

• 论著 •

不同性别的大鼠骨质疏松形态计量学和生物力学研究

史念珂 雪原

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)10-0723-04

摘要: 目的 研究不同性别骨质疏松大鼠的骨力学特性。方法 基于切除卵巢雌性大鼠和切除肾上腺雄性大鼠骨质疏松模型,研究不同性别大鼠骨形态计量学和生物力学的测量结果。结果 骨形态计量学提示,骨小梁厚度(Tb. Th)、平均骨小梁接点数(Tb. N)、相对类骨质体积(OV/BV)雌性大鼠低于雄性;四环素单标记面(sLS/BS)雌性大鼠高于雄性大鼠。生物力学指标提示,骨质疏松大鼠弯曲弹性模量、弯曲刚性系数低于正常;最大弯曲应力低于正常,且雌性低于雄性大鼠。弯曲韧性系数雄性大鼠高于正常,雌性大鼠低于正常。结论 骨质疏松雌性大鼠骨小梁形态结构弱于雄性。骨质疏松大鼠抗应力强度减弱,骨韧性度雌性大鼠弱于雄性。因此,雌性大鼠骨质疏松的骨力学状态弱于雄性。

关键词: 骨质疏松; 形态计量学; 生物力学

The histomorphometry and biomechanics study of osteoporotic rats of different sex SHI Nianke, XUE Yuan. Department of Operative Surgery, Tianjin University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: SHI Nianke, Email: niankes@yahoo. com. cn

Abstract: Objective To study the bone biomechanical characteristics of osteoporotic rats with different sex. **Methods** Based on the osteoporotic models of ovariectomy for female rats and adrenalectomy for male rats, the bone histomorphometry and biomechanics of rats of different sex were analyzed. **Results** The bone histomorphometry data showed that the thickness of bone trabecula (Tb. Th), number of average bone trabecula junction (Tb. N), and relative volume of osteoid (OV/BV) in female rats were lower than those in male ones. The index of sLS/BS in female rats was higher than that in male ones. The biomechanical results illustrated that the indexes of modulus of bending elasticity and modulus of bending rigidity in the rats with osteoporosis were both lower than those in normal rats. The index of maximal bending stress in rats with osteoporosis was lower than that in the normal rats and this index in female rats were lower than that in male rats. **Conclusion** The trabecular bone structure in female osteoporotic rats was weaker than that in male rats. The anti-stress intensity in osteoporotic rats weakened compared to that in normal rats. The bone ductility in female rats was weaker than that in male rats. Thus, the bone biomechanical status in female osteoporotic rats was weaker than that in male rats.

Key words: Osteoporosis; Histomorphometry; Biomechanics

随着人类寿命的延长和人口的老龄化,骨质疏松症已成为一个世界性的公共健康问题,由骨质疏松症导致的骨痛和病理性骨折严重影响着老龄人群

的生活质量。因此,对骨质疏松症的研究及防治越来越受到世人重视。本文基于去卵巢雌性大鼠和切除肾上腺雄性大鼠骨质疏松模型,利用骨组织形态计量学和骨生物力学实验,对不同性别动物骨质疏松特性进行比较研究。

1 材料和方法

1.1 材料

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772193,30571876);
天津市应用基础研究计划重点资助项目(07JCZDJC08000)

作者单位: 300070 天津医科大学外科手术学(史念珂);天津
医科大学总医院骨科(雪原)

通讯作者: 史念珂, Email: niankes@yahoo. com. cn

实验动物 3 月龄 SD 雌性大鼠 84 只, 雄性大鼠 76 只, 平均体重 250 g, 清洁级。由天津放射学研究所实验动物中心提供。随机分为 3 组, 正常对照组 60 只(雌、雄性大鼠各 30 只), 卵巢切除组 54 只, 肾上腺次全切除组 46 只。

实验仪器: VITALAB Micro-II 半自动生化分析仪(Vital Scientific 公司); SN-682 型放射免疫 γ 计数器(上海核福光电仪器有限公司); 硬质骨切片机(德国 POLYCUT); 全自动图象处理系统(KONTRONIBAS 2.0); 荧光显微镜(OLYMPUS B $\times$ 60); 力学实验采用 CSS-44001 型电子万能试验机(长春材料试验机研究所)。

