

低钙日粮诱导蛋鸡骨质疏松模型的研究

刘秀云 孙玉玺 李西林 江莎*

西南大学动物科技学院 重庆 400715

中图分类号: R68 S8531 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 09-1087-05

摘要: 目的 建立蛋鸡骨质疏松模型,研究蛋鸡骨质疏松,为人类骨质疏松的研究提供参考。方法 用低钙日粮(钙含量 1.5%)连续 60d 诱发笼养蛋鸡骨质疏松症,并设立对照组(钙含量 3.7%),分光光度法检测血清中钙、磷、碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶的含量;称量蛋鸡股骨和胫骨的重量;游标卡尺测量骨骼的长度、宽度;万能材料试验机进行三点弯曲实验检测骨骼的强度;并制作观察骨组织切片进行 HE 染色,分析骨切片上成骨细胞、破骨细胞和骨细胞的变化。结果 研究发现与对照组相比,低钙日粮导致了血清中碱性磷酸酶含量显著性增加,血清钙含量显著性下降,蛋鸡股骨和胫骨重量显著性变轻,宽度显著性变窄,骨强度显著性降低。病理切片结果显示,与对照组相比,低钙组蛋鸡股骨远端骨切片中成骨细胞和破骨细胞含量均增加,但骨细胞含量减少。结论 连续 60d 给蛋鸡饲喂低钙日粮可成功建立蛋鸡骨质疏松模型,且该模型为高转化型骨质疏松。

关键词: 笼养蛋鸡;骨质疏松;高转化型;碱性磷酸酶;病理切片

The study of hen osteoporosis model using low calcium diet

LIU Xiuyun, SUN Yuxi, LI Xilin, JIANG Sha

College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Corresponding author: JIANG Sha, Email: jiangsha0527@swu.edu.cn

Abstract: Objective Cage layer osteoporosis is a common bone disease, which leads to a decline of eggshell quantity, an increase of fracture rate, paralysis, and even death in hens. The disease has a big negative effect on the modern chicken industry. The chicken osteoporosis model not only plays an important role in research of cage layer osteoporosis, but also in the human osteoporosis. **Methods** In order to establish the model, the low calcium diet which only included 1.5% of calcium was used for inducing the cage layer osteoporosis. 3.7% of calcium was used as control. The serum levels of calcium, phosphates, alkaline phosphates (ALP), and tartrate resistant acid phosphates (TRACP) were detected using spectrophotometric method. The weight, width, and length of the tibia and femur were measured. The strength of the tibia and femur were measured by 3-point bending test using an universal material testing machine. Bone slices were HE-stained for the analysis of osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes on the slices. **Results** The experiment results showed that compared with those in the control group, the hens in low calcium group had an increase of serum ALP and a decrease of calcium. The weight of the tibia and femur in low calcium group was lighter than that in control group. The width of the tibia and femur in low calcium diet group was narrower. And the strength of the bone was weaker. Pathological section of the distal femur results showed that the bone slices of the hens in low calcium group had more osteoclasts and osteoblasts but less bone cells than in the control group. **Conclusion** The experiment suggests that the chicken osteoporosis model can be induced by low calcium diet intake for 60 days. The model is a high bone-turnover model.

Key words: Cage hens; Osteoporosis; High bone turnover; Alkaline phosphatase; Pathological slices

笼养蛋鸡骨质疏松症(cage layer osteoporosis)又叫笼养蛋鸡疲劳症(cage layer fatigue),是蛋鸡生产中常见的骨骼疾病,表现为蛋鸡产蛋量下降,蛋壳

质量降低,全身性骨质减少,骨组织微结构退化,骨脆化,骨折率增加,瘫痪,甚至死亡,给养禽业带来巨大影响。正常情况下,成骨细胞和破骨细胞处于平衡状态,若两者之一发生紊乱或者同时发生异常,将影响骨形成和骨吸收,导致代谢性骨病。骨质疏松主要分为高转换型骨质疏松和低转换型骨质疏松,

基金项目: 西南大学本科生科技创新基金(20152802001); 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2016E038, DJK2014C123)

