

# 卵巢切除对鼠椎体骨形态学的影响

胡侦明 戴克戎



**摘要** 3月龄成熟SD大鼠88只,随机分卵巢切除组(OVX)及假手术组(Sham-O),切除双侧卵巢或作假手术。术后1,3,5,7月时各分别处死,剖取出第4、5腰椎体,进行光镜、透射电镜、扫描电镜观察。发现OVX后椎体皮质骨及终板变薄,中央区小梁稀少、变细、吸收、穿孔、中断,水平连结小梁丧失,骨小梁胶原排列明显不规则甚至断裂,并可见较多骨小梁显微骨折及细微骨痂结构。大量功能活跃的破骨细胞出现,成骨细胞功能相对减退,向骨细胞转化。提示OVX后骨小梁的结构强度明显下降,椎体的力学强度降低。

**关键词** 卵巢切除 椎体 骨小梁 骨改建 鼠

Effect of ovariectomy on morphology and structure of vertebrae in rats

Hu Zhenming and Dai Kerong

Dept. of Orthopaedic surgery Affiliated Ninth Hospital Shanghai Medical University

Dept. of Orthopaedic Surgery, Affiliated Second Hospital, Kunming Medical College

**Abstract** The authors used 88 3-month-old females SD rats, weighing 180~240g, which were ovariectomized (OVX) or sham-operated (Sham-O). The rats were sacrificed at 1, 3, 5, 7 months later. Microscopy, transmission and scanning electron microscopy were used to observe the L<sub>4-5</sub> vertebrae. The results shows that in OVX rats, lumbar vertebral cortex were thin, perforated and even disappeared. Disorderly orientation and a age of the collagen structure of trabeculae were manifested. Microfracture and microcallus appeared, a large number of active osteoclasts and less active osteoblasts appeared. The results revealed that the structure strength of trabeculae declined post OVX.

**Key words** Ovariectomy Vertebrae Trabecular bone Bone remodeling Rats

骨改建发生于骨表面,小梁骨表面有骨内膜复盖,骨改建活动非常活跃<sup>[1,2]</sup>。雌激素缺乏时,骨转换增加,破骨细胞过于活跃,改建呈负平衡,这是绝经后骨质疏松症发生的主要原

因<sup>[3-5]</sup>。椎体具有特殊的几何形态,皮质菲薄,松质骨小梁丰富且在力学上具有明显的不均匀性及各向异性特性。椎体的力学性能除与骨量有关外,还与其形态结构密切相关。目前对于不

作者简介:胡侦明,男,1962年生,昆明医学院附二院骨科研究室主任、副教授、硕士生导师,云南省中青年学术和技术带头人,云南省骨科学会常委、骨质疏松学组副组长,昆明医学院毕业获学士、硕士学位,1996年毕业于上海第二医科大学获得博士学位。现从事骨科临床及骨质疏松研究工作,发表论文30余篇,主编专著一部,获省部级科技进步奖5项,第三届中国优秀青年科技创业奖。

作者单位:上海第二医科大学附属第九人民医院骨科(胡侦明 戴克戎)

现在昆明医学院附二院骨科 650101(胡侦明)

同年龄椎体皮质骨及终板的结构变化、松质骨小梁在改建中的形态学变化对骨小梁的结构强度乃至对椎体的力学强度的影响,还缺乏更多的了解<sup>[2,6-8]</sup>。本文通过对骨小梁形态结构及超微结构的研究,探讨卵巢切除椎体形态结构变化对其强度的影响。

## 1 材料与方法

3月龄成熟SD大鼠88只,体重180~240g,随机分卵巢切除组(OVX)及假手术组(Sham-O),每组44只。2.5%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉下经背双侧切口切除双侧卵巢或作假手术。动物分笼饲养,标准饲料喂养(含1%钙0.6%磷),室温20~25℃<sup>[9-1]</sup>。两组动物分别于手术后1,3,5,7月时各处死,剖取出第4,5腰椎体。

### 1.1 光学显微镜观察

1)脱钙切片观察:每组取L<sub>4</sub>椎体4个,腹侧磨见松质骨时固定于10%中性甲醛溶液中48小时,然后4.16% EDTA (PH7.4)溶液脱钙1周左右,待脱钙完成后,按常规方法进行梯度乙醇脱水,石蜡包埋,纵向切片(10μm),HE染色,以Olympus-BH<sub>2</sub>显微镜作普通光镜和偏光观察骨小梁形态。