1.2 方法

1.2.1 造模组以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉。假手术组(SHAM 组)找到卵巢后不予切除即分层缝合, 卵巢切除术行双侧卵巢切除术, 肾上腺次全切除术切除全部右侧肾上腺及左侧肾上腺下半部分。术后均给予常规饲料、自由饮水。饲养 4 w 后, 股动脉放血方法处死大鼠。

1.2.2 标本的制备

1.2.2.1 四环素双标记处死大鼠前 14 d 进行第 1 次标记, 方法为: 盐酸四环素按每日 50 mg/(kg $\cdot$ d) 灌胃, 连续 2 d, 9 d 后进行第 2 次标记, 方法同前。第 2 次标记后 3 d 处死大鼠。

1.2.2.2 不脱钙骨切片的制备取左侧胫骨去除软组织, 将胫骨近端 2/3 两侧沿纵向用水砂纸磨平, 暴露骨髓腔。将标本置于 70% 甲醇中固定 30 min 后放入 1% Villaneuva 染色液中浸泡 4 d。再经脱水脱脂、配置包埋, 最后用德国 POLYCUT 硬质骨切片机切片, 树脂胶封片。

1.2.2.3 观察方法骨切片置于光学显微镜下, 用 KONTRONIBAS 2.0 全自动图象处理系统测量骨骺板远端 1 ~ 3 mm 范围内骨形态学参数: 单位体积骨量(BV /TV, %)、平均骨小梁厚度(Tb. Th, μ m)、平均骨

小梁间距(Tb. Sp, μ m)、平均骨小梁接点数(Tb. N, 个/视野)、相对类骨质体积(OV/BV, %)、骨形成表面(OS/BS, %); 切片置于荧光显微镜下观察, 用 KONTRON IBAS2.0 全自动图象分析仪测量骨骺板远端 1 ~ 3 mm 范围内骨动力学参数: 四环素单标记面(sLS/BS, %)、四环素双标记面(dLS/BS, %)、骨矿化表面(MS/BS, %)、骨矿化沉积率(MAR, μ m/d)、骨矿化延迟时间(MLT, d)、组织水平的骨形成速率(BFR, d)。

1.2.2.4 实验动物于第 4 周末以腹主动脉放血法处死大鼠, 取左、右侧股骨用生理盐水浸透的纱布包裹标本, 贮于 -20℃ 冰箱内保存股骨。

1.2.2.5 力学实验采用 CSS-44001 型电子万能试验机进行三点弯曲实验测试并计算弯曲弹性模量(MPa) 最大弯曲应力(MPa) 最大应变(%) 弯曲能量(N $\cdot$ mm) 弯曲刚性系数(Nmm²) 弯曲韧性系数(mm/N) 等参数。在三点弯曲力学实验测试中弯曲刚性系数和弯曲韧性系数计算如下:

弯曲刚性系数(EJ) = $F_p L^3 / 48 d_p$

式中: F_p —弹性载荷; L—跨距; d_p —弹性挠度

弯曲韧性系数(K) = $d_b - d_p / F_b - F_p$

式中: F_p —弹性载荷(N); F_b —最大载荷(N); d_p —弹性挠度(mm); d_b —最大挠度(mm)

1.3 统计学处理

应用 MINITAB 软件进行实验数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用标准正态分布 t 检验, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

骨组织形态学参数提示, 两种手术组各项参数均与正常组存在差异, 手术组中平均骨小梁厚度(Tb. Th)、平均骨小梁接点数(Tb. N)、相对类骨质体积(OV/BV) 肾上腺切除组低于卵巢切除组。

