

· 基础研究 ·

超短波早期治疗对兔激素性股骨头缺血性坏死病理变化的影响

孙强三 徐青 孙昭辉 徐明

【摘要】目的 研究超短波早期治疗对激素性股骨头缺血性坏死病理变化的影响,并探讨其防治效果及作用机制。**方法** 选择健康雄性新西兰兔 30 只,随机分成对照组、造模组、超短波组,采用马血清与激素联合造模制造兔激素性股骨头缺血性坏死模型,光镜观测 12 周末骨组织病理变化(成骨细胞破骨细胞计数、关节软骨厚度、软骨细胞空骨细胞陷窝率、软骨下血管计数、骨小梁宽度、脂肪细胞直径和脂肪细胞面积百分比的改变)。**结果** 造模组成骨细胞计数比对照组显著减少,超短波组成骨细胞则较对照组显著增加($P < 0.01$);造模组和超短波组破骨细胞均较对照组显著增加,超短波组破骨细胞计数比造模组显著降低($P < 0.05$);造模组和超短波组软骨厚度均比对照组减少,超短波组较造模组显著增加($P < 0.05$);造模组和超短波组软骨细胞空骨陷窝率较对照组显著增加,造模组较超短波组增加显著($P < 0.05$);造模组软骨下血管计数较对照组显著减少,超短波组则比对照组显著增多($P < 0.01$);造模组和超短波组骨小梁宽度比对照组均减小,超短波组骨小梁宽度比造模组显著增加($P < 0.01$);造模组和超短波组脂肪细胞直径较对照组显著增大($P < 0.01$),超短波组脂肪细胞直径较对照组显著减少($P < 0.05$);造模组和超短波组脂肪细胞面积百分比(%)分别较对照组显著提高,超短波组较造模组显著降低($P < 0.05$)。**结论** 超短波早期治疗兔激素性股骨头缺血性坏死有较好疗效。

【关键词】 股骨头缺血性坏死; 超短波; 病理; 兔

The effects of early intervention with ultrashortwave diathermy on pathologic changes in hormone-induced ischemic necrosis of the femoral head SUN Qiang-san, XU Qing, SUN Zhao-hui, XU Ming. Department of Rehabilitation, The Second Hospital of Shandong University, Ji'nan 250033, China

【Abstract】Objective To investigate the pathogenesis of avascular necrosis of the femoral head (ANFH) and to observe the effects of ultrashortwave diathermy treatment of ANFH through animal experiments. **Methods** A total of 30 New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: a control group, a model group, and a diathermy group. All the groups were injected with horse serum and methylprednisolone to induce ANFH. The pathological effects were observed. **Results** The amount of osteoblast in the model group was significantly less than in the control group, while in the diathermy group it was significantly increased compared with the control group. The amount of osteoclast in the model and diathermy groups was significantly higher than in the control group, and in the diathermy group it was significantly more than in the model group. The thickness of femoral head cartilage in the model and diathermy groups was reduced compared with the control group, while it was thicker in the model group than in the diathermy group. The empty cartilage cell lacunae ratios of the model and diathermy groups were significantly higher than for the control group, and the diathermy group showed significant degradation compared to the model group. The density of blood vessels under the cartilage in the model group was significantly less compared with the control group, while in the diathermy group it was significantly increased compared with the control group. The width of bone trabeculae in the model and diathermy groups was significantly less compared with the control group, while they were significantly wider in the diathermy group compared with the model group. The diameters of fat cells in the model and diathermy groups were increased compared with the control group, while they were significantly smaller in the diathermy group compared with the model group. The adipocyte area rates in the model and diathermy groups were significantly elevated compared with the control group, and rates in the model group were significantly elevated compared with the diathermy group. **Conclusion** Ultrashortwave diathermy is an effective treatment for early stage ANFH.

【Key words】 Avascular necrosis, the femoral head; Ultrashortwave diathermy; Pathology; Rabbits

激素在临床上的应用范围日趋广泛,由激素所导

致的股骨头缺血性坏死(avascular necrosis of the femoral heads, ANFH)亦随之增加。肾移植手术后及严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome,

基金项目:山东省科学技术发展计划重点项目(2004GG2202159)

