

早期激素性股骨头坏死模型的建立 *

张国桥 易诚青[△] 滕松松 宋旺胜

(上海交通大学附属第一人民医院 上海 200080)

摘要 目的 :建立早期股骨头坏死模型 ,为研究其发病机制及合理治疗方法的提供可靠的模型基础。方法 :用单一剂量脂多糖 LPS (10 μg/kg)联合三次甲强龙 MPS(10 mg/kg)注射 ,每次间隔 24h ,诱导建立兔早期股骨头坏死模型 ,通过影像学及组织病理学方法评估模型建立情况。结果 :4 周后 ,模型组死亡 1 例 ,模型组 16 例 X 线检查未见异常表现 ,2 例 X 线提示股骨头密度不均 ,未出现股骨头塌陷 ,18 例 HE 染色示骨细胞空骨陷窝增多 ,脂肪细胞体积变大 ,数量增多。结论 :用脂多糖(LPS)联合甲强龙可成功诱导建立兔早期股骨头坏死模型 ,模型成功率高、死亡率低。
关键词 :早期 ;激素性股骨头坏死 ;脂多糖 ;甲基强的松龙
中图分类号 :Q95-3 R68 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)07-1223-02

Construction of the Model of First-Stage Steroid-Induced Femoral Head Necrosis in Rabbits*

ZHANG Guo-qiao, YI Cheng-qing[△], TENG Song-song, SONG Wang-sheng

(Department of orthopedics ,The First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To construct the model of first-stage steroid-induced osteonecrosis in rabbits and prepare to seek for pathogenesis and rational treatment of first-stage osteonecrosis of femoral head. **Methods:** We constructed the model with lipopolysaccharide (signal-dose 10ug/kg) plus methylprednisolone (10mg/kg,three times every 24h internals). The osteonecrosis model was evaluated by X-ray examination and hematoxylin and eosin stain. **Results:** In model group two samples were featured with uneven density of femoral head in X-ray photograph. There were 18 samples with increased numbers of empty bone lacunae and larger quantity of fat cells compared with normal group under light microscopy and histological. **Conclision:** The animal model was induced by LPS plus MPS, with a high success rate and low mortality.
Key words: Steroid-induced osteonecrosis of femoral head; Lipopolysaccharide; Methylprednisolone; First-stage
Chinese Library Classification: Q95-3, R68 **Document code:** A
Article ID: 1673-6273(2012)02-1223-02

前言

股骨头缺血性坏死是临床常见的疾病之一，因其发病率高、致残率高、生活质量差等成为临床上比较棘手的问题^[1,2]。人工全髋关节置换对于中晚期股骨头坏死塌陷、严重骨性关节炎等治疗效果明显，显著提高患者生活质量，但是对于早期股骨头坏死的治疗方法存在很大争议^[3]。本试验中我们试图建立一种高效的造模方法，为探讨早期激素性股骨头坏死的发病机制以及治疗方法提供模型基础。

1 材料和方法

1.1 模型建立和分组

取 6 月龄新西兰大白兔 30 只,体重 2.0-2.5kg ,由上海市第一人民医院动物中心提供,雌雄不限.喂养一周后 ,随机分成两组 :造模组 20 只 ,空白组 10 只 ,精确称重后 ,实验组经耳缘静脉注射 10 μg / kg 脂多糖(Sigma 公司) ,间隔 24h 肌肉注射甲强龙 10 mg / kg(辉瑞公司) ,共三次 ,对照组肌肉注射相应量

的生理盐水。
1.2 一般观察
记录两组动物食欲、精神、两便、活动其存活情况。
1.3 X 检查
于最后一次注射 MPS 后 4 周 ,右侧髋关节行 X 检查 ,并协助同一有经验诊断医师 ,记录 X 线表现。
1.4 HE 染色
X 线检查后 ,取下右侧股骨头 ,经甲醛固定、洗涤、酒精梯度脱水、二甲苯透明 ,石蜡包埋后 ,于上海市瑞金骨伤研究所切片(金刚石切片机) ,厚度 4μm ,HE 染色成功后 ,于倒置显微镜下观察、记录。
2 结果
2.1 一般观察
注射 LPS 后实验组动物出现嗜睡 ,精神差 ,食欲减退 ,活动少、小便失禁、大便不成形 ,注射后 LPS 后 24h 死亡 1 只 ,3 天后情况改善 ,食欲增加 ,两便恢复正常 ,活动良好 ,未再出现死

