

Syddansk Universitet

## The sheep as a large osteoporotic model for orthopaedic research in humans

Cheng L, Ding M, Li Z, Wang Z

Cheng, L.; Ding, Ming; Li, Z.; Wang, Z.

*Published in:*  
Zhongguo Guzhi Shusong Zazhi

*Publication date:*  
2008

*Document version*  
Også kaldet Forlagets PDF

*Citation for published version (APA):*  
Cheng, L., Ding, M., Li, Z., & Wang, Z. (2008). The sheep as a large osteoporotic model for orthopaedic research in humans: Cheng L, Ding M, Li Z, Wang Z. Zhongguo Guzhi Shusong Zazhi, 14(16), 441-448.

### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

# 羊骨质疏松模型在人类骨科研究中的作用

程立明 丁铭 李子荣 王冉东

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)06-0441-08

**摘要:** 尽管啮齿类小动物目前是骨质疏松最常见的动物模型,大体形动物是研究人类骨质疏松疾病所必需的。羊作为骨质疏松模型有许多优点。羊足够大的体积有利于获得进行各种生化检查的血液和尿液标本和用于组织学检查的骨组织标本,也有利于应用于临床检查的仪器用于羊的相关检查。多因素综合处理的方法是诱导羊骨质疏松模型的最有效的方法。BMD 的最大减少被发现在行 OVX + 限制钙摄入 + 糖皮质激素应用的羊动物模型中。该方法所诱导的羊骨质疏松程度足以达到人类较严重骨质疏松症的程度,有可能成为研究人类骨质疏松的理想模型。羊骨质疏松模型是评估各种药物和其他治疗措施如人工关节置换对骨质疏松及骨质疏松性骨折的防治效果的理想模型。不过,羊作为更为理想的骨质疏松模型,还有一些有待解决的问题。

**关键词:** 羊; 骨质疏松; 模型; 骨科

**The sheep as a large osteoporotic model for orthopaedic research in humans** CHENG Liming<sup>1</sup>, DING Ming<sup>2</sup>, LI Zirong<sup>1</sup>, et al. 1. Dept. of Orthopaedics, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 2. Dept. of Orthopaedics, Odense University Hospital, Clinical Institute, University of Southern Denmark, 5000 Odense C, Denmark

**Abstract:** Although small animals as rodents are very popular animals for osteoporosis models, large animals models are necessary for research of human osteoporotic diseases. Sheep osteoporosis models are becoming more important because of its unique advantages for osteoporosis research. Sheep are docile in nature and large in size, which facilitates obtaining blood samples, urine samples and bone tissue samples for different biochemical tests and histological tests, and surgical manipulation and instrument examinations. Their physiology is similar to humans. To induce osteoporosis, OVX and calcium intake restriction and glucocorticoid application are the most effective methods for sheep osteoporosis model. Sheep osteoporosis model is an ideal animal model for studying various medicines reacting to osteoporosis and other treatment methods such as prosthetic replacement reacting to osteoporotic fracture. However, to be used as the most ideal animal for osteoporosis model, some researches need to be done for sheep. Here, we review the use of sheep as an animal model for human orthopaedic diseases.

**Key words:** Sheep; Osteoporosis; Model; Orthopaedic diseases

骨质疏松是影响老年人健康的重要因素,尤其是绝经后骨质疏松是影响妇女健康的主要问题之一。动物模型不仅有助于理解骨质疏松的发病机制,也有助于开发和评估新的预防和治疗措施。1994年,美国食品药品监督管理局(FDA)要求进行试验性治疗的新药提供以临床剂量和5倍临床剂量在小鼠和一种被证明有效的大动物模型中应用的临床前

期评估资料。因而,大体形动物骨质疏松模型是研究人类骨质疏松疾病所必需的。

## 1 骨质疏松模型的动物选择

尽管鼠、兔、猫、狗、猪、羊和灵长类等动物不同程度被诱导出骨质疏松并被用于人类骨质疏松疾病的研究,但是,它们所诱导骨结构和功能的改变与人类骨质疏松的相关性是不一致的。各种动物有各自的生物学特征和解剖生理特征,应根据研究的不同要求、方法和目的选择不同的动物。

小鼠和大鼠等啮齿类动物是骨质疏松最常见的动物模型<sup>[1]</sup>。然而,啮齿动物也有明显的不足,其骨

基金项目:国家自然科学基金(30772194);广东省自然科学基金博士启动项目(05300746)

作者单位:100029 北京,中日友好医院骨科(程立明、李子荣、王冉东);南丹麦大学附属医院骨科(丁铭)

通讯作者:丁铭,Email:zdclm123@126.com

皮质缺乏 Haversian 系统,且在雌激素缺乏后期不出现成骨细胞功能损害,故其不适合作为研究 OVX 对骨影响的动物<sup>[2]</sup>。体积小,给评估带来困难。

狗是用于人类骨质疏松研究中仅次于啮齿类动物的动物。Ding 等<sup>[3]</sup>发现,双膦酸盐、阿伦膦酸钠明显增加狗骨质密度和改善骨微结构。然而,狗 1 年排卵两次,与人类生殖生理差别较大。动情期没有性激素的波动,卵巢及子宫切除并不能诱发很明显的骨量丢失。

由于体积大、管理和饲养困难,猪不是理想的骨质疏松模型研究动物。不过,小体形猪则克服了这些困难。且与人相似,有恒定的发情周期(18~21 d)和与人类相似的骨结构。然而,小体形猪分布稀少,所需费用高。

