

· 基础研究 ·

脊髓损伤继发骨质疏松大鼠后肢骨质量变化

叶超群¹ 纪树荣^{2,3} 张昆亚⁴ 潘立冬²

摘要 **目的:**探讨脊髓损伤对大鼠后肢骨质量的影响,揭示 SCI 继发骨质疏松特点。**方法:**60 只 SD 大鼠按体重随机分为 6 组,对 20 只采用脊髓横断法在第 10 胸椎处横断脊髓制作完全性 SCI 模型,分为 SCI 6 周和 12 周组;20 只同水平处切断棘突、椎板制作假手术对照组(sham),分为 Sham 6 周和 12 周组;另 20 只分为正常 6 周和 12 周对照组。分别在脊髓损伤后 6 周和 12 周时取材,进行股骨生物力学性能和胫骨上端骨形态计量学测试。**结果:**脊髓损伤 6 周时,大鼠胫骨上端骨小梁厚度、骨小梁面积百分比明显降低($P<0.01$ 、 $P<0.05$),单位面积破骨细胞数明显增加($P<0.05$);股骨中段最大载荷明显降低($P<0.05$)。脊髓损伤 12 周时,除上述改变外,胫骨上端骨体积百分比也明显降低($P<0.05$);股骨最大载荷进一步降低($P<0.001$),结构刚度也明显下降($P<0.05$)。其他指标无明显改变($P>0.05$)。**结论:**脊髓损伤 6 周时,大鼠后肢骨已出现损害,12 周时,其损害进一步加重。

关键词 脊髓损伤;骨质疏松;后肢;骨形态计量;生物力学特征

中图分类号:R493,R681 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-01-0042-04

The influence of spinal cord injury on hinder limb bone histomorphometric and biomechanical characterization in SD rats/YE Chaoqun,JI Shurong,ZHANG Kunya,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(1):42—45

Abstract **Objective:**To determine the change of hinder limb bone histomorphometric and biomechanical characterization in rats with spinal cord injury(SCI). **Method:**Sixty SD rats were randomly divided into control group(40 cases) and experiment group (20 cases). The rats of experiment group were transected at the tenth thoracic vertebra to make models of SCI, and control group included normal control group and sham operation group in which the rats were undergone a sham procedure. At SCI 6th and 12th weeks, the hinder limb bone histomorphometric and biomechanical characterization were tested respectively with analysis techniques of histomorphometric data and femur three point bending test. **Result:** Compared with the control group, the trabecular thickness and trabecular area of proximal tibia in experiment group decreased ($P<0.05$), and osteoclast number/space of proximal tibial increased in SCI 6-weeks group($P<0.05$). The maximal load of femur shaft reduced in SCI 6-weeks($P<0.05$). In SCI 12-weeks group, BV/TV of proximal tibia reduced except for above changes ($P<0.05$). The maximal load of femur shaft further decreased ($P<0.001$), the structural rigidity of femur shaft reduced too ($P<0.05$). **Conclusion:**The hinder limb bone histomorphometric and biomechanical characterization are deteriorated significantly in rats with SCI at SCI 6-weeks. The damage is more serious at SCI 12-weeks.

Author's address Faculty of Rehabilitation of Capital University of Medical Sciences, The China Rehabilitation Research Center, Beijing,100068

Key words spinal cord injury; osteoporosis; hinder limb; histomorphometric characterization; biomechanical characterization

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后,大鼠骨代谢迅速发生改变,以骨吸收增强为特点,损伤平面下骨密度(bone mass density, BMD)降低;但 BMD 仅只是决定骨生物学质量的一个因素,不能反映骨组织的形态、结构、性能等内在特征。为全面揭示脊髓损伤继发骨质疏松(osteoporosis, OP)的特点,我们利用体视学和生物力学方法对脊髓损伤大鼠后肢骨组织形态计量学和骨生物力学特征进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雌性 10 周龄 SD 大鼠 60 只(军事医学科学院动物中心提供),体重 200—230g,随机分为 6 组,每组 10 只。脊髓损伤 6 周组(SCI6): 220 ± 8.94 g;假手术