* 通讯作者: 江莎, Email: jiangsha0527@swu.edu.cn

前者主要表现为骨吸收加快,骨形成代偿性加快,如绝经后妇女骨质疏松;后者表现为骨吸收慢,骨形成更慢,如老年性骨质疏松。蛋鸡骨质疏松模型是研究蛋鸡骨质疏松的重要手段,同时也为研究人类骨质疏松的提供参考。因此本试验用低钙日粮诱发笼养蛋鸡骨质疏松症,检测血清中 Ca、P、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRACP)的含量,蛋鸡股骨和胫骨的重量、长度、宽度及强度,并制作观察骨组织切片,分析骨组织切片成骨细胞、破骨细胞和骨细胞数量的变化,确定该模型的分型,为蛋鸡骨质疏松的诊断和防治提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验动物与饲养

60 羽 64 周龄罗曼粉蛋鸡被随机分成两组,每组 30 羽,每 2 羽饲喂在同一笼中,分别提供常规饲料(对照组:Ca 含量 3.7%)和低钙饲料(低钙组:Ca 含量 1.5%),连续饲养 60d。饲养阶段采取自由采食饮水,鸡舍使用自然光源和人工补充光照,每天提供 16h 光源。

1.2 样品的采集与保存

在试验第 0 天及第 60 天,称量蛋鸡体重。第 60 天,从蛋鸡翅静脉采血 2 ml,室温静置 1 h,3 000 r/min 离心 15 min,收集血清,冻存于 -20℃。蛋鸡放血致死,采集整只右腿并放入 -20℃ 保存,供测定胫骨和股骨宽度、长度及骨强度。采左腿胫骨,放入 10% 甲醛中固定,用于骨显微结构的观察。

1.3 测定方法

1.3.1 血清中 ALP、TRACP、Ca 和 P 含量检测:分光光度法检测血清中 ALP、TRACP、Ca 和 P 含量。ALP 与 TRACP 测定所用试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所,血清 Ca、P 测定所用试剂盒购自美国博世生物技术有限公司。

1.3.2 骨形态检测:将保存的右腿剔除肌肉、筋膜。用分析天平(精天 JA2003A)测量胫骨质量和股骨质量,称量 3 次取平均值。用游标卡尺测量胫骨长度(胫骨脊到胫骨下关节面)、股骨长度(滑车槽到股骨头)、胫骨和股骨中点宽度,测量 3 次取平均值。

1.3.3 骨强度检测:采用 3 点弯曲法,使用万能材料试验机(LR10K PLUS 万能材料试验机,劳埃德仪器有限公司,英国)检测右侧胫骨股骨强度。骨按

同一方向放置在弯曲试验磨具支撑点上,胫骨两点相距 7 cm,股骨两点相距 4 cm,保持骨中点与试压点在同一位置。加压砧以 4 mm·min⁻¹ 向下施压至胫骨断裂停止。计算机自动记录加压砧的压力和位移,并绘制压力位移图,收集骨强度参数。记录骨骼最大载荷[牛顿(N)]及刚度[牛顿·米⁻¹(N·M⁻¹)]。

1.3.3 骨显微结构的观察:将股骨远端切成两片,固定于 10% 甲醛溶液中,从 10% 甲醛溶液中取出骨组织,放入脱钙液(盐酸:20 ml;甲酸:30 ml;甲醛:20 ml;蒸馏水:30 ml)脱钙 4 d;不同浓度的乙醇(70% 1 h;80% 1 h;90% 1 h;95% 1 h;100% I 1 h;100% II 1 h)依次脱水;苯(100% I 1 h;100% II 1 h;100% III 1 h)透明;不同熔点石蜡液(50-52℃ 1 h;52-54℃ 1 h)依次浸蜡;石蜡包埋;5 μm 切片(莱卡切片机, RM2235, 德国),H. E. 染色,显微镜(莱卡生物显微镜, DM500, 德国)下观察其结构,分析成骨细胞、破骨细胞和骨细胞数量的变化。

1.4 统计分析

采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,采用独立 T 检验进行分析,结果以平均数 ± 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著, $0.05 < P < 0.09$ 表示有变化趋势。

2 结果

2.1 血液指标检查结果

与对照组相比,低钙组蛋鸡血清 ALP 含量大于对照组($P = 0.002$)。血清 Ca 含量低于对照组($P = 0.02$)。血清 TRACP 含量相对于对照组有增加的趋势($P = 0.07$) (见表 1)。