豚鼠、猫和兔等动物都被尝试过用于骨质疏松的研究。行 OVX 处理后豚鼠的骨量没有变化。豚鼠也不是理想的糖皮质激素诱导性骨质疏松的动物模型<sup>[4]</sup>。猫虽然是有用的动物模型,然而,由于是宠物,猫用作实验研究的公众可接受度较低<sup>[5]</sup>。兔虽然是医学和生物学研究中广泛应用的动物,但较少有用兔作为去势骨质疏松模型研究的报道。

灵长类动物模型是继大鼠和一种其他大动物的研究后过渡到临床试验的最后实验手段。灵长类动物由于有规律的月经期,器官系统包括骨组织结构和功能与人类相近,因而,灵长类动物很适合作为骨质疏松研究的动物模型<sup>[6]</sup>。不过,也有不足之处:野生灵长类动物携带有传染性病原体,容易传播动物源性疾病;饲养管理要求高;实验操作危险大;作绝经后动物模型时,老龄化的雌性灵长类动物难得到;所需费用昂贵。

羊作为骨质疏松模型日益受到重视。1994 年前,羊很少被用于骨质疏松和其他骨科问题的研究。然而,由于羊所具备的优点正使这一情况得到改变。羊性情温顺、易于饲养和管理;相对较便宜;在草原上群养,既可降低饲养成本,非个体化的饲养方式又使人与有较少的感情联系,对羊作为动物模型的可接受度高;羊可以大量获得,有利于大规模的研究;自发性排卵,激素分泌与女性类似<sup>[7]</sup>;体形大,可以反复获取血、尿标本和骨组织标本,也便于进行人工植入体的研究;有些品种(如美丽奴羊,Merino)整年有循环不断的动情期,这比动情期稀少的动物(如狗)的骨组织对激素缺乏更敏感<sup>[4]</sup>。可见,羊是一种极具潜力的骨质疏松模型动物。在大鼠-大体形动物-人体临床试验这一研究模式中,大体形动物是骨

质疏松模型新药和新的治疗方式研究的必需动物。而在这一群体中,羊有许多突出的优点。因而,羊有望成为骨质疏松研究的重要动物。

## 2 羊骨生物学特点

以羊作为骨质疏松模型研究的动物,必须了解其不同年龄阶段及不同状况的生理生化及结构特点。与其他动物一样,羊的解剖生理特征和机体反应性随年龄增长而有明显的变化。羊性成熟时间 6~7 个月,秋冬两季繁殖,发情周期 17 d,发情时间持续 23 h,妊娠期 149 d,哺乳期 30 d,寿命 10~14 年。年轻羊(3~4 岁)的皮质骨是丛状结构骨,而老年羊(7~9 岁)骨结构可见 Haversian 系统重建。随着羊老化,Haversian 重建首先出现股骨的尾侧,Haversian 重建的其他部位是桡骨干和肱骨干<sup>[8]</sup>。Turner 等<sup>[9]</sup>通过行 OVX 处理,比较青年羊和老年羊的骨质情况,发现它们之间的股骨近端 Sing 指数是不同的。妊娠和哺乳可使骨量减少。

对于骨质疏松相关的生化改变。7 岁羊血清骨钙素(osteocalcin, OC)水平相似于 65 岁的妇女<sup>[10]</sup>。其肽构型与人有高度的同源性<sup>[4]</sup>,且密切相关于羊骨组织形态测量。在各种情况下,人和羊成骨细胞对 OC 的反应是相似的。象人类一样,羊血清 OC 水平在生长期较高,且随年龄增长而下降。孕产期,羊成骨细胞功能经历了明显变化。在产前,血清骨钙素维持较低水平<sup>[11]</sup>。对于骨转换标记物的昼夜变化,人与羊极为相似,转换活性在夜间后期或凌晨增高<sup>[4]</sup>。骨代谢的季节性变化也被注意到。瑞士 Arens 等<sup>[12]</sup>观察到,在冬季羊骨密度最低,春季和夏季骨密度升高。

幼年羊与成年羊对实验的敏感性不同,对药物的毒性反应也有差异。在生物学行为和结构特点方面,年轻羊骨骼不能代表成年羊。制备骨质疏松模型应该使用大于 3.5 岁的骨骼成熟的羊<sup>[13]</sup>。

## 3 羊骨质疏松模型的诱导及其应用现状

### 3.1 羊骨质疏松模型的诱导

羊原发性骨质疏松并不常见。在上个世纪 60、70 年代,有一些作者注意到,营养问题和有害物质的摄入会导致骨营养不良、骨质疏松。咬合不良、哺乳以及铜缺乏饲料喂养的羊有骨质疏松的表现。而铅摄入可以导致幼羊骨质疏松,氨喋呤可以诱导胎羊骨质疏松<sup>[14]</sup>。在 80 年代,进一步研究发现,在老龄羊,牙齿的磨损和脱落导致体质逐渐衰弱,骨量丢

失、骨质疏松伴随产生<sup>[15]</sup>。这时,应用羊动物模型进行骨质疏松的研究也已开始。

在行卵巢切除术(ovariectomy, OVX)的母羊动物模型中,骨转换加快。在90年代,有更多的去卵巢动物模型的研究。Chavassieux<sup>[15]</sup>发现,行OVX处理后10w到6个月,羊骨形成持续减少。这些研究进一步证实,OVX可以诱导羊骨质疏松的发生。OVX已成为最常用的羊骨质疏松模型。然而,一些实验研究显示,在羊OVX骨质疏松模型中<sup>[16]</sup>,BMD减少约10%,而严重的人类骨质疏松BMD减少超过20%~30%。所以,羊OVX骨质疏松程度不符合严重骨质疏松模型的要求。限制钙/维生素D的摄入可以加强羊行OVX术后BMD降低的效果。有研究显示,钙摄入减少可大大地增强由于雌激素缺乏所导致的骨量丢失效果<sup>[17]</sup>。食物诱导的代谢性酸性物质过多也可增强行OVX处理的羊BMD降低的效果<sup>[18]</sup>。

