

骨形态计量学在骨质疏松研究领域研究进展

刘康 史晓林

骨质疏松症,是以骨量减少及骨组织显微结构退变为特征的一种全身性骨骼疾病,伴有骨脆性增加,易于发生骨折。骨质疏松症可分为原发性、继发性及特发性 3 大类。其中,原发性骨质疏松症约占骨质疏松症的 90%,它又可分为两型:其一,为绝经后骨质疏松症,其二,为老年性骨质疏松症^[1]。目前,随着人口老龄化日趋明显,骨质疏松症的发病率已位居全球常见病的第 7 位,由骨质疏松所致的骨痛和骨折直接影响中老年人的生存质量^[2]。以往对骨质疏松症的研究主要集中于骨量,而对骨质量问题的研究是一个新近提出的热门方向。骨组织形态计量学方法对骨质疏松症的防治研究有着不可或缺的价值与意义。

1 骨形态计量学在骨质疏松研究领域研究价值

骨组织形态计量学(bone histomorphometry,简称骨计量学)属于体视学、生物医学组织形态计量学中的一个特殊分支,是依据骨组织学和生理学,基于体视学原理,从二维切片上推导三维结构的一种方法^[12]。该方法除能将形态学观察到的骨组织结构改变,用定性、定量的计量方法求得骨体积密度、骨小梁表面积、皮质骨厚、骨小梁间距、骨小梁厚的平均值等,还能对类骨质进行分析,求得平均类骨质体积、平均类骨质表面、平均类骨质宽、成骨细胞活跃表面、破骨细胞活跃表面和平均骨壁厚等指标,并且还能通过活体四环素双标记的方法,利用四环素能与骨特异结合并沉积在骨矿化前沿的特性,把时间因素标记在骨的重建过程中,可以测定多组骨动力学组织参数^[3]。在荧光显微镜下,观测骨组织内两次标记的四环素荧光线条间距离,单、双标四环素荧光骨矿化前沿的标记率等动态变化,从而求得诸如骨矿化沉积率、单标四环素表面、双标四环素表面及

单、双标四环素表面比、矿化延迟时间、骨再建单位时间和纠正矿化沉积率等多项骨动力学指标,从而可获取骨细胞、组织以及器官水平上的信息。

虽然当今的研究中机能变化已普遍地用定量指标来表达,但形态与机能的定量关系都因形态学普遍停留在定性描述上而未能准确地给予揭示。形态学改变与机能的定量结合还有助于揭示病理现象与病变本质的关系^[5]。而骨计量学正是有助于揭示骨的生理与病理改变的机能与组织定量研究的一种新方法。它是在分析代谢性疾病的研究中一项不可或缺的基本技术,其在疾病的发生机理研究、药物疗效的评价中都有着广泛的应用价值,是评价骨转换与骨结构的有效手段,能直观、形象对松质骨进行定量分析^[10]。

2 骨形态计量学在骨质疏松领域的基础研究

2.1 骨组织形态计量学在骨质疏松领域的静态研究

骨计量静力学参数包括:单位体积骨小梁骨量,平均骨小梁宽度,相对类骨质量,骨形成表面,成骨细胞数,成骨细胞表面,破骨细胞数目,侵蚀表面积等^[17]。

2.1.1 有关类骨质表面的指标:(1)相对类骨质表面(relative osteoid surface, ROS)也可称作骨样组织表面,构成松质骨的骨小梁,面对骨髓腔具有广阔的表面,称之为骨小梁表面。在平面图像上表现为骨小梁的边界上覆盖着一层类骨质,其边缘长称之为表面长度,在三维的结构中以面积存在,也称表面积,其指标代表着类骨质生成空间的多少,间接体现成骨量的多少与骨形成期的长短^[20]。(2)相对类骨质体积(relative osteoid volume, ROV)它表示在松质骨空间体积内所含类骨质的体积数,常用百分数来表示,表明类骨质量的多少。平均类骨质层宽(mean osteoid width, MOSW)同上指标一样,在显微镜下图像测定中,可多次直接测得类骨质表面的厚度,经求均而得 MOSW,其代表着类骨质生成的速度和

基金项目:浙江省科技厅重点攻关项目(2006C23011)

