

應用卵巢摘除術和低鈣飼糧建立兔骨質疏鬆症模式⁽¹⁾

蔡佩均⁽²⁾⁽⁴⁾ 陳裕信⁽²⁾ 康定傑⁽³⁾ 陳立人⁽²⁾

收件日期：110 年 9 月 10 日；接受日期：111 年 6 月 2 日

摘 要

此研究的目的是為應用母兔建立骨質疏鬆症 (osteoporosis) 動物模式以模擬更年期婦女，提供後續藥物試驗的模式動物。成熟之紐西蘭母兔 6 隻隨機分為卵巢摘除組 (ovariectomized group, OVX) 與對照組 (sham-surgery group, SHAM)；卵巢摘除組餵食低鈣 (0.68% calcium) 而對照組餵食正常含鈣量之兔飼料 (1.36% calcium)，第 4 週手術，10 週後犧牲取後腿脛骨以微米級電腦斷層掃描儀 (micro computed tomography, micro CT) 進行 3D 成像合成顯微結構，並以雙能量 X 光吸光式測定儀 (dual energy x-ray absorptiometry, DXA) 分析測量脛骨骨密度 (bone mineral density, BMD)，以及進行脛骨組織切片之組織化學染色分析。結果顯示，OVX 組母兔之左右後腿脛骨的 BMD 在 OVX 手術後比 SHAM 組分別減少了約 34.7% 與 53%。組織化學染色的分析結果顯示，OVX 組之兔後腿脛骨之哈氏小管變大及骨小樑變細、減少、間隙變寬，都是發生骨質疏鬆症的組織學明顯的典型之特徵。本研究利用卵巢摘除手術配合餵飼低鈣飼糧所建立的兔骨質疏鬆症動物模式，已可提供人類骨質疏鬆症研究所用。

關鍵詞：骨質疏鬆症、動物模式、紐西蘭白兔。

緒 言

骨質疏鬆症 (osteoporosis, OP) 是一種骨骼疾病，會增加由於低骨密度導致的骨小樑受損或骨強度降低造成的骨折風險。這種無明顯外觀症狀的情況，若非經身體檢查通常難以預先發現，直到患者出現經常性地發生髖部、脊柱、肱骨近端、骨盆和 / 或腕部的低創傷骨折而導致住院 (Cosman *et al.*, 2014; Jeremiah *et al.*, 2015)。骨質疏鬆症在美國影響了大約 1,400 萬人 (Tu *et al.*, 2018)。2005 – 2008 年臺灣國民營養與健康調查 (Nutrition and Health Survey in Taiwan, NAHSIT) 使用骨密度 (bone mineral density, BMD) 評估並得知 50 歲以上的臺灣人中，38.3% 的女性和 23.9% 的男性患有骨質疏鬆症 (Lin and Pan, 2011)，相當於全臺灣約有 160 萬人患有骨質疏鬆症，包括 95 萬名婦女。50 歲以上女性的研究結果顯示，臺灣地區骨質疏鬆症盛行率已由 2001 年的 12% 升至 2006 年為 14% (Lan *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2011)。罹患率越來越高的高比例骨質疏鬆症，讓臺灣成為亞洲國家中髖部骨折發生率最高的地方，這數據也高於世界平均 (Kanis *et al.*, 2012)。

雌激素對骨骼健康有兩個關鍵作用。首先，雌激素對於正常的骨骼成熟和礦物質獲取以達成最高峰骨質至關重要；再者，雌激素藉由調節骨重塑 (bone remodeling) 來維持成年後的骨質。雌激素缺乏會導致骨質減少 (bone loss) 以及骨微結構 (bone microarchitecture) 惡化兩個典型骨質疏鬆症標誌。因此，雌激素缺乏是導致與年齡相關的骨質流失的主要決定因素，同時也是女性和男性骨質疏鬆症的主要原因 (Tu *et al.*, 2018)。

雌激素缺乏還會導致骨骼微結構的惡化和骨骼強度的降低。骨骼強度係由骨骼幾何形狀 (geometry)、皮質厚度 (cortical thickness)、孔隙率 (porosity)、骨小樑形態 (trabecular bone morphology) 和骨組織的內在特性所決定。骨重塑導致骨強度的主要決定因素發生改變，例如包括質量、微結構 (小樑體積、連結性和厚度)、幾何形狀 (外徑和皮質厚度) 以及與骨強度的內在機械質量相關的骨組織之因素 (礦化、膠原纖維排列和連接、孔隙率、和微損傷) 的變動 (Ferrari and Ringe, 2010)。

由於沒有理想的骨質疏鬆症動物模型，自 1994 年以來，美國食品與藥物管理局 (U. S. Food and Drug Administration, FDA) 要求新的試驗藥物至少須提供至少兩種不同物種的動物臨床前評估 (Thompson *et al.*, 1995)。即

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2704 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(4) 通訊作者，E-mail: pctsai@mail.tlri.gov.tw。

