

# 六月龄大鼠去卵巢后建立骨质疏松症模型的可行性★

郭峰, 李正南, 刘晋平, 朱江涛

## Feasibility of establishing an animal model of osteoporosis in ovariectomized rats aged 6 months

Guo Feng, Li Zheng-nan, Liu Jin-ping, Zhu Jiang-tao

### Abstract

**BACKGROUND:** There are rare reports about establishing an animal model of osteoporosis in ovariectomized rats.

**OBJECTIVE:** To explore the feasibility to establish an animal model of osteoporosis in ovariectomized rats aged 6 months.

**METHODS:** Forty-eight female rats aged 6 months old were divided into sham operation group and ovariectomized group. Bilateral ovaries were removed in the ovariectomized group to establish osteoporosis models. A small amount of adipose tissue around the ovary was removed in the sham operation group. Body weight, wet weight of the uterine, alkaline phosphatase, tartrate-resistant acid phosphatase, bone mineral density and bone mineral content were measured at 1, 2 and 3 months after modeling.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 1, 2, 3 months after modeling, the ovariectomized rats had a significantly increase in the body weight as well as a decreased in wet weight of the uterine ( $P < 0.05$ ). Serum alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase levels in the ovariectomized group were significantly higher than those in the sham operation group at 1 and 3 months, respectively ( $P < 0.05$ ). Serum alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase levels had a slight increasing tendency with aging in rats. After 2 and 3 months, bone mineral density in the ovariectomized group was significantly lower than that in the sham operation group ( $P < 0.05$ ). These findings indicate that the animal model of osteoporosis can be established successfully in ovariectomized rats aged 6 months.

Department of  
Orthopedics, Xinzhou  
People's Hospital,  
Xinzhou 034000,  
Shanxi Province,  
China

Guo Feng★,  
Studying for master's  
degree, Attending  
physician,  
Department of  
Orthopedics, Xinzhou  
People's Hospital,  
Xinzhou 034000,  
Shanxi Province,  
China  
xzliyq@163.com,  
lzn032200@163.com

Received: 2011-12-31  
Accepted: 2012-03-21

Guo F, Li ZN, Liu JP, Zhu JT. Feasibility of establishing an animal model of osteoporosis in ovariectomized rats aged 6 months. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(24): 4459-4462. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

### 摘要

**背景:** 目前关于鼠龄对去势雌性大鼠建立骨质疏松模型影响的报道较少。

**目的:** 验证6月龄大鼠去卵巢对构建骨质疏松模型的可行性。

**方法:** 6月龄雌性大鼠48只,分为2组,去卵巢组摘除双侧卵巢建立大鼠骨质疏松模型,假手术组不摘除卵巢,切除卵巢周围少量脂肪组织。建模后1,2,3个月测定大鼠体质量、子宫湿质量、碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶、骨矿密度和骨矿含量等指标变化。

**结果与结论:** 建模后1,2,3个月,去卵巢组比假手术组大鼠体质量明显增加( $P < 0.05$ ),子宫湿质量较假手术组明显下降( $P < 0.05$ )。建模后1个月,去卵巢组大鼠血清碱性磷酸酶指标显著高于假手术组( $P < 0.05$ );建模后3个月,去卵巢组抗酒石酸酸性磷酸酶指标显著高于假手术组( $P < 0.05$ );碱性磷酸酶指标和抗酒石酸酸性磷酸酶指标随大鼠月龄增加有轻度增高趋势。建模后2,3个月去卵巢组骨矿密度显著低于假手术组( $P < 0.05$ )。表明6月龄大鼠去卵巢可成功建立骨质疏松症模型。

**关键词:** 骨密度; 去卵巢; 骨质疏松症; 碱性磷酸酶; 抗酒石酸酸性磷酸酶

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.24.018

郭峰, 李正南, 刘晋平, 朱江涛. 六月龄大鼠去卵巢后建立骨质疏松症模型的可行性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(24): 4459-4462. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

忻州市人民医院  
骨一科, 山西省忻  
州市 034000

郭峰★, 男,  
1974年生, 山西  
省五寨县人, 汉  
族, 山西医科大学  
在职硕士, 主治医  
师, 主要从事小儿  
骨科、创伤及骨关  
节疾病的研究与  
治疗。  
xzliq@163.com  
lzn032200@  
163.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225  
(2012)24-04459-04

