

瘦素缺乏小鼠椎体骨质的 Micro-CT 评价

郭震¹ 姚劭炜¹ 张世民¹ 涂意辉¹ 蒋雷生^{2*}

1. 同济大学附属杨浦医院骨科

2. 上海交通大学医学院附属新华医院骨科, 上海 200090

中图分类号: R814.4 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 01-0012-05

摘要: **目的** 探讨瘦素通过对椎体骨质代谢的影响, 从而进一步影响椎间盘退变的可能性。 **方法** 获取 12 个 6 月龄雄性 ob/ob 小鼠(瘦素缺乏小鼠)和野生型小鼠(C57BL 小鼠)的腰 5 椎体(各 6 个), 通过 Micro-CT 检测比较两者骨密度、皮质骨厚度、小梁骨体积、小梁骨厚度、小梁骨数量、连接性密度、结构模型指数等显微结构参数的差异。 **结果** 与野生型小鼠相比较, 6 月龄 ob/ob 小鼠的椎体骨密度及小梁骨厚度增大, 椎体连接性密度(Conn. D)明显增加; 椎体骨小梁间隙明显减少; 椎体结构模型指数(SMI)明显减小, 两者比较差异均有显著统计学意义($P < 0.01$); 其小梁骨体积(BV/TV)、小梁骨数量增加、皮质骨厚度增大, 两者比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。 **结论** 瘦素可能通过对小鼠椎体骨质代谢影响椎间盘的营养供应从而进一步影响椎间盘的退变。

关键词: 瘦素; Micro-CT; 椎体; 营养; 椎间盘退变

Micro-CT evaluation of the vertebral bone structure in leptin-deficiency mice

GUO Zhen¹, YAO Mengwei¹, ZHANG Shimin¹, TU Yihui¹, JIANG Leisheng²

1. Department of Orthopedics, Yangpu Hospital, Tongji University

2. Department of Orthopedics, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University 200090, China

Corresponding author: JIANG Leisheng, Email: jiangleisheng@126.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of leptin on bone metabolism of the vertebral body, and to further discuss the possibility affecting the intervertebral disc degeneration. **Methods** The bodies of the 5th lumbar vertebral were surgically obtained from 6 wild type mice (C57BL mice) and 6 ob/ob mice (leptin-deficiency mice). The variation of the micro-structural parameters, including bone mineral density (BMD), cortical thickness, trabecular bone volume, trabecular thickness, trabecular number, connectivity density (Conn. D), and the structure model index were evaluated using Micro-CT. **Results** Compared with those in wild type mice, significant increase of BMD of the vertebral bodies, trabecular thickness, and Conn. D was observed in 6-month ob/ob mice, while the significant decrease of the trabecular separation and the vertebral structure model index (SMI) were also observed in ob/ob mice ($P < 0.01$). Meanwhile, trabecular bone volume fraction (BV/TV), trabecular number, and the cortical thickness in ob/ob mice also increased compared with those in wild type mice ($P < 0.05$). **Conclusion** Leptin may affect the nutrition supply of the intervertebral disc through its effect on bone metabolism of the vertebra body, thus affecting the intervertebral disc degeneration.

Key words: Leptin; Micro-CT; Vertebral body; Nutrition; Intervertebral disc degeneration

2007 年, Gruber 等^[1]发现人体椎间盘细胞表达瘦素。我们同样发现椎间盘细胞表达瘦素及其受体, 瘦素对体外培养的大鼠椎间盘软骨细胞有增殖作用^[2]。而最近我们发现, 比较正常小鼠, 6 月龄瘦素缺乏型小鼠的椎间盘退变加速^[3]。这与瘦素在关节软骨的表现并不相同^[4]。由于椎间盘的营养

主要靠软骨下骨脉管的渗透作用, 少部分由纤维环外周的血管渗透, 软骨下骨质的变化可因明显减少椎间盘的营养供应, 从而加重椎间盘退变^[5]。而瘦素对四肢骨及中轴骨的作用不同^[6]。我们拟通过 Micro-CT 检测 6 月龄瘦素缺乏小鼠(ob/ob 小鼠)和正常野生型小鼠椎体骨质的差异, 以期了解瘦素对椎体骨质退变的影响, 从而影响椎间盘的退变可能。

