

激素性股骨头缺血坏死发病机制的实验研究

李毅 同志超 陈君长 王坤正

(西安交通大学第二临床医院骨科, 陕西 西安 710004)

【摘要】 目的 探讨股骨头缺血坏死的发病机制,以冀正确指导临床。方法 24 只日本大耳白兔随机分为模型组和对照组。给模型组动物大剂量肌注醋酸泼尼松龙(8 mg/kg)8 周,造成股骨头缺血坏死模型。造模开始后第 4 周、8 周、12 周两组动物各取 2 只进行光镜和扫描电镜观察,并在两组动物中各取 4 只测定晨空腹血中一氧化氮、组织型纤溶酶原激活物、纤溶酶原激活物抑制物的含量。结果 与对照组相比,模型组股骨头骨质疏松,光镜下空骨陷窝数增多,脂肪细胞数增多,扫描电镜下骨小梁断裂塌陷,骨基质表面胶原纤维松解、断裂。模型组动物与对照组相比血浆中一氧化氮、组织型纤溶酶原激活物含量下降($P < 0.01$),纤溶酶原激活物抑制物的含量升高($P < 0.01$)。结论 激素性股骨头缺血坏死可能与一氧化氮含量及纤溶系统的活性下降有关。

【关键词】 股骨头坏死; 病理过程; 一氧化氮; 纤溶酶原激活物,组织型; 纤溶酶原激活物抑制物

An experimental study of pathogenesis of steroid induced avascular necrosis of femoral head LI Yi, TONG Zhichao, CHEN Junchang, et al. Second Hospital of Xi'an Jiaotong University (Shanxi Xi'an, 710004, China)

【Abstract】 Objective To explore the pathogenesis of avascular necrosis of femoral head (ANFH) in order to search for an effective method for clinical treatment **Methods** 24 rabbits were divided into two groups of the experimental models and controls. ANFH models were produced by intramuscular injection of large dosage of steroid to rabbits in 8 weeks period. From the 4th, 8th, 12th week after production of models, 2 rabbits of model group and 2 rabbits of control group were sacrificed to observe the structure of femoral head. The contents of nitric oxide (NO), tissue type plasminogen activator(tPA), plasminogen activator inhibitor (PAI) in plasma of the 4 rabbits of the tow groups were determined at the same time. **Results** Compared with control group, the rabbits of model group exhibited many changes such as osteoporosis of femoral head, the presence of more bone lacuna and fat cell, the rarely seen and broken thinner trabeculae. Compared with control group, the contents of NO and tPA in plasma of the model rabbits decreased obviously, but the contents of the PAI increased obviously. **Conclusion** The steroid induced ANFH might be related to the lower level of NO and the descent of fibrinolytic activity.

【Key words】 Femur head necrosis; Pathologic processes; Nitric oxide; Plasminogen activator, tissue type(tPA); Plasminogen activator inhibitor (PAI)

目前关于激素性股骨头缺血坏死(ANFH)确切的发病机制尚未完全明了,本实验旨在探讨血管功能障碍在激素性股骨头缺血坏死发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 造模及分组 取6个月龄日本大耳白兔24只,

雌雄不限,体重2.5 kg ± 0.25 kg,随机分为模型组与对照组各12只。模型组每周2次肌注醋酸泼尼松龙^[1](浙江医药股份有限公司仙居制药厂,批号0006060),每次8 mg/kg,对照组肌注生理盐水每次0.32 mg/kg(盐重量),连续8周共16次。为预防感染,每只动物每周2次肌注青霉素钠5 × 10⁴U。

1.2 观察指标

1.2.1 一般形态学观察 动物的体重、精神、毛发

基金项目:陕西省中医管理局科研课题(编号:99017)

光泽度、大小便、反应度等情况, 及股骨头的外观、重量、硬度。

1.2.2 组织病理学观察 造模开始 4 周、8 周、12 周后分别在两组动物各取 2 只, 将股骨头从冠状面正中劈开, 一半常规石蜡切片, HE 染色, 光镜观察; 另一半, 用超声波清洗机冲洗, 2% 戊二醛固定 48 h, 0.1 M 二甲胍酸钠缓冲液冲洗, 逐级乙醇脱水, 醋酸异戊酯保存 12 h, 二氧化碳临界点干燥, 真空喷金, 扫描电子显微镜下观察骨小梁、骨基质排列。

1.2.3 血浆一氧化氮(NO)含量测定 两组分别于造模开始 4 周、8 周、12 周后各取 4 只动物, 抽取晨空腹耳缘静脉血 1 ml, 肝素抗凝, 2000 rpm 离心 5 min, 取血浆置于 -25 °C 冰箱内保存备用。采用硝酸盐还原酶还原法, 通过测定血浆的 NO_3^- 浓度, 间接反映 NO 的含量。

