

· 临床研究 ·

Micro-CT 动态观察骨质疏松骨折的愈合

王耀琴 彭江 睦翔 赵钧如 薛静 许文静 汪爱媛 卢世璧 覃秀桃

中图分类号: R580;R683 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013)03-0283-05

摘要: 目的 通过 Micro-CT 探讨骨质疏松大鼠股骨干骨折愈合过程中骨痂的体积、骨矿物密度、骨小梁结构等的动态变化规律。方法 将清洁级 4 月龄雌性 Wistar 大鼠 40 只, 体重 $300\text{ g} \pm 20\text{ g}$, 行双侧卵巢切除术 (OVX), 3 个月后形成骨质疏松模型。进行股骨干中段骨折造模, 髓内钉固定。骨折固定术后, 分别于术后 4 周, 6 周, 8 周, 12 周进行骨折端显微 CT 观察, 并进行骨结构和骨矿物密度 (BMD) 的定量分析。术后 12 周取材进行组织学观察。结果 骨质疏松大鼠骨折后 8 周骨折区骨痂总体积 (Total Volume, TV)、骨痂中高矿化组织出现下降趋势, 但无统计学差异。骨组织占骨痂总体积的比率 (Bone Volume Fraction, BVF) 随时间点有明显上升趋势, 且 12 周后显著大于 4 周。骨痂中总体矿物密度 (Bone Mineral Density, BMD), 12 周明显高于 4 周。矿化组织自身的密度 (Tissue Mineral Density, TMD), 12 周高于 4 周, 8 周于 6 周比较, 均有显著性差异。骨小梁厚度 (Tb. Th) 和骨小梁间隙 (Tb. SP), 12 周与 4 周、6 周比较均有显著性差异, 且 Tb. SP 在 12 周出现下降, 12 周时改建塑型基本完成。组织学观察显示, 术后 12 周, 骨折断端板层骨改建形成骨小梁, 恢复骨结构的完整性。结论 对于骨质疏松骨折大鼠早期, Micro-CT 分析显示骨痂数量因损伤而增加, 但软骨性骨痂至骨痂演变过程较慢。骨折后期, 矿化诱导新骨生成, 且骨折大鼠在 12 周基本完成矿化, 从而促进骨折修复。

关键词: 骨质疏松骨折; Micro-CT

Dynamic observation of osteoporotic fracture healing using micro-CT WANG Yaoqin, PENG Jiang, SUI Xiang, et al. Institute of Orthopedics, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Corresponding author: WANG Aiyuan, Email: wangaiyuan301@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the dynamic change of callus volume, bone mineral density (BMD), and trabecular bone structure during the healing of osteoporotic femoral shaft fractures in rat using micro-CT.

Methods A total of 40 4-month-old female Wistar rats, weighted $300 \pm 20\text{ g}$, received bilateral ovariectomy (OVX). The osteoporosis model was established after 3 months. The middle of the femoral shaft was fractured and intramedullarily nailed. Bone structure and BMD were observed on 4-, 6-, 8-, and 12-week using micro-CT after the operation. Histological observation was performed at the 12th week after the operation. **Results** The callus total volume (TV) and high-mineralized tissue in the callus declined at the 8th week, but there was no significant difference. Bone volume fraction (BVF) was in a upward trend, and BVF at the 12th week was significantly larger than that at the 4th week. BMD at the 12th week was significantly higher than that at the 4th week. The tissue mineral density (TMD) at the 12th week was higher than that at the 4th week. TMD of the 8th week was higher than that at the 6th week. Trabecular thickness (Tb. Th) and trabecular bone sepatium (Tb. SP) at the 12th week were significantly different compared to those at the 4th week and the 6th week. Tb. SP declined at the 12th week. The process of remodeling was basically completed at the 12th week. Histological observation showed that the lamellar bone of fracture fragments remodeled into trabecular bone and restored the integrity of the structure. **Conclusion** The micro-

基金项目: 国家自然科学基金 (30872633); 国家科技支撑计划 (2009BA187B02), 军队“十二五”重点项目 (BWS11J025), 国家重点基础研究发展计划 (2012CB518106)

作者单位: 100853 北京, 中国人民解放军总医院骨科研究所 (王耀琴、彭江、睦翔、赵钧如、薛静、许文静、汪爱媛、卢世璧); 030001 太原, 山西医科大学 (王耀琴、覃秀桃)

通讯作者: 汪爱媛, Email: wangaiyuan301@yahoo.com.cn

CT analysis reveals that the number of callus increases due to injury at early stage of osteoporotic fractures in rats. The changing of cartilage bone callus into bone callus is a slow evolutionary process. New bone formation is induced by mineralization at the later stage of fracture. The mineralization is basically completed at the 12th week, which contributes to the repair of the fracture.

