

• 基础研究 •

脂质代谢及破骨细胞活性在激素性股骨头坏死塌陷发生过程中的作用研究

童培建¹, 肖鲁伟², 季卫锋¹, 田琨¹

(1.浙江中医药大学附属第一医院骨伤科, 浙江 杭州 310006; 2.浙江中医药大学)

【摘要】目的:通过诱导激素性股骨头坏死的动物模型并观测模型的相关指标, 研究脂质代谢及破骨细胞活性在激素性股骨头坏死塌陷发生过程中的作用。**方法:**将雄性 SD 大鼠 40 只(150 g 左右), 随机分为空白对照组和激素实验组, 腹腔注射大肠杆菌内毒素后, 实验组每周 1 次臀肌注射醋酸强的松龙 35.5 mg/kg, 对照组每周 1 次臀肌注射生理盐水 2 ml, 于第 12 周用药结束后处死动物, 进行血清抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (Trap-5b)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、软骨下骨生物力学、股骨骨密度测定, 制作 HE 染色病理切片, 进行茜红素和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)染色, 并进行统计分析。**结果:**实验组的血清总胆固醇、甘油三酯、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 含量显著升高($P<0.01$), 局部骨髓内出现大量破骨细胞, 骨质丢失严重($P<0.01$), 软骨下骨生物力学性能显著下降($P<0.01$)。**结论:**脂质代谢紊乱是激素性股骨头坏死重要的发病机制; 破骨细胞活性增强、数量增加, 引起骨质严重丢失导致的软骨下骨生物力学性能下降是股骨头塌陷的直接原因。

【关键词】 脂质代谢紊乱; 破骨细胞; 生物力学; 股骨头坏死; 动物实验

Research on the role of metabolism of fatty substance and osteoclast activity during the development of steroid-induced necrosis of femoral head TONG Pei-jian*, XIAO Lu-wei, JI Wei-feng, TIAN Kun. *Department of Orthopaedic, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the role of metabolism of fatty substance and osteoclast activity during the process of steroid-induced necrosis of femoral head through mice model inducing and model index measurement. **Methods:** Forty SD male mice were divided into 2 groups randomly, the control group and the experiment group. After the gluteal injection of colibacillus endotoxin, the experiment group was given gluteal injection of prednisolone acetate 35.5 mg/kg per week, and 2 ml of normal saline to the control group. The mice were killed 12 weeks later and tested the content of Trap-5b, TC and TG of the blood serum. Vitodynamics, bone density were measured and sections of HE staining, Ca^{2+} and TRACP staining was made then statistic analysis was performed. **Results:** The content of TC, TG and Trap-5b increased apparently ($P<0.01$). Large amount of

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(编号:Z303656)

心理恐惧, 肩部肌肉更加紧张, 成功率并不高, 肩关节脱位同时伴有肱骨大结节骨折或伴有明显骨质疏松者, 牵引时过早内收, 杠杆力可造成肱骨外科颈骨折导致复位失败^[6]。

4.3 固定时间 肩关节脱位后关节囊破裂, 适当制动有助于损伤的软组织的修复, 以恢复肩关节的稳定性, 固定时间不少于 3 周^[7], 年龄较大者和合并肱骨大结节骨折延长至 4 周。如固定时间太短, 破裂的关节囊得不到完好的修复, 日后肱骨头极易从该破裂处再次脱出。本组中 2 例固定时间不足 1 周, 结果再次脱位; 1 例由于患者步态不稳摔倒, 复发脱位。固定期间作手、腕关节功能锻炼, 3~4 周后解除固定作肩、肘关节各方向功能锻炼, 随访无肩关节活动受限。

参考文献

[1] 葛宝丰, 胥少汀, 徐印坎. 实用骨科学. 第 2 版. 人民军医出版社, 2001. 413-419.

