

间断性水平位站立对尾吊大鼠胫骨骨小梁结构影响的 micro-CT 评价

胡泽兵¹ 周涛² 王冰¹ 曹新生¹ 杜挺媛¹ 张舒^{1*}

(1. 第四军医大学航空航天生物动力学教研室, 航空航天医学教育部重点实验室, 西安 710032;

2. 第四军医大学口腔医院显微 CT 实验室, 西安 710032)

中图分类号: R852.22 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013)05-0431-04

摘要: **目的** 应用 micro-CT 研究尾吊大鼠胫骨骨小梁微结构的变化, 以此评价间断性水平位站立对抗模拟失重导致的骨微结构退化的效果。 **方法** 24 只 SD 雄性大鼠随机等分为 3 组: 对照组 (CON 组)、尾吊组 (SUS 组)、水平位站立对抗组 (ST 组)。尾吊组大鼠始终保持约 30° 头低位及后肢自由悬垂不负重状态, 水平位站立对抗组在尾吊处理的基础上, 大鼠每天固定时间水平站立 1 h。实验 3 周后处死各组大鼠, 取其右侧胫骨行 micro CT 扫描及三维重建, 对其骨微结构进行定量分析。 **结果** 选定感兴趣区 (ROI) 行定量分析及三维可视化后, 与 CON 组相比, SUS 组胫骨骨体积分数 (BVF)、骨小梁数量 (Tb. N)、骨小梁厚度 (Tb. Th) 均显著降低, 而骨表面积/体积 (BS/BV)、骨小梁间隙 (Tb. Sp) 及骨小梁模式因子 (Trabecular Pattern Factor, TPF) 均显著升高; ST 组的变化介于 SUS 组和 CON 组之间; 三维可视化图像结果与物理参数结果趋势一致。应用 One-Way ANOVA 分析及多重比较 LSD-t 检验, 三组各参数之间统计学差异显著 ($P < 0.05$)。 **结论** 间断性水平位站立可明显减弱尾吊大鼠胫骨的微结构退化和骨质丢失, 而 micro CT 可以有效地辨别胫骨松质骨微结构的精细变化。

关键词: 尾吊大鼠; 间断性水平位站立; micro-CT; 胫骨微结构

Evaluation of the effect of intermittent standing exposure on the tibia trabecular structure in tail-suspended rats using micro-CT

HU Zebing¹, ZHOU Tao², WANG Bing¹, CAO Xinsheng¹, DU Tingyuan¹, ZHANG Shu¹

(1. Key Laboratory of Aerospace Medicine, Chinese Ministry of Education; 2. Micro-CT Laboratory, the Stomatological Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Corresponding author: ZHANG Shu, Email: shuzhang@fmmu.edu.cn

Abstract: Objective To study the changes of the tibia trabecular microstructure in tail-suspended rats using micro CT, in order to evaluate the effect of intermittent standing exposure on microstructure degeneration induced by hind limb unloading.

Methods Twenty-four male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into 3 groups: control group (CON), suspension group (SUS), and intermittent standing group (ST). The tail-suspended rats were kept approximately 30° head-down-tilt and tail-suspension for 3 weeks, and the rats in intermittent standing group were granted hind limb reloading for 1 hour per day at fixed time on the basis of tail-suspension. After 3-week treatment, all the rats were euthanized, and the right tibias were collected for micro-CT scanning and three-dimensional reconstruction. Quantitative analysis of bone microstructure was also performed. **Results** Quantitative analysis and three-dimensional visualization of the region of interest (ROI) were performed. The results showed that bone volume fraction (BVF), trabecular number (Tb. N), and trabecular thickness (Tb. Th) in SUS group were significantly lower than those in CON group. While bone surface area/bone volume (BS/BV), trabecular separation (Tb. Sp), and trabecular pattern factor (TPF) were significantly higher than those in latter group. The changes in ST group were between these 2 groups. Three-dimensional visualized image showed similar trends with the physical parameters. Statistical analysis was performed using One-way

ANOVA analysis and LSD-t multiple comparison. No significant difference among the three groups was observed ($P < 0.05$). **Conclusion** Intermittent standing resistance can significantly alleviate microstructure degeneration and bone loss of the tibia induced by tail-suspension. And meticulous changes of the tibia trabecular microstructure can be detected and distinguished by micro-CT.

