

甲泼尼龙诱导股骨头坏死发生发展的实验研究

魏青 杨杏芬 刘力 胡斌 陈铁江 张越华 邓丽霞

(中山医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室; 广州, 510089)

摘要 目的: 动态观察甲泼尼龙诱导家兔股骨头坏死的发生发展, 找出股骨头坏死动物模型的确切观察终点。方法: 以马血清和甲泼尼龙联用诱导兔股骨头坏死模型的产生, 通过活体股骨头 X 线照片、骨密度的测量、股骨头切片光镜和电镜及骨动力学检查, 对动物模型不同阶段进行评价。结果: 模型 8 周时 X 线照片显示: 骨质软化, 不规则骨小梁吸收, 坏死, 光镜、电镜检查显示软骨下区骨髓造血细胞减少, 脂肪细胞肥大; 16 周时 X 线照片显示模型动物骨质疏松, 骨小梁模糊, 股骨头密度减低, 光镜、电镜检查呈现股骨头坏死的早期病理改变, 属 Ficat 分级的 I 级和 II 级, 计数空骨陷窝率明显增加, 股骨头生长测定值明显降低。结论: 甲泼尼龙诱导的家兔股骨头坏死 8 周时已开始发生, 16 周已具备确切、明显股骨头坏死特征。

关键词 股骨头坏死/化学诱导; 股骨头坏死/病理学; 疾病模型/动物; 甲泼尼龙/副作用

中图分类号 R 96

Experimental Study of Generation and Development of the Methylprednisolone-induced Femur Head Necrosis

Wei Qing Yang Xingfen Liu Li Hu Bing Chen Tiejiang Zhang Yuehua Deng Lixia

(Department of Toxicology, School of Public Health, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To investigate dynamically the generation and development of methylprednisolone-induced femur head necrosis of rabbits, provide a confirmed observing terminal. **Methods:** Femur head necrosis of rabbits was induced by employing a combined protocol of vasculitis and methylprednisolone, and the different phase of models was elucidated through X-rays, measurement of bone density, examination of femoral head slice under light microscope (LMS) and electron microscope (EMS) and bone dynamics. **Result:** In the model, X-ray showed osteomalacia, irregular bone trabecula absorption and necrosis, LMS and EMS indicated reduction of hematopoietic cells in the subchondral bone, fat cells masted at the 8 th week; X-rays showed osteoporosis, ambiguous bone trabecula and reduced density of femoral head, LMS and EMS indicated early phase pathogenesis of femur head necrosis, belonging to Ficat I, II grade, number of empty laecuna increased and growth of femur bone decreased significantly at the 16 th week. **Conclusion:** The signature of femur head necrosis induced by methylprednisolone appeared at the 8 th week, which was confirmed and evidenced at the 16 th week.

Subject headings femur head necrosis/chemical induced; femur head necrosis/pathology; diseases model/animal; methylprednisolone/adverse effect

股骨头坏死是一种严重危害患者的劳动能力和生活质量的疾病, 近年有不断上升趋势。但目前尚未发现效果显著的治疗方法^[1], 早期诊断和治疗是影响该疾患预后的主要环节, 故了解其早期病理改变和骨动力学发展变化非常关键。本研究通过马血清与激素联用的方法, 从形态学、形态学结果量化和代谢动力学等方面动态观察家兔股骨头坏死模型的发生发展过程, 找出股骨头坏死动物模

型的确切观察终点, 为股骨头坏死机制的深入研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型

实验选用健康成年新西兰兔 18 只, 雌雄各半, 体重 1.5 ~ 2.0 kg, 由第一军医大学动物实验中心

提供,合格证号:96A29。检疫1周后,随机分为2个动物模型组和空白对照组,每组6只。首先行耳背静脉注射马血清(上海生工生物工程有限公司,批号:36p.6360,10 mL/kg)1次,间隔2周再注射1次。2周后,连续3日行腹腔注射甲泼尼龙(日本产,批号:5R1579/2)40 mg/Kg,对照组腹腔内注射等量生理盐水。于最后1次注射激素后8周和16周,两组动物麻醉后(30 mg/kg 硫喷妥钠静脉注射)分别进行活体检查及处死取材。

1.2 观察指标

1.2.1 放大X线片 动物麻醉后固定在操作台上,拍摄双侧股骨X线片,观察股骨头、骨小梁排列。

1.2.2 股骨头密度测定 动物仰位固定在骨密度仪测量台上,两侧后肢股骨头部位选择5个测定点,使用美国HOLOGIC公司生产的X射线机(型号为QDR-2000⁺ plus),该机器配备装载骨密度自动测定软件的计算机,可自动测量股骨头密度(g/cm^3),相关数据经SPSS-Win6.0软件包进行分析。

