

建立大型犬骨质疏松动物模型的实验研究

王 方 周建伟 张瑞娟 曾 辉 邹德威 吴继功 马华松

摘 要 **目的** 采用激素注射联合低钙饮食的方法快速建立大型犬骨质疏松动物模型。**方法** 健康雌性杂种犬 16 只,体重 27.0 ± 1.8 kg, 5~7 岁龄,随机分两组(每组 8 只):实验组喂低钙饲料,静脉注射地塞米松磷酸钠注射液 2.5 mg/kg,每周 2 次;对照组喂食正常犬饲料,静脉注射生理盐水 2.5 ml/kg,每周 2 次。实验前、实验 4 周、8 周进行骨密度测定、生化检查,实验 12 周进行骨密度测定、生化检查、骨生物力学及骨组织形态学检查。**结果** 与对照组相比,实验组应用激素合并低钙饮食 8 周骨密度显著降低($P < 0.05$),12 周进一步降低($P < 0.01$);实验中两组血钙无显著差别($P > 0.05$),实验组 4 周血磷较对照组降低($P < 0.05$),8 周及 12 周血磷进一步降低($P < 0.01$),实验 4、8、12 周实验组碱性磷酸酶均显著升高($P < 0.01$);实验组第 12 周骨小梁面积百分数(% Tb. Ar)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁数量(Tb. N)较对照组显著降低($P < 0.01$),骨小梁分离度(Tb. Sp)较对照组显著增高($P < 0.01$);实验第 12 周实验组腰椎压缩极限载荷、极限强度和压缩模量均明显低于对照组($P < 0.01$),股骨三点弯曲极限载荷实验组低于对照组($P < 0.05$)。**结论** 激素注射联合低钙饮食的方法短期内成功建立了大型犬骨质疏松动物模型,该模型具有人类骨质疏松症的临床特性,为进行外科学实验研究提供了依据。

关键词 糖皮质激素 骨质疏松 低钙饮食 动物模型

Study on Establishment of Large Canine Osteoporosis Model. Wang Fang, Zhou Jianwei, Zhang Ruijuan, et al. Department of Orthopedics, 306 Hospital of PLA, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract **Objective** To establish large canine osteoporosis model quickly using the method of both hormone injections and low calcium diet. **Methods** Totally 16 healthy female hybrid canine, which weighted 27.0 ± 1.8 kg and were 5~7 years old, were divided into two groups (each group 8). Experimental group was intravenous injected dexamethasone sodium phosphate injection 2.5 mg/kg twice per week, and fed low calcium feed. Control group was injected physiological saline twice per week, and fed normal feed. The bone mineral density and biochemical indicator were measured both before the experiment and on the 4th, 8th, and 12th week of the experiment. The biomechanics of bone and bone tissue morphology were examined on the 12th week of the experiment. **Results** On the 8th week of experiment, bone mineral density significantly reduced ($P < 0.05$), and further reduced ($P < 0.01$) on the 12th week. During the experimental process, the calcium of the two group had no significant difference ($P > 0.05$). On the 4th week the phosphorus of the experiment group reduced ($P < 0.05$), and further reduced ($P < 0.01$) on the 8th and 12th week. On the 4th, 8th and 12th week the alkaline phosphatase of the experiment group significantly increased ($P < 0.01$). On the 12th weeks the Tb. Ar, Tb. Th and Tb. N of the experiment group were significantly reduced and the Tb. Sp was significantly increased ($P < 0.01$ for both) comparing with the control group. On the 12th week the lumbar compressive ultimate load, ultimate strength and compression modulus of the experiment group were significantly lower than the control group ($P < 0.01$), the 3 point bending ultimate load of the experiment group was lower than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion**

The method of both hormone injections and low calcium diet successfully established large osteoporosis animal model in the short term, and this model has human osteoporosis clinical characteristics, providing the basis for surgical experimental research.

