

· 基础研究 ·

大鼠骨质疏松模型骨组织形态测量[△]

刘雨晴, 李璐, 黄虎, 张树鹏*

(山东第一医科大学第二附属医院病理科, 山东泰安 271000)

摘要: [目的] 观察去卵巢大鼠术后不同时期腰椎与股骨骨微结构的组织学变化。[方法] 50只12周龄雌性SD大鼠采用随机数字表法分为两组, 去卵巢组(ovariectomy, OVX) 25只, 假手术(sham operation, SO) 25只。于术后1、4、8、12和16周每组分别处死5只动物, 取L₅及股骨干骺端制备4 μm切片, HE染色, 采用NIS-Elements D显微图像处理软件, 测量骨小梁宽度、骨小梁间隔距离、皮质骨厚度。[结果] 随时间推移, OVX组骨小梁宽度显著下降($P < 0.05$), 骨小梁间隔距离显著增大($P < 0.05$); 而皮质骨厚度无显著变化($P > 0.05$)。相比之下, SO组的骨小梁宽度、骨小梁间隔距离及皮质骨厚度均无显著变化($P > 0.05$)。相应时间点比较, 术后1~8周两组间骨小梁宽度、骨小梁间隔距离差异均无统计学意义($P > 0.05$); 术后12、16周OVX组骨小梁宽度显著低于SO组($P < 0.05$), 骨小梁间隔距离显著大于SO组($P < 0.05$); 两组间皮质骨厚度的差异无统计学意义($P > 0.05$)。[结论] 切除卵巢后, 大鼠腰椎及股骨骨微结构均出现明显的骨质疏松化, 且腰椎的改变早于股骨, 小梁骨的改变早于皮质骨。病理形态计量学有一定的诊断意义。

关键词: 骨质疏松症, 骨小梁, 皮质骨, 去卵巢, 骨微结构

中图分类号: R687 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2022) 21-1987-05

Bone morphometry of osteoporotic model in rat // LIU Yu-qing, LI Lu, HUANG Hu, ZHANG Shu-peng. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital, Shandong First Medical University, Tai'an 271000, China

Abstract: [Objective] To observe the histological changes in terms of bone microstructure of the lumbar spine and femur in ovariectomized rats. [Methods] A total of 50 12-week-age female SD rats were divided into two groups by random number table method, 25 of them underwent ovariectomy (OVX), while the remaining 25 animals received sham operation (SO). At 1, 4, 8, 12 and 16 weeks after operation, 5 animals in each group were sacrificed, and 4 μm sections were made from the L₅ vertebral body and the femoral metaphysis with HE staining. The trabecular width, the distance between the trabecular interval and cortical bone thickness were measured by using NIS-Elements D microscopic image processing software. [Results] The width of trabecular bone significantly decreased ($P < 0.05$), whereas the distance between trabecular bone significantly increased ($P < 0.05$), and the cortical bone thickness remained unchanged in the OVX group over time ($P > 0.05$). By contrast, the trabecular width, the distance between trabecular and cortical bone thickness remained unchanged in the SO group ($P > 0.05$). In term of comparison between two groups, there were no significant differences in the width of bone trabecular and the distance between the two groups at 1-8 weeks after surgery ($P > 0.05$), while the OVX group had significantly lower width of trabecular bone, greater distance between trabecular bone than the SO group at 12 and 16 weeks after surgery ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in cortical bone thickness between the two groups ($P > 0.05$). [Conclusion] After ovariectomy, the rat has significantly osteoporotic bone microstructure variations, which in lumbar vertebrae is earlier than that in the femur, and in the trabecular bone earlier than that in cortical bone. The bone morphometry has certain diagnostic significance.

