骨质疏松症动物模型研究现状

徐洪璋[1],余 斌[2](第一军医大学[1]分校外科教研室,广东 广州 510315;[2]珠江医院创伤骨科,广东 广州 510282)

摘要:骨质疏松症动物模型是研究骨质疏松的重要基础。本文综述了常见的骨质疏松症的动物模型及其特点,认为今后的研究,将更多地转向大动物模型,如绵羊和小型猪等。

关键词:骨质疏松症;动物模型;实验动物
中图分类号:R681;Q95-331 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2002)01-0047-04

Currentstatusofstudy on animalmodels ofosteoporosis

XUHong-zhang[1],YUBin[2]
[1]Department ofSurgicalTeachingandResearch, Branch Campus ofFirstMilitaryMedicalUniversity, Guangzhou 510315,China; [2]DepartmentofOrthopaedicsandTraumatology,ZhujiangHospital,FirstMilitaryMedicalUniversity, Guangzhou510282,China

Abstract Animalmodelsofosteoporosislaythefoundationofsophistcatedstudiesonosteoporosis. Thisarticlereviews the currently mostwidely-usedanimalmodels of osteoporosisandtheiressentialfeatures, arrivingattheconclusionthatfuture studies of osteoporosis willbeconductedmoreandmoreinlarge animalsasewesandgilts etc.

Key words osteoporosis;animalmodel;experimentalanimal

骨质疏松症是威胁中老年人健康的一种常见病,以骨量减少、骨组织显微结构改变和骨折危险度增加为特征。随着人类寿命的延长和老龄化社会的到来,该病的防治已成为一个迫切的问题。在骨质疏松症的研究中,模型动物被广泛使用。正确选择和建立一个理想的骨质疏松实验动物模型,是开展骨质疏松研究工作的基础。本文就目前各种骨质疏松症动物模型的发展现状及特点作一综述。

1 大鼠

实验用大鼠有远交和近交系两种。远交系包括Wistar、Spraque-Dauley、Long-Evans、Holtzman等品种,近交系包括ACI、Brown-Norway、Fischer 344、Lewis、Wistar-Furth等品种。常用Wistar、Holtzzman、Fischer 344、SD大鼠来作骨质疏松模型。大鼠的自然寿命为2~3年,性成熟期2~3月。大鼠有明显的生长期和成年期,但性别不同的大鼠生长期和成年期时间不同。成年雄性大鼠30个月时骨干骺端仍持续生长,因此使用雄性大鼠的实验结果不易被学者广泛接受。而雌性大鼠的骨干骺端闭合明显早于雄性。雌性大鼠在6~9个月进入骨生长静止期,骨骺开始封闭,这是骨代谢相对稳定的阶段;到10个月时达到峰值骨量[1];12个月以后一般被认为已进入老龄;21个月以后,由于雌激素缺乏,雌性大鼠乳腺肿瘤发病率上升,已不适合作骨代谢研究。福田俊等[2]对雌、雄大鼠连续30个月的观察发现,两种性别大鼠股骨的钙含量和断裂强度在1~3个月时增长都很快,3~12个月时增长变慢,12~27个月基本不变。因此在选择模型动物的年龄时,根据需要决定,若要复制老年大鼠骨质疏松模型最好选择18~24个月龄大鼠。有的研究者因为“退休”(产仔后)雌鼠价廉,选用这类鼠作实验,来观察促进骨生成或预防骨折药物的作用,常常容易造成错误。因为2月龄大鼠性已成熟(骨骼未完全成熟前),3~4个月时即可受孕产仔,到6~7个月时,一般已产仔2~3窝;孕期和哺乳期大鼠由于对钙的过度需求抑制了骨骼的正常发育,多伴有骨骼生长发育迟缓,到10~12个月时才达到峰值骨量,与未经孕产鼠相比差异较大。