作者单位:250033 济南,山东大学第二医院康复科

SARS) 治疗过程中遇到的这种问题也相当突出, 已引起临床工作者的高度重视, 但目前各种疗法效果尚不能令人满意^[1]。随着对该疾病认识的不断深入和诊断技术的提高, 目前对股骨头缺血性坏死的早期诊断越来越提前。因此, 如何在骨坏死的早期进行治疗, 逆转骨坏死的进展, 是目前国内外治疗该病的同行所十分关注的问题。我们采用马血清与激素联合应用造模, 制造兔激素性股骨头缺血性坏死模型, 研究超短波早期治疗对兔激素性股骨头缺血坏死病理变化的影响, 探讨超短波对激素性股骨头缺血性坏死的防治效果及作用机制。

材料与方法

一、实验动物及相关器材

雄性成年新西兰兔 30 只, 体重 2.5 ~ 3.5 kg, 周龄 24 周以上。实验兔购回后, 适应性饲养 1 周。同一饲养条件, 分笼喂养。山东省医学科学院动物实验中心提供, 许可证号: SCXK(鲁 20040013)。

二、实验试剂和药物

1. 注射用甲基强的松龙(甲泼尼龙琥珀酸钠): 规格为 40 mg/瓶, 1 ml 双室瓶, 上室含稀释液(苯甲醇 9 mg 及注射用水), 下室含甲泼尼龙琥珀酸钠及辅料。进口药品注册证号: H20040338。

2. 马血清: 500 ml/瓶, 美国产(Triple0. 1 μ m, Sterile Filtered, Cat No.: SH30074. 03, 许可证号: APH21830, 瓶号: 2232), -20 $^{\circ}$ C 冰箱存放。

三、动物分组及模型制作

将 30 只实验兔编号后按随机数字表分为 3 组: 对照组、造模组、超短波组各 10 只。对照组: 选择兔耳缘静脉, 分别于实验第 1 和 3 周注射生理盐水, 15 ml/kg 体重, 共 2 次。于实验第 5 周腹腔注射生理盐水 5 ml/kg 体重, 连续 3 d, 每日 1 次。造模组: 按照实验要求, 根据文献[2-5]方法制作动物模型。选择兔耳缘静脉, 分别在实验第 1 周、第 3 周注射马血清 15 ml/kg 体重, 共 2 次。于实验第 5 周腹腔注射甲基强的松龙 40 mg/kg 体重, 每天 1 次, 连续 3 d。超短波组: 前 5 周同造模组, 实验第 6 周初即开始进行超短波治疗。超短波治疗仪采用上海产 LDT-CD31 型落地式超短波电疗机, 频率 40.68 MHz, 波长 7.3 m, 最大输出功率 200 W, 20 cm \times 15 cm 电极两个, 电极于兔双髋部对置, 电极与皮肤间隙 2 ~ 3 cm, 微热量, 每日 1 次, 每次治疗 15 min, 共不间断治疗 3 周, 即第 9 周末结束。

四、标本的收集和处理

(一) 一般情况观察

观察兔体重变化、皮毛色泽及 3 组兔之间活动量、

活动能力及活动的灵敏度。

(二) 股骨头标本的收集

于实验第 12 周末以空气栓塞的方法处死动物, 快速取兔双侧股骨头, 存放于 10% 的中性福尔马林药液内, 常温下固定 36 ~ 72 h。

(三) 股骨头病理检查

1. 标本处理与观察: 经固定后的股骨头标本, 置于 5% 硝酸溶液中脱钙 1 周, 经常规梯度脱水, 浸蜡包裹, 石蜡包埋, 切片机切出 5 μ m 厚切片, 然后脱蜡, 常规 HE 染色, 以备光镜观察。观察项目包括: 成骨细胞和破骨细胞形态学变化、空骨陷窝率、软骨下血管条数。利用图像分析系统检测关节软骨厚度、骨小梁厚度、脂肪细胞直径及脂肪细胞面积所占的百分比。

2. 成骨细胞和破骨细胞的计数: 40 倍物镜下随机计数 10 个视野, 观察计数成骨细胞数量和破骨细胞数量, 取其平均值作为每个股骨头组织内细胞均数。最后取各组的平均值进行统计学分析。

3. 关节软骨厚度、骨小梁、脂肪细胞直径的测量: 光镜下用测微尺进行定量测量。每张 HE 染色切片均选 10 个低倍(5 倍物镜下)视野, 每个视野至少 10 个不同位置测骨小梁宽度(5 倍物镜下)和关节软骨的厚度(5 倍物镜下测量关节表面到潮线的距离), 取其平均值, 结果进行统计学分析。同理, 每个视野计数 10 个股骨头组织内脂肪细胞的直径数值, 最后取各组的平均值进行统计学分析。

