

· 论著 ·

去势比格犬腹部脂肪与相关血清学指标及骨密度的变化关系

杨若培¹ 徐黎¹ 王玲¹ 张晨鑫¹ 张天宇¹ 端木羊羊¹ 闫国强² 程晓光^{1*}

1.北京积水潭医院放射科,北京 100035

2.北京积水潭医院动物室,北京 100035

中图分类号: R-332;R814.42 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 05-0606-05

摘要: 目的 通过建立去势比格犬模型,观察绝经早期腹部脂肪变化规律,并通过对脂肪与骨代谢相关血清学指标的测量与分析,探讨脂肪及骨代谢的关键影响因素。**方法** 选取6只成年雌性比格犬进行去势术,分别在术前、术后4个月、6个月、10个月进行腰椎定量CT(quantitative computed tomography, QCT)腹部脂肪面积、骨密度(bone mineral density, BMD)、MRI腰椎骨髓脂肪含量及血清学指标的检测,比较不同时间各指标的变化趋势及关系。**结果** 比格犬腹内脂肪面积(visceral fat area, VFA)、皮下脂肪面积(subcutaneous fat area, SFA)、腹部总脂肪面积(total fat area, TFA)在术后6个月、10个月均增加($P < 0.05$),术后10个月VFA增加百分比均值为84.39%,且为三者中最大;术后比格犬BMD并未明显降低。体重、BMD、瘦素(leptin, LP)、VFA、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)与SFA相关。SFA、体重、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、内脏脂肪素(visfatin, VFN)与BMD相关。**结论** 去势比格犬模型可用于研究绝经后雌激素缺乏所引起的脂肪代谢变化,但短期内BMD并未明显丢失,骨、脂肪代谢之间存在交互作用。

关键词: 卵巢切除;腹部脂肪;骨密度;脂肪因子;比格犬

The relationship between abdominal fat tissue, bone mineral density and serum biochemistry parameters in ovariectomized beagle dogs

YANG Ruopei¹, XU Li¹, WANG Ling¹, ZHANG Chenxin¹, ZHANG Tianyu¹, DUANMU Yangyang¹, YAN Guoqiang², CHENG Xiaoguang^{1*}

1.Department of Radiology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035

2.Department of Animal House, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

* Corresponding author: CHENG Xiaoguang, Email: xiao65@263.net

Abstract: Objective To observe the changes of abdominal fat tissue in ovariectomized beagle dogs, and to explore the key factors that influence the metabolism of lipid and bone through the measurement and analysis of serum indexes. **Methods** Six mature female beagle dogs were ovariectomized. Quantitative computed tomography (QCT) and MR mDixon-quant examinations, respectively, were used to determine the abdominal fat area, BMD of the lumbar vertebrae, and the percentage of bone marrow fat content on pre-surgery, 4, 6, and 10 months post-surgery. Serum biochemical indexes were also measured. The relationship and change trend at different times were compared. **Results** The VFA, SFA, TFA increased in 6 and 10 months post-surgery ($P < 0.05$). The average growth rate of VFA in 10-month post-surgery was 84.39%, and it was the highest among the three indexes. The post-surgery BMD did not decrease. Weight, BMD, LP, VFA, HDL were correlated with SFA. SFA, weight, LDL, and VFN were correlated with BMD. **Conclusion** This model can be used to simulate and study fat distribution in menopausal women. However, BMD does not decline in a short term after operation. There is interaction between the metabolism of lipid and bone.

Key words: ovariectomy; abdominal fat; bone mineral density; adipocytokines; beagle dog

围绝经期及绝经后妇女由于卵巢功能衰退,雌

激素、孕激素水平逐渐下降,骨骼丢失性疾病发病率高,严重影响生存质量^[1]。绝经后相应体脂分布也会发生变化,近年来的研究发现,脂肪组织在妇女绝经后具有再分布的现象,主要表现为绝经后体脂趋

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81401407)

