

活骨注射液治疗股骨头坏死的扫描电镜观察

徐西林¹ 胡海¹ 张晓峰^{1△} 王政春² 吕航¹ 张杰¹ 李小冬¹

[摘要] **目的:**观察活骨注射液股骨头灌注对兔液氮冷冻法股骨头坏死模型的扫描电镜下改变。**方法:**将 34 只新西兰大白兔随机分为空白组 2 只,造模组 32 只,造模组采用液氮冷冻法进行股骨头坏死造模,造模成功 1 周后随机抽取 2 只造模组动物与 2 只空白组动物进行电镜观察比较坏死情况;造模组随机分为模型组、对照组、实验组各 10 只,分别以生理盐水、冠心宁注射液和活骨注射液进行髋关节腔灌注,药物干预开始 1,3,6,9,12 周后,分别从各组随机选取 2 只动物以空气栓塞法处死后取出坏死股骨头,采用扫描电镜观察标本微观结构变化情况。**结果:**实验组股骨头坏死恢复明显较对照组和模型组快且完整,实验组股骨头塌陷程度相对较轻,骨坏死修复过程中增生的纤维出现更早,纤维束的塑形时间更短,软骨下层骨组织排列更紧密,结构恢复更趋近正常,骨陷窝结构出现更多,股骨头坏死区域恢复面积更大,骨坏死区恢复更接近正常骨组织。**结论:**中药髋关节腔灌注对股骨头坏死的恢复有积极意义,且相对于活血化瘀法及补肾活血法对股骨头坏死的修复作用更强。

[关键词] 股骨头坏死;活骨注射液;模型,动物;扫描电镜;动物实验

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]**1005-0205(2017)02-0001-05

Scanning Electron Microscopic Observation on the Treatment of Femur Head Necrosis with Huogu Injection

XU Xilin¹ HU Hai¹ ZHANG Xiaofeng^{1△} WANG Zhengchun²
LÜ Hang¹ ZHANG Jie¹ LI Xiaodong¹

¹ The Second Hospital, Affiliated to Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150001, China;

² Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150001, China.

Abstract Objective: To observe the changes of scanning electron microscope of femur head perfusion with Huogu injection in the treatment of femur head necrosis model induced by liquid nitrogen freezing in rabbits. **Methods:** All 34 New Zealand white rabbits were randomly divided into blank group($n=2$) and modeling group($n=32$). The modeling group was modeled with femur head necrosis induced by liquid nitrogen freezing. After 1 week of successful modeling, 2 rabbits in the modeling group and 2 in the blank group were randomly selected to observe the necrosis by electron microscopy. The modeling group was randomly divided into model group, control group, and experimental group(10 rabbits in each group), and were perfused hip joint cavity with saline solution, Guanxinning injection and Huogu injection respectively. At the 1st, 3rd, 6th, 9th and 12th week after drug intervention, 2 rabbits were randomly selected from each group to remove the necrotic femur head by air embolization. The microstructural changes of the specimens were observed by scanning electron microscope. **Results:** The recovery of femur head necrosis was significantly faster and more complete in the experimental group than that in the control group and the model group. And in the experimental group, the collapse degree of the femur head was relatively slight, the proliferating fibers appeared earlier in the osteonecrosis repair process, the time of the fibrous capsule was shorter, the subchondral bone was arranged more closely, the structure recovered more normal, the area of the femur head necrosis was larger, and the area of osteonecrosis was much closer to the normal bone tissue. **Conclusion:** Hip joint

perfusion of traditional Chinese medicine on the restoration of femur head necrosis has a positive significance, but compared to Huoxuehuayu method, the femur head necrosis recovery of the Bushenhuoxue method was stronger.

