

鼠龄对大鼠去卵巢骨质疏松模型的影响

唐存贵 李灵芝 金鑫 张新宁 吕琪

中图分类号: R965 R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)04-0229-04

摘要:目的 探讨鼠龄对大鼠去卵巢后骨质疏松的影响。方法 3 月龄和 6 月龄 Wistar 雌性大鼠各 16 只, 分别分为去卵巢组和假手术组。去卵巢组行双侧卵巢切除, 6 个月后, 测定大鼠骨密度、骨矿含量、股骨生物力学和股骨远端形态结构的变化。结果 与假手术组相比, 去卵巢组全身及脊柱骨密度、骨矿盐含量、股骨最大压缩载荷、最大压缩应力、弹性模量均明显下降 ($P < 0.01$)。髌板下骨小梁结构排列稀疏, 骨小梁间的连接性变差, 总量明显减少, 6 月龄组更明显。结论 3 月龄和 6 月龄大鼠去卵巢 6 个月, 均可发生骨质疏松症。6 月龄大鼠骨质疏松程度更严重。

关键词: 骨密度; 生物力学; 形态结构; 去卵巢; 骨质疏松症

The effect of age on the osteoporosis induced by ovariectomy in rats TANG Cungui, LI Lingzhi, JIN Xin, et al. Department of Pharmacy, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of age on the osteoporosis induced by ovariectomy in rats. **Methods** Each sixteen Wistar female rats about three or six months old, were divided into sham operation group and ovariectomized group respectively. The ovariectomized groups underwent bilateral ovariectomy by dorsal approach. Six months after surgery, the rats bone mass density, bone mineral content, biomechanics properties of femurs and morphosis of distal femurs were measured to assess osteoporosis. **Results** Compared to corresponding sham operation group, the ovariectomized rats had a significantly decreases in body and spine BMD, BMC, maximum compress load, maximum compress stress and elastic modulus of femurs ($P < 0.01$), the morphosis of trabecula under epiphyseal plate in distal femur was raritas; the conjunction of trabecular was worsen, and the volume of trabecular decreased significantly. The six months old rats lost more bone than that in three months old rats. **Conclusion** Six months after surgery, both three months and six months old rats developed osteoporosis. The six months old rats had lost more bone.

Key words: Bone mass density; Biomechanics; Morphology; Ovariectomize; Osteoporosis

大鼠去卵巢后的骨丢失与妇女绝经后的骨丢失有许多相似之处, 已成为研究妇女绝经后骨质疏松症的经典模型之一^[1]。但对于鼠龄及造模持续时间目前并无统一标准, 文献报道使用 6 ~ 10 月雌鼠^[2]; 研究持续时间为 6 周到 6 月不等^[3-5]。目前国内多使用 3 ~ 6 月龄未孕雌性大鼠, 研究持续时间多为 3 ~ 4 月^[6,7]。本实验分别选用 3 月龄和 6 月龄未孕雌性大鼠建立去卵巢骨质疏松模型, 从骨量、骨生物力学和骨形态结构三个方面综合评价大鼠去卵巢后

骨质疏松状况, 研究鼠龄对大鼠去卵巢后骨质疏松模型的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 3 月龄和 6 月龄雌性未孕 Wistar 大鼠各 16 只, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供(许可证号: SCXK-(军)2002-001), 体重 270 ~ 300 g。

1.1.2 主要仪器设备: 双能 X 射线骨密度仪 (Lunar Prodigy, 美国 GE 公司), 电子万能材料测试仪 (5543 型, 美国 Instron 公司), 重型切骨机 (Jung K, 德国), 光学显微镜 (CH-2 型, 日本 Olympus), BioMias 2000 图像分析处理系统 (四川大学图像研究所)。

基金项目: 天津市自然科学基金课题 (033609811) 武警总部科研基金课题 (WKH2004-8)

作者单位: 300162 天津, 武警医学院药物化学教研室

通讯作者: 李灵芝, Email: lizhx@tom.com

1.2 方法

1.2.1 骨质疏松动物模型的建立 3 月龄和 6 月龄 Wistar 大鼠分别随机分为假手术组 (3Sham 和 6Sham), 去卵巢组 (3OVX 和 6OVX), 每组 8 只。各组大鼠乙醚麻醉后, 去卵巢组沿侧背部切入, 无菌切除双侧卵巢, 假手术组仅摘除卵巢旁小块脂肪组织, 腹腔内滴入青霉素钠 0.2 mL (16 万单位/mL), 缝合, 伤口碘伏消毒。术后连续 1 周阴道细胞涂片, 观察有无周期性变化以证实双侧卵巢是否切除完全。以假手术组每日平均进食量为标准控制去卵巢组饲料摄入量, 饲养于 (22 ± 2) °C, 相对湿度 30% ~ 50% 的清洁环境中, 喂养由协和医科大学实验动物中心提供的标准颗粒饲料 (许可证号 SCSK (京) 2006-003)。

