

·运动人体科学·

运动骨代谢实验动物特点与动物模型评价 ——运动骨代谢动物模型研究进展(二)

张 林

(苏州大学 体育学院, 江苏 苏州 215021)

摘 要:介绍了不同实验动物的骨代谢特点和运动骨代谢动物模型的评价指标,以了解当前运动骨代谢动物模型的研究进展状况。

关 键 词:运动骨代谢特点;动物模型;评价指标

中图分类号:G804.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-7116(2006)01-0051-03

Characteristics of exercise-related experimental animals and the evaluating indicators of animal model ——The progress of exercise-related animal model on osseous metabolism(II)

ZHANG Lin

(College of Physical Education, Suzhou University, Suzhou 215021, China)

Abstract: In order to know the progress of exercise-related animal model on osseous metabolism, this paper introduced different experimental animals' characteristics of osseous metabolism and evaluation indexes of exercise-related osseous animal model.

Key words: characteristic of exercise-related osseous metabolism; animal model; evaluation index

运动骨代谢研究建立动物实验模型时,应清楚不同实验动物的骨代谢特点,了解运动骨代谢动物模型的评价指标,以建立符合实验设计目的要求的动物实验模型,本文介绍了这方面的研究进展。

1 常用骨代谢实验动物的特点

在选择实验动物时,应知道每一种动物模型的优点和限制,才能更好地设计和进行动物运动干预实验。

1.1 灵长类(primates)

灵长类动物与人类骨骼结构近似,骨构建(bonemodelling)和骨转化(boneturnover)也类似。灵长类动物都有一个规律的月经周期,每28d一个循环,自然绝经在出生后第15~20年之间,与人类一样会出现增龄性和制动性失骨。在理论上灵长类动物作为骨代谢动物模型是最为理想的,目前认为在人工饲养环境下,把灵长类动物与鼠类结合起来进行基因调控峰值骨量研究是最佳选择^[1]。但由于年龄和骨代谢延迟对灵长类动物实验性骨丢失的影响较大,同时灵长类的驯养条件要求严格、费用昂贵、运动实验操作难度高、实验周期长等因素限制了研究应用。

1.2 啮齿目动物(rodents)

(1)大鼠(rats):大鼠是建立骨代谢动物模型应用最广泛的动物^[2]。实验用大鼠有远交和近交系两种。远交系包括Wistar、Sprague-Dauley(SD)、Long-Evans、Holtzman等品种,近交系包括ACI、Brown-Norway、Fischer344、Lewis、Wistar-Furth等品种。常用Wistar、SD、Holtzman、Fischer344大鼠制作骨代谢模型。大鼠的自然寿命为2~3年,性成熟期2~3个月。大鼠有明显的生长期和成年期,成年雄性大鼠30个月时骨干骺端仍持续生长,而雌性大鼠的骨干骺端闭合明显早于雄性。雌性大鼠在6~9个月进入骨生长静止期,骨骺开始封闭,这是骨代谢相对稳定的阶段,到10个月时达到峰值骨量,雄性大鼠约12个月时达骨峰值;成年雌鼠每4d有一个发情期,此时动物体内雌二醇水平也处于峰值;12个月以后一般被认为已进入老龄,15个月后可观察到松质骨丢失现象;卵巢切除模型可较好地模拟人正常绝经时高转换型骨丢失状态,并且药物治疗和运动干预后与人体中的应用效果近似。21个月以后,由于雌激素缺乏,雌性大鼠乳腺肿瘤发病率上升,已不合作骨代谢研究。