已发现糖皮质激素对羊骨组织有类似于对人骨组织的作用<sup>[19]</sup>。骨量减少在糖皮质激素处理后6个月内被诱导产生,并在终止应用的随后6个月维持这一效果<sup>[20]</sup>。Goldhahn J等<sup>[21]</sup>发现,在停止应用糖皮质激素后BMD的恢复速度明显慢于糖皮质激素应用时BMD的下降速度。因此,这为骨质疏松性骨折的假体植入实验提供了足够的时间窗口。然而,尽管单独行糖皮质激素处理3个月的羊导致明显的动态骨形成生化参数减少、骨吸收生化参数增加,但是,骨显微结构并不受影响,这可能与受糖皮质激素作用时间短有关。单独行糖皮质激素处理4个月的羊并不引起明显的骨质完整性和骨强度破坏<sup>[22]</sup>。不过,国内有报道<sup>[23]</sup>用山羊行OVX处理后60d可见骨小梁数量轻度减少,相互连接分离;处理后120~180d骨小梁数量进一步减少,骨小梁变细,宽度降低,骨髓腔扩大。

OVX结合糖皮质激素处理使羊BMD明显减少。Lill等<sup>[17]</sup>在对羊行OVX术结合应用甲基强的松龙的动物模型中,骨BMD显著地减少了40%。Augat等<sup>[20]</sup>发现,在行OVX处理的羊与对照组羊之间,小梁骨表面BMD没有区别。然而,行OVX+糖皮质激素处理的羊与对照组羊相比,小梁骨表面BMD有明显下降,在处理6个月时下降了27%,在12个月时下降了33%。同时有力学特性的降低,弹性压力模量在6个月时降低了36%,在12个月时降低了62%。单独行OVX处理的羊其小梁骨力学特性没有明显的变化。与对照组比较,行OVX+糖皮质激素

处理的羊小梁骨三维结构有显著的不同,在处理6个月时小梁骨体积和小梁骨厚度减少了30%,骨表面/体积比增加了40%。而单独行OVX处理的羊在处理6个月时小梁骨体积和小梁骨厚度变化不明显。然而,最近的研究显示,单独行OVX处理的羊在术后12个月小梁骨三维结构有明显变化。小梁骨体积和厚度明显减少,小梁骨间隔增加,并且,血清17-雌二醇浓度明显降低,血清骨钙素浓度和尿脱氧吡啶酚浓度明显增高<sup>[24]</sup>。也就是说,如果有足够的作用时间,单独行OVX处理的羊可以有小梁骨结构的明显变化。BMD的最大减少被发现在行OVX+限制钙摄入+糖皮质激素应用的羊动物模型中。Lill等<sup>[17]</sup>观察到,松质骨BMD减少了58%,而皮质骨BMD也减少了22%。因而认为,多因素综合处理的方法是诱导羊骨质疏松模型的最有效的方法。该方法所诱导的羊骨质疏松程度足以达到人类较严重骨质疏松症的程度,有可能成为研究人类骨质疏松的理想模型。

废用性骨质疏松模型有助于局部骨质疏松的研究。Thomas等<sup>[25]</sup>应用外固定方法制动踝关节12w,经组织形态计量学检测制动侧跟骨小梁骨体积减少了29%。而Skerry等<sup>[26]</sup>应用外固定方法制动踝关节12w,跟骨BMC下降了22%。因而,局部制动是用于建立并研究局部骨质疏松模型的较好的方法。

### 3.2 羊骨质疏松模型在骨科研究中的应用

骨质疏松和继发于骨质疏松的骨骼损伤的适当治疗需要以了解机体和疏松化骨质对不同药物、生物材料以及其他治疗方法的作用效果为前提。必须了解疏松化骨质的结构特性、骨折的发生机制以及骨折愈合机理和愈合方式。

在研究不同药物对实验性羊骨质疏松的反应中,早在1979年Whitelaw<sup>[14]</sup>就证明,补充铜剂可使因低铜饮食诱导的母羊体重减轻和骨质疏松有所缓解。Hornby等<sup>[15]</sup>在母羊行OVX术后15个月观察到总BMD下降,之后持续38w给予雌二醇,总BMD下降受阻。Turner等<sup>[27]</sup>也应用OVX骨质疏松模型观察雌二醇对羊骨局部BMD的影响,发现12个月跟骨、桡骨和腰5椎BMD明显上升。可见,象妇女应用激素替代疗法防治绝经后骨质疏松一样,雌激素也能有效地防治OVX诱导的羊骨质疏松。Chavassieux等<sup>[28]</sup>利用羊模型评估一种新的选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulator, SERM)MDL对骨重建的作用,发现MDL明显抑制了骨转换,增加了BMD,提示该选择性雌激素受体可

以预防绝经后骨量丢失。甲状旁腺激素 (Parathyroid hormone, PTH) 是骨转换刺激剂, 有增加小梁骨骨量的合成代谢作用。然而, 由于同时有增加骨吸收和皮质骨损害的作用, 其在临床中用于防治骨质疏松受限。Delmas 等<sup>[29]</sup> 分析了在老龄雌羊中同时应用 PTH 与双膦酸盐对骨转换的作用效果。结果显示, 在骨重建活性与老龄人极其相似的母羊中, 与双膦酸盐同时使用, PTH 并不能维持对骨组织的合成代谢作用, 这与 PTH 对鼠骨质的作用明显不同。氟对羊骨骼的作用也有报告<sup>[5]</sup>。利用废用性骨质疏松模型, 可以评估药物和其他治疗措施对局部骨质疏松的预防和治疗作用。Thomas 等<sup>[25]</sup> 发现鲑鱼降钙素对羊模型中局部废用性骨质疏松无明显的预防作用。

