

# APP/PS1 转基因鼠的骨微结构及骨密度分析

王铜浩 杨茂伟 赵梦楠 初立伟

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)09-0632-05

**摘要:**目的 应用高分辨率 CT(Micro-CT)定量研究 APP/PS1 转基因鼠(老年痴呆鼠模型)胫骨近端骨微结构及骨密度的变化。方法 3月龄雌性 APP/PS1 转基因鼠( $n=6$ )和野生型小鼠( $n=6$ )自由摄食和饮水,分别于12月龄时处死,取其胫骨,应用 Micro-CT 进行骨微结构及骨密度分析。结果 APP/PS1 转基因组小鼠胫骨近端骨微结构、骨密度参数明显小于野生型小鼠( $P<0.05$ )。Micro-CT 扫描图像显示 APP/PS1 转基因小鼠的骨小梁数目、骨小梁厚度、骨皮质厚度明显小于野生型小鼠。结论 APP/PS1 转基因组小鼠胫骨近端骨微结构、骨密度参数与野生型小鼠相比存在明显的差异,APP/PS1 转基因组小鼠更易患骨质疏松。

**关键词:** APP/PS1 转基因鼠;野生型小鼠;骨质疏松;micro-CT;骨密度

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.09.002

**To analyse the bone microarchitecture and bone mineral density of APP/PS1 transgenic mice** WANG Tonghao, YANG Maowei, ZHAO Mengnan, et al. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

**Abstract:** **Objective** To quantitatively investigate the changes of bone microarchitecture and bone mineral density in proximal tibia of APP/PS1 transgenic mice(a mice model of senile dementia) by micro computer tomography. **Methods** 3-month-old APP/PS1 transgenic and wild-type female mice( $n=6$ /group) were housed with food and tap water available ad libitum. Twelve mice were sacrificed at 12 months of age and the tibias were harvested to analyse the bone microarchitecture and bone mineral density by Micro-CT. **Results** Bone microarchitecture and bone mineral density in Micro-CT analysis of APP/PS1 transgenic mice were significantly lower than those of wild-type mice( $P<0.05$ ); the Micro-CT image of trabecular number, trabecular thickness and cortical thickness in APP/PS1 transgenic mice were significantly lower than those in wild-type mice. **Conclusion** Bone microarchitecture and bone mineral density were significantly diverse in APP/PS1 transgenic mice as compared to wild-type mice. APP/PS1 transgenic mice were liable to osteoporosis.

**Key words:** APP/PS1 transgenic mice; Wild-type mice; Osteoporosis; Micro-CT; Bone mineral density

老年痴呆症,又称阿尔茨海默症(alzheimer's disease, AD),是一种主要发生在老年和老年前期的神经退行性疾病,AD患者可出现记忆、语言、智力功能减退等症状给患者及其家属乃至整个社会都带来了沉重的负担<sup>[1]</sup>。

近年来,老年痴呆性骨质疏松已逐渐引起人们的关注,目前这方面的研究还不多见,尚未见应用显微 CT(Micro-CT)研究老年痴呆患者骨微结构的相

关报道。淀粉样蛋白前体蛋白(APP)基因和早老素1(PS1)基因的改变与AD患者发病关系密切<sup>[2]</sup>,APP/PS1转基因鼠可表达与AD患者相关的突变基因,为研究 $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )在AD患者发病过程的作用以及AD的并发症提供了有力的动物模型<sup>[3]</sup>。本研究应用micro-CT对APP/PS1转基因鼠和野生型小鼠的胫骨近端的超微结构及骨密度进行了研究,通过比较分析APP基因改变对老年痴呆鼠骨量、骨结构的影响,进一步证实患老年痴呆后更易导致骨质疏松的发生,同时探讨老年痴呆性骨质疏松的发病机制。

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院骨科(王铜浩、杨茂伟、初立伟),中国医科大学7年制94期(赵梦楠)

