

早期激素性股骨头缺血性坏死动物模型的建立研究

张翔¹ 董晓俊² 吴泱^{1△} 齐理华³

[摘要] 目的:采取内毒素加激素诱导建立早期激素性股骨头缺血坏死动物模型,采取病理学检查和影像学检查评价其可靠性,以及探讨造模过程中动物死亡原因。方法:20 只健康成年白兔,体质量(2.5±0.2)kg,随机分为对照组、实验组,每组 10 只。实验组兔耳缘静脉注射 LPS(10 μg/kg),24 h 后再次给药 1 次;在第 2 次注射 LPS 后,立刻臀肌注射醋酸泼尼松龙注射液(25 mg/kg),共 3 次。对照组臀肌注射等量生理盐水(10 mg/kg)。造模过程中记录动物一般情况,造模 6 周后行股骨头病理组织学检查及影像学检查。结果:通过病理组织学检查实验组骨小梁缩小,稠密度降低,局部断裂,甚至可见结缔组织包绕形成云片状;骨细胞核固缩,空骨陷窝明显增多;骨髓腔内脂肪细胞增多、增大;骨髓受压变小。实验组死亡动物肝组织广泛水肿,组织充血,门管区炎性细胞浸润,部分细胞气球样变坏死。对照组和实验组空骨陷窝率分别为(9.368±2.310)%和(32.500±3.479)%,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:内毒素加激素诱导可短期内建立动物模型,操作简便,重复性高,同时形成动物体内高凝血状态,更符合激素性股骨头缺血性坏死临床病理特征。

[关键词] 早期激素性股骨头缺血坏死;动物模型;病理学检查;死亡原因

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)02-0067-05

Model Establishment of Early Steroid-Induced Avascular Necrosis of Femoral Head in Rabbit

ZHANG Xiang¹ DONG Xiaojun² WU Yang^{1△} QI Lihua³

¹ Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital of Wenzhou, Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Wenzhou 325000, Zhejiang China;

² Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430014, China;

³ Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China.

Abstract Objective: To establish a rabbit model of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head (SANFH) by LPS and sodium phosphate solution and to evaluate its validity and death factors with pathological examination. **Methods:** Twenty healthy adult rabbits with body weight of (2.5±0.2) kg were randomly divided into control group and model group, 10 rabbits in each group. The model group received one intravenous injection of LPS (10 μg/kg), and it was repeated after 24 h. After the second injection of LPS, 1 injection of dexamethasone sodium phosphate solution (25 mg/kg) was given intramuscularly immediately. The control group was injected with equal amount of saline, every day for 3 times. The general conditions of rabbits were recorded during modeling. The histopathological examination and imaging examination of the femoral head were made after 6 weeks. **Results:** The histopathological examination indicated that the bone trabecula in model group shrunk, collapsed locally and decreased in bone density, and even it was surrounded by connective tissue form a cloud sheet. Light microscopy showed that the nucleus of osteocytes was compressed and the empty lacuna and the

fatty cells increased, with the decreasing of bone marrow. Pathological changes in the experimental group included widely liver tissue edema, hyperemia, inflammatory cells infiltration within the portal area, ballooning changes and necrosis in liver cells. The rates of empty lacunae were (9.368±2.310)% in control group and (32.500±3.479)% in model group, showing significant difference ($P<0.01$). **Conclusion:** Endotoxin with hormone induction, which is simple and re-

基金项目:湖北省中医药中西医结合科研项目(2013Z-Y12)

¹ 浙江中医药大学附属温州市中西医结合医院
(浙江 温州, 325000)

² 武汉市中医医院

³ 湖北中医药大学

△通信作者 E-mail: 173552256@qq.com

producible, can set up animal models in a short time. And the high blood coagulation state of the animal is more in line with the pathological characteristics of steroid-induced avascular necrosis of femoral head.