* 通信作者:程晓光,Email:xiao65@263.net

于上半身型分布^[2]。目前有研究进一步表明,骨骼与脂肪之间存在交互调控作用。脂肪组织能够分泌多种脂肪因子,如瘦素、脂联素,对骨组织代谢有重要调节作用^[3-4]。而骨组织则能分泌骨钙素等因子调节脂肪及糖类代谢^[5]。对比男性,骨骼丢失性疾病对中老年女性的生存质量影响更为严重,有文献指出,我国患骨量减少或骨质疏松症患者男女性别比例为1:2^[6]。围绝经期女性骨骼、脂肪代谢过程与男性比较存在不同的作用机制。以往国内外研究侧重于探索绝经后出现的典型脂肪和骨代谢改变,但尚有一些问题未能解决,如绝经早期脂肪与骨变化是否同绝经后期一致,围绝经期脂肪分布有何变化及同骨密度变化趋势是否一致,两种组织之间能否交互影响,针对这些问题,本研究采用去势犬动物模型,模拟绝经早期腹部脂肪的变化过程,探讨脂肪与骨及相关血清学指标之间的关系及影响因素。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取成年雌性比格犬6只,年龄1~3岁,体重7.5~11.5 kg,均未生育,由北京玛斯生物技术有限公司提供并由北京积水潭医院实验动物中心饲养,经体检与编号后饲养在阳光充足且有足够独立空间的犬舍中1个月,实验犬在麻醉下行双侧卵巢摘除术,麻醉药使用江苏中牧倍康药业有限公司生产的复方氯胺酮注射液,0.06 mL/kg进行注射。所有犬术后恢复良好,手术由北京积水潭医院动物室有资质医师操作。本研究经北京积水潭医院伦理委员会通过。

1.2 影像扫描与测量方法

1.2.1 定量CT(quantitative computed tomography, QCT)扫描与测量:所有比格犬均采用Toshiba Aquilion 80排螺旋CT扫描仪和Mindways 5样本固体模(Mindways Software Inc, Austin, TX, USA)进行腹部QCT扫描,扫描时间为术前、术后4个月、6个月、10个月。扫描前动物均行麻醉术,麻醉药用法同去势术。采取俯卧位,下肢先进,出床扫,体膜放置于比格犬腹下,扫描范围包括膈上1 cm至S1椎体下方。扫描参数:床高120 cm,120 kV,150 mAs,层厚1.0 mm,扫描视野(scan field of view, SFOV)300 mm,采用标准重建算法。原始图像传至QCT工作站使用QCT Pro Version 5.0(Mindways Software Inc, Austin, TX, USA)软件进行分析。腹部脂肪测量采用QCT Pro软件中的体脂分析功能,选择L4/5椎

间隙层面,软件通过校准后自动设定阈值,以腹壁肌肉为界区分腹内脂肪与皮下脂肪组织(图1),自动计算腹部总脂肪面积(total fat area, TFA)与腹内脂肪面积(visceral fat area, VFA),前者减去后者得到皮下脂肪面积(subcutaneous fat area, SFA)。腰椎骨密度(bone mineral density, BMD)测量选取L3、L4、L5椎体中心水平稍靠上层,选取横截面积为20~30 mm²、层厚为9 mm的感兴趣区域(region of interest, ROI),测量时避开椎体骨皮质及椎基静脉区域(图2)。所有测量操作均由1名有经验的放射科医生完成,以往研究已经证明该测量方法有着良好的准确性及重复性^[7-8]。

1.2.2 MR mDixon-quant扫描及测量:所有比格犬于术前、术后6个月、10个月与QCT扫描同一天行MR mDixon-quant扫描,采用Ingenia 3.0 T MR扫描仪(Philips Healthcare, Best),32通道Ds Torso体部线圈,选择6回波mDixon-quant梯度回波序列,扫描参数:翻转角3°,TR=8.1 ms,TE1=1.33 ms,△TE=1.3 ms,视野200 mm×144 mm×90 mm,体素大小2 mm×1.89 mm×3 mm,层数30,敏感性编码2,信号采集数1。所有数据传输至工作站使用ISP软件(Version 7, Philips Healthcare, Best)进行测量。在脂肪分数彩图上,选取L3、L4、L5椎体中心水平稍靠上层,测量骨松质区域椎体脂肪分数,ROI横截面积为20~30 mm²,测量时同样避开骨皮质及椎基静脉区域。

