

激素性股骨头坏死病机的实验研究

肖鲁伟¹ 童培建² 赵万军³ 马镇川² 吴承亮¹

(1. 浙江中医学院, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江省中医院, 浙江 杭州; 3. 杭州市中医院, 浙江 杭州)

【摘要】 目的 探讨激素性股骨头坏死的发病机理。方法 22 只雄性家兔随机分为两组, 正常对照组 10 只, 模型组 12 只, 以肌注糖皮质激素诱导家兔股骨头坏死模型为对象, 动态观察下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA) 形态和功能变化, 以及股骨头形态学变化。结果 激素性股骨头坏死模型其 HPA 轴从形态到功能出现抑制状态, 表现为血浆皮质醇(CORT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)降低, 垂体、肾上腺明显萎缩, 股骨头陷窝内骨细胞坏死。结论 HPA 轴从形态到功能的全面抑制状态, 可能是激素性股骨头坏死早期发病的直接或间接的原因之一。

【关键词】 股骨头坏死 糖皮质激素 病理学

Experimental study of pathogenesis of steroid induced avascular necrosis of femoral head XIAO Lu-wei, TONG Pei-jian, ZHAO Wan-jun, et al. Zhejiang College of TCM (Zhejiang Hangzhou, 310006)

【Abstract】 Objective To investigate pathogenesis of steroid induced avascular necrosis of femoral head (ANFH) **Methods** The ANFH models were produced in 22 male rabbits by injecting intramuscularly glucocorticosteroid and the animals were divided into two groups: 10 rabbits served as control group and 12 as the experimental group. The morphological and functional change of hypothalamic pituitary adrenal(HPA) axis and the morphological change of femoral head were observed in the experiment. **Results** The morphology and function of HPA axis were observed in experimental group; there were marked decrease of plasma cortisol and adrenocorticotrophic hormone, atrophy of hypophysis and adrenal, osteocyte necrosis in femoral head lacuna. These were signs of inhibition of the function of HPA axis. **Conclusion** The inhibition effect on the morphology and function of HPA axis may be one of important pathogenesis of steroid induced avascular necrosis of femoral head.

【Key Words】 Femur head necrosis Glucocorticoids Pathology

本文重点研究下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA 轴)与激素性股骨头坏死发生、发展的关系, 以探讨其发病机理。

1 材料与与方法

1.1 动物 22 只雄性家兔, 平均体重 2.31 ± 0.29 kg, 由浙江中医学院动物中心提供。室温 $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 光照与黑暗的时间为每 12 小时交替, 饲养期间给家兔颗粒饲料(浙江中医学院动物中心提供)及自由饮水。

1.2 药物 醋酸氢化泼尼松(浙江仙居制药股份有限公司, 浙卫药准(1993)18531), 青霉素 G 钠(江西东风制药厂, 赣卫药准字(1996)第 001008)。

1.3 试剂 ^{125}F ACTH(Double Antibody)放射免疫检测药盒, ^{125}F CORT(Coat A Count Cortisol)放射免疫检测药盒, 均由天津德普生物技术和医学产品有限公司提供(美国 DPC 公司生产)。

1.4 模型 每只兔均于上午 8:00~10:00 臀肌注射醋酸氢化泼尼松, 每周 1 次, 剂量每次 8mg/kg, 每次注射激素时必须重新称量和计算激素用量。同时每周 2 次臀肌注射青霉素 8 万单位, 预防感染, 到第 9 周结束。

1.5 分组及给药 造模前先适应观察 1 周。22 只雄兔随机分成两组。正常组 10 只, 模型组 12 只。正常对照组每周 3 次等体积生理盐水臀肌注射, 共 9 周。

1.6 标本制备 所有实验动物于第 4 周、第 9 周结束时, 分批在上午快速耳缘静脉抽血, 肝素抗凝分离血浆, -36°C 冰箱保存。实验于第 9 周结束, 所有实验动物大量空气栓塞快速致死, 不超过 1 分钟。速取新鲜垂体、右侧肾上腺、股骨头, 所有标本固定于 Bouin 液中, 分离包膜 4°C 过夜, 其中每份股骨头取软骨下 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 大小骨块放置在 2.5% 戊二醛溶液中, 4°C 保存。

