

去卵巢法骨质疏松树鼯模型的建立

王运林¹, 匡德宣², 马朝霞³, 王娅娟³, 张利东³, 高斌³, 徐显鑫⁴, 胡敏^{3*}, 段宜强^{1*}

(1. 贵州医科大学, 贵阳 550025; 2. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心, 昆明 650118;
3. 昆明学院, 昆明 650214; 4. 昆明医科大学, 昆明 650500)

【摘要】目的 采用手术双侧卵巢去势法复制人绝经后骨质疏松树鼯模型。**方法** 100 只雌性树鼯纳入实验, 参照中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会 2011 年发布的《原发性骨质疏松症临床诊疗指南》(以下简称《指南》) 诊断标准进行模型评价: ① 根据人自然寿命、性成熟时间、骨密度(BMD) 峰值年龄及树鼯自然寿命、性成熟时间, 推测树鼯 BMD 峰值月龄。随机抽取 6、12、18、24 月龄树鼯各 6 只行全身 BMD 检测, 比较各月龄段 BMD 差异, 验证树鼯 BMD 峰值月龄; ② 从余下的树鼯中随机抽取 BMD 峰值月龄段树鼯 62 只行 BMD 检测, 确定树鼯 BMD 峰值均数与标准差。然后将其随机分为模型组($n=32$) 与空白组($n=30$), 模型组手术切除双侧卵巢, 空白组切除与卵巢等体积的大网膜, 各组分别于术后 3、6、9、12 月时随机抽取 6 只行 BMD 检测, 对 BMD 值符合《指南》诊断标准者取材行病理检测验证。**结果** ① 6、12、18、24 月龄段受测树鼯 BMD 峰值分别为 (0.138 ± 0.012) 、 (0.143 ± 0.010) 、 (0.141 ± 0.009) 、 (0.139 ± 0.009) g/cm², 各月龄树鼯 BMD 峰值差异无显著性($P>0.05$); ② 树鼯 BMD 峰值均数为 (0.143 ± 0.016) g/cm²; ③ 模型组各时相点 BMD 值符合《指南》诊断标准的树鼯的数量分别为 0、5、4、5 只, 其胫骨近端病理切片与 6 月龄树鼯比较: 骨小梁稀疏、断裂, 小梁间距增宽; 空白组各时相点 BMD 值符合《指南》诊断标准的树鼯数量均为 0, 其胫骨近端病理切片与 6 月龄树鼯比较无异常。**结论** 按《指南》诊断标准判断, 6 月龄雌性树鼯行双侧卵巢去势术后 6 月可复制出人绝经后骨质疏松模型, 造模成功率较高, 模型稳定。

【关键词】 树鼯; 卵巢切除术; 骨质疏松; 骨密度; 石蜡病理检查

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0562-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.06.003

Establishment of an osteoporosis model in tree shrews by bilateral ovariectomy

WANG Yun-lin¹, KUANG De-xuan², MA Zhao-xia³, WANG Ya-juan³, ZHANG Li-dong³,
GAO Bin³, XU Xian-xin⁴, HU Min^{3*}, DUAN Yi-qiang^{1*}

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Center of Tree Shrew Germplasm Resources,
Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118;
3. Kunming University, Kunming 650214; 4. Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】 Objective To establish an osteoporosis model in tree shrews by bilateral ovariectomy. **Methods** One hundred healthy 6-24 month old female tree shrews were used in this study. The diagnosis and treatment of osteoporosis in the model tree shrews was assessed according to the Interpretation of the Clinical Practice Guidelines for Primary Osteoporosis 2011 released by the Chinese Medical Association of Osteoporosis and Bone Mineral Salt Disease Branch. ① According to the human natural life span, sexual maturation time and peak bone mineral density (PBMD) and the tree shrew natural life span and sexual maturation time, we estimated the PBMD of tree shrew in the age of months. Six 6-, 12-, 18-