Key words Glucocorticoid; Osteoporosis; Low calcium diet; Animal model

骨质疏松(osteoporosis)目前已经成为影响人类健康的全球性问题,骨质疏松性骨折有较高的发病率和致死率,骨折好发于椎体、髋关节和膝关节等部位,目前的手术方式如经皮后凸成形术(percutaneous ky-

phoplasty, PKP)、关节置换术和钢板内固定术等存在不足之处,还需要进一步完善和改良^[1~4]。研究治疗骨质疏松症的新的外科方法需要大型骨质疏松动物模型,大型犬应用于外科学研究有独特的优势,建立大型犬骨质疏松动物模型,模拟其临床症状和病理学变化,对于研究新的手术方式治疗骨质疏松性骨折具有重要意义^[5]。本研究尝试采用激素注射与低钙饮食联合的方法短期建立大型犬骨质疏松动物模型。

基金项目:总后勤部“十一五”专项基金资助项目(08Z018)

作者单位:100191 北京大学解放军 306 医院教学医院骨科

通讯作者:邹德威,电子信箱:zoudewei@vip.163.com

材料与方 法

1. 实验材料与仪器:地塞米松磷酸钠注射液(国药准字 H12020515(2011)第 110423 号,湖北天药药业股份有限公司生产);0.1% 低钙饲料(中国人民解放军总医院动物中心提供);速眠新/氯胺酮合剂(中国人民解放军总医院动物中心提供);法国 DMS 公司双能 X 线骨密度仪(DXA 型号,CHALLENGER);日立 7060 型全自动生化分析仪;生物力学试验机(MTS,858Mini Bionix II,美国);OlympusBX50 型高级荧光显微镜和 DP72 数码照相系统,Shandon 石蜡切片机(Shandon Finesse 325)、日本 SANYO 超低温冰箱(-80℃)。

2. 实验动物与方法:经过中国人民解放军总医院动物伦理委员会审批同意,中国人民解放军总医院动物中心提供健康雌性杂种犬 16 只,体重 27.0 ± 1.8 kg,5~7 岁龄,购买后适应性饲养 1 周,随机分两组(每组 8 只):实验组喂低钙饲料,同时静脉注射地塞米松磷酸钠注射液 2.5mg/kg,每周 2 次;对照组注射生理盐水,每周 2 次,喂食正常犬饲料。实验前、实验 4 周、8 周进行骨密度测定、生化检查,实验 12 周进行骨密度测定、生化检查、骨生物力学及骨组织形态学检查。麻醉方法:由专业动物麻醉师操作,建立静脉通道,速眠新/氯胺酮合剂 0.1ml/kg 诱导麻醉,待四肢肌张力下降、睫毛反射消失后行气管插管。标本制备:实验 12 周时,两组分别随机选取 4 只犬,静脉麻醉后,动物静脉注射氯化钾处死,取俯卧位固定于手术台上,后背及下肢备皮,后正中切开皮肤、筋膜,手术刀、骨膜剥离器剥离脊柱周围肌肉,咬骨钳咬断胸椎和骶骨,取出腰椎。取后肢外侧纵切口,切开皮肤、筋膜及肌肉,骨膜剥离器显露股骨,取出双侧股骨,-80°保存,动物尸体按医疗垃圾处理。

3. 观察指标:(1)一般情况:观察两组动物精神、饮食、活动、局部感染及死亡等。(2)骨密度(BMD)测定:两组分别于实验前、实验 4、8、12 周测量骨密度。静脉麻醉后采用双能 X 线骨密度仪测定,研究对象取仰卧位测定其腰椎 L2~L4 的 BMD 值(g/cm^2),以 L2~L4 BMD 平均值作为其 BMD 值, T 值=(实验组 BMD-对照组 BMD)/实验组标准差,具体操作由专业技术人员进行。(3)生化检查:两组分别于实验前、实验 4、8、12 周经犬后肢小隐静脉采血,用日立 7060 型全自动生化分析仪测定血中钙、磷、碱性磷酸酶(AKP)。(4)生物力学测试:采用轴向加压测试椎体的力学强度。取犬标本,室温下复温,用生理盐水保持标本湿润。测量时,分别将实验组和对照组各 4 只犬的腰 3 和腰 4 的椎体置于生物力学试验机(MTS,858Mini Bionix II,美国)加压模具之间,以 2mm/min 的恒定速度逐渐施加轴向压力,直到出现明显的塌陷性骨折。根据软件采集的压力-应变曲线,取曲线峰值为松质骨极限载荷,曲线在上升阶段的斜率为骨质的弹性模量(E),极限强度(σ_{uk})=最大压力/体界面积^[6]。采用三点弯曲试验测量两组犬股骨干的力学强度,测量股骨中点的直径和股骨长度。将股骨置于生物力学试验机的支架上,下方支点间距为 15cm,以 2mm/min 的恒定速度压股骨中点,直至股骨断裂,取压力曲线