Key words: osteoporosis, trabecular bone, cortical bone, ovariectomy, bone microstructure

骨质疏松症是一种全身性骨病, 其特征为骨量低及骨微结构退化, 导致骨脆性增加和骨折易感性^[1, 2]。骨质疏松症分原发性和继发性, 原发性骨质疏松症又分为 I 型(绝经后型)以及 II 型(老年

型)^[3]。骨质疏松症主要发生在中老年人, 尤以绝经后妇女较常见^[4]。

骨质疏松症是一个全球面临的问题, 随着人口趋于老龄化, 低骨密度及骨质疏松患者人数呈上升趋势

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.21.14

[△]基金项目: 山东第一医科大学“学术提升计划”项目(编号:2019QL017)

作者简介: 刘雨晴, 硕士研究生在读, 研究方向: 骨与软组织病理学, (电话)17753881945, (电子信箱)1026212514@qq.com

* 通信作者: 张树鹏, (电话)18505387050, (电子信箱)zhangshp01@163.com

势。在中国,老年人骨质疏松症的平均患病率估计为15.7%,预测到2050年,低骨密度及骨质疏松患者数量可能达到2.12亿^[5]。这不仅会影响患者的生活质量,还将为其造成巨大的经济负担^[6]。

3~6个月龄大鼠是目前研究者认为进行去卵巢术后观察骨微结构变化的最佳时期,是研究绝经后骨质疏松症较为理想的实验动物模型^[7,8]。随着骨组织形态计量学在骨质疏松症中的开展与使用,通过软件系统获取骨微结构相关静态参数及动态参数可以较准确地反映骨组织形态结构的变化^[9,10]。经查阅发现,大多数研究者常通过测量骨密度、生化指标及影像学检查等方法协助判断骨质疏松症及其骨折风险^[11,12]。

在临床病理方面,对骨质疏松症的诊断,大多仍是从组织形态进行分析描述,很少对组织切片进行组织形态计量学测量。骨质疏松性骨折好发于椎骨、股骨近端和前臂远端^[13]。骨折处的活检主要是鉴别肿瘤转移及其他原发疾病所致病理性骨折,但对于可能存在的骨质疏松常易漏诊,对于骨髓穿刺样本的评估仍是简单估计,主观性较强,缺乏客观指标。现有研究均为动物实验数据,对于大鼠骨骼部位的选择不一,单独观察椎体及股骨的相关内容较多^[14,15]。对于椎体与股骨结合观察骨组织形态计量学方面的研究相对较少。因此,本文通过探讨骨组织形态计量学方法测量雌激素缺乏对腰椎与股骨骨微结构的客观数据,为病理学的准确诊断提供数据支持,并对将来人工智能辅助诊断技术在病理形态学上的引入打好理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

12周龄雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 50 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。采用随机数字表法分为两组,去卵巢组 (ovariectomy, OVX) 25 只,假手术 (sham operation, SO) 25 只。动物实验已获批准,且实验程序都是按照相关的制度规定进行。

1.2 手术处理

术前 12 h 均禁食水。0.3%戊巴比妥溶液,以 30 mg/kg 腹腔注射麻醉,仰卧位固定,于腹正中线脱毛后用碘伏及 75%酒精行术前消毒,铺巾后切开皮肤暴露腹腔。OVX 组:切除双侧卵巢,分层缝合肌肉与皮肤。SO 组则只行腹部切开后缝合,不切除双侧卵巢。

待动物完全苏醒后,将其放回笼中饲养。实验室的温度、光线、食物和环境条件相同。

1.3 标本获取与处理

于术后 1、4、8、12、16 周分别处死两组雌鼠中各 5 只动物。然后取出 L₅ 及股骨干骺端。置于 10% 中性缓冲福尔马林中固定 24 h,后浸泡于浓度约 6% 的硝酸脱钙液中 24 h,流水冲 2 min。修剪,逐级脱水,石蜡包埋。制 4 μm 切片,苏木素-伊红 (HE) 染色及封片。

1.4 组织形态测量

将组织切片置于显微镜下,选择主要特定区域,L₅ 为椎体中心部,股骨干骺端为距离骨骺生长板约 4 mm 处。以 200×放大率观察骨组织形态变化。将所选定的视野同步到与显微镜相连接的 NIS-Elements D 显微图像处理软件,锁定当前视野,把鼠标的运行轨道转换为距离、周长、宽度及面积等参数,即可以测量所需数据。本次实验所选用参数为骨小梁宽度:每个骨小梁之间的平均距离;骨小梁间隔距离:小梁与小梁之间的平均距离;皮质骨厚度:内外皮层的平均宽度,单位均为 μm。为了减少实验误差,每张切片除测量特定所选区域,还以其为中心适当扩大测量范围,均测量 2 次,求平均值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,资料呈正态分布时,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,组内不同时间点间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *LSD* 法。资料呈非正态分布时,采用秩和检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 镜下形态描述

