

正常和去势大鼠胫骨皮质机械性显微损伤的比较研究

宋国路 于志锋 汤亭亭 戴尅戎 裘世静

中图分类号: R329.4 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)04-0259-04

摘要: **目的** 观察骨质疏松病理状态对机械性显微损伤产生和修复的影响。**方法** SD大鼠去势和假手术后3个月在右胫骨钻孔造成机械性损伤,分别在钻孔后1、2、4周后取材,进行标本碱性品红染色,制作50 μm 厚切片在光镜和荧光显微镜下观察,并利用BIOQUANT图像分析软件对显微损伤进行定量分析。**结果** 镜下观察发现损伤呈现片状的弥散性损伤和线性裂纹。对线性裂纹的统计学分析发现,裂纹的数量密度和长度密度在去卵巢组明显地高于假手术组($P < 0.01$)。对弥散性损伤的统计学分析发现:去卵巢组的损伤骨表面的比率明显高于假手术组($P < 0.05$);损伤面积比在两组之间的差异没有统计学上的差异(均为 $P > 0.05$)。随着时间的延长,弥散性损伤和线性裂纹都有逐渐减少的倾向,其中损伤面积比在各组的不同时间点之间存在着统计学上的差异($P < 0.01$)。**结论** 在雌激素缺乏导致的骨质疏松骨上,植入物可产生更多的显微损伤。随着时间的延长,这些显微损伤可逐渐修复。

关键词: 机械性显微损伤; 去势; 线性裂纹; 弥散性损伤

A comparative study of mechanical microdamage in cortical bone between normal and ovariectomized rats
SONG Guolu, YU Zhifeng, TANG Tingting, et al. Department of Orthopaedic Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Abstract: **Objective** To observe the morphological changes and repair of mechanically induced microdamage in normal and osteoporotic bone. **Methods** Either ovariectomy (OVX) or sham-operation was performed on the adult female SD rats. Three months later, a hole was drilled in the right tibial diaphysis by a metal pin. The rats were sacrificed at 1, 2 and 4 weeks after hole drilling. Bone segments containing the hole were stained with basic fuchsin. Light microscope and fluorescent microscope were used to observe the microdamage around the drilling areas on bone sections of 50 μm thickness. Histomorphometric measurements were conducted using Bioquant image analysis system. **Results** Both diffuse damage and linear cracks were detected around the pin-hole under microscopy. The number and length densities of linear cracks (Cr. N/B.Ar and Cr. L/B.Ar) were significantly higher in rats with OVX than those with sham-operation ($P < 0.01$). The ratio of bone damage surface to bone surface (DBS/BS) was significantly greater in OVX rats than in sham-operated rats ($P < 0.05$). The two group has no difference in the ration of bone damage area to bone area (DB.Ar/B.Ar, $P > 0.05$). Both diffuse damage and linear cracks had a tendency to decrease with time following surgery in both groups. And DB.Ar/B.Ar significantly decreased with time after surgery ($P < 0.01$). **Conclusion** Mechanical insult, such as pin and screw implantation, would cause more severe damage in osteoporotic bone resulting from estrogen deficiency. These microdamage will be repaired as the time passes by.

Key words: Mechanical microdamage; Ovariectomy; Linear cracks; Diffuse microdamage

作者单位: 200011 上海,上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科(宋国路、于志锋、汤亭亭、戴尅戎);
Bone and Mineral Research Laboratory, Henry Ford Hospital, USA(裘世静)

