

EDTA-Na₂ 脱钙模拟骨质疏松及打孔对骨密度的变化影响

程自申 张智海 刘莉 尹磊 李鹏 王岩 肖嵩华 张永刚 张雪松 毛克亚

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)04-0296-04

摘要: **目的** 观察利用乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA-Na₂)椎体脱钙骨密度的变化,以及打孔对椎体骨密度的影响,探讨一种制作骨质疏松模型的方法。**方法** 取98个新鲜猪单胸腰椎椎体,随机分成14小组,每组7个标本,1~7组全部经椎弓根打孔,记A大组,8~14组不行椎弓根打孔,记为B大组,然后把所有标本浸入0.4916mmol/L的EDTA-Na₂脱钙液体中,分别在0、5、7、9、11、13、15天取出A大组与B大组各一小组行骨密度测试及每小组取一个标本大体剖开。观察脱钙时间与A、B两组骨密度变化及两组差异关系。**结果** A、B随着脱钙时间的延长,大体观察可见各组标本骨小梁逐渐变细、间隙增宽,骨密度检测结果显示逐渐减低,并且各组脱钙前后骨密度变化均有明显的差异性($P=0.0000$)。A与B大组在骨密度的变化无明显的差异($P>0.05$)。**结论** 采用0.4916mmol/L EDTA-Na₂脱钙0~15天可模拟轻、中、重度骨质疏松,打孔对骨密度变化并没有影响。

关键词: 骨质疏松; EDTA-Na₂; 原位脱钙; 骨密度

Effect of EDTA-Na₂ decalcification to simulate osteoporosis and drilling on the alteration of bone mineral density CHENG Zishen, ZHANG Zhihai, LIU Li, et al. Department of Orthopedics, PLA General Hospital Beijing 100853, China

Corresponding author: MAO Keya, Email: maokeya@sina.com

Abstract: Objective To observe the alteration of bone mineral density (BMD) of the vertebra body using ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA-Na₂) decalcification, and the effect of drilling on BMD of the vertebra body. **Methods** Ninety-eight single fresh porcine thoracic or lumbar vertebral bodies were randomly divided into 14 groups, with 7 specimens in each group. The specimens in group 1-7 were drilled two holes in the vertebral pedicle, marked Group A. The specimens in group 8-14 were not drilled, marked Group B. All the specimens were dipped in 0.4916mmol/L of EDTA-Na₂ decalcification solution. One specimen in every group of Group A and B were collected for BMD examination and for sectioning, on day 0, 5, 7, 9, 11, 13, and 15, respectively. The relationship between the alteration of BMD and the decalcification time in Group A and B group was observed. **Results** Following the extension of decalcification time, gross observation showed that the trabecular bone was getting thinner, and the gap was getting wider in all specimens of both Group A and B. BMD testing showed that BMD appeared a trend of gradual reduction in all specimens, and the alteration of BMD in specimens of each group was significant ($P=0.0000$) before and after the decalcification. The alteration of BMD between Group A and B was not significant ($P>0.05$). **Conclusion** Decalcification using 0.4916mmol/L EDTA-Na₂ could simulate minor, moderate, and severe osteoporosis. No effect of drilling on BMD was found.

Key words: Osteoporotic; EDTA-Na₂; Demineralized bone in situ; Bone mineral density

基金项目: 国家自然科学基金(编号:39670731); 国家863计划(编号:2009AA02Z405); 国家自然科学基金(编号:50830102)

作者单位: 100853 北京,解放军总医院骨科(程自申、李鹏、王岩、肖嵩华、张永刚、张雪松); 北京航空工业中心医院脊柱外科(张智海); 河北保定第一中心医院妇产科(刘莉); 河北保定解放军252医院神经外科(尹磊)

通讯作者: 毛克亚, Email: maokeya@sina.com

随着人口寿命的延长及老龄化社会的到来,老年人骨质疏松发病率越来越高,目前全球有2亿骨质疏松患者。根据世界卫生组织(WHO)的标准,美国国家健康和营养调查结果表明,骨质疏松严重影响老年人生活质量,50岁以上人群中,1/2的女性、1/5的男性在他们的一生中都会出现骨质疏松性骨折,一旦患者经历了第一次骨质疏松性骨折,继发性骨折的危险明显加大。该病的防治已经成为一个迫切需要解决的问题,随着对骨质疏松的研究逐步深入,骨质疏松的模型也得到广泛应用。目前骨质疏松模型的建立有多种方法如去势法^[1],糖皮质激素^[2]等,但动物的购买、饲养、药物、手术费用投入较大,而且动物的数量有限,差异性,重复性差。短期内制备脱钙骨质疏松体外模型国内张智海等^[3]曾有描述,其用椎弓根钻孔并EDTA-Na₂脱钙的方法达到骨质疏松的目的,但没有阐明骨密度随时间的变化及椎弓根钻孔对椎体骨密度的影响,本研究的目的正是研究脱钙时间与骨密度的变化及椎弓根钻孔对骨密度变化的影响,探讨骨质疏松模型的快速制作的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 收集新鲜雄性成年猪(体重120~140 kg,平均128 kg,均为同一天屠宰)胸腰段椎体(T₁₄-L₂)分解为98个单椎体,透视下无骨缺损、畸形,除去肋骨头、椎肌肉,保留横突(1mm)、棘突、肌间韧带和纵韧带的完整性,大量清水冲洗后备用。随机分A、B两组。

