基础研究 文章编号：0253-3626（2011）09-1033-04

兔椎体成形术后骨水泥－骨界面组织形态学观察和骨钙素动态表达研究

汪礼军，胡侦明
（重庆医科大学附属第一医院骨科，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察兔椎体成形术后骨水泥-骨界面组织形态学变化和骨钙素（Osteocalcin，OC）动态表达及意义。方法：24 只骨质疏松新西兰大白兔随机分成聚甲基丙烯酸甲酯（Polymethylmethacrylate，PMMA）组和对照组，实验组建立椎体成形术模型，对照组只进行手术不注射骨水泥，分别于术后 1、24 h、3 d、7 d、4 周、12 周行 X 线观察椎体内骨水泥情况，处死兔子，取实验椎体，行 HE 染色观察骨水泥-骨界面组织学形态变化，用免疫组化方法检测骨水泥-骨界面 OC 蛋白的动态表达水平。结果：术后 PMMA 组 X 线正侧位片显示手术椎体内骨水泥无脱落、松动，骨水泥体积未发生明显变化。对照组椎体手术部位见约 0.5 cm 大小直径的圆形低密度区。术后取标本，见 PMMA 与周围组织紧密结合，骨水泥体积较术前无明显变化。HE 染色，对照组的骨愈合过程与正常骨组织一致，但有所延迟，PMMA 周围未见明显组织坏死。PMMA 组和对照组骨水泥界面 OC 表达在术后逐渐增高，但 PMMA 组较对照组有所延迟。结论：PMMA 骨水泥-骨界面有一定的炎症反应，较对照组有所延迟，表明 PMMA 的放热反应和单体毒性不会造成骨组织永久坏死；PMMA 骨水泥-骨界面修复过程中 OC 高表达，比正常愈合过程有所延迟，表明局部骨组织细胞功能未受不可逆损害。

【关键词】椎体成形术；骨质疏松；骨钙素
【中国图书分类法分类号】R681.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-18

Observation on the histomorphological changes and study of the dynamic expression of OC at the bone cement interface of rabbit after vertebroplasty

WANG Li-jun, HU Zhen-ming
(*Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the histomorphological changes and study the dynamic expression of OC at the bone cement interface of rabbit after vertebroplasty. *Methods*: 24 New-Zealand rabbits with osteoporosis were randomly divided into two groups, including experimental group and control group. The experimental group were established into vertebroplasty model, and the procedure in control group was completed without bone cement injection. Respectively, at 1, 24 h, 3 d, 7 d, 4 w and 12 w, rabbits from each group were killed by aeroembolism. The operative vertebral bodies were taken out as research objects. The histomorphological changes were observed by HE staining and the OC expression of the rabbits was studied by immunohistochemistry stain at the bone cement interface. *Results*: At all of the injected sites, there was intimate contact between the cement and the surrounding tissue in experimental group. The volume of PMMA had no prominent changes. There was a 0.5 cm low density area in the puncture site in the control group. After the operative vertebra was taken out, it was observed that PMMA was closely integrated with the surrounding tissue. Bone cement volume had no significant change compared with the preoperative volume. The control group showed normal bone healing process in HE staining. The bone cement was closely integrated with bone surrounding tissue in experimental group. There was no osteonecrosis between PMMA and surrounding tissue. The OC expression increased in both groups after surgery. Compared with the control group, the OC expression of experimental group was delayed. *Conclusion*: There is inflammatory reaction at the bone cement interface, and it is delayed compared with the control group. It indicates that the exothermic reaction of PMMA and monomer toxicity do not cause permanent bone necrosis. During the curing process, the OC shows high expression, which is delayed compared with control group. This demonstrates that the function of local bone tissue and cells doesn't suffer irreversible damage.

【Key words】vertebroplasty; osteoporosis; osteocalcin

作者介绍：汪礼军（1983- ），男，硕士，
研究方向：脊柱外科、骨质疏松。
通信作者：胡侦明，男，教授，Email：zhenminghu62@yahoo.com.cn。
基金项目：重庆市自然科学基金资助项目（编号：CSTC,2008BB5080）。

