

运动骨代谢动物模型的选择与构建 ——运动骨代谢动物模型研究进展(一)

张 林

(苏州大学 体育学院, 江苏 苏州 215021)

摘 要: 为了解当前运动骨代谢动物模型的研究进展状况, 对骨代谢研究动物模型选择的基本原则、选择模型动物应注意的问题、常用骨代谢实验动物的特点、常用与运动相关骨代谢动物模型的制备和评价指标等方面进行了综述介绍。

关 键 词: 运动骨代谢; 动物模型

中图分类号: G804.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7116(2005)06-0057-03

Choice and establishment of exercise related animal model on osseous metabolism

——The progress of exercise-related animal model on osseous metabolism (I)

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 reviewed the research findings on the principle of the selection of animal model, the consideration of the selection of animal model, the characteristic of the animal used in osseous metabolism experimentation, the preparation and evaluation index of exercise-related animal model.

Key words: exercise-related osseous metabolism; animal model

近年来,运动骨代谢研究已成为运动医学领域的研究热点。在骨代谢基础研究中,正确选择和建立一个理想的骨代谢实验动物模型,是开展运动骨代谢研究工作的基础,本文就目前动物模型的研究进展作一概述。

1 实验动物模型选择的基本原则

在骨代谢研究中,选择实验动物模型一般应考虑如下几个方面的问题:

(1)关联性(Relevance):与人体的骨代谢状况和运动状况相关联,得到的信息能转化为人体的规律。模型动物的骨代谢过程、骨代谢病理改变和转归应与人体的变化相似,相似程度越高,模型价值越大。

(2)适合性(Appropriateness):为研究运动骨代谢中的某一特定问题,应选择适合于该研究的动物和动物模型。从与人类骨代谢变化的相似程度上看,以灵长类动物如猴造模最好,但费用高;小鼠虽来源广,但骨骼太小不易进行各种操作和指标测量;大鼠的骨代谢过程与人类接近,对各种致病因素和治疗药物的反应性与人类基本一致,在复制模型中使用

最多,但仍有许多方面与人类不完全一致,如不易发生自发性骨折、骨重建(bone remodeling)周期较人类短等。

(3)方便性(Convenience):实验动物购买容易、价格便宜、易于饲养,模型复制成功率高,运动实验具有可操作性。

美国食品与医药管理局(FDA)和日本厚生省制订了关于治疗骨质疏松药物的动物模型标准^[1,2],运动干预研究应在实验设计时参照这些标准。另外,从国际上关于对实验动物的要求来看,动物模型制备还应符合伦理学要求。

2 选择模型动物应注意的问题

2.1 模型动物的遗传性状

模型动物的选择应遗传背景明确、遗传性稳定,资料完整便于交流。在决定骨质密度(BMD)的诸因素中,以下几种基因可能和骨质疏松(OP)有关:雌激素受体基因、维生素D受体基因、I型胶原 $\alpha 1$ 基因、转移生长因子 $\beta-1$ 基因及IL-6基因等^[3]。

2.2 模型动物的年龄选择

明确实验动物的生理期,如实验目的是研究成年人骨代

谢的过程,使用生长期动物模型虽然能观察到快速和显著的代谢变化数据,但由于骨代谢状态不同,研究价值不大。在选择不同年龄的模型动物时,应根据实验目的决定,绝经后 OP 模型大鼠的年龄以 3~6 月龄为佳,若要复制老年大鼠骨质疏松模型,应选择 18~24 个月龄大鼠。

2.3 模型动物的性别选择

女性规律的月经周期与雌激素有关,研究绝经后骨质疏松症应选择有规律月经周期的雌性成年动物,目前应用最多的是卵巢切除(OVX)大鼠骨质疏松动物模型。研究男性骨质疏松则大多采用睾丸切除(ORX)大鼠骨质疏松动物模型。

2.4 骨的几何形状和外膜

虽然动物骨骼与人类骨骼名称相同,但骨的形态、骨密度以及皮质骨与松质骨的成分比例并不完全相同。例如人类股骨颈的骨膜并不完整,因此在动物实验中能显著促进骨膜成骨的方法,用于防治人的股骨颈失骨或骨折时可能无效。

2.5 造型时间和运动干预时间

不同造型方法所需的时间不同。秦林林等^[4]对 3 月龄大鼠去卵巢后发现,约 50 d OP 模型可靠形成。Wronski (1991)单纯切除大鼠单侧坐骨神经 7 d 仅观察到骨膜下成骨减少,同时结合低钙饮食,30 h 即可看到骨丢失,72 h 骨质疏松表现即很明显。无论选什么年龄的大鼠来复制 OP 模型,设立无任何处理因素的本底对照组(baseline control)来消除增龄的影响都是必要的。

