

## ·论著·

老年大鼠松质骨重建的组织形态  
计量学研究

崔燎 马燕飞 Webster SS Jee Tong C Liang

**【摘要】** 目的 研究老年大鼠及在促骨合成药前列腺素  $E_2$  ( $PGE_2$ ) 作用下松质骨重建和骨建造的形态计量学改变, 探讨动物骨重建形态学新参数测量方法及其意义。方法 50 只 20 月龄雄性 Wistar 大鼠随机分成 5 组, 年龄对照组 (基础组、10 d 和 30 d 年龄对照组),  $PGE_2$  给药组 (分别 10 d 和 30 d 给予 3 mg/kg/d 处理组)。用体内双荧光标记, 不脱钙组织切片, 粘合线 (cement line) 染色, 骨组织形态计量学方法, 测定骨重建和骨建造参数。结果 20 月龄雄性大鼠胫骨近端松质骨的骨形成表面大多数为骨重建单位 (占 63.3%), 少部分为骨建造单位 (占 26.7%);  $PGE_2$  用药后骨重建单位增加 1.5 倍, 骨建造单位增加 4 倍, 比值倒置, 成骨细胞 10 d 时明显增多。说明  $PGE_2$  通过刺激成骨细胞骨合成而介导骨建造性骨量增加和骨重建性骨量增加, 并以前者为主。结论 老年雄性大鼠松质骨以骨重建活动为主, 仍有骨建造活动。 $PGE_2$  主要通过刺激成骨细胞骨建造而增加骨量。

**【关键词】** 老年大鼠; 前列腺素  $E_2$ ; 松质骨; 骨重建; 骨建造; 骨组织形态计量学

**Histomorphometric study on cancellous bone remodeling and modeling of aged male Wistar rats** CUI Liao<sup>1</sup>, MA Yanfei<sup>2</sup>, Webster SS Jee<sup>2</sup>, Tong C Liang<sup>3</sup>. <sup>1</sup> Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China, <sup>2</sup> Radiobiology Laboratory of University of Utah, USA, <sup>3</sup> Gerontology Research Center, NIA/NIH, Baltimore, USA

**【Abstract】 Objective** To study cancellous bone remodeling and modeling activity in aged male Wistar rats, and to observe the effect of prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) on them by bone histomorphometry. **Methods** Fifty 20-month-old male Wistar rats were divided into basic 1, 10- and 30-day control groups, and 10- and 30-day treated groups with 3 mg/kg/d of  $PGE_2$ . After twice *in vivo* fluorochrome labeling, undecalcified longitudinal sections were subjected to bone histomorphometry and classification of the contour of the cement line in bone formation sites. The later was used to classify bone formation sites into remodeling and modeling and uncertain units. **Results** 63.3% of bone formation sites were remodeling units in the trabecular surface of aged male Wistar rats, and the remaining were modeling and uncertain units. After treatment with  $PGE_2$ , osteoblasts increased markedly in 10 days; fluorochrome labeling surface and bone mass increased dramatically in 30 days' treatment; remodeling sites increased by 1.5-fold and modeling sites increased by 5-fold in both 10 and 30 days' treatment. **Conclusion** Remodeling is the dominant activity on trabecular bone surface in aged male rats.  $PGE_2$  increase bone mass mainly by stimulating bone modeling of osteoblasts.

**【Key words】** Aged rats; Prostaglandin  $E_2$ ; Trabecular bone; Remodeling; Modeling; Bone histomorphometry

骨量调控机制包括骨的生长 (growing)、骨建造 (modeling) 和骨重建 (remodeling)。人类在 35 岁以前, 骨的生长与骨建造占主要地位, 直接影响骨量累积率及峰值的大小, 45 岁以后则以骨重建为主, 骨重建是在旧骨的基础上去旧建新, 这种新陈代谢过

程一般很少能增加骨量。老年人由于骨重建增加, 引起净剩骨量减少而导致骨质疏松。骨重建过程发生在骨重建单位 (remodeling site), 它是一个基本多细胞单位 (BMUs), 由一群细胞完成骨的吸收和骨的合成过程, 首先是破骨细胞前体形成破骨细胞并附着在骨表面称为激活 (activity), 破骨细胞骨吸收 (resorption), 形成吸收陷窝, 然后成骨细胞出现在吸收陷窝表面, 合成新的骨质 (formation), 此过程简称 A-R-F。于是在骨吸收时骨表面形成扇形皱褶,