大鼠作为模型动物的主要缺点是缺乏由于脆性而导致的骨折(其他大动物则无),同时因为骨皮质缺乏Haversian系统,不适于卵巢切除术对皮质骨影响的研究;体重不能作

收稿日期:2005-06-19

作者简介:张 林(1956-),男,教授,博士,博士研究生导师,研究方向:运动生理生化。

为年龄的标志,同种系有不同的生长曲线;不能多次取活检标本和大量取血。由于大鼠易于训练,因此在运动骨代谢研究中是应用最广的模型动物^[3]。

(2)小鼠(mice)和豚鼠(guineapigs):在遗传背景、饲养、寿命等方面有和大鼠一样的优势,小鼠切除卵巢、睾丸后松质骨变化与大鼠相似。不同种系的小鼠,有着不同的峰值骨量,C57BL/6J小鼠峰值骨量低,而C3H/HeJ小白鼠的峰值骨量高;SAM-P/6(早老型)小鼠则具有低峰值骨量和中、老年时易发生骨折的特点,是目前唯一证实可随增龄出现脆性骨折的动物。如果SAM-P/6小鼠不存在像纤维骨硬化症那样胶原异常的现象,则可能是研究低峰值骨量引起老年性骨折增加的实用动物模型。由于小鼠的基因易于调控,鉴于SAM-P/6、C57BL/6J和C3H/HeJ小鼠的峰值骨量方面的差异,应用现代分子生物学技术如杂交技术和cDNA探针等,对其基因进行定点识别分析研究,探索决定峰值骨量的基因,是目前研究的热点。Kalu等^[4]比较C3H/HeJ和C57BL/6J小鼠后,认为C57BL去卵巢小鼠适宜用于研究绝经后妇女肠内钙吸收不良。Beamer等^[5]研究发现不同品系小鼠的皮质骨密度由共同基因型决定,而股骨、椎骨、趾骨的密度、长度随基因型的不同各异。因此,小鼠常被用于转基因或基因敲除的骨质疏松动物模型。

但小鼠存在可供研究用血清少、发情期不受下丘脑-垂体轴调节等因素影响,骨代谢及骨组织对性激素的反应性与人类不尽一致,目前在运动骨代谢研究中应用较少。

1.3 兔形目(lagomorpha)

兔(rabbits)自然寿命为4~6年,性成熟期为5~8个月,1年以上达中老年。成年兔有Haversian重建活性,可以用作合成代谢促进药物对松质骨及Haversian重建作用的研究。由于耳缘取血方便,便于长期动态观察,且从胫骨病理切片上看,兔骺板多数钙化并消失,与人类相似。因而被学者用于卵巢切除后,糖皮质激素及肝素等诱导的OP模型^[6]。在运动骨代谢研究中尚无利用兔作为模型动物的报道。

1.4 食肉目(carnivora)

成年狗在骨代谢和组织结构方面与人类相似,皮质骨有丰富的Haversian系统,体内重建活性与人相似;皮质骨与松质骨的比例与人骨相似;Haversian单位和松质骨重建与人的形态相似,但狗的重建更快,因而被用于OP的模型研究^[7]。但也有研究表明卵巢切除的狗,术后6个月在组织形态学、骨量等方面无明显改变,对雌激素缺乏的反应差,认为不适用于作研究松质骨的OP模型。目前比较肯定的是,应用狗研究废用性骨质疏松较为成功,但狗不适用于骨代谢研究。

猫在骨质疏松模型研究中尚未被广泛应用。

1.5 偶蹄目(artiodactyla)

(1)小型猪(minipigs)曾被成功地用于运动和氟化物对骨骼影响的研究,其品种有Sinclair、Hanford、Homel、Yucatan、Vietnamese-Pot-Belled、中国的贵州小猪等。猪峰骨出现在2~3岁,具有与人相当的皮质骨及松质骨丢失与沉积的发生率;有连续的发情周期,与人相似,每次18~21d;有层状骨,骨小梁和骨皮质重建与人相似,其骨量重,骨小梁网比人

致密;骨骼大,足以能接受人工装置的植入,可以多次采活检,多次取血标本;属杂食动物,是人体消化道功能最佳模型。Mosekilde等^[8]研究表明,卵巢切除的小型猪术后6个月BMD下降6%,骨小梁体积下降15%。但不足之处在于价格昂贵,卵巢子宫切除手术较为困难。