2.2 骨重及骨形态检测结果

与对照组相比,低钙组蛋鸡起始体重、结束体重没有显著性变化。但是,低钙组胫骨绝对重量($P = 0.05$)和股骨绝对重量显著性小于对照组($P = 0.05$) (见表 2),且低钙组胫骨($P = 0.04$)、股骨宽度($P = 0.02$)小于对照组胫骨、股骨宽度(见表 3)。

2.3 骨强度检测结果

与对照组相比,低钙组蛋鸡骨骼强度显著性低于对照组。低钙组蛋鸡股骨最大载荷($P = 0.01$)、胫骨最大载荷($P = 0.04$)低于对照组,且差异显著。低钙组蛋鸡股骨刚度低于对照组,且差异极显著($P = 0.002$) (表 4)。

表 1 两组碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶、钙、磷的浓度

Table 1 Concentrations of ALP, TRACP, Ca, and P

组别 Group	碱性磷酸酶 ALP (U/L)	抗酒石酸酸性磷酸酶 TRACP(U/L)	钙 Ca (mg/dL)	磷 P (mg/dL)
对照组 Control group	218. 65 ± 19. 03	99. 97 ± 22. 69	16. 37 ± 0. 99	0. 23 ± 0. 01
低钙组 Low calcium group	292. 60 ± 10. 82 **	159. 20 ± 35. 95	13. 33 ± 0. 79 *	0. 21 ± 0. 02
N	20	17	20	17
P	0. 002	0. 07	0. 02	0. 31

注: 与对照组比较, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$ * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$, compared with the control group

表 2 两组 胫骨、股骨重量及体重情况

Table 2 The body weight and the weight of the tibia and femur

组别 Group	结束体重 BWt at end(kg)	胫骨重量 Tibial weight (kg)	股骨重量 Femoral weight(kg)	胫骨相对重量 Relative tibial weight (g/kg)	股骨相对重量 Relative femoral weight (g/kg)
对照组 Control group	1. 71 ± 0. 04	9. 13 ± 0. 20	7. 62 ± 0. 20	5. 41 ± 0. 12	4. 47 ± 0. 10
低钙组 Low calcium group	1. 70 ± 0. 04	8. 60 ± 0. 17 *	7. 15 ± 0. 17 *	5. 13 ± 0. 13	4. 26 ± 0. 11
N	29	29	28	29	28
P	0. 86	0. 05	0. 05	0. 12	0. 16

注: 与对照组比较, * $P < 0. 05$ * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$, compared with the control group

表 3 两组胫骨、股骨长度及宽度

Table 3 The length and width of the tibia and femur

组别 Group	胫骨宽度 Tibial width (mm)	胫骨长度 Tibial length (mm)	股骨宽度 Femoral width (mm)	股骨长度 Femoral length (mm)
对照组 Control group	70. 74 ± 0. 06	109. 90 ± 0. 67	76. 07 ± 0. 06	74. 35 ± 0. 51
低钙组 Low calcium group	69. 17 ± 0. 04 *	108. 66 ± 0. 69	74. 23 ± 0. 05 *	73. 63 ± 0. 41
N	28	28	28	28
P	0. 04	0. 20	0. 02	0. 27

注: 与对照组比较, * $P < 0. 05$ * $P < 0. 05$, compared with the control group

表 4 两组 胫骨、股骨强度

Table 4 The strength of the tibia and femur

组别 Group	股骨最大载荷 Femoral mixed force(N)	股骨刚度 Femoral stiffness ($\text{N} \cdot \text{M}^{-1}$)	胫骨最大载荷 Tibial mixed force(N)	胫骨刚度 Tibial stiffness ($\text{N} \cdot \text{M}^{-1}$)
对照组 Control group	182. 75 ± 8. 80	322580 ± 13727	126. 45 ± 5. 31	129710 ± 63. 1
低钙组 Low calcium group	147. 89 ± 10. 21 *	284430 ± 22172	110. 46 ± 5. 67 *	97877 ± 7. 57 **
N	28	28	27	28
P	0. 01	0. 15	0. 04	0. 002

注: 与对照组比较, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$ * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$, compared with the control group

