

## • 基础研究 •

# 激素性股骨头坏死中内皮素和一氧化氮含量的变化

沙启乐<sup>1</sup> 陈晓亮<sup>2</sup> 王英振<sup>2</sup> 于学忠<sup>2</sup>

(1. 菏泽医学专科学校, 山东 菏泽 274030; 2. 青岛大学医学院附属医院, 山东 青岛)

**【摘要】** 目的 研究内皮素(ET-1)、一氧化氮(NO)在激素性股骨头缺血坏死中的作用,进一步探讨激素性股骨头缺血坏死的发病机制。方法 给家兔注射大剂量的醋酸氢化可的松(每周 12mg/kg)后 4、8、12 周,用放射免疫法测定血浆、股动脉组织 ET-1 的含量变化;用硝酸还原酶法测定其 NO 含量的变化。观察股骨头组织病理学改变并行 X 线检查。结果 用药后不同时间的血浆和股动脉组织 ET-1 含量不断升高( $P < 0.01$ ),而其 NO 的含量持续下降( $P < 0.01$ )。光镜下 4~8 周的股骨头标本见脂肪细胞增多、肥大,生骨细胞、成骨细胞减少,微血管栓塞,管壁增厚,骨小梁变细、萎缩,骨细胞核边聚、固缩、溶解,骨细胞坏死,空骨陷窝增多。随着时间的延续上述改变加重。结论 ①激素性股骨头缺血坏死动物模型的血浆和血管组织中 ET-1 含量增多,而其 NO 含量减少,这种改变在激素性股骨头缺血坏死中可能起着重要作用。②大剂量激素短期内就可诱发股骨头缺血坏死。

**【关键词】** 内皮素; 一氧化氮; 股骨头坏死

**The changes of ET-1 and NO in steroid induced femoral head necrosis** SHA Qile, CHEN Xiaoliang, WANG Ying-zhen, et al. The Affiliated Hospital of Heze Medical College(Shandong Heze, 274030)

**【Abstract】 Objective** To investigate the role played by endothelin 1(ET-1) and nitric oxide(NO) on steroid induced femoral head necrosis, and to study further the pathogenesis of steroid induced femoral head necrosis. **Methods** High dose hydrocortisone acetate was administered to adult rabbits for 12 weeks(12mg/kg once weekly). The endothelin 1 concentration of plasma and femoral arterial wall in rabbits were determined using radioimmunoassay technique, and the level of NO was measured with nitrate reductase assay at 4th, 8th and 12th weeks. The histopathologic and radiographic changes were observed at different stages. **Results** The ET-1 level of plasma and femoral artery wall in the rabbits injected with steroid was significantly higher than that in the control group( $P < 0.05$ ), however, the NO level was significantly lower than that in control group( $P < 0.01$ ). Evidences of vascular stasis, fat cells quantitative hypertrophy, hemopoiesis and osteoblast reduction, trabeculae atrophy, attenuation and fracture, bone nucleolus peripheral aggregation, pyknosis and nuclear solution, empty bone, increasing of bone lacuna were observed. Osteoporosis appeared in the radiography at 12th week. **Conclusion** 1. The increase of ET-1 and the decrease of NO might play an important role in the pathogenesis of steroid induced avascular necrosis of the femoral head. 2. High dose steroid may induce femoral head necrosis in a short time.

**【Key Words】** Endothelin; Nitric oxide; Femoral head necrosis

鉴于内皮素(ET-1)和一氧化氮(NO)的生物学特性以及心血管外科对其的研究现状,我们进行了动物实验。通过检测激素诱导的家兔股骨头缺血坏死模型的血浆、股动脉壁 ET-1、NO 含量改变,进一步探讨激素性股骨头缺血坏死的发病机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物分组及模型制备** 取健康家兔 24 只,雌雄不限,平均体重 2.45kg(2.2~2.8kg),随机分为两组,激素组 12 只,按 12mg/kg 体重肌注醋酸氢化可地松,每周一次;对照组 12

只,每周肌注与激素等容量的生理盐水。两组动物在同样条件下饲养。

**1.2 标本收集及处理** 分别于用药后 4、8、12 周两组各取 8、8、4 只动物,抽取空腹静脉血 3ml,1.5ml 注入含 10% EDTA 二钠 30μl 和抑肽酶 40μl 的测 ET-1 的试管中,混匀,4℃ 3000rpm 离心 10 分钟,分离血浆,置 -70℃ 低温冰箱保存备检;另 1.5ml 注入测 NO 的空白试管内,37℃ 孵育 1 小时,4℃ 3000rpm 离心 10 分钟,取上清液,置 -70℃ 低温冰箱保存备检。

