

# 绝经后骨质疏松症鼠模型的研究进展

沈赞<sup>1</sup>, 王冠尹<sup>1</sup>, 张镒<sup>1</sup>, 裴航<sup>1</sup>, 徐开源<sup>1</sup>, 施振宇<sup>1</sup>, 何帮剑<sup>2</sup>

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

**摘要** 绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是国内外医学领域研究的重点内容,动物模型在 PMOP 的发生机制探索和治疗药物疗效评价中发挥了至关重要的作用,PMOP 鼠模型是 PMOP 相关研究中最基础、最常用的动物模型。本文从实验鼠的品种、鼠 PMOP 的造模方法及 PMOP 鼠模型的鉴定方法 3 个方面对 PMOP 鼠模型的研究进展进行了综述。

**关键词** 骨质疏松;绝经后;模型;动物;大鼠;小鼠;综述

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是指女性绝经后卵巢分泌雌激素水平下降引起的以骨量减少、骨密度降低、骨折风险增高为主要特征的代谢性骨病<sup>[1]</sup>。根据相关流行病学调查结果推算,我国骨质疏松症患者人数约 9000 万,其中女性约 7000 万<sup>[2]</sup>;女性骨质疏松症患者率显著高于男性<sup>[3]</sup>。PMOP 患者骨折风险增高,易导致患者残疾甚至死亡,给社会和家庭造成了沉重的负担<sup>[4]</sup>。PMOP 是国内外医学领域研究的重点内容,在 PMOP 的发生机制探索和治疗药物疗效评价中,动物模型发挥了至关重要的作用。PMOP 鼠模型是 PMOP 研究中最基础、最常用的动物模型,具有操作便捷、评价系统完善等优点。本文对 PMOP 鼠模型的研究进展进行了综述。

## 1 实验鼠的品种

**1.1 大鼠** 目前动物实验中常用的大鼠有 SD 大鼠和 Wistar 大鼠。SD 大鼠属于近交品系,寿命约 14 个月。Wistar 大鼠属于远交品系,寿命为 2~3 年;Wistar 大鼠在 2~6 月龄时进入性成熟时期,20 个月后进老龄期<sup>[5]</sup>。未妊娠的 SD 或 Wistar 健康雌性大鼠进行 PMOP 造模的最适鼠龄为 3~6 个月<sup>[6]</sup>,老龄大鼠则不适用于 PMOP 造模<sup>[7]</sup>。大鼠具有易饲养、成本低、造模简单、实验重复性好等优点。Li 等<sup>[8]</sup>的研究结果表明,大鼠去势造模 14 周后即可出现 PMOP 的典型临床症状。然而,大鼠模型也存在如下不足:

①大鼠骨皮质重建能力弱,对于以哈氏系统重建为目的的药物实验则不宜采用大鼠 PMOP 模型;②大鼠骨组织发育过程与人类不同,SD 大鼠的骨密度在 2~3 月龄时会显著增加<sup>[9]</sup>且骨骺闭合周期较长<sup>[7]</sup>,因此大鼠 PMOP 模型与人 PMOP 仍存在一定的差异;③大鼠体型较小,所能提供的血液量和组织材料有限,不能满足大量检测的需求。

**1.2 小鼠** 雌性小鼠寿命 18~27 个月,于 6 周龄时达到性成熟;小鼠去势造模手术的最佳鼠龄一般是在 6~8 周<sup>[10]</sup>。目前,常用的造模小鼠主要有 C57BL/6J(B6)小鼠和昆明小鼠,前者属于近交品系,后者属于远交品系<sup>[11]</sup>。昆明小鼠在去势造模 8~12 周后可出现典型的 PMOP 症状,多用于药效评定和毒性实验<sup>[12]</sup>。小鼠性格温顺,易于群体饲养,是基因图谱研究较为清楚的模型动物。因此,小鼠模型在药物的作用机制研究中具有独特的优势<sup>[13]</sup>。同样,由于皮质重建能力弱、体型较小等原因,小鼠模型存在与大鼠模型类似的不足。