*通讯作者: 蒋雷生, Email: jiangleisheng@126.com

1 材料和方法

1.1 实验动物及标本准备

选择 2 月龄雄性野生型 C57BL 小鼠及 ob/ob 小鼠(瘦素缺乏小鼠)各 6 只,购自上海斯莱克动物中心。分别 SPF 级别和清洁级喂养,保证明暗周期为 12 h,室温 $23 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,自由摄食,饮水。实验和操作流程经所在单位的动物实验伦理委员会审核通过。(实验动物合格证号:SYXK(沪)2008-0052)动物喂养 4 个月,在 6 月龄时过量麻醉处死,分离第五腰椎(完整腰椎),尽量清除干净周围软组织,然后在 70% 乙醇溶液里固定,直至实验开始。

1.2 Micro-CT 原理扫描方法

所有标本采用高分辨率微型计算机断层成像系统(micro-computed tomography system) μ -CT80 (Scanco Medical AG, Zürich, Switzerland) 以此前文献报道的多层连续性、标准模式进行扫描^[7]。扫描时,将标本沿长轴垂直固定于固定器内,周围填塞少许医用纱条,加入 70% 乙醇作为扫描介质。以 Fluro 方式选择扫描区。同时扫描标准体模,校正 CT 值。扫描完成后,手工校正旋转中心及 CT 值,以 $41.0\text{ }\mu\text{m} \times 41.0\text{ }\mu\text{m} \times 41.0\text{ }\mu\text{m}$ voxel 的各向同性分辨率完成扫描标本的整体结构重建。行松质骨分析时手工选取感兴趣区域(regions of interest, ROI),行皮质骨分析时选取椎体表层厚 0.16 mm 骨组织为感兴趣区域(ROI)行 $8.0\text{ }\mu\text{m} \times 8.0\text{ }\mu\text{m} \times 8.0\text{ }\mu\text{m}$ voxel 三维重建,以计算机自动生成域值提取图像信息。应用显微 CT 自带的 Micro view 2.0 + ABA 软件对重建图像进行定量分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计学软件处理,所有测定数值均使用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,数据采用独立样本 *t* 检验, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

比较 6 月龄 ob/ob 小鼠,正常野生型小鼠的椎体三维成像显示,骨量减少,骨小梁更薄,松散,结构呈“杆状”变化(图 1);比较野生型小鼠,比较野生型小鼠骨密度及小梁骨厚度增大,椎体连接性骨密度(Conn. D)明显增加;椎体骨小梁间隙明显减少;椎体结构模型指数(SMI)明显减小,两者比较差异有统计学意义($P < 0.01$);其小梁骨体积((BV/TV)、皮质骨厚度增大;小梁骨数量增加,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 1,图 2)。

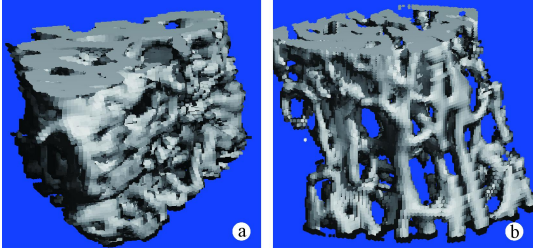


图 1 与 ob/ob 小鼠(a)的椎体相比,正常野生型小鼠(b)的椎体三维成像显示:骨量减少,骨小梁更薄,松散,结构呈“杆状”变化

Fig. 1 Compare to that in the ob/ob mice (a), the 3-demensional imaging of the lumbar vertebrae in normal wild type mice (b) revealed decreased trabecular bone volume, decreased trabecular thickness, and loose trabecula, showing a rod-shaped change in structure.