1.2.3 血清学及体重测量:所有犬于影像测量当天进行体重测量及上肢皮下头静脉采血。采血量3~5 mL,肝素抗凝,3 500 r/min离心分离出血浆,于-20℃冻存。测量血生化指标:总胆固醇(cholesterol, CHOL)、甘油三酯(triglyceride, TRIG)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、血糖(blood glucose, GLU)。激素及脂肪因子:内脂素(visfatin, VFN)、脂联素(adiponectin, ADPN)、瘦素(leptin, LP)、胰岛素(insulin, INS)、雌二醇(estradiol, E₂)。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件(IBM)进行统计学分析。数据样本量小,不满足正态分布,数据以中位数(下四分位数,上四分位数)表示,术后增长率用平均值表示。对于术后各期同术前各指标的比较采用配对样本秩和检验(Wilcoxon signed-rank Test)以及方差分析趋势检验。将脂肪面积、BMD分别作为因变量,将其余影像指标及血清学指标作为自变量进行

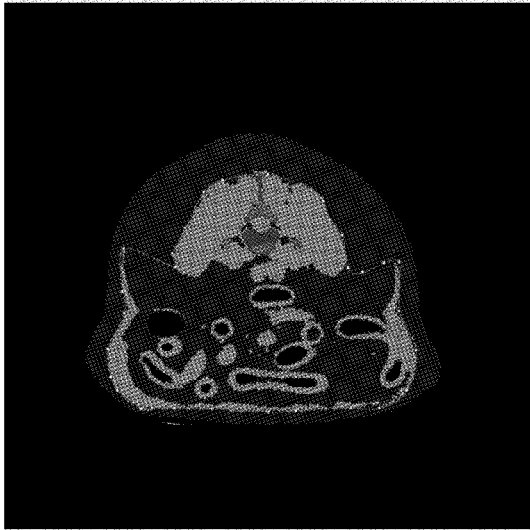


图1 QCT PRO 软件所示 L4/5 椎间隙层面脂肪分布情况(蓝色区域代表脂肪组织,黄色区域代表肌性软组织,绿色套索外蓝色区域代表腹部皮下脂肪,绿色套索内蓝色区域代表腹腔内脂肪)

Fig.1 The fat distribution at L4/5 intervertebral space shown by QCT PRO (The blue area represents adipose tissue, the yellow area represents muscular soft tissue, the blue area outside the green lasso represents abdominal subcutaneous fat, and the blue area inside the green lasso represents abdominal fat).

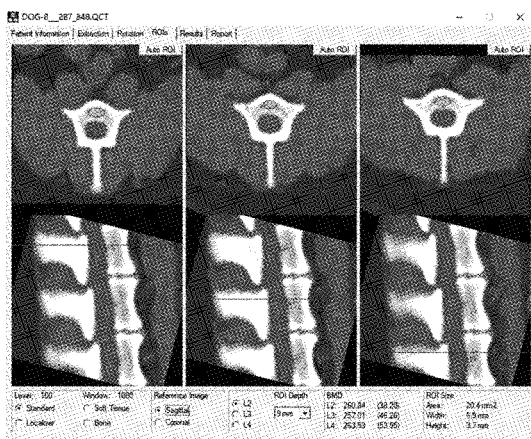


图2 腰椎骨密度感兴趣区域范围

Fig.2 The ROI location and range in the lumbar vertebrae by BMD measurement

回归分析(Multiple linear regression), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

各时间点影像学及血清学测量指标结果见表

1、2。术后 VFA 较术前升高,术前为 $28.90(21.57, 40.15) \text{ cm}^2$,术后 6 个月、10 个月持续增加,平均增长率分别为 40.23%、84.39%,差异有统计学意义($P=0.028, 0.046$),SFA 及 TFA 术后较术前也有所增大。虽然 VFA、SFA 以及 TFA 均呈升高趋势,然而 VFA 增加百分比在术后 6 个月、10 个月均为三者中最大。骨髓脂肪百分比各期差异无统计学意义。

术后 6 个月、10 个月测得的 BMD 较术前有所升高,术前 BMD 值为 $323.79(296.92, 343.05) \text{ mg/cm}^3$,术后 6 个月、10 个月分别增长 13.58%、12.26%,差异有统计学意义($P=0.028$)。对不同时间点 BMD 进行趋势性检验发现,切除卵巢后比格犬 BMD 值先升高后降低,术后 10 个月较术后 6 个月有所下降,平均下降约 4.17 mg/cm^3 。

