

文章编号:1000-5404(2014)19-2051-04

技术方法

应用软骨下钻孔结合液氮冷冻制作兔股骨头缺损坏死模型

李海冰,瞿向阳,李明,罗聪,魏光辉 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院骨科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地)

[摘要] **目的** 通过液氮冷冻在兔股骨头缺损的基础上造成坏死,为股骨头缺血坏死的治疗研究建立动物模型。**方法** 22只健康成年新西兰大白兔建立单侧股骨头缺损模型,并用液氮从骨缺损内将股骨头冷冻坏死,术后定期行股骨头X线片检查、大体标本观察、组织切片及墨汁灌注染色了解股骨头坏死及修复情况。**结果** 液氮冷冻构建兔股骨头坏死缺损股骨头X线片、大体标本、组织学形态及墨汁灌注染色不同阶段均出现明显变化。**结论** 液氮冷冻建立的兔股骨头缺损坏死可以作为模拟临床手术刮出死骨,植骨治疗研究的动物模型。

[关键词] 股骨头坏死;骨缺损;液氮冷冻;动物模型;兔

[中图分类号] R681.8

[文献标志码] B

股骨头缺血性坏死是一种发生于髋关节的棘手疾病,好发于30~50岁青壮年,近年来其发病率呈上升趋势,其病因涉及多种因素^[1],发病机制尚未明了,病理过程复杂,治疗方法多种多样^[2-3],但均不能终止或者逆转已发生股骨头坏死的病理过程,最终股骨头塌陷需行全髋关节置换^[4]。建立能够复制人股骨头缺血性坏死的动物模型,对了解股骨头缺血性坏死的发生、发展及预后具有重要意义。目前股骨头缺血性坏死动物模型大多数只能模拟股骨头缺血坏死的早期病理变化,很少能制作出股骨头坏死伴关节面塌陷。本实验总结已有研究成功经验并进行改进,采用液氮在股骨头缺损的基础上冷冻,成功诱导出股骨头坏死伴关节面塌陷,为探索股骨头缺血性坏死治疗,特别是为Ficat分期I、II髓芯减压和(或)股骨头头颈交界处开窗刮出死骨后植骨治疗提供较好的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年新西兰大白兔22只,雌雄不拘,体质量(2.25±0.23)kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

动物术前采用3%戊巴比妥钠,按30mg/kg自耳缘静脉麻醉动物,麻醉显效后,取仰卧位固定于手术台上,剪毛、脱毛后常规消毒铺巾,取右下肢髋关节外侧横行切口长3~5cm,切开皮肤、皮下组织、深筋膜,分离肌肉,部分切断附着于大粗隆上的肌肉,暴露大转子,顺大转子前内侧分离直达髋关节囊,打开

髋关节囊,暴露股骨头,在软骨与骨的交界处,用电钻以直径3.5mm钻头向股骨头前内侧钻孔,深度约4mm,然后用mini刮匙向内侧潜行刮除松质骨至软骨下骨占股骨头总体积的30%~40%,模拟骨坏死行病灶清理术,充分保护周围软组织,用空针穿入股骨头钻孔处,将液氮注射到股骨头局部冷冻1次^[5],维持1min,冷冻后生理盐水复温,逐层缝合切口。实验动物均单侧手术,对侧作为自身对照。术后将动物单独置于兔笼中,肌注青霉素预防感染。

1.3 观察方式

1.3.1 全身情况观察 观察术后实验动物的一般情况,如饮食、精神状态、运动、毛发、有无伤口感染等。

1.3.2 X线片观察 术后1、2、4、6、8周行X线片检查,观察股骨头的密度变化,观察股骨头外形密度及小梁变化。

1.3.3 股骨头大体标本观察 术后1、2、4、6、8周各处死3只,大体观察股骨头外观。

1.3.4 股骨头标本的制作和观察 处死实验动物,常规行HE染色及甲苯胺蓝染色,光镜下观察股骨头骨膜、软骨、骨组织、骨小梁及骨髓组织。

1.3.5 血管墨汁灌注染色 术后2、4、8周各2只,麻醉后行墨汁灌注。厚切片(25μm)观察股骨头血管分布和生长情况,所有标本切片取5个低倍视野,对微血管数进行计数。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 12.0统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 动物一般情况