表 1 骨质疏松模型组与正常组骨形态学比较

组别	BV /TV	Tb. Th	Tb. Sp	Tb. N	OV /BV	OS /BS
正常组	31.22 $\pm$ 9.18	117.56 $\pm$ 26.16	264.40 $\pm$ 58.18	2.71 $\pm$ 0.54	0.18 $\pm$ 0.06	2.87 $\pm$ 0.65
卵巢切除组	18.12 $\pm$ 4.40 *	89.68 $\pm$ 14.26 *	440.83 $\pm$ 87.24 *	2.01 $\pm$ 0.31 *	0.08 $\pm$ 0.02 *	3.79 $\pm$ 0.75 *
肾上腺切除组	17.60 $\pm$ 4.86 #	67.35 $\pm$ 12.53 #▲	448.74 $\pm$ 98.36 #	1.51 $\pm$ 0.51 #▲	0.07 $\pm$ 0.03 #▲	3.95 $\pm$ 0.81 #

注: 正常组与肾上腺切除组比较, # $P < 0.05$; 正常组与卵巢切除组比较, * $P < 0.05$; 肾上腺切除组与卵巢切除组比较, ▲ $P < 0.05$; 下同

表 2 骨质疏松模型组与正常组骨动力学比较

组别	sLS/BS	dLS/BS	Ms/BS	MAR	MLT	BFR
正常组	9.88 $\pm$ 0.75	0.47 $\pm$ 0.21	5.48 $\pm$ 0.45	0.19 $\pm$ 0.10	5.17 $\pm$ 1.72	1.07 $\pm$ 0.91
卵巢切除组	11.56 $\pm$ 1.05 *	0.71 $\pm$ 0.46 *	6.42 $\pm$ 0.63 *	0.28 $\pm$ 0.16 *	4.22 $\pm$ 1.25 *	1.85 $\pm$ 1.12 *
肾上腺切除组	10.68 $\pm$ 1.07 #▲	0.64 $\pm$ 0.32 #	6.21 $\pm$ 0.49 #	0.31 $\pm$ 0.19 #	4.34 $\pm$ 1.54 #	2.06 $\pm$ 1.37 #

骨组织的动力学参数提示,两种手术组各项参数均与正常组存在差异,手术组中四环素单标记面(sLS/BS)卵巢切除组高于肾上腺切除组。

表 3 骨质疏松模型组与正常组骨生物力学比较

项目	正常组	肾上腺切除组	卵巢切除组
弯曲弹性模量 (MPa)	150.23 ± 31.17	132.77 ± 20.30 [#]	126.56 ± 38.97 [*]
最大弯曲应力 (MPa)	168.73 ± 31.15	139.06 ± 42.14 [#]	126.33 ± 24.48 ^{*▲}
最大应变 (%)	0.052 ± 0.018	0.057 ± 0.024	0.054 ± 0.010
弯曲能量 (N · mm)	23.26 ± 5.95	22.02 ± 7.56	22.39 ± 4.95
弯曲刚性系数 (Nmm ²)	25.04 ± 5.20	22.13 ± 3.38 [#]	21.09 ± 6.50 [*]
弯曲韧性系数 (mm/N)	5.67 ± 1.27	14.73 ± 9.13 [#]	3.39 ± 1.02 ^{*▲}

骨力学参数提示,两种手术组最大应变和弯曲能量与正常组无差异,弯曲弹性模量、最大弯曲应力、弯曲刚性系数低于正常组,肾上腺切除组弯曲韧性系数高于正常组和卵巢切除组,卵巢切除组弯曲韧性系数低于正常组和肾上腺切除组。

3 讨论

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^[1]。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。

骨质疏松的发生与内源性雌激素有关^[2],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。雌激素减少,对破骨细胞的抑制作用减弱,破骨细胞相对加强,破骨与成骨明显失衡,出现骨的吸收增加,骨的形成减少,导致骨质逐渐丢失。去卵巢大鼠动物模型基于雌性大鼠去卵巢后的高转换骨代谢过程与人类绝经后骨质疏松非常相似,因此被广泛用于绝经后骨质疏松的实验研究中。基于雄激素对骨代谢的不稳定作用,致使雄性动物去势手术不能成为理想的骨质疏松模型。近年研究提示^[3],切除肾上腺制作出比较稳定的雄性动物骨质疏松模型。

目前较公认的骨质疏松诊断标准是骨组织计量学指标^[4],这一标准能从静态和动态两个方面反映骨新陈代谢的过程,主要考虑到骨量的因素对骨强度的影响。骨力学是生物力学的重要分支^[5],研究骨组织在外力作用下的力学特性和骨受力后的生物效应,是对骨质量进行评定的一种可靠方法。虽然骨密度的测量常常被用于评定骨脆性和对骨折危险性进行预测,但大量的动物实验和临床研究结果表

