

· 基础研究 ·

雄激素对雄性去势大鼠骨微结构及力学性能的影响

代洪宾^{1,2}, 杜宁¹, 林开泽², 蒋水明¹, 张伟滨^{1,2}

(1. 上海交通大学附属瑞金医院, 上海 200025; 2. 上海市伤骨科研究所)

【摘要】 目的: 运用骨密度、骨生物力学、骨形态计量学检测、Micro CT 分析及三维结构重建的方法, 从“骨密度检测-形态学观察-功能学测试”角度出发, 观察雄激素对老龄雄性去势大鼠骨微结构及力学性能的影响。方法: 30 只 12 月龄雄性 Wistar 大鼠随机分为去势组、治疗组和假手术组, 每组 10 只。治疗组大鼠睾丸及附睾切除术后第 2 天开始, 用睾丸酮水溶液灌胃给药, 12 周后取材, 运用双能 X 线骨矿含量测定仪 (DXA) 检测治疗前后大鼠骨密度 (BMD)。取大鼠 L₅ 椎体做生物力学测试, 取左胫骨近端做骨形态计量学测试, 取 L₅ 椎体行 Micro CT 分析及三维结构重建。结果: 治疗组大鼠经雄激素干预后, 骨密度升高 24.5%。生物力学测试结果表明, 治疗组骨最大载荷、吸收能量、最大应力、弹性模量值较去势组显著升高 ($P < 0.05$)。Micro CT 分析表明, 治疗组骨小梁体积、骨小梁数目值升高, 骨小梁分离度值降低。四环素单、双标面等骨形成、骨吸收及骨矿化参数值较去势组均明显升高, 骨形成大于骨吸收。结论: 雄激素能增加去势老龄雄鼠骨密度, 促进骨形成及骨转换, 改善骨微结构, 提高骨的力学性能。

【关键词】 雄激素类; 骨密度; 骨生成; 生物力学

Effects of androgen on microstructure and mechanics nature of bone in orchietomied male rats DAI Hong-bin*, DU Ning, LIN Kai-ze, JIANG Shui-ming, ZHANG Wei-bin. *Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

ABSTRACT **Objective:** To investigate the effect of androgen on microstructure and mechanics nature of bone in orchietomied (ORX) male rats and reveal its mechanism by using the Micro CT analysis, bone biomechanics test, bone histomorphometric parameter test, and total body bone mineral density (BMD) measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). **Methods:** Thirty 12-month-old male Wistar rats were randomly divided into three groups including ORX, sham-operated (Sham) and androgen (AD) group, ten rats in every group. Total body BMD was measured by DXA. Femurs and vertebrae were then harvested at the 12th week after ORX for micro-computed tomography (Micro CT), histology and biomechanical were tested. **Results:** The administration of testosterone may reverse the decreasing BMD of total body and may prevent the decreasing weight. The biomechanical values of Maximum load, Energy, Maximum stress, Elastic Modulus of AD group significantly enhanced compared with ORX group ($P < 0.05$). The results of histomorphometric parameters showed that cancellous bone volume, osteoblast-osteoid interface, linear extent of bone formation, mineralizing surfaces, mineral apposition rate increased in the therapy group. **Conclusion:** Androgen can accelerate cancellous bone formation and bone turnover, improve bone microstructure and enhance bone intensity and BMD.

Key words Androgens; Bone density; Osteogenesis; Biomechanics

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(12):903-906 www.zggszz.com

骨质疏松症通常认为是绝经后女性或老年女性的问题, 但随着老龄化社会的到来, 男性骨质疏松症已经成为日益严重的公共健康问题。男性骨质疏松症, 常见病因是性腺机能减退和糖皮质激素的应用。男性性腺机能减退类似于绝经后女性, 体内激素水平迅速下降, 是男性骨质疏松症发生的重要原

因^[1]。虽然针对男性骨质疏松症的研究逐渐增多, 但男性骨质疏松症的发病机制及诊断标准至今缺如。目前国外骨质疏松的前沿研究采用 Micro CT 来观察骨质变化, 国内尚无相关文献报道。本实验从“骨密度检测-形态学观察-功能学测试”角度出发, 对男性骨质疏松大鼠模型骨组织做完整评估。