术后1周内,实验动物右下肢轻度跛行,饮食精神欠佳,运动量明显减少,毛发少紊乱。后逐渐恢复,2周后实验动物回复术前状态,大部分伤口I期愈合,其中2例出现伤口感染,经换药后有效控制,1例术后7d行X线片检查发现股骨颈骨折而退出实验。

2.2 股骨头X线片检查

造模后1周,股骨头缺损清晰,外形圆,软骨下骨无塌陷,

[基金项目] 重庆市科委计划项目(CSTC2009BB5359);国家临床重点专科建设项目(2013554)

[通信作者] 瞿向阳, E-mail: drqxy04090@126.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140807.1602.013.html> (2014-08-07)

骨密度无明显变化,骨小梁结构基本正常。术后2周,股骨头缺损仍可见,但较前略缩小,软骨下骨开始出现塌陷,股骨颈开始变粗短。术后4周,股骨头缺损塌陷,股骨头失去正常圆的形态,变得扁平,骨小梁结构出现紊乱。术后6周,股骨头形态不规则,呈椭圆形,软骨下骨塌陷,骨密度下降,骨小梁结构紊乱。术后8周,股骨头变形,软骨下骨塌陷,骨小梁结构紊乱。对照侧股骨形态规则,外形圆,骨小梁结构正常(图1)。

2.3 股骨头标本大体观察

术后1周,股骨头标本缺损清晰可见,关节软骨面光滑。术后2周,股骨头标本仍可见缺损,关节软骨面基本光滑。术后4周,股骨头标本关节软骨面出现塌陷,关节软骨轻度剥脱,股骨头失去圆形轮廓。术后6周,股骨头关节软骨面片状剥脱,剥脱加重。术后8周,股骨头标本关节软骨面大片剥脱,关节软骨下骨裸露。对照侧股骨头完整,关节软骨光滑,无剥脱(图2)。

2.4 股骨头标本组织学观察

2.4.1 股骨头标本 HE 染色观察 对照侧股骨头 HE 染色,软骨表面光滑;骨小梁完整,排列规则;骨髓中造血细胞丰富,脂肪细胞相对较少,形态正常。术后1周,软骨面较光滑,周围骨小梁内可见空骨陷窝;骨髓腔内造血细胞减少,充满脂肪细

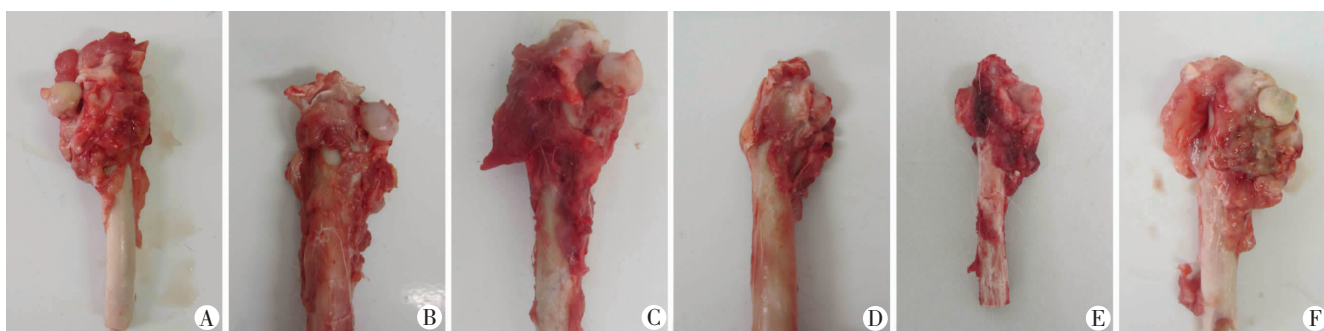
胞,可见散在炎性渗出物。术后2周,软骨面基本光滑;空骨陷窝数量增多,软骨下骨小梁发生断裂,排列紊乱;骨髓腔造血细胞明显减少,可见散在炎性渗出物及骨碎片。术后4周,软骨开始剥脱,软骨区可见断裂,软骨层变薄;周围骨小梁断裂、排列紊乱;可见增生的纤维组织包绕骨碎片,骨碎片出现溶解吸收;骨髓腔内脂肪细胞融合成小囊。术后6周,软骨表面片状剥脱,软骨及骨小梁骨折塌陷;周围骨小梁排列更加紊乱,大部分骨小梁为空骨陷窝;可见较多剥脱的骨碎屑及碎片;骨髓腔内可见大片纤维化。术后8周,关节软骨大片剥脱,软骨区菲薄,软骨及骨小梁断裂塌陷;周围骨小梁排列杂乱无章;可见大量骨碎片及溶骨坏死组织;骨髓腔内脂肪细胞坏死(图3)。

