

体外冲击波疗法对激素性股骨头缺血坏死中血管内皮生长因子及骨形态发生蛋白的影响

李平 郭小波 刘宇强 刘强 范晓洁

【摘要】 目的 观察体外冲击波疗法对激素性股骨头缺血坏死中血管内皮生长因子(VEGF)和骨形态发生蛋白(BMP)的影响。方法 新西兰大白兔40只, Yamamoto法制造模成功后, 左侧股骨头做冲击波治疗设为实验组(A组), 右侧股骨头不做冲击波治疗设为对照组(B组)。A组分别于治疗后1、2、4、8、12周处死动物, 每次随机处死8只, 取双侧股骨头行大体标本HE染色及细胞计数, 免疫组化观察VEGF和BMP的表达。结果 HE染色观察在体外冲击波冲击后4、8、12周, 毛细血管计数平均值分别为 9.95 ± 2.14 , 14.70 ± 3.08 , 13.15 ± 3.07 , 而B组分别为 4.85 ± 1.67 , 4.30 ± 1.63 , 4.40 ± 1.79 ; 成骨细胞计数A组平均值为 33.35 ± 3.39 , 47.35 ± 5.20 , 53.40 ± 5.09 , 而B组分别为 24.1 ± 2.45 , 21.70 ± 4.08 , 19.60 ± 4.28 , HE染色两组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。免疫组化染色在体外冲击波冲击后的2、4、8、12周VEGF表达A组平均值为 0.104 ± 0.018 , 0.177 ± 0.020 , 0.167 ± 0.017 , 0.144 ± 0.031 , 而B组分别为 0.074 ± 0.017 , 0.078 ± 0.021 , 0.078 ± 0.023 , 0.070 ± 0.019 ; 且BMP表达A组平均值为 0.210 ± 0.028 , 0.304 ± 0.039 , 0.292 ± 0.052 , 0.268 ± 0.053 , 而B组分别为 0.136 ± 0.025 , 0.140 ± 0.033 , 0.144 ± 0.029 , 0.118 ± 0.028 , 免疫组化染色两组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 体外冲击波疗法可促进激素性股骨头缺血坏死中VEGF和BMP的表达。

【关键词】 股骨头坏死; 血管内皮生长因子类; 骨形态发生蛋白类; 体外冲击波疗法

Effects of extracorporeal shock wave therapy on the expression of VEGF and BMP in femoral head tissue of rabbits with steroid-induced avascular necrosis Li Ping*, Guo Xiaobo, Liu Yuqiang, Liu Qiang, Fan Xiaojie. *Department of Orthopedics, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Li Ping, Email: liping4639@163.com

【Abstract】 Objective To observe the VEGF and BMP in the glucocorticoid-induced ischemic necrosis of femoral head treated with extracorporeal shock wave therapy. **Methods** 40 New Zealand rabbits were modeled in Yamamoto. Experimental group (group A): the left side of the rabbits, femoral head treated with extracorporeal shock wave therapy; contrast group (group B): the right side of the rabbits, femoral head without any treatment. After 1, 2, 4, 8, 12 weeks random eight rabbits to be put to death at a time. Both sides of all the rabbits, femoral head were observed in HE staining for cell count, the expression of VEGF and BMP immunohistochemical observation. **Results** HE dyeing observation after 4, 8, 12 weeks, group A blood capillary count average were 9.95 ± 2.14 , 14.70 ± 3.08 , 13.15 ± 3.07 , and group B were 4.85 ± 1.67 , 4.30 ± 1.63 , 4.40 ± 1.79 ; Osteoblast count group A mean value of 33.35 ± 3.39 , 47.35 ± 5.20 , 53.40 ± 5.09 , while group B were 24.1 ± 2.45 , 21.70 ± 4.08 , 19.60 ± 4.28 , HE staining was similar between the

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.13.023

基金项目: 山西省科技攻关计划项目(20100311097)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第一医院骨科(李平、范晓洁); 山西省晋煤集团总医院骨科(郭小波); 山西医科大学[刘宇强(骨科研究生)]; 山西大医院骨科(刘强)