在建立大鼠骨质疏松模型的方法研究上,有双侧卵巢切除法(去势法)、维甲酸法、糖皮质激素诱导法、营养法、人工法等。其中双侧卵巢切除法最常用。成年雌性大鼠有一个规则的发情期,发情期动物体内雌二醇水平处于峰值,每4d有18h峰值时间,在15个月后骨折发生较多,并且观察到松质骨有一些骨丢失现象,当不出现雌二醇的峰值时标志“绝经”,松质骨骨丢失发生加快。雌性大鼠的卵巢切除后,松质骨的骨量减少,骨强度下降,某些部位骨丢失现象加快,这种骨丢失是伴随骨转换增强而进行的,这种特性类似于人正常绝经时高转换型骨质疏松发生的骨丢失状态。另外,手术后雌性大鼠在骨质疏松性骨折和骨量减少部位上,也表现出与人类很大的相似性[3],切除卵巢的大鼠经合适的雌激素进行替代治疗时并不增加骨

收稿日期:2001-04-19
作者简介:徐洪璋(1974-),男,江西波阳人,1996年毕业于第一军医大学,本科,助教,现为在读硕士研究生,电话:020-84219935-50521

转换和骨丢失,这与绝经后妇女对雌激素替代法的反应相一致。因此在一般情况下,双侧卵巢切除法制成的动物模型以松质骨丢失为主,为高转换型的骨质疏松症,与临床绝经后骨质疏松极为相似。此模型成功率高,稳定可靠,适用范围广,一般以 6~12月龄大鼠最好。维甲酸是维生素 A的衍生物,是治疗白血病的药物,它对骨代谢有明显影响,有研究表明,低剂量维甲酸 (70mg/kg)造型效果欠佳,主张用高剂量维甲酸 (90、100、120mg/kg)造型。因为高剂量维甲酸可以有效地拮抗饲料中钙对骨丢失的补偿作用。维甲酸法因其制作模型所需时间短,在国内中药开发研究中被普遍采用。虽然在病因上与人类骨质疏松不同,但此模型在发病症状、组织形态学表现以及对雌激素的骨反应上与人类有较大的相似性,是大鼠急性骨质疏松的有用造模方法。与双侧卵巢切除模型相比较,摘除卵巢模型的不足之处为创伤性且所需时间较长 (通常需 3个月以上)。糖皮质激素诱导法对研究人类糖皮质激素引起的继发性骨质疏松症有积极意义。目前研究发现由于糖皮质激素可致肌肉、结缔组织、淋巴组织退化,使动物体质量迅速降低,适用范围相对较小而在体育锻炼与骨质疏松关系的研究中能获得满意效果。营养法是通过对大鼠的钙、磷进行控制来制作骨质疏松症动物模型的一种简单方法。有研究表明,采用高蛋白低钙饲养 20周后可取得较好的骨质疏松症模型[4],但目前单独应用营养法制作骨质疏松大鼠模型的不多,往往是作为一种辅助方法,比如和去势法相结合制作骨质疏松模型[5]。人工法制作的骨质疏松模型通常指废用性骨质疏松模型,常用的有机械固定法、悬吊法、腱切除法、坐骨神经切除法 4种。机械固定法骨质疏松模型可用于模拟研究临床截去一侧部分下肢拄拐行走病人的骨代谢变化。悬吊法常用于模拟航天航空人员失重研究。目前认为机械固定法、悬吊法优于神经或肌腱切除法。最近有研究[6]发现对新生期大鼠注射谷氨酸单钠后 100d 可出现明显的骨质疏松,考虑为谷氨酸单钠可选择性破坏下丘脑弓状核,而下丘脑弓状核参与全身骨骼生长发育的调控。该发现对骨质疏松模型的建立研究以及骨质疏松治疗的意义尚待进一步研究。

