

丹参骨髓腔内注射对兔股骨头坏死破骨细胞数量的影响

瓦庆德, 张天宏*, 李振威, 洪嵩

(遵义医学院第一附属医院, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的: 复制激素性股骨头坏死动物模型, 观察兔破骨细胞数量, 从分子水平探讨丹参注射液骨髓腔内注射预防激素性股骨头缺血性坏死的可行性及机制。方法: 选用家兔 30 只, 随机分为对照组、模型组、丹参注射液预防组, 每组 10 只。糖皮质激素诱导兔激素性股骨头坏死动物模型, 造模同时预防组行骨髓腔内注射丹参注射液, 每侧 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每周 2 次, 连续 8 周。8 周后观察 3 组家兔破骨细胞数量及组织病理学的改变。结果: 预防组能有效的降低破骨细胞数量及股骨头空骨陷窝率。结论: 丹参骨髓腔内注射可抑制破骨细胞生成, 对早期激素性股骨头缺血性坏死有预防作用。

[关键词] 股骨头缺血性坏死; 糖皮质激素; 髓腔内注射; 丹参; 破骨细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0176-03

Influence of Intramedullary Given with *Salvia miltiorrhiza* Injection on Osteoclast of Steroid-induced Necrosis of Femoral Head in Rabbit

WA Qing-de, ZHANG Tian-hong*, LI Zhen-wei, HONG Song

(Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[Abstract] **Objective:** To copy the rabbit model of necrosis of the femoral head, observe the number of osteoclasts, study the feasibility and mechanism of intramedullary injection with *Salvia miltiorrhiza* injection for preventing of steroid-induced necrosis of the femoral head at the molecular level. **Method:** Thirty rabbits were randomly divided into three groups: control group, model group, prevention group, 10 in each group. Glucocorticoid-induced rabbit model of femoral head necrosis was prepared. While making the models, the prevention group has received bone marrow cavity intramedullary injection with *Salvia miltiorrhiza* at a dose of $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ twice a week for 8 weeks. 8 weeks later, the number of osteoclasts and histopathological changes in three groups of rabbits were observed. **Result:** The prevention group could effectively reduce the number of osteoclasts and the rate of empty lacunae femoral head. **Conclusion:** *Salvia miltiorrhiza* injection plays a good effective role in the prevention of steroid-induced avascular necrosis of femoral head through inhibiting osteoclast formation.

[Key words] avascular necrosis of femoral head; glucocorticoid; intramedullary injection; *Salvia miltiorrhiza*; osteoclast

股骨头缺血性坏死 (avascular necrosis of femoral head, ANFH) 是临床常见病, 其发病率和致残率高, 是骨科界三大难治症之一^[1]。临床治疗分非手术治

疗与手术治疗两大类, 但目前尚未有理想的预防及治疗方法。骨组织通过骨的吸收与再生完成不断的更新, 其中骨的吸收与再生则是通过破骨细胞与成骨细胞的作用来实现^[2]。本实验以兔为对象, 诱导激素性股骨头坏死动物模型, 探讨骨髓腔内注射丹参对破骨细胞数量变化的影响及其作用机制, 为临床防治股骨头坏死提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型的制备 健康家兔 48 只, 雌

[收稿日期] 2010-08-31

[第一作者] 瓦庆德, 研究方向: 股骨头坏死, 主治医师, Tel: 13984203817, E-mail: waqingde887gk@vip.163.com

[通讯作者] * 张天宏, 主任医师, 硕士生导师, 从事股骨头坏死研究, Tel: 13809433744, E-mail: zth0118@126.com

雄各半, 6 月龄, 体重 (2.5 ± 0.25) kg, 由遵义医学院动物实验中心提供。适应性喂养 1 周, 精确称重, 随机分为 3 组, 每组 16 只, 按贺西京等^[3]的方法造模。对照组 im 生理盐水, 每次 0.32 mg·kg⁻¹ (盐重量), 每周 2 次; 模型组 im 醋酸泼尼松龙, 每次 7.5 mg·kg⁻¹, 每周 2 次; 预防组造模同时双侧股骨头在全麻下, 采用髂骨穿刺针在股骨第三转子尖下方 0.3 ~ 0.5 cm 处由外向内上方穿入后注入丹参注射液, 每侧 0.4 mg·kg⁻¹, 每周 2 次, 均连续用 8 周。全部动物 im 青霉素钠 5 万 U/只和硫酸链霉素 100 mg/只, 每周 2 次, 共 8 周, 以预防感染。

