

建立幼犬股骨头坏死模型的实验研究

官建中¹, 周建生¹, 肖玉周¹, 刘振华¹, 郭冰沁², 张俊祥³

[摘要]目的: 为研究 Perthes病治疗建立理想的动物模型。方法: 采用健康未成年杂种犬 20 只, 随机分为两组, 一组每周肌肉注射甲基强的松龙 (16 mg/kg) 2 次; 另一组用液氮冷冻股骨头, 术后定期行 X 线、MRI、ECT 检查, 并取股骨头行组织切片了解股骨头坏死情况。结果: 两实验组均出现股骨头缺血性坏死, 激素组第 4 周复制成功率为 40.0%, 第 8 周成功率为 75.0%, 总成功率为 55.6%; 而液氮冷冻组第 4 周复制成功率为 90.0%, 第 8 周成功率为 100.0%, 总成功率 95.0%。结论: 单独使用激素或液氮冷冻股骨头均可建立幼犬股骨头坏死模型, 但单用激素并非一定引起股骨头坏死。液氮冷冻建立的幼犬股骨头坏死可作为研究 Perthes 病治疗的理想动物模型。

[关键词] 股骨头坏死; 糖皮质激素; 犬; 冷冻; 动物模型

[中国图书资料分类法分类号] R 681.8 [文献标识码] A

An experiment study on establishment of the animal model for osteonecrosis of femoral head in young dogs

GUAN Jian-zhong¹, ZHOU Jian-sheng¹, XIAO Yu-zhou¹, LIU Zhen-hua¹, GUO Bing-qin², ZHANG Jun-xiang³

(1. Department of Orthopedics, 3. Department of Radiology, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004
2. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] Objective: To establish the ideal animal model for the study of Perthes disease. Methods: Twenty healthy young dogs were randomly divided into two groups. Dogs in one group were injected into muscle with methylprednisolone twice a week for 2 months. Dogs in other groups were frozen by liquid nitrogen. X-ray, MRI, ECT and histology examination were made periodically after experiment to evaluate osteonecrosis. Results: Necrosis of the femoral head in 4th and 8th week was confirmed in two experiment groups. The success rates were 40.0% in 4th week and 75.0% in 8th week with the methylprednisolone group while in the liquid nitrogen group the success rates were 90.0% in 4th week and 100.0% in 8th week. Conclusions: The model of Perthes disease could be built up by steroid injection or liquid nitrogen in young dogs, but not all the dogs model can be built by steroid injection. The animal model of Perthes disease with liquid nitrogen in young dogs can be established.

[Key words] femur head necrosis; glucocorticoid; dogs; freezing; animal model

[收稿日期] 2006-02-28

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究计划项目 (2004k275)

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院 1. 骨科, 3 影像中心, 安徽 蚌埠 233004; 2 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 官建中 (1973-), 男, 主治医师。

儿童股骨头坏死 (Perthes 病) 是骨科领域颇为棘手的问题之一, 其病理过程复杂, 治疗方法的选择及其疗效存在很大争议^[1]。建立理想的 Perthes 病动物模型, 是研究 Perthes 病病因及发病机制十分重要的手段, 也是进行治疗研究的基础^[2]。本文在总

