

不同年龄段雌性 Wistar 大鼠不同骨骼区域骨密度值的测定与比较

叶尤松, 王陈芸, 李哲丽, 马开利*, 唐东红*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

【摘要】 目的 提供不同年龄段雌性 Wistar 大鼠不同骨骼区域骨密度参考值。**方法** 选取 30 只 SPF 级雌性 Wistar 大鼠, 分别在 6 月龄、10 月龄、12 月龄、24 月龄和 30 月龄时, 采用双能 X 线骨密度仪依次测量大鼠头部、上肢、大腿、躯干、肋骨、骨盆、脊柱及全身等骨骼区域的骨密度, 并进行不同年龄段间和同一年龄段不同骨骼区域间骨密度值的比较。**结果** 随着月龄的增加雌性大鼠头部、上肢、大腿、躯干、肋骨、骨盆、脊柱和全身骨密度值迅速增加至 10 月龄达到峰值; 大鼠头部、上肢、大腿、躯干和肋骨部骨密度值均显著或极显著高于同月龄全身骨密度值 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而骨盆和脊柱部骨密度值和同月龄全身骨密度值比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 相关性分析三者均呈显著正相关 ($P < 0.01$)。**结论** 本文提供了雌性 Wistar 大鼠骨生物学指标的部分背景数据, 为以 Wistar 大鼠为对象的骨代谢研究及其在生物医学领域的应用补充了基础参考资料。

【关键词】 Wistar 大鼠; 骨骼区域; 骨密度

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0065-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.04.011

Determination and comparison of the bone mineral density of different skeletal regions of female Wistar rats at different ages

YE Yousong, WANG Chenyun, LI Zheli, MA Kaili*, TANG Donghong*

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To provide reference values for bone mineral density (BMD) in different skeletal regions of female Wistar rats at different ages. **Methods** Thirty SPF female Wistar rats were selected. The BMD of different skeletal regions (skull, upper limbs, thighs, trunk, ribs, pelvis, spine and the whole body) was measured by dual energy X-ray absorptiometry (DXA) at 6, 10, 12, 24 and 30 months of age. The bone mineral densities between different age groups and that of different skeletal regions in the same age groups were compared. **Results** The BMD of the skull, upper limbs, thighs, trunk, ribs, pelvis, spine and the whole body was increased rapidly with age, and reached a peak at 10 months of age. The BMD of the skull, upper limbs, thighs, trunk, ribs were significantly higher than the whole body BMD in the same month-age group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). However, there was no significant difference between the pelvic, spine and the whole body BMD ($P > 0.05$). There was a significant positive correlation among the three correlations ($P < 0.01$). **Conclusions** Some background data are provided for the bone biology studies of female Wistar rats, and provide

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(2016-I2M-2-006); 国家自然科学基金(81571254, 81570749)。

【作者简介】 叶尤松(1974—), 男, 副主任技师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: yys@imbcams.com.cn

【通信作者】 唐东红(1966—), 女, 主任技师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: tdh@imbcams.com.cn。

马开利(1982—), 男, 副研究员, 研究方向: 药理学。E-mail: mkl@imbcams.com.cn。* 共同通信作者

useful supplementary reference for the studies of bone metabolism in rats and their application in biomedicine.