1 首都体育学院保健康复教研室

2 首都医科大学康复医学院,中国康复研究中心,北京丰台区角门北路,100068

3 通讯作者:纪树荣,(中国康复研究中心康复部,100077)

4 首都医科大学生物工程教研室

作者简介:叶超群,女,讲师

收稿日期:2005-06-26

组 6 周组 (Sham6): 218.33 ± 7.52 g; 正常组 6 周组 (N6): 219.16 ± 4.91 g; 脊髓损伤 12 周组 (SCI12): 211.42 ± 8.99 g; 假手术组 12 周组 (Sham12): 211.66 ± 11.69 g; 正常 12 周对照组 (N12): 216.48 ± 8.72 g。分组后, 进行 ANOVA 验证, 各组体重差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

1.2 动物模型制作

采用脊髓横断全切术式在第 10 胸椎段横断脊髓制作完全性 SCI 模型, 假手术组在相同水平切断棘突和椎板, 手术方法及判别模型确立的标准同前^[1]。

1.3 荧光标记

各组大鼠在处死前 14、4 天注射四环素 (Sigma), 剂量为: 25mg/kg , 处死前 13、3 天注射 Calcein (北京化学试剂公司), 剂量: 5mg/kg ; 方法为颈部皮下注射。

1.4 取材和标本制备

分别在术后 6、12 周时进行, 10% 水合氯醛腹腔内注射麻醉后, 取右侧股骨、胫骨上端, 仔细剔除其周围软组织, 分别浸泡于生理盐水和 70% 酒精中, -20°C 和 4°C 保存。备行生物力学和形态计量学检测。

1.5 骨组织形态计量学

取右侧胫骨上端自胫骨粗隆处沿冠状面切开, 暴露骨髓腔, 经酒精上行梯度脱水、甲基丙烯酸甲酯浸透包埋、不脱钙切片、Giemsa 染色后, 测量、计算以下参数: 骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tbth)、骨小梁面积百分比 (trabecular area, Tbar)、单位面积破骨细胞数 (osteoclast number/space, OC.N/S)、骨体积百分比 (bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁数 (trabecular number, Tb.N)、矿化率 (minerineal, MAR)。其中, 每个标本自中部取切片 4 张, 包括普

透光镜切片和荧光显微镜切片各 2 张, 厚度分别为 $4-5\mu\text{m}$ 、 $10-25\mu\text{m}$; 每张切片取 5 个视野, 计算其平均值。

1.6 生物力学性能

将股骨置于 WD-1 型万能材料实验机上, 行股骨三点弯试验。设置跨距为 20mm , 加载速度为 2mm/min 。

1.7 统计学分析

利用 SPSS11.5 软件, 采用单因素方差分析对各时间点实验组与对照组间进行比较; 实验数据以均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

所有实验组动物根据文献^[1]标准确立模型, 其死亡率为 30% , 死亡动物不列入资料统计; 对照组所有动物一般情况良好, 均存活到实验结束; 取材、标本制备、检测过程中, 标本损坏者剔除。

2.1 骨组织形态计量学

SCI 6 周后, Tbth、Tbar、OC.N/S 较同时间各对照组明显改变 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$); BV/TV、Tb.N、MAR 无明显改变 ($P > 0.05$)。SCI 12 周时, 除 Tb.th、TBar 外, BV/TV 也较同时间各对照组降低 ($P < 0.001$ 、 $P < 0.05$), 其他各指标无明显改变 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.2 生物力学

SCI 6 周时, 股骨最大载荷明显降低 ($P < 0.05$), 结构刚度无明显改变 ($P > 0.05$); 在 SCI 12 周时, 股骨最大载荷较对照组降低 ($P = 0.000$), 结构刚度较同时间假手术对照组降低 ($P = 0.0165$), 较同时间正常对照组明显降低 ($P = 0.000$); 与 6 周相比, SCI 12 周组各参数无明显变化 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 1 不同组别骨形态计量学