椎体成形术应用于治疗骨质疏松所致的椎体压缩性骨折，其主要的优点是迅速缓解疼痛、稳定椎体以及较少的并发症。目前，椎体成形术的填充材料主要是聚甲基丙烯酸甲酯（Polymethylmethacrylate，PMMA），该材料最早被运用于口腔科填充材料，其特点是安全、低毒，有较好的强度和刚度，能迅速稳定骨质疏松性骨折椎体和缓解患者的疼痛，是目前最为理想的灌注材料。关于椎体成形术后骨水泥-骨界面损伤修复的报道较少。本实验拟模仿人经皮穿刺椎体成形术，在骨质疏松兔子模型腰椎注入 PMMA 骨水泥，动态观察注射 PMMA 骨水泥后椎体骨缺损修复的组织形态学变化及骨水泥-骨界面骨钙素（Osteocalcin，OC）动态表达，从分子及形态学水平了解 PMMA 骨水泥植入后界面局部骨组织的损伤变化及修复过程，为全面评价 PMMA 骨水泥对机体的影响及转归提供一定的理论及实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 24 只老年新西兰雌兔，兔龄 3.0~3.5 年，平均 3.2 年，平均体重 3~4 kg，平均 3.5 kg（均由重庆医科大学实验动物中心提供），经 DXA 检测符合骨质疏松标准者采用。术前拍腰椎正侧位 X 线片提示腰椎序列及骨质正常。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 24 只实验动物随机编号，分为实验组和对照组，实验组手术并注射 PMMA 骨水泥，对照组只进行手术而不注射骨水泥，再分为术后 1、24 h、3 d、7 d、4 周、12 周共 6 个亚组，每个亚组 2 只兔子。用 3%戊巴比妥钠（1 ml/kg）经耳缘静脉注射麻醉兔子；麻醉满意后侧卧位，取背部旁正中切口，显露 $L_{2\text{-}5}$ 椎体的前半部分，由椎弓根中线与横突前缘连线交点前方 1 mm 处进针，与横突呈 80°~85°夹角，针体前倾 0°~5°夹角，进针深度 4~6 mm。将 PMMA 调配后装入 1 ml 注射器，经硬膜外穿刺针缓慢注射进实验组椎体，边注射边拔针，注射量 0.3~0.5 ml。每只进行 3 个椎体，对照组只进行手术不注射骨水泥；术后 7 d 肌肉注射青霉素 80 万U/（只·d）。实验动物均由本院实验动物中心专业人员饲养。

1.2.2 动物标本的采集 术后 1、24 h、3 d、7 d、4 周、12 周取动物标本，取标本前摄取腰椎侧位 X 线片检查，观察骨水泥材料是否在位、有无脱落，观察植入材料形态变化。随即用空气栓塞的方法处死兔子，从原手术入路进入，取出实验椎体节段，去除椎体附件，包括其上肌肉、韧带、椎弓根、椎板和椎间盘，只剩椎体，锡箔纸包裹密闭冷藏于-75℃保存备用。

1.2.3 HE 观察 标本经固定、脱钙、常规石蜡包埋、切片，HE 染色，镜下观察。

1.2.4 免疫组织化学染色 每个时间段切片行免疫组化检测 PMMA 骨水泥-骨界面 OC 表达。免疫组化基本步骤：石蜡切片二甲苯脱蜡，梯度酒精水化，自来水冲洗片刻，蒸馏水冲洗片刻，磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered saline，PBS）洗 5 min；复合消化液室温消化 10 min，PBS 溶液洗 3 次，每次 3 min；3% H_2O_2 室温孵育 5 min，以消除内源性过氧化物酶的活性，PBS 溶液洗 3 次，每次 3 min；5%正常山羊血清封闭，37℃ 30 min，倾去血清，勿洗；滴加适当比例稀释的一抗，阴性对照滴加等量 PBS，37℃孵育 1 h 后 4℃过夜，PBS 溶液洗 3 次，每次 3 min；滴加山羊抗兔 IgG，37℃孵育 30 min，PBS溶液洗 3 次，每次 3 min；滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液，37℃孵育 30 min，PBS 溶液洗 3 次，每次 3 min；显色剂显色（现配现用）；自来水充分冲洗，复染，封片。

1.3 统计处理

图像分析通过与计算机相连的显微镜采集到的免疫组化切片图像存入微机用 Image-Pro Plus6.0 图像处理系统进行分析。测定骨水泥-骨界面阳性细胞和基质中染色平均光密度值，每组 2 张切片，每张切片随机取 3 个视野，取平均光密度值为该标本的阳性表达的灰度值。统计分析中各指标均以均数±标准差（n=12，$\bar{x}\pm s$）表示，采用重复测量设计的方差分析，以 SPSS11.0 统计软件进行分析。

