

实验性骨质疏松对骨缺损自然愈合的影响

段王平 张民 李刚 卫小春

中图分类号: R683 R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)02-0080-06

摘要:目的 探讨骨质疏松对大鼠股骨骨缺损自然修复过程的影响。方法 选用 8 月龄雌性 SD 大鼠 20 只,随机分为两组。实验组行双侧卵巢摘除术,对照组行假手术。术后 12 w 两组大鼠双侧股骨外侧髁上造成直径 3 mm 骨缺损,其深度为一侧骨皮质和髓腔宽度之和。缺损术后 4、8、12 w 取双侧股骨标本,进行组织学、X 线、骨密度、透射电镜及生物力学检测。结果 切除卵巢后 3 个月大鼠体重明显增加($P < 0.01$)。两组骨缺损到 12 w 时都未能完全愈合,实验组新生骨痂少,成骨过程延缓,破骨细胞功能活跃。4、8 w 时实验组缺损部位 X 线灰度、骨密度值均明显低于对照组($P < 0.05$)。结论 大鼠股骨髁上直径 3 mm 缺损到 12 w 时未能完全愈合,同时,特别是在早期,骨质疏松更加延缓了该缺损自然修复的过程。

关键词: 骨质疏松; 骨缺损; 修复

The effect of osteoporosis on bone defect healing without implanting DUAN Wangping, ZHANG Min, LI Gang, et al. Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of osteoporosis on the healing of femur bone defects without implanting in rats. **Methods** Twenty female SD rats (8 months old) were randomly divided into two groups. In experimental group ovariectomy was performed and in control group sham operation was received. Twelve weeks after surgery, cylindrical defect of which the diameter is 3.0mm and depth to medial cortical bone were performed on both condylus lateralis femoris and no graft in both groups. The effect of bone defect healing was evaluated in the 4th, 8th and 12th week after operation by histomorphology, radiology, bone mineral density (BMD), transmission electron microscope (TEM) and vitodynamics. **Results** The body weight obviously increased in 3rd month after ovariectomized ($P < 0.01$). In both groups, the defects cannot heal completely in 12th week. In experimental group, new bone was fewer and the growth was delayed, meanwhile, the osteoclasts were active. Radiological gray scale and BMD of defects all significantly decreased in experimental group compared with control group in the 4th and 8th week ($P < 0.05$). **Conclusions** This defect cannot heal completely in 12th week, meanwhile, especially in the early stage, the healing of bone defects can be delayed by osteoporosis.

Key words: Osteoporosis; Bone defect; Healing

骨质疏松症是以骨量减少、骨小梁稀疏变细为特征的全身性骨疾患。随着人口的老龄化,发病率越来越高。临床上,骨质疏松患者由于各种原因所致的大型骨缺损的修复,一直是棘手的难题。人们越来越关注骨质疏松对骨缺损愈合的影响,但是骨质疏松情况下骨缺损自然修复的过程尚不明确。探

讨这一过程不仅有很大的临床意义,而且能为骨质疏松骨缺损新型材料的修复研究奠定基础。本研究通过切除大鼠双侧卵巢建立骨质疏松模型,探讨骨质疏松对骨缺损自然愈合过程的影响。

1 材料和方法

选用 8 月龄雌性 SD 大鼠 20 只,体重 0.32 ± 0.03 kg,由山西医科大学实验动物中心提供。随机分为两组:实验组(ovariectomy, OVX 组,10 只)和对照组(sham operation, Sham 组,10 只)。5% 水合氯醛(7 mL/kg)腹腔麻醉,经双侧腰背侧切口进入腹腔,

基金项目:山西省留学归国人员基金(2006074)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第二医院骨科(段王平、张民、卫小春);英国北爱尔兰女王大学医学院(李刚)

通讯作者:卫小春,Email:weixiaochun06@yahoo.com.cn

实验组切除双侧卵巢,对照组切除双侧卵巢周围等量的脂肪组织。术后 3 个月,两组动物用骨科钻在双侧股骨外侧髁上 3 mm 处钻取直径 3 mm 骨缺损,其深度为一侧骨皮质与髓腔宽度之和(图 1),术后放至笼中自由活动与进食。缺损术后 4、8、12 w 时随机处死动物,取双侧股骨标本观察下列项目。

