

本文引文格式:李兰,杨一秋,解继胜.去卵巢小鼠绝经后骨质疏松模型的建立和综合评定[J].右江民族医学院学报,2021,43(1):6-10.

【论著与临床报道】

去卵巢小鼠绝经后骨质疏松模型的建立和综合评定

李兰¹,杨一秋¹,解继胜²

- (1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院组织胚胎学教研室,广西 百色 533000)

摘要:目的 建立和评定去卵巢小鼠骨质疏松模型,以期为后期进行不同的药物干预治疗提供准确的时机和模型。方法 选取10~12周龄的C57BL/6雌性小鼠10只,随机分为假手术对照(Sham)组和卵巢摘除骨质疏松模型(OVX)组,每组5只。术后8周,将小鼠取血后处死,取一侧的股骨,剔除软组织,然后进行冰冻切片,另一侧进行显微断层扫描技术(Micro CT)检查。分别检测血钙、磷、镁水平,行组织病理学以及免疫荧光观察。结果 血清学检测,OVX组与Sham组的钙、磷、镁含量变化不大,OVX组碱性磷酸酶含量比Sham组的含量低($P < 0.01$);Micro CT检查,OVX组小鼠骨小梁数量减少,间隔大,分离度也增加,排列稀疏,组织病理学HE染色发现OVX组破骨细胞数目增加($P < 0.01$);OVX组以及Sham组的碱性磷酸酶染色(ALP)的变化差异不大,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP酶)表达的面积增加,颜色加深。结论 C57BL/6雌性小鼠行双侧卵巢摘除法可以建立骨质疏松症模型,通过多种方法可以客观准确验证骨质疏松模型,以期为相关研究提供重要的参考依据。

关键词:骨质疏松;模型;动物;双侧卵巢摘除法;显微断层扫描技术;组织病理学;免疫荧光

中图分类号:R681.4;R381 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2021)01-0006-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.01.002

Establishment and comprehensive evaluation of postmenopausal osteoporosis model in ovariectomized mice

Li Lan¹, Yang Yiqiu¹, Xie Jisheng²

- (1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Department of Histology and Embryology, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To establish and evaluate the osteoporosis model in ovariectomized mice, so as to provide appropriate timing and model for different drug interventions in later period. **Methods** Ten female C57BL/6 mice aged 10~12 weeks were selected and randomly divided into Sham operation control (Sham) group and ovariectomized osteoporosis model (OVX) group, with 5 mice in each group. At eight weeks after operation, the mice were sacrificed after blood collection. Their femur on one side was separated, soft tissue was removed, and then frozen section was made. The other side was examined by Micro CT. Lastly, their levels of serum calcium, phosphorus and magnesium were measured and observed by histopathology and immunofluorescence. **Results** Serological tests showed that the calcium, phosphorus and magnesium contents in

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560362)

第一作者简介:李兰(1995-),女,在读硕士研究生,初级技师,研究方向:骨代谢异常、骨转换与骨质疏松研究,E-mail:1766997142@qq.com

通讯作者简介:解继胜(1968-),男,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:老年性骨质疏松防治研究,E-mail:xiejisheng1968@163.com

OVX group and Sham group did not change significantly. The alkaline phosphatase content of OVX group was lower than that of Sham group ($P < 0.01$). Micro CT examination showed that the number of bone trabeculae of rats decreased, the interval was large, the separation degree increased, and the arrangement was sparse in the OVX group. Histopathology HE staining showed increased number of osteoclasts in rats of OVX group ($P < 0.01$). The change of alkaline phosphatase staining (ALP) in two groups showed little difference. Their expression area of trap-resistant acid phosphatase (TRAP) expanded, with color deepened. **Conclusion** Postmenopausal osteoporosis model can be established by bilateral ovariectomy in female C57BL/6 mice. And the osteoporosis model can be verified objectively and accurately by various methods, so as to provide an important reference for relevant studies.