* 基金项目 国家自然科学基金项目(30700853)
作者简介 张国桥(1985-) ,男 ,硕士研究生 ,主要研究方向 :关节外科与组织工程 ,Tel :15921044920
[△]通讯作者 :易诚青 ,电话 :13564419992 E-mail: ycq3000@126.com
(收稿日期 2011-08-17 接受日期 2011-09-12)

亡情况。

2.2 X 线检查

实验组 16 例与正常组比较未出现异常变化 2 例 X 线提示股骨头密度不均,出现絮状低密度区,股骨头内骨小梁模糊,未出现股骨头塌陷、变形。

2.3 HE 染色

实验组 18 个样本出现阳性表现,显微镜下可及骨细胞空骨陷窝增多,细胞核固缩、深染,脂肪细胞体积变大,数量增多,骨小梁紊乱、变细。骨髓腔内及充血,未出现明显死骨(见图 1)。

2.4 结果分析

根据 X 线和组织病理学结果综合分析,造模成功 18 例,其中 Ficat 分期中 0-I 期 16 例,II 期 2 例,死亡 1 例,本实验死亡率 5%(1/20),造模成功率 90%(18/20)。

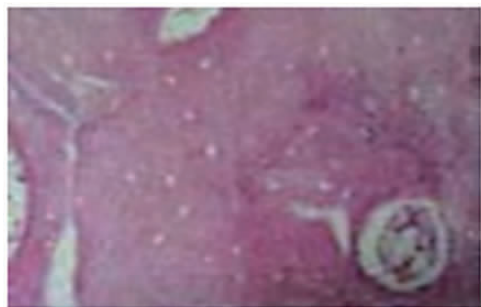


图 1 股骨头坏死 HE 染色切片(400×)

Fig. 1 Section of ONFH, HE stain(400×)

3 讨论

股骨头坏死的发病机制尚未明确,病因众多。目前存在脂肪栓塞学说、骨内压学说、血管内凝血学说等^[4]。临床上分为两大类,创伤性股骨头坏死和非创伤性股骨头坏死。创伤性因素多见于股骨颈骨折、股骨头骨折、髋关节脱位、髋臼骨折等;非创伤性因素有激素、酒精中毒、痛风、减压病、血红蛋白病、烧伤、高血压病等。1957 年 Pietrogrande 和 Mastromarin 报道了第一例使用糖皮质激素引起股骨头坏死的病例,之后随着激素在临床广泛的应用,激素性股骨头坏死已居非创伤性股骨头坏死的首位,约占 30%-50%^[1]。

Ficat 和 Arlet 综合分析 ONFH 患者的 X 线表现、骨扫描和骨功能等方面的表现后提出了 Ficat-Arlet 分期^[5],将 ONFH 分为 0~IV 期,即没有典型症状 X 线正常;I 期 X 线正常或轻微异常,仅是感到关节的隐痛或不适,骨功能性检查可能检测出阳性结果;II 期 X 线片表现为股骨头硬化、囊性变、骨质疏松,髓芯活检肯定有组织病理学的改变,临床症状明显;III 期 X 线片上出现新月征,股骨头外形异常,关节间隙正常,临床症状加重;IV 期 X 线片示股骨头塌陷、扁平及关节间隙狭窄等骨关节炎特征,临床症状疼痛明显,髋关节各方向活动明显受限。

ONFH 的早期(0~II 期)发现并给予适当的干预治疗可有效防止股骨头进一步坏死塌陷,而晚期股骨头塌陷,严重功能障碍,最终只能选择人工全髋关节置换^[6]。目前髓芯减压、骨移植、组织工程技术等已试验性用于早期股骨头坏死的治疗,但

