

激素诱导去势后绵羊骨质疏松动物模型的椎体微观结构观察及力学性能研究

崔轶 李军 陆声 王毅 何晓清 徐永清*

成都军区昆明总医院,昆明 650032

中图分类号: R332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 07-0818-07

摘要: **目的** 运用去势 + 糖皮质激素的方法,建立绵羊骨质疏松椎体模型,并通过 Micro-CT 观察其微观结构变化与其生物力学之间的关系。**方法** 采用完全随机的设计方法,选用 3 ± 0.5 岁绵羊 24 只,随机分配至 3 个处理组: A 组(去势组), B 组(去势 + 激素组), C 组(假手术组), 每组 8 只绵羊。观察时间为经过相应处理后 9, 12 月。在每个时间点,处死一定数量的绵羊,然后检测各组在各时间点上椎体的骨密度(BMD);生物力学性能变化:测试最大轴向拔出力(F_{max})和最大抗压强度及其能量吸收值。同时切取部分椎体行 Micro-CT 检查,对每组各个时间点绵羊腰椎骨小梁微观结构进行观察。**结果** 随着时间的延长, A, B 组较 C 组均出现 BMD 及生物力学性能下降,显微 CT 观察见骨小梁空间结构呈骨质疏松样变化,且在同一时间点 B 组较 A 组向骨质疏松样变化更显著。**结论** 运用去势 + 糖皮质激素的方法,可快速的建立绵羊骨质疏松动物模型,且经激素诱导 9 个月及 12 个月的去势绵羊均是较为理想的骨质疏松动物模型。

关键词: 骨质疏松;糖皮质激素;骨密度;生物力学;动物模型;绵羊;显微 CT

The study of microstructure and mechanical properties of the lumbar vertebrae in glucocorticoid and ovariectomy-induced osteoporotic sheep

CUI Yi, LI Jun, LU Sheng, WANG Yi, HE Xiaoqing, XU Yongqing

Department of Orthopedic Surgery, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, China

Corresponding author: XU Yongqing, Email: xuyongqing_kunming@163.com

Abstract: **Objective** To establish osteoporotic lumbar vertebrae model in sheep using glucocorticoid injection and ovariectomy, and to observe the changes of microstructure and mechanical properties and to study the relationship. **Methods** Twenty-four 3 ± 0.5 years old adult sheep were randomly selected and divided into 3 groups: Group A (OVX sheep group), Group B (steroid-treated OVX sheep group), and Group C (sham group), with 8 sheep in each group. Observing time was 9 and 12 months after the treatment. At each time point, several sheep in each group were killed. Bone mineral density (BMD) of the lumbar vertebrae, biomechanics, and maximum axial pullout force and uniaxial compression were determined. Partial vertebrae were scanned using micro-CT for observing the microstructure of the cancellous bone on different time points. **Results** With the time extension, BMD and mechanic properties of sheep in group A and B decreased compared to those in group C. The microstructure of cancellous bone appeared osteoporotic changes in group B compared to that in group A at micro-CT. **Conclusion** Osteoporosis sheep model can be established effectively by the method of glucocorticoid injection and ovariectomy rapidly. In 9 months or 12 months the model is ideal.

Key words: Osteoporosis; Glucocorticoid; Bone mineral density; Biomechanics; Animal model; Sheep; Micro-CT

目前随着世界人口老年化比例不断上升,越来越多的人出现因骨质疏松引发的脊柱相关临床疾病^[1,2];椎体骨折、椎体滑脱及退变性脊柱侧弯等。在临床的治疗中最常用的方法即椎弓根螺钉内固定

技术,为提高骨质疏松情况下椎弓根螺钉的稳定性,研究各种新型内固定器械及新型骨填充材料则是目前国内外研究的热点^[3-6]。因此,建立用于生物力学测试的大动物模型对新技术及新型内固定器械的研究,具有重要的意义。目前适用于骨质疏松大动物实验研究的动物主要有狗、猪、羊、非人类灵长

基金项目: 全军后勤科研计划面上项目(CCD14J003)

* 通讯作者: 徐永清, Email: xuyongqing_kunming@163.com

类动物等^[7-9],以羊为主,建立骨质疏松模型的方法主要有^[10-12]:去势法,激素诱导及低钙饮食等方法。上述方法均可促使骨质流失,最终引起骨密度(Bone Mineral Density, BMD)下降而建立骨质疏松模型。利用去势复合激素诱导的方法可建立骨质疏松大动物模型^[13,14],目前国外已有相关报道,但国内在这方面的研究报道较少,尤其是对骨质微观结构变化及其生物力学变化之间关系方面未见相关报道。本实验则通过去势+激素诱导的方法建立绵羊骨质疏松椎体模型,通过 Micro-CT 观察其微观结构,评价骨质微观结构变化与其生物力学性能之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