2 小鼠

小鼠是医学实验中用途最广泛和最常用的动物。但能够验证小鼠做为骨质疏松研究模型的数据较少。少数研究提示,其骨量变化与大鼠相似。华盛顿大学的 Lewis等发现基因工程小鼠 (含 IL-4基因)的骨架发育正常,但出生后骨质开始丧失,提示 IL-4可以降低新骨的产生。他们已监测了这种小鼠 12代,发现每生下的一批小鼠中有一半出现骨质疏松症。最近的研究[4]证实 C57BL/6J小鼠峰值骨量低,而 C3H/HeJ小白鼠的峰值量高;SAM-P/6 (早老型)小鼠则具有低峰值骨量和中、老年时易发生骨折的特点,是日前唯一证实可随增龄出现脆性骨折的动物。如果 SAM-P/6小鼠不存在象纤维骨硬化症那样胶原异常的现象,则可能是研究低峰值骨量引起老年性骨折增加的实用动物模型,但这一点目前仍有待进一步研究。近年来,考虑到 SAM-P/6、C57BL/6J和 C3H/HeJ小鼠的峰值骨量方面的差异,应用现代分子生物学技术如杂交技术和 cDNA探针等,对其基因进行定点识别分析研究,以便找到决定峰值骨量的基因,为在大动物包括人类的研究方面提供有益的经验。有些学者正在作这方面的研究。但小鼠存在可供研究用血清少,发情期不受下丘脑 -垂体轴调节等因素影响。最近日本研究人员选用一种基因突变小鼠 twy (Tiptoe walking yoshimura)小鼠进行研究[7]。这种小鼠体内存在不平行钙化现象,颈椎有高度骨化现象,腰椎发生高转化率的骨质疏松[8]。

3 狗

在骨质疏松研究中,可选用狗来作研究,成年狗无论从合成代谢还是从结构特征方面,都是与人类骨骼相似的可靠模型。其皮质骨与松质骨的比例与人骨相似。哈佛氏单位和松质骨重建与人的形态相似,但狗的重建更快[9]。当评价合成代谢药物对松质骨和哈氏重建的影响时,狗是个优秀的模型。但狗在 1年中,只有 2次发情期 (春、秋天),与人类生殖生理学相差甚远[10]。同时,狗的骨组织生长代谢对雌激素的依赖性相对较小;狗对钙的每日需要量比人高,为 120mg/kg d,每日磷需要量 90mg/kg d,摄入钙 /磷之比为 1.2~1.4:1,狗小肠对钙的吸收低于人类[11],更值得注意的是卵巢和子宫切除并不足以引起明显的骨丢失。因此,目前所有用于研究成人骨骼模型中,卵巢切除模型是有争论的。目前比较肯定的是,应用狗研究废用性骨质疏松较为成功。此外,应用狗作骨质疏松研究的一个优点是可以在狗的髂骨上作多次骨活检,便于反复、长期观察。在选择狗的品种上,一般选用目的杂交系的小猎犬,而随意杂交系因为不知其背景,不适用于骨代谢研究。小猎犬身体大小适中,性格温顺,容易管理,是杂食性动物,胃肠系统与人类相似,且其钙磷代谢方面已有资料可查,但小猎犬价格昂贵[12]。

4 兔

兔是医学和生物学研究中广泛应用的动物之一。兔的寿命一般为 4~9年,性成熟期 5~8个月,成年兔有哈氏重建活性,可以用作合成代谢促进药物对松质骨及哈氏重建作用的研究[13]。由于兔具有明显的哈氏

重建能力,它们可以成功地作为糖皮质激素诱导的骨质疏松模型。在卵巢切除模型方面的研究报道较少,一般认为制作去势兔骨质疏松模型,以兔龄 5个月为宜,经过半年周期,骨质疏松模型基本可建立。

5 猪

猪曾被成功地用于氟化物和运动对骨骼影响的研究。因为农家猪太大,管理和饲养困难,不适于医学研究[14],所以一般选用小型猪。小型猪的品种有 Sinclair、Hanford、Hormel、Yucatan Vietnamese-Pot-Belled、中国的贵州小猪等。小猪作为骨质疏松模型有如下优点:(1)有连续的发情周期,与人相似,每次 18~21 d[15];(2)有层状骨、骨小梁和骨皮质重建,与人相似,其内量重,骨小梁网比人致密;(3)骨骼大,足以接受人工装置的植入,可以多次采活检,多次取血标本;(4)杂食动物是人体消化道功能最佳模型。不足之处是:(1)小型猪昂贵,有些地区买不到;(2)卵巢子宫切除手术比狗更困难,因为子宫的血管更容易破裂。