基金项目: 美国 NIH 青年基金资助项目

作者单位: 524023 广州, 广东医学院药理教研室、骨生物学研究室 (崔燎); 美国犹他大学放射骨生物学实验室, UT 84108, USA (马燕飞, Webster SS Jee); 老年病学研究中心, NIA/NIH, Baltimore, USA (Tong C Liang)

又因新合成的骨质(wall或packet)其纤维走向与原来的旧骨质不同,形成旧骨与新骨之间皱褶界面,用特殊染色可显现一条皱褶线,也叫 scalloped cement line。由此线加上新骨质(骨质表面复盖双荧光者或复盖成骨细胞者),从形态学角度则为一个骨重建单位(remodeling site)。如果此过程仅为成骨细胞激活(activity)和成骨细胞骨合成(formation),即 A-F,在新骨形成之前的界面是光滑线,而不是皱褶线,称光滑粘合线(smooth cement line),此线加新形成骨质(复盖双荧光或成骨细胞者),则为骨建造单位(modeling site),用形态计量学方法测定骨重建单位和骨建造单位的数量、厚度和长度,可体现骨表面重建功能<sup>[1]</sup>。老年大鼠的骨代谢过程中骨建造和骨重建在维持老年大鼠的骨量的过程中占有多大的比例,促骨合成药能否促进老年大鼠的骨建造过程从而增加骨量,目前还没见报道。为测定老年动物的骨建造和骨重建在骨形成中的比例,探讨老年性骨质疏松的形成机制,以及促骨合成药在防治老年性骨质疏松方面的骨药理学作用机制,本实验采用20月龄雄性 Wistar 大鼠,取胫骨上段松质骨为对象,用改良的 cement line 染色方法,通过对松质骨表面的骨重建及骨建造比例分析比较,对上述问题进行研究和探讨,现报道如下。

### 材料和方法

#### 1. 动物与给药

50只三级雄性 Wistar 大鼠,20月龄,体重(540±36)g,由美国 NIH Gerontology Research Center 提供。用标准饲料(含钙1.46%,磷0.99%和 Vitamin D 4.96 IU/100g)在清洁级环境下饲养。对照组大鼠30只,给药组大鼠20只,皮下注射3 mg/kg/d 的 PGE<sub>2</sub> (Upjohn Co, Kalamazoo, MI, USA),分别在给药10 d、30 d后处死大鼠取材。大鼠进行2次荧光标记,第一标记于处死前14 d皮下注射 Demeclocycline 20 mg/kg (Sigma Chemical Co.),第二标记于处死前4 d皮下注射 Calcein 10 mg/kg (Sigma Chemical Co.),两次荧光标记相隔10 d。动物分组与给药设计如表1。

表1 动物分组与给药设计

| 组别               | 基础组      | 给药10 d   | 给药30 d   |
|------------------|----------|----------|----------|
| 对照组              | 10只      | 10只      | 10只      |
| PGE <sub>2</sub> |          | 10只      | 10只      |
| 标记               | ▲ ↑      | ▲ ↑      | ↑ ▲      |
|                  | Deme Cal | Deme Cal | Deme Cal |

#### 2. 取材及标本制作

动物麻醉后心脏彻底放血,迅速取下胫骨上段,锯开骨髓腔后放入10%福尔马林溶液固定,24 h后用75%乙醇固定,然后梯度脱水,甲基丙烯酸甲酯包埋<sup>[2]</sup>。用硬组织切片机(2050 Supercut microtome, USA)沿矢状面作5 μm厚的不脱钙切片,每对相邻切片中,其中一张作特殊粘合线(cement line)染色,另一张不作染色,用于相应骨再建点的荧光观察。粘合线染色参照文献<sup>[3]</sup>稍作改良,简言之,将切片(不脱塑)浸于0.2%甲酸45 s,然后于20%甲醇60 min,蒸馏水冲净,用1%甲苯胺蓝(含0.5%四硼酸)染色3 min后封片。