选取 24 只雌性健康小尾寒羊。年龄: 3 ± 0.5 岁,体重: 32 ± 3.5 kg,均已过生育哺乳期,由成都军区昆明总医院动物中心提供。

1.2 实验设备

Explore Locus SP 型显微 CT(Healthcare, GE, U. S. A.); 特制的短尾椎弓根螺钉及灌注固定器(山东威高骨科材料有限公司); 双能 X 线吸收骨密度仪(Lunar Corp, Madison, WI, USA); 生物力学测试机(AG-IS, 日本岛津公司)。

1.3 实验分组

选用 3 ± 0.5 岁绵羊 24 只,完全随机分配至 3 个处理组: A 组(去势组,摘除绵羊双侧卵巢), B 组(去势+激素组,摘除绵羊双侧卵巢+注射甲泼尼龙 0.45 mg/kg/d), C 组(假手术组,腹腔打开后未进行双侧卵巢摘除及激素注射),每组 8 只绵羊。其中两组均需在麻醉下进行双侧卵巢摘除术,术前半小时及术后三天均给予头孢唑林钠 1g 肌注。术后伤口愈合良好,两周后拆线。观察时间点为经过相应处理后 9, 12 月,每个时间点各组分别为 4 只羊。

1.4 BMD 检测

在术前及术后 9, 12 月时间点, A, B, C 各组绵羊经肌肉注射速眠新及异丙嗪复合麻醉,麻醉成功后,对各组绵羊腰椎进行 BMD 检测,每只羊选取 L_1 - L_5 椎体作为扫描对象,并计算 L_1 - L_5 椎体的 BMD 均值。

1.5 Micro-CT 检测

在每个时间点, A, B, C 各组随机抽取 2 只羊并将其安乐死,每只羊选取 L_1 - L_5 椎体,随机抽取 10

个腰椎,用牙科齿锯去除腰椎附件及椎体上下终板,再用直径 5 mm 环钻钻取椎体中央处骨质,制成直径为 5 mm,高度 30 mm 的标本,分别将标本放入 Micro-CT 样本杯中,在相同的条件下进行三维 CT 扫描重建,扫描分辨率 $14 \mu\text{m}$ 。扫描结束后,采用 GE 公司的配套软件分析椎体中央处骨小梁三维微观结构并采集骨小梁的空间结构参数:骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. th),发生骨质疏松时, Tb. Th 值减小;骨小梁数量(Trabecular Number, Tb. N)发生骨质疏松时, Tb. N 的值减小;骨小梁分离度(Trabecular Separation, Tb. Sp) Tb. Sp 增加,提示骨吸收增加,可能发生骨质疏松;相对骨体积或骨体积分数(Bone Volume to Tissue Volume),即骨小梁的体积(BV)除以 ROI(感兴趣区)的体积(TV),以%表示。

1.6 生物力学测试

1.6.1 轴向拔出力试验: A, B, C 各组随机抽取 5 个椎体,并经椎体双侧椎弓拧入特制的椎弓根螺钉,然后进行轴向拔出力试验。将椎体安装在自制夹具上,保持螺钉轴向受力。用日本岛津 AG-IS 系列生物力学测试机,以 5 mm/min 的速度轴向牵拉,直至螺钉被拉出,记录各组椎体的最大轴向拔出力($F_{\max}$)及其能量吸收值。螺钉被拔出的标准是位移-拔出力曲线到最高点后随即明显下降。实验机的载荷信号由计算机数据采集系统记录,并由相应的测试软件计算出螺钉的最大轴向拔出力及拔出的能量吸收值。实验过程中用生理盐水保持标本处于湿润状态。选取双侧椎弓根螺钉的最大轴向拔出力($F_{\max}$)及其能量吸收值的平均值为测试结果。

1.6.2 垂直压缩试验: 在 A, B, C 各组随机取出 10 个椎体,去除所有脊柱的附件,仅保留椎体,假设椎体为圆柱形根据每个椎体的前后径,求出平均直径和体表面积。用义齿基托树脂将椎体下端 8-10 mm 包埋于特制的圆形金属容器内,以 2 mm/min 的速度进行椎体整体轴向压缩,直至椎体出现断裂,记录最大轴向压缩载荷(F)及能量吸收值,最大应力(σ_{ult}) = 最大压力/体表面积(N/cm^2)^[6],即椎体的最大抗压强度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件分析。不同处理组 BMD 均值、 $F_{\max}$ 均值及 σ_{ult} 均采用完全随机的单因素方差分析及 Dunnett-t 检验、SNK-t 检验进行比较。EXCELL2007 制作图表。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BMD 测量结果(表 1)

表 1 不同时间点 A,B,C 各组绵羊腰椎 BMD 数值情况
Table 1 BMD of the lumbar vertebrae in group A, B, and C at different time points