峰值为皮质骨弯曲极限载荷^[7]。(5)组织学检查:取实验组和对照组各 4 只犬的腰 2 和腰 3 椎体标本,中性甲醛固定后,脱钙,甲基丙烯酸甲酯包埋,在 Shandon 石蜡切片机上切片,厚度约 7 μm ,每只动物随机选取 2 张切片,采用 HE 染色,在 OlympusBX50 型高级荧光显微镜下观察骨小梁的形态结构并照相。每只动物随机取 2 张切片,做胶原特殊染色,用图像数字分析仪测量及计算骨小梁面积百分数(%Tb.Ar)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁分离度(Tb.Sp)。

4. 统计学方法:所有数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用 SPSS 17.0 统计软件进行独立样本 t 检验或多个样本方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况:两组动物均活动自如,无精神异常,无严重疾病及死亡。实验组进食偏少,1 例动物出现注射药物侧肢体肿胀,改换肢体注射后好转,4 例出现压疮、脚趾裂伤,给予消毒、晒太阳后 1 周内愈合,对照组没有上述情况。

2. 骨密度测定结果:与对照组相比,实验前两组骨密度无统计学差异($P > 0.05$);实验组应用激素合并低钙饮食 4 周骨密度开始下降,8 周及 12 周骨密度显著性降低($P < 0.01$),8 周 T 值为 -1.76,12 周后 T 进一步降低为 -4.6,12 周骨密度低于标准差 2.5 倍,符合骨质疏松标准。骨密度测定结果见表 1。

表 1 两组犬 BMD 的比较($n = 8, \bar{x} \pm s, \text{g}/\text{cm}^2$)

组别	骨密度(BMD)			
	实验前	实验 4 周	实验 8 周	实验 12 周
对照组	0.817 $\pm$ 0.050	0.820 $\pm$ 0.058	0.820 $\pm$ 0.063	0.821 $\pm$ 0.053
实验组	0.828 $\pm$ 0.049 [#]	0.787 $\pm$ 0.048 [#]	0.709 $\pm$ 0.064 [△]	0.577 $\pm$ 0.085 [*]

两组相比,[#] $P > 0.05$;两组组间相比,[△] $P < 0.05$;两组组间相比,^{*} $P < 0.01$

3. 生化检查:实验前后两组血钙无显著性差别($P > 0.05$);实验组 4 周血磷降低($P < 0.05$),8 周及 12 周血磷进一步降低($P < 0.01$);实验 4、8、12 周实验组碱性磷酸酶均显著性升高($P < 0.01$)。生化测定结果见表 2。

4. 生物力学测定:实验第 12 周骨生物力学检查结果:实验组腰椎压缩极限载荷、极限强度和压缩模量均明显低于对照组($P < 0.01$),股骨三点弯曲极限载荷实验组低于对照组($P < 0.05$)。生物力学测定结果见表 3。

5. 组织学检查结果:显微镜下观察,见图 1,实验第 12 周骨切片实验组与对照组相比骨组织结构紊乱,骨小梁数目减少、间隔增大、断裂增多、排列不整,

表 2 两组犬血钙、血磷及 AKP 的比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别		血钙	血磷	碱性磷酸酶
		(mmol/L)	(mmol/L)	(U/L)
实验前	对照组	2.53 ± 0.15	1.35 ± 0.19	21.0 ± 4.1
	实验组	2.49 ± 0.28 [#]	1.24 ± 0.17 [#]	33.1 ± 38.3 [#]
实验 4 周	对照组	2.54 ± 0.18	1.30 ± 0.15	26.5 ± 7.3
	实验组	2.56 ± 0.16 [#]	1.48 ± 0.25 [#]	170.3 ± 92.8 [*]
实验 8 周	对照组	2.56 ± 0.20	1.28 ± 0.18	26.3 ± 8.6
	实验组	2.51 ± 0.16 [#]	1.50 ± 0.13 [△]	223.2 ± 101.1 [*]
实验 12 周	对照组	2.53 ± 0.15	1.29 ± 0.14	26.6 ± 8.7
	实验组	2.54 ± 0.19 [#]	1.63 ± 0.19 [*]	491.6 ± 245.9 [*]