6 绵羊

迄今只有很少的研究以绵羊作为骨质疏松的动物模型。从多方面因素看,绵羊是一种极具潜力的骨质疏松模型动物[14]。绵羊温顺,容易处置和圈养;相对较便宜,能大量购买到;能取大量血、尿标本,反复骨活检没有困难;髂嵴与人的有相似性;便于安装人工植入体。绵羊的秋冬季发情,发情期 14~21 d,自发性排卵,激素分泌情况与女性相似,但没有自然停经[16]。在年老的绵羊 (7~9岁),可见 Haversian系统的重建,首先在股骨的尾部,其次在肱骨和桡骨的骨干部分发现这种重建[17]。Turner采用母绵羊建立去卵巢骨质疏松模型,发现在双侧卵巢切除后 6个月髂骨骨小梁容量 (BV/TV,%)、骨小梁厚度明显低于手术前 ($P<0.01$);骨小梁间距则明显高于手术前 ($P<0.01$)。因此他们认为与其他动物如狗、猪、非人灵长类相比,绵羊可能是一种更具有实用价值,更经济的大动物模型。

已经证明绵羊是研究骨质疏松合适的动物模型,但有不少问题需要解决。(1)需搞清股骨的哪个部位骨重建最活跃?(2)如何解释和对待绵羊骨密度、生化指标、髂嵴的组织形态学等指标有季节性和日节律性波动?(3)确定一年中哪个季节进行卵巢切除术引起骨丢失最迅速?(4)如何排除外界因素引起的骨丢失?这些因素包括繁殖、喂食、钙磷比值、接受阳光的程度等。国内还有报道应用山羊进行去势建立骨质疏松模型的报道[18]。

7 灵长类动物

灵长类动物有骨生长和骨成熟两个时期。所有灵长类动物都有一个规律的月经周期,每 28 d一个循环,与人极为相似。灵长类动物的组织形态学与人类极其相似,也同样出现增龄性和制动性失骨。灵长动物自然绝经时间在出生后第 15~20年之间。恒河猴和狒狒中峰值骨量出现的年龄在 9~10岁。但大部分研究采用 4~7岁的猴作卵巢切除术。因此,骨骼未成熟的灵长类通过卵巢切除来建立模型似乎是不适当的。但是老龄化的雌性灵长类很难找到,且代价很高。老年狒狒和恒河猴在脊椎病理上发现有严重的骨性关节炎,狒狒的骨性关节炎带有明确的年龄相关性,发病椎体的前缘高度有所下降,这种改变与脊椎压缩骨折很相似,使老年灵长类动物脊椎的骨量测定受到影响。另外年龄和骨代谢延迟对灵长类动物实验性骨丢失的影响较大,同时由于灵长类的驯养条件要求严格,传播的动物源性疾病的危险性相对较高,如 Marburg病毒疾病、Eloda病毒疾病、病毒性肝炎、猿猴疱疹病毒 (B-病毒)和结核等,加上费用高,试验周期长等都限制了他们的应用[14]。

8 小结

骨质疏松症研究中动物模型选择的合适与否,不仅关系到实验研究的成败,更重要的是这一模型动物能否模拟出类似人类骨代谢过程中的各项变化,从而为人类骨质疏松症的防治研究提供确切可靠的指标。因此,实验前必须明确实验设计上想要了解或研究的内容,研究者也需了解不同动物种属与人类骨的生物代谢特征,以及疾病对人体的影响等,当你对这些情况了解得越透彻,骨质疏松症动物模型成功的机率越大。建立的骨质疏松动物模型在骨质疏松的发病机制研究。防治措施探讨和新药研究中均占有十分重要的地位。目前鼠类骨质疏松模型应用最广泛,今后更多的研究将转向以绵羊和小型猪作为骨质疏松模型,因为它们有很多优点。少数研究者试探着用灵长类作模型,但它们的应用限制太多,几乎不大现实。