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学附属第二医院

通讯作者:刘康,Email:liukang1982@163.com

矿化速度^[19]。

2.1.2 骨细胞表面计量指标:活跃成骨细胞表面(active osteoblastic surfaces, AOS)是指骨样组织表面上覆盖着成骨细胞的表面,也称为成骨表面。在所有的骨小梁表面(trabecular surface, TS)均分为静止面、骨吸收面及骨形成面。破骨细胞吸收表面(osteoclastic resorption surfaces, ORS)包括两种情形,一是破骨细胞正在吸收的骨小梁表面,二是吸收已经完成,破骨细胞已经消失而成骨细胞尚未出现的,此参数多以此类表面占骨小梁表面的百分数表示。活跃骨吸收面(R1)是指覆以破骨细胞的骨吸收面,不活跃吸收面(R2)无破骨细胞, $R = R1 + R2$ 。R2 的范围不能反映当时吸收情况,但能说明以前曾被吸收而现在尚未为新生骨所修复^[18]。

活跃骨形成面(O1)覆以活跃的成骨细胞,不活跃骨形成面(O2)是指未矿化的类骨质面, $O = O1 + O2$ ^[18]。全体类骨质面不能直接反映骨形成,只能代表骨基质沉积及随后矿化的延迟的时间(mineralization lag time, MLT)^[7]。全体类骨质面(OS)数为占整个骨小梁面的 12%,直到 50 岁以后才逐渐下降,此时类骨质面增加与活跃骨形成面相反,不能说明骨形成增加,而是类骨质矿化的延迟。

2.1.3 平均骨体积(mean bone volume, MBV):平均骨体积用来测定单位体积内骨小梁(或皮质骨)所占的体积百分比。在不同解剖及组织部位与不同性别年龄组中,骨体积可有相应变化。不管各种原因造成的骨质疏松,MBV 值如低于正常(或小于对照标准的 15%),就应视为骨质疏松症^[18]。在观察的成人股骨头无菌性坏死病例中,所观察的股骨头病变部位的 MBV 值均低于正常股骨头。同样的现象也见于去势大鼠的骨质疏松症的模型中,另外骨小梁厚度(trabecular thickness)、皮质骨厚(cortical thickness)等相关指标在原发性老年骨质疏松症中也出现改变^[19]。

2.2 骨组织形态计量学在骨质疏松领域的动态研究

2.2.1 反映骨形成和骨吸收的参数:反映骨形成参数:荧光标记周长百分数(L. Pm%),矿化沉积率(MAR),单位骨小梁周长骨形成率(BFR/PBS),单位骨小梁面积骨形成率(BFR/PBV)等;反映骨吸收参数:单位骨小梁面积上的破骨细胞数(Oc. N),破骨细胞周长百分率(Oc. Pm%)等^[9]。这些参数对反映骨形成和骨吸收有重要的价值和意义。

2.2.2 骨活检技术(Bone biopsy):骨活检做为一种

重要的研究手段已被广泛运用于临床和动物实验研究中,它能为代谢性骨病的发生机制和治疗方法提供重要的线索^[12]。除静态的组织学信息外,荧光双标记能对两个不同时间的组织矿化进行定位,从而提供关于骨形成的动态信息。矿物沉积率是一个关键的动态指标,用来测量骨形成率,由双标记线之间的距离决定^[8]。有学者曾对 25 例患者进行了骨活检,发现老年髌部骨折患者的骨小梁体积、皮质骨厚度、骨小梁宽度、骨小梁厚度、结点末端比均显著低于对照组^[20]。骨活检的技术可分为以下几步:(1)四环素标记:在人类研究中,四环素类药物是唯一适用的荧光标记药物。在荧光显微镜中,通过 350nm 波长荧光的激发后能出现明亮的荧光^[20]。标记的明亮度由药物的血浆浓度决定,而浓度由剂量决定。双标记过程包括连续服药几天,休息更长一段时间后第 2 次服药,在最后 1 次服药后 5 ~ 14 d 活检,能产生良好的标记效果。两次服药时间中点之间的间隔称为标记时间,这个数值被用来计算矿物沉积率。(2)活检:使用内径不少于 7.5mm 的环锯能获得合适的标本。患者以仰卧位躺于手术台上。活检部位在大约髌前上棘后下 2.5cm。局部麻醉后做 2cm 皮肤切口并钝性分离至骨膜。插入环锯取出一小块骨,包括双侧的骨皮质和其中的松质骨小梁。缺损处用 2 小条明胶海绵压迫止血,关闭切口,压迫包扎。(3)标本处理:标本取下后立刻放在盛有 70% 酒精的带盖瓶子内。进行抗酒石酸酸性磷酸酶染色的标本,在低温下进行固定。脱水,去脂,包埋,修整组织块后用装有炭化钨钢刀的切片机切片。用甲苯胺蓝染色测定壁厚,用 Goldner 染色切片测量任何其他参数。

