



股骨头坏死动物模型研究进展

张成龙¹, 尹华¹, 章建华²

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006)

【摘要】 股骨头坏死是一种临床症状重、致残率高的疾病,为研究其发病机制和治疗方法,学者们在该疾病的动物模型研究上做出不懈努力,本文就近年来股骨头坏死动物模型的研究做一综述。

【关键词】 股骨头坏死; 动物模型; 激素

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013)03-0058-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.03.015

Advances in research on animal models of osteonecrosis of femoral head

ZHANG Cheng-long¹, YIN Hua¹, ZHANG Jiang-hua²,

(1. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Chinese Medical University First Affiliated Hospital, Hangzhou 310006, China)

【Abstract】 Osteonecrosis of Femoral Head is a kind of disease which has serious clinical symptoms and high morbidity. For study the pathogenesis and treatment, scholars make unremitting efforts. This article is a review on the progress in research on animal models of osteonecrosis of femoral head.

【Key words】 Osteonecrosis of femoral head; Animal models; Glucocorticoid

股骨头缺血性坏死(osteonecrosis of femoral head, ONFH)是由于不同的病因破坏股骨头的血液循环造成骨细胞、骨髓造血细胞和脂肪细胞坏死的病理过程,最终导致股骨头塌陷,髋关节功能障碍的一种疾病^[1]。近年来发病率不断增高,发病年龄趋于年轻化,因其临床症状较重、致残率高,治疗困难,越来越引起医学界的重视,其中激素性股骨头坏死占总发病率的50%以上,并呈逐年上升的趋势。

ONFH按照病因分类可分为创伤性股骨头坏死及非创伤性股骨头坏死。创伤性ONFH主要见于髋部创伤,如:股骨颈骨折、股骨头骨折、髋关节脱

位、髌臼骨折等,股骨头由于血运中断而发生坏死。非创伤性ONFH主要是由于激素滥用、饮酒过量、风湿病、血液病等引起。

正因为股骨头坏死的发病机制并不明确,且缺乏切实有效的早期治疗方法,所以建立与人类临床病理特征相似的股骨头坏死动物模型以研究其发病机制及寻求有效的治疗方法显得尤为重要。现就目前股骨头坏死动物模型建立的研究进展综述如下。

1 模型动物的选择

国内外学者的研究中,选择用来建立股骨头坏

[基金项目]浙江省科技厅实验动物科技计划项目(2011C37094);浙江省科技厅科技计划项目(2006C33003);浙江省中药现代化专项资金资助项目(2007-237号)。

[作者简介]张成龙,男,浙江中医药大学中药学专业在读研究生。

[通讯作者]尹华(1965-),女,教授,博士生导师,研究方向:中药质量标准、中药成分分析及中药新药研发。Tel: (0571) 86613604, Fax: (0571) 86613606, E-mail: maryinhua@163.com.

死动物模型的动物包括四足类动物(如大鼠、兔、犬、猪、羊、马)和双足类动物(鸡、鹅、鹌鹑)。

双足类动物的特点是双下肢负重,与人类的负重方式相似,突出生物力学在 ONFH 病程中的作用。鸡的股骨头坏死的进程与人类相似,病理变化接近人类。曾有国内外学者应用鸡、鹌鹑建立激素性股骨头坏死模型^[3-4]。但是鸡与人类的亲缘性较远,人们对其解剖学及生理学上的认识较少。且鹌鹑来源有限,饲养难度大,限制了其广泛应用。