Key words: osteoporosis; model, animal; bilateral ovariectomy; microscopic tomography; histopathology; immunofluorescence

骨质疏松症是一种以骨量低和骨组织结构恶化为特征的疾病,导致骨折风险易感性增加。骨质疏松症的发生率随着年龄的增长而增加,并且由于雌激素缺乏,绝经后妇女中骨质疏松症的发生率最高,因为骨吸收和骨形成之间的平衡朝着骨吸收水平的增加转移^[1]。骨质疏松症影响着全世界大约 2 亿人,其防治仍然是一项艰难的挑战,需要我们去进一步研究和探索新的预防策略和更有效的治疗方式^[2]。骨质疏松模型的建立是研究骨质疏松发病机制,合理地选择动物模型对实验的结果起着至关重要的作用,是用药干预治疗防御的基础^[3]。卵巢摘除法由于操作简单,造模易成功,实验可重复性高,已成为骨质疏松症常用的动物造模方法,C57BL/6 种属的小鼠由于其遗传信息明确,耐受性高,而且消耗的成本比大鼠少,造模周期短,因此选择 C57BL/6 雌性小鼠作为实验研究的基础媒介^[4]。本研究的目的是通过制备去卵巢小鼠骨质疏松模型,建立一种模拟人体病理的骨质疏松症。

1 材料和方法

1.1 实验材料 雌性 C57BL/6 小鼠,10~12 周龄,体重 20~25 g,购于长沙市天勤生物技术有限公司 [SCXK(湘)2019-0014];冰冻切片机 Leica CM1950 (2019175001,德国);SAKURA 樱花冷冻包埋盒(Surgipath FSC 22 Blue Frozen Section Compound Leica Biosystems Melbourne Pty Ltd-ABN);Cryofilm type II C(9)SECTION-LAB Co. Ltd., Japan;TRAP/ALP 染色试剂盒(294-67001,FUJIFILM WAKO);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(C0105,碧云天);荧光倒置显微镜(2015236500,Leica DMI3000B),Micro CT 扫描仪(QuantumGX2,PerkinElmer)。

1.2 实验动物 本研究选取了 10 只雌性 C57BL/6 小鼠,10~12 周龄,体重 20~25 g。所有的动物实验均完全遵守相关伦理审批要求,实验动物饲养流程均严格遵守实验室动物的饲养规程和使用指南。实验

前,所有购买的小鼠均于右江民族医学院动物实验中心检疫室饲养 7 d 适应环境,然后转移至 SPF 级实验室,每天观察小鼠状态。每个笼子饲养 5 只,不限水,标准饮食,室温维持在 24~26℃,湿度为 55%~60%,光照时间适宜,实验过程中小鼠也是继续饲养于 SPF 级实验室。

1.3 实验分组 10 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分组,分别为卵巢摘除骨质疏松模型(OVX)组和假手术(Sham)组,饲养环境和条件均保持一致。术后 8 周取 10 只小鼠的左边股骨均进行 Micro CT 检测,右边股骨用包埋剂包埋,-80℃冰箱保存,由于骨组织较硬,未进行脱钙,因此我们使用 SECTION-LAB Co. Ltd 切片装置,将其黏附在骨组织包埋块表面,使骨组织转移至该切片装置上,然后使用冰冻切片进行冰冻切片,厚度为 6 μm,行 HE 染色、TRAP 染色、ALP 染色、免疫荧光染色。

1.4 卵巢摘除术 将已分组的 10 只 C57BL/6 雌性小鼠,75%酒精消毒注射部位后,水合氯醛(4%,5 ml/kg,腹腔注射)进行麻醉,待其行动迟钝后,背部备皮,消毒手术部位,从背部肾区附近双侧分别作一纵行切口,切开筋膜分离肌肉及腹膜,找到附着于脂肪组织上的粉红色卵巢组织,完整摘除两侧卵巢组织,剩下 Sham 组 5 只小鼠,则切除卵巢旁小块脂肪组织,手术针线层层缝合,庆大霉素消毒。术后 3 d 也连续用庆大霉素涂抹伤口,以防手术感染,摘除的卵巢块经冰冻切片(6 μm),苏木精伊红(HE)染色法镜下鉴定为卵巢组织。

1.5 外周血生物化学检测 麻醉小鼠后,眼球取血检测血钙(Ca)、磷(P)、镁(Mg)、碱性磷酸酶(ALP)水平,于右江民族医学院附属医院检验科检验,采用分光光度法检测。