Keywords: early steroid-Induced avascular necrosis; animal model; pathological examination; death factors

股骨头缺血性坏死(ANFH)是由各种病因诱发的股骨头血液供给破坏或骨细胞变性导致骨的正常成分死亡的病理过程,研究显示激素性股骨头缺血性坏死(SANFH)发病率已占该病种首位^[1,2]。对于该病治疗,关键是早期确诊,对症干预治疗,恢复股骨头血液循环,阻止股骨头塌陷,若发展迅速,则很快进入不可逆的病理过程。诱导理想的激素性股骨头坏死动物模型是研究本病发病及治疗的关键组成部分,人与动物的SANFH具有相同的病理过程^[3]。目前常用建立SANFH动物模型方式有单纯激素诱导、内毒素加激素诱导、异体血清加激素诱导^[4]。三种造模方式在诱导骨坏死过程中各具优点,但同时存在并发症,甚至导致动物死亡。本实验采用内毒素加激素诱导兔激素性股骨头缺血性坏死模型,对这种造模方式的实验效果以及副作用进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

20只健康成年新西兰大耳白兔,体质量(2.5 ± 0.2)kg,全部为雄性,由武汉市中医医院药学实验研究基地提供,动物许可证号为SKXK(鄂)2010-0056。标准条件下饲养,每笼2只。实验过程中对动物处置符合2006年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[5]。

1.2 实验药物及试剂

大肠杆菌脂多糖(LPS,美国Sigma公司,批号111M4035V);醋酸泼尼松龙注射液(125 mg/支,浙江仙琚制药股份有限公司,批号H33020824);注射用青霉素钠(8.0×10^5 U/支,哈药集团制药总厂,批号A080700411);40%甲醛溶液、10%水合氯醛溶液、蒸馏水、梯度酒精、苏木精、伊红、中性树脂封固剂等辅助试剂(武汉市中医院药学实验研究基地提供)。

1.3 实验仪器

TDZ4-WS台式低速自动平衡离心机(Beckman counter);-80℃超低温保存箱(Ultralow, SANYO);KQ-500E型超声波清洗器;岛津分析天平;Olympus显微镜BX-0001型;配全自动照相装置PM20-35型(均由武汉市中医院药学实验研究基地提供)。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 实验于2014年11月至2016年6月在武汉市中医院药学实验研究基地国家中医药管理局三级实验室完成。采用内毒素加激素诱导兔激素性

股骨头缺血性坏死模型。

1.4.2 分组方法 所有动物适应性喂养1周,随机分为对照组、实验组,每组10只。实验组兔首先耳缘静脉注射LPS($10 \mu\text{g/kg}$),24 h后再次给药1次;在第2次注射大肠杆菌内毒素后,立刻臀肌注射醋酸泼尼松龙注射液(25 mg/kg),共3次,24 h之后重复(每次给药前均测量体重,调整剂量)^[6]。对照组臀肌注射等量生理盐水(10 mg/kg)。两组兔均采取青霉素钠 8.0×10^5 U/kg臀肌注射,每周2次,共6周,预防感染。

1.4.3 标本制作方法

1.4.3.1 取材:造模第6周后,分别每组随机抽取2只兔经耳缘静脉注入空气法处死,并取出双侧股骨头,同时取出动物肝脏,肉眼观察,并用手术刀沿冠状面剖开用于观察股骨头的大体形态及骨质情况。

1.4.3.2 组织学切片 每组随机抽取2只动物,经耳缘静脉注入空气法处死,并取出双侧股骨头,观察大体情况,用4%甲醛溶液固定3 d,利用6% EDTA脱钙液脱钙定期更换脱钙液并观察脱钙情况,直至大头针能无阻力插入骨组织则终止脱钙。利用乙醇脱水,常规石蜡切片(片厚 $3 \sim 5 \mu\text{m}$),包埋,依次做好标记。脱蜡和水化后常规苏木精伊红染色,光镜下观察。

1.5 实验指标测定

1.5.1 一般观察 造模后即开始观察动物精神、毛发、饮食、二便、体质量及活动状况。

1.5.2 死亡现象观察 记录动物死亡时间,并立即进行解剖分析死因,统计各组的最终死亡数量。

1.5.3 病理组织学检查 光镜下观察组织学切片,骨细胞坏死病理改变以空骨陷窝率体现,即在400倍放大率下,任选5个视野,经ipp6.0图像分析软件计算单位视野骨小梁面积百分比和空骨陷窝所占百分比。