应用于 ONFH 造模四足类动物多属哺乳类动物,生物进化上与人类较近。应用最多的是大鼠、兔和犬。其中大鼠的骺生长板终生存在,常用来制作儿童股骨头骨骺坏死(Perthes'病)动物模型;自发性高血压大鼠(SHR)易患多种骨骼疾病(包括 ONFH),可以模拟 Perthes'病的自然病程;大鼠没有呕吐反射,用作灌胃法制作酒精性 ONFH 模型,剂量确切;大鼠也用作激素性 ONFH 模型建立,马信龙等人^[5]尝试 Wistar 大鼠臀肌注射地塞米松磷酸钠 20mg/kg,每周 1 次,并每天辅以强制活动,8 周后造模成功。用兔作 ONFH 模型的研究也较多,特别是用作激素性股骨头坏死模型^[6-10],但兔在病程上与人类激素性股骨头坏死病程不符,病理变化差别大;犬的体形较大,较适合于外科手术建模^[11]。羊的长骨粗大,脂肪丰富,易于发生减压性骨坏死,是制作减压性骨坏死动物模型的最好动物^[12]。猪和马作为实验动物建模的相对较少^[13]。同时由于猪、羊等大动物成模时间长,实验成本高,成功率较低,死亡率高,较少应用于实验室研究。

理想的股骨头坏死动物模型首先要要求实验动物要与人具有较好的亲缘性及相似性,所选动物的解剖和生理学特点尽可能与人类相似,符合人类 ONFH 病变规律,即从早期的病理组织学改变到晚期的股骨头塌陷,股骨头坏死区域应接近软骨面并与周围活骨相连接,且在坏死修复过程中股骨头应承载正常的应力;可重复性好,便于检测评价;经济可行。

2 造模方法

2.1 激素造模

从 20 世纪已经有学者用不同方法建立激素性股骨头坏死模型。

2.1.1 单纯激素诱导:赵广辉等人对新西兰大白兔进行每周 2 次的臀肌注射地塞米松磷酸钠(8mg/kg),

分别于 3 周、6 周后观察到股骨骨密度及组织病理学上的软骨改变^[14]。据赵金东等人研究,用 40mg/kg 甲基强的松龙臀肌注射中国大耳白兔造模,8 周后模型建立成功^[15]。研究报道也有学者选择 SD 大鼠造模,每周 2 次臀肌注射醋酸泼尼松龙(24.5 mg/kg)连续 6 周,大鼠股骨头骨小梁模糊,空骨陷窝率明显升高^[16-17]。

2.1.2 激素联合马血清诱导:模拟临床上高免疫状态下大剂量使用激素造成的股骨头坏死。王伟等人应用马血清 10 mL/kg,经兔耳缘静脉注射 3 周后,减量为 6 mL/kg 再次注射 2 周后,腹腔注射甲基强的松龙,按 45 mg/kg 连续 3 天,每天注射 1 次,可造成激素性坏死模型^[18]。

2.1.3 激素联合内毒素诱导:模拟高凝血状态下使用激素导致的股骨头坏死。童培健等人^[19]选用 Wistar 大鼠,腹腔注射内毒素 20 μg/kg 两天,臀肌注射甲强龙 40 mg/kg 三天,6 周后组织病理学观察结果显示,模型组坏死率达 70%。黄克勤等^[20]研究发现,SD 大鼠尾静脉注射内毒素 10 μg/kg 1 次,肌注 20 mg/kg 甲强龙 4 天,6 周后模型建立成功。据赵金东等人^[21]研究报道显示,对中国大耳白兔进行耳缘静脉注射内毒素(50 μg/kg)两天后臀肌注射甲强龙(40 mg/kg)三天,4 周后 MRI 扫描,造模组兔 T₁WI 表现为右侧股骨头信号减低,组织病理学观察发现模型组骨小梁数目明显减少,断裂,但模型组动物死亡率较高。

激素造模法的应用越来越广泛,但在各家报道中,建立 ONFH 动物模型所用激素的类型,剂量以及致 ONFH 发生率均不同。对激素剂量的研究方面目前还没有大量的实验数据证明 ONFH 发病的最佳用药剂量,同时针对内毒素、激素的用量过大导致的动物死亡这方面的文献报道也不多。因此对激素类型、用量的考察对于完善激素性股骨头坏死动物模型的建立有着重要意义。