通讯作者: 汤亭亭, Email: tingtingtang@hotmail.com

显微损伤的积累被认为是老年人发生脆性骨折、抵抗骨折的能力下降以及运动员发生应力骨折的重要因素^[1-3]。引起骨显微损伤的主要原因大致有两种:一是过度连续承载造成的疲劳损伤,另一种是各种机械性损伤,如重力撞击,假体或骨(螺)钉的植入。在骨科临床上,对老年骨折患者进行内固定时,螺钉常需植入到疏松的皮质部位,螺钉植入部位显微损伤的积聚可能是骨质疏松性骨折内固定松动的主要原因之一。对骨显微损伤的研究大多集中在疲劳损伤方面,对机械性损伤观察较少。在前期研究中,我们已建立了皮质骨机械性显微损伤的形态分析和定量研究方法^[4],本研究进一步利用卵巢切除大鼠和假手术大鼠的动物模型,比较观察机械性显微损伤在疏松和正常骨上的产生和修复情况,为骨质疏松症的评价和骨质疏松性骨折的治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 动物模型和分组

SD 成年雌性大鼠 6 月龄 30 只。体重 400~450 g, SPF 级动物饲养。每只大鼠腹腔注射 2.5% 的戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉后,卵巢切除组结扎并完整切除双侧卵巢,而假手术组不切除卵巢,仅结扎并切除卵巢附近少许脂肪组织。术后 3 个月在两组大鼠右胫骨结节处钻孔(直径为 1 mm,见图 1)。钻孔后 1、2、4 周处死取材。实验动物分组情况见表 1。由于钻孔过程中胫骨断裂及取材时造成的标本损伤,实际纳入分组的动物为 27 只。

表 1 动物分组和取材时间

组别	1 周	2 周	4 周
卵巢切除组(只)	5	5	5
假手术组(只)	3	5	4

1.2 主要材料与仪器

硬组织切片机(Leica SP1600,德国),荧光显微镜(Leica DM4000B,德国),骨形态计量分系统(Bioquant Osteo II VB.10.20,美国)。

1.3 制片和观察

大鼠处死后取出其右侧胫骨,碱性品红块染后截下带孔处 1 cm 两边各 0.5 cm 的胫骨作甲基丙烯酸甲酯包埋,用 LEICA SP 1600 切片机经骨孔处作横截面切片,最后将切片磨至 70 μm 左右厚度。光镜和荧光显微镜(绿色滤光镜)作同步观察。同时对损伤区(靠近断端 1 mm 范围内)进行定量分析,定量分析采用 Bioquant 图像分析系统。主要测量线性裂

纹和弥散性损伤参数。

1.3.1 线性裂纹参数:裂纹的数量密度(Cr. N/B. Ar),是裂纹数与测量区骨面积之比,单位为个数/mm²;裂纹的长度密度(Cr. Le/B. Ar),是裂纹长度与测量区骨面积之比,单位为 μm/mm²。

1.3.2 弥散性损伤参数:损伤骨表面的比率(损伤骨表面长度/骨孔表面长度):DBS/BS,%;损伤骨的面积比(损伤骨的面积/测量区骨面积):DB. Ar/B. Ar, %。

1.4 统计学处理

对测量所得数据利用双因素方差分析方法(Two-Way ANOVA)进行统计,以比较各组间、不同时间点及总体的差异情况。

2 结果

2.1 显微损伤的大体形态(图 1、图 2)



图 1 碱性品红染色的去势组显微损伤
线状的紫红色条纹为显微裂纹(绿色箭头),弥散的紫红色区域为弥散性损伤(红色箭头)(10×)



图 2 荧光显微镜下的去势组裂纹形态

在普通光镜下观察,可发现在钉孔周围的皮质骨近断端处有碱性品红染色的呈紫红色的显微损

伤 ,部分表现为线性的较粗大的裂纹 ,更多的是呈现片状的品红着色 ,即所谓的弥散性损伤(图 1);在荧光显微镜(绿色滤光镜)下表现为深红色的线性或弥散性损伤区(图 2)。

2.2 对去卵巢组和假手术组显微损伤的定量比较研究

对线性裂纹的数量密度和长度密度的统计学分析发现 ,裂纹的数量密度(表 2)在去卵巢组明显地高于假手术组($P < 0.01$) ,说明在局部骨质疏松状态下 ,裂纹更容易产生。无论是去卵巢组还是假手术组 ,随着时间的延长 ,裂纹在总数量上也有逐渐减少的趋势 ,但不同时间点之间的差异没有统计学意义($P > 0.05$) ;而裂纹的长度密度(表 2) ,在去卵巢组也明显地高于假手术组($P < 0.01$) ,尽管随着时间的延长逐渐减少 ,但不同时间点之间的差异没有统计学意义($P > 0.05$) 。

