

酒精联合激素加速兔早期股骨头坏死的模型建立及病理学研究

张震,魏屹东,汪伟基,叶斯波,卢鸿超,徐慧,郭树章

(新疆军区总医院创伤骨科,新疆乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 检测长期较大剂量摄入酒精联合应用大剂量糖皮质激素能否加速早期股骨头坏死病程的进展,并探讨该方法的有效性。方法 取 6 月龄新西兰大白兔 30 只,体重 2-3 kg,随机分为三组,空白对照组 10 只,实验 1 组(单纯使用糖皮质激素)10 只,实验 2 组(联合使用糖皮质激素及酒精)10 只。实验 1 组于双侧臀肌交替肌肉注射地塞米松磷酸钠注射液 10 ml/kg,每 3 d 1 次,共 10 次;实验 2 组在实验 1 组基础上给予饮用酒灌胃 8 ml/kg,每 3 d 1 次,共 10 次;空白对照组于双侧臀肌交替注射等量生理盐水,正常饮食、饮水,造模期间观察实验动物一般情况,30 d 后观察股骨头病理学检查。结果 空白对照组动物未出现脱毛、食量减小及运动改变;实验 1 组出现轻微脱毛,无跛行,无食量改变;实验 2 组饮食、饮水明显减少,有脱毛及轻微跛行。三组股骨头进行冠状面剖开肉眼观察未见明显差别。病理学观察示,空白对照组骨小梁粗大,骨陷窝内骨细胞形态正常,脂肪细胞较少;实验 1 组骨小梁变薄,空骨陷窝增多,骨细胞核固缩;实验 2 组骨小梁变薄,核固缩的骨细胞及空骨陷窝明显增多。实验 1 组,实验 2 组,空白对照组空骨陷窝率分别为(8.85±0.99)%、(33.20±1.51)%、(51.30±1.87)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 短期、大剂量给予地塞米松成功构建兔早期激素性股骨头坏死模型,同时在给予激素的过程中加用较大剂量酒精能够加速股骨头坏死的病程,可通过病理学检查对模型进行有效性评价。

关键词:激素性股骨头坏死;酒精性股骨头坏死;病理学检查;动物模型;兔

中图分类号:R681.8

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2020.08.022

文章编号:1006-1959(2020)08-0067-03

Alcohol Combined with Hormones Accelerates Early Femoral Head Necrosis Model Establishment and Pathological Study in Rabbits

ZHANG Zhen,WEI Yi-dong,WANG Wei-ji,YE Si-bo,LU Hong-chao,XU Hui,GUO Shu-zhang

(Department of Traumatology and Orthopedics,Xinjiang Military Region General Hospital,Urumqi 830000,Xinjiang,China)

Abstract:Objective To investigate whether long-term large-dose alcohol intake combined with high-dose glucocorticoids can accelerate the progression of early femoral head necrosis and explore the effectiveness of this method.Methods 30 New Zealand white rabbits of 6 months old,weighing 2 to 3 kg,were randomly divided into three groups,there were 10 blank control groups,10 in the experimental group 1 (using glucocorticoids alone),and 10 in the experimental group 2 (using glucocorticoids and alcohol together).The experimental group 1 was alternately intramuscularly injected with 10 ml/kg of dexamethasone sodium phosphate injection into both gluteal muscles,once every 3 d for a total of 10 times;the experimental group 2 was given 8 ml/kg of drinking wine on the basis of the experimental group 1,Once every 3 d,a total of 10 times;the control group was alternately injected with bilateral saline muscles with the same amount of normal saline,normal diet and drinking water,and observed the general conditions of experimental animals during the modeling period,and observed the femoral head pathology after 30 d.Results The animals in the control group showed no hair loss,reduced food intake and exercise changes;the experimental group 1 had slight hair loss,no claudication,and no changes in food intake;the experimental group 2 had significantly reduced diet and drinking water,and had hair loss and slight lameness.The three groups of femoral heads showed no obvious difference by coronal plane dissection.Pathological observation showed that the bone trabecula in the control group was thick,the bone cell morphology was normal in the bone lacuna,and there were fewer fat cells;the bone trabecula in the experimental group 1 was thinner,the empty bone lacuna increased,and the bone cell nucleus was contracted,in the experimental group 2,the trabecular bones became thinner,and the bone cells and empty bone lacunae increased significantly.The rates of empty bone lacunae in the experimental group 1 and experimental group 2 were (8.85±0.99)%,(33.20±1.51)%,and (51.30±1.87)%,respectively,the difference was statistically significant ($P<0.05$).Conclusion Short-term and high-dose administration of dexamethasone successfully constructed a rabbit model of early hormonal femoral head necrosis.At the same time,the addition of larger doses of alcohol during the administration of hormones can accelerate the course of femoral head necrosis.Pathological examination can be effective for the model Sexual evaluation.

