

• 实验研究 •

激素诱发骨坏死的免疫组织化学研究*

杨万石 王坤正** 王奎生 郭瑞京 孙 彤 王新同 朱 伟 王大民
北京煤碳总医院 (100028)

〔摘要〕 目的 探讨激素治疗变态反应疾病过程中诱发骨坏死的发病机制。方法 白兔 40 只, 静脉注射马血清 (10ml/kg) 2 次 (2 次间隔 3 周), 建立变态反应模型。然后分为 2 组, 第 1 组不予治疗, 第 2 组在第 2 次注射马血清后 2 周, 腹腔内注射强的松龙 (45mg/kg) 连续 3 天, 治疗“血清病” (III 型变态反应)。分别在 1、2、3、5 周时解剖取出双侧股骨头标本, 采用 ABC 直接法显示免疫复合物沉积的部位及免疫反应强度, 光镜观察。结果 强阳性的着色均发生在用激素治疗变态反应病组。不同的个体, 免疫组织化学染色阳性反应愈强, 骨组织细胞发生变性坏死的程度、范围愈大, 骨坏死的发病率愈高。结论 激素在治疗变态反应疾病过程中, 加重血循环损害, 抑制正常骨化, 最终导致骨坏死发生。

〔关键词〕 糖皮质激素 骨坏死 变态反应 免疫组织化学

Immunohistochemical Study on Steroid- Induced Osteonecrosis Yang Wanshi, Wang Kunzheng, Wang Kuisheng, et al. Beijing General Hospital of Mineral Industrial Ministry (100028)

〔Abstract〕 **Objective** To inquire into the pathogenesis of the osteonecrosis induced in the therapeutic process of allergic disease with steroid. **Methods** The allergic disease model of rabbit was established by intravenous injection of horse serum (10ml/kg) twice, with an interval of 3 weeks. Forty modeled rabbits were divided into two groups: the first group without treatment; and the second group, 2 weeks after the second injection of serum was injected intraperitoneally with prednisolone (45mg/kg) for 3 days in order to treat the “serum disease” (allergy type III). The bilateral specimens of femoral head were taken out at the first, second, third and fifth week, respectively, and the direct ABC method for immunohistochemistry was applied for observing the deposition site and intensity of the immune complex.

Results The strong positive reaction was found in the steroid- treated group only. In different animals, the more intensive the immunohistochemical reaction was, the more severe and more extensive the degeneration and necrosis of bone and its cells were, and the more higher the occurrence of osteonecrosis was.

Conclusion Prednisolone in the therapeutic process of allergic disease can damage the blood circulation more severely, inhibit the normal ossification and finally, induce the osteonecrosis.

〔Key words〕 Glucocorticoid Osteonecrosis Allergic reaction Immunohistochemistry

由糖皮质激素类药物 (以下简称为激素)

治疗过程联系起来。

诱发产生的骨坏死, 特别是经常发生在髋关节的股骨头坏死, 常常是在应用激素作为免疫抑制剂治疗原发疾病 (如: 变态反应疾病, 胶原性疾病, 血液病, 器官移植) 的过程发生的^[1,2]。因此, 对激素应用诱发骨坏死的发病机制的研究, 应将原发疾病及激素在临床上的

材料和方法

1. 变态反应病动物模型的建立及分组处理 选用成年 (24 周龄以上) 健康日本白色家兔 50 只, 雌雄不限, 体重 2.5~ 2.8kg (平均 2.65kg), 随机分组。第 1 组, 单纯变态反应病组, 参照 Rich 等^[3]的方法, 将马血清

* 本实验由陕西省自然科学基金资助
** 西安医科大学第二附属医院

(郑州中化生物技术公司) 10ml/kg, 经耳缘静脉注射致敏, 间隔 3 周, 以相同方法、剂量, 再次静脉注射, 诱发产生“III 型变态反应”, 即“血清病”。第 2 组, 激素治疗变态反应病组, 与第 1 组相同的方法、剂量、时间、间隔, 经耳缘静脉注射马血清 2 次, 在第 2 次注射马血清后 2 周, 将强的松龙 (Upjohn) 45mg/kg 每天 1 次腹腔内注射, 连续 3 天, 治疗变态反应病。两个实验组每组各 20 只, 每个实验组各自设立 5 只作为对照检查, 每组对照与实验动物处理方法相同, 但注射不含药物成份的等量生理盐水。注射强的松龙的动物, 每天每只腹腔内注射青霉素 20 万单位, 庆大霉素 4 万单位, 预防感染。所有动物相同方式及环境内饲养。每个组在以上处理完成后, 分别在满 1、2、3、5 周时进行免疫组织化学观察。

