

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.016

动态观察去卵巢骨质疏松大鼠股骨骨微结构的变化*

杨 涵 卜淑敏[△] 文思敏 韩天雨 许 澳

(首都体育学院 北京 100191)

摘要 目的:绝经后骨质疏松是好发于中老年女性人群中的骨代谢疾病,去卵巢骨质疏松大鼠模型是国内外通用的模拟绝经后骨质疏松发生的经典动物模型,本研究通过观察去卵巢骨质疏松大鼠股骨骨微结构的动态变化,为骨质疏松大鼠模型的临床应用提供理论参考依据。**方法:**将 90 只 3 月龄雌性 SD 大鼠按体重分层后随机分为基础组(10 只)、假手术组(40 只)和去卵巢组(40 只)。分别在手术前(基础组)和后的 3、6、12、24 周,腹主动脉取血处死基础组以及假手术组和去卵巢组大鼠,每组各 8-10 只。每组中随机取 6 只大鼠,对其左股骨行 micro-CT 扫描及三维结构重建。选择股骨远端距生长板远端 1 mm 处,2.0 mm×3.5 mm,厚 0.9 mm 的骨组织为感兴趣区域,对感兴趣区域进行骨形态计量学分析。**结果:**与 0 周组比较,从去卵巢 3 周开始一直持续到 24 周,去卵巢组大鼠股骨 vBMD、BV/TV 和 Tb.N 显著降低,Tb.Sp 和 SMI 显著升高,而 Tb.Th 无显著变化;与 0 周组比较,从假手术后 3 周开始一直到 24 周,假手术组所有检测指标均无显著变化。与同周龄假手术组比较,从去卵巢 3 周开始一直持续到 24 周,去卵巢组大鼠股骨 Tb.N、BV/TV 和 vBMD 显著降低,Tb.Sp 显著升高,而 Tb.Th 没有显著变化。从去卵巢 6 周开始一直到 24 周,去卵巢组大鼠 SMI 显著增加。**结论:**3 月龄大鼠股骨远端的骨微结构在去卵巢 3 周时就出现显著变化。提示,采用 3 月龄大鼠进行抗骨质疏松药物筛选时,去卵巢 3 周后就可以进行药物处理。

关键词:去卵巢大鼠;骨质疏松;骨微结构

中图分类号:G804.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)30-5862-05

Dynamic Change of Trabecular Bone Microarchitecture in the Ovariectomized Osteoporosis Rats*

YANG Han, BU Shu-min[△], WEN Si-min, HAN Tian-yu, XU Ao

(Capital University of Physical Education and Sports, Beijing, 100191, China)

ABSTRACT Objective: Postmenopausal osteoporosis is a kind of metabolic bone disease occurred in middle-aged women. Ovariectomized rat model is a classic animal model to simulate postmenopausal osteoporosis. The dynamic change of trabecular bone microarchitecture in the ovariectomized (OVX) osteoporosis rats is investigated in this paper. This provides a theoretical basis for the clinical application of ovariectomized rat model. **Methods:** Ninety 3-month-old Sprague-Dawley female rats were used. Forty rats underwent ovariectomy, and forty received sham surgery. Ten animals without any surgery were sacrificed at week 0 to serve as the baseline group. Eight to ten animals in both OVX and sham group, respectively, were euthanized at week 3, 6, 12 and 24 post-surgery. The femur microarchitecture was detected by micro-CT in vitro and a three-dimensional model was rebuilt. The osseous tissue, which was around 1 mm from the distal femur, was selected as the region of interest with 2.0 mm in length, 3.5 mm in width and 0.9 mm in thickness and this region was analyzed with bone morphometry. **Results:** From third week post surgery until twenty-fourth week post surgery, Micro-CT revealed the number of trabecular bone (Tb.N), the fraction of bone tissues (BV/TV), as well as the volume bone mineral density (vBMD) in distal femur of OVX group were significantly lower than that in the baseline group. Whereas the separation of trabecular bone (Tb.Sp) and the bone structure index (SMI) were significantly higher than that in the baseline group. There were no significant changes in all microstructure parameters of the sham group. The vBMD, BV/TV and Tb.N in distal femur of OVX group were significantly lower than that in the sham group with the same age, while the Tb.Sp was significantly higher than that in the sham group. From the sixth weeks until 24 weeks, the SMI of OVX group increased significantly. There was no difference in the thickness of trabecular bone (Tb.Th) during four chosen periods. **Conclusion:** The femur trabecular bone microarchitecture changed significantly from 3 weeks after OVX in 3-month female rats. The 3-month-old rats ovariectomized after 3 weeks could receive the drug intervention to screening anti-osteoporosis drugs.

