

# 去睾大鼠骨丢失的组织学机理研究

成羿 朱杭 黄海

(杭州市中医院, 浙江 杭州 310007)

**【摘要】** 目的 探讨雄性大鼠去睾后骨丢失的组织学机理, 为临床治疗用药提供理论依据。方法将 30 只 10 月龄雄性大鼠, 用完全随机设计方法分为正常对照组和去睾病理组, 每组各 15 只。饲养 12 周后处死取腰 1~2 脊椎, 作不脱钙骨切片, 测定骨形态计量学各骨量参数和表面参数。两组参数作方差分析, 显著性检验。结果 去睾病理组骨量参数小于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 其表面参数显示: 成骨参数减少、破骨参数增加、骨转换加快 ( $P < 0.05$ )。结论 重建负平衡和骨高转换是导致去睾后骨丢失的组织学机理。临床治疗老年男性骨质疏松症应联合应用促进骨形成、抑制骨吸收和降低骨转换药物。

**【关键词】** 骨质疏松, 老年性 骨密度 组织学

**Studies on Histological Mechanism of Bone Loss of Castrated Male Rats** CHENG Yi, ZH U Hang, H UANG Hai. Hangzhou Chinese Traditional Medicine Hospital (Zhejiang Hangzhou, 310007)

**【Abstract】 Objective** To investigate the histological mechanism of the bone loss of castrated male rats and provided theoretical basis for clinical treatment. **Methods** 30 male rats aged 10 months were randomly divided into two groups as normal and castrated pathological groups. The animals were sacrificed after administration Heihudan (a TCM agent) for 12 weeks. L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> were chosen to make bone slices without decalcification and then diverse bone indexes and superficial indexes of bone morphological metrology were determined. ANOVA was used for data analysis. **Results** Bone indexes in the pathological group were smaller than the normal one ( $P < 0.05$ ). The superficial indexes show: osteoclast index increased, osteogenesis index decreased, bone transformation became faster than before ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Reconstruction of negative balance and high bone transformation were the mechanisms of the bone loss of castrated male rats. The method of combining with drugs to promote bone formation, restrain bone absorption, reduce bone transformation seems to be useful for the treatment of senile male patients with osteoporosis.

**【Key Words】** Osteoporosis, senile Bone density Histology

随着人均寿命的延长, 男性骨质疏松症(属老年性骨质疏松)的发病率呈持续上升趋势, 骨质疏松性骨折给男性患者所造成的生活能力丧失及生命危险丝毫不逊于女性。但目前有关老年男性骨质疏松症的研究却少见报道, 其骨质疏松的发生机理仍不十分明确。本研究应用骨组织形态计量学方法, 从组织学角度对去睾大鼠骨丢失的机理进行探讨, 为临床治疗用药提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 动物** 10 月龄 SD 雄性大鼠 30 只, 体重  $290 \pm 25$ g。由浙江省实验动物中心提供。

**1.2 动物分组和造模** 将 30 只大鼠用完全随机设计方法分为正常对照组和去睾病理组。所有大鼠均以 3% 戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔内注射麻醉, 正常组行单纯切开阴囊术, 病理组行去睾术(切除双侧睾丸)<sup>[1]</sup>。

**1.3 动物饲养和四环素标记** 置大鼠于常温 ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) 下分笼饲养, 自由摄水、食物。饲料为标准饲料, 其中钙、磷含量分别为 1.6% 和 1.1%。12 周后处死。在处死前第 14 天, 每日以 0.25% 盐酸四环素 35mg/kg 体重腹腔内注射 2 天, 于处死

前第 4 天, 再以同样剂量同一时间内注射 2 天。

**1.4 取材和组织标本制作** 实验期间有 2 只大鼠因手术中失血过多等原因死亡而剔除。其余 28 只大鼠均在实验结束时以过量戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 截取 L<sub>1</sub>~L<sub>2</sub> 脊椎骨, 常规福尔马林溶液固定, 乙醇上升梯度脱水, 甲基丙烯酸甲酯包埋<sup>[2]</sup>。用 Reichart—Jung 型重型切片沿椎体矢状面做不连续切片, 在椎体中矢面时, 分别取厚度为 12 $\mu\text{m}$  和 5 $\mu\text{m}$  切片数张。12 $\mu\text{m}$  切片不染色为荧光观察用, 5 $\mu\text{m}$  切片用 1% 甲苯胺蓝染色。

