

脊髓损伤大鼠股骨松质骨超微结构的变化

李靖 王全平 李新奎 马真胜 王哲 范宏斌
(第四军医大学西京医院全军骨科研究所, 陕西 西安 710033)

【摘要】 目的 探讨脊髓损伤(SCI)对大鼠骨组织超微结构的影响及其在 SCI 后骨代谢变化中的意义。方法 40 只 3 个月龄 SD 大鼠均分为 SCI 组与对照组。SCI 组于 T₁₀ 处完全横断脊髓; 对照组仅行椎板切除术。术后 1、3 周时处死动物后用透射电镜对股骨髁部进行超微结构观察并检测血清钙(Ca)、碱性磷酸酶(ALP)、尿钙、尿钙/肌酐(Ca/Cr)的变化。结果 SCI 组大鼠 1 周时可见显著的成骨细胞凋亡的发生; 3 周时可见凋亡的骨细胞, 而成骨细胞多处于正常状态。截瘫鼠血钙、尿钙、尿钙/肌酐酶在伤后不同时间段均升高; 血 ALP 在伤后 1 周时显著下降, 3 周时恢复正常。结论 SCI 后早期成骨代谢受抑制可能与成骨细胞凋亡有关; 骨细胞凋亡可能在破骨-成骨脱偶联中起中介作用。

【关键词】 脊髓损伤; 骨细胞; 病理学

Ultrastructural investigation of the trabecular bone from rat femur following spinal cord injury LI Jing, WAN G Quanping, LI Xinkui, et al. Department of Orthopaedics, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University (Shanxi Xi'an, 710033, China)

【Abstract】 Objective To investigate the histomorphological response of bone to spinal cord injury (SCI) and its significance in bones metabolism **Methods** Forty SD rats with 3 months old were equally divided into SCI group and control group. Rats in the experimental group underwent spinal cord transection at the tenth thoracic vertebra. Control rats underwent laminectomy without any spinal cord lesion. Rats in both groups were sacrificed at 1 and 3 weeks postoperatively, with 10 animals at each interval. Biochemical testing of the serum concentrations of ionized calcium, ALP, urine concentrations of calcium and creatinine were performed at each interval. Ultrastructural observation of trabecular bone in distal femur was performed with the use of transmission electron microscopy. **Results** Condensation and margination of heterochromatins, which were the typical features of apoptosis, were obviously seen in osteoblasts at 1 week and osteocytes at 3 weeks in SCI group. Compared with control, rats with SCI had high level of serum ionized calcium, urinary calcium and urinary calcium/creatinine at each interval. At 1 week, the significant decrease of serum ALP was found in rats with SCI, however, it returns to the normal level at 3 weeks. **Conclusion** Suppression of osteogenesis in early stage may be related to apoptosis of osteoblasts and the apoptosis of osteocytes may play an important role in disorder of activation/resorption formation cycle.

【Key words】 Spinal cord injuries; Osteocytes; Pathology

骨质疏松是脊髓损伤后的主要并发症之一。其所引起的继发病理性骨折常常给患者的康复带来诸多不便。近年对于脊髓损伤患者骨密度以及骨代谢的改变作了广泛的研究, 但对于脊髓损伤后骨组织超微结构的变化尚未见文献报道。本研究利用大鼠脊髓损伤模型, 对骨组织进行透射电镜观察以探讨脊髓损伤后骨代谢变化的机理。

1 材料与方 法

1.1 实验动物分组及处理 40 只体重为(205±15) g 的 3 个月龄雌性 SD 大鼠, 随机均分为 SCI 组与对照

组。每组又根据 1、3 周不同的时间段分为 2 个亚组, 每亚组 10 只。动物用 846 合剂(解放军农牧大学生产)麻醉后于 T₁₀ 处切开椎板用锐刀横切脊髓, 对照组为假手术组则仅行 T₁₀ 椎板切除后止血缝合。术后于室温下分笼饲养, 标准大鼠饲料, 自由饮水、摄食。

1.2 标本采集及检测 动物处死前, 收集 24 h 空腹尿液, 主动脉取血 3 ml, 离心取上清液, -20℃冰箱保存。测定血钙(Ca)、血碱性磷酸酶(ALP)、尿钙(Ca)、尿肌酐(Cr)。取右股骨干骺端大小为 1 mm × 1 mm × 1 mm 的松质骨块, 4℃条件下用 2.5% 戊二