2.4.2 股骨头标本甲苯胺蓝染色观察 术后1周,软骨层无剥脱,软骨基质着均匀蓝色,细胞呈柱状排列、整齐,核大小均匀,与对照侧基本一致。术后2周,软骨层无明显剥脱,细胞排列开始紊乱,细胞大小基本一致。术后4周,软骨层变薄,软骨基质着色不均,着色变浅,可见细胞排列不整齐,呈细胞簇状。术后6周,软骨层片状剥脱,软骨基质着色不均,着色变浅,可见软骨细胞大量减少,排列紊乱。术后8周,软骨层大片剥脱,软骨层薄,软骨细胞稀少,排列紊乱(图4)。



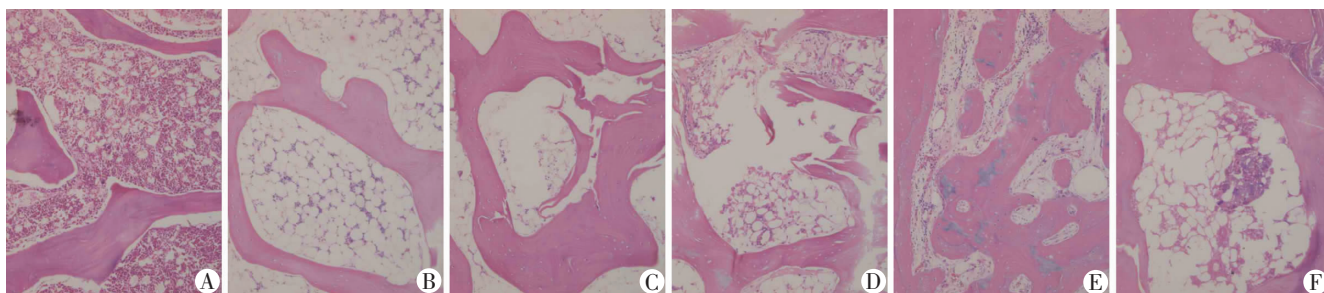
A: 对照侧股骨头; B: 1周股骨头缺损清晰(箭头所示); C: 2周股骨头缺损缩小(箭头所示); D: 4周股骨头扁平(箭头所示); E: 6周股骨头变形(箭头所示); F: 8周股骨头变形,骨质稀疏(箭头所示)

图1 液氮冷冻构建兔股骨头坏死缺损股骨头 X 线片表现



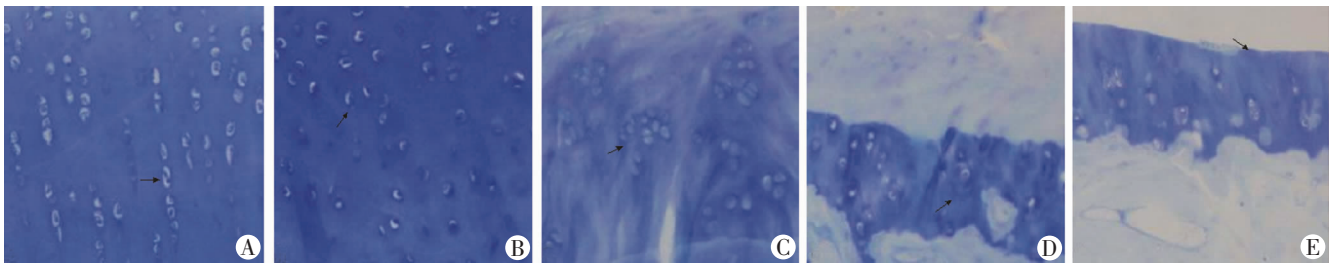
A: 对照侧股骨头; B: 1周; C: 2周; D: 4周; E: 6周; F: 8周