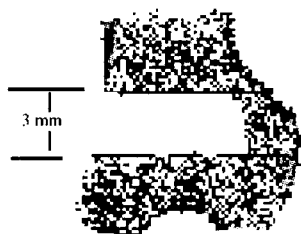


图 1 大鼠股骨骨缺损模型

1.1 一般情况

观察各组大鼠伤口、精神状况以及体重的变化,第一次术后 3 月内,各组动物每周用电子天平测量体重 1 次。

1.2 大体观察

将整个股骨取下,观察缺损部位的修复情况、骨痂以及周围组织反应等。

1.3 X 线放射学检测

缺损术后 4、8、12 w 每组随机处死 2 只动物,剖取双侧股骨全长,于 Philips 数字 X 线机下拍摄正位片(条件:48 kV、16.0 mAs、61.2 mS)观察骨缺损修复程度。选取包括缺损在内的上下各 3 mm 区域,用 MIAS-2000 图像分析系统进行缺损部位灰度分析。每组每个时间点 4 个标本,每个标本测量两次,取平均值。

1.4 骨密度(BMD)检测

X 线检测后,标本在 DPX-L 型双能 X 线骨密度测量仪(Lunar, USA, 附动物骨密度测量软件)下扫描整个股骨,选取包括缺损在内的上下各 3 mm 区域,测量其骨密度值。每组每个时间点 4 个标本,每个标本测量两次,取平均值。

1.5 HE 染色组织学观察

缺损术后 4、8、12 w 每组随机处死 1 只动物,剖取双侧缺损部位组织,4% 多聚甲醛固定,10% EDTA 脱钙满意后,纵向石蜡包埋,5 μ m 连续切片,HE 染色,显微镜观察。

1.6 透射电镜观察

缺损术后 12 w 每组随机处死 1 只动物,双侧缺

损部位组织用 5% 的戊二醛和 4% 的多聚甲醛混合液固定脱钙后再用锇酸固定,逐级脱水,环氧树脂 618 包埋,超薄切片经铅铀双重电子染色,TEM-100SX 透射电镜观察。

1.7 生物力学检测

骨密度检测后,将整个股骨平放,置于一特制的模具中用牙托粉包埋固定,使股骨外侧骨缺损处于最高位。将标本置于 Instron-4455 型材料性能试验机,用一直径 3 mm 的压载面,以 2 mm/min 速度加载缺损内部组织,载荷测量精度 2 N,在应力应变曲线上计算其极限应力值。极限应力: $\sigma_{\max} = N_{\max}/A$,单位为 Pa,其中 $N_{\max}$ 为最大载荷, A 为载头的面积,反映缺损部位新生骨组织的最大破坏强度。

1.8 统计学处理

所有实验数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SAS 9.1.3 软件进行析因方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般状况与体重变化

两次造模术后动物切口无感染、破溃,均 I 期愈合。去势术后 3 d 内,动物精神状态较差,3 d 后逐渐恢复正常。缺损术后 2 d 内,动物双侧后肢受惊吓时可暂时负重,2 d 后逐渐恢复正常。

实验组去势后 12 w 与 1 w 时进行比较,动物体重明显增加(图 2), $P < 0.01$ 。对照组体重随时间没有明显变化。

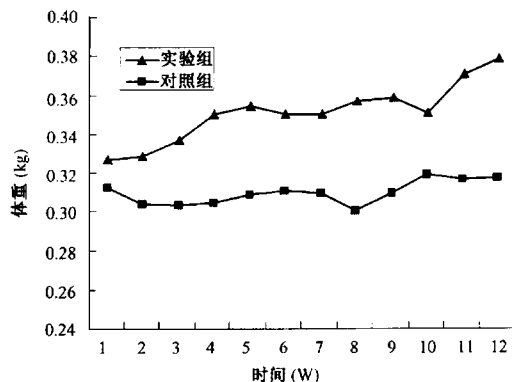


图 2 体重随时间变化折线图

2.2 大体观察结果

缺损术后 4 w: 实验组缺损底部边缘有少许新生骨组织填充,缺损表面皮质骨塌陷、拓宽;对照组缺损底部有少量新生骨组织填充,缺损表面皮质骨

没有明显变化。术后 8 w: 两组缺损底部新生骨组织增多, 表面皮质缺损直径较前变小。术后 12 w: 实验组缺损表面皮质骨愈合面凹陷, 缺损边缘仍然可见; 对照组皮质骨愈合面突起, 与周围肌肉组织黏连。

