

# 建立雄性大鼠骨质疏松模型的方法学研究

孙岩<sup>1</sup> 陈冉<sup>1</sup> 王小琦<sup>1</sup> 张洋<sup>1</sup> 蒋罡<sup>1</sup> 胡敏<sup>2</sup> 赵宏斌<sup>1\*</sup> 李文辉<sup>3\*</sup>

1. 昆明医科大学第一附属医院, 云南 昆明 650032

2. 昆明学院, 云南 昆明 650032

3. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650032

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 04-0441-04

**摘要:** 目的 探讨药物诱导与手术去势构建雄性大鼠骨质疏松模型的可行性, 为进一步研究男性骨质疏松提供支持。方法 雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为 4 组 (每组 10 只): 空白对照组、手术组、给药组和共处理组。对照组未做处理; 手术组行双侧睾丸切除方法; 给药组行皮下注射 D-半乳糖; 共处理组同时行手术和皮下注射 D-半乳糖。于干预前及干预后第 8 周测定体重、骨密度和骨矿盐含量, 组织、脂肪、肌肉含量。结果 术后第 8 周, 三组实验组骨密度较对照组骨密度降低, 共处理组和手术组骨密度分别下降 12% 和 7%, 统计学差异显著 ( $P < 0.01$ ); 给药组骨密度下降 2%, 不存在统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 各组骨矿盐含量无差异 ( $P > 0.05$ )。共处理组骨密度较手术组骨密度低 5.6%, 肌肉含量低 19.8%, 存在统计学差异 ( $P < 0.05$ )。四组间体重无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 三组实验组均低于对照组脂肪含量, 统计学差异显著 ( $P < 0.01$ ), 三组间脂肪含量无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。结论 本研究手术去势法 8 周可以建立骨质疏松模型; 去势法和皮下注射 D-半乳糖联合使用 8 周建立骨质疏松模型骨密度下降更为明显; 雄性动物骨质疏松后, 脂肪含量减少。

**关键词:** 男性骨质疏松症; D-半乳糖; 骨密度; 骨矿盐含量; 脂肪含量。

## The methodology research on establishing osteoporosis model in male rats

SUN Yan<sup>1</sup>, CHEN Ran<sup>1</sup>, WANG Xiaoqi<sup>1</sup>, ZHANG Yang<sup>1</sup>, JIANG Gang<sup>1</sup>, HU Min<sup>2</sup>, ZHAO Hongbin<sup>1\*</sup>, LI Wenhui<sup>3\*</sup>

1. Kunming Medical University, Kunming 650032, China

2. Kunming College, Kunming 650032, China

3. Kunming Institute of Zoology, Kunming 650032, China

Corresponding author: ZHAO Hongbin, LI Wenhui, Email: 553046530@qq.com

**Abstract:** **Objective** To evaluate the methodology feasibility of building osteoporosis model in male rats experimentally using drug induction and surgical castration, in order to provide supports for further study. **Methods** 40 male SD rats were divided into four groups randomly (10 in each group): the control group, the surgery group, the dose group and the combined intervention group. Surgical method was bilateral testicular resection. Rats in the dose group were injected D-galactose subcutaneously. Rats in the combined intervention group were treated with both methods. We then determined weight, bone mineral density (BMD), bone mineral salt content (BMC), contents of soft tissue, fat and muscle before and 8 weeks after the intervention. **Results** Eight weeks after the intervention, BMD of the three experimental groups decreased relatively to the controls. BMD of the combined intervention group and surgery group reduced by 12% and 7%, respectively, with statistical significances ( $P < 0.01$ ). BMD of the dose group decreased by 2%, which was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). There were no significant differences between the four groups in bone mineral salt content ( $P > 0.05$ ) and body weight ( $P > 0.05$ ). However, the combined intervention group had 5.6% lower BMD than the surgery group ( $P < 0.05$ ) and the fat content of the three experimental groups were lower than that of the control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** At the 8<sup>th</sup> week, the male rat osteoporosis model was established. Using the castration method and the injection of D-galactose at the same time can speed up the establishment of male rat osteoporosis model. After developing osteoporosis, fat content of male rats reduced.