3 讨论

瘦素这个 16kDa 的多肽类激素是在小鼠肥胖基因自然突变体(ob/ob 小鼠)中发现的。目前已经证实瘦素受体除下丘脑外,还广泛存在于许多组织,骨骼系统就是其重要的作用部位。人们发现瘦素受体在多个骨骼细胞类型中都存在,包括骨髓间充质

表 1 野生及瘦素缺乏小鼠腰 5 椎体 micro-CT 测量结果

Table 1 Micro-CT measurement of the 5 th lumbar vertebral bodies in wild type mice and leptin-deficiency mice										
项目	长度 (mm)	骨矿物 含量(g)	骨密度 (g/cm ²)	皮质骨 厚度 (mm)	小梁骨 厚度 (mm)	小梁骨 间隙 (Tb. Sp;mm)	小梁骨 含量 (Bv/Tv $\times$ 100)	结构模型 指数 (SMI)	连接性 骨密度 (Conn. D; mm ⁻³)	小梁骨数量 (Tb. N; */mm)
WT (n = 6)	3.25 (0.12)	0.025 (0.003)	0.044 (0.002)	0.081 (0.003)	0.0431 (0.0014)	0.1800 (0.0201)	22.9 (6.0)	1.725 (0.125)	162.67 (15.12)	3.16 (0.65)
ob/ob (n = 6)	3.37 (0.11)	0.034 (0.003)	0.052 (0.002)	0.091 (0.006)	0.0520 (0.0011)	0.1491 (0.0121)	30.1 (5.0)	0.738 (0.112)	205.87 (16.34)	3.89 (0.85)
<i>p</i>	<0.05	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.05

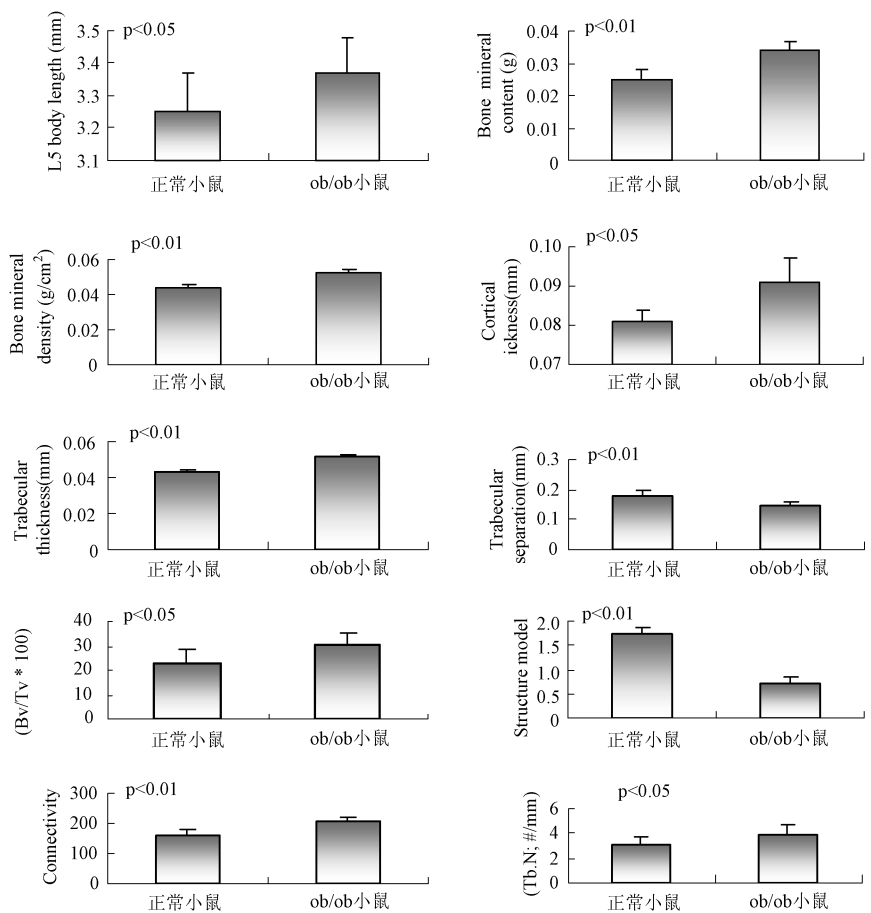


图 2 与野生型小鼠比较,6 月龄 ob/ob 小鼠的椎体骨密度及小梁骨厚度增大,椎体连接性骨密度 (Conn. D) 明显增加;椎体骨小梁间隙明显减少;椎体结构模型指数 (SMI) 明显减小,两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$);其小梁骨体积 ((BV/TV)、皮质骨厚度增大;小梁骨数量增加,两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$))。