2.3 X 线放射学检测结果

缺损术后 4 w: 实验组缺损底部凹陷, 影像密度较低, 表面皮质骨缺损扩大、不规则; 对照组缺损底部平整, 影像密度较高, 表面皮质骨缺损变小、边缘规则。术后 8 w: 实验组缺损变小, 呈锥形变化, 底部凹陷, 影像密度较低, 表面皮质骨缺损变小; 对照组缺损变小, 底部平整, 密度较高, 表面皮质骨缺损变小、规则。术后 12 w: 实验组表面皮质骨愈合凹陷, 密度较低, 缺损内部呈锥形低密度影; 对照组表面皮质骨愈合饱满, 密度较高, 内部低密度区较小。

缺损术后 4、8、12 w 时, 实验组缺损部位 X 线灰度值均低于同期对照组, 4、8 w 时差异明显 ($P < 0.05$); 12 w 时差异较小 ($P > 0.05$)。两组随时间增加灰度值逐渐降低, 12 w 与同组 4 w 时比较降低明显 ($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 缺损部位 X 线灰度值 ($n = 4$)

分组	4 w	8 w	12 w
对照组	196.3 ± 6.49	193.2 ± 8.29	169.0 ± 8.22 [■]
实验组	184.3 ± 5.97 [*]	175.3 ± 5.12 [*]	162.9 ± 8.54 [■]

注: 与对照组同期比较, ^{*} $P < 0.05$; 同组 12 w 与 4 w 时比较, [■] $P < 0.05$

2.4 骨密度检测结果

缺损术后 4、8、12 w 时, 实验组缺损部位骨密度值均低于同期对照组, 4、8 w 时差异明显 ($P < 0.05$); 12 w 时差异较小 ($P > 0.05$)。对照组随时间增加骨密度值逐渐降低, 12 w 与 4 w 时比较降低明显 ($P < 0.05$); 实验组随时间增加骨密度值降低不明显 ($P > 0.05$) (见表 2)。

表 2 缺损部位骨密度值 (g/cm^2 , $n = 4$)

分组	4 w	8 w	12 w
对照组	0.207 ± 0.008	0.197 ± 0.009	0.191 ± 0.006 [■]
实验组	0.190 ± 0.009 [*]	0.188 ± 0.005 [*]	0.186 ± 0.004

注: 与对照组同期比较, ^{*} $P < 0.05$; 同组 12 w 与 4 w 时比较, [■] $P < 0.05$

2.5 组织学观察结果

缺损术后 4 w: 实验组缺损部位主要由纤维肉芽组织填充, 仅缺损边缘可见局灶性新生软骨和骨组织形成, 骨吸收处有大量破骨细胞 (图 3); 对照组缺损边缘可见较成熟的骨小梁修复, 其中可见大量

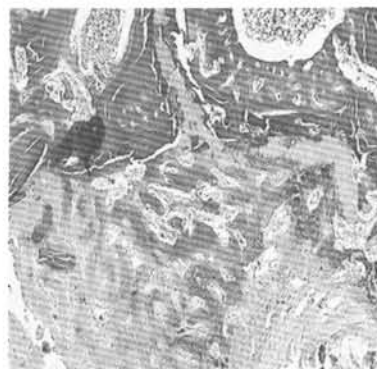


图 3 实验组 4 w HE 染色 ×40: 缺损边缘有局灶性的软骨和骨组织形成



图 4 对照组 4 w HE 染色 ×40: 缺损边缘可见较成熟的骨小梁修复



图 5 实验组 8 w HE 染色 ×100: 新生骨小梁中可见大量未骨化软骨灶

排列紧密的软骨细胞, 骨小梁周围可见成骨细胞, 缺损中央有部分纤维肉芽组织填充 (图 4)。术后 8 w: 实验组缺损边缘骨小梁稀疏, 其中可见大量未骨化的团块状软骨灶, 软骨细胞排列紧密, 骨组织周围可见大量的成骨细胞 (图 5); 对照组缺损边缘骨小梁丰富, 部分骨小梁出现断裂, 大部分软骨细胞骨化,