($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	BV/TV (%)	Tbth (μm)	Tbar (%)	Tb.N (个/mm)	MAR ($\mu\text{m/d}$)	OC.N/S (个/mm ²)
N 6	10	24.62 ± 2.86	102.66 ± 6.86	52.66 ± 3.53	33.42 ± 8.13	2.41 ± 0.66	15.44 ± 5.32
Sham 6	10	25.55 ± 7.74	117.32 ± 18.63	51.62 ± 15.31	33.81 ± 7.81	2.64 ± 0.49	15.80 ± 4.48
SCI 6	7	19.33 ± 3.10	79.65 ± 8.44 ^②	35.07 ± 4.68 ^①	24.83 ± 6.00	3.14 ± 0.65	25.66 ± 6.57 ^①
N 12	10	23.73 ± 5.2	100.84 ± 8.75	45.99 ± 10.38	36.27 ± 11.48	2.51 ± 0.119	18.90 ± 4.41
Sham 12	10	27.42 ± 5.2	103.28 ± 3.59	53.73 ± 10.52	31.71 ± 5.06	2.49 ± 0.17	16.68 ± 4.18
SCI 12	7	16.81 ± 3.8 ^③	78.84 ± 9.61 ^④	32.57 ± 7.8 ^③	26.19 ± 8.35	2.82 ± 0.45	22.83 ± 8.26

SCI 6 周组与同时间其他组比较: ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; SCI 12 周组与同时间其他组比较: ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.001$

表 2 不同组别生物力学

组别	动物数	结构刚度 ($\times 10\mu\text{N/m}$)	最大载荷 (N)
N 6	9	123.56 ± 27.67	81 ± 8.29
Sham 6	9	109.70 ± 12.05	73.83 ± 5.03
SCI 6	7	101.61 ± 29.26	62.20 ± 12.61 ^①
N 12	8	167.8 ± 13.57	106 ± 15.636
Sham 12	8	137.86 ± 19.05	92.17 ± 14.716
SCI 12	6	110.58 ± 16.5 ^③	63.17 ± 9.04 ^②

①SCI 6 周组与同时间其他组比较 $P < 0.05$; SCI 12 周组与同时间其他组比较: ② $P < 0.0001$, ③ $P < 0.05$

3 讨论

OP 是一个多因素相关性疾病, 以骨量降低、骨显微结构破坏为特征, 常导致骨折的发生。WHO 根据 BMD 提出了 OP 的诊断标准, 但 BMD 仅反映骨量的变化, 不能反映骨的结构和生物力学性能等骨质量特征, 不能完全预测骨折的发生; 骨组织形态计量学不仅可较 BMD 早 3 个月以上反映骨量变化, 而

且还可以反映骨骼形态、结构和动态的代谢过程;骨生物力学则从骨骼的材料特性和力学特性两方面来反映骨质量;因此,美国国立卫生研究院(national institutes of health, NIH)1996 年的骨代谢研究模型和“骨生化标志物的全球招标指南”和 2000 年有关骨质疏松预防、诊断、和治疗的世界专家会议的文件要求,为揭示骨质疏松的发病机制和客观评价治疗效果,应从细胞与骨组织的形态计量变化、骨质密度、细胞-分子水平、基因表达等多个层面来研究^[2]。

3.1 SCI 继发 OP 胫骨形态计量学特征

目前,SCI 继发 OP 的研究大部分来源于临床总结,为数不多的从动物模型探讨其特点的研究也局限于对 BMD 和骨代谢相关生化指标的观察,有关 SCI 后骨组织形态计量学研究极少见,我们对此进行了研究。骨形态计量学参数主要包括骨量、骨结构和骨代谢三大类,每一类又包括许多指标,我们选取了 BV/TV、Tbar、TbN、Tbth、MAR、OC.N/S 等指标,其中,BV/TV、Tbth 反映骨量,Tbar、TbN 反映骨结构,MAR 反映骨形成,OC.N/S 反映骨吸收。