1.1.2 双能X线吸收骨密度仪(NORLAND XR-36,美国制造)、直径4.5mm的钻头。

1.1.3 化学药品包括EDTA-Na₂(二乙胺四乙酸的二钠,国产分析纯,分子量372.24)、氢氧化钠(国产分析纯,分子量为40)、10%甲醛溶液等。配制成0.4916mmol/L的EDTA-Na₂溶液(称取EDTA-Na₂ 183g与NaOH 20g加入约800ml的蒸馏水中剧烈搅拌至完全溶解,定容至1000ml,此时PH值≈7)。

1.2 实验方法

1.2.1 以A组49个标本的中间椎体横突上缘松质骨处为钻点,用直径为4.5mm的手摇钻头,水平面与椎体纵轴方向垂直,矢状面与棘突方向呈45度的夹角,两钻孔约在离椎体前缘中前1/3相通。然后把A、B两组个标本浸泡入配制好的10%甲醛溶液中24 h,以防止腐败。

万方数据

1.2.2 A、B两大组标本的前后位测量骨密度后,在室温下浸入5L的0.4916mmol/L EDTA-Na₂溶液中(每日更换EDTA-Na₂溶液,保持每一标本所占有的EDTA-Na₂溶液一致),每日早晚各一次用50ml注射器向钻孔内注射新配置的0.4916mmol/L的EDTA-Na₂溶液,溶液从另一孔中出来,及用新配置的0.4916mmol/L的EDTA-Na₂冲洗两组椎体标本,分别在5天、7天、9天、11天、13天、15天随机取出A、B两大组中的任意一小组行骨密度测试,所有标本都采用统一的前后位,且为同一操作员操作,保持相同的温度、体积和脱钙溶液的浓度。且每小组在不同时间取一标本,纵行切开,行大体标本观察。

1.2.3 统计方法:使用SPASS 13.0进行统计分析,数据采用均数±标准差表示,两两比较采用非配对t检验,组间比较采用单因素方差分析;P<0.05表示显著性差异。

2 结果

2.1 脱钙时间与骨密度变化的关系

为消除各标本的个体差异性,脱钙前均行骨密度测试,观察骨密度的变化,以骨密度的减少的百分数为观察指标,结果显示随脱钙时间的延长A、B大组骨密度迅速降低,骨密度的变化与脱钙时间呈正相关,见图1、2。

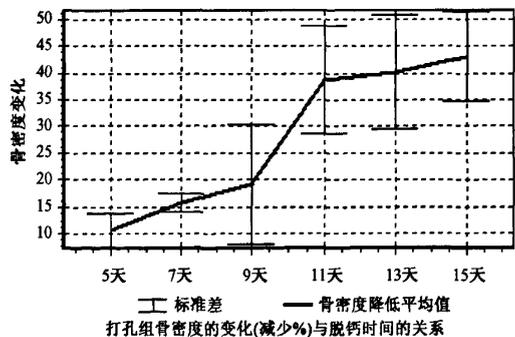


图1 打孔组骨密度的变化(减少%)与脱钙时间的关系

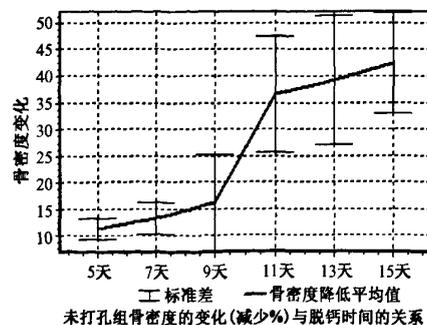


图2 未打孔组骨密度的变化(减少%)与脱钙时间的关系

2.2 相同脱钙时间骨密度变化

在不同的时间内 A、B 两组 $P > 0.05$ 显示 A、B 两组在相同的脱钙时间内骨密度降低无明显的差异性,见表 1。

表 1 A、B 两组相同的脱钙时间骨密度变化比较

脱钙时间	A 组骨密度降低 (%)	B 组骨密度降低 (%)	P 值
5 天	10.629 ± 3.138	11.451 ± 1.963	0.5676
7 天	15.843 ± 1.613	13.257 ± 2.804	0.0561
9 天	19.229 ± 11.103	16.226 ± 9.026	0.5889
11 天	38.814 ± 9.911	36.716 ± 10.859	0.7123
13 天	40.171 ± 10.622	39.171 ± 12.219	0.8729
15 天	43.171 ± 8.148	42.497 ± 9.403	0.9130