是效果报道参差不齐,因此建立早期股骨头坏死动物模型,对于探索股骨头坏死发生机制及选择治疗方法具有重要意义。

50 世纪以来学者尝试不同的动物建立股骨头坏死模型。猪狗羊等大型动物用以造模,花费时间长、实验成本高、成功率低,因此免常被用于建立激素诱导性股骨头坏死模型^[7]。

在建立股骨头坏死模型中,关于激素种类、用量、发病率、是否添加辅助制剂(马血清、内毒素)报道不一。Iwakiri^[8]等运用单一激素建立兔股骨头坏死模型,3 周后成功率 83%。Kuribayashi^[9]、Takao^[10]等采用了类似模型建立方法,造模成功率分别为 70%和 75%,发现单一激素造模动物死亡率较高,股骨头坏死集中在近端骨髓。Irisa^[11]等运用脂多糖引发的施万反应, Tsuji^[12,13]等一提及血清引发的免疫反应构建股骨头坏死模型,均提示死亡率较高。如何模拟临床发病情况,从而更有利于临床预防及治疗应用成为研究方向。在临床实际中,患者在应用激素以前机体已存在基础病变(如血液系统、脉管系统、免疫系统疾病等),因此在建立股骨头坏死动物模型应用激素前,加用一些辅助制剂造成血液系统和脉管系统病理改变后,再应用激素,这样更接近临床发病及治疗情况。Yamamoto^[14]等在 1995 年首次运用内毒素结合皮质激素注射在兔身上成功建立模型。加用内毒素后建立模型的效率会大大提高,造模时间相对缩短,但死亡率较高。Qin L^[15]等使用单一剂量 LPS(10 μg/kg)静脉注射,联合三次高剂量 MPS (20 mg/kg)肌肉注射,每次间隔 24h,6 周后股骨头坏死发生率 93%,未出现动物死亡。但是对于早期股骨头坏死模型的建立,未作相关研究,本实验在前研究基础之上,探索一种建立早期股骨头坏死模型的方法。

综上所述,本实验运用 LPS LPS(10 μg/kg)联合 MPS (10 mg/kg)注射可建立早期激素性 ONFH 模型,其成功率高(90%),死亡率低(5%)。但是如何构建能更加模拟临床发病情况的模型并指导临床应用还需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Alert J. Nontraumatic avascular necrosis of the femoral head: Past, present and future [J]. Clin orthop Relat Res, 1992,(277):12-18
- [2] Mont MA, Hungerford DS, Maryland B. Current concepts review: nontraumatic avascular necrosis of the femoral head [J]. J Bone Joint Surg(Am), 1995, 77(6): 459-468
- [3] Kobayashi S, Kubo T, Takaoka K. Hemiarthroplasty and total hip arthroplasty for idiopathic osteonecrosis of the femoral head [J]. Clin Calcium, 2007, 17(6): 939-946
- [4] Kothapalli R, Aya-ay JP, Bian H, et al. Ischaemic injury to femoral head induces apoptotic and oncotic cell death[J]. Pathology, 2007, 39 (2): 241-246
- [5] Ficat RP, Arlet J. Necrosis of the femoral head//Hungefford DS .ed. Ischemia and necrosis of bone [J]. Baltimore: Williams and Wilkins. 1980: 53-74
- [6] 李子荣, 张念非, 史振才, 等. 股骨头坏死塌陷的预测与治疗方法的选择[J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(4): 193-196
- [7] Li Zi-rong, Zhang Nian-fei, Shi Zhen-cai, et al. Prediction of collapse and selection of preserving femoral head for the osteonecrosis of the femoral head[J]. Chin J Orthop, April, 2003, 23(4): 93-196

(下转第 1235 页)