研究结果显示:SCI 6 周时,大鼠 Tbth 明显降低($P<0.01$),BV/TV 无明显改变($P>0.05$),说明此时大鼠骨量已出现减少,以松质骨为主。Tbar 较对照组降低 33%($P<0.05$),TbN 较对照组无明显改变($P>0.05$),说明骨结构已发生改变,主要表现为骨小梁面积减少。一般说来,骨量丢失有两种方式:一种是骨吸收在破骨细胞集中处进行,导致骨小梁变薄;另一种是破骨细胞在骨小梁的两侧同时进行骨吸收,使骨小梁断开,导致骨小梁数量减少,但厚度不变^[3]。二者均可引起骨小梁面积百分比减少。由此可见,在 SCI 后,骨量丢失、骨结构改变主要由第一种方式即骨吸收在破骨细胞集中处进行,导致骨小梁变薄引起。结果还显示:OC.N/S 分别较正常对照组和假手术对照组增加 66%、62%($P<0.05$),MAR 无明显改变($P>0.05$),说明 SCI 6 周时,骨代谢以骨吸收加快为特点,骨形成无明显改变,骨吸收大于骨形成,这可能正是造成上述骨量、骨结构变化的原因;此结果与我们以前的研究结果一致^[4]。在探讨 SCI 对大鼠 BMD 和骨代谢的影响的研究中,我们发现,SCI 6 周时,股骨 BMD 明显降低,反映骨吸收的骨代谢指标血 Ca 较对照组明显降低($P<0.05$),而反映骨形成的指标血碱性磷酸酶和骨钙素与对照组无明显区别^[4]。

SCI 12 周时,除 Tbar 较同时间对照组低($P<0.05$)外,Tbth 较同时间对照组进一步降低($P<0.001$),BV/TV 也出现明显降低($P<0.05$),说明此时骨量丢失和结构改变进一步加重,导致 BV/TV 降

低;该结果与相关研究结果一致。Modlesky CM^[4]应用 MRI 研究了 10 例完全性 SCI 患者(病程大于 2 年)和 8 名同年齡、身高、体重对照者的骨形态计量参数,发现 SCI 患者股骨远端和胫骨近端的 BV/TV 分别较对照组低 27%、20%,TbN 分别减少 21%、20%,骨小梁分离度分别增高 44%、33%,同时股骨远端的 Tbth 较对照组降低 8%,所有变化均有统计学意义($P<0.05$),作者认为:SCI 患者骨微结构的改变有助于提高对骨折危险性的预测。

值得注意的是,本研究结果显示:SCI 12 周时,OC.N/S 和 MAR 较对照组无明显区别,说明此时骨吸收和骨形成已形成新的偶联,在正常上限水平处于稳定状态;而我们以前的研究^[4]则显示:反映骨吸收的指标血 Ca 在 SCI 12 周时,仍在较高水平,二者结果不一致。我们认为可能与血 Ca 检测会受到多种因素影响有关;而骨组织形态计量学则能直观、客观地反映骨重塑的动态过程。据此,我们认为,在 SCI 12 周,骨吸收与骨形成已在正常上限形成新的偶联。与 6 周相比,12 周时各指标未出现统计学意义的变化;而我们以前的研究^[4]结果则显示股骨远端 BMD 在 SCI 12 周时较 6 周出现回升,对比二者,结果似乎未表现出应有的一致性。事实上,二者并不矛盾。动物和人体实验^[5]均显示:SCI 后,胫骨近端骨量丢失程度重于股骨远端,且持续时间长;我们前面的研究显示的是股骨远端 BMD 出现回升,本部分则测试的是胫骨近端的形态计量学指标,二者骨量丢失程度、持续时间本来就不一致,所以结果会表现出不一致性。

3.2 SCI 继发 OP 股骨生物力学特征

骨生物力学指标可较好地反映骨的材料和力学性能,是评价骨质量的一种可靠方法。良好的骨质量要求骨强度和韧性的统一。但是,骨的结构是依据功能而建造的,因功能不同对骨骼质量的要求不一。股骨的主要功能是负重,需要具有足够的抗弯曲能力即骨强度;因此,本研究采用三点弯曲试验对 SCI 大鼠股骨干的生物力学特性进行研究。

试验结果显示:SCI 6 周时,股骨干最大载荷分别较正常对照组和假手术对照组降低 22%、15%($P<0.05$);12 周时,股骨干最大载荷进一步降低,差异具有极显著性意义($P<0.01$),同时,结构刚度也出现明显下降($P<0.05$);说明 SCI 6 周时,大鼠股骨生物力学性能已出现改变,其抗骨折能力降低;到 12 周时,其生物力学性能和抗骨折能力进一步降低;此结果与上述形态计量学结果以及以前研究中 BMD 的结果^[4]具有较好的一致性。最大载荷是试验中引起骨折