Keywords: femur head necrosis; Huogu injection; models; animal; scanning electron microscope; animal experimentation

基金项目:国家自然科学基金项目(81173276)

¹ 黑龙江中医药大学附属第二医院(哈尔滨,150001)

² 黑龙江中医药大学

[△]通信作者 E-mail: zxfeng9919@163.com

股骨头缺血性坏死(INFH)是骨科常见的致残疾病之一,由于病机不明,临床上常无法实现对因治疗,中医药治疗股骨头坏死具有较多优势,是患者较容易接受的治疗方式^[1],应用前景广泛,经前期研究表明^[2,3],中药注射液对防治股骨头缺血性坏死(INFH)具有明确的效果,为了进一步观察中药注射液股骨头灌注对 INFH 的微观结构变化的影响,2015 年 3 月至 2015 年 10 月应用扫描电镜对液氮冷冻法 INFH 模型及中药干预后的组织结构进行了研究,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 6 月龄清洁级新西兰大白兔 34 只,体质量 2~2.2 kg,雌雄各半。由哈尔滨医科大学实验动物学部提供,许可证号:SCXK(黑)2006-010。

1.2 主要实验试剂和仪器设备

活骨注射液(内含生药:丹参 3 g,川芎 2 g,骨碎补 2 g)由黑龙江中医药大学药学院制备。冠心宁注射液(国药准字 Z14021943),运城市银湖制药有限公司。戊二醛溶液(武汉博士德)。次氯酸钠溶液(富宇化工)。I-B3 型离子溅射仪(日本 EIKO 公司),S-3000N 型扫描电子显微镜(日本 HITACHI 公司),超声清洗机(宁波新芝)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组 34 只新西兰大白兔随机分为两组,空白组 2 只,造模组 32 只,行股骨头坏死动物造模成功后 1 周随机抽取 2 只,其余 30 只再随机分为 3 组:模型组,对照组,实验组。

1.3.2 造模方法 液氮冷冻法诱导兔的股骨头坏死^[4]。

1.3.3 给药剂量 参照活骨注射液股骨头坏死动物实验剂量^[5]。

1.3.4 治疗方案 空白组正常饲养,不予药物治疗,1 周后与造模组 2 只动物一同处死。模型组、对照组、实验组分别给予 0.9%生理盐水、冠心宁注射液、活骨注射液髋关节腔灌注,剂量均为 0.70 mL/次,3 d/次。造模术后 2 周开始治疗,各组按 1,3,6,9,12 周时间点分批处死动物,每批每组 2 只,进行检测。

1.3.5 扫描电镜标本制作 将股骨头标本剖开 4 份,取 1 份,生理盐水轻轻冲洗股骨头断面,置标本于 2.5%戊二醛溶液中固定 48 h 后,1%磷酸缓冲液冲洗后锇酸固定,10% 次氯酸钠溶液中浸泡 2 h,超声清洗 15 min,使骨小梁之间的骨髓细胞脱落,乙醇梯度脱水,叔丁醇冷冻干燥,I-B3 型离子溅射仪真空喷金,最后将标本置于 S-3000N 型加速电压为 10 kV 的扫描电镜内观察。

2 结果

2.1 正常股骨头扫描电镜观察

200 倍下观察,放大的软骨表面仍光滑,未见塌陷、裂痕,软骨下层骨组织排列紧密、结构清晰,骨陷窝呈串由内向外均匀排列,骨小梁排列紧密,结构清晰;500 倍下观察,并可见软骨层布满小的扁形、椭圆形凹陷(软骨陷窝)分层有序的排列,骨小管均匀分布于软骨下骨组织间(图 1)。

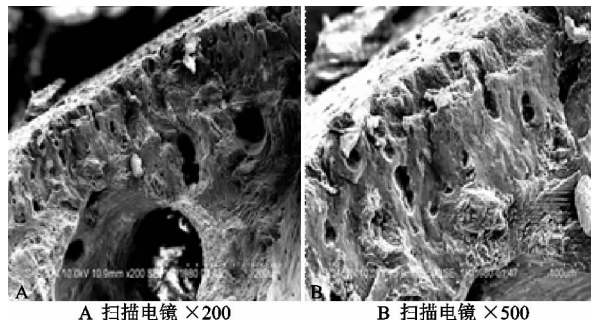


图 1 正常动物股骨头组织切片扫描电镜观察

2.2 造模 1 周后扫描电镜观察

200 倍下观察可见软骨层表面粗糙,软骨层内小的扁形、椭圆形凹陷(软骨陷窝)失去原有形态结构,出现排列无序的大小不一形状各异的凹陷;500 倍下观察,软骨表面凹凸不平,软骨层软骨陷窝排列紊乱,失去紧密有序结构,呈蜂窝状(图 2)。