时间点	数量	A 组 BMD(g/cm ²)	B 组 BMD(g/cm ²)	C 组 BMD(g/cm ²)
术前	8	1.08 ± 0.07 [#]	1.04 ± 0.07 [#]	1.04 ± 0.08 [#]
9 个月	8	0.92 ± 0.05 ^{a,b}	0.79 ± 0.05 ^{a,b}	1.04 ± 0.08 ^{c,b}
12 个月	4	0.76 ± 0.03 ^{a,b,d}	0.67 ± 0.04 ^{a,b,d}	1.06 ± 0.08 ^{c,b}

注: [#]表示术前 A,B,C 各组组间 BMD 数值比较, $P > 0.05$; ^a $P < 0.05$ VS 同一组术前 BMD 数值; ^b表示 A,B,C 各组组间 BMD 数值在同一时间点的比较, $P < 0.05$; ^c $P > 0.05$ VS 术前 C 组 BMD 数值; ^d表示 12 个月时间点 BMD 与 9 个月时间 BMD 的比较。

Note, [#] $P > 0.05$, comparison of BMD among group A, B, and C before the operation; ^a $P < 0.05$, BMD vs. same group before the operation; ^b $P < 0.05$, BMD between different groups at the same time point; ^c $P > 0.05$, vs. BMD before the operation in group C; ^d $P < 0.05$, BMD between 12 months and 9 months.

结果显示:术前 A,B,C 各组组间 BMD 无显著差异,无统计学意义;经相应处理后,在 9 个月时间点时,A,B 各组 BMD 均较术前分别下降 16.8%、23.5%,有显著差异,具有统计学意义;在 12 个月时间点时,A,B 各组 BMD 均较术前分别下降 25.5%、32.8%,有显著差异,具有统计学意义;同时 C 组在 9,12 个月时间点 BMD 与术前无显著差异,无统计学意义;在 9,12 个月的同一时间点上横向比较,B

组较 A 组及 C 组 BMD 下降明显,A 组较 C 组 BMD 下降明显,有显著差异,具有统计学意义;在 9,12 个月的同一组内纵向比较,12 个月时间点上,A,B 组 BMD 均较 9 个月时 BMD 下降明显,有显著差异,具有统计学意义。

2.2 Micro-CT

2.2.1 骨小梁的空间结构参数(表 2)

表 2 A,B,C 各组不同时间点椎体骨小梁空间结构参数值
Table 2 Cancellous bone index in group A, B, and C at different time points

分组	参数	数量	时间点(月)	
			9	12
A 组	Tb. th	10	0.53 ± 0.03 ^{a,d}	0.48 ± 0.05 ^{a,d}
	Tb. N	10	2.17 ± 0.08 ^{a,d}	1.85 ± 0.06 ^{a,d}
	Tb. Sp	10	0.29 ± 0.04 ^{b,c,e}	0.32 ± 0.04 ^{b,c,e}
	BV/TV(%)	10	55.32 ± 2.44 ^a	49.49 ± 3.92 ^a
B 组	Tb. th	10	0.49 ± 0.04 ^{a,d}	0.39 ± 0.04 ^{a,d}
	Tb. N	10	1.74 ± 0.10 ^{a,d}	1.64 ± 0.09 ^{a,d}
	Tb. Sp	10	0.32 ± 0.04 ^{b,c,e}	0.37 ± 0.06 ^{b,c,e}
	BV/TV(%)	10	49.29 ± 3.32 ^{a,d}	49.59 ± 3.80 ^{a,d}
C 组	Tb. th	10	0.65 ± 0.06 ^{a,d}	0.64 ± 0.07 ^{a,d}
	Tb. N	10	2.24 ± 0.06 ^{a,d}	2.16 ± 0.08 ^{a,d}
	Tb. Sp	10	0.26 ± 0.03 ^{b,c,e}	0.27 ± 0.05 ^{b,c,e}
	BV/TV(%)	10	66.61 ± 5.39 ^{a,d}	64.37 ± 4.68 ^{a,d}

注: ^a表示 A,B,C 各组间在同一时间点上,各组间骨小梁空间结构参数(Tb. th、Tb. N、BV/TV)的相互比较, $P < 0.05$; ^b表示 A,B 两组 Tb. Sp 在同一时间点的比较, $P > 0.05$; ^c表示 A,B 两组与 C 组的 Tb. Sp 在同一时间点的比较, $P < 0.05$; ^d表示不同时间点上,同一组内骨小梁空间结构参数(Tb. th、Tb. N、BV/TV)的横向比较, $P < 0.05$; ^e表示不同时间点上,同一组内 Tb. Sp 的横向比较, $P > 0.05$;

Note, ^a $P < 0.05$, comparison of Tb. th, Tb. N, and BV/TV in group A, B, and C at the same time point; ^b $P > 0.05$, comparison of Tb. Sp between group A and B at the same time point; ^c $P < 0.05$, comparison of Tb. Sp among group A, B, and C; ^d $P < 0.05$, comparison of Tb. th, Tb. N, and BV/TV in the same group at different time points; ^e $P > 0.05$, comparison of Tb. Sp in the same group at different time points.