图 6 对照组 8 w HE 染色 $\times 100$: 骨小梁中大部分软骨细胞骨化

缺损中央无新生骨组织填充(图 6)。术后 12 w: 实验组缺损边缘骨小梁稀疏, 部分地方发生断裂, 软骨细胞骨化, 骨组织周围可见少量的成骨细胞, 有类骨质存在, 缺损中央无新生骨组织填充; 对照组缺损边缘骨小梁稀疏、塌陷, 骨小梁骨化完全, 可见骨陷窝形成。

2.6 透射电镜观察结果

缺损术后 12 w: 对照组骨痂中可见大量功能比较活跃的成骨细胞, 胞体方形或卵圆形, 胞核圆形, 胞质内充满大量粗面内质网(图 7a), 细胞周围有大量排列规则、致密的胶原纤维; 实验组骨痂中成骨细胞数量少, 胞体多呈扁平状, 胞核皱缩变形, 核膜不光滑, 胞质内粗面内质网肿胀(图 7b), 胞外可见少量稀疏、紊乱的胶原纤维。同时可见较多的破骨细胞, 胞浆内可见大量线粒体和大小不等的空泡(图 7c), 粗面内质网分布稀疏, 可见较多已被吞噬的钙盐颗粒沉积(图 7d)。

2.7 生物力学检测结果

缺损术后 4、8、12 w 时, 实验组缺损部位极限应力值均低于同期对照组, 但差异较小无统计学意义 ($P > 0.05$); 两组随时间增加极限应力值升高不明显 ($P > 0.05$)(见表 3)。

表 3 缺损部位极限应力值(10^6 Pa, $n = 4$)

分组	4 w	8 w	12 w
对照组	12.11 $\pm$ 0.81	14.47 $\pm$ 0.01	17.74 $\pm$ 0.87
实验组	10.51 $\pm$ 0.61	12.11 $\pm$ 0.84	14.81 $\pm$ 0.94