- [9] Xiaowen H, Shuhan S, Zhenlin H, et al. Augmented humoral and cellular immune responses of a hepatitis B DNA vaccine encoding HbsAg by protein boosting. *J. Vaccine* 2005; 23 (14): 1 649-1 656
- [10] Wang QM, Sun SH, Hu ZL, et al. Immune response and protection elicited by DNA immunisation against Taenia cysticercosis. *J. Vaccine* 2003; 21 (15): 1 672-1 680
- [11] Robinson HL. DNA vaccines: Basic mechanism and immune responses (Review). *J. Int J Mol Med* 1999; 4 (5): 549-555
- [12] Gregoradis G. Genetic vaccines: Strategies for optimization. *J. Pharm Res* 1998; 15 (5): 661-670
- [13] Wolff JA, Dowty ME, Jiao S, et al. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J. J Cell Sci* 1992; 103 (Pt 4): 1 249-1 259
- [14] Lew D, Parker SE, Latimer T, et al. Cancer gene therapy using plasmid DNA. *J. Hum Gene Ther* 1995; 6 (5): 553-564
- [15] Gauci CG, Flisser A, Lightowers MW. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to 45W antigen of *Taenia ovis*. *J. Mol Biochem Parasitol* 2001; 112 (2): 173-181
- [16] Harrison GB, Heath DD, Dempster RP, et al. Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres. *J. Int J Parasitol* 1996; 26 (2): 195-204
- [17] Dempster RP, Robinson CM, Harrison GB. Parasite vaccine development. *J. Parasitol Res* 1996; 82 (4): 291-296
- [18] 方强, 孙新, 夏惠, 等. 猪带绦虫六钩蚴期特异性抗原基因真核表达质粒 pDNA3-1/TSO45-4B 的构建. *蚌埠医学院学报*, 2006; 31 (4): 334-335.

结前人成功经验的基础上,对单纯应用激素和液氮冷冻股骨头两种建立股骨头坏死动物模型方法进行对比分析,拟探索建立 Perthes病的动物模型的有效方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料 20只 1月龄健康杂种犬,雌雄不限,体重 (1.3 ± 0.2) kg,所有动物均由蚌埠医学院动物实验中心提供,按统一标准饲养,随机分成两组,每组各为 10只实验动物,实验前经 MR 检查髋关节证实双侧股骨头均为正常表现,幼犬适应 1周后开始实验。

1.2 实验方法

1.2.1 液氮冷冻建立幼犬股骨头坏死模型 10只幼犬均用 3% 硫喷妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉,无菌操作下取髋关节前外侧斜短切口,逐层切开显露股骨头,并脱出之,再用相当于花生米大小的纱布团蘸液氮即刻冷冻股骨头上端,持续 10 s,然后用温盐水复温,反复 2~3次,股骨头回位后分层缝合,术后青霉素 4万 U 肌肉注射(肌注) 2次/日,连续 3天以预防感染。

1.2.2 肌注激素建立幼犬股骨头坏死模型 10只幼犬每周肌注甲泼尼龙 2次, 16 mg/kg 给药后正常饲养。

1.3 观察项目

1.3.1 X线检查 分别于初始实验后第 2、4、6、8周摄标准正蛙式位 X线片,观察股骨头密度及关节面改变情况。

1.3.2 MR 检查 于初始实验后第 2、4、6、8周在 3% 硫喷妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉状态下行髋关节的 MR 检查,观察股骨头及髋关节囊周围的信号改变。

1.3.3 ECT检查 在 3% 硫喷妥钠麻醉下自前肢静脉注射 $^{99m}\text{Tc-MDP}$ 1.0 mg/kg 即刻采集动态像及 3 h 后局部静态像,并对单位投照野的股骨头正位片核素静态相采用计算机核素计数处理,了解局部血供情况。

1.3.4 组织学检查 分别于实验后第 4周随机处死 5只实验犬,8周时处死剩余实验犬,取双侧股骨头,常规固定脱钙,石蜡包埋,切片后苏木精-伊红(HE)染色,计算骨小梁面积百分数

1.4 统计学方法 采用 检验。

2 结果

两实验组均各为 10只犬,激素组有 1只幼犬在 5周时因肺部感染死亡,实际完成实验动物为 9只,18个股骨头。

2.1 影像学观察

2.1.1 X线检查 实验 2周时所有实验动物正蛙式位片示双侧股骨头均无明显变化,4周时激素组有 3个股骨头(10只)关节面下有透亮区或密度增高,液氮冷冻组有 15个股骨头(10只)密度有异常改变。8周时激素组有 4个股骨头(4只)密度发生改变,而液氮冷冻组有 8个股骨头(5只)密度改变。