通讯作者: 李平, Email: liping4639@163.com

two groups had statistical significance ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining after 2, 4, 8, 12 weeks of VEGF expression in group A mean value of 0.104 ± 0.018 , 0.177 ± 0.020 , 0.167 ± 0.017 , 0.144 ± 0.031 , while group B were 0.074 ± 0.017 , 0.078 ± 0.021 , 0.078 ± 0.023 , 0.070 ± 0.019 ; And the expression of BMP group A mean value of 0.210 ± 0.028 , 0.304 ± 0.039 , 0.292 ± 0.052 , 0.268 ± 0.053 , while group B were 0.136 ± 0.025 , 0.140 ± 0.033 , 0.144 ± 0.029 , 0.118 ± 0.028 , immunohistochemical staining was similar between the two groups had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Extracorporeal shock wave therapy can promote rabbit VEGF and BMP in the glucocorticoid-induced ischemic necrosis of femoral head.

【Key words】 Femur head necrosis; Vascular endothelial growth factors; Bone morphogenetic proteins; Extracorporeal shock wave therapy

股骨头缺血性坏死 (avascular necrosis of femoral head, ANFH) 仍然是骨科治疗难题之一, 致残率高, 尽管人工关节置换为该患者带来了福音, 但对年轻或股骨头早期缺血的患者, 人工关节置换不是首选。经临床和基础研究发现, 体外冲击波疗法对于股骨头缺血坏死有一定疗效, 尽管治疗机制还不是十分清楚, 但却是股骨头缺血坏早期或不适宜手术患者的选择之一。

材料与方法

一、材料和仪器设备

健康新西兰大白兔40只, 雌雄不限, 体重3~4 kg。脂多糖Lipopolysaccharides (LPS), 甲基强的松龙注射液40 mg, 注射用青霉素钠400万单位, EDTA分析纯, 戊巴比妥钠, 即用型SABC免疫组化染色试剂盒, Anti-Rabbit VEGF 以及 Anti-Rabbit BMP2/4。南鲸HB-ESWL-VG冲击波碎石机, Olympus普通光学显微镜, SONY ssc-dc18p color video camera 图像采集器, 美国通用电器 Signa Infinity 1.5T 医用磁共振成像设备, 成都泰盟科技有限公司 BI2000 医学图像分析系统。

二、方法

1. 模型制作: 使用Yamamoto等^[1]的技术造模, 6周后取出股骨头标本剖开肉眼大体观察(图1), 可见: 股骨头外观色暗, 软骨变薄, 沿股骨颈轴线剖开, 见股骨头内有脂肪组织堆积, 形成脂肪占位。骨小梁减少, 股骨头内可见囊性病灶。股骨头MR(图2)可见, 头下方不规则片状低信号区。HE染色(图3, 4)可见骨小梁稀疏变细, 可见碎片, 髓腔内造血组织明显减少, 毛细血管数量减少, 脂肪细胞体积增大, 有的融合成泡状, 空骨陷窝明显增多, 证明造模成功。

2. 分组: 每只动物左股骨头进行体外冲击波冲击, 设计为实验组(A组), 右股骨头不作任何处理,

作为对照组(B组)。

3. 冲击波治疗: 采用南鲸HB-ESWL-VG冲击波碎石机进行坏死股骨头的体外冲击波冲击。其仪器参数为: 能量 0.26 mJ/mm^2 , 冲击波剂量1 000次, 频率60~80次/min。3%戊巴比妥钠按每1 ml/kg体重麻醉状态下, 左侧股骨头区剃毛、涂抹耦合剂、体位固定后, X线透视下定位行体外冲击波疗法。兔行冲击波冲击后自由活动。

4. 观察指标与方法: 分别在冲击波治疗后1、2、4、8、12周处死动物, 取A组和B组股骨头, 分别进行HE染色和免疫组化染色。

(1) HE染色细胞计数: 毛细血管计数: 每个组织选取2张组织切片, 每一切片随机选取2个视野, 在 $200 \times$ 光学显微镜下计数微血管的数目(/视野), 管腔面积大于8个红细胞直径的血管不计, 取平均值。

