年人的生活质量和生存状况^[2]。在骨质疏松症的研究中, 正确建立和选择理想的骨质疏松实验动物模型, 是各种骨质疏松研究工作的基础。本文就骨质疏松症实验动物模型的选择及特点作一综述。

临床上用于骨质疏松的动物模型的种类和方法很多, 但目前还没有哪一种动物模型能复制人类骨质疏松的所有特征。骨质疏松症的发生原因十分复杂, 目前认为与遗传、营养、生活习惯、激素、运动、机械负荷和多种细胞因子有关。这就对骨质疏松症的动物模型提出了严格的要求。

合适的动物模型有3个必需考虑的要点 (1) 方便性 (Convenience): 动物购买容易, 价格便宜, 实验操作简便。(2) 相关性 (Relevance): 与人体条件有相似关联之处, 研究获得的信息能与人体的规律有同一性。(3) 适宜性 (Appropriateness): 对某种特殊的问题, 最好使用某一特定的动物模型对人体进行模拟^[3]。在建立骨质疏松模型中, 不可能满足全部理想条件。因此建立一种其组织行为的改变在人类骨质疏松症中所检测到的结果相匹配的动物模型是最基本的研究方法。目前常用的骨质疏松模型动物有大鼠、小鼠、兔、羊、狗、猪、猴等。

1 狗

狗性情温和驯良, 体型大小适中, 易于饲养管理; 可以做多次髌骨活检和抽取大量的血标本, 便于反复、长期观察; 骨骼可以接受人工装置的植入;

胃肠系统与人相似。随意杂交的狗, 因背景不确定, 种系难于了解, 不适于做骨质疏松的模型。因此, 实验常用特殊杂交 (purpose bred) 的 Beagle 狗。与其它的动物相比, 狗最大的优势在于皮质骨具有 Haversian 系统, 而且其骨代谢和骨结构特征、松质骨与皮质骨的比率、Haversian 系统及松质骨重建的形态学与人相似, 仅其重建的速率比人类稍快, 去睾丸狗有类似人类骨吸收大于骨形成的改变。骨量丢失在切除卵巢和子宫的狗只是一个暂时现象, 不能促使骨质疏松的发生, 因此卵巢切除模型有争议。目前比较肯定的是, 应用狗研究废用性骨质疏松较为成功, 而不适用于骨代谢研究^[1]。Fukuda 等^[4]的研究发现切除睾丸的狗, 术后第一个月有一个骨量丢失的起始阶段, 出现骨小梁断裂和海绵骨体积显著减小, 但血清钙、磷和肌酸酐变化不明显。第二阶段也就是骨量丢失持续阶段, 与成骨细胞不足有关, 可以部分地被给予 $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 而恢复丢失的骨量, 但对骨细胞数量和骨转换有抑制作用。不足之处在于: Beagle 狗价格昂贵, 动物来源困难; 1年只有春秋两次发情期, 雌激素分泌明显比人类低, 作雌激素缺失骨质疏松模型存在争议; 有两对血液供应不同的甲状旁腺, 在老年动物, 可发生甲状旁腺和甲状腺内分泌异常, 在骨代谢研究中所有的狗都要作甲状旁腺扫描; 狗为食肉动物, 对钙的日需要量比人类高, 对钙的小肠吸收低于人类, 易产生继发性甲状旁腺功能亢进。

2 猪

农家猪体重体型巨大, 成年体重近 150 kg, 管理饲养困难, 不适合作医学研究。用于作骨质疏松模型的猪大都采用小型猪, 品种主要有 Sinclair、Hanford、Homel、Yucatan、Vietnamese-Pot-Belled、中国贵州小猪等。其体积小, 占用空间少, 易于实验操作管理。用猪作骨质疏松模型优点主要有: 有明显的骨骼生长期和成年期; 发情周期与人类相似; 消化道结构的解剖与人类相近; 骨骼能接受人工装置的植入; 可以多次取活检和血标本; 有层状骨, 皮质骨重建和