**Key words:** Male osteoporosis; D-galactose; Bone mineral density (BMD); Bone mineral salt content (BMC); Fat content

基金项目: 国家自然科学基金委-云南省人民政府联合基金项目: 滇产彝药恒骨骨伤愈合剂促进骨质疏松骨形成机制的研究 (U1502227); 国家自然科学基金项目: 创建去卵巢树胸骨折模型研究彝药恒古骨伤愈合剂促骨形成作用机理 (81460647)

\* 通讯作者: 赵宏斌, 李文辉, Email: 553046530@qq.com

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以单位骨量减少和骨组织显微结构破坏为特征,并导致骨脆性增加、发生骨折及相关并发症的风险增加的一种全身性骨骼疾病<sup>[1]</sup>。由于人口老龄化加速,骨质疏松性骨折的发病率预计将增加,骨质疏松已经成为一个全球性的公共卫生问题<sup>[2]</sup>。现在骨质疏松研究对象多选择雌性动物,模拟绝经后妇女由于雌激素分泌的减少导致的骨量丢失<sup>[3]</sup>,但是忽视了男性骨质疏松的研究。随着年龄的增加,男性性腺功能减退,雄激素分泌减少,会导致男性骨质疏松的产生<sup>[4]</sup>。目前全球有 15% 的 60 岁以上男性患有骨质疏松症<sup>[5]</sup>。在台湾,骨质疏松后骨折男性发病率 42.3% 大于女性发病率 38.8%<sup>[6]</sup>。在我国,流行病学研究已经证实 60 岁以上男性吸烟、饮酒、受教育程度低是骨质疏松独立因素<sup>[7-8]</sup>。被忽视的男性骨质疏松问题及后续发生的严重的骨质疏松后骨折带来了更高的死亡率、社会成本,男性骨质疏松症的研究迫在眉睫。

目前骨质疏松动物模型的建造使用雌性动物去卵巢手术造模或者药物造模;雄性动物的骨质疏松模型建造方法相关内容很少。本研究参考雌性动物造模方法,拟使用 10 月龄雄性 SD 大鼠,采取双侧睾丸切除手术造模和皮下注射 D-半乳糖造模两种方法建立雄性骨质疏松模型,探寻雄性骨质疏松模型的可靠建造方法,为进一步研究男性骨质疏松提供动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

40 只 3 月龄雄性 SD 大鼠,购买自成都达硕实验动物有限公司(大鼠生产许可证号:sc 川-2013-24),饲养于中国科学院昆明动物研究所(温度  $22 \pm 4^\circ\text{C}$ ,湿度  $65\% \pm 5\%$ ,昼夜周期 12 h)。本实验通过了昆明医科大学动物试验和伦理委员会批准。

### 1.2 实验分组

饲养期间无大鼠死亡。饲养 28 周后,随机平均分为 4 组(每组 10 只):A 组空白对照组,不做处理;B 组手术组,行经阴部双侧睾丸切除术;C 组给药组,每日颈部皮下注射 100 mg/kg 的 D-半乳糖水溶液(1 g:100 mL 生理盐水);D 组共处理组,同时行手术和药物皮下注射。

手术组和共处理组动物行经阴部双侧睾丸切除术,术前 12 h 禁食禁水,使用 10% 水合氯醛 0.5 mL/100 g 麻醉,深度麻醉后固定、脱毛、消毒,严格

遵守无菌原则。于阴囊小切口暴露睾丸,结扎后切除,止血,逐层缝合。经病理检查证实睾丸切除完全。术后当日到术后 5 天予青霉素 1 万单位/只,采用无菌医用棉垫作为饲养垫料。术后 7 天伤口愈合,不拆线。手术组术后大鼠死亡 1 只,第 8 周骨密度测量后死亡大鼠 2 只,尸检未见明确死因。