Key words: Osteoporosis fracture; Micro-CT

骨质疏松是以骨组织显微结构受损,骨矿成分和骨基质等比例不断减少^[1],骨质变薄,骨小梁数量减少,骨脆性增加的一种人类最常见的代谢性骨病^[2]。但骨质疏松的病因至今尚未完全阐明^[3],而骨质疏松性骨折是一种随增龄而骨量减少、骨显微结构异常、骨脆性增加、仅因轻度暴力或非创伤因素导致的骨折,又称脆性骨折。传统方法对骨质疏松骨折等动物实验的研究都是通过骨形态计量手段——二维的骨切片显微技术进行的。断层扫描技术可以高分辨率地观察大鼠骨形态,但是只能提供二维图像^[4-6]。但受二维平面及生物标本非均匀性的影响,在实现骨“质”体素结构形态、密度分布、方向分布及功能力学特征等分析时会较为困难。

为了观察骨质疏松骨折不同时期骨愈合的过程,本研究采用 Micro-CT 方法对动物骨质疏松性骨折愈合过程中骨痂形成和改建规律进行超微分析。作者利用小动物活体显微 CT 连续观察骨质疏松大鼠股骨干骨折愈合过程中骨痂的体积、骨矿物密度、骨小梁结构等的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

清洁级雌性 Wistar 大鼠 40 只,解放军总医院动物实验中心提供(二级合格动物:军医动字 D98010),体重 300 ± 20 g,4 月龄,饲养于解放军总医院实验动物中心。

用于骨质疏松骨折后固定的 1.2mm 克氏针由北京华杰豪科技开发公司生产。GE Explore Locus 小动物活体显微 CT (System: RS-9, GE Healthcare, Ontario, Canada)。

1.2 方法

1.2.1 造模方法:4 月龄 Wistar 大鼠 43 只,用 10% 的水合氯醛溶液(中国人民解放军总医院,北京)按 0.3 ml/100 g 体重腹腔注射,麻醉大鼠。无菌条件下,腰背部作正中切口,游离切除双侧卵巢,缝合筋膜。术后肌内注射青霉素钠(华北制药股份有限公司,河北石家庄),缝合皮肤。

术后所有动物在同一条件下饲养,给予标准饲

料(含钙 1.66%,磷 1.24%),喂养 3 个月。术后 3 月随机 Micro-CT 检测证实去卵巢大鼠骨量明显减少。

大鼠骨折模型按照 Utvang 方法制备并加以改良^[7]单侧股骨干骨折模型的建立。OVX 术后 3 月,10% 的水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉,右股骨外侧切口,通过股外侧肌与腓绳肌间隙钝性分离,暴露外侧股骨干中段。小心保护骨膜,距离大转子 13 mm 用金刚砂轮切割钻将股骨干横向截骨。采用电钻将 1.2 mm 髓内钉固定于髓腔中心位置,术后肌内注射青霉素钠同前,缝合切口。

1.2.2 Micro-CT 扫描与测定:所有大鼠分别于骨折固定术后 4 周,6 周,8 周,12 周 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉后行活体 Micro-CT 检查。

将大鼠俯卧于检查床上,双下肢屈曲,保持大鼠股骨纵轴与 Micro-CT 检查床滑轨的移动轴平行,心电图监护下进行 Micro-CT 扫描,扫描分辨率为 47 μ m,单次扫描时间为 14 分钟。