- [2] 纪斌平. 肩关节功能评估的历史与现状. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(8): 567-569.
- [3] 王亦璠. 骨与关节损伤. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 514-524.
- [4] 陈劲松, 张韬. Sitmsom 法在老年人肩关节脱位中的应用及机理探讨. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(1): 99-100.
- [5] 周旭东, 陈洪杰. 肱骨近端骨折并肩关节脱位的内固定治疗. 临床骨科杂志, 2007, 10(4): 297-298.
- [6] 马常青, 丛海波. 肩关节脱位的整复手法及发展. 中医正骨, 2006, 18(9): 80-82.
- [7] 马常青. 肩关节脱位手法整复的流派及发展动态. 中国骨伤, 2006, 19(11): 686-688.

(收稿日期: 2008-10-26 本文编辑: 王玉蔓)

osteoclasts were found in local medullary cavity. There was severe bone loss and decrease of vitodynamics in subchondral bone ($P<0.01$) in experiment group. **Conclusion:** Metabolic disorder of fatty substance is the key pathogenesis of steroid-induced avascular necrosis of femoral head. Decrease of vitodynamics in subchondral bone due to hyperactivity and increase of osteoclast lead to collapse of femoral head directly.

Key words Metabolic disorder of fatty substance; Osteoclasts; Biomechanics; Femur head necrosis; Animal experimentation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(2): 110-113 www.zggszz.com

激素性股骨头坏死塌陷的发生机制至今仍不明确, 本文通过使用醋酸强的松龙诱导 SD 大鼠的激素性股骨头坏死模型, 研究脂质代谢及破骨细胞活性在激素性股骨头坏死塌陷发生过程中的作用, 报告如下。

1 材料与方

1.1 动物分组与模型诱导 雄性 SD 大鼠 40 只(150 g 左右, 由中国科学院上海实验动物中心提供), 随机分为 2 组(空白对照组、激素实验组), 每组 20 只。所有动物腹腔注射 3 次大肠杆菌内毒素 97.92 $\mu\text{g}/\text{kg}^{[1]}$, 每次间隔 24 h。最后一次注射大肠杆菌内毒素 24 h 后, 实验组大鼠臀肌注射醋酸强的松龙 35.5 mg/kg, 对照组则予臀肌注射生理盐水 2 ml, 左右侧交换, 每周 1 次, 连续注射 12 周^[2]。所有动物均在同一条件下饲养, 进食普通颗粒饲料, 为预防感染, 所有动物每周肌肉注射青霉素钠 4 万 U。

1.2 生化指标检测 停药后, 每只大鼠股动脉取血 5 ml, 将 4 组血液 4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 4 h, 离心 (7 200 r/min) 15 min 后取上层血清, 56 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 min 灭活, 再将血清经 0.45、0.22 μm 抽滤除菌后, 分装, 采用酶标法检测血清总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)的含量, 使用 ELLISA 试剂盒检测血清检测血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP-5b)的含量。

1.3 组织学检查 颈椎脱臼法处死所有动物, 每组取左侧股骨头 10 只从冠状面切开, 10% 中性甲醛固定, 硝酸脱钙, 乙醇脱水, 石蜡包埋切片, 切片厚 4 μm , HE 染色, 光镜下观察形态学变化。10 只进行聚甲基丙烯酸甲酯包埋、不脱钙切片(厚度为 5~10 μm)、脱塑, 然后进行抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP 染色)、茜红素染色。

1.4 骨密度测定 利用双能 X 线骨密度测量仪(LUNAR DXA)测量右侧股骨头及股骨干中段的骨密度值。

1.5 软骨下骨生物力学测试 在精密仪表床上取骨密度测试后的股骨头关节软骨下骨骨块高(1.00 \pm 0.15) mm, 外径均为(1.50 \pm 0.02) mm。密封-30 $^{\circ}\text{C}$ 保存。使用前先将试件复温 2 h, 采用点压技术在 AX 万能实验机上进行测定, 压头外径为 1.54 mm, 软骨面朝上, 加载速度为 1.5 mm/min, 载荷测定精度 1 N, 变形测量精度 0.005 mm。在应力应变曲线上测量其抗压强度及弹性模量。抗压强度计算公式为: $P_{\text{max}}=P/A$, 式中 P 为加载后出现第一个波时的压力, A 为骨块初始截面积。点压时 P 为压穿软骨下骨时的压力, A 为压头截面积。弹性模量计算公式为 $E=\Delta P \cdot L/A \cdot \Delta l$, 式中 ΔP 为施压时弹性载荷, Δl 为骨块的应变量, A 为压头面积, L 为骨块初始高度, 弹性模量 E 即为标本应力-应变曲线上的弹性区的斜率。实验过程中记录压力-位移曲线, 将压力与压头面积的比值记录于纵轴, 软骨下骨被压缩的距离与骨块厚度的比值记录于横轴,