作者单位: 310005 杭州, 浙江中医药大学附属第二医院骨伤实验室

通讯作者: 朱彦昭, Email: ulyssess03@163.com

松质骨丢失与沉积的发生率与人类相似,但其骨量重,骨小梁网比人致密^[5];尽管通过切除卵巢、子宫和用氟化物诱导的骨质疏松与人类骨质疏松存在骨量和骨强度的差别,但在表现形式上与人类相似;另外,它还可存在与骨量减少相关的自发性骨折。不足之处是:小型猪的价格昂贵,且有些地区买不到;饮食要求严格,尤其是钙的摄取,容易影响到骨密度(BMD)。并且小型猪子宫的血管容易破裂,因而其卵巢子宫切除术很困难。

3 羊

常用的有绵羊和山羊。使用羊作为骨质疏松的动物模型有许多优点:羊有明显的骨骼生长期和成年期,发情期在秋冬季,自发性排卵,激素分泌规律与女性相似,性格温驯,容易管理,价格相对便宜,来源丰富,便于安装人工假体,能多次活检和取大量血标本,髂嵴骨组织结构,氟化物在骨的沉积和对骨细胞的毒性反应方面与人类相似;年轻绵羊(小于3~4岁)的皮质骨呈丛状骨,而年老的绵羊(7~9岁)可见到 Haversian 系统的重建^[6],首先在股骨的尾部,其次在肱骨和桡骨部分。用放射免疫法测定骨钙素(Osteocalcin)发现绵羊血清骨钙素水平在妊娠期和哺乳期是不同的,老年(7岁)绵羊的血清骨钙素水平,与65岁老年妇女相似。

李良等^[7]选用1.5年龄的成都山羊双侧卵巢切除后6个月,动态观察髂骨骨组织的病理学变化及长骨骨生物力学变化,发现骨小梁数量逐渐减少,骨强度降低,易于骨折。双侧切除卵巢术后60天出现轻度骨小梁减少,相互连接分离。120~180天骨小梁数量进一步减少,骨小梁变细,宽度降低,出现纽扣样变,骨髓腔扩大,呈典型的骨量减少病理学改变^[8]。山羊在双侧卵巢切除后3月就出现骨量减少的变化,术后6个月骨量减少最为明显,这种变化与雌激素的降低有关^[9]。切除双侧卵巢的雌性山羊,随着实验时间从半年、至1年、至1年半,其骨质疏松的程度是逐步加深的^[10]。术后60天即出现轻度骨小梁减少,术后120天到180天,骨小梁进一步减少,宽度变薄,骨小梁间距扩大,呈典型的骨量减少病理学改变。术后180天各长骨密度、断端骨组织厚度、整体骨弯曲破坏荷载与弹性模量明显降低。除股骨外,各长骨整体骨的弯曲极限强度以及骨试件的弯曲、压缩、拉伸的极限强度和弹性模量明显降低。何成明等^[11]选用2岁左右的雌山羊,双侧切除卵巢1年后,股骨、胫骨、跖骨的几何参数均减小,股

骨整体骨三点弯曲弹性模量减小23.7%。胫骨骨试件的弯曲压缩和拉伸实验极限强度明显降低,1年半后股骨胫骨骨试件的压缩极限强度和弹性模量及胫骨试件弯曲的弹性模量明显减小。

研究表明,绵羊和山羊是极具潜力的大动物骨质疏松模型。但作为骨质疏松模型也有其不足之处:羊为草食反刍动物,维生素代谢和矿物质需要量以及磷代谢与人相差较大,尿中磷排泄较人低,消化道是排泄磷的主要渠道,为反刍类,如要进行口服药物吸收实验,需皱胃(第四胃)瘘管,没有自发性停经,BMD、生化、骨组织形态学等指标有季节性和日节波动,缺乏自发性骨折等。