2 结 果

术后 X 线检查未见骨水泥脱落、松动，术后 12 周骨水泥材料体积未见明显变化，骨与材料紧密结合（图 1）。对照组椎体手术部位见约 0.5 cm 大小直径的圆形低密度区。

椎体成形术后标本观察显示，PMMA 组标本骨与材料均紧密结合骨水泥体积未见明显变化。

HE 染色切片观察，与正常骨组织比较（图 2），PMMA 骨水泥-骨界面间有炎性细胞和纤维组织生成，界面周围未见明显的骨坏死。术后 24 h 出现明显炎症细胞聚集，3 d 达到高峰（图 3），至 7 d 炎症反应减轻，PMMA 组界面间有少量巨噬细胞（图4）。4 周及 12 周时未见明显的炎性细胞。4 周时PMMA 骨水泥-骨界面周围有大量成纤维细胞，结缔组织与正常骨组织之间出现软骨细胞成团生长（图 5）。12 周时 PMMA 骨水泥-骨界面周围软骨向骨组织转换，有大量板层骨形成（图 6）。对照组骨缺损愈合过程与正常骨组织一致。

免疫组化阳性表达信号为黄褐色颗粒，主要定位于胞浆和细胞外基质中，阴性对照均未见着色。对表达强度的分析显示，与正常骨组织相比较，术后 1、24 h、3 d，PMMA 组和对照组 OC 未见明显表达，两者差别无统计学意义（P>0.05）；术后 7 d，对照组 OC 表达逐渐升高，PMMA 组轻度升高，两者差别有统计学差异（P<0.05）；术后 4 周，对照组 OC 明显升高，PMMA 组 OC 升高不如对照组明显，两者差别有统计学差异（P<0.05，图 7）；术后 12 周时 PMMA 组 OC 继续升高，对照组 OC 表达有所下降（P>0.05）（表 1，图 8）。实验结果提示 PMMA 骨水泥-骨界面有一定的炎症反应，较对照组有所延迟，表明 PMMA 的放热反应和单体毒性不会造成骨组织永久坏死。PMMA 骨水泥-骨界面修复过程中 OC 高表达，比正常愈合过程有所延迟，表明局部骨组织细胞功能未受不可逆损害。

一定的异物反应。骨水泥界面组织未见明显坏死区。4 周及 12 周时未见明显的炎性细胞。4 周时 PMMA 周围形成一层纤维组织层，有大量的成纤维细胞出现，有成纤维细胞向成骨细胞转换，靠近正常组织一侧可见成团软骨细胞生长。术后 12 周时界面之间仍有大量的纤维组织，界面间有新骨形成。表明 PMMA 不会影响周围骨组织的愈合，但愈合过程较正常组织有所延迟。对照组的骨愈合过程与正常骨组织一致。

骨水泥-骨界面骨是一种动态的组织，它的重塑过程受到局部和全身性的调节（如基因组、激素、生长因子、细胞因子和载荷情况等），与成骨细胞和破骨细胞活性、骨基质的沉积和矿化作用密切相关。再者，假体骨床的实际状态受到移植物变量的影响，如：移植材料、手术设计、固定方式、表面参数等[5]。