2.3 大体标本观察比较

A、B 2 组脱钙前与脱钙 13 天,骨小梁间距明显增大,钻孔明显扩大。

2.4 A、B 两组脱钙程度分布

可见 A、B 两组脱钙程度大小分布基本类似,椎体中部脱钙明显,终板及小关节处相对较轻。

3 讨论

活体动物的骨质疏松的动物模型主要用于研究骨质疏松的机制及药物作用,而活体动物的模型的制作周期长,可重复性差,费用高,限制了其在大规模的试验。动物标本体外骨质疏松的模型牛标本已有报道^[5],张智海等^[3]报道了猪作为制作骨质疏松的体外模型,本研究选取猪脊柱作为研究对象基于其来源广泛、标本的均一性好,另外所选猪脊柱的骨密度为 $1.249 \pm 0.121 \text{g/cm}^2$ 与人体脊柱的骨密度相近。短期内制作一种骨质疏松的体外模型有硝酸法、双氧水法。但硝酸法把椎体置入一个酸性的环境中对骨质破坏较大,双氧水法只是改变骨质的弹性模量^[4], $0.4916 \text{mmol/L EDTA-Na}_2$ 为一相对中性的环境,改变骨密度的程度是可控的。

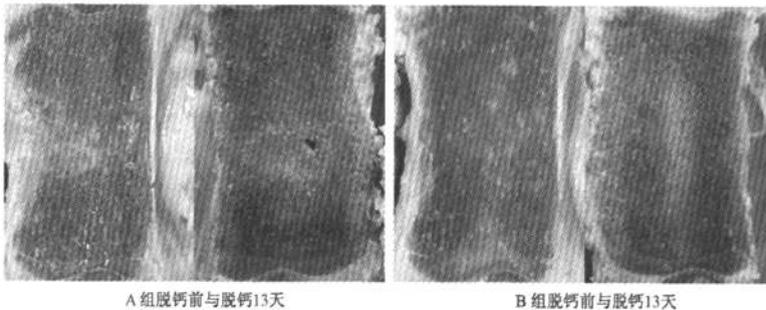


图 3 A、B 两组大体标本观察

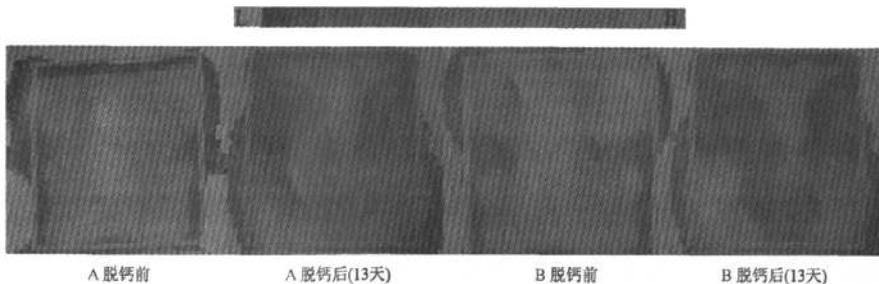


图 4 A、B 两组脱钙程度分布

一般认为椎体骨部分由有机部分、无机部分及水组成,其中有机部分主要是胶原纤维,其周围为无机部分的羟基磷灰石^[6,7],由大量的钙和磷组成,而其中的钙和其他的矿物质可以被 EDTA-Na_2 所螯合,使钙游离达到脱钙物质的目的,从而成功制作骨质疏松的模型的。其骨质疏松的程度与脱钙的时间

呈正相关,根据需要可以复制出轻-中-重不同程度的骨质疏松的模型,即经过 0 ~ 15 天的脱钙可以使骨密度降低约 10% ~ 40%。在本研究中脱钙 5 ~ 9 天骨密度变化相对缓慢,9 ~ 11 天变化较快而 11 ~ 15 天又趋于缓慢,推测 EDTA-Na_2 脱钙的过程中有一阈值,这时骨质中的矿物质大量被 EDTA-Na_2 所