【基金项目】 国家科技支撑计划项目子课题(2014BAI01B01)。

【作者简介】 王运林(1988-), 男, 硕士生, 研究方向: 骨关节, E-mail: 185281780@qq.com。

【通讯作者】 段宜强, 副主任医师, 研究方向: 骨关节, 手显微, E-mail: 784853938@qq.com。

胡敏, 教授, 主要研究方向: 骨科基础与临床, E-mail: 576794680@qq.com。

and 24-month old tree shrews in each group were randomly taken for measurement of BMD, and compared the differences between groups to verify the PBMD age of tree shrews. ② We chose 62 6-month old tree shrews from the rest of tree shrews to measure their BMD to determine the mean and standard deviation of BMD. Then we divided them into study group ($n = 32$) and control group ($n = 30$). Bilateral ovariectomy was performed in the study group, while omentectomy was done in the control group. BMD was measured at 3, 6, 9, 12 months after the surgery, 6 animals from each group. The animals which met the criteria of guideline were taken for pathological examination. **Results** ①The PBMD of 6-, 12-, 18-, 24-month old tree shrews was 0.138 ± 0.012 , 0.143 ± 0.010 , 0.141 ± 0.009 , and 0.139 ± 0.009 g/cm², respectively, showing no significant differences among them ($P > 0.05$). ②The mean PBMD of the tree shrews was 0.143 ± 0.016 g/cm². ③ In the model groups, the number of tree shrews whose BMD met the criteria of guideline was 0, 5, 4, 5, respectively. The pathological examination of the proximal tibia from the model group showed sparse and some disrupted trabeculae and enlarged inter-trabecular space. In the control group, the tibia tissues showed normal histology of bone structure and no one tree shrew showed a BMD value which met the criteria of diagnosis of osteoporosis. **Conclusions** An osteoporosis model in tree shrews can be established at 6 months after bilateral ovariectomy, showing similar manifestation of osteoporosis in postmenopausal women. The success rate of this modeling method is high and the model is stable.

【Key words】 Tree shrew; Ovariectomy; Osteoporosis; Bone mineral density; Pathology

目前,用于骨质疏松(osteoporosis, OP)造模的动物有:大鼠、兔、犬、羊和非人灵长类动物等^[1-3], OP 模型中广泛使用的动物是大鼠,但大鼠缺乏哈弗氏系统^[4];兔具有哈弗氏系统,但松质骨含量少,对检测带来一定困难^[5];犬的雌激素分泌水平明显低于人类,卵巢和子宫切除不会诱发明显的骨丢失^[6]。非人灵长类动物可较好地复制人类 OP 模型,但饲养困难、体型大、成本高、实验周期长,因而使用受到限制^[7]。故采用上述动物复制的人类 OP 模型均存在一定不足。云南省重点开发的实验动物树鼩是攀鼩目树鼩科动物,其大拇指(趾)与其他指(趾)分开、胫骨与腓骨独立、牙齿具有前臼齿等特征;月经周期为 $(26.5 \pm 8.3) \text{ d}$ ^[8],与人相似;全基因组测序发现其比小鼠、大鼠、犬等与人有更高的同源性^[9],与目前常用的非人灵长类动物相比,具有体型小,易于饲养,繁殖率高,成本低等优点,适合于人绝经后 OP 模型的研究。本研究采用手术双侧卵巢去势法复制绝经后 OP 树鼩模型,拟为 OP 的研究提供新型动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

盐酸塞拉嗪注射液($1.5 \times 10^{-3} \text{ L}; 0.03 \text{ g}$, 圣鑫);盐酸苯噻唑注射液($2 \times 10^{-3} \text{ L}; 0.03 \text{ g}$, 圣鑫);双能 X 线骨密度测量仪(Prodigy Advance 型,美国 GE-Lunar 公司);显微镜(Nikon Eclipse Ci-E, 日本);电脑超薄切片机(KD-3358, Kedee)。

1.1.2 实验动物

100 只滇西亚种雌性树鼩,体重(128.603 ± 5.997)g,6~24 月龄,实验所用树鼩均由中国科学院生物医学研究所提供【SCXK(滇)K2013-0001】;实验在昆明学院分子医学研究中心【编号:SYXK(滇)K2014-0002】进行。运输应激反应及麻醉意外共死亡 14 只。