收稿日期: 2011-12-31  
修回日期: 2012-03-21  
(20110831011/W·W)

## 0 引言

骨质疏松是Pommer在1885年提出来的, 但人们对骨质疏松的认识是随着历史的发展和技术的进步逐渐深化的。早年一般认为全身骨质减少即为骨质疏松, 美国则认为老年骨折为骨质疏松。直到1990年在丹麦举行的第三届国际骨质疏松研讨会, 以及1993年在香港举行的第四届国际骨质疏松研讨会上, 骨质疏松才有一个明确的定义, 并得到世界的公认: 原发性骨质疏松是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征的, 致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。

骨质疏松症是以骨量减少<sup>[1]</sup>, 骨组织微细结构改变为特征, 伴有骨脆性和骨折危险性增加的一种全身性骨骼疾病。骨量减少是骨矿物质(钙、磷)和骨基质(骨胶原)比例降低<sup>[2]</sup>, 表现为骨强度降低, 在轻微外力作用下即可发生骨折。

大鼠双侧卵巢切除模型(ovariectomized model, OVX)是自发或诱发卵巢功能缺陷而复制的活体模型, 是研究绝经后骨质疏松的经典模型<sup>[3]</sup>。大鼠去卵巢后的骨丢失与妇女绝经后的骨丢失有许多相似之处, 大鼠模型已成为研究妇女绝经后骨质疏松症的经典模型之一<sup>[4]</sup>。本实验通过切除卵巢的方法建立大鼠骨质疏松模型, 观察雌性大鼠在切除卵巢后不同时期的骨骼变化, 确定建立模型的最佳时间及评价方法。实验选用6月龄未孕雌性大鼠建立去卵巢骨质疏松模型, 从大鼠体质量、子宫湿质量、血清学指标、骨量等方面综合评价大鼠去卵巢后骨质疏松状况, 研究鼠龄对大鼠去卵巢后骨质疏松模型的影响。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2009-01/2010-12在山西医科大学附属忻州市人民医院骨科研究所及中心实验室完成。

**材料:** 6月龄普通级雌性大鼠48只, 平均体质量336 g, 购自上海中科院实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(沪) 2007-0005。

## 实验方法:

**实验分组:** 选取6月龄雌性大鼠48只, 平均体质量336 g, 大鼠每天12 h光照/黑, 室温在20℃, 自由进食大鼠标准饲料和自来水。随机分成为去卵巢组和假手术组两组。

**建立大鼠骨质疏松模型:** 去卵巢组用10 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 大鼠仰卧固定, 腹部术部剃毛、消毒。正中切开腹部皮肤, 钝性分离腹肌腹膜后进腹。寻找到卵巢后, 用镊子夹取出卵巢并用丝线结扎, 然后将之摘除, 缝合切口。建模后1周拆线。

假手术组麻醉方法、手术路径同上, 只是不摘除卵巢, 切除卵巢周围少量脂肪组织。

于建模后1, 2, 3个月两组大鼠分别麻醉后各处死8只进行指标检测。

## 检测指标:

**大鼠体质量变化:** 于建模后1, 2, 3个月处死大鼠后称其净质量。

**子宫湿质量:** 处死大鼠后, 游离大鼠子宫组织, 剥离子宫黏附的脂肪组织, 用电子分析天平称其湿质量。

**血清学指标测定:** 大鼠断头取血, 静置, 留取血清, 贮存于-80℃冰箱备用, 按照碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒说明书采用比色法进行检测, 待测标本含量根据相应的计算公式算出。

**骨密度测定:** 大鼠称质量, 20 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 采用双能X射线骨密度仪提供的小动物全身骨密度测定软件, 进行全身骨密度测定, 自动分析出大鼠整体骨矿密度和骨矿含量。

**主要观察指标:** ①观察两组大鼠体质量、子宫湿质量。②大鼠血清碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶变化。③骨矿密度和骨矿含量变化。

**统计学分析:** 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 11.5统计软件进行统计分析, 两组间比较采用独立样本t检验, 骨矿密度和骨矿含量组间比较采用协方差分析。

## 2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠48只,

分为2组, 无脱失, 全部进入结果分析。

## 2.2 各组大鼠体质量、子宫湿质量 见表1。

表1 去卵巢组和假手术组大鼠体质量、子宫质量比较  
Table 1 Comparison between the body weight and wet weight of the uterine in the ovariectomized and sham operation groups ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=24$ ,  $g$ )