结果显示:A,B,C 各组在同一时间点,各组间骨小梁空间结构参数(Tb. th、Tb. N、BV/TV)相互比较均具有显著差异,具有统计学意义;A,B 两组在

同一时间点,各组 Tb. Sp 相互比较不具有显著差异,不具有统计学意义;A,B 两组与 C 组在同一时间点比较 Tb. Sp,有显著差异,具有统计学意义。在

A,B,C 各组内,不同时间点骨小梁空间结构参数 (Tb. th、Tb. N、BV/TV) 相互比较均具有显著差异,具有统计学意义;在 A,B,C 各组内,不同时间点 Tb. Sp 横向比较,不具有显著差异,不具有统计学意义。说明 A、B 两组随着时间的延长,其椎体骨小梁空间结构朝骨质疏松的方向发展,同时 B 组椎体骨质疏松程度较 A 组明显。

2.2.2 骨三维重建影像:如图 1 所示,A、B 两组椎体中央骨小梁其空间结构随着时间的延长,其骨小梁结构均出现骨质疏松样变化,骨小梁变薄、骨小梁间距增宽,骨小梁部分断裂,骨小梁结构完整性破坏,A 组椎体骨小梁结构变化较 B 组更明显,但 C 组椎体中央骨小梁结构完整,骨小梁无明显变薄,骨小梁间距无显著变化,并未随时间的延长出现骨质疏松样变化。

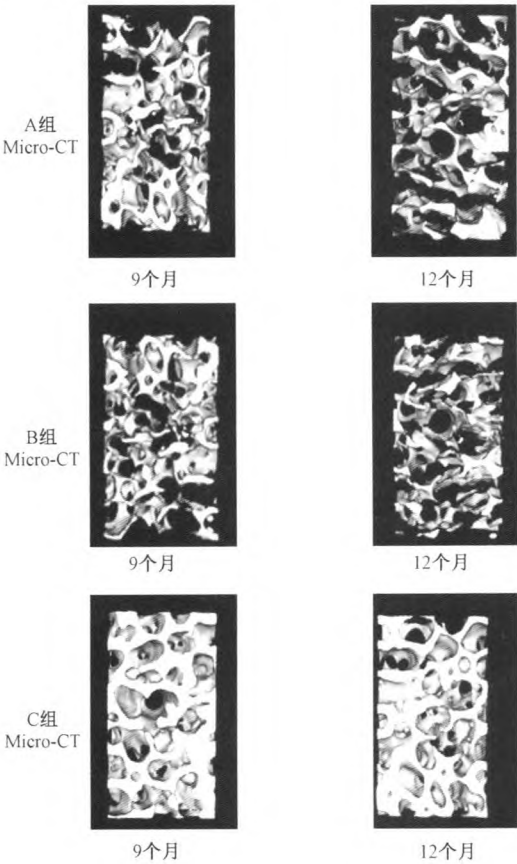


图 1 A,B,C 三组椎体中央骨小梁的三维重建图

Fig. 1 3D reconstruction of central cancellous bone in group A, B, and C

2.3 生物力学检测结果(表 3)

结果显示:A,B,C 各组在同一时间点,椎体经轴向拔出力实验及垂直压缩实验,B 组的 F_{max} 及 σ_{ult} 较 A 组及 C 组显著下降,且 A 组 F_{max} 及 σ_{ult} 亦较 C

表 3 A,B,C 各组不同时间点椎体最大轴向拔出力 (F_{max}) 及最大抗压强度 (σ_{ult}) 数据表

Table 3 Data of F_{max} and σ_{ult} in group A, B, and C at different time points

分组	参数	数量	时间点(月)	
			9	12
A 组	F_{max} (N)	10	724.56 ± 128.00 ^{a,b}	525.80 ± 112.85 ^{a,b}
	σ_{ult}	5	645.74 ± 60.52 ^{a,b}	513.80 ± 125.01 ^{a,b}
B 组	F_{max} (N)	10	653.80 ± 71.72 ^{a,b}	406.80 ± 71.61 ^{a,b}
	σ_{ult}	5	525.80 ± 110.22 ^{a,b}	365.80 ± 71.54 ^{a,b}
C 组	F_{max} (N)	10	946.88 ± 84.14 ^{a,c}	869.85 ± 129.10 ^{a,c}
	σ_{ult}	5	932.85 ± 129.85 ^{a,c}	875.86 ± 123.85 ^{a,c}

注:^a表示 A,B,C 三组在同一时间点上, F_{max} 及 σ_{ult} 纵向比较, $P < 0.05$; ^b表示 A,B 三组分别在各自组内不同时间点上, F_{max} 及 σ_{ult} 横向比较, $P < 0.05$; ^c表示 C 组在不同时间点上, F_{max} 及 σ_{ult} 横向比较, $P > 0.05$ 。

Note, ^a $P < 0.05$, comparison of F_{max} and σ_{ult} in group A, B, and C at the same time point; ^b $P < 0.05$, comparison of F_{max} and σ_{ult} in group A, B, and C at different time points; ^c $P > 0.05$, comparison of F_{max} and σ_{ult} in group A, B, and C at different time points.

