

· 基础研究 ·

髁板损伤的显微 CT 表现及病理变化研究

闫东, 景金珠, 于爱红, 白荣杰, 程晓光

(北京积水潭医院, 北京 100035)

摘要 目的:探讨实验性髁板损伤修复过程中的显微 CT 表现及病理变化。**方法:**取 4~5 周龄 Wistar 大鼠 50 只, 选择右侧胫骨制作髁板损伤动物模型, 左侧作为对照。分别于造模后 1、3、7、11 和 21 d 各选取 10 只大鼠处死, 取双侧胫骨行显微 CT 扫描, 观察损伤髁板的影像特征, 并通过组织学切片 HE 染色, 观察髁板内组织细胞的动态改变。**结果:**①对照侧髁板显微 CT 及组织形态表现。造模后 1 d, 显微 CT 图像显示骨骼与干骺端高密度带间波浪形带状低密度区, 边缘清晰; 造模后 7 d, 髁板轻度变窄; 11 d 后逐渐明显变窄, 中间部位较边缘显著; 21 d 时髁板区密度增高, 明显变窄。造模后 1 d, 髁板 HE 染色切片示髁板 4 层结构清晰可见, 软骨细胞呈柱状规律排列; 7 d 后幼稚软骨细胞逐渐减少, 增殖层细胞柱逐渐稀疏, 肥大层宽度减小, 细胞膨大、退化, 髁板逐渐变窄, 其中以造模后 21 d 表现最明显。②观察侧髁板显微 CT 及组织形态表现。造模后 1 d, 显微 CT 可见干骺端骨折; 造模后 3~7 d, 髁板宽度先增加, 然后趋于正常; 11 d 时髁板宽度减小伴新生骨质形成, 干骺端下见迂曲透亮影; 21 d 时髁板宽度明显变窄, 骨桥形成。HE 染色显示损伤早期髁板细胞正常结构消失, 肥大层结构紊乱, 组织出血、水肿; 造模后 7 d 时静止层细胞聚集, 并大量出现在损伤区, 同时软骨细胞增殖活跃; 11 d 时损伤区出现大量静止层细胞, 软骨细胞增殖活跃, 成簇的软骨细胞团伸入干骺端; 21 d 时损伤区见成熟小梁骨横贯干骺端至骨骼。**结论:**显微 CT 空间分辨率高, 可动态反映髁板损伤的修复过程, 是研究实验性小动物髁板损伤理想的影像学检查方法。

关键词 生长面 骨骺 显微 CT 病理过程 动物实验

A dynamic study on micro computed tomography manifestation and pathological change of epiphyseal plate injury in rat model Yan Dong*, Jing Jinzhu, Yu Aihong, Bai Rongjie, Cheng Xiaoguang. *Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

ABSTRACT Objective: To observe the micro computed tomography (CT) manifestation and pathological change of experimental epiphyseal plate injury during repairs. **Methods:** The right tibiae were fetched out from fifty Wistar rats (aged 4-5 weeks) to build epiphyseal plate injury animal models, while the left tibiae were treated as controls. At 1, 3, 7, 11 and 21 days after modeling, 10 rats were executed, and their bilateral tibiae were fetched out and received micro CT scanning. The imaging features of epiphyseal plate injury were observed. Then the tibiae were made into sections and the dynamic changes of cells within epiphyseal plate were observed after HE staining. **Results:** On the 1st day after modeling, micro CT images of left tibiae showed the low density girdle-shaped area with clear margin between high density areas of osteoepiphysis and metaphysis, and the epiphyseal plate became narrow slightly 7 days after modeling. On the 11st day after modeling, the epiphyseal plate became narrow obviously, and more obvious changes were found in the centre area compared to the margin area. The epiphyseal plate became narrow obviously and its density increased at 21 days after modeling. On the 1st day after modeling, HE staining clearly showed 4 layer structure of epiphyseal plate and cartilage cells which lined up in columnar style. Seven days after modeling, the immature cartilage cells increased gradually, the cell columns in proliferation layer were sparse, the width of hypertrophic layer decreased, the cells swelled and degenerated, and the epiphyseal plate became narrow gradually. The most obvious change were found at 21 days after modeling. Metaphysis fractures were found in right tibiae by micro CT scanning at 1 day after modeling. Between 3 and 7 days after modeling, the width of epiphyseal plate increased at first and then tended to be normal. At 11 days after modeling, the width of epiphyseal plate decreased with new bone formation, and the curved lucent shadow were found in the metaphysis. At 21 days after modeling, the width of epiphyseal plate decreased obviously and the bone bridge could be found. The result of HE staining in sections from the right tibiae showed that the normal structures of epiphyseal plate cell were absent and the structures of hypertrophic layer were indiscernible and the hemorrhage and edema of tissues occurred in earlier period after injury. On the 7th day after modeling, the cells gathered in quiescent layer and appeared in the injury zone in large number, at the same time, the cartilage cells proliferated actively. At 11 days after modeling, a large amount of quiescent layer cells appeared in injury zone, and the cartilage cells proliferated actively, and clusters of cartilage cells stretched