利用模型动物对运动干预效果进行评价时,要考虑动物的骨重建周期。成年大鼠骨重建周期为 30~40 d,13 月龄老年大鼠骨重建周期在 20~25 d,运动干预时间应在 40 d 以上^[5]。

人体骨重建需要 3~4 个月时间,因此运动干预时间应以 3 个月为 1 周期,至少应 2 个周期以上^[6]。在观察某种药物的防治作用时试验观察期需 12 个月,相当于人的 4 年。

2.6 慎重判定实验结果

人类某些疾病尤其是骨病的变化时间可达数年或数十年不等,但使用动物模型则可在数周或数月内模仿出类似变化,这些改变是否能真正反映出人类疾病的病变特征仍有待进一步研究,尤其是在观察某种药物和运动处方的防治作用时更应慎重。

3 常用与运动相关骨代谢动物模型的制备

骨代谢动物模型的制备在方法上应尽量模拟临床致病因素,以期在发病机理、运动干预等方面获得科学的数据。

3.1 骨吸收增加为主的模型

(1)卵巢切除(OVX)和睾丸切除(ORX)模型。

OVX 模型于 1969 年由 Saville 建立,目前已被公认为研究绝经后妇女骨质疏松症的“gold standard”模型。在造模过程中,动物体重因卵巢切除会有所增加(增重效应),对骨质减少有部分防护作用,可通过设立对照组的方法来消除这种影响。尽管去卵巢成年大鼠模型有许多优点,但考虑到它主要反映妇女绝经后骨质疏松早期阶段的骨丢失与骨代谢特

点,并且骨质疏松症是一个与年龄有关的疾病,所以不能完全替代老年大鼠模型。雄性成熟期大鼠 ORX 术后骨转换增加,反映破骨细胞骨吸收功能的生化指标及骨形态计量学指标均增加,同时伴有小梁骨及皮质骨骨量的净丢失^[7],是研究男性骨代谢的常用动物模型。

OVX 模型在运动骨代谢相关研究中得到广泛应用,利用 ORX 模型研究运动干预效果的报道较少,是一项具有研究前景的课题。

(2)废用性模型。

废用性骨丢失模型,是指人工方法使动物部分肢体处于不负重状态而建立的活体模型。由于动物肢体的骨量和骨代谢与载重、肌肉活动、神经血管对肌肉和骨的营养等因素密切相关,对临床上研究长期卧床及骨折固定等引起的骨代谢有重要的意义。机械固定法骨质疏松模型可用于模拟研究临床截去一侧部分下肢拄拐行走病人的骨代谢变化;悬吊法常用于模拟航天航空人员失重研究,是将动物尾部悬吊,双后肢悬空,让动物靠两前肢载重并在一定范围内活动的方法。以上两种造型方法的优点是在同一动物身上既可研究固定肢失重时骨丢失变化,又可研究承重肢超重时骨代谢变化,去除固定因素后还能观察其恢复过程,对运动损伤的康复有一定的参考价值。手术切除动物一侧坐骨神经或一侧膝腱甚至跟腱也能成功复制废用性骨质疏松模型。Brighton^[8]通过切断坐骨神经建立大鼠废用性 OP 模型,用耦合电场治疗获得了较好效果。

(3)药物性模型。

最常用的药物有糖皮质激素、维甲酸、肝素、酒精等。糖皮质激素既可直接抑制成骨细胞,也可通过降低肠道钙吸收引起继发性甲旁亢,在总体上造成成骨细胞减弱,破骨细胞增强,对研究人类糖皮质激素引起的继发性及男性 OP 有重要意义,尤其在体育锻炼与骨质疏松关系的研究中能获得满意效果。维甲酸是维生素 A 的衍生物,对骨代谢有明显影响,因其制作模型所需时间短,在发病症状、组织形态学表现以及对雌激素的骨反应上与人类有较大的相似性,是大鼠急性骨质疏松的有效造模方法。酗酒、过量应用甲状腺激素及抗凝药物如肝素等,均可诱发骨质减少改变,但能否达到 OP 标准,有待进一步探索。

(4)营养性模型。

通过限制饮食中的钙、VitD,增加磷的摄入,可使骨密度下降,血钙、磷浓度上升,尿钙增加,来复制骨吸收增加模型^[9]。由于其饲料配方复杂,且影响因素较多,难以普及推广,往往作为一种辅助方法,目前结合运动干预的研究较少。