成骨细胞计数: 成骨细胞位于骨小梁的边缘, 细胞较骨细胞大, 胞浆蓝染。根据上述特点, 每个组织选取2张组织切片, 按照从左至右, 从上到下的顺序, 随机选取2个骨小梁区域。在 $200 \times$ 光学显微镜下, 对成骨细胞进行计数(/视野), 取平均值。

(2) 免疫组化平均光密度分析: 对不同时相所得到的血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 免疫组化染色切片, 在 $250 \times$ 光学显微镜下采集图像, 医学图像分析系统行真彩图像分析, 取得平均光密度值。每个组织随机选取2个切片每切片随机取2个阳性反应区, 其均数作为该区相对表达含量。

三、统计学分析

所得数据用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用SPSS 13.0 统计学软件对相同时间所获得的实验组和对照组的数据进行配对t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 实验组与对照组毛细血管计数的对比 (条/视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	体外冲击波冲击后时间				
	1周	2周	4周	8周	12周
实验组	4.81±1.38	5.10±1.17	9.95±2.14 ^a	14.70±3.08 ^a	13.15±3.07 ^a
对照组	4.62±1.36	4.80±1.32	4.85±1.67	4.30±1.63	4.40±1.79

注: 与相同时间对照组相比, ^aP<0.05

表2 实验组与对照组成骨细胞计数的对比 (个/视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	体外冲击波冲击后时间				
	1周	2周	4周	8周	12周
实验组	21.19±4.04	23.10±3.85	33.35±3.39 ^a	47.35±5.20 ^a	53.40±5.09 ^a
对照组	21.81±3.71	21.65±3.60	24.1±2.45	21.70±4.08	19.60±4.28

注: 与相同时间对照组相比, ^aP<0.05

表3 实验组与对照组VEGF表达对比 (μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	体外冲击波冲击后时间				
	1周	2周	4周	8周	12周
实验组	0.066±0.011	0.104±0.018 ^a	0.177±0.020 ^a	0.167±0.017 ^a	0.144±0.031 ^a
对照组	0.069±0.011	0.074±0.017	0.078±0.021	0.078±0.023	0.070±0.019

注: 与相同时间对照组相比, ^aP<0.05

表4 实验组与对照组BMP表达对比 (μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	体外冲击波冲击后时间				
	1周	2周	4周	8周	12周
实验组	0.140±0.030	0.210±0.028 ^a	0.304±0.039 ^a	0.292±0.052 ^a	0.268±0.053 ^a
对照组	0.133±0.028	0.136±0.025	0.140±0.033	0.144±0.029	0.118±0.028

注: 与相同时间对照组相比, ^aP<0.05

结 果

一、HE染色观察

体外冲击波冲击后1周和2周, A组可以观察到髓腔内出血。4周, 实验组髓质中毛细血管形成明显, 骨小梁周围出现少量梭形成骨细胞。而B组骨小梁变细、稀疏。8周, A组骨小梁较前增粗, 毛细血管和成骨细胞在新骨形成区明显增多(图5, 6), 而B组部分骨小梁断裂。12周, A组可以观察到骨小梁明显增厚(图7), 而B组大部分骨小梁断裂(图8)。

1. 毛细血管计数: 体外冲击波冲击后1周和2周, A组股骨头内可见少量的毛细血管。4周, 毛细血管开始增高。8周, 毛细血管明显增高, 特别是在坏死后增殖区。12周, A组在新骨形成区可见到高密度的毛细血管, 而在B组股骨头内只有少量的毛细血管。体外冲击波冲击后4、8、12周, A组毛细血管计数比对照组显著增高(表1)。

