

实验性骨质疏松大鼠胫骨髌病理变化的图像分析研究

李莉 张平 沈乾一 韩凤岳*

(中国中医研究院骨伤科研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的 用骨计量学和去卵巢诱发骨质疏松模型的方法, 观察大鼠胫骨髌组织病理学的基本变化。方法 取 40 只成年纯系 Wistar 雌性大鼠, 随机分为 2 组, 造模组切除双侧卵巢 3 个月后, 造成骨质疏松模型。对照组不切除卵巢, 平行喂养。处死动物, 取右侧胫骨上段, 制备石蜡切片, 行 HE 和奥新蓝染色。进行组织病理学观察、图像分析骨计量学研究和统计学处理。结果 骨质疏松大鼠胫骨髌的小梁骨明显减少、变细、断裂形成纽扣状碎片、小梁骨的比面和比积减少、小梁骨和皮质骨内变性骨细胞和空化骨细胞陷凹数量增加, 小梁骨的成骨细胞减少, 而小梁骨钙化软骨轴的面积略有增加。以上数字化的指标与对照组大鼠的差异有显著性意义。结论 骨质疏松时, 骨的基本病理变化是小梁骨和皮质骨骨质破坏吸收、骨量减少、变性坏死骨细胞的数量增多和成骨细胞数量减少等。

【关键词】 骨质疏松; 胫骨; 病理学; 图像处理, 计算机辅助

Micro-image analysis for pathological alteration in the tibial condyle of rat with experimental osteoporosis
LI Li, ZHANG Ping, SHEN Qianyi, et al. Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of TCM (Beijing, 100700, China)

【Abstract】 Objective To research on primary histopathologic alteration in the condyle tibiae of rat with osteoporosis induced by ovariectomy with micro-image analysis. **Methods** 40 adult Wistar female rats were randomly divided into 2 groups: model group and control group. 3 months after bilateral ovariectomy, the rat models with osteoporosis were prepared. Rats in control group were not ovariectomy and feed same as model group. The rats were executed, and the tibiae were removed from the rats. The tibial condyles were prepared into paraffin sections and stained with HE and Alcian blue method. Histopathologic observation, micro-image analysis of osteometry, and statistic analysis were done. **Results** In the tibial condyles of model rat, the trabeculars became thin, and fracture forming into scraps as button, and trabecular amount, and trabecular specific surface and specific volume diminished distinctly, and number of metamorphic osteocytes and empty lacunae increased distinctly, and number of osteoblast decreased, area of calcified cartilage core in the trabecular was slightly augmented. There were significant differences between model and control groups. **Conclusion** In the tibial condyle of rat with osteoporosis, primary pathological alterations are that there are destroy and absorption, diminishing of bone mass in the trabecular and compact bone, and number of metamorphic and necrotic osteocyte increased, of osteoblast decreased, etc.

【Key words】 Osteoporosis; Tibia; Pathology; Image interpretation, computer-assisted

骨质疏松症是以骨量减少为特征的常见病, 可是参考书中, 对于骨质疏松症病理学变化的描述都很简短^[1,2]。确定骨质疏松症的基本病理变化, 不仅对其病理学诊断有一定的意义, 而且对于评价骨质疏松药物的疗效也有十分重要的意义。本文利用图像分析方法, 对去卵巢诱发骨质疏松大鼠的胫骨髌,

进行了计量形态学观察。现将主要结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 骨质疏松动物模型的建立

(1) 实验动物和分组。本实验用 40 只成年纯系 Wistar 雌性大鼠, 随机分为造模组 (M 组) 20 只和对照组 (N 组) 20 只。N 组即正常的成年雌性大鼠。

(2) 骨质疏松动物模型的制备。M 组大鼠, 在戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (剂量 35 mg/kg 体重) 下,