1 材料和方法

1.1 手术模型建立、分组及处理 30 只 12 月龄 Wistar 雄性大鼠, 上海斯莱克实验动物有限公司 [SCXK(沪)2003-0003]。随机分为去势组 (ORX 组), 假手术组 (Sham 组), 雄激素治疗

基金项目: 上海交大科技基金项目 (编号: 06XJ21028)

通讯作者: 张伟滨 E-mail: weibin@medmail.com.cn

通讯地址: 上海市伤骨科研究所 200025

组(AD 组), 每组 10 只, 体重分别为 (378±40) g, (368±29) g, (383±35) g。ORX、AD 组大鼠在 2%戊巴比妥钠麻醉完全后, 纵隔旁相距 1 cm 处各开一纵行切口, 分别将双侧睾丸与附睾分离、切除。假手术组同样方法剥离出双侧睾丸及附睾, 取少量脂肪组织后, 放回阴囊缝合切口。术后 1~3 d 予庆大霉素 4 000 U/d 肌注抗感染。睾丸酮 (欧加农公司, 批号: A76515001)生理盐水溶解后, 术后第 2 天开始对治疗组大鼠灌胃给药, 每日 26.7 mg/kg^[2]。其余组大鼠予生理盐水灌胃, 12 周后取材。

1.2 标本的制作 将四环素(Sigma 公司, 批号: 200-593-8) 稀释为 1%溶液, 分别于取材前第 13、3 天肌注四环素(40 mg/kg)进行荧光标记。取大鼠 L₅ 椎体行 Micro CT 分析及三维结构重建, L₅ 椎体行骨组织生物力学测定。取左胫骨近段, 低温塑料包埋, Jung K 重型切片连续切取 4 张 5 μm 厚不脱钙纵向切片, HE 和甲苯胺蓝染色, 行细胞观察和骨小梁结构参数检测。

1.3 观测项目与方法

1.3.1 骨小梁结构及参数测定 将 L₅ 椎体放入 Micro CT 机样本球管中, 在相同条件下行 Micro CT 扫描及三维结构重建。扫描完成后, 采用配套软件分析其骨小梁三维微观结构并采集骨小梁的空间结构参数。

将不脱钙骨切片标本置于 VIDAS 全自动图像分析系统上(德国 Zeiss 公司, 上海市伤骨科研究所), 行骨形态计量学测定。骨计量动态参数测定如下指标: 矿物质沉积率(MAR)、矿化表面积(MS/BS)、矿化延迟时间(MI)、四环素单标记面(sLs/BS)、四环素双标记面(dLs/BS)。

1.3.2 骨密度及体重测定 各组大鼠分别在手术前和取材前 1 周, 2%戊巴比妥钠麻醉完全后, 置于双能 X 线骨矿含量测定仪扫描台上 (Hologic Discovery A, 上海市第九人民医院), 取俯卧式行全身扫描, 扫描速度为 4.8 s/cm。骨密度(BMD)以骨量(BMC)(g)/骨投影面积(cm²)表示。每周称体重 1 次。

1.3.3 骨生物力学测定 将 L₅ 椎体标本置于 Instron 电拉

实验机上(Instron; 5543, USA, 复旦大学放射医学研究所)。加载速度为 10 mm/min, 直至骨折, 并制作相应的应力-应变曲线。测定如下指标: 骨最大载荷 (M-load)、最大应力 (M-stress)、弹性模量(E-lastic)、吸收能量(Energy)。

1.4 统计学方法 各测量指标结果均以均数±标准差表示, 使用 SPSS 11.0 软件对数据进行单因素方差分析和 Student-t 检验。

2 结果

2.1 骨小梁结构变化

2.1.1 骨小梁组织学观察 组织学观察发现, ORX 组骨小梁数目少, 排列稀疏, 连接性差, 骨小梁厚度降低。Sham 组和 AD 组骨小梁较粗大, 数目多, 厚度较一致, 小梁连接呈网状, 排列较有序。