羊骨质疏松模型也用于研究物理刺激对骨骼代谢的影响。Skerry 等<sup>[26]</sup> 发现, 制动期间的短期制动中断 (每天运动 20 min) 并不能阻止骨量的丢失。Rubin 等<sup>[30]</sup> 利用成年母羊进行低幅度力学刺激实验, 发现遭受震动刺激传导的部位 BMD 增加。由于羊的温顺性, 易于受训站立于这种特制的装置中, 而其他大动物很难适应这类研究。

骨折固定的足够稳定是负重肢体骨折治疗的基本要求, 而这对骨质疏松性骨折的治疗来说却是一个具有挑战性的问题。负重肢体中假体与疏松性骨质的界面整合也是有待解决的问题。羊是评估植入材料的理想的骨质疏松模型动物<sup>[31]</sup>。发生于羊髌关节的作用力与人类的有可比性<sup>[32]</sup>。在骨质疏松性骨折患者的治疗中, 要使骨骼与植入物界面达到生物学稳定是一个有挑战性的问题。Turner 等<sup>[33]</sup> 发现, 行 OVX 处理的老龄羊股骨远端是用于检测陶瓷涂层如羟基磷灰石 (HA) 在骨质疏松骨骼中应用的有效性的良好模型。陶瓷涂层的假体在置入后的 6 个月在骨质疏松性和正常股骨远端与骨的整合有改善。且在骨质疏松性骨质中, 生物学固定的改善更为明显<sup>[13]</sup>。行 OVX 处理的羊股骨远端的骨量减少的环境是评估各种植入物、不同的涂层及生长因子的作用效果的理想部位<sup>[34]</sup>。羊骨质疏松性骨骼在调查生物材料中有重要的应用价值, 仔细评估植入体内的生物材料周围骨组织的生长情况及骨组织成熟度对生物材料的研究有重要的意义。

在脊椎骨, 椎弓根螺钉固定是脊柱病变中如椎间盘退变、失稳、感染和肿瘤常用的治疗方法。Weinhold 等<sup>[35]</sup> 应用非破坏性震动实验方法研究母羊脊椎松质骨定向力学特性, 发现羊脊椎松质骨与人

类有相似的物理和力学特性, 可用于人类脊椎骨有关物理和力学特性的研究。Turner 等<sup>[36]</sup> 发现, 行 OVX 处理后, 羊腰椎 BMD 明显下降。Aldini 等<sup>[37]</sup> 和 Fini 等<sup>[38]</sup> 通过实验研究表明, 羊是研究人类骨质疏松性脊椎骨内置物生物学行为以及物理和力学特性的良好模型。具有骨传导功能的 HA 涂层可改善椎弓根螺钉的骨组织长入和矿化。不管材料表面特性如何, 骨质疏松明显影响螺钉周边骨组织长入过程。

椎体成形是椎体骨质疏松性骨折的治疗方法之一。传统的经皮椎体成形术是将聚甲基丙烯酸甲酯 PMMA (polymethylmethacrylate cement) 注入椎体内, 有外逸和热损伤神经和其他局部组织的危险。而有骨传导作用的生物陶瓷有重建椎体的功能, 且不发热, 有类似于骨的化学结构, 是一种有前途的骨填充替代物, 可作为骨质疏松性脊椎骨折的充填物。且可作为骨形态发生蛋白如重组骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) 和重组骨形态发生蛋白-7 (rhBMP-7) 的载体。这类充填物是否有不良作用需要进行进一步的研究, 羊是非常有潜力的研究椎体成形治疗方法的大体动物<sup>[39]</sup>。

## 4 羊骨质疏松评估技术方法

羊足够大的体积有利于获得进行各种生化检查的血液和尿液标本和用于组织学检查的骨组织标本, 也有利于应用于临床检查的仪器用于羊的相关检查。

### 4.1 有关骨质疏松的生化检查

这涉及到骨质疏松的生化改变, 羊比其他大动物更具特征性。因而, 骨转换标记物的生化检查对于评估羊骨质疏松的变化程度有重要意义。放射性免疫分析技术显示由成骨细胞产生的血清骨钙素 (OC) 水平象人类一样随年龄而变化<sup>[10]</sup>。骨特异性碱性磷酸酶 (bone-specific alkaline phosphatase, BSAP) 涉及骨形成和骨矿化。行 OVX 处理的羊骨特异性碱性磷酸酶活性增高, 与人老化状况尤其是妇女绝经相一致。Turner 等<sup>[36]</sup> 报告 ERT 可以明显降低对照组和骨质疏松模型羊 BSAP 水平。羊尿中的胶原吡啶酚 (pyridinoline) 和羟基脯氨酸 (hydroxyproline) 水平反应了骨吸收的程度<sup>[29]</sup>, 哺乳和施加糖皮质激素及 OVX 处理都可以使其尿液中的水平发生改变。

型胶原合成和分解片段如 型胶原羧基端前肽 (PICP) 和 型原胶原羧基端前肽 (ICTP) 可能最能反应骨转换情况。这些生化标记物在使用羊作为骨质疏松动物模型、监测新的治疗方案中有重要的

作用<sup>[40]</sup>。

#### 4.2 有关骨质疏松的形态、结构和矿物含量的评估

骨组织由具有特定构象的矿物质和有机质组成。骨骼的力学特性既依赖于其材料特性也有赖于其几何特性,即其结构、构象和空间分布。有许多方法应用于骨质疏松的形态、结构和矿物含量的评估。