表 2 去势组与正常组线性裂纹比较($\bar{x} \pm s$)

取材 时间	去卵巢组		假手术组	
	裂纹数量密度	裂纹长度密度	裂纹数量密度	裂纹长度密度
1 周	2.56 ± 1.15 *	425.95 ± 235.75 *	1.24 ± 0.23	167.60 ± 48.55
2 周	2.03 ± 1.25 *	283.22 ± 141.61 *	0.98 ± 0.39	157.95 ± 90.66
4 周	1.83 ± 0.59 *	185.92 ± 48.40 *	0.92 ± 0.61	79.14 ± 43.99

注 组间比较 , * $P < 0.01$

对弥散性损伤的统计学分析发现 ,去卵巢组的损伤骨表面的比率(表 3)明显的高于假手术组 ,差异有统计学意义(均为 $P < 0.05$) ,说明在骨质疏松组 ,更多的钻孔周围骨表面产生显微损伤。在钻孔后的不同时间段 ,损伤骨表面的比率逐渐减少 ,但差异无统计学意义($P > 0.05$) ;损伤面积比(表 3)在两组之间的差异没有统计学上的差异(均为 $P > 0.05$) ,但是在各组的不同时间点之间存在着统计学上的差异 ,即随着时间的延长明显减少(分别为 $P = 0.01$ 和 $P < 0.01$) 。

表 3 去势组与正常组弥散性损伤比较($\bar{x} \pm s$)

取材 时间	去卵巢组		假手术组	
	损伤骨表面的比率	损伤骨面积比	损伤骨表面的比率	损伤骨面积比
1 周	0.80 ± 0.24 *	0.11 ± 0.10	0.86 ± 0.03	0.07 ± 0.01
2 周	0.83 ± 0.15 *	0.05 ± 0.01 #	0.70 ± 0.20	0.03 ± 0.01
4 周	0.83 ± 0.03 *	0.05 ± 0.01 #	0.29 ± 0.02	0.01 ± 0.01

注 组间比较 , * $P < 0.05$ 不同时间点比较 , # $P < 0.01$

3 讨论

随着我国人口的老年化 ,骨质疏松患者的数量正在逐渐增加 ,对骨质疏松骨质量的评估也正受到广泛的重视。除松质骨小梁的构筑方式(节点和游离末端数、小梁间距等) ,皮质骨的厚度和孔隙率外 ,人们逐渐认识到 ,骨组织显微损伤的程度对骨的力学性能也有重要影响 ,显微损伤的积累会引起骨刚度下降和骨折的发生^[2]。但既往的研究主要关注疲劳对显微损伤形成的影响 ,而对植入物造成的机械性显微损伤则未引起应有的重视。Huja 等^[5]首先发现在内植物的周围也会产生显微损伤的积聚。Tris^[6]的研究进一步提出这种显微损伤是评价内植物稳定性和内植物周围骨适应性的重要指标。我们的试验进一步发现 ,去卵巢组大鼠显微损伤的积聚更多(包括线性裂纹和弥散性损伤) ,其长度也比假手术组的大鼠要长 ,这样会导致骨的力学性能下降 ,并进而影响内植物的稳定性。

