# 论著・

# 肋骨内外侧骨细胞密度的比较

刘恒 曹永平 孟志超 王瑞 杨昕 刘超 单鹏程 Tasuku Mashiba Satoshi Mori

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)03-0214-05 摘要:目的 比较不同应力类型对骨皮质骨细胞密度大小的影响。方法 选取成年猎犬 10 只,处死 后取左侧第九肋骨标本垂直切片,观察并测量肋骨内外侧骨皮质中骨单位面积、哈佛氏管面积、骨细 胞数量,进行统计学比较。结果 肋骨外侧骨单位面积小于内侧,哈佛氏管面积差异没有意义。而肋 骨外侧骨细胞密度大于内侧。结论 皮质骨骨单位面积大小及骨细胞密度可能与应力类型有关。应 力类型的不同可能通过作为力学感受器的骨细胞的调节骨转换率的作用最终实现骨细胞密度的不同。

关键词:应力类型;骨转换;骨细胞密度

**Comparison of the osteocyte distribution between internal and external side of the rib** LIU Heng, CAO Yongping, MENG Zhichao, et al. Department of Orthopedics, The First Hospital of Peking University, 100034, China

Corresponding author: CAO Yongping, Email: caoyongping2010@ sohu. com

Abstract: Objective To compare the effect of different strain on the osteocyte distribution in the cortical bone. Methods Ten adult beagles were selected. Their left 9th ribs were excised to make vertical slices after death. Bone unit area, Haversian canal area, and the number of the osteocyte in the internal and external sides of ribs were observed and measured. And the results were analyzed statistically. **Results** The bone unit area in the external side of the rib was lower than that in the internal side. The difference of Haversian canal area between the internal and external side of the rib was not statistically significant. The osteocyte density in the external side was statistically higher than that in the internal side. **Conclusion** The bone unit area and osteocyte density may be related to the type of strain. The different strain type may function through regulating the bone remodeling of the osteocyte as mechanical sensor to lead to the difference of osteocyte density.

Key words: Strain mode; Bone remodeling; Osteocyte density

骨细胞由激活的成骨细胞演变而来,是骨基质 内唯一的细胞,占骨组织功能细胞总数的95%左 右。骨细胞被包藏在陷窝(lacunae)内。骨细胞不 进行分裂,每一个陷窝内只有一个骨细胞。骨组织 中,骨细胞陷窝和骨小管形成一个无处不在的三维 立体结构。骨细胞树状突的末端通过间隙连接(gap junction)在骨小管内与其他细胞(骨细胞或衬里细 胞)树状突的末端形成细胞间连接而传递信号指 令。这些树状突表面有许多随液体流而摆动的刷状 微丝,可以感受骨小管内因骨组织受力变形而改变 的电场和细胞外液的流速等。骨小管的直径约 0.01μm,骨骼任何部位受外力后产生的微小形变都

通讯作者: 曹永平, Email: caoyongping2010@ sohu. com

可使骨小管液流动,进而产生剪切应力和流动电压, 作用于骨细胞树状突表面的刷状微丝使其产生电位 变化或激活其表面的感受器,进而使骨细胞内发生 一连串的生物学反应,传递到骨表面的衬里细胞,使 其分泌相关因子,进而激活骨重建,通过修复缺损或 自我调整来适应新的力学环境。因此,骨细胞被认 为具有生物力学感受器的功能。

尽管目前骨细胞的功能并未被完全揭示,但多 项研究提示它可能在骨重建中起着重要的调节作 用<sup>[1]</sup>。并且,这一调节可能是通过骨细胞的力学感 受器的特性实现的。有学者<sup>[25]</sup>提出假说:骨细胞在 受到应力刺激的情况下调节基础多细胞单位(basic multicellular units,BMUs)和骨细胞的前体细胞 – 成 骨细胞的募集。

肋骨是动物体参与呼吸运动的重要骨骼之一。

作者单位: 100034 北京,北京大学第一医院骨科

在一个呼吸周期中,吸气相时膈肌和肋间肌主动性 收缩,胸廓扩张,胸腔内负压增大,外界气体进入肺 泡内。这是一个主动做功的过程。呼气相时,膈肌 及肋间肌松弛,胸廓依靠弹性回缩,肺泡内气体排出 体外。这是一个非主动做功的过程。因此,正常呼 吸运动时肋骨内外侧所受的应力,主要都是在吸气 相中呼吸肌主动收缩产生的非负重性应力(nonweight-bearing mechanical load)。肋骨外表面主要受 呼吸肌的拉应力,而内表面主要受呼吸肌的张应力。 本实验试图研究在这种不同的受力情况下肋骨内外 侧骨皮质骨细胞密度的区别并探讨其相关影响 因素。

