

文章编号:1004-7220(2017)04-0375-05

多聚甲醛固定对大鼠椎骨黏弹性影响的实验研究

颀天阳¹, 程朋真²

(1. 西安市铁一中学, 西安 710054; 2. 第四军医大学西京医院 骨科, 西安 710032)

摘要: **目的** 观察多聚甲醛固定对大鼠椎骨黏弹性力学性能的影响,从生物力学角度寻找松质骨样品的最佳保存方式。**方法** 选择8周龄健康雌性SD大鼠20只,手术分离获得完整的腰椎L4和L5共40只,随机平均分为固定组和对照组,固定组置于4%多聚甲醛中固定72h,对照组置于5mL EP管内-20℃冷冻保存。两组随机各取10只分别行应力松弛和蠕变实验,7200s后收集样品并通过显微CT分析其微观结构变化。**结果** 固定组松弛蠕变曲线相比对照组更加平滑,达到稳态的时间较短,且500s和7200s的松弛蠕变总量明显降低($P < 0.01$)。显微CT结果显示松弛蠕变实验会引起骨小梁断裂,且固定组比对照组骨小梁破坏更加严重。**结论** 多聚甲醛固定法显著降低大鼠椎骨的黏弹性,在力学负荷下更易造成其微观结构破坏,不利于松质骨保存。

关键词: 黏弹性; 应力松弛; 蠕变; 弹性模量

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.05.013

An experimental study on effects of paraformaldehyde fixation on viscoelasticity of rat vertebrae

JIE Tian-yang¹, CHENG Peng-zhen² (1. Xi'an Tie Yi High School, Xi'an 710054, China; 2. Department of Orthopedics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To observe the effect of paraformaldehyde fixation on viscoelastic properties of the vertebrae in rats, so as to find the best methods of preserving cancellous bone samples from the perspective of biomechanics. **Methods** Twenty 8-week-old healthy female Sprague-Dawley rats were selected, and their whole L4 and L5 vertebra were separated by surgery. The total 40 vertebrae were randomly and evenly divided into experimental group and control group. The experimental group was fixed with 4% paraformaldehyde for 72 h, and the control group was transferred to 5 mL EP tube and cryopreserved at -20 °C. Ten vertebrae were randomly selected from each group for stress relaxation and creep experiments. After 7200 s, the samples were collected and their micro-structure changes were analyzed by micro-CT. **Results** The relaxation creep curve of experimental group was smoother than that of control group, the time to reach steady state was shorter, and the total amount of relaxation creep at 500 s and 7200 s was significantly decreased ($P < 0.01$). Micro-CT results showed that relaxation and creep experiment could cause trabecular rupture, and trabecular damage was more severe in experimental group than that in control group. **Conclusions** Paraformaldehyde significantly reduce the viscoelasticity of rat vertebrae, and it is more easily to cause microstructure damage under mechanical stimulation, which is detrimental to cancellous bone preservation.