传统的 X 线摄影、显微 X 线摄影及放射照片测量学是最早用来检测骨骼变化的方法。X 线照片法的敏感性低,只有在骨量丢失超过 30%~40% 时才显示。

在骨量测定方面,单光子吸收法(single photon absorptiometry, SPA)由于不能检测软组织丰富的部位如腰椎和髌骨限制了它的使用,而双光子吸收法(dual photon absorptiometry, DPA)由于照射剂量大和检测时间长也已渐少应用。双能量 X 线吸收测量法(dual energy X-ray absorptiometer, DXA)可直接测定体内骨组织与软组织的构成比例,比 DPA 具有更好的准确性和精确性。DXA 对动态检测骨 BMD 的变化有较好的作用。然而,Rueggsegger<sup>[41]</sup>认为,DXA 的图像不具备诊断品质,建议同时做补充性 X-线检查以避免误读。定量计算机断层扫描(quantitative computed tomography, QCT)则是更为精确的仪器。与 DPA 和 DXA 相比,QCT 和周围骨 QCT(peripheral QCT, pQCT)既可提供精确的三维解剖结构,又可准确地检测感兴趣区的 BMC 和体积 BMD,是目前惟一能够选择性地测量小梁骨和皮质骨骨量的方法<sup>[41]</sup>。由于 pQCT 能更灵敏地反应骨密度的变化,因而可能允许更短的动物实验期和更经济的研究方法。定量磁共振虽然也可用于骨量检测<sup>[42]</sup>,但目前还不是一种成熟的方法。BMD 检查的精密仪器如 DXA 或 pQCT,尽管设计为人类临床应用,由于大小的相似性,也很适宜于羊中轴骨和附肢骨的检查<sup>[43]</sup>。在羊骨质疏松模型中的应用显示<sup>[44]</sup>,DXA 能敏锐反应羊骨量的变化。对于纵向研究,要可复性地检查动物骨骼同一感兴趣区的 BMD 是一个具有挑战性的问题。应用定位仪可以改善离体羊骨检查的精确度<sup>[43]</sup>。

骨量减少伴随有骨结构的变化,继而导致力学强度下降。骨力学强度不仅依赖于骨量,也依赖于骨结构。对绝经后骨骼变化的研究发现,在骨密度显著下降之前,骨小梁的连续性丢失已经发生,骨小梁的连续性比骨密度更敏感<sup>[45]</sup>。Ding 等<sup>[46]</sup>认为,骨物理特性是力学特性的主要决定因素。小梁骨显微结构关键参数的测量对骨质疏松及骨强度的研究是

极其重要的,而基于 BMD 的测量方法不能提供这些信息。上世纪 70 年代发展起来的骨组织形态计量学技术,可定量观察骨组织的变化,是骨质疏松诊断和药物疗效评估的最重要手段之一<sup>[47]</sup>。该技术可以提供成骨细胞和破骨细胞的形态与活性、骨量的改变以及骨转换率和骨结构等多方面的信息,判断骨重建的进程,评价骨小梁微观结构变化,对防治骨质疏松新药疗效的评估有重要意义。有些药物并不使骨髓随 BMD 的增加而改善力学性能,骨形态可以对此作出及早和有效的判断。在羊骨质疏松模型中,骨组织形态计量学被用于研究药物诱导、制动及 OVX 处理对骨质显微结构的影响,并评估药物对羊骨质疏松的防治效果以及假体和内固定材料对骨质的作用<sup>[34]</sup>。

随着计算机技术的发展,对骨小梁三维(three dimensions, 3-D)重建进行分析,可以从根本上提高骨量计量的准确性。近代 3-D 成像技术的发展使松质骨显微结构的 3-D 量化成为可能。结构参数,如结构的各向异性、连接性和小梁骨厚度等可以直接从 3-D 图像中计算出来。1990 年 Kuhn 等<sup>[48]</sup>注意到,显微计算机断层摄影(micro-CT)检测骨小梁结构,其精确性和准确性都非常好。Micro-CT 用于研究人类老化与骨小梁结构的变化<sup>[49]</sup>、骨关节炎中骨小梁显微结构的变化<sup>[50]</sup>,用于研究 PTH 处理、双膦酸盐处理和 ERT 处理后骨显微结构的变化以及小鼠、大鼠、狗等动物骨质疏松模型中骨显微结构的变化<sup>[51]</sup>。应用 micro-CT 技术和新颖的 3-D 方法,可以对松质骨骨小梁的厚度和结构类型进行量化分析<sup>[49]</sup>。Ding 等<sup>[3,51]</sup>通过实验研究表明,双膦酸盐可以增强狗骨骼的力学特性,改善松质骨 3-D 显微结构和物理特性,继而降低骨折的风险。在羊骨质疏松模型研究中,micro-CT 也显示了其强大的优势<sup>[52-54]</sup>。有研究显示,OVX 和糖皮质激素等多因素结合处理的羊在 BMD 下降最明显的同时,骨 3-D 显微结构改变也最为明显<sup>[52]</sup>。在羊骨质疏松模型中,骨密度、显微结构参数及力学特性之间有良好的相关性。近年来,micro-MRI 也被用于评估骨显微结构<sup>[55,56]</sup>。羊股骨颈松质骨结构可在 MRI 图像中清晰显示。这些显微结构的检测方法使产生精确的骨 3-D 结构量化结果,偏差小,可以直接了解不同状况下的骨组织 3-D 结构的变化情况以避免间接的推测,有利于理解骨质疏松的发病机制和骨显微结构与力学特性的关系。