4. 空骨细胞陷窝率: 光镜下, 骨细胞坏死用空骨细胞陷窝表示, 在股骨头软骨区 HE 染色的骨组织切片上, 随机选 10 个高倍镜(400 倍光镜下)视野, 每个视野计数 50 个软骨细胞骨陷窝, 并分别计数空骨陷窝数, 根据计数求出每个视野下空骨细胞陷窝所占百分数, 然后取其平均数作为该股骨头组织空骨细胞陷窝率, 最后将各组的平均值结果进行统计学分析。

5. 软骨下血管: 普通 HE 染色, 每张 HE 染色切片在 20 倍物镜下随机选取 5 个视野, 数出每个视野中软骨下小血管条数, 然后取其平均值进行统计学分析。

6. 脂肪组织面积所占的百分比测量: 利用 Leica Microsystems 观察 5 倍物镜下股骨头组织, 然后利用 Leica DM4000B 图像采集系统采集图像, 再通过(Leica QWinV3)真彩色医学图像分析处理软件系统, 先将脂肪组织的白色区域定为阳性点, 标出所有阳性点后, 由计算机在所采集的图像上精确计算股骨头组织中脂肪面积的百分比。

五、统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、一般情况观察变化

3 组兔在同一环境条件下饲养,实验前 3 组兔的平均体重分别为 2.67, 2.64 和 2.65 kg。到实验第 6 周初开始超短波治疗前,3 组兔的平均体重分别为对照组 2.92 kg,模型组 2.61 kg,超短波组 2.69 kg。对照组兔:精神好,毛光泽,行动灵敏;造模组兔:精神萎靡,皮毛蓬松无光泽,皮下脂肪变薄,兔行动时后肢笨拙,弹跳距离近,高度减小,其中有 2 只因厌食死亡;超短波组兔:未治疗(实验第 6 周前)时精神萎靡同模型组,经治疗后平均体重由 2.69 增至 3.15 kg,接近对照组兔体重(3.27 kg),皮毛渐有光泽,兔活动灵敏度增加,弹跳距离和高度较前增大,较活跃,接近对照组兔活动水平。该组兔中有 1 只因心脏采血死亡。

二、骨组织病理组织学检查

(一) 股骨头大体病理观察

对照组兔:股骨头、颈形态完整,骨面光滑,质硬,色透明,呈白色。造模组兔:股骨头形态尚完整,股骨颈变松脆易折断取出,且部分股骨头关节面毛糙、塌陷(12 周末处死的兔中 2 只单侧股骨头轻度塌陷),呈现青紫色,皮质薄,股骨头软骨失去光泽,色暗。软骨尚未见纤维化及局部剥脱、溃疡,冠状面切开时阻力小,表示骨质疏松明显。股骨头冠状剖面可见软骨与骨质在局部有分离,未见明显坏死区。超短波组:股骨头及股骨颈形态完整,硬度介于对照组和造模组兔骨标本之间,颜色呈淡白色。冠状面切开时骨组织阻力介于对照组和造模组之间。

(二) 病理组织学观察

1. 兔股骨头成骨细胞、破骨细胞形态学观察:12 周末,超短波组成骨细胞数较对照组增加 71.43%,造模组成骨细胞数较对照组减少 29.76%,超短波组成骨细胞数较造模组增加 143.10%;各两组间比较差异有统计学意义, $P < 0.01$;超短波组破骨细胞数较对照组增加 81.29%,造模组破骨细胞数较对照组增加 175.00%,超短波组破骨细胞数较造模组减少 34.08%,各两组间比较,差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。激素的使用抑制了成骨细胞的分化,使破骨细

胞活性增加,而应用超短波治疗则促进成骨细胞分化,抑制破骨细胞的活性。详见表 1。

2. 兔股骨头软骨厚度和软骨细胞空骨陷窝率:从表 1 可以看出,造模组软骨厚度较对照组减少 55.75%,超短波组软骨厚度较对照组减少 35.48%,超短波组较造模组软骨厚度增加 31.41%,各组间两两比较,差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。3 组软骨细胞空骨陷窝率各组间比较,差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

3. 兔股骨头软骨下血管分布情况:12 周末,超短波组软骨下血管数较对照组血管增加 17.83%,造模组较对照组血管减少 42.32%,各组间两两比较,差异有统计学意义,均 $P < 0.01$ 。使用激素后动物造模组软骨下血管部分破坏,而超短波组软骨下血管较对照组增加,较造模组明显增加(表 1)。

4. 兔股骨头缺血性坏死早期骨小梁宽度的比较:12 周末,各组间兔股骨头缺血性坏死早期骨小梁宽度比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。使用激素后造模组和超短波组兔骨小梁均稀疏变细,但经治疗后,超短波组兔骨小梁宽度较造模组明显增宽,差异有统计学意义, $P < 0.01$ (表 1)。