L₅ 椎体及股骨 SO 组骨小梁相互连接呈网状结构。与 SO 组相比,OVX 组大鼠 L₅ 椎体及股骨骨小梁间的连通性逐渐丧失,骨小梁数目减少,间隔增大,游离盲端增多,见图 1。

2.2 测量结果

两组大鼠 L₅ 骨组织形态测量结果见表 1。随时间推移,OVX 组骨小梁宽度显著下降 (*P* < 0.05),骨小梁间隔距离显著增大 (*P* < 0.05);而皮质骨厚度无显著变化 (*P* > 0.05)。相比之下,SO 组的骨小梁宽度、骨小梁间隔距离及皮质骨厚度均无显著变化 (*P* > 0.05)。

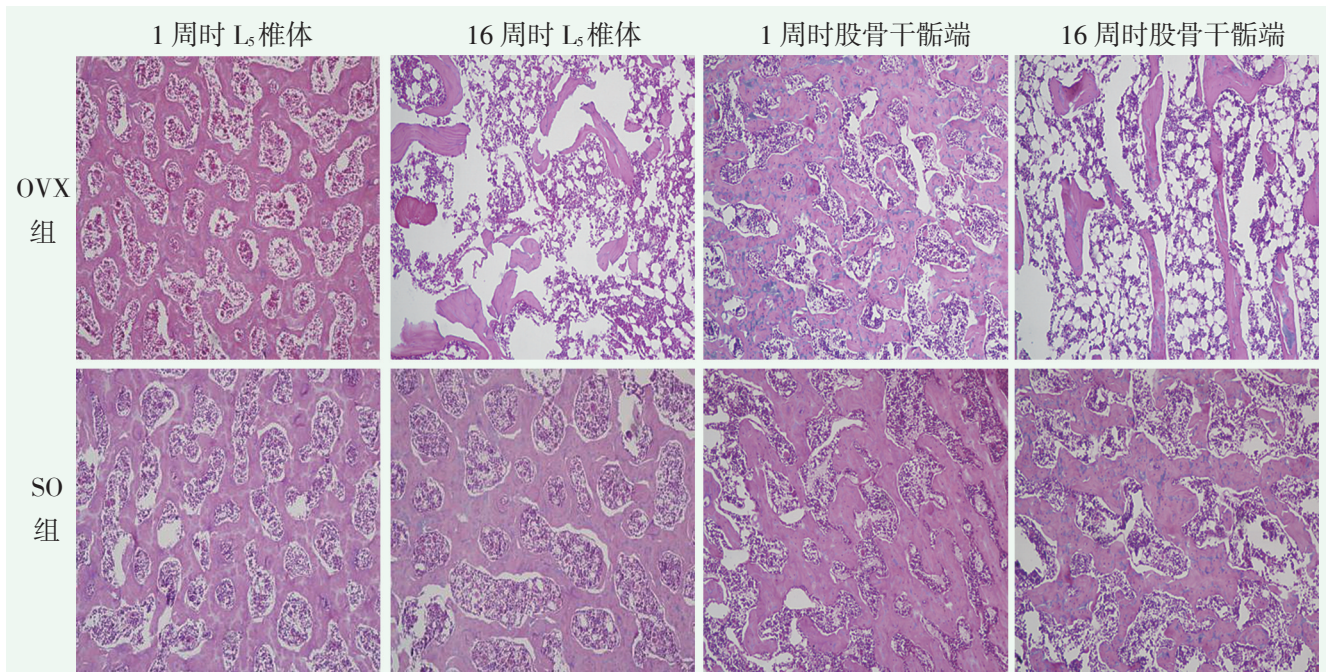


图 1 两组动物镜下组织形态 (HE, ×100) 与术后 1 周相比, 术后 16 周时 OVX 组骨连通性明显丧失, 骨小梁数目减少, 而 SO 组无明显变化