Key words: Tail-suspended rat; Intermittent standing; micro-CT; Tibia microstructure

航天飞行中,航天员暴露于失重环境中可引起骨骼系统的功能和代谢紊乱,呈现出负钙平衡和骨质丢失等现象,导致骨骼结构出现类似于临床骨质疏松症的表现。采用后肢去负荷尾吊大鼠模拟失重模型,研究发现失重性骨质丢失主要发生在承重骨的松质骨区,表现为骨生成降低,钙化减少,松质骨变薄,脆性增加等^[1,2]。目前,失重性骨质丢失的对抗措施主要包括体育锻炼、药物治疗、饮食控制、物理刺激及人工重力等,其中“人工重力”被认为是最有希望全面解决失重导致的人体不良反应的理想措施,水平位站立就是一种简便易行的人工重力模拟方法。我们前期的地面试验已经证实,间断性人工重力可以显著改善尾吊大鼠股骨的生长及生物力学特性^[3],但是承重骨松质骨区的骨小梁微观结构变化情况却鲜见报道。

Micro-CT是近年来被广泛应用的一种高分辨率三维定量分析技术,它在普通CT的基础上将分辨率提高到微米级,实现了对样本的三维连接性、拓扑结构和微结构的定量分析及三维可视化呈现,同时兼有无创性、快捷方便等特点,使得micro-CT迅速成为分析研究骨微观结构的得力工具^[4]。本研究利用micro-CT技术,定量分析了间断性水平位站立暴露下尾吊大鼠胫骨微结构变化情况,在骨微观结构层次研究了间断性人工重力对抗模拟失重的效果。

1 资料与方法

1.1 动物分组及模型建立

7 w龄的雄性Sprague-Dawley (SD)大鼠24只(第四军医大学实验动物中心提供),适应喂养7 d后,平均体重为 258.1 ± 12.5 g。随机分为对照组(CON组)、尾吊组(SUS组)、水平位站立对抗组(ST组)三组,每组8只。尾吊组采用Falcai等^[5]改进的尾部悬吊方法,使大鼠始终保持约30°头低位及后肢自由悬垂不负重状态,尾吊时间为3 w;水平位站立对抗组在尾吊处理的基础上,每天固定时间段解悬吊1 h,使大鼠后肢着地恢复活动;对照组大鼠于正常条件下饲养。

1.2 取材及保存

尾吊3 w后,过量戊巴比妥钠麻醉大鼠致死。剥离两侧比目鱼肌称重;取出两侧胫骨并尽力剥离其上软组织,称量胫骨湿重后放入冻存管中在-80°冰箱保存备用;micro-CT扫描前,将右侧胫骨取出于室温下解冻,然后用4%多聚甲醛固定24 h即可。

1.3 micro CT扫描、三维重建及定量分析

本次micro-CT扫描所用仪器为Siemens inveon micro-CT(Siemens, Germany),扫描参数为:电压80 kV,电流500 μ A,曝光时间800 ms,旋转角度增量0.5°,扫描分辨率10.44 μ m。扫描完成后,应用Cobra软件以 $1024 \mu\text{m} \times 1024 \mu\text{m} \times 1024 \mu\text{m}$ 体素进行三维重建。定量分析时,感兴趣区(Region of Interest, ROI)选为距生长板远端1.5 mm处 $2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm} \times 3.0 \text{ mm}$ 立方体中的骨组织(图1A),对其进行三维可视化呈现,并分析如下物理参数:骨体积分数(Bone volume fraction, BVF)、骨表面积/体积(Bone surface area/bone volume, BS/BV)、骨小梁厚度(Trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁数量(Trabecular number, Tb. N)、骨小梁间隙(Trabecular separation, Tb. Sp)及骨小梁模式因子(Trabecular Pattern Factor, TPF)。

1.4 统计学分析

所有数据以均数 \pm 标准差表示,用SPSS 17.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),根据方差齐与否,分别采用LSD-t检验或Games-Howell检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠一般情况对比

实验结束时,三组大鼠体重无显著性差异。与CON组大鼠相比,SUS组及ST组大鼠的胫骨湿重及比目鱼肌重显著降低($P < 0.01$);ST组与SUS组大鼠相比,胫骨湿重略升高,差异无显著意义,比目鱼肌重量显著升高($P < 0.05$)(见表1)。