1.6 显微断层扫描技术(Micro CT) 分别取 OVX 组和 Sham 组小鼠的股骨标本剔除干净周边软组织,

放置于 4% 多聚甲醛中浸泡 24 h 后进行 Micro CT 扫描,电压 90 kV;电流 80 μ A,扫描方式 360° 旋转,成像视野 9 mm \times 9 mm \times 9 mm,高分辨率模式分辨率 18 μ m,扫描时间 14 min,扫描完毕后使用系统自带的三维重建软件对所扫描的图片进行重建,得到三维 Micro CT 数据。

1.7 组织病理学检查 自 -80℃ 低温冰箱取出 OVX 组和 Sham 组小鼠股骨头的冰冻切片,将切片置于常温 10~15 min 回温至 37℃,自然晾干,-20℃ 甲醇固定 10 min,1 \times PBS 缓冲液清洗,依次滴加苏木素 1 min,流水冲洗,伊红染液覆盖标本 30 s,70%、80%、90%、100% 乙醇依次脱水,二甲苯透明,晾干后中性树胶封片,镜下观察。

1.8 组织化学染色 取 OVX 组和 Sham 组小鼠股骨头冰冻切片行抗酒石酸酸性磷酸酶染色 (TRAP 染色) 以及碱性磷酸酶染色 (ALP 染色)。将切片置于常温 10~15 min 回温 37℃ 自然晾干,-20℃ 甲醇固定 10 min,流水清洗,滴加适量的按比例配制的 TRAP 染色液覆盖标本,常温放置 30 min (酒石酸溶液:酸性磷酸酶底物溶液 A:酸性磷酸酶底物溶液 B 为 1:9:0.1 配置混匀),PBS 清洗,二甲苯透明,中性树胶封片。骨组织切片固定水洗后进行 ALP 染色,滴加 0.1 mol AMPD-HCL 缓冲液覆盖组织标本,10 min,滴加适量的碱性磷酸酶预混物溶液,室温保湿盒孵育 30 min,然后水洗,核染色试剂覆盖组织 5 s,水洗后二甲苯透明,中性树胶封片。

1.9 免疫荧光染色 取 OVX 组和 Sham 组小鼠股骨头冰冻切片行免疫荧光染色。切片置于常温 10~

15 min 回温 37℃ 自然晾干,-20℃ 甲醇固定 10 min。1 \times PBS 缓冲液清洗 2~3 次,每次 5 min,滴加 PBS/1%BSA 封闭液,保湿盒常温放置 40 min,4℃ 孵育一抗抗酒石酸酸性磷酸酶 (以 1:1000 的比例稀释) 过夜,DAPI (1 h) 染色细胞核,免疫荧光倒置显微镜观察组织。

1.10 统计学方法 采用 ($\bar{x}\pm s$) 表示。首先用方差分析来检验各组间是否差异有统计学意义,当存在差异有统计学意义时,再用 t 检验分析各均数间是否具有差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

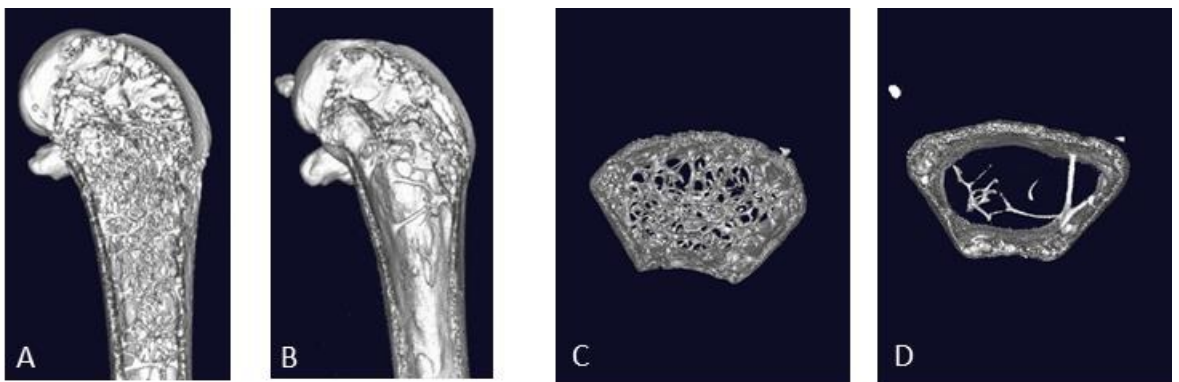
2.1 外周血生物化学检测 行双侧卵巢切除术 8 周后,经血清学检测,OVX 组与 Sham 组的钙、磷、镁含量变化不大,Sham 组的 ALP 含量比 OVX 组的含量高 ($P < 0.001$),见表 1。