* 论文联系人

进行无菌手术,摘除双侧卵巢,术后常规喂养 3 个月。处死,取出右侧胫骨髌,通过组织病理学检查确定,已经建立骨质疏松的模型。

1.2 处死取材 造模组和对照组大鼠,同期喂养 3 个月。届时利用兰格恒流蠕动泵,经心脏一主动脉插管,用 10% 中性福尔马林溶液灌注和处死实验大鼠,即刻取出双侧胫骨上段,浸入 10% 中性福尔马林溶液内继续固定,作为脱钙和制备石蜡切片的样本。

1.3 观察和分析的主要内容

(1) 胫骨髌一般组织病理学观察。

(2) 胫骨髌小梁骨骨量的图像分析。利用美产 3Y-MIS-2000SP 型图像分析仪 (MIS-2000SP, Microimage analysis system, MAS), 连接有 CCD 图像采集系统的日产 Nikon H8-202 显微镜, 按规定的方位, 采集胫骨髌小梁骨的图像(放大倍率为 10×1), 每个样本取 2 个视野。采用 Image-Pro 图像分析的 Count/size 程序, 测量和分析以下内容: ①小梁骨面积(area), 以该视野小梁骨面积和, 作为该样本小梁骨比积的代表参数; ②小梁骨的平均直径(diameter mean); ③小梁骨的“面积比”(Pre-area), 即该区小梁骨面积与该视野面积的比值, 是反映小梁骨比积的参数; ④小梁骨周长(perimeter 2), 以该视野小梁骨周长和, 作为该样本小梁骨比面的代表参数。利用半自动化程序圈画(定义)测量目标的边界。

(3) 胫骨髌小梁骨钙化软骨轴面积、周长和光密度的测量和分析。在奥新蓝染色标本上, 钙化软骨轴呈紫红色。按上述的方法和程序采集和分析小梁骨的钙化软骨轴。

(4) 胫骨髌小梁骨骨细胞及其陷凹的计数和分

析。在 40×放大倍率下, 分别计数每个视野内正常骨细胞、变性骨细胞和骨细胞空陷凹的数量, 计算出正常细胞/骨细胞总数的百分比。该指标可以反映小梁骨内骨细胞变性坏死的程度。

(5) 胫骨上段皮质骨厚度的测量和分析。10×放大倍率下, 测量和分析胫骨上段皮质骨的平均厚度。该指标可以反映皮质骨骨量变化的情况。

(6) 胫骨上段皮质骨骨细胞及其陷凹的计数和分析。在 40×放大倍率下, 分别计数每个视野内正常骨细胞、变性骨细胞和骨细胞空陷凹的数量, 计算出正常细胞/骨细胞总数的百分比。该指标可以反映皮质骨内骨细胞变性坏死的程度。

(7) 小梁骨表面成骨细胞计数。按规定的方位, 在 40×放大倍率下, 每个样本统计 3 个视野内小梁骨表面成骨细胞的数量。该指标可以反映小梁骨的成骨活性。

1.4 统计学处理 各项数据都采取 SPSS 统计学软件, 用单因素方差分析法进行组间比较。

2 结果

2.1 骨质疏松的一般病理学变化 骨质疏松大鼠胫骨髌的主要病理变化包括小梁骨变细、减少、碎裂形成纽扣状碎骨片、小梁骨钙化软骨轴面积增大、骨吸收陷凹增多、髓腔扩大、皮质骨变薄、正常骨细胞减少、变性骨细胞增多、骨细胞空陷凹增多等等(见图 1, 2)。

2.2 小梁骨骨量图像分析的结果 表 1 的数据表明, M 组大鼠小梁骨的比面和比积明显的减少, 小梁骨变细, 即骨质疏松大鼠胫骨髌小梁骨的骨量明显减少, 组间比较差异有显著性意义。

表 1 小梁骨骨量主要数据一览表(n=28)