分别于 4、8、12 周两组各取 4 只动物,取双侧股动脉,长约 3.5cm,重约 100mg,用生理盐水冲净血迹。测 ET-1 者剪碎放入含 0.1mol/HAC 1ml 的试管中略做研磨,然后在 100℃ 水浴中煮沸 10 分钟,再次研磨成匀浆,4℃3000rpm 离心 15 分钟,取上清液,置 -70℃ 低温冰箱保存备检;测 NO 的血管放入含生理盐水 1ml 的试管研磨匀浆,4℃3000rpm 离心 15 分钟,取上清液,置 -70℃ 低温冰箱保存备检。同时,取双侧股骨头,从冠状面正中劈开,10% 福尔马林液固定、脱钙、脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色组织病理检查。每期两组各取 4 只动物拍双侧髋关节正位 X 线片。

**1.3 观察指标和方法** ① 股骨头组织病理观察:光镜下观察骨细胞、成骨细胞、骨髓细胞、骨小梁、骨内小血管的改变。② 血浆、血管组织 ET-1 的测定:用放射免疫法测定,试剂盒购于解放军总医院放免所。③ 血清、血管组织 NO 的测定:用硝酸还原酶法测定,试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

**1.4 统计学处理** 各组数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,显著性检验用组间 *t* 检验。

**2 结果**

**2.1 组织病理学观察** 大体标本观察:实验组与对照组股骨头外观无明显变化,但 12 周咬剪实验组股骨头时感酥脆。光镜下观察:各期对照组骨小梁结构正常,骨细胞、成骨细胞、骨髓细胞、骨内血管无异常。实验组 4~8 周见骨髓内脂肪细胞肥大增生,骨细胞核边聚、固缩,出现空骨陷窝,成骨细胞减少,骨小梁开始萎缩、变细,骨髓腔内小血管壁轻度增厚,有些小静脉内有血栓形成。12 周时上述改变加重,骨小梁进一步萎缩变细甚至断裂,骨细胞核固缩溶解消失,空骨陷窝增多,可达 50% 以上,成骨细胞几乎消失,骨髓腔几乎被增生肥大的脂肪细胞完全占据,髓腔内小血管管壁增厚,管腔狭窄,栓塞闭锁。

**2.2 血浆、血管壁 ET-1 含量变化** 用药后第 4 周实验组血浆、血管壁 ET-1 含量明显升高,一直持续到 12 周,各期与对照组比较有显著性差异,实验组用药后不同时期 ET-1 含量变化无显著性差异。具体数据详见表 1、2。

表 1 血浆 ET-1 的含量 (pg/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	4 周	8 周	12 周
对照组	39.04±9.49	30.57±7.22	31.97±10.37
实验组	51.97±10.06	51.87±24.94	59.67±14.09

注:各期实验组与对照组比较 *P* < 0.05

表 2 血管组织 ET-1 的含量 (pg/mg,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	4 周	8 周	12 周
对照组	0.98±0.57	1.22±0.43	1.40±0.31
实验组	2.20±40.60*	2.94±0.97	3.36±0.77

注:与对照组比较\* *P* < 0.05,其它 *P* < 0.01

**2.3 血清、血管壁 NO 含量的变化** 用药后第 4 周起实验组血清、血管壁 NO 含量降低,与对照组相比有非常显著差异 (*P* < 0.01),实验组用药后不同时期 NO 含量无显著性差异。具体数据详见表 3、4。

**2.4 X 线表现** 对照组各期髋关节 X 线片未见异常,12 周实验组有 2 只动物髋关节 X 线片表现为股骨头、颈骨质疏

松,余无异常。

表 3 血清 NO 的含量 ( $\mu\text{mol/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	4 周	8 周	12 周
对照组	25.41±1.94	26.23±1.28	25.48±1.72
实验组	15.41±1.89	14.89±0.96	13.50±1.24

注:与对照组比较 *P* < 0.01

表 4 血管组织 NO 含量 ( $\mu\text{mol/mg}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	4 周	8 周	12 周
对照组	8.70±1.96	8.73±1.60	8.94±2.11
实验组	3.04±1.24	3.83±0.83	3.60±0.56