#### 3. 骨重建和骨建造单位的骨形态计量学观察

测量方法采用全自动图像分析系统(DIAS; KSS Image, Magna, UT, USA)进行,测量范围为右侧胫骨近端矢状面骨髓线下1 mm和4 mm之间的松质骨。根据 Erban<sup>[1]</sup>的方法,骨重建单位(remodeling site)判定标准的定义为:①骨小梁表面的新骨小梁(packet)以皱褶线(图2a)与旧骨相连,该特征表示骨形成之前有骨吸收迹象;②新骨小梁的表面有双荧光标记(用相邻切片对合,因 cement line 染色已将荧光消去),该特征表示有骨形成;③新形成骨质的胶原纤维走向与旧骨质不同(图2b)。骨建造单位(modeling site)判定标准的定义为:①骨小梁表面的新骨小梁以光滑粘合线(图1a)与旧骨相连,②新骨小梁的表面有双荧光标记,③新骨质胶原纤维走向与旧骨质几乎一致(图1b)。有些粘合线及新骨形成在形态学上不是很清楚时,被定为非明确单位(uncertain site),也分别作计数。三者总和为骨形成单位(formation sites),静止的骨表面新骨小梁不计其内。将测得“骨重建单位”或“骨建造单位”的数目分别除以骨形成单位得骨重建百分数或骨建造百分数。同时测量骨小梁面积和骨表面成骨细胞和破骨细胞周长百分率(成骨细胞或破骨细胞覆盖面积占骨小梁表面百分比)。

### 结 果

#### 1. 20月龄 Wistar 大鼠骨再建和骨建造形态学参数改变

30只从20到21月龄 Wistar 大鼠测得的平均骨小梁面积为14.8%±3.5%,平均骨表面成骨细胞周长百分率为1.4%±0.6%,破骨细胞周长百分率为0.8%±0.2%,骨重建(图2a,b)数量为19±6单位,占骨形成单位的63.3%,骨建造(图1a,b)单位数为

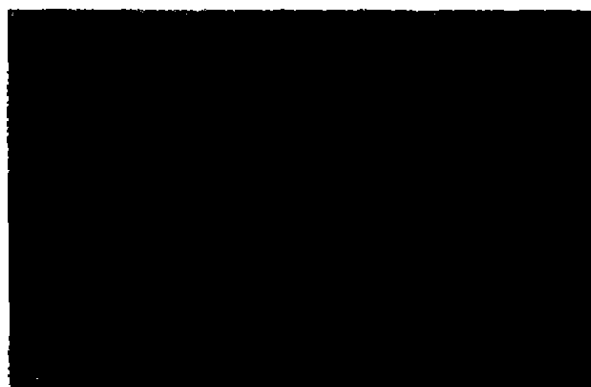


图1 20月龄雄性 Wistar 大鼠骨小梁表面骨建造单位 (modeling site, 箭头范围)。图 1a 显示光滑粘合线 (cement line 染色); 图 1b 显示骨小袋胶原纤维走向与旧骨质一致 (偏振光下)

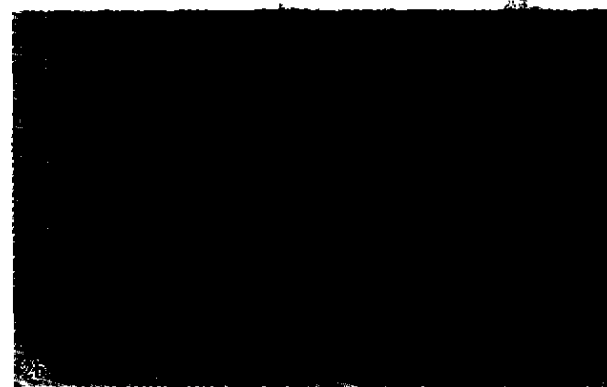


图2 20月龄雄性 Wistar 大鼠骨小梁表面骨重建单位 (remodeling site, 箭头范围)。图 2a 显示皱褶粘合线 (cement line, cement line 染色); 图 2b 显示骨小袋胶原纤维走向与旧骨质不一致 (偏振光下)

$8 \pm 1$ , 占骨形成单位的 26.7%, 不明确单位数为  $3 \pm 1$  单位, 占骨形成单位的 10.0%; 骨重建/骨建造 (比值) 为  $2.3 \pm 1.4$  (图 6)。三组对照大鼠 (基础组、10 d、30 d 组) 之间差异无显著性。结果说明老年大鼠骨小梁表面是以骨重建活动为主, 但仍有骨建造活动。