对 Micro-CT 扫描的结果用标准体模块校准后,以骨折线为中心,沿股骨纵轴上下围绕骨痂周围各取 50 个扫描层面,共 100 个层面,建立三维兴趣区(ROI)。对所有标本均采用标准皮质骨密度的 45% 作为固定的阈值,用于将高矿化组织与低或未矿化组织区分开,根据对 Micro-CT 断层照片的观察及文献中的应用^[10,11]。分别计算:骨痂总体积(Total callus volume, TV)、矿化骨组织体积(Mineralized callus volume, BV)、矿化骨痂体积分数(Callus mineralized volume fraction, BVF)、骨矿密度(Bone mineralized density, BMD)、矿化组织密度(Tissue mineralized density, TMD)、骨小梁厚度(Trabecula thickness, Tb. Th. 3D)、骨小梁间隙宽度(Trabecula Space, Tb. SP. 3D),并进行统计学分析。

1.2.3 组织学观察:取材后将右侧股骨立即置入 10% 多聚甲醛溶液(pH = 7.2 ~ 7.4),在 4℃ 条件下固定 1 周。再经 15% EDTA·Na₂ 缓冲液(pH = 7.4)脱钙,每隔 3 天更换一次脱钙液。经过 3 ~ 5 周后,经鉴定脱钙完全。然后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。股骨近端矢状面 5 μ m 连续切片,HE

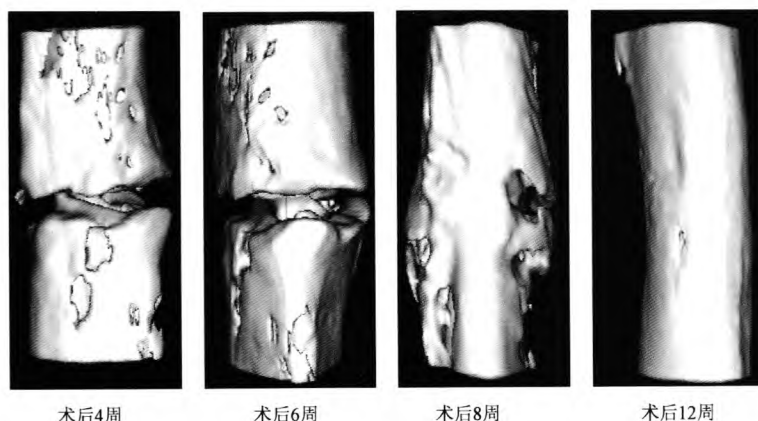


图 1 术后各时间点 Micro-CT 图片

Fig. 1 Micro-CT images at the time points after the operation

染色,透明后中性树胶封片,显微镜下观察。

1.3 统计学方法

实验数据用均值 $\pm$ 标准差表示,并且 SPSS13.0 对其定量数据进行统计学分析,根据需要进行 t 检验,方差分析。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 动物存活情况

卵巢切除术后 3 月,大鼠胫骨上端发生明显的骨量丢失,Micro-CT 结果显示:骨小梁数目减少,间距增加,骨密度降低显著,OVX 术前大鼠胫骨近端的 BMD 平均值为 184 ± 68 (mg/cm^3),术后 3 个月 $\text{BMD} = 71 \pm 22$ (mg/cm^3)。在骨折模型制作过程中,1 只大鼠发生麻醉意外死亡,2 只大鼠术中骨质劈裂导致内固定失败,其余大鼠均完全存活,并无感染发生。

2.2 Micro-CT 分析

在骨折 2 周内,骨折处只有少量纤维骨痂形成,因此 Micro-CT 检测结果显示骨痂不明显。而从第 4 周开始,Micro-CT 动态观察显示:术后 4 周骨折区仅有极少的高矿化组织,仅占总体积的少数。术后 6 周骨折端仅在截骨近端见少量骨痂形成,Micro-CT 分析结果显示此时骨折区矿化组织较少;术后 8 周,骨痂组织几乎填满骨折区,但骨折区中央仍可见明显未连通的断层,显示骨痂生长到中央区后继续生长的能力有所下降;术后 12 周形成连续骨痂,原有生成的骨痂较前塑形良好,可见骨痂改建形成骨小梁结构,中央区周围骨痂量增多,仍处于塑形改建中,图 1。

骨质疏松骨折愈合过程中,极惯性矩无显著性差异。极惯性矩即刚体受外力作用下的转动势,但

从其变化趋势分析,极惯性矩随时间点逐渐增加,与 4 周相比分别增加了 0.48%, 6.46%, 12.68%。骨体积分数 BV/TV 降低,松质骨在去卵巢骨折后出现了骨小梁体积分数下降,骨小梁大量丢失。骨矿物质密度 (Bone Mineral Density, BMD) 是反映骨强度的公认指标,随时间点呈上升趋势;矿化骨痂体积分数 (BVf) 随时间点有上升趋势。