(2)羊在卵巢切除后可致骨皮质少量丢失,但由于其无自然绝经,且Haversian系统重建时间较晚,皮质骨为丛状结构等不利因素,至今作为骨质疏松动物模型报道较少。近年来,骨的生物力学性能的测量受到人们的重视,山羊在切除卵巢后骨量丢失、骨密度降低,使骨的生物力学强度降低^[9]。因此,羊作为模型动物在运动骨代谢研究中具有开发的潜力。马、牛等动物目前作为骨代谢的模型动物应用极少。

2 运动骨代谢动物模型评价指标

用于评价运动骨代谢动物模型的指标较多,概括起来主要包括如下几大类:

(1)骨量变化的评定。

骨量的变化是评定骨代谢状况的重要指标,可以用单光子或双光子骨矿仪、双能X-线骨密度仪、定量CT等仪器对实验动物的管状骨如股骨、胫骨或椎骨等标本的骨密度进行测定;也可直接称量处死后动物骨标本的湿质量、干质量和灰质量来反映骨量变化;还可通过X光片上骨皮质厚度、骨小梁密度来粗略估算骨量变化。这些方法的优点是无损伤性、简单而快速,缺点是骨量有明显变化时才能反映出来,因而灵敏度较低,在运动骨代谢研究中应有较长的运动干预时间^[3]。

(2)骨代谢平衡指标。

骨代谢平衡研究的常用指标有(1)骨矿物质代谢:骨钙、磷的定量测定,血和尿钙、磷、镁定量测定,同位素标记钙的骨吸收等。(2)钙调激素与性激素水平:钙调激素主要有甲状旁腺激素(PTH)、1,25(OH)₂D₃及降钙素(CT)三大激素,性激素包括雌激素、雄激素、孕激素等。这些指标可快速、灵敏、及时地反映骨转换率,但由于其干扰因素较多,不能全面反映模型动物的变化等缺点,故常作为模型判定的辅助指标,目前在运动骨代谢研究中已有大量文献报道^[10]。

此外,模型动物的体质量、性腺、内分泌腺的质量、形态变化也被看作模型的参考指标。

(3)骨代谢生化标志物与细胞因子。

常用指标包括1)骨形成生化标志物:主要有血浆骨特异性碱性磷酸酶(plasma bonespecific alkaline phosphatase)、骨特异性磷蛋白(bone specific phosphoprotein)、骨钙素(osteocalcin)、骨结合素(osteonectin)、I型前胶原羧基前肽(carboxyterminal propeptide of type I procollagen)、骨唾液酸蛋白(bone specific sialoproteins)、骨蛋白聚糖(bone proteoglycans)等。2)骨吸收生化标志物:主要有血浆抗酒石酸盐酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase)、I型胶原交联羧基末端肽(type I collagen cross-linked ctelopeptide)、尿羟脯氨酸(hydroxyproline)、尿中胶原吡啶交联(PyT)、尿Ca/Cr等。3)骨代谢细胞

因子:与骨形成有关的因子有骨形态发生蛋白(BMP1-7)、骨趋化因子(BCF)、胰岛素样生长因子(IGF)、TGF- β 等;与骨吸收有关的细胞因子如白细胞介素-1、3、4、6、8、11等,肿瘤坏死因子(TNF α 和 β),干扰素(IFN-g)等,生长因子如集落刺激因子(M-CSF,GF-CSF)、血小板生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、前列腺素等。这些指标不能全面反映模型动物的变化,并且许多指标的变化不显著,因此仅作为运动骨代谢动物模型判断的辅助指标^[11]。

(4)骨生物力学性能指标。

骨生物力学测试包括骨结构力学和骨材料力学 2 个方面的指标,这些指标包括管状骨长度、直径和厚度的测定;整体骨的抗弯、抗压、抗扭转强度以及骨试件的抗弯、抗压、抗拉伸强度及最大荷载、弹性荷载;椎体骨的抗压强度、破坏荷载等。这些生物力学指标能全面反映骨骼的物理特性和结构特性,可从不同方面定量地反映动物模型的骨质状况及运动干预效果,因此是运动骨代谢研究的重要指标^[12]。