1.2.4 血浆组织型纤溶酶原激活物(tPA)和纤溶酶原激活物抑制物(PAI)活性测定 造模 4 周、8 周、12 周时两组分别取 4 只动物, 耳缘静脉取血, 取体积百分数 2% EDTA-Na 抗凝血 2.5 ml, 3000 rpm 离心 10 min, 取血浆 -20 °C 保存, 以备测 PAI 活性。取部分血浆等体积 1 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH=3.9)酸化后 -20 °C 保存, 以备测定 tPA。用发色底物法测定 PAI 和 tPA 活性。tPA 活性参照 WHO 标准品(861670), 以国际单位 IU 表示。PAI 活性单位定义为: 在 25 °C, 20 min 内抑制 1.0 国际单位 tPA 的 PAI 的酶量, 即 1.0 AU(Arb: Unit)。

1.2.5 统计学处理方法 用 *t* 检验方法进行统计学处理。

2 实验结果

2.1 一般形态观察 模型组动物造模 1 周后体重

表 1 血浆 NO_3^- 、tPA、PAI 测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	NO_3^- ($\mu\text{mol/l}$)			tPA (IU/ml)			PAI (AU/ml)		
	4周	8周	12周	4周	8周	12周	4周	8周	12周
模型组	21.08±2.12	20.87±1.62*	18.07±1.76**	0.32±0.04	0.28±0.02**	0.24±0.03**	0.78±0.09*	0.82±0.02**	0.87±0.05**
对照组	24.21±1.67	24.07±1.78	23.75±1.76	0.49±0.02	0.54±0.07	0.49±0.09	0.66±0.05	0.67±0.04	0.67±0.04

注: 模型组与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

3.1 ANFH 与 NO 的关系 近来研究表明血管功能障碍是导致 ANFH 的重要因素, 而激素可引起一系列的血管和血流动力学改变。NO 是一种重要的体内生物信使分子, 其生成受一氧化氮合成酶(NOS)的调控。NO 能松弛血管平滑肌, 舒张血管, 抑制血小板凝集。正常机体由于受到搏动性血流的不断刺激, 血管内皮细胞持续释放 NO, 使血管系统

下降, 食欲亢进, 逐渐出现精神差、皮毛失去光泽、皮下脂肪减少, 至 8 周时更加明显, 而对照组未见异常变化。两组动物股骨头外观、重量无明显差别, 但模型组动物的股骨头骨质酥脆, 易于凿取。

2.2 组织病理学观察

2.2.1 光镜观察 对照组动物股骨头骨小梁及骨细胞形态结构正常。模型组动物股骨头造模 4 周时骨小梁变细稀疏, 髓腔内造血细胞减少和肥大脂肪细胞增多, 骨细胞部分核深染; 8 周时, 股骨头软骨下区骨小梁萎缩, 较多的骨细胞核固缩、染色深, 骨髓内有大量脂肪细胞, 部分骨陷窝内骨细胞消失, 空骨陷窝数增多; 12 周时, 空骨陷窝数明显增多, 髓内脂肪细胞增大并融合成片。

2.2.2 扫描电镜观察 对照组动物股骨头骨小梁致密, 骨细胞结构正常。模型组动物股骨头在造模 4 周时骨细胞形态无明显变化; 8 周时, 骨基质表面胶原纤维散乱, 广泛存在纤维松解, 骨小梁表面的成骨细胞极少, 骨细胞肿胀或萎缩, 失去正常的形态结构; 12 周时骨小梁断裂塌陷, 骨基质表面胶原纤维松解、断裂, 电镜视野下死亡骨细胞已占 40% 左右。由组织病理学观察结果可知本实验模型的复制是成功的。

2.3 血浆 NO 、tPA、PAI 测定结果 由表 1 可见:

①模型组造模 4 周时血浆 NO_3^- 含量降低, 第 8 周、12 周明显下降, 显著低于对照组($P < 0.01$), 说明模型组血浆 NO 含量下降; ②造模 8 周时模型组血浆 tPA 活性下降, 至 12 周时下降更为明显, 显著低于对照组($P < 0.01$); ③造模 4 周后模型组血浆 PAI 活性比对照组升高($P < 0.05$), 至 8 周、12 周时升高更明显($P < 0.01$)。

维持一种松弛状态, 保证组织的正常灌注。本实验表明在用激素后不同时间(4、8、12 周)均存在着血浆 NO_3^- 含量明显降低, 即血浆 NO 含量降低, 提示 NO 生成减少, 可能与 ANFH 的发病密切相关。其机制可能如下: ①激素对血管内皮细胞产生损害性作用^[2], 破坏 NO 生成场所; ②激素可以抑制 NOS 活性, 使 NO 合成减少^[3]; ③激素还可引起脂质代谢紊乱, 血脂增高, 而高血脂症内皮细胞合成 NO 能力下