2.2 酒精造模

过度的酒精引起肝的损害,脂肪肝又产生了脂肪栓子。脂肪栓子对非创伤性骨坏死起关键作用^[22]。郭天明^[23]曾用雄性 Wistar 大鼠每次以 56 度白酒灌胃(10 mL/kg)连续两天后停一天,持续 24 周后,血液生化指标显示 HDL-C、LDL 值均较正常组低;组织病理学显示部分骨小梁出现空骨陷窝,多于 50%。齐振熙等^[24]对 SD 大鼠给予 56 度白酒 8 mL/kg·d(含纯酒精约 4 g/kg·d)灌胃,20 周后处

死动物进行组织病理学观察,发现实验组股骨头软骨层较薄,软骨下骨小梁变细,间距增大,结构紊乱,骨小梁有断裂。

酒精性股骨头坏死模型的建立主要问题在于灌胃剂量的选择及造模时间。在大鼠能耐受的情况下,应尽可能采取大剂量和高频度灌胃。但在保证实验大鼠不发生酒精中毒致死的情况下,造模时间仍然较长,增加了饲养的难度。

2.3 创伤性造模

成年创伤性股骨头坏死动物模型的制备有液氮冷冻法、手术破坏骨髓法、选择性血管结扎法、局部细胞灭活法等。

2.3.1 液氮冷冻法:有学者用液氮冷冻法造成犬整个股骨头坏死及修复反应,但坏死由外向内,且一周后即出现股骨头外形改变和骨性关节炎^[25-26]。但液氮冷冻法造成的动物股骨头坏死模型的骨坏死与临床有一定的差别,对临床的指导有很大的局限性。

2.3.2 手术破坏骨髓法:李印良等^[27]通过将兔圆韧带切断,在近股骨附着点处环形切断结扎关节囊,股骨颈底部钻直径 2 mm 骨孔,破坏骨髓的方法制作股骨头坏死模型。此方法造成缺血性坏死缺点是手术创伤大,坏死的修复可能会受到多方面因素的影响,修复时间较长,不利于短期内观察其完整的修复过程。

2.3.3 选择性血管结扎法:Nakamura 等^[27]结扎狗股骨头周围血管,并使髋关节后脱位 9 h,术后 3 d、1、2、4 周进行 MRI 及组织切片观察,组织切片 3 d 开始出现异常,MRI 1 周开始出现异常。动脉和静脉的结扎虽然能引起骨坏死,但造模时间长,骨的修复较为明显,造成的模型往往不典型。

2.3.4 局部细胞灭活法:彭吾训等^[28]将微波天线插入兔股骨头进行微波灭活,1、2、4、8 和 12 周后利用 X 射线、MRI 检测股骨头影像。55℃,10 min 微波灭活后 4 周时坏死与修复同时进行,8 周时坏死骨小梁及骨髓组织完全吸收,12 周时骨修复停止,骨坏死继续,股骨头开始塌陷。杨明亮等^[29]则利用家兔股骨头内注射盐酸、氢氧化钠的方法造模,6 周左右即可出现典型的骨坏死。但灭活法与人类临床的发病过程不一致,对于临床股骨头坏死病程发展及治疗方法研究指导意义不大。

3 ONFH 动物模型评价指标

在股骨头坏死的实验研究中,判定动物模型是

否复制成功,是至关重要的一步。对模型的评价指标有以下研究:

3.1 大体观察及 X 线片

已造成股骨头坏死的模型股骨头松脆,易于剖开凿切。X 线往往显示股骨头周围骨质变疏松,骨皮质变薄,骨小梁模糊不清或消失,股骨头内有散在低密度区的表现。但此项指标不适用于早期股骨头坏死的诊断。

3.2 组织形态学检查

贺西京等^[30]于光镜下观察了坏死的股骨头组织,发现第 4 周开始,软骨下骨区骨小梁部分骨细胞核固缩,胞核较小,染色深,空缺骨陷窝数增多,透射电镜下观察到较多的骨细胞发生核固缩及骨细胞破裂成碎片,出现了股骨头骨细胞的坏死。本课题组经过前期的实验研究发现,股骨头坏死大鼠股骨头表面出现不平整,骨小梁结构出现紊乱,甚至断裂现象,骨髓腔内脂肪细胞逐渐增大。由于骨坏死的确诊标志是骨和骨髓死亡的组织学证据,所以此项指标被广泛采用。