注:与对照组比较 *P* < 0.01

**3 讨论**

**3.1 ET-1 的生物学特征及其含量升高的意义** ET-1 是哺乳动物体内最强的收缩血管物质,其收缩血管作用比血管紧张素 II 强 10 倍<sup>[1]</sup>。ET-1 对机体不同部位的动脉、静脉和微血管均能产生强烈、持久的收缩作用,但是,由于静脉对之的收缩阈低于动脉 100 倍,因此,ET-1 对静脉的收缩作用明显强于对动脉的收缩作用<sup>[2]</sup>。另外,ET-1 对微血管的收缩作用强于对大中血管的收缩作用,尤其对直径小于 50 $\mu\text{m}$  的血管有更强的收缩作用。ET-1 是所有收缩血管物质中唯一强有力的缩微血管物质,对微循环的调节起着重要作用<sup>[3]</sup>。在生理情况下体内 ET-1 含量甚微,在病理或使用糖皮质激素的情况下 ET-1 含量升高,可以使血管强烈收缩,且对静脉收缩明显强于对动脉的收缩作用。这样会在股骨头内形成高灌低排、髓内血液淤滞、骨内高压,且血液高凝,易于血栓形成。尤其是微血管收缩直接影响股骨头微循环和物质代谢。ET-1 还促使血管平滑肌、内膜增生肥厚,致管腔狭窄,更易栓塞。以上病理改变将严重影响股骨头血液循环和营养供应,最终导致股骨头缺血坏死。

对激素性股骨头缺血坏死动物模型血浆、血管组织 ET-1 含量增高的机理尚不清楚,可能与下列因素有关:① 激素造成血管内皮细胞损害而释放过量的 ET-1<sup>[4]</sup>。② NO 能抑制 ET-1 的生成,激素使 NO 合成、分泌减少,对 ET-1 的生成抑制作用减弱因而其生成增多<sup>[5]</sup>。③ 激素促使肾素、血管紧张素分泌增多,而后者促进 ET-1 的生成。

**3.2 NO 的生物学特性和含量减少的意义** NO 是近年来发现的由血管内皮细胞分泌的重要的血管活性物质。NO 主要有以下生物活性<sup>[6,7]</sup>:① 舒张血管平滑肌。生理情况下血流对血管的切应力 (shear stress) 与血管搏动的牵张力可在几秒钟内激发钙内流,使内皮细胞释放一定量的 NO 以舒张血管。② 抗血小板聚集作用。NO 具有很强的抗血小板聚集作用,对胶原、ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集有对抗作用,并且能使上述物质引起的小血小板聚集解聚。③ 抗血小板、白细胞粘附作用。实验表明,适当浓度的 NO 有抗血小板粘附于血管内皮细胞的作用。NO 还具有抑制粘连分子表达的作用,因此,它还能抑制白细胞相互粘连。④ 抗血管平滑肌增生。当血管内皮细胞受损失去其屏障作用时其下层平滑肌细胞与血液中的大分子物质如血小板生长因子、内皮生长因子、内皮素相接触,可以促进平滑肌细胞增生,这是产生血管壁病理增

殖重构的重要因素, NO 有抑制平滑肌增生的作用从而避免血管病理重构和管腔狭窄。

适当浓度的 NO 能维持正常的血管舒缩功能和血液的良好流动状态以保持器官的有效灌注。NO 含量减少, 血管则收缩痉挛, 管壁增生, 管腔狭窄, 血小板聚集, 白细胞粘附, 血栓形成。这些病理改变发生在股骨头及其周围血管, 将导致股骨头缺血坏死。

激素性股骨头缺血坏死动物模型血浆和血管组织 NO 含量减少的机理目前尚不清楚, 可能与下列因素有关<sup>[2]</sup>: ①激素导致血管内皮细胞损害, 使 NO 的生成场所遭受破坏。②激素能抑制 NOS 的活性从而使 NO 合成减少。③激素能引起高血脂症, 高血脂的情况下内皮细胞合成 NO 的能力下降。

本实验病理检查结果与 ET-1 升高、NO 降低所能产生血管、血液病理的理论结果基本一致。所以, 我们认为激素性股骨头缺血坏死与血浆、血管组织中 ET-1、NO 浓度改变有关。