# 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和分组

成年猎犬 10 只(雌雄各5只),体重在9~ 13Kg, 犬龄4岁, 饲养于标准动物间温度(26± 4) ℃, 湿度(75 ± 25)%, 12h 进行昼夜交替, 动物可 自由饮水,饲以标准干性犬饲料)。动物处死后取 第九肋骨进行评估。

#### 1.2 非脱钙骨磨片的制备

剔除肋骨软组织后在 70% 的乙醇中固定 72h, 用 Villanueva 法进行大块标本染色 2 周, 然后逐级 脱水,整段肋骨在丙酮中脱脂后包埋在甲基丙稀酸 甲脂中。将包埋好的标本用切片机直接切片 (SP1600,德国莱卡公司),注意保持切锯与哈佛氏 管的走向垂直。切片厚约 150µm,然后用磨片机将 切片磨至 50µm 以备进行组织学测量。

#### 1.3 组织学测量

用带有数字摄像系统的显微镜,在40倍放大率 下从非脱钙骨磨片上采集图像,该系统装有图像处 理软件 Image-Pro Plus (Version 4.0011, Media Cybermetics. Inc., USA)。利用 Adobe Photoshop (Version 6.0, Adobe, USA) 分别选取数字化图像上 肋骨内侧和外侧成骨的骨单位(正在进行骨改建的 骨单位除外)。每例标本选取肋骨内外侧各 20 个 骨单位并对骨单位的面积、哈佛氏管面积、骨单位内 骨陷窝数量进行测量,并以骨陷窝数目代表骨细胞 数目,计算出骨细胞密度(骨细胞数目/骨单位面 积 - 哈佛氏管面积)。



# 图1 选取的肋骨内(A)外(B)侧骨单位图像

#### 1.4 统计分析

利用 SPSS17.0 软件进行肋骨内外侧各组样本 均值并进行成对样本 t 检验。P < 0.05 认为有显著 统计学差异。

	肋骨内侧	肋骨外侧	统计结果	
骨单位面积(mm <sup>2</sup> )	18329. 87 ± 2900. 48	13589. 82 ± 2006. 80	P < 0.05	
哈佛氏管面积(mm <sup>2</sup> )	390. 24 ± 90. 93	341. 19 ± 66. 09	P > 0.05	
骨细胞密度(mm <sup>-2</sup> )	$0.06 \pm 0.0070$	$0.12 \pm 0.02$	P < 0.05	

表1 肋骨内外侧骨单位面积、哈佛氏管面积、骨细胞密度比较

注:骨单位面积(单位:mm<sup>2</sup>),哈佛氏管面积(单位:mm<sup>2</sup>),骨细胞密度(单位:mm<sup>-2</sup>)

#### 2 结果

肋骨外侧的骨单位的面积均值是 13589.82 ± 2006.80mm<sup>2</sup>;内侧骨单位面积均值是 18329.87 ± 2900.48 mm<sup>2</sup>。内侧骨单位面积较外侧大,差存在 显著统计学差异(P=0.003)。肋骨外侧的哈佛氏 管的面积均值是 341.19 ± 66.09 mm<sup>2</sup>;内侧哈佛氏 管的面积均值是 390. 24 ± 90. 93 mm<sup>2</sup>。二者之间不 存在显著统计学差异(P=0.25)。肋骨外侧骨细 胞密度的均值是 0.12 ± 0.02 mm<sup>-2</sup>; 内侧骨细胞密 度的均值是 0.06 ± 0.0070 mm<sup>-2</sup>。外侧骨细胞密度 较内侧大,差存在显著统计学差异(P<0.01)。

215

万方数据



# 3 讨论

成骨细胞被包埋于骨基质逐渐成为骨细胞被认 为是骨细胞本身及骨前体细胞参与的一个可调控性 极强的过程。因此,任何对骨(前体)细胞的影响也 万方数据 极有可能导致骨细胞形态及数目的改变。Marotti 等<sup>[6,7]</sup>提出成骨细胞向骨细胞分化受到已经形成的 成骨细胞自身的负反馈调节。此假说又被 Martin<sup>[8]</sup> 进一步发展成为:在静息的骨表面,骨细胞的抑制性 信号作用在衬里细胞上,有效的抑制这些细胞开启 骨重建过程。因此,骨骼上有高骨重建率的区域就 会有比较低的骨细胞密度,因为较低活性的骨细胞 可降低对骨重建的抑制。