2. 成骨细胞计数: 体外冲击波冲击后1周和2周, A组股骨头内可见稀少的成骨细胞。4周, 骨小梁周围出现少量梭形成骨细胞。8周, A组骨小梁周

围出现成单行排列的成骨细胞。12周, 观察到骨小梁明显增厚且被大量的成骨细胞所包绕。而B组大部分骨小梁断裂, 只有少量的成骨细胞出现。在体外冲击波冲击后4、8、12周, A组成骨细胞计数比B组显著增高(表2)。

二、免疫组化染色观察

1. 体外冲击波对于缺血坏死股骨头VEGF表达的影响: A组, 体外冲击波冲击后1周, 只有少量的VEGF表达。2周, 成骨细胞和血管内皮细胞VEGF表达开始增多(图9)。4周, 成骨细胞和血管内皮细胞中VEGF表达达高峰(图10)。8周, 在新骨形成区的内皮细胞和成骨细胞VEGF表达最多(图11)。12周, 新形成骨表面的成骨细胞也可以见到VEGF密集的表达(图12)。而B组, 只有少量的VEGF表达(图13)。体外冲击波冲击后2、4、8、12周, A组股骨头VEGF表达比B组显著增高(表3)。

2. 体外冲击波对于缺血坏死股骨头BMP表达的影响: A组, 体外冲击波冲击后1周, 仅少量的BMP表达。2周, 成骨细胞BMP表达开始增高(图14)。4周, 成骨细胞BMP表达达到高峰(图15)。8周,

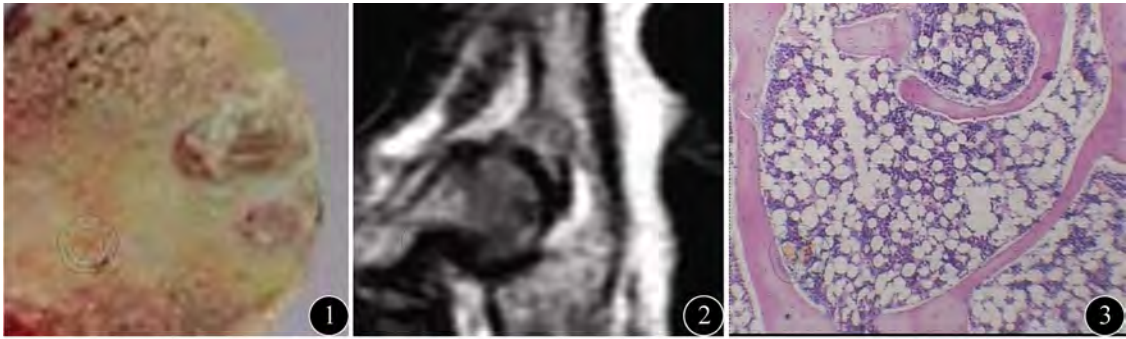


图1 造模成功, 肉眼大体表现 图2 造模成功MRI表现 (T1WI) 图3 造模成功 (HE × 40)

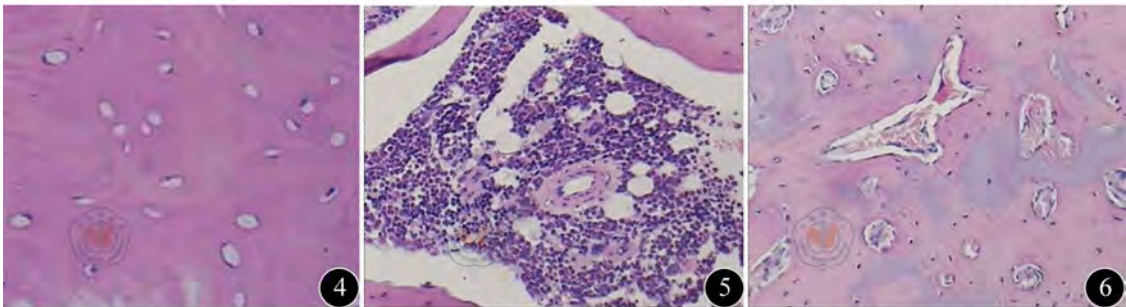


图4 造模成功 (HE × 400) 图5 体外冲击波冲击后8周 (HE × 200) 图6 体外冲击波冲击后8周 (HE × 200)