Key words: Ovariectomized rats; Bone mineral density; Femur microarchitecture

Chinese Library Classification: G804.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)30-5862-05

* 基金项目:北京市教委长城学者项目(CIT&TCD20130337)

作者简介:杨涵(1989-),女,硕士研究生,主要研究方向:运动生理生化理论与应用,电话:15101082869,E-mail: yanghan@cupes.edu.cn

△ 通讯作者:卜淑敏(1967-),女,教授,博士,硕士生导师,主要从事运动医学研究,电话:010-82099207,E-mail: boshumin@163.com

(收稿日期:2014-05-10 接受日期:2014-05-30)

前言

绝经后骨质疏松症是以骨量下降,骨微结构损坏为特征的常见骨代谢疾病,好发于女性绝经后,随着社会人口的老龄化,其发病率呈逐年上升趋势^[1]。由于大鼠切除双侧卵巢后的症状与女性绝经后骨质疏松的临床症状极为相似^[2],因此,去卵巢大鼠模型常被用于评估和开发新的防治绝经后骨质疏松症的方法的研究中^[3,4]。去卵巢骨质疏松大鼠模型是1969年由 Savile 等人建立^[5],后 Wronski 等人^[6]报道,3月龄SD大鼠在术后6个月时,第一腰椎松质骨体积显著减少;Ito 等人^[7]发现,8周龄大鼠在去卵巢后4周时,右胫骨骨骺端骨质严重流失,骨体积分数和骨小梁数目明显减少,骨小梁间隙增大;而 Devareddy^[8]等人报道,6月龄大鼠在去卵巢后100天时,大鼠胫骨、股骨、第四腰椎以及全身的骨密度均降低约6%。可见,不同学者采用不同月龄大鼠得出的结果并不完全一致。那么去卵巢骨质疏松大鼠模型究竟应该采用几月龄大鼠,以及大鼠去卵巢后骨质疏松发生的进程如何?这些问题目前还不是很清楚,因此,本研究采用 micro-CT 技术,检测了大鼠去卵巢后不同时间点股骨远端松质骨微结构的变化,旨在了解去卵巢对大鼠股骨远端骨微结构影响的时空特点,为绝经后骨质疏松的防治提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及手术和分组

3月龄健康雌性未孕SD大鼠90只,体重(263.9±11.9)g,由北京维通利华实验动物中心提供及饲养(动物合格证SCXK(京)2011-0012)。自由饮水及进食,标准啮齿类动物饲料,分笼饲养。大鼠适应饲养1周后,按体重分层后随机分为基础组(10只),假手术组(40只)和去卵巢组(40只)。假手术组和去卵巢组均禁食12h,腹腔注射10%水合氯醛麻醉(3 ml/kg),去卵巢组从背部切除双侧卵巢^[9,10],假手术组只将卵巢旁与卵巢