1.2.2 检测指标及测定方法 ①活体骨密度 (BMD) 测量 大鼠去卵巢术后 6 个月, 经乙醚麻醉后, 仰卧固定于测试板上, 全身扫描, 小动物分析软件测定大鼠全身及脊柱骨矿密度 (BMD) 和全身骨矿盐含量 (BMC)。②股骨生物力学测量 测量骨密度后, 处死大鼠, 分离左侧股骨, 进行股骨三点弯曲试验。仪器参数 加载速度 6 mm/min, 量程 200 N, 跨距 20 mm, 测定材料力学和结构力学指标。③股骨远端形态学观察 取右侧股骨远端, 以甲基丙烯酸甲酯与邻苯二甲酸二丁酯 (3:1) 进行不脱钙骨包埋, 切成 7 μm 厚切片, 进行 Von Kossa 染色, 光镜下观察。④股骨小梁骨体积测量 各组切片均选取远端股骨骺板下 3 mm 范围内骨小梁, 分内、中、外 3 点选取图像录入微机, BioMias 2000 图像分析处理系统测量平均小梁骨体积。

1.2.3 统计学处理 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠体重的变化

3Sham 和 6Sham 组实验开始时体重分别为 (290.4 ± 10.8) g 和 (287.9 ± 11.5) g, 6 个月后, 体重分别为 (293.6 ± 18.12) g 和 (290.4 ± 11.8) g, 无明显差异 (*P* > 0.05); 3OVX 组和 6OVX 组去卵巢 6 个月后体重分别由 (293.9 ± 12.4) g 和 (288.9 ± 13.6) g 增至 (320.5 ± 22.5) g 和 (314.1 ± 24.1) g, 差异均有显著性 (*P* < 0.05) (表 1)。

2.2 大鼠全身及脊柱骨密度、骨矿盐含量和股骨小

梁骨体积变化

大鼠去卵巢 6 个月后, 全身及脊柱骨密度、骨矿盐含量、股骨小梁骨体积与同月龄 Sham 组相比均明显下降 (*P* < 0.01); 6Sham 组全身及脊柱骨密度、骨矿盐含量低于 3Sham 组 (*P* < 0.01), 6OVX 组脊柱骨密度、股骨小梁骨体积明显低于 3OVX 组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01) (表 2)。

表 1 大鼠体重的改变 (*n* = 8, $\bar{x} \pm s$)

项目	3Sham	3OVX	6Sham	6OVX
实验前体重 (g)	290.4 ± 10.8	293.9 ± 12.4	287.9 ± 11.5	288.9 ± 13.6
6 个月后体重 (g)	293.6 ± 18.12	320.5 ± 22.5*	290.4 ± 11.8	314.1 ± 24.1*

注 大鼠 6 个月后与实验开始时体重比较 * *P* < 0.05

表 2 去卵巢大鼠骨密度、骨矿含量、股骨小梁骨体积的变化 (*n* = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	全身骨密度 (BMD) (g/cm ²)	脊柱骨密度 (g/cm ²)	全身骨矿盐含量 (BMC) (g)	股骨小梁骨体积 (BV) (%)
3Sham	0.167 ± 0.006	0.179 ± 0.008	9.5 ± 0.3	34.5 ± 3.3
3OVX	0.151 ± 0.004*	0.148 ± 0.006*	8.1 ± 0.4*	18.4 ± 4.8*
下降率 (%)	9.58	17.32	14.74	46.67
6Sham	0.159 ± 0.002 [#]	0.162 ± 0.005 [#]	8.9 ± 0.3 [#]	32.31 ± 5.01
6OVX	0.143 ± 0.008*	0.134 ± 0.015* [△]	7.9 ± 0.8*	10.82 ± 3.08* [▲]
下降率 (%)	10.06	17.28	11.23	66.51

注 :OVX 组与同月龄 Sham 组比较 * *P* < 0.01; 与 3OVX 组比较 [△] *P* < 0.05, [▲] *P* < 0.01; 与 3Sham 组比较 [#] *P* < 0.01