明,单纯骨矿盐含量的增加,骨质量不一定增加,有时反而降低。因此对骨进行生物力学实验研究,不但有助于对骨质量进行直接评价,而且也是评价各种对抗骨量丢失措施的最佳方法之一。骨骼不是普通固体物质,而是具有一定韧性的粘弹性物质,骨骼的刚度是通过弯曲刚性系数和弯曲韧性系数反应的。对于骨质疏松来说^[6],更重要的是骨骼的强度。影响骨强度的因素主要包括骨量因素和骨质量因素。保证自主的生理负荷不至于引起骨折是骨的生物力学行为的能力和主要目标。骨骼的强度不同同于骨量,强度是从整体上评估力学性能,除骨量外骨骼的强度还受到骨小梁的空间结构、骨矿盐的分布等结构形态学因素的影响。

反复的应变会使骨发生疲劳损伤即细微损伤。骨重建可以通过新骨的替换来修复有限数量的细微损伤。少量的细微损伤对骨强度影响不大,若骨所发生的应变超出了骨修复的能力。这种细微损伤的积累可以增加骨折的危险性。Dai 等^[7]研究了卵巢摘除大鼠和假手术大鼠、雌激素替代大鼠第 5 腰椎椎体显微损伤和力学性能的关系,结果发现与后两种大鼠相比,卵巢摘除大鼠椎体上的显微裂纹密度明显偏高,而压缩试验时的最大载荷和弹性模量则明显偏低,说明在裂纹积聚和骨强度下降之间存在一定的关系。

骨是一种具有独特结构高密度的结缔组织^[8],在胶原的有序排列基础上矿化,以提供人体的机械支持功能。骨胶原组织主要由 3 种纤维组成,即胶原纤维,弹性纤维和网状纤维。胶原纤维使胶原组织具有一定的强度和刚度。弹性纤维使胶原组织在载荷作用下有延伸的功能。骨矿含量的变化对弹性区的影响较大,而有机质的变化对塑性区的变化影响较大。骨胶原的合成减少及胶原纤维的排列不足是造成骨矿化不足的基础。骨小梁的基质主要由矿物质和胶原纤维丝构成。在正常的骨小梁上,70%~80%的部位有新的胶原纤维丝形成,骨质疏松可使胶原部分纤维断裂及骨小梁穿孔,造成胶原组织应力松弛量降低,松弛速度变缓慢。穿孔的骨小梁上仅有不足 20%的部位上有新的胶原纤维形成,这种胶原的病损和骨矿物质含量的减少造成了骨小梁本身性能的变化。

Brianne 等^[9]研究提示,骨质疏松病理过程呈骨矿化不均一,骨小梁变薄且不规则状态,同时呈现微小损伤。骨生物力学实验研究,不但有助于对骨质量进行直接评价,而且也是评价各种对抗骨量丢失

的最佳方法。骨质疏松三点力学实验提示骨质疏松的骨弹性模量降低,其骨弹性模量的变化源于骨量急剧丢失,骨小梁出现微小损伤,机械敏感性降低。因此,骨矿物质含量的保存或骨细胞机械敏感性的维持是防止骨质疏松潜在的治疗策略。

骨骼可能通过 Mechanostat 机制^[10],在时间和解剖形态的空间上调整自身的状态以适应不同的机械负荷。所有这些过程将使负重骨满足 Frost 提出的结论。也就是说,强壮的肌肉(肌力)使相应的骨骼变为更加强壮。反之亦然。如果该调控机制中的各项反馈通路功能减退,或效应器官功能减退,可能导致老年性骨质疏松。