等大的脂肪组织切除,基础组不做任何处理。分别在手术前和手术后第3、6、12、24周时,处死基础组(0)、假手术组和去卵巢组各8-10只大鼠。

1.2 样品的收集

腹主动脉取血处死大鼠。根据解剖位置分离左侧股骨并剥离干净,将左侧股骨用生理盐水浸湿的纱布包裹后,置于-80℃的冰箱待行 Micro-CT 扫描。

1.3 micro-CT

本研究使用的 Micro-CT 扫描仪为中国科学院自动化研究所分子影像研发中心自主研发的小动物 Micro-CT 扫描仪,型号为 ZKKS-MCT-Sharp。将实验材料固定于固定物上,设置电压为 60 kV,电流为 0.666667 mA,4 帧叠加(每个角度拍摄 4 张图片,在 4 张中选择最好的一张作为最后图像),角度增益 0.72°,曝光时间 400 ms,分辨率为 46 μm×46 μm×46 μm,进行扫描。扫描后得到 Prj 格式图像,将 Prj 导入软件 medproject,处理后得到 IMO 格式图像,对 IMO 图像进行重建后,将 IMO 转化为 Dicom 格式图像。得到二维图像,在感兴趣区域截图后得到图像。得到 Dicom 图像后,将 Dicom 图像的数据导入软件 Mimics,设置分割阈值为 16-162,转化后优化图像,得到三维 STL 图像。

1.4 统计学处理

实验数据采用 SPSS17.0 软件进行统计。采用单因素方差分析进行数据比较,各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为具有显著性差异, $P < 0.01$ 为具有极显著性差异。

2 结果

2.1 去卵巢大鼠体重的动态变化

由图1可知,与基础组比较,除3周假手术组以外,其余各组大鼠体重均显著增加;与同周龄假手术组比较,从去卵巢后第3周开始一直持续到24周,去卵巢组大鼠体重均显著增加。

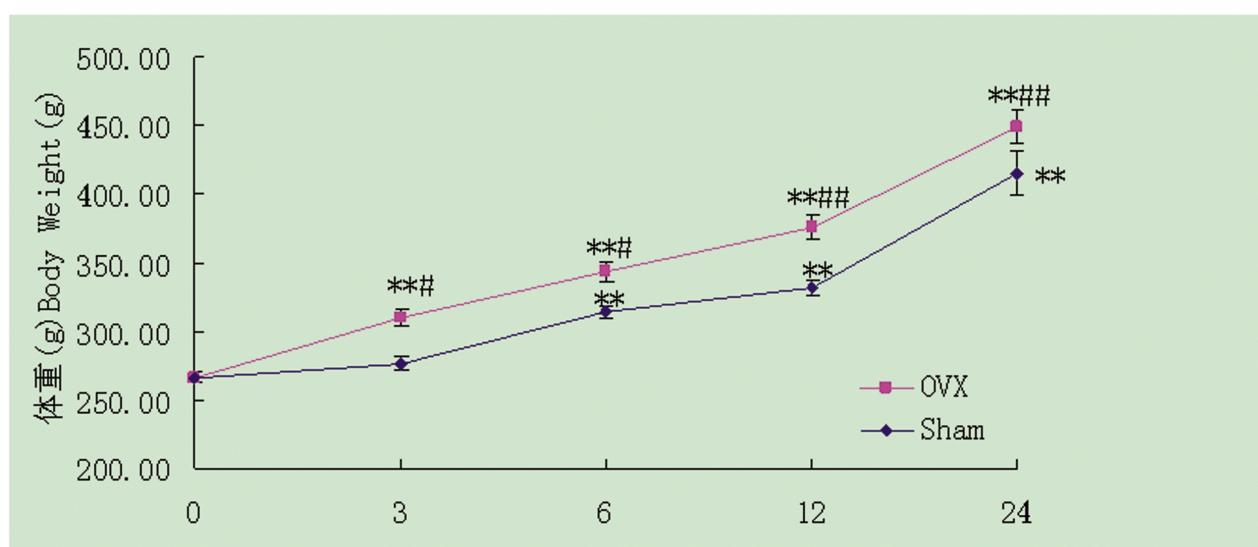


图1 去卵巢大鼠体重动态变化

Fig.1 Dynamic change of the body weight in ovariectomized rats

注:与基础组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与同周龄假手术组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the base group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with the sham group with the same age, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