骨小梁厚度 Tb. Th 增大,且 12 周与 4 周,6 周有显著统计学差异 ($P < 0.05$)。骨小梁间隔 (Tb. Sp) 增大,且 12 周与 4 周,6 周有显著统计学差异 ($P < 0.05$)。矿化骨痂表面积比值在 8w 后无明显变化。结构模型指数 (SMI) 先上升后下降,表明骨小梁形态结构发生变化,图 2。

2.3 组织学观察

骨质疏松大鼠股骨骨折后 12 周,组织形态学观察发现,骨折断端附近出现连续的新生板层骨,且发生不同程度的改建形成不等量的新生骨小梁。新生骨小梁顺延股骨干长轴方向纵向排列。骨小梁粗壮,间隙增大,形态结构较完整,图 3。

3 讨论

骨骼的年更新率约为 18%,正常皮质骨占骨总量的 80%,但仅有 20% 得到更新;松质骨仅占骨总量的 20%,而 80% 骨小梁参与了更新^[8]。

骨折愈合是一个复杂的生物修复过程,涉及一系列组织、细胞、细胞成分等的共同参与和相互作用,该过程的最终目的是恢复骨的力学特性^[14]。郝永强等报道^[9],在骨折早期骨质疏松性骨折骨痂体积较正常组增加,但密度降低。骨折区骨痂总体积及骨痂中高矿化组织在 8 周时出现下降,此时主要表现为大量的软骨生成并发生钙化形成骨性骨痂;