2.1.2 MR 检查 液氮冷冻组在 4周时 9个股骨头(10只)呈现片状 T₁、T₂信号异常(T₁低信号, T₂高信号),14个髋关节腔不同程度积液;第 8周时 7个股骨头(5只)呈 T₁、T₂信号异常,9个髋关节腔内积液。激素组第 4周时 4个股骨头(10只)呈现片状 T₁、T₂信号异常,9个髋关节腔内有积液,8周时 2个股骨头(4只)呈信号异常,3个伴关节腔内积液增多。

2.2 ECT检查 造模 4周时 ECT扫描两实验组没有明显差异,第 8周时液氮冷冻组股骨头放射性核素分布明显减低,坏死病灶区放射性缺损清晰可见;而激素造模组表现为股骨头放射性核素分布减低,但未见明显的放射性缺损区。两实验组股骨头静态相核素计数差异有统计学意义($P < 0.01$)提示液氮冷冻组股骨头局部血供较激素模型组差(见表 1)。

2.3 组织学检查 造模 4周时各组随机处死 5只共 10个股骨头,发现股骨头的大体形态基本完好,HE染色光镜观察液氮组 9个股骨头,激素组 4个股骨头出现典型坏死,表现不同程度骨小梁坏死,稀疏,有断裂现象,可见大量空虚的骨陷窝,骨髓内脂肪细胞破裂。8周时液氮组 10个股骨头,激素组 6个股骨头呈现典型坏死表现,镜下见大量空虚的骨陷窝,骨髓组织坏死,骨小梁崩解,紊乱,纤维组织增生明显(见表 2)。各组股骨头骨小梁面积百分数差异有统计学意义(见表 3)。

表 1 造模 8周后各组股骨头 ECT表现和核素计数比较

组别	n (股骨头数)	放射性 核素浓聚	放射性 核素稀疏	放射性 缺损	核素计数 ($\bar{x} \pm s$)
液氮组	10	1	9	4	966.10 ± 211.25
激素组	8	0	5	0	1272.38 ± 362.83*
合计	18	1	14	4	—

检验: $t=2.25$ * $P < 0.05$

表 2 股骨头缺血坏死模型制作的成功率

处死时间 (周)	处死动物数		股骨头坏死数		模型制作成功率(%)	
	激素组	液氮组	激素组	液氮组	激素组	液氮组
4	5	5	4	9	40.0	90.0
8	4	5	6	10	75.0	100.0
合计	9	10	10	19	55.6	95.0

表 3 造模后的股骨头结构改变 ($\bar{x} \pm s$)

组别	4周		8周	
	股骨头个数(n)	骨小梁面积(%)	股骨头个数(n)	骨小梁面积(%)
液氮组	10	34.0 \pm 3.65	10	30.40 \pm 4.88
激素组	10	41.4 \pm 3.78	8	38.25 \pm 5.50
t	—	4.45	—	3.21
P	—	<0.01	—	<0.01

3 讨论

Perthes病真正的病因尚未明了,但所有股骨头坏死基本病理变化一致,即股骨头坏死与修复,首先是骨细胞坏死,随后是修复反应^[3]。目前国内外报道股骨头坏死动物模型的建立主要有以下几种方法:通过酒精灌胃诱导股骨头无菌性坏死^[4];通过肌肉注射激素诱导股骨头无菌坏死^[5];通过盐酸、氢氧化钠依次注入股骨头诱导无菌性坏死^[6];采用液氮冷冻股骨头以制作股骨头坏死模型^[7]。但最常应用的是激素诱导或液氮冷冻制作股骨头坏死动物模型。本实验即是对这两种模型制作方法进行对比分析。