Key words: Hormonal femoral head necrosis;Alcoholic femoral head necrosis;Pathological examination;Animal model;Rabbit

股骨头坏死(osteonecrosis of femoral head, ONFH)是临床上骨坏死疾病中较常见的一种,目前认为不同原因破坏了股骨头的血供是发生股骨头坏死的根本原因,其特征是因股骨头血供障碍导致的骨及骨髓细胞坏死、再生,最终导致股骨头塌陷、变形,形成严重的髋关节病变。在造成非创伤性股骨

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号:2016D01C397)

作者简介:张震(1993.2-),男,新疆乌鲁木齐人,硕士,住院医师,主要从事创伤骨科方向的研究

通讯作者:郭树章(1975.11-),男,天津人,博士,主任医师,副教授,主要从事创伤骨科方向的研究

头坏死的病因中,大剂量使用糖皮质激素造成的股骨头坏死占该病种首位^[1]。对于非创伤性股骨头坏死治疗的关键是早期发现、早期诊断、早期干预,及时恢复股骨头血供,阻止或延缓股骨头塌陷。建立理想的非创伤性股骨头坏死模型对该病的早期诊断及治疗有重要意义。人与动物在激素性股骨头坏死发病的病理过程中大致相同,目前常用的造模方法包括单纯激素诱导、激素联合内毒素诱导^[2]、激素联合异体血清诱导^[3]。但是激素联合内毒素或异体血清诱导股骨头坏死虽然能够加快病程进展,但是费用

较为昂贵,同时存在并发症^[3,4]。研究表明^[5-7],激素与酒精均可通过影响脂代谢、新血管的生成造成股骨头内微循环障碍、微血管内血栓形成,导致股骨头坏死的发生。本实验通过联合酒精与激素联合诱导兔早期股骨头坏死模型,以病理学研究对构建的动物模型进行评估,以期研究出一种有效、快速、经济的方法构建早期股骨头坏死动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物 30 只健康年轻的新西兰大耳白兔(6 月龄),体重 2~3 kg,由新疆医科大学动物实验中心提供,所有操作符合实验动物伦理审核要求。标准条件下饲养,每笼 1 只,适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法随机分为三组,每组 10 只,实验 1 组为单纯使用糖皮质激素诱导,实验 2 组为联合使用糖皮质激素及酒精诱导,空白对照组不做特殊处理。

1.2 实验药物及试剂 地塞米松磷酸钠注射液(安徽联谊药业股份有限公司,批号:H34021930,规格:5 mg/支)、北京红星二锅头(52°)、注射用青霉素钠(哈药集团制药总厂,批号:A080700411,规格:8.0×105 U/支)、生理盐水、奥美拉唑肠溶胶囊(悦康药业集团有限公司,批号:H20056577,规格:20 mg/粒)、40%甲醛溶液、3%戊巴比妥钠溶液、梯度酒精、苏木素、伊红、二甲苯、中性树脂封固剂(新疆军区总医院动物实验中心提供)。

1.3 造模及取材

1.3.1 造模方法 实验 1 组动物于双侧臀肌交替肌肉注射地塞米松磷酸钠注射液 10 mg/kg,每 3 d 注射 1 次,共 10 次;实验 2 组于双侧臀肌交替肌肉注射地塞米松磷酸钠注射液 10 mg/kg,每 3 d 注射 1 次,共 10 次,同时以饮用酒(北京红星二锅头)8 ml/kg 缓慢灌胃,每 3 天 1 次,共 10 次^[8];空白对照组双侧臀肌交替注射生理盐水(10 mg/kg);所有动物双侧臀肌交替注射青霉素钠 5 万 U/kg,2 次/周,共 4 周,预防感染。所有动物给予口服奥美拉唑肠溶胶囊 20 mg/d 预防大量饮酒导致胃黏膜损伤。4 周后处死所有动物,取双侧股骨头做病理学检查。