1.7 观察指标

(1) 放大 X 线摄片 实验动物在第 9 周时, 每组取 2 只兔, 200mg/kg 氯氨酮腹腔内麻醉, 俯卧位 X 线摄片台上, 拍双髋正位片, 观察股骨头骨小梁排列以及关节间隙。

(2) 光镜观察 将股骨头冠状面剖开, Bouin 液固定, Plank Bychdo 液脱钙, 系列酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 重型切片机切片厚度 $7\mu\text{m}$, HE 染色, 光学显微镜观察股骨头

骨陷窝内骨细胞病理变化。各组均以软骨下区为读片区,随机选取 10 个高倍视野,每个视野内计数 50 个骨陷窝,计数空骨陷窝,求出平均空骨陷窝百分比。垂体、右侧肾上腺标本用 Boine 液固定,常规脱水、透明、包埋、石蜡切片,依次置 10 张载玻片上,每组取相同序号做 HE 染色,观察病理变化。

(3) 扫描电镜观察 每组各选 2 只动物股骨头,软骨下区取 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 骨块,2.5% 戊二醛固定 48 小时,锇酸后固定,酒精、丙酮透明脱水,醋酸异戊酯置换,CO₂ 临界点干燥,扫描电镜观察。

(4) 皮质醇(CORT)放射免疫检测 兔耳缘静脉快速抽血 8ml,肝素抗凝,离心沉淀,取血浆 4ml, -36℃ 保存。成对标号 4 支 $12\text{mm} \times 75\text{mm}$ 聚丙烯试管 T(总计数)和 NSB(非特异性结合)为空白试管(未包被)。成对标号 12 支 CORT 抗体一包被试管 A(最大结合),从 B 到 F,也成对标号其他抗体一包被试管,为包被试管,用于质控和检测样本。向 NSB 和 A 试管中加入 25ml 零标准品 A,向其他的标号试管中加入 25ml 相应的标准品从 B 到 F。再向每支试管中加入 1.0ml ¹²⁵I CORT,振荡,在 37℃ 室温下温育 45 分钟。完全倒掉液体,γ 计数器上计数 1 分钟。

(5) 促肾上腺皮质激素(ACTH)放射免疫检测 ① 血浆的制备与提取:同上法抽血,取低温保存的血浆 2ml,加入含硅酸 75mg 的锥形塑料管(1.5cm × 1.5cm)中,室温旋转混和 30 分钟,4℃ 离心,弃液液加蒸馏水 2ml 洗涤沉淀,旋转混合、离心,弃洗涤液。加 1mol/L HCl 0.1ml,旋转混合,离心,弃洗涤液。加入酸性丙酮溶液 1.0ml,旋转混合,离心,得提取液。取提取液 0.5ml 和 0.25ml,分别加入试管(1.0cm × 7.5cm)内,抽成真空为样品管 U。② 制作标准曲线:去 ACTH 激素的牛血清 2.0ml,加入含硅酸 75mg 的试管中,给试管内加 14% EDTA 20μl,2.5% 马来酰亚胺液 10μl,再加标准 ACTH,同血浆样品同时提取,得到标准提取液,取 0.4ml 加入试管,抽成真空为标准管 S。③ 放射免疫法测定:于样品管和标准管内依次按表加入试剂,离心,γ 计数器测量沉淀的放射量。

1.8 统计学方法 F 检验和 Q 检验。

2 结果

2.1 光镜观察 ① 正常组:股骨头骨小梁及骨细胞结构、形态正常,髓腔内造血细胞和脂肪细胞正常,空骨陷窝占 10 ± 2.6%,关节软骨厚约 32mm(见图 1)。垂体、肾上腺形态正常,肾上腺皮质厚约 9.5cm,球状带、束状带、网状带界限清楚,细胞排列规则,核染色均匀。② 模型组:股骨头骨皮质变薄,骨小梁变细、稀疏、萎缩,骨髓腔扩大,充满肥大的脂肪细胞,造血细胞明显减少。软骨下区骨细胞核边聚、核固缩,核深染,有些核消失而使骨陷窝空虚增加,空骨陷窝占 43 ± 3.0% 等骨细胞坏死的病理学表现。关节软骨厚约 19mm(见图 2)。垂体、肾上腺萎缩,垂体前叶 ACTH 细胞数减少明显,胞体变少,淡染。肾上腺皮质厚约 5.2cm,束状带萎缩明显,实质细胞体积变小、数量变少、排列紊乱,胞质、胞核深染(见图 3)。

