

基础研究

脊髓损伤早期及制动后大鼠股骨远端骨量丢失的实验研究

余文超, 刘 岩, 袁 文, 郭永飞, 曹振羽, 邹翰林

(上海市第二军医大学附属长征医院骨科 200003 上海市)

【摘要】目的:建立大鼠脊髓损伤及后肢废用模型,观察建模早期两种模型大鼠股骨远端骨密度及远端破骨细胞数量的改变。**方法:**24 只 SD 大鼠随机分为 3 组(每组 8 只),对照组(A 组),行 T10 椎板切除,不损伤硬膜及脊髓;脊髓损伤(SCI)组(B 组):切除 T10 椎板后用 Allen's 法(60g·cm 势能)造成脊髓损伤;制动组(C 组):采用大鼠双侧腿-尾缝合,造成双下肢制动。分别于造模后第 1、7 天采用 BBB(Basso, Beattie and Bresnahan)评分评估脊髓损伤大鼠后肢运动功能,确定模型建立成功。建模第 10 天后处死,取一侧尺、桡骨及股骨远端,行骨密度检测。取另一侧股骨远端行 TRAP 染色,观察大鼠股骨远端破骨细胞数量的变化。**结果:**A、B、C 3 组股骨远端骨密度值分别为 0.114、0.096、0.108g/cm²,B 组骨密度值最低,其次为 C 组,A 组最高($P<0.05$)。尺、桡骨骨密度 3 组比较无差异($P>0.05$)。与 A 组比较,B 组大鼠股骨干骺端破骨细胞数量增加显著,其次为 C 组,A 组最少($P<0.01$)。**结论:**脊髓损伤后,股骨远端破骨细胞数量大量增多,活性增强,骨吸收加强,引起脊髓损伤平面以下肢体骨量的迅速丢失,比废用性骨量丢失的程度更重。

【关键词】脊髓损伤;骨质疏松;股骨;骨密度;破骨细胞

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2011.05.04

中图分类号:R683.2,R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2011)-05-0370-04

An experimental study of bone loss after spinal cord injury and immobilization in rats/YU Wenchao, LIU Yan, YUAN Wen, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(5): 370~373

【Abstract】 Objective: To establish rats models with both spinal cord injury(SCI) and lower limbs disused atrophy, and to observe the bone density and number of osteoclast at distal femur. **Method:** A total of 24 male rats of 7 weeks were randomly divided into three groups: control group(group A), the SCI group(group B) and the immobilization group (group C). After general anesthesia, T10 vertebrae laminar was removed in group B and A, while weight-drop (60g·cm) on spinal cords (Allen's contusion SCI model) was introduced only in group B; rats in group C were immobilized by bilateral hindlimbs-tail fixation. The Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale was used to evaluate the injury severity by rating hindlimb functional deficits on day 1 and 7 post-injury. Animals were sacrificed on day 10 post-injury for subsequent analyses. Bone density of elbow-bone, radius and femur at one side was measured. The TRAP staining was performed on the distal femur of the other side to detect the number of osteoclast. **Result:** Bone density in the distal femur of group A, B, C was 0.114, 0.096, 0.108g/cm². The difference of them was significant ($P<0.05$). No difference of bone density in the elbow-bone and radius between three groups was noted ($P>0.05$). Compared with group A, the number of osteoclast at the distal femora in group B increased most, the less was in group C and A ($P<0.01$) respectively. **Conclusion:** SCI results in a rapid bone loss in early stage which is originated from increasing number and potential of osteoclast, which is more serious than disused bone loss.

【Key words】 Spinal cord injury; Osteoporosis; Femur; Bone density; Osteoclast

【Author's address】 Orthopaedic Surgery, the Affiliated Chang Zheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China

基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目资助(编号:08411965800)

第一作者简介:男(1985-),硕士,研究方向:创伤外科

电话:(021)81886807 E-mail:yuwenchao0117@163.com 通讯作者:刘岩 E-mail:liuyan318@yahoo.cn

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后骨质疏松(Osteoporosis, OP)多发生于损伤平面以下肢体,尤多见于股骨远端或胫骨近端,SCI后继发骨质疏松在发病机制、病理特点、骨量丢失发生部位和速度等方面均不同于其他继发OP的特征^[1,2]。笔者采用Allen's法建立脊髓挫伤模型,采用缝合制动建立后肢废用性模型,观察早期大鼠脊髓损伤后骨量丢失及股骨远端破骨细胞数量变化,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性7周龄SD大鼠24只(第二军医大学动物中心提供),体重200~250g,随机分为3组,假手术组(A组),脊髓损伤组(B组),废用组(C组),每组8只。