### 1.3 DXA 双能射线骨密度测定

于术前、术后第 8 周使用 7% 水合氯醛 0.35 mL/100 g 腹腔麻醉后,俯卧位于检测台上,脊柱拉直,行双能射线 DXA 骨密度测定(GE-Lunar 公司 DXA 骨密度仪 Prodigy 型及附带的小动物骨密度测定软件测量)。

### 1.4 数据收集与分析

实验数据使用 SPSS19.0 分析,相关数值表示使用均值  $\pm$  标准差,精确到小数点后三位。组间比较选择单因素(ANOVA)方差分析。 $P < 0.05$  表示有统计学差异, $P < 0.01$  表示有显著统计学差异。

## 2 结果

2.1 体重第 8 周,空白对照组、手术组、共处理、给药组体重无明显差异( $P > 0.05$ )。空白对照组体重较第 1 周体重高,同时其余三组实验组体重较第 1 周体重降低,共处理组大鼠体重绝对值最低。见图 1。

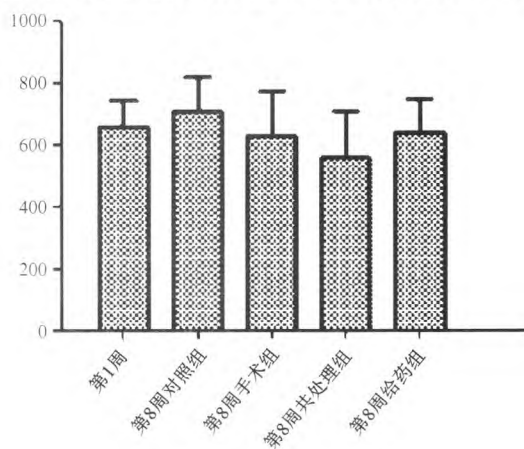


图 1 SD 大鼠体重

Fig. 1 Body weight of SD rats

### 2.2 骨密度及骨矿盐含量

第 8 周,手术组、共处理组与对照组骨密度存在显著统计学差异( $P < 0.01$ ),均低于对照组全身骨密度;给药组与对照组骨密度无差异( $P > 0.05$ ),但给药组骨密度绝对值低于对照组骨密度。共处理组骨密度低于手术组骨密度,有统计学差异( $P < 0.05$ )。四组间骨矿盐含量无统计学差异( $P >$

0.05)。见表 1。

表 1 第 8 周各组全身骨密度、骨矿盐含量  
Table 1 BMD and BMC of each group at 8 weeks

	对照组 n = 10	手术组 n = 9	共处理组 n = 10	给药组 n = 10
骨密度	0.209 ± 0.005	0.195 ± 0.008 <sup>△△</sup>	0.184 ± 0.004 <sup>△△</sup>	0.205 ± 0.004
骨矿盐含量	14.00 ± 2.271	12.70 ± 3.002	11.00 ± 3.267	13.55 ± 2.350
组织	641 ± 92.519	573 ± 95.840	502 ± 136.541	587 ± 92.519
脂肪	247 ± 102.917	159 ± 135.100 <sup>△△</sup>	169.4 ± 71.528 <sup>△△</sup>	160 ± 58.703 <sup>△△</sup>
肌肉	394 ± 44.907	414 ± 39.260	332.6 ± 65.221	427 ± 60.288

注：与对照组比较，<sup>△△</sup> $P < 0.01$ ，即两组存在显著统计学差异；<sup>△</sup> $P < 0.05$ ，即两组存在统计学差异；未标注表示不存在统计学差异

### 2.3 组织、脂肪、肌肉含量

对照组与三个实验组的组织含量、肌肉含量绝对值不同，但是互不存在统计学差异( $P > 0.05$ )。对照组脂肪含量高于手术组、共处理组、给药组脂肪含量，且存在显著统计学差异( $P < 0.01$ )；三组实验组之间脂肪含量不存在统计学差异( $P > 0.05$ )。见图 2。