使以卵巢摘除的大鼠作為停經後 (post-menopausal) 骨質疏鬆研究的實驗動物模式，儼然已成為「黃金標準」(Kalu, 1991; Frost and Jee, 1992; Lelovas *et al.*, 2008)，但此大鼠動物模式具有幾項缺點，像是無法達成真正地骨骼成熟，骨組織欠缺完整之哈氏小管系統 (Haversian system) 且重塑密骨質 (cortical bone) 的效率太低 (Mosekilde, 1995; Rodgers *et al.*, 1993)。這些條件限制了以大鼠為動物模式進行骨質疏鬆症新藥療效性評估的代表性，特別是需要探討動態的骨小樑和密骨質重塑的骨形成藥劑。因此，建立其他動物物種以作為研究骨質疏鬆症更適當的動物模式顯得更加迫切。兔之骨骼在 7 – 8 月齡時到達完全成熟，顯示出可觀的密質骨間的重塑，並擁有比其他齧齒類及甚至靈長類較快的骨周轉率 (Gilsanz *et al.*, 1988; Newman *et al.*, 1995)，常被用做研究組織可以向內生長的骨骼植入物和骨植入交界面整合 (osteointegration) 的試驗動物 (Mori *et al.*, 1997; Southard *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2004)。雖然有這些潛在優勢，兔骨質疏鬆症模式 (rabbit osteoporosis) 先前已經有被許多團隊嘗試建立 (Mori *et al.*, 1997; Castañeda *et al.*, 2008; Wanderman *et al.*, 2018)，均以卵巢摘除 (ovariectomy, OVX) 手術或再搭配糖皮質激素 (glucocorticoid) 或副甲狀腺素 (parathyroid hormone) 等施打以加速兔骨質疏鬆症的形成，均產生不同的效果，但目前缺乏哪種是最佳方式的共識 (Permuy *et al.*, 2019)。

本研究以摘除母兔卵巢的方式，模擬更年期婦女的生理狀態，不以添加激素干擾骨質生成，而是藉由餵食低鈣飼糧此種比較新穎的方式進一步誘導；同時將其骨密度、骨微構造 (bone microarchitecture) 及骨組織特徵都列入評估測試項目，企以建立兔之骨質疏鬆症模式動物。

材料與方法

I. 試驗動物之飼養管理

供試之紐西蘭大白兔係來自於行政院農業委員會畜產試驗所 (簡稱畜試所) 兔舍，飼養於半開放式畜舍，籠架長 1.40 公尺，寬 0.43 公尺，高 0.41 公尺；採自然光照，無空調控制溫濕度，飲水由自動給水裝置供應，飼料則採任飼。本研究涉及之動物試驗係於畜試所執行，動物之使用、飼養及實驗內容皆依據畜試所實驗動物照護及使用小組審查同意進行 (動物實驗申請表暨同意書編號：107-1)。

II. 試驗設計

6 隻供試之紐西蘭大白兔母兔在四個月齡時逢機分為兩組，一組為卵巢摘除組 (OVX 組，3 隻)，另一組為對照組 (SHAM 組，3 隻)。OVX 組餵飼低鈣飼料 (41 號料，含鈣 0.68%) 而 SHAM 組餵飼一般兔飼料 (36 號料，含鈣 1.36%)。OVX 組先以 36 號及 41 號料 1:1 之混合飼料餵飼兩週，之後再全換成 41 號低鈣飼料；而 SHAM 組的兔子則全程餵飼 36 號料。適應 4 週之後進行卵巢摘除手術 (圖 1)。

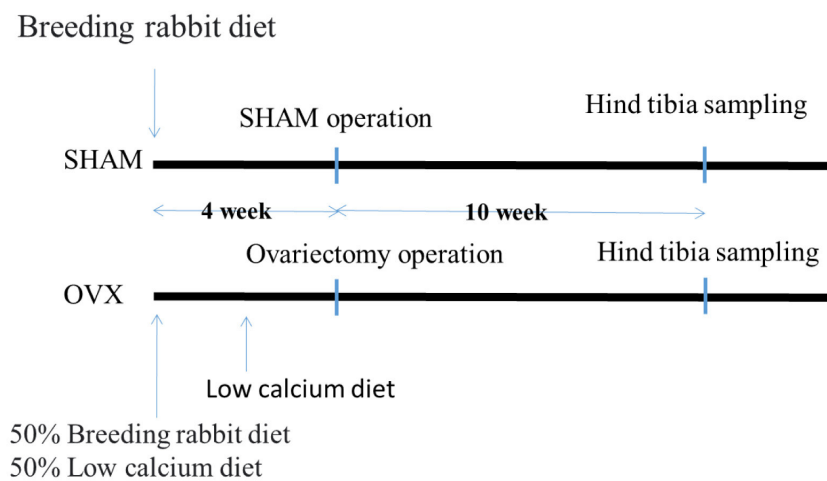


圖 1. 兔骨鬆試驗處理時序安排。

Fig. 1. Experimental processes of rabbit osteoporosis study.