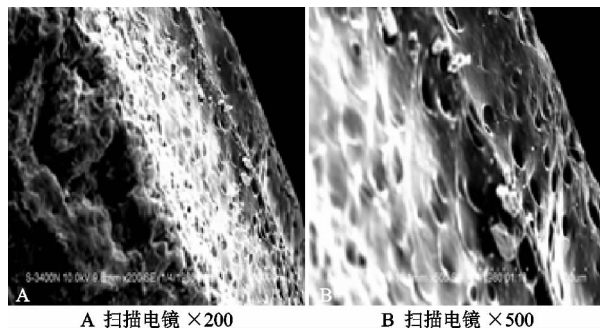


图 2 造模 1 周后坏死股骨头组织切片扫描电镜观察

2.3 药物干预 1 周后扫描电镜观察

模型组:200 倍下观察,冷冻区软骨损伤严重,软骨下层骨组织杂乱无序失去原有形态结构,骨陷窝略变大,其形态发生变化,数量略减少且分布散乱,骨小梁结构变化不明显;500 倍下观察,软骨层仅能见到部分软骨残片附着在表面,软骨下层骨组织明显稀疏,结构有些紊乱,骨组织间的骨小管数量略增多(图 3)。

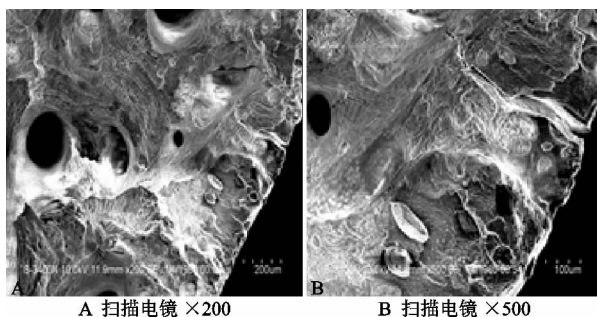


图 3 药物干预 1 周后模型组扫描电镜观察

对照组:200 倍下观察,冷冻区软骨明显较正常软骨处薄,软骨层结构杂乱,裂痕明显,贴近软骨下层骨组织杂乱无序失去原有形态结构,骨陷窝略变大,排列尚整齐,骨小梁结构变化不明显;500 倍下观察,软骨层的软骨陷窝减少,软骨下骨组织略显稀疏,结构紊乱,骨组织间的骨小管数量略增多(图 4)。

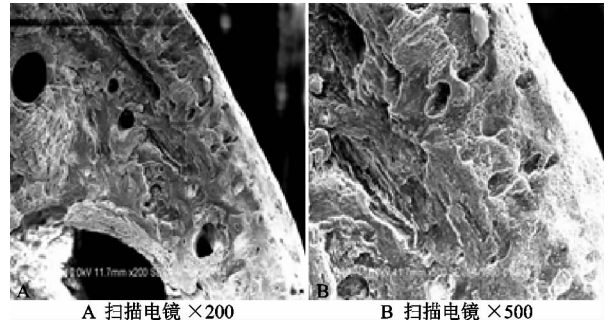


图 4 药物干预 1 周后对照组扫描电镜观察

实验组:100 倍下观察,冷冻区骨组织损伤面积及深度扩大,软骨开始有轻微剥脱,表面粗糙,软骨层可见裂痕;200 倍下观察,冷冻区软骨表面毛糙,软骨层结构杂乱,裂痕明显,贴近软骨下层骨组织杂乱无序失去原有形态,骨陷窝略变大,数量减少,骨小梁结构变化不明显;500 倍下观察,软骨层的软骨陷窝减少,软骨下骨组织略显稀疏,结构紊乱,骨组织间的骨小管数量略增多(图 5)。