2.2 各组大鼠 micro-CT 分析及三维结构重建结果

micro-CT 三维结构重建结果表明,与 0 周组比较,从去卵巢 3 周开始一直持续到 24 周,去卵巢组大鼠股骨 Tb.N、BV/TV 和 vBMD 均显著降低,Tb.Sp 和 SMI 均显著升高,而 Tb.Th 却无显著变化;与 0 周组比较,从假手术后 3 周开始一直到 24 周,假手术组所有检测指标均无显著变化。与同周龄假

手术组比较,从去卵巢 3 周开始一直持续到 24 周,去卵巢组大鼠股骨 Tb.N、BV/TV 和 vBMD 均显著降低,Tb.Sp 显著升高;从去卵巢 6 周开始一直到 24 周,去卵巢组大鼠 SMI 显著增加;从去卵巢 3 周开始一直持续到 24 周,去卵巢组大鼠股骨 Tb.Th 均无显著变化。结果见表 1。

表 1 各组大鼠股骨结构参数结果比较

Table 1 Comparison of the femur structural parameters

Groups		vBMD/mg·cc ⁻¹	BV/TV/%	Tb.N/mm ⁻¹	Tb.Sp/μm	Tb.Th/μm	SMI
0	base	551.73± 20.52	46.94± 4.29	6.99± 0.44	69.07± 10.71	74.45± 3.53	1.42± 0.33
3	Sham	532.74± 73.22	43.26± 13.54	6.54± 0.80	92.37± 35.33	82.48± 18.28	1.33± 0.81
	OVX	385.60± 48.41***	20.68± 7.37***	3.45± 0.72***	255.03± 62.38***	65.26± 10.69	2.23± 0.31**
6	Sham	552.00± 37.59	46.76± 7.76	6.19± 0.18	81.33± 20.54	87.19± 9.89	1.34± 0.26
	OVX	337.96± 52.70***	14.75± 4.98***	2.57± 0.72***	383.21± 39.79***	63.40± 3.71	2.47± 0.22***
12	Sham	542.60± 55.90	45.10± 10.76	6.20± 0.57	81.06± 25.57	81.12± 15.72	1.60± 0.33
	OVX	315.23± 20.63***	12.06± 2.08***	1.93± 0.21***	452.87± 57.10***	69.41± 4.80	2.52± 0.21***
24	Sham	529.00± 87.20	42.34± 15.68	6.12± 0.73	95.62± 57.96	76.29± 13.80	1.79± 0.29
	OVX	287.20± 34.72***	9.79± 2.08***	1.50± 0.26***	557.92± 44.84***	72.34± 4.57	2.52± 0.18***

注:与基础组比较,*P<0.05,**P<0.01;与同周龄假手术比较,#P<0.05,##P<0.01。

Note: Compared with the base group, *P<0.05, **P<0.01; Compared with the sham group with the same age, #P<0.05, ##P<0.01.

micro-CT 扫描结果表明,去卵巢 3 周时,去卵巢组大鼠股骨远端骨质密度减少,骨小梁分布变得稀疏,骨小梁数量显著减少,局部有较大的骨小梁空隙形成。到去卵巢 6 周时,骨小梁断裂继续增加,数量继续减少,一直持续到 12 周时基本稳定,与 24 周组比较,看不出明显的变化。结果见图 2 和图 3。