基金项目: 国家自然科学基金(81071131), 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养项目(2009-2-03)

通讯作者: 程晓光 E-mail: xiao65@263.net

into metaphysis. At 21 days after modeling, mature trabecular bones traversed metaphysis and osteoepiphysis in the injury zone.

Conclusion: With high spatial resolution micro CT can dynamically reflect the reparative process of epiphyseal plate injury, so it is an ideal radiological examination for study of epiphyseal plate injury in small experimental animals.

Key words Growth plate; Epiphyses; Micro computed tomography; Pathologic processes; Animal experimentation

儿童骺板软骨结构相对脆弱, 骺板损伤约占儿童骨损伤的 15%^[1]。骺板损伤可导致骨骺与干骺端之间骨桥形成, 使骺板部分或全部提前闭合, 导致骨发育障碍^[2]。动物实验对认识骺板损伤发挥了重要作用, 但目前对相关实验动物骺板的观察主要依据 X 线、CT 或 MRI, 有关显微 CT 在该领域应用的研究较少。本研究拟通过制作大鼠胫骨近端骺板损伤模型, 探讨骺板损伤修复过程中骺板的显微 CT 表现及病理变化过程。

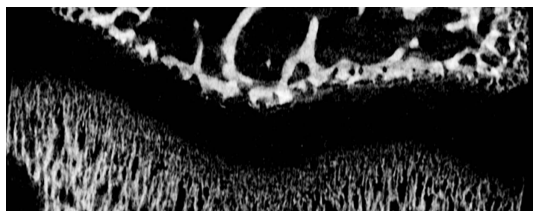
1 材料与仪器

1.1 实验动物 4~5 周龄未成熟雄性 Wistar 大鼠 50 只, 体质量 (140±10) g, 由北京维通利华实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(京)2006-0009。

1.2 实验仪器 Skyscan1172 显微 CT (Skyscan 公司), Nrecon 软件 (1.6.9.4 版, Skyscan 公司), Data-view 软件 (1.5.0 版, Skyscan 公司), Olympus BX41 光学显微镜 (Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物造模 通过戊巴比妥钠腹腔注射对所有大鼠进行麻醉, 按照 Gomes 等介绍的方法^[3]进行骨骺损伤造模。选择右侧胫骨 (观察侧), 切开暴露近端骨骺, 分离内侧副韧带和骨膜, 抓紧大鼠膝关节, 施加外翻力和适当剪切力, 直视下确认骨骺损伤。复位后, 逐层缝合骨膜和皮肤软组织。左侧胫骨 (对照侧) 不做处理。