Dai 等^[7]利用卵巢摘除大鼠的模型 ,研究了卵巢摘除大鼠、假手术大鼠、卵巢摘除后雌激素替代大鼠 L₅ 椎体显微损伤和力学性能的关系 ,结果发现和后两种大鼠比较 ,卵巢摘除大鼠椎体上的显微数量密度明显偏高 ,而压缩试验时的最大载荷和弹性模量则明显偏低 ,这说明在骨质疏松状态下 ,松质骨上更容易产生疲劳性显微损伤 ,且这种损伤和骨强度下降之间存在一定的关系。Waldorff 等^[8]比较了 8 月龄和 24 月龄雄性大鼠股骨远端显微裂纹产生后的修复情况 ,发现加载(诱导裂纹产生)后 35 天 ,老年大鼠骨内的裂纹明显多于年青大鼠。本研究发现 ,在内植物孔道周围的皮质骨上 ,同时出现了两种类型的显微损伤 :线性裂纹和弥散性损伤 ,而损伤的程度在去卵巢大鼠表现得更为明显。和假手术组相比 ,裂纹的数量密度(对线性裂纹而言)和骨表面比率(对弥散性损伤而言) ,在去卵巢组均明显地高于假手术组 ,说明在骨质疏松状态下 ,裂纹更容易产生。这可能是由于去卵巢大鼠的皮质骨和正常大鼠相比 ,其孔隙率更高 ,这样在钻孔过程中单位骨组织上承受的应力更大 ,更容易产生显微损伤。

Burr 等^[9]在犬股骨的离体疲劳试验中发现 ,裂纹的密度(Cr. Dn)和刚度下降呈现二次方关系 ,也就是它们之间并不是线性的相关 ;而显微损伤的区域(Cr. Ar)和强度的下降之间呈现线性关系。这提示我们 ,在本研究中发现的线性裂纹比弥散性损伤对骨的力学性能和内植物稳定性的影响更大。骨的力

学性能在很大程度上取决于裂纹的长度而非密度。少量长裂纹的急剧增大即可导致骨的完全断裂,钻孔周围可见一些较大的裂纹与弥散性损伤共存。这些粗大的裂纹对螺钉稳定性的影响尚不明了。

本研究还发现,随着时间的延长,裂纹的密度逐渐减少,但各时间点之间无统计学差异,而弥散性损伤面积的减少更为明显,在各时间点之间差异有显著性。这说明随着时间的延长,裂纹出现了部分修复。对显微损伤的修复机制,Frost^[3]首先提出骨依靠靶向骨重建来清除疲劳性显微损伤以维持自身结构和力学性能的完整性。机械性显微损伤是否存在同样的修复机制,值得我们进一步探讨。

【参 考 文 献】

- [1] Martin RB. Fatigue microdamage as an essential element of bone mechanics and biology. *Calcif Tissue Int* 2003 ;73 :101-107.
- [2] Burr DB. Microdamage and bone fragility. *Current Opinion in Orthopaedics* , 2001 ,12 :365-370.

- [3] Frost HM. Emerging views about " osteoporosis ", bone health , strength , fragility , and their determinants. *J Bone Miner Metab* , 2002 ,20(6) 319-325.
- [4] 宋国路,汤亭亭,戴 戎,等. 皮质骨机械性显微损伤的形态分析及其研究价值. *中国骨质疏松杂志* 2007 ,13(4) 225-228.
- [5] Huja SS ,Katona TR ,Burr DB ,et al. Microdamage adjacent to endosseous implants. *Bone* ,1999 ,25 :217-222.
- [6] Trisi P ,Rebaudi A. Progressive bone adaptation of titanium implants during and after orthodontic load in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002 ;22 :31-43.
- [7] Dai RC ,Liao EY ,Yang C ,et al. Microcracks : an alternative index for evaluating bone biomechanical quality. *Bone Miner Metab* , 2004 ,22 :215-223.
- [8] Waldorff EI , Goldstein SA , McCreadie BR. Age-dependent microdamage removal following mechanically induced microdamage in trabecular bone *in vivo* . *Bone* 2007 ;40 :425-432.
- [9] Burr DB ,Turner CH ,Naick P ,et al. Does microdamage accumulation affect the mechanical properties of bone ? *J Biomech* ,1998 ,31 :337-345.

(收稿日期 : 2008-12-08)