1.3.2 取材方法 耳缘静脉注入空气法处死,取出双侧股骨头,以 4%甲醛溶液固定 3 d,利用 5%硝酸脱

钙,每日更换脱钙液至大头针能够无阻力插入骨组织,终止脱钙,石蜡包埋,切片,HE 染色。

1.4 观察指标

1.4.1 一般情况 给药后三组动物食量、脱毛情况、体重及步态变化。

1.4.2 死亡观察现象 记录死亡时间,并立即解剖分析死因,统计各组死亡数量。

1.4.3 病理组织学检查 光镜下观察组织学切片,骨细胞坏死病理学改变及计数空骨陷窝率,在放大倍数为 400 倍时,任选 5 个视野,计数空骨陷窝率。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计数资料以($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 造模期间,实验 1 组动物于第 1 周出现食量减少,第 2 周出现活动神志萎靡、脱毛情况,第 4 周出现食量减少,异常步态;实验 2 组动物于第 3 天出现神志萎靡,食量减少症状,1 周后出现活动减少,脱毛情况,其中 1 只动物死亡,取其双侧股骨头进行固定,切片,其余动物第 3 周出现食量明显减少,体重减轻,步态异常,第 4 周出现跛行;空白对照组未出现明显异常。

2.2 死亡观察现象 实验 2 组中第 3 天死亡的动物口咽处见较多分泌物,考虑与呕吐致呼吸道阻塞与大量饮酒刺激有关,解剖见气管内较多异常分泌物,含食物残渣,胃内有残余食物,胃壁广泛充血、水肿,可见大面积溃疡形成,考虑与大量酒精刺激有关。

2.3 病理组织学检查 空白对照组毛细血管网丰富,股骨头内骨小梁粗大,骨陷窝内骨细胞形态正常,骨髓腔内脂肪细胞正常,红细胞丰富;实验 2 组毛细血管网稀疏,股骨头内骨小梁变细,部分断裂,空骨陷窝明显增多,可见骨细胞核固缩,骨髓腔内脂肪细胞增多,增大;实验 1 组介于空白对照组与实验 2 组间。实验 1 组,实验 2 组,空白对照组空骨陷窝率分别为(8.85±0.99)%、(33.20±1.51)%、(51.30±1.87)%,三组比较,差异有统计学意义($t=3.458、6.230、6.633, P < 0.05$),见图 1、图 2。



空白对照组

实验 1 组

实验 2 组

图 1 三组股骨头负重区病理表现(HE×100)

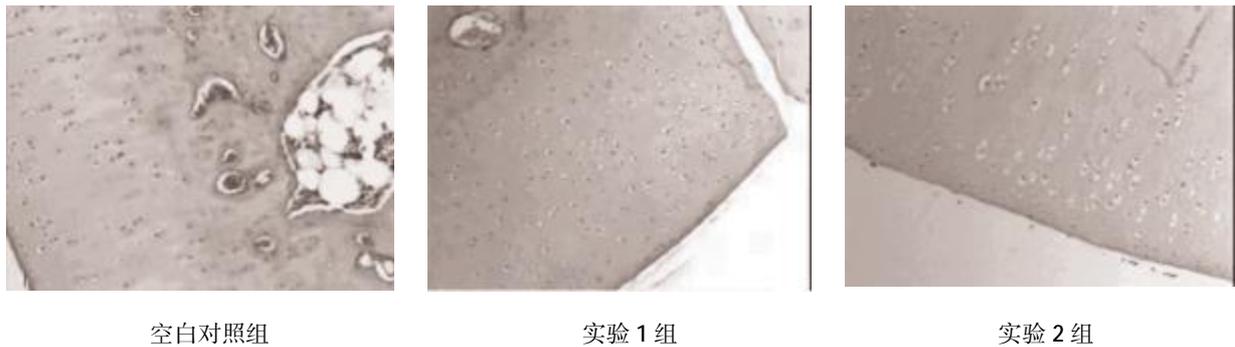


图 2 三组股骨头负重区病理表现(HE×400)