组下降,具有显著差异,有统计学意义;在不同时间点上,随着时间的延长,A,B 各组的 F_{max} 及 σ_{ult} 呈不断下降的趋势,均有显著差异,有统计学意义。

3 讨论

骨质疏松症是全世界最流行人类疾病之一^[15],脊柱是最常发病的部位之一。骨质疏松的特点为骨质丢失及骨组织微观结构破坏,且伴随骨质脆性增加及易于发生骨折^[16]。在骨质疏松的情况下,由于骨质的丢失,椎体 BMD 下降,骨小梁数量减少、变薄、间距增大,最终导致脊柱内固定固定失败,表现为螺钉松动拔钉、断裂和移位。因此,提高在骨质疏松情况下椎弓根螺钉的固定效果是国内外的研究热点^[3-6],而解决上述问题的前提,就是要基于骨质疏松脊柱模型进行相关的体内研究,其中以生物力学测试作为实验检测金标准,因此必须选择合适的动物来建立骨质疏松脊柱模型。

目前主要选择绵羊用于骨质疏松研究的模型动物,与其他动物比较羊有以下优点:①物种丰富,与猪、犬及灵长类动物比较,购买相对经济,获得动物途径较多;②寿命较长,通常为可活到 10 岁以上,便于进行骨质疏松状态下的长期实验研究,可以观察研究的远期效果^[7];③绵羊体形及骨骼较大,可耐受长期反复抽取大量血、尿标本及骨组织活检标本,同时方便研发的内置物及假体的植入^[8];④雌性成

年羊激素分泌规律,自发性排卵,与成年女性之间的激素分泌时间和数量相似,具有与成年女性相似的排卵周期^[9,10],因而当摘除绵羊卵巢可出现人类女性绝经后的骨质丢失情况,进而出现绝经后骨质疏松,而犬在摘除卵巢后,只会出现短暂的骨量丢失,不会诱导出骨质疏松^[10];⑤绵羊脊柱结构与人类相似,适合做相关脊柱手术操作^[11]。因此羊是做为骨质疏松大动物研究的理想动物。

目前建立骨质疏松模型的方法主要有:去势法,激素诱导,低钙饮食三种方法,尤其是前两种方法。去势骨质疏松的动物模型是为了模拟女性绝经后因雌激素水平下降而出现骨矿含量不断减少,导致原发性骨质疏松。该模型于 1969 年首先由 Saville 用大鼠建立,经多年研究者证实:去势雌鼠骨质疏松模型已成为标准化的公认的绝经后骨质疏松症经典病理模型。Turner 等^[14]对绵羊采用卵巢切除术建立骨质疏松模型,发现在双侧卵巢切除后 6 个月髂骨骨小梁容量、骨小梁厚度明显低于手术前($P < 0.01$);骨小梁间距则明显高于手术前($P < 0.01$)。而就去势骨质疏松模型的生理机制,研究者认为^[16-17]由于卵巢摘除后,卵巢功能的下降导致雌激素(Estrogen, E)水平显著下降,并伴随卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)相应的增加,两者的复合作用导致骨吸收活动明显活跃以及在一段时间内骨质的迅速丢失,这也是绝经后骨质疏松发生的关键因素。因为 E 是调控骨代谢的主要激素, E 主要通过抑制破骨细胞来抑制骨重塑的活动,进而抑制骨吸收。当卵巢摘除后引起 E 缺乏,增加造血祖细胞活性并提供大量的破骨细胞池,延长破骨细胞的生命周期,进而促进破骨细胞的活性及形成,最终引起骨质的丢失、骨脆性增加及易于发生骨折^[18-20]。但也有学者认为单纯卵巢摘除诱导骨量丢失相对困难,因为其骨量丢失速度缓慢且丢失量不充分,若要出现大量的骨质丢失亦要在一年或更长的时间^[21,22]。这与国内学者吴子祥的研究结果^[15]一致,吴子祥研究认为通过 OVX 方法可建立绵羊 OP 模型,但其去势时间应当在 1 年以上才可确保模型的成功。