2.1.2 Micro CT 三维结构重建结果 从 Micro CT 三维结构重建图可以看出, ORX 组骨小梁结构破坏严重, 中间有较大空洞; AD 组骨小梁结构完整, 破坏不明显; Sham 组骨小梁结构有破坏, 边缘有断裂(见图 1-3)。

2.1.3 Micro CT 扫描结果 ORX 组与 Sham 组比较, BV/TV、Tb.Th、Tb.N 值降低, Tb.Sp 值升高; 与 ORX 组比较, AD 组 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 值升高, Tb.Sp 值降低(见表 1)。

表 1 去势大鼠腰椎空间结构参数(̄x±s)

Tab.1 3-D microstructural properties of the vertebrae trabecular bone in male archiechtomied rats(̄x±s)

组别	BV/TV	Tb.Th(mm)	Tb.N(mm ⁻¹)	Tb.Sp(mm)
ORX 组	29.3±7.2	0.06±0.02	2.15±0.26	0.30±0.07
AD 组	44.8±13.6*	0.18±0.09*	3.91±0.41*	0.14±0.09**
Sham 组	36.9±10.2*	0.14±0.06*	2.76±0.21	0.25±0.07*

注: 与 ORX 组比较, *P<0.05, #P<0.05

Note: Compared with ORX group, * P<0.05, # P<0.05

2.1.4 骨形态计量学动态参数测试 与 Sham 组比较, ORX 组四环素双标记面、矿化表面积值、矿化沉积率值均明显降低(P<0.001), 矿化延迟时间值差异无统计学意义; 与 ORX 组比

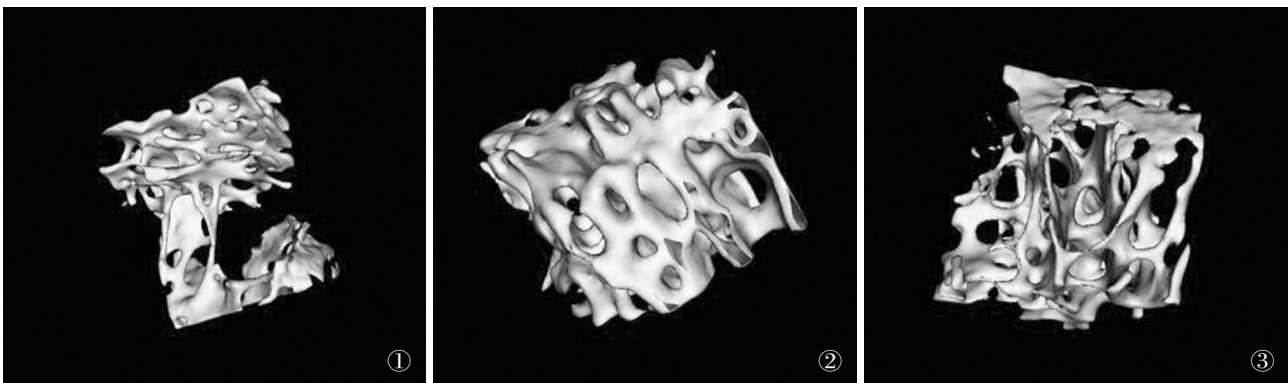


图 1 ORX 组三维结构重建图, 骨小梁结构破坏严重, 中有较大空洞 图 2 AD 组三维结构重建图, 骨小梁结构保持较完整 图 3 Sham 组三维结构重建图, 骨小梁结构破坏, 边缘骨小梁连接性差

Fig.1 Three-dimensional reconstructed images of the vertebrae in male rats of Group ORX using micro-CT. Trabecular bone seriously damaged and has a greater hole **Fig.2** Three-dimensional reconstructed images of the vertebrae in male rats of Group AD using micro-CT. Trabecular bone structure maintained integrity **Fig.3** Three-dimensional reconstructed images of the vertebrae in male rats of Sham operated Group using micro-CT. Trabecular bone structure damaged and the edge poor connection

较,AD 组大鼠四环素双标记面、矿化表面积值均显著升高 ($P<0.001$), 矿化沉积率、矿化延迟时间值也明显升高 ($P<0.05$)。各组间四环素单标记面值差异无统计学意义(见表 2)。