Fig. 2 Compared with that in wild type mice , BMD of the vertebral bodies , trabecular thickness , and Conn. D in 6-month ob/ob mice increased significantly , while trabecular separation and vertebral structure model index (SMI) decreased significantly ($P < 0.01$) . Meanwhile , trabecular bone volume fraction (BV/TV) , trabecular number , and cortical thickness in ob/ob mice also increased compared with that in wild type mice ($P < 0.05$) .

细胞^[8]、成骨细胞^[9]、造血干细胞^[10]。然而瘦素对骨骼的作用仍然存在争议:有研究者发现,在活体内瘦素起到合成代谢作用,它可以刺激成骨细胞合成与分化,同时抑制破骨细胞破骨化作用^[11]。然而有的研究者发现瘦素可以通过中枢性神经系统作用从而消极的影响骨骼成骨作用,直接在第三脑室注射瘦素,可以引起脊柱骨量的丢失,以及体重的明显降低^[12]。对于瘦素缺乏情况下,啮齿类动物的骨骼表型同样存在争议,尽管许多研究者发现 ob/ob 小鼠表现为骨密度降低^[13]以及骨量的减少^[14],但仍有高骨量的报道^[15]。

我们通过高分辨率的 Micro-CT 对 6 月龄的瘦素缺乏小鼠 (ob/ob 小鼠) 和正常野生型小鼠的腰 5 椎体进行检测发现,与野生型小鼠相比,ob/ob 小鼠的椎体表现为长度增加、骨密度的增加,同样发现其骨小梁厚度增加。这与 Hamrick^[16] 等的报告相一致。与 Hamrick 等用组织形态学检测方法检测的结果不同,我们应用更先进的高分辨 Micro-CT 检测发现椎体的骨皮质增厚,我们考虑这也可能与椎体退变后局部的骨赘出现有关。Mailer R 等^[17] 发现与组织形态学检测方法相比 Micro-CT 是一种更快速、更准确、又不损伤样本内部结构的有效的检查方法。

在检测中我们发现 ob/ob 小鼠椎体表现为 BMC 及骨密度和小梁骨容量的增加。Kafi N 等^[18]通过生物力学及双能源 X 线机检测发现, ob/ob 小鼠椎体的 BMC 及骨密度降低, 我们认为其矛盾可能在于动物的时间点选择不同, 他们选择的是 10 周的小鼠, 而我们是 6 月龄小鼠, Ducy 等^[19]的研究发现 4-6 月龄左右是小鼠骨密度的高峰时段。

在对骨的微结构进行 micro-CT 分析时我们发现, 比较正常野生型小鼠, ob/ob 小鼠的小梁骨厚度增加, 小梁骨间隙减少, 骨体积分数增大, 而连接性较高。结构模型指数减小。Leung^[20]等运用 micro-CT 在骨质疏松动物模型中发现, 骨体积分数 (BV/TV)、小梁数目 (Tb. N) 及连接性 (Conn. D) 下降, 而小梁间隙和结构模型指数 (SMI) 增加, 涉及骨关节炎方面, 多数学者认为骨关节炎的骨体积 (BV/TV)、小梁数目 (Tb. N) 及连接性 (Conn. D) 增加^[21]。实验中发现, 与正常野生小鼠比较, ob/ob 小鼠椎体的退变表现为骨性关节炎样变化, 而正常野生小鼠的椎体退变则表现为骨质疏松样变化。一般认为虽然骨关节炎和骨质疏松都与骨代谢及身体衰老过程密切相关, 却属于性质完全不同的两类疾病。研究者甚至提出两者相反关系的假说^[22]。众所周知, 瘦素对骨的影响有中枢性抑制和外周成骨样作用。我们的实验结果表明对于野生型小鼠, 瘦素对其椎体骨质可能存在中枢性抑制作用。这与 Hamrick 等^[16]的研究相一致, 他们认为瘦素信号的改变对骨产生的效应在中轴骨和四肢骨、皮质骨、小梁骨是不同的, 而瘦素这种对不同部位骨骼作用不同的原因, 跟股骨和脊柱周围的肌肉量以及骨髓内脂肪细胞数量明显有差别有关。