(1) 造模后 1 d

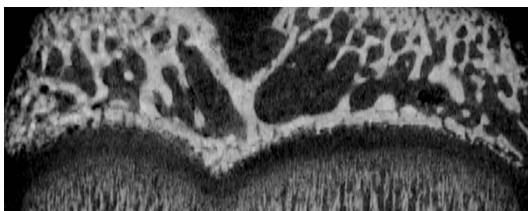
2.2 显微 CT 检查 分别于造模后 1、3、7、11 和 21 d 各选取 10 只大鼠处死, 完整解剖双侧胫骨后行显微 CT 扫描。将胫骨标本垂直固定在标配容器内, 沿标本长轴方向, 从胫骨近端骨骺上极扫描至干骺端下极。扫描条件: 球管电压 80 kV, 球管电流 180 μA, 矩阵 1 024×1 024, 滤过器铝 0.5 mm, 旋转步长 0.4°, 分辨率 3 μm。将扫描所得 TIF 图像用 NRecon 软件进行多平面重建和三维重建, 使用 Dataview 软件浏览所得图像, 观察分析骺板损伤修复过程中的影像表现。

2.3 组织学观察 完成显微 CT 扫描后, 将大鼠的双侧胫骨标本用 10% 的福尔马林固定, 0.5 mol·L⁻¹ EDTA 脱钙后行石蜡包埋, 4 μm 切片, HE 染色, 光学显微镜下观察。

3 结果

3.1 大鼠对照侧胫骨骺板显微 CT 及组织形态表现

造模后 1 d, 骺板显微 CT 图像显示骨骺与干骺端高密度带间波浪形带状低密度区, 边缘清晰 [图 1(1)]; 造模后 7 d, 骺板轻度变窄; 11 d 后逐渐明显变窄, 中间部位较边缘显著; 造模后 21 d, 骺板区密度增高, 明显变窄 [图 1(2)]。造模后 1 d, HE 染色切片示骺板 4 层结构清晰可见, 软骨细胞呈柱状规律排列 [图 2(1)]; 7 d 后幼稚软骨细胞逐渐减少, 增殖层细胞柱逐渐稀疏, 肥大层宽度减小, 细胞膨大、退化, 骺板逐渐变窄, 其中以造模后 21 d 表现最明显 [图 2(2)]。



(2) 造模后 21 d

图 1 大鼠对照侧胫骨骺板冠状位显微 CT 图像

3.2 大鼠观察侧胫骨骺板显微 CT 及组织形态表现

造模后不同时点大鼠观察侧胫骨骺板显微 CT 及组织形态表现见表 1、图 3、图 4。

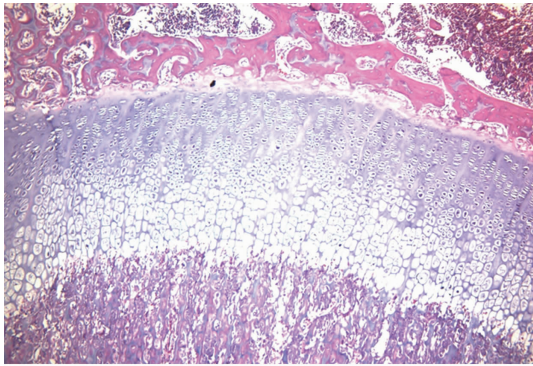
4 讨论

骺板损伤的动物模型制备方法很多, 主要有克氏

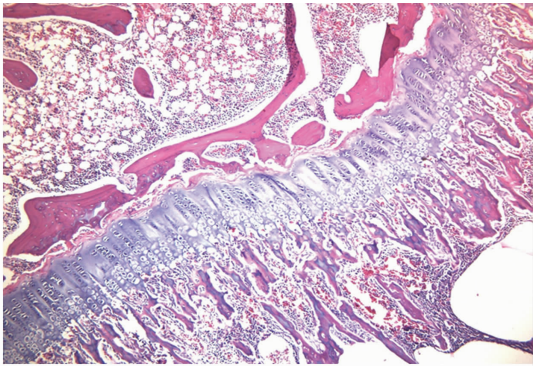
针钻孔法、磨钻法、直接刮除法、凿除法、重锤敲击法和手动成角法^[4]。前 5 种方法均为应用工具直接损伤骺板, 对于损伤部位、范围及程度相对可控; 手动成角法通过施加外翻和剪切力造成骺板损伤, 这更符合临床上大部分骺板损伤的机制。同时, 临床通常使用