1.2 动物模型制作

A组:麻醉后,单纯暴露并切除大鼠T10棘突和椎板,不损伤硬膜及脊髓。B组:10%水合氯醛腹腔内注射麻醉后,切除大鼠T10棘突和椎板,暴露脊髓,采用Impact II,10g打击杆从60mm高度垂直下落打击脊髓,造成脊髓损伤。C组:麻醉后,将大鼠双侧后肢和尾部近段消毒后,用手术丝线穿过后肢踝部将其缝合至肛门开口远端约1.0~2.0cm处之尾部,造成双下肢制动(图1)。建模成功后,实验动物室温下分笼饲养,标准大鼠饲料,自由饮水、摄食。B组大鼠每8h人工排尿一次。伤后第1、7天采用BBB(Basso、Beattie、Bresnahan)评分^[3],BBB评分大于2分者剔除。

1.3 取材和标本制备

建模10d后处死大鼠,取右侧尺、桡骨、股骨,仔细剔除其周围软组织。分别浸泡于生理盐水,

2℃保存。运用双能X线束骨密度仪行骨密度检测(Lunar Prodigy Advance PA+300164 GE Healthcare)。取左侧股骨远端,沿矢状轴切开,EDTA脱钙,石蜡包埋,制作5μm厚度冠状面石蜡切片,采用抗酒石酸磷酸酶(TRAP)染色以显示成熟破骨细胞,选择切片中股骨干骺端生长板全长作为破骨细胞计数范围,显微镜放大400倍观察破骨细胞数量,采用AxioVision Rel.4.7软件计数(破骨细胞数目/mm长度骨骺板)。

1.4 统计学分析

实验数据以均数±标准差表示,采用SPSS 13.0软件,对所得数据进行多因素方差分析(LSD-t检验)。设 $P<0.05$ 差异具有显著性。

2 结果

3组大鼠体重差异无显著性($P<0.05$)。实验期间所有动物均未出现死亡。

A组大鼠术后后肢BBB评分均为21分;B组大鼠术后第1、7天后肢BBB评分均为0分或1分,对针刺无反应,存在排尿障碍。C组的大鼠生长良好,双下肢固定坚固。B组动物中有3只术后第2天出现血尿,一直持续到术后第7天血尿消失。

术后10天,与A组相比,B组及C组大鼠股骨远端骨密度均明显下降;B组下降最显著($P<0.05$,表1)。实验大鼠的尺桡骨骨密度3组间的差异均无显著性($P>0.05$,表1)。

TRAP染色结果见图2,B组中股骨远端干骺端破骨细胞增多、聚集,大量的破骨细胞附着在骨小梁上,表现出了较强的骨吸收活性(16.6 ± 1.8 个/mm),C组中仅见少量破骨细胞增殖(6.8 ± 1.7 个/mm),而A组中破骨细胞数量最少(4.1 ± 1.0 个/mm)($P<0.01$)。

表1 建模10d时3组骨密度值 ($\bar{x}\pm s$, g/cm², n=8)

	尺、桡骨	股骨远端
A组	0.085±0.005	0.114±0.000
B组	0.082±0.002	0.096±0.006 ^①
C组	0.083±0.00	0.108±0.007 ^①