2.2 Micro CT 检查 小鼠在卵巢摘除术后 8 周,股骨经 Micro CT 扫描三维重建后,与 Sham 组相比,无论是从横断面还是纵切面来看,OVX 组的骨小梁数量减少,排列稀疏,间隔大,分离度也增加,见图 1。

表 1 双侧卵巢切除术后 8 周小鼠生化指标变化

组别	Ca/ (mmol \cdot L ⁻¹)	P/ (mmol \cdot L ⁻¹)	Mg/ (mmol \cdot L ⁻¹)	ALP/ (u \cdot L ⁻¹)
Sham 组	2.45 \pm 0.30	2.02 \pm 1.16	1.45 \pm 0.35	76.40 \pm 7.54
OVX 组	2.27 \pm 0.18	1.61 \pm 0.64	1.51 \pm 0.52	54.40 \pm 2.41
t/t'	1.081	1.452	0.618	3.517
P	0.336	0.221	0.568	0.003

注:①表内计量资料数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示

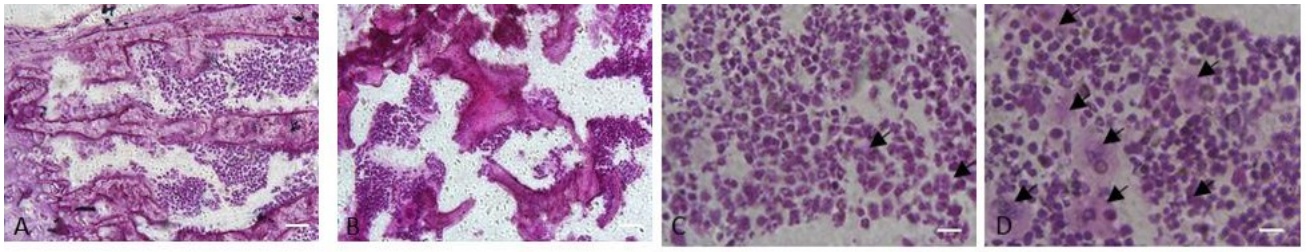


注:A:Sham 组(纵切面);B:OVX 组(纵切面);C:Sham 组(横切面);D:OVX 组(横切面)。

图 1 术后 8 周 OVX 和 Sham 组股骨 Micro CT 扫描三维重建

2.3 组织病理学检查 小鼠术后 8 周,股骨组织 HE 染色结果显示,Sham 组骨小梁致密、完整、连续;OVX 组骨小梁紊乱,出现断裂(见图 2A、图 2B)。破骨细胞 (细胞核 $>$ 2) 计数,单位面积内 Sham 组的破骨细胞总

数比 OVX 组的少 ($P < 0.01$);在相同的视野下也发现 OVX 组破骨细胞的数目明显多于 Sham 组 ($P < 0.01$),差异具有统计学意义,见图 2C、图 2D,表 2。



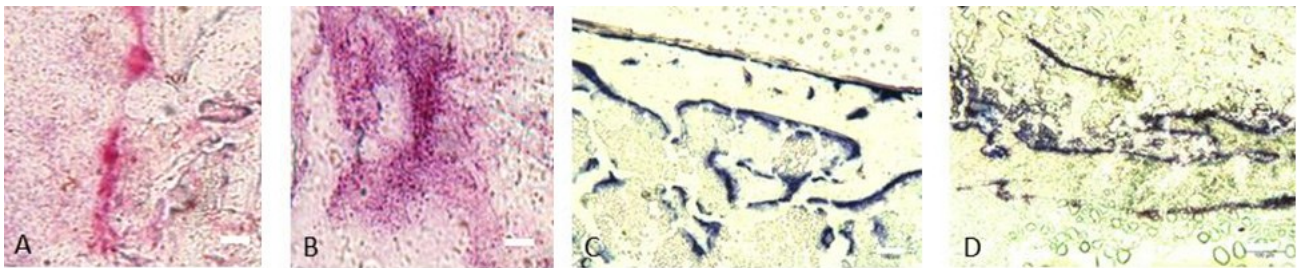
注：A;Sham 组；B;OVX 组；C;Sham 组；D;OVX 组。
图 2 股骨组织的形态结构(HE 染色,63×)