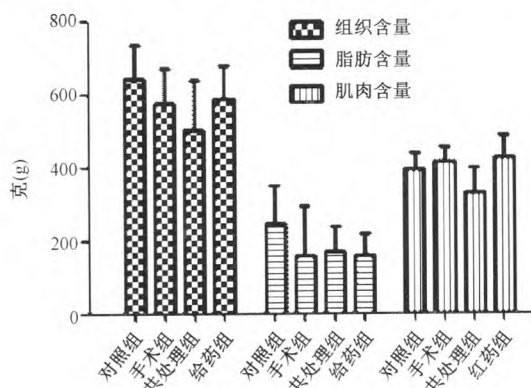


图 2 各组组织、脂肪、肌肉含量

Fig. 2 Tissue, fat and muscle content of each group

## 3 讨论

在骨质疏松的研究中，动物模型被广泛运用，理想的动物模型是研究者开展骨质疏松疾病相关研究的基础。成年大鼠具有充足的皮质骨重建，运用于骨骼研究，其在较长时间内可保持稳定，从而表现骨形成与吸收的动态平衡。以往多选用雌性大鼠骨质疏松模型，手术去势或药物诱导后，骨量减少且骨密度降低明显。

本实验着眼于雄性骨质疏松相关研究较少，通过建立雄性大鼠骨质疏松模型对了解雄性骨质疏松具有重要的意义。参考雌性骨质疏松模型的手术建模与药物建模方法，选用双侧睾丸切除术及 D-半乳糖皮下注射法建立雄性骨质疏松动物模型并加以比较，研究有效的雄性骨质疏松动物模型的建立方法；

并联合两种方法对雄性大鼠进行处理，观察去势和给药对于雄性动物骨质疏松是否存在协同作用。

结果显示，实验第 8 周各组骨密度均高于第 1 周。已有研究表明，大鼠 10 个月 ~ 12 个月才能达到骨密度峰值<sup>[9]</sup>，骨密度峰值过后进入衰老期。说明本实验 10 月龄大鼠骨密度峰值仍未达到，骨密度仍处在增长期；一般来说骨密度达到平台期后建模为最理想时间，作为老年动物模型，下一步考虑使用年龄更大的 SD 大鼠进行实验。

实验第 8 周手术组骨密度低于对照组骨密度，且存在显著统计学差异( $P < 0.01$ )。已有报道称手术切除双侧睾丸 8 周后大鼠骨密度(BMD)会显著降低<sup>[10]</sup>，大鼠去势 8 周后可以达到骨质疏松。手术组双侧睾丸切除术是通过模拟老年男性性腺功能减退导致睾酮水平下降，骨密度流失所致的骨质疏松<sup>[11-12]</sup>。给药组骨密度虽然低于对照组骨密度，但不存在统计学差异( $P > 0.05$ )。给药组 D-半乳糖通过皮下大剂量注射，会在大鼠体内会经氧化酶分解为  $\text{CO}_2$  和木酮糖，伴有氧自由基和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生，产生氧化损伤，形成亚急性衰老模型<sup>[13]</sup>；同时 D-半乳糖的过量堆积影响骨的代谢，改变骨结构的力学和生物力学参数，造成骨质疏松<sup>[13-14]</sup>。本研究中给药组骨密度下降不明显，说明连续 8 周使用 D-半乳糖无法造成骨质疏松，仍需延长给药时间。

另外，共处理组骨密度与手术组骨密度均低于对照组，共处理组骨密度较手术组骨密度降低 5.6%，两组存在统计学差异( $P < 0.05$ )。研究发现，在缺乏睾酮的机体内，D-半乳糖造成的骨量丢失更加明显；而在单独使用 D-半乳糖的给药组中，骨量丢失不明显。睾酮是否存在一种抗氧化应激作用，避免 D-半乳糖在骨代谢中的堆积。这将是我们的下一步研究的方向。

值得关注的是，第 8 周三组实验组与对照组相比脂肪含量显著下降( $P < 0.01$ )。很多研究表明雌

性骨质疏松模型建立后,雌性动物脂肪含量均会代偿性增加。而在雄性动物模型中,其脂肪含量却在建立骨质疏松模型后较少。其机理可能与睾酮抑制瘦素的表达有关。切除睾丸后,机体瘦素分泌增加,脂肪含量减少。同时,D-半乳糖导致机体衰老,内环境代谢紊乱也会导致脂肪含量减少。这样,睾酮减少和机体衰老对机体脂肪含量的影响,远远大于骨骼肌-机械负荷对于骨质疏松的代偿性保护,结果就表现为雄性动物骨质疏松后脂肪减少。

