

· 基础研究 ·

高压氧对大剂量激素用药后大鼠股骨近端组织的影响

赵继军 杨述华 胡勇 叶树楠 刘勇 刘奔

【摘要】目的 研究不同疗程高压氧干预对大剂量激素用药后大鼠股骨近端组织学、BMP-2 及其受体表达水平的影响。**方法** 对 90 只 4 月龄雄性 Wistar 大鼠进行大剂量地塞米松肌肉注射 6 周后,将其随机分为 3 组,即对照组(A 组)、1 个疗程组(B 组)和 3 个疗程组(C 组)。以 B、C 组高压氧治疗开始后 4、8、12 周作为观察时间点,对 3 组大鼠股骨近端骨质进行组织学观察,同时检测 BMP-2 和 BMP-R I 表达水平的变化。**结果** B 组、C 组股骨髓腔内血管数量多于 A 组,骨小梁较 A 组宽,骨皮质较 A 组厚,3 组骨小梁/髓腔面积比(TCR)、皮质/髓腔面积比(CCR)、BMP-2 平均染色面积百分比(DAP)、BMP-2 染色平均光密度值(OD)、BMP-R I 含量(BRC)在各观察时间点的关系均为:C 组 > B 组 > A 组,各组间差异均具有统计学意义($P < 0.01$);A 组 TCR、CCR、DAP、OD、BRC 均随时间延长呈降低趋势,但在 3 个观察时间点间的差异无统计学意义($P > 0.05$),而 B 组、C 组上述 5 个指标则呈升高趋势,其中 BRC 在各时间点间的差异均有统计学意义($P < 0.01$),其它 4 项指标在 4 周与 8 周时、4 周与 12 周时的差异均有统计学意义($P < 0.01$),而在 8 周与 12 周时的差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 组大鼠空骨陷窝率(ER)间差异具有统计学意义($P < 0.01$);A 组的 ER 有随时间延长而增高的趋势,但在 3 个观察时间点间的差异无统计学意义($P > 0.05$);而 B 组、C 组 ER 随时间延长而降低,在 4 周与 8 周时、4 周与 12 周时的差异均具有统计学意义($P < 0.01$),而 8 周与 12 周时的差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 停止使用大剂量激素后,大鼠股骨近端组织的病理改变继续存在,并且在早期有加重的趋势;高压氧干预可以抑制甚至逆转这些病理改变;3 个疗程高压氧治疗效果优于 1 个疗程干预。

【关键词】 高压氧; 激素; 股骨; 骨形态发生蛋白; 骨形态发生蛋白受体

Effects of different courses of hyperbaric oxygenation on proximal femur after high dosage of corticoid application in rat model ZHAO Ji-jun*, YANG Shu-hua, HU Yong, YE Shu-nan, LIU Yong, LIU Ben. * Department of Orthopaedics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Corresponding author: YANG Shu-hua, Email: shuhuayabc@sina.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of different sessions of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on proximal femur after a short period of high dosage of glucocorticoid application in rat model by assessing histology, expression of BMP-2 and its receptor. **Methods** Ninety 4-month-old Wistar male rats were administered with high dosage of dexamethasone by intramuscular injection for 6 weeks, and then were divided into 3 groups: a control group (Group A) and two experimental groups (Groups B and C). Groups B and C were treated with HBO once daily for 10 days and 30 days, respectively. After 4, 8 and 12 weeks of HBO therapy, histological observation, and immunohistochemistry examination of expression of BMP-2 and its receptor (BMP-R I) of the upper 1/3 of femur were conducted, respectively. **Results** There were significantly more vessels of cavity in Groups C and D than those of Group A, the bone trabeculae and cortical bone of Groups C and D were thicker than those of Group A. The order of the three groups with regard to area ratio of bone trabeculae and medullary cavity (TCR), area ratio of cortical bone and medullary cavity (CCR), average percentage of dyed areas (DAP) and average optical density (OD) of BMP-2 and contents of BMP-R I (BRC) of proximal femurs are Group C > Group B > Group A, the differences among the three groups were statistically significant ($P < 0.01$). There was a trend of decreasing in Group A with regard to TCR, CCR, DAP, OD, BRC, but the differences among the 3 phases were not significantly different ($P > 0.05$). TCR, CCR, DAP, OD, BRC in Groups B and C showed trends of increasing, the differences in terms of the contents of BMP-R I among the 3 phases were statistically significant ($P < 0.01$). As of the empty rate of bone lacunae (ER), there is significant difference among the three groups ($P < 0.01$). The ER in group A showed a trend of in-

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科(赵继军、杨述华、叶树楠、刘勇);宁波市第六医院(胡勇);大连医科大学基础医学院(刘奔)

通讯作者:杨述华,Email:shuhuayabc@sina.com

creasing with time, however, there was no significant difference among the 3 phases ($P > 0.05$); the ER in Group B and C showed a trend of decreasing, the difference between 4- and 8-week and 4- and 12-week were significantly different ($P < 0.01$ both), except for that between the 8- and 12-week ($P > 0.05$). **Conclusion** After application of glucocorticoid for a short term, pathological changes maintained and showed trends of increasing in early stage. HBO can reverse these changes. The outcome of 3-course HBO therapy is better than that of 1-course therapy.