4 家兔

家兔(rabbits)是一种很好的骨质疏松研究模型。其自然寿命为4~6年,性成熟期为5~8个月,1年以上达老年。繁殖率高,容易饲养管理。骨转化快,性腺发育6个月左右,骨骼即发育成熟。成年兔有 Haversian 重建活性,可用作合成代谢药物对松质骨及 Haversian 系统重建作用的研究^[12],耳缘取血方便,便于长期动态观察,骺板多钙化并消失,与人类相似。用于研究睾酮及雌激素对生长发育过程中BMD的影响,或卵巢切除后,糖皮质激素及肝素诱导OP动物模型。

方忠、杨琴等^[13]的研究表明,5月龄雌兔,双侧卵巢切除6个月后,家兔的BMD明显降低,骨代谢指标TRAP-5b、BALP及BGP明显增高。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明显下降。骨组织形态计量学显示,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)。但因兔的松质骨含量少,给骨计量学检测带来一定困难^[14]。

5 猴

与其他动物相比,灵长类动物用作骨质疏松动物模型具有突出优势:身体保持直立位,骨生物力学特性与人类极为相似,消化道、内分泌系统、骨代谢最接近人类;具有 Haversian 和松质骨重建活性;存在增龄性和制动性骨丢失;更为重要的是,有与人类女性相似的月经周期、动情周期和绝经,卵巢功能停止后骨矿密度降低、骨丢失速率等骨反应与绝经后妇女的情况相似^[15];由于灵长类动物与人类在进化树中的位置最近,对于建立基因显性特征研究方

面同样很有帮助^[16]。但是要作为绝经后的骨质疏松模型,雌性灵长类的年龄必须足够大,Cynomolgus猴9岁以后才能达到骨量峰值,而很多研究采用4~7岁的猴作卵巢切除术。因此,骨骼未成熟的灵长类在卵巢切除后似乎是一种不适当的模型。但是要找到老龄化的雌性灵长类很困难并且代价太高。由于费用昂贵,饲养管理条件要求高,操作危险,实验周期长;不可避免地携带或传播动物源性传染病等极大地限制了它们的应用;其次还有动物保护和环境保护等因素。

6 小鼠

小鼠(mice)在卵巢或睾丸切除后很快出现松质骨骨量丢失,遗传性性功能减退的雌性小鼠有明显的骨量减少。采用小鼠进行骨代谢遗传因素的研究了解特殊骨骼类型与遗传基因的联系,或是导入目的基因或敲除目的基因,观察其表型特征和病理变化,是目前骨质疏松研究领域中最感兴趣的课题之一^[17]。小鼠的基因易于调控,鉴于SAM/P 6、57 B 1/6 J和C 3 H/HeJ等小鼠的峰值骨量(PBM)的差异,应用分子生物学技术如杂交技术和cDNA探针等,对特定基因位点进行完整的基因学研究,识别一个或多个骨质疏松相关基因,是研究的热点之一。SAM/P 6小鼠是目前惟一被证实可出现老年性脆性骨折的实验动物。日本研究人员选用一种基因突变小鼠即twy小鼠进行OP研究,发现这种小鼠体内存在不平行钙化现象,颈椎有高度骨化现象,而腰椎发生高转化率的骨质疏松。Jackson实验室培育成的SAMP衰老小鼠,老化较正常小鼠快,有低峰骨量和中老年骨折的发生趋向。Iwaniec^[18]等的研究表明不同种系的小鼠去卵巢1月和3月后,骨质(BV/TV)分别降低20%和27%。并伴随松质骨表面破骨细胞增加。Weinstein等^[19]研究发现成年小鼠骨密度峰值在4个月,之后股骨继续增长4~8个月。他们发现不同品系小鼠的皮质骨密度由共同基因型决定,而股骨、椎骨、趾骨的密度、长度随基因型的不同各异。小鼠也存在骨骼太小,可供研究的血清较少,动情期不受下丘脑-垂体轴调节等因素影响。