而目前国内外学者均一致认为^[23-26]应用糖皮质激素,可促进成骨细胞凋亡、减少成骨细胞活性以及破坏骨髓间充质干细胞成骨细胞分化而负性影响骨形成。研究发现在去势及激素处理的绵羊中,绵羊骨形成标志物骨钙蛋白受快速而持久抑制,其水平与临床上绝经后女性应用激素治疗后其骨形成标

志物受快速抑制的水平一致^[25]。然而一些研究表明单纯应用激素处理后,虽然会导致更多且严重骨质的丢失,但在停止使用激素处理后 3 个月,骨量丢失的情况会消失^[27-28]。而采用去势复合激素的方法,不仅能使骨量丢失快速发生,而且即使停止使用激素 6 个月内,骨质丢失仍会持续存在^[29]。因此,采用 OVX 复合激素的方法建立骨质疏松动物模型,不仅可以较快速建立,而且其骨质疏松程度持续稳定,所以采用 OVX 复合糖皮质激素的建模方法是目前研究的热点。

Schorlemmer 等^[30]对行 OVX 后的绵羊持续注射甲强龙(0.45mg/kg/天)6 个月后发现,该方法使皮质骨和松质骨的生成显著减少,皮质骨的厚度显著降低;1 年后松质骨的生成、松质骨的 BMD 和压缩刚度分别下降了 38%、34% 和 55%。然而,也有研究发现^[31]在绵羊 OVX 手术后 10 周内出现骨形成增加,并持续至手术后 6 月。我们基于 OVX 术后绵羊椎体在术后半年之内会出现骨形成增加的原因,因此选择实验观察时间为术后第 9 及第 12 个月。

本实验分别采用去势+激素诱导的方法建立绵羊椎体骨质疏松模型,通过在不同时间点的观察,我们发现随时间的延长, A 组及 B 组的 BMD 及生物力学参数均出现下降,在 9 个月时间点时, A、B 各组 BMD 均较术前分别下降 16.8%、23.5%,在 12 个月时间点时, A、B 各组 BMD 均较术前分别下降 25.5%、32.8%,有显著差异,具有统计学意义。由于本实验的实验对象为绵羊,无法做峰值骨密度调查。根据人骨质疏松的标准,可用骨量丢失百分率(%)诊断法^[32-33]: M-12% 正常; M-13%-24% 骨量减少; M-25% 骨质疏松症(根据诊治的要求分为轻、中、重三级); M-25% 伴有一处或多处骨折为严重骨质疏松症。因此,根据这一标准, B 组在 9 个月时间点,即可基本达到骨质疏松的诊断标准,而 A 组要在 12 个月的时候才满足骨质疏松的诊断标准,这一研究结果与国内外相关研究结果基本一致^[15,30,34]。

Micro-CT 是目前临床上一种先进的、非侵入性对骨质的微观结构评估手段,不仅可以对骨质的微观结构进行三维重建,进行精确、直观的观察,还可对松质骨骨小梁的结构参数进行计算测量,为骨质疏松程度判断提供更为较为准确的定性及定量资料,为骨质疏松情况下骨质力学变化提供可靠依据。本实验中我们采用 Micro-CT 对 A、B 两组的椎体骨小梁微观结构变化进行三维立体观察,并计算出相

应骨小梁空间结构参数,我们发现 A、B 两组均出现骨质疏松样变化:骨小梁变薄、数量减少及间距增宽。在同一时间点上,B 组的骨小梁骨质疏松化变化较 A 组更明显,且其相应的生物力学性能亦出现相应下降,说明激素复合去势的方法进一步加剧绵羊椎体骨质疏松化变化,其骨密度及骨小梁微观结构变化均进一步说明了这一点。

综上所述,去势及去势+激素诱导的方法均可导致绵羊椎体 BMD 及生物力学性能下降,且椎体骨小梁微观结构均朝骨质疏松化方向变化,两种方法均可建立绵羊骨质疏松椎体模型,但是两种方法的建模成功时间有差别,通过去势+激素诱导的方法建模时间更短,且骨小梁空间结构更接近骨质疏松的结构,因此我们认为采用去势+激素诱导 9 个月以上的方法,绵羊椎体更接近于骨质疏松建模的标准,可为脊柱内固定器械的研发提供骨质疏松动物椎体模型。

