

去势加地塞米松肌肉注射法兔骨质疏松模型建立的实验研究

张堃 孟国林 刘建 袁志 张钦 王军 李晓娟 张志敏 李生

中图分类号: R965.5 R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)02-0069-04

摘要:目的 探究应用去势加肌肉注射地塞米松的方法建立兔骨质疏松模型的可行性。方法 将24只5月龄雌性新西兰兔随机分成假手术+肌注生理盐水组、去势+肌注生理盐水组和去势+肌注地塞米松组,每组8只动物。后两组动物行双侧卵巢切除术。术前和术后2、3月时采用双能X线吸收骨密度测量仪及术后3月应用micro-CT进行测量分析。结果 micro-CT三维重建分析表明,去势加肌注地塞米松肌肉注射组兔术后3月时股骨远端BMD、BMC和骨小梁立体测量的一些指标与假手术的差值有统计学意义,去势+肌注地塞米松组和去势组兔骨小梁稀疏、断裂、排列紊乱,但前者更为明显。结论 去势+肌注地塞米松法建立新西兰兔骨质疏松症模型切实可行,造模时间较单纯去势法更短,3个月即可。

关键词: 去势; 地塞米松; 骨质疏松症; 动物模型; 显微CT

Study on establishment of rabbit osteoporosis model by ovariectomy plus dexamethasone intramuscular injection ZHANG Kun, MENG Guolin, LIU Jian, et al. Institute of Orthopaedic & Department of Orthopaedic, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To investigate the feasibility of the establishment of rabbit osteoporosis model by ovariectomy plus Dexamethasone intramuscular injection. **Methods** 24 five months old female New Zealand white rabbits were divided into three groups equally. Group A, sham operation plus Sodium Chloride intramuscular injection. Group B, ovariectomy plus Sodium Chloride intramuscular injection. Group C, ovariectomy plus Dexamethasone intramuscular injection. The bilateral ovaries of the last two groups were ectomized. 2 and 3 months before and after operation, the BMD was measured by double-energy X-ray absorption meter, respectively. 3 months after operation, micro-CT was used to detect the experimental rabbits. **Results** The micro-CT reconstruction analysis showed that 3 months after operation, the difference of BMD, BMC and trabecula stereology parameter of distal femur has statistical value between group 1 and 3. The trabecular of the distal femur in group 2 and group 3 all became raritas, broken and disordered and it was more obvious with group 3. **Conclusions** These results suggest that ovariectomy plus Dexamethasone intramuscular injection is a good method to establish New Zealand rabbit osteoporosis model. Three months are enough to establish the osteoporosis model using ovariectomy plus dexamethasone intramuscular infection, shorter than using only ovariectomy.

Key words: Ovariectomy; Dexamethasone; Osteoporosis; Animal model; Micro-CT

随着社会进入老龄化时代,骨质疏松已成为挑战人类健康、威胁老年人生活质量的主要疾病之一^[1]。目前对于骨质疏松症的病因、发病机制、治疗及预防等还没有完全了解清楚,尚需进一步的研究;同时,对于骨质疏松症最严重的并发症骨质疏松骨

折防治研究的深入,这就要求选择建模更快、更合适的动物模型。兔做为一种很好的骨质疏松动物模型,但去势建模所需时间较长,需6~8月^[2]。笔者拟通过动物实验研究去势加肌肉注射地塞米松的方法建立兔骨质疏松模型,以求获得一种耗费时间更短而效果较好的骨质疏松动物建模方法,缩短相关骨质疏松症研究的周期,节省构建动物模型的经费。

基金项目:陕西省国际科技合作重点项目(2005KW-14)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院骨科

通讯作者:刘建,Email ljreny@fmmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

新西兰系纯种大白兔,由第四军医大学实验动物中心提供,雌性,5月龄,体重 2.5 ± 0.28 kg。

地塞米松磷酸钠注射液[国药准字H41020035]天津药业有限公司生产。

DPX-IQ 双能 X 线骨密度检测仪(美国 GE 公司,第四军医大学附属西京医院骨科提供)。

GE-LSP micro-CT(美国 GE 公司,第四军医大学全军骨科研究所提供)。

1.2 方法

1.2.1 分组及处理 将 24 只新西兰雌兔随机分为 3 组,即假手术 + 肌注生理盐水组(A 组),去势 + 肌注生理盐水组(B 组)和去势 + 肌注地塞米松组(C 组),每组 8 只,采用速眠新麻醉动物,无菌条件下正中切开腹腔,B、C 两组动物切除双侧卵巢,A 组切开腹腔找到卵巢后即关闭腹腔。术后 3 d 内肌注庆大霉素 1 万 U/kg,每天 2 次。术后动物定量喂食(200 g/d),自由饮水,饲养温度 20 ~ 25℃,相对湿度为 40% ~ 70%。手术 1 w 后 C 组兔予肌肉注射地塞米松 0.5 mg/kg,每周 2 次,其余两组予等量生理盐水肌肉注射,共 8 w。