2. 免疫组织化学标本制备 采用常规 ABC 法显示免疫复合物, 试剂盒为 Vector 产品。具体步骤: (1) 剖取双侧股骨头, 10% 中性福尔马林固定 72 小时, 10% EDTA 脱钙 (中性), 常规石蜡切片 (7~ 8 μ m)。 (2) 切片常规脱蜡、水化。 (3) 0.01% 胰酶消化 30 分钟, 温度 37 $^{\circ}$ C。 (4) 0.3% H₂O₂ 甲醇室温下封闭 30 分钟。 (5) 生物素化羊抗兔 IgG, 工作浓度 1: 100, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 40 分钟; 阴性技术对照以 PBS 代替生物素化羊抗兔 IgG。 (6) 卵白素——生物素过氧化物酶复合物, 工作浓度 1: 100, 室温下孵育 40 分钟。 (7) DAB 显色。 (8) 苏木素复染细胞核。 (9) 光镜观察。

结 果

1. 免疫组织化学反应结果评价标准 对免疫复合物沉积部位及免疫反应强度的观察, 以在细胞膜、细胞质、以及基质中出现黄棕色反应产物为阳性, 并据光镜所见, 将染色强度分为 4 级: $\#$, 骨组织 (包括骨小梁、骨髓、骨内微血管) 内可见大量深棕色颗粒; $\#$, 骨组织内可见较深棕黄色颗粒; $+$, 骨组织内可见淡黄色颗粒, 深于背景色; $-$, 骨组织内无

棕黄色颗粒, 或颜色均匀一致与背景无区别。阴性技术对照标本以 PBS 替代生物素化羊抗兔 IgG, 标本上均无黄棕色产物。

2. 各组动物股骨头免疫组织化学反应观察结果 从表 1 可以看出: 对照组 10 只中仅 1 只出现弱阳性反应; 第 1 组, 即单纯变态反应病组, 20 只中无强阳性反应者, 有 3 只中等阳性反应和 1 只阳性反应; 第 2 组, 即变态反应病加激素治疗组, 20 只中 7 只呈强阳性反应, 1 只中等阳性, 1 只弱阳性 (均发生在第 2 周所取标本)。从这些结果可以看出, 第 1 组虽有部分动物出现较弱阳性反应, 而强阳性反应都出现在第 2 组。第 2 组强阳性着色的股骨头标本中, 均发生了骨组织细胞的坏死, 着色的部位主要在已发生坏死的骨小梁、骨髓内网状结构、新生的小血管壁周围 (图 1、2)。以第 2、3 周所取的标本为显著。

表 1 免疫组织化学染色结果

分组	例数	染色强度			
		$\#$	$\#$	$+$	$-$
对照组	10	0	0	1	9
第 1 组	20	0	3	1	16
第 2 组	20	7	1	1	11
合计	50	7	4	3	36

3. 股骨头坏死的发生率与免疫反应染色强度密切相关 从表 2 可以看出: 对照组动物均未发生股骨头坏死; 第 1 组仅出现 2 只股骨头坏死; 第 2 组则有 7 只动物发生股骨头坏死。从对免疫组织化学染色结果及对组织结构的观察显示: 机体的免疫反应强度愈高, 即免疫组织化学阳性反应愈强, 股骨头发生变性坏死的程度、范围愈大。(图 1, 2 见加页)