1.2 方法

1.2.1 确定滇西亚种雌性树鼩 BMD 峰值均数与标准差

(1)确定滇西亚种雌性树鼩 BMD 峰值取样个体月龄:根据中国女性性成熟年龄 18 岁^[10],女性人均期望寿命 76.7 岁^[11],女性 BMD 峰值年龄 30 岁左右^[12];雌性树鼩性成熟年龄 6 月,与雌性树鼩自然寿命 8~12 岁^[13];推算树鼩 BMD 峰值月龄。

(2)抽样验证滇西亚种雌性树鼩 BMD 峰值:随机抽取 6、12、18、24 月龄雌性树鼩各 6 只行 BMD 检测, LSD-t 检验比较不同月龄树鼩间的 BMD 峰值差异,验证滇西亚种雌性树鼩 BMD 峰值适宜的取样月龄。

(3)确定本研究中滇西亚种雌性树鼩 BMD 峰值均数与标准差:随机抽取 BMD 峰值月龄雌性树鼩 62 只行 BMD 检测,计算其均数与标准差,以此作为滇西亚种雌性树鼩 BMD 峰值均数与标准差。

1.2.2 造模动物与分组

随机选取适龄 BMD 峰值月龄雌性树鼩 62 只,随机分为模型组($n = 32$)与空白组($n = 30$)。臀肌注射盐酸塞拉嗪注射液(注射剂量: $0.2 \times 10^{-3} \text{ L}/100 \text{ g}$)麻醉后,无菌条件下取腹正中切口,进入腹腔。模型组动物均切除双侧卵巢,空白组动物均切

除与卵巢等体积的大网膜。术后立即注射盐酸苯噻唑注射液(注射剂量: 0.4×10^{-3} L/100 g),保温,常规饲养,严密观察进食、活动、掉毛、患病以及死亡情况,并记录。两组动物均于术前、术后 3、6、9、12 个月各随机抽取 6 只行 BMD 检测;BMD 值符合《指南》^[14]诊断标准者即时取材病理检测。

1.2.3 检测方法

(1)骨密度(BMD)检测:测量参数:电压 76.0 kV;电流 0.150 mA;时间 63 s;辐射剂量 0.20 mrem。

(2)骨组织形态学观察:实验动物臀肌注射大量盐酸塞拉嗪注射液安乐死后,取右侧胫骨近端 0.2 cm 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,磷酸盐缓冲液冲洗后再置于 25% 甲酸中浸泡脱钙,3 d 后取出脱水。石蜡切片、苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察骨组织形态。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 20.0 软件对所得数据进行单因素方

表 1 62 只 6 月龄雌性树鼩 BMD (g/cm²) 值

Tab.1 The value of BMD from 62 6-month-old female tree shrews (g/cm²)

ID	BMD	ID	BMD	ID	BMD	ID	BMD	ID	BMD	ID	BMD
1	0.130	12	0.145	23	0.147	34	0.170	45	0.163	56	0.126
2	0.137	13	0.143	24	0.148	35	0.161	46	0.159	57	0.117
3	0.134	14	0.129	25	0.159	36	0.168	47	0.157	58	0.115
4	0.133	15	0.155	26	0.161	37	0.142	48	0.130	59	0.128
5	0.125	16	0.144	27	0.152	38	0.155	49	0.134	60	0.138
6	0.132	17	0.161	28	0.112	39	0.166	50	0.132	61	0.122
7	0.138	18	0.154	29	0.169	40	0.158	51	0.149	62	0.133
8	0.137	19	0.138	30	0.114	41	0.164	52	0.116		
9	0.153	20	0.126	31	0.165	42	0.164	53	0.132		
10	0.140	21	0.141	32	0.165	43	0.168	54	0.154		
11	0.142	22	0.134	33	0.125	44	0.164	55	0.120		

$\bar{x} = 0.143$ $s = 0.016$ $\bar{x} - 2.5s = 0.103$

2.3 造模结果

2.3.1 造模动物的 BMD 检测结果

两组树鼩 BMD 值随时间变化情况见图 1,模型组 BMD 逐渐降低,6 个月时最明显,且一直持续到 12 月;空白组在正常范围内波动。按《指南》标准判断(骨密度降低程度等于和大于同性别、同种族正常成人的骨峰值 2.5 个标准差为骨质疏松),双侧卵巢去势术后 3、6、9、12 个月时成模树鼩数量分别为 0、5、4、5 只,造模成功率分别为 0%、83%、66%、83%;空白组各时相点 BMD 值符合《指南》诊断标准的树鼩数量均为 0,见表 3。