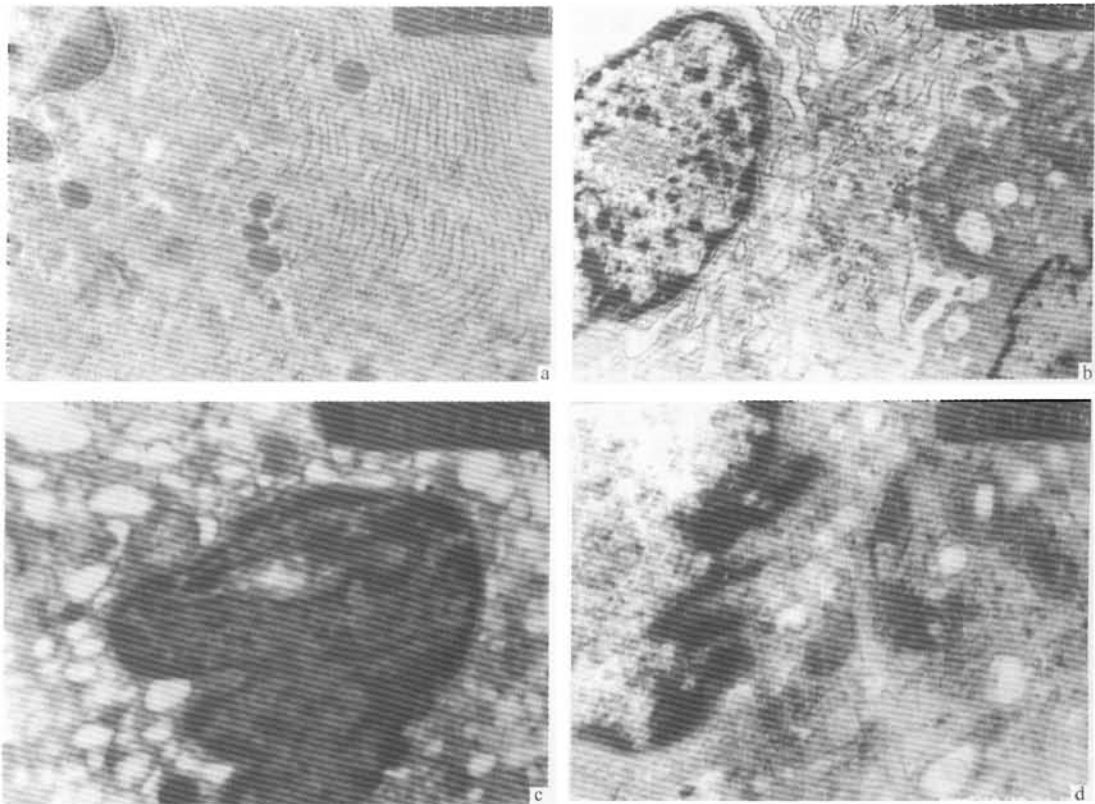


图 7 12 w 透射电镜照片 醋酸双氧铀 + 柠檬酸铅染色 a 对照组成骨细胞中可见大量排列规则的粗面内质网($\times 8000$); b 实验组成骨细胞胞核皱缩, 粗面内质网肿胀($\times 8000$); c 实验组破骨细胞胞质内可见大量的线粒体和大小不等的空泡($\times 8000$); d 实验组破骨细胞可见已被吞噬的钙盐颗粒($\times 20000$)

3 讨论

3.1 实验性极限骨缺损模型

Schmitz 和 Hollinger 最早定义骨极限缺损 (Termed critical size defects, CSDs) 的概念, 即指在特定骨骼上所造成的终生不能自行修复并愈合的最小缺损。文献报道大鼠颅骨极限缺损的直径大多为 2 mm^[1], 下颌骨极限骨缺损的直径为 4 mm^[2]。目前骨极限缺损模型已被广泛应用于骨移植材料修复性能的研究。本实验中, 在大鼠股骨外侧髁上 3 mm 处凿出直径 3 mm 骨缺损, 深度为一侧骨皮质与髓腔宽度之和。该缺损直径超过了股骨髓直径的三分之二, 到 12 w 时, 缺损未能完全愈合, 只是在缺损表面形成一层骨质, 内部仍呈锥形缺损。组织学切片发现, 缺损由边缘到中央、由下到上逐渐填充, 到 12 w 时只是在缺损底部边缘有一些新骨形成, 中央没有新生骨组织填充。而且随时间延长, 新生骨组织由于缺乏有效的支撑作用出现骨小梁的断裂、塌陷, 这也有可能是缺损部位 X 线灰度值以及骨密度值随时间增加逐渐降低的原因之一。由于缺乏有效的材料支撑, 缺损内部未能完全愈合, 致使 12 w 时缺损部位的极限应力值没有明显的提高。

绝经后骨质疏松的发生与雌激素水平下降明显相关, 因此大鼠双侧卵巢切除后引致的骨量丢失与女性绝经后骨量丢失极为相似。由于人类骨质疏松症多在中年后期发生, 故采用中老年大鼠可以复制出较为符合临床特征动物模型^[3]。有研究证实 8 月龄 SD 大鼠双侧卵巢切除后 3 个月全身骨密度较术前明显降低, 表明该方法建立骨质疏松模型比较可靠^[4]。本研究中同样采用 8 月龄 SD 大鼠, 去势后 3 个月动物体重明显增加, 这种由于雌激素缺乏引起的增重变化, 与文献报道一致^[5]。研究证明: 去势后, 动物松质骨骨量的丢失较皮质骨更为严重, 而且松质骨是评价生物材料的较好部位^[6]。因此, 为了更好的研究骨质疏松对骨缺损愈合的影响, 本实验中, 在去势大鼠股骨外侧髁上松质骨区造成骨缺损模型, 并利用余下的内侧股骨皮质起支撑作用, 不需要其他固定措施。实验中可以采用预制的材料植入缺损, 致使材料具有相同的形状和体积, 便于进行相互比较分析, 消除由于材料形状不同造成的偏差。本模型对难以施行内外固定的中小型动物尤为方便, 具有较强的科学性和实用性。