表 1 两组大鼠 L₅ 骨组织形态测量结果 (μm, $\bar{x} \pm s$) 与比较

指标	时间点	OVX (n=5)	SO 组 (n=5)	P 值
骨小梁宽度	术后 1 周	56.27±16.55	57.56±15.76	0.903
	术后 4 周	53.85±12.44	57.70±5.66	0.547
	术后 8 周	49.14±4.02	60.95±10.87	0.052
	术后 12 周	45.52±3.81	54.77±2.20	0.002
	术后 16 周	32.33±8.96	54.38±9.24	0.005
	P 值		0.041	0.705
骨小梁间隔距离	术后 1 周	138.08±20.73	136.39±24.32	0.909
	术后 4 周	161.60±23.51	120.89±38.71	0.079
	术后 8 周	166.50±24.91	138.54±14.95	0.064
	术后 12 周	170.88±19.85	121.46±19.18	0.016
	术后 16 周	192.59±11.39	125.80±13.18	<0.001
	P 值		0.020	0.565
骨皮质厚度	术后 1 周	437.97±59.27	409.02±88.86	0.561
	术后 4 周	450.15±56.75	490.55±35.32	0.214
	术后 8 周	444.72±37.31	491.40±31.75	0.008
	术后 12 周	457.84±56.01	483.35±26.35	0.394
	术后 16 周	443.35±32.94	449.88±39.50	0.784
	P 值		0.706	0.274

相应时间点比较, 术后 1~8 周两组间骨小梁宽度、骨小梁间隔距离差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 术后 12、16 周 OVX 组骨小梁宽度显著低于 SO 组 ($P < 0.05$), 骨小梁间隔距离显著大于 SO 组 ($P < 0.05$); 术后 8 周 OVX 组的皮质骨厚度显著低于 SO 组 ($P < 0.05$), 其他时间点两组骨皮质厚度差异无

统计学意义 ($P > 0.05$)。

两组大鼠股骨骨组织形态测量结果见表 2。随时间推移, OVX 组骨小梁宽度显著下降 ($P < 0.05$), 骨小梁间隔距离显著增大 ($P < 0.05$), 皮质骨厚度无显著变化 ($P > 0.05$)。相比之下, SO 组的骨小梁宽度、骨小梁间隔距离及皮质骨厚度均无显著变化 ($P >$

0.05)。

相应时间点两组间比较, 术后 1~12 周, 两组骨小梁宽度、骨小梁间的间隔距离及皮质骨厚度差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。术后 16 周, OVX 组骨

小梁宽度显著小于 SO 组 ($P<0.05$), 而骨小梁间隔距离显著大于 SO 组 ($P<0.05$); 相应时间点两组皮质骨厚度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 两组大鼠股骨骨组织形态测量结果 (μm , $\bar{x} \pm s$) 与比较

指标	时间点	OVX (n=5)	SO 组 (n=5)	P 值
骨小梁宽度	术后 1 周	65.82±12.79	68.20±10.83	0.760
	术后 4 周	65.84±7.20	65.94±3.73	0.980
	术后 8 周	63.98±5.43	65.55±1.11	0.559
	术后 12 周	57.71±9.24	61.57±9.88	0.541
	术后 16 周	49.39±7.06	65.59±8.05	0.010
	P 值	0.032	0.911	
骨小梁间隔距离	术后 1 周	122.51±31.17	121.50±36.28	0.964
	术后 4 周	163.99±53.90	109.32±21.72	0.069
	术后 8 周	167.59±50.54	140.31±23.22	0.305
	术后 12 周	189.17±51.84	154.13±52.66	0.320
	术后 16 周	227.97±42.98	131.62±25.88	0.003
	P 值	0.029	0.311	
骨皮质厚度	术后 1 周	383.43±54.04	404.74±75.34	0.621
	术后 4 周	375.56±41.04	381.44±59.83	0.861
	术后 8 周	373.59±39.06	426.93±68.28	0.168
	术后 12 周	381.58±41.58	389.03±23.98	0.737
	术后 16 周	383.74±46.76	380.38±55.53	0.920
	P 值	0.994	0.704	