(5)骨组织形态计量学指标。

将骨组织切片与图形体视学结合起来的骨组织形态计量学技术方法,是 20 世纪 70 年代开始应用的,可以准确、真实地反映骨量和骨形态结构的变化,同时可定量的反映骨代谢的动态过程。根据骨组织处理方法的不同,可分为常规脱钙和不脱钙骨组织切片测量。不脱钙骨组织形态计量学技术可直接测量骨皮质厚度,直接观察骨小梁和密质骨组织形态,尤其是骨组织显微结构变化;再结合荧光染料四环素、茜红等进行活体标记,还可观察到新骨生长、新骨矿化和骨吸收的动态过程,定量地获得骨细胞水平、组织水平及器官水平的动态信息,对动物模型判断具有很高的准确性,目前已被应用在运动骨代谢研究中^[13]。

以上指标从各个不同的角度定量地反映模型动物的变化以及程度如何,但这些指标均有其局限性,需要综合多种信息才能得到确实的情况判断。在运动骨代谢动物模型评价指标中,骨量、骨生物力学性能和骨组织显微结构变化是不可缺少的。

3 展望

随着新型测量技术的出现和生命科学研究方法的深入,骨代谢动物模型的复制方法、观察指标和研究领域在不断发展,运动骨代谢研究将在干预模型动物与骨代谢相关的基因表达、不同模型动物峰值骨量的控制基因、细胞调节因子在造型过程中的变化和运动对成骨细胞、破骨细胞的活性改变与膜上激素受体的关系等方面获得进展。

参考文献:

- [1] Rogers J, Hixson J E. Baboons as an animal model for genetic studies of common human disease[J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 61: 489-493.
- [2] Ke H Z, Crawford D T, Qi H, et al. Long-term effects of aging and orchidectomy on bone and body composition in rapidly growing male rats[J]. *J Musculoskel Neuron Interact*, 2001(1): 215-224.
- [3] 张 林. 骨质疏松大鼠运动模型的建立与训练效果评定[J]. *体育科学*, 1999, 19(6): 72-76.
- [4] Kalu D N, Chen C. Ovariectomized murine model of postmenopausal calcium malabsorption[J]. *J Bone Miner Res*, 1999(14): 593-601.
- [5] Beamer W G, Donahue L R, Rosen C J, et al. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice[J]. *Bone*, 1996(18): 397-403.
- [6] Southard T E, Southard K A, Krizan K E, et al. Mandibular bone density and fractal dimension in rabbits with induced osteoporosis[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2000, 89(2): 244-249.
- [7] Fukuda S, Lida H. Effects of orchidectomy on bone metabolism in beagle dogs[J]. *J Vet Med Sci*, 2000, 62(1): 69-73.
- [8] Mosekilde L, Weisbrode S E, Safron J A, et al. Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation[J]. *Bone*, 1993, 14(3): 379-382.
- [9] Weinhold P S, Roe S C, Gilbert J A, et al. Assessment of the directional elastic moduli of ewe vertebral cancellous bone by vibrational testing[J]. *Ann Biomed Eng*, 1999(27): 103-105.
- [10] 张 林. 健骨运动处方的研究与应用[J]. *体育科学*, 1999, 19(5): 50-54.
- [11] 张 林. 运动与骨代谢生化标志物研究进展[J]. *中国运动医学杂志*, 1999, 18(3): 260-262.
- [12] 张 林. 运动对骨力学性能的影响——骨生物力学研究进展[J]. *中国运动医学杂志*, 2002, 21(1): 85-88.
- [13] 张 林. 不同强度运动对骨质疏松大鼠骨形态计量学的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 1999, 18(4): 317-320.

[编辑: 郑植友]