1.2 破骨细胞体外培养 造模成功后, 从 3 组中各随机抽取 8 只动物, 无菌条件下分离其股骨, 放入含 HEPES 缓冲液的 199 培养液 (加含有 15% 胎牛血清和适量的抗生素) 的培养皿中, 去净软组织和骨膜后纵行剖开, 将股骨头及骨髓刮入培养液中并用吸管吹打均匀, 37 ℃ 水浴静置 30 min 使骨碎片沉降。取 6 孔培养板, 每孔加 1 mL DMEM 全培养液及 1 个无菌盖玻片, 置二氧化碳培养箱, 于 37 ℃, 5% CO₂ 预孵育 1 h, 然后加入兔破骨细胞悬液, 5% CO₂ 条件下培养 3 h 后, 冲洗去未贴壁细胞, 保留 1/5 旧培养液, 换以同体积 DMEM 全培养液继续培养。首次 8 h 后换液, 而后每 12 h 换液, 每次换液后在倒置显微镜下观察细胞形态、运动及贴壁情况。

1.3 破骨细胞的鉴定 TRAP 染色试剂盒 (Sigma) 染色: 5 d 后取出细胞爬片, PBS 缓冲液冲洗 2 遍, 固定液固定 1 min, 流水冲洗 2 min, 晾干后滴加作用液并将其置于 37 ℃ 湿盒内孵育 1 h, 取出冲洗 2 min, 最后酸化乙醇氨水各浸 1 ~ 5 s, 蒸馏水冲洗至细胞核变为蓝色, 晾干, 倒置显微镜观察、摄片。在 200 倍镜下随机选取 3 个视野计数, 核红染者即为破骨细胞。

1.4 股骨头组织病理学观察 每组动物剩余的 8 只全部处死, 取双侧股骨头。将股骨头沿冠状面中间剖开, 洗净, 放入 10% 中性福尔马林缓冲液中固定 1 周, 5% 硝酸脱钙 5 ~ 7 d, 流水冲洗 24 h, 系列梯度酒精脱水, 常规石蜡包埋, 作 4 ~ 6 μm 连续切片, HE 染色, 光学显微镜观察。读片区为软骨下区, 观察股骨头骨小梁、骨细胞、髓腔及脂肪细胞形态、结构及数量的变化; 高倍镜下任选 10 个视野, 每个视野计数 50 个骨陷窝, 分别数出空缺的骨陷窝数, 求出空骨陷窝率 (取双侧平均值)。

1.5 统计学处理 使用 SPSS17.0 统计软件, 破骨细胞数量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 破骨细胞鉴定及计数 细胞培养 5 d 后, 空白组破骨细胞数量正常, 模型组则明显增多, 丹参注射液预防组较模型组有明显降低。见图 1, 表 1。