7 大鼠

大鼠是迄今为止骨质疏松研究中使用最多的模型动物^[1]。SD(Sprague-Dawley)和Wistar大鼠已广泛用于骨质疏松的研究。美国食品与药品管理局(FDA)建议采用月龄6~10个月的大鼠复制骨质疏

松模型,此时有足够的骨小梁重建,适于实验观察。大鼠骨质疏松模型的优点主要是:分布广,繁殖快,花费低,体积小,易于饲养和管理,骨代谢、解剖与人类有众多的相似之处^[20],有明显的生长期和成年期,容易观察年龄对骨组织的影响,成年大鼠多个部位的松质骨骨量可在一段较长时期内保持稳定,是研究松质骨重建的合适条件。其松质骨分布和重建功能及板层骨的骨小梁重构能力与人类相似。大鼠去卵巢后,血清雌二醇明显下降,骨代谢活跃,骨转换增强,成骨细胞减少,破骨细胞增殖,骨吸收大于骨形成,进而导致骨量的丢失和骨力学强度的降低^[21]较好地模拟了正常人绝经后高转换型骨质疏松症,该模型最快可在15 d出现骨质疏松,至少在12个月之内的骨代谢改变与人类绝经后骨质疏松症的高转换型骨代谢过程有非常相似之处^[22]。去卵巢后大鼠的骨量丢失中,以股骨、胫骨近端和脊柱较明显^[23]。去卵巢大鼠对雌激素、他莫昔芬、二膦酸盐、甲状旁腺素和降钙素等药物的反应亦与人类有相似之处。成年雌鼠由于E₂的周期变化,每四天有一个动情期。1岁后雌鼠可观察到动情期的逐渐减少和松质骨的丢失。予雌激素替代治疗时无骨转化增加和失骨。抑制人骨转化的药物如双膦酸盐类和降钙素也可以有相似的骨组织变化。

谢肇等^[24]的研究表明,大鼠去势股骨密度明显降低,腰椎骨密度尤其显著。股骨最大荷载显著降低,腰椎最大荷载尤其显著。骨小梁面积百分数(%Tb.Ar)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)显著降低。骨小梁分离度(Tb.Sp)显著增高。血、尿生化指标显示骨吸收大于骨形成。

不足之处包括:大鼠缺乏Haversian系统,皮质骨内骨重建罕见;12~24月后骨骺方闭合;终身维持活跃的骨构塑(modeling);去卵巢后不发生脆性骨折,承载方式与人类不同等。此外,大鼠体积小,不允许反复进行骨组织活检及大量采取血液标本。大鼠去势后体重会有增加,骨质的防护作用会减弱,同时会影响到它的消化系统、内分泌系统的功能,肯定会影响到实验结果的分析,因此美国FDA规定,在进行这类研究时,有必要进行两种不同种类动物模型,要求不但有小动物模型,而且要有大动物模型,不但观察骨的建造,还要观察骨的再建,不但检测骨量,也检测骨的生物学特性,还必须对椎骨、长骨、股骨等多部位进行检测^[1]。

还有研究者采用鸟、豚鼠、白鼬、猫等作为骨质疏松的模型动物。由于这类动物骨骼行为不能很好

地模拟成年人的骨质疏松变化特征,与人类骨质疏松相关性较小,因此对这类动物的研究资料较少。

用于骨质疏松症模型动物模型首先应该考虑的是模型应与人类骨质疏松的临床症状及组织行为相似,但要求某种动物模型在各个方面完全与人类骨质疏松症的表现一致是很困难的,因此动物模型根据研究的不同,侧重表现其某一阶段、某些症状或一些病理生理变化,作为观察特定阶段和指征的病理模型是较为可行的方法。研究者应知道每一种动物模型的优点和限制,才能更好地设计和进行动物实验,得到可靠地研究数据,准确评价实验的结果,以揭示人类骨质疏松的发病机制,找出理想的防治方法。