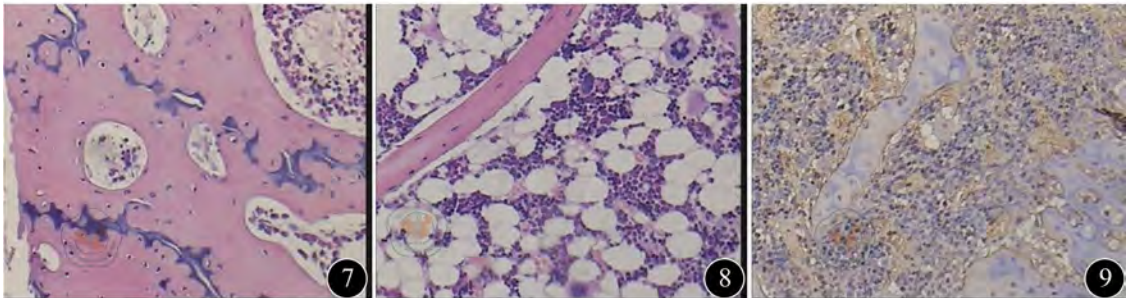


图7 体外冲击波冲击后12周 (HE × 200) 图8 体外冲击波冲击后12周 (HE × 200) 图9 A组体外冲击波冲击后2周VEGF表达 (免疫组化 × 250)

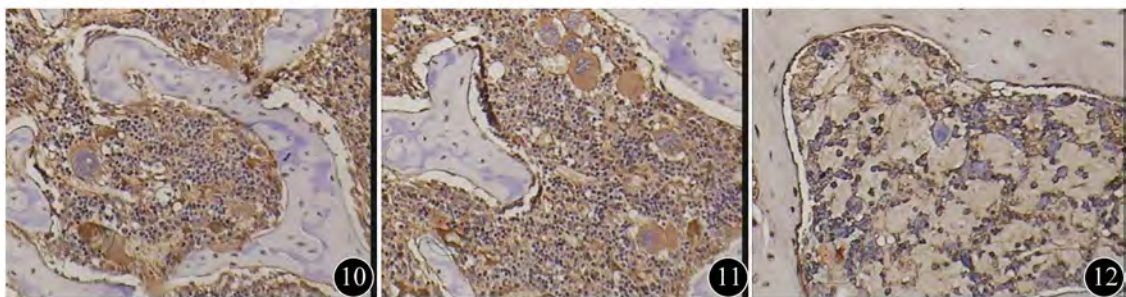


图10 A组 体外冲击波冲击后4周VEGF比表达 (免疫组化 × 250) 图11 A组体外冲击波冲击后8周VEGF表达 (免疫组化 × 250) 图12 A组体外冲击波冲击后12周VEGF表达 (免疫组化 × 250)

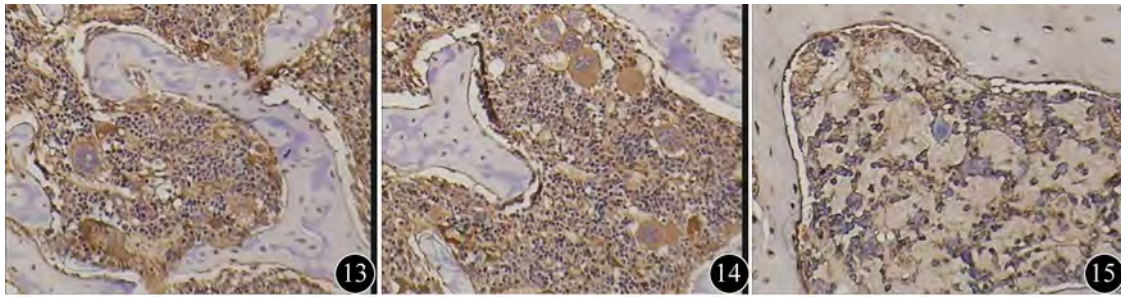


图13 体外冲击波冲击后12周B组VEGF免疫组化染色(×250) 图14 A组体外冲击波冲击后2周BMP表达(免疫组化×250) 图15 A组体外冲击波冲击后4周表达(免疫组化×250)