组别	小梁骨面积(μ²)	小梁骨比积	小梁骨周长和(μ)	小梁骨平均宽度(μ)
正常组	452710.6 ± 164776	0.236 ± 0.086	9247.6 ± 3796.1	462.2 ± 182.0
造模组	191930.3 ± 56996.5	0.100 ± 0.030	4747.1 ± 1390.3	310.7 ± 90.4
P 值	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

2.3 胫骨髌小梁骨钙化软骨轴图像分析的结果 表 2 的资料表明, M 组大鼠胫骨髌内, 小梁骨的钙化软骨轴明显地增多, 组间差异有显著性意义。

2.4 胫骨髌小梁骨骨细胞及成骨细胞图像分析结果 表 3 的资料表明, 骨质疏松大鼠胫骨髌小梁骨内正常骨细胞数量减少, 变性和脱失骨细胞数量增

表 2 小梁骨钙化软骨轴图像分析数据一览表(n=28)

组别	钙化软骨轴面积(μ²)	面积(%)	钙化软骨轴周长(μ)	平均光密度
正常组	101184.3 ± 52202.2	29.45 ± 19.5	7064.0 ± 2670.7	0.632 ± 0.076
造模组	137125.9 ± 57530.9	62.19 ± 20.8	8830.7 ± 3405.4	0.795 ± 0.098
P 值	<0.05	<0.0001	<0.05	<0.0001

表 3 小梁骨骨细胞和成骨细胞数量平均值比较表(单位:个, $n=42$)

组别	正常骨细胞	变性和空凹	细胞总数	正常细胞%	成骨细胞计数
正常组	26.7±9.5	6.9±3.5	33.6±11.9	79.18%	7.45
造模组	18.3±8.1	10.7±5.0	29.0±11.0	62.57%	23.64
P 值	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

多;而小梁骨表面成骨细胞数量减少,组间差异有显著性意义(图 3,4)。

2.5 胫骨上段皮质骨厚度图像分析结果 表 4 的资料表明 M 组大鼠胫骨上段皮质骨的厚度变薄,与正常组大鼠比较差异有显著性意义。

表 4 胫骨上段皮质骨厚度平均值比较表(单位: μ , $n=56$)

组别	正常组皮质骨厚	造模组皮质骨厚
平均值	486.02±86.85	427.32±136.54
P 值	<0.01	

2.6 胫骨上段皮质骨骨细胞及其陷凹图像分析结果 表 5 表明, M 组大鼠胫骨上段骨细胞总数(即正常骨细胞、变性骨细胞和骨细胞空陷凹的和)与 N 组比较差别无显著性意义($P>0.05$);但是 M 组正常骨细胞数减少,变性骨细胞和骨细胞空陷凹的数量增加,与 N 组比较差异有显著性意义($P<0.001$)。

表 5 胫骨上段皮质骨骨细胞数量平均值比较表(单位:个, $n=56$)

组别	正常骨细胞	变性和空凹	细胞总数	正常细胞%
正常组	40.5±11.7	15.9±4.0	56.4±13.0	70.98%
造模组	34.1±8.2	19.2±4.7	53.3±10.5	64.00%
P 值	<0.001	<0.0001	>0.05	<0.0001

3 讨论

3.1 骨质疏松症小梁骨和皮质骨骨量均有明显的减少 一些作者提出,骨质疏松的主要病理变化是松质骨内小梁骨的骨量明显减少^[2-6]。我们在双侧卵巢切除诱发大鼠骨质疏松的条件下,对胫骨髁纵切片组织形态和骨计量学的观察,不仅说明骨质疏松时,小梁骨的骨量明显地减少;而且也注意到胫骨上段皮质骨的骨量也明显地减少($P<0.01$)。这与 Valinaki 等的报道相同^[7,8]。

3.2 小梁骨成熟度降低是骨质疏松症的一个病理变化 据 Jee 等的描述(参见 Weiss: Histology, 227-234),在骨质生长活跃的样本,其小梁骨骨质的中央区,富含钙化软骨,称为钙化软骨轴(calcified cartilage core, 又称钙化软骨核心)。该指标可以反映被检测骨标本的成熟度。如果计算出小梁骨钙化软骨