本文基于雌性大鼠去卵巢动物模型和雄性大鼠切除肾上腺动物模型实现骨质疏松动物模型研究平台,对不同性别大鼠进行骨质疏松形态计量学及生物力学方面的研究。结果提示,骨组织形态学参数提示两种模型多项指标无差异,平均骨小梁厚度及平均骨小梁接点数卵巢切除的雌性大鼠低于肾上腺切除的雄性大鼠;骨组织动力学参数提示,两种手术组各项参数均与正常组存在差异,手术组中四环素单标记面(sLS/BS)卵巢切除组高于肾上腺切除组。说明所研究雌性及雄性大鼠骨质疏松形态结构近似,雌性大鼠骨质疏松的骨小梁形态结构弱于雄性。生物力学指标提示,弯曲弹性模量、弯曲刚性系数低于正常组,手术组间无差异,说明骨质疏松生物力学综合指标降低,抗应力强度减弱。在不同性别和不同致病因素中结果无差异。两种手术组最大弯曲应力指标低于正常组,且卵巢切除的雌性大鼠低于肾上腺切除的雄性大鼠,提示雌性大鼠骨质疏松的骨力学状态弱于雄性。卵巢切除组弯曲韧性系数低于正常组和肾上腺切除组进一步证实了上述观点。肾上腺切除组弯曲韧性系数高于正常组和卵巢切除组,卵巢切除组弯曲韧性系数低于正常组和肾上腺切除组。肾上腺切除的雄性大鼠组的生物力学结果中出现了看似矛盾的结果,弯曲弹性模量降低提示骨骼综合力学功能降低,弯曲刚性系数随之降低提示骨骼抗应力降低是符合逻辑的。然而弯曲韧性系数高于正常组似乎是矛盾的。其解释应该是雄性动物骨质疏松性生物力学综合指标降低,抗应力强度减弱是与其他模型骨质疏松相同的。而肾上腺切除的雄性大鼠骨强度低下是以骨刚性力度显著下降以

及骨塑性韧度相对下降偏小的偏韧性结构状态。

综上所述,不同性别不同手术方式均可获得骨质疏松的结果,证实下丘脑内分泌环对骨代谢的影响力有共通之处;不同性别骨质疏松生物力学特点有所差异,雄性动物骨质疏松性骨强度低下是以骨刚性力度显著下降以及骨塑性韧度相对下降偏小的偏韧性结构状态;雌性动物骨质疏松性骨强度低下是以矿物质减少为主造成骨量减少、骨刚性力度显著下降以及骨塑性韧度同样下降的刚性和韧性均差的结构状态。由此认为,雌性动物骨质疏松过程中不仅是骨矿物质减少造成骨力学强度下降,而且骨胶原蛋白丢失亦很明显,造成骨塑性韧度同样下降的刚性和韧性均差的结构状态。所以,在骨质疏松病理过程中,雌性较雄性更容易发生骨折。

【参 考 文 献】

- [1] 段王平,张民,李刚等. 实验性骨质疏松对骨缺损自然愈合的影响. 中国骨质疏松杂志,2008,14(2):80-85.
- [2] Eric S Orwoll, Lynn M Marshall, Carrie M Nielson, et al. Finite Element Analysis of the Proximal Femur and Hip Fracture Risk in Older Men. J Bone Miner Res, 2009, 24:475-483.
- [3] 史念珂,雪原,马中书. 对大鼠骨组织影响中国骨质疏松杂志肾上腺功能低下及补充肾上腺皮质激素. 2008, (14) 1:23-27.
- [4] Björn Busse, Michael Hahn, Markus Soltan, et al. Increased calcium content and in homogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis: Mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae. Bone, 2009, 45:1034-1043.
- [5] 马洪顺,陆有,王晓晨. 骨质疏松对骨生物力学性质影响实验研究. 中国生物医学工程学报, 2003, 22(4):364-369.
- [6] 唐海,陈浩. 骨质疏松的生物力学研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(4):544-549.
- [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] 谢斌,陈允震,刘海春. 骨胶原在骨质疏松中的作用. 中国老年学杂志, 2009, 29(16):2057-2059.
- [9] Brianne M, Mulvihill A, Patrick J. Mechanobiological regulation of the remodelling cycle in trabecular bone and possible biomechanical pathways for osteoporosis. Clinical Biomechanics, 2010, 25(5):491-498.
- [10] Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": A proposal. The Anatomical Record, 2005, 219(1):1-9.

(收稿日期:2010-06-12)