表 2 骨形态计量学动态参数值($\bar{x}\pm s$)
Tab.2 Dynamic parameter changes of bone histomorphology($\bar{x}\pm s$)

组别	dLs/BS (%)	MS/BS (%)	MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	Mlt (%)
ORX 组	22.40 \pm 5.06	41.43 \pm 8.67	0.63 \pm 0.05	6.25 \pm 0.74
AD 组	40.16 \pm 9.3**	57.20 \pm 7.22**	0.77 \pm 0.05*	5.47 \pm 0.65*
Sham 组	35.76 \pm 6.45**	56.73 \pm 6.01**	0.83 \pm 0.07**	6.04 \pm 0.68

注:与 ORX 组比较,** $P<0.001$,* $P<0.05$

Note: Compared with ORX, ** $P<0.001$,* $P<0.05$

2.2 骨密度与体重的变化 治疗前大鼠组间整体 BMD 无明显差异,治疗后各组大鼠骨密度均有所提高,但 ORX 组与 Sham 组比较,骨密度明显降低($P<0.001$);与去势组比较,AD 组骨密度明显增高($P<0.05$)(见表 3)。随着治疗的不同,各组大鼠体重均有所增加,AD 组和 Sham 组大鼠体重增长接近,ORX 大鼠体重增长缓慢,但各组间体重差异无统计学意义(见图 4)。

表 3 治疗前后 BMD 的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 The change of BMD before treatment($\bar{x}\pm s$)

组别	治疗前(g/cm^2)	治疗后(g/cm^2)	BMD 增加(%)
ORX 组	0.185 \pm 0.091	0.189 \pm 0.085	2.1
AD 组	0.179 \pm 0.071	0.223 \pm 0.093*	24.5
Sham 组	0.191 \pm 0.085	0.213 \pm 0.084*	11.5

注:与 ORX 组比较,* $P<0.05$

Note: Compared with ORX,* $P<0.05$

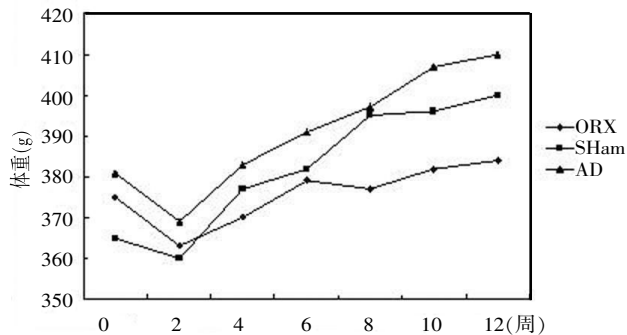


图 4 大鼠去势后体重变化趋势

Fig.4 The change of body weight after orchiechtomied

2.3 生物力学测试 腰椎抗压实验:与 Sham 组比较,ORX 组 L₅ 椎体最大应力、弹性模量、最大载荷、吸收能量值均下降,差异有统计学意义($P<0.001$);与 ORX 组比较,AD 组大鼠股骨的最大应力、弹性模量、最大载荷值均有升高($P<0.05$),吸收能量值亦明显增高($P<0.001$)(见表 4)。

3 讨论

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨组织微结构退化为特征,致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。骨质疏松症强调骨强度的改变,骨强度集中反映了骨的“质”和“量”两方面,不仅包含了骨量多少,而且与骨微结构及由微结构变化引起的骨生物力学改变息息相关。骨微结构包含骨小梁粗细、密度、空间排列及骨小梁间连接等因素,特别是连接性骨小梁的数量和力学构筑对骨的承载能力有重要意义。骨微结构决定骨质量,骨微结构破坏是骨质疏松性骨折发生的直接原因^[3]。大鼠去势后雄激素迅速撤退,骨转换加快,骨吸收大于骨形成导致骨量丢失^[4-5]。本实验骨密度测试结果表明,雄激素具有增加老龄雄性去势大鼠 BMD,防止骨量丢失的作用。ORX 组大鼠 BMD 降低同时伴随低体重,体重降低与性激素水平下降导致脂肪合成减少和肌肉萎缩有关^[6],但 BMD 和体重之间是否有直接联系有待进一步研究。