3.3 血生化测定

生化测定是对骨坏死的一种定量分析。学者在研究股骨头坏死过程中,发现模型组动物涉及到脂代谢的各项血脂指标,包括总胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、低密度低蛋白(LDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)、高密度脂蛋白(HDL)、血浆脂联素含量与正常组动物有显著性差异^[31]。本课题组研究发现,股骨头坏死动物的血清 P 含量均较正常组低、血清 Ca 含量则无显著性差异,这可能与骨中钙元素的融出有关。目前尚无对动物股骨头坏死进行分期的统一标准,单独依靠血生化的指标来评价股骨头坏死模型复制成功与否是不全面,亦是不合理的,血生化指标的测定与组织形态学等其他指标结合的方法可作为参考,有助于判断骨坏死的程度。

3.4 骨生物力学、骨 Ca、P 和骨密度

根据股骨头坏死的综合分期,在骨坏死早期,会出现轻微的骨质疏松,整个股骨头坏死的发病期间经历一个共同的骨质疏松的病理过程^[1]。在股骨头坏死动物模型中,利用骨生物力学中股骨弯曲载荷值、单位面积最大载荷量、弹性模量的测定^[32],可以显示出坏死动物股骨脆性明显增加,骨质明显疏松。骨中的 Ca、P 是骨矿物质的主要成分,股骨中 Ca、P 含量的高低是衡量骨质的一个重要标志。Ca、P 含量低,说明骨质松脆,反应在骨生物力

学上的各项评价指标更加明显。骨密度,是骨质量的一个重要标志,反映骨质疏松程度。也曾有学者^[33]研究发现股骨头坏死的新西兰大白兔骨密度比正常组明显偏低,有非常显著性的统计学差异。因此骨生物力学、骨 Ca、P 及骨密度可作为股骨头坏死动物模型建立成功的间接性评价指标。

3.5 股骨头血管造影

王锐英等^[34]认为血管造影可用于股骨头坏死的早期诊断。股骨头血管密度最低生理限度是多少,破坏或减少到何种程度可产生不可逆损害,可作为早期诊断股骨头坏死的标准,尚有待进一步研究。

3.6 骨内压

文献早有报道骨内压与骨坏死的密切关系,在股骨头坏死的早期,骨内压就有明显的增高。曾有研究者采用测量骨内压的方法,早期诊断股骨头坏死,准确率高^[35]。因此,骨内压也被认为可以用作于间接判断股骨头坏死模型是否成功。

综上所述,复制股骨头坏死动物模型的方法很多,但是由于 ONFH 的发病机理尚未完全明确,以及人和动物在生理解剖上存在的差异,现今还没有一种公认的方法可以完全复制与人 ONFH 自然病理过程相一致的动物模型。近年来由于我国临床上激素应用的增多,由于滥用激素引发的激素性股骨头坏死发病率也逐年增高,应当提高对激素性股骨头坏死的重视。目前国内外学者对于激素性股骨头坏死动物模型的研究越来越多,但应用于造模的激素类型种类繁多,激素应用剂量也不尽相同,甚至有的学者在不同的造模动物之间采用体表面积换算的方法确定造模剂量。另外关于高剂量激素引起的动物死亡率问题没有很多文献报道,能够使 ONFH 模型复制成功的最佳激素剂量亦尚无学者做过相关研究。另外在评价模型成立与否的评价指标方面,许多文献研究中所选用的检测指标也有待商榷,如血清钙、血清磷含量,血脂等。在前期课题组的研究中发现血中的钙、磷含量变化可能与骨头中的钙、磷元素的融出有关,而血脂的变化受多种因素的影响,不宜将其作为评价股骨头坏死的特异性指标。因此还需进一步确定更为直观、更能反映骨坏死本质的评价指标。综上所述,对激素类型、剂量的考察以优化激素性股骨头坏死动物模型的建立,以及形成合理、系统的评价体系应当是今后股骨头坏死动物模型领域研究的重点内容。