在骨质疏松骨折愈合过程中受到多种因子的调节，在成骨作用方面主要是血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）、成纤维细胞生长因子（Fibroblast growth factor，FGF）、转移生长因子 β（Transforming growth factor，TGF-β）、骨形态发生蛋白（Bone morphogenetic protein，BMP）、血小板衍生生长因子（Platelet-derived growth factor，PDGF）、生长激素（Growth hormone，GH）与胰岛素样生长因子（Insulin-like growth factor，IGF）[6,7]等。破骨作用方面主要有白细胞介素 1（Interleukin-1，IL-1）、白细胞介素 2（Interleukin-2，IL-2）、肿瘤坏死因子 α（Tumor necrosis factor，TNF-α）、白细胞介素 6（Interleukin-6，IL-6）等。OC 属于 γ-羧谷氨酸包含蛋白类，此蛋白类为维生素 K 依赖性。OC 又称骨 γ-羧谷氨酸包含蛋白（Bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing proteins，BGP）。是一种非胶原蛋白，分子量为 5 800，主要是存在于骨和牙质当中。OC 的分子结构特征包括：(1)其 17、21、24 位有 3 个羧化的谷氨酸残基，为 Ca^{+}结合氨基酸。(2)Gla 螺旋：为 Ca 依赖的紧密 α 螺旋结构，这种构象使 Gla 突向同一方向排列，以促进其与羟基磷灰石的结合。(3)羟基末端折叠：潜在的与细胞受体和细胞外蛋白相互作用的位点。OC 是成骨细胞合成并分泌的，沉积在骨基质中，比较稳定，不受骨吸收因素的影响。OC 对机体的代谢调节、成骨分化和骨的构建有重要作用，同时还影响骨矿化和钙离子的动态平衡。研究认为，OC 主要生理功能是维持骨的正常矿化速率，抑制异常的羟磷灰石结晶的形成，抑制生长软骨的矿化速率。抑制前矿化新羟磷灰石结晶的形成和血清钙离子和磷酸盐向骨的流动是 OC 保持正常矿化作用的机理。近期研究发现破骨细胞的趋化与分化也受到 OC 的影响，OC 的羧化末端对破骨细胞的前体有化学诱导作用，可能具有调节骨吸收的作用。实验表明人成骨细胞确实表达 OC 受体，属于 G 蛋白偶联受体超家族成员，通过与成骨性谱系细胞的 OC 受体结合而抑制成骨细胞的活性[8]。大量研究也表明，局部 OC 在骨折愈合过程中有重要作用[9]。Stefan Rammelt 等研究表明 OC 可以提高羟基磷灰石胶原复合物周围骨组织的愈合能力[10]。我们实验研究发现，OC 在骨损伤愈合过程后期呈高表达，术后4周和12周 PMMA 组和对照组 OC 表达均增高，表明 OC 在骨折愈合起重要作用。术后 4 周，PMMA 组 OC 表达不如对照组升高明显，表明在骨水泥-骨界面 OC 表达较对照组有所延迟，但是局部骨组织细胞功能未受不可逆损害。

PMMA 骨水泥-骨界面早期有炎症反应，一周后逐渐减退。表明骨水泥聚合放热和单体毒性不会造成局部组织的永久性坏死。PMMA 骨水泥-骨界面早期有轻微的异物反应，骨折的愈合过程与正常愈合过程类似。4 周时界面间有一层纤维结缔组织，其间大量成纤维细胞生成。12 周时界面间仍有纤维结缔组织。界面间未发现明显骨坏死。PMMA 骨水泥-骨界面组织修复过程中有 OC 高表达，表达较正常愈合组有所延迟，表明局部骨组织细胞的功能未受到不可逆的损害。

参 考 文 献

[1] Turner T M，Urban R M，Singh K，et al.Vertebroplasty comparing injectable calcium phosphate cement compared with polymethylmethacrylate in a unique canine vertebral body large defect model[J].Spine，2008，8(3)：482-487.

[2] Urrutia J，Bono C M，Mery P，et al.Early histologic changes following polymethylmethacrylate injection (vertebroplasty) in rabbit lumbar vertebrae[J].Spine，2008，33(8)：877-882.

[3] Togawa D，Bauer T W，Lieberman I H，et al.Histologic evaluation of human vertebral bodies after vertebral augmentation with polymethyl methacrylate[J].Spine，2003，28(14)：1521-1527.

[4] Togawa D，Kovacic J J，Bauer T W，et al.Radiographic and histologic findings of vertebral augmentation using polymethylmethacrylate in the primate spine：percutaneous vertebroplasty versus kyphoplasty[J].Spine，2006，31(1)：4-10.

[5] Buckwalter J A，Glimcher M J，Cooper R R，et al.Bone biology.Part Ⅱ：Formation，form，modeling，remodeling，and regulation of cell function[J].J Bone Jt Surg，1995，77(8)：1276-1289.

[6] Hu Z M，Sean A F，Stephen K C，et al.The expression of bone matrix proteins induced by different bioimplants in a rabbit sinus lift model[J].Journal of Biomedical Materials Research Part A，2010，95A(2)：1048-1054.

[7] Hu Z M，Sean A F，Stephen K C，et al.Comparison of platelet-rich plasma，bovine BMP and rhBMP-4 on bone matrix protein expression in vitro[J].Growth Factor，2009，27(5)：280-288.

[8] Bodine P V，Komm B S.Evidence that conditionally immortalized human osteoblasts express an osteocalcin receptor[J].Bone，1999，25(5)：535-543.

[9] 高堂成，张春才，康庆林，等.持续加压应力对兔骨折局部 IGF-I 和骨钙素含量的影响[J].第二军医大学学报，2004，25(11)：1220-1223.

[10] Stefan Rammelt，Mirjam Neumann，Uwe Hanisch，et al.Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites[J].J Biomed Mater Res A，2005，73(3)：284-294.

（责任编辑：关蕴良）