Key words: Viscoelasticity; Stress relaxation; Creep; Elastic modulus

收稿日期:2017-03-21; 修回日期:2017-04-12

基金项目:国家自然科学基金项目(81572192)。

通信作者:程朋真,助理研究员,E-mail:rest5540@163.com。

研究骨组织在外力作用下的力学特性和骨受力后的生物学效应,是对骨质量进行评定的一种可靠方法,而骨的力学性质主要与其成分和结构决定。骨的两大生物化学成分是无机骨矿盐与有机骨胶原,无机盐赋予骨抵抗外力的强度,骨胶原则使骨组织在载荷作用下具有一定的延伸能力^[1-3],它们共同影响骨的线弹性和黏弹性。在生理状态下,骨组织持续受到自身重力和肌肉收缩的影响,必然导致其微观结构缓慢产生变化,进而影响其力学性能。骨对抗这种低载荷、低应变长时间作用的应力松弛和蠕变现象即为黏弹性,它对于骨组织缓冲载荷和维持关节与骨的稳定性具有重要作用。原则上,为了精确测量骨的力学性能,必须采用新鲜的样本进行测试。但考虑到操作可行性并减少系统误差,应当保证不同批次取材的骨组织同时间进行测试。因此,从生物力学角度探讨样品的保存方式具有重要意义。有学者提出通过低温冷冻或多聚甲醛固定法来保存测试标本,但只考虑到骨的线弹性力学性质,对于骨组织的黏弹性影响鲜有报道^[4-5]。本文选择大鼠椎骨进行应力松弛和蠕变试验,探讨标本在4%多聚甲醛固定后的黏弹性变化,并结合显微CT观察其微观结构改变。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选择8周龄健康雌性SD大鼠20只,清洁级,体重200~220 g,由第四军医大学动物实验中心提供。大鼠经腹腔注射2%戊巴比妥钠过量麻醉致死,取俯卧位,手术分离获得完整的腰椎L4和L5,随机分为4组,每组10只样本,其中固定组置于4%多聚甲醛中固定72 h,对照组用湿润的盐水纱布包裹,置于5 mL EP管内-20℃^[5]冷冻保存备用。样品处理完毕,分别行应力松弛和蠕变实验,120 min后收集样品进行显微CT分析。

1.2 生物力学测试

1.2.1 仪器设备 力学仪:美国BOSE公司生产的3220型电子动静态万能材料试验机,载荷测量精度10 mN,位移精度1 nm,试验机自动记录载荷-挠度变化。显微CT:美国GE公司Healthcare Locus Sp,像素2048×2048 CCD,分辨率8 μm,图像处理软件为Inweon Research Workplace。

1.2.2 样品准备 测量前应将标本置于生理盐水中复温,所有标本上下接触面修剪平整,检测前,用显微镜观察椎骨,以保证所有标本骨皮质完好无损,以免标本上的微小裂痕影响检测结果。用游标卡尺测量椎骨高度,显微CT测量横截面积,所有数据记录备用。

1.2.3 应力松弛实验 室温25℃,将标本置于压盘中心的水槽内,确保椎骨上下表面与压盘完全接触,预载荷1 N,运行BOSE专利的IQ调频,使加载曲线达到平稳。以1 N/s的速度压缩标本,当载荷达到100 N时,使应变保持恒定,持续120 min,应力随时间不断减小,每隔2 s采集一次数据,达到设定时间后实验结束。

1.2.4 蠕变实验 室温25℃,调频后以10 μm/s的加载速度压缩标本,当载荷达到100 N时,使应力保持恒定,持续120 min,应变随时间不断增加,每隔2 s采集一次数据,达到设定时间后实验结束。

1.2.5 显微CT分析 将椎骨垂直放入样本固定管内,做好标记。扫描电压80 kV,电流500 mA,分辨率8 μm,扫描数据导入仪器自带的Inweon Research Workplace软件,对椎骨进行三维重建,骨小梁重建阈值为1500。

1.2.6 数据处理和统计学分析 记录力学测试过程中的载荷与位移,计算得出每个样品的应力、应变和弹性模量,手动绘制应力松弛和压缩蠕变曲线。所有数据通过Graphpad Prism 5进行统计学分析并绘制柱形图。

2 结果

2.1 大鼠椎骨结构数据

大鼠椎骨的高度为 (5.5 ± 0.1) mm,初始横截面积为 (9.53 ± 0.5) mm²。

2.2 应力松弛实验

由松弛曲线可见,两组样品松弛量持续增加,其中固定组曲线较为平滑,约1000 s时应力减小趋于平衡;新鲜对照组松弛现象更加明显,约6500 s后达到稳态阶段。两组样品在初始500 s内应力下降最为明显,对照组松弛量显著大于固定组($P < 0.01$);7200 s时对照组松弛总量也明显大于固定组($P < 0.01$,见图1)。