2.4 骨组织显微结构观察

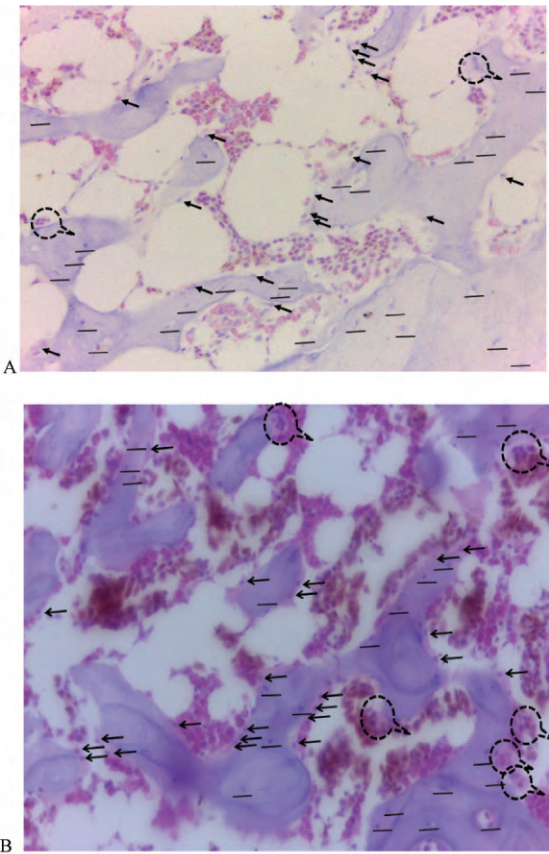
与对照相比,低钙组骨小梁稀少或断裂,小梁变细,体积减小,连接减少,游离端增多,小梁上骨细胞数量减少。在 400 倍镜下采集图片,计数每张图片成骨细胞、破骨细胞、骨细胞个数。低钙组成骨细胞相比对照组有增加的趋势($P=0.09$);破骨细胞增加($P=0.02$),且差异显著;骨细胞减少,且差异显著($P=0.03$)(表 5)。

3 讨论

鸟类与哺乳动物骨骼不同,雌性鸟类包括两种骨骼:结构骨和髓质骨^[1-3]。结构骨由皮质骨和松质骨组织,与哺乳动物相似。髓质骨是雌性鸟类性成熟初期在长骨中形成的一种特殊疏松状骨质,其主要作用是蛋的形成提供钙源。蛋鸡骨质疏松是指由于骨重建不平衡,骨吸收大于骨形成,导致结构骨发生退行性减少^[1-3]。骨质疏松的蛋鸡显示结构骨广泛丢失,且这种丢失从蛋鸡到达性成熟时开始,直到整个产蛋周期,因此产蛋后期骨质疏松最严重。目前临床上主要通过临床症状诊断该病,如软破壳蛋增加,瘫痪,死亡等^[4]。

本试验使用 1.5% 的低钙饲料饲喂蛋鸡,引起了蛋鸡的胫骨和股骨的宽度变窄,胫骨和股骨强度降低,直接说明低钙饲料可成功诱导蛋鸡骨质疏松,本试验结果与主性^[5]等研究结果一致,低钙日粮能引起蛋鸡骨量减少,骨密度减少,骨强度降低。但是值得注意的是,本试验在结束时也未见明显的产蛋率下降,软破壳蛋增加,蛋鸡病死率增加,说明在生产中可能存在较大比例未有明显骨质疏松临床症状的蛋鸡。

食物中的钙的缺少,直接导致血清中钙含量的减少。蛋鸡血液 ALP 主要由成骨细胞分泌的,是代



A.对照组; B.低钙组; ○破骨细胞; —骨细胞; ←成骨细胞

图 1 蛋鸡股骨远端骨组织脱钙切片(HE 染色 400 ×)

Fig. 1 Demineralized bone tissue slices of the chicken distal femur (HE staining ,400 ×)

表骨形成的特异性指标^[6,7]。而 TRACP 主要由破骨细胞分泌的,是代表骨吸收的特异性指标^[8]。低钙组中血液 ALP 和 TRACP 均增加,表明低钙饲料引起成骨细胞和破骨细胞均增加。当食物中的钙不足时,为了满足蛋壳形成的需要,结构骨中的钙被释

表 5 两组蛋鸡股骨远端骨组织脱钙切片细胞数

Table 5 The cell number on demineralized bone tissue slices of chicken distal femur