## 2. $PGE_2$ 对老年大鼠骨重建和骨建造形态学参数的影响

$PGE_2$  对老年大鼠选择性骨形态学参数和骨重建、骨建造的影响见表 2。表 2 可见  $PGE_2$  给药 10 d, 骨小梁面积和荧光周长无显著性变化, 而成骨细胞周长百分率明显增加, 骨重建单位和骨建造单位均显著增加, 骨重建单位约增加 1.5 倍, 骨建造单位约增加 5 倍, 骨建造单位比骨重建单位增加更明显, 骨重建与骨建造的比值减少, 说明  $PGE_2$  可引起早期成骨细胞骨建造增加, 但骨小梁面积百分率增加没有显著, 这与用药早期新生骨的矿化还未完成有关。 $PGE_2$  给药 30 d, 骨小梁面积和荧光周长明显增加, 此时新生骨已形成了矿化骨, 骨建造活跃, 新生骨小

梁从静止骨表面 (smooth cement line) 长出, 骨量显著增加 (图 3a、b); 骨重建的表现也很明显, 新生骨小梁始形成于骨吸收表面 (scalloped cement line), 因骨形成作用显著, 故骨量增加明显 (图 4、5); 骨重建和骨建造单位数量与给药 10 d 时相同。结果提示  $PGE_2$  同时通过增加骨重建和骨建造来增加骨量, 而以骨建造增加骨量为主; 给药 10 d 时成骨细胞增多, 类骨质形成增加, 给药 30 d 时骨形成作用继续增强, 骨矿化率增加, 骨量显著增加。给药 10 d 或 30 d 破骨细胞周长百分率未见显著性改变。

## 讨 论

成年大鼠一个骨重建周期约 3 到 4 周, Villanueva 在 1989 年观察了四环素标记的荧光与粘合线、破骨细胞和成骨细胞的位置关系<sup>[4]</sup>, 发现荧光阳性与成骨细胞活动有关, 皱褶线则与破骨细胞活动有关。粘合线染色法能在组织水平上清楚分别骨小梁表面某一部位的一个骨小袋 (packet, 表明新形成的骨小梁), 在形成之前是否发生了骨吸收活动, 以此区别最新的骨的形成是属于骨重建或是骨建造。一

表2 正常老年大鼠和  $\text{PGE}_2$  给药后胫骨上段松质骨选择性骨形态学参数和骨重建、骨建造的变化( $\bar{x} \pm s$ ;  $n=10$ )

| 参数          | 对照组            |                 | $\text{PGE}_2$ 处理组  |                      |
|-------------|----------------|-----------------|---------------------|----------------------|
|             | 10 d           | 30 d            | 10 d                | 30 d                 |
| 骨小梁面积(%)    | $16.5 \pm 5.0$ | $13.5 \pm 3.4$  | $18.2 \pm 5.9$      | $43.2 \pm 14.0^{**}$ |
| 成骨细胞周长(%)   | $1.6 \pm 0.7$  | $1.1 \pm 0.4$   | $12.5 \pm 7.6^{**}$ | $1.5 \pm 0.5$        |
| 荧光周长(%)     | $24.6 \pm 8.5$ | $18.1 \pm 10.3$ | $18.0 \pm 12.6$     | $44.7 \pm 9.3^{**}$  |
| 破骨细胞周长(%)   | $0.9 \pm 0.3$  | $1.0 \pm 0.2$   | $0.8 \pm 0.4$       | $1.0 \pm 0.3$        |
| 骨重建单位(No)   | $18 \pm 8$     | $19 \pm 6$      | $28 \pm 12^*$       | $29 \pm 7^*$         |
| 骨建造单位(No)   | $7 \pm 1$      | $8 \pm 1$       | $37 \pm 18^{**}$    | $30 \pm 7^{**}$      |
| 骨重建/骨建造(比率) | $2.5 \pm 1.4$  | $2.3 \pm 1.3$   | $0.7 \pm 0.5^{**}$  | $0.9 \pm 0.3^{**}$   |

注:与相应 10 d 比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与相应 30 d 比较 \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$



图3  $\text{PGE}_2$  作用 30 d 后老年大鼠骨小梁表面骨建造情况。图 3a 箭头所示新骨小梁(NB)形成始点的光滑粘合线。图 3b 为相应部位荧光照片,箭头所示为第一荧光标记,与光滑粘合线相应

