

1,25(OH)₂D₃ 对模拟失重大鼠股骨远端松质骨的扫描电镜观察

孙平 蔡德鸿 黄震 陈宏 杨力

摘要:目的 观察 1,25-二羟维生素 D₃ 对模拟失重状态下大鼠股骨远端松质骨超微结构的影响。方法 SPF 级雄性 SD 大鼠 66 只,随机分为自由活动组、悬吊对照组和悬吊实验组,同时悬吊实验组给予 1,25-二羟维生素 D₃ 皮下注射(0.05 μg/kg·d),实验期为 14 d、28 d。取股骨远端沿冠状面切开,蒸馏水冲洗净骨髓腔,乙醇梯度脱水,表面喷金后利用扫描电镜对大鼠股骨远端松质骨的形态结构进行观察。结果 悬吊对照组与自由活动组比较大鼠骨小梁变细,断裂,数目减少,胶原纤维排列杂乱,微损伤增多;悬吊实验组较悬吊对照组大鼠骨小梁数目增多,胶原纤维排列规整,未见明显微骨折发生,且悬吊 14 d 实验组较悬吊 28 d 实验组保持了更好的微结构。结论 1,25-二羟维生素 D₃ 能够对模拟失重状态下大鼠股骨远端松质骨的超微结构产生有利影响。

关键词: 模拟失重; 1,25-二羟维生素 D₃; 骨生物力学; 大鼠

Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on cancellous bone of distal femur of rats in simulated weightlessness rats under SEM observation SUN Ping, CAI Dehong, HUANG Zhen, et al. Department of Endocrinology, Department of Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To observe the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the change of ultrastructural in distal femoral trabecular in male rats after simulated weightlessness. **Methods** Sixty six male SD rats were randomly divided into six groups: free control for 14, 28 d, tail-suspended for 14, 28 d and tail-suspended for 14, 28 d were treated with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. The experiment lasted 14, 28 d. The distal femurs were coronarily sectioned. Subsequently, the bone marrow was carefully rinsed with distilled water and dehydrated in graded ethanol. Coated with gold, trabeculae was observed under scanning electron microscopy. **Results** In group tail-suspended for 14, 28 d, trabecular bone of the femur were manifested with fewness, fragility, disconnection and microcrack as compared with control group. Trabecular bone tail-suspended rats for 14 d and treated with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ were much better than those for 28 d. **Conclusions** 1,25-dihydroxyvitamin D₃ has a positive effect on cancellous bone of distal femur in simulated weightlessness rats.

Key words: 1,25-dihydroxyvitamin D₃; Simulated weightlessness; Bone trabeculae; Scanning electron microscopy; Rats

国内外大量研究已证实,在模拟失重和航天微重力条件下均会发生骨钙调节失衡,导致骨生物量降低,引起骨质疏松等一系列与骨代谢紊乱相关的疾病,对航天员的健康构成严重威胁,因此寻找一种有效预防失重性骨质丢失并改善骨质量的方法是当前航天医学领域研究的热点。1,25-二羟基维生

素 D₃ 是维生素 D 在体内最有活性的形式,其作用机制十分复杂。本研究以大鼠尾吊作为动物模型,采用扫描电镜观察 1,25(OH)₂D₃ 对模拟失重环境下 14 d 和 28 d 大鼠股骨远端松质骨超微结构的改变,为探讨失重性骨质疏松引起骨折的机制提供形态学资料。

1 材料和方法

1.1 动物分组和模型制作

3 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 66 只,体质量(215 ± 8)g,购于南方医科大学实验动物中心。随机配对

基金项目:广东省科技计划项目(20042070062)

作者单位:510282 广州,南方医科大学附属珠江医院内分泌科(孙平、蔡德鸿、陈宏、杨力)外科学教研室(黄震)

通讯作者:蔡德鸿,Email: sing_ping@163.com

分为6组,自由活动14 d、28 d组,悬吊对照14 d、28 d组和悬吊实验14 d、28 d组,每组11只。悬吊实验组给予 $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (美国Sigma公司) $0.05 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,无水乙醇溶解,谷物油稀释。悬吊对照组皮下注射相同剂量谷物油。所有动物均于相同笼具单独饲养,室温 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,人工控制室内照明,保持12 h光照和黑暗交替。实验期间给予清洁饮水,摄食。尾部悬吊按文献[1]方法进行,动物在悬吊期间始终保持 -30° 头低位及后肢悬垂不负重状态,前肢着地可自由活动、觅食饮水。实验期为14 d、28 d。