1.5.4 X线片观察 分别于用药3周、用药6周后,每组随机抽取2只兔经耳缘静脉麻醉后,取双髌蛙式位固定于实验动物台上,进行X线片检测。

1.6 统计学方法

采用CHISS统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察

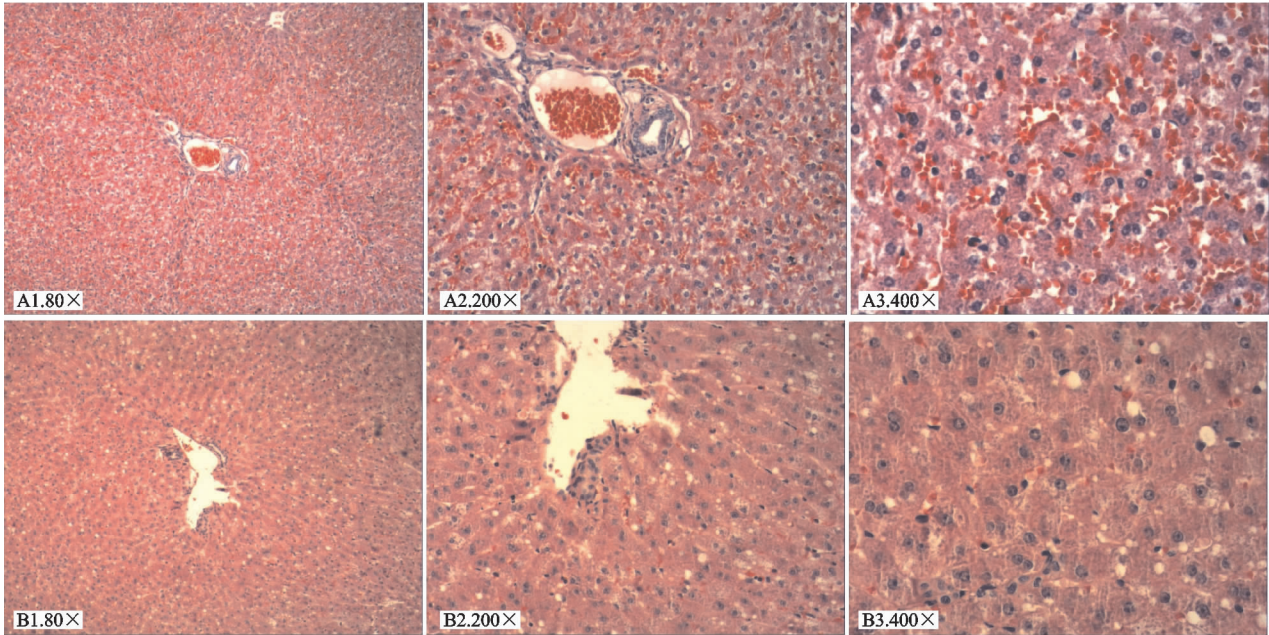
造模期间,实验组动物第2天即呈现出神志萎靡,食量减少症状;第1周出现行动减少,食量减少;第2周出现脱毛,有1只动物死亡,即取出其双侧股骨头及肝

脏进行切片;第 4 周出现食量减少明显,步态异常,活动明显减少,体重明显减轻,有 1 只动物死亡,即取出其双侧股骨头及肝脏进行切片;至第 6 周末出现大部分兔子站立困难,跛行。对照组动物未出现明显异常。

2.2 病理组织学检查

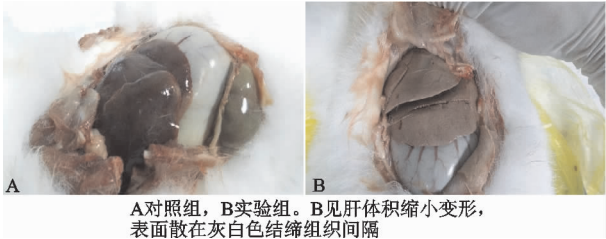
本次实验造模采取兔耳缘静脉注射 LPS(10 μg/kg),24 h 后再次给药 1 次;在第 2 次注射大肠杆菌内毒素后,立刻臀肌注射醋酸泼尼松龙注射液(25 mg/kg),

共 3 次,期间隔开 24 h(每次给药前均测量体质量,调整剂量)。造模过程中第 2 周、第 4 周各有一只动物死亡,对于实验组造模期间死亡动物及时取出肝脏,肉眼观察与对照组存在明显差异,肝体积缩小变形,存在深浅不一的塌陷区,质量减轻,表面散在灰白色结缔组织间隔。肝脏组织镜下观察显示:肝组织广泛水肿,组织充血,门管区炎性细胞浸润,部分细胞气球样变坏死。对照组则为正常肝组织镜下形态(见图 1~2)。