通讯作者:杨茂伟,Email: ymw69@sohu.com

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验组 3 月龄雌性 APP/PS1 转基因小鼠 6 只 (购自美国 Jackson Laboratory) 对照组 3 月龄雌性野生型小鼠 6 只。各组小鼠重量(20 ± 1)g。小鼠饲养于中国医科大学实验动物中心,分笼饲养,常规饮食,室温 23 ~ 25℃,12 h 间隔照明,定期紫外线消毒与通风。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 胫骨标本制作** 饲养 12 个月后,APP/PS1 转基因小鼠和对照组小鼠各 6 只断头处死后在解剖显微镜下取出胫骨,分别置于 10% 的磷酸盐缓冲甲醛溶液中 24 h,然后取出用蒸馏水冲洗干净后放入 70% 乙醇溶液中,用于骨微结构及骨密度分析。

**1.2.2 Micro-CT 扫描** 将样本取出,用清洁纸包裹,放入圆柱形塑料管中,其间注满体积分数为 70% 乙醇,防止有气泡产生,然后密封塑料管,放入 micro-CT (Skyscan 1076 micro-CT system;skyscan,Aartselaar,Belgium)中,沿胫骨标本长轴方向扫描,获得连续的 micro-CT 图像,扫描电压 50 kV,扫描电流 200 μA,像素点尺寸分别设置为 9 μm × 9 μm、18 μm × 18 μm,层间距分别为 9 μm 和 18 μm,得到二维图像后,手动圈出感兴趣区域(range of interests, ROI),兴趣区为胫骨干骺端 1.18 cm 处向下扫描 200 个片段,将获得的扫描图像导入医学影像三维重建软件 Mimics 10.0 中进行三维重建后,计算评估相关参数。

测量指标包括总容量(total volume, TV),骨容量(bone volume, BV)和骨质表面积(bone surface area, BS)。BV 计算采用 Guilak 法<sup>[4]</sup>,BS 计算采用 Müller 的六面体累计法(marching cubes)<sup>[5]</sup>。骨体积分数(bone volume fraction, BVF),又称相对骨体积(bone volume/total volume, BV/TV)是描述骨微结构的一个非常重要的参数,表示单位体积内骨容量大小。骨面积容积比(BS/TV)表示单位体积内骨质面积的大小。

直接法测量是在三维空间直接测量各结构的距离和大小。骨小梁数目(trabecular number, Tb. N)为单位长度下骨小梁数目,计算方法为骨小梁中轴平均距离的倒数(Tb. N = 0.5 BS/TV)。骨小梁间隙用(trabecular separation, Tb. Sp)表示。骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)指各骨性柱体的平均厚度。骨小梁模型因子用(trabecular pattern factor, Tb. Pf)表示,结构模型指数(structure model index, SMI)

是 Hildebrand 和 Ruegsegger 介绍的一种新的 3D 计量法,可按如下数学表达式计算:

$$SMI = 6 \cdot \frac{BV \cdot \frac{dB}{dr}}{BS^2} \quad (1)$$

这一参数表明骨小梁是呈“杆状”还是呈“板状”结构(从理论上讲完整的圆柱形结构的理论值是 3,理想板状结构的理论值是 0)。几何定轴程度(degree of anisotropy, DA,)表示平均截距长度(the mean intercept length, MIL)的最大半径和最小半径之比。皮质厚度(cortical thickness)表示扫描区域中骨皮质的厚度。

间接法计算其他指标,骨小梁厚度(Tb. Th = 2BV/BS),骨小梁间隙(trabecular separation, Tb. Sp)表示骨髓腔厚度(Tb. Sp = 2MS/MV = 2(TV - BV)/BS),其中 MS 为骨髓腔面积(marrow surface),MV 为骨髓腔体积(marrow volume)。连接密度(connectivity density, Conn. D.)用 Euler 方法计算<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 Micro-CT 测定相关骨密度(BMD)** 将胫骨标本和仿体(PHANTOM)置于 micro-CT 系统检测管中,扫描胫骨干骺端 1.18 cm 处向下 1 cm 区域的骨小梁容积密度(trabecular volumetric BMD, vBMD)和组织骨密度(tissue BMD, tBMD),重复 3 次,每次重置标本,组内和组间变异系数 < 2%。仿体为人工制造的标准骨样本,骨密度为已知的。扫描胫骨样本得到图像和数据通过和仿体的灰度值进行比较得出相应的 BMD。vBMD 代表骨小梁器官水平上的骨密度,tBMD 代表骨小梁组织水平上的骨密度。