1.2 标本处理

实验期满后用2%浓度的戊巴比妥钠盐溶液($40 \text{ mg}/\text{kg}$)麻醉,左心室放血处死大鼠。尽快取出左侧股骨,剔除附着软组织,用合金钢骨锯平均横为3段。取下1/3段沿冠状面切开,暴露骨髓腔,用双蒸水将骨髓腔内组织冲洗干净后,2.5%戊二醛固定。24 h后依次置于70%、95%、100%乙醇进行梯度脱水,24 h/次,乙醚浸泡,临界点干燥,真空喷金,制备电镜标本,在日立S-3000型扫描电镜下对松质骨结构和形态进行观察。

2 结果

6组大鼠低倍镜的观察:对照组(14 d、28 d)大鼠股骨远端松质骨丰富,骨小梁数目较多,厚度较均匀,间隙较小,骨小梁相互连接形成密集的立体网状结构,游离末端少见(图1)。高倍镜下对照组(14 d、28 d)表现为骨小梁表面光滑,静止骨面多,胶原纤维走向清晰,排列紧密、整齐,纤维之间有斜向纤维(图2)。悬吊14 d对照组大鼠骨小梁变细、厚薄不均匀,且数量明显减少,排列稀疏,小梁间距离增宽。部分骨小梁则断裂形成盲端游离于骨髓腔中,立体网状结构尚存在(图3)。在高倍观察下可见骨小梁表面欠光滑,有些部位骨小梁表面的胶原纤维基本完整,纤维粗细较均匀,但排列杂乱,结构变得松散,可见到骨吸收现象,即被破坏的骨胶原失去正常结构,其中有的区域胶原已消失,变成形状、深浅不一的骨吸收陷窝,其形状多为圆形或椭圆形,较浅(图4、5)。悬吊28 d对照组大鼠骨髓腔扩大,皮质骨变薄,骨小梁表面凹凸不平,立体网状结构完全破坏(图6)。可观察到大面积的骨吸收面,静止骨面较少。有的部位有众多的骨吸收陷窝及被破坏的胶原纤维,有的浅窝下的胶原仍在继续被破坏,形成较深的骨吸收陷窝(图7、8)。另外骨小梁存在较多的微骨折和明显的断裂,其断端的骨质结构松散(图9)。

悬吊实验组骨小梁数目较悬吊对照组数目增多,但少于正常对照组,其立体网状结构比较完整(图10、11),胶原细丝较粗排列整齐成束状,走向更清晰(图12、13)。悬吊14 d实验组与悬吊28 d实验组之间比,骨小梁壁更厚、骨小梁数目更多,皮质骨厚度差

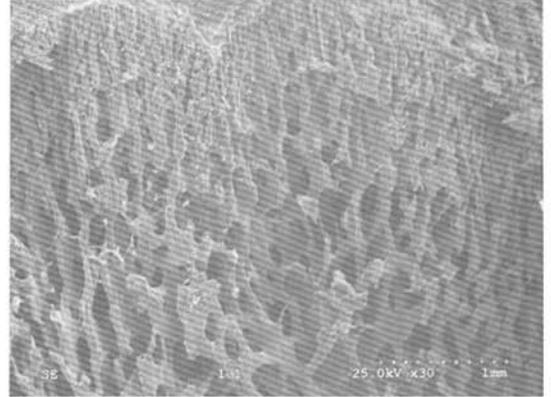


图1 自由活动组大鼠正常股骨骨小梁($\times 30$)

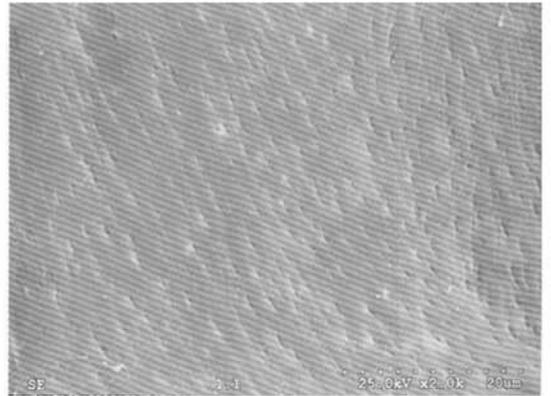


图2 自由活动组大鼠骨小梁表面排列规律的胶原纤维($\times 2000$)