将 SFA 作为因变量,其余 BMD 及血清学指标作为自变量进行多元线性回归分析,结果显示体重、BMD、LP、VFA、HDL 为有统计学意义的变量($P < 0.02$),见表 3。将 BMD 作为因变量,其余 FAT 及血清学指标作为自变量进行多元线性回归分析,结果显示, SFA、体重、SFA、LDL、VFN 为有统计学意义的变量($P < 0.05$),见表 4。所得的回归方程如下:

$$\begin{aligned} \text{SFA} = & -124.023 + 8.361(\text{体重}) + 0.26(\text{BMD}) + \\ & 1.65(\text{LP}) + 0.25(\text{VFA}) - 2.75(\text{HDL}) \\ \text{BMD} = & 448.42 + 2.50(\text{SFA}) - 23.46(\text{体重}) + 86.56(\text{LDL}) - 2.95(\text{VFN}) \end{aligned}$$

3 讨论

雌激素(E_2)是骨代谢的关键调控因子,成功建立绝经后模型是本次实验的先决条件,笔者在对术前比格犬雌二醇的测量中发现,1 号及 4 号犬血清 E_2 浓度远高于其余 4 只犬平均水平,血清 E_2 浓度分别为 1 号 25.12 pg/mL 、4 号 56.2 pg/mL ,余样本 E_2 含量均值为 7.36 pg/mL 。根据文献报道,狗在发情间期的末期, E_2 开始升高,在发情前 1 d 至发情后 3 d 内出现 E_2 高峰($52.5 \pm 29.26 \text{ pg/mL}$)^[9]。因此,推测两个奇异值的出现可能由于 1 号和 4 号比格犬测量时处于发情前期,趋势检验可见术后 E_2 含量在波动中下降明显,在术后 6 个月后差异明显,证明对比格犬切除双侧卵巢能够成功建立围绝经及绝经早期动物模型。

术后腹部脂肪均出现了不同程度的增加,其中 VFA 在术后 6 个月及 10 个月增加量较 TFA 和 SFA 都高,反映出绝经后体脂再分布现象,脂肪组织由外周转向中心,这一过程与雌激素受体在白色脂肪组

表 1 各时间段影像学及体重测量结果

Table 1 The results of image and weight at different time

时间段	骨密度 (mg/cm ³)	腹部总脂肪 面积/cm ²	腹内脂肪 面积/cm ²	皮下脂肪 面积/cm ²	骨髓脂肪 含量百分比/%	体重/kg
术前	323.79 (296.92, 343.05)	66.55 (50.10, 89.42)	28.90 (21.57, 40.15)	36.75 (19.97, 57.07)	11.51 (8.25, 24.77)	9.12 (7.88, 10.76)
术后 4 个月	5.55%	21.77%	18.57%	31.94%	—	2.65%
术后 6 个月	13.58% *	32.79% *	40.23% *	30.90% *	22.95	10.47%
术后 10 个月	12.26% *	62.24% *	84.39% *	54.64% *	-7.85	18.42%

注:术前为基线数据,术后各期为增长率,均同术前基线数据相比,计算公式=(术后值-术前值)/术前值×100%;同术前比较,* $P<0.05$ 。

表 2 各时间段血清学检测结果

Table 2 The serum biochemistry results at different time

时间段	雌二醇 (pg/mL)	胆固醇 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)	高密度 脂蛋白 (mmol/L)	低密度 脂蛋白 (mmol/L)	血糖 (mmol/L)	胰岛素 (uIU/mL)	内脂素 (ng/mL)	脂联素 (ng/mL)	瘦素 (ng/mL)
术前	11.10 (3.95, 32.89)	4.91 (4.27, 6.14)	0.53 (0.44, 0.67)	3.96 (3.46, 4.60)	0.15 (0.11, 0.22)	5.25 (4.28, 6.71)	12.56 (8.21, 15.50)	7.41 (4.68, 8.66)	716.14 (596.97, 885.44)	2.94 (2.49, 5.19)
术后 4 个月	-34.27%	45.46%	22.24%	39.02%	64.31%	51.98%	-5.11%	29.21%	0.85%	108.26%
术后 6 个月	-83.67%	53.42%	55.60%	41.56%	182.89%	21.30%	36.55%	74.73%	0.35%	92.52%
术后 10 个月	-64.77%	62.72%	57.15%	56.53%	135.15%	18.11%	33.73%	-68.04%	-10.05%	-89.72%