注:①与A组比较 $P<0.05$



图1 双侧腿-尾固定废用性模型

3 讨论

OP是SCI后常见并发症,Allen's法脊髓挫伤模型不打开硬脊膜,较接近临床脊髓损伤的病理

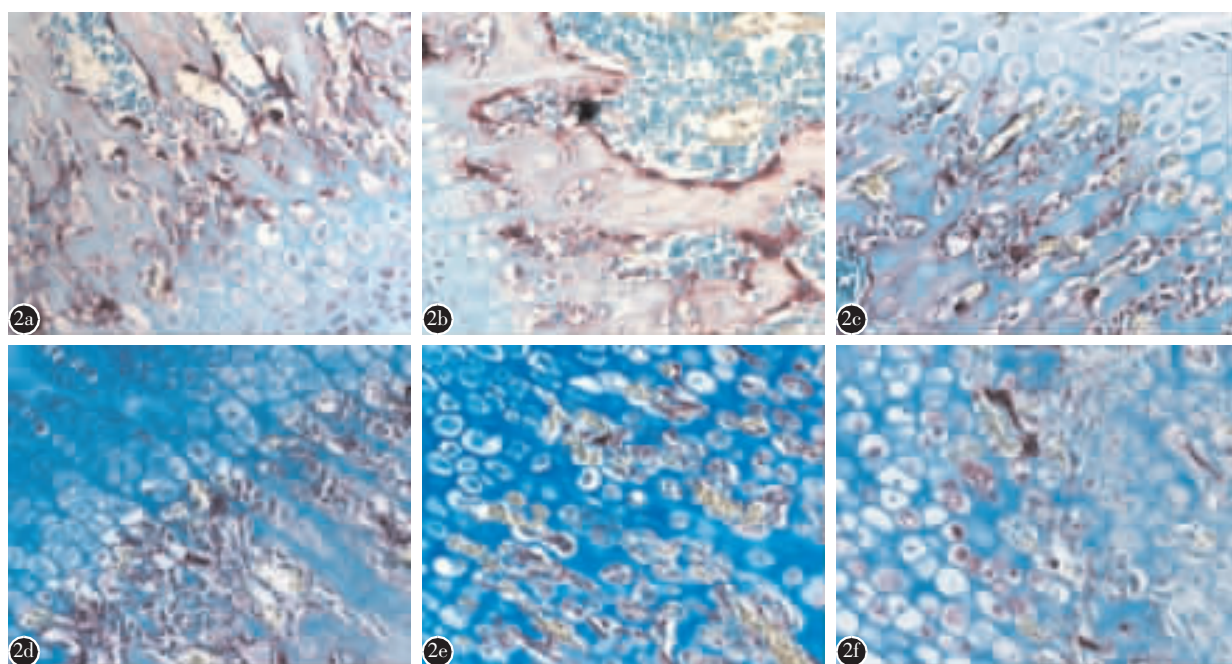


图 2 大鼠股骨远端干骺端 TRAP 染色的切片($\times 200$) a、b B 组股骨远端干骺端破骨细胞增多、聚集,大量的破骨细胞附在骨小梁处 c、d C 组股骨远端干骺端较 A 组破骨细胞稍有增多,未观察到骨小梁处破骨细胞的聚集的现象 e、f A 组破骨细胞数量较少

生理特点及变化规律,与临床 SCI 相关性较好。观察大鼠脊髓损伤后早期骨量丢失的情况、骨密度及破骨细胞数量,并与废用性模型比较,观察 SCI 早期与废用性的骨量丢失之间的区别。

骨矿物质密度测定(MBD)是评价骨量丢失的“金指标”^[4,5]。对 SCI 及制动 10 天后大鼠进行 BMD 的测定,发现 SCI 及制动早期均可引起骨量丢失,但 SCI 后损伤平面以下骨量丢失的较多,而损伤平面以上部位影响不大。微观结构^[6]研究也表明:SCI 后损伤平面以下部位骨小梁的改变比骨质疏松的更显著。

SCI 后造成骨质疏松的原因较多,如 SCI 平面以下血流动力学的变化^[7],激素的分泌异常^[8],损伤平面以下骨组织中 IL-6 的含量增加等^[9],但目前具体机制还不是很清楚。研究提示 SCI 后骨转换机制发生了变化,骨形成和骨吸收偶联失衡,骨吸收超过了骨生成,导致了骨量的丢失和骨的微观结构发生变化^[10,11]。本研究直观观察 B 组及 C 组大鼠股骨干骺端破骨细胞数量,发现 SCI 早期大鼠股骨干骺端破骨细胞数量明显增多,大量的破骨细胞附着在骨小梁上,活性明显增强,SCI 可以刺激破骨细胞的增生,活性增强可能是导致脊

髓平面以下骨量快速大量丢失的原因之一。相比之下,C 组中大鼠股骨干骺端破骨细胞增殖的数量明显比 B 组少,骨量丢失的程度也明显少于 B 组。C 组中的破骨细胞增生的原因可能是由于大鼠双下肢制动后,局部缺乏应力刺激,导致骨形成减弱,破骨细胞增生,骨吸收加强。

关于 SCI 后损伤平面之下破骨细胞数量增多及活性增强的机制尚不明确,有研究发现核因子 kappa B 受体激活物配体(receptor activator of nuclear factor KB ligand,RANKL)和骨保护素(osteoprotegerin,OPG)是调控骨吸收和骨形成的关键因子^[12,13]。RANKL 表达于成骨细胞及基质细胞的表面,与造血前体细胞表面的 RANK 结合后可促进破骨细胞的发生、活化、存活和粘附在骨表面^[14-17]。OPG 作为 RANKL 的伪受体与 RANKL 结合,阻止其与 RANK 的结合。在 SCI 大鼠的成骨细胞中发现 RANKL 的 mRNA 及蛋白表达增加,然而 OPG 的表达明显减少,这种 RANKL/OPG 比例的增加导致破骨细胞增殖,骨吸收增加^[18]。还有研究^[19]发现,SCI 后损伤平面下骨组织微环境中神经肽 P 物质(substance P,SP)免疫阳性神经纤维增多,SP 的含量增加,SP 对骨髓 MSCs 源性成骨