降。因此可以认为激素性 ANFH 的重要发病因素之一
一是 NO 含量下降。

3.2 ANFH 与前凝血状态、纤溶系统活性的关系

近来研究证实,激素能影响纤溶和凝血系统,即使用激素本身能引起血液性状发生改变。早在 1951 年 Cosgriff 首先证明了激素能引起系统的高凝血状态,他认为凝血异常是激素引起骨坏死的一个潜在因素。Kisker 等^[4]研究表明激素通过抑制网状内皮系统,降低其纤溶蛋白溶解活性引起血浆的高凝血及低纤溶状态。血栓前状态(Prethrombotic State, PTS)的存在已成为激素导致 ANFH 的一个不可忽视的因素。PTS 是多种因素引起的止血、凝血和抗凝系统失调的一种病理过程,具有易导致血栓形成的多种血液学变化。分子标记物单克隆抗体的研制成功,使测定某些血栓前状态标记物成为现实。如反映血小板变化的有血栓素(TXB₂)、血小板 α 颗粒膜蛋白(GMP-140);内皮细胞损伤的标记物有 6 酮前列腺素-F_{1a}(6-Ket-PGF_{1a})、血栓调节蛋白(TM);纤溶系统活性的指标有组织型纤溶酶原激活物(t-PA)、纤溶酶原激活物抑制物(PAI)等。其中 GMP-140T、PAI、t-PA 均为特异性和敏感性较高的生化指标^[5]。血液中纤溶功能的表达主要取决于 t-PA 和 PAI 之间的相互作用。纤溶是凝血的继续,其核物质是纤溶蛋白酶原(PLG)经纤溶酶原激活物激活成为有纤溶活性的纤溶酶(PL),PL 的活性水平对血

栓的发展或清除有重要意义。t-PA 是纤溶系统主要的生理激活剂,由血管内皮细胞合成贮存并释放入血,它能使 PLG 转化为 PL 而降解和消除纤维蛋白块。PAI 是 t-PA 的抑制物,主要分为血管内皮细胞型(PAF-1)和胎盘型(PAF-2)。PAF-1 主要由血管内皮细胞合成且释放入血,少量 PAF-1 来自血小板。血浆中的 PAI 主要为 PAF-1,能快速地以 1:1 分子比例与 t-PA 形成复合物而使其失活,故 t-PA 降低、PAI 增高,可致 PTS。临床及实验研究证实,ANFH 患者存在 t-PA 活性下降和 PAI 活性升高。本实验结果表明激素诱导的家兔 ANFH 模型在 4 周、8 周、12 周存在着 t-PA 的活性降低和 PAI 的活性升高,即纤溶活性下降这一事实。综上所述,激素性 ANFH 与血管功能障碍密切相关,血管内皮受损,血液高凝低纤溶,可能是激素性 ANFH 的病理机制之一。

参考文献

- 1 贺西京,毛履真,王坤正,等.肾上腺皮质激素引起股骨头缺血坏死的机制实验研究.中华骨科杂志,1992,12(6):440-443.
- 2 Nishimura T, Matsumoto T, Nishino M, et al. Histopathologic study of veins in steroid treated rabbits. Clin Orthop, 1997, 334: 37-42.
- 3 Di Rosa M, Radomski, Carnaccio R, et al. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 172(3): 1246-1252.
- 4 Kisker CT, Robillard JE, Bohlkon DP. Glucocorticoid stimulation of blood coagulation factor activities in the fetal lamb. J Lab Clin Med, 1983, 101(4): 569-575.
- 5 王淑娟.关于选择血栓前状态实验诊断指标和建议.中华医学检验杂志,1998,21(5):305-307.

(收稿:2002-04-17 编辑:房世源)

《中国骨伤》第五届编委会名单

主编: 尚天裕

常务副主编: 胡荫奇

副主编: (按首字汉语拼音字母顺序为序)

董福慧 杜宁 冯天有 金鸿宾 孟和 沈志祥 孙树椿

编委委员: (按首字汉语拼音字母顺序为序)

毕大卫	陈宝兴	陈渭良	骧华	董福慧	董清平	杜宁	樊粤光	房世源
冯天有	葛尊信	顾云伍	郭效东	郭艳幸	何伟	胡兴山	胡荫奇	蒋位庄
金鸿宾	孔繁锦	黎君若	李德达	李国衡	李盛华	李同生	李为农	梁克玉
刘柏龄	刘定汉	刘金文	刘兴炎	刘仲前	马真胜	孟和	邱勇	沈冯君
沈霖	沈志祥	施杞	石关桐	石印玉	苏玉新	孙材江	孙树椿	谭远超
涂丰	王和鸣	王坤正	王胜利	王志彬	韦贵康	卫小春	吴林生	肖鲁伟
杨小平	姚共和	姚树源	余庆阳	袁浩	张安祯	张春才	张德桂	张连仁
张英泽	赵建宁	赵文海	赵易	郑忠东	钟广玲	周福贻	周沛	周卫
朱惠芳	朱少廷	朱云龙	诸方受	邹季				