

骨质疏松症松质骨连接性参数改变 与计算机辅助测量

戴克戎 汤亭亭 薛文东 吴小涛 黄遂柱

摘要 目的 松质骨连接性参数主要指小梁骨的节点数和游离末端数,是反映松质骨显微构筑的重要参数,而松质骨的构筑情况可直接影响其力学性能。本研究旨在观察骨质疏松症小梁骨连接性参数的改变,并介绍一种计算机辅助测量方法。方法 对老年人和青年人股骨头负重区与非负重区、卵巢切除后7周大鼠椎体骨以及采用重组人生长激素治疗后的椎体标本,进行节点数和游离末端数的测量。并发展了小梁骨节点数和游离末端数的计算机图像自动分析系统。即采用 $5\mu\text{m}$ 硬组织切片将其光镜图像输入计算机,用我们自行编制的程序进行分析,结果与人工计量方法比较,具有很好的相关性(分别为 $r=0.95$, $r=0.99$)。结果 与青年人相比,老年人股骨头标本的节点数明显下降,游离末端数明显上升(均为 $P<0.05$),卵巢切除3个月后椎体小梁骨的节点数和游离末端数也呈现同样的变化趋势。而重组人生长激素治疗后这些参数有一定的改善,其中骨小梁节点数和末治疗组比较,其增加有统计学意义($P<0.05$)。结论 骨小梁节点数的下降和游离末端的增加是骨质疏松症的主要病理特征,这两个参数的计测对骨质疏松症的诊断、骨折风险预测和药物疗效评定具有较大的参考价值。

The Changes of Parameters of Cancellous Bone Connectivity of Osteoporosis and Computer-aided Measurement

Dai kerong, Tang Tingting, Xue Wendong, Wu Xiaotao, Huang Suizhu

Department of orthopedics, Ninth People's Hospital Shanghai Second medical University

Abstract **Aim:** To explore the changes of cancellous bone connectivity of osteoporosis and develop a computer-aided measurement method. **Methods:** we measured the numbers of nodes and free ends in the weight-bearing and non-weight-bearing areas of femoral head in the aged and the youth, in the vertebrae of rats 7 weeks after ovariectomy and in the specimens of vertebrae after treatment with recombinant human growth hormone. Also, a computer-aided image analysis system for the numbers of the nodes and free ends of trabeculae was developed, for examining $5\mu\text{m}$ undecalcified sections with the program drawn up by ourselves, the results being well correlated with those of manual measurements ($r=0.95$, $r=0.99$ respectively). **Results:** It was found that the number of nodes in the specimens of femoral head of the aged markedly reduced as compared with that in the youth, while the number of free ends markedly increased ($P<0.05$ in both cases); the two parameters of vertebral trabeculae 3 months after ovariectomy showed the same tendency of changes. Some improvements were observed in the specimens treated with recombinant human growth hormone, as compared with the untreated group, the increase in the number of trabecular nodes was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** The results suggest that

the decrease in the number of trabecular nodes and increase in the number of free ends are the principal pathological characteristics of osteoporosis. The measurement of these two parameters is of great value as reference for the diagnosis of osteoporosis, the prediction of the risk of fracture and the evaluation of pharmaceutical effects.

骨质疏松症的主要危害是骨折,引起骨折的直接原因是骨强度下降。骨量与骨强度有很好的相关性,但骨量并非是骨强度的唯一决定因素。与骨量丢失同时存在的骨结构退变,越来越多地受到重视。在众多反映骨结构变化的参数中,骨小梁连接性计测(主要是节点数和游离末端数)更能反映骨的力学强度^[1]。上海第二医科大学附属第九人民医院骨科近年来致力于骨结构变化与骨质疏松症的关系研究。本文是对其中部分工作的总结,包括对青年人与老年人股骨头标本、大鼠卵巢切除前后椎体小梁骨及重组人生长激素治疗前后小梁骨连接性参数变化的比较研究,以及这些参数测量的计算机自动分析方法。

1 材料和方法

1.1 标本来源

1.1.1 股骨头标本:老年组标本为新鲜股骨颈骨折行人工股骨头置换术时取出的股骨头。青年组标本取自急性脑外伤死亡后2小时的健康成人。每例任取一侧,在股骨头致密区和稀疏区各截取软骨下3 mm处7 mm×7 mm×5 mm松质骨块。

1.1.2 大鼠卵巢切除前后椎体标本:6月龄清洁级健康雌性SD大鼠10只,氯胺酮腹腔麻醉下背侧入路摘除双侧卵巢。假手术组大鼠仅做开腹手术,不摘除卵巢。术后3个月处死,取L3椎体标本。

1.1.3 生长激素治疗前后椎体标本:卵巢摘除3个月后大鼠10只,每日注射重组人生长激素(中科院上海细胞生物研究所提供)1.0 mg/kg/d。对照组给以生理盐水。给药8周后处死,