【Key words】 Wistar rats; bone area; BMD

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨强度下降、骨折风险性增加为特征的骨骼系统的疾病^[1], 它已成为最常见的老年病之一, 严重危害老年人的健康和生活质量。目前全世界患 OP 总人数超过 2 亿, 是位居第 6 位的常见病、多发病^[2], 世界卫生组织 (WHO) 将其列为三大老年病之一^[3]。骨密度测定是早期诊断骨质疏松、预测骨质疏松性骨折的可靠方法。世界卫生组织对骨质疏松诊断标准的制订也是基于骨密度的测量^[4]。其中双能 X 射线吸收法 (dual energy X-ray absorptiometry, DXA) 因其操作简单、对患者辐射剂量低、检查时间短、测量精确度与准确度相对较高等优点已被公认为金标准广泛应用^[5]。在探讨发病机理及开发治疗新药的过程中, 动物造模是不可缺少的手段。大鼠作为常用实验动物, 因其繁殖快, 生命周期短、便于饲养、费用较低, 成为目前研究 OP 中使用最多, 最成熟的造模候选动物, 且以雌性为主, 对其施行卵巢切除术, 模拟老年妇女骨质疏松的动物模型已得到国际上的普遍公认^[6-7]。与人类相同, 大鼠 BMD 的测量主要用于大鼠骨量减少的评价和骨质疏松的诊断。然而, 诊断标准中尚缺乏 DXA 可以采用的计算 T 值的大鼠正常参考值, 以至于无法客观地评价大鼠骨质疏松, 而且检测部位的适合性也有待探讨, 为此本文采用 DXA 法测量不同年龄段活体雌性大鼠不同骨骼区域的骨密度, 观察比较骨密度值的增龄和部位变化, 以完善雌性 Wistar 大鼠骨密度相关的骨生物学参考数据库。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 Wistar 大鼠 30 只, 体重 (355 ± 12) g, 6 月龄, 由中国医学科学院生物医学研究所提供 [SCXK (滇) K2014 - 0002], 实验在本单位设施内进行 [SYXK (滇) K2014 - 0007], 实验方案获得本单位伦理委员会审查通过 (No: 2016 - 003)。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠, 用时配制成 3% 的水溶液, 每只大鼠按 40 mg/kg 体重剂量进行腹腔注射麻醉; 双能 X 线骨密度仪 (GE Healthcare China, GE Lunar Prodigy, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 质控模型检测

采用双能 X 射线骨密度分析仪进行检测。开机后对质控模型进行测量, 待模型测量值在允许变化范围内时, 再对样本进行测量。

1.3.2 骨密度测量

为得到准确的月龄, 选取同日出生大鼠并详细记录出生日期, 离乳起单独分笼饲养。分别在 6 月龄、10 月龄、12 月龄、24 月龄和 30 月龄时, 大鼠按 40 mg/kg 体重腹腔注射麻醉后, 将大鼠放置在骨密度仪检查床上, 选用双能 X 射线骨密度分析仪系统默认标准测量方式对大鼠的头部、上肢、大腿、躯干、肋骨、骨盆、脊柱、躯干和全身分别进行骨密度分析, 并记录其数据, 见图 1。



图 1 系统默认标准方式分析图

Fig. 1 Analysis graph by the system default standard mode

1.4 统计学方法

用 Graphpad Prism 5.0 统计软件对骨密度数据进行结果分析, 在相同骨骼区域不同月龄大鼠间和相同年龄段不同骨骼区域间, 分别进行双因素方差分析 (two-way ANOVE analysis), 实验数据以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 骨密度值的增龄变化

随着动物月龄的增加, 雌性大鼠头部、上肢、大腿、躯干、肋骨、骨盆、脊柱和全身骨密度值迅速增加, 至 10 月龄达到峰值 ($P < 0.01$) 见表 1, 之后除头部骨密度值增速减缓趋于稳定外, 其它部位随着月龄的增加而逐渐降低至 24 月龄, 10 月龄至 12 月

龄变化明显 ($P < 0.05$), 12 月龄至 24 月龄变化趋于稳定 ($P > 0.05$); 24 月龄到 30 月龄全身、脊柱和骨盆部骨密度有明显的上升趋势 ($P < 0.05$), 而且三根曲线从 6 月龄到 30 月龄有相同的趋势甚至重叠; 其它部位变化趋于平稳 ($P > 0.05$), 见图 2。

2.2 不同年龄段雌性 Wistar 大鼠各骨骼区域骨密度值的测量结果

对同月龄的雌性 Wistar 大鼠各骨骼区域骨密度值进行统计分析 (表 1), 结果显示: (1) 6 月龄大

鼠除头部骨密度值极显著高于全身骨密度值外 ($P < 0.01$), 其它部位和全身骨密度值无差异 ($P > 0.05$), 提示头部骨骼发育先于其它区域; (2) 其它月龄大鼠头部、上肢、大腿、躯干和肋骨部骨密度值均显著或极显著高于同月龄全身骨密度值 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而骨盆和脊柱部骨密度值和同月龄全身骨密度值比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 从图 2 增龄趋势图看, 三者有相同甚至重叠的趋势。