Salter-Harris 法^[5]对骺板损伤进行分型,其中Ⅱ型为剪式和推压的合力使骺板裂开,并穿出干骺端,致骨骺分离伴干骺端骨折,此型占所有骺板损伤的 75%^[6]。因

此,本研究采用了手动成角法造模。但是,该方法所致的骺板损伤程度与制作者的手法、力度有关,因此本研究无法对骺板损伤的程度进行量化比较。



(1)造模后1 d

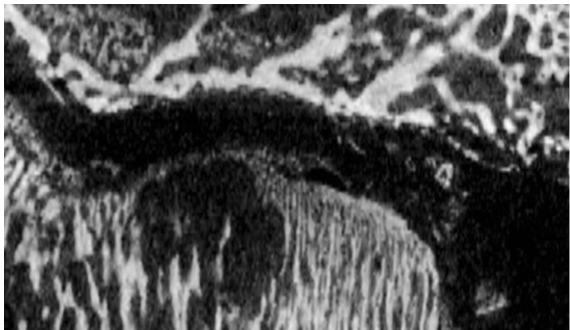


(2)造模后21 d

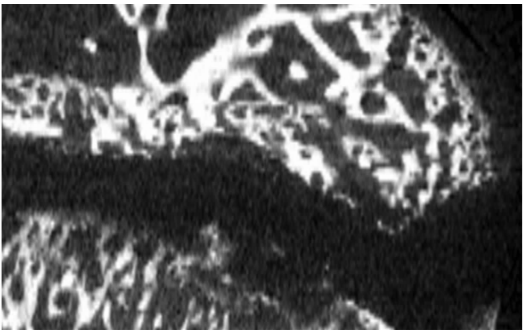
图 2 大鼠对照侧胫骨骺板组织病理切片(HE 染色 ×100)

表 1 造模后不同时点大鼠观察侧胫骨骺板显微 CT 及组织形态表现

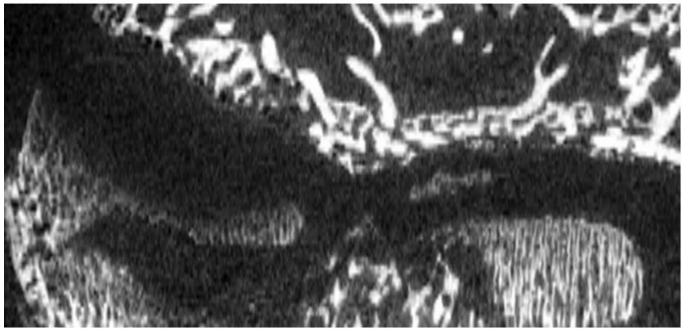
观察时间	显微 CT 表现	组织形态表现
造模后 1 d	胫骨干骺端局部骨折,边缘可见骨折碎片,骨骺、干骺端正常对位关系消失[图 3(1)]	损伤区骺板各层细胞结构紊乱,局部以肥大层为中心出现裂隙,组织细胞出血、水肿[图 4(1)]
造模后 3 d	干骺端骨折区显示模糊,邻近部位密度减低,损伤处骺板明显增宽,干骺端损伤侧见骨膜反应[图 3(2)]	干骺端及骺板损伤区组织细胞水肿加剧,增殖层、肥大层结构紊乱加重,干骺端见骨折邻近部位骨质疏松[图 4(2)]
造模后 7 d	干骺端骨折区周围骨质疏松,骺板宽度较前趋于正常,骨膜反应较前更加明显	组织水肿减轻,静止层细胞聚集,软骨细胞增殖活跃,幼稚与成熟的软骨细胞并存[图 4(3)]
造模后 11 d	损伤区骺板变窄,内见细小新生骨质成份,干骺端可见迂曲透亮影,骨膜反应较前减弱[图 3(3)]	损伤区出现大量静止层细胞,软骨细胞增殖更加活跃;局部出现骨性成份,内含未完全退化的软骨同源细胞团,并见成簇的软骨细胞团伸入干骺端[图 4(4)]
造模后 21 d	骺板宽度明显变窄,损伤区见成熟骨小梁由干骺端伸入骨骺端,骨桥形成[图 3(4)]	骺板普遍变薄,柱状结构消失,成熟软骨细胞退化、钙化并形成骨样结构,损伤区见成熟小梁骨横贯干骺端至骨骺[图 4(5)]