### 1.3 统计学处理

所有数值以均值 ± 标准差的形式表示。采用 *t* 检验比较 APP/PS1 转基因鼠和野生型小鼠胫骨的 Micro-CT 各指标。采用 ANOVA 比较两组 BMD 的差别。所有统计全部在 SPSS 13.0 统计软件下完成, *P* < 0.05 时具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 应用 micro-CT 成像观察骨微结构

9 μm 相关参数表明 APP/PS1 转基因小鼠 BV/TV、Tb. Th、Tb. N、C. Th 均小于对照组(*P* < 0.05), Conn. D 明显小于对照组(*P* < 0.01), Tb. Sp、DA 大于对照组(*P* < 0.05),BS/BV、Tb. Pf 明显大于对照组(*P* < 0.01),SMI 参数差异无统计学意义(表 1)。

18 μm 相关参数表明 APP/PS1 转基因小鼠 BV/TV 小于对照组(*P* < 0.05),Tb. Th、Tb. N、Conn. D、C.

Th 明显小于对照组 ( $P < 0.01$ ), BS/BV、Tb. Pf、Tb. Sp、SMI、DA 大于对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

9、18  $\mu\text{m}$  相关骨密度参数表明: APP/PS1 转基因小鼠 vBMD、tBMD 均小于对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 1 APP/PS1 转基因小鼠与野生型小鼠骨微结构参数比较

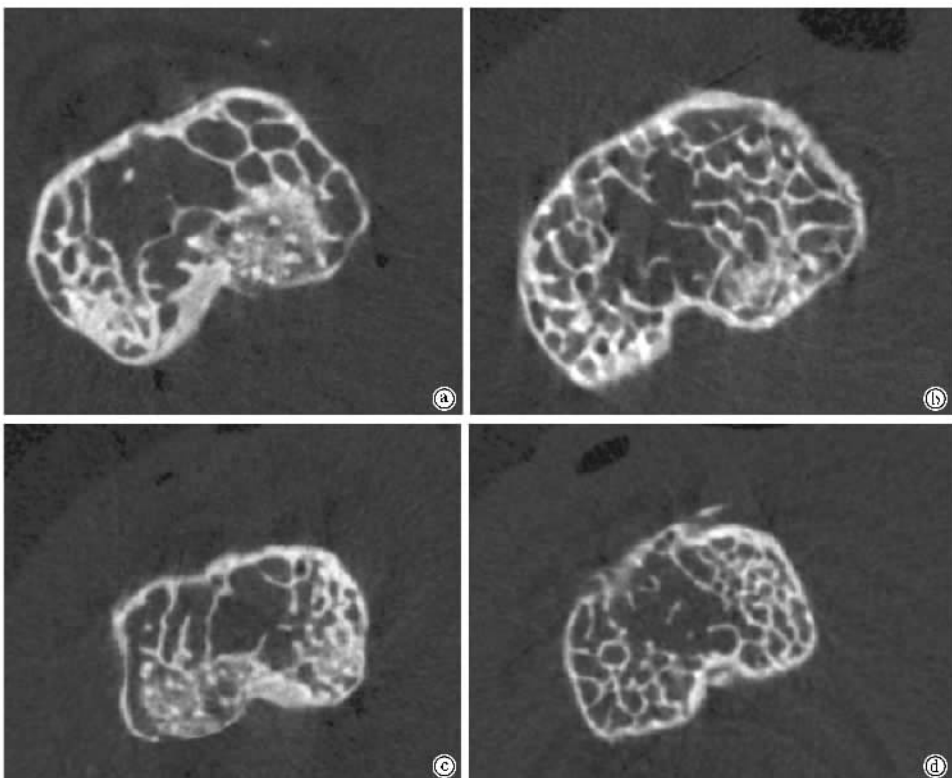
结构参数	9 $\mu\text{m}$		18 $\mu\text{m}$	
	APP/PS1 转基因鼠	野生型小鼠	APP/PS1 转基因鼠	野生型小鼠
BV/TV (%)	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.21 $\pm$ 0.02	2.31 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	3.95 $\pm$ 0.26
BS/BV ( $\text{mm}^{-1}$ )	85.7 $\pm$ 6.4 <sup>b</sup>	75.3 $\pm$ 5.6	70.9 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	66.8 $\pm$ 6.9
Tb. Th (mm)	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.94 $\pm$ 0.17
Tb. N ( $\text{mm}^{-1}$ )	2.05 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	2.76 $\pm$ 0.27	3.24 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	4.88 $\pm$ 0.38
Tb. Sp (mm)	0.43 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.48 $\pm$ 0.03
Tb. P ( $\text{mm}^{-1}$ )	42.9 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>	32.8 $\pm$ 3.6	31.6 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	29.8 $\pm$ 3.1
SMI	2.22 $\pm$ 0.19	2.15 $\pm$ 0.09	2.06 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.78 $\pm$ 0.13
DA	3.16 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	2.17 $\pm$ 0.14	2.55 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	1.89 $\pm$ 0.08
Conn. D	20.3 $\pm$ 5.7 <sup>b</sup>	56.7 $\pm$ 10.8	33.7 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup>	71.8 $\pm$ 11.7
C. Th (mm)	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.30 $\pm$ 0.03