图2 液氮冷冻构建兔股骨头坏死缺损股骨头大体观察



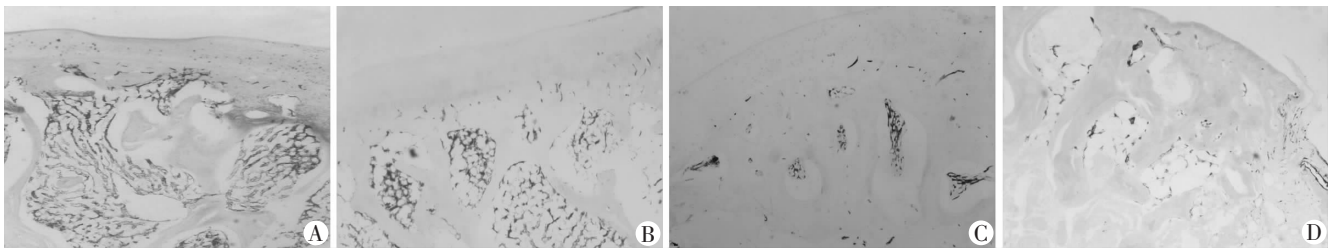
A: 对照侧股骨头; B: 1周; C: 2周; D: 4周; E: 6周; F: 8周

图3 术后不同时间缺损股骨头组织病理学变化 (HE × 100)



A:1周;B:2周;C:4周;D:6周;E:8周

图4 甲苯胺蓝染色观察术后不同时间缺损股骨头组织病理学变化 (×100)



A:对侧股骨头;B:2周;C:4周;D:8周

图5 墨汁灌注染色观察术后不同时间缺损股骨头组织病理学变化 (×40)

2.5 血管墨汁灌注染色观察

对照侧股骨头软骨下骨小梁内的髓腔中形成血管网,血管网相通,小血管丰富,未见血管内墨汁外渗。术后2周,股骨头血管开始减少,血管网仍相通。术后4周,股骨头血管显著减少,灌注不全面,血管出现明显栓塞。术后8周,股骨头血管稀疏,血管大量闭塞(图5)。经统计学处理,2、4、8周低倍视野微血管数实验侧与对照侧比较,差异有统计学意义($P < 0.01$,表1)。

表1 术后不同时间缺损股骨头微血管计数比较($n = 10, \bar{x} \pm s$)

时间	实验侧	对照侧	P 值
2周	117.54 ± 29.12	345.40 ± 15.79	<0.01
4周	73.56 ± 7.22	412.50 ± 37.44	<0.01
8周	36.66 ± 6.76	374.56 ± 22.74	<0.01

3 讨论

股骨头缺血性坏死是骨科领域一个较为棘手的难题。近年来,国内外学者对 AVFH 动物模型进行了许多研究,但众多模拟实验中无一种动物模型组织学和形态学改变能够完全模拟人股骨头坏死病理学变化^[6]。股骨头缺血坏死分创伤性和非创伤性两种类型,因此,建立动物模型也主要是分创伤型模型和非创伤型模型。创伤性股骨头坏死主要通过人为造成动物股骨头脱位,对股骨颈截骨或阻断股骨头血供而造成股骨头坏死^[7],模拟临床股骨头颈骨折和髋关节脱位后股骨头坏死的形成过程。建立非创伤型动物模型方法较多,目前主要包括采用激素和酒精性模型、缺损模型、液氮模型等^[8]。激素和酒精性模型多用于病因及病理机制研究^[9-10],缺损型模型适合于开窗减压和髓芯减压的治疗研究^[11-12]。LaPorte 等^[13]应用 Trapdoor 方法制造骨缺损建立了犬股骨头坏死模型,这种方法

直接损伤关节软骨,不符合人股骨头缺血性坏死的自然病程,影响对软管的观察。液氮冷冻股骨头缺血性坏死动物模型适用于各种治疗性实验研究的实施。Takaoka 等^[14]利用液氮冷冻方法建立犬股骨头坏死模型,但这种方法存在诸多缺陷,如造成髋关节脱位、创伤大、动物存活率较低等,不利于后续研究。