2.2 micro-CT定量分析及三维可视化成像结果

Micro-CT定量分析结果显示,与CON组大鼠相比,SUS组及ST组大鼠胫骨BVF、Tb. N、Tb. Th均

显著降低($P < 0.01$), 而 BS/BV、Tb. Sp 则显著升高($P < 0.01$), SUS 组中 TPF 较 CON 组显著升高($P < 0.01$), TPF 在 CON 组和 ST 组间无显著差异; ST 组

与 SUS 组大鼠相比, 胫骨 BVF、Tb. N、Tb. Th 均显著升高($P < 0.01$), 而 BS/BV、Tb. Sp、TPF 则显著降低($P < 0.05$, 见表 2)。

表 1 实验结束时三组大鼠体重、胫骨湿重及比目鱼肌重量间的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of body weight, wet weight of the tibia, and weight of the soleus of rats in 3 groups at the end of the experiment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	n	体重(g)	胫骨湿重(mg)	比目鱼肌重量(mg)
CON	8	380.2 ± 18.5	826.0 ± 59.3 ^{△△}	141.8 ± 13.0 ^{△△}
ST	8	370.5 ± 15.0	626.5 ± 59.4	88.8 ± 9.5*
SUS	8	367.1 ± 14.2	619.0 ± 43.4 ^{##}	72.1 ± 8.1 ^{##}

注: 与 L 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与 S 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

[△]: C versus +Gz; ^{△△} $P < 0.05$, ^{△△△} $P < 0.01$; * : S versus +Gz; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

[#]: S versus C; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

表 2 三组大鼠胫骨(右)近端骨微结构参数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of microstructural parameters in proximal tibia (right) of rats in 3 groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	n	BVF (%)	BS/BV (mm ⁻¹)	Tb. Th (mm)	Tb. N (mm ⁻¹)	Tb. Sp (mm) ^{&}	TPF (1/mm)
CON	8	18.2 ± 3.3 ^{△△}	31.3 ± 2.5 ^{△△}	0.064 ± 0.005 ^{△△}	2.801 ± 0.524 ^{△△}	0.296 ± 0.063 ^{△△}	9.25 ± 1.84
ST	8	7.5 ± 2.2 ^{**}	35.1 ± 2.6 ^{**}	0.057 ± 0.004 ^{**}	1.284 ± 0.297 ^{**}	0.761 ± 0.201*	9.84 ± 1.76 ^{**}
SUS	8	3.2 ± 1.4 ^{##}	39.7 ± 2.7 ^{##}	0.051 ± 0.003 ^{##}	0.626 ± 0.279 ^{##}	1.834 ± 0.798 ^{##}	15.34 ± 1.93 ^{##}

注: 与 L 组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与 S 组比较, ** $P < 0.01$; 与 C 组比较, ^{##} $P < 0.01$

[&]: 方差不齐, 采用 Games-Howell 检验

[△]: C versus +Gz [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; * : S versus +Gz, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

[#]: S versus C, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, &: equal variances not assumed, so Games-Howell test was applied

2.3 micro-CT 三维可视化成像结果

三维可视化成像形象地展示了三组间胫骨松质骨的形态变化情况。与 CON 组致密的骨小梁微结构形态相比, SUS 组呈现出明显的骨微结构退化, 表现为骨小梁减少、变细、断裂, 不能保持完整的微观构筑。经过间断性水平位站立暴露后, ST 组的骨微结构退化较 SUS 组显著减轻, 较 SUS 组表现出骨小梁增多变厚, 间隙变小, 出现大量完整的小梁连接结构。

3 讨论

失重条件下出现负钙平衡和骨质丢失的主要原因包括重力作用的消失, 肌肉牵拉活动的减弱, 激素调节系统紊乱, 以及局部血流动力学的改变等, 因此, 实施人工重力对抗可以说是从根本上全面解决失重问题的有效措施。我们的前期研究发现, 每天给予尾吊大鼠 1 h 人工重力暴露即可明显缓解失重引起的骨质丢失, 改善承重骨的力学性能, 而增加暴露时间及暴露 G 值并未显著增加对抗效果^[3]。但既往对人工重力对抗效果的评价研究中, 缺少对骨小梁微结构变化的细致评价。随着骨质疏松研究水平的日益深入, 松质骨微结构逐渐成为评价骨骼力学性能的一个重要因素^[6]。Odgaard^[7]认为骨的生物力学性能随负荷方向而改变, 松质骨具有生物力学各向异性, 骨