两组相比, [#] $P > 0.05$; 两组组间相比, [△] $P < 0.05$; 两组组间相比, ^{*} $P < 0.01$

表 3 两组犬生物力学比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	腰椎极限	腰椎极限	腰椎压缩	股骨弯曲极限
	载荷 (kN)	强度 (MPa)	模量 (MPa)	载荷 (kN)
对照组	6.29 ± 0.31	20.42 ± 3.13	335.49 ± 31.68	1.89 ± 0.17
实验组	3.25 ± 0.38 [*]	12.57 ± 3.49 [*]	148.39 ± 52.35 [*]	1.17 ± 0.11 [△]

两组组间相比, [△] $P < 0.05$; 两组组间相比, ^{*} $P < 0.01$

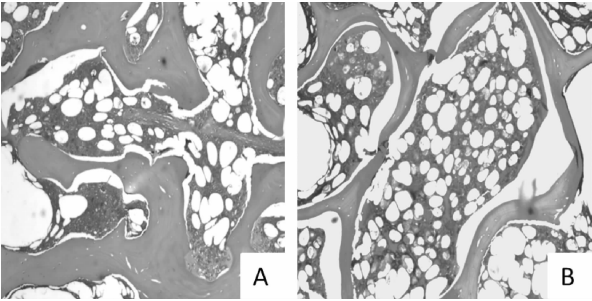


图 1 两组犬的椎体病理学检查 (HE, ×40)

A. 对照组椎体骨小梁切片检查; B. 实验组第 12 周椎体骨小梁切片检查, 骨组织结构紊乱, 骨小梁数目减少、间隔增大、断裂增多 (箭头)、排列不整, 骨髓量增加

骨髓量增加。骨组织形态计量学检测结果显示: 实验组第 12 周骨小梁面积百分数 (% , Tb. Ar)、骨小梁厚度 (Tb. Th)、骨小梁数量 (Tb. N) 较对照组显著降低 ($P < 0.01$), 骨小梁分离度 (Tb. Sp) 较对照组显著增高 ($P < 0.01$), 见表 4。

表 4 两组犬骨小梁结构比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	Tb. Th (mm)	Tb. N (1/mm)	Tb. Sp (mm)	Tb. Ar (%)
对照组	0.835 ± 0.038	2.83 ± 0.18	2.36 ± 0.19	38.47 ± 3.27
实验组	0.629 ± 0.042 [*]	2.47 ± 0.16 [*]	2.77 ± 0.22 [*]	25.91 ± 4.93 [*]

两组组间相比, [△] $P < 0.05$; 两组组间相比, ^{*} $P < 0.01$

讨 论

1. 骨质疏松动物模型概述: 据联合国预测, 到 2020 年中国 65 岁以上老龄人口将达 1.67 亿, 随着老龄化的加速, 因骨质疏松症所致的骨折呈显著上升趋势^[2]。

这些骨折的患者如果行常规手术治疗, 术后感染率、病死率及内固定物松动比例等明显高于正常人群^[1]。目前, 有许多科研工作者在对此进行研究, 如何治疗骨质疏松症及其并发症已经成为骨科的研究热点。

研究骨质疏松症需要动物模型, 动物模型常使用大鼠、小鼠、兔、猪、狗、羊及灵长目动物作为研究对象, 大鼠和小鼠作为骨质疏松动物模型研究较多, 但因为其体型小, 不适合做外科实验。大型动物中, 羊骨质疏松模型研究较为透彻, 而对于大型犬骨质疏松动物模型的研究国内外研究不多。犬性情温和、体型大、单次采血量大, 骨骼较大可以种植人工装置, 犬的皮质骨具备 Havers 系统, 骨代谢和组织结构与人类非常类似, 故本实验采用大型犬建立骨质疏松模型^[8-10]。