轴面积的百分比(即钙化软骨轴面积/小梁骨面积×100%),大概可以进一步表明骨组织的成熟程度,即比值越大,骨的成熟度越低。在骨质破坏比较严重的样本内,其成熟骨因为吸收破坏而减少,破骨活动激发的成骨活动比较活跃和软骨骨化缓慢,从而使钙化软骨骨量增多,骨的成熟度将明显地降低。我们的观察表明, N 组大鼠小梁骨钙化软骨轴面积的百分比为 29.45%,而 M 组大鼠的是 62.19%,组间差异有显著性意义($P<0.0001$)。不仅如此,而且 M 组大鼠钙化软骨轴的比面、比积和光密度值,都高于 N 组大鼠的,其组间差异有显著性意义($P<0.05$)。造成 M 组钙化软骨轴百分比大幅度升高的主要原因是:①M 组小梁骨比积(面积)的明显降低(即比值的分母变小);②小梁骨内钙化软骨轴面积比较大(即比值的分子较大)。这可能表明 M 组大鼠股骨髁小梁骨软骨骨化的进程缓慢,造成其成熟度明显降低。

3.3 卵巢切除诱发骨质疏松大鼠胫骨髁内小梁骨的成骨活性明显地降低 许多作者认为绝经后骨质疏松症,主要是由于骨质破坏吸收增强所致,而新骨形成没有明显的降低^[3-5,7-8]。但是我们的资料表明,卵巢切除诱发骨质疏松大鼠胫骨髁内,小梁骨的成骨细胞数明显减少,骨表面不光滑,多为梭形成骨细胞被覆,在梭形细胞深方,骨细胞和新生骨基质比较少。这些与正常大鼠的情况(成骨表面光滑、富于立方形和椭圆形成骨细胞、成骨细胞深方有比较多的新生骨基质等)形成明显的对比。这些形态学和数据资料提示,骨质疏松大鼠小梁骨的成骨活性也有明显的降低。

3.4 小梁骨和皮质骨内骨细胞死亡和脱失是骨质疏松的一个重要变化 在本实验条件下可以看到,在两组样本的小梁骨和皮质骨内,都有腾空的骨细胞陷凹和变性的骨细胞,而且 M 组明显高于 N 组。一般认为,生理条件下骨细胞有不断的更新,所以可以看到一定数量腾空的骨细胞陷凹和变性的骨细胞。在卵巢切除诱发的骨质疏松样本内,正常骨细胞的数量明显低于 N 组($P<0.001$),而变性的骨细胞和空陷凹数量明显高于 N 组($P<0.0001$)。这可能表明,炎症和代谢障碍等病理因素,在激活破骨活动的同时,也启动了骨细胞变性坏死的程序。从理论上讲,骨质破坏吸收的加剧,也必然伴随着更多的骨细胞死亡。有趣的是我们发现:①在 M 组大鼠小梁骨内,骨细胞总数(正常、变性与空陷凹之和)比 N

组的低($P < 0.0001$), 而皮质骨内骨细胞总数, 两组没有差异; ②小梁骨骨量的丢失比皮质骨严重。这两个发现是一致的, 说明定量图像分析的数据提示, 在去卵巢诱发骨质疏松的条件下, 小梁骨破坏吸收的情况比皮质骨为严重, 而正常骨细胞丢失的情况与骨质破坏的程度呈正相关。在卵巢切除诱发骨质疏松条件下, 骨细胞的死亡和脱失与骨细胞凋亡的关系是一个值得探讨的问题。它既可以说明骨细胞凋亡与骨质疏松的关系, 也可以在一定的程度上揭示, 基因调控与骨质疏松发病的关系。这个问题将留待下一篇文章讨论。