**3.3 本实验结果与激素性股骨头缺血坏死的预防和早期治疗** 对激素性股骨头缺血坏死的早期治疗到目前为止最为有效的方法是髓芯减压, 其设计原理是经过钻孔降低髓内压, 改善血循环, 促使股骨头修复。但它并没有解决脂质代谢紊乱和 ET-1、NO 等生物活性物质质量的改变所引起的血管舒缩、血液流动性功能障碍, 并且它仅能治疗却不能预防该病的发生。本实验从第 4 周就发现骨髓内脂肪细胞增生肥大, 12 周部分视野骨髓腔完全被脂肪细胞填充。并发现 ET-1 升高、NO 降低。从理论上讲, 要能较早地阻断这些病理过程就可以预防

和治疗激素性股骨头缺血坏死。而清脂药物如氯苯丁脂和其他汀类药物, ET-1 拮抗剂如 Bosentan、BQ 123, NO 代用品 L-精氨酸可以起到清除高血脂, 改善脂质代谢紊乱, 恢复正常的血管壁组织结构和血管舒缩功能, 保持血液的良好流动状态, 改善股骨头血液循环, 从而起到预防和治疗早期激素性股骨头坏死的作用。相关研究国内刚刚起步, 预期将会有良好的研究前景。

#### 参考文献

- 1 Yanggisarra M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature (London), 1988, 332: 411-415.
- 2 Miller VM, Komari K, Burrnett JC, et al. Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and vein. Br J Pharmacol, 1989, 257: 1127-1131.
- 3 Homma S, Miyachi T, Sugishita Y, et al. Vasoconstrictor effects of endothelin 1 on myocardium microcirculation studied by the Langendorff perfusion method: differential sensitivities among microvessels. Microvasc Res, 1992, 43(2): 205-217.
- 4 王春喜, 段志泉, 吴咸中. 内皮素一氧化氮与自体静脉移植再狭窄的关系. 中华实验外科杂志, 1999, 16(5): 400-401.
- 5 陈修, 陈维洲, 曾贵云. 新血管药理学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 133.
- 6 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA, et al. Nitric oxide: Pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev, 1991, 43: 109.
- 7 Schultz R, Triggle CR. Role of NO in vascular smooth muscle. Trends Pharmacol Sci, 1994, 15(7): 255-259.

(收稿 2001-08-20 编辑: 李为农)

## 中国中医研究院针灸研究所针灸培训学校招生

(京) 教社证字 A91048 京教社广字(东城) 2002012 号

我校是经北京成教局批准, 由中国中医研究院针灸研究所主办, 是医务界最早开展针灸、推拿培训的母校, 尤其以主办著名针灸推拿专家的临床经验传授班及特色疗法班而闻名于社会, 至今已有近二十年办学经验, 为社会培训了二万余名高水平, 高技能针灸、推拿人才, 普遍受到学员及用人单位好评。凡希望自己的医术有质的飞跃者, 不妨到此学习。2002 年办班如下:

一、全国高级针灸进修班: 此班为国家级继续教育项目, 授予 25 学分, 学费 980 元。8 月 1 日~ 8 月 14 日; 9 月 4 日~ 9 月 19 日。

二、全国高级推拿进修班及高级按摩师取证班: 此班学习期满, 颁发中华人民共和国劳动和社会保障部颁发的资格证书。5 月 24 日~ 6 月 6 日; 8 月 17 日~ 9 月 1 日; 学费 2300 元。

以上两班为著名针灸、推拿专家临床经验传授班, 将邀请著名针灸、推拿专家(非一般专家)亲自授课, 表演手法特技、指导操练、答疑等。

三、中医特效美容学习班: 该班将介绍具有特效的中药内服、外敷, 多种针法、灸法、手法按摩、点穴等治疗各种皮肤病, 减肥、保健、养颜。均邀请有关专家前来授课, 指导操练, 保教保会。7 月 22 日~ 7 月 29 日; 学费 1000 元。

四、痛症特效疗法学习班: 介绍最具有疗效的特种针法、手法、局部外用及现代最新方法治疗各种痛症。9 月 20 日~ 9 月 26 日; 学费: 800 元。

五、针灸、推拿函授班: 2002 年 4 月 5 日~ 2003 年 10 月 5 日, 学费: 645 元。

以上各班详情请见招生简章, 免费提供。联系电话: (010) 64007111 或 64014411 转 2911 或 2781。通讯地址: 北京东直门内北新仓 18 号 中国中医研究院针灸研究所 邮编: 100700 联系人: 裴女士, 赵先生。广告刊出按时开课。