A 对照组, B 实验组。A 中为正常肝组织镜下形态; B2 可见门管区炎性细胞浸润, B3 部分细胞气球样变坏死

图 1 兔肝脏组织病理学观察



A 对照组, B 实验组。B 见肝体积缩小变形, 表面散在灰白色结缔组织间隔

图 2 兔肝脏大体观察

对照组兔股骨头组织镜下观察未见明显异常。实验组股骨头组织病理学切片可见骨小梁缩小, 稠密度降低, 局部断裂, 甚至可见结缔组织包绕形成云片状; 骨细胞核固缩, 空骨陷窝明显增多; 骨髓腔内脂肪细胞增多、增大; 骨髓受压变少(见图 3)。对照组和实验组空骨陷窝率分别为(9.368±2.310)% 和(32.500±3.479)%, 差异有统计学意义($P<0.01$), 见表 1。

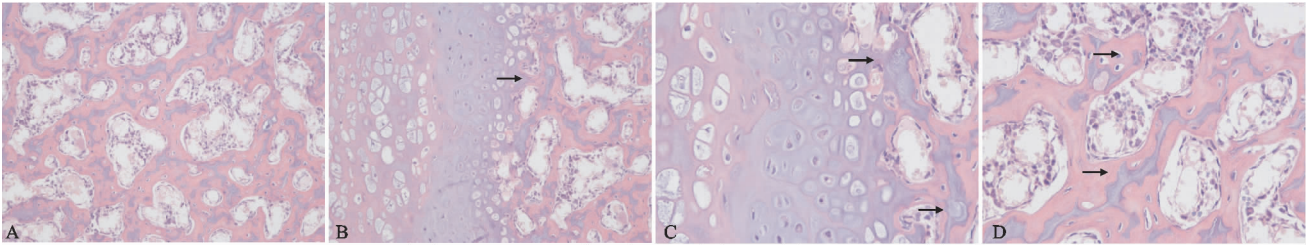


图400倍镜下, 可见骨细胞核固缩, 空骨陷窝明显增多 注: →空骨陷窝

图 3 实验组造模 6 周后股骨头苏木精-伊红染色观察

表 1 两组兔子股骨头切片病理组织观察(±s)

组别	兔数	空骨陷窝率(%)	骨小梁面积百分比(%)	死亡动物(只)
对照组	10	9.368±2.310	0.457±0.042	0
实验组	10	32.500±3.479	0.201±0.194	2
P		0.003 79	0.032 70	

第 6 周末对照组股骨头组织形态学观察未见明显异常。实验组股骨头组织形态学观察结果显示: 骨小

梁稠密度降低,局部出现断裂,空骨陷窝增多,成骨细胞和血管数量降低,破骨细胞增加,骨髓腔内有新出血区,造血细胞减少,而脂肪细胞增加,骨坏死显著,根据早期激素性股骨头坏死的病理学判断标准,可确定兔早期激素性股骨头坏死模型成功建立(见图4)。

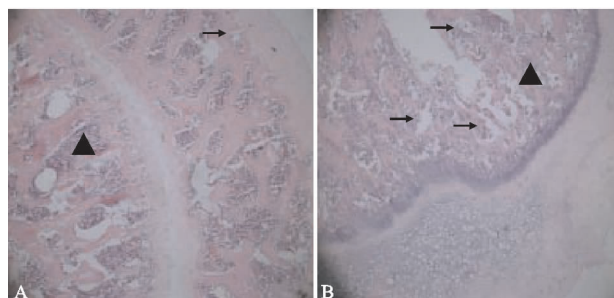


图4 兔股骨头组织形态学观察
A对照组, B实验组; A为正常组织学形态, B中骨小梁稠密度降低, 局部出现断裂, 空骨陷窝增多 注: →空骨陷窝 ▲骨小梁

图4 兔股骨头组织形态学观察

2.3 X线检查结果

随机从对照组及实验组动物中各抽取2只兔耳缘静脉麻醉后,取双髌蛙式位进行X线片检测:对照组未见明显异常。实验组X线片显示股骨头轻度密度不均骨小梁模糊(见图5)。



图5 造模6周末兔股骨头X线片观察
A对照组, B实验组见股骨头轻度密度不均骨小梁模糊

图5 造模6周末兔股骨头X线片观察

3 讨论

激素性股骨头缺血性坏死(SANFH)发病机制复杂,建立良好动物模型对于该病的研究和治疗起到关键作用,SANFH动物模型存在建立时间长、成本高、动物死亡率高弊端,通过长期的临床研究,目前采取的措施有单纯激素诱导、内毒素加激素诱导、异体血清加激素诱导^[4],但是关于激素的种类、用法、用量仍有争议^[7-9]。