After operation	Index	Ovariectomized group	Sham operation group
1 mon	Body weight	412.3±35.6 <sup>a</sup>	346.7±32.1
	Wet weight of the uterine	0.139±0.151 <sup>a</sup>	0.277±0.198
2 mon	Body weight	427.6±31.8 <sup>a</sup>	365.4±24.5
	Wet weight of the uterine	0.114±0.176 <sup>a</sup>	0.286±0.211
3 mon	Body weight	431.5±33.7 <sup>a</sup>	371.7±30.8
	Wet weight of the uterine	0.069±0.161 <sup>a</sup>	0.299±0.075

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. sham operation group

大鼠体质量随月龄逐渐增加, 去卵巢后大鼠活动减少, 食量增多, 去卵巢组较假手术组体质量增加显著, 建模后1, 2, 3个月时去卵巢组比假手术组大鼠体质量明显增加( $P < 0.05$ )。去卵巢组大鼠子宫湿质量随月龄增加显著下降, 建模后1, 2, 3个月较假手术组子宫湿质量明显下降( $P < 0.05$ ), 建模后3月下降低达50.36%。

## 2.3 各组大鼠血清学指标、骨矿含量、骨矿密度结果见表2。

表2 去卵巢组和假手术组大鼠血清学指标、骨密度比较  
Table 2 Comparison between serologic indexes and bone mineral density in the ovariectomized and sham operation groups ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=24$ )

After operation	Index	Ovariectomized group	Sham operation group
1 mon	AKP ( $\mu\text{kat/L}$ )	2.621±0.478 <sup>a</sup>	1.692±0.387
	TRAP (nkat/L)	288.56±25.50	270.22±41.01
	BMC (g)	14.2±1.3	13.1±0.8
	BMD ( $\text{g/cm}^2$ )	0.211±0.051	0.247±0.061
2 mon	AKP ( $\mu\text{kat/L}$ )	2.690±0.435	2.143±0.480
	TRAP (nkat/L)	429.75±58.51	375.24±34.67
	BMC (g)	15.1±1.6	13.8±0.6
	BMD ( $\text{g/cm}^2$ )	0.187±0.072 <sup>b</sup>	0.251±0.068
3 mon	AKP ( $\mu\text{kat/L}$ )	3.026±0.959	2.544±0.669
	TRAP (nkat/L)	557.61±93.52 <sup>a</sup>	354.24±21.34
	BMC (g)	14.8±0.8	14.2±1.3
	BMD ( $\text{g/cm}^2$ )	0.177±0.054 <sup>b</sup>	0.286±0.056

AKP: alkaline phosphatase; TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase; BMD: bone mineral density; BMC: bone mineral content; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. sham operation group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. covariance of the sham operation group

建模后1个月, 去卵巢组大鼠血清碱性磷酸酶指标显著高于假手术组( $P < 0.05$ ), 2, 3个月差异无显著性意义; 建模后1, 2个月, 去卵巢组抗酒石酸酸性磷酸酶指标与假手术组比较, 差异无显著性意义, 3个月显著高于假手术组( $P < 0.05$ ); 碱性磷酸酶指标和抗酒石酸酸性磷酸酶指标随大鼠月龄增加有轻度增高趋势。大鼠

骨矿含量随月龄持续增加, 去卵巢组比假手术组增加显著, 由于体质量与骨矿含量存在相关性( $r=0.658$ ,  $P < 0.05$ ), 以体质量为协变量进行协方差分析, 建模后1, 2, 3个月, 去卵巢组骨矿含量指标与假手术组比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。骨矿密度随月龄增加, 到成年期6月龄进入峰值平台期, 以后随月龄逐渐下降, 去卵巢组比假手术组下降显著, 以体质量为协变量进行协方差分析, 体质量与骨矿密度存在相关性( $r=0.426$ ,  $P < 0.05$ ), 建模后2, 3个月显著低于假手术组( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