Micro CT 具有良好的密度分辨率,并可以通过软件在三维空间观察骨标本的 BMD 和微结构,从骨小梁水平上评价骨质的结构及功能。在进一步 Micro CT 分析中发现,治疗组大鼠骨 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 值增高、Tb.Sp 值降低,表明骨小梁变粗、变稠,骨小梁数目增加,说明雄激素能促进骨形成,改善骨微结构。骨形态计量学动态参数测试结果表明,治疗组大鼠骨小梁四环素双标记面、矿化沉积率值均增加,提示骨形成增加。矿化延迟时间缩短、矿化表面积值增加,表明骨矿化加快,表明雄激素能通过促进骨转换来发挥它对骨代谢的影响,促进骨形成^[7]。治疗组大鼠力学参数值升高,表明雄激素能提高去势大鼠骨力学特性,增加骨强度。骨的力学特性与骨微结构有显著关系,骨的变形、弯曲通常发生在椎体等松质骨,这是由于支持、连接骨小梁的水平小梁被吸收所致。

骨在代谢中的重建是破骨细胞骨吸收作用与成骨细胞骨形成作用之间的一种动态平衡。当雄激素缺乏时,破骨细胞寿命延长而成骨细胞寿命缩短,导致骨分解代谢升高和骨合成代谢降低,骨重建速率加快,骨重建呈负平衡,引起骨量丢失^[8]。本实验中,去势雄鼠经雄激素治疗后,骨量和骨强度明显增强,提示雄激素对性腺机能减退导致的骨质疏松症有良好防治作用。目前认为雄激素对破骨细胞的作用可能是通过成骨

表 4 腰椎抗压性能变化($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 The change of lumbar compressive test($\bar{x}\pm s$)

组别	E-elastic (MPa)	M-stress (MPa)	M-load (N)	Energ (MJ)
ORX 组	31.59 \pm 8.88	3.30 \pm 0.12	264.12 \pm 10.39	144.16 \pm 15.77
AD 组	45.36 \pm 7.72**	3.77 \pm 0.19	301.43 \pm 22.19**	214.30 \pm 18.49***
Sham 组	59.30 \pm 10.98**	6.04 \pm 1.52**	483.39 \pm 15.61**	576.38 \pm 25.37**

注:与 ORX 组比较,** $P<0.001$,* $P<0.05$;与 Sham 组比较,*** $P<0.001$,** $P<0.05$

Note: Compared with ORX group, ** $P<0.001$,* $P<0.05$; Compared with Sham, *** $P<0.001$,** $P<0.05$

细胞系统间接完成,是否对破骨细胞有直接作用待研究。雄激素对成骨细胞的作用是通过促进成骨细胞分化,减少成骨细胞与骨细胞凋亡^[9]。雄激素这个作用是通过调节局部细胞因子来实现,例如:胰岛素样生长因子 I(IGF-I)和碱性成纤维细胞生长因子(FGF)等^[3,10]。另有研究表明雌激素对骨骼生长和骨量维持同样起重要作用^[11],老龄雄鼠去势后骨量丢失与雌激素之间的关系,尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Morote J, Martinez E, Trilla E, et al. Osteoporosis during continuous androgen deprivation: influence of the modality and length of treatment. *Eur Urol*, 2003, 44(6): 661-665.
- [2] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [3] Legrand E, Audran M, Guggenbuhl P, et al. Trabecular bone microarchitecture is related to the number of risk factors and etiology in osteoporotic men. *Microsc Res Tech*, 2007, 70(11): 952-959.
- [4] Blouin S, Gallois Y, Moreau MF, et al. Disuse and orchidectomy have additional effects on bone loss in the aged male rat. *Osteoporosis Int*, 2007, 18(1): 85-92.
- [5] Moreau MF, Libouban H, Legrand E, et al. Lean, fat and bone masses are influenced by orchidectomy in the rat. A densitometric X-ray absorptiometric study. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2001, 1: 209-213.
- [6] Borst SE, Conover CF. Orchidectomized Fischer 344 male rat models body composition in hypogonadal state. *Life Sci*, 2006, 79: 411-415.
- [7] Kung AW. Androgen and bone mass in men. *Asian J Androl*, 2003, 5(2): 148-154.
- [8] Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, et al. Androgens and bone. *Endocr Rev*, 2004, 25(3): 389-425.
- [9] Kousteni S, Chen JR, Bellido T, et al. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science*, 2002, 298(5594): 843-846.
- [10] 廖二元, 谭利华. 代谢性骨病学. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 672-680.
- [11] 白雪, 王毅, 王顺禄, 等. 骨质疏松相关基因的研究进展. *中国骨伤*, 2006, 19(9): 573-575.