取L3椎体标本。

1.2 骨小梁连接性参数和计测

1.2.1 硬组织切片与甲苯胺兰染色:标本Millonig's液固定,流水冲洗过夜,乙醇逐级脱水,每次24小时,二甲苯透明4小时,甲基丙烯酸甲酯包埋。在Leria硬组织切片机上做5μm厚切片。置48℃烘箱中18至24小时,37℃乙二醇乙醚乙酸酯中50分钟,以去除聚合的甲基丙烯酸甲酯,乙醇逐级水化,甲苯透明,中性树脂封片。

1.2.2 观察与分析:部分标本参照Parfitt等的方法^[2],在显微镜下进行目测。后期发展了节点数和游离末端数的计算机自动分析系统。具体方法为:图像在Olympus BH-2型光学显微镜下成像,经Microtek Scanmaker II在600dpi,256灰阶条件下扫描,原始图存入计算机。在计算机内用阈值法对原始图作二值处理,然后再利用Hilditch细化算法对图像作处理。以3×3模板沿图像的扫描方向移动,并对每个图形点的邻域作 $\sum(|A(i)-A(i+1)|)/2$ 计算。计算所得结果分列为1、2、3、4,分别表示端点、内点、分支点和交点。将分支点和交点作为结节,端点作为游离点,内点表示连通性(图1)。

1.3 统计学处理:

1.3.1 骨质疏松标本连结性参数的比较分析:所测指标以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,在各组间以SPSS 7.5统计软件行 t 检测。

1.3.2 人工测定和计算机自动测定方法的比较分析:随机抽取样图15张,分别用上述两种方法计算结节和游离端,并对结果用STAT-PAL统计软件作线性相关分析。

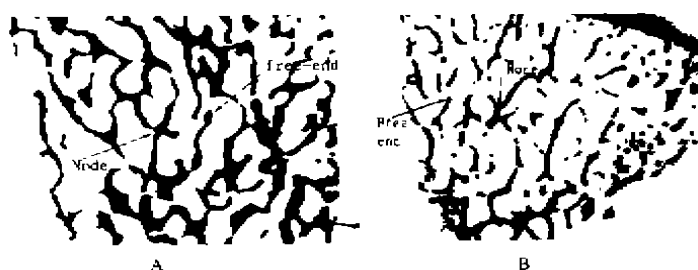


图1 青年人股骨头致密区骨小梁(A)与老年人股骨头致密区骨小梁(B)比较

2 结果

2.1 青年人与老年人股骨标本的分析结果

和青年人股骨头标本相比,老年人股骨头标本骨小梁明显稀疏,骨小梁节点(Node)数减少,游离末端(Free end)数上升(图1)。

骨小梁节点(Tb.n)测定结果见表1,游离末端数测定结果见表2。

表1 骨小梁节点(Tb.n)测定结果($\bar{x} \pm s$)

区域	标本数(n)	交叉点数(Tb.n,个/mm ²)
青年组:致密区	23	72.61±16.14
稀疏区	11	56.09±15.17
老年组:致密区	26	50.81±17.06
稀疏区	8	33.45±11.69

注:青年组两区比较 $P < 0.01$,两组稀疏区比较 $P < 0.005$

老年组两区比较 $P < 0.05$,两组致密区比较 $P < 0.001$

表2 骨小梁游离末端数(FET)比较($\bar{x} \pm s$)

区域	标本数(n)	游离末端数(个/mm ²)
青年组:致密区	23	37.78±7.53
稀疏区	11	44.36±11.29
老年组:致密区	26	62.27±15.54
稀疏区	8	54.66±5.92

注:青年组两区差异无显著性 两组稀疏区比较 $P < 0.001$

老年组两区比较差异无显著性 两组致密区比较 $P < 0.05$

2.2 卵巢切除和生长激素治疗对小梁骨连结性的影响

卵巢切除3个月后小梁骨连结性参数的变化见表3。生长激素治疗后的结果见表4。由表中可以看出,卵巢摘除后小梁骨节点数下降,而游离末端数增加,和对照组相比均为 $P < 0.05$ 。

而生长激素治疗与未治疗组相比,节点数的恢复较为明显, $P < 0.05$,游离末端数也有一定程度的下降,但 $P > 0.05$ 。

表3 卵巢摘除后3个月小梁骨连接性参数的变化($\bar{x} \pm s$)

分组	N.Nd	N.Tm
对照组	8.63±1.12	8.14±1.62
卵巢摘除组	5.06±1.94*	13.65±2.94*

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$

表4 生长激素治疗对小梁骨连接性参数的影响

分组	N.Nd	N.Tm
对照组	4.75±0.82	15.32±3.05
治疗组	7.02±1.39*	12.86±2.98

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$

2.3 连结性参数的手工测量与计算机自动分析比较见表5,两者具有较好的相关性。

表5 15张切片结果比较($\bar{x} \pm s$)

分组	N.Nd	N.Tm
人工测定	26.7±8.3(X ₁)	59.8±17.5(X ₂)
计算机分析	33.2±10.7(Y ₁)	66.3±18.6(Y ₂)