## 2 鼠 PMOP 的造模方法

**2.1 药物干预法** 药物干预法是通过药物抑制雌激素分泌进行造模的方法<sup>[5]</sup>。目前药物干预法进行鼠 PMOP 造模的常用药物有布舍瑞林和促性腺激素释放激素<sup>[14]</sup>。皮下注射布舍瑞林后能够促使黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)分泌水平增加,长期使用能够引起垂体机能下降,导致 LH 和 FSH 的分泌减少<sup>[15]</sup>。通过皮下注射布舍瑞林抑制鼠雌激素的分泌,降低血清雌二醇的含量,进而达到和去势造模相当的水平。长期注射促性腺激素释放激素可降低性

基金项目:国家自然科学基金项目(82205146,82074469);浙江省基础公益研究计划项目(LY21H270008);浙江省中医药科技计划项目(2023ZF019)

通讯作者:何帮剑 E-mail:hebangjian@163.com

激素水平,引起鼠骨量减少。药物干预法具有操作简便,避免手术产生的负氮平衡、电解质紊乱等优点<sup>[16]</sup>。但也存在不良反应多、造模成功率不高、造模药物与治疗药物存在相互作用、实验可信度偏低等不足。鉴于这些不足,药物干预法的采用率较去势造模法偏低<sup>[17]</sup>。

**2.2 去势造模法** 去势造模法是通过卵巢切除术(ovariectomy, OVX)降低鼠的雌激素水平,进而模拟 PMOP 的造模方法<sup>[18]</sup>。OVX 模型是美国食品药品监督管理局特定的 PMOP 临床试验前模型,用于评价 PMOP 治疗药物的有效性和安全性<sup>[19]</sup>。OVX 模型也是最符合世界卫生组织要求的用于预测药物作用的临床试验前动物模型之一<sup>[20]</sup>。OVX 有背侧和腹侧 2 种入路,背侧入路是在大鼠的背部脊柱两侧 1 ~ 2 cm 处各做长约 3 cm 的纵向切口,在小鼠的背部脊柱两侧 0.5 cm 处各做长约 0.5 cm 的纵向切口;腹侧入路则是在腹部沿正中中线做长约 1.5 cm 的切口。2 种入路在术中出血量方面相当,但背侧入路操作简单、手术时间短,且能够避免腹侧入路导致的腹腔粘连和感染,安全性更高<sup>[21-22]</sup>。然而,值得注意的是,去势造模法并不能完全模拟 PMOP 的病理表现,且切除手术对鼠伤害较大,可能会对实验结果产生一定的影响<sup>[18]</sup>。

**2.3 基因编辑法** 基因编辑法通过定向敲除、置换和插入 DNA 片段获得具有特定基因型的基因工程小鼠。该方法对于研究 PMOP 的发生机制和药物靶点具有重要意义。Karam 等<sup>[23]</sup>研究发现,过表达 PIX1 基因的 MCOL1-PIXX1 转基因小鼠在短期内会表现出严重的骨质疏松症状。Tanaka 等<sup>[24]</sup>通过 Cre/LoxP 位点特异重组酶系统构建 Foxf2 基因缺陷型小鼠,结果显示 Foxf2 基因缺陷型小鼠的成骨能力显著增强,同时也提示抑制 Foxf2 基因的表达有助于促进骨形成、逆转 PMOP 的发展。Xu 等<sup>[25]</sup>研究发现,系统性敲除小鼠 miR-143/145 基因能够延缓 PMOP 发生、逆转 PMOP 进展。此外,基因编辑法也常和去势造模法联合使用以探究 PMOP 的药物靶点。Melanie 等<sup>[26]</sup>通过基因编辑法建立了携带人源 Plexin-B1 基因的基因工程小鼠,并通过去势造模法建立 PMOP 模型,进而探究 Plexin-B1 抗体对 PMOP 的治疗效果。基因编辑法在 PMOP 发生机制和药物靶点研究方面具有独特优势,但同时也存在成本高、步骤繁琐、成功率低、存

在伦理争议等不足。因此,基因编辑法建立 PMOP 模型在操作技术和伦理方面仍需进一步研究和完善。

### 3 PMOP 鼠模型的鉴定方法

**3.1 生化代谢指标检测** PMOP 患者血清雌二醇、血清碱性磷酸酶、血清 I 型前胶原氨基末端肽、血清抗酒石酸酸性磷酸酶含量会下降,而尿钙、血清骨钙素、血清 I 型胶原羧基末端肽水平会升高<sup>[27-29]</sup>。模型鼠的生化代谢指标呈现上述改变,再结合骨密度及骨组织形态结构改变即可鉴定 PMOP 鼠模型是否造模成功。