3.5 关于骨计量学的探讨 随着图像分析仪的应用, 形态学计量研究得到普遍的认可。我国在骨计量学方面也有一些系统的介绍和报道^[9,10]。由于国内不脱钙骨切片仪器的制约, 用不脱钙骨切片观察骨量动态变化受到一定的限制。利用石蜡切片, 对骨的显微结构进行计量学观察和分析, 已经为骨科界所青睐。这对于研究骨质疏松和股骨头坏死为代表的骨病, 有比较大的实际意义。采用骨量动态分析的主要目的是, 检测成骨活性与破骨活性。这对于鉴别骨质丢失的机理有一定的帮助。其实, 骨量静态分析所取得的数据, 不仅是动态变动的结果, 而且有一些指标, 也反映了骨量的动态变化。例如: ①反映成骨活性的指标有成骨细胞计数和成骨表面百分比; ②反映破骨活性的指标有破骨细胞计数、骨吸收陷凹计数和陷凹表面百分比; ③小梁骨钙化软骨轴面积及其百分比, 则可以反映更新小梁骨的数量及其成熟度。鉴于在普通切片上, 准确地划定成骨表面和破骨表面的范围、计数破骨细胞数目等, 确有一定的困难, 并且需要丰富的经验, 也容易产生“人

工假象”。所以我们推荐用成骨细胞计数和小梁骨钙化软骨轴面积百分比, 作为判断成骨和破骨活性的指标: ①当成骨活性增高时, 成骨细胞计数、钙化软骨轴面积百分比和小梁骨比积都增高; ②如果成骨细胞计数和钙化软骨轴百分比正常或升高, 而小梁骨的比积降低, 则表明破骨活性增高。我们认为, 通过这样的分析也能够判断, 骨量的减少是由于成骨活性降低, 还是因为破骨活性增加所致。虽然这两个指标不能完全取代骨量动态分析的指标, 但是在不具备不脱钙骨切片的情况下, 这两个指标的意义和作用是值得同道们思考的。

(本文图 1-4 见后插页 1)

参考文献

- 1 Juan R 著. 回允中译. 阿克曼外科病理学. 第 8 版. 沈阳: 辽宁教育出版社, 2000. 1920.
- 2 白希清. 病理学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 917.
- 3 李代强. 原发性骨质疏松症病理学研究进展. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 1998, 18(1): 14-16.
- 4 Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Mineral, 1991, 15: 175-192.
- 5 Fleisch H. Pathophysiology of osteoporosis. Bone Mineral, 1993, 22 (Suppl): S3-6.
- 6 夏志道, 蔡国平, 常超英, 等. 中药补肾丹治疗去卵巢大鼠骨质疏松的研究. 中国骨伤, 1998, 11(2): 16-19.
- 7 Valinaki MJ, Jahlela R, Jones JD, et al. Bone resorption in healthy and osteoporotic postmenopausal women. Europ J Endocrinal, 1994, 131 (3): 258-267.
- 8 Marie PJ. The molecular genetics of bone formation: implications for therapeutic interventions in bone disorders. Am J Pharmacogenomics, 2001, 1(3): 175-187.
- 9 时光达, 陈宝兴. 实验骨伤科学. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 107-111.
- 10 史伟镇, 杜宁, 符诗聪, 等. 骨松 II 号对去卵巢兔骨代谢影响的骨计量学研究. 中国骨伤, 1997, 10(3): 11-14.

(收稿: 2002-10-16 编辑: 李为农)

北京天东电子医用设备公司供货信息

北京天东医疗设备有限公司生产部是多年生产口腔正畸材料、骨科器械及小针刀系列产品的专业厂家。审批文件: 京药管械经营许 20000629 号, 京药管械生产许 20000333 号, 京药管械(准)字 2001 年第 2140253 号, 京医械广审(文)200303012 号。

现办理小针刀邮购业务, 售价: I 型(20 支装)每套 120 元; II ~ III 型(10 支装)每套 90 元。每套加收 10 元包装邮资, 款到发货。地址: 北京天东医疗设备有限公司, 北京市丰台区三路居乙 12 号。邮编: 100073 电话: 010-63266458 63488112