注: $Y_1 = 0.63 \pm 1.22X_1$, $R = 0.92$, $R^2 = 0.9$, $P < 0.01$

$Y_2 = 3.34 \pm 1.55X_2$, $R = 0.99$, $R^2 = 0.98$, $P < 0.01$

3 讨论

早期认为骨力学强度主要由骨的矿质含量决定,但八十年代后期,很多学者研究发现,当骨量降低时,并不一定引起骨折发生^[1],相反,有些骨量正常或者某些骨密度极度增高的疾病,如石骨症,却有骨折发生。因而认为,骨量并

不能完全反映出骨强度高低内,骨强度除了由骨量(quantity)决定外,还与骨内部结构(quality)有关,且认为“质”的因素在骨强度中比“量”的因素作用更为主要。对于松质骨来说,其骨小梁微构筑方式的改变,具体表现为骨小梁变细、穿孔、断裂、断端变钝,最终该骨小梁完全消失(图2)。这些变化反映在骨小梁骨的二维切片上,就主要表现为小梁骨连接性参数的改变。

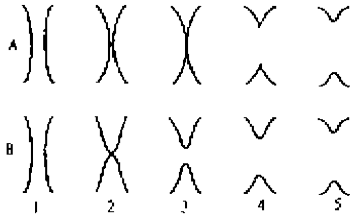


图2 骨小梁变化示意图 A 示骨小梁先变细再逐渐消失,B 示骨小梁并未变细,而是局部穿孔,再逐渐消失。1~5 示骨小梁穿孔、断裂、断端变钝、消失的演变过程

Compston 等^[4]在二维切片上对骨小梁间节点(trabecular nodes)以及骨小梁游离末端(free-ending trabeculae)进行计数,从而首次对骨小梁之间的连结性(connectivity)进行了量化描述。Hahn 等^[5]认为骨小梁的稳定性不仅取决于骨量的大小,还取决于其三维构筑以及小梁间连接程度,并将后者统称为微构筑(microarchitecture)。Mellish^[6]等进一步测量了节点间的距离(node-to-node)、游离末端到节点的长度(end-to-node length)以及游离末端间长度(end-to-end)等发现,当治疗后病人的骨小梁体积已接近正常人时,上述这些测量指标仍明显低于正常值水平。因而认为,节点和游离末端的测量更能解释为什么骨量正常而骨力学强度下降。本研究对老年与青年人股骨头标本,卵巢切除前后椎体节点数和游离末端数进行了比较分析,发现增龄与雌激素缺乏两种因素均能导致小梁骨连结性遭到破坏,并进而导致骨折危险性增加。

Parfitt^[7]认为:现有的传统骨质疏松治疗手段,即使能使骨量增加,却不能使骨的节点增

多,但本组重组人生长激素治疗后大鼠椎体节点数却有明显增加,表明它是一种极有应用前景的、能改善骨结构的药物。

传统的对节点数和游离末端数的测量一般是在显微镜下目测,需耗费大量时间,且可因工作人员的疲劳而导致失误增加。Garrahan^[8]等所用的 IBAS 系统虽然自动化程度有所提高,但仍需在计算机上对原始图作人工编辑,删除噪声点,且硬件架构不开放,软件不可移植,分析样本速度慢(分析游离端和结节需 3—4 分钟),造成分析系统价值昂贵,使用效率低。

有鉴于此,我们选用了个人电脑、扫描仪和 C 语言为软、硬件架构。其理由是:个人电脑和扫描仪可用于各种事务性工作、使用效率高,而 C 语言移植能力强,适用于各种操作平台。在程序编制中,我们对原始图中一些带有多余的毛刺和凹陷声的曲线目标,用 3×3 模板作了平滑处理,提高了细化策略的准确性和速度。并应用改进的 Hilditch 细化算法,缩短了分析结节、游离点等参数的时间。从结果看人工方法与计算机自动方法仍存在有一定的差别,而这些差别主要来自于 Hilditch^[3]算法本身的缺陷,即“X”的粗交叉细化后可能畸变,但两种方法间有极佳的正相关性,说明计算机自动分析所得结果能全面反映专业人员手工测定的结果,加之,整个分析速度有了极大的提高,每次分析样本只需数秒,且检测过程不会发生疲劳,因而可认为本方法的测定准确性较高,具有实用价值。

参 考 文 献

- 1 Robert RR. Architecture and vertebral fracture. *Calcif Tissue Int* 1993;53(suppl):S139.
- 2 Parfitt AM, Drezner MK, Glorion FH, et al. Bone histomorphometry standardization of nomenclature, symbols and units report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Min Res*, 1987;3:595.
- 3 Sembo L, Johnell D. Changes in bone mass and fracture type in patients with hip fractures. A comparison between the 1950 s and 1980 s in Malmö Sweden. *Clin Orthop* 1989;238:139.

(下转第 47 页)