表 2 术后 8 周骨组织切片破骨细胞计数

组别	骨组织切片单位面积内细胞总数	骨组织切片相同视野下细胞个数/mm ²
Sham 组	201.33±18.82	12.77±1.83
OVX 组	607.67±21.13 ^a	36.48±1.17
<i>t</i>	-24.878	-18.905
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注：①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。

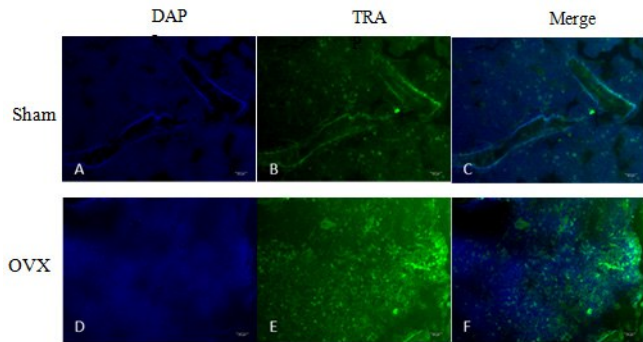
2.4 TRAP 染色和 ALP 染色 小鼠骨组织 TRAP 染色,TRAP 的活性部位呈红紫色;ALP 染色,ALP 的活性部位呈蓝色(茶褐色)。ALP 和 TRAP 染色显示,与 Sham 组相比,OVX 组 ALP 酶分泌减少,但差异不明显;而 TRAP 酶的分泌增多,紫红色区域更深,分布面积更广。



注:TRAP 染色,A;Sham 组,B;OVX 组;ALP 染色,C;Sham 组,D;OVX 组。

图 3 抗酒石酸酸性磷酸酶染色观察破骨细胞的形成(TRAP 染色,20×,图 3A、图 3B)和碱性磷酸酶染色观察破骨细胞以及成骨细胞的形成(ALP 染色,20×,图 3C、图 3D)

2.5 免疫荧光检测结果 荧光倒置显微镜观察发现 OVX 组的骨组织上 TRAP 蛋白(绿色荧光)的表达增多,见图 4。



注:A~C;Sham 组;D~F;OVX 组。

图 4 股骨组织的 TRAP 蛋白的表达(免疫荧光染色,20×)

3 讨论

随着人口老龄化的增加,绝经后骨质疏松症已成为全球性的公共卫生问题。雌激素和孕激素可以影响

骨的生长,雌激素的缺乏引发了骨质流失的快速阶段,增加绝经后骨质疏松妇女患骨质疏松的风险,影响骨代谢的平衡^[5],其水平降低,可显著增加破骨细胞的活性,加速骨吸收,使骨形成不足^[6]。在老化的骨骼中,雌激素减少会导致过量的破骨细胞(OC)介导的骨组织吸收,从而导致正常骨代谢失衡,在这一失衡过程中,由单核巨噬细胞分化而来的破骨细胞是唯一具有骨吸收生物学活性的细胞系^[7]。因此,破骨细胞在生理和病理性的骨吸收中发挥核心作用,从而导致包括绝经后骨质疏松症的发生。

本研究的实验目的是验证评定双侧卵巢切除后的 C57BL/6 小鼠是否形成骨质疏松状态,以便考究是否可以进行下一步的药物治骨质疏松症的活体实验。由于大鼠的骨代谢周期久,造模时间长,用药多,耗资大,因此我们选择 10~12 周龄、成熟的、骨代谢水平趋于稳定的 C57BL/6 雌性小鼠行双侧卵巢摘除法以建立骨质疏松症模型^[8]。现今也有很多其他的造模方法,如维甲酸、链脲佐菌素诱导方法等。但是由于卵巢