随着研究的深入和新技术的出现,对骨质疏松动物模型的复制方法、观察指标和研究领域也将不断发展。比如模型动物体内细胞生长因子在造型过程中的变化和意义;成骨细胞和破骨细胞的活性改变与膜上激素受体的关系;模型动物不同的峰值骨量的控制基因的组成和意义以及骨质疏松症的组织工程和基因治疗的应用等。正在引起人们的兴趣,相信随着老龄化社会的到来,和骨质疏松症越来越被重视,现有骨质疏松模型的采用将会不断增加,新的模型将不断出现,骨质疏松症的治疗方法也将不断改进。

参考文献:

[1] ShiraishiA, TakedaS, MasakiT, et al. Alfacalcidolinhibitsbone

resorptionandstimulatesformationinanovariectomizedratmodel of osteoporosis: distinctactionsfromestrogen [J]. JBoneMiner Res,2000, 15(4):70-9.

[2] 福田俊,饭田治三·加齢に伴う雌雄うットの骨代谢の变化と卵巢,精巢摘除年齢による影响の差 [J].日骨形态志,1991,1: 89-94.

[3] ChachraD, LeeJM, KasraM, et al. Differentialeffectsof ovariectomyonthemechanical properties of cortical and cancellous bones inrat femoraand vertebrae [J]. BiomedSci Instrum, 2000, 36: 123-8.

[4] 乔伟伟,许兰文.营养性骨质疏松动物模型的实验研究 [J].营养学报,1999,21(2):240-1.

[5] KuboT,ShigaT,HashimotoJ, et al. Osteoporosisinfluencesthelate periodoffracturehealing inaratmodel prepared byovariectomy and low calciumdiet [J]. J SteroidBiochemMolBiol, 1999, 68 (5-6):197-202.

[6] 刘浩宇,刘锡仪.新生期大鼠注射谷氨酸单钠后导致骨质疏松 [J].中国骨质疏松杂志,2000,6(4):10-2.
LiuHY, LiuXY. Effectsofmono-sodiumglutamateadministered neonatallyongrowthanddevelopmentofboneinrat [J]. ChinJ Osteoporo, 2000,6(4):10-2.

[7] OkawaA,IkegawaS,NakamuraI, et al. Mappingofagene responsible for twy (tip-toe walking Yoshimura), a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL) [J]. MammGeonome,1998,9(2):155-6.

[8] Ohtsuki T, Furuya S, Yamada T, et al. Geneexpression of noncollagenous bone matrix proteins in the limb joints and intervertebral disksof thetwy mouse [J].CalcifTissueInt,1998, 63(2): 167-72.

[9] PanulaHE, NieminenJ, ParkkinenJJ, et al. Subchondralbone remodelingincreasesinearlyexperimentalosteoarthrosisinyoung beagle dogs [J]. AxtaorthopScand,1998,69(6):627-32.

[10] KooistraHS, OkkensAC, BeversMM, et al. Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone andfollicle-stimulatinghormone during differentphasesoftheestrouscycleandanestrusinbeagle bitches [J]. BiolReprod, 1999,60(1):65-71.

[11] AkimotoM,NagahataN,FukushimaK, et al. GastricpHprofilesof beagledogsandtheiruseasanalternative to humantesting [J]. Eur J PharmBiopharm,2000,49(2):99-102.

[12] BranemarkR, OhrnellLO, SkalakR, et al. Biomechanical characterizationofosteointegration: anexperimental in vivoinvestigationinthe beagle dog [J].JOrthopRes,1998,16(1):61-9.

[13] WatersRV, GamradtSC, Asnis P, et al. Systemiccorticosteroids inhibitbonehealinginarabbitulnarosteoto my model [J]. Acta Orthop Scand, 2000,71(3):316-21.