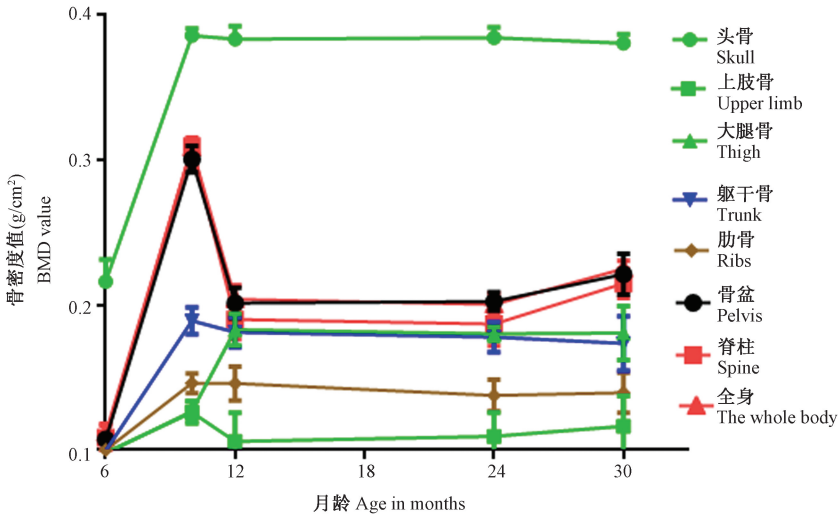


图 2 Wistar 雌性大鼠各骨骼区域骨密度增龄变化

Fig.2 Changes of BMD in different skeletal regions of the Wistar female rats

表 1 不同年龄段雌性 Wistar 大鼠各骨骼区域骨密度值测量结果 (g/cm²)

Tab.1 BMD measurements in different skeletal regions of the Wistar rats in different ages

区域 Regions	月龄 Months of age				
	6	10	12	24	30
头 Skull	0.216 ± 0.015 **	0.386 ± 0.005 **	0.384 ± 0.009 **	0.384 ± 0.007 **	0.381 ± 0.006 **
上肢 Upper limb	0.098 ± 0.005	0.126 ± 0.007 **	0.106 ± 0.020 **	0.110 ± 0.017 **	0.117 ± 0.021 **
大腿 Thigh	0.098 ± 0.004	0.127 ± 0.007 **	0.183 ± 0.011 *	0.180 ± 0.005 *	0.181 ± 0.019 **
躯干 Trunk	0.099 ± 0.003	0.189 ± 0.009 **	0.181 ± 0.011 **	0.178 ± 0.010 **	0.174 ± 0.019 **
肋骨 Ribs	0.100 ± 0.004	0.146 ± 0.007 **	0.146 ± 0.012 **	0.138 ± 0.011 **	0.140 ± 0.014 **
骨盆 Pelvis	0.107 ± 0.003	0.301 ± 0.009	0.202 ± 0.011	0.203 ± 0.006	0.221 ± 0.014
脊柱 Spine	0.109 ± 0.008	0.310 ± 0.006	0.190 ± 0.014	0.187 ± 0.015	0.215 ± 0.010
全身 Whole body	0.112 ± 0.006	0.309 ± 0.004	0.204 ± 0.010	0.201 ± 0.008	0.225 ± 0.006

注: 同月龄与全身骨密度值比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the whole-body BMD at the same months of age, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 Pearson 相关性分析结果

Tab.2 Results of the Pearson correlation analysis

骨密度 BMD	骨盆骨密度 Pelvic BMD	脊柱骨密度 Spine BMD	全身骨密度 Whole body BMD
骨盆骨密度 Pelvic BMD	1	0.992 **	0.999 **
脊柱骨密度 Spine BMD	0.992 **	1	0.996 **
全身骨密度 Whole body BMD	0.999 **	0.996 **	1

** $P < 0.01$ 。

2.3 相关性分析结果

以盆骨骨密度和脊柱骨密度为因变量,以全身骨密度为因子对所测得的骨骼区域骨密度值进行相关性分析,结果表明:全身骨密度值和盆骨骨密度值以及脊柱骨密度值均呈显著正相关($P < 0.01$),见表 2。