细胞的生物学特性有影响。柳达等^[20]对神经肽 P 物质调控 SCI 大鼠骨髓间充质干细胞源性成骨细胞 RANKL/OPG 的表达做了研究, 证明 SP 在成骨细胞与破骨细胞偶联的关系中发挥重要作用, 神经肽 SP 可以促进骨髓 MSCs 源性成骨细胞 RANKL 的表达, 抑制 OPG 的表达, 刺激破骨细胞的发生和活化, 最终引起骨吸收增强和骨量丢失。

综上所述, SCI 后, 破骨细胞数量大量增多, 活性增强, 骨吸收加强, 引起脊髓损伤平面以下骨量的大量、快速丢失, 与废用性骨量丢失相比, SCI 后的程度更大。本实验从大鼠骨密度及股骨远端破骨细胞计数的角度探讨了 SCI 后骨量丢失的病理机制, 并与废用性的骨量丢失作了比较, 但是 SCI 及制动后早期造成股骨远端骨量丢失的机制尚需进一步的探讨。

4 参考文献

- Garland DE, Adkins RH, Kushwaha V, et al. Risk factors for osteoporosis at the knee in the spinal cord injury population [J]. Spinal Cord Med, 2004, 27(3): 202-206.
- Warden SJ, Bennell KL, Matthews B, et al. Quantitative ultrasound assessment of acute bone loss following spinal cord injury: a longitudinal pilot study [J]. Osteoporos Int, 2002, 13(7): 586-592.
- Teng YD, Lavik EB, Qu X, et al. Snyder EY functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 3024-3029.
- Siris ES, Brennan SK, Miller PD, et al. Predictive value of low BMD for 1-year fracture outcomes is similar for postmenopausal women ages 50-64 and 65 and older: results from the National Osteoporosis Risk Assessment (NORA) [J]. Bone Miner Res, 2004, 19(3): 1215-1220.
- Poetzschner R, Abendroth K. Relationship of risk factors, clinical and X-ray findings of osteoporosis with BMD results of different QCT and pQCT measurements [J]. Bone Miner Res, 2001, 16(5): 518-518.
- Liu D, Zhao CQ, Li H, et al. Effects of spinal cord injury and hindlimb immobilization on sublesional and supraslesional bones in young growing rats [J]. Bone, 2008, 43(1): 119-125.
- Chantraine A, Nussgens B, Lapiere CM, et al. Bone remodeling during the development of osteoporosis in paraplegia [J]. Calcif Tissue Int, 1986, 38(6): 323-327.
- Hjeltnes N, De Groot P, Birkeland KI, et al. Tetraplegic subjects have hyperleptinaemia with marked circadian variation [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2005, 62(2): 223-227.
- 李靖, 王全平, 李新奎, 等. 脊髓损伤对大鼠松质骨 BMP, TNF- α 及 IL-6 表达的影响 [J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(2): 106-107.
- Slade JM, Bickel CS, Modlesky CM, et al. Trabecular bone is more deteriorated in spinal cord injured versus estrogen-free postmenopausal women [J]. Osteoporos Int, 2005, 16(3): 263-272.
- Modlesky CM, Majumdar S, Narasimhan A, et al. Trabecular bone microarchitecture is deteriorated in men with spinal cord injury [J]. Bone Miner Res, 2004, 19(1): 48-55.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation [J]. Cell, 1998, 93(2): 165-176.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [J]. Cell, 1997, 89(2): 309-319.
- Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, et al. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function [J]. Immunol, 1999, 163(1): 434-442.
- Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts [J]. Cell Biol, 1999, 145(3): 527-538.
- Lacey DL, Tan HL, Lu J, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo [J]. Am J Pathol, 2000, 157(2): 435-448.
- O'Brien EA, Williams JH, Marshall MJ. Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 274(2): 281-290.
- Jiang SD, Jiang LS, Dai LY. Effects of spinal cord injury on osteoblastogenesis, osteoclastogenesis and gene expression profiling in osteoblasts in young rats [J]. Osteoporos Int, 2007, 18: 339-349.
- Liu D, Li H, Zhao CQ, et al. Changes of substance P-immunoreactive nerve fiber innervation density in the sublesional bones in young growing rats at an early stage after spinal cord injury [J]. Osteoporos Int, 2008, 19(4): 559-569.
- 柳达, 黄瑛, 刘忠厚, 等. 神经肽 P 物质调控脊髓损伤大鼠骨髓间充质干细胞源性成骨细胞 RANKL/OPG 的表达 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(6): 415-419.

(收稿日期: 2010-11-23 修回日期: 2011-01-30)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 刘彦)