的最大力量;结构刚度表示在弹性范围内,骨受力时发生变形的能力,反映骨强度;一般情况下,骨强度越大,其抗骨折能力越强。然而,本研究中,SCI 6周时,SCI组股骨干最大载荷较对照组降低($P<0.05$),说明抗骨折能力降低;但结构刚度与对照组无明显区别,显示骨强度无明显改变;二者未表现出应有的一致性,我们认为可能与以下因素有关:①最大载荷由试验机直接测得,而结构刚度由计算机根据最大载荷模拟出来,模拟过程可能会出现误差;②股骨干主要由皮质骨组成,其骨量和骨结构改变较慢,导致在SCI 6周时其结构刚度未出现统计学意义;因为结果显示:虽然SCI 6周时SCI组结构刚度与对照组虽然无明显区别,但分别较正常对照组和假手术对照组降低17%、7%($P>0.05$),不能排除存在降低趋势;12周时的结果证实了这一点。SCI 12周时,不仅其最大载荷进一步降低($P<0.01$),而且其刚度也出现明显下降($P<0.05$)。另外,我们还发现,在对SCI 6周大鼠取材时有个别大鼠股骨已发生骨折,12周时发生股骨骨折的大鼠例数增多,这也直接证明了SCI 6周时大鼠股骨生物力学性能出现改变,其抗骨折能力降低;SCI 12周时大鼠股骨的生物力学性能和抗骨折能力进一步下降的研究结果。有学者^[6]曾对脊髓全横断造成的OP大鼠股骨颈生物力学指标进行了研究,发现SCI 3周时,结构刚度、最大载荷、能量吸收等与对照组无差别,6周时,上述各项指标均降低;Sugawara H^[7]等则发现SCI 8周时,股骨干、胫骨干最大扭矩、股骨远端、胫骨近端压缩载荷均与对照组无区别,24周时出现显著降低。这些结果从不同的侧面显示:SCI后,股骨的

生物力学性能逐步发生改变。上述各研究选用的对象、部位、实验方法不同,所以,结果中出现变化的时间不一致。

4 结论

通过对SCI后不同时间胫骨形态计量学、股骨生物力学性能的研究,我们发现:脊髓损伤6周时,大鼠骨量、骨结构和生物力学性能均已发生改变,松质骨改变先于皮质骨发生;脊髓损伤12周时,骨结构、生物力学性能改变进一步加重;原因与破骨吸收增加有关。

参考文献

- [1] 叶超群,纪树荣,张庆民,等. 脊髓损伤后大鼠骨代谢和骨密度变化[J]. 中国康复医学杂志,2005,20(4):258—260.
- [2] 廖二元. 骨质疏松研究的现状与展望[J]. 中华内分泌代谢杂志,2002,18(2):87—89.
- [3] Ankrom MA, Patterson JA, Vetter UK, et al. Age-related changes in human estrogen receptor alpha function and levels in osteoblast[J]. Biochem J, 1998, 333(pt 3):787—794.
- [4] Modlesky CM, Majumdar S, Narasimhan A, et al. Trabecular bone microarchitecture is deteriorated in men with SCI [J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(1):48—55.
- [5] Dauty I, Perrouin Verbe B, Jaugars Y, et al. Supralesional and sublesional bone mineral density in SCI patients [J]. Bone, 2000, 27(2):305—307.
- [6] 李靖,王全平,黄鲁豫,等. 脊髓损伤对大鼠股骨骨密度与生物力学特性的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2003,25(9):524—526.
- [7] Sugawara H, Linsenmeyer TA, Beam H, et al. Mechanical properties of bone in a paraplegic rat model [J]. J Spinal Cord Med, 1998, 21:302—308.

《新编康复医学》出版发行

复旦大学上海医学院康复医学系主任、博士生导师胡永善教授主编的《新编康复医学》一书,近期已由复旦大学出版社出版发行。

《新编康复医学》是11所大学的康复医学专家教授共同编写而成,他们都具有较长期从事康复医疗和教学工作的经验,可保证其内容的质量。本书适合5—8年制医学生作为教材使用,也可供医学院校师生及其他相关科室的医务人员参考。