2. 建模方法的选择: 骨质疏松动物的建模方法分为原发性和继发性。原发性造模方法主要是去性腺造模法, 包括雌性去除卵巢法 (OVX), 雄性去除睾丸法 (ORX); 继发性造模方法包括糖皮质激素造模法、维 A 酸造模法、制动造模法、低钙饮食法等^[11]。

骨质疏松动物建模方法并不是都适合用来建立犬骨质疏松模型。犬在去势以后骨量变化不规律, 而且部分犬缺乏子宫和卵巢, 所以去性腺造模法并不能成为犬造模的首选方法^[12]; 刘和娣等^[13]在研究中发现: 应用维 A 酸造模大鼠骨灰重、骨密度均显著低于正常大鼠, 血钙、磷、ALP 变化明显, 但与人类骨质疏松时的指标不符, 维 A 酸导致大鼠骨骼软化, 而不是疏松; Fini 等^[14]研究去势法建立山羊骨质疏松模型, 建模时间长达 1 年; Ding 单用激素法建立羊骨质疏松症模型需要 3~6 个月^[15]; 低钙饮食法通常单独使用难以凑效。考虑到上述因素, 所以本实验采用糖皮质激素注射联合低钙饮食的方法。

3. 骨质疏松动物模型的诊断: 骨质疏松症以单位骨矿物质和骨基质减少和组织细微结构退变为特征, 并出现脆性增加、骨强度降低, WHO 建议根据骨密度 (bone mineral density, BMD) 或者骨矿含量 (bone mineral content, BMC) 值定义骨质疏松, 正常健康成年人的 BMD 或者 BMC 值加减 1 个标准差 (SD) 为正常值, 较正常值降低 (1.0~2.5) 标准差为骨质减少; 降低 >2.5 个标准差为骨质疏松症。

目前没有动物骨质疏松的诊断标准, 多数相关研究采用的是骨密度 (BMD) 出现显著下降, 结合生物学、组织学、血液生化等方面的变化确定模型成功建立。本文实验组应用激素合并低钙饮食 8 周及 12 周骨密度均显著性降低 ($P < 0.01$), 8 周 T 值为 -1.76,

12 周后进一步降低为 -4.6 , 实验组与对照组相比 BMD 降低 >2.5 个标准差, 符合国家通用人的骨质疏松症诊断标准。采用双能 X 线骨密度仪进行骨密度测定时, 注意消除外部环境所导致的偏差, 特别是测量活体动物时, 动物体位的变动会产生伪影, 导致实验结果出现偏差。因此, 本研究中的动物均在静脉复合麻醉下进行腰椎骨密度测定, 以消除伪影, 减少实验误差。

研究发现: 糖皮质激素可以使肠钙、磷吸收减少, 使尿钙排泄增加, 对成骨有抑制作用, 对破骨有促进作用, 导致骨盐丢失, 糖皮质激素可以使影响 PTH、 $1, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ 、性激素的分泌水平从而影响骨代谢。低钙饮食对骨代谢的影响主要是有促进破骨, 减少尿钙排泄, 最终升高血钙、血磷的作用。血钙、血磷的来源相同: 通过消化道吸收以及骨骼释放。实验组尿钙排泄增加, 主要通过骨骼释放保持血钙浓度基本正常, 故两组之间血钙无差异 ($P>0.05$)。血磷升高 ($P<0.01$) 可能为骨骼释放大于排出所致。碱性磷酸酶 (ALP) 的活性可以反映成骨活性, 血清中大约一半的 ALP 都来自骨, 成骨细胞活跃时分泌大量 ALP, ALP 参与骨钙化, 多余的 ALP 释放到血液中^[19]。笔者认为, 实验组血清 ALP 升高 ($P<0.01$) 是骨吸收亢进、成骨细胞活跃的表现。

本研究还对松质骨及皮质骨进行了生物力学的检测, 对骨质疏松模型的建立提供了生物力学依据。松质骨抗压的应力-应变曲线有其特点: 松质骨在承受压力负荷的早期出现弹性应变, 随着负荷增加, 松质骨的部分骨小梁发生断裂, 松质骨的应力开始下降, 曲线出现第 1 个峰值; 当碎裂的骨小梁逐渐填满松质骨的孔洞, 松质骨抗压能力又出现增大。本实验结果表明, 实验组骨的力学强度与骨密度均呈下降趋势, 这和微观结构骨小梁数目减少、间隔增大、断裂增多、排列不整的变化相符合。