## 5 总结与未来研究方向

总之,在骨质疏松动物模型研究中,与其他大动物如猪、狗和非灵长类相比,羊是一种更经济、更有实用价值和方便实验操作的动物。其骨生物学特点在许多方面与人类相似。实验表明,导致人类骨质疏松的因素同样能引起羊产生骨质疏松。OVX、低钙饮食和糖皮质激素应用等综合因素处理是最有效的羊骨质疏松模型的诱导方法,它可以使羊产生类似于人类严重骨质疏松症的骨代谢、结构和力学性能的变化。羊骨质疏松模型是评估各种药物和其他治疗措施如人工关节置换对骨质疏松及骨质疏松性骨折的防治效果的理想模型。

不过,还有一些有待解决的问题。股骨是假体和内固定物材料常用的实验部位,股骨的不同部位其骨重建、骨代谢的活跃程度有待搞清楚。羊骨组织代谢有季节性和日节律性波动,骨密度、生化指标及组织形态学指标如何随着季节和日节律变化而发生改变?这也是有待进一步研究的内容。如何排除外界因素如繁殖、饲食、活动量及接受阳光的多少等对骨量丢失的影响也有待进行更多的研究。峰值骨量的年龄有待更准确和更精确地认定。与年龄和性别相关的BMD、各种生化指标、结构参数和力学参数的参考标准也有待确立。不同的研究目的可能要求不同类型的骨质疏松模型。目的特异性的标准制模方法可能也是未来的研究方向。假体材料、内固定材料、生物填充材料和组织工程化骨的理想实验部位也值得探讨。

在药物诱导的骨质疏松模型方面,除糖皮质激素被证明是常用而有效的骨质疏松诱导剂之外,其他的一些药物也被用于制造骨质疏松动物模型。如:通过增强骨吸收活性的维甲酸模型、拮抗雄性激素的Casodex模型、促性腺激素分泌激素GnRH模型和促黄体素分泌激素类似物buserelin模型等。注射谷氨酸钠也可引起大鼠骨质疏松<sup>[57]</sup>。这些药物对羊骨代谢如何、是否也会引起明显的骨质疏松,都是有待研究的问题。

尽管男性骨质疏松是日益增长的问题,大部分骨质疏松模型由雌性动物制备。雄性动物作为骨质疏松模型对于男性骨质疏松的研究有更直接的帮助。尽管公羊的可获得性是一个限制性因素,公羊作为研究男性老年骨质疏松症的动物模型是有价值的。

## 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Barlet JP, Coxam V, Davicco M, et al. Animal models of postmenopausal osteoporosis. [ French ] *Reproduction, Nutrition, Development*, 1994, 34(3) :221-236.
- [ 2 ] Wronski T, Yen CF. Anabolic effects of parathyroid hormone on cortical bone in ovariectomized rats. *Bone*, 1994, 15(1) :51-58.
- [ 3 ] Ding M, Day JS, Burr DB, et al. Canine cancellous bone microarchitecture after one year of high-dose bisphosphonates. *Calcified Tissue International*, 2003, 72(6) :737-744.
- [ 4 ] O'Connell SL. The sheep as an experimental model for osteoporosis. Doctoral Thesis, Department of Medicine, The University of Melbourne, Australia, 1999.
- [ 5 ] Chavassieux P. Bone effects of fluoride in animal models *in vivo*. A review and a recent study. *Journal of Bone & Mineral Research*, 1990, 5 (Suppl 1) :s95-s99.
- [ 6 ] Stroup GB, Hoffman SJ, Vasko-Moser JA, et al. Changes in bone turnover following gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist administration and estrogen treatment in cynomolgus monkeys: a short-term model for evaluation of antiresorptive therapy. *Bone*, 2001, 28(5) :532-537.
- [ 7 ] Goodman RL. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: *Physiology of Reproduction* (2nd ed.). Knobil E, Neill J (eds.). Raven Press, New York, NY. 659-709.
- [ 8 ] Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*, 1995, 16(Suppl4) :s277-s284.
- [ 9 ] Turner AS, Park RD, Aberman HM, et al. effects of age and ovariectomy on trabecular bone of the proximal femur and iliac crest in sheep. *Proc Orthop Res Soc*, San Francisco, CA. 548.
- [ 10 ] Pastoureau P, Meunier PJ, Delmas PD. Serum osteocalcin (bone Gla-protein), an index of bone growth in lambs. Comparison with age-related histomorphometric changes. *Bone*, 1991, 12(3) :143-149.
- [ 11 ] Farrugia W, Fortune CL, Heath J, et al. Osteocalcin as an index of osteoblast function during and after ovine pregnancy. *Endocrinology*, 1989, 125(3) :1705-1710.
- [ 12 ] Arens D, Sigrist I, Alini M, et al. Seasonal changes in bone metabolism in sheep. *Vet J*, 2007, 174(3) :585-591.
- [ 13 ] Turner AS. Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *European Cells & Materials*, 2001, 1 :66-81.
- [ 14 ] Whitelaw A, Armstrong RH, Evans CC, et al. A study of the effects of copper deficiency in Scottish blackface lambs on improved hill pasture. *Veterinary Record*, 1979, 104(20) :455-460.
- [ 15 ] Atkinson PJ, Spence JA, Aitchison G, et al. Mandibular bone in ageing sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 1982, 92(1) :51-67.
- [ 16 ] Hornby SB, Ford SL, Mase CA, et al. Skeletal changes in the ovariectomized ewe and subsequent response to treatment with 17 beta oestradiol. *Bone*, 1995, 17(4 Suppl) :s389-s394.
- [ 17 ] Lill CA, Fluegel AK, Schneider E. Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: a pilot study. *Osteoporosis International*, 2002, 13(6) :480-