3 讨论

大鼠去卵巢后,雌激素缺乏,脂肪生成增多,体重迅速增加^[11]。Wei 等人^[12]发现 6 月龄大鼠去卵巢后 3 月体重有显著降低。本研究表明,与 0 周组比较,除 3 周假手术组以外,其余各组大鼠体重均显著增加。Jast 等人^[13]用高分辨率 micro-CT 扫描仪,对 3、12、32、42、60 和 72 周的雌性 SD 大鼠胫骨皮质骨三维结构扫描后发现,随周龄变化,大鼠胫骨骨微结构的变化并不明显。本实验中,从假手术后 3 周开始一直到 24 周,假手术组大鼠股骨远端骨微结构所有检测指标均无显著变化。结果表明,3 月龄大鼠在增龄过程中,虽然体重自然生长,而骨微结构已不发生显著变化。提示,3 月龄大鼠股骨的骨微结构已发育成熟稳定,不再随发育而发生显著变化,已适合建立去卵巢骨质疏松大鼠模型。

绝经后骨质疏松骨吸收和骨形成均增加,属于骨高转换型骨质疏松,骨吸收大于骨形成,导致骨量下降^[14,15]。本研究显示,从去卵巢 3 周开始,去卵巢组大鼠股骨 Tb.N、BV/TV 和 vBMD 均显著低于假手术大鼠,Tb.Sp 和 SMI 均显著高于假手术组大鼠,只有 Tb.Th 无显著变化。Ito 等人^[16]发现,8 周龄大鼠去卵巢后 4 周时,BV/TV、Tb.Th、Tb.Sp 和 SMI 均有显著变化,使骨骺端骨质严重流失,骨体积分数和骨小梁数目明显减少,而骨小梁间隙增大。与本研究结果基本一致。提示,3 月龄大鼠在去卵巢后 3 周时,股骨远端骨量就已显著下降。

有研究发现,12 周龄大鼠分别在去卵巢后 6 周和 8 周时

股骨骨密度均显著降低^[16],同时,6 月龄大鼠在去卵巢后 36 周时,胫骨和股骨的骨流失最为严重,分别为 75.0 %和 70.4 %^[17]。也有研究发现,大鼠去卵巢后 12 周,股骨骨密度、平均最大载荷、刚度、能量吸收分别比假手术低 14 %、55 %、72 %和 32 %,弹性模量降低 53 %,最大应力和最大应变分别降低 22 %和 25 %^[18]。本实验中,大鼠 vBMD、BV/TV 和 Tb.N 在去卵巢 3 周时,分别下降了 27.62 %、52.20 %和 47.25 %;在去卵巢 6 周时分别下降了 38.78 %、68.46 %和 58.49 %;在去卵巢 12 周时分别下降了 41.91 %、73.26 %和 68.87 %,在去卵巢 24 周时分别下降了 45.71 %、76.88 %和 75.49 %。提示,大鼠在去卵巢后 3 周和 6 周,骨量下降较显著,12 周之后直至 24 周,骨量持续平稳下降。可见,大鼠去卵巢后股骨骨微结构的疏松变化主要发生在去卵巢后的 3-6 周,此阶段应为动物模型防治研究选择的关键时期。

综上,3 月龄大鼠生长状况已基本稳定,适合建模。去卵巢后 3 周时,骨量就出现显著下降,并持续到 6 周,12 周后随时间推移持续平稳下降。可见,进行抗骨质疏松药物筛选时,最好在大鼠去卵巢 6 周前给予,否则会影响药效的确定。

参考文献(References)

- [1] Sipos W, Pietschmann P, Rauner M, et al. Pathophysiology of osteoporosis[J]. Wien Med Wochenschr, 2009, 159(9-10): 230-234
- [2] Lei Z, Xiaoying Z, Xingguo L. Ovariectomy-associated changes in bone mineral density and bone marrow haematopoiesis in rats[J]. Int J Exp Pathol, 2009, 90(5): 512-519
- [3] Inada M, Matsumoto C, Miyaura C. Animal models for bone and joint disease. Ovariectomized and orchidectomized animals[J]. Clin Calcium, 2011, 21(2):164-170
- [4] Nakamuta H. The ovariectomized animal model of postmenopausal bone loss[J]. Nippon Rinsho, 2004, 62(2): 759-763