3.2 骨生成减少为主的模型

骨生成减少的模型有助于研究低峰值骨量,低骨转化率,积蓄性骨显微结构受损及骨折危险性增加,并可用于筛选对低转换型,骨生物力学强度受损 OP 患者的有效防治药物和体育锻炼方法。但目前真正的骨生成减少动物模型研究比较少见,人们希望利用早老型动物以及采用将卵巢切除和制动方法联合应用的途径,制成骨生成减少的动物模型,模拟出老年 OP 患者骨重建的变化。

雄鼠增龄模型 1993 年由 Vanders Chueren 提出,现在已得到了初步应用^[10]。Ke 等^[11]将快速生长期的 SD 雄鼠予以 ORX 处理,其中假手术组反映了增龄对雄性大鼠骨骼的影响,结果发现 12~23 月龄出现明显的与年龄相关的骨量减少。这种因增龄引发的骨代谢失衡动物模型,也许更适合于进一步研究雄激素和雌激素对男性骨骼的调节功能以及开发新的防治男性骨质疏松药物和运动干预方法。雄激素与骨骼肌肌力密切相关,有研究应用体育锻炼来预防 ORX 后骨质疏松。Horcajada Molteni 等^[12]发现跑步可防治 ORX 后骨量减少,而 Yao 等^[13]则发现大鼠双后肢直立进食运动不但能增加肌力,还能防止 ORX 后胫骨近端皮质骨和松质骨以及腰椎的骨量丢失。

3.3 转基因模型

近年来,小鼠用于骨基因调控方面的研究引起人们的关注。Okawa(1998)对基因突变小鼠(Tiptoe walking yoshimura 小鼠)进行了研究,发现体内存在不平行钙化现象,颈椎有高度骨化,腰椎发生高转化率的骨质疏松。华盛顿大学的 Lewis 等发现基因工程小鼠(IL-4 基因)的骨架发育正常,但出生后骨质开始丧失,提示 IL-4 可以降低新骨的产生。研究将淋巴细胞特异性近中启动子应用于 1ck 基因造成小鼠异常表达 IL-4,出现了驼背,骨质变细及成骨细胞活性降低等表现,建立了小鼠 OP 模型。日本 Jackson 实验室 1970 年从 AKR/J 小鼠培育成 SAM 小鼠,12 个品系中 9 个品系为 SAM 小鼠,3 个为 SAMR 小鼠。其中 SAMR 小鼠为衰老小鼠,老化较正常小鼠快,有低峰值骨量和中老年骨折的发生趋向^[14]。采用雄激素治疗能够保护雌激素受体 α 基因、敲除小鼠 ORX 后的骨量丢失^[15]。目前利用转基因模型进行运动干预的研究尚未见报道。

参考文献:

- [1] Food and Drug Administration. Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: Division of metabolism and endocrine drug[R]. products Draft, April, 1994.
- [2] 日本厚生省.关于骨质疏松症治疗药物临床评价方法的指导原则[R].平成7年,1995.
- [3] Obenmayer P B, Chararas C, Kotschan S, et al. Genetic background of osteoporosis[J]. Acta Med Austriaca, 2000, 27(1): 18 - 20.
- [4] 秦林林,陈金标,姜海洋,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.
- [5] 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.
- [6] 张林.健骨运动处方的研究与应用[J].体育科学,1999,19(5):50-54.
- [7] Erben R G, Eberle J, Stahr K, et al. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15: 1085 - 1098.
- [8] Brighton C T. Treatment of sciatic denervation disuse osteoporosis in the rat with capacitively coupled electrical stimulation[J]. J Bone Joint Surg(AM), 1985, 67: 1022 - 1025.
- [9] 乔伟伟,许兰文.营养性骨质疏松动物模型的实验研究[J].营养学报,1999,21(2):240-241.
- [10] Zhou H, Ma Y F, Yao W, et al. Lumbar vertebral cancellous bone is capable of responding to PGE2 treatment by stimulating both modeling and remodeling - dependent bone gain in aged male rats[J]. Calcif Tissue Int, 2001, 68: 179 - 184.
- [11] 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.
- [12] Horcajada - Molteni M N, Davicco M J, Coxam V, et al. Treadmill running starting 3 months after orchidectomy restores femoral bone mass in rats[J]. Eur J Appl Physiol, 1999, 79: 251 - 259.
- [13] Yao W, Jee W S, Chen J, et al. Erect bipedal stance exercise partially prevents orchidectomy - induced bone loss in the lumbar vertebrae of rats[J]. Bone, 2000, 27: 667 - 675.
- [14] Takeda T. Senescence accelerated mouse(SAM): a biogerontological resource in aging research[J]. Neurobiol Aging, 1999; 20: 105 - 106.
- [15] Vandenput L, Ederveen A G, Erben R G, et al. Testosterone prevents orchidectomy - induced bone loss in estrogen receptoralpha knockout mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285: 70 - 76.

[编辑:郑植友]