- [J], 2001, 68(3): 788-794
- [4] Malacarne M, Gennaro E, Madia F, et al. Benign familial infantile seizures mapping of a novel locus on chromosome 2q24 and evidence for genetic heterogeneity [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(6): 1521-1526
- [5] Li HY, Li N, Jiang H, et al. A novel genetic locus for benign familial infantile seizures maps to chromosome 1p36.12-p35.1 [J]. *Clin Genet*, 2008, 74: 490-492
- [6] Engel J Jr. International League Against Epilepsy. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology[J]. *Epilepsia*, 2001, 42(6): 796-803
- [7] Sander T, Schulz H, Saar K, et al. Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(10): 1465-1472
- [8] Letts VA. Genes Underlying Monogenic and Multigenic Epilepsies in Mice[J]. *Current Genomics*, 2001, 2(1): 71-83
- [9] McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy [J]. *Nature*, 1999, 399(6738 Suppl): A15-22
- [10] 王家勤, 李红梅, 尹景岗, 等. 良性家族性婴儿惊厥一家系基因定位及钾离子通道基因测序研究[J]. *中华儿科杂志*, 2002, 40 (9) : 513-517
- Wang Jia-qin, Li Hong-mei, Yin Jing-gang, et al. Linkage mapping of benign familial infantile convulsions (BFIC) and sequencing analysis of KCNQ2 gene in a BFIC family [J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2002, 40 (9) : 513-517(In Chinese)
- [11] 周军卫, 李晓文, 黄希顺, 等. 良性家族性婴儿惊厥和阵发性运动障碍综合征基因位点异质性: 5 个家系的研究(英文) [J]. *中国临床康复*, 2005, 9 (7) : 238-240
- Zhou Jun-wei, Li Xiao-wen, Huang Xi-shun, et al. Gene mapping and locus heterogeneity of benign familial infantile convulsion and paroxysmal dyskinesia-study on five Chinese pedigrees[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2005, 9 (7) : 238-240(In Chinese)
- [12] 周熙惠, 马爱群, 刘小红, 等. 良性家族性婴儿惊厥一家系遗传连锁分析和基因定位研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(2): 89-92
- Zhou Xi-Hui, Ma Ai-Qun, Liu Xiao-Hong, et al. Linkage analysis and gene mapping of one Chinese family with benign familial infantile convulsions [J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2010, 12 (2): 89-92(In Chinese)
- [13] Xiao B, Deng FY, Xiong G, et al. Clinical and genetic study on a new Chinese family with benign familial infantile seizures[J]. *Eur J Neurol*, 2005, 12(5): 344-349
- [14] Zhou X, Ma A, Liu X, et al. Infantile seizures and other epileptic phenotypes in a Chinese family with a missense mutation of KCNQ2[J]. *Eur J Pediatr*, 2006, 165 (10): 691-695

(上接第 1224 页)

- [7] Kabata T, Kubo T, Matsumoto T. Onset of steroid-induced osteonecrosis in rabbits and its relationship to hyperlipaemia and increased free fatty acids[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2005, 44(10): 1233-1239
- [8] Iwakiri K, Oda Y, Kaneshiro Y. Effect of simvastatin on steroid-induced osteonecrosis evidenced by the serum lipid level and hepatic cytochrome p4503a in a rabbit model [J]. *OrthopSci*, 13(5): 463-468
- [9] Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi KA. Vitamin e prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits [J]. *Acta Orthop*, 81 (1): 154-160
- [10] Takao M, Sugano N, Nishii T. Different magnetic resonance imaging features in two types of nontraumatic rabbit osteonecrosis models[J]. *Magn Reson Imaging*, 27(2): 233-239
- [11] Irida T, Yamamoto T, Miyaniishi K, Yamashita A, Iwamoto Y, Sugioka Y, Sueishi K (2001) Osteonecrosis induced by a single administration of low-dose lipopolysaccharide in rabbits [J]. *Bone*, 2001, 28(6): 641-649
- [12] Tsuji T, Sugano N, Sakai T, Yoshikawa H (2003). Evaluation of femoral perfusion in a non-traumatic rabbit osteonecrosis model with t2*-weighted dynamic mri[J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(2): 341-351
- [13] Sakaia T, Sugano N, Tsuji T, Nishii T, Yoshikawa H, Ohzono K (2000). Serial magnetic resonance imaging in a non-traumatic rabbit osteonecrosis model: an experimental longitudinal study [J]. *Magn Reson Imaging*, 2000, 18(7): 897-905
- [14] Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, (1995). Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with shwartzman reaction [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1995, (316): 235-243
- [15] Qin L, Zhang G, Sheng H. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone[J]. *Bone*, 39(4): 863-871. doi: S8756-3282(06) 00419-4.8