参考文献:

- [1] 王义生. 股骨头缺血坏死[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(4): 310-312.
- [2] 刘尚礼, 刘永轶. 骨坏死基础与临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 2008. 72-75.
- [3] 林诗富. 不同治法预防激素性股骨头坏死发生的比较研究[D]. 贵阳: 贵阳中医学院骨伤科, 2006: 7-9.
- [4] Conzemius MG, Brown TD, Zhang Y, et al. A new animal model of femoral head osteonecrosis is one that progresses to human like mechanical failure [J]. J Orthop Res, 2002, 20(2): 303-309.
- [5] 马信龙, 孙智超, 马剑雄, 等. 改良型大鼠激素性股骨头坏死模型建立和相关评价[J]. 实用骨科杂志, 2010, 15(10): 760-763.
- [6] 吴淮. 补肾活血祛瘀法预防激素性股骨头坏死的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学药学院中药学, 2010: 20-22.
- [7] 苏强, 孙大胜, 于秋良, 等. 不同剂量内毒素联合激素建立免股骨头缺血性坏死模型的影像学评估[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(11): 2108-2111.
- [8] 王坤正, 扬万石, 黄溶, 等. 免激素性股骨头缺血坏死早期细胞学电镜观察[J]. 中华医学杂志, 1996, 76(1): 49-50.
- [9] 赵万军, 肖鲁伟, 童培建, 等. 右归饮、鹿马片对激素诱导的免股骨头坏死的血浆雌二醇、睾酮的影响及疗效观察[J]. 中医正骨, 2000, 12(1): 3-4.
- [10] Meng Fan, Jiang Peng, Ling Qin, et al. Experimental animal models of osteonecrosis [J]. Rheumatol Int (2011) 31: 983-994.
- [11] Nishino M, Matsumoto T, Nakamura T, et al. Pathological and hemodynamic study in a new model of femoral head necrosis following traumatic dislocation [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 1997, 116(5): 259-262.
- [12] Lehner CE, Adams WM, Dubielzig RR, et al. Dysbaric osteonecrosis in divers and caisson workers: A animal model [J]. Clin Orthop Relat Res, 1997, 344: 320-332.
- [13] Seiler JG, Kregor PJ, Conard EU, et al. Posttraumatic osteonecrosis in a swine model. Correlation of blood cell flux, MRI and histology [J]. Acta Orthop Scand, 1996, 67(3): 249-254.
- [14] 赵广辉. 联合用药对激素性股骨头坏死干预作用的实验研究[D]. 郑州: 郑州大学第一临床医学院外科学, 2009: 21-25.
- [15] 赵金东, 吕松岑, 薛震, 等. 激素性股骨头坏死动物模型的建立与评价[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2007, 6(4): 220-225.
- [16] 黄俊. 脂联素促进大鼠激素性股骨头坏死修复的实验研究[D]. 安徽: 安徽医科大学第一附属医院外科学, 2009: 1-4.
- [17] 孙克明, 王和鸣, 林久茂. 复方巴戟天合剂对激素性股骨头坏死大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学, 2011, 17(7): 117-119.
- [18] 王伟, 刘利英, 王坤正, 等. 激素性股骨头坏死模型的建立