醛固定 24 h, EDTA 混合脱钙液脱钙 3 周。冲洗, 1% 四氧化锇后固定, 乙醇逐级脱水, 环氧树脂 618 定向包埋后做超薄切片, 经醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色后, 在 JEM-200 透射电镜下观察。

1.3 统计学处理 各指标均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所有比较均在 SCI 组与对照组之间, 组间比较用双尾 *t* 检验, 以 Excel 97 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 血尿生化指标测定

SCI 组术后 1 周时血 Ca

浓度显著升高, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 3 周时差异极其显著 ($P < 0.01$); 血 ALP 在 1 周时显著下降 ($P < 0.01$), 3 周时回升正常, 与对照组比较无显著性差异; 尿 Ca 浓度 1 周时显著上升 ($P < 0.001$), 3 周时继续上升, 与对照组比较, 差异极其显著 ($P < 0.001$); 用尿 Cr 校正后发现 SCI 组尿 Ca/Cr 值 1 周时上升, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$), 3 周时 SCI 组尿 Ca/Cr 比值与对照组相比差异极其显著 ($P < 0.01$) (结果见表 1)。

表 1 各组动物血尿生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	术后 1 周		术后 3 周	
	对照组 (n=10)	SCI 组 (n=9)	对照组 (n=10)	SCI 组 (n=9)
血 Ca (mmol/L)	2.15 ± 0.20	2.42 ± 0.27*	2.12 ± 0.21	2.55 ± 0.32**
血 ALP (U/L)	114.00 ± 14.10	89.40 ± 8.40**	118.40 ± 15.70	126.60 ± 14.80
尿 Ca (mmol/L)	0.28 ± 0.07	1.03 ± 0.47*	0.25 ± 0.09	1.08 ± 0.64*
尿 Ca/Cr (mmol/mmol)	0.35 ± 0.10	0.51 ± 0.19*	0.33 ± 0.09	0.54 ± 0.20**

注: 与术后同时间对照组比较: * $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$

2.2 透射电镜观察 术后 1 周时 SCI 组成骨细胞内高尔基体和内质网较少, 线粒体空泡化明显, 部分细胞可见异染色质浓聚, 呈环状边集于核膜下, 呈现早期凋亡样改变 (图 1); 对照组的成骨细胞内线粒体较多, 粗面内质网丰富, 有较多的游离核糖体 (图 2)。SCI 组还有一些向骨细胞转化的成骨细胞内异染色质增多, 浓聚、边集趋势明显 (图 3), 对比之下对照组向骨细胞转化的成骨细胞核内以常染色质为主 (图 4)。术后 3 周时 SCI 组成骨细胞可见粗面内质网较丰富, 胞浆内可见散在的游离核糖体, 与对照组比较无显著差异 (图 5, 6)。此期 SCI 组骨细胞除了正常处于静止相的骨细胞外, 还可见一些骨细胞胞体变小, 细胞器减少, 骨陷窝增大, 絮状物质增多、凝聚以及骨陷窝壁嗜锇板层的形成, 另外一些骨细胞异染色质成环形边集于核膜下呈凋亡样改变 (图 7)。对照组骨细胞核内以异染色质为主, 细胞质及细胞器较少, 陷窝内絮状物质较均匀, 四周嗜锇板层清楚, 轮廓光整, 多处于静止相 (图 8)。

3 讨论

3.1 脊髓损伤后成骨细胞的形态学变化 成骨细胞作为构成骨组织的一种细胞在骨重建的过程中起着重要的作用。破骨细胞性骨吸收后接着进行的成骨细胞骨修复活动对于正常的激活-吸收-形成偶联的维持有着重要的生理意义。本实验以大鼠作为脊髓损伤动物模型发现伤后 1 周时, 血钙、尿钙、尿钙/肌酐显著上升, 表明破骨代谢功能极度活跃, 与此阶段相对应的血 ALP 的浓度显著下降, 提示成骨