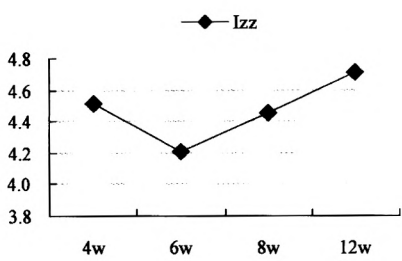


图 2-1 各时间点 Micro-CT 分析: 极惯性矩 (Izz) 变化趋势

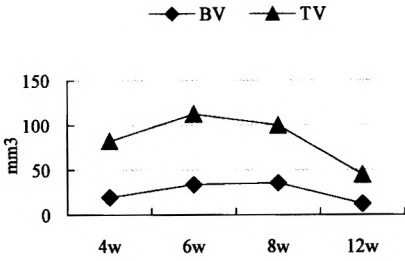


图 2-2 各时间点 Micro-CT 分析: 骨体积变化趋势

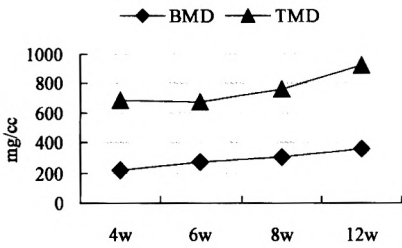


图 2-3 各时间点 Micro-CT 分析: 骨矿物密度 (BMD) 及矿化组织密度 (TMD) 变化趋势

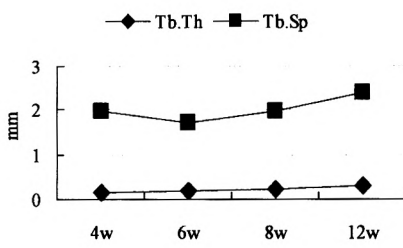


图 2-4 各时间点 Micro-CT 分析: 骨小梁厚度 (Tb.Th) 及骨小梁间隙 (Tb.Sp) 变化趋势

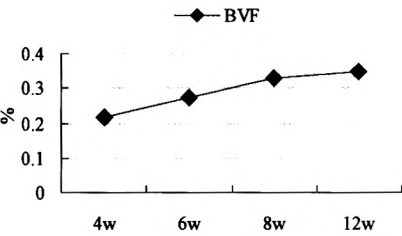


图 2-5 各时间点 Micro-CT 分析: 矿化骨痂体积分数 (BVF) 变化趋势

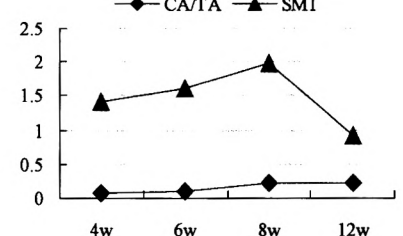


图 2-6 各时间点 Micro-CT 分析: 皮质骨占总面积比值 (CA/TA) 及结构模型指数 (SMI) 变化趋势

图 2 各时间点 Micro-CT 分析: 各参数变化趋势

Fig. 2 Analysis of Micro-CT at each time point; trend of different indexes

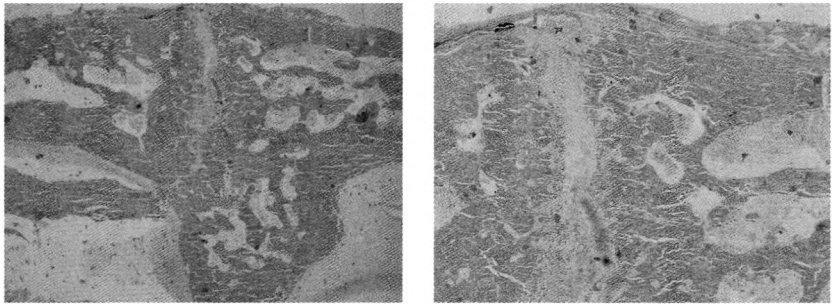


图 3 术后 12 周骨折端组织学切片

Fig. 3 The histological observation at 12th week after operation

骨痂总体矿物密度及自身组织密度在各时间点呈现上升趋势, 此期主要为改建塑形阶段, 说明此时骨折

修复过程主要为改建塑形阶段^[13]。骨小梁厚度 Tb.Th 逐渐增大, 可能由松质骨密度及微结构的改

变引起各点应力的重新分布,残余骨小梁因承受过多载荷而发生代偿性肥厚所致。骨小梁间隔增大,表明到 12 周时骨小梁数量和连接密度升高,间隙增宽,出现了结构的改建。结构模型指数 (Structure Model Index, SMI),定义骨小梁板状 (plate-like) 和杆状 (rod-like) 的程度,板状骨小梁和杆状骨小梁的 SMI 数值分别为 0 和 3。发生骨质疏松是,骨小梁从板状向杆状转变,SMI 数值增加。该研究中,骨质疏松骨折大鼠 SMI 先上升后下降,说明 8 周前骨小梁结构形态由板层结构退变成杆状结构,继而形成板层结构。正常情况下骨折愈合情况与骨质疏松骨折愈合情况类似^[15]。

骨质疏松骨折的愈合过程是一个复杂而连续的过程。骨质疏松骨折后在断端附近内外形成的骨样组织逐渐骨化,形成新骨,即膜内成骨。原始骨痂中新生骨小梁逐渐增粗,排列逐渐致密。8 周后,原始骨痂将被板层骨所替代,使骨折部位形成坚强的骨性连接。从而增强骨的机械强度,进而避免骨折的再发生。

目前,老年人骨质疏松发病率较高,并且女性多于男性。根据世界卫生组织 (WHO) 标准,美国营养调查结果表明骨质疏松严重影响生活质量,且容易出现骨折,而且继发性骨折的危险明显加大。故本研究中采用骨质疏松骨折模型,目的是通过研究其愈合过程,从而寻求一种有效的治疗药物,掌握治疗时机,从而改善症状。骨质疏松骨折的治疗,将成为下一步研究的重点。