**1.5 骨组织形态计量学分析** 采用 Option III RS 多功能显微镜, Morphomat—10 半自动图象分析系统。测量参数如下<sup>[2]</sup>:

- (1) TBV(%): 骨小梁相对体积;
- (2) MTT( $\mu\text{m}$ ): 骨小梁指数(骨小梁平均厚度);
- (3) MWT( $\mu\text{m}$ ): 骨小梁平均骨壁厚度;
- (4) MCT( $\mu\text{m}$ ): 皮质骨平均厚度;
- (5)  $\delta\text{fT}$ (d): 骨小梁重建单位成骨时相;
- (6) OSt(%): 骨小梁形成(类骨质)表面占骨小梁总表面百分比;
- (7) OSta(%): 骨小梁活性形成(类骨质)表面占骨小梁总表面的百分比;
- (8) MBNt(n/ $\mu\text{m}$ ): 骨小梁表面成骨细胞数;
- (9) RSt(%): 骨小梁吸收表面占骨小梁总表面百分比;
- (10) RSta(%): 骨小梁活性吸收表面占骨小梁总表面的百分比;
- (11) MCNt(n/ $\mu\text{m}$ ): 骨小梁表面破骨细胞数;

(12) LSt(%) : 骨小梁四环素标记表面占骨小梁总表面的百分比; (13) MRt( $\mu\text{m}/\text{d}$ ) : 骨小梁骨矿化率; (14) OSe(%) : 骨内膜形成(类骨质)表面占骨内膜总表面的百分比; (15) OSea(%) : 骨内膜活性形成(类骨质)表面占骨内膜总表面的百分比; (16) MBNe( $\text{n}/\mu\text{m}$ ) : 骨内膜表面成骨细胞数; (17) RSe(%) : 骨内膜吸收表面占骨内膜总表面的百分比; (18) RSea(%) : 骨内膜活性吸收表面占骨内膜总表面的百分比; (19) MCNe( $\text{n}/\mu\text{m}$ ) : 骨内膜表面破骨细胞数; (20) LSe(%) : 骨内膜四环素标记表面占骨内膜总表面的百分比; (21) MRe( $\mu\text{m}/\text{d}$ ) : 骨内膜骨矿化率。

表 1 两组大鼠骨量和骨小梁重建参数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TBV(%)	MTT( $\mu\text{m}$ )	MWT( $\mu\text{m}$ )	MCT( $\mu\text{m}$ )	$\delta\text{fT}(\text{D})$
正常对照组	15	35.83 $\pm$ 3.11	56.02 $\pm$ 3.21	25.96 $\pm$ 2.29	194.30 $\pm$ 13.29	21.72 $\pm$ 2.96
去睾病理组	13	29.09 $\pm$ 3.34*	48.59 $\pm$ 3.77*	20.21 $\pm$ 1.37*	155.92 $\pm$ 15.61*	28.24 $\pm$ 3.52*

注: \* 与正常对照组比较,  $P < 0.05$

2.2 与成骨有关的骨表面参数比较 由表 2 可见, 各组大鼠骨内膜表面有关成骨参数变化与骨小梁表面有关成骨参数变化基本一致。表现为去睾病理组骨形成表面(OS)与正常组比较虽无统计学差异, 但活性骨形成表面(OSa)、成骨细胞数

表 2 两组大鼠与成骨有关的骨表面参数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	骨小梁表面成骨参数					骨内膜表面成骨参数				
		OSt(%)	OSta(%)	LSt(%)	MBNt( $\times 10^{-3}\text{n}/\mu\text{m}$ )	MRt( $\mu\text{m}/\text{D}$ )	OSe(%)	OSea(%)	LSe(%)	MBNe( $\times 10^{-3}\text{n}/\mu\text{m}$ )	MRe( $\mu\text{m}/\text{D}$ )
正常对照组	15	14.36 $\pm$ 1.59	7.61 $\pm$ 1.17	10.44 $\pm$ 1.58	41.37 $\pm$ 2.89	1.22 $\pm$ 0.25	9.97 $\pm$ 0.94	5.67 $\pm$ 0.81	10.17 $\pm$ 0.75	30.94 $\pm$ 2.63	1.07 $\pm$ 0.16
		14.72 $\pm$ 1.25	5.24 $\pm$ 0.59*	7.21 $\pm$ 1.15*	27.44 $\pm$ 2.88*	0.77 $\pm$ 0.16*	9.67 $\pm$ 0.61	4.08 $\pm$ 0.62*	7.44 $\pm$ 1.20*	24.00 $\pm$ 2.69*	0.76 $\pm$ 0.10*