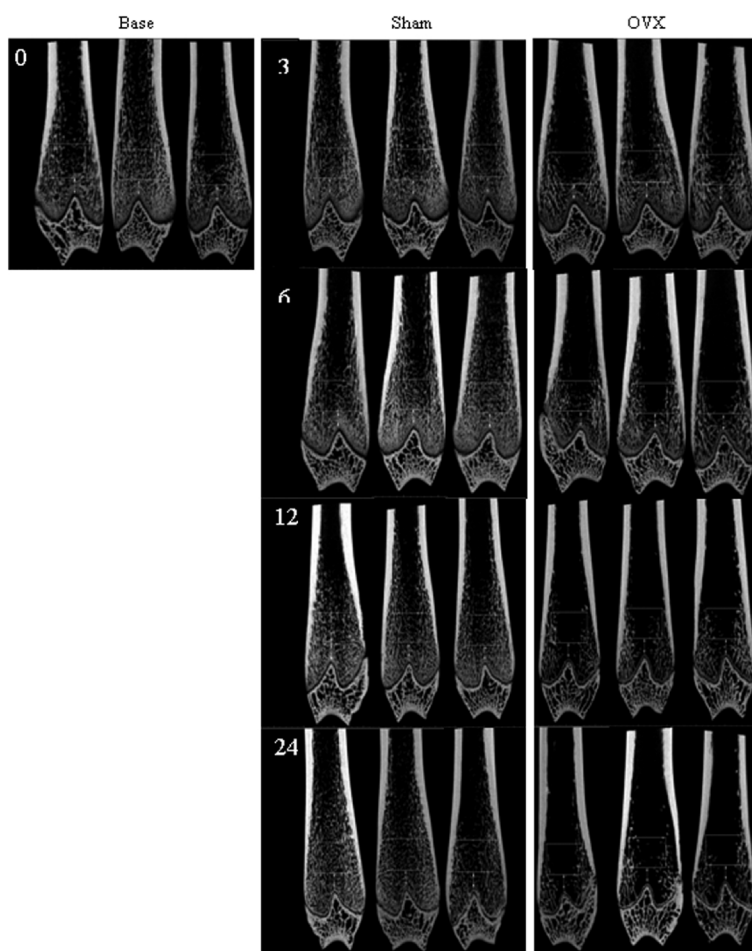


图 2 各组大鼠股骨远端骨二维结构图。

Fig.2 two-dimensional structure of the distal femur

注:每组大鼠随机取 3 只。黄色矩形框中为选取的感兴趣区域。

Note: Randomly selected 3 Rats in each group. The yellow rectangle is the area of interest (ROI).