整合游离,之后因矿物质剩余较少所以骨密度变化又趋于缓慢。大体标本观察 A、B 两组经过脱钙骨小梁的间距增大,这与骨质疏松相符。

原发性骨质疏松为一种骨量减少、骨微观结构退化为特征、致使脆性增加而发生骨折的一种全身性骨骼疾病^[8]。本试验采用脱矿的方法使钙磷分离,骨小梁变细,间距增大,骨量减少,达到骨质疏松的目的。骨质疏松的诊断标准采用目前世界卫生组织诊断骨质疏松的所推荐的基于双能 X 线骨密度仪测量髌及腰椎部位的骨密度。其诊断标准为当骨量丢失 2.5SD 诊断骨质疏松,丢失 2.5SD 并发生一处或多处骨折时为严重的骨质疏松,此时骨量丢失大约为 30%,结合本实验经过 10 左右的脱钙可使骨密度降低约 30%,这样在较短的时间就可以制作重度的骨质疏松的标本,制作时间较短。

在脱钙程度的分布椎体骨密度普遍降低,在椎体中部骨密度降低较大,而小关节处骨密度降低不大,这与小关节处 EDTA-Na₂ 渗透有关,而椎体中央及上终板处的骨密度变化不大这与脱钙液的渗透有关。

在标本的制作上,经椎弓根钻孔虽对椎体有部分破坏,但在改变骨密度与未钻孔组并没有区别,两组在改变骨密度的变化趋势大致相同 ($P > 0.05$),可能把 A、B 大组标本侵入 EDTA-Na₂ 的溶液中,通过骨小梁间隙,椎体的各个部分都能得到很好的渗透,但因猪的椎体前缘有个骨嵴,此与人体椎体结构不同,钻孔的目的是为了使椎体前缘有一个薄弱的力量,这样易形成压缩性骨质疏松骨折模型,并在此基础上的相关研究。

4 结论

0.4916mmol/L EDTA-Na₂ 对椎体脱钙模拟骨质疏松模型是一种简单、快速、可重复性高的方法,证明了通过椎弓根钻孔并没有对骨密度的变化并没有影响,但其生物力学性质及病理有待进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Erben RC, Eberle J, Stahr K, et al. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 1085-1098.
- [2] Reid IR. Glucocorticoid osteoporosis-mechanisms and management. *Eur J Endocrinol*, 1997, 137:209-217.
- [3] 张智海,沈建雄,吴志宏,等. 快速制备骨质疏松性椎体压缩性骨折的动物模型研究. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11(1): 19-21.
- [4] 罗卓荆,胡蕴玉,王茜. H₂O₂ 浸渍对牛松质骨力学特性的影响. *Chin J Orthop*, 1997, 17(11): 714-717.
- [5] Atilla Akbay, Gokhan Bozkurt, Ozgur okhan Bozkur II gaz, et al. Benzel A demineralized calf vertebra model as an alternative to classic osteoporotic vertebra models for pedicle screw pullout studies. *Eur spine J*, 2008, 17:468-473.
- [6] Faibish D, Ott SM, Boskey AL. Mineral changes in osteoporosis: a review. *Clin orthop Relat Res*, 2006, 443: 28-38.
- [7] Turner AS. Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. *Eur Cell Mater*, 2001, 22(1): 66-81.
- [8] NIH Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. NIH consensus statements, 2000, 17: 1-45.

(收稿日期: 2010-11-15)

EDTA-Na₂脱钙模拟骨质疏松及打孔对骨密度的变化影响

作者: 程自申, 张智海, 刘莉, 尹磊, 李鹏, 王岩, 肖嵩华, 张永刚, 张雪松, 毛克亚
作者单位: 程自申, 李鹏, 王岩, 肖嵩华, 张永刚, 张雪松, 毛克亚(解放军总医院骨科, 北京, 100853), 张智海(北京航空工业中心医院脊柱外科), 刘莉(河北保定第一中心医院妇产科), 尹磊(河北保定解放军252医院神经外科)
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS
年, 卷(期): 2011, 17(4)

参考文献(8条)

1. NIH Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy 2000
2. Turner AS Animal models of osteoporosis—necessity and limitations 2001(01)
3. Faibish D;Ott SM;Boskey AL Mineral changes in osteoporosis:a review 2006
4. Atila Akbay;Cokhan Bozkurt;Ozgur okhan Bozkur H gaz Benzel A demineralized calf vertebra model as an alternative to classic osteoporotic vertebra models for pedicle screw pullout studies 2008
5. 罗卓荆;胡蕴玉;王茜 H2O2浸渍对牛松质骨力学特性的影响 1997(11)
6. 张智海;沈建雄;吴志宏 快速制备骨质疏松性椎体压缩性骨折的动物模型研究 2005(01)
7. Reid IR Glucocorticoid osteoporosis—mechanisms and management[外文期刊] 1997
8. Erben RC;Eberle J;Stahr K Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats:a sequential histomorphometric study[外文期刊] 2000(6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201104003.aspx