韦氏活骨 I 号胶囊治疗家兔股骨头缺血性坏死的实验研究

(正文见 716 页)

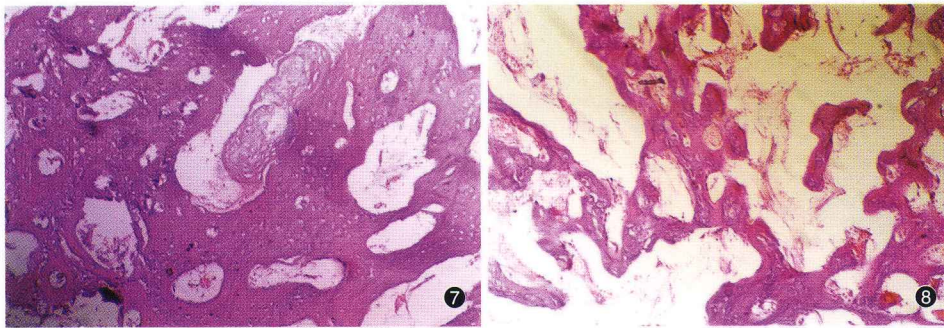


图7 实验组术后第20周组织学切片见骨小梁致密整齐,分布均匀。HE × 100

图8 对照组术后第20周负重区软骨下骨小梁杂乱稀疏。HE × 100

实验性骨质疏松大鼠胫骨髌病理变化的图像分析研究

(正文见 719 页)