(收稿日期: 2008-06-30 本文编辑: 王玉蔓)

· 会议纪要 ·

第 16 届全国中西医结合骨伤科学术研讨会会议纪要

第 16 届全国中西医结合骨伤科学术研讨会于 2008 年 10 月 24-26 日在上海市科学会堂召开。这次大会由中国中西医结合学会骨伤科专业委员会、第二军医大学长海医院主办,上海市中西医结合骨伤科专业委员会和上海沐阳医院承办,《中国骨伤》杂志社等单位协办。参加这次学术大会的有全国各地代表共 300 余人,大家共聚一堂,共同研讨了中医、中西医结合在脊柱、关节、创伤、骨病、软组织损伤、微创技术、康复医疗和药物研究及器械研制等方面的新理论、新技术和新进展以及中西医结合临床与基础研究成果。

天津医院金鸿宾教授作了关于“危重多发伤的治疗兼谈创伤性脓毒症防治与损伤控制性手术”的专题报告,介绍了危重多发伤后脓毒症的临床特点、诊断指标和治疗进展,以及损伤控制性手术的适应证和处理措施。长海医院张春才教授作了“成骨力值相关概念与技术”专题报告,通过大量临床实践总结,提出获得生理成骨力值的 MO 理论核心是把国际 AO 骨折的机械“固定段”变成 MO 骨折的生理“生长段”,并在骨盆、髌臼等创伤的治疗中广泛应用,更接近骨愈合规律,为提高创伤骨折与骨不连的救治水平掀开了崭新的一页,得到了与会者欢迎并展开了热烈的讨论。上海沐阳医院杜宁教授作了“手法治疗膝关节骨关节炎促进软骨修复的临床与试验研究”的学术报告,指出手法具有荣筋养骨作用,可促进不全缺损和完全缺损软骨的修复作用,对早、中、晚期 OA 均有效,为临床防治骨关节炎开创了新的有效方法。大会特设了灾害医学专题,总结研讨了抗震救灾救治的相关经验和体会。

为满足参会代表的不同需要,大会设有 2 个分会场。在以保守疗法为主的中医和中西医结合治疗的分会场,各地代表分别对脊柱疾患、基础研究、创伤、骨与关节等专题进行了研讨,中日友好医院的谭明生教授介绍了 C₁₋₂ 后路固定技术研究进展,瑞金医院的王亚梓副主任医师作了踝关节损伤失误常见原因分析报告,分会场还设有手法演示专场,代表们交流了正骨、整脊、长银针和针刀等手法治疗骨科疾病的经验。在以西医手术治疗为主的西医分会场,代表们分别就骨盆、髌臼骨折、骨折和骨不连专题进行了研讨,长海医院的禹宝庆报告了复杂髌臼骨折的治疗,提出了改良联合手术入路。

为激励广大中青年医生积极参加中西医结合骨伤科临床与基础研究,大会还举办了首届全国中西医结合骨伤科中青年论文大赛,长海医院苏佳灿的“髌臼骨折三位有限元分析及其临床意义”等分别获得了中青年论文奖。此外,大会还增选了 6 位新的全国委员,成立了中青年工作委员会。

由于组委会的辛勤劳动和全体参会代表的积极参与,大会在充满友谊、热烈与欢乐的气氛中圆满结束。明年的学术会议拟在广西南宁召开。

(桑志成整理)