III. 兔卵巢摘除手術操作

母兔以舒泰 (Zoletil 50) / 若朋 (rompum 20) 混合液 (10:1) 進行肌肉注射 (0.6 mL/kg body wt.) 予以麻醉。母兔腹部經剃毛消毒後，自其倒數第一及第二對乳頭之間沿腹中線縱向依序切開皮膚、肌肉層及腹膜約 5 公分，

以腸鉗夾住子宮角暴露出卵巢。先在子宮輸卵管交接處用 14 cm 彎式止血鉗固定住卵巢下緣，再以另一隻 16 cm 彎式止血鉗固定在前述止血鉗下方，再旋轉 14 cm 彎式止血鉗至卵巢與輸卵管斷開分離予以摘除卵巢，再解開止血鉗確認沒有出血。兩側卵巢均如此摘除之後，依序縫合腹膜、肌肉及皮膚層傷口。術後七日每天肌肉注射福力鎮注射液 (Flunixin, meglumine type, 5%) 止痛 (0.1 mL/ 隻)，並給予皮下注射抗生素 (益樂富注射液 10% , 0.1 mL/kg)；同時觀察採食飲水情形，若沒採食則以乳酸林格氏注射液 (30 – 50 mL/ 隻) 進行輸液。SHAM 組僅進行麻醉及腹腔切開手術後縫合而不進行卵巢摘除。

IV. 體重變化紀錄

自 4 月齡起，餵飼低鈣飼料之 OVX 組及吃一般 36 號料之 SHAM 組兔隻每週秤重，總共為期 14 週，以記錄試驗期間體重變化。

V. 脛骨 (tibia) 採樣

OVX 組摘除卵巢處理後 10 週，連同 SHAM 組的兔隻予以安樂死犧牲後，剔除後腿毛及肌肉，取下脛骨以 10% 福馬林浸泡，待後續分析。

VI. 微米級電腦斷層掃描儀 (micro computed tomography, micro CT) 分析

以模擬連續橫切的方式利用微米級電腦斷層掃描儀 (SkyScan1076, Burkert, Germany) 之 X- 光以 1 片 18 μm 的厚度掃描兔後腿脛骨，設定範圍後，再以電腦軟體 (NRecon Reconstruction 及 dataviewer) 模擬 3D 成像合成兔後腿脛骨顯微結構的圖像。

VII. 雙能量 X 光吸收式測定儀 (dual energy x-ray absorptiometry, DXA) 分析

DXA (Lunar Prodigy, GE, 醫影股份有限公司) 為可產生兩種低能量 X 光的 X 光機。不同能量的 X 光對不同介質衰減的程度不同，介質的密度越高，對 X 光造成的衰減越大。DXA 藉助不同能量之 X 光在骨骼和軟骨組織穿透度的差異，據以測量單位面積內的礦物質含量，以 g/cm^2 來表示其骨質密度檢查數值，本試驗即以 DXA 掃描 OVX 與 SHAM 組之兔後腿脛骨，再以對應之軟體 (GE Medical systems, encore 2004 software) 輸出 BMD 數值。

VIII. 組織化學染色的分析 (hematoxylin/eosin staining)

兔後腿脛骨經 10% 福馬林固定後以乙醇脫水完畢後，再以 10% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 脫鈣 30 天，再經石蠟包埋後切成 0.5 μm 厚的組織切片，貼在載玻片上進行 hematoxylin/eosin 染色，用光學顯微鏡觀察分析並拍照記錄。常規的 hematoxylin/eosin 染色，可將軟骨組織染成藍色，軟骨凹窩不著色，成熟的骨小樑被染成粉紅色。

IX. 統計分析

試驗結果以 SAS (2009) 套裝軟體 (SAS 9.3) 進行統計分析，使用一般線性模式程序 (general linear model procedure, GLM) 進行變方分析，再以最小平方平均法 (least square means, LSMEANS) 比較其差異。

結 果

I. 體重變化

試驗期間兔隻體重變化如圖 2 所示，X 軸週數表示的是兔子移入個別籠舍時序，移入個別籠，開始不同飼料餵飼 (詳見圖 1) 適應 4 週後進行手術。試驗期間平均體重變化的情形如圖 2 所示；在第 4 週進行手術後 OVX 組體重有明顯變輕 (手術後連續二週， $P < 0.05$)，直到第 6 週後開始恢復，且超過移入個別籠時 (第 0 週) 的體重；而 SHAM 組兔隻體重在試驗期間都呈現平緩而無變化。

II. Micro CT 分析結果

兔後腿脛骨經由 micro CT 進行 3D 造影重塑之骨頭影像如圖 3 所示，比較 OVX 組與 SHAM 組 (其上編號為兔耳號) 並無明顯差異。

III. DXA 分析結果

利用 DXA 掃描並計算兔後腿脛骨骨密度之結果如圖 4，顯示 OVX 組與 SHAM 組的左後腿脛骨 BMD 值有顯著差異 (0.162 ± 0.028 vs. 0.248 ± 0.032 , $P < 0.05$)，且 OVX 組的右後腿脛骨 BMD 也顯著低於 SHAM 組 (0.174 ± 0.005 vs. 0.371 ± 0.013 , $P < 0.05$)。由上述結果得知 OVX 組兔之左後腿脛骨的 BMD 在 OVX 手術後比 SHAM 組減少了約 34.7%，而 OVX 組兔之右後腿脛骨之 BMD 在 OVX 手術後比 SHAM 組減少了 53%。依據世

界衛生組織 2004 年對骨質疏鬆症標準的訂定為 BMD 比正常年輕健康女性低 2.5 個標準偏差 (standard deviation, SD) (WHO, 2004)，即大約比正常值少 25%。由此可知，本研究應用卵巢摘除手術和餵飼低鈣飼料誘導紐西蘭白兔，可導致兔之後腿脛骨骨質明顯降低，且其降低的程度已達符合 WHO 定義的骨質疏鬆症認定標準。