注: \* 与正常对照组比较,  $P < 0.05$

2.3 与破骨有关的骨表面参数比较 由表 3 可见, 各组大鼠骨内膜表面有关破骨参数与骨小梁表面有关破骨参数变化基本一致。表现为去睾病理组骨吸收表面(RS)、活性骨吸收表面(RSa)和破骨细胞数(MCN)与正常组比较明显增加( $P < 0.05$ )。与正常组比较, 去睾病理组骨小梁吸收表面(RSt)增

表 3 两组大鼠与破骨有关的骨表面参数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	骨小梁表面破骨参数			骨内膜表面破骨参数		
		RSt(%)	RSta(%)	MCNt( $\times 10^{-3}\text{n}/\mu\text{m}$ )	RSe(%)	RSea(%)	MCNe( $\times 10^{-3}\text{n}/\mu\text{m}$ )
正常对照组	15	9.47 $\pm$ 1.23	2.07 $\pm$ 0.25	0.79 $\pm$ 0.11	7.02 $\pm$ 1.16	1.79 $\pm$ 0.33	0.63 $\pm$ 0.12
去睾病理组	13	15.60 $\pm$ 1.66*	3.37 $\pm$ 0.72*	1.22 $\pm$ 0.20*	10.29 $\pm$ 1.00*	2.44 $\pm$ 0.23*	0.89 $\pm$ 0.13*

注: \* 与正常对照组比较,  $P < 0.05$

2.4 组织形态观察 镜下观察发现, 去睾病理组可见广泛骨吸收表面, 有时吸收和形成在同一表面上, 静止表面稀少, 骨小梁中断穿孔现象也较常见(见图 1、图 2)。

### 3 讨论

3.1 有关造模方法和观察方法 老年男性随着增龄而雄激素不足在骨质疏松症的发病机理中起重要作用。根据这一现象, 考虑并采用摘除睾丸的方法建立大鼠骨质疏松症模型已有较多报道<sup>[3-6]</sup>。为了加快骨质疏松的发展, 一些研究者常同时伴加其他处理, 如给予低钙饮食, 皮质激素等<sup>[3,4]</sup>。有人亦选用 2~4 月龄未成熟大鼠<sup>[6]</sup>, 尽管可较快地复制出骨质疏

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 8.0 统计分析软件微机处理, 两组参数作方差分析, 显著性检验。

### 2 结果

2.1 骨量及骨小梁重建参数比较 由表 1 可见, 去睾病理组大鼠骨小梁相对体积(TBV), 皮质骨平均厚度(MCT), 骨小梁指数(MTT), 以及骨小梁平均骨壁厚度(MWT)均较正常组明显减少( $P < 0.05$ ); 骨小梁重建单位成骨时相( $\delta\text{fT}$ )大于正常组( $P < 0.05$ )。与正常组比较, 去睾病理组骨小梁相对体积(TBV)降低 18.81% ( $P < 0.05$ )。

(MBN)、四环素标记表面(LS)、骨矿化率(MR)明显减少( $P < 0.05$ )。与正常组比较, 去睾病理组骨小梁活性形成表面(OSta)减少 31.14% ( $P < 0.05$ ); 骨内膜活性形成表面(OSea)减少 28.04% ( $P < 0.05$ )。

加 64.73% ( $P < 0.05$ ); 骨小梁活性吸收表面(RSta)增加 62.80% ( $P < 0.05$ ); 骨内膜吸收表面(RSe)增加 46.58% ( $P < 0.05$ ); 骨内膜活性吸收表面(RSea)增加 36.31% ( $P < 0.05$ )。

松模型, 但由于其基本生理条件仅能代表年轻机体, 与临床老年肾虚骨痿的发病过程不尽吻合。为此, 本研究选用 10 月龄雄性大鼠, 此时动物处于中年后期, 趋向于类似男子精少, 肾藏衰的年龄阶段及机体状态。再采用手术摘除睾丸, 使动物垂体-性腺轴的平衡遭到破坏。而诱导肾虚骨痿的发生。在摘除睾丸三个月后, 模鼠年龄已达 13 个月, 进入中老年, 且未加其他处理, 如其发生骨质疏松显然应归因于雄性激素缺乏及增龄本身。这既与中医肾虚骨痿的病理实质相符, 也与现代医学对老年性骨质疏松症的认识一致。