2.2 扫描电镜观察 ① 正常组:股骨头关节软骨富有光泽,无裂缝。软骨下骨板排列整齐。骨小梁呈柱状、片状,构成层层叠叠的拱形结构。② 模型组:股骨头关节软骨无光泽,软骨变薄、有脱落。骨小梁失去完整的表面及弧度,出现微骨折

(见图 4)。

2.3 CORT 和 ACTH 水平 模型组第 4 周血浆 CORT 及 ACTH 较对照组降低,两者比较有非常显著的差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组第 9 周血浆 CORT、ACTH 较第 4 周下降。模型组 CORT、ACTH 水平较对照组下降,两者比较有非常显著的差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见表 1)。

表 1 血浆 CORT(μg/dl) 及 ACTH(pg/dl) 水平变化($\bar{x} \pm s$)

组别	第 4 周		第 9 周	
	CORT	ACTH	CORT	ACTH
对照组	29.2 ± 8.41	81.0 ± 48.5	30.3 ± 9.44	82.3 ± 50.1
模型组	8.07 ± 3.98**	32.1 ± 25.1*	3.90 ± 1.32**	27.9 ± 22.4*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 讨论

关于激素性股骨头坏死发病机理的学说有多种^[1], 本实验结果表明:激素诱导的股骨头坏死模型动物表现为下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴形态萎缩、功能抑制,模型动物光镜观察垂体、肾上腺细胞形态明显萎缩,第 4 周、第 9 周 CORT、ACTH 水平均降低,表明此时的 HPA 轴处于全面抑制状态。第 9 周 CORT、ACTH 水平均较第 4 周更低,说明随着外源性糖皮质激素给药时间的延长,能加重 HPA 轴的受抑制程度。模型组 CORT、ACTH 水平降低,是由于一定量的外源性糖皮质激素使垂体前叶的 ACTH 释放迅速受到抑制;而 ACTH 又转而使肾上腺皮质类固醇释放量也减少,同时使肾上腺皮质萎缩^[2]。HPA 轴在调节机体多种机能,维持内环境的相对稳定方面发挥重要作用。内环境稳定(Homeostasis)的维持虽然依靠神经内分泌网络系统的调控,但其自身须在稳态的前提下进行活动^[3]。因此当外源性糖皮质激素抑制 HPA 轴时,内环境亦出现不同程度的失衡。内环境的失衡作为中间环节可能直接或间接作用于股骨头,加速了股骨头骨细胞的死亡。这是我们认为的一个全身因素。另一个局部因素是:长期应用皮质激素直接抑制成骨细胞的功能,刺激破骨细胞的活性,增加骨组织对 PTH 和 1,25-(OH)₂D₃ 的敏感性,在总体上造成成骨作用减弱,破骨作用加强^[4]。其结果是骨小梁变细、疏松、萎缩或断裂,发生微骨折,负重时,拱形结构在机械力的作用下,发生微骨折而塌陷,继而进一步压迫骨内微血管引起缺血,最终导致股骨头坏死。因此 HPA 轴的形态到功能抑制,内环境失稳,可能是股骨头坏死一个重要的发病机理。

(本文图 1~4 见插图 4)

参考文献

- [1] 赵万军,肖鲁伟,童培建.激素诱导股骨头缺血性坏死的发病机理及中医药的防治(综述).中国中医骨伤科杂志,1998,6(3):49-52.
- [2] Dallman MF. Corticosteroid feed back control of ACTH in the rat. Endocr, 1972, 91: 96-97.
- [3] 朱宪彝. 临床内分泌学. 天津:天津科学技术出版社,1993. 361.
- [4] Mastai M, Sa'ito S, Ohzono E, et al. Experimental steroid-induced osteonecrosis in adult rabbits with hyperzerventive vasculitides. Clin Orthop, 1992, 272: 61-63.