2.3 大鼠股骨最大压缩载荷、最大应力及弹性模量变化

与 3Sham 组相比, 3OVX 组大鼠股骨最大压缩载荷、最大应力、弹性模量明显下降; 与 6Sham 组相比, 6OVX 组大鼠股骨最大压缩载荷、最大应力、弹性模量也均明显下降 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。与同月龄的 Sham 组相比, 3OVX 组、6OVX 组的变形能及最大压缩位移均无明显差别 (表 3)。

2.4 大鼠股骨远端形态学观察

光学显微镜下可见 3Sham 和 6Sham 组骺板下骨小梁结构成熟, 排列紧密、有序, 形态正常; 3OVX、6OVX 组骺板下骨小梁结构排列稀疏, 总量较同月龄的 Sham 组明显减少, 其中 6OVX 组骨质丢失更明显, 骨小梁间的连接性差, 出现典型的“纽扣”现象 (图 1)。

表 3 去卵巢大鼠股骨生物力学参数的变化 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	最大压缩载荷(N)	弹性模量(MPa)	变形能(J)	最大压缩应力(MPa)	最大压缩位移(mm)
3Sham	136 ± 10	1783.6 ± 15.8	0.046 ± 0.011	25.7 ± 1.8	0.500 ± 0.086
3OVX	111 ± 7.0 *	1539.8 ± 27.4 *	0.043 ± 0.009	20.8 ± 1.4 *	0.459 ± 0.07
下降率(%)	18.38	13.67	6.52	19.07	8.20
6Sham	152.9 ± 7.9	1172.7 ± 61.4	0.042 ± 0.007	19.5 ± 1.0	0.431 ± 0.031
6OVX	128.4 ± 11.7 *	1031.7 ± 64.6 *	0.041 ± 0.007	16.3 ± 1.5 *	0.401 ± 0.056
下降率(%)	16.02	12.02	2.38	16.41	6.96

注:OVX 组与同月龄 Sham 组比较 *P < 0.01

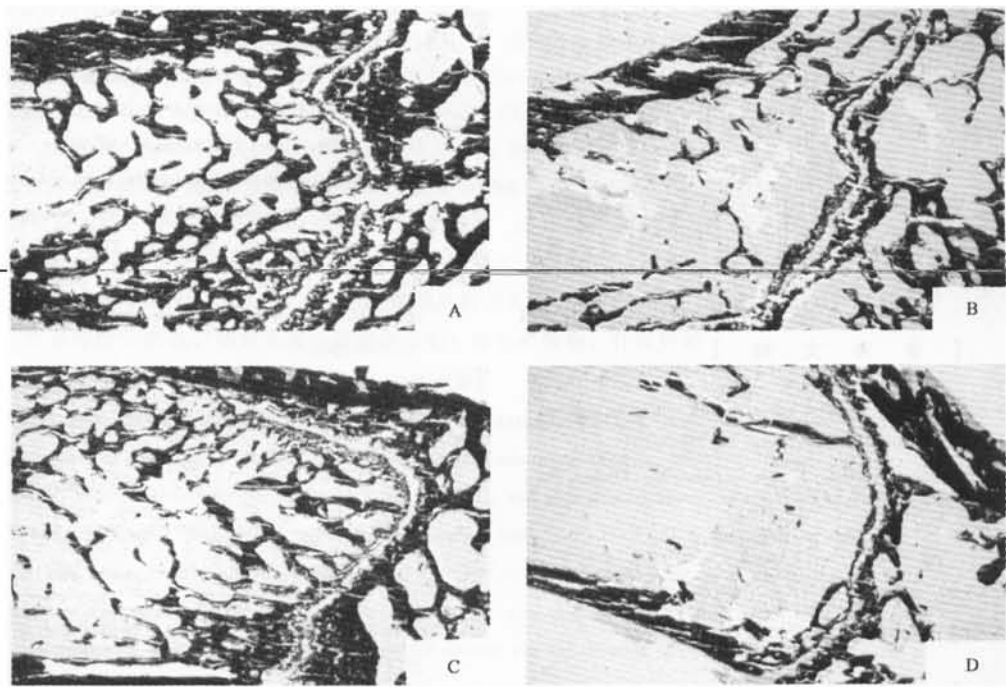


图 1 大鼠股骨远端骺板下骨小梁形态结构变化(von kossa × 40)