3.2 去睾大鼠骨丢失的组织学机理分析 大鼠去睾后骨小

梁相对体积减小,骨小梁厚度和皮质骨平均厚度变薄。表明骨量明显丢失。骨壁厚度变薄说明存在重建负平衡。这是骨丢失的主要原因,属永久性骨丢失。造成重建负平衡的因素包括两个方面。其一是活性骨形成表面减少、成骨细胞数减少,提示成骨细胞的量和活力均降低,四环素标记表面减少、骨矿化率降低和成骨时相延长也在一定程度上反应了成骨活力的下降。其二是骨吸收表面增加、活性骨吸收表面增加、破骨细胞数增多,不但显示破骨细胞的量和活力增加,而且也是作为吸收时相延长的一种提示。其吸收表面显著增多,而形成表面无明显变化,提示骨重建单位激活率增高,即骨转换加快。由于破骨速度快于成骨速度 2 倍<sup>[7]</sup>,这种因空间时间差造成的暂时性骨丢失可以随骨转换加快而增多,这是除重建负平衡以外造成去睾后大鼠骨丢失的另一原因。因此重建负平衡和骨高转换是导致去睾后骨丢失的组织学机理。

**3.3 对老年男性骨质疏松发生机理的不同认识** 目前大多学者认为,雄性激素不足引起的老年男性骨质疏松症,是由于骨形成表面减少,成骨活性减弱,蛋白质合成能力下降,骨胶原形成减少所致,而骨吸收表面和吸收活性并不增加,其骨重建单位激活率降低,属低转换型骨丢失<sup>[7-9]</sup>。然而与其相反的观点也不乏报道,在一项对 27 名男性椎体骨折病人的研究结果显示,血清碱性磷酸酶,尿羟脯氨酸和尿钙均较同年龄健康对照组高<sup>[10]</sup>,提示骨吸收增加。Sharp 等研究了 21 例男性椎体骨质疏松病人,证实了骨形成降低而骨吸收增加明显<sup>[11]</sup>。目前又有资料表明,老年男性髌部骨折病人血清骨钙素偏低,而骨吸收显著增加<sup>[12]</sup>。本实验也显示:去睾后大鼠成骨细胞活性减弱,但骨形成表面与正常组无差异,骨吸收表面增加非常显著( $P < 0.05$ ),提示激活率明显升高,属高转换型骨丢失。同时在镜下观察中发现病理组广泛骨吸收表面,且有时吸收与形成在一个表面上,以及由于骨转换加快,骨结构破坏,致骨小梁中断增多等,这也是高转换型骨丢失的形态学特征之一。其原因可能由于雄激素减少后影响降钙素的分泌和贮备,体内降钙素水平低下,而降钙素可通过破骨细胞受体直接抑制破骨细胞活性,故导致破骨细胞活性增强<sup>[13]</sup>,其机理

有待进一步研究。

(本文图 1, 2 见封 3)

(本实验得到北京医科大学附属三院骨科郭昭庆博士和骨科实验室王志国主任的大力指导和支持,在此表示感谢。)

#### 参考文献

- [1] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1991.1286.
- [2] 时光达,陈宝兴.实验骨伤科学.北京:人民卫生出版社,1993.105~117.
- [3] Kalu DN. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats, *Endocrinol*, 1984, 115: 507.
- [4] Tabuchi C. Bone Defect in ovariectomized rats. *J Clin Invest*, 1986, 78: 633.
- [5] Donahue HJ. Endurance training and bone loss in calcium deficient and ovariectomized rats. *Metabolism*, 1998, 37(8): 741.
- [6] 施新猷.医学动物实验方法.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1986.207.
- [7] Jackson JA. Osteoporosis in men. diagnosis, pathophysiology and prevention. *Medicine*, 1990, 69: 137.
- [8] Marie PJ, DeVernejoul MC, Connes D. Decreased DNA synthesis by cultured osteoblastic cells in eugonadal osteoporotic men with defective bone formation. *J Clin Invest*, 1991, 88: 1167.
- [9] Zervick JE, Sakhaee K, Breslau NA, et al. Impaired bone formation in male idiopathic osteoporosis: further reduction in the presence of concomitant hypercalciuria. *Osteoporosis in men. Bone Miner*, 1989, 5: 347.
- [10] Kaufman JM, Vermeulen A. Declining gonadal function in elderly men. *Baill Clin Endocrinol Metab*, 1997, 11: 289.
- [11] Sharp CA, Worsfold M, Rowlands PR, et al. Accurate prediction of spinal osteoporosis in men using a biochemical measure of collagen balance. *Bone*, 1994, 15: 243.
- [12] Boonen S, Vanderschueren D, Cheng XG, et al. Age related (type III) femoral neck osteoporosis in men: biochemical evidence for both hypovitaminosis D and androgen deficiency induced bone resorption. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 2119.
- [13] 刘忠厚.骨质疏松症.北京:化学工业出版社,1992.275.