小梁的结构类型在决定松质骨生物力学性能时起重要作用。Ulrich 等^[8]的研究表明, 微结构参数能完善对松质骨弹性模量的解释, 不同结构位置的有效预测微结构参数不同。这些研究均在一定程度上说明了骨微结构参数在评价骨骼特性方面的重要性。但传统的骨组织切片计量学测量限于切片方向的不固定性及二维平面的局限性, 无法全面、细致地反应骨小梁的基本形态及三维连接性, 同时不易消除骨小梁各向异性对微结构参数的影响而容易造成测量结构出现较大偏倚^[9]。Micro-CT 技术的应用极大地解决了骨小梁微结构测量方面存在的问题, 成为研究分析骨微观结构的新兴技术。

Micro-CT 技术可以对松质骨的微结构进行无偏差的脱离模型的定量分析, 所得各物理参数与骨骼力学性能有紧密的联系。Perilli 等^[10]认为, BVF、Tb. N、Tb. Th 的增加与 Tb. Sp 的降低预示着极限应力得到提高。TPF 的意义基本与 SMI (结构模型指数) 相同, 它衡量骨小梁凸面和凹面的比例程度。TPF 增高时, 提示骨小梁由板状向杆状变化, 板状结构出现穿孔、消失及向杆状结构转化时为松质骨结构退变的重要特征之一^[11]。Ding 和 Hvid^[12]的研究显示, SMI 是预测弹性模量和疲劳能量的最佳参数, SMI 增加会降低疲劳能量。本研究应用 micro-CT 技

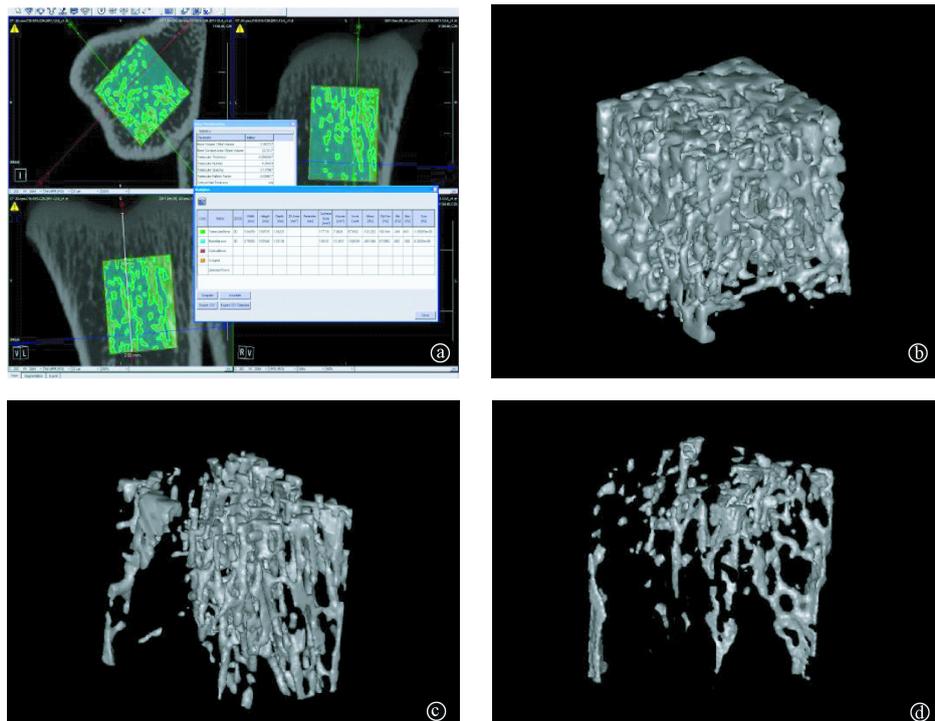


图1 ROI的选择及三组大鼠ROI内骨小梁三维可视化图像

a:ROI的选择,三块彩色区域为同一个ROI的不同角度显示;b:CON组ROI骨小梁;
c:ST组ROI骨小梁;d:SUS组ROI骨小梁

Fig. 1 Selection and three - dimensional visualization of the region of interest (ROI) of rats in 3 groups.

a:Selection of ROI. Three different color regions represent the different section of the same ROI ;

b:Trabecular of the CON group in ROI. c:Trabecular of the ST group in ROI. d:Trabecular of the SUS group in ROI.