1.2.2 骨密度测定 分别于术前 3 d 及术后 2、3 m 检测各兔腰椎及双侧股骨近端 BMD。

1.2.3 Micro-CT 检测 所有兔于术后 3 m 采用耳缘静脉空气栓塞法处死,分离右侧股骨远端,分别将每组的 8 个标本放入 Micro-CT 样品杯中,在相同条件(4044 mm-21 μ m-150 mins)下扫描并对每个标本行三维重建,测定 BMD 及 BMC,分析其骨小梁数量、厚度、连接密度、及骨骼体积比等骨小梁立体测量学指标。

1.2.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析和 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 大体观察

术后所有动物手术切口出现不同程度的肿胀,2 ~ 5 d 后消失,切口愈合良好。注射地塞米松及生理盐水期间及以后动物活动、进食基本正常,无一例死亡。

2.2 BMD 检查结果

结果显示,B 组和 C 组术后 2 m、3 m 腰椎和股骨近端的 BMD 与术前及 A 组各阶段的差别有统

计学意义($P < 0.05$),但只有 C 组术后 3 m 的 BMD 均值小于术前及 A 组各时期骨密度均值减去 2SD。

表 1 不同时期各组动物腰椎及股骨近端 BMD(mg/cm^2)

组别	腰椎骨 BMD			股骨近端骨 BMD		
	术前	2 m	3 m	术前	2 m	3 m
A 组	269 ± 14	271 ± 32	266 ± 31	300 ± 37	306 ± 35	293 ± 42
B 组	272 ± 26	243 ± 27	223 ± 26	306 ± 35	254 ± 29	233 ± 23
C 组	274 ± 29	236 ± 24	185 ± 15	295 ± 41	235 ± 67	189 ± 56

2.3 Micro-CT 检测结果

统计结果显示,B 组和 C 组股骨远端的 BMD 和 BMC 均值明显低于 A 组($P < 0.05$),但 C 组的 BMD 和 BMC 均值均小于 A 组的均值减去 2 SD。

表 2 Micro-CT 检测股骨远端 BMD 及 BMC 结果

组别	BMD(mg/cm^3)	BMC(mg)
A 组	291 ± 54	3.727 ± 0.467
B 组	198 ± 78	3.063 ± 0.240
C 组	165 ± 39	2.764 ± 0.321

表 3 Micro-CT 检测股骨远端骨小梁立体测量学指标结果

组别	相对体积比 (BV/TV)%	骨小梁数量 (Tb.N) mm^{-1}	骨小梁间距 (Tb.Sp) mm	骨小梁厚度 (Tb.Th) mm	骨小梁连接 密度 $1/\text{m}^3$
A 组	32.5 ± 4.1	2.28 ± 0.41	0.43 ± 0.05	0.15 ± 0.04	8.09 ± 0.75
B 组	27.9 ± 3.6	1.89 ± 0.31	0.54 ± 0.04	0.12 ± 0.01	5.33 ± 0.71
C 组	24.5 ± 4.6	1.62 ± 0.38	0.63 ± 0.05	0.11 ± 0.02	4.64 ± 0.65

结果表明,C 组的 BV/TV、Tb.N 均显著低于 A 组(F 值分别为 6.975、5.111, P 值分别为 0.007、0.02),而 B 组与 A、C 两组的差别无统计学意义($P > 0.05$);B 组和 C 组的 Tb.Sp、骨小梁连接密度(Connectivity Density)均显著低于 A 组(F 值分别为 30.67、34.99,两 P 值均 < 0.01),而 B、C 两组的差别无统计学意义($P > 0.05$);三组 Tb.Th 的差异无统计学意义(F 值为 3.16, P 值为 0.07)。相同条件下进行重建的二维和三维图像也直观地显示了各组骨小梁形态和结构的差别。