些学者在过去仅以此线区别而得出结果<sup>[5]</sup>,但这不能反映骨形成活动与目前年龄是否吻合,这些粘合线也许是在前一个骨重建或骨建造周期时留下的,年龄越前,“光滑”线可能要比“皱褶”线计数多,因此结果不够准确。本实验根据 Erben<sup>[1]</sup>的方法,用连续成对切片比较方法,根据粘合线形状,骨小梁是否有荧光标记,和骨小梁胶原纤维走向进行鉴别,以反映正在形成的骨小梁是骨重建或是骨建造,不计数在此前留下的骨小梁和无骨合成的骨小梁(无荧光



图4  $\text{PGE}_2$  作用 30 d 后老年大鼠骨小梁表面骨重建情况  
箭头所示新骨小梁形成始点的皱褶粘合线

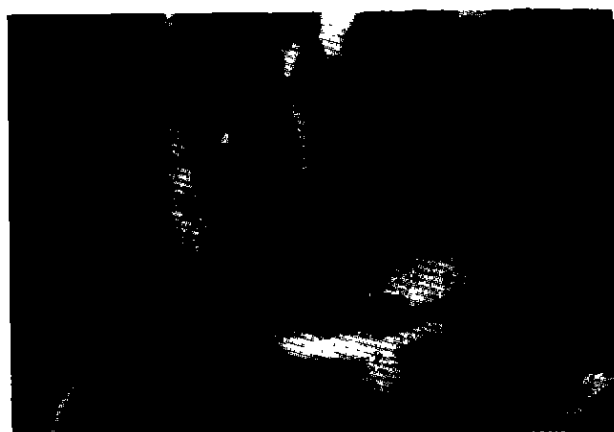


图5  $\text{PGE}_2$  作用 30 d 后老年大鼠骨小梁表面骨重建荧光照片  
箭头所示骨小梁表面荧光呈弥散性形成,形成始于吸收面(皱褶线)

者),这样更正确反映最新的骨重建活动,可以以此方法从形态学角度去区别,从而可测量每一个骨单位的长度、厚度以及数目。

本实验结果显示 20 月龄雄性 Wistar 大鼠松质骨表面骨重建单位占总骨形成单位 63.3%,说明老年大鼠松质骨表面以骨重建为主。Erben<sup>[1]</sup>报道 3 月龄和 6 月龄 Fisher-344 雌性大鼠胫骨上段松质骨

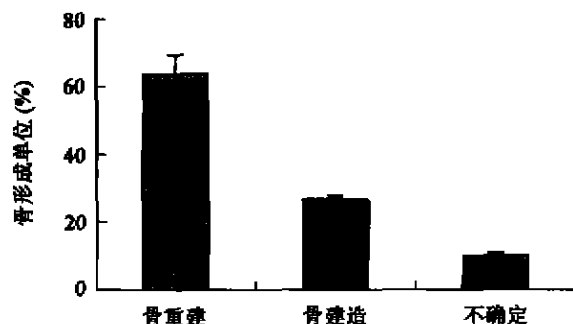


图6 20月龄 Wistar 雄性大鼠胫骨近端松质骨表面骨重建和骨建造活动占总骨形成单位百分数( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=30$ )

骨重建单位分别占 21.1% 和 33%, 12 月龄的骨重建上升到 84%, 说明随年龄增长, 由骨建造为主要活动变为骨重建。本实验发现 20 月龄的雄性 Wistar 大鼠中(相当于 50% 衰老死亡年龄)仍有占 26.6% 骨建造的活动, 这提示雄性大鼠的骨生长期要比雌性大鼠更长, 雌性大鼠骨建造期短可能与雌激素作用使骨骺早闭合比雄性大鼠早有关。本研究结果和有关文献都提示了大鼠的骨建造可能持续在它的一生之中<sup>[6]</sup>。在对人类骨建造的研究中, 已有报道认为人类在 45 岁以后松质骨 99% 是骨重建, 仅有 1% 以下为骨建造<sup>[6]</sup>。因此, 大鼠与人类在骨建造和骨重建方面的差异, 对我们研究和寻找抗骨质疏松药物有指导作用, 应引起重视。