5. 脂肪细胞直径及脂肪面积百分比:表 1 显示,超短波组较对照组脂肪细胞直径增加 20.98%,造模组较对照组脂肪细胞直径增加 42.30%,超短波组较造模组脂肪细胞直径减少 15.46%,各两组间比较差异有统计学意义, $P < 0.01$;脂肪细胞面积百分比两两组间比较差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

讨 论

随着激素的广泛应用,由其引起的疾病有增多的趋势。激素诱导股骨头缺血性坏死(steroid-induced avascular necrosis of the femoral heads, SANFH)就是其中的一种。它是因大剂量应用激素而造成股骨头骨的活成分(骨细胞、骨髓造血细胞和脂肪细胞)的死亡所引起的病理过程^[6]。我们深入学习总结了 Nakat^[7]、李子荣^[5]、杨万石^[8]等诸位同仁的动物实验结果后发现:采用马血清联合激素的方法,完全可以在实验条件下建成激素性股骨头坏死的模型并且具有可重复性。

表 1 兔股骨头的各项病理组织学指标检测($\bar{x} \pm s$)

组 别	股骨头数	成骨细胞数 (个)	破骨细胞数 (个)	软骨下血管数 (条)	骨小梁宽度 (μm)	软骨厚度 (μm)	空骨陷窝率 (%)	脂肪细胞直径 (μm)	脂肪组织面积 (%)
对照组	20	21.00 \pm 3.63	4.75 \pm 1.59	11.55 \pm 2.16	127.25 \pm 13.51	518.46 \pm 62.31	6.51 \pm 1.47	43.85 \pm 6.24	12.54 \pm 3.52
造模组	16	14.75 \pm 3.68 ^a	13.06 \pm 2.79 ^c	6.69 \pm 1.62 ^a	73.06 \pm 16.61	229.44 \pm 45.91 ^c	20.29 \pm 2.64 ^c	63.44 \pm 7.33 ^a	25.79 \pm 4.61 ^c
超短波组	18	36.00 \pm 6.02 ^{ab}	8.61 \pm 2.45 ^{cd}	14.06 \pm 2.15 ^a	102.89 \pm 10.17 ^a	334.50 \pm 49.22 ^{cd}	9.18 \pm 1.85 ^{cd}	52.11 \pm 5.80 ^{ab}	20.91 \pm 2.51 ^c

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$,^c $P < 0.05$;与造模组比较,^b $P < 0.01$,^d $P < 0.05$

在此基础上,应用病理学诊断方法观测造模组和超短波组,发现股骨头组织均呈现不同程度的骨损伤。造模组应力区软骨细胞排列较散乱,骨软骨细胞坏死多,软骨细胞核浓缩,偏于一侧,空骨陷窝明显增多。软骨下血管管腔变小,数量较少,血管内可见微小血栓形成,血管内皮细胞破坏。软骨下骨板变薄,脂肪细胞增多,骨小梁广泛稀疏、变细,并出现断裂现象,骨小梁周围未见成骨细胞,骨小梁断裂处见大量破骨细胞存在,髓腔内生血细胞数量减少,脂肪细胞体积增大,有的融合呈泡状,髓腔内有新旧出血迹象,病理分期为第Ⅱ期。病理结果表明,本实验兔激素性股骨头缺血坏死模型的复制是成功的。

目前针对激素性股骨头缺血性坏死的早期治疗,大体上分为非手术治疗和手术治疗两大类。ANFH 早期病理变化的本质是股骨头的缺血性改变,后期则继发股骨头塌陷,因此早期重建及改善缺血坏死区股骨头的血供,加强对股骨头软骨下骨的支撑,促进其缺血坏死区的骨修复重建,保存自体股骨头,防止塌陷是治疗的指导方针,股骨头坏死的早期保守治疗方法很多,我们取物理疗法作为研究方向。但是相当一段时间以来,对于理疗的作用机制,相关的研究相对有些滞后。理疗具有无痛苦、无创伤、费用低、容易被患者接受等优点。理疗治疗股骨头坏死的方法有:体外冲击波、脉冲电磁场、高压氧治疗^[9,10]。如 Ludwig 等^[11]对高频振荡波、Eftekhar 等^[12]和 Seber 等^[13]对脉冲电磁场治疗,Reis 等^[14]、常巍等^[15,16]对高压氧治疗的研究均证实理疗对早期股骨头坏死确实有效。