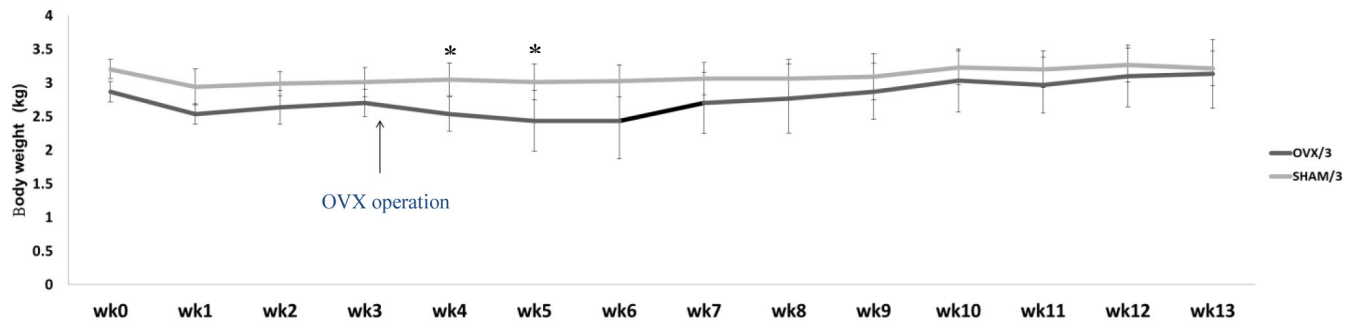


圖 2. SHAM 組及 OVX 組在試驗 14 週期間平均體重變化情形 (n = 3 / 組) 如圖中所示 OVX 組的體重在卵巢摘除手術後 1 – 2 週有顯著下降情形 ($P < 0.05$)，10 週後體重則恢復，且超過第 0 週體重，而 SHAM 組體重在試驗期間則沒有明顯的變化。

Fig. 2. Average body weight of the rabbits in SHAM and OVX groups through 14-wk experimental period (n = 3/group). As shown in the figure, the weight of the OVX group decreased significantly after 1-2 weeks after the OVX operation, and the weight recovered after 10 weeks, and exceeded the weight of the 0th week. The body weight of the SHAM group did not change significantly during the test period.

SHAM: SHAM-surgery group, OVX: ovariectomized group.

* means $P < 0.05$.

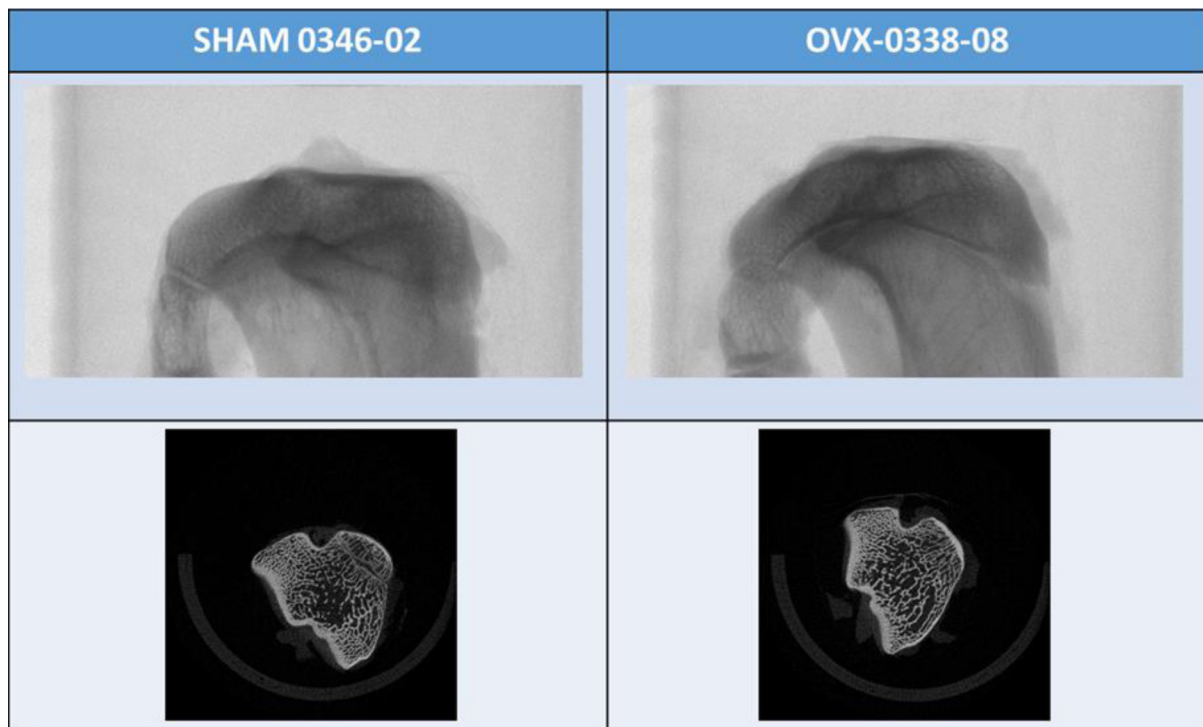


圖 3. 紐西蘭白兔 SHAM 組及 OVX 組小腿脛骨利用 micro CT 進行 3D 成像結果，上圖為縱切面，下圖為橫切面。

Fig. 3. The micro CT image of the hind tibia from the New Zealand White rabbits in SHAM and the OVX groups. The picture above is a longitudinal section, and the picture below is a transverse section.