**3.2 骨生物力学参数检测** 腰椎压缩试验、三点弯曲试验是检测模型鼠骨生物力学参数的常用方法,可用于 PMOP 鼠模型的鉴定。腰椎压缩试验检测腰椎最大压缩力、抗压强度和弹性模量等参数,三点弯曲试验检测股骨或胫骨的最大负荷、刚度、弹性模量、最大载荷等参数。模型组鼠进行腰椎压缩试验或三点弯曲试验,上述参数显著降低,且与假手术组的差异有统计学意义,即可判断造模成功<sup>[29-30]</sup>。

**3.3 骨密度检测** 骨密度可以作为判断 PMOP 造模是否成功的依据。骨密度检测可在造模后第 6 周开始,每 2 周 1 次,直至取材<sup>[31]</sup>。通过 Micro-CT 可检测实验鼠的腰椎或股骨、胫骨近端干骺端的骨密度,骨密度下降且与假手术组的差异有统计学意义,则可判断造模成功<sup>[32-33]</sup>。

**3.4 骨组织观察** 通过 Micro-CT 扫描可观察模型鼠的胫骨、股骨微结构。模型组鼠的骨小梁分离度大于假手术组,骨小梁厚度、骨小梁体积、骨小梁数量、骨体积分数小于假手术组,则可判断造模成功<sup>[34]</sup>。通过 HE 染色观察模型组鼠股骨、胫骨组织切片,能够发现模型组鼠的骨小梁稀疏、断裂、厚薄不均、排列紊乱、面积减少,骨干厚度变薄,骨髓腔内脂滴增加、聚集,脂肪细胞数量增加<sup>[35-36]</sup>。亦可通过抗酒石酸酸性磷酸酶染色观察股骨切片中成骨细胞、破骨细胞的分布和比例,模型组鼠骨组织成骨细胞数量显著减少,则可判断造模成功<sup>[37-38]</sup>。

**3.5 生殖器官观察** OVX 后,鼠生殖器官的变化也可作为 OVX 效果的评价指标。待模型组鼠恢复后,连续 5 d 进行阴道上皮细胞涂片观察,正常组或假手术组的阴道上皮细胞主要由有核上皮细胞、角化上皮细胞和白细胞组成,模型组则以白细胞为主<sup>[37]</sup>。在处死鼠后,取子宫进行肉眼观察、湿重称重及子宫内

膜组织切片 HE 染色,模型组鼠子宫萎缩、子宫湿重降低,且 HE 染色显示子宫内膜与子宫肌层变薄,子宫腺退化,则提示模型组鼠卵巢切除完整,造模成功<sup>[39-40]</sup>。

#### 4 小 结

大鼠和小鼠均是 PMOP 鼠模型的常用品种,可根据研究目的选择合适的实验鼠品种。药物干预法由于存在诸多不足,在鼠 PMOP 造模中应用较少。去势造模法是鼠 PMOP 造模的经典方法,也是应用最多、最广的造模方法,但其同样存在无法完全模拟人 PMOP 的问题。基因编辑法在 PMOP 发生机制和药物靶点研究方面具有独特优势,拥有广阔的应用前景。在 PMOP 鼠模型的鉴定方面,多种鉴定方法结合能够提高模型鉴定的准确度,实践中可优先选择生化代谢指标、骨密度和骨组织形态学指标进行 PMOP 鼠模型的鉴定。