注:术前为基线数据,术后各期为增长率,均同术前基线数据相比,公式为(术后值-术前值)/术前值×100%。

表 3 皮下脂肪面积同骨密度及血清学指标的多元线性回归分析

Table 3 The multiple linear regression between SFA, BMD and serum biochemical indexes

变量	R^2	P 值
体重	0.726	0.000
骨密度	0.871	0.000
瘦素	0.919	0.003
腹内脂肪面积	0.940	0.016
高密度脂蛋白	0.957	0.018

表 4 骨密度同脂肪及血清学指标的多元线性回归分析

Table 4 The multiple linear regression between BMD, fat and serum biochemical indexes

变量	R^2	P 值
皮下脂肪面积	0.280	0.008
体重	0.546	0.002
低密度脂蛋白	0.757	0.001
内脂素	0.810	0.033

组织的分布有关^[10]。SFA 随体重、BMD、LP、VFA 的增加而增加,随 HDL 的增加而减小。表明此动物模型可用于研究雌激素缺乏所引起的脂肪代谢变化、分析相关脂因子与体内脂肪再分布的关系。

有关腹部脂肪含量同骨密度关系文章中有很多不同观点,如 Wang 等^[11]认为无论男女,瘦体重和脂肪组织对 BMD 均有保护作用;Liu 等^[12]认为在校正了身体指数和体重之后,内脏脂肪含量与 BMD 没

有相关性;同样的结果也被 Salimzadeh 等^[13]证实。本次实验发现 BMD 先升后降,而腹部脂肪尤其是 VFA 一直保持增长,BMD 随着 SFA 的增加而增加,而随体重的增加而降低,且同 VFA 无明确关系。验证了 SFA 而非 VFA 在绝经超早期对 BMD 的保护作用,但体重越大 BMD 越小。以往对绝经后妇女体脂及 BMD 研究选择的人群的纳入标准常为绝经一年以上,本次实验观察时间较短,可能观测不到腹部脂肪同 BMD 经典动态变化的过程。

绝经后 E_2 的降低会导致 BMD 的降低^[14]。本次实验结果显示,双侧卵巢切除术后 10 个月,比格犬 BMD 并未显著下降,这与以往研究的结果不同。对不同时间点 BMD 做趋势分析后发现,其在术后 10 个月较 6 个月有下降趋势,可能原因为激素变化先于骨代谢,在较短的时间内 BMD 并不会明显减低。Martin 等^[15]对去势比格犬进行骨髓脂肪含量相关性研究时发现,在切除卵巢后 11 个月,脊柱和第 11 肋骨小梁髓腔内骨小梁体积百分比才开始减少,而本次实验至切除卵巢后 10 个月就终止,未观察到骨髓脂肪百分比有显著改变。本研究未能观察到比格犬 BMD 的下降,可能与比格犬 BMD 影响因素较成人更多、犬的骨代谢代偿能力更强有关。光照、运动及食物等因素均能影响犬骨代谢过程,而这类因素难以很好控制。但是本研究从趋势变化上验证了 Martin 等^[15]关于卵巢切除术后比格犬骨密度

变化的结果。以往研究发现 BMD 同 E_2 、VFN 呈正相关,同 CHOL、LDL 呈负相关^[16-17],而同 HDL 的相关性研究争论较大^[18]。回归分析可知,本实验去势犬骨 BMD 随着 VFN 的增加而减低,随 LDL 的增加而增加,出现了同前人研究相矛盾的结果,原因亦可能为绝经后超早期 BMD 还未明显下降而骨脂因子水平已明显改变,也侧面反映出 BMD 同脂蛋白关系密切,骨脂代谢相互影响。现有结果证明对比格犬切除双侧卵巢观察 10 个月无法建立绝经后骨质疏松模型,如需建立应观察更长时间。尽管未能观测到 BMD 在去势后明显下降,但术后 VFN/SFN/TFA、BMD 及 E_2 均从术后 6 个月起开始有变化,可反映出 E_2 在绝经后脂肪与骨代谢中的关键作用。