代谢功能受到严重抑制。对该期的成骨细胞的超微结构观察发现细胞内内质网及高尔基体稀少, 线粒体空泡化, 提示成骨细胞功能低下。凋亡是细胞死亡的方式之一, 骨系细胞异常发生的凋亡参与骨质疏松的发病^[1,2]。细胞的凋亡一般在数分钟内完成, 在正常骨组织电镜下极少可以观察到典型细胞凋亡的形态改变。我们在对照组未见到有成骨细胞凋亡发生, 在脊髓损伤组则可见一些成骨细胞或向骨细胞转化的成骨细胞出现异染色质浓聚成月环状边集于核膜下等典型的凋亡样改变, 说明细胞凋亡的发生较高。成骨细胞的凋亡数目增加提示维系正常破骨-成骨偶联的活性细胞数量的降低或可能存在的功能的低调, 这可能是脊髓损伤后早期破骨代谢增强的同时成骨代谢功能降低的原因之一。

3.2 脊髓损伤后骨细胞的形态学变化 骨细胞作为构成骨组织的主要细胞, 在骨量维持以及破骨-成骨偶联中起着至关重要的作用。骨细胞之间以及位于骨组织表面的成骨细胞、破骨细胞通过骨小管相互连接, 彼此组成庞大的网络系统。骨细胞在感受骨组织的应变, 调节网络的活性中起着中介作用。我们发现脊髓损伤后 1 周骨细胞在形态上与对照组比较尚无太大的差别。3 周时, 脊髓损伤组骨细胞细胞器减少, 骨陷窝增大, 絮状物质增多、凝聚以及骨陷窝壁嗜锇板层的形成; 另外一些骨细胞出现异染色质凝集、边聚, 细胞出芽等典型的凋亡样变化。骨细胞利用网样结构通过细胞间信号或细胞外的信号分子将信号传至骨表面, 激活成骨细胞、破骨细胞进

行骨改建。骨细胞还可以通过感受力学刺激,产生具有合成代谢功能的细胞因子如 IGF-1 等以旁分泌的方式作用位于骨表面的成骨细胞^[3],因此,一旦骨细胞的凋亡增加可使维系破骨-成骨偶联的中间环节的活性细胞数量减少,从而在破骨代谢持续增强的同时无成骨代谢的相应增强,最终产生偶联的失调导致骨量的丢失和骨质稀少的发生。

综上所述,通过透射电镜观察我们发现早期成骨细胞以及随后骨细胞凋亡的发生以及细胞功能低下是脊髓损伤后骨系细胞的形态学特点;细胞凋亡可能与脊髓损伤后骨代谢的改变有关。但本研究只是从形态学分析脊髓损伤后骨系细胞的变化,因此,是否细胞凋亡所致活性细胞数量减少为导致脊髓损

伤后的破骨-成骨脱偶联的原因则需要进一步对凋亡细胞进行定量分析尚可确定。

(本文图 1-8 见后插页 2)

参考文献

- 1 Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, et al. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(9): 3128-3135.
- 2 Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*, 1998, 102(2): 274-282.
- 3 Lean JM, Jagger CJ, Chambers TJ, et al. Increased insulin like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol*, 1995, 268: 318-327.

(收稿: 2001-04-23 修回: 2001-07-16 编辑: 房世源)

• 短篇报道 •

粉碎性桡骨远端骨折 60 例

孔畅 林定坤 黄刚

(广东省中医院骨一科, 广东 广州 510120)

对于严重的经关节面的粉碎性骨折,固定较为困难,远期常遗留腕关节背伸受限及疼痛或尺偏畸形,前臂旋前受限等后遗症,也是远期引起关节疼痛的主要原因。我科自 1998 年来采用手法复位,三期调整夹板,配合早期功能康复训练治疗老年粉碎性桡骨远端骨折 60 例,效果满意。

1 临床资料

共 60 例患者,其中男 18 例,女 42 例;年龄 62~90 岁,平均年龄 76.8 岁。受伤原因:平地跌伤 44 例,车祸致伤 11 例,从高处跌落 5 例。合并症情况:同时合并股骨颈骨折 2 例,股骨粗隆骨折 1 例,肱骨外科颈骨折 1 例,胸腰椎压缩性骨折 1 例。骨折分型:伸直型 42 例,屈曲型 18 例。所有患者均行腕关节正侧位检查,所有患者均为累及关节面的严重桡骨远端粉碎性骨折。

