

去卵巢骨质疏松症大鼠模型骨密度的变化

董培智 曹丽梅 李波*

(中国药品生物制品检定所药理室 北京 100050)

摘要: 观察 3 月龄 SD 雌鼠切除双侧卵巢 29 周内模型组和雌二醇组动物第三腰椎及股骨骨密度的变化, 同时与假手术组比较。结果表明, SD 雌性大鼠切除卵巢 9 周股骨骨密度明显低于假手术组 ($P < 0.01$), 13 周后腰椎骨骨密度也有显著差异 ($P < 0.01$), 29 周内模型稳定。皮下注射苯甲酸雌二醇 $40 \mu\text{g}/\text{kg} \times 2$ 次/周, 在 12 周能够明显提高切卵巢 SD 大鼠的股骨骨密度并使其接近正常, 16 周后第三腰椎的骨密度也能够明显提高。切卵巢骨质疏松症大鼠模型治疗性给药需要大约 9~13 周左右模型才能成功, 切除卵巢后 29 周内模型仍然稳定。

关键词: SD 大鼠; 卵巢切除术; 骨密度; 骨质疏松症; 苯甲酸雌二醇/药效学

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)06-87-04

Changes in Bone Mineral Density in Ovariectomized Rats

DONG Pei-Zhi CAO Li-Mei LI Bo

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Department of Pharmacology, Beijing 100050, China)

Abstract: The changes in Bone Mineral Density (BMD) were evaluated in female Sprague-Dawley rats that had been ovariectomized (OVX) at 3 months old. The femoral BMD of OVX rats was significantly lower than that of the sham group ($P < 0.01$) 9 weeks after OVX and the BMD of lumbar spine was significantly lower than that of the sham group ($P < 0.01$) 13 weeks after OVX. Osteoporosis was established 9 weeks after OVX and was kept till 29 weeks. When estradiol ($40 \mu\text{g}/\text{kg}$) was administrated to osteoporosis rats subcutaneously 2 times weekly 13 weeks after OVX, the femoral BMD of osteoporosis SD rats was improved significantly and the BMD value was close to that of the sham rats 12 weeks after estradiol administration. The BMD of the lumbar spine increased significantly 16 weeks after estradiol administration.

Key words: Sprague-Dawley rat; Ovariectomy; Bone mineral density (BMD); Osteoporosis; Estradiol; Pharmacology

骨质疏松症是老年人的一种常见病和多发病, 随着全球人口的老齡化, 已经越来越成为影响老年人尤其是绝经后妇女生活质量的一个严重的社会问题, 研制有效地治疗骨质疏松症的药物势在必行。但目前国内外用于药物评价的绝经后骨质疏松症大鼠模型的文献缺乏统一的标准, 预防性药物选用手术动物最小 3 月龄^[1], 最大用 12 月龄^[2], 一般在切除卵巢后 3~7 d 后开始干预, 共给药 11~13 周^[1,3-5]; 治疗性药物选用的手术动物最小 3 月龄^[6,7], 最大用 6 月龄^[8,9], 在手术后 4~12 周开始给药, 维持 4~48 周^[6-10]。只有国外的个别实验在给药之前杀检动物以验证模型是否成功^[6,7], 所以有必要对此模型大鼠的骨密度变化规律进行研

究, 以寻找合适的给药时机。本实验用雌性 SD 大鼠切除双侧卵巢所建立的绝经后骨质疏松症动物模型, 观察假手术组大鼠以及手术组大鼠骨密度的变化, 探讨模型形成的时间、合适的给药时间以及造模中应注意的事项。

* 通讯作者, E-mail: libo@nicpbp.org.cn;

第一作者介绍 董培智, 男, 30 岁, 硕士研究生; 主要从事新药药效评价方面的工作; E-mail: peizhid@tom.com.