差分析,计算结果以($\bar{x} \pm s$)形式表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 树鼩的一般状况

造模前及空白组树鼩毛发光洁,活动体态正常;模型组逐渐出现反应迟钝,活动迟缓,毛色无光泽、稀疏、脱落。

2.2 确定本研究滇西亚种雌性树鼩 BMD 峰值

推算出滇西亚种雌性树鼩 BMD 峰值月龄为 10.8 月;6、12、18、24 月龄段受测树鼩 BMD 峰值分别为(0.138 ± 0.012 、 0.143 ± 0.010 、 0.141 ± 0.009 、 0.139 ± 0.009) g/cm²,6、12、18、24 月龄段雌性树鼩 BMD 峰值差异无显著性($P > 0.05$);62 只 6 月龄雌性树鼩 BMD 值为(0.143 ± 0.016) g/cm²,见表 1;据此确定本研究中滇西亚种雌性树鼩 BMD 峰值为(0.143 ± 0.016) g/cm²。

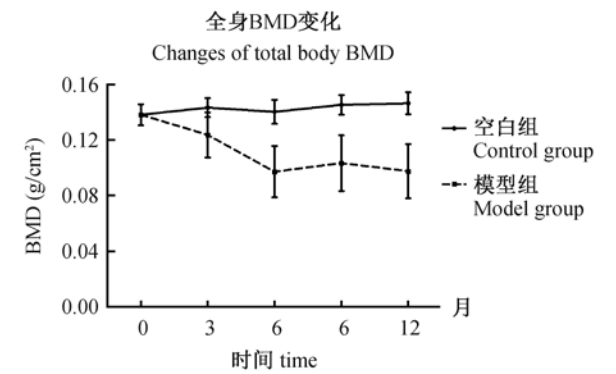


图 1 各时相点树鼩全身 BMD 变化

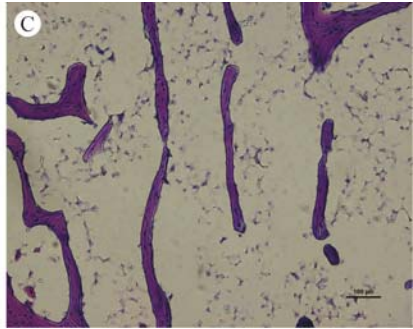
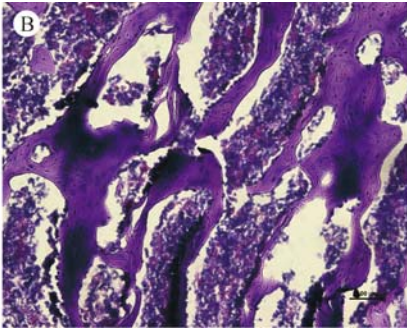
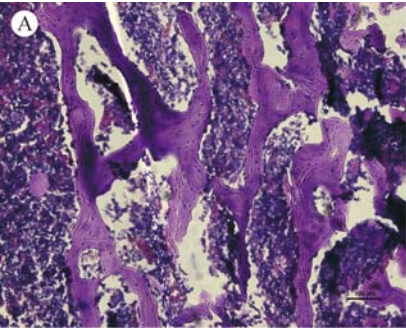
Fig. 1 Changes of total body BMD of the tree shrews at different time points

表 2 各时相点造模结果($n=6$)

Tab. 1 The results of modeling at different time points

组别		0 月	3 月	6 月	9 月	12 月
模型组	A	5/6	2/6	0/6	0/6	0/6
	B	1/6	4/6	1/6	2/6	1/6
	C	0/6	0/6	5/6	4/6	5/6
空白组	A	6/6	5/6	4/6	4/6	5/6
	B	0/6	1/6	2/6	2/6	1/6
	C	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

注: A. 正常; B. 骨量减少; C. 骨质疏松症。
Note. A: Normal; B: Osteopenia; C: Osteoporosis



注: A. 造模前; B. 空白组 6 月; C. 模型组 6 月(BMD 降低 $\geq 2.5 s$)。

图 2 树鼩胫骨近端病理切片 HE 染色观察($\times 100$)