SHAM: sham-surgery group, OVX: ovariectomized group

IV. 組織化學染色分析結果

兔後腿脛骨經固定、脫水、石蠟包埋、切片後以 hematoxylin/eosin 染色鏡檢分析結果如圖 5 所示，顯現 OVX 組的兔後腿脛骨之哈氏小管系統 (圖 5A 箭頭處) 的直徑比 SHAM 組大。進一步放大如圖 5B 及 5C，可見 OVX 組的骨小樑 (bone trabecula, 方框) 比 SHAM 組的明顯變細、間隙變大且比 SHAM 組稀疏。這些骨組織特徵的變化，顯示供試 OVX 組紐西蘭白兔在經過卵巢摘除與餵飼低鈣飼料的處理後，已被誘導發生典型的骨質疏

鬆症狀。

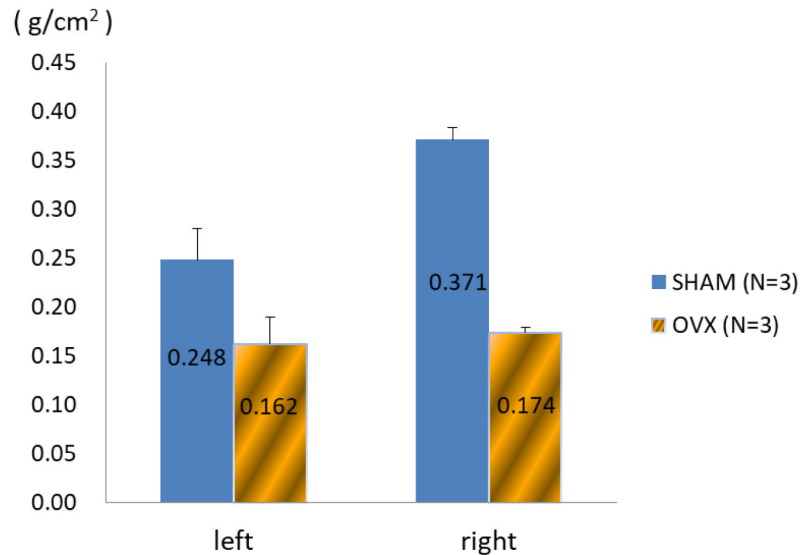


圖 4. 利用 DXA 偵測比較 SHAM 組與 OVX 組紐西蘭白兔後肢脛骨密度。圖中顯示不論是左後肢或右後肢，OVX 組骨密度顯著低於 SHAM 組 ($P < 0.05$)。

Fig 4. Comparison of bone mineral density of the hind legs of the New Zealand White rabbits in SHAM and the OVX groups by using DXA. The figure shows that whether it is the left hind limb or the right hind limb, the bone density of the OVX group is significantly lower than that of the SHAM group.

SHAM: sham-surgery group, OVX: ovariectomized group, DXA: dual energy x-ray absorptiometry.

討 論

骨骼是一種動態組織，終生會不斷調整其結構。它最初是在發育過程中通過骨膜內或軟骨內骨化過程形成的。一旦形成，骨骼就會通過塑形 (modeling) 進行改變形狀和生長，這是一個在既定的骨骼表面上發生骨骼形成或骨骼吸收的過程。骨重塑 (remodeling) 的功能是更新骨骼，並涉及同一空間位置的連續骨吸收和形成。骨形成及骨吸收這兩個過程都會影響整體骨骼結構，而骨重塑會影響材料特性，例如微損傷、礦化和膠原交聯。骨形成和吸收的臨床評估可以透過骨活檢的組織學評估或血清和尿液生物標誌物的檢視分析來進行 (Yan *et al.*, 2018)。

(5A)