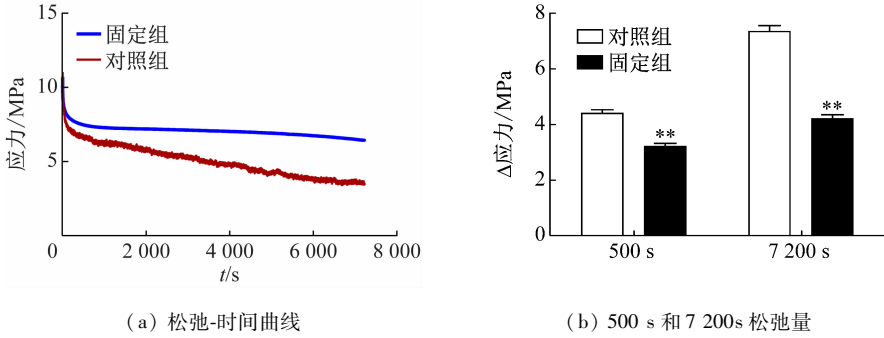


图1 应力松弛实验结果

Fig.1 Results of stress relaxation experiment (a) Relaxation-time curve, (b) Relaxation at 500 s and 7 200 s

2.3 压缩蠕变实验

两组样品蠕变量持续增加,其中固定组曲线较为平滑,约1 800 s后应变增加缓慢且与时间呈线性关系,即稳态蠕变;对照组松弛现象更加明显,约2 000 s后达到稳态阶段,蠕变速率不再变化。两组

样品在初始500 s内应变增加最为明显,对照组蠕变量远大于固定组($P < 0.01$);7 200 s时对照组蠕变总量也明显大于固定组($P < 0.01$)。在蠕变前的线性加载阶段(弹性变形区间),固定组的弹性模量显著小于对照组($P < 0.05$,见图2)。

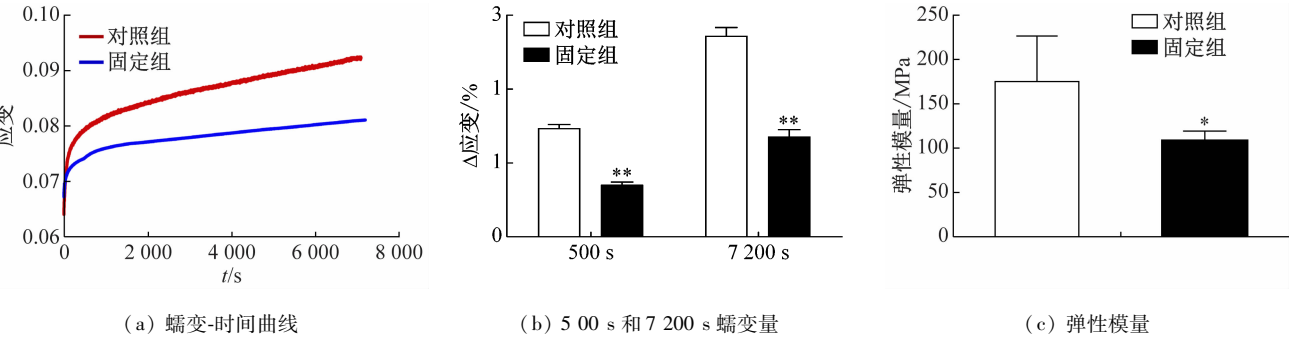


图2 蠕变实验结果

Fig.2 Results of creep experiment (a) Creep-time curve, (b) Creep at 500 s and 7 200 s, (c) Elastic modulus

2.4 椎骨压缩后的微观结构变化

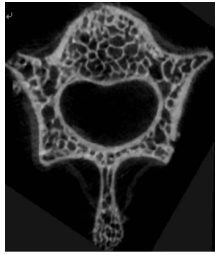
显微CT分析椎骨轴向受力中心横截面的骨小梁变化可知:新鲜的椎骨骨小梁呈网状分布,排列完整有序;行应力松弛实验后,部分骨小梁断裂,相比对照组,多聚甲醛固定使骨小梁损伤增加;蠕变实验对骨小梁结构造成严重破坏,其中固定组骨小梁断裂更加明显,甚至部分皮质骨产生断裂(见图3)。