绝经后骨质疏松的动物模型于1969年首先由Saville用大鼠切除卵巢建立<sup>[5]</sup>, 并经美国食品药品监督管理局(FDA)和世界卫生组织(WHO)推荐的研究绝经后骨质疏松症的最佳模型<sup>[6]</sup>。雌性大鼠有明显的生长期和成年期, 有利于观察峰值骨量的形成及骨量丢失的规律, 其次雌性大鼠的卵巢切除以后, 骨代谢活跃, 骨转换增强, 骨吸收大于骨形成, 初始为快速骨丢失阶段, 随后为缓慢的骨丢失阶段, 松质骨的丢失多于皮质骨, 松质骨的骨量减少, 骨强度下降, 这种特性较好地模仿了人正常绝经时高转换型骨质疏松发生时的骨丢失状态<sup>[7]</sup>。

大鼠体质量指标术后去卵巢组较假手术组显著增加, 因为雌激素的主要来源为卵巢和肾上腺, 卵巢切除后, 肾上腺分泌的雄烯二酮在外周组织转化增加, 同时雌激素减少, 负反馈机制作用于垂体和下丘脑, 促性腺激素分泌增加, 同时作用于下丘脑食欲调节中枢, 故大鼠进食增多, 活动减少, 同时雌激素下降, 其调节脂代谢能力下降, 大鼠脂肪含量增加, 导致去卵巢组体质量显著增加, 与文献报道一致<sup>[8-10]</sup>。

手术后去卵巢组较假手术组子宫质量显著下降, 主要由于子宫是雌激素的靶器官, 去除卵巢, 缺乏雌激素导致子宫逐渐萎缩。血清总碱性磷酸酶是反映骨形成的指标<sup>[11]</sup>, 主要来自骨和肝脏。骨源性碱性磷酸酶为反映骨形成的特异指标<sup>[12]</sup>, 在正常生理条件下, 骨源性碱性磷酸酶与肝源性碱性磷酸酶之比约为1:1, 所以在大鼠肝肾功能正常的情况下, 血清总碱性磷酸酶也能在一定程度上反映成骨细胞的活性。抗酒石酸酸性磷酸酶是反映骨吸收的特异指标<sup>[13]</sup>, 血清中的抗酒石酸酸性磷酸酶主要来源于破骨细胞。在骨吸收时破骨细胞附着在骨表面, 接着分泌酸和酶, 在骨与破骨细胞之间形成一个空隙, 位于破骨细胞微粒体的抗酒石酸酸性磷酸酶, 即通过破骨细胞波状缘分泌进入此空隙, 与其他酶一起参与

骨基质中钙磷矿化底物的降解, 导致骨吸收<sup>[14-16]</sup>。绝经后骨质疏松症骨代谢特点为高转换型, 骨吸收和骨形成均增加, 而骨吸收速率大于骨形成导致骨质疏松<sup>[17]</sup>。

本实验去卵巢组术后碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶均较假手术组显著升高, 表明骨转换率增加, 符合绝经后骨质疏松特点, 说明切除卵巢建骨质疏松模型成功。骨矿密度和骨矿含量是骨量的主要测量指标, 本实验采用双能X射线骨密度仪对活体大鼠进行全身骨密度扫描, 应用小动物分析软件测算全身骨矿盐含量<sup>[18-19]</sup>, 结果显示去卵巢大鼠骨矿密度较同月龄假手术组均下降, 骨矿含量指标术后2, 3个月均显著性下降, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。表明去卵巢组大鼠导致了明显的骨丢失、骨量减少。

本实验结果表明, 不论从大鼠体质量、子宫湿质量等指标、还是从大鼠血清学指标、骨密度指标水平考虑, 6月龄大鼠去卵巢后可成功发生骨质疏松, 说明切除卵巢模拟绝经后骨质疏松症模型成功。