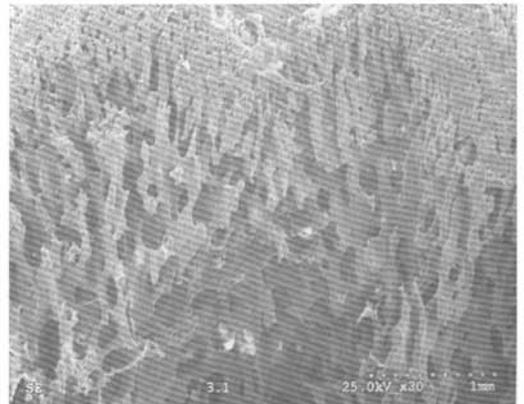


图3 补充 $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 后,悬吊14 d组大鼠股骨骨小梁及其网状空间结构的改变($\times 30$)

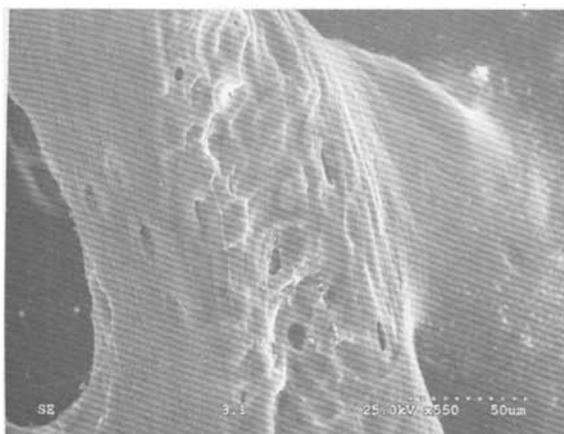


图4 悬吊14 d对照组大鼠部分骨小梁呈虫蚀样改变($\times 550$)

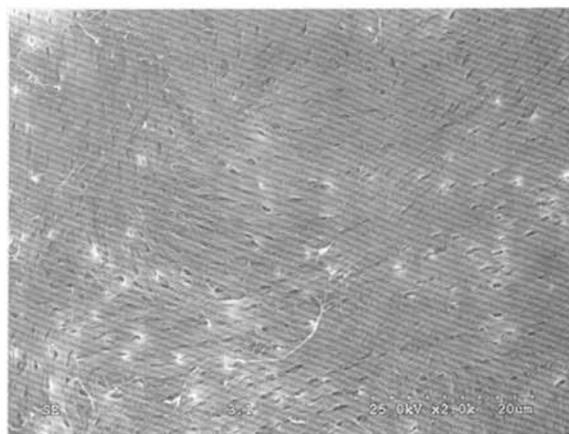


图5 悬吊14 d对照组大鼠骨小梁表面排列杂乱、结构松散的胶原纤维($\times 2000$)

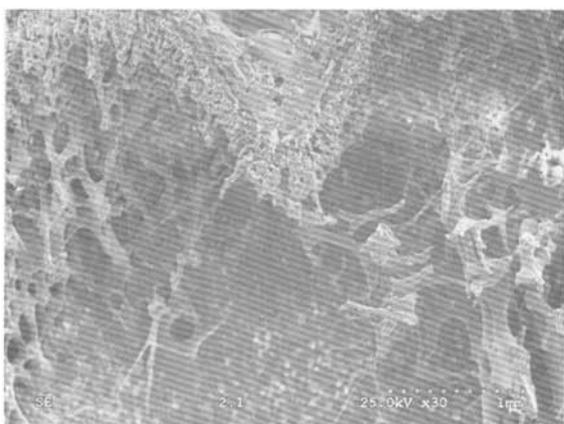


图6 悬吊28 d对照组大鼠股骨骨小梁立体网状结构被完全破坏($\times 30$)