切除法简单易行,成本小,不易感染,造模成功率高,如今成为了FDA和WHO公认的研究绝经后雌激素缺乏型骨质疏松症的最佳模型^[9]。骨质疏松模型的鉴定方法也多种多样,从血清学骨代谢生化指标、病理组织形态学分析、骨组织计量方法等均能阐述骨组织的改变情况。传统的骨质疏松模型鉴定方法单一,我们通过综合多种检测方法客观评定骨质疏松模型的成功与否,以便进行下一步的小鼠体内药物干预实验。

既往的研究发现^[10],由于小鼠体积较小,使用双能X线骨密度仪(dual energy X-ray absorptiometry, DEXA)测量小鼠的骨密度存在较大误差,结果的准确性不高;而Micro CT的分辨率可达微米级别,对骨组织的微结构可进行精确的测量,其测量参数的一致性和可重复性更高^[8],更适合用于评估小鼠的骨微结构的改变以及骨质疏松模型,能更早、更真实地反映出老年骨组织结构的改变情况^[11]。本研究的结果也发现小鼠股骨远端行Micro CT扫描重建后发现骨小梁的数目以及结构发生明显改变,而骨组织切片HE染色形态学观察也证实了符合骨质疏松的病理改变情况,初步验证了骨质疏松模型建立成功。

TRAP是显示骨吸收以及破骨细胞活性的良好标志物,可以比较直观地反映出机体的骨代谢情况,观察破骨细胞的分化程度;而ALP是反映成骨形成的重要标志物。TRAP染色结果显示TRAP酶的颜色以及分布面积增加,提示OVX组破骨细胞比Sham组的更加活跃;免疫荧光染色的结果也证实了这一结果;而ALP则相反,卵巢摘除后成骨细胞的活性及数目均降低。从血清生化指标检测以及病理组织切片HE、TRAP、ALP染色、免疫荧光结果分析均反映了骨形成活性降低,成骨细胞凋亡,破骨细胞与成骨细胞的动态失衡导致骨细胞功能的丧失,骨组织微结构之间的空隙增加,骨质疏松加剧,进一步证实了上述结果的可靠。

骨小梁结构和数目的改变,血清生化检测指标的变化以及病理组织染色反映了骨组织结构发生较大的改变,证实了双侧卵巢摘除法使小鼠发生骨质疏松模

型很成功,可以进行后期小鼠体内药物的干预实验,以期为骨质疏松提供合理、有效的治疗策略。

参考文献:

- [1] Chen HL, Tung YT, Chuang CH, et al. Kefir improves bone mass and microarchitecture in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26(2): 589-599.
- [2] Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, et al. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide [J]. *Excli J*, 2020, 19: 89-107.
- [3] 蒙文丹, 解继胜. 骨质疏松动物模型建立的知识图谱分析 [J]. *右江民族医学院学报*, 2015, 37(6): 821-823, 833.
- [4] Eastell R, Szulc P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(11): 908-923.
- [5] Hadji P, Colli E, Regidor PA. Bone health in estrogen-free contraception [J]. *Osteoporosis Int*, 2019, 30(12): 2391-2400.
- [6] Zhang Y, Hua F, Ding K, et al. Angiogenesis changes in ovariectomized rats with osteoporosis treated with estrogen replacement therapy [J]. *Biomed Res Int*, 2019: 1283717.
- [7] Kong L, Wang B, Yang X, et al. Integrin-associated molecules and signalling cross talking in osteoclast cytoskeleton regulation [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(6): 3271-3281.
- [8] 傅光涛, 刘生, 李长川, 等. 12周是使用卵巢切除法建立雌性C57/BL6J成年小鼠绝经后骨质疏松模型的合适时机 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(5): 582-587.
- [9] Komori T. Animal models for osteoporosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 759: 287-294.
- [10] 金超岭, 王猛, 李红磊, 等. 双能X线骨密度仪精密度和准确度的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(12): 1425-1427.
- [11] 邹佳瑜, 李易. 双能X线骨密度仪与定量CT对骨质疏松检出率的比较分析 [J]. *影像研究与医学应用*, 2020, 4(12): 224-226.

收稿日期: 2020-10-21; 修回日期: 2020-11-16