2 治疗方法

2.1 手法复位 常规血肿内麻醉,患肢屈肘位,助手牵引患肢上臂,术者牵引手腕部,维持牵引,徐徐拔伸,牵引过程中可轻轻回旋摇摆,术者在牵引的同时,先纠正患者的尺偏,再根据骨折远折端移位方向行掌屈或背伸复位,同时用力扣挤下尺桡关节,并将远端轻度旋前。

2.2 夹板固定 伸直型骨折早期夹板固定患腕轻度掌屈位,2 周后改为稍背伸位,4 周后改为功能位固定;屈曲型骨折早期夹板固定根据骨折稳定位置调整固定角度,2 周后改为功能位固定。

2.3 功能锻炼 3 d 后即在维持牵引的状态下,进行捋顺理筋手法按摩局部,并调整夹板的松紧度,1 周后在保护下由医生进行轻微的腕关节功能活动,6 周后根据患者局部情况及

X 线表现,改用双夹板保护或拆除夹板,配合中药外洗进行系统被动腕关节功能康复锻炼。

3 随访结果

所有患者均经 6~12 个月随访,全部患者均骨性愈合,疗效评定按照病种规范管理诊疗标准所定的关节内及近关节骨折疗效标准^[1],其中 I 级(优)46 例、II 级(良)12 例、III 级(尚可)2 例,优良率为 96.3%。

4 讨论

对于老年患者骨折的治疗,关节功能早期的恢复是治疗的关键,由于老年人生活要求相对年青人要少,对手部的精细度也要求不高,过份强求完美的解剖复位往往是不可能的,多次反复的整复更会加重局部的软组织损伤,极大的影响治疗效果。所以我们采用分期不同位置固定配合早期体疗治疗桡骨远端骨折,具有早期恢复关节功能,并发症少,骨折愈合快等优点。骨折早期,由于骨折端粉碎,应固定于腕关节轻度掌屈位,这样位置有利于骨折端的稳定,复位术后早期利用轻柔捋顺手法舒通经络气血,有助于肿胀的消除,减轻疼痛,但要注意早期按摩手法需在牵引下进行,以防止再移位,2 周后骨折有部分纤维骨痂生长时,应开始加强关节功能锻炼,除捋顺手法外应增加腕关节的活动外,并应将腕关节固定于背伸位,因背伸位固定近似于功能位,有利于手、腕关节功能的恢复,6 周后拆除夹板后开始在用活血化瘀消肿止痛的中药熏洗腕关节的同时,主动用力锻炼腕关节的屈伸和前臂的旋转运动,我们的体会是前臂的旋转活动较难恢复,尤其是旋后功能,这应是固定于旋前位置致旋前方肌痉挛所致。

(收稿: 2002-09-13 修回: 2002-11-22 编辑: 李为农)

BMP 和 TGF- β 对兔尺骨骨缺损修复作用的研究

(正文见 148 页)