- 486.
- [18] MacLeay JM, Olson JD, Enns RM, et al. Dietary-induced metabolic acidosis decreases bone mineral density in mature ovariectomized ewes. *Calcified Tissue International*, 2004, 75(5):431-437.
- [19] Chavassieux P, Pastoureaux P, Chapuy MC, et al. Glucocorticoid-induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewes: a biochemical and histomorphometric study. *Osteoporosis International*, 1993, 3(2):97-102.
- [20] Augat P, Schorlemmer S, Gohl C, et al. Glucocorticoid-treated sheep as a model for osteopenic trabecular bone in biomaterials research. *J Biomed Mater Res*, 2003, 66A:457-462.
- [21] Goldhahn J, Jenet A, Schneider E, et al. Slow rebound of cancellous bone after mainly steroid-induced osteoporosis in ovariectomized sheep. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 2005, 19(1):23-28.
- [22] Deloffre P, Hans D, Rumelhart C, et al. Comparison between bone density and bone strength in glucocorticoid-treated aged ewes. *Bone*, 1995, 17(4 Suppl):s409-s414.
- [23] 李良, 陈槐卿. 建立骨质疏松山羊模型初探. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4(2):82-95.
- [24] Newton BI, Cooper RC, Gilbert JA, et al. The ovariectomized sheep as a model for human bone loss. *Journal of Comparative Pathology*, 2004, 130(4):323-326.
- [25] Thomas T, Skerry TM, Vico L, et al. Ineffectiveness of calcitonin on a local-disease osteoporosis in the sheep: a histomorphometric study. *Calcified Tissue International*, 1995, 57(3):224-228.
- [26] Skerry TM, Lanyon LE. Interruption of disuse by short duration walking exercise does not prevent bone loss in the sheep calcaneus. *Bone*, 1995, 16(2):269-274.
- [27] Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, et al. Dose-response effects of estradiol implants on bone mineral density in ovariectomized ewes. *Bone*, 1995, 17(4 Suppl):s421-s427.
- [28] Chavassieux P, Garnero P, Duboeuf F, et al. Effects of a new selective estrogen receptor modulator (MDL 103,323) on cancellous and cortical bone in ovariectomized ewes: a biochemical, histomorphometric, and densitometric study. *Journal of Bone & Mineral Research*, 2001, 16(1):89-96.
- [29] Delmas PD, Vergnaud P, Arlot ME, et al. The anabolic effect of human PTH (1-34) on bone formation is blunted when bone resorption is inhibited by the bisphosphonate tiludronate— is activated resorption a prerequisite for the *in vivo* effect of PTH on formation in a remodeling system?. *Bone*, 1995, 16(6):603-610.
- [30] Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, et al. Site-specific increase in bone density stimulated non-invasively by extremely low magnitude thirty Hertz mechanical stimulation. *Proc Orthop Res Soc*, San Francisco, CA. 1997, 110.
- [31] Bruns DP, Blunn ML, Litsky AS. Technique and results for total hip replacement in sheep: An experimental model. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 1996, 9:158-164.
- [32] Bergmann G, Siraky J, Rohlmann A. A comparison of hip joint forces in sheep, dog and man. *J Biomechanics*, 1984, 17(12):907-921.
- [33] Turner AS, Eckhoff DG, Dewell RD, et al. Peri-apatite-coated implants improve fixation in osteopenic. *Proc Orthop Res Soc*, New Leans, LA. 4.
- [34] Fini M, Gavaresi G, Rimondini L, et al. Titanium alloy osseointegration in cancellous and cortical bone of ovariectomized animals: histomorphometric and bone hardness measurements. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2002, 17(1):28-37.
- [35] Weinhold PS, Roe SC, Gilbert JA, et al. Assessment of the directional elastic moduli of ewe vertebral cancellous bone by vibrational testing. *Annals of Biomedical Engineering*, 1999, 27(1):103-110.
- [36] Turner AS, Alvis M, Myers W, et al. Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. *Bone*, 1995, 17(4 Suppl):s395-s402.
- [37] Aldini NN, Fini M, Gavaresi G, et al. Pedicular fixation in the osteoporotic spine: a pilot *in vivo* study on long-term ovariectomized sheep. *Journal of Orthopaedic Research*, 2002, 20(6):1217-1224.
- [38] Fini M, Gavaresi G, Greggi T, et al. Biological assessment of the bone-screw interface after insertion of uncoated and hydroxyapatite-coated pedicular screws in the osteopenic sheep. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 2003, 66(1):176-183.
- [39] Wu ZX, Wei L, Hu YY, et al. Staged-injection procedure to prevent cement leakage during vertebroplasty: an *in vitro* study. *Spine*, 2007, 32(22):2437-2442.
- [40] Sigrist IM, Gerhardt C, Alini M, et al. The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep. *J Bone Miner Metab*, 2007, 25(1):28-35.
- [41] Rueggsegger P. The use of bone density measurements in the diagnosis and therapy of osteoporosis. [German] *Therapeutische Umschau*, 1991, 48(2):113-119.
- [42] Bohic S, Rey C, Legrand A, et al. Characterization of the trabecular rat bone mineral: effect of ovariectomy and bisphosphonate treatment. *Bone*, 2000, 26(4):341-348.
- [43] Kaymakci B, Wark JD. Precise accurate mineral measurements of excised sheep bones using X-ray densitometry. *Bone & Mineral*, 1994, 25(3):231-246.
- [44] Thorndike EA, Turner AS. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Frontiers in Bioscience*, 1998, 3:17-26.
- [45] Takagi Y, Fujii Y, Miyauchi A, et al. Transmenopausal change of trabecular bone density and structural pattern assessed by peripheral quantitative computed tomography in Japanese women. *Journal of Bone & Mineral Research*, 1995, 10(11):1830-1834.
- [46] Ding M, Dalstra M, Danielsen CC, et al. Age variations in the properties of human tibial trabecular bone. *Journal of Bone & Joint Surgery-British Volume*, 1997, 79(6):995-1002.
- [47] Meunier P, Courpron P, Groux JM, et al. Bone histomorphometry as applied to research on osteoporosis and to the diagnosis of "hyperostoidosis states". *Calcified Tissue Research*, 1976, 21(Suppl):354-360.
- [48] Ding M, Odgaard A, Hvid I. Accuracy of cancellous bone volume fraction measured by micro-CT scanning. *Journal of Biomechanics*, 1999, 32(3):323-326.