(收稿:2000-02-15 修回:2000-09-30 编辑:房世源)

几丁质-硅胶复合膜引导性骨再生的实验研究

(正文见 405 页)

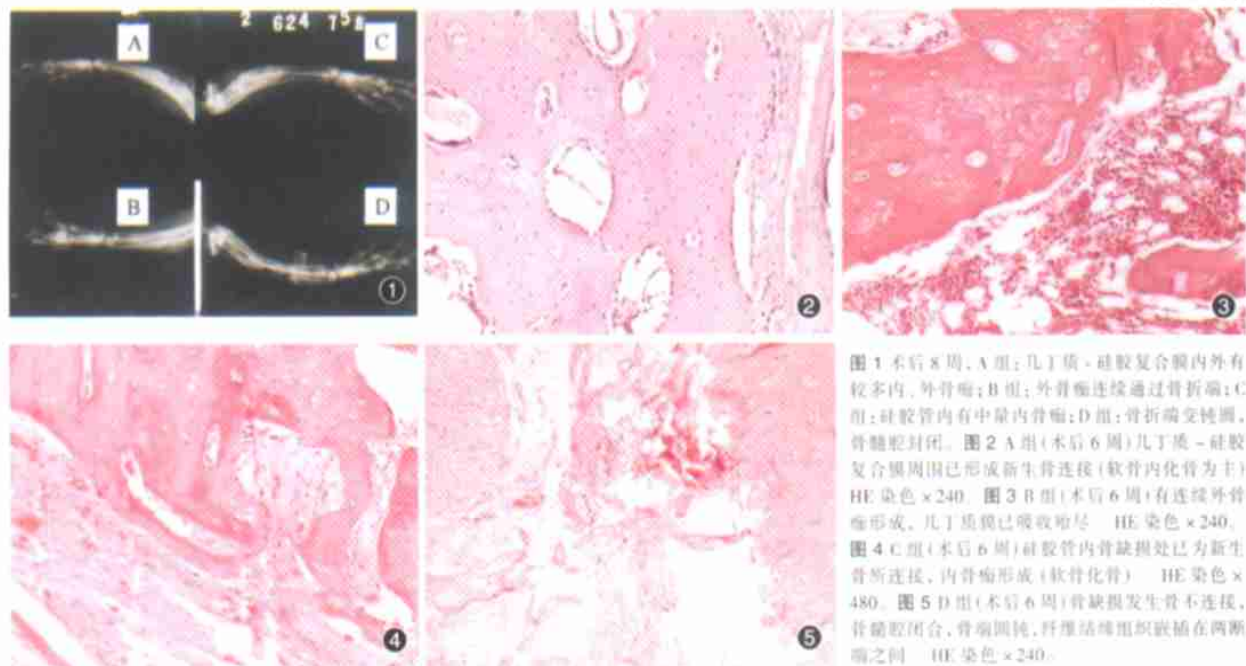


图 1 术后 8 周。A 组:几丁质-硅胶复合膜内外有较多内、外骨痂;B 组:外骨痂连续通过骨折端;C 组:硅胶管内有中量内骨痂;D 组:骨折端变钝圆,骨髓腔封闭。图 2 A 组(术后 6 周)几丁质-硅胶复合膜周围已形成新生骨连接(软骨内化骨为主) HE 染色 $\times 240$ 。图 3 B 组(术后 6 周)有连续外骨痂形成,几丁质膜已吸收殆尽 HE 染色 $\times 240$ 。图 4 C 组(术后 6 周)硅胶管内骨缺损处已为新生骨所连接,内骨痂形成(软骨化骨) HE 染色 $\times 480$ 。图 5 D 组(术后 6 周)骨缺损发生骨不连接,骨髓腔闭合,骨端圆钝,纤维结缔组织嵌插在两端之间 HE 染色 $\times 240$ 。