本实验以常见的新西兰大白兔作为造模动物,总结已有研究成功经验,并进行一定的改进,出于对软骨变化的考虑,尽可能避免骨缺损模型对软管的直接损伤,因而选择不直接损伤软管的改良的股骨头缺损制作方案,在头颈交界处开窗,mini 刮匙潜行刮骨至软骨下骨,克服了 Trapdoor 方法的不足,骨缺损能有效地诱导软骨下骨修复时软骨塌陷,应用局部液氮冷冻兔股骨头内缺损,能引起股骨头内血管痉挛、血管内凝血及血管内皮损伤,继而血管壁通透性增加、股骨头内髓腔出血,股骨头复温后诱发缺血再灌注损伤,最终导致股骨头无菌性坏死^[14]。液氮冷冻不同于其他方法造成的坏死,它不会残留化学物质,因此不会干扰刮骨后植骨的研究。

将改良 Trapdoor 法制造骨缺损模型和液氮冷冻模型有效地结合起来,不造成动物股骨头脱位,是一种坏死程度和坏死时间可以控制的标准化的动物模型,造模时间短,坏死塌陷成功率高,动物死亡率低,可重复性大,能在短期内复制不同分期的骨坏死模型。本研究结果显示,实验兔无因造模而死亡,除1例出现股骨颈骨折外,实验动物均造模成功,对于创伤导致的股骨头缺损性坏死病理改变及防治研究具有重要意义,为进一步研究股骨头缺血坏死刮出死骨后植骨治疗奠定基础。

参考文献:

[1] Peled E, Bejar J, Barak M, et al. Core decompression and alendronate

- treatment of the osteonecrotic rat femoral head: computer-assisted analysis[J]. *Int J Exp Pathol*, 2013, 94(3): 212-216.
- [2] Lim Y W, Kim Y S, Lee J W, *et al.* Stem cell implantation for osteonecrosis of the femoral head[J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45: e61.
- [3] Calori G M, Mazza E, Colombo M, *et al.* Treatment of AVN using the induction chamber technique and a biological-based approach: indications and clinical results[J]. *Injury*, 2014, 45(2): 369-373.
- [4] Banerjee S, Issa K, Pivec R, *et al.* Osteonecrosis of the hip: treatment options and outcomes[J]. *Orthop Clin North Am*, 2013, 44(4): 463-476.
- [5] Velez R, Soldado F, Hernandez A, *et al.* A new preclinical femoral head osteonecrosis model in sheep[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2011, 131(1): 5-9.
- [6] Fan M, Peng J, Qin L, *et al.* Experimental animal models of osteonecrosis[J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(8): 983-994.
- [7] Hang D, Wang Q, Guo C, *et al.* Treatment of osteonecrosis of the femoral head with VEGF165 transgenic bone marrow mesenchymal stem cells in mongrel dogs[J]. *Cells Tissues Organs*, 2012, 195(6): 495-506.
- [8] Long T, Xu J, McClure S R, *et al.* Potential femoral head osteonecrosis model induced by high-intensity focused ultrasound[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2013, 39(6): 1056-1065.
- [9] Zhao G, Yamamoto T, Motomura G, *et al.* Cholesterol- and lanolin-rich diets may protect against steroid-induced osteonecrosis in rabbits[J]. *Acta Orthop*, 2013, 84(6): 593-597.
- [10] Okazaki S, Nagoya S, Tateda K, *et al.* Experimental rat model for alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Int J Exp Pathol*, 2013, 94(5): 312-219.
- [11] Mont M A, Jones L C, Elias J J, *et al.* Strut-autografting with and without osteogenic protein-1: a preliminary study of a canine femoral head defect model[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83-A(7): 1013-1022.
- [12] Mont M A, Einhorn T A, Sponseller P D, *et al.* The trapdoor procedure using autogenous cortical and cancellous bone grafts for osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1998, 80(1): 56-62.
- [13] LaPorte D M, Mont M A, Mohan V, *et al.* Osteonecrosis of the humeral head treated by core decompression[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355): 254-260.
- [14] Takaoka K, Yoshioka T, Hosoya T, *et al.* The repair process in experimentally induced avascular necrosis of the femoral head in dogs[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 1981, 99(2): 109-115.