表 2 骨坏死的发生率

分组	例数	骨坏死例数	骨坏死率
对照组	10	0	0%
第 1 组	20	2	10%
第 2 组	20	7	35%
合计	50	9	18%

讨 论

1. 机体的免疫反应强度与股骨坏死的发

生与否密切相关 从实验结果可以看出单纯变态反应病组和激素治疗变态反应病组股骨头的坏死均发生在第 2、3 周的标本中, 这与机体产生的免疫反应时间相一致, 并与临床上观察到的发生症状时间基本吻合。不同的个体之间免疫反应程度及调控机能存在着差异, 过度的免疫反应即可导致组织损伤, 发生变态反应病^[4]。从实验中也可观察到, 单纯变态反应病组 3 例中等强度染色的组织标本中有 2 例发生股骨头坏死, 与坏死的发生率趋向一致。临床上用激素治疗的时间应在大量免疫复合物形成, 并开始对机体产生强烈损伤之际, 由于激素的免疫抑制作用, 使得免疫复合物清除受阻, 广泛沉积在股骨头内这样一个骨性密闭的空间中, 因而在实验中可观察到数量较多的强阳性着色反应。当激素的免疫抑制作用由于机体的代谢而消失后, 免疫复合物在其所沉积的部位固定并激活补体, 产生生物活性介质而致组织损伤。股骨头坏死发生率随之增加。

2. 激素治疗变态反应疾病的过程中诱发股骨坏死发病机制的探讨 (1) 激素治疗变态反应疾病过程中导致骨组织结构内微血管结构损害。激素作为一种免疫抑制剂用于治疗变态反应疾病, 有抑制免疫功能的作用^[5,6], 尤其是吞噬细胞(大单核细胞、中性粒细胞)功能被抑制, 使得免疫复合物清除受阻, 大量沉积在微血管基底膜, 特别是基底膜暴露相对较广, 血液流速较慢的小静脉。之后随着激素被机体代谢其免疫抑制作用消失, 在免疫复合物沉积的部位产生由免疫复合物介导, 激活补体, 产生生物活性物质, 引起大量白细胞浸润, 受损伤的毛细血管内皮细胞增生肿胀, 弹性胶原纤维损伤后增生, 导致血管壁增厚, 管腔狭窄, 循环血流量下降, 组织细胞由于缺血性缺氧而发生病变。通过对由于激素治疗变态反应疾病、自身免疫性疾病等引起股骨头坏死的病例进行病理组织学的研究中也发现, 进出股骨头的动、静脉受损伤, 管壁增厚, 管腔狭窄^[7]。但动脉狭窄对股骨头内血流量的影响远不如静脉狭窄的影响大, 这就造成了股

骨头内血流瘀滞, 缺血性缺氧, 酸性代谢产物瘀积, 在股骨头这样一个骨性密闭的腔室内, 必然导致骨内压升高, 其结果是股骨头内缺血性缺氧加重, 导致骨细胞发生变性坏死。(2) 激素在治疗变态反应疾病过程中反复应用, 加重了血循环的损伤, 抑制正常骨化, 最终导致骨坏死发生。实验中观察到单纯变态反应可使骨组织发生溶骨性骨坏死和小动脉炎, 这一病理变化结果与机体的免疫状态、自身的免疫调节机能密切相关。通过免疫组织化学的实验结果亦可看出, 机体的免疫反应强度愈高, 由体液免疫和细胞免疫所造成的循环系统的损害愈重, 骨组织细胞的坏死性病变反应愈重。许多类似的研究也证实了这一点^[4,8]。应用激素治疗常常是在机体发病的高峰, 即机体内已形成大量的免疫复合物, 已开始进行排异反应之际。应用激素治疗抑制了免疫反应, 免疫复合物清除受阻, 广泛沉积在机体组织器官内。通过免疫组织化染色可观察到, 免疫复合物广泛沉积在骨小梁、髓内网状结构及小血管壁周(图 1)。当激素的免疫抑制作用消失后, 又可再次在免疫复合物沉积的部位发生排异免疫反应, 对组织结构造成损伤, 临床又再次应用激素治疗, 在反复的治疗过程中加重组织细胞的损伤, 并且, 由于激素的应用导致血液粘稠度增加, 循环阻力增加, 血流缓慢^[9], 组织细胞缺血性缺氧, 抑制毛细血管再生及正常的骨化过程, 阻碍了对已变性坏死骨组织的修复重建, 最终, 由于骨组织坏死范围的逐渐扩大, 难以通过正常生理过程修复, 导致股骨头发生不可逆性坏死。

参考文献

1. Nishiyama A, Okinaga A. Osteonecrosis after renal transplantation in children. Clin Orthop, 1993, (295): 168
2. Tonniss D. Ischemic necrosis as a complication of treatment of C. D. H. Acta Orthop Belg, 1990, 56 (1): 195
3. 大园 健二, 松井 稔, 中村 宣雄. 宓聰の骨塊死. 整形. 灾害外科, 1993, 36 (1): 29
4. 奥平 博一. 免疫麻答とアレルギー-炎症 [アレルギー-麻答とその制御]. 日本内科学会誌, 1994, 82 (10): 14