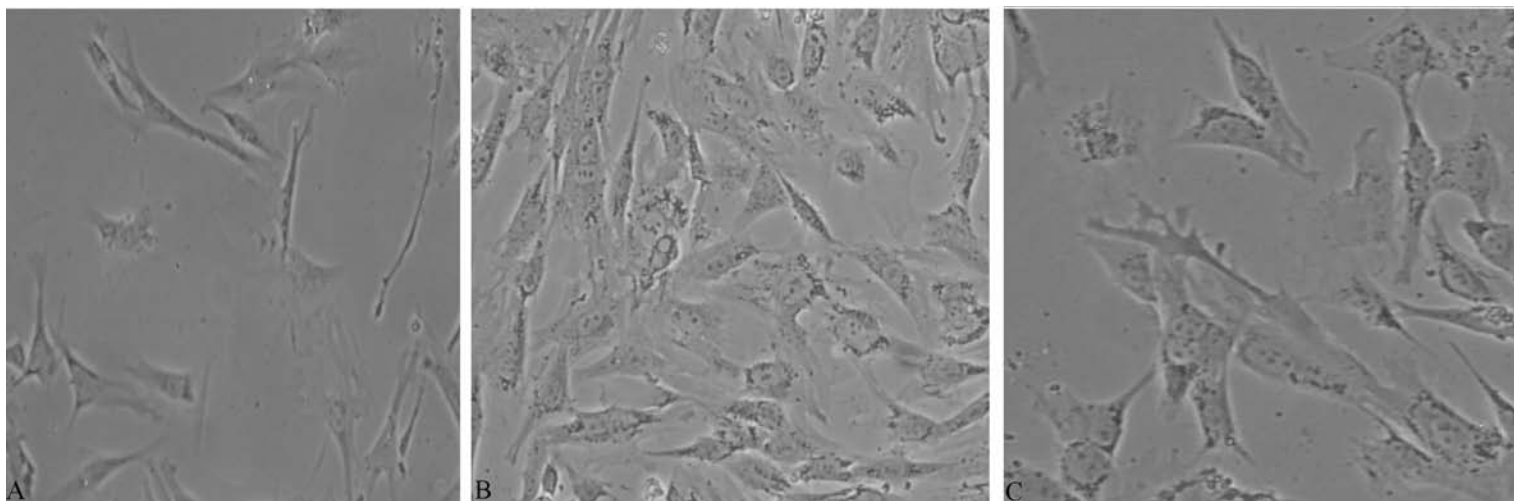


图 1 各组破骨细胞照片 (×200)

A. 空白组; B. 模型组; C. 丹参注射液 0.4 mg·kg⁻¹ 骨髓腔内注射 2 次/周预防组 (图 2 同)。

表 1 丹参注射液骨髓腔内注射给药 8 周对股骨头破骨细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / mg·kg ⁻¹	破骨细胞数 / 个
对照	-	3.63 ± 1.30 ¹⁾
模型	-	7.63 ± 2.13
丹参注射液	0.4	4.00 ± 0.93 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$; 丹参注射液给药次数 2 次/周 (表 2 同)。

2.2 股骨头组织病理学观察 对照组股骨头骨小梁致密, 排列规则, 陷窝内骨细胞数量多, 细胞核较大, 偶见空骨陷窝; 髓腔增生活跃, 造血细胞丰富, 脂肪细胞体积及数量正常。模型组股骨头骨小梁稀疏, 结构紊乱, 空骨陷窝数量较对照组明显增多; 骨髓出现较多坏死、溶解现象, 造血细胞减少, 脂肪细胞增多, 体积增大。丹参注射液组骨小梁介于对照