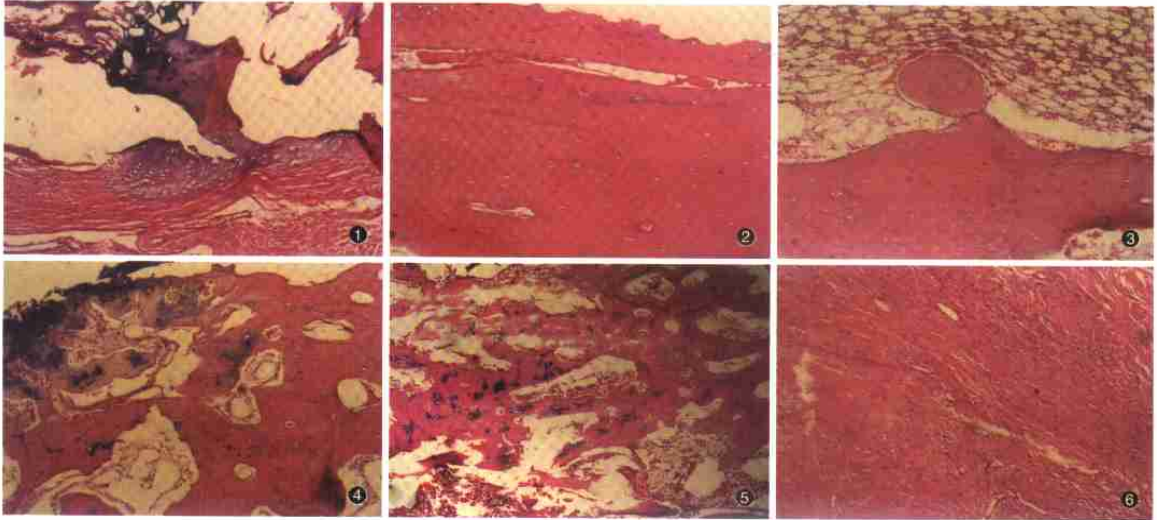


图1 TGF- β +BMP组第4周, 缺损区内出现岛状生长的新生软骨和骨组织 HE \times 100 图2 TGF- β +BMP组第8周, 新生软骨和骨组织增多, 融合成片, 出现板层骨 HE \times 40 图3 TGF- β +BMP组第12周, 缺损区修复, 被新生骨组织取代, 形成正常骨干结构, 髓腔再通 HE \times 40 图4 BMP组第12周, 新生骨内骨髓腔出现, 逐渐向板层骨结构改建但尚不完全 HE \times 40 图5 TGF- β 组第12周, 缺损区被新生骨组织取代, 骨改建不完全, 新生骨髓腔形成 HE \times 40 图6 对照组第12周, 缺损中央被纤维结缔组织充填 HE \times 40

脊髓损伤大鼠股骨松质骨超微结构的变化

(正文见 152 页)

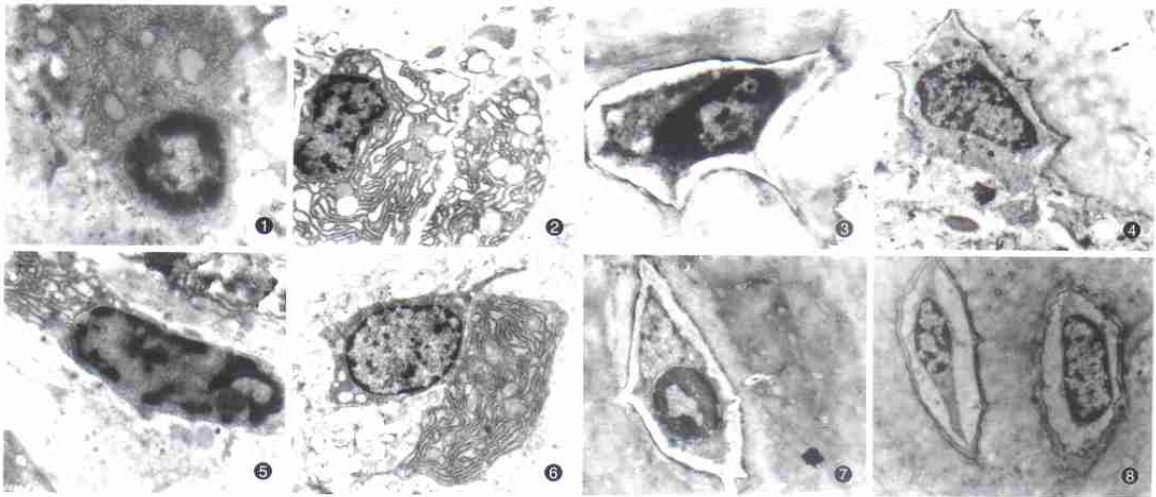


图1 SCI组1周时成骨细胞 透射电镜 \times 12K 图2 对照组1周时成骨细胞 透射电镜 \times 8K 图3 SCI组1周时成骨细胞 透射电镜 \times 10K 图4 对照组1周时成骨细胞 透射电镜 \times 8K 图5 SCI组3周时成骨细胞 透射电镜 \times 10K 图6 对照组3周时成骨细胞 透射电镜 \times 8K 图7 SCI组3周时成骨细胞 透射电镜 \times 8K 图8 对照组3周时成骨细胞 透射电镜 \times 6K