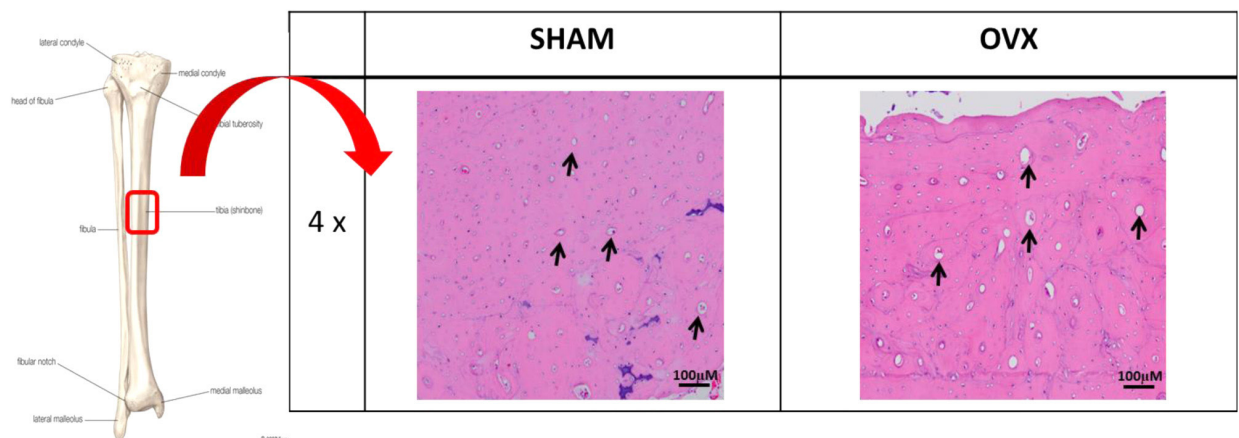


圖 5. SHAM 組及 OVX 組西蘭白兔後腿脛骨切片以組織化學染色結果。

5(A) 由後腿脛骨切片可見 OVX 組之哈式小管系統 (箭頭處) 之直徑明顯比 SHAM 組大。

Fig. 5. The histochemical staining of the hind tibia slices of the New Zealand rabbits in SHAM and OVX groups.

5(A) From the tibia section of the hind leg, it can be seen that the diameter of the Ha-tube system (arrow) in the OVX group is significantly larger than that in the SHAM group.

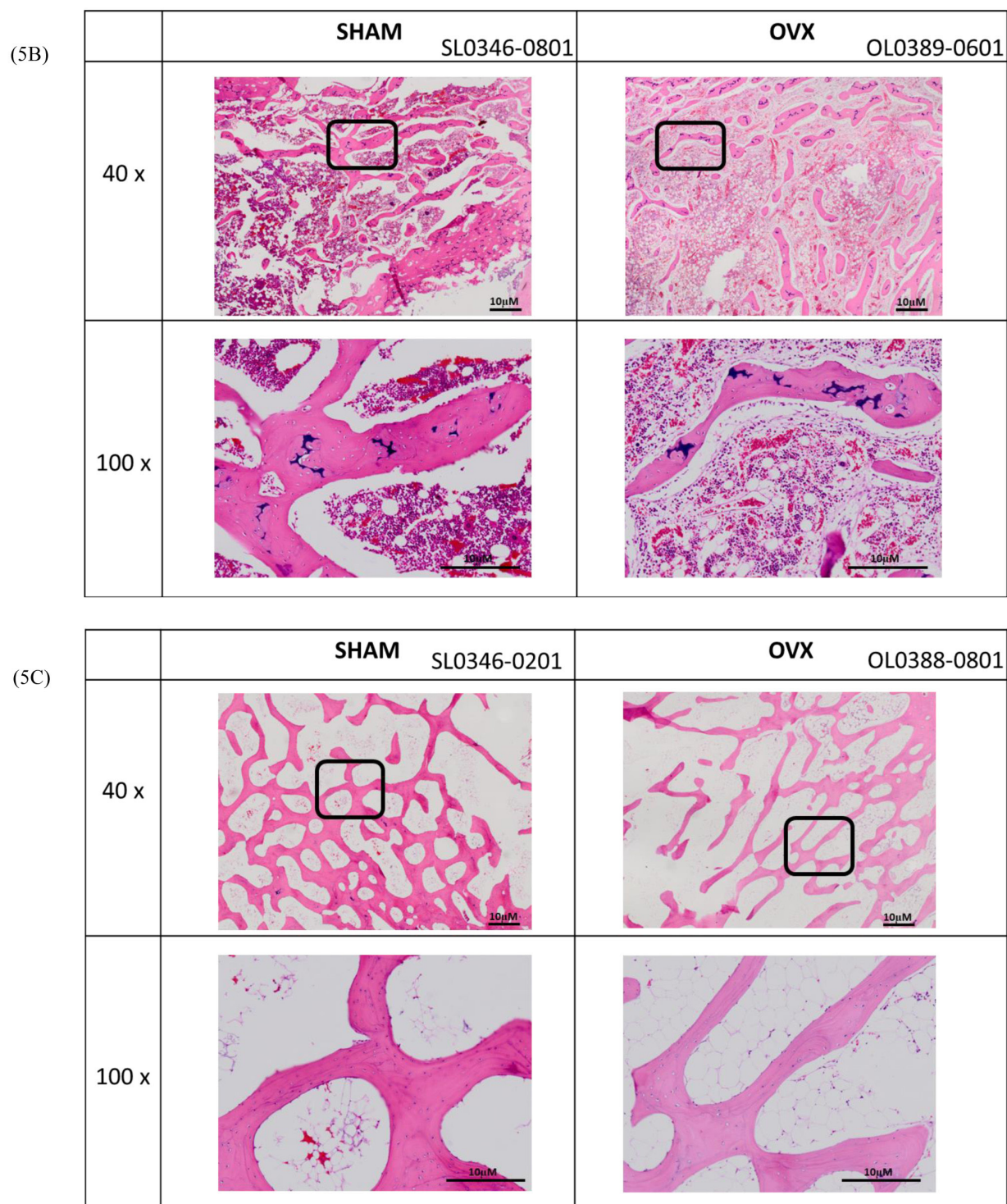


圖 5. SHAM 組及 OVX 組西蘭白兔後腿脛骨切片以組織化學染色結果。(續)

5(B) 放大到 40 倍可見 OVX 組之骨小樑 (方框處) 明顯較 SHAM 組細, 且間隙較大, 比較稀疏。

5(C) 可見 SHAM 組骨小樑 (方框處) 厚度較大, OVX 組骨小樑變薄且結構鬆散。

Fig. 5. The histochemical staining of the hind tibia slices of the New Zealand rabbits in SHAM and OVX groups. (continued)
5(B) Magnified to 40 times, it can be seen that the trabecula (square) of the OVX group is obviously thinner than that of the SHAM group, and the gap is larger and sparse.