虽然上述假说的机制未被完全揭示,但学者都 认为这与骨细胞对应力刺激的反应有密切关系。一 系列试验表明在应力的刺激下,骨细胞会产生许多. 影响骨转换的因子<sup>[9,4]</sup>。Mullender et al<sup>[1,10]</sup>的试验 表明小梁骨的形成模式受机械刺激的影响可部分解 释为骨细胞在调节骨转换的过程中充当了一种应力 敏感细胞的角色。同时,他们发现降低骨细胞对机 械应力的敏感性会导致类似于废用性的骨量丢失。 Terai 等<sup>[11]</sup>最近的一项研究指出骨细胞表达骨特殊 蛋白 (bone-specific protein)、骨桥蛋白 (osteopontin),而此两种蛋白正是在机械应力刺激 下骨细胞调节骨重建的触发点。Power<sup>[12]</sup>研究示: 骨折标本中的正在形成的骨单位和正在吸收的骨单 位上骨细胞密度显著高于对照组。此升高可解释为 骨折的骨骼中有更多成骨细胞的参与,也即表明修 复处有更多的骨细胞。同样, Mullender 一项研 究<sup>[13]</sup>显示骨质疏松的骨骼标本中的骨细胞密度也 较对照组高。可见,骨细胞密度和区域内骨转化率 是密切相关的,骨转化率低的区域骨细胞密度相对 较高;而转化率高的区域则骨细胞密度相对较低。 且骨骼所受应力的刺激极有可能参与了对骨转化率 的调控。

本实验进一步研究骨骼所受应力种类(strain mode)的不同对骨皮质骨单位面积及骨细胞密度的 影响。Lanyon<sup>[14,15]</sup>以羊的桡骨为研究对象,认为羊 在行走过程中其桡骨近端主要受张应力,而其远端 主要受压应力。尽管在此模型中桡骨两侧除受力类 型不同外,受力大小也不相同(行走中桡骨远端受 力大小约为近端的1.6倍,而受力峰值远端也是近 端的1.8倍),但通过检测两处的骨转换指标发现 二者确实存在显著性差异。在 René<sup>[16]</sup>对跟骨背 侧、跖侧骨单位的研究中,由于背侧压应力大小显著 大于内侧的张应力,所以研究者尽可能地选取了背 侧皮质最外侧和跖侧皮质最内侧的骨单位进行比 较,以尽量避免应力大小的不同,而突出应力类型即 压力和张力之间的差异。其结果也显示出不同受力 类型下骨单位大小及形态的差异。

本实验中以正常的呼吸过程中肋骨内外侧受力 为干预因素。由于解剖结构不同,肋骨内侧主要受 张应力,肋骨外侧主要受压应力。肋骨作为非承重 骨,其承受的应力较桡骨或跟骨更小,内外侧骨皮质 受力大小的差异更小。且本试验选择内外侧皮质全 层的骨单位进行测量后取平均值。因此,本试验减 少了骨皮质受力大小不同对实验结果造成的影响, 突出骨皮质受力种类不同对骨单位大小及骨细胞密 度的影响。

骨骼受不同应力刺激产生的微小形变使骨小管 液流动,进而产生剪切应力和流动电压,作用于作为 力学感受器的骨细胞突起表面的刷状微丝,使其产 生电位变化或激活其表面的感受器,进而使骨细胞 内发生一连串的生物化学反应,并通过骨表面的衬 里细胞的信号传递激活骨重建。通过本实验结果我 们推测,在不同应力刺激中,压应力刺激导致相对较 低的骨转换率使得肋骨外侧具有更高的骨细胞密 度;张应力刺激导致相对较高的骨转换率使得肋骨 内侧具有更低的骨细胞密度。

骨单位的形成过程是破骨细胞的截锥(cutting cone) 先在骨皮质中切割出孔道, 然后由成骨细胞的 闭合锥(closing cone)以新生骨对孔道进行围绕中 心管的环形填充[17]。换言之,骨单位的大小是在破 骨细胞的截锥形成孔道时即被决定,而成骨细胞的 功能只决定此孔道被填充的速度及程度。因此,骨 单位的大小实际上主要是受破骨细胞活性的直接调 节。肋骨外侧的骨单位显著小于内侧,提示在外侧 皮质中,破骨细胞形成的截锥横截面积较小,破骨细 胞的活性被抑制。这一现象可能提示着在不同应力 类型所引起的骨基质形变或细胞外液流动剪切力的 变化中,受力类型的不同导致了骨转换率的不同,也 导致调节基础多细胞单位——成骨细胞和破骨细胞 功能的程度不同。同样的,受压应力的肋骨外侧有 更低的骨转换率和更低的破骨细胞的活性,形成了 较小的截锥面积,其骨单位二维形态较小;受张应力 的肋骨内侧有更高的骨转换率和更高的破骨细胞的 活性,形成了较大的截锥面积,其骨单位二维形态较 大。