#### 参考文献

- [1] 雷欣东,于慧,龙琼,等.绝经后骨质疏松症发病机制研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2021,27(11):1681-1684.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)[J].中国全科医学,2023,26(14):1671-1691.
- [3] SALARI N, GHASEMI H, MOHAMMADI L, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis [J]. J Orthop Surg Res, 2021, 16(1): 609.
- [4] 邱晓萍,刘铠婕,林宇慧,等.骨质疏松症的流行病学、管理与防治研究进展[J].山东医药,2023,63(21):107-111.
- [5] 盛玲玲,李先娜,霍金海,等.骨质疏松症动物模型及评价方法研究进展[J].黑龙江中医药,2018,47(6):111-113.
- [6] 张奕奋,耿倚云,段莉,等.构建骨质疏松动物模型研究进展[J].生物骨科材料与临床研究,2021,18(2):62-66.
- [7] 李彦冉,闫盼盼,苗艳艳,等.骨质疏松动物模型构建进展与应用特点分析[J].中国实验动物学报,2023,31(7):928-934.
- [8] LI B, WANG Y, GONG S, et al. Puerarin improves OVX-induced osteoporosis by regulating phospholipid metabolism and biosynthesis of unsaturated fatty acids based on serum metabolomics [J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154198.
- [9] SONG H, POLK J D, KERSH M E. Rat bone properties and their relationship to gait during growth [J]. J Exp Biol, 2019, 222(Pt 18): jeb203554.
- [10] 张洪,鲍波.浅谈国内 BALB/c 小鼠及 KM 小鼠的基本生物学特性[J].中国实用医药,2010,5(3):252-254.
- [11] BATOON L, MILLARD S M, RAGGATT L J, et al. Osteal macrophages support osteoclast-mediated resorption and contribute to bone pathology in a postmenopausal osteoporosis mouse model [J]. J Bone Miner Res, 2021, 36(11): 2214-2228.
- [12] WANG L, DING Y Y, WU Y Q, et al. Koumine ameliorates neuroinflammation by regulating microglia polarization via activation of Nrf2/HO-1 pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115608.
- [13] YANG L, ZHANG B, LIU J, et al. Protective effect of acteoside on ovariectomy-induced bone loss in mice [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 2974.
- [14] 王起家,李可大,张江.骨质疏松动物模型研究进展[J].实用中医内科杂志,2023,37(9):134-138.
- [15] KONG J Y, SU F Q, LIU Y, et al. The pharmacokinetics of buserelin after intramuscular administration in pigs and cows [J]. BMC Vet Res, 2022, 18(1): 136.
- [16] 尹航,董博,康武林,等.补肾复方在绝经后骨质疏松症动物模型中的研究进展[J].中医药导报,2022,28(9):110-113.
- [17] 周丹妮,卫若楠,康梦娇,等.围绝经期综合征动物模型研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(18):243-250.
- [18] BRENT M B. Pharmaceutical treatment of bone loss: from animal models and drug development to future treatment strategies [J]. Pharmacol Ther, 2023, 244: 108383.
- [19] THOMPSON D D, SIMMONS H A, PIRIE C M, et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis [J]. Bone, 1995, 17(4 Suppl): 125S-133S.
- [20] BONJOUR J P, AMMANN P, RIZZOLI R. Importance of preclinical studies in the development of drugs for treatment of osteoporosis: a review related to the 1998 WHO guidelines [J]. Osteoporos Int, 1999, 9(5): 379-393.
- [21] 马艳芳,张鑫,李慧,等.骨质疏松症动物模型中大鼠卵巢切除手术要点及其术后护理[J].实验动物科学,2022,39(3):57-62.
- [22] 李明,吕厚辰,尹鹏滨,等.两种卵巢切除术式建立大鼠骨质疏松模型的优势比较[J].解放军医学院学报,2015,36(4):383-387.
- [23] KARAM N, LAVOIE J F, ST-JACQUES B, et al. Bone-specific overexpression of PITX1 induces senile osteoporosis in mice through deficient self-renewal of mesenchymal progenitors and Wnt pathway inhibition [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):