3 讨论

去卵巢后的大鼠雌激素缺乏使骨代谢处于负平衡状态。这种变化与绝经后妇女骨代谢变化相似^[16]。大鼠在 2.5 个月龄时达到性成熟^[17]。本实验选择 3 个月龄大鼠, 在术后 1、4、8、12、16 周分别观察骨微结构的变化, 具有连续观察性。

本实验结果显示, OVX 组 L₅ 椎体于术后 12 周出现明显的骨质疏松化, 与同一时段 SO 组相比, 骨小梁宽度下降 16.95%, 骨小梁间隔距离增加 40.69%。而同时段股骨, 骨小梁宽度下降 6.27%, 骨小梁间隔距离增加 22.72%。到了术后 16 周, 股骨骨质疏松化的程度才更为显著。由此可知, 去卵巢大鼠术后 12 周股骨虽有骨小梁微结构的变化, 但是明显晚于 L₅ 椎体出现骨质疏松化的时间。该结果也提示, 腰椎对雌激素缺乏比股骨更敏感。原因可能为椎骨、长骨的组成及机械负荷不同, 每只大鼠活动和安静的状态不一, 就会使消耗的骨量存在差异。

OVX 组 L₅ 椎体及股骨随着去势时间的延长, 与术后 1 周比较, 术后 16 周差异最为显著。L₅ 椎体骨小梁宽度下降 42.55%, 骨小梁间隔距离增大 39.48%。证明随着雌激素缺乏, 骨质疏松化也愈加明显, 这也证实本次大鼠模型模拟绝经后骨质疏松妇女的骨微结构变化具有一定参考价值。股骨的变化趋势同 L₅ 椎体。

本次大鼠造模时间截止到术后 16 周, 存活时间相对较短, 结果大鼠的皮质骨变化并不明显。有文献显示, 小梁骨比皮质骨更早且更广泛地出现骨质疏松化^[18]。邱宇等^[19]认为, 若是仅仅通过卵巢切除手术观察骨微结构的变化, 皮质骨不太适宜与小梁骨同期观察。可以适当延长造模时间, 以监测皮质骨的变化情况。

骨组织形态计量学目前所统计的指标大约有几十种, 不但能提供与骨密度仪 BMD 测定和微计算机断层扫描 (micro-CT) 测定相似的静态参数结果, 而且更突出的是可以通过测量细胞水平等动态参数反映骨组织发生静态变化的相关机制^[20]。韩天雨等^[21]通过

micro-CT检测, 3个月龄雌鼠的腰椎在去卵巢12周时, 骨质疏松症状明显体现, 这与本实验中使用骨组织形态计量学测量3个月龄雌性大鼠腰椎去卵巢术后12周出现明显骨质疏松化的趋势相似。但不可否认的是, 在骨微结构的测量技术上, 影像学中micro-CT的使用率明显高于病理学中骨组织形态计量学的应用, 可见病理诊断加入数字化及人工智能的必要性。卞修武等^[22]认为“下一代诊断病理学”是可以使病理诊断从数据到智能的转变。因此, 希望通过这种自动/半自动化测量, 可以为将来人工智能辅助诊断提供实验数据支持。由于本次实验侧重于骨组织的静态测量, 后续会对细胞活性水平展开进一步探究。

本研究的局限性在于: 由于设备限制, 本文未采用硬组织切片或骨磨片制片, 而是使用常规组织切片, 所以取材过程中只能采取轻脱钙措施, 这会使骨微结构的完整性发生轻微改变^[23]。但为了防止出现较大误差, 本次实验通过测量多张切片并扩大测量视野范围, 其测量的结果与预期趋势相符, 具有真实性及参考价值。另外, 此种方法的好处是只依据常规病理制片技术, 不再引入特殊的设备与工序, 方便快捷, 能更好地将实验结论向临床一线转化使用。

综上所述, 通过组织形态计量学测量L₅椎体与股骨骨微结构形态变化, 是对雌激素缺乏导致骨质疏松症骨微结构的改变做出有意义的判断和分析。并且, 从实验结果可知, 腰椎出现骨质疏松化的时间早于股骨, 小梁骨的改变早于皮质骨。这为将来研究骨质疏松病理诊断及人工智能辅助诊断提供可靠的参考指标, 也为临床诊疗和药物评用提供更准确的理论及实验依据。