激素性股骨头坏死病机的实验研究

(正文见 408 页)

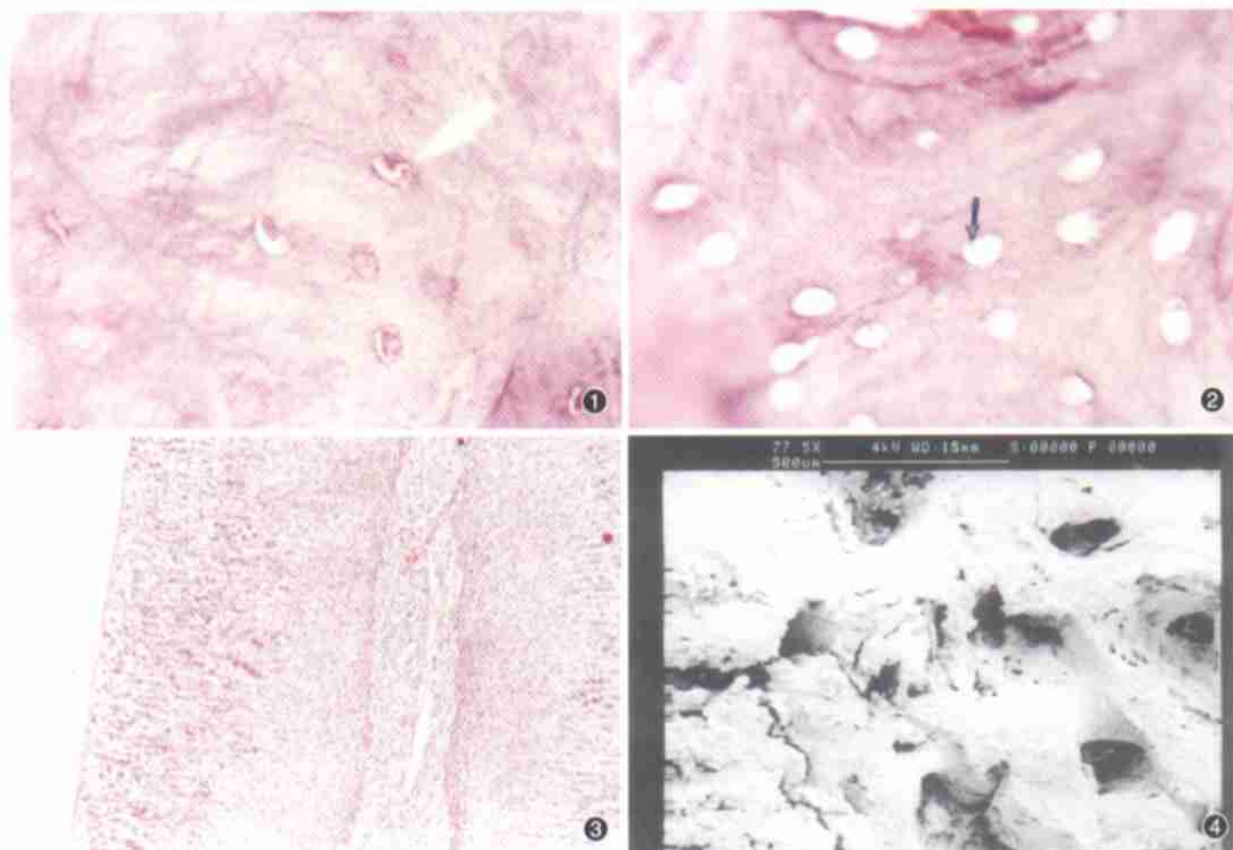


图 1 正常组:骨髓腔内骨髓细胞。(箭头示) HE $\times 400$ 。图 2 模型组:骨髓腔内骨髓细胞坏死, HE $\times 400$ 。图 3 模型组:萎缩的肾上腺,束状带细胞排列紊乱, HE $\times 40$ 。图 4 模型组:骨小梁结构,扫描电镜 $\times 25000$ 。