(收稿:2000-08-28 修回:2000-11-17 编辑:李为农)

## • 病例报告 •

### 双腕掌关节脱位一例

石冰 李乐元

(聊城市人民医院,山东 聊城 252000)

××,女,19岁,学生。2小时前患者骑自行车行驶中,被横向坠落的木棒击中双侧手背、前臂。双侧手背肿胀,呈银叉样畸形,压痛明显,手指伸屈功能障碍。X线片显示双侧桡骨、桡骨骨折外,双侧掌骨基底部向背侧移位,并和远排腕骨相重叠。双侧桡骨、桡骨给予相应处理,双侧腕掌关节脱位行闭合复位,配合中药薰洗及功能锻炼。术后1个月随

诊,双手手指伸屈功能较差,2个月后双手功能恢复良好。

**讨论** 双腕掌关节同时脱位临床罕见,因为掌骨基底间、腕骨间及掌骨和腕骨间均有坚强的韧带相连,且腕掌关节的活动范围极小,坚固稳定,因此很难脱位。发生脱位多为直接暴力所致。本例受伤时,双手握持自行车把,横向坠落的木棒猛击双侧手背部及前臂,使骨折后

的尺桡骨远端连同腕骨向掌侧移位,而掌骨基底部承受相反的冲击力,使腕掌关节背侧薄弱的韧带及关节囊被撕裂,而发生腕掌关节背侧脱位,新鲜脱位者以手法复位为主。如手法复位失败,或陈旧性脱位明显妨碍手部功能及疼痛者,可以切开复位及克氏针固定,或将掌骨基底部骨突切除,或作腕掌关节融合术。

(编辑:李为农)

## 基质金属蛋白酶-3 和其组织抑制剂-1 在椎间盘中的表达及意义

(正文见 204 页)

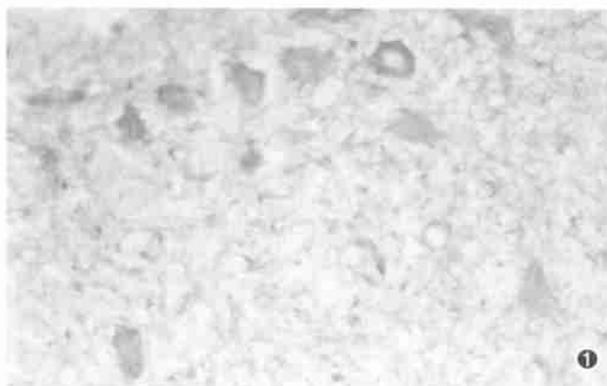


图 1 软骨细胞 MMP3 染色阳性; 细胞核为蓝色; 细胞浆为棕黄色。ABC  $\times 400$

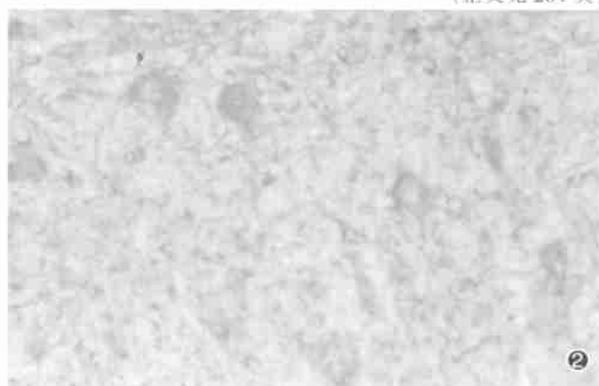


图 2 软骨细胞 TIMP-1 染色阳性; 细胞浆为棕黄色; 细胞核为蓝色。ABC  $\times 400$

## 胚胎脊髓移植后大鼠损伤脊髓 c-Jun 免疫反应的变化及其意义

(正文见 206 页)



图 1 A 组大鼠脊髓损伤后 7 天 c-Jun 免疫反应的表达,  $\times 200$



图 2 B 组大鼠脊髓损伤后 7 天 c-Jun 免疫反应的表达,  $\times 200$

## 去睾大鼠骨丢失的组织学机理研究

(正文见 209 页)



图 1 病理组: 广泛的骨吸收表面, 提示: 骨吸收增强, 骨重建单位激活率增高, 骨转换加快 (甲苯胺蓝染色 光镜  $\times 400$ )



图 2 病理组: 骨小梁稀疏、较薄, 且有较多的中断现象, 说明骨量丢失, 骨转换加快导致骨结构破坏 (甲苯胺蓝染色 光镜  $\times 100$ )