参考文献

- [1] Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, et al. Postmenopausal osteoporosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16069.
- [2] Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis [J]. *Lancet*, 2019, 393 (10169): 364-376.
- [3] 王建华, 张庆彬, 杨华清, 等. 骨质疏松动物实验骨折风险分析 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2004, 12 (9): 692-694.
- [4] Pavel OR, Popescu M, Novac L, et al. Postmenopausal osteoporosis - clinical, biological and histopathological aspects [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2016, 57 (1): 121-130.
- [5] Lin X, Xiong D, Peng YQ, et al. Epidemiology and management of osteoporosis in the People's Republic of China: current perspectives [J]. *Clin Interv Aging*, 2015, 10: 1017-1033.
- [6] Si L, Winzenberg TM, Jiang Q, et al. Projection of osteoporosis-related fractures and costs in China: 2010-2050 [J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26 (7): 1929-1937.
- [7] Sakata M, Tonomura H, Itsuji T, et al. Osteoporotic effect on bone repair in lumbar vertebral body defects in a rat model [J]. *J Orthop Surg (Hong Kong)*, 2018, 26 (2): 2309499018770349.
- [8] Liu XL, Li CL, Lu WW, et al. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2015, 26 (4): 392-398.
- [9] Hong SH, Jiang X, Chen L, et al. Computer-automated static, dynamic and cellular bone histomorphometry [J/OL]. *J Tissue Sci Eng*, 2012. Published on line. <https://dx.doi.org/10.4172/2157-7552.S1-004>
- [10] Arlot ME, Jiang Y, Genant HK, et al. Histomorphometric and micro-CT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate [J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23 (2): 215-222.
- [11] 郭兴满, 马宝荣, 姚倩倩, 等. 卵巢切除对大鼠骨骼结构与力学特征的早期影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2021, 29 (18): 1683-1687.
- [12] Shin YH, Cho DC, Yu SH, et al. Histomorphometric analysis of the spine and femur in ovariectomized rats using micro-computed tomographic scan [J]. *J Kor Neurosurg Soc*, 2012, 52 (1): 1-6.
- [13] Lupsa BC, Insogna K. Bone health and osteoporosis [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2015, 44 (3): 517-530.
- [14] Shen GY, Ren H, Tang JJ, et al. Effect of osteoporosis induced by ovariectomy on vertebral bone defect/fracture in rat [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (43): 73559-73567.
- [15] Giavaresi G, Fini M, Gnudi S, et al. The femoral distal epiphysis of ovariectomized rats as a site for studies on osteoporosis: structural and mechanical evaluations [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2002, 20 (2): 171-178.
- [16] Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, et al. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide [J]. *Excli J*, 2020, 19: 89-107.
- [17] Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research [J]. *Comp Med*, 2008, 58 (5): 424-430.
- [18] Hsu PY, Tsai MT, Wang SP, et al. Cortical bone morphological and trabecular bone microarchitectural changes in the mandible and femoral of ovariectomized rats [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (4): e0154367.
- [19] 邱宇, 赵月阳, 龙志敏, 等. 去卵巢小鼠股骨微结构的动态变化研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2021, 43 (17): 1627-1633.
- [20] 陈珺, 张豪, 杨国柱, 等. 骨形态计量学目前应用专家共识 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20 (9): 1031-1038, 1054.
- [21] 韩天雨, 卜淑敏, 文思敏, 等. 去卵巢大鼠腰椎骨微结构变化的动态观察 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15 (11): 2018-2021, 2026.
- [22] 卞修武, 张培培, 平轶芳, 等. 下一代诊断病理学 [J]. *中华病理学杂志*, 2022, 51 (1): 3-6.
- [23] 宁可永, 张绍霞. 骨质疏松症的实验研究进展 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2002, 9 (5): 81-83.

(收稿:2021-12-15 修回:2022-07-18)
(同行评议专家:李慎江 陈君生)
(本文编辑:宁桦)