[14] BellinoFL.Nonprimateanimalmodelsofmenopause:workshop report [J]. Menopause,2000,7(1):14-24.

[15] KraelingRR, BarbCR,RampacekGB, et al. Luteinizinghormone responsetocontrolled-releasedestorelinin estradiolbenzoateprimed ovariectomizedgilts [J].Theriogenology,2000,53(9): 1681-9.

[16] ReynoldsLP,KirschJD,KraftKC, et al. Time-courseoftheuterine response toestradiol-17betainovariectomized ewes: expressionof angiogenic factors [J].BiolReprod,1998,59(3):613-20.

[17] KimmelDB.Animalmodelfor in vivoexperimentationinosteoporosis research [C].In:MarcusR,FeldmanK, KelseyJ,eds. Osteoporosis [M]. NewYork:AcademicPress,1996.671-96.

[18] 李 良,陈槐卿.建立骨质疏松山羊模型初探 [J].中国骨质疏松杂志,1998,4(2):82-95.

(上接 46 页)

规电泳后对电泳凝胶作分析即可，方法简便且费用较低。由于只提取凋亡细胞样品 DNA,所以对检测结果影响小,保证了结果的准确性和重复性。但在实验中我们也发现，电泳结果的好坏与凋亡率的准确性密切相关,所以须有好的电泳结果,电泳时间不足、太过或者凋亡率太低时,DNA 梯状条带不明显,影响结果的准确。如果只用于定性检测细胞凋亡,则对电泳结果的要求较低,得出 DNA 的梯状条带即可。

综上所述,我们认为琼脂糖凝胶电泳结合 GDAS 是一种简便、低耗、准确易行的细胞凋亡定性定量检测方法。

参考文献：

[1] JacobsonMD,WeilM,RaffMC.Programmedcelldeathinanimal development [J].Cell,1997,88(3):347-54.

[2] 姜 泊,张亚历,周殿元.分子生物学常用研究方法 [M].北京:人民军医出版社.1996.172.

[3] Messmer UK,LapetinaEG, BruneB, et al. Nitric oxide-induced apoptosisinRAW264.7macrophagesisantagonizedbyproteinkinaseC-andproteinkinaseA-activatingcompounds [J]. MolPharmocol,1995,47(4):757-65.

[4] SchmidI,UittenbogaartCH,KeldB, et al. Arapidmethodformeasuringapoptosisanddual-colorimmunofluorescencebysinglelaser flowcytometry [J].JImmunolMethods,1994,170(2):145-57.

[5] GavrieliY, ShermanY, BenSA.Identificationofprogrammedcell death in situ via specificlabelingofnuclearDNAfragmentation [J]. JCellBiol,1992,119(3):493-502.

[6] 周俊岭,杨德立,方向东.凝胶图像电密度分析系统在分子生物学研究中的应用 [J].第一军医大学学报,1998,18(1):73-6.

[7] 郭 征.组织培养技术 [M].北京:人民卫生出版社,1993.185-9.

[8] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, et al. A rapidandsimple method for measuring thymocyte apoptosis bypropidium iodide stainingandflowcytometry [J].JImmunolMethods,1991,139(2): 271-9.

[9] HaleAJ,SmithCA,SutherlandLC, et al. Apoptosis:molecularregulationofcelldeath. [J] EurJBiolchem,1996,236(1):1-26.

[10] FadokVA,VoelkerDR,CampbellPA, et al. Exposureofphosphatidylserineonthesurfaceofapoptoticlymphocytesspecificrecognitionandremovalbymacrophages [J]. JImmunol, 1992,148 (7): 2207-16.

[11] GongJP,TraganosF,DarzynkiewiczZ.Aselectiveprocedurefor DNAextractionfromapoptoticcellsapplicableforgelelectrophoresisandflowcytometry [J]. AnalBiochem,1994,218(2):314-9.

责任编辑:吴锦雅)