3 讨论

目前,关于 Wistar 大鼠骨生物学指标早期有一些零星报道,多以造模后相同时相点模型组与空白组 BMD 值的差异是否具有显著性为评价 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;缺点是结果判断以对照组的 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,且多数在测定中未严格控制其影响因素,样本量也不充足,因此参考价值亦受到影响。本文选择 30 只 SPF 级 Wistar 大鼠,严格控制饲养环境,实验操作均由同一人员完成,确保数据的稳定性。骨密度值的增龄变化结果显示,随着月龄的增加雌性大鼠头部、上肢、大腿、躯干、肋骨、盆骨、脊柱和全身骨密度值迅速增加至 10 月龄达到峰值,处于文献报道骨密度峰值位于 7~12 月龄的范围内^[8-9],与宋敏等^[10]报道结果一致。但较秦林林等^[11]报道的 8 月龄大鼠骨峰值形成和 Gibson 等^[12]报道的 6 月龄大鼠骨峰形成的时间延迟,可能系动物种群、微生物控制级别和饲养环境不同,活体测量还是离体测量,测量仪器、操作人员和测量方式不一致以及所扫描部位略有差异导致。

现广泛使用的双能 X 线骨密度仪虽有较高的测量精度,但由于大鼠个体关节小而且各骨骼区域分界不尽明显,而且没有统一的固定体模,以至于无论使用系统默认标准分析方式还是用自定义手动分析方式都很难精确扫描到特定部位,从而无法避免系统误差的存在。本文不同年龄段各骨骼区域骨密度测量及相关性分析结果显示:大鼠头部、上肢、大腿、躯干和肋骨部骨密度值均显著或极显著高于同月龄全身骨密度值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而盆骨和脊柱部骨密度值和同月龄全身骨密度值比较差异无显著性($P > 0.05$),从图 2 增龄趋势图看,三者有相同甚至重叠的趋势,全身骨密度值和盆骨骨密度值以及脊柱骨密度值均呈显著

正相关($P < 0.01$),即三个区域骨密度值比较接近,表明盆骨和脊柱骨密度值可以和全身骨密度值相互替换,这就为大鼠骨密度的测量和分析提供了一种有效的途径。

总之,实验动物月龄、评价指标和考察部位等的选择直接影响到骨质疏松研究结果和实验数据的参考价值,骨量峰值和骨量丢失月龄的确定是动物月龄选择的关键,这些目前仍无统一的观点。因此,在大鼠骨生物学种群标准及必要的基础数据方面亟待解决问题仍旧很多,如需统一种群,统一微生物控制级别,明确样品数量,统一固定体模,规定活体还是离体测量等方面都有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis [R]. World Health Org Tech Rep Ser 843, 1994, 843: 5-6.
- [2] 冯燕茹,黄庆森. 老年性骨质疏松症诊断的进展 [J]. 中国骨伤, 2001, 14(11): 682-684.
- [3] 王军. 老年性骨质疏松的危险因素发病机制及防治 [J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(18): 1869-1871.
- [4] 张丽萍,荣海钦,季虹,等. 2 型糖尿病大鼠骨代谢和骨生物力学的观察 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(5): -323.
- [5] 鄯铃,张园月,魏川,等. DXA 骨密度标准体模的研究 [J]. 中国测试, 2009, 35(1): 28-30.
- [6] Ammann P, Rizzoli R, Slosman D, et al. Sequential and precise in vivo measurement of bone mineral density in rats using dual-energy X-ray absorptiometry [J]. J Bone Miner Res, 1992, 7(3): 311-316.
- [7] Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss [J]. Endocrinology, 1989; 124(1): 7-16.
- [8] Iida H, Fukuda S. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and strength at different skeletal sites in male rats [J]. J Vet Med Sci, 2002, 64(1): 29-34.
- [9] 高建军,周轶,顾淑珠,等. 大鼠骨生物学指标的月龄特征 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(2): 143-146.
- [10] 宋敏,李晶. 大鼠骨质疏松模型的复制方法及意义 [J]. 当代医学, 2010, 16(15): 16-18.
- [11] 秦林林,陈金标,龚海洋,等. 不同月龄雌性大鼠骨质疏松模型研究 [J]. 中日友好医院学报, 1997, 11(1): 6-9.
- [12] Gibson GR, Beatty ER, Wang X, et al. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin [J]. Gastroenterology, 1995, 108(4): 975-982.

[收稿日期]2017-10-16