- 及其发病机理的探讨[J]. 西安交通大学学报, 2007, 28(5): 5444 - 547.
- [19] 童培健, 毛强, 吴承亮, 等. 大鼠激素性股骨头坏死骨代谢差异表达基因的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 2011, 31(7): 794 - 799.
- [20] 黄克勤, 陈燕平, 薛延, 等. “承载丸”对股骨头坏死大鼠细胞黏附分子基因的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(28): 5495 - 5498.
- [21] 赵金东, 吕松岑, 薛震, 等. 激素性股骨头坏死动物模型的建立与评价[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2007, 6(4): 220 - 225.
- [22] Jones JP Jr. Fat embolism and osteonecrosis [J]. Orthop Clin North, 1985 Oct, 16(4): 595 - 633.
- [23] 郭天明, 朱天岳. 酒精中毒致股骨头坏死的动物模型[J]. 汕头大学医学院学报, 1999, 12(2): 16 - 20.
- [24] 齐振熙, 喻灿明. 酒精性股骨头缺血坏死的动物模型研究[J]. 福建中医学院学报, 2005, 15(2): 35 - 37.
- [25] 龚跃昆, 彭吾训, 李世和, 等. 液氮冷冻建立犬股骨头缺血坏死模型的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 7(15): 1171 - 1173.
- [26] 吴士良, 徐岚, 周迎会, 等. 实验性股骨头缺血性坏死与修复对局部组织生化指标的影响[J]. 上海实验动物学, 2004, 1(1): 26 - 29.
- [27] 李印良, 徐莘香, 张晓南, 等. 实验性股骨头坏死血运变化的初步观察[J]. 骨与关节损伤杂志, 1995, 10(2): 95 - 97.
- [28] 彭吾训, 王蕾, 邓进, 等. 微波加热制作股骨头坏死模型: 最适宜的温度和时间筛选[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(17): 3143 - 3146.
- [29] 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.
- [30] 贺西京, 毛履真, 王坤正, 等. 肾上腺糖皮质激素引起 ONFH 机制实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1992, 12(6): 40 - 44.
- [31] 帅波. 非创伤性 ONFH 患者脂质代谢相关因子及血小板活化相关因子的临床研究及中医药的治疗作用[D]. 湖北: 华中科技大学中西医结合临床, 2011: 9 - 15.
- [32] 林婷. 芪参健骨颗粒对股骨坏死模型大鼠的干预作用[D]. 浙江: 浙江中医药大学药学院中药学, 2011: 35 - 36.
- [33] 赵广辉. 联合用药对激素性股骨头坏死干预作用的实验研究[D]. 郑州: 郑州大学第一临床医学院外科学, 2009: 21 - 25.
- [34] 王锐英, 毛小军, 张其亮, 等. 数字减影血管造影评价股骨头坏死模型[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(23): 4538 - 4541.
- [35] 李鹏翠, 卫小春, 牛金亮, 等. 骨内压在激素诱导型股骨头坏死病程发展中的价值[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2006, 3(2): 39 - 41.

(修回日期)2012-0-0

• 国际动态 •

日本成功“人造”小鼠卵子

日本京都大学一个研究小组在 5 日的美国《科学》杂志上报告说,他们首次利用诱导多功能干细胞(iPS 细胞)成功培育出实验鼠的卵子,并使其受精从而诞出健康的小鼠。

iPS 细胞是具有较强分化潜力的干细胞,由皮肤细胞等体细胞经基因改造“诱导”发育而成。科学家利用由雌性实验鼠胎儿体细胞培养得到的 iPS 细胞,添加生理活性物质促进其分化,培养出原始生殖细胞,原始生殖细胞是未来形成卵子的初始细胞。

科学家进而将其和能发育成卵巢的细胞一起培养,之后再移植到雌鼠的卵巢中,成功获得了尚未成熟的卵子。之后科学家将其从卵巢中取出,人工培养到成熟可受精状态,再使这些卵子和正常实验鼠的精子体外受精后,成功诞生出健康、有正常生殖能力的小鼠。

该研究小组去年 8 月曾成功“人造”实验鼠精子,因此理论上利用 iPS 细胞培养的精子 and 卵子“人造”受精卵、进而“人造生命”成为可能。京都大学名誉教授森崇英说,这对不能生成卵子的不育女性是一个好消息。不过,相关研究尚处在动物实验阶段,还将面临安全性和伦理等诸多挑战。

文章来源: 科技日报