注: 与野生型小鼠比较<sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$

表 2 APP/PS1 转基因小鼠与野生型小鼠骨密度参数比较

骨密度	9 $\mu\text{m}$		18 $\mu\text{m}$	
	APP/PS1 转基因鼠	野生型小鼠	APP/PS1 转基因鼠	野生型小鼠
vBMD ( $\text{mg}/\text{mm}$ )	202 $\pm$ 27 <sup>a</sup>	224 $\pm$ 26	200 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	225 $\pm$ 29
tBMD ( $\text{mg}/\text{mm}^3$ )	1085 $\pm$ 119 <sup>a</sup>	1128 $\pm$ 107	1112 $\pm$ 89 <sup>a</sup>	1166 $\pm$ 71

注: 与野生型小鼠比较<sup>a</sup>  $P < 0.05$



a、c 分别是转基因小鼠 9  $\mu\text{m}$ 、18  $\mu\text{m}$  b、d 分别是野生型小鼠 9  $\mu\text{m}$ 、18  $\mu\text{m}$   
图 1 APP/PS1 转基因小鼠和野生型小鼠的 Micro-CT 横切面图像

2.2 通过 Micro-CT 扫描得到了两组小鼠胫骨近端的横切面和纵切面图像。由横切面可发现 APP/PS1 转基因小鼠骨小梁数目较野生型小鼠明显减少,骨

小梁间隙增加(图 1)。由纵切面图像和(表 1)中皮质厚度(C.Th)的相关数据可发现 APP/PS1 转基因小鼠骨皮质较野生型小鼠明显变薄(图 2)。

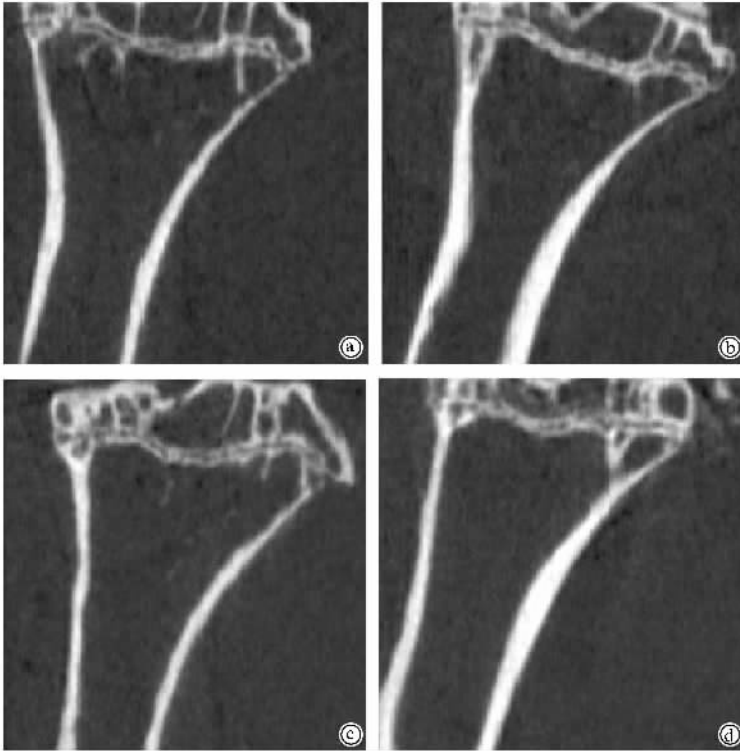


图 2 APP/PS1 转基因小鼠(a 9  $\mu\text{m}$  c 18  $\mu\text{m}$ )和野生型小鼠(b 9  $\mu\text{m}$  d 18  $\mu\text{m}$ )的 Micro-CT 纵切面图像