5(C) It can be seen that the trabecular bone (square) in the SHAM group is thicker, and the trabecular bone in the OVX group is thinner and loose in structure.

兔子具有活躍的哈氏小管重塑 (Haversian remodeling) 系統, 且可快速達到骨骼成熟階段 (Gilsanz *et al.*, 1988), 先前 Baofeng *et al.* (2010) 指出對於母兔僅以摘除卵巢處理, 10 週後尚不足以引起明顯的 BMD 降低; Turner (2001) 甚至指出以卵巢摘除法進行骨質疏鬆症誘導時, 兔子是很差的模式動物, 因為誘導徵狀的結果不明顯。先前 Dai *et al.* (2015) 將六個月大之日本大白兔進行雙邊卵巢摘除, 沒有用其他處理, 手術 150 天後, 兔的脊髓 BMD

比對照組降了 14%，明顯發生骨質疏鬆症狀，但耗時太久。故後續許多相關研究還會佐以施打糖皮質激素 (methylprednisolone, MP) 以加速骨鬆症之進程。本研究中則在 OVX 組繼之以減少飼料中的鈣 (約平常量的一半) 的方式，促使骨質疏鬆的現象在手術後 10 週即可出現，致使 OVX 組兔左邊脛骨與右邊脛骨 BMD 量分別比對照組少了 34.7 及 53%，已達符合世界衛生組織訂定之骨質疏鬆症 BMD 比正常值少了 25% 的標準 (WHO, 2004)，本研究結果誘發之 BMD 減少的程度比該標準還高。而且 OVX 組兔後腿脛骨之哈氏小管變大及骨小樑變細、減少、間隙變寬，都是發生骨質疏鬆症的組織學典型之特徵，足證明本研究所建立的兔骨質疏鬆症動物模式已達可提供人類骨質疏鬆症之研究所用。

結 論

在研究人類疾病的致病機制，和開發對應的新藥與新療法時，適當的實驗動物模式是很重要的，其對於增進病因學、病理生理學及診斷的研究方面都有貢獻，且對於疾病的預防和療法的開發具有關鍵性的影響。本研究比較紐西蘭大白兔 OVX 組和 SHAM 組之 BMD 值及脛骨組織化學染色的顯著差異結果，證實兔的骨質疏鬆症動物模式可以經由卵巢摘除手術搭配餵飼低鈣飼糧的處理方式成功建立。

誌 謝

試驗期間承成功大學李澤明教授及周宛靜小姐協助成大醫院儀器商借，另本組兔舍陳念琪及林明村先生協助試驗動物照顧及試驗資料整理，特此誌謝。

參考文獻

- Baofeng, Li, Z. Yuan, B. Chen, G. Meng, Q. Yin, and J. Liu. 2010. Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. *Acta Orthop.* 81: 396-401.
- Cao, T., T. Shirota, K. Ohno, and K. I. Michi. 2004. Mineralized bone loss in partially edentulous trabeculae of ovariectomized rabbit mandibles. *J. Periodontal. Res.* 39: 37-41.
- Castañeda, S., E. Calvo, R. Largo, R. González-González, C. de la Piedra, M. Díaz-Curiel, and G. Herrero-Beaumont. 2008. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *J. Bone. Miner. Metab.* 26: 53-59.
- Chang, S. F., C. M. Hong, and R. S. Yang. 2011. Global computer-assisted appraisal of osteoporosis risk in Asian women: an innovative study. *J. Clin. Nurs.* 20: 1357-1364.
- Cosman, F., S. J. de Beur, M. S. LeBoff, E. M. Lewiecki, B. Tanner, S. Randall, and R. Lindsay. 2014. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 25: 2359-2381.
- Dai, L., H. Wu, S. Yu, H. Zhao, L. Xue, M. Xu, Z. Shen, and M. Hu. 2015. Effects of OsteoKing on osteoporotic rabbits. *Mol. Med. Rep.* 12: 1066-1074.
- Ferrari, S. and J. D. Ringe. 2010. Pathophysiology of postmenopausal osteoporosis, In: Rizzoli, R. (Ed.), *Atlas of Postmenopausal Osteoporosis*, Springer Healthcare Ltd., Tarporley, pp. 1-32.
- Frost, H. M. and W. S. Jee. 1992. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner.* 18: 227-236.
- Gilsanz, V., T. F. Roe, D. T. Gibbens, E. E. Schulz, M. E. Carlson, O. Gonzalez, and M. I. Boechat. 1988. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am. J. Physiol.* 255(4 Pt 1): E416-421.
- Jeremiah, M. P., B. K. Unwin, M. H. Greenawald, and V. E. Casiano. 2015. Diagnosis and management of osteoporosis. *Am. Fam. Physician* 92: 261-268.
- Kalu, D. N. 1991. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 15: 175-191.
- Kanis, J. A., A. Odén, E. V. McCloskey, H. Johansson, D. A. Wahl, and C. Cooper. 2012. A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. *Osteoporos. Int.* 23: 2239-2256.
- Lan, T. Y., S. M. Hou, C. Y. Chen, W. C. Chang, J. Lin, C. C. Lin, W. J. Liu, T. F. Shih, and T. Y. Tai. 2010. Risk factors for hip fracture in older adults: a case-control study in Taiwan. *Osteoporos. Int.* 21: 773-784.
- Lelovas, P. P., T. T. Xanthos, S. E. Thoma, G. P. Lyrakis, and I. A. Dontas. 2008. The laboratory rat as an animal model for