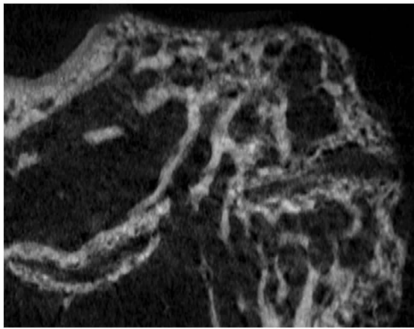
(1)造模后1 d



(2)造模后3 d

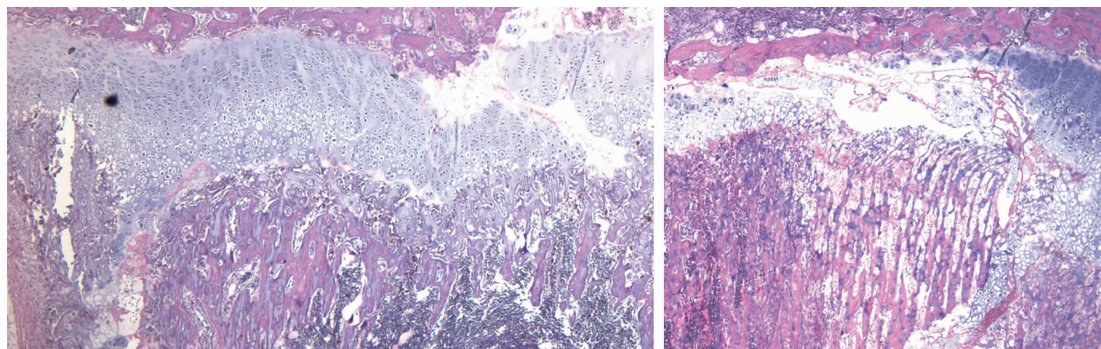


(3)造模后11 d



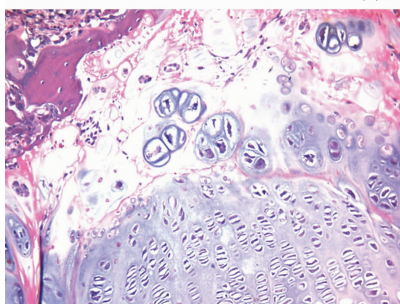
(4)造模后21 d

图 3 大鼠观察侧胫骨骺板冠状位显微 CT 图像

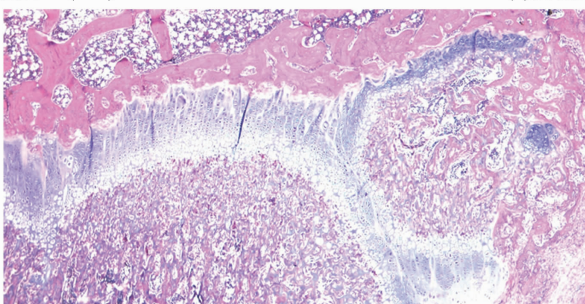


(1)造模后1 d(×40)

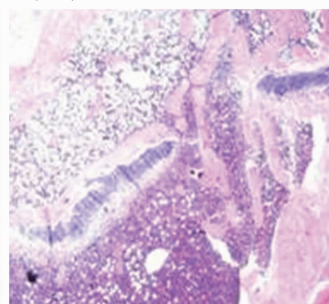
(2)造模后3 d(×40)



(3)造模后7 d(×200)



(4)造模后11 d(×40)



(5)造模后21 d(×40)

图4 大鼠观察侧胫骨骺板组织病理切片(HE染色)