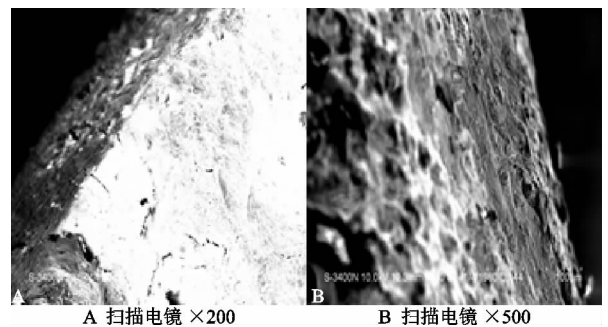


图 5 药物干预 1 周后实验组扫描电镜观察

2.4 药物干预 3 周后扫描电镜观察

模型组:200 倍下观察,软骨损伤严重,股骨头表面有塌陷,骨组织间有少量的增生纤维,外周的梁结构排列紊乱,结构变稀疏;500 倍下观察,股骨头表面隐约能见到软骨层残片,增生的纤维杂乱分布,其表面骨小管增多(图 6)。

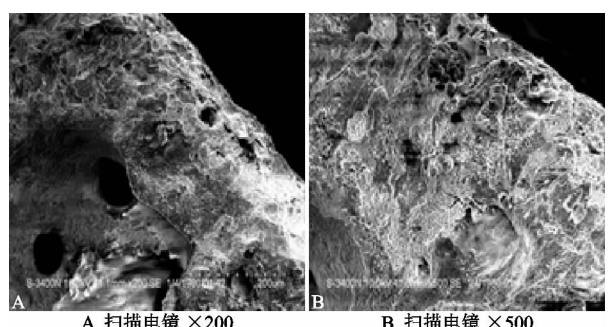


图 6 药物干预 3 周后模型组扫描电镜观察

对照组:200 倍下观察,软骨损伤严重,股骨头表面有塌陷,骨组织结构紊乱,骨组织间骨陷窝变大,数量减少,纤维增生明显,且增生的纤维呈簇集状分布,外周的骨小梁结构排列变稀疏;500 倍下观察,股骨头表面隐约能见到部分软骨层残片,明显可见分布紊乱的纤维增生,且其表面可见较多的骨小管(图 7)。

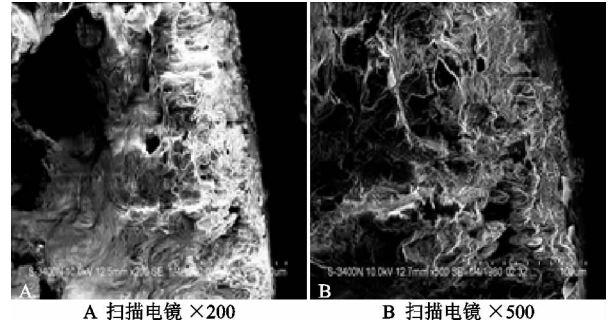


图 7 药物干预 3 周后对照组扫描电镜观察

实验组:200 倍下观察,有部分较薄的软骨残留,软骨下骨组织结构紊乱,骨陷窝变大形态异常,分布散乱,数量减少,纤维增生明显,且纤维呈束状分布,外周的骨小梁结构排列变稀疏;500 倍下观察,股骨头表面隐约能见到部分软骨层残片,明显可见较多的分布紊乱的纤维增生,且其表面可见骨小管明显增多(图 8)。