- 3544.
- [24] TANAKA T, TAKAHASHI A, KOBAYASHI Y, et al. Foxf2 represses bone formation via Wnt2b/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(6): 753–764.
- [25] XU R, SHEN X, XIE H, et al. Identification of the canonical and noncanonical role of miR-143/145 in estrogen-deficient bone loss[J]. *Theranostics*, 2021, 11(11): 5491–5510.
- [26] MELANIE V, ARKADIUSZ O, SABRINA S, et al. An antagonistic monoclonal anti-Plexin-B1 antibody exerts therapeutic effects in mouse models of postmenopausal osteoporosis and multiple sclerosis[J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(9): 102265.
- [27] NI X, WU B, LI S, et al. Equol exerts a protective effect on postmenopausal osteoporosis by upregulating OPG/RANKL pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154509.
- [28] 付晓宁, 胡朝晖. 骨代谢生化指标对于骨质疏松症诊断与治疗的临床意义[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2018, 33(9): 1003–1005.
- [29] 刘蔚楠, 周晓霞, 朱玮, 等. 益肾健骨膏对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(6): 857–862.
- [30] ZHANG J, ZHANG Q, LIU H, et al. Soy-whey dual-protein alleviates osteoporosis of ovariectomized rats via regulating bone fat metabolism through gut-liver-bone axis[J]. *Nutrition*, 2022, 103/104: 111723.
- [31] LARRAÑAGA-VERA A, TOTI K S, FLATOW J S, et al. Novel alendronate-CGS21680 conjugate reduces bone resorption and induces new bone formation in post-menopausal osteoporosis and inflammatory osteolysis mouse models[J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 265.
- [32] 刘文静, 杨娟, 张楚天, 等. 巴戟天抗去卵巢骨质疏松大鼠的血清代谢组分析[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(3): 446–453.
- [33] 叶维建, 李国山, 黄建芳. 甲状旁腺激素对绝经后骨质疏松大鼠骨密度和骨生物力学的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(8): 1991–1994.
- [34] ZHENG L, ZHUANG Z, LI Y, et al. Bone targeting antioxi-dative nano-iron oxide for treating postmenopausal osteoporosis[J]. *Bioact Mater*, 2022, 14: 250–261.
- [35] 许勇, 谢贤斐, 颜威, 等. 木犀草素调控 PI3K/AKT 通路改善绝经后骨质疏松症大鼠模型骨丢失的机制[J]. *热带医学杂志*, 2022, 22(5): 639–643.
- [36] 文枝, 于慧, 龙琼, 等. 基于药效成分比较研究山萸肉酒制前后分别配伍入六味地黄汤对绝经后骨质疏松症模型大鼠的干预作用[J/OL]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2023 [2023-12-1]. <https://link.cnki.net/urlid/11.5699.r.20231123.1644.004>.
- [37] ZHOU E, XIANG D, YU B, et al. Ovarian tissue transplantation ameliorates osteoporosis and dyslipidaemia in ovariectomised mice[J]. *J Ovarian Res*, 2022, 15(1): 139.
- [38] ZHAO Y, XU Y, ZHENG H, et al. QingYan formula extracts protect against postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rat model via active ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113644.
- [39] TAO H, LI W, ZHANG W, et al. Urolithin A suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and postmenopausal osteoporosis by, suppresses inflammation and downstream NF- $\kappa$ B activated pyroptosis pathways[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 174: 105967.
- [40] 凌家艳, 刘庆, 马威, 等. 补肾通络方对去势大鼠骨质疏松症模型子宫内膜和骨量流失的影响[J]. *中医药导报*, 2022, 28(6): 20–23.
- (收稿日期: 2023-09-09 本文编辑: 吕宁)

(上接第 45 页)

- [44] BAO W, ZHANG Q, ZHENG H, et al. Radix astragali polysaccharide RAP directly protects hematopoietic stem cells from chemotherapy-induced myelosuppression by increasing FOS expression[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 1715–1722.
- [45] 雷蕾, 李小阳, 刘骏, 等. 化学功效组学: 中药现代研究的新方向——以止血药和活血化瘀药核心成分群研究为例[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(24): 6803–6809.
- [46] 向为民, 徐无忌. 加味桃红四物汤治疗腰椎后路椎体融合术后隐性失血的临床研究[J]. *云南中医中药杂志*, 2023, 44(2): 53–56.
- [47] 班正涛, 李少荣, 刘汝专, 等. 益血生膏方对腰椎后路椎间融合术术后隐性失血的影响[J]. *广西中医药*, 2020, 43(4): 25–28.
- [48] YOKOI H, CHAKRAVARTHY V, WINKLEMAN R, et al. Incorporation of blood and fluid management within an enhanced recovery after surgery protocol in complex spine surgery[J]. *Global Spine J*, 2022, 23: 21925682221120399.
- [49] 邓罗义, 杨华, 宁旭, 等. 腰椎后路手术患者隐性失血的影响因素[J]. *骨科临床与研究杂志*, 2022, 7(4): 245–250.
- [50] 柏天婷, 冷楠楠, 左莹, 等. 营养状况与髌骨骨折围手术期隐性失血的研究进展[J]. *联勤军事医学*, 2023, 37(2): 171–175.
- (收稿日期: 2023-08-28 本文编辑: 杨雅)