### 3 讨论

随着世界人口的老龄化,老年痴呆的发病率也大大增加,已成为继心血管病、癌症、脑卒中之后的第 4 位引起老年人死亡的原因。因为老年痴呆及其并发症严重影响了老年人的身体健康,因此该领域已经成为世界研究的热点。

近年来,临床流行病学研究表明在 AD 人群中骨质疏松症的发病率明显高于同龄老年人群,但目前就这方面实验研究还不多见。AD 患者的主要病理改变是大脑海马区和杏仁核处  $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )沉积并形成老年斑。目前为研究 AD 的发病机制,有很多动物模型,其中 APP/PS1 转基因小鼠模型是 AD 研究领域的最佳动物模型之一<sup>[7]</sup>,APP/PS1 转基因小鼠在 9 个月左右时出现老年斑<sup>[8]</sup>,病情越严重老年斑越明显。本研究从 3 月龄开始饲养雌性 APP/PS1 转基因小鼠和野生型小鼠,12 个月龄时应用 Micro-CT 对其胫骨近端进行扫描。

Micro-CT 是一种高分辨率 CT,1989 年 Feldkamp 等<sup>[9]</sup>率先应用 Micro-CT 对松质骨样本的三维结构进行了检查,并报道了其研究结果,以后又有很多研究小组应用 Micro-CT 技术进行了无破坏性的骨小梁结构的研究。为了提高实验结果的准确性,本实验应用 Micro-CT 分别对两组小鼠的胫骨近端进行了 9  $\mu\text{m}$  和 18  $\mu\text{m}$  扫描,9  $\mu\text{m}$  扫描图像更加清晰,相关参数更加精确,18  $\mu\text{m}$  扫描图像的扫描区域更大,相关参数计算的空间范围更广。两组图像和参数可以互相弥补不足之处,使研究结果准确性更高。通过两组数据进行对比分析,发现 APP/PS1 转基因小鼠骨微结构参数、骨密度明显小于对照组( $P < 0.05$ )。

目前,骨密度的测定虽然是衡量骨质疏松的金标准,在本实验中也进一步明确 APP/PS1 转基因小鼠骨质疏松的情况,但骨密度不能反映骨结构<sup>[10]</sup>,测量微结构参数是可以较精确的预测骨强度的方法<sup>[11]</sup>。对于骨微结构进行分析,一定程度上可反应骨强度。获得的 Micro-CT 相关参数和图像说明 APP/PS1 转基因小鼠胫骨骨强度明显小于野生型小