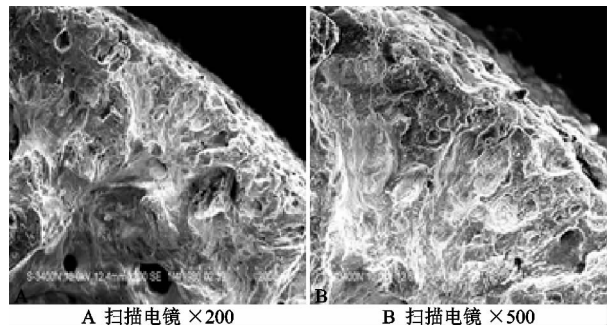


图 8 药物干预 3 周后实验组扫描电镜观察

2.5 药物干预 6 周后扫描电镜观察

模型组:200 倍下观察,骨小梁结构紊乱,股骨头表面有轻微塌陷,增生纤维明显增多,呈散乱分布;500 倍下观察,股骨头表面隐约能见到部分软骨层残片,表面凹凸明显,可见较多的分布散乱的增生纤维,其表面骨小管相对明显增多(图 9)。

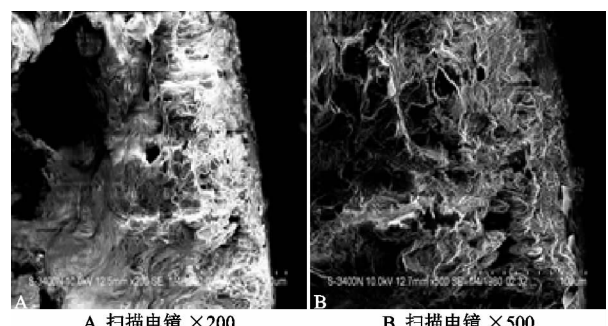


图 9 药物干预 6 周后模型组扫描电镜观察

对照组:200 倍下观察,股骨头表面不光滑且有轻微塌陷,骨组织排列更加紊乱,几乎看不到完整骨陷窝,

增生的纤维明显增多;500倍下观察,股骨头表面隐约能见到部分软骨层残片,表面凸凹明显,可见更多的分布散乱的纤维增生,其表面的骨小管相对减少(图10)。

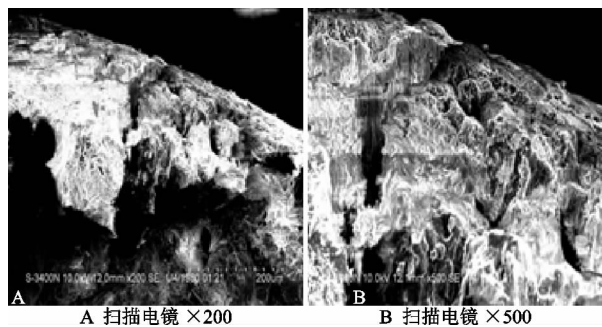


图10 药物干预6周后对照组扫描电镜观察

实验组:200倍下观察,股骨头表面不光滑且有轻微塌陷,骨组织排列更加紊乱,几乎看不见完整的骨陷窝,有较多的呈束状的散乱的增生纤维,增生的纤维开始有沿细胞轴向由内向外的趋向性;500倍下观察,股骨头表面凸凹明显,可见增生纤维明显增多,增生纤维趋向性明显,其表面骨小管相对明显减少(图11)。

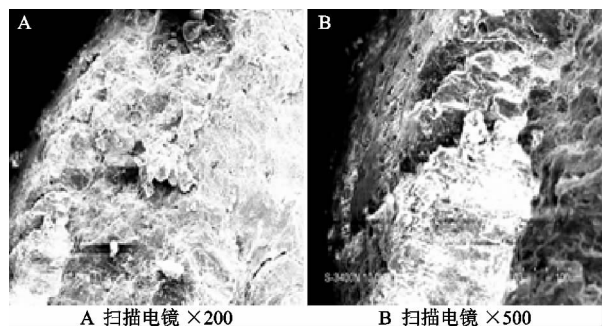


图11 药物干预6周后实验组扫描电镜观察

2.6 药物干预9周后扫描电镜观察

模型组:200倍下观察,股骨头表面有轻微塌陷,骨组织表面出现更多的增生纤维且纤维分布散乱,可见形态变化的大小不一的骨陷窝存在;500倍下观察,可见增生纤维像“蚕吐丝做茧”一样,分布散乱,其表面骨小管数量减少(图12)。