3.2 骨质疏松对骨缺损自然愈合的影响

骨质疏松症是老年人的多发病, 其特点是骨量

减少、骨小梁稀疏变细, 遭受微小创伤容易发生骨折, 同时骨质疏松症也是影响骨重建重要的全身因素之一^[7,8]。本实验通过制作大鼠股骨髁上骨缺损模型, 来探讨骨质疏松对骨缺损自然愈合过程的影响。结果表明, 骨质疏松骨缺损愈合明显延迟, 特别在 4 w 时, 骨质疏松引起的骨吸收现象比较明显, 致使缺损表面皮质骨塌陷、拓宽, 缺损内部松质骨区新生骨量明显减少。缺损部位组织学染色发现: 新生骨组织修复过程主要是一种软骨成骨的过程, 与正常骨相比, 骨质疏松明显延缓了该过程的进程, 到 12 w 时骨质疏松骨痂中仍然可见软骨细胞, 有类骨质存在。同时骨质疏松骨缺损底部边缘新生骨小梁稀疏, 而且随时间增加骨小梁断裂、塌陷较快, 致使骨质疏松缺损部位 X 线灰度值、骨密度值以及生物力学强度降低。说明骨质疏松不仅会阻碍骨缺损愈合新骨的骨量, 而且会延长新生骨组织的成熟时间。

骨组织通过破骨细胞的骨吸收和成骨细胞的骨形成不断进行重建, 在这一过程中, 骨髓微环境对成骨细胞和破骨细胞的生长发育起着极其重要的作用。雌激素可以通过调控骨质再形成的细胞因子网络及一些体液因子对骨髓微环境及直接对破骨细胞和成骨细胞发挥精细的调节作用来维持骨量的平衡^[9]。Motohashi^[10]研究认为: 骨质疏松对骨缺损愈合的影响与破骨细胞促进原有骨小梁及新生骨组织吸收有关。在本实验中观察到: 与正常骨相比, 骨质疏松骨痂中胶原纤维排列稀疏、紊乱, 骨小梁表面的成骨细胞少, 胞核皱缩, 粗面内质网肿胀。而破骨细胞数量多, 胞浆内可见大量线粒体、空泡以及大量吞噬钙盐颗粒的沉积。进一步表明, 骨质疏松骨缺损愈合时, 成骨细胞成骨能力降低, 而破骨细胞功能增强, 致使骨愈合质量较差。

研究表明, 大鼠股骨髁上直径 3 mm 的缺损是一种较好的研究骨质疏松骨愈合的极限骨缺损模型。同时, 特别是在早期, 骨质疏松延缓了骨缺损自然愈合的过程, 降低愈合新骨的质量。因此, 对骨质疏松合并有较大骨缺损的患者, 应妥善对待。

【参 考 文 献】

- [1] Turnbull RS, Freeman E. Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. J Periodont Res, 1974, 9(1): 39-43.
- [2] Kaban LB, Glowacki J. Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. J Dent Res, 1981, 60(7): 1356-1364.

(上接第 84 页)

- [3] 曾晓 , 谢林 , 姚共和 . 去势雌性大鼠骨质疏松症模型的复制及相关指标测定 . 浙江中医学院学报 , 1999 , 23 (4) : 44-45 .
- [4] 郝永强 , 戴 戎 . 骨质疏松性骨折实验模型的设计与建立 . 中国矫形外科杂志 , 2002 , 9 (6) : 569-572 .
- [5] Lu JX , About I , Stephan G , et al . Histological and biomechanical studies of two bone colonizable cements in rabbits . Bone , 1999 , 25 (2) : 41-45 .
- [6] Habets L , Bras J , Borgmeyer-Hoelen AM . Mandibular atrophy and metabolic bone loss . Endocrinology , radiology and histomorphometry . Int J Oral Maxillofac Surg , 1988 , 17 (3) : 208-211 .

- [7] 徐少文 , 王建卫 , 李伟 , 等 . 骨质疏松对大鼠胫骨骨折愈合质量的影响 . 中华医学杂志 , 2004 , 84 (14) : 1205-1209 .
- [8] 戚孟春 , 周秀青 , 胡静 , 等 . 实验性骨质疏松对种植体周骨缺损植骨愈合的影响 . 中国口腔种植体学杂志 , 2002 , 7 (4) : 155-157 .
- [9] Teitelbaum SL . Bone resorption by osteoclasts . Science , 2000 , 289 (5484) : 1504-1508 .
- [10] Motohashi M , Shiota T , Tokugawa Y , et al . Bone reactions around hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats . Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod , 1999 , 87 (2) : 145-152 .

(收稿日期 : 2007-08-12)