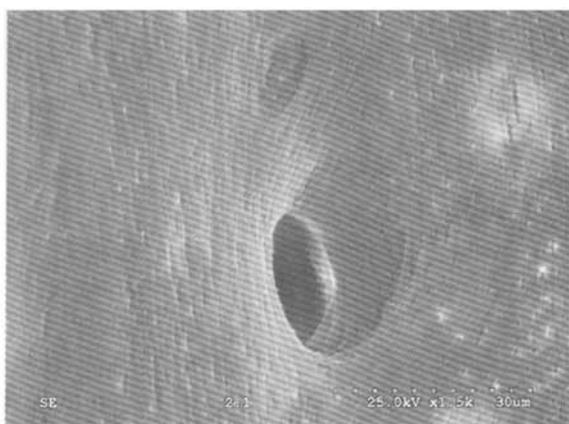


图7 悬吊28 d对照组大鼠被逐层吸收的骨小梁,出现较深的骨吸收陷窝($\times 1500$)

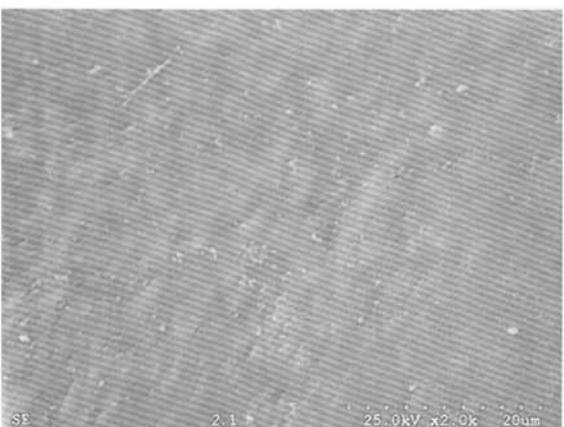


图8 悬吊28 d对照组大鼠骨小梁表面被破坏、断裂的胶原纤维($\times 2000$)

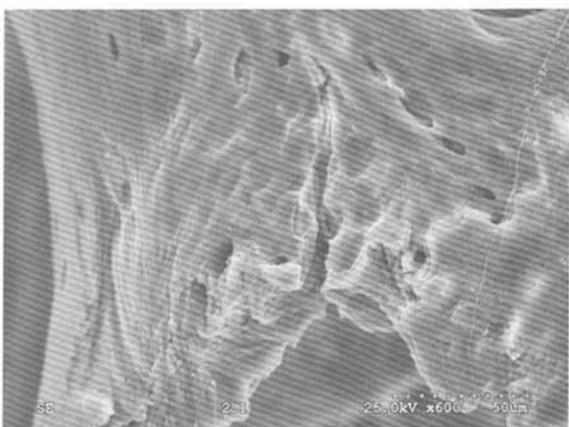


图9 悬吊28 d对照组大鼠骨小梁表面胶原纤维被较深的骨吸收陷窝取代,并出现微骨折($\times 600$)

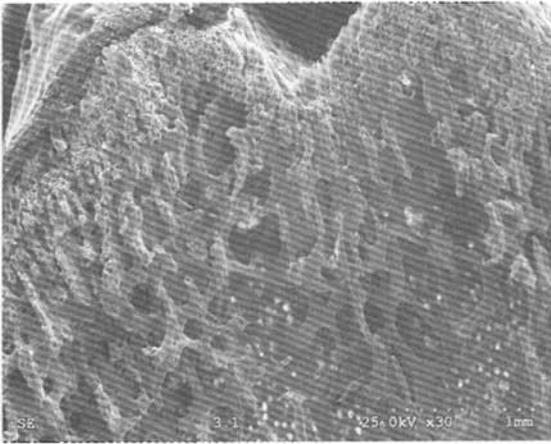


图 10 悬吊 14 d 对照组大鼠股骨骨小梁变细, 数量减少 (× 30)

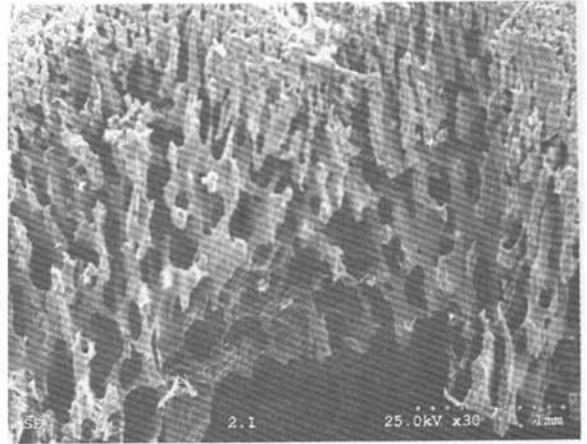


图 11 补充 1,25(OH)₂D₃ 后, 悬吊 28 d 组大鼠股骨骨小梁及其网状空间结构的改变 (× 30)