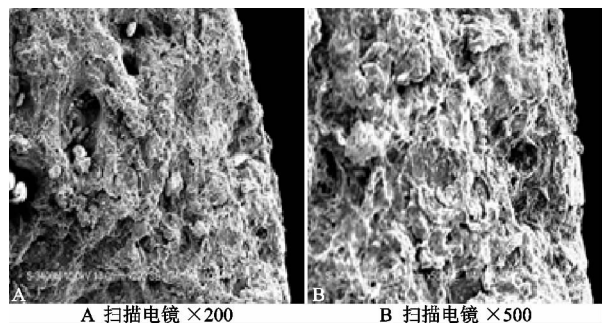


图12 药物干预9周后模型组扫描电镜观察

对照组:200倍下观察,有部分较薄的软骨存在,股骨头表面不光滑,软骨下层骨组织排列更加紊乱,可见个别形态各异的骨陷窝,增生的纤维开始有沿细胞轴向由内向外的趋向性;500倍下观察,股骨头表面能见到部分软骨层残片,可见更多的分布散乱的纤维增

生,纤维束像“蚕吐丝做茧”一样,形似山峰,增生纤维趋向性明显,其表面骨小管明显减少(图13)。

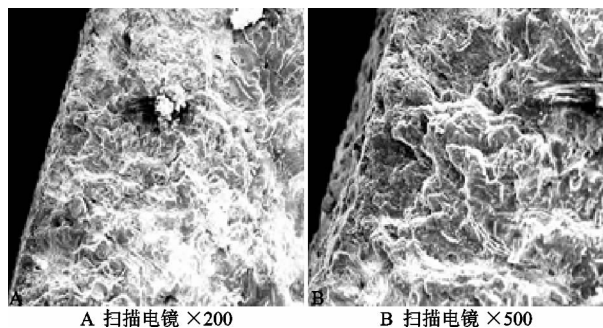


图13 药物干预9周后对照组扫描电镜观察

实验组:200倍下观察,股骨头软骨表面不光滑,部分可见接近正常的骨组织排列,骨陷窝明显增多,增生的纤维数量明显减少,沿细胞轴向的趋向性更清晰;500倍下观察,股骨头表面仍凸凹明显,增生的纤维减少、缩短、变细,纤维排列规律,纤维周围可见接近正常的骨组织结构,其表面骨小管明显减少(图14)。

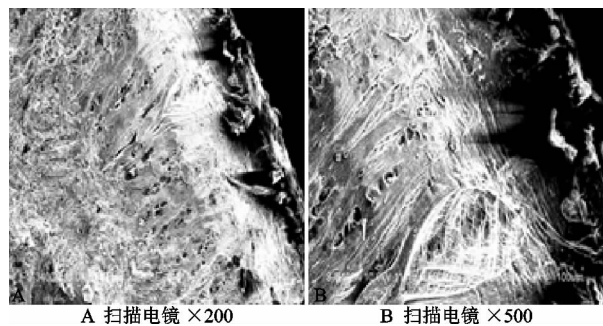


图14 药物干预9周后实验组扫描电镜观察

2.7 药物干预12周后扫描电镜观察

模型组:200倍下观察,软骨下层骨组织排列变清晰,骨陷窝数量略增多,增生的纤维变稀疏,数量减少;500倍下观察,股骨头表面仍不光滑,增生纤维沿细胞轴向的趋向性明显,纤维束形似山峰,分布仍较散乱,其表面的骨小管减少(图15)。