组别 Group	成骨细胞数 Number of Osteoblast	破骨细胞数 Number of Osteoclast	骨细胞数 Number of osteocyte
对照组 Control group	17.8 ± 0.8	2.6 ± 0.4	24.6 ± 0.6
低钙组 Low calcium group	20.2 ± 0.2	6 ± 0.3*	20.3 ± 0.6*
N	6	6	6
P	0.09	0.02	0.05

注:与对照组比较,* $P<0.05$

* $P<0.05$, compared with the control group

放,迫使结构骨的骨代谢处于高位,即成骨细胞和破骨细胞增加,但骨形成小于骨吸收。骨切片试验结果显示低钙组蛋鸡骨切片中成骨细胞和破骨细胞均比对照组多也证明了低钙饲料诱导骨代谢高位运转。这结果与其他研究人员结果不一致,主性^[9]和吕文婷^[10]的结果显示,低钙饲料引起的破骨细胞代谢增强,导致骨吸收大于骨形成,但未明确说明低钙饲料会引起成骨细胞代谢增加。这些不一致的结果可能是与检测指标不同有关,本试验同时检测了骨吸收和骨形成特异性指标,但在主性^[9]和吕文婷^[10]的试验中,他们重点关注了骨吸收。本试验结果表明低钙饲料能够诱导蛋鸡形成高转化型骨质疏松,表现为成骨细胞和破骨细胞代谢均增加,但破骨细胞代谢更强于成骨细胞。这种高转化型骨质疏松还表现在动物体内雌激素减少时。大鼠实施卵巢摘除手术后,可建立高转换性骨质疏松模型^[11],中老年妇女绝经后引起的骨质疏松也表现为高转化型骨质疏松^[12]。有研究表明低钙日粮可导致蛋鸡卵巢萎缩,卵泡变小^[5],雌激素含量降低^[9],因此低钙日粮诱发的高转化型骨质疏松也可能与蛋鸡体内雌激素的下降有关。但是动物钙摄入不足引起体内雌激素减少的机理目前并不完全清楚,还需要进一步的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Whitehead C, Fleming R. Osteoporosis in cage layers. Poultry Science 2000, 79(7): 1033-1041.
- [2] Webster A. Welfare implications of avian osteoporosis. Poultry Science, 2004, 83(2): 184-192.
- [3] Whitehead CC. Overview of bone biology in the egg-laying hen. Poultry Science, 2004, 83(2): 193-199.
- [4] Julian RJ. Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry -A review. The Veterinary Journal, 2005, 169(3): 350-369.
- [5] ZhuXing, Hou Jiafa, Shen Xiangzhe, et al. Influence of low calcium dietary on skeletal microstructure and bone mineral content in cage layer. China Poultry, 2001, 23(16): 11-13 (in Chinese).
- [6] Lumeij J T, Westerhof I. Blood chemistry for the diagnosis of hepatobiliary disease in birds. A review. Veterinary Quarterly, 1987, 9: 255-261.
- [7] Calabuig C P, Ferrer, M, Muriel R, et al. Plasma alkaline phosphatase as a sensitive indicator of age and skeletal development in wild coscoroba swans. Wildlife Research, 2010, 37: 504-511.
- [8] Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. Clinical Biochemist Reviews, 2005, 26(4): 97-122.
- [9] Zhu Xing, Hou Jiafa, Zhang Yongmei, et al. Changes of PTH, CT and E2 in Cage layerO steoporosis form Lower Calcium Dietary. Chinese Journal of Veterinary Science 2001, 21(1): 72-74 (in Chinese)
- [10] Lv Wenting, Ma Liqin, Yang Yonghong, et al. Effects of adding ipriflavone to low calcium diet on microstructure and histomorphometry of bone in cage layers. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica 2012, 43(11): 1818-1824 (in Chinese).
- [11] Feng Kun, Liu Yuegui, Zhang Lingjuand, et al. Biochemical characteristics of osteoporosis model with high bone turnover activity. Chinese journal of osteoporosis, 1997, 3(2): 24-27 (in Chinese).
- [12] LI Xu, , Bai Wenpei, Liu Zhonghou. Therapeutic progress of postmenopausal osteoporosis. Chinese journal of osteoporosis, 2007, 13(9): 607-612 (in Chinese).

(收稿日期: 2016-01-15; 修回日期: 2016-03-24)