收稿日期: 2004-06-29, 修回日期: 2004-09-10

1 材料与方法

1.1 动物 136 只 SD 雌性大鼠, 3 月龄, 体重 (237 ± 14)g。三级动物, 合格证号 SCXK11-00-0010, 购自中国药品生物制品检定所实验动物繁育中心。

1.2 药品、试剂与饲料 苯甲酸雌二醇: 2 mg/ml, 批号 000104, 由上海生化药厂生产。4℃ 保存, 用前以橄榄油稀释成所需浓度的溶液。橄榄油: 分析纯, 西班牙进口分装, 北京芳草医药化工研制公司分装, 批号: 990428。氯化钠注射液: 500 ml, 4.5 g, 北京双鹤药业股份有限公司生产, 批号: 020124512。戊巴比妥钠: 25 g, 批号: 860901, 广东佛山市化工实验厂进口分装。

^{60}Co 灭菌的大鼠生长繁殖颗粒饲料: 京动许字 (2000) 第 15 号, 含 Ca 0.8% ~ 1.8%、总 P 0.6% ~ 1.2%、VitD ≥ 600 IU/kg, 北京科澳协力饲料有限公司加工。

1.3 仪器 双能 X 线骨密度仪, LUNAR 公司生产; METTLER 260 电子天平; XY 型实验动物清洁柜, 北京实验动物学会监制, 北京文慧净化设备厂制造。

1.4 造模方法 从 136 只大鼠中取 6 只杀检作为基础值后, 其余按体重用随机区组化的方法分为假手术组和手术组两组, 假手术组 50 只, 手术组 80 只。每只大鼠用 2.5% 戊巴比妥钠 (2 ml/kg) 腹腔注射麻醉后, 沿下腹部正中打开腹腔。手术组结扎并完整切除双侧卵巢, 彻底止血后缝合腹壁; 而假手术组不切除卵巢, 仅结扎并切除卵巢附近少许脂肪组织后缝合腹壁。术后每 5 只分笼饲养在温度 20 ~ 25℃, 湿度 40% ~ 50% 的三级动物实验室中, 以日光灯光照 12 h 间隔交替进行。

1.5 饲养条件、给药途径及剂量 鼠摄食 ^{60}Co 灭菌的大鼠生长繁殖颗粒饲料和纯净水, 每 5 只一盒, 每周更换灭菌垫料两次。术后第 5 d 开始控制手术组大鼠的食量, 每日参考前一日假手术组的食量平均值, 调整手术组动物的食量。

造模第 9 周和 13 周从假手术组及手术组各随机抽取 10 只大鼠, 杀检测试骨密度变化, 验证模型是否成功。第 13 周模型成功后, 将手术组随机分成 2 组: 模型组 30 只, 雌二醇组 30 只大鼠。

假手术组、模型组大鼠每天皮下注射 2 ml/kg 0.9% 氯化钠注射液, 每周注射 5 次。雌二醇组大鼠背部皮下注射 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 苯甲酸雌二醇注射液 2 ml/kg, 每周 1、4 上午 8 ~ 10 时注射, 共 2 次。各组给药时间最长为 16 周。

1.6 骨密度测定 自给药后第 8、12、16 周 (即造模 21、25、29 周) 分别从假手术组, 模型组和雌二醇组中随机各挑选 10 只大鼠股动脉放血处死, 迅速取出右侧股骨

及第 3 腰椎, 去除表面附着的软组织, 保留骨膜、椎弓等附件, 用生理盐水浸湿的纱布包裹, 置 -80℃ 冰箱内保存, 集中用双能 X 线骨密度仪检测右侧股骨及第 3 腰椎的骨密度。单位为 g/cm^2 , 表示大鼠扫描所取区域每平方厘米含的骨矿物质质量。

1.7 体重及子宫重量 每周称动物体重一次, 在杀检处死后解剖并剥离子宫, 称重, 计算子宫系数。除假手术组外, 将其余两组大鼠的子宫系数作为判断本组动物卵巢切除干净与否、模型成立与否和其它指标特异值取舍的参考。体重另外作为给药体积的参考。

1.8 统计学处理 实验数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示, 组间差异性用 *t*-检验。

2 结果

2.1 骨密度 切除卵巢前, 切除卵巢 9、13、21 周 (即给药后 8 周)、25 周 (即给药后 12 周)、29 周 (即给药后 16 周) 大鼠的右侧股骨以及第三腰椎骨密度测定结果见图 1、2, 右侧股骨 X 光照片见图 3。

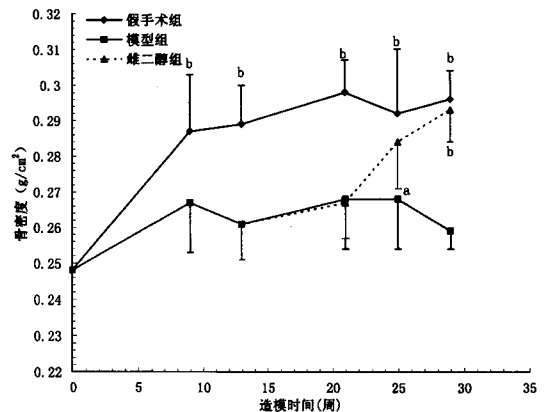


图 1 切除双侧卵巢大鼠 29 周内右侧股骨骨密度的变化 ($\bar{X} \pm S$)