组和模型组之间,排列较规则,空骨陷窝数量较模型组明显减少;髓腔增生有一定恢复,脂肪细胞数量及

体积较模型组减少。见图 2,表 2。

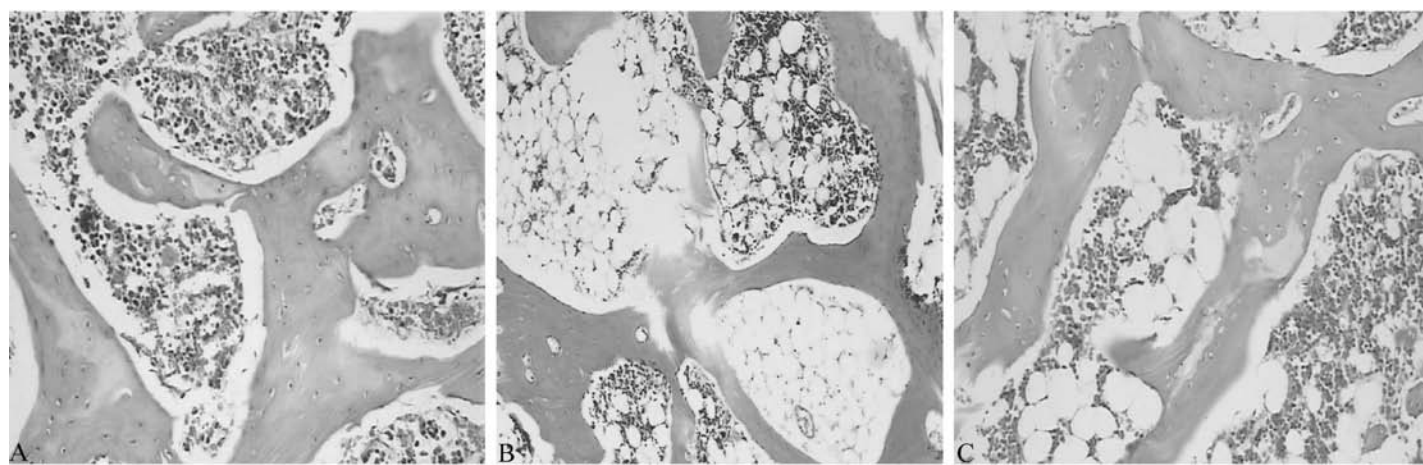


图 2 各组兔股骨头病理组织切片(HE 染色, ×40)

表 2 丹参注射液骨髓腔内注射给药 8 周对股骨头空骨陷窝率的影响(±s, n=8)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	空骨陷窝率 /%
对照	-	9.50 ±1.41 ¹⁾
模型	-	31.88 ±2.59
丹参注射液	0.4	11.63 ±2.56 ¹⁾

3 讨论

本试验组织病理学观察显示模型组股骨头骨小梁稀疏,结构紊乱,空骨陷窝数量较对照组明显增多,说明模型复制成功。与作者之前的研究结果一致,且之前还从 X 线、发射型计算机断层扫描(ECT)及血脂和血钙血磷测定等方面进行了研究^[4]。破骨细胞来源于骨髓或脾脏中的造血干细胞,经血液循环运送至骨骼,在多种细胞因子及成骨细胞(osteoblast, OB)的诱导下,分化、融合为成熟的多核破骨细胞^[5]。相关研究表明,激素能使血中皮质醇增高,使成骨细胞数量减少,活性下降;另一方面,激素直接刺激破骨细胞活性,使甲状腺素分泌增多,肠道吸收的钙量减少,而肾对钙、磷的排泄增加,从而导致骨吸收增加。Bjar J 等^[6]对鼠股骨头坏死动物模型的研究发现,其造模后有破骨细胞的活性增高,参与骨的吸收。Kim H/K 等^[7]对猪股骨头坏死动物模型的研究发现,在股骨头塌陷的整个过程中,都存在破骨细胞对骨的吸收,从而加快塌陷的进程。本实验结果显示,骨髓腔注射丹参注射液能有效降低空骨陷窝率及降低破骨细胞数量,说明丹参可部

分抑制破骨细胞数量及活性,从而对股骨头坏死有一定的防治作用。

[参考文献]

- [1] 朱盛修. 股骨头缺血性坏死诊疗学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1999: 306.
- [2] 袁浩, 李雄, 何伟, 等. 生脉成骨胶囊预防激素性股骨头缺血性坏死的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 1999, 7(4): 8.
- [3] 贺西京, 毛履真, 王坤正, 等. 肾上腺皮质激素引起股骨头缺血性坏死的机制实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1992, 12(6): 440.
- [4] 瓦庆德, 张天宏, 刘毅. 丹参骨髓腔内注射预防激素性股骨头坏死的可能性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(50): 9884.
- [5] Middleton J, Arnott N, Walsh S, et al. Osteoblasts and osteoclasts in adult human osteophyte tissue express the mRNAs for insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor[J]. Bone, 1995, 16(3): 287.
- [6] Bejar J, Misselevich I, Peled E, et al. Pyogenic granuloma-like reaction in the necrotic vessels-deprived femoral head of the rat[J]. Exp Mol Pathol, 2005, 78(2): 140.
- [7] Kim H K, Su P H. Development of flattening and apparent fragmentation following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in a piglet model[J]. J Bone Joint Surg Am, 2002, 84(8): 1329.

[责任编辑 何伟]