【Key words】 Hyperbaric Oxygen; Glucocorticoid; Femur; Bone morphogenetic protein; Bone morphogenetic protein receptor

激素性股骨头坏死常发生于年轻患者中,可导致严重的髋部疼痛及功能障碍。当股骨头坏死发展到晚期时,全髋关节置换是唯一有效的治疗方法。如何提高人工关节置换后假体生存率是目前研究的热点之一。本研究通过对大鼠短期使用大剂量激素后进行不同疗程的高压氧干预,来探讨高压氧对其股骨近端骨质的影响,为高压氧用于假体置换后续治疗提供实验依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取 4 月龄 Wistar 大鼠 90 只,全部为雄性,体重 180 ~ 220 g,将其随机分为 3 组,即对照组(A 组)、1 个疗程组(B 组)和 3 个疗程组(C 组),每组 30 只。

二、实验步骤及标本制备

所有实验大鼠每次按每千克体重肌肉注射地塞米松 10 mg,每周 2 次,共持续 6 周;此后 A 组不再给予其它特殊处理;B 组及 C 组大鼠则每天给予高压氧(3 个标准大气压)干预,每天 1 次,每次 1 h, B 组干预 10 d, C 组则干预 4 周。

上述 3 组大鼠于高压氧干预开始后 4, 8, 12 周时各随机处死 10 只,切取双侧股骨近端组织(股骨颈干内侧皮质交界水平至小转子下缘水平)。所有实验大鼠左侧股骨标本用甲醛固定并脱钙,采用石蜡包埋、切片,用于 HE 染色、骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 的 SABC 法免疫组化染色;所有实验大鼠右侧新鲜股骨标本经反复冻融 3 次后研磨制成组织匀浆,采用 ELISA 法检测骨形成蛋白 I 型受体 (bone morphogenetic protein receptor I, BMP-RI) 含量。

三、实验观察指标

1. 空骨陷窝率:计数 5 个高倍视野下 HE 染色切片中的空骨陷窝数量及骨陷窝数量,二者之比即为空骨陷窝率。

2. 骨小梁/髓腔面积比:采用 American Image-Pro Plus 4.5 版计算机图像分析系统测量 HE 染色切片中骨小梁面积及骨髓腔面积,并计算两者的比值。

3. 皮质/髓腔面积比:采用 American Image-Pro Plus 4.5 版计算机图像分析系统测量 HE 染色切片的整个骨皮质面积及髓腔面积,计算两者的比值。

4. BMP-2 平均染色面积百分比:采用 American Image-Pro Plus 4.5 版计算机图像系统分析股骨 5 个高倍视野下阳性染色面积占骨质面积的百分比,并计算均值,以代表 BMP-2 分布范围大小。

5. BMP-2 染色的平均光密度值:采用 American image-pro plus 4.5 版计算机图像分析系统测量股骨 5 个高倍视野下染色区域的灰度,分别除以各自的染色面积,计算出均值,以代表单位面积内 BMP-2 含量。

6. BMP-R I 浓度:按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤测定样品吸光值,根据厂家 (Boster) 提供的坐标图查出所测吸光值对应的 BMP-R I 的浓度值。

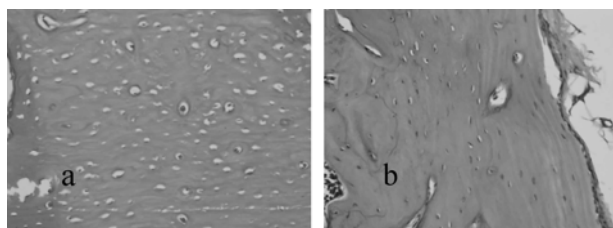
四、统计学分析

本研所得数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 11.0 版软件进行统计学分析,组间比较采用随机区组设计的方差分析 (ANOVA),组内各时间点比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