3 骨形态计量学在骨质疏松领域的临床研究

骨组织形态计量学方法对防治骨质疏松症的药效学研究有重要价值。近年来,有研究者在大鼠异黄酮抗辐射损伤致肾性骨病的药效实验和骨质疏松防治骨质疏松症的药效学研究中,应用骨组织形态计量学方法对药物进行了评估。与 BMD 测量相比,骨组织形态计量学指标敏感性更高。还有研究者将骨矿物含量测定与骨组织形态学结合在一起,可全面反映骨生理、病理与功能变化,从而对骨质量做出科学的判断,为合理评价骨质疏松或新药的药效提供理论依据。

据国外研究表明,补肾中药其组方中含有异黄

酮、 β -谷甾醇等植物激素成分具有防治骨质疏松的功效^[3,4],因此中药在防治骨质疏松方面具有特殊的意义和价值。有研究表明,经补肾方药治疗后能显著增加骨小梁体积百分率,降低骨小梁形成表面百分率和骨小梁吸收百分率^[14]。而淫羊藿总酮能明显提高股骨表面密度,并有提高 Ca、P 的趋势,在骨形态计量学上高剂量组大鼠的骨小梁百分率和形成表面百分率等参数明显下降,骨小梁体积百分率明显提高^[15]。还有研究发现,他汀类与双膦酸盐治疗骨质疏松研究中,发现两者均有骨体积的明显改善,但改善的具体方面并不一致^[16]。

国外学者对 90 位未经治疗的绝经后骨质疏松患者和 34 位健康的绝经后妇女进行了骨形态计量学研究^[4],选择患者的标准是至少 1 处脊柱变形,伴有低骨量,没有其他导致骨脆弱的原因。正常组为 45~75 岁的绝经后健康的妇女。结果发现,最大的不同是骨小梁数目和骨小梁分离度。比起正常组,骨质疏松组的骨小梁数目低 1/3,骨小梁厚度轻微受影响,在骨质疏松组比正常组低 1/10。这说明绝经后骨质疏松去掉了完整的骨小梁,因而减少了骨小梁的连接,导致骨的脆性增加,并且这一脆性的增加与骨量的减少不成比例。

在临床试验中长期安全性的预测也许是能从骨活检中获得的最有价值的信息^[10]。比如,一种能完全停止骨重建活动的药物其长期安全性是令人担忧的。骨重建完全缺失的患者经头几年的治疗后能减少骨折的风险,但几年后,当未修复的骨纤维损伤积累后,即使骨量保持稳定,骨折风险也会增加。髌骨活检能及时发现这一问题,以指导调节剂量或停止治疗^[12]。

近来骨组织形态计量学技术有进一步的发展,可用于皮质骨结构的分析,对于开展骨构塑的细胞和组织机制研究有重要意义^[13];在肿瘤骨转移机制的研究中,应用骨形态计量学对骨保护素(OPG)、组织蛋白酶 K 和血清基质金属蛋白酶-9(MMP-9)等在骨表面和间充质组织中的不同表达及调控机理进行探讨。

另外,骨活检能为骨质疏松症的发病机制和治疗方法提供重要的线索^[11]。比如,在治疗的第 1 年增加的骨量,活检能区别是由减少骨重建引起的,还是增加合成代谢引起的。一种真正的增加合成代谢的药物会增加骨小梁的厚度和连续性,以及再骨重建单位水平产生正向骨平衡,导致骨量上更大的净增加,在预防骨折上更有效。