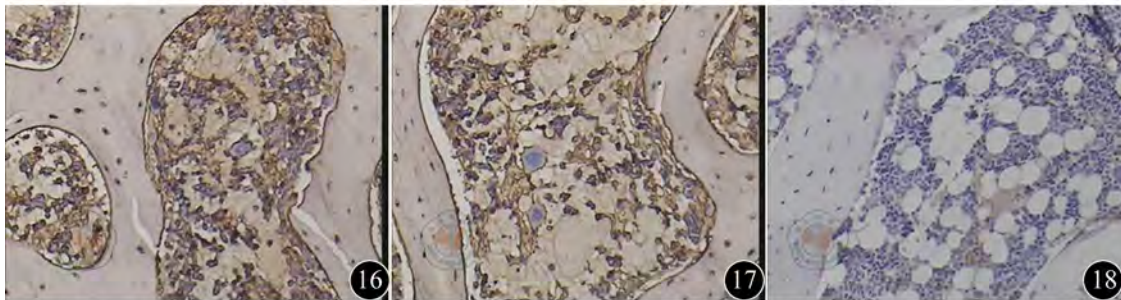


图16 A组体外冲击波冲击后8周表达(免疫组化×250) 图17 A组体外冲击波冲击后12周表达(免疫组化×250) 图18 体外冲击波冲击后12周B组BMP免疫组化染色(×250)

成骨细胞BMP表达仍然很高,特别是在坏死后增殖区(图16)。12周,成骨细胞BMP表达有所下降(图17)。而B组,仅少量BMP表达(图18)。体外冲击波冲击后2、4、8、12周,A组股骨头BMP表达较B组显著增高(表4)。

讨 论

一、激素性股骨头坏死原因

股骨头坏死的病因有许多因素,包括激素使用史、酗酒、创伤事件,血管损伤和特发性起源等^[2],激素性股骨头缺血坏死位于首位。激素导致的ANFH的发病机制有几种学说^[3]。主要有脂肪栓塞、凝血机制改变、骨质疏松等。长期服用皮质激素可致脂肪于肝脏中沉积,形成高脂血症和脂肪栓塞。正常的股骨头内血管通道是恒定的,如任何原因致股骨头内压增高,可使血管舒缩受限而失代偿功能,如脂肪栓子于股骨头内终末动脉时可使微血管栓塞,致这些血管供应区域的骨组织发生缺血改变甚至坏死。长期服用激素使血液处于高凝状态,并可引起血管内皮细胞病变致血管炎,由于股骨头前外上部软骨下毛细血管襻呈180°转弯且血管吻合支少,血流易瘀滞,致微血栓的形成,最终使血流不畅或血管闭塞。长期使用激素可致破骨细胞过活

跃致骨质疏松,负重后致骨小梁的骨折和软骨下骨的骨折,最终致股骨头的塌陷。

二、体外冲击波对于VEGF及毛细血管增生的作用

VEGF是促进血管内皮细胞有丝分裂的因子,可刺激血管内皮细胞增殖、增强血透性、介导血管内皮细胞的迁徙进而促进血管再生。在众多已知的血管生成诱导因子中,VEGF被认为是作用最强,特异性最高的一种,与骨骼修复过程中的新生血管的形成是密切相关的^[4]。许多临床及基础实验证明,体外冲击波可促进缺血组织血管化再生。本实验中兔缺血坏死股骨头体外冲击波疗法后显示,A组中,在体外冲击波冲击后2周,成骨细胞和血管内皮细胞中的VEGF表达增多,4周达到高峰,8周和12周稍降低。而对照组仅有少量的VEGF表达。说明体外冲击波可促进缺血坏死股骨头内VEGF的表达和毛细血管再生。Chen等^[5]实验发现体外冲击波可以促进鼠股骨缺损处的间充质细胞VEGF及TGF-β1的表达。Wang等^[6]用NADPH氧化酶阻断法证实,经体外冲击波作用后成骨细胞中VEGF-A的分泌水平升高。