虽然在实验前笔者已经做了充分准备,但由于实验条件限制,本研究尚存在以下不足:①未设置对照组,会在后续实验中增加对照组,获取数据,继续比对实验组同对照组之间的关系,使结果更有说服力;②因实验犬难得,价格昂贵,实验组个数尚少,可能影响统计学效力;③在图像扫描方面,磁共振扫描时间较长,且犬需要麻醉,部分犬呼吸运动伪影明显,图像质量不如人群研究;④观察时间过短。

【参 考 文 献】

- [1] 陶敏芳,朱洁萍,章振林.围绝经期与绝经早期妇女骨密度及身体成分分析[J].中国全科医学,2009,12(17):1587-1588.
- [2] 吴洁,姜允飞,林华,等.绝经对身体脂肪分布影响的研究[J].江苏医药,2000,26(11):878-879.
- [3] Burnham R, Kai-kee E. Relationship between serum leptin levels and bone mineral density: A systematic review and meta-analysis [J]. Clin Chim Acta, 2015, 444(2):260.
- [4] Mohitidekani J, Soleymanisalehabadi H, Owlia MB, et al. Relationships between serum adipocyte hormones (adiponectin, leptin, resistin), bone mineral density and bone metabolic markers in osteoporosis patients[J]. J Bone Miner Metab, 2014, 32(4):400-404.
- [5] Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(6):1149.
- [6] 李宁华,区品中,朱汉民,等.中国部分地区中老年人群原发性骨质疏松症患病率研究[J].中华骨科杂志,2001,21(5):275-278.
- [7] 王玲,汪伟,邓微,等.定量 CT 测量腹部脂肪面积及分布的重复性研究[J].中国骨质疏松杂志,2012,18(11):999-1003.
- [8] 张晨鑫,张勇,王玲,等.定量 CT 与 MRI 测量腹部脂肪面积及分布的比较[J].重庆医学,2016,45(30):4179-4181.
- [9] 王新蕾,邵义祥,高瑞霖,等.自然发情母犬的雌孕激素变化规律初探[J].中国比较医学杂志,2008,18(2):28-31.
- [10] 王懿,刘彩玲,于学文.雌激素和雌激素受体在脂肪组织中的作用[J].中国妇幼保健研究,2003,14(2):94-95.
- [11] Wang J, Yan D, Hou X, et al. Association of adiposity indices with bone density and bone turnover in the Chinese population [J]. Osteoporos Int, 2017, 28(9):2645-2652.
- [12] Liu CT, Broe KE, Zhou Y, et al. Visceral adipose tissue is associated with bone microarchitecture in the framingham osteoporosis study [J]. J Bone Miner Res, 2017, 32(1):143.
- [13] Salimzadeh A, Abolhasani M, Sedaghattalab M, et al. Relationship between bone density and abdominal visceral fat in premenopausal overweight and obese Iranian women aged 30-50 years [J]. Int J Rheum Dis, 2014, 20(5):555-560.
- [14] Cauley JA. Estrogen and bone health in men and women [J]. Steroids, 2015, 99(Pt A):11-5.
- [15] Martin RB, Chow BD, Lucas PA. Bone marrow fat content in relation to bone remodeling and serum chemistry in intact and ovariectomized dogs [J]. Calcif Tissue Int, 1990, 46(3):189-194.
- [16] Jeong TD, Lee W, Choi SE, et al. Relationship between serum total cholesterol level and serum biochemical bone turnover markers in healthy pre- and postmenopausal women [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:398397.
- [17] Yamauchi M, Yamaguchi T, Nawata K, et al. Increased low-density lipoprotein cholesterol level is associated with non-vertebral fractures in postmenopausal women [J]. Endocrine, 2015, 48(1):279-286.
- [18] Ackert-Bicknell CL. HDL cholesterol and bone mineral density: Is there a genetic link? [J]. Bone, 2012, 50(2):525.

(收稿日期:2018-07-13;修回日期:2018-08-27)