从左至右分别为 A、B、C 组。可见 B、C 组骨小梁稀疏,孔隙率增加,水平方向可禁骨小梁减少,局部有较大的骨小梁孔隙形成,这种改变 C 组更为明显。

从左至右分别为 A、B、C 组。B、C 组的骨小梁

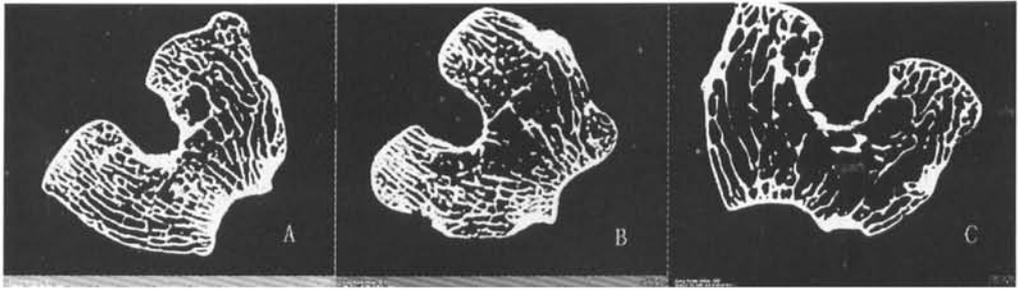


图1 股骨远端体松质骨重建二维图像

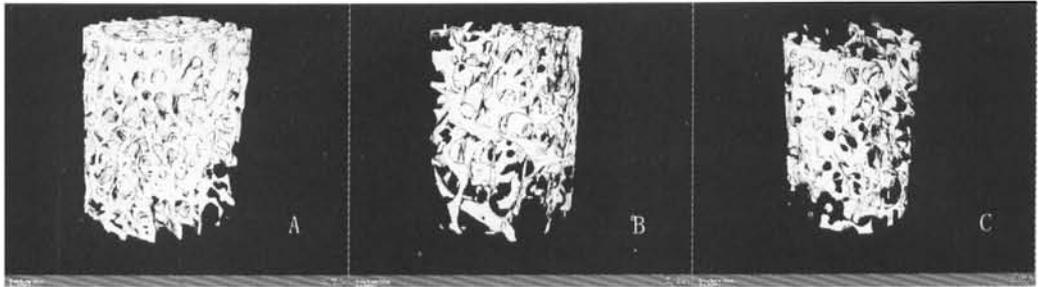


图2 股骨远端体松质骨重建三维图像

稀疏,骨小梁的连接率、孔隙率明显降低,三维构筑明显差于A组,尤以C组为甚。

3 讨论

3.1 骨质疏松动物模型的选择

用来建立骨质疏松症模型的实验动物有很多,如大鼠、羊、灵长类动物、兔、猪、狗等。其中灵长类动物作为动物模型来模拟人类疾病最为相近,但因其来源有限、价格昂贵而限制了它的使用。大鼠是迄今为止骨质疏松研究中使用最多的动物,但它终生维持活跃的骨构塑,骨骺闭合迟,皮质骨内骨重建罕见,缺乏 Haversian 系统。此外,大鼠体积小,不允许反复进行骨组织活检和骨内植物实验,并且不适合大量采取血液标本。其余大动物作为骨质疏松动物模型亦有或多或少的缺陷,如狗1年只有两次发情期,雌激素分泌明显低于人类;羊为食草反刍动物,维生素代谢和矿物质需要量以及磷代谢与人相差较大。而兔自然寿命为4~6年,性成熟为5~8个月,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,骺板多钙化并消失,与人类相似,并且较大动物建模时间短,因而较为经济,只是兔的松质骨含量较少,给某些实验带来一定的困难,综合而言,兔是一种很好的骨质疏松研究动物模型^[2]。