单纯激素诱导往往需要较长时间^[10],且骨坏死并不局限于股骨头,有文献报道在肱骨近端等处也产生骨坏死^[11]。Bekler等^[12]的研究表明单一使用激素诱导并不是骨坏死发展的唯一危险因素,且很难诱导出典型的骨坏死模型。通过使用单纯激素诱导是从病因引发股骨头缺血性坏死的发生,但也存在以下不足:造模使用大量激素,改变了骨细胞的内外环境;造模成本高,成功率低,动物死亡率高;造模周期长,引发的骨坏

死区域并不局限在股骨头,实验动物对激素反应的敏感性存在个体差异,难于标本化。异体血清加激素诱导一般采取马血清加激素诱导,马血清能够产生Ⅲ型过敏反应^[13],诱发导致冠状动脉管腔变窄,影响血流,从而导致骨坏死。但是马血清有可能引起过度免疫反应、消化道感染等因素导致动物死亡^[14]。

国内外已有较多文献研究采用内毒素加激素诱导激素性股骨头缺血性坏死动物模型,张琳等^[15]选用SD大鼠,分别予以LPS(10,20,40 μg/kg),尾静脉注射2 d,1次/d,末次注射24 h后,臀肌注射相应剂量甲强龙(40 mg/kg)3 d,1次/d,成功建立动物模型,最终结果40 μg/kg为大鼠最佳内毒素剂量。宋才渊等^[16]予以SD大鼠腹腔注射LPS(97.92 μg/kg)2 d,臀肌注射甲泼尼龙琥珀酸钠(24.5 mg/kg)1次,结果虽可成功诱导骨坏死模型,但是由于剂量过高,导致动物死亡率高。现有的研究结果大部分以大鼠作为模型对象,本实验以兔作为动物模型,兔在发病机制和病理改变方面与人相似,课题组在前期试验中,以10 μg/kg内毒素用量成功建立了SANFH模型,未见动物死亡,用量较安全。LPS能直接激活血管内皮细胞多条信号通路,诱导内皮细胞凋亡,引起血小板集聚和激活凝血因子Ⅶ,使机体处于高凝状态^[2],股骨头血供以末梢循环为主,当机体高凝状态,容易引起股骨头缺血性坏死,更加符合SANFH临床病理特征。此外可短期内诱导动物模型,操作简便,重复性高,但同时应当注意不同模型建立的内毒素剂量差别较大。不足之处:内毒素用量需要严格控制,剂量太低又不能构成高血液粘稠度环境^[17],剂量过高又会引起内毒素血症、肝坏死,从而引起动物死亡^[18]。

应用动物股骨头标本切片进行病理学检测是早期SANFH动物模型诊断的重要方法,其中空骨陷窝是主要观察指标。本研究中实验组骨小梁缩小,稠密度降低,局部断裂,甚至可见结缔组织包绕形成云片状;骨细胞核固缩,空骨陷窝明显增多;骨髓腔内脂肪细胞增多、增大;骨髓受压变少。表明实验组动物模型已具备早期骨坏死病例特征。死亡动物肝脏组织观察肝组织广泛水肿,组织充血,门管区炎性细胞浸润,部分细胞气球样变坏死,说明肝坏死是动物死亡的主要因素,因此在造模过程中需要注意内毒素用量,防止Shwartzman现象发生。MRI检查是早期骨坏死动物模型的敏感方法,其中T1WI上局限性带状低信号以及T2WI观察"双线征"是主要诊断指标^[19]。目前国内外应用模型评价指标的选择通常有骨组织病理学、骨密度、血液生化指标、局部TNF-α免疫组织化学SP法检测等^[20,21]。