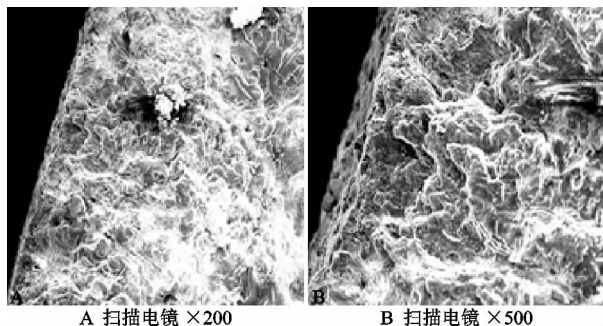
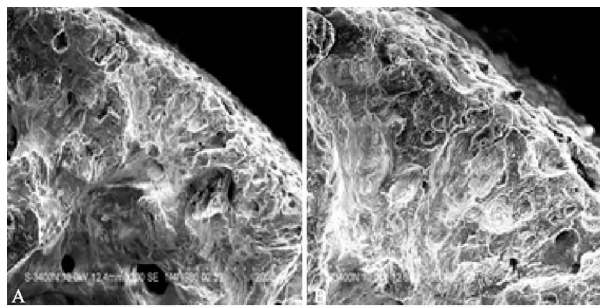


图15 药物干预12周后模型组扫描电镜观察

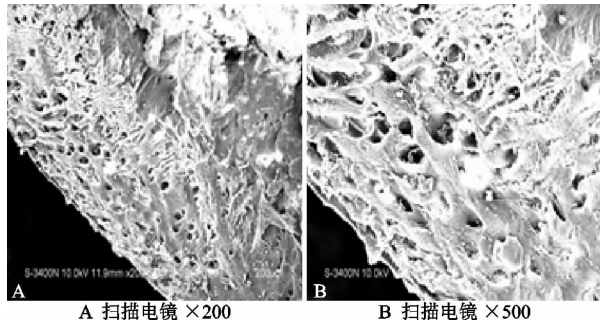
对照组:200倍下观察,股骨头表面不光滑,软骨下层出现接近正常的骨组织排列,形态各异的骨陷窝数量明显增多,分布散乱,增生的纤维明显减少;500倍下观察,股骨头表面欠光滑,散乱的增生纤维明显减少、变细,排列更清晰,骨陷窝大小不一、形态各异,纤维表面的骨小管明显减少(图16)。



A 扫描电镜 ×200 B 扫描电镜 ×500

图 16 药物干预 12 周后对照组扫描电镜观察

实验组:200 倍下观察,可见分布散乱的大小不一的骨陷窝存在,其数量明显多于正常骨组织内的骨陷窝,骨陷窝间骨组织排列结构清晰,增生纤维明显减少;500 倍下观察,股骨头表面可见一层较薄的软骨层,有大量的大小不一的骨陷窝出现,骨陷窝间清晰可见接近正常的骨组织排列结构,增生纤维明显减少且变细、变短,排列稀疏,纤维表面的骨小管数量接近正常骨组织(图 17)。



A 扫描电镜 ×200 B 扫描电镜 ×500

图 17 药物干预 12 周后实验组扫描电镜观察

3 讨论

液氮冷冻法制备的股骨头坏死动物模型是目前实验中常用的动物模型,其病理变化被认为与人类股骨头坏死变化过程基本一致^[6]。液氮冷冻法制备股骨头坏死动物模型是股骨头坏死理想的造模方法^[7,8],广泛应用于实验研究。

股骨头坏死在传统医学中被归为“骨蚀”“骨痿”“骨痹”“髓骨痹”等范畴^[9],由于本病的病因病机不明,中医证候分型也各家纷呈,没有统一观点^[10-12]。但“补肾活血法”是股骨头坏死常用的治疗大法,广泛应用于临床,疗效显著^[13]。活骨注射液是由中药制备的复方水针制剂,具有补肾活血的作用^[5]。冠心宁注射液由丹参和川芎组成,主要有活血化瘀的作用,在临床上选用冠心宁注射液局部注射治疗股骨头缺血性坏死也取得了较好的疗效^[14]。那么补肾活血法与活血化瘀法在股骨头坏死修复微观结构中是否存在差异呢?实验研究表明:对照组与实验组相对于模型组,对股骨头坏死有较强的修复作用。药物干预 1 周后,3 组差异并不明显。在药物干预 3 周后表现出明显修复反应;在药物干预 6 周后,增生纤维明显增多,像“蚕吐丝做茧”一样,但实验组增生纤维趋向性较明显;从药物干预 9 周后开始,实验组修复更加明显,股骨头表面逐渐形成