#### 4 参考文献

- [1] Ferrari S L,Rizzoli R.Gene variants for osteoporosis and their apheliotropic effects in aging.Molecular Aspects of Medicine. 2005;26(3):145-167 .
- [2] Song B,Zhang ZQ.Zhongguo Laonianxue Zazhi. 宋冰,张兆强.运动和尼尔雌醇联合应用对去卵巢大鼠骨矿盐含量的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011(10),1814-1815.
- [3] Uppel ME, Miller LM, Burr DB. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. Osteoporos Int. 2008;19(9):1251-1265.
- [4] Nakamuta H.The ovariectomized animal model of postmenopausal bone loss.,J Nippon Rinsh.2004;62(suppl 2): 759-763.
- [5] Lorenz CH.Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism.Eur J Endocrinol.1999;141:195-210.
- [6] Thompson DD,Simmons HA,Pirie CM,et al.FDA guidelines and animal models for osteoporosis.Bone.1995;17(4): 125-133.
- [7] Kalu DN.The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss.Bone Miner,1991,15(3):175-191.
- [8] Khosla S,Arrighi HM,Melton LJ 3rd,et al.Correlates of osteoprotegerin levels in women and men.Osteoporos Int. 2002;13(5):394-399.
- [9] Tang CG,Li LZ,JX.Zhongguo Guzhi Shusong Zazhi. 2008; 14(4):229-232. 唐存贵,李灵芝,金鑫. 鼠龄对大鼠去卵巢骨质疏松模型的影响 [J].中国骨质疏松杂志, 2008,14(4):229-232.
- [10] Zheng LP,Li YZ,Hu HX,et al.Fujian Zhongyiyao. 2009;40(2): 50-51. 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.
- [11] Sun WF,Pei JQ,Liu B,et al.Zhongguo Yufang Yixue Zazhi. 2009;10(4):263-266. 孙伟方,裴继强,刘波,等. 舟山海岛老年人患骨质疏松症影响因素的研究[J].中国预防医学杂志,2009,10(4):263-266.
- [12] Liang BB,Zhang MM,Zhang YH,et al.Zhongguo Shiyao Zhenduanxue. 2011;15(4):711-712. 梁斌斌,张萌萌,张艳会,等. 436例女性骨代谢生物化学指标测定的临床意义[J].中国实验诊断学, 2011,15(4):711-712.
- [13] Dong W,Yu J,Qi MC,et al.Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi. 2010;27(6):1336-1340. 董伟,于静,戚孟春,等. M-CSF、RANKL浓度及M-CSF预诱导对破骨细胞生成影响的研究[J].生物医学工程学杂志, 2010,27(6): 1336-1340.
- [14] Georgescu CE, Mihai A, Didilescu AC, et al. Cone beam computed tomography as a method of quantitative and qualitative analysis of alveolar crest in the frontal mandibular area. Rom J Morphol Embryol. 2010;51(4):713-717.
- [15] Grases F, Sanchis P, Prieto RM, et al. Effect of tetracalcium dimagnesium phytate on bone characteristics in ovariectomized rats. J Med Food. 2010;13(6):1301-1306.
- [16] Alwood JS, Yumoto K, Mojarrab R, et al. Heavy ion irradiation and unloading effects on mouse lumbar vertebral microarchitecture, mechanical properties and tissue stresses. Bone. 2010;47(2):248-255.
- [17] Shu XC,Zhang RH,Zhu XF,et al.Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2003;17(9) :83-86. 舒晓春,张荣华,朱晓峰,等. 益骨胶囊含药血清对大鼠破骨细胞凋亡和分泌抗酒石酸酸性磷酸酶的影响[J].中国病理生理杂志, 2003,17(9) :83-86.
- [18] Chachra D, Lee JM, Kasra M, et al. Differential effects of ovariectomy on the mechanical properties of cortical and cancellous bone in rat femora and vertebrae. Biomed Sci Instrum. 2000;36:123-128.
- [19] Zhang ZX,Zhang ZQ.Weiliang Yuansu yu Jiankang Yanjiu. 2009;26(5):6-8. 张兆贤,张兆强. 运动对去卵巢大鼠骨大小和骨量的影响[J]. 微量元素与健康研究,2009,26(5):6-8.

#### 来自本文课题的更多信息—

**作者贡献:** 实验设计为第一作者, 实施为第二、四作者, 评估为第三作者, 资料收集为第一、二、四作者。第三作者审校, 第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

#### 文章概要:

**文章要点:** 验证6月龄大鼠去卵巢对构建骨质疏松症模型的可行性。

**关键信息:** 实验结果表明6月龄大鼠去卵巢可成功建立骨质疏松症模型。

**研究的不足:** 未选取不同年龄段的鼠进行实验。