与模型组骨密度作组间 *t*-检验, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

由图 1、2 可见, 模型组大鼠右侧股骨的骨密度在手术 9 周和 13 周均降低, 与假手术组比较差异显著 ($P < 0.01$), 其腰椎的骨密度在手术后 13 周也明显降低 ($P < 0.01$)。提示 SD 雌鼠去卵巢 9 ~ 13 周后骨质疏松症病理模型复制成功。

此后, 模型组大鼠股骨和腰椎的骨密度除手术 21 周略有上升外, 其余时间点呈下降的趋势, 与假手术组比较, 差异均非常显著 ($P < 0.01$)。雌二醇组大鼠股骨骨密度在给药第 12 周 (即造模 25 周) 和 16 周 (即造模 29 周) 显著高于模型组 (分别 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 其腰椎骨密度在第 16 周也显著高于模型组 ($P < 0.01$)。

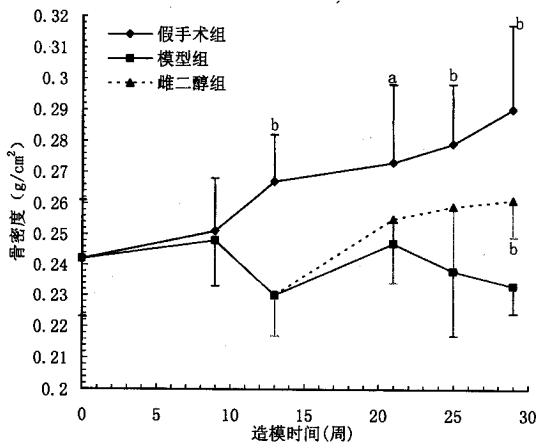


图2 切除双侧卵巢大鼠29周内第三腰椎骨密度的变化 ($\bar{X} \pm S$)

与模型组骨密度作组间 *t*-检验, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

另由图3切除卵巢29周后股骨的X光照片也可以观察到各组之间骨密度的差别。

2.2 子宫及体重 造模29周后模型组大鼠中有2只大鼠子宫与假手术组的差别不大,剔除这2只手术不成功的大鼠,各组动物的体重、子宫重量和子宫系数如表1所示。

结果显示,在29周内模型组大鼠的体重比假手术

表1 大鼠切除双侧卵巢29周后的体重和子宫重量 ($\bar{X} \pm S$)

组别	给药剂量	动物数(只)	体重(g)	子宫重(g)	子宫重/ 体重(g/kg)
假手术组	生理盐水 2 ml/kg × 5次/周	10	363.3 ± 59.3 ^a	0.894 ± 0.133 ^c	2.495 ± 0.397 ^e
模型组	生理盐水 2 ml/kg × 5次/周	8	444.4 ± 49.2	0.127 ± 0.026 ^b	0.283 ± 0.041 ^b
雌二醇组	40 μg/kg × 2次/周	10	343.3 ± 40.9 ^c	0.719 ± 0.149 ^{a,b}	2.145 ± 0.617 ^c

与假手术组作组间 *t*-检验, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与模型组作组间 *t*-检验, c: $P < 0.01$

3 讨论

手术造模时大鼠月龄选择可能影响模型的形成时间,国外治疗性药物造模一般选用3~3.5月龄的大鼠^[6,7,10],本实验亦选用3月龄SD大鼠。从实验结果来看,造模9周后模型大鼠的股骨以及第3腰椎的骨密度逐渐呈下降趋势。

饲料中所含钙、磷以及维生素D均会影响到骨密度的变化,所以本实验用的是标准的大鼠生长繁殖颗粒饲料,其钙、磷以及维生素D的含量标示值为Ca 0.8%~1.8%、总P 0.6%~1.2%、Vit D ≥ 600 IU/kg。但是仅通过控制手术大鼠的摄食量不能完全消除手术大鼠和假手术大鼠之间的体重差别。另外,考虑到光照和注射雌激素的时间可能要影响到大鼠体内一些激素的变化,实验中所有大鼠在三级动物实验室中饲养,光