3 讨论

目前快速建立早期股骨头坏死动物模型的方法包括激素联合内毒素诱导、异体血清诱导。但是内毒素或异体血清虽然能够诱导股骨头坏死,加快病程进展,但是费用较为昂贵,同时存在并发症。异体血清联合激素诱导能够产生Ⅲ型过敏反应,诱导动脉管腔变窄,减小血流,进而导致骨坏死,但是有可能引起过度免疫反应等因素导致动物死亡^[6]。常用的内毒素是一种强烈的炎性因子,作用于机体后可能头坏死的发病机制相似,均为外界干预后产生脂代谢障碍导致股骨头内微血管内血栓形成,进而破坏股会导致内毒素血症,大大增加动物的死亡率^[7],如内毒素剂量过低,无法有效形成高血液黏稠度环境,而剂量过高,则有可能造成内毒素血症,增加动物死亡率^[8];研究表明酒精性股骨头坏死的发病机制与激素性股骨头血运,导致股骨头坏死,这与人发病原因相同。

组织病理学检查是诊断骨坏死的金标准,激素性股骨头坏死的主要病理学改变是骨陷窝中骨细胞消失或变性坏死。本研究中实验 1、2 组骨小梁变细、稀疏,结构紊乱,脂肪细胞明显增多,空骨陷窝率明显增加,且高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明实验 1、2 组动物模型符合股骨头缺血性坏死的早期病理特征。

本研究通过联合应用糖皮质激素及饮用酒制作长期应用糖皮质激素及酗酒状态的模型,充分模拟人股骨头坏死的病因学,内毒素或异体血清虽然可以加速诱导股骨头坏死,但不能模拟人股骨头坏死的病因,同时,使用内毒素或异体血清可能会导致相关实验室检查指标异常,造成实验误差,酒精联合糖皮质激素诱导股骨头坏死,可有效加速股骨头坏死进展,缩短造模时间,且经济、实用、方便、稳定可靠、重复性较好、可成功诱导兔早期激素性股骨头缺血坏死模型,致死率低。不足在于大量酒精灌胃可能

致兔急性死亡,应注意予以保护胃黏膜治疗,降低死亡率;四足动物股骨头负重方式与人类不同,很难模拟人类股骨头缺血坏死的全部病理过程,宜选择 2 足动物,其股骨头负重方式与人体生物力学相似^[9]。

综上所述,采用大量酒精联合大量地塞米松可成功构建兔早期激素性股骨头坏死模型,并可以加速其病情进展。

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]董维,郭杨,马勇,等.甲强龙联合脂多糖诱导兔股骨头坏死模型的建立[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(4):402-405.
- [3]曹良权,杜斌,孙光权,等.不同剂量糖皮质激素联合马血清构建激素诱导型股骨头缺血性坏死兔模型[J].中国组织工程研究,2017,21(8):1229-1235.
- [4]李超,尚希福,李旭,等.提高激素性股骨头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.
- [5]陈雁飞,吴吉荣.糖皮质激素致股骨头坏死的病理生理机制研究进展[J].解放军药科学报,2017,33(6):566-569,587.
- [6]陈亦轩,朱道宇,殷俊辉,等.酒精性股骨头坏死研究进展[J].国际骨科学杂志,2018,39(1):28-32.
- [7]席立成,李宏宇.酒精对股骨头局部微环境影响的机制研究进展[J].中国组织工程研究,2017,21(7):1137-1142.
- [8]Wang YH,Zhang CL,Tian SQ,et al.Establishment of steroid-induced necrosis of femoral head [J].Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research,2013,17(50):8729-8734.
- [9]赵道洲,李兴国,代长泉,等.兔激素性股骨头坏死造模中死亡因素与对策[J].影像研究与医学应用,2017,1(18):149-151.
- [10]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.
- [11]曲春涛.构建双足类大型鸟类鸬鹚股骨头坏死模型[J].中国组织工程研究,2016,20(5):611-615.

收稿日期:2020-02-03;修回日期:2020-02-10

编辑/肖婷婷