【参 考 文 献】

- [1] 刘忠厚,主编. 骨矿与临床. 北京:中国科学技术出版社, 2006 2:903-905.
- [2] 刘忠厚. 骨质疏松学. 第1版. 北京:科学出版社,1998,455-459.
- [3] 李恩,薛延,王洪复,等. 骨质疏松鉴别诊断与治疗. 北京:人民卫生出版社,2005,620-623.
- [4] Fukuda S, Lida H. Effects of orchidectomy on bone metabolism in beagle dogs. *J Vet Med Sci*, 2000, 62:69-73.
- [5] Scholz-ahrens KE, Delling G, Jungblut PW, et al. Effect of ovariectomy on bone histology and plasma parameters of bone metabolism in nulliparous and multiparous sows. *Z Ernährung Swiss*, 1996, 35:13-21.
- [6] Schorlemmer S, Gohl C, Iwabu S, et al. Glucocorticoid treatment of ovariectomized sheep affects mineral density structure and mechanical properties of cancellous bone. *J Bone Miner Res*, 2003, 18:2010-2015.
- [7] 李良,陈槐卿,陈孟诗,等. 建立骨质疏松山羊模型初探. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4:12-16.
- [8] 李良,吴文超,陈槐卿,等. 去势山羊骨组织形态学变化的动态观察. *华西医学报*, 1997, 28:398-400.
- [9] 李良,陈槐卿,何成明,等. 双侧卵巢切除山羊不同时间段骨形态计量学与骨密度的变化. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 5:10-12.
- [10] 李良,陈槐卿,吴文超,等. 去卵巢山羊长骨生物力学性能的变化. *生物医学工程学杂志*, 1998, 15:101.
- [11] 何成明,陈槐卿,李良,等. 雌性山羊去卵巢后不同时间骨生物力学参数变化. *生物医学工程杂志*, 1999, 16:295-299.
- [12] Waters RV, Gamradt SC, Asnis P, et al. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthop Scand*, 2000, 7:316-321.
- [13] 方忠,杨琴,李峰,等. 去势法兔骨质疏松模型建立的探讨. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11:202-205.
- [14] Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res*, 2002, 13:631-636.
- [15] Jerome CP, Turner CH, Lees CJ. Decreased bone mass and strength in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Calcif Tissue Int*, 1997, 60:265-270.
- [16] Jerome CP, Lees CJ, Register TC, et al. Bone loss in skeletally mature female monkeys fed minimal requirement of calcium is accelerated by ovariectomy. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(Suppl. 1):S259.
- [17] Kostenuik PJ, Bdon B, Morony S, et al. Gene therapy with human recombinant osteoprotegerin reverses established osteopenia in ovariectomized mice. *Bone*, 2004, 34(4):656-664.
- [18] Iwaniec UT, Yuan D. Strain-dependent variations in the response of cancellous bone to ovariectomy in mice. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(7):1068-1074.
- [19] Weinstein RS, Jia D, Powers CC, et al. The skeletal effects of glucocorticoid excess override those of orchidectomy in mice. *Endocrinology*, 2004, 145:1980-1987.
- [20] Compston Juliet E. Sex steroid and bone. *Physiol Rev*, 2001, 81:419-444.
- [21] Seeman E. Invited review. Pathogenesis of osteoporosis. *J Appl Physiol*, 2003, 95:2142-2151.
- [22] Egermann M, Goldhahn J. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2005, 16(suppl 2):S129-S138.
- [23] Yao W, Hadi T. Basic fibroblast growth factor improves trabecular bone connectivity and bone strength in the lumbar vertebral body of osteopenic rats. *Osteoporos Int*, 2005, 16:1939-1947.
- [24] 谢肇,李起鸿,孟萍,等. 去卵巢大鼠骨质疏松模型的特点. *中国临床康复*, 2006, 10:79-81.