3 讨论

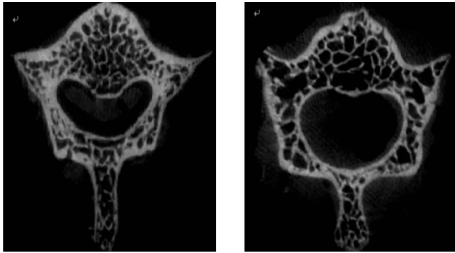
骨是承重的特殊组织,受力作用时会发生形变,当外力超过骨本身的弹性极限时,就会发生塑性变形,塑性变形不断累积超过一定阈值时会发生骨折。在生理状态下,骨组织受到自身重力和肌肉收缩的影响,虽然这种力学负荷在弹性范围之内,但由于持续作用于骨组织,必然导致其弹性形变不断转化为塑性形变。这种缓慢的力学变化称为松弛和蠕变,是骨的黏弹性的主要表现形式,对于缓冲载荷和维持骨与关节的稳定具有重要作用。

重建椎体结构后,分析每 1 mm^3 内骨小梁的连接密度,可见新鲜组的骨小梁连接度最高,松弛实验后由于部分骨小梁断裂,其连接度降低,且固定组明显低于对照组($P < 0.05$);蠕变实验造成骨小梁破坏较大,其连接度相比新鲜椎体差异明显($P < 0.01$),固定组亦显著低于对照组($P < 0.05$,见图4)。

骨的力学性能本质上由其成分和结构决定。近年来对胶原纤维的排列方向及结构与力学属性之间的相关性研究进一步说明,胶原纤维是一个影响骨



(a) 正常椎体骨小梁结构



(b) 松弛实验对骨小梁结构的影响

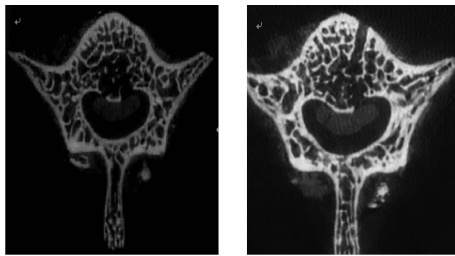
(c) 蠕变实验对骨小梁结构的影响
对照组 固定组

图3 松弛蠕变实验对骨小梁结构的影响

Fig. 3 Effects of relaxation and creep experiment on trabecular bone structure (a) Trabecular bone structure of normal vertebra, (b) Effect of relaxation experiment on trabecular bone structure, (c) Effect of creep experiment on trabecular bone structure

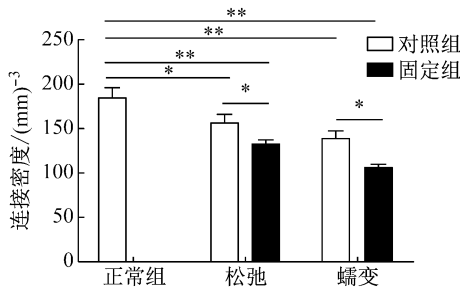


图4 骨小梁连接密度

Fig. 4 Trabecular connectivity density

力学性能^[6]。在组织学研究中,多聚甲醛固定是标本保存的常用方法,其原理是甲醛可与蛋白质的氨基结合,形成分子内交联^[5],进而使骨有机质定型。但这种化学固定法对骨的黏弹性力学性质的影响尚未见报道。因此,本文通过松弛蠕变实验研究多聚甲醛固定对大鼠椎骨黏弹性的作用,并结合显微CT观察其微观结构变化。

骨组织受到持续的低应变作用,其内应力不断减小的现象称为应力松弛。两组样品在初始500 s内应力下降最为明显,对照组松弛量显著大于固定组($P < 0.01$),7 200 s时对照组松弛总量也明显大于固定组($P < 0.01$)。该结果说明新鲜对照组标本具有更好的延展性,4%多聚甲醛使胶原纤维发生硬化,脆性增加,曲线达到相对平衡点的时间较短。另一方面,骨组织受到持续的应力作用,其应变缓慢增加的现象称为蠕变。两组样品在初始500 s内应变增加最为明显,但蠕变速度逐渐降低直到稳态阶段,固定组较快达到稳态,且蠕变量明显小于对照组($P < 0.01$)。这是由于椎骨内固有的膨胀压与局部的压力导致水分向外溢出的速度快,随着松质骨内液不断溢出,其固有的膨胀压与局部的压力差减少,故后期曲线比较平缓,最后达到相对平衡,而多聚甲醛处理后,样品膨胀压降低导致蠕变量小,黏弹性降低。