假手术组 模型组 雌二醇组

图3 大鼠切除双侧卵巢29周后股骨X光照片

组大鼠的体重明显提高,虽然限制手术大鼠的摄食量,仍不能完好地控制其体重增加(数据未列出)。雌二醇组大鼠体重开始给药时略有降低,以后增加缓慢,在试验结束前与假手术组相近(表1)。

造模29周后假手术组和雌二醇组大鼠的子宫重以及子宫系数比模型组大鼠明显高,差异非常显著($P < 0.01$);雌二醇组与假手术组比较只有子宫重量显著低($P < 0.05$),其它两项指标没有明显差别。

照条件是每日12h交替日光灯照明,给药时间也固定在上午8~10时以尽量减少这些条件的影响。

骨密度测定结果提示SD雌鼠去卵巢9~13周左右骨质疏松症病理模型能够复制成功,但腰椎骨密度降低可能要比股骨骨密度变化较慢,所以建议在进行有潜在治疗腰椎骨质疏松和骨折药物的实验时要适当将给药时间推后至13周左右。给药期间,模型组大鼠股骨和腰椎的骨密度与假手术组比较,差异非常显著($P < 0.01$),皮下注射40 μg/kg × 2次/周苯甲酸雌二醇12~16周能使得大鼠的股骨和腰椎骨密度恢复和接近假手术组大鼠的,提示在给药结束即造模29周模型仍然成立。

给药16周后假手术组和雌二醇组大鼠的子宫重以及子宫系数比模型组动物的明显增加($P < 0.01$);雌二醇组与假手术组比较只有子宫重量显著低($P < 0.05$),

但经过体重校正后两组动物的子宫系数没有明显差别。其原因是切除卵巢后雌激素分泌减少,子宫萎缩。提示切除卵巢的手术是成功的。模型组大鼠体重比假手组的明显增加,与文献报道一致^[9],推测原因可能是大鼠切除卵巢后雌激素水平降低,影响机体激素平衡调节,进而改变物质代谢的结果。

文献报道观察模型成功与否要测定体内雌激素水平,比较准确,但要用放免的方法,要求具备一定的仪器和技术^[5],而且存在潜在的放射性污染等问题,实验成本也高。本实验用子宫称重的办法,操作简便,也较直观准确。

参 考 文 献

- [1] 邓伟民,韦蒿,贺杨淑等.补肾壮骨中药对去势雌性大鼠骨丢失的影响.广州中医药大学学报,2000,17(3):233~234.
- [2] 徐叔云,卞如濂,陈修主编.药理实验方法学(第三版).北京:人民卫生出版社,2002,1560~1561.
- [3] 邵敏,杜莹,庄洪等.骨康防治去势大鼠骨质疏松的实验研究.中国骨质疏松杂志,1999,5(2):67~69.
- [4] 王学娅,戴力明,韩键等.龟地散与钙剂对去卵巢大鼠骨重、骨密度、骨强度的影响.中国骨质疏松杂志,2000,6(1):74~77.
- [5] 邵敏,刘庆思,庄洪等.补肾中药对骨质疏松大鼠性激素影响的实验研究.中国骨质疏松杂志,1999,5(4):23~26.
- [6] Charlotte H, Thomas J, Jody E, *et al.* The positive effect of parathyroid hormone on femoral neck bone strength in ovariectomized rats is more pronounced than that of estrogen or bisphosphonates. *Endocrinology*, 1994, 134(2):650~657.
- [7] Liu Z, Naoto Endo, Noriaki Yamamoto, *et al.* Effects of single and concurrent intermittent administration of human PTH (1-34) and incadronate on cancellous and cortical bone of femoral neck in ovariectomized rats. *Tohoku J Exp Med*, 1998, 186:131~141.
- [8] 夏维波,孟迅吾,邢小平等.阿法骨化醇对去卵巢大鼠骨质疏松症防治作用的实验研究.中华医学杂志,2000,80(9):702~705.
- [9] 黄遂柱,戴尅戎,姜立本等.重组人生长激素对卵巢切除大鼠松质骨的影响.中华骨科杂志,2000,20(11):685~688.
- [10] Eva S, Iwaniec U T, Cullen DM, *et al.* Maintenance of cortical bone in human parathyroid hormone (1-84)-treated ovariectomized rats. *Bone*, 2001, 28(3):251~260.