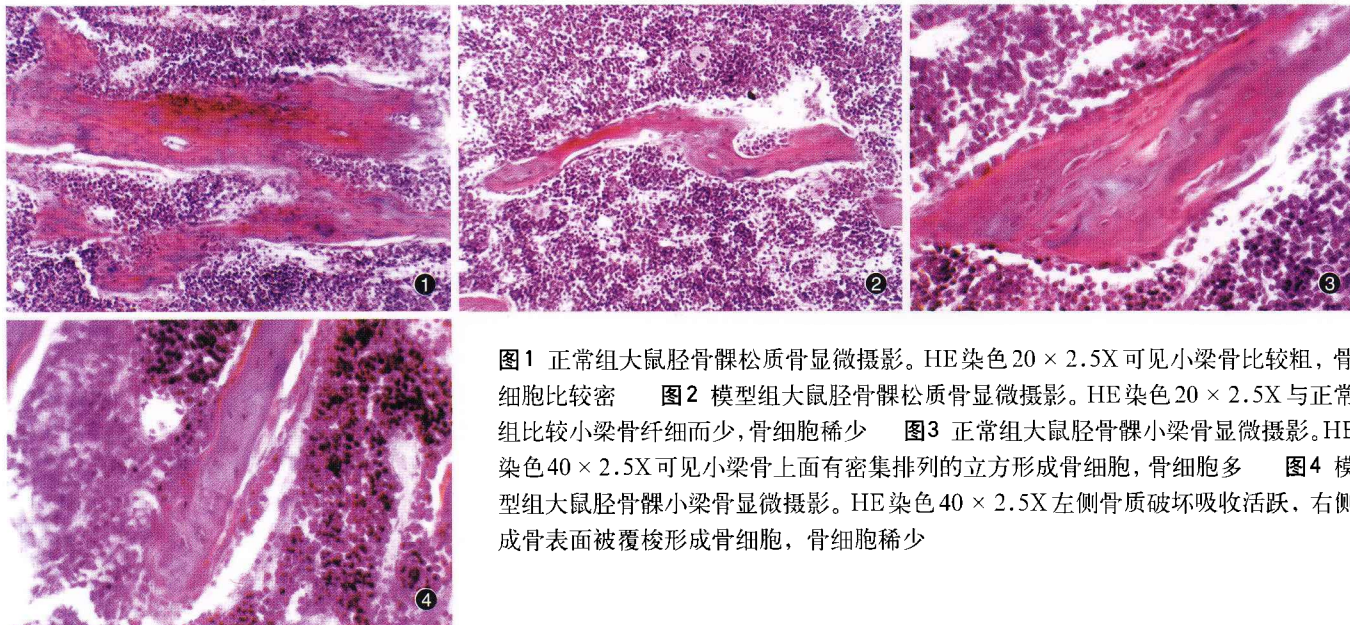


图1 正常组大鼠胫骨髌松质骨显微摄影。HE染色20 × 2.5X可见小梁骨比较粗,骨细胞比较密 图2 模型组大鼠胫骨髌松质骨显微摄影。HE染色20 × 2.5X与正常组比较小梁骨纤细而少,骨细胞稀少 图3 正常组大鼠胫骨髌小梁骨显微摄影。HE染色40 × 2.5X可见小梁骨上面有密集排列的立方形成骨细胞,骨细胞多 图4 模型组大鼠胫骨髌小梁骨显微摄影。HE染色40 × 2.5X左侧骨质破坏吸收活跃,右侧成骨表面被覆梭形成骨细胞,骨细胞稀少

磷酸钙骨水泥人工骨的制备及修复兔桡骨大段骨缺损的实验研究

(正文见 723 页)

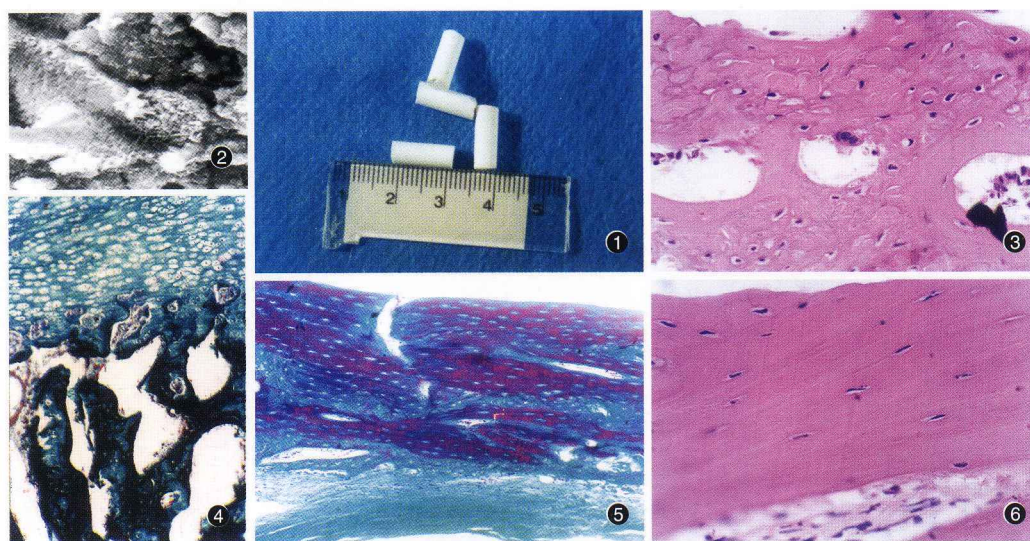


图1 CPC人工骨肉眼观察可见骨块色白,表面光滑,质硬,较脆,未见明显孔隙结构 图2 CPC骨块SEM可见骨块主要由针状、花瓣状晶体构成,微孔直径约4~10μm(SEM × 3000) 图3 植入术后4周,出现新生软骨及不成熟的骨组织,可见软骨细胞、骨细胞及破骨细胞(HE × 40) 图4 植入术后

8周,出现髓腔结构,可见大量的软骨细胞、成骨细胞及胶原组织(Masson × 10) 图5 植入术后12周,出现大量的新生软骨及成熟的骨组织,并向板层骨改建(Masson × 4) 图6 植入术后16周,骨结构逐步成熟,板层骨相互融合生长(HE × 40)