将压力-位移曲线转化为应力-应变曲线。

1.6 统计分析 统计参数用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, 以 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TRAP-5b、TC 和 TG 的测定 激素实验组与空白对照组相比血清抗酒石酸酸性磷酸酶、总胆固醇、甘油三酯指标均显著升高(见表 1)。

表 1 生化指标检测 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Biochemical indicator test ($\bar{x} \pm s$)

指标	空白对照组	激素实验组
TRAP-5b(U/L)	0.25 \pm 0.11	0.39 \pm 0.13*
TC (mmol/L)	1.26 \pm 0.09	1.87 \pm 0.10*
TG (mmol/L)	0.82 \pm 0.16	2.29 \pm 0.21*

注: 与对照组比较, * $P<0.01$

Note: Compared with control group, * $P<0.01$

2.2 HE、TRACP、茜红素染色 (见图 1-6) HE 染色: 股骨头结构破坏, 骨骺板存在明显内凹现象, 骨骺及干骺端骨小梁粗细不均, 骨小梁结构中中断缺, 变性骨细胞增多, 骨髓组织中中性粒细胞和淋巴细胞浸润, 毛细血管瘀血。破骨细胞特异性染色(TRACP 染色); 股骨头部骨髓内出现大量破骨细胞和骨吸收陷窝。茜红素染色是将骨基质内的钙盐染成橘红色, 可以直观的观察骨骼局部的钙盐分布情况。茜红素染色, 染色明显减低, 骨质着色紊乱, 软骨下骨出现圆形或椭圆形的不着色或大片的淡染区域。

2.3 股骨头、股骨干的骨密度测试 测试结果显示激素实验组与空白对照组相比股骨头松质骨、股骨干中段皮质骨骨密度显著下降(见表 2)。

表 2 骨密度测定值 ($\bar{x} \pm s, \text{g}/\text{cm}^2$)
Tab. 2 Bone densitometry test ($\bar{x} \pm s, \text{g}/\text{cm}^2$)

部位	空白对照组	激素实验组
股骨头	0.235 \pm 0.037	0.103 \pm 0.024*
股骨干	0.497 \pm 0.022	0.362 \pm 0.061*

注: 与对照组比较, * $P<0.01$

Note: Compared with control group, * $P<0.01$

2.4 软骨下骨的生物力学测定 采用点压法对两组大鼠的软骨下骨进行了生物力学测试, 结果显示激素实验组与空白对照组相比, 弹性模量、轴向刚度明显下降; 相同负荷下, 激素实验组位移、应变显著增大(见表 3)。激素实验组的生物力学性能与空白对照组相比较, 抗压强度低 14%, 弹性模量低 26%, 轴向刚度低 25%, 统计显示具有显著性差异 ($P<0.01$)。