1.2.3 组织形态学检查及空骨陷窝率 动物处死后取一侧股骨头,股骨头从冠状面切开,10%(V/V)中性甲醛固定,硝酸脱钙,乙醇脱水,石蜡包埋切片,切片厚4 μ m,HE染色,光镜下观察形态学变化,并观察15-20个高倍镜视野内的骨陷窝,计数空缺的骨陷窝数(表示骨细胞已坏死)占正常骨陷窝的百分比,求出空骨陷窝率。

1.2.4 超微结构 从股骨头冠状面取下1 mm³左右的骨组织2~3块,置于2.5%(V/V)戊二醛和2%(V/V)多聚甲醛混合液中预固定,5%(W/V)ED-

TA脱钙,10%(V/V)锇酸固定,Epon 812包埋,制超薄切片,片厚600 μ m,醋酸铅、柠檬酸铅染色,日立H-600型透射电镜观察骨组织内的超微结构。

1.2.5 骨组织动力学检查 于处死前13、3 d分别肌注盐酸四环素(上海第十一制药厂,批号:950312)30 mg/kg 1次,处死动物后取一侧股骨头制作不脱钙切片:10%(V/V)甲醛固定,70%、80%、90%(V/V)酒精、丙酮、二甲苯脱水,置于以甲基丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸乙酯3:7混合的包埋液中,44 $^{\circ}$ C温箱中固化包埋,切片4~10 μ m厚,荧光显微镜观察,用目镜测微尺测定四环素双标记之间的距离(mm,反映骨生长测定值)。

1.3 统计学处理

实验数据采用SPSS for win6.0进行 χ^2 、 t 检验等统计学分析。

2 结果

2.1 X线表现

和对照组相比,8周时模型组动物表现骨质疏松,骨质软化,不规则骨小梁吸收,16周时模型组股骨头骨皮质尚完整,无明显塌陷,骨小梁模糊不清,细小状的骨小梁消失,剩粗大纵向的骨小梁,骨小梁间隔增大,股骨头内有散在的低密度区,股骨头圆韧带窝下周边的质密度增高。

2.2 股骨头密度测定

两组股骨头密度测定值详见表1。由表可见,模型组骨密度测定值比对照组降低,但经统计学处理未见显著性差别。

表1 两组间股骨头骨密度测定值、空骨陷窝率和骨生长测定值的比较

Tabel 1 Comparison of density, mean empty lacuna and growth of femur head in two groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Bone density(g/cm^3)	Mean empty lacuna(%)	Bone growth (mm)
Control	6	0.38 \pm 0.09	5.31	0.029 \pm 0.007
Model(8 week)	6	0.37 \pm 0.07	12.89	0.025 \pm 0.006
Model(16 week)	6	0.36 \pm 0.09	31.03 ¹⁾	0.018 \pm 0.006 ¹⁾

Compared with control group, 1) $P < 0.05$

2.3 组织形态学检查及空骨陷窝率

和对照组相比,8周时模型组主要是骨髓内血细胞坏死较多,脂肪细胞增大,骨小梁较稀疏,变细,骨细胞空陷窝有所增高。16周时模型组骨小梁间距增宽,部分动物骨小梁连续性尚好,但变纤细,部分断裂,空骨陷窝增多,成骨细胞减少,血管数量减少,部

分血管内有网状纤维充填,骨髓腔内有广泛新出血区,骨髓造血细胞少,代为较多脂肪细胞。表1显示了两组间平均空骨陷窝率的差异。从表可见,模型组的空骨陷窝率明显高于对照组,说明模型组的骨细胞坏死明显(图1)。

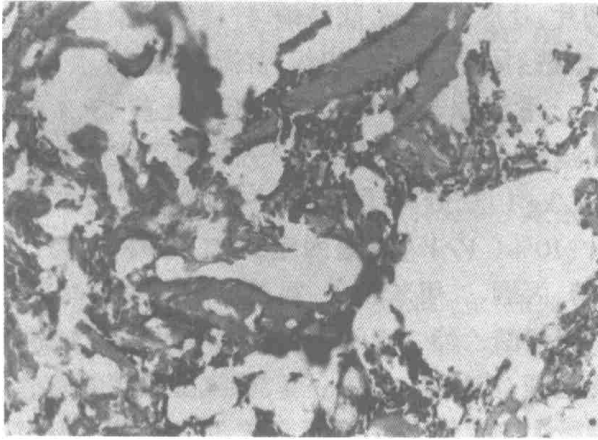


图1 模型组干骺端的死骨碎片($\times 40$)

Fig. 1 The fragments of necrotic bone in the femoral head of the experimental model