本研究讨论并说明了去势法第 8 周雄性大鼠骨质疏松模型的建立;去势法和 D-半乳糖给药法联合使用第 8 周建立骨质疏松模型,骨密度下降更为显著;雄性大鼠骨质疏松后,脂肪含量减少,与雌性大鼠骨质疏松模型后脂肪增加不同。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Testa G, Pavone V, Mangano S, et al. Normal nutritional components and effects on bone metabolism in prevention of osteoporosis[J]. *Biol Regul Homeost Agents*, 2015, 29(3):729-736.
- [ 2 ] Deng ZH, Zeng C, Li YS, et al. Relation between phalangeal bone mineral density and radiographic knee osteoarthritis: a cross-sectional study[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2016, 17:71.
- [ 3 ] Farford B, Balog J, Jackson KD, et al. Osteoporosis: What about men? [J]. *Fam Pract*, 2015, 64(9):542-552.
- [ 4 ] Gu H, Xu Z, Wu Y, et al. Therapeutic effects and mechanisms of androgen and simvastatin on osteoporosis in castrated rats[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2015, 95(48):3941-3944.
- [ 5 ] Rasheed M, Khani GMK, Rasheed N. Awareness of osteoporosis in men[J]. *SJ Pak Med Assoc*, 2016, 65(Suppl3):S12-S16.
- [ 6 ] Liu LK, Lee WJ, Chen LY, et al. Association between Frailty, Osteoporosis, Falls and Hip Fractures among Community-Dwelling People Aged 50 Years and Older in Taiwan: Results from I-Lan Longitudinal Aging Study[J]. *PLoS One*, 2014, 10(9):e0136968.
- [ 7 ] Fasolino T, Whitright T. A Pilot Study to Identify Modifiable and Nonmodifiable Variables Associated With Osteopenia and Osteoporosis in Men[J]. *Orthop Nurs*, 2015, 34(5):289-293.
- [ 8 ] Yu CX, Zhang XZ, Zhang K, et al. A cross-sectional study for estimation of associations between education level and osteoporosis in a Chinese men sample[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2015, 16(1):1-7.
- [ 9 ] Alam I, Alkhouli M, Gerard-O'Riley RL, et al. Osteoblast-Specific Overexpression of Human WNT16 Increases Both Cortical and Trabecular Bone Mass and Structure in Mice[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(2):722-736.
- [ 10 ] Ryu SJ, Ryu DS, Kim JY, et al. Bone Mineral Density Changes after Orchiectomy using a Scrotal Approach in Rats[J]. *Korean J Spine*, 2015, 12(2):55-59.
- [ 11 ] Panis B, Forget PP, van KMJ, et al. Bone metabolism in galactosemia[J]. *Bone*, 2004, 35(4):982-987.
- [ 12 ] Yongping C, Satoshi M, Tasuku M, et al. Raloxifene, Estrogen, and Alendronate Affect the Processes of Fracture Repair Differently in Ovariectomized Rats[J]. *Bone Miner Res*, 2002, 17(12):2237-2246.
- [ 13 ] Zhang CE, Wei W, Liu YH, et al. Hyperhomocysteinemia increases betaamyloid by enhancing expression of gamma-secretase and phosphorylation of amyloid precursor protein in rat brain[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(4):1481-1491.
- [ 14 ] 裴林鹏, 惠伯棣, 董福慧. 斑螫黄质对 D-半乳糖老龄大鼠骨折影响[J]. *中国骨伤*, 2008, 21(8):613-616.  
Pei LP, Hui BD, Dong FH. Influence of canthaxanthin on D-galactose induced osseous changes of rat in China[J]. *China J Orthop and Trauma*, 2008, 21(8):613-616. (in Chinese)

(收稿日期:2016-11-15,修回日期:2016-12-25)