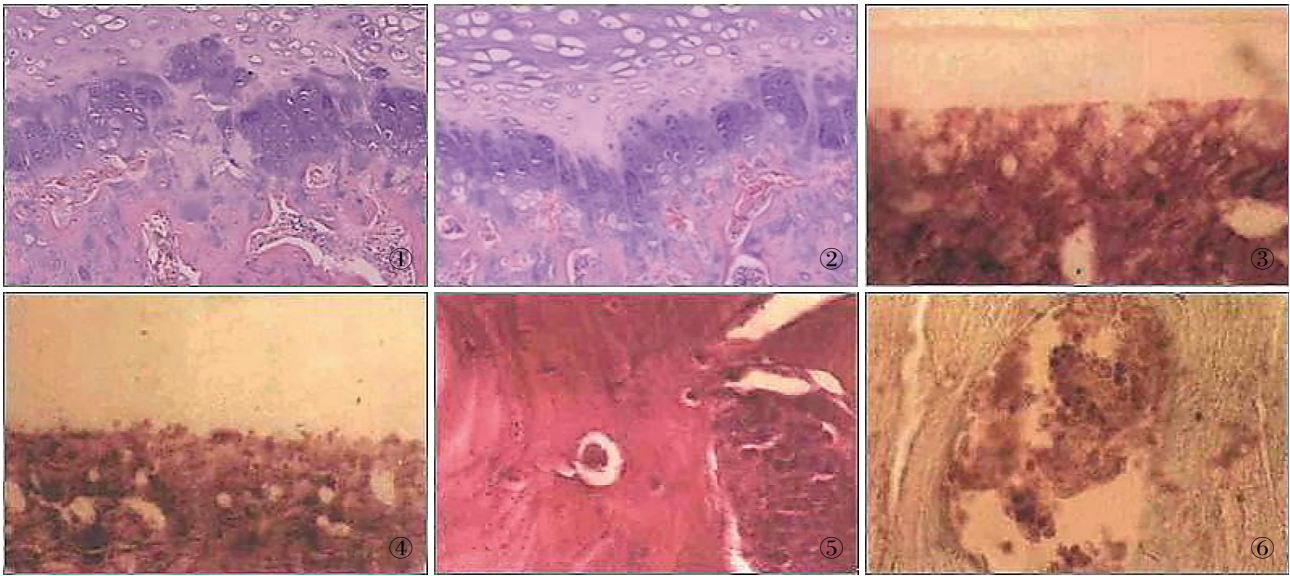


图 1 实验组承重区软骨细胞及软骨下层骨髓腔,骨骺线断裂区 HE×100 图 2 实验组承重区软骨细胞及软骨下层骨髓腔,骨骺线反凹处 HE×100 图 3 实验组软骨下骨出现圆形或椭圆形的不着色或大片的淡染区域 茜红素染色×100 图 4 实验组软骨下骨染色明显减低、着色紊乱、不均匀 茜红素染色×100 图 5 实验组局部骨髓内出现大量多核巨细胞,邻近骨质内有多个骨吸收陷窝 HE×100 图 6 实验组不脱钙切片,局部增殖的多核细胞为 TRACP+ TRACP 染色×100

Fig.1 Experimental group: cartilage cell, subchondral medullary canal and epiphyseal line breakage of weight bearing area HE×100 Fig.2 Experimental group: cartilage cell, subchondral medullary canal and epiphyseal line antifossa of weight bearing area HE×100 Fig.3 Experimental group: round and elliptical uncoloration and olisterozone area of subchondral bone alizarin carmine stain ×100 Fig.4 Experimental group: decrease, derangement and uneven color of subchondral bone alizarin carmine stain ×100 Fig.5 Experimental group: a large amount of multinucleated giant cell and absorption lacuna in the local bone marrow HE×100 Fig.6 Experimental group: undecalcification section, apocyte of local multiplication is TRACP+ TRACP stain ×100

表 3 软骨下骨生物力学参数测定(̄x±s)

Tab.3 Vitodynamics test of subchondral bone(̄x±s)

项目	空白对照组	激素实验组
载荷 Pb(N)	354.06±29.01	289.99±20.30*
位移 Δ(mm)	1.82±0.12	2.21±0.16*
应力 σb(MPa)	69.97±5.72	57.31±4.02*
应变 ε(%)	0.46±0.04	0.57±0.03*
弹性模量 E(MPa)	143.75±11.22	100.54±7.04*
轴向刚度 EF(N/mm)	186.25±15.44	131.22±9.19*