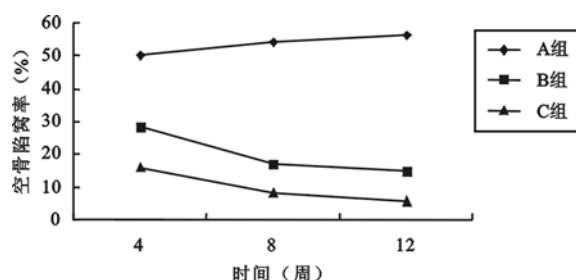
一、组织学观察

A 组大鼠骨髓腔内血管数量较少、直径较细,骨小梁稀疏,骨皮质较薄,空骨陷窝十分多见(图 1a),在各观察时间点间的差异不显著。B、C 组各观察时间点的骨髓腔内血管数目明显多于 A 组,直径较 A 组粗,骨小梁变密、增宽,骨皮质明显较 A 组增厚,空骨陷窝数量显著少于 A 组(图 1)。A 组空骨陷窝率呈进行性增高趋势,但是各观察时间点间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); B、C 组空骨陷窝率进行性降低,4 周与 8 周时以及 4 周与 12 周时差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),但是 8 周与 12 周时差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。空骨陷窝率在 3 组间的差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 2)。A 组大鼠的骨小梁/髓腔面积比和皮质/髓腔面积比有随时间延长而降低的趋势,但各观察时间点间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), B、C 组的骨小梁/髓腔面积比和皮质/髓腔面积比则随时间延长而增高,4 周与 8 周时以及 4 周与 12 周时差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$),而 8 周与 12 周时的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。骨小梁/髓腔面积比及皮质/髓腔面积比的组间比较结果如下, C 组 > B 组 > A 组,组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),具体数据详见表 1。



注:图中显示 A 组(图 1a)空骨陷窝数量明显多于 C 组(图 1b)

图 1 12 周时 A 组(图 1a)及 C 组(图 1b)空骨陷窝数量比较(HE 染色, ×400)



注:图中数据显示, A 组空骨陷窝率明显高于 B、C 组

图 2 3 组空骨陷窝率比较

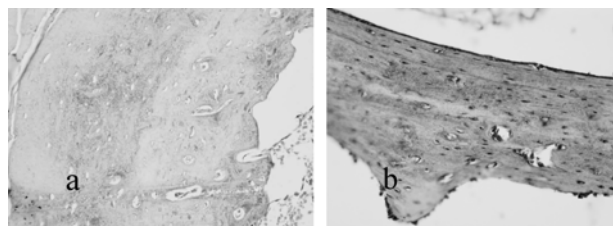
二、BMP-2 的表达

3 组大鼠间 BMP-2 的平均染色面积百分比和平均光密度值差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 其中 A 组骨基质甚至无褐染, 平均染色面积百分比和平均光密度值在各时间点差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。B、C 组骨基质染色深度及范围随时间延长有增加趋势; B、C 组 BMP-2 的平均染色面积百分比和平均光密度值在 4 周与 8 周时、4 周与 12 周时差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 但在 8 周与 12 周时差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具体数据详见表 2、图 3。

三、BMP-R I 的表达

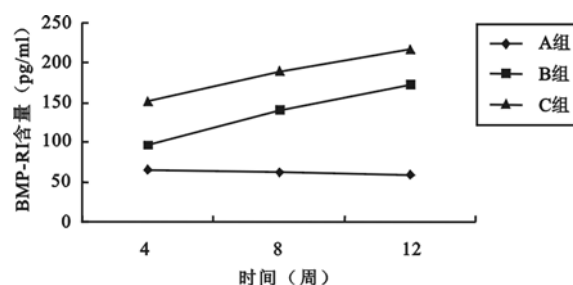
A 组大鼠 BMP-R I 含量呈进行性降低趋势, 但是在各观察时间点间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。A、B、C 组 BMP-R I 表达间差异具有统计学意义 ($P <$

0.01), B、C 组各观察时间点 BMP-R I 表达水平间差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 具体数据见图 4。



注:图中深色代表阳性表达

图 3 A 组(图 3a)与 C 组(图 3b)在 12 周时 BMP-2 表达水平比较 (SABC 法, ×400)



注:图中数据显示, 各观察时间点 BMP-R I 含量 C 组 > B 组 > A 组, 且 B 组、C 组 BMP-R I 含量随时间延长而增加

图 4 3 组大鼠 BMP-R I 表达水平比较

讨 论

人工髋关节置换是激素性股骨头坏死晚期唯一有效的治疗方法, 但由于在激素性股骨头坏死患者中, 以年轻患者居多, 其活动量较大, 故关节置换后的失败率较高。目前关于强化股骨柄固定、延长股骨柄使用寿命的研究较多^[2-4], 但多处于实验阶段, 推广到临床应用还需要进一步研究。高压氧作为一种无创物理治疗手段在骨科中的应用越来越广泛^[5-7], 对激素性股骨头坏死患者进行假体置换后, 能否用高压氧手段来强化股骨柄固定、延缓假体松动是值得探讨且有实际意义的课题。本实验通过研