但是本实验只进行了静息骨单位骨细胞密度的 测量,没有对正在形成的骨单位和正在吸收的骨单 位进行测量,也未加以药物干预骨转换率,故无法得 出骨细胞密度与骨转换更细致的联系,也无法肯定 骨细胞本身对骨转化有确切的抑制作用。Power<sup>[12]</sup> 万方数据 研究显示,骨单位无论是正在进行再吸收或是已经 完成再吸收,它们的骨细胞密度都高于不活动的骨 单位。这一结果则挑战了多数学者所拥护的骨细胞 是负向调节骨转换的观点。骨细胞对骨转换是否具 有双向调节作用以及这种作用与应力类型的关系可 能还需要进一步的研究。本实验中对肋骨内外侧应 力分别设定为"张力"和"压力"可能并不十分严格, 因为在呼吸运动的复杂过程中,肋骨承受的应力可 能还有剪切力的参与。同时内外侧应力的大小并不 完全相等,但肋骨承受应力较承重骨明显小,且经过 对全层皮质的骨单位进行取样测量取平均值后,我. 们认为可以近似忽略内外侧应力大小的差异,而将 内外侧骨细胞密度的差异主要归因于应力种类的不 同。本试验设定由骨陷窝数目代表骨细胞数目有一 定局限性,无法确知骨细胞存活情况。可在下一步 试验中进一步明确。

通过本实验我们认为:犬的肋骨内外侧骨皮质 的骨单位面积及骨细胞密度有显著性差异。外侧骨 皮质骨细胞密度显著大于内侧骨皮质骨细胞密度。 这一结果可能是由于在长期的呼吸运动过程中肋骨 内外侧所受应力类型不同而导致的。应力类型的不 同可能通过作为力学感受器的骨细胞的调节骨转换 率的作用而最终实现骨细胞密度的不同。受压应力 的皮质骨转换率较低,骨单位面积较小,骨细胞密度 较大;受张应力的皮质骨转换率较高,骨单位面积较 大,骨细胞密度较小。

#### 【参考文献】

- [1] Mullender M G, Huiskes R A. A proposal for the regulatory mechanism of Wolff's law. J Orthopaed Res, 1995, 13:503-512.
- [2] Aarden E M, Burger E H, Nijweide P J. Function of osteocytes in bone. J Cell Biochem, 1994, 55:287-299.
- [3] Cowin S C, Moss-Salentijn L, Moss, et al. Candidates for the mechanonsensory system in bone. J Biomech Eng, 1991, 113:191-197.
- [4] Lanyon, L. E. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. J Calcif Tissue Int 1993,53 (suppl. 1); s102-s106.
- [5] Marotti, G., Cane. V., Palazzini, S., et al. Structure-function relationships in the osteocyte. J Itel J Miner Electrolyte Metab, 1990,4:93-106.
- [6] Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. Ita J Anat Embryol, 1996, 101:25-79.
- [7] Marotti G, Ferretti M, Muglia M A, et al. A quantitive evaluation of osteoblast-osteocyte relationships on growing endosteal surface of rabbit tibi. Bone, 1990, 13:363-368.
- [8] Martin R. B. Towards a unifying theory of bone remodeling. Bone, 2000,26:1-6.

- [9] Klein-Nulend J, Van der Plas A, Semins C M, et al. Sensitivity of soteocytes to biomechanical stress in vitro. J FASEB J, 1995, 9: 441-445.
- [10] Mullender M G, Huiskes R, Weinans, H. A physiological approach to he stimulation of bone remodeling as a self-organizational control process. J Biomech, 1994, 27:1389-1394.
- [11] Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, et al. Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. J Bone Miner Res, 1999, 14:839-849.
- [12] J Power, N Loveridge, N Rushton et, al. Osteocyte density in aging subjects is enhanced in one adjacent to remodeling haversian systems. J Bone, 2002, 30:859-865.
- [13] Mullender M G, Meer D D, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density

changes in ageing and osteoporosis. Bone, 1996, 18:109-113.

- [14] Lanyon L E, Goodship A E, Pyec C J. et al. Mechanically adaptive bone remodelling. Journal of Biomechanics, 1982, 15 (3): 141-154.
- [15] Lanyon L E, Magee P T, Baggott D G. The relationship of functional stress and strain to the processes of bone remodeling. J Journal of Biomechanics, 1979, 12(8):593-600.
- [16] René F M van Oers, Ronald Ruimerman, Bert van Rietbergen. Relating osteon diameter to strain, Bone 43 (2008) 476-482.
- [17] Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. J Cell Biochem, 1994;55:273-286.

(收稿日期: 2011-11-30) \*

# 肋骨内外侧骨细胞密度的比较



 作者:
 刘恒,曹永平,孟志超,王瑞,杨昕,刘超,单鹏程,TasukuMashiba,SatoshiMori

 作者单位:
 北京大学第一医院骨科,北京,100034

 刊名:
 中国骨质疏松杂志ISTIC

 英文刊名:
 Chinese Journal of Osteoporosis

 年,卷(期):
 2012,18(3)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\_zggzsszz201203006.aspx