骺板是位于骨骺和干骺端间具有生长能力的透明软骨区,通过软骨内化骨保证骨骼的生长发育。正常骺板在组织学上由骨骺向干骺端分为静止层、增殖层、肥大层和退化层。静止层和增殖层软骨基质丰富、胶原纤维多,结构较坚韧;肥大层细胞大、间质少,胶原纤维最少,是骺板中最薄弱的部位;退化层由于钙化而得以加固。我们的研究发现,损伤主要位于肥大层,同时累及到增殖层和退化层,这与吕学敏等的研究结果基本一致^[7]。

静止层又称储备层,由具有增殖能力的软骨细胞构成,主要为软骨细胞的后期发育提供细胞分化来源和蛋白多糖等相关物质。增殖层细胞呈柱状排列,具有增殖、分化的能力,使骨骼纵向生长。我们的研究发现,从造模后 7 d 开始,静止层细胞聚集,并大量出现在损伤区,同时软骨细胞增殖活跃,造模后 11 d 时成簇状的软骨细胞团伸入干骺端。这提示在骺板软骨结构和功能损伤的同时,静止层细胞得以激活并加速向增殖型细胞分化,损伤修复、重建得以开始。关于骨桥形成的机制目前颇有争论,尚无法确定是膜内化骨还是软骨内化骨,亦或两者共同参与^[8]。本研究发现,造模后 11 d,新出现的骨性成分内含未完全退化的软骨同源细胞团,提示有软骨内化骨的可能。

目前医学影像技术飞速发展,CT 的空间分辨率已达亚毫米级,可以清晰地发现和观察病灶。但是医

用 CT 在动物实验的应用中具有较大的局限性,毫米级的空间分辨率远远满足不了科学研究的要求。在骺板损伤实验模型中,以大鼠造模最为广泛,但是无论是 X 线、CT 还是 MRI,都难以观测其细微结构。因此,分辨率高又可进行三维重建的显微 CT 显示出在小动物实验中的应用价值。显微 CT 的原理和普通 CT 相同,但其空间分辨率可以达到 1 μm ,目前已经广泛用于骨科领域对骨小梁水平的结构分析^[9]。

在本实验中,大鼠观察侧胫骨骺板造模后不同时点的显微 CT 和组织形态表现表明,显微 CT 可以动态反映骺板损伤后的修复过程,可为评估和判断骺板损伤的预后提供影像支持。但本实验采用的显微 CT 机只能对离体标本进行扫描,无法对同一动物活体进行扫描,这是本实验的局限性。

5 参考文献

- [1] Hussain HM, Barnes CE. Pediatric skeletal trauma-Plain film to MRI[J]. Appl Radiol,2007,36(8):24-33.
- [2] Kay RM, Matthys GA. Pediatric ankle fractures: evaluation and treatment[J]. J Am Acad Orthop Surg,2001,9(4):268-278.
- [3] Gomes LS, Volpon JB, Goncalves RP. Traumatic separation of epiphyses. An experimental study in rats[J]. Clin Orthop Relat Res,1988,23(6):286-295.
- [4] 陈梓锋,陈爱民. 骺板损伤动物模型及制备方法[J]. 国际骨科学杂志,2008,29(1):31-34.

- [5] Salter RB, Harris WR. Injuries involving the epiphyseal plate[J]. J Bone Joint Surg Am, 1963, 45(3): 587-622.
- [6] Uhl M, Geiger J, Strohm PC. Skeletal trauma during the growing period. Radiological diagnostics [J]. Radiologe, 2011, 51(8): 719-734.
- [7] 吕学敏, 胡浩, 鲁明, 等. 骨骺损伤修复过程中骺板形态及 VEGF 表达的变化[J]. 中华骨科杂志, 2012, 32(6): 570-575.
- [8] 颀强, 胡蕴玉, 杨柳, 等. 大鼠胫骨近端骨骺损伤后骨桥形成分子机制的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(9): 1039-1045.
- [9] 刘洪鹏, 宋祥胜, 周晓中, 等. 灌注造影显微 CT 三维重建研究骨痂微血管新生[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(7): 1245-1247.
- (2013-04-23 收稿 2013-06-13 修回)