表 1 各组大鼠骨小梁/髓腔面积比和皮质/髓腔面积比分析 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	骨小梁/髓腔面积比			皮质/髓腔面积比		
		4 周	8 周	12 周	4 周	8 周	12 周
A 组	30	26.22 ± 4.23	25.67 ± 5.63	24.45 ± 4.89	30.78 ± 3.28	28.92 ± 2.67	27.00 ± 3.88
B 组	30	32.66 ± 3.47	36.95 ± 2.86	38.19 ± 3.34	34.77 ± 4.62	37.86 ± 3.98	39.21 ± 4.79
C 组	30	40.51 ± 4.43	46.66 ± 2.98	49.02 ± 4.87	41.10 ± 3.61	45.63 ± 2.77	47.04 ± 3.30

注:3 组间骨小梁/髓腔面积比和皮质/髓腔面积比两两比较, $P < 0.01$; A 组骨小梁/髓腔面积比和皮质/髓腔面积比各时间点间比较, $P > 0.05$; B、C 组骨小梁/髓腔面积比和皮质/髓腔面积比 4 周与 8 周时、4 周与 12 周时比较, $P < 0.01$; 8 周与 12 周时比较, $P > 0.05$

表 2 各组大鼠 BMP-2 平均染色面积百分比和平均光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	平均染色面积百分比 (%)			平均光密度值		
		4 周	8 周	12 周	4 周	8 周	12 周
A 组	30	18.44 ± 2.67	16.28 ± 3.46	15.90 ± 3.88	0.123 ± 0.022	0.110 ± 0.034	0.098 ± 0.044
B 组	30	38.79 ± 4.55	47.07 ± 5.87	50.59 ± 4.26	0.158 ± 0.026	0.194 ± 0.050	0.211 ± 0.043
C 组	30	57.72 ± 5.99	66.48 ± 5.23	70.29 ± 6.63	0.202 ± 0.034	0.238 ± 0.018	0.251 ± 0.025

注:3 组间 BMP-2 平均染色面积百分比和平均光密度值比较, $P < 0.01$; A 组 BMP-2 平均染色面积百分比和平均光密度值各时间点比较, $P > 0.05$; B、C 组平均染色面积百分比和平均光密度值 4 周与 8 周时、4 周与 12 周时比较, $P < 0.01$; 而 8 周与 12 周时比较, $P > 0.05$

究高压氧对大剂量激素用药后大鼠股骨近端的影响,为其用于假体置换后的后续治疗提供实验依据。

本实验中 A 组大鼠使用大剂量激素后未给予特殊处理,与 B、C 组比较,其股骨近端髓腔血管数量较少、直径较细,股骨内空骨陷窝十分多见,骨小梁稀疏,骨皮质较薄;BMP-2 表达无论是在分布的面积还是单位面积内的含量(光密度)均较低,与陈崇桓等^[8]的研究结果一致;BMP-R I 含量呈进行性降低趋势。上述表现提示,大剂量激素用药对大鼠股骨近端的影响是多方面的。当停止使用激素后,尽管各时间点的观察指标差异均无统计学意义($P > 0.05$),但这些变化总体上仍呈现加重趋势,形成了假体置换后早期松动的病理基础,提示停止使用激素后,股骨近端骨质所受的影响并未完全消除,只是加重的趋势有所减缓而已。由于股骨近端髓腔内血管数量少、直径较细,容易出现局部能量供给危机和供氧不足,导致机体组织水肿、坏死;当局部组织氧分压降低至一定程度时,机体纤维母细胞增殖及胶原纤维形成均停滞,BMP-2 和 BMP-R I 表达水平降低也不利于坏死骨组织的修复。

本实验中 B、C 组大鼠的髓腔血管数量、血管直径、股骨内 BMP-2 及 BMP-R I 含量均明显高于 A 组($P < 0.05$),且随着疗程的增加而有上升的趋势,与 A 组比较,其骨小梁变密、增宽,骨皮质增厚,空骨陷窝率显著低于 A 组,表明高压氧干预不仅能促进血管生成,还能防止细胞坏死,挽救濒临坏死或凋亡的细胞。在临床实践中发现,BMP-2 可被用来诱导骨组织生长,但是 BMP-2 只能通过作用其受体发挥相应功能。大剂量激素应用时导致骨组织中 BMP-R I 含量显著降低,对于这样的病例若单纯给予 BMP-2 或许不会获得满意的骨诱导效应。在本研究中,发现高压氧干预能显著提高骨组织中 BMP-2 及其受体的含量水平,这对于骨诱导是非常有利的,可以增加股骨近端的骨储量、提高股骨近端骨质强度。由此可见,假体置换后采用高压氧干预来强化股骨柄固定在理论上是可行的。