Note. A. Before modeling; B. Control group, 6 months; C. Model group, 6 months. (BMD decreased more than 2.5 s)

Fig. 2 Histological changes of the proximal tibia of tree shrews (HE staining, $\times 100$)

3 讨论

骨质疏松患病率随着人口老龄化而逐年增加^[15]。目前我国 OP 患者近 7000 万人,其中绝经后 OP 患者约占 80%,且发病机理尚不完全清楚,现有防治策略效果有限^[16]。动物模型是进行绝经后 OP 基础与临床研究的基础^[17]。双侧卵巢去势法是最常用的研究绝经后 OP 的造模方法,其优点是可较好地模拟绝经后 OP 的病理生理状态,造模成功率高、稳定性可靠、重复性好、适用范围广^[18]。本研究证实了采用手术双侧卵巢去势法复制人类 OP 树鼩模型,具有较高的成模率;动物成模后动态监测 BMD 提示此 OP 模型具有较好的稳定性。

评价 OP 动物模型的指标主要有 BMD、超微螺旋 CT、骨组织形态学、生化指标和生物力学等,其中双能 X 线吸收法是诊断 OP 的“金标准”^[19],骨组织形态学检测可直观地观测与评价 OP 的程度。故本研究采用 BMD 与骨组织形态学相结合的方法评价 OP 树鼩模型,两种检测方法互为补充,结果吻合度高,方便快捷,可较好满足本研究实验设计需求。

目前文献常以造模后相同时相点模型组与空白组 BMD 值的差异是否具有统计学意义为评价 OP 动物模型的标准,其优点是实验体系相对封闭,直接

2.3.2 光镜观察结果

普通光镜 100 倍下观察,6 月龄雌性树鼩骨小梁排列均紧密,小梁宽厚、间距小,小梁之间连接丰富,骨髓细胞多,脂肪空泡少。造模后 6 个月时,空白组与造模前比较无明显差异;模型组骨小梁数量显著减少,排列稀疏,小梁断裂,骨髓细胞减少,脂肪空泡多,与造模前及空白组相比较差异有显著性,见图 2。

进行模型组与空白组之间的比较,方便快捷;缺点是结果判断以参照组的 BMD 值为标准而非以种群的 BMD 峰值为标准,设计理念与《指南》规定的人类临床诊断标准不尽相符。本研究中,组织学检测结果证明参照《指南》标准评价树鼩 OP 模型可较好地反映 OP 的疾病特征。

以《指南》诊断标准为依据,以 BMD 与组织学检测为主要评价手段,6 月龄雌性树鼩行双侧卵巢去势术后 6 个月能成功建立 OP 模型,且具有造模成功率高、模型稳定的优点。由于树鼩是近年开始发展的实验动物,尚缺乏必要的基础数据,遗传背景不完全清楚,尚未标准化规模化饲养,可纳入实验的树鼩数量过少,因而本研究结果尚缺乏广泛的代表性。

参 考 文 献

[1] 张月峰, 韩景献. 骨质疏松动物模型研究进展 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(3): 8-11.
[2] 徐洪璋, 余斌. 骨质疏松症动物模型研究现状 [J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(1): 47-50.
[3] 丁桂芝, 周勇. 骨质疏松症研究中动物模型的选择与应用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3(3): 84-88.
[4] Ke HZ. Animal models for osteoporosis research [J]. Bone, 2010, 47(Suppl 3): 349-350.
[5] 廖慧娟, 廖二元. 骨质疏松症动物模型 [J]. 国外医学内分