一层较薄的软骨层,出现大量的大小不一的骨陷窝,骨陷窝间清晰可见接近正常的骨组织排列结构,增生纤维明显减少且变细、变短,排列稀疏,纤维表面的骨小管数量逐渐接近正常骨组织。

通过本实验观察,实验组在股骨头坏死修复中明显较模型组与对照组快且完整,实验组股骨头塌陷程度相对较轻,骨坏死修复过程中增生的纤维出现早,纤维束的塑形时间短,软骨下层骨组织排列紧密,结构恢复更趋近正常,骨陷窝结构出现相对较多,股骨头坏死区域恢复面积大,骨坏死区恢复相对接近正常骨组织。随着用药时间加长,效果就更明显,结果与光镜观察结果相一致,亦可与该药对兔股骨头坏死血管内皮生长因子等表达的作用相印证^[15]。

由此可见中药髋关节腔灌注对股骨头坏死的恢复有积极意义,相对于活血化瘀法,补肾活血法对股骨头坏死的修复作用更强。

参考文献

- [1] 陈雷雷,张颖.何伟教授采用中医药疗法治疗股骨头坏死的经验[J].中医正骨,2015,27(5):74-77.
- [2] 张晓峰,张文进,孙志华.活骨注射液治疗Ⅱ期股骨头缺血性坏死 80 例临床观察[J].中医正骨,2003,15(4):13-14.
- [3] 杨珺,张晓峰,徐西林.活骨注射液治疗Ⅰ期股骨头缺血性坏死 58 例临床观察[J].中医药信息,2009,26(1):40-41.
- [4] 沈霖,林燕萍,王拥军.骨伤科实验研究[M].北京:北京科学技术出版社,2005:434.
- [5] 徐西林,张晓峰,段洪超.活骨注射液髋关节腔注射对兔 VEGF 表达影响的研究[J].中医药信息,2011,28(5):64-66.
- [6] 刘春晖,赵德伟,李志刚.活骨注射液髋关节腔灌注对兔股骨头坏死模型血管内皮生长因子表达的动态影响[J].中国骨与关节外科,2011,4(2):135-140.
- [7] 吕智,刘小丽,卫小春,等.股骨头坏死修复过程的动物实验研究[J].实用骨科杂志,2001,7(6):430-433.
- [8] 周正丽,张潜,周正平,等.液氮冷冻致兔股骨头坏死病理学特征研究[J].临床与实验病理学杂志,2011,27(10):1095-1098.
- [9] 于潼,谢利民,王文岳,等.从中医证候学研究探讨股骨头坏死的病因病机[J].中国中医骨伤科杂志,2014,22(3):74-76.
- [10] 刘少军,袁浩.股骨头坏死的中医临床思路与方法探讨[J].中国医药学报,2002,17(1):44-47.
- [11] 魏秋实.股骨头坏死证候学及中医药治疗适应症的规范化研究[D].广州:广州中医药大学,2012.
- [12] 周正新,刘安平,王峰,等.丁铎论股骨头缺血性坏死的学术特点[J].中医临床杂志,2007,19(3):209-210.
- [13] 丁宁,赵丹,马勇.中医药治疗股骨头坏死近况[J].河南中医,2014,34(7):1300-1301.
- [14] 毕殿奎,吴兴杰.髋关节腔注射冠心宁配合针灸治疗股骨头坏死的临床观察[J].中国医学创新,2011,8(35):19-21.
- [15] 徐西林,赵永兰,张晓峰,等.活骨注射液髋关节腔灌注对兔股骨头坏死模型血管内皮生长因子表达的动态影响[J].中医正骨,2015,27(8):1-6.

(收稿日期:2016-05-01)