注:与对照组比较,*P<0.01

Note:Compared with control group,*P<0.01

载荷-位移关系:空白对照组软骨下骨在载荷作用下,从典型载荷-位移曲线上看到,从软骨到界面接触压有一个“屈服”现象,而后达到最大载荷点软骨下骨破裂,破裂以后载荷就开始下降。激素实验组软骨下骨的生物力学参数下降明显,表现在载荷-位移曲线达到最大载荷后,会出现急剧下降,不像空白对照组软骨下骨对抗压缩力“坚持”的曲线,韧性差(见图 7-8)。

3 讨论

本实验选用醋酸强的松龙^[2]诱导激素性股骨头坏死模型,探究激素性股骨头坏死塌陷与脂质代谢、破骨细胞活性的相关性。股骨头坏死的发生机制:大肠杆菌内毒素引起高凝血状

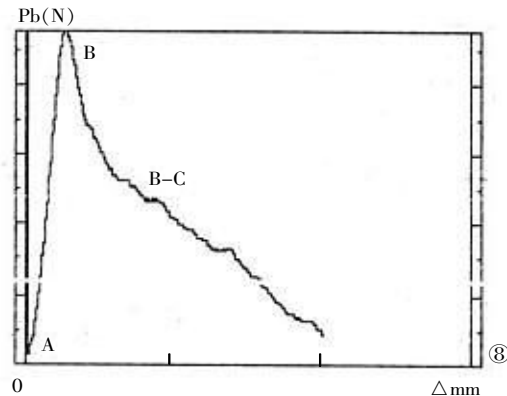
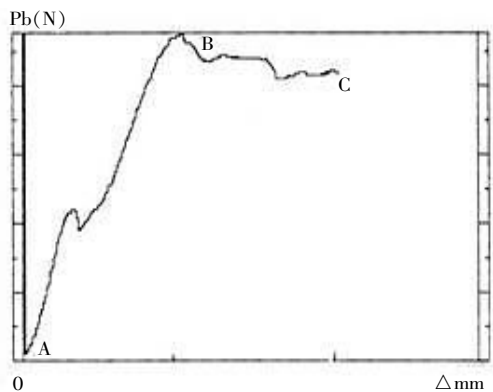


图 7 对照组软骨下骨载荷-位移曲线 图 8 实验组软骨下骨载荷-位移曲线

Fig.7 Control group:load-displacement curve of subchondral bone Fig.8 Experimental group:load-displacement curve of subchondral bone

态,醋酸强的松龙增加了大肠杆菌内毒素的全身 Schwartz-man 反应^[3],并引起骨细胞的脂肪变性^[4]和高脂血症^[5],最终导致了股骨头坏死。与其他骨坏死模型相比,该动物模型有更典型的骨坏死的病理表现。

3.1 股骨头坏死与脂质代谢异常 本实验中实验组血清甘油三酯、总胆固醇含量与对照组相比明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$)。光镜下可见实验组大鼠髓腔内充满肥大的脂肪细胞,出现脂肪堆积现象,红骨髓明显减少。这表明醋酸强的松龙通过某种途径引起了高脂血症和股骨头的骨髓脂肪化。有研究表明,糖皮质激素能诱导骨髓基质细胞向脂肪细胞分化,减少向成骨细胞分化^[6-7],同时可以刺激骨母细胞样细胞转化为脂肪细胞^[8]。殷力等^[9]通过对小鼠原代骨髓基质细胞的研究发现糖皮质激素能够诱导骨髓基质细胞表达脂肪特异性基因 aP2 mRNA,同时降低成骨基因 I 型胶原 mRNA 表达。Li 等^[10]也从基因调控水平进一步证实激素能够诱导骨髓基质细胞直接向脂肪细胞分化,减少向成骨细胞分化。本实验中激素给药后诱导股骨头内骨髓基质细胞大量分化为脂肪细胞,由于股骨头髓腔是一个半封闭的空间,造成髓内脂肪组织堆积引起骨内高压,导致股骨头内微循环障碍,大量骨细胞缺血缺氧而死亡。同时,成骨分化减少,使骨修复过程缓慢,加速了股骨头坏死的发生;另一方面激素的使用引起高脂血症,导致骨内血管栓塞,引起血管供应区域的骨组织缺血。这两方面的原因最终导致股骨头缺血坏死。