2)不脱钙切片观察:每组取L<sub>4</sub>椎体4个,腹侧磨见松质骨时标本固定于10%中性甲醛溶液48小时,以乙醇逐级脱水,乙醚脱脂30分钟,甲基丙烯酸甲酯负压下浸透24小时,甲稀酸甲酯加5%过氧化苯甲酰于35~37℃水浴温箱内包埋,作纵向硬切片(50μm),HE染色,光镜及偏光镜观察皮质、终板及小梁结构。测量椎体一侧皮质骨的厚度,10倍物镜下测5点,取其平均值。

### 1.2 透射电镜观察

同法切取L<sub>4</sub>椎体松质骨1mm大小固定于2.5%戊二醛溶液24小时,4.13%中性EDTA脱钙35天(不全脱钙)后用0.1M二甲胂酸钠缓冲液冲洗,1%四氧化锇后固定1.5小时,乙醇逐级脱水,环氧树脂618包埋,700Å超薄切片,醋酸双铀-枸橼酸铅重染色,以H-200型透射电镜观察。

### 1.3 扫描电镜

取L<sub>4</sub>椎体二个,沿冠状面中线纵向切开,高压注射器冲洗剖面后用2.5%戊二醛溶液固定24小时,然后用0.1M二甲胂酸钠溶液冲洗,10%次氯酸钠液浸泡8小时,超声清洗15分钟,1%四氧化锇液后固定2小时,乙醇逐级脱水,醋酸异戊酯保存12小时,二氧化碳临界点干燥,真空喷金,在JMS-840扫描电镜下观察骨小梁的形态结构。

## 2 结果

### 2.1 普通光镜及偏光镜

Sham-O组椎体骨小梁结构完整,皮质骨厚实,小梁连接性完好,术后1~7月骨小梁形态无明显异常。偏光下骨小梁折光性强,胶原结构排列规则。而OVX组与Sham-O组相比较有明显差异,1月时椎体中央区小梁开始稀少,小梁变细,吸收,至3月时皮质变薄,终板变薄,5月时骨小梁进一步稀疏,小梁吸收,穿孔,中断,终板似有内陷的Schmorl氏结节征,终板变薄,7月时更加明显。偏光见骨小梁胶原排列明显不规则甚至断裂,折光性较差;在不脱钙硬组织切片中还可到典型的骨小梁微细骨痂。皮质骨厚度测量见表1。

表1 卵巢切除后椎体皮质骨厚度测定结果(μm)

时间(月)	1	3	5	7
OVX	242.73-15.52	217.51+4.13	182.57+35.66	178.87+27.15
Sham-O	246.36-21.61	250.64+15.71	261.59+18.77	268.74-23.43
P值	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01

## 2.2 透射电镜

1) Sham-O 组: 骨小梁表面覆盖有扁平状细胞, 核呈扁长形, 核内染色质深, 细胞浆少, 细胞器不发达。偶见位于骨表面的立方形成骨细胞, 其胞核为圆形或椭圆形, 胞浆丰富, 线粒体及粗面内质网发达, 分泌功能旺盛, 尚可见骨细胞位于骨小梁深层的骨陷窝内, 其细胞突伸入骨小管内, 骨细胞核为卵圆形, 核染色质浓聚, 胞浆较少, 线粒体及高尔基复合体不多, 粗面内质网不多, 极少见破骨细胞。

2) OVX 组: 1月时骨表面细胞明显活跃, 常可见功能活跃的骨细胞及处于分泌旺盛期的成骨细胞, 细胞器发达, 细胞体大, 胞浆丰富, 部分骨细胞异染色质较多呈块状聚于核的一侧。3月时可见到大量功能活跃的破骨细胞, 多核, 每个核可见1~2个核仁, 细胞体大, 有时贴附整个陷窝骨面, 胞浆丰富, 胞浆内有大量的线粒体和基质泡, 在与骨贴附的表面可见典型的透亮区(无细胞区)。5月时仍见大量的功能活跃的破骨细胞, 细胞旁可见骨吸收空腔, 成骨细胞不多。7月时仍见破骨细胞功能活跃, 成骨细胞功能减退, 向骨细胞转化, 周围出现骨陷窝轮廓。