注:A:3Sham; B:3OVX; C:6Sham; D:6OVX

3 讨论

大鼠去卵巢后体重增加,与雌激素缺乏,活动减少,能量消耗小而进食未减有关。本实验通过假手术组饲料摄入量限制去卵巢组进食,发现各去卵巢组大鼠体重均较手术前增高,与文献报道一致^[8]。骨质疏松症是以骨量减少及骨组织微观结构退化为特征的一种全身性骨骼疾病,伴有脆性增加、易于发生骨折^[9]。因此骨质疏松状况应从骨量、骨形态结构和骨强度三方面综合评价。BMD 和 BMC 是骨量的主要测量指标,目前测量方法主要有双能 X 线骨密度仪(DEXA)、单光子骨密度仪(SPA)、双光子骨密度仪(DPA)和定量 CT(QCT)等物理方法,其

中 DEXA 由于具有敏感性高、精确性和准确性好、检查时间短、费用低、辐射性小和可以进行全身骨扫描等优点,已成为骨质疏松症检查诊断的首选方法和金标准^[10]。本实验采用 DEXA 对活体大鼠进行全身骨密度扫描,应用小动物分析软件测算全身骨矿盐含量,结果显示:两组去卵巢大鼠全身及脊柱 BMD、全身 BMC 较同月龄假手术组均显著下降(P < 0.01)。表明不管是 3 月龄大鼠还是 6 月龄大鼠,去卵巢 6 个月均可导致明显的骨丢失、骨量减少。生物力学包括材料力学和结构力学两个方面,最大压缩载荷和最大压缩应力是结构力学主要指标,反映材料的抗破坏能力;弹性模量是材料力学主要指标,反映材料的抗变形能力。本实验测得两组

大鼠去卵巢 6 个月后最大压缩载荷、最大压缩应力和弹性模量均较同月龄假手术组明显下降,表明两组大鼠去卵巢 6 个月后,其骨质脆性均增加。

骨的形态结构可以反映骨的微观结构退化的程度,本实验显示 去卵巢组大鼠与同月龄假手术组大鼠相比,股骨远端骺线下 3 mm 范围内骨小梁数量明显减少,连接性变差。这为去卵巢大鼠骨强度的下降提供了组织形态学的证据。

实验结果还显示 %Sham 组全身及脊柱 BMD 较 3Sham 组低,且差异明显,可能是由于大鼠在 6 月龄时松质骨的骨量达到最高峰,随后骨矿物质逐渐丢失,骨矿物质丢失主要发生在松质骨,因而骨密度随之下降,而 3 月龄组大鼠在进行试验时其骨量并未到达最高峰,在实验的前 3 个月骨量是增加的,到试验结束时,骨矿物质丢失量要少于 6 月龄组。

本试验结果表明 3 月龄或 6 月龄大鼠去卵巢 6 个月后可成功发生骨质疏松,6 月龄去卵巢组骨质疏松程度更严重。

【参 考 文 献】

- [1] Nakamuta H. The ovariectomized animal model of postmenopausal bone loss. Nippon Rinsho, 2004, 62 (Suppl 2) : 759-763.
- [2] Marcus R, Feldman D, Kelsey J. Osteoporosis. In : Kimmel DB

(ed), Animal models for *in vivo* experimentation in osteoporosis research. London : Academic Press, 1996 : 671-681.

- [3] Reddy Nagareddy P, Lakshmana M. Assessment of experimental osteoporosis using CT-scanning, quantitative X-ray analysis and impact test in calcium deficient ovariectomized rats. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005, 52 (3) : 350-355.
- [4] Kim MS, Lee YS. Effects of soy isoflavone and/or estrogen treatments on bone metabolism in ovariectomized rats. J Med Food, 2005, 8 (4) : 439-445.
- [5] Yang J, Pham SM, Crabbe DL, et al. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. Dentomaxillofac Radiol, 2003, 32 (4) : 247-251.
- [6] 刘石平, 廖二元, 伍汉文, 等. 绝经后骨质疏松大鼠模型的综合评价. 湖南医科大学学报, 2001, 26 (2) : 111-114.
- [7] 王宝利, 贾红蔚, 权金星, 等. 尼尔雌醇对去卵巢大鼠胫骨骨重建的影响. 中华病理学杂志, 2004, 33 (3) : 255-259.
- [8] Lotinun S, Westerlind KC, Kennedy AM, et al. Comparative effects of long-term continuous release of 16 alpha-hydroxyestrone and 17 beta-estradiol on bone, uterus, and serum cholesterol in ovariectomized adult rats. Bone, 2003, 33 (1) : 124-131.
- [9] Anonymous Consensus development conference : diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. Am J Med, 1993, 94 (6) : 646-650.
- [10] Heinemann DF. Osteoporosis. An overview of the National Osteoporosis Foundation clinical practice guide. Geriatrics, 2000, 55 (5) : 31-36.

(收稿日期 : 2007-10-10)