- 泌学分册, 2004, 24(1): 60-62.
- [6] 李素萍. 骨质疏松动物模型的研究现状 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20): 3767-3770.
- [7] Jerome CP, Peterson PE. Nonhuman primate models in skeletal research [J]. Bone, 2001, 29(1): 1-6.
- [8] 吴强, 刘棒深, 刘玲玲, 等. 树鼩血浆生殖激素初步研究 [J]. 上海实验动物科学, 1989, 9(3): 140-141.
- [9] Yu F, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nature Comm, 2013, 4(2): 66-78.
- [10] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学 [M]. 第八版. 中国: 人民卫生出版社, 2013: 14.
- [11] Khalid M. Human Development Report 2014 [M]. USA, The United Nations Development Programme, 2014: 177.
- [12] 全国十三省市骨矿含量调查合作组. 骨骼生长衰老规律和原发性骨质疏松症预诊的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 1995, 1(1): 1-7.
- [13] Hubrecht R, Kirkwood J. The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals; Tree shrew [M]. Eighth Edition. Singapore: Robert Hubrecht and James Kiskwood, 2009: 262-275.
- [14] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南(2011 年) [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(1): 2-17.
- [15] Rejmanster JY, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence [J]. Bone, 2006, 38(2): 4-9.
- [16] 吴海洋, 索欢, 王平. 绝经后骨质疏松症的临床中药治疗进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(2): 241-244.
- [17] Turner AS. Animal models of osteoporosis — necessity and limitation [J]. Eur Cells Mat, 2001, 1: 66-81.
- [18] 程群, 朱汉民. 建立骨质疏松动物模型的标准化问题 [J]. 老年医学与保健, 2003, 9(2): 122-124.
- [19] Link TM. Osteoporosis imaging: state of the art and advanced Imaging [J]. Radiology, 2012, 263: 3-17.

[收稿日期] 2015-09-24

(上接第 561 页)

- [8] Zhao S, Lin L, Kan G, et al. High autophagy in the naked mole rat may play a significant role in maintaining good health [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(2): 321-332.
- [9] 林丽芳, 赵懿宁, 赵善民, 等. 裸鼹鼠与 C57BL/6 小鼠自噬调节的比较研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(4): 301-305.
- [10] 林丽芳, 赵善民, 肖邦, 等. 裸鼹鼠成纤维细胞原代培养方法的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(6): 481-486.
- [11] Zhao S, Luo H, Kan G, et al. The protective role of autophagy in *Heterocephalus glaber* hepatic stellate cells exposed to H_2O_2 or nutritional stress [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(2): 463-473.
- [12] Luo S and Rubinshtein DC. Apoptosis blocks *Beclin 1*-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by *Bcl-xL* [J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 268-277.
- [13] Liu J, Xia H, Kim M, et al. *Beclin1* controls the levels of *p53* by regulating the deubiquitination activity of *USP10* and *USP13* [J]. Cell, 2011, 147(1): 223-234.
- [14] Hou YJ, Dong LW, Tan YX, et al. Inhibition of active autophagy induces apoptosis and increases chemosensitivity in cholangiocarcinoma [J]. Lab Invest, 2011, 91(8): 1146-1157.
- [15] Ren Y, Huang F, Liu Y, et al. Autophagy inhibition through *PI3K/Akt* increases apoptosis by sodium selenite in NB4 cells [J]. Bmb Reports, 2009, 42(9): 599-604.
- [16] 邵月, 胡玉玺, 杜纪锋, 等. *p53* 信号稳态调节线粒体能量代谢延缓衰老的运动适应 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(22): 2966-2968.
- [17] Hastay P and Vijg J. Accelerating aging by mouse reverse genetics: a rational approach to understanding longevity [J]. Aging Cell, 2004, 3(2): 55-65.
- [18] Rodier F, Campisi J, and Bhaumik D. Two faces of *p53*: aging and tumor suppression [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(22): 7475-7484.
- [19] Jiang LC, Huang SY, Zhang DS, et al. Expression of *Beclin 1* in primary salivary adenoid cystic carcinoma and its relation to *Bcl-2* and *p53* and prognosis [J]. Braz J Med Biol Res, 2014, 47(3): 252-258.
- [20] Furuya N, Yu J, Byfield M, et al. The evolutionarily conserved domain of *Beclin 1* is required for *Vps34* binding, autophagy and tumor suppressor function [J]. Autophagy, 2005, 1(1): 46-52.
- [21] Zhang W, Li Q, Song C, et al. Knockdown of autophagy-related protein 6, *Beclin-1*, decreases cell growth, invasion, and metastasis and has a positive effect on chemotherapy-induced cytotoxicity in osteosarcoma cells [J]. Tumour Biol, 2015, 36(4): 2531-2539.

[收稿日期] 2015-11-15