近年来,松质骨微观结构逐渐成为评价骨骼力学性能的一个重要因素^[7]。Odgaard^[8]研究表明,骨小梁微观结构框架决定着松质骨的生物力学强度。Ulrich等^[9]认为,微观结构参数能完善对松质骨弹性模量的解释。以上研究均体现了骨微观结构参数在评价骨骼力学特性的准确性及重要性。Micro-CT可以对松质骨的微观结构从三维方向上进行无偏倚的定量分析,所得的参数与在体骨骼力学性能有紧密联系。正常新鲜椎骨的骨小梁结构完整,排列有序;松弛蠕变实验造成骨小梁断裂且蠕变破坏更为严重;固定组经过松弛蠕变实验刺激后,骨小梁断裂程度加大,每1 mm³的连接密度最低,远小于正常椎体。以上结果说明,4%多聚甲醛使骨组织脆性增加,松弛蠕变等黏弹性力学属性降低,承载能力下降,易发生显微骨折。

骨是人体支架,衡量骨骼变化和反映骨骼质量的最终指标是骨骼的生物力学性能,必须以生物力

力学性质的重要因素,其排列方向决定了羟基磷灰石沉积位置,两者高度有序的结合使骨具有良好的

学分析作为最终检测和评价手段,才能够得出较为确切的结果^[10-12]。本文通过评价多聚甲醛固定对骨黏弹性的影响,为骨组织或人工材料的保存方式提供理论依据,研究结果对骨科基础研究和临床转化具有一定意义。

参考文献:

[1] 王溪原,罗民,马洪顺. 骨质疏松对骨的粘弹性性质影响的实验研究[J]. 医用生物力学, 2007, 22(2): 199-208.
WANG XY, LUO M, MA HS. Experiment study on bone viscoelasticity properties impact of osteoporosis [J]. J Med Biomech, 2007, 22(2): 199-208.

[2] 冯正昕,高明,马洪顺. 大鼠脊髓损伤继发性骨质疏松生物力学性质实验研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2006, 25(2): 207-218.

[3] FRANKEL VH, NORDIN M, 主编. 骨骼系统的生物力学基础[M]. 戴尅戎,王以进,周健男,等译. 上海:上海学林出版社, 1985: 89.

[4] KANG Q, AN YH, FRIEDMAN RJ. Effects of multiple freezing-thawing cycles on ultimate indentation load and stiffness of bovine cancellous bone [J]. Am J Vet Res, 1997, 58(10): 1171-1173.

[5] 程朋真,宁芬茹,李丹,等. 不同保存方式对大鼠股骨力学性能的影响[J]. 生物医学工程学报, 2016, 3(6): 1139-1144.

[6] LIU SH, YANG RS, SHAIKH RA. Et alcoll agenintencil ligment and bone healing [J]. Clin Orthop, 1995, 316: 295.

[7] 张恒,刘宇,任宁涛,等. 模拟失重状态下雌雄大鼠骨质疏松模型骨结构及生物力学对比研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(9): 1076-1082.

[8] ODGAARD A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture [J]. Bone, 1997, 20(4): 315-328.

[9] ULRICH D, VAN RIETBERGEN B, LAIB A, et al. The ability of three dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone [J]. Bone, 1999, 25(1): 55-60.

[10] FERRETTI JI, CAPOZZA RF, MONDELO N, et al. Interrelationships between densitometric, geometric and mechanical properties of rat femora: Inferences concerning mechanical regulation of bone modeling [J]. Bone Miner Res, 1993, 8(11): 1389-1396.

[11] BAUSS F, LALLA S, ENDELE R, et al. Effects of treatment with Ibandronate on bone mass architecture biomechanical properties and bone concentration of Ibandronate in ovariectomized aged rats [J]. Rheumatol, 2002, 29(10): 2200-2208.

[12] 刘铭,朱振安,汤亭亭,等. 辛伐他汀对增龄大鼠椎体骨形成功能的影响[J]. 医用生物力学, 2012, 27(6): 619-623.
LIU M, ZHU ZA, TANG TT, et al. Effect from simvastatin on osteogenesis of the lumbar vertebra in aging rats [J]. J Med Biomech, 2012, 27(6): 619-623.