## 2.3 扫描电镜

1) Sham-O 组: 椎体松质骨系由棒柱状(strut)或板条状骨小梁构成与椎体纵轴平行的垂直骨小梁和位于水平方向的骨小梁, 垂直骨小梁厚实, 水平骨小梁稍细, 水平骨小梁连结垂直的骨小梁形成立体的网状结构, 小梁结构主要位于椎体的上1/3及下1/3区, 表面光滑。小梁表面被覆有胶原纤维丝, 排列取向整齐、紧密, 纤维之间又有更细的纤维作斜形连接相邻的几条纤维, 以加固其结构。各阶段小梁表面改建吸收范围小, 吸收陷窝表浅, 陷窝内可见排列规整的更细小的纤维结构, 可能为新形成的类骨结构, 微细骨痂较少见。

2) OVX 组: 骨小梁也呈棒柱状或板条状结构, 但随着时间的推移骨小梁逐渐减少, 变细, 吸收, 中断。水平骨小梁的吸收变细更加明显, 椎体中1/3区小梁消失明显。1月时小梁结构开

始出现稀疏, 骨小梁连结尚可, 表面较多的浅表吸收陷窝(Howship's lacunae), 水平小梁变细, 吸收的浅表陷窝分布于骨小梁表面, 局部表面有胶原纤维丝覆盖, 陷窝的底部可见少量排列不规则及松散的纤维。3月时水平小梁明显变细, 吸收, 部分垂直骨小梁变细, 骨吸收表面扩大, 往往一个骨吸面累及几个骨小梁, 陷窝较深, 胶原纤维丝杂乱不规则, 并可见典型的显微骨折及细微骨痂结构, 部分小梁吸收变细, 菲薄近穿孔。5月时骨小梁进一步变细, 骨小梁吸收破坏后变细, 变尖, 终而断裂, 穿孔, 水平连结丧失, 以椎体中央区较明显。7月时骨小梁进一步稀少, 小梁表面广泛吸收, 表面纤维丝杂乱不规则, 有硬化征。

## 3 讨论

骨在代谢活动过程中的改建(remodeling)是骨吸收与骨形成之间的一种动态平衡。骨改建发生于骨表面, 小梁骨表面有骨内膜覆盖, 骨改建活动非常活跃<sup>[1,2,5,6]</sup>。雌激素有促进降钙素分泌、抑制破骨细胞的作用, 故当雌激素缺乏时, 骨转换增加, 破骨细胞过于活跃, 改建呈负平衡, 这是绝经后骨质疏松症发生的主要原因<sup>[3~5]</sup>。

骨质疏松时骨的结构变化主要表现在骨小梁变细, 穿孔甚至消失, 从而使骨的总体力学强度下降。对于雌激素缺乏引起的骨质疏松, 骨丢失的原因是因破骨细胞性骨吸收增加还是成骨细胞功能下降或数量减少而导致新骨形成减少, 或两者兼有之, 目前还存有争议<sup>[2,9]</sup>。

骨质疏松时骨小梁因破骨细胞性骨吸收而出现各种不同的特征, 诸如小梁减少, 变细, 变尖, 继而发生穿孔、断裂, 使骨小梁的三维结构和连续完整性丧失, 严重影响其结构强度和稳定性。Shen 等<sup>[10]</sup>也认为雌激素缺乏时, 骨吸收是因骨改建活动和骨转换增加, 改建呈负平衡, 成骨细胞量不足及破骨细胞活性过强所致。有人对破骨细胞的骨吸收作用机理进行了广泛深入的研究, 发现成骨细胞上有 PTH 及 1,25