【参 考 文 献】

- [1] Goldring SR, Goldring MB. Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006, 6:376-378.
- [2] NIH Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA*, 2001, 285:785-795.
- [3] Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001;1:363-376. Wooley PH. The usefulness and the limitations of animal models in identifying targets for therapy in arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2004, 18: 47-58.
- [4] Patel NA, Zoeller J, Stamper DL, et al. Monitoring osteoarthritis in the rat model using optical coherence tomography. *IEEE Trans Med Imaging*, 2005, 24:155-159.
- [5] Roberts MJ, Adams SB Jr, Patel NA, et al. A new approach for assessing early osteoarthritis in the rat. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377:1003-1006.
- [6] Yang Y, Whiteman S, Gey van Pittius D, et al. Use of optical coherence tomography in delineating airways microstructure: comparison of OCT images to histopathological sections. *Phys Med Biol*, 2004, 49:1247-1255.
- [7] Utvag SE, Korsnes L, Rindal DB, et al. Influence of flexible nailing in the later phase of fracture healing: strength and mineralization in rat femora. *J Orthop Sci*, 2001, 6(6):576-584.
- [8] Chappard D, Basle MF, Legrand E, et al. Trabecular bone microarchitecture. *Morphologie*, 2008, 92:162-170.
- [9] 郝永强,戴魁戎.骨质疏松性骨折愈合与骨量、骨结构及力学性能相关性的实验研究. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11(3): 273-276.
- [10] Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, et al. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone*, 2009, 44(2):335-44.
- [11] Nyman JS, Munoz S, Jadhav S, et al. Quantitative measures of femoral fracture repair in rats derived by micro-computed tomography. *J Biomech*, 2009, 42(7):891-7.
- [12] Virk MS, Conduah A, Park SH, et al. Influence of short-term adenoviral vector and prolonged lentiviral vector mediated bone morphogenetic protein-2 expression on the quality of bone repair in a rat femoral defect model. *Bone*, 2008, 42(5):921-31.
- [13] 王建卫,杨迪生.骨质疏松对大鼠中晚期骨折愈合的影响及辛伐他汀对大鼠骨质疏松性骨折愈合质量的影响. *浙江大学博士学位论文*, 2006.
- [14] Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop*, 1998, 355S:S7-S21.
- [15] 余昶,董启榕,周晓中.两种大鼠股骨骨折模型愈合的比较. *苏州医学杂志*. 2008, 28(1):4-7.

(收稿日期: 2012-07-16)

作者: 王耀琴, 彭江, 眭翔, 赵钧如, 薛静, 许文静, 汪爱媛, 卢世璧, 覃秀桃
作者单位: 王耀琴(100853北京, 中国人民解放军总医院骨科研究所;030001太原, 山西医科大学), 彭江, 眭翔, 赵钧如, 薛静, 许文静, 汪爱媛, 卢世璧(中国人民解放军总医院骨科研究所, 北京, 100853), 覃秀桃(山西医科大学, 太原, 030001)
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: Chinese Journal of Osteoporosis
年, 卷(期): 2013, 19(3)

参考文献(16条)

1. Goldring SR;Goldring MB Clinical aspects,pathology and pathophysiology of osteoarthritis 2006
2. NIH Consensus development panel on osteoporosis prevention,diagnosis and therapy.Osteoporosis prevention,diagnosis and therapy 2001
3. Bendele AM Animal models of osteoarthritis 2001
4. Wooley PH The usefulness and the limitations of animal models in identifying targets for therapy in arthritis 2004
5. Patel NA;Zoeller J;Stamper DL Monitoring osteoarthritis in the rat model using optical coherence tomography 2005
6. Roberts M J;Adams SB Jr;Patel NA A new approach for assessing early osteoarthritis in the rat 2003
7. Yang Y;Whiteman S;Gey van Pittius D Use of optical coherence tomography in delineating airways microstructure:comparison of OCT images to histopathological sections 2004
8. Utvag SE;Korsnes L;Rindal DB Influence of flexible nailing in the later phase of fracture healing:strength and mineralization in rat femora 2001(06)
9. Chappard D;Basle MF;Legrand E Trabecular bone microarchitecture 2008
10. 郝永强;戴魁戎 骨质疏松性骨折愈合与骨量、骨结构及力学性能相关性的实验研究 2005(03)
11. Morgan EF;Mason ZD;Chien KB Micro-computed tomography assessment of fracture healing:relationships among callus structure,composition,and mechanical function 2009(02)
12. Nyman JS;Munoz S;Jadhav S Quantitative measures of femoral fracture repair in rats derived by micro-computed tomography 2009(07)
13. Virk MS;Conduah A;Park SH Influence of short-term adenoviral vector and prolonged lentiviral vector mediated bone morphogenetic protein-2 expression on the quality of bone repair in a rat femoral defect model 2008(05)
14. 王建卫;杨迪生 骨质疏松对大鼠中晚期骨折愈合的影响及辛伐他汀对大鼠骨质疏松性骨折愈合质量的影响 2006
15. Einhorn TA The cell and molecular biology of fracture healing 1998
16. 余昶;董启榕;周晓中 两种大鼠股骨骨折模型愈合的比较 2008(01)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201303020.aspx