为了探讨促骨合成药前列腺素  $E_2$  ( $PGE_2$ ) 的骨药理作用, 本实验重点观察了前列腺素  $E_2$  对骨重建和骨建造形态学的影响。本实验发现  $PGE_2$  给药 10 d 就能促进成骨细胞的增殖和分化, 继而荧光周长增加, 骨矿化增加, 在给药 30 d (一个骨重建周期) 时骨小梁面积非常显著增加; 骨小梁表面骨重建和骨建造单位从给药 10 d 开始均已显著性增加, 一直持续到 30 d, 开始是类骨质合成, 以后是矿化骨合成, 最后导致新骨形成, 骨量增加。本实验的另一个重要发现是观察到  $PGE_2$  引起的骨建造比骨重建增加更明显。 $PGE_2$  引起这种骨建造发生在骨小梁静止表面, 使静止的骨小梁表面的成骨细胞的增殖和分化, 从而启动骨建造的过程。这种不是首先破骨细胞激活, 使破骨细胞骨吸收而启动的骨合成增加, 引起的净骨量增加, 我们称为骨建造性增骨 (modeling-dependent bone gain)。 $PGE_2$  能够启动老年大鼠静止骨小梁表面上骨建造的过程, 提示了药物能够改变老年大鼠骨代谢的进程, 增加骨建造的能力, 是研究

防治骨质疏松的一个很好的思路。本研究还观察到  $PGE_2$  有很强的促进骨重建的作用, 骨重建发生在骨吸收表面, 由于  $PGE_2$  的作用, 骨形成常常溢出陷窝而使骨重建超过骨吸收而使骨量明显增加, 我们称为骨重建性增骨 (remodeling-dependent bone gain)。实验结果未显示  $PGE_2$  增加破骨细胞活性, 但显著增加以皱褶线而形成的骨重建单位, 这可能是  $PGE_2$  比刺激成骨细胞更早的时候刺激了破骨细胞的活性<sup>[7]</sup>, 从而增加了骨重建性的骨形成面。 $PGE_2$  与促骨合成药 PTH 相似, 后者也是同时促进两种方式的骨增加<sup>[8]</sup>。对  $PGE_2$  的体内研究, Jee<sup>[7]</sup> 的实验室已作了大量研究, 证实它是一种强大的促骨合成剂, 可刺激成骨细胞合成骨胶原及促进矿化, 增加新生骨量。由于  $PGE_2$  的全身作用广泛, 临床未能用于骨质疏松的治疗, 但它是典型促骨合成阳性参照药, 作为一种工具药, 研究其骨药理机制, 对我们寻找和发现其他新型促骨合成药将有重要指导意义。

本研究采用的测定骨建造和骨重建单位的方法, 对我们了解骨重建活动及周期长短, 推测骨转换率及转换频度<sup>[9,10]</sup>, 探讨年龄与骨转换关系, 也将有重要的意义。此外, 本方法对我们探讨药物作用机制, 区别抗骨吸收药及促骨合成药在骨吸收和骨合成偶联中的作用, 评价药物对骨质量的影响也将是一个十分有价值的方法。

#### 参 考 文 献

- 1 Erben GR. Trabecular and endocortical bone surface in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec*, 1996, 246: 39-46.
- 2 Baron R, Vignery A, Neff L, et al. Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: Recker RR, ed. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*. Boca Raton: CRC, 22-28.
- 3 Schenk RK, Olah AJ, Herrmann. Preparation of calcified tissues for light microscopy. In: Dickson ed. GR. *Methods of calcified tissue preparation*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1-56.
- 4 Villanueva AR, Lundin KD. A versatile new mineralized bone stain for simultaneous assessment of tetracycline and osteoid seams. *Stain Technol*, 1989, 64: 129-138.
- 5 Chow JWM, Badve S, Chambers TJ. Bone formation is not coupled to bone resorption in a site-specific manner in adult rats. *Anat Rec*, 1993, 236: 336-372.
- 6 Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. *Bone Miner*, 1992, 18: 227-236.
- 7 Jee WSS, Ma YF. *In vivo* anabolic actions of prostaglandins in bone. *Bone*, 1997, 21: 297-304.
- 8 Dempster DW, Cozzman F, Parfitt M, et al. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev*, 1993, 14: 690-709.
- 9 Parfitt AM, Dresner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Min Res*, 1987, 2: 595.
- 10 Erickson EF, Axelrod DW, Melsen F. *Bone histomorphometry*. Raven Press, 1994.