(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>受体,成骨细胞介导了破骨细胞的吸收作用。

椎体结构的布局合理,几何结构特殊,中央区骨小梁呈网状多孔状结构,力学上具有各向异性。通常情况下骨小梁主要位于椎体的上1/3和下1/3部,承受椎体垂直方向上的压缩应力,故垂直小梁较粗,水平(横向)小梁较细。椎体中央段狭小,有血管穿行。椎体的皮质骨不具有一般皮质骨的(组织学)特征,可能是骨小梁承受应力和压缩而成,近年来发现皮质骨在椎体骨折病因学中亦起重要作用,其存在随年龄的增长而逐渐变薄的趋势,皮质骨及终板的厚度随着年龄的增加而减少,与椎体强度的减低相应<sup>[6,9]</sup>。当雌激素缺乏时,骨小梁的改建发生变化,这种变化开始出现在椎体中央的血管周围,继而扩大到椎体的上、下部,再到终板及皮质骨,但也有人认为由于椎体承受垂直压缩应力,椎体上、下1/3区水平小梁吸收得最早,微细骨折出现得较多。在骨改建过程中,骨小梁变细、吸收、穿孔(perforation),这种所谓的穿孔实际上是破骨细胞侵蚀(erosion)的陷窝太深或陷窝中成骨细胞量不足导致骨表面丢失的结果<sup>[5]</sup>。Parfitt等发现,椎体结构变化过程中,骨小梁数量的减少较厚度的变化出现早,随着破骨细胞的吸收,陷窝不断加深,或小梁壁两侧对应的吸收陷窝累加到一起,骨小梁又菲薄,以至穿孔。同时,骨吸收导致终板和皮质骨变薄,局部骨膜的成骨反应和骨赘形成,椎体横切面积发生变化,椎间发生退行性改变,当椎体载重时,最大的应力不位于终板的中央,而位于终板的边缘及皮质骨上<sup>[6~8]</sup>。

从本实验结果可以看出,OVX后1月时骨小梁的变化最先出现在椎体中央的血管周围,小梁变细、变薄,然后再至终板及皮质骨区,皮质骨的吸收从3月时较明显,与Sham-O组相比较, $P < 0.05$ ,在观察期内,7月时最薄。雌激素缺乏时,骨转换立即增加,破骨细胞的活性增强,骨小梁的基质结构受到严重影响,3个月时偏光下胶原结构排列不规则,甚至断裂,折光性

减弱。各阶段有不同形式的新骨形成,表现为电镜下骨小梁吸收陷窝内外的新骨形成胶原纤维。Sandber<sup>[11]</sup>发现,在破骨细胞吸收过程中,原来存在于骨组织中的转移生长因子(TGF- $\beta$ )可被释出,破骨细胞内封闭的微酸环境能使释出的TGF- $\beta$ 活化,进而刺激成骨细胞的基质形成,构成一个骨改建过程,但在卵巢切除7月时,这种骨的形成已严重受到影响。同时发现较多的破骨细胞,活性较强,成骨细胞相对减少,致使骨吸收不断加重,小梁表面陷窝加深,小梁变细、变薄,由于不能承受应力的刺激,水平小梁吸收、穿孔、断裂,小梁网连结性丧失,这种情况在7月时最为明显,与Wronski等<sup>[9]</sup>观察到的结果相近。

本实验结果显示,雌激素缺乏时椎体松质骨结构变化,骨小梁吸收、骨丢失的原因为破骨细胞的吸收增加,成骨细胞的成骨作用下降。实验中观察到有骨小梁细微骨折(microfracture)和微细骨痂(microcallous)结构的存在,被认为是变细的骨小梁在反复的周期性载荷作用下发生的致密骨微细破裂(microcrack),并在修复中形成的细微骨痂<sup>[11,12]</sup>。光镜下微细骨痂内为早期编织骨样结构,其折光性较邻近骨小梁弱,电镜下微细骨痂表面仍有吸收陷窝存在。显微骨折修复时产生的细微骨痂可能为一种暂时性支架,但此时骨小梁的结构强度已明显下降。当小梁网连结性丧失和结构强度较差的微细骨折达到足够数量时,在外力甚至无明显外力作用下,椎体即可发生骨折<sup>[1,7,11]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 Parfitt AM. The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. *Calcif Tissue Int*, 1984, 36 (Suppl), 37~45
- 2 Weinhold PS, Gilbert JA, Woodard JC. The significance of transient change in trabecular bone remodeling activation. *Bone*, 1994, 15: 577~584.
- 3 Dempster DW, Lindsay R. Pathogenesis of osteoporosis. *Lancet*, 1993, 341: 79~801. (下转第72页)

摘卵巢3个月后再天灸的骨密度比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。显然摘卵后马上施灸是防治本病的关键时机。