【参 考 文 献】

- [1] Nguyen T V, Center J R, Eisman J A. Association between breast cancer and bone mineral density: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. [J]. *Maturitas*, 2000, 36(1): 27-34.
- [2] Gaines R J. The use of pedicle-screw internal fixation for the operative treatment of spinal disorders [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2000, 82-A(10): 1458-1476.
- [3] Yerby S A, Toh E, McLain R F. Revision of failed pedicle screws using hydroxyapatite cement. A biomechanical analysis. [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1998, 23(15): 1657-1661.
- [4] Pfeifer B A, Krag M H, Johnson C. Repair of failed transpedicle screw fixation. A biomechanical study comparing polymethylmethacrylate, milled bone, and matchstick bone reconstruction. [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1994, 19(3): 350-353.
- [5] Moore D C, Maitra R S, Farjo L A, et al. Restoration of pedicle screw fixation with an in situ setting calcium phosphate cement. [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1997, 22(15): 1696-1705.
- [6] FAN Shicai, LIU Shixue, DENG, Yu xing, et al. An invitrol biomechanical evaluation of effect of augmentation on pedicle screw fixation with polymethylmethacrylate on osteoprotic spine stability. *Chinese J Reparative and Reconstructive Surgery*, 2004, 18(3): 168-170.
- [7] Borsari V, Fini M, Giavaresi G, et al. Osteointegration of titanium and hydroxyapatite rough surfaces in healthy and compromised cortical and trabecular bone; In vivo comparative study on young, aged, and estrogen deficient sheep [J]. *J Orthop Res*, 2007, 25: 1250-1260.
- [8] Reinwald S, Burr D. Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(9): 1353-1368.
- [9] Ilonka M, Sigrist, Christian Gerhardt, Mauro Alini, et al. The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep [J]. *J Bone Miner Metab*, 2007, 25: 28-35.
- [10] Fukuda S, Iida H. Effects of orchidectomy on bone metabolism in beagle dogs [J]. *J Vet Med Sci*, 2000, 62(1): 69-73.
- [11] Pearce AI, Richards RG, Milz S, et al. Animal models from implant biomaterial research in bone: A review [J]. *Eur Cell Mater*, 2007, 2(13): 1-10.
- [12] Reid I R. Glucocorticoid-induced osteoporosis. [J]. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2000, 14(2): 279-298.
- [13] Turner AS, Par RD, Aberman HM, et al. Effects of age and ovariectomy on trabecular bone of the proximal femur and iliac crest in sheep [J]. *Orthopedic Research Society*, 1993, 17(3-4): 805.
- [14] 吴子祥, 雷伟, 胡蕴玉. 骨质疏松绵羊模型皮质骨及皮质骨的微观结构及力学性能变化的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13(8): 537-541, 546.
- [15] WU Zixiang, LEI Wei, HU Yunyu, et al. The trabecular and cortical bone difference in ovariectomized sheep: a densitometric, histomorphometric and biomechanical study [J]. *Chinese Journal of Osteoporos*, 2007, 13(8): 537-541, 546. (in Chinese)
- [16] Maria Felicia Faienza, Annamaria Ventura, Flaviana Marzano, et al. "Postmenopausal Osteoporosis: The Role of Immune System Cells," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2013, Article ID 575936, 6 pages, 2013. doi:10.1155/2013/575936
- [17] B. L. Riggs, S. Khosla, L. J. Melton III. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton [J]. *Endocrine Reviews*, 2002, 23(3): 279-302.
- [18] C. J. Rosen. Pathogenesis of osteoporosis [J]. *Bailliere's Best Practice & Research*, 2000, 14(2): 181-193.
- [19] R. L. Jilka, G. Passeri, G. Girasole, et al. Estrogen loss upregulates hematopoiesis in the mouse: a mediating role of IL-6 [J]. *Experimental Hematology*, 1995, 23(6): 500-506.
- [20] R. L. Jilka, G. Hangoc, G. Girasole, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6 [J]. *Science*, 1992, 257(5066): 88-91.
- [21] Augat P. Glucocorticoid-treated sheep as a model for osteopenic trabecular bone in biomaterials research. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 66(3): 457-462.
- [22] Wu ZX. Effect of ovariectomy on BMD, micro-architecture and biomechanics of cortical and cancellous bones in a sheep model. *Med Eng Phys*, 2008, 30(9): 1112-1118.
- [23] Jensen PA, T. L., Abdelgawad M, Hauge E, Bollerslev J, Delaissé J-M. Arrest of the reversal phase in postmenopausal and glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(Suppl. 1): 57.
- [24] Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*, 2001, 2(1): 65-73.
- [25] Dalle Carbonare L. Comparison of trabecular bone microarchitecture and remodeling in glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(1): 97-103.

(下转第 836 页)