本研究结果证明,采取内毒素联合激素使用可成

功诱导兔早期激素性股骨头缺血性坏死动物模型,造模过程严格控制药物剂量,防止肝坏死及动物死亡的发生。近年来国内外研究者积极经行相关实验研究,根据不同的研究目的选择不同的动物模型、造模方法,在 SANFH 模型建立、发病机制、治疗方式方面取得了许多进展。目前常用的动物模型包括大鼠、兔等,本实验采用兔作为动物模型,最终成功建立了骨坏死模型,但是四足哺乳动物髋关节生物力学模式与人类存在明显差异,四肢着地能保护性地减轻髋关节负重,在实验中很难诱导出股骨头塌陷。因此,可考虑使用鸡、食火鸟等两足着地动物进行相关研究。综上所述,诱导激素性骨坏死动物模型目前仍未达成一致,动物模型的选择、药物使用方法各有利弊,进一步研究理想的激素性骨坏死动物模型及其发病机制仍是一项长期课题。

参考文献

- [1] 张立岩,孙新,田丹,等.兔早期激素性股骨头缺血性坏死模型建立及其 MRI 与病理特征研究[J].中国修复重建外科杂志,2015,29(10):1240-1243.
- [2] Wang XS, Zhuang QY, Weng XS, et al. Etiological and clinical analysis of osteonecrosis of the femoral head in Chinese patients[J]. Chin Med J(Engl), 2013, 126(2): 290-295.
- [3] Guan XY, Han D. Role of hypercoagulability in steroid-induced femoral head necrosis in rabbits[J]. J Orthop Sci, 2010, 15(3): 365-370.
- [4] 董玉雷,周磊,李玉龙,等.大鼠激素性股骨头缺血性坏死模型的建立和评价[J].中国医学科学院学报,2015,37(2):152-156.
- [5] 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见[S].2006-09-30.
- [6] 田力,梁晓鹏,田晓晔,等.地塞米松联合脂多糖诱导股骨头坏死模型的构建[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(35):6571-6574.
- [7] 张国桥,易诚青,滕松松,等.早期激素性股骨头缺血性坏死模型的建立[J].现代生物医学进展,2012,12(7):1223-1224.
- [8] 李超,尚希福,李旭,等.提高激素性股骨头缺血性坏死兔模型动物存活率的实验研究[J].安徽医科大学学报,2014,49(12):1726-1729.
- [9] 杨帆,朱振中,李广翼,等.股骨头缺血性坏死病理形态学

研究进展[J].国际骨科学杂志,2014,35(5):313-315.

- [10] Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, et al. Effects of an anti-platelet drug on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits[J]. Rheumatology, 2012, 51(5): 789-793.
- [11] 王葵懋,张长青.股骨头缺血性坏死实验动物模型:分类与实验应用[J].中国组织工程研究,2014,18(36):5879-5884.
- [12] Bekler H, Uygur AM, Gökçe A, et al. The effect of steroid use on the pathogenesis of avascular necrosis of the femoral head: an animal model[J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2007, 41(1): 58-63.
- [13] Wang YH, Zhang CL, Tian SQ, et al. Establishment of rabbit models of corticosteroid-induced avascular necrosis of femoral head[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2011, 15(24): 4419-4422.
- [14] Li RQ, Zhang GP, Li YJ, et al. A method for elevating survival rate of models of steroid-induced necrosis of femoral head[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2013, 17(50): 8729-8734.
- [15] 张琳,汪轩,张成龙,等.激素性股骨头坏死大鼠模型内毒素剂量的优选[J].中成药,2016,38(11):2462-2465.
- [16] 宋才渊,沈兴潮,吕帅杰,等.右归饮治疗激素性股骨头坏死的研究[J].中华中医药杂志,2015,30(4):1204-1207.
- [17] 张志辉,李玲,刘晓倩,等.急性细菌脂多糖暴露对小鼠血糖的影响[J].安徽医科大学学报,2013,48(2):142-145.
- [18] Powell C, Chang C, Gershwin ME. Current concepts on the pathogenesis and natural history of steroid-induced osteonecrosis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2011, 41(1): 102-113.
- [19] Wang W, Liu L, Dang X, et al. The effect of core decompression on local expression of BMP-2, PPAR- α and bone regeneration in the steroid-induced femoral head osteonecrosis[J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2012, 13: 142-150.
- [20] 齐振熙,余航,万甜,等.髓芯减压联合羟基红花黄色素 A 对兔激素性股骨头坏死骨内压的影响[J].中华中医药杂志,2015,30(6):2143-2145.
- [21] 张立岩,孙新,田丹,等.兔早期激素性股骨头缺血性坏死模型建立及其 MRI 与病理特征研究[J].中国修复重建外科杂志,2015,29(10):1240-1243.

(收稿日期:2017-08-11)