(下转第 380 页)



一些学者认为是骨骼发育、生长、重塑及维护关节功能的关键环节<sup>[5]</sup>。在骨的微环境中,有许多生长因子参与调控软骨细胞的代谢,其中 IGFs 具有重要调节作用<sup>[6]</sup>。IGFs 家族是由两种多肽(IGF-I、IGF-2)、两种受体及 6 种 IGFBPs 所构成;IGFs 的生物学效应与 IGFBPs 关系密切。IGFBPs 可稳定 IGFs 的水平,使其半衰期延长,但以剂量依赖方式抑制 IGFs 生物活性。IGFBP-6 蛋白 N-末端 GCAEAxxC 结构可以结合 IGF-2 并特异性地抑制其生物活性。IGFBP-6 还通过 C-末端 heparin 位点结合于细胞表面或细胞外基质,可能参与细胞内特定的信号传导途径,发挥负性调控细胞的增殖与凋亡、核糖体的合成、氨基酸的摄入及利用等重要生理过程<sup>[7]</sup>。Bienvenu 等<sup>[8]</sup>研究发现,IGFBP-6 转基因小鼠出现大脑与小脑发育迟缓,生殖发育异常,且伴有体重降低等改变。本研究显示  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 浓度的维甲酸诱导软骨细胞凋亡、负性调节软骨细胞代谢的过程中,IGFBP-6 在基因的转录和翻译水平的表达明显升高。因此我们推测,作为维甲酸的靶基因,IGFBP-6 与软骨细胞生长代谢密切相关,维甲酸调节 IGF 家族成员 IGFBP-6 的表达,可能是其参与软骨组织代谢的作用机制之一。

### 【参 考 文 献】

[1] Lisignoli G, Grassi F, Zini N, et al. Anti-Fas-induced apoptosis in

chondrocytes reduced by hyaluronan: evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) involvement. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(8):1800-1807.

[2] Jia D, Heersche JN. Expression of insulin-like growth factor system constituents in differentiating rat osteoblastic cell populations. *Growth Horm IGF Res*, 2002, 12(6):399-410.

[3] Gao L, Zhao YY, Zhao YY, et al. Toxic effects of TCDD on osteogenesis through altering igfbp-6 gene expression in osteoblasts. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(11):2018-2026.

[4] Gømaa MS, Yee SW, Millbourne CE, et al. Homology model of human retinoic acid metabolising enzyme cytochrome P450 26A1 (CYP26A1): active site architecture and ligand binding. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2006, 21(4):361-369.

[5] Adams CS, Shapiro IM. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002, 13(6):465-473.

[6] Long F, Joeng KS, Xuan S, et al. Independent regulation of skeletal growth by Ihh and IGF signaling. *Dev Biol*, 2006, 298(1):327-333.

[7] De Los Rios P, Hill DJ. Expression and release of insulin-like growth factor binding proteins in isolated epiphyseal growth plate chondrocytes from the ovine fetus. *J Cell Physiol*, 2000, 183(2):172-181.

[8] Bienvenu G, Seurin D, Grelhier P, et al. Insulin-like growth factor binding protein-6 transgenic mice: postnatal growth, brain development, and reproduction abnormalities. *Endocrinology*, 2004, 145(5):2412-2420.

(收稿日期:2007-12-17)

### (上接第 447 页)

[49] Ding M, Hvid I. Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone. *Bone*, 2000, 26(3):291-295.

[50] Ding M, Odgaard A, Hvid I. Changes in the three-dimensional microstructure of human tibial cancellous bone in early osteoarthritis. *Journal of Bone & Joint Surgery-British Volume*, 2003, 85(6):906-912.

[51] Ding M, Day JS, Burr DB, et al. Orthopaedic Research Laboratory, Canine cancellous bone microarchitecture after one year of high-dose bisphosphonates. *Calcified Tissue International*, 2003, 72(6):737-744.

[52] Lill CA, Fluegel AK, Schneider E. Sheep model for fracture treatment in osteoporotic bone: a pilot study about different induction regimens. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 2000, 14(8):559-566.

[53] Mitra E, Rubin C, Qin YX. Interrelationship of trabecular

mechanical and microstructural properties in sheep trabecular bone. *J Biomech*, 2005, 38(6):1229-1237.

[54] Rubin C, Turner AS, Müller R, et al. Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(2):349-357.

[55] Wehrli FW, Saha PK, Gømberg BR, et al. Role of magnetic resonance for assessing structure and function of trabecular bone. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, 2002, 13(5):335-355.

[56] Jiang Y, Zhao J, Geusens P, et al. Femoral neck trabecular microstructure in ovariectomized ewes treated with calcitonin: MRI microscopic evaluation. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(1):125-130.

[57] 刘浩宇,刘锡仪. 新生期大鼠注射谷氨酸钠后导致骨质疏松. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6(4):10-12.

(收稿日期:2008-03-28)