Beresford^[8]已证实,激素可以诱导骨髓基质细胞分化为脂肪细胞,并减少其向成骨细胞分化,骨髓内脂肪细胞的肥大增生是激素直接作用的结果。同时,骨细胞内脂滴形成,软骨下骨及血管的脂肪消除能力下降,由于自由脂滴对血管内皮的损伤,使血管中产生血栓或出血,脂肪细胞的增加可以导致骨内压增高,而血管的损伤则可以直接导致骨坏死。本实验观察到,激素组部分股骨头出现骨坏死表现,虽然早期在X线上难以出现阳性结果,但在MR可见异常信号,出现骨髓水肿、关节积液增多。组织学观察到8周时见大量空虚的骨陷窝,骨髓内脂肪细胞坏死、破裂,骨小梁稀疏,血管内血栓形成。因此,激素可以造成骨坏死,但骨坏死的形成可能受个体差异等因素的影响,所需时间较长,有的还未出现骨坏死,成功率较低(55.6%),因而只适合于病因方面发病机制研究,而不适合于治疗方面研究,这与杨述华等观点一致^[9]。

液氮冷冻幼犬股骨头制作股骨头坏死动物模型的机制为液氮即刻冷冻股骨头可引起股骨头内血管痉挛,血管内凝血及血管内皮细胞损伤,继发血管通透性增加,股骨头髓内出血,复温后血管再通诱发缺血再灌注损伤,最终导致骨坏死。本组实验中,4周时股骨头(9/10)、8周时股骨头(10/10)出现骨坏死表现,4周时组织学切片观察到坏死区有修复反应。且液氮冷冻组与激素组在实验4周时骨小梁面积百分数差异有统计学意义($P < 0.01$),实验8周时两组股骨头ECT扫描静态相核素计数及组织学股骨头骨小梁面积百分比差异均有统计学意义($P < 0.01$),说明液氮冷冻组制作的动物模型更优于激素模型组。此外,液氮冷冻还不同于其他方法造成的坏死,它不会残留化学物质,且对动物全身无毒副作用,造模所需时间短,模型坏死成功率高(95.0%),动物死亡率低,可重复性强。因此,我们认为利用液氮冷冻建立幼犬股骨头坏死的模型可作为模拟临床手术清除死骨、植骨治疗研究的动物模型,较其他方法制备的模型更适合于Perthes病治疗的研究。

[参考文献]

- [1] Lieberman JR, Berry DJ, Mont MA, et al. Osteonecrosis of the hip: Management in the twenty-first century [J]. Instr Course Lect 2003; 52(5): 337-355.
- [2] Rosenwasser MP, Garino P, Kijman HA, et al. Long term follow-up of thorough debridement and cancellous bone grafting of the femoral head for avascular necrosis [J]. Clin Orthop 1994; 306(1): 17-27.
- [3] Hungerford DS, Lennox DW. Ischemic necrosis of the femoral head: Insurgency of the musculoskeletal system [M]. New York: Churchill Livingstone 1990; 2: 757-2: 794.
- [4] 王义生, 毛克亚, 李月白, 等. 酒精性股骨头缺血性坏死发病机理的实验研究 [J]. 中华骨科杂志, 1998; 18(4): 231-233.
- [5] 薛元锁, 时述山, 李亚非, 等. 激素性股骨头坏死病程中骨形态发生蛋白-2的改变及其意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2000; 17(5): 455-456.
- [6] 杨明亮, 罗先正, 王正明. 实验性动物股骨头坏死模型的制备及其病理生理机制 [J]. 中国骨伤, 2000; 13(4): 207-208.
- [7] Conzanius MG, Brown TD, Zhang Y, et al. A new animal model of femoral head osteonecrosis: One that progresses to human like mechanical failure [J]. J Orthop Research 2002; 20(2): 303-309.
- [8] Beresford N, Bennett JH, Devlin C, et al. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures [J]. J Cell Science 1992; 102(3): 341-351.
- [9] 杨述华, 杨操, 许伟华, 等. 液氮冷冻建立兔股骨头缺血性坏死模型 [J]. 中国矫形外科杂志, 2001; 8(1): 48-49.