综上,骨组织形态计量学方法能从静态和动态两个方面反映骨新陈代谢的过程,对防治骨质疏松症有着不可或缺的价值与意义。但在研究松质骨显微结构方面,目前主要集中于髌骨小梁的骨组织硬切片的形态计量测定,却很少对骨质疏松性骨折的好发部位如股骨上段松质骨进行研究^[21]。而在临床应用上,由于骨组织活检对患者有创伤,而骨质疏松症是一种非致命的慢性病,故难以被患者所接受,而且骨片制作,有关参数的测算均需要较长时间及付出复杂艰辛的劳动,因此在实际临床应用中,骨组织活检也没有广泛的应用和开展。今后可对骨活检中取骨标本的方法进行研究,使得骨活检简便、宜行、微创,并加强研发测算骨形态计量学参数指标的软件,使骨形态计量学检测在临床上得以广泛的开展和应用。

【参 考 文 献】

- [1] Abbott TA, Mucha L, Manfredonia D, et al. Efficient patient identification strategies for women with osteoporosis. *J Clin Densitom*, 1999, 2(3):223-230.
- [2] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry, standardization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Miner Res*, 1987, 2:595-610.
- [3] Vincent A, Fitzpatrick LK. Soy isoflavone are they useful in menopause? *Mayo Clin Proc*, 2000, 75(5):1174-1184.
- [4] Kimmel DB, Recker RR, Gallagher JC, et al. A comparison of iliac bone histomorphometric data in postmenopausal osteoporotic and normal subjects. *Bone Miner*, 1990, 11:217-235.
- [5] Frost HM. Measurement of human bone formation by means of tetracycline labeling. *Can J Biochem Physiol*, 1969, 41:331-342.
- [6] Schwartz MP, Recker RR. Comparison of surface density and volume of human iliac trabecular bone measured directly and by applied stereology. *Calcif Tissue Int*, 1981, 33:561-565.
- [7] Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, et al. Trabecular bone microarchitecture. *Bone*, 1992, 13:327-330.
- [8] Thompson DD, Simmons HA. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, 1995, 17:125-133.
- [9] Wang X, Wu J, Chiba H, et al. Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab*, 2003, 21(5):268-275.
- [10] Frost HM. Measurement of human bone formation by means of tetracycline labeling. *Can J Biochem Physiol*, 1969, 41:331-342.
- [11] 冯燕茹. 老年性骨质疏松症诊断的进展. *中国骨伤杂志*, 2001, 14(11):682-686.
- [12] 刘忠厚, 主编. 骨矿与临床. 第 1 版, 北京: 中国科学技术出版社, 2006. 353-356.
- [13] 廖胜文, 陈永强, 汤亭亭, 等. 老年髌部骨折患者骨组织形态计量分析. *中华骨科杂志*, 2001, 21(6):223-237.

(下转第 450 页)

(上接第 442 页)

- [14] 李思,孔德娟.补肾方药对骨质疏松防治的实验研究.中国骨质疏松杂志,2002,8(2):166-170.
- [15] 季晖,刘康.淫羊藿总酮对摘除卵巢骨质疏松症的防治作用.中国骨质疏松杂志,2001,1(2):4-8.
- [16] 于顺禄.他汀类与二膦酸盐对去卵巢大鼠股骨的比较.中国骨质疏松杂志,2002,3(8):243-247.
- [17] 李爽,刘海全.运动对去卵巢大鼠骨组织形态计量学的影响.中国康复理论与实践,2005,4(4):245-246.

- [18] 于顺禄,白人晓.骨质疏松的病理与骨组织形态计量学观察指标与临床意义.中国体视学与图像分析,1999,3(9):189-192.
- [19] 史晓林.自拟强骨饮治疗骨质疏松症的 32 例临床报告.中国中医骨伤科杂志,2006,14(2):33-34.
- [20] 徐建春,毛应德龙,史晓林,等.骨质疏松疾病的研究进展与展望.浙江临床医学,2006,8(1):89-90.
- [21] 吴小涛,戴克戎,裘世静.老年与青年股骨头内松质骨组织形态计量学比较研究.中国骨质疏松杂志,2000,1(2):26-28.

(收稿日期:2006-07-05)