大鼠为爬行类动物,其股骨部受力(占体重比例)情况与人类有很大差异。高压氧对激素性股骨头坏死患者股骨近端的影响,与其对大鼠股骨近端的影响可能会存在一定差异,因此本研究结果与临床实际情况可能不完全一致。本研究的意义在于观察高压氧对股骨近端影响的总体趋势,大鼠与人类股骨部受力情况的差异只能是加速或延缓这种趋势,而不会颠覆这种趋势。总之高压氧对于大剂量激素应用后股骨近端骨质的改善具有积极意义,首先高压氧治疗可增加血液及组织中的物理溶解氧,并可增强氧的穿透力,从而提高全身各个器官和组织的氧分压,有效改善缺血部位的氧代谢功能^[9];其次高压氧能促进新生血管形成,从

而间接增加局部血液供应^[10],高压氧还能提高 BMP-2 及其受体的表达水平,极大地促进骨更新速度;另外,高压氧对厌氧菌感染的疗效也早已得到确认;而且近年来研究发现,高压氧可使细菌中含巯基(-SH)的酶及辅酶受到抑制,代谢功能发生障碍,导致其生长和繁殖受到抑制,所以高压氧也可被看作为一种广谱抗菌素,能抑制革兰氏染色阳性及阴性菌的生长^[11]。上述效应对于大剂量激素应用后股骨头置换术患者是非常有益的,可增强其股骨近端力学强度,提高局部抗感染能力,促进骨长入型假体的整合,从而降低手术失败率。

就本研究数据分析,3 疗程高压氧干预对大鼠股骨近端骨质的改善作用明显优于 1 疗程干预,但是大鼠经高压氧干预 8 周与 12 周时比较,骨小梁/髓腔面积比、皮质/髓腔面积比、BMP-2 平均染色面积百分比、平均光密度值、空骨陷窝率间的差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明高压氧干预停止后,其对股骨近端的影响仍将持续,但并不是无限制地持续下去,经一段时间后其作用将有所减缓。本实验以高压氧治疗 12 周为观察终点,12 周以后股骨近端组织将如何变化还不清楚,这也是本研究的不足之处,故高压氧对股骨近端组织的长期疗效将是我们下一步研究的重点。

参 考 文 献

- [1] Ivankovich DA, Rosenberg AG, Malamis A. Reconstructive options for osteonecrosis of the femoral head. *Tech Orthop*, 2001, 16: 66-79.
- [2] Bragdon CR, Doherty AM, Rubash HE, et al. The John Charnley award: the efficacy of BMP-2 to induce bone in growth in a total hip replacement model. *Clin Orthop Relat Res*, 2003, 417: 50-61.
- [3] Ono I, Tateshita T, Inoue M, et al. In vivo strength enhancement of hydroxyapatite combined with rhBMP-2. *J Bone Miner Metab*, 1998, 16: 81-87.
- [4] Stenport VF, Johanson C, Heo SJ, et al. Titanium implants and BMP-7 in bone: an experimental model in rabbits. *J Mater Sci*, 2003, 14: 247-254.
- [5] 喻晃. 高压氧辅助治疗骨折术后窦道不愈患者 2 例报道. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25: 580.
- [6] 张健. 高压氧治疗膝关节内侧副韧带损伤疗效观察. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25: 519.
- [7] 赵玉梅, 孙莉, 石燕. 高压氧治疗骨折延迟愈合患者 17 例. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 508.
- [8] 陈崇桓, 张瑞根, 何美玲, 等. 地塞米松和洛伐他汀对骨坏死患者骨形态发生蛋白 2 表达的影响. *中华医学杂志*, 2006, 86: 488-489.
- [9] 常巍, 程少华, 宋跃明. 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, 13: 1323-1325.
- [10] Wang IC, Ueng WN, Yuan LJ, et al. Early administration of hyperbaric oxygen therapy in distraction osteogenesis: a quantitative study in new zealand rabbits. *J Traum*, 2005, 58: 1230-1235.
- [11] Gill AL, Bell CAN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *Q J Med*, 2004, 97: 385-395.

(修回日期: 2007-06-25)

(本文编辑: 易 浩)