骨组织形态计量学是用定量的方法分析骨组织结构, 能精确地测量骨组织结构和总体骨量的变化, 可作为诊断骨质疏松的依据。实验组犬骨小梁面积百分数 (% Tb. Ar) 减少 25.9%, 骨小梁数量 (Tb. N) 减少 12.7%, 骨小梁厚度 (Tb. Th) 减少 24.7% 和骨小梁分离度 (Tb. SP) 增加 13.4%, 这些指标表明骨量显著减少。

本实验从骨密度、力学实验及组织学检查等多方面证实了实验犬应用糖皮质激素结合低钙饮食 12 周后骨结构明显退变、骨量减少、骨强度下降, 出现了类似人类的骨质疏松。该模型的成功建立将为外科学实验研究提供依据, 有利于促进新的内置物和新的手

术方式的研发。

该模型不足之处是长期使用糖皮质激素会抑制免疫力, 导致动物出现压疮、感染等并发症。为了防止并发症, 应该定时让动物活动, 注意无菌操作。

参考文献

- Baddoura R, Hoteit M, Fuleihan GE. Osteoporotic fractures, DXA, and fracture risk assessment: meeting future challenges in the Eastern Mediterranean region[J]. J Clin Densitom, 2011, 14(4): 384-394
- Gardner MJ, Demetropoulos D, Shindle MK, et al. Prevention and treatment of osteoporotic fractures[J]. Minerva Med, 2005, 96(5): 343-352
- Kasperk C, Hillmeier J, Noldge G, et al. Treatment of painful vertebral fractures by kyphoplasty in patients with primary osteoporosis: a prospective nonrandomized controlled study[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(4): 604-612
- 蒋尧传, 唐志宏, 辛桂桐, 等. 老年髋部骨折的手术治疗[J]. 骨与关节损伤杂志, 2003, 18(10): 670-672
- Turner AS. Animal models of osteoporosis - necessity and limitations [J]. European Cell and materials, 2011, 22(1): 66-81
- Mitton D, Rumelhart C, Hans D, et al. The effects of density and test conditions on measured compression and shear strength of cancellous bone from the lumbar vertebrae of ewes[J]. Med Eng Phys, 1997, 19(5): 464-474
- Schorlemmer S, Ignatius A, Claes L, et al. Inhibition of cortical and cancellous bone formation in glucocorticoid-treated OVX sheep[J]. Bone, 2005, 37(4): 491-496
- Schorlemmer S, Gohl C, Iwabu S, et al. Glucocorticoid treatment of ovariectomized sheep affects mineral density structure and mechanical properties of cancellous bone[J]. J Bone Miner Res, 2003, 18(11): 2010-2015
- Aerssens J, Boonen S, Lowet G, et al. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for *in vivo* bone research[J]. Endocrinology, 1998, 139(2): 663-670
- Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery [J]. Comp Med, 2011, 61(1): 76-85
- 崔轶, 雷伟, 吴子祥, 等. 骨质疏松大动物模型的研究进展[J]. 脊柱外科杂志, 2010, 8(5): 316-320
- Turner RT, Maran A, Lotinun S, et al. Animal models for osteoporosis[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2001, 2(1): 117-127
- 刘和娣, 李星海, 佟晓旭, 等. 地塞米松与维甲酸致大鼠骨质疏松动物模型的比较[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(4): 697-699
- Fini M, Pierini G, Giavaresi G, et al. The ovariectomized sheep as a model for testing biomaterials and prosthetic devices in osteopenic bone: a preliminary study on iliac crest biopsies[J]. Int J Artif Organs, 2000, 23(4): 275-281
- Ding M, Cheng L, Bollen P, et al. Glucocorticoid induced osteopenia in cancellous bone of sheep: validation of large animal model for spine fusion and biomaterial research[J]. Spine, 2010, 35(4): 363-370

(收稿: 2011-12-04)

(修回: 2011-12-13)