三、冲击波对于BMP及成骨细胞增生的作用

BMP属于转化生长因子β超家族,其作用主要

是刺激骨髓基质细胞分化成为成软骨细胞和成骨细胞,再通过软骨内化骨最终达到修复骨缺损并具有一定力学性能的骨组织^[7]。

目前研究发现,高能冲击波产生新的骨折血肿,可趋化多种细胞聚集,诱导和产生大量的细胞因子, BMP、胰岛素样生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子等,它们都对细胞增殖分化和新骨形成有诱导和调节作用。高能量冲击波所产生的扭拉力可裂解硬化骨质,形成局部血肿及骨微碎屑被吸收可释放BMP,可诱导未分化的间充质细胞向成骨细胞和成软骨细胞分化,这些细胞又可以合成和分泌更多BMP,促进骨组织再生,从而促进缺血坏死股骨头的修复。Wang等^[8]应用冲击波对大鼠骨缺损进行治疗,发现在骨缺损处的间质细胞和新形成的软骨细胞与成骨细胞中, BMP-2、BMP-3和BMP-4有强阳性表达。彭昊等^[9]研究发现,正常时BMP-2在骨组织中含量微少,而在骨损伤后迅速出现表达增强,包括量的增加和活性的增强。本实验A组中可见,在体外冲击波疗法后2周BMP的表达增多,4周达到高峰,8周和12周表达稍弱,而对照组仅少量BMP阳性表达。体外冲击波疗法后2、4、8、12周, A组股骨头内BMP表达明显高于B组。HE染色示:4周时骨小梁周围出现少量成骨细胞,8周A组骨小梁周围可见成单行排列的成骨细胞。12周可见骨小梁明显增厚。而B组大部分骨小梁断裂。由此看出,体外冲击波可促进缺血坏死股骨头内BMP的表达和成骨细胞增生。

总之,体外冲击波可能是通过对股骨头缺血坏死中的VEGF和BMP细胞因子的影响,调节或促进骨重建的过程,来达到其治疗股骨头缺血坏死的生

物学效应。但究竟是直接影响还是间接作用,还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, et al. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction[J]. Clin Orthop, 1995(316): 235-243.
- [2] Tsung-Cheng Yin. Shockwaves Enhance the Osteogenetic Gene Expression in Marrow Stromal Cells from Hips with Osteonecrosis[J]. Chang Gung Med J, 2011, 34: 367-374.
- [3] Kosaka Y, Mitsumori M, Araki N, et al. Avascular necrosis of bilateral femoral head as a result of long-term steroid administration for radiation pneumonitis after tangential irradiation of the breast[J]. Int J Clin Oncol, 2006, 11(6): 482-486.
- [4] Clarkin CE, Gerstenfeld LC. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication?[J]. Cell Biochem Funct, 2013(1): 1-11.
- [5] Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats[J]. Orthop Res, 2004, 22: 526-534.
- [6] Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, et al. Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1alpha and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts[J]. Biol Chem, 2004, 279(11): 10331-10337.
- [7] de Mara CS, Duarte ASS, Sartori-Cintra AR, et al. Chondrogenesis from umbilical cord blood cells stimulated with BMP-2 and BMP-6[J]. Rheumatol Int, 2013, 33(1):121-128.
- [8] Wang FS, Yang KD, Kuo YR, et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal shock wave-promoted healing of segmental defect[J]. Bone, 2003, 32(4): 387-396.
- [9] 彭昊, 彭波, 汪茹, 等. 体外冲击波治疗兔缺血性股骨头坏死过程中骨形态发生蛋白的表达[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(4): 540.

(收稿日期: 2014-03-31)

(本文编辑: 戚红丹)