术发现,间断性水平位站立可以显著增加尾吊大鼠胫骨 BVF、Tb. N 和 Tb. Th,并显著降低 BS/BV、Tb. Sp 以及 TPF,明显缓解了因后肢去负荷模拟失重导致的骨微观结构退化,提高了极限应力以及疲劳能量耐限。本次 micro-CT 定量分析结果与以往力学性能结果相互补充印证,进一步从骨微观结构层次对人工重力对抗模拟失重效果进行了验证和解释。

Micro-CT 检测也有不足之处,不能完全取代组织病理与生物学检测。它只能提供骨骼的结构和空间构成信息,而不像组织病理与生物学检测那样可以描述成骨细胞、破骨细胞以及骨表面的缝隙再吸收和再形成等过程,即不能直接用于探讨骨骼变化发生的机制。所以,在骨骼研究中,可充分利用 microCT 在物理形态测量方面的优势,结合组织功能与形态测量的结果,综合判断骨骼功能和结构变化的成因。

【 参 考 文 献 】

[1] Pornprasertsuk S, Ludlow JB, Webber RL, et al. Fractal dimension analysis of weight-bearing bones of rats during skeletal unloading. *Bone*, 2001. 29(2): 180-4.
[2] Dehority W, Halloran BP, Bikle DD, et al. Bone and hormonal

changes induced by skeletal unloading in the mature male rat. *Am J Physiol*, 1999, 276(1 Pt 1): E62-9.

[3] Cao XS, Wu XY, Wu YH, et al. Effects of intermittent artificial gravity on femur of simulated weightlessness rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2001, 17(4): 392-5.
[4] Xu SF, Wang Z. Application and Evolution of Micro-CT in Orthopedics. *Chin J Bone and Bone Disease*, 2004. 3(4): 236-241.
[5] Falcai MJ, Louzada MJ, de Paula FJ, et al. A modified technique of rat tail suspension for longer periods of observation [J]. *Aviat Space Environ Med*, 2012, 83(12):1176-1180.
[6] Laib A, Barou O, Vico L, et al. 3D micro-computed tomography of trabecular and cortical bone architecture with application to a rat model of immobilisation osteoporosis. *Med Biol Eng Comput*, 2000, 38(3): 326-32.
[7] Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone*, 1997, 20(4): 315-28.
[8] Ulrich D, van RB, Laib A, et al. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone*, 1999, 25(1): 55-60.
[9] Frost HM. On the trabecular "thickness"-number problem. *J Bone Miner Res*, 1999. 14(11): 1816-21.
[10] Perilli E, Baleani M, Ohman C, et al. Structural parameters and mechanical strength of cancellous bone in the femoral head in osteoarthritis do not depend on age. *Bone*, 2007. 41(5): 760-8.
[11] Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, et al. Trabecular bone pattern factor—a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone*, 1992. 13(4): 327-30.
[12] Ding M, Hvid I. Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone. *Bone*, 2000, 26(3): 291-5.

(收稿日期:2013-01-12)

间断性水平位站立对尾吊大鼠胫骨骨小梁结构影响的micro-CT评价

作者: [胡泽兵](#), [周涛](#), [王冰](#), [曹新生](#), [杜挺媛](#), [张舒](#), [HU Zebing](#), [ZHOU Tao](#), [WANG Bing](#), [CAO Xinsheng](#), [DU Tingyuan](#), [ZHANG Shu](#)

作者单位: [胡泽兵, 王冰, 曹新生, 杜挺媛, 张舒, HU Zebing, WANG Bing, CAO Xinsheng, DU Tingyuan, ZHANG Shu \(第四军医大学航空航天生物动力学教研室, 航空航天医学教育部重点实验室, 西安, 710032\)](#), [周涛, ZHOU Tao \(第四军医大学口腔医院显微CT实验室, 西安, 710032\)](#)

刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)

年, 卷(期): 2013, 19(5)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201305003.aspx