5. Lausten GS, Egfiord M, Olgaard K. Metabolism of prednisone in kidney transplanted patients with necrosis of the femoral head. *Pharmacol Toxicol*, 1993, 72 (2): 78
6. Murphy KG, Greenberg ML. Osteonecrosis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 1990, 65 (8): 1717
7. 居石 克夫, 平野 薰, 筒井 秀树, 等. 特 性大腿骨

- 头壊死症の临床病理学研究. 整形. 灾害外科, 1993, 36 (1): 3
8. 世古 义观. 血管壁における细胞性免疫反麻と动脉硬化病变の形成. *最新医学*, 1994, 49 (5): 58
9. 王坤正, 毛履真, 胡长根, 等. 激素性股骨头缺血坏死发病机制的实验研究. *中华外科杂志*, 1994, 32 (9): 515
(收稿: 1998-03-30, 修回: 1998-10-14)

硒对家兔实验性骨折愈合过程影响的病理研究

卫建平 芦汉生 杜爱平 薛华新

山西医科大学第二临床医院 (太原 030001)

〔摘要〕 目的 研究硒对骨折愈合的影响。方法 应用 40 只家兔做成双侧肱骨中段实验性骨折, 随机分为 2 组: 对照组饲常规饲料; 实验组每日加饲微量元素硒 0.6mg。术后 2、3、4、5 周取材, 进行骨痂横截面积测量, 光镜及电镜观察。结果 实验组 2~4 周骨痂内的软骨细胞、成骨细胞等及基质的变化较对照组出现早, 且功能活跃。结论 饲料中加硒可促进兔骨折愈合, 这可能与硒刺激软骨细胞的蛋白合成有关。

〔关键词〕 骨折愈合 微量元素 硒 软骨细胞

Pathological Study on the Effect of Selenium in the Healing Process of Experimental Fracture in Rabbits

Wei Jianping, Lu Hansheng, Du Aiping, et al. The Second Teaching Hospital of Shanxi Medical University (Taiyuan 030001)

〔Abstract〕 Objective To study the effect of trace element, selenium (Se) in the healing process of fracture. Methods Forty rabbits had been made experimental fractures at the middle shaft of the humerus bilaterally and divided into two groups randomly: the control group, fed with common forage; the experimental group, fed with Se (0.6mg/day) additionally. The specimens were taken out 2, 3, 4, and 5 weeks after operation, cross sections of the calluses were made to measure the area of the callus and to observe the structures with light and electron microscope. Results At 2 and 4 weeks, the appearance of chondrocyte and osteoblast and the changes of matrix in the callus of experimental group were much more earlier and the function of chondrocyte and osteoblast was more active. Conclusion Se added in forage could stimulate the synthesis of protein in chondrocyte to promote the healing of rabbit's fracture.

〔Key words〕 Fracture union Trace element Selenium Chondrocyte

微量元素在人体中的作用越来越被人们重视, 国内外许多学者注意到骨折后机体微量元素含量的变化^[1,2], 并对锌、铜、锰等微量元素与骨折的关系进行了研究, 但很少有人研究硒与骨折的关系。本实验旨在通过兔骨折后加硒饲养过程中的病理观察, 探索硒元素在骨折愈合中的作用, 为临床预防和治疗骨折提供参考资料。

材料及方法

1. 骨折模型与实验分组 健康雄性家兔 40 只, 体重 2.5~3kg, 无菌条件下在双侧肱

骨中段以双片锯锯断成 3mm 宽缺损的骨折模型。术后随机分成两组: 实验组 20 只, 每日饲以含 0.6mg 微量元素硒的饲料 (含硒丸剂由山西省太原市制药厂制造); 对照组 20 只, 以常规饲料喂养。

2. 检测项目及方法 (1) 骨痂横截面积检测: 每组在骨折后 2 周、3 周、4 周、5 周在静脉麻醉下分别处死 4 只, 剔除骨痂表面软组织, 用游标尺测骨痂的最大横径, 计算骨痂横截面积。(2) 光学显微镜检查: 按柴本甫等^[3]划分骨痂的方法, 分别在骨内膜骨痂及