超短波是临床常用的理疗方法,有无热、微热、温热、热 4 个剂量级别,我们选择微热量,作为我们实验的治疗剂量。超短波对于改善血流、血液状态等方面的作用已有报道^[17]。而血液循环的改善对于股骨头坏死而言,是早期治疗股骨头坏死的最终目的。超短波治疗可以改善股骨头的血液供应,减缓或逆转疾病的病理发展。正如我们实验中观察到的那样,超短波组软骨下血管数较造模组有显著性增加。我们推测血液循环的改善促进了软骨厚度的增加,促进骨髓基质细胞向前成骨细胞和成骨细胞的分化,增加成骨细胞的来源,进而促使骨小梁变宽,骨坏死减少,从而使坏死骨能够获得有效修复和塑型,阻止股骨头坏死的进一步发展。此外,超短波可能促进骨髓基质细胞向前成骨细胞和成骨细胞的分化,抑制向脂肪细胞分化,间接抑制髓内脂肪的堆积,以降低股骨头内的压力并改善股骨头的血流,防止骨缺血的进一步演化。我们的实验证实,超短波组不论是软骨厚度、成骨细胞数、骨小梁宽度及脂肪细胞数等与造模组的差异均有显著

性。所以,超短波治疗对于早期激素性股骨头坏死是一种有效的治疗方法,其疗效是肯定的。

参 考 文 献

- [1] Dotti R, Muller DM, Benini A. Clinical aspects, etiology, pathogenesis, diagnosis and therapy of aseptic bone necrosis—a current analysis of the literature. *Schweiz Rundsch Med Prax*, 2002, 91: 163-176.
- [2] 叶建红, 宁亚功, 李峻辉, 等. 兔股骨头缺血性坏死模型的血管改变和血液流变学研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 602-603.
- [3] 孙强三, 孙昭辉, 王晓红, 等. 超短波早期治疗激素性股骨头缺血性坏死的实验研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 729-731.
- [4] 孙强三, 王道清, 王晓红, 等. 超短波或中药早期治疗对激素性股骨头缺血性坏死兔 TXA2-PG2 平衡的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 729-731.
- [5] 李子荣, 张念非, 岳德波, 等. 激素性股骨头坏死动物模型的诱导和观察. *中华外科杂志*, 1995, 33: 485.
- [6] 田伟明, 张英泽. 激素诱导股骨头缺血性坏死发病机制的研究进展. *中医正骨*, 2004, 16: 57-58.
- [7] Nakata K, Masuhara K, Matsui M. et al. Suppression of osteonecrosis by platelet activating factor antagonist in a rabbit serum sickness model. *ARCO News Letter*, 1996, 8: 109.
- [8] 杨万石, 王坤正, 王奎生, 等. 激素诱发骨坏死的免疫组织化学研究. *中国骨伤*, 1999, 12: 14-17.
- [9] 李明亮, 高根德. 体外冲击波治疗家兔降股骨头坏死的实验研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 648-651.
- [10] 燕铁斌, 常华. 体外冲击波在骨关节疾患中的应用. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 699-700.
- [11] Ludwig J, Lauber S, Lauber HJ, et al. High energy shock wave treatment of femoral head necrosis in adults. *Clin Orthop*, 2001, 387: 119-126.
- [12] Eftekhar NS, Schink-Ascani MM, Mitchell SN, et al. Osteonecrosis of the femoral head treated by pulsed electromagnetic fields (PEMFs): a preliminary report. *Hip*, 1983, 306-330.
- [13] Seber S, Omeroglu H, Cetinkanat H, et al. The efficacy of pulsed electromagnetic fields used alone the treatment of femoral head osteonecrosis a report of two cases. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2003, 37: 410-413.
- [14] Reis ND, Schwartz O, Militianu D, et al. Hyperbaric oxygen therapy as a treatment for stage-I avascular necrosis of the femoral heads. *J Bone Joint Surg Br*, 2003, 85: 371-375.
- [15] 常巍, 程少华, 宋跃明, 等. 高压氧治疗兔激素性股骨头缺血坏死的病理学变化实验研究. *中国矫形外科杂志*, 2005, 9: 1323-1325.
- [16] Landry PS, Sadasivan KK, Marino AA, et al. Electromagnetic fields can affect osteogenesis by increasing the rate of differentiation. *Clin Orthop*, 1997, 338: 262-270.
- [17] 张志强, 张立新, 苑秀华, 等. 超短波对大鼠局灶性脑缺血再灌注后大脑的保护作用. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25: 322-324.

(修回日期: 2006-11-29)

(本文编辑: 熊芝兰)