3.2 股骨头坏死塌陷与破骨细胞活性 我们采用点压法对软骨下骨进行生物力学测试结果显示:实验组与对照组相比较,抗压强度、弹性模量、轴向刚度均显著下降($P<0.01$)。为明确实验组大鼠的软骨下骨生物力学性能下降的原因我们进行了组织学和大体标本两种方法的骨密度检测,并对骨密度值进行比较。股骨头标本茜红素染色观察:实验组股骨头部出现严重的骨质丢失,软骨下骨尤为显著。组织病理切片显示:股骨头结构破坏,骨骺板明显内凹,有折弯改变。骨小梁粗细不均,排列欠规则,干骺端存在骨小梁结构中中断缺损,出现骨小梁的空缺区域。骨密度测试结果:实验组股骨头部和干部骨密度降低。同时 TRACP 染色显示:实验组股骨头部出现大量破骨细胞和骨吸收陷窝,抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 是反映破骨细胞活性和骨吸收状态的敏感指标,实验组血清中抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 的含量与对照组相比显著增高,差异有统计学意义($P<0.01$),这说明实验组激素用药后促进了股骨头局部破骨细胞的活性增强、数量增加,导致局部骨吸收增加。对于正常骨骼形态、骨质代谢,骨吸收与骨合成的动态平衡起着决定性作用,骨吸收能力增强直接导致局部骨质丢失和骨密度下降。因而软骨下骨出现严重的骨质丢失,骨小梁结构中中断缺损,局部力学性能严重降低,软骨下骨力学性能降低与股骨头塌陷有直接关系^[11],在机械力的作用下,发生微细骨折,随着

病程发展最终软骨下骨断裂出现股骨头塌陷^[12]。

综上所述:①激素用药后,出现高脂血症和股骨头的骨髓脂肪化,导致股骨头坏死;脂质代谢紊乱是激素性股骨头坏死重要的发病机制。②破骨细胞活性增强、数量增加,引起骨质严重丢失导致的软骨下骨生物力学性能下降是股骨头塌陷的直接原因。

对于激素性股骨头坏死,如果能降低血脂水平,抑制破骨细胞的活性和数量,减少软骨下骨的骨质丢失,则能够很好的预防股骨头坏死塌陷的发生。

参考文献

- [1] 施新猷,王四旺,顾为望,等. 比较医学. 西安:陕西科学技术出版社,2003. 234-235.
- [2] Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, et al. Effects of different corticosteroids on the development of osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(3):332-336.
- [3] Kim HK. Introduction to osteonecrosis of the femoral head and osteonecrosis of the jaw. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2007, 7(4):350-353.
- [4] Peled E, Bejar J, Zinman C, et al. Vasculature deprivation-induced osteonecrosis of rats' femoral heads associated with the formation of deep surface depressions. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2007, 127(5):369-374.
- [5] Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(11):2055-2064.
- [6] Kim HK, Sanders M, Athavale S, et al. Local bioavailability and distribution of systemically (parenterally) administered ibandronate in the infarcted femoral head. *Bone*, 2006, 39(1):205-212.
- [7] Cui Q, Wang CJ, Balian C, et al. Steroid induced adipogenesis in a pluripotential cell line from bone marrow. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1997, 79:1054-1063.
- [8] Kim HK, Randall TS, Bian H, et al. Ibandronate for prevention of femoral head deformity after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in immature pigs. *J Bone Joint Surg (Am)*, 2005, 87(3):550-557.
- [9] 殷力,李月白,许建中,等. 地塞米松调节骨髓基质细胞成脂分化及成骨分化的研究. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(6):557-558.
- [10] Li X, Jin L, Cui Q, et al. Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression. *Osteoporos Int*, 2004, 15:1.
- [11] Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, et al. Effects of different corticosteroids on the development of osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(3):332-336.
- [12] Conzemi MG, Brown TD, Zhang Y, et al. A new animal model of femoral head osteonecrosis: one that progresses to human-like mechanical failure. *J Orthop Res*, 2002, 20(2):303-309.

(收稿日期:2008-10-13 本文编辑:李为农)