鼠,证明了 APP/PS1 转基因小鼠较正常小鼠更易患骨质疏松。那么为什么会出现这一现象呢?目前其发病机制尚无相关报道,可能和 APP 基因的改变有关,APP 基因编码淀粉样前体蛋白(APP),这一基因突变后可导致 APP 代谢发生异常,进而导致 AD 患者脑内  $A\beta$  水平的升高<sup>[12]</sup>,最终可形成老年斑。Fillit 等<sup>[13]</sup>应用 ELISA 检测 AD 患者血清及脑脊液中的炎性因子,发现 TNF- $\alpha$  的水平较对照组显著升高。同时 Perlmutter 等<sup>[14]</sup>研究发现 AD 患者血脑屏障局部功能发生改变。而 Le 等<sup>[15]</sup>报道 AD 患者的脑组织和血浆  $A\beta$  浓度较正常人高。这些研究提示  $A\beta$  水平的升高可能对中枢神经系统小胶质细胞产生 TNF- $\alpha$  以及血液系统 TNF- $\alpha$  水平的升高有着重要作用,TNF- $\alpha$  等细胞因子是最强的骨吸收刺激因子,它们对骨重建的调节作用基本相同,直接或间接地作用于破骨细胞前体细胞,使其分化为破骨细胞,发挥骨吸收重建的作用<sup>[16]</sup>,最终导致骨质疏松。由此可见 APP 基因突变后可通过信号传导等途径导致神经系统,免疫系统功能的改变,使炎性因子水平升高,从而骨吸收增加,导致骨质疏松。针对这一发病机制可以开发有关药物,通过阻断和抑制相关信号途径,以期达到同时治疗 AD 和骨质疏松的目的。但由于老年痴呆性骨质疏松的发病机制错综复杂,因此还有待进一步的研究。

### 【参 考 文 献】

[ 1 ] Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D, et al. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders ( Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis ). *Chem Rev*, 2006, 106 ( 6 ):1995-2044.

[ 2 ] Price DL, Sisodia SS. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci*, 1998, 21 :479-505.

[ 3 ] Janus C, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol Behav* 2001, 73( 5 ) :873-886.

[ 4 ] Müller R, van Campenhout H, van Damme B, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies : a quantitative structural comparison

of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*, 1998, 23( 1 ) :58-66.

- [ 5 ] Müller R, Hildebrand T, Ruegsegger P. Non-invasive bone biopsy : a new method to analyse and display the three-dimensional structure of trabecular bone. *Phys Med Biol*, 1994, 39( 1 ) :145-164.
- [ 6 ] Odgaard A, Gundersen HJ. Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. *Bone*, 1993, 14( 2 ) :173-182.
- [ 7 ] Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations : potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 2006, 26( 40 ) :10129-10140.
- [ 8 ] Liu L, Ikonen S, Heikkinen T, et al. Effects of fimbria-fornix lesion and amyloid pathology on spatial learning and memory in transgenic APP + PS1 mice. *Behav Brain Res*, 2002, 134( 1-2 ) :433-445.
- [ 9 ] Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, et al. The direct examination of three-dimensional bone architecture *in vitro* by computed tomography. *J Bone Miner Res*, 1989, 4( 1 ) :3-11.
- [ 10 ] Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework : determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin Ther*, 2005, 27( 1 ) :1-11.
- [ 11 ] Guldberg RE, Ballock RT, Boyan BD, et al. Analyzing bone, blood vessels, and biomaterials with microcomputed tomography. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 2003, 22( 5 ) :77-83.
- [ 12 ] Hardy J. Toward Alzheimer therapies based on genetic knowledge. *Annu Rev Med*, 2004, 55 :15-25.
- [ 13 ] Fillit H, Ding WH, Buee L, et al. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 1991, 129 ( 2 ) :318-320.
- [ 14 ] Perlmutter LS, Chui HC. Microangiopathy, the vascular basement membrane and Alzheimer's disease : a review. *Brain Res Bull*, 1990, 24( 5 ) :677-686.
- [ 15 ] Le Y, Gong W, Tiffany HL, et al. Amyloid( beta )42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J Neurosci*, 2001, 21( 2 ) :123-128.
- [ 16 ] Kimble RB, Srivastava S, Ross PF, et al. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cell to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated stimulation of macrophage colony stimulating factor production. *J Biol Chem*, 2008, 271( 46 ) :28890-28897.

( 收稿日期 : 2009-03-08 )