3.2 去势和糖皮质激素与骨质疏松

去势是切除动物双侧卵巢,致雌激素缺失引起骨代谢异常,最终形成骨质疏松。长期大剂量的应用糖皮质激素可致糖皮质激素性骨质疏松,其主要的机制是糖皮质激素在分子和基因水平降低成骨细胞的增殖和分化,抑制信号转导过程影响成骨细胞的功能^[3-5],通过抑制 Krox 20/Egr 2 基因的表达影响胶原的合成,地塞米松使基质金属蛋白酶 13 的表达大幅升高,促进胶原分解,使骨吸收增加^[6],在转录和蛋白水平均可抑制成骨细胞 I 型胶原的表达^[8],糖皮质激素可抑制胰岛素样生长因子(IGF)基因启动子的活性而降低 IGF 的转录^[3],还可显著下调 BMP 的表达^[7],从而影响成骨细胞的骨形成。另外,糖皮质激素还可间接地通过降低雄激素的分泌、增加尿钙的排出、减低肠道对钙的吸收等方面影响维生素 D 的代谢,致继发性甲状腺腺机能亢进而引发骨质疏松形成^[8]。

对于骨质疏松的诊断,需要获得正常群体的骨密度值,但目前尚无正常新西兰兔骨密度正常值的文献报道,本实验参照《中国人原发骨质疏松症诊断标准》,以同期正常对照组的骨密度值作为正常值对实验组进行诊断,若实验组的骨密度值低于正常值减去 2 SD,结合骨组织结构的变化而诊断骨质疏松。本实验结果显示,所选动物在去势+地塞米松肌注后3月时骨矿物质密度、骨矿物质含量、骨组织相对体积比均低于未去势对照组的均值减去 2 SD

($P < 0.05$) ,Micro-CT 对骨组织结构进行定性及定量分析均显示骨小梁呈明显退行性变。而单纯去势 + 生理盐水肌注动物手术后 3 m 时骨组织的质和量的改变未达到这个标准。

3.3 Micro-CT 扫描在骨质疏松症检测中的应用

骨质疏松症的病理学改变包括质和量两方面,量变主要体现在骨密度的下降,而质变主要表现在骨小梁的生长状况、骨矿化程度、骨质的堆积范围、微损伤等区域性组织形态学改变,如皮质骨和小梁骨容量下降,骨小梁断裂、稀疏。大量的动物实验和临床研究表明,单纯增加骨矿物质含量,并不相应的增加骨强度,有时反而降低^[9,10]。因而我们应用高分辨率的 Micro-CT 对股骨远端进行三维立体重建,通过软件进行 BMD 和 BMC 的测定,测量分析骨小梁立体测量学参数,如骨小梁体积、骨小梁厚度、骨小梁空间距离及骨小梁连接密度等,以评估骨质疏松模型是否建立成功。结果表明,使用 micro-CT 在骨质疏松动物模型的检测中不仅可以全面、立体的观察骨质量的变化,而且还可以对观测的骨组织同步进行 BMD 和 BMC 的测定,真正做到骨质疏松病理学检测的质与量结合。

综上所述,以去势加地塞米松肌肉注射的方法建立新西兰兔骨质疏松症模型切实可行,选用新西兰雌兔以 5 m 龄为宜,3 个月即可建立骨质疏松模型,较单纯去势建模,本法具有操作简便、周期短、费用低廉等优点,是一种较好的建立骨质疏松实验动物模型的方法。

【参 考 文 献】

- [1] Retornaz F, Paris F. Association between androgen receptor gene polymorphism and bone density in older women using hormone replacement therapy. *J Maturitas*, 2006, 47:7-47:9.
- [2] 廖慧娟, 廖二元. 骨质疏松动物模型. 国外医学内分泌分册, 2004, 24: 60-62.
- [3] Delany AM, Durant D, Canalis, et al. Glucocorticoid suppression of IGF- I transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol*, 2001, 15: 1781-1789.
- [4] Pereira RC, Delany AM, Canalis, et al. Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. *Bone*, 2002, 30: 685-691.
- [5] Pereira RC, Delany AM, Canalis, et al. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone*, 2001, 28: 484-490.
- [6] Nathalie L, Cynthia AL, Vincent VH, et al. Gene expression profiling of glucocorticoid-inhibited osteoblasts. *J Mol Endocrinol*, 2004, 33: 175-193.
- [7] Luppen CA, Smith E, Spevak L, et al. Bone morphogenetic protein-2 restores mineralization in glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblast cultures. *J Bone Miner Res*, 2003, 18: 1186-1197.
- [8] Van Cromphaut SJ. Duodenal calcium absorption in dexamethasone-treated mice: Functional and molecular aspects. *J Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 460: 300-305.
- [9] Iegrand E, Chappard D, Pascaretti C, et al. Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 13-19.
- [10] Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue *in vivo*. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 60-67.

(收稿日期: 2007-07-20)