从研究的其它结果分析看也支持此观点。骨力学参数是反映骨质量可靠的指标。骨质疏松症引起骨力学强度下降。主要机理不仅为骨量丢失,还有骨正常结构布局合理性遭到了破坏<sup>[4]</sup>。骨的横截面积增加,骨干增粗主要反应了骨膜成骨作用增强,反之则说明成骨作用减弱<sup>[7]</sup>。骨干横截面积增加是机体的一种自我保护的代偿反应。从力学上分析,这种代偿是非常有意义的。因为骨分布远离中心可使骨的载荷力提高<sup>[5]</sup>。即当骨干增粗时,使骨干强度也增加。我们测量的载荷值虽然不等于骨强度,但在一定程度上反映了骨强度。本研究的结果提示:天灸可使去卵巢大鼠股骨干的横截面积有所增加,但仅局限在去卵巢马上天灸组。此结果又一次说明天灸的早期施用的重要意义。此外,无论摘卵巢后马上施灸还是3个月后再施灸的天灸组,最大载荷均明显增加。其中摘卵后马上天灸组与对照组比较呈现非常显著性差异 ( $P < 0.01$ )。天灸对弹性载荷的影响也仅体现在摘卵巢马上天灸组 ( $P < 0.01$ )。

综上所述,我们发现天灸在摘卵巢后马上

施用与摘卵巢3个月后再施用效果有显著差异。通常摘卵巢后马上天灸可有效地减少骨量丢失,对抗骨密度的下降,骨干增加、承载外力作用也有一定的提高。摘卵巢3个月后再施用天灸也有一定疗效,但比起早期施灸的效果要逊色些。可见施用天灸,抓住治疗时机是提高疗效最关键的环节。

### 参 考 文 献

- 1 李洪洋等. 去势雌鼠骨质疏松模型的研究. 现代预防医学, 1992, 19(1):5.
- 2 宋宪彝主编. 代谢性骨病学. 天津:天津科技出版社, 1989, 266~305.
- 3 孟昭亨. 见:刘忠厚主编. 骨质疏松症. 北京:化学工业出版社1992, 173.
- 4 Sgaard CH, Mosekilde L, Schwartz W, et al. Effects of fluoride on rat vertebral body biomechanical competence and bone mass. Bone, 1995, 16(1):163.
- 5 程小光. 骨质疏松的形态改变及对骨强度影响. 中国骨质疏松杂志, 1997(4):25.
- 6 姚清华. 骨质疏松发病机制和治疗原则. 中华骨科杂志, 1982, 2(1):60.
- 7 闫景龙. 低负荷对大鼠皮质骨结构和力学性能影响的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 1996(3):41.
- 8 孟昭亨. 骨钙素及其临床意义. 中华内分泌代谢杂志, 1992, 8(1):41.

(上接第12页)

- 4 胡侦明, 戴克戎. 小梁骨改建特点, 国外医学创伤与外科基本问题分册. 1996, 3:162.
- 5 Mosekilde L, Mosekilde Le. Sex differences in age-related changes in vertebral size, density and biomechanical competence in normal individual. Bone, 1990, 11:67~73.
- 6 胡侦明, 戴克戎. 椎体结构与其力学强度的关系. 医用生物力学, 1997, 2:143.
- 7 Parfitt AM. Implications of architecture for the pathogenesis and prevention of vertebral fracture. Bone, 1992, 13:41~47.
- 8 Snyder BD, Piazza S, Edwards WT, et al. Role of trabecular morphology in the etiology of age-related vertebral fracture. Calcif Tissue Int, 1993, 53(Suppl): 14~22.

- 9 Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. Bone, 1989, 10:295~301.
- 10 Omi N, Ezawa I. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. Bone, 1995, 17(Suppl):163~168.
- 11 Shen V, Birchban R, Xu R, et al. Short-term changes in histomorphometric and biochemical turnover markers and bone mineral density in estrogen-and dietary calcium-deficient rats. Bone, 1995, 16:149~156.
- 12 Hansson T, Ross B. Microcallouses of the trabeculae in lumbar vertebral relation to the bone mineral content. Spine, 1981, 6:375~380.
- 13 Sandber MM, Aro HT, Vuorio EL. Gene expression during bone repair. Clin Orthop, 1993, 289:292~312.