2.4 超微结构

和对照组相比, 8周时模型组在软骨下区多见骨细胞内出现低电子密度的脂滴, 较大, 周围有一包膜。16周时模型组表现为成骨细胞数量少, 排列稀疏, 粗面内质网上多聚核糖体脱落、解聚, 线粒体数量较多, 出现肿胀, 线粒体嵴短缩, 骨细胞位于骨陷窝内, 非空骨陷窝内骨细胞极少, 细胞体积大, 胞内有巨大脂滴, 细胞核被挤向一侧, 核固缩, 染色质浓集, 有的可见核膜溶解, 核碎裂, 胞质固缩, 周围骨基质胶原纤维排列紊乱, 骨小管内的细胞基质可见脂滴(图2)。

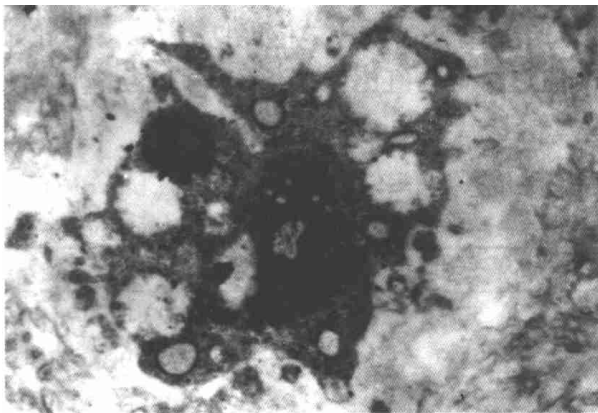


图2 模型组固缩性坏死细胞形态($\times 10\ 000$)

Fig. 2 The morphology of the pyknotic necrotic cell in the experimental model

2.5 骨组织动力学检查

如表1所示, 模型组股骨骨生长测定值明显低于对照组, 说明病变代偿修复能力差, 需及时进行治疗。

3 讨论

本实验采用马血清使兔机体呈过敏状态, 再应

用激素诱导股骨头坏死, 观察其不同阶段的变化。8周时表现轻微的改变: 主要是骨髓内造血细胞坏死较多, 脂肪细胞增大且融合成片, 骨髓内血管减少明显, 骨小梁较稀疏, 变细, 骨细胞空陷窝比例有所增高。病变发展至16周时, 呈现出股骨头坏死早期的病理变化: 骨小梁间距增宽, 部分断裂, 空骨陷窝增多, 血管数量减少, 部分血管内有网状纤维充填, 骨髓腔内有广泛新出血区, 空骨陷窝率明显增加, 但未达到50%, 也无骨小梁坏死; 电镜检查也显示成骨细胞少, 骨细胞极少, 细胞体积大, 胞内有巨大脂滴, 核固缩, 有的可见核膜溶解、核碎裂; 骨动力学检查发现股骨骨生长测定值明显降低。从这些结果可见, 本研究诱导的股骨头坏死模型, 至16周达到Ficat分级的II级和III级^[3], 虽还属于早期病变, 但坏死特征已确实、明显, 观察终点确切。

激素引起的股骨头坏死机制尚不十分清楚, 有人认为由激素引起的骨小血管病变造成^[3], 也有人认为是激素造成脂肪代谢异常, 引起骨细胞脂肪变所致^[4]。本实验观察到病变骨小血管内有网状纤维充填, 数量减少; 同时也发现骨细胞内出现大脂肪滴。这些现象提示糖皮质激素诱发的股骨头坏死可能通过激素引起脂质代谢紊乱, 出现高脂血症, 增加血液粘滞性和血小板沉积, 形成脂栓, 栓塞关节软骨下骨微血管, 导致骨质缺血坏死。

目前国内的研究报道侧重于较单一的检测手段, 有些只观察了骨小动脉的改变, 有些仅测定了脂肪代谢的变化^[5]。本研究除采用一般的病理学手段, 还应用了形态学结果的计量和骨动力学检测方法, 对家兔股骨头坏死不同过程进行了较全面的动态观察, 找出了反映股骨头坏死早期病理改变的确切观察终点。为激素性股骨头坏死的相关实验研究提供了很好的研究思路和检测方法。

参 考 文 献

- 1 李子荣. 股骨头无菌性坏死的早期诊断和治疗. 中日友好医院学报, 1992, 15(6): 187
- 2 Ficat R P, Arlet J. Ischemia and necrosis of bone. Baltimore: Williams & Wilkins Press., 1980. 131 ~ 161
- 3 Atsumi T, Yoshikatsu K. Role of impairment of blood supply of the femoral head in the pathogenesis of idiopathic osteonecrosis. Clin Orthop, 1992, 227(1): 22
- 4 贺西京. 激素性股骨头坏死与骨细胞脂肪变性的实验研究. 中华骨科杂志, 1996, 16(1): 44
- 5 Jones J P. Fat embolism and osteonecrosis. Orthop Clin North Am, 1985, 16(9): 595

(1998-10-08 收稿 1999-04-22 修回)