(收稿:2014-03-24;修回:2014-04-07)

(编辑 龙亮)

(上接 2050 页)

台州地区既往无蝗虫病即发热伴血小板减少综合征的报道,基层医生可能对该病临床经验不足,对蝗虫病缺乏认识,是出现误诊的一大原因。本病例表现为发热及消化道症状为主,台州地区是蝗虫病非流行地区,近十余年罕见本病,4月份虽为流行季节,但患者入院后第2天查体有咽部充血、肺部啰音体征,又有血小板减少,且本地区4月份是上呼吸道感染和肾综合征出血热的高发季节,故易误诊为呼吸道感染、肾出血热等病毒感染。其次,本病例主要为血小板减少明显,血小板减少常见于原发性血小板减少性紫癜、再生障碍性贫血、血栓性血小板减少性紫癜等,作为血液科专科医生,缺少其他系统或者学科的基础,因此对于疑难病历,建立完善的多学科病历讨论制度是减少误诊的1项重要措施。再次,新型布尼亚病毒感染常累及多器官系统,无特异性临床表现及体征,缺少统一诊断标准,且发展迅速,获取病原学往往等待时间过长,是导致本病例误诊的又一重要原因。根据卫生部《发热伴血小板减少性综合征诊疗方案》,在蝗活动区有蝗叮咬史,临床表现以发热、全身酸痛、乏力、恶心和呕吐等主要症状,临床检验血小板降低、白细胞进行性减少,尿蛋白阳性,实验室检测新型布尼亚病毒核酸阳性,血清中分离到新型布尼亚病毒,恢复期血清免疫荧光抗体1:(160~320),可确诊^[4]。最后,蝗病患者在蝗虫叮咬后无典型皮疹等体征,本病例入院后未详细追问病史并进行详尽的体格检查,是误诊的另一重要原因。因此对于在丘陵、低山产茶县区的田间或林地劳作的患者,突发有发热、乏力等症状,应联系到该病的可能性,并详细追问病史及进行详尽的体格检查以尽量减少误诊。

在治疗上,目前临床针对本病的治疗方案,鲜少有针对病原学的特异性治疗方法报道,主要治疗方法多为对症支持治疗。张海涛等^[5]报道试用人免疫球蛋白升高白细胞和血小板治疗重症发热伴血小板减少综合征患者,有效地预防了细菌及

真菌的继发感染,使得病情在短期内得到控制。其次,在基础治疗的同时要注意维持水电解质和酸碱平衡,保护肝功能,防止多器官功能障碍的发生。对合并有DIC患者,建议可早期使用肝素^[6]。第三,临床上建议早期使用多西环素进行实验性治疗,以免延误治疗时机。本患者虽然于入院第2天给予多西环素治疗,仍然未逆转疾病进展,可能与最初发热时诊断、治疗不及时相关,也可能由于多西环素目前只是处于实验性治疗阶段,具体治疗效果不确切。

因此,对SFTS应做到早发现、早诊断、早治疗,特别是对SFTS临床特点、实验室检查要有清醒的认识,力争做到早干预,多学科干预,才能最大可能地降低病死率。

参考文献:

- [1] Yu X J, Liang M F, Zhang S Y, *et al.* Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(16): 1523-1532.
- [2] Zhang Y Z, He Y W, Dai Y A, *et al.* Hemorrhagic fever caused by a novel Bunyavirus in China: pathogenesis and correlates of fatal outcome[J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(4): 527-533.
- [3] Hoffmann B, Scheuch M, Hoper D, *et al.* Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011[J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(3): 469-472.
- [4] 庞卫龙,葛君华,陈杨. 新型布尼亚病毒感染1例报告[J]. *浙江预防医学*, 2013, 25(7): 54-55.
- [5] 张海涛,叶继斌,胡传松,等. 丙种免疫球蛋白冲击治疗危重型发热伴血小板减少综合征临床观察[J]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2013, 7(5): 725-726.
- [6] 吕沐天,孙颖,刘沛,等. 发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2013, 33(2): 86-88.

(收稿:2014-08-13;修回:2014-09-15)

(编辑 王红)