椎间盘退变和骨性关节炎是肌肉骨骼系统最常见的退变性疾病, 关节软骨和椎间盘的细胞外基质主要有 II 型胶原和蛋白聚糖组成, 他们细胞外基质退变的生化表现非常相像, 均是通过金属蛋白酶 (MMPs) 和 ADAMTs 的分解实现的^[23]。两者在临床上和放射学上同样可以显示出来。疼痛是最重要的临床症状, 在放射学上表现为关节间隙增宽、椎间盘高度减低, 骨赘形成以及软骨下硬化。软骨下骨的增厚可以因为阻止营养物质的扩散从而对软骨的营养供应产生不利影响^[24-25]。此外软骨下骨质的僵硬因为增加软骨上的剪切力, 从而引起 OA 的开始以及随后的退变发生^[26-27]。同样我们经常可以观察到椎间盘软骨终板的钙化以及软骨下骨的变化。在放射片中我们常常可以看到椎间盘终板的硬

化而且这是椎间盘退变的标志^[28]。由于椎间盘的营养主要靠软骨下骨脉管的渗透作用, 少部分由纤维环外周的血管渗透, 软骨下骨质的硬化、钙化可因明显减少椎间盘的营养供应, 从而进一步加重椎间盘退变^[5]。因此为了解椎体骨质的变化, 上述试验中, 我们特意在选择椎间盘下作为兴趣区。而测定结果发现, 比较野生型小鼠, ob/ob 小鼠的椎间盘下 BV/TV 明显增高, 骨小梁厚度增加, 而连接性轻度升高。这与文献报道的随着年龄增长软骨下骨的骨化、硬化的表现相一致^[28]。众所周知, 椎间盘的营养供应会因为终板的钙化而减少。目前有研究者通过动物模型已经证实, 退变椎间盘的渗透性与其与终板表面骨髓接触点的表面通道有明显相关性^[30]。研究者发现在脊柱侧凸, 终板的硬化可以明显减少椎间盘的营养扩散^[31]。

尽管我们不清楚上述退变椎间盘软骨下骨质变化的具体机制, 但我们认为软骨下骨这一形态学退变可能会减少椎间盘营养物质的供应。从而进一步影响椎间盘退变。

【 参 考 文 献 】

- [1] Gruber HE, Ingram JA, Hoelscher GL, et al. Leptin expression by annulus cells in the human intervertebral disc. *Spine J*, 2007, 7:437-443.
- [2] Zhao CQ, Liu D, Li H, et al. Expression of leptin and its functional receptor on disc cells: contribution to cell proliferation. *Spine* 2008, 33:E858-E864.
- [3] Guo Zhen, Li Xin-feng, Dai Li-yang, et al. Histomorphological observations of the intervertebral discs in leptin-deficiency mice. *Spinal Surg*, 2012, 10:113-117.
- [4] Timothy M. Griffin, Janet L, et al. Extreme obesity due to impaired leptin signaling in mice does not cause knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatism*, 2009, 2935-2944.
- [5] Haefeli M, Kalberer F, Saefesser D, et al. The course of macroscopic degeneration in the human lumbar intervertebral disc. *Spine*, 2006, 31:1522-31.
- [6] Battie MC, Videman T, Levalahti E, et al. Genetic and environmental effects on discs degeneration by phenotype and spinal level: a multivariate twin study. *Spine*, 2008, 33 (25): 2801-2808.
- [7] Mackie PS, Fisher JL, Zhou H, et al. Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *Br J Cancer*, 2001, 84:951-958.
- [8] Thomas T, Gori F, Khosla S, et al. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, 1999, 140 (4): 1630-8.
- [9] Cornish J, Callon KE, Bava U, et al. Leptin directly regulates

- bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *Endocrinol*, 2002, 175(2):405-45.
- [10] Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, et al. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Bio*, 1996, 6(9):1170-80.
- [11] Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, et al. Leptin inhibits osteoclast generation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17(2):200-9.
- [12] Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: A central control of bone mass. *Cell*. 2000, 100(2):197-207.
- [13] Ealey KN, Fonseca D, Archer MC. Bone abnormalities in adolescent leptin-deficient mice. *Regulatory Peptides*, 2006, 136(1-3):9-13.
- [14] Hamrick MW, Pennington C, Newton D, et al. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone*, 2004, 34(3):376-83.
- [15] Baldock PA, Sainsbury A, Allison S, et al. Hypothalamic control of bone formation: distinct actions of leptin and γ 2 receptor pathways. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(10):1851-7.
- [16] Hamrick MW, Pennington C, Newton D, et al. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bone of the limb and spine. *Bone*, 2004, 34(3):376-383.
- [17] Mailer R, Van Campenhout H, Van Damme B, et al. Morphometric Analysis of Human Bone Biopsies: A Quantitative Structural Comparison of Histological Sections and Micro-Computed Tomography. *Bone*, 1998, 23:59-66.
- [18] Kafi N, Ealey, Debbie Fonseca, Michael C. Archer, Wendy E. Ward. Bone abnormalities in adolescent leptin-deficient mice. *Regulatory Peptides*, 2006, 136: 9-13.
- [19] Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 2000, 100:197-207.
- [20] Siu WS, Qin L, Cheung WH, et al. A study of trabecular bone in ovariectomized goats with micro-computed tomography and peripheral quantitative computed tomography. *Bone*, 2004, 35: 21-26.
- [21] Fazzalari NL, Parkinson JH 1997 Fractal properties of subchondral cancellous bone in severe osteoarthritis of the hip. *J Bone Miner Res*, 12:632-640.
- [22] Dequeker J, Franssens R, Boremans A. Relationship between peripheral and axial osteoporosis and osteoarthritis. *Clin Radiol*, 1971, 22:74-7.
- [23] Bramono DS, Richmond JC, Weitzel PP, et al. Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. *Clin Orthop Relat Res*, 2004, 428:272-85.
- [24] Malinin T, Ouellette EA. Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8:483-91.
- [25] Zhou S, Cui Z, Urban JP. Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface. *Arthritis Rheum*, 2004, 50:3915-24.
- [26] Radin EL, Paul IL, Rose RM. Role of mechanical factors in pathogenesis of primary osteoarthritis. *Lancet*, 1972, 1:519-22.
- [27] Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res*, 1986, 213:34-40.
- [28] Bell GR, Ross JS. Imaging of the spine. In: Frymoyer JW, Wiesel SW, Eds. *The adult & pediatric spine*. 3rd edn. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004, 69-86.
- [29] Bernick S, Cailliet R. Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae. *Spine*, 1982, 7:97-102.
- [30] Laffosse JM, Accadbled F, Molinier F, et al. Correlations between effective permeability and marrow contact channels surface of vertebral endplates. *J Orthop Res*, 2010, 28:1229-34.
- [31] An MR, Fairbank JC, Etherington PJ, et al. Electrochemical measurement of transport into coliotic intervertebral discs in vivo using nitrous oxide as tracer. *Spine*, 2001, 26:984-90.

(收稿日期: 2013-02-04)

瘦素缺乏小鼠椎体骨质的 Micro-CT 评价

作者：[郭震](#)，[姚劭炜](#)，[张世民](#)，[涂意辉](#)，[蒋雷生](#)，[GUO Zhen](#)，[YAO Mengwei](#)，[ZHANG Shimin](#)，[TU Yihui](#)，[JIANG Leisheng](#)

作者单位：[郭震,姚劭炜,张世民,涂意辉,GUO Zhen,YAO Mengwei,ZHANG Shimin,TU Yihui \(同济大学附属杨浦医院骨科\)](#)，[蒋雷生,JIANG Leisheng\(上海交通大学医学院附属新华医院骨科,上海,200090\)](#)

刊名：[中国骨质疏松杂志](#)

ISTIC

Chinese Journal of Osteoporosis

年，卷(期)：2014(1)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201401003.aspx