- 医学妇幼保健分册, 2005, 16(4): 222-224.
- Yan Zhang, YaliHu. Comparison of phytoestrogens therapy with hormone replacement therapy [J]. Foreign Medical Sciences (Section of Maternal and Child Health), 2005, 16(4): 222-224. (in Chinese)
- [6] 祁珊珊, 杨伟琦, 庞田田, 等. 去卵巢法建立 SD 大鼠绝经后骨质疏松模型手术探讨 [J]. 中国兽医杂志, 2014, 2(50): 27-29.
- Shanshan Qi, YiqiYang, TiantianPang, et al. A successful surgical procedure of rat ovariectomy for establishing an animal model of women's postmenopausal osteoporosis [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2014, 2(50): 27-29. (in Chinese)
- [7] 祁珊珊, 王永吉, 辛薇. SD 大鼠绝经后骨质疏松疾病动物模型的构建 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(1): 49-52.
- Shanshan Qi, Yongji Wang, WeiXing. An animal model establishment of SD rat with women's postmenopausal osteoporosis [J]. J Clin Exp Pathol, 2016, 32(1): 49-52. (in Chinese)
- [8] P. A. Revell. Histomorphometry of bone [J]. Journal of Clinical Pathology, 1983, 36: 1323-1331
- [9] 祁珊珊, 王永吉, 庞田田, 等. 去卵巢大鼠骨、生殖系统的组织病理学与形态计量学观察 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(7): 774-779.
- Shanshan Qi, Yongji Wang, TiantianPang, et al. Observation of histopathology and histomorphometry of the bone and the reproductive system in ovariectomized rats [J]. Chin J Osteoporos, 2015, 21(7): 774-779. (in Chinese)
- [10] Zhou YX, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects [J]. Phytother Res. 2014, 28(7): 961-975.
- [11] Estrogenic activity of Pueraria phaseoloides Roxb. Benth evaluated in Ovariectomized rats [J]. Philippine Journal of Science. 2006, 135(1): 39-48.
- [12] Dong Wook Lim, Jae Goo Kim, Yun Tai Kim. Effects of dietary isoflavones from Puerariae radix on lipid and bone metabolism in ovariectomized rats [J]. Nutrients, 2013, 5(7): 2734-2746.
- [13] 周艳, 扶晓明, 贺栋梁, 等. 不同剂量葛根异黄酮联合 VitD 对去势大鼠骨质疏松的防治 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(23): 3944-3946.
- Yan Zhou, Xiaoming Fu, Dongliang He. Prevention and treatment of osteoporosis by different doses of Puerarin isoflavones combined with VitD in ovariectomized rats [J]. The Journal of Practical Medicine, 2009, 25(23): 3944-3946. (in Chinese)
- [14] Wang Y, Zhu G, DeLuca H F. Where is the vitamin D receptor? [J]. Archive Biochemistry and Biophysics, 2012, 523(1): 123-133.
- [15] Michihara S, Tanaka T. Puerarin exerted anti-osteoporotic action independent of estrogen receptor-mediated pathway [J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2012, 58(3): 202-209.
- [16] Cândido FG, Bressan J. Vitamin D: Link between Osteoporosis, Obesity, and Diabetes [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4): 6569-6591.

(收稿日期: 2015-10-19)

(上接第 823 页)

- [26] Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. Curr Osteoporos Rep, 2005, 3(3): 98-102.
- [27] Ding M. Glucocorticoid induced osteopenia in cancellous bone of sheep: validation of large animal model for spine fusion and biomaterial research. Spine (Phila Pa 1976) 2010, 35(4): 363-370.
- [28] Ding M, Danielsen CC, Overgaard S. The effects of glucocorticoid on microarchitecture, collagen, mineral and mechanical properties of sheep femur cortical bone. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(6): 443-450.
- [29] Goldhahn J. Slow rebound of cancellous bone after mainly steroid-induced osteoporosis in variectomized sheep. J Orthop Trauma, 2005, 19(1): 23-28.
- [30] Schorlemmer S, Ignatius A, Claes L, et al. Inhibition of cortical and cancellous bone formation in glucocorticoid-treated OVX sheep. [J]. Bone, 2005, 37(4): 491-496.
- [31] Pastoureaux P, Arlot ME, Caulin F, et al. Effects of oophorectomy on biochemical and histological indices of bone turnover in ewes [J]. J Bone Miner Res. 1989(4 suppl. 1): 477.
- [32] 中国人原发性骨质疏松症诊断标准(试行). 中西医结合杂志, 1999, 19(10): 639-640.
- The Chinese diagnostic criteria of primary osteoporosis (Trial). Journal of Chinese and Western Medicine. 1999, 19(10): 639-640.
- [33] 张智海, 刘忠厚, 李娜. 中国人骨质疏松症诊断标准专家共识(第三稿·2014 版). 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(9): 1007-1010.
- ZHANG Zhihai, LIU Zhonghou, LI Na. Expert consensus on the diagnosis of osteoporosis in Chinese Population. Chinese Journal of Osteoporos, 2014, 20(9): 1007-1010.
- [34] 刘达, 张译, 潘显明, 等. 去势手术联合激素注射对绵羊腰椎生物力学性能的作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(9): 814-817, 820.
- LIU Da, ZHANG Yi, PAN Xianming, et al. The effect of ovariectomy combined with methylprednisolone injection on biomechanical properties of sheep lumbar vertebrae [J]. Chinese Journal of Osteoporos, 2012, 18(9): 814-817, 820. (in Chinese)

(收稿日期: 2016-01-26)