- osteoporosis research. *Comp. Med.* 58: 424-430.
- Lin, Y. C. and W. H. Pan. 2011. Bone mineral density in adults in Taiwan: results of the nutrition and health survey in Taiwan 2005-2008 (NAHSIT 2005-2008). *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 20: 283-291.
- Rodgers, J. B., M. C. Monier-Faugere, and H. Malluche. 1993. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone* 14: 369-377.
- Mosekilde, L. 1995. Assessing bone quality-animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone* 17(4 Suppl): 343-352.
- Mori, H., M. Manabe, Y. Kurachi, and M. Nagumo. 1997. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 55: 351-361.
- Newman, E., A. S. Turner, and J. D. Wark. 1995. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 16(4 Suppl): 277-284.
- Permuy, M., M. López-Peña, F. Muñoz, and A. González-Cantalapiedra. 2019. Rabbit as model for osteoporosis research. *J. Bone Miner. Metab.* 37: 573-583.
- SAS. 2009. SAS User's guide: Statistics. SAS Inst., Cary, NC. USA.
- Southard, T. E., K. A. Southard, K. E. Krizan, S. L. Hillis, J. W. Haller, J. Keller, and M. W. Vannier. 2000. Mandibular bone density and fractal dimension in rabbits with induced osteoporosis. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 89: 244-249.
- Thompson, D. D., H. A. Simmons, C. M. Pirie, and H. Z. Ke. 1995. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17(4 Suppl): 125-133.
- Tu, K. N., J. D. Lie, C. K. V. Wan, M. Cameron, A. G. Austel, J. K. Nguyen, K. Van, and D. Hyun. 2018. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. *P T.* 43: 92-104.
- Turner, A. S. 2001. Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. *Eur. Cell Mater.* 1: 66-81.
- Wanderman, N. R., C. Mallet, H. Giambini, N. Bao, C. Zhao, K. N. An, B. A. Freedman, and A. Nassr. 2018. An ovariectomy-induced rabbit osteoporotic model: a new perspective. *Asian Spine J.* 12: 12-17.
- World Health Organization (WHO). 2004. WHO Scientific Group on the assessment of osteoporosis at primary health care level: summary meeting report. May 5-7, Available at: www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf. Accessed December 27, 2017.
- Yan, D. D., J. Wang, X. H. Hou, Y. Q. Bao, Z. L. Zhang, C. Hu, and W. P. Jia. 2018. Association of serum uric acid levels with osteoporosis and bone turnover markers in a Chinese population. *Acta Pharmacol. Sin.* 39: 626-632.

Establishment of osteoporotic rabbit model by ovariectomy and lower Calcium diet ⁽¹⁾

Pei-Chun Tsai ^{(2) (4)} Yu-Hsin Chen ⁽²⁾ Ting-Chieh Kang ⁽³⁾ and Lih-Ren Chen ⁽²⁾

Received: Sep. 10, 2021; Accepted: Jun. 2, 2022

Abstract

The purpose of this study was to establish an animal model for osteoporosis in rabbits to simulate osteoporosis occurred in postmenopausal women, with subsequent drug trial supplied. Adult female New Zealand White rabbits were randomly divided into an ovariectomized (OVX) group and a sham-surgery (sham) group as the control group. The OVX group was fed with low calcium (0.68%) diet while the sham group was given with normal (1.36% Ca) rabbit diet for 10 weeks. The 3D microstructure visualization, bone mineral density (BMD), and histopathological evaluation of the hind tibia of sham and OVX groups were analyzed by micro computed tomography (micro CT), dual-energy x-ray absorptiometry (DXA), and hematoxylin/eosin staining accordingly. The BMD of the left and right hind tibia in the OVX group was 0.162 ± 0.028 and 0.174 ± 0.005 g/cm², respectively, and both were significantly lower than those in the sham group of 0.248 ± 0.032 and 0.371 ± 0.013 g/cm² ($P < 0.05$). On the other hand, the results in histopathological examination of the hind tibia showed a bigger diameter of Haversian system and the significantly thinner bone trabecular structure was found in the OVX group than that in the sham group. In conclusion, the animal model for osteoporosis in rabbits model induced by OVX and lower Ca diet was successfully established.

Key words: Osteoporosis, Animal model, New Zealand rabbit.

(1) Contribution No. 2704 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: pctsai@mail.tlri.gov.tw.