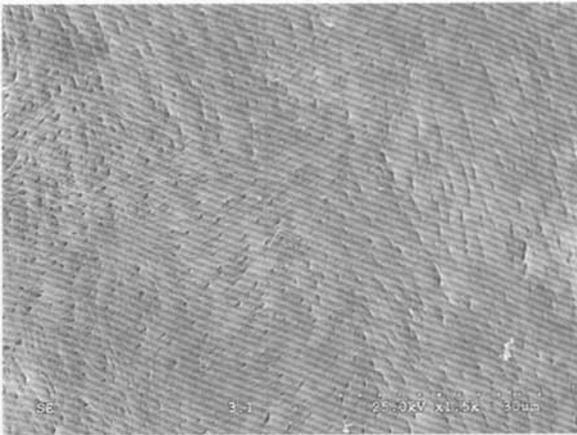


图 12 补充 1,25(OH)₂D₃ 后, 悬吊 14 d 组大鼠骨胶原纤维的变化 (× 2000)

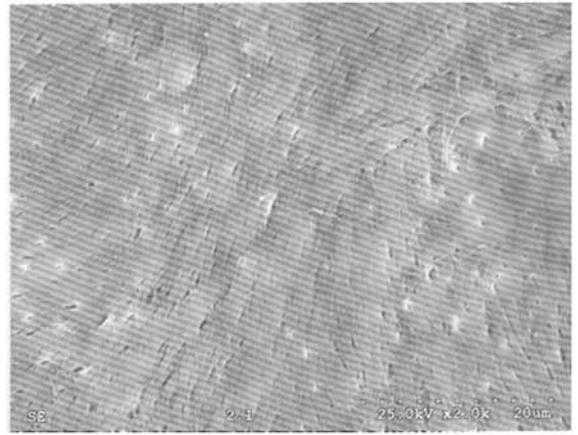


图 13 补充 1,25(OH)₂D₃ 后, 悬吊 28 d 组大鼠骨胶原纤维的变化 (× 2000)

异不明显,高倍镜下骨小梁表面较为光滑,胶原纤维结构较完整,排列规则,其骨吸收面明显减少,未见明显吸收陷窝,在一些胶原面上可见新形成的骨胶原,其上可见更细的胶原细丝聚集。

3 讨论

在长时间太空飞行中,骨量的丢失导致骨质疏松的发生是影响人类健康的主要问题之一。骨质疏松除了骨量减少的因素外即骨横截面积上骨组织的多少,还与骨结构因素和骨内微损伤的数量有关,骨微损伤存在于活体骨中并影响骨组织微结构性质和功能^[2]。微损伤积蓄引起骨的生物质量下降,脆性增加易发生骨折。在骨重建过程中,每根骨小梁根据所承受的力量大小而发生改变,以适应新的应力状态,因此,骨小梁处于一种不断更新、变化的过程

中。骨小梁退行性改变与显微骨折导致了骨小梁的结构强度下降,骨显微结构的改变可以更直接地反映骨质疏松情况。Aguirre 等^[3]实验发现小鼠在尾吊 14 d 时破骨细胞数量显著增加且活性增强。Iwasaki 等^[4]研究表明大鼠在模拟失重尾吊 28 d 发现破骨细胞数量增加,骨吸收增强,而骨形成受到明显抑制,导致骨量逐渐减少。在骨吸收活动中,破骨细胞从骨小梁的表面逐层破坏骨胶原的连续性、降解骨胶原、移走骨无机盐最终将骨组织移除。1,25-二羟维生素 D₃[1,25(OH)₂D₃]是体内生物活性最强的维生素 D 活性形式,对骨具有双向作用,体内给药能够促进骨形成^[5],并促进成骨细胞的合成分泌及骨基质的矿化,改善骨的质与量。Li 等^[6]实验发现,1,25(OH)₂D₃ 可增加兔骨小梁厚度和骨痂的骨体积,减少小梁间距,对骨折的愈合有促进作用。