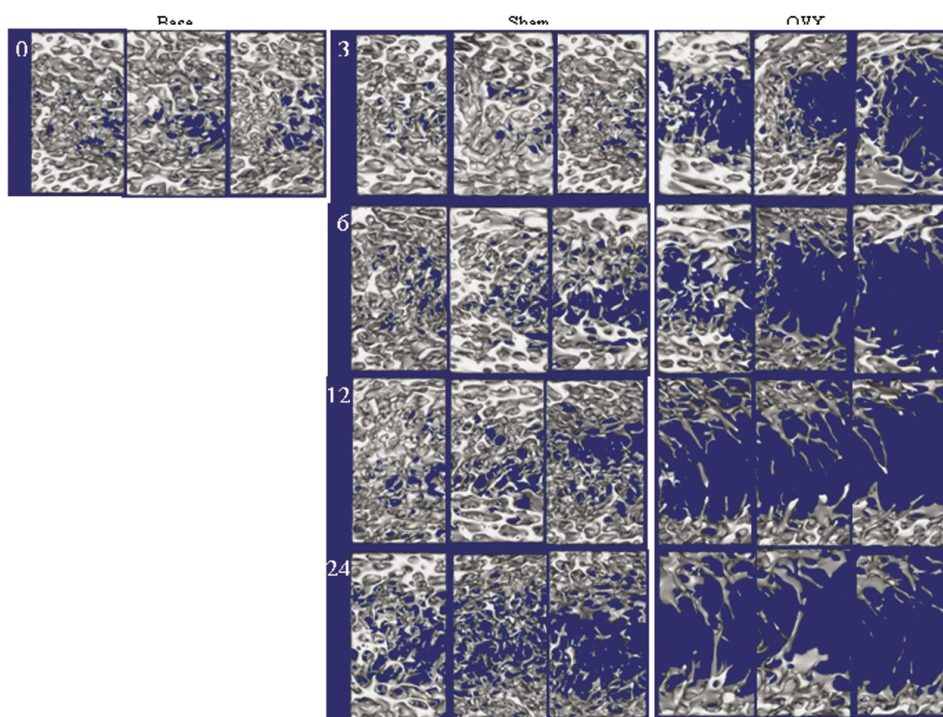


图 3 各组大鼠股骨远端松质骨感兴趣区域三维结构图

Fig.3 Three-dimensional structure of cancellous bone of the distal femur in the region of interest

- [5] 郑良朴, 李远志, 胡海霞, 等. 不同月龄大鼠去卵巢骨质疏松模型的比较[J]. 福建中医药, 2009, 40(2): 50-51
Zheng Liang-pu, Li Zhi-yuan, Hu Hai-xia, et al. Comparison of Different Age Rats in ovariectomized osteoporosis model[J]. Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine, 2009, 40(2): 50-51
- [6] Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats[J]. Bone, 1989, 10(4): 295-301
- [7] Ito M, Nishida A, Nakamura T, et al. Differences of three-dimensional trabecular microstructure in osteopenic rat models caused by ovariectomy and neurectomy[J]. Bone, 2002, 30(4): 594-598
- [8] Devedreddy L, Hooshmand S, Collins JK, et al. Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis[J]. J Nutr Biochem, 2008, 19(10): 694-699
- [9] Waynforth HB. Experimental and surgical technique in the rat[M]. New York: Academic press, 1980: 161-163
- [10] Lasota A, Danowska-Klonowska D. Experimental osteoporosis-different methods of ovariectomy in female white rats [J]. Roczniki Akademii Medycznej, 2004, 49(1): 129-131
- [11] Carl CD, Lis M, Birgit S. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution[J]. Calcified Tissue International, 1993, 52(1): 26-33
- [12] Wei QS, Huang L, Chen XH, et al. Effect of whole body vibration therapy on circulating serotonin levels in an ovariectomized rat model of osteoporosis[J]. Iran J Basic Med Sci, 2014, 17(1): 62-68
- [13] Jast J, Jasiuk I. Age-related changes in the 3D hierarchical structure of rat tibia cortical bone characterized by high-resolution micro-CT [J]. J Appl Physiol. 2013, 114(7): 923-933
- [14] Z Qiu, L Wei, J Liu, et al. Effect of intermittent PTH (1-34) on posterolateral spinal fusion with iliac crest bone graft in an ovariectomized rat model [J]. Osteoporosis International, 2013, 24 (10): 2693-2700
- [15] Lewiecki EM. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7 (11): 631-638
- [16] Sung BP, Yoon JL, Chun KC. Bone Mineral Density Changes after Ovariectomy in Rats as an Osteopenic Model: Stepwise Description of Double Dorso-Lateral Approach[J]. J Korean Neurosurg Soc, 2010, 48(4): 309-312
- [17] Liu XL, Li CL, Lu WW, et al. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture [J]. Clin Oral Implants Res, 2014, Mar 5. doi: 10.1111/clr.12360
- [18] Ulku C, Selda B, Serap Y, et al. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model[J]. Clinical Rheumatology, 2007, 2 (3): 380-384

· 重要信息 ·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001; 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN:978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法 and 应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。