本研究利用扫描电镜对模拟失重环境(14 d、28 d)下大鼠骨的超微形态结构进行观察,尤其是高倍数对胶原结构的观察,从而对模拟失重环境骨小梁微结构的改变提供了理论依据。小鼠在尾吊14 d时电镜观察发现,骨小梁破坏率增加,数量减少,小梁上的网孔增多、扩大^[3]。Guo等^[7]发现尾吊28 d后大鼠股骨和腰椎骨的小梁数目减少,排列稀疏,厚度不均。David等^[8]实验发现,大鼠后肢无负荷悬吊14 d,皮质骨和松质骨明显减少,骨小梁的厚度和数量也均减少,网状结构连接稀疏,骨形成率显著降低,而骨吸收增强。本实验观察到大鼠尾吊14 d其网状结构比较完整,随着尾吊时间的推移,骨小梁逐渐变薄、穿孔、消失,骨小梁的微结构破坏范围加大;尾吊28 d骨小梁网状结构的完整性完全被破坏,骨小梁节点数明显减少,游离末端数明显增加。与David报道的结果一致。尾吊28 d组较尾吊14 d组骨小梁的破坏更为明显,骨小梁变薄、变细,数量减少,连续性较差,间距增大,发生穿孔、微裂纹和微骨折的微损伤增多。说明随着尾吊时间的推移原来致密、排列规整的小梁表面胶原纤维,逐渐变得零碎、杂乱、稀薄。提示模拟失重组大鼠由于骨微结构的骨吸收面和微损伤的增多必定会影响骨强度的下降,随着尾吊时间的延长,骨质进一步丢失,从而增加了骨折的危险性。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能显著增加骨量和骨膜下骨的成骨速度,促进骨形成同时降低骨吸收^[9]。本实验给予补充 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 后悬吊实验组大鼠较悬吊对照组大鼠骨小梁保持了较好的网状空间结构,高倍镜下骨胶原纤维结构较完整,排列尚规则,骨吸收面较少,且悬吊14 d实验组较28 d保持了更好的微结构。说明 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可对大鼠股骨远端骨微结构产生有利影响,提示其在减缓骨量丢失,改善松质骨的空间结构方面有积极作用。

本研究表明,松质骨表面骨吸收活动的增强,造

成松质骨骨量减少,特别是造成骨结构破坏是导致模拟失重环境下大鼠松质骨强度下降的重要原因。 $1,25\text{-二羟基维生素 D}_3$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)可明显延缓大鼠骨量减少,改善骨质量,降低骨折的发生,其具体机制尚待进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Chen J, Ma J, Ding ZP, et al. Influence of a model of tail-suspension in simulated long-term weightlessness rat. Chinese journal of space science, 1993, 13(2): 159-162. (In Chinese).
- [2] Fazzalari NL, Forwood MR, Manthey BA, et al. Three-dimensional confocal images of microdamage in cancellous bone. Bone, 1998, 23(4): 373-378.
- [3] Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. Bone Miner Res, 2006, 21(4): 605-615.
- [4] Iwasaki Y, Yamato H, Murayama H, et al. Maintenance of trabecular structure and bone volume by vitamin K(2) in mature rats with long-term tail suspension. Bone Miner Metab, 2002, 20(4): 216-222.
- [5] Erben RG, Scutt AM, Miao D, et al. Short-term treatment of rats with high-dose calcitriol stimulates bone formation *in vivo* and increases the number of osteoblast precursor cells on the bone marrow. Endocrinology, 1997, 138: 4629-4635.
- [6] Li KH, TF JF, et al. Study of bone tissue morphometry effects of $1,25\text{-二羟基维生素 D}_3$ on primary osteoporotic fracture healing. China Journal of Modern Medicine, 2005, 15(21): 3236-3238.
- [7] Guo R, Hu M, Sun ZY, et al. Effects of simulated weightlessness on rats mandible, lumbar vertebra and femur. Space Med Med Eng, 2005, 18(3): 165-169.
- [8] David V, Lafage-Proust MH, Laroche N, et al. Two-week longitudinal survey of bone architecture alteration in the hindlimb-unloaded rat model of bone loss: sex differences. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 290(3): 440-447.
- [9] Duque G, Macoritto M, Dion N, et al. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ acts as a bone-forming agent in the hormone-independent senescence-accelerated mouse (SAM-P/6). Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 288(4): 723-730.

(收稿日期:2006-08-08)