

· 基础研究 ·

超短波治疗对早期激素性股骨头缺血性坏死兔 I 型胶原蛋白的影响

崔宝娟 孙强三 徐青 孙昭辉 徐明

【摘要】目的 研究超短波治疗对早期激素性股骨头缺血坏死兔 I 型胶原蛋白的影响,并探讨其作用机制。**方法** 选择健康雄性新西兰兔 40 只,分为正常组 10 只和实验组 30 只。实验组采用马血清与激素复制兔激素性股骨头缺血性坏死模型后,选出 20 只股骨头坏死处于临床分期 I 期的兔,随机分为造模组和超短波组,每组 10 只。超短波组给予超短波治疗,其它 2 组不予干预。于实验第 12 周末,采用免疫组织化学法检测兔股骨头组织 I 型胶原蛋白的表达。**结果** 造模组 I 型胶原染色强度较正常组低,超短波组染色强度较造模组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 激素可抑制 I 型胶原蛋白的分泌,而超短波治疗可减轻股骨头坏死程度,可能延缓或逆转股骨头坏死的进展。

【关键词】 股骨头缺血性坏死; 超短波; I 型胶原蛋白

The effect of ultrashort wave diathermy on expression of collagen type I in early stage of hormon-induced avascular necrosis of the femoral head CUI Bao-juan, SUN Qiang-san, XU Qing, SUN Zhao-hui, XU Ming. Department of Physical Medicine and Rehabilitation, the Second Hospital of Shandong University, Ji'nan 250033, China Corresponding author: SUN Qiang-san, Email: sunqsan@126.com

【Abstract】Objective To observe the effect of ultrashort wave diathermy on collagen type I expression in early stage of hormon-induced avascular necrosis of the femoral head (ANFH) in rabbit. **Methods** A total of 40 New Zealand white rabbits were randomly divided into two groups: a control group ($n = 10$) and a treatment group ($n = 30$). All the animals in the treatment group were injected with horse serum and methylprednisolone to establish the ANFH model, and then divided into 2 subgroups: a model group and a ultrashort wave diathermy group, which were treated accordingly. After 12 weeks of treatment, all the animals were sacrificed and collagen type I expression in the femoral head was observed. **Results** It was shown that the expression of the collagen type I was significantly lower in the model animals than that in the controls as indicated by the stronger immunohistochemistry staining for rabbit collagen type, while that of the ultrashort wave diathermy group was significant higher than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Ultrashort wave diathermy can delay or even reverse the ANFH, which might be mediated by promoting the expression of collagen type I.

【Key words】 Avascular necrosis of the femoral head; Ultrashort wave; Collagen type I

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 head, ANFH)亦随之增加。目前各种早期疗法如中药治疗、抗血脂药物的应用等效果尚不能令人满意^[1]。在骨坏死的早期进行干预,延缓或逆转骨坏死的进一步发展,是目前国内外治疗 ANFH 所十分关注的问题。我们应用马血清联合激素复制 ANFH 模型,研究超短波治疗对早期激素性 ANFH 兔 I 型胶原蛋白的影响,初步探讨超短波对激素性 ANFH 的作用机制。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及相关试剂

基金项目:山东省科学技术发展计划(重点项目)项目(2004 GG2202 159)

作者单位:250033 济南,山东大学第二医院康复科

通讯作者:孙强三, Email: sunqsan@126.com

选择雄性成年新西兰兔 40 只,体重 2.5 ~ 3.5 kg, 周龄 24 周以上,由山东省医学科学院动物实验中心提供,许可证号:SCXK(鲁 20040013)。实验兔购回后,在相同条件下分笼喂养,适应性饲养 1 周。

二、实验试剂和药物

注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(商品名为甲基强的松龙),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),下室为甲泼尼龙琥珀酸钠及辅料,进口药品注册证号为 H20040338;美国产马血清,规格为 500 ml/瓶,于 -20℃ 冰箱中存放;即用型链霉亲和素-生物素化过氧化物酶复合物(streptavidin biotin-peroxidase complex, SABC)免疫组织化学试剂盒,兔 I 型胶原多克隆抗体均由北京天来生物医学科技有限公司提供。

三、模型制作及动物分组

采用随机数字表法将兔随机分成正常组 10 只与

实验组 30 只。

实验组兔按照文献[2-5]介绍的方法制作 ANFH 动物模型:分别于实验第 1,3 周经耳缘静脉注射马血清,剂量为 15 ml/kg 体重,共 2 次;于实验第 5 周经腹腔注射甲基强的松龙,剂量为 40 mg/kg 体重,连续 3 d,每日 1 次。2 周后,根据 MRI 检查结果,从实验组中选出 20 只股骨头坏死处于临床分期 I 期的兔,并按随机数字表法分为造模组和超短波组,每组 10 只。

正常组兔于实验第 1,3 周经耳缘静脉注射生理盐水,剂量为 15 ml/kg 体重,共 2 次;于实验第 5 周经腹腔注射生理盐水,剂量为 5 ml/kg 体重,连续 3 d,每日 1 次。

四、超短波治疗

超短波组兔于实验第 8 周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,频率为 40.68 MHz,波长为 7.3 m,最大输出功率为 200 W。2 个 20 cm × 15 cm 电极,于兔双髋部对置,空气间隙 2 ~ 3 cm,采用微热量。每日治疗 1 次,每次 15 min,共治疗 3 周。正常组和造模组不予任何处理。

五、免疫组织化学法检测及评价标准

于实验第 12 周末,用空气栓塞法处死动物,快速取兔双侧股骨头组织制作标本。将股骨头组织存放于 10% 的中性福尔马林药液内,常温下固定 36 ~ 72 h;用 20% 的乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)微波脱钙^[6],制作石蜡切片,备做免疫组织化学检查;切片常规脱蜡水化,磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗,柠檬酸缓冲液修复组织抗原;滴加一抗、生物素化羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)多聚体、亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(avidin-biotinylated-enzyme complex, ABC),冲洗后用双氧水溶液显色;显微镜下观察,至出现棕黄色颗粒,终止反应;用苏木素染色,梯度酒精脱水干燥,中性树脂封片。以 PBS 替代生物素化羊抗兔 IgG 作阴性对照。

观察免疫复合物沉积部位及免疫反应强度,以在骨小梁及骨髓基质细胞中出现阳性产物,即棕黄色片状或颗粒状染色为阳性反应, I 型胶原蛋白的分泌程度与免疫反应染色强度呈正相关^[7]。

据光镜观察结果分为 5 个等级:“-”为骨组织内无棕黄色染色,或颜色均匀一致与背景无区别;“+”为弱阳性反应,切片中可见淡黄色条带状分布纤维,骨小梁中可见到较多团块状不规则阳性着色,深于背景色,沉淀呈浅棕色;“++”为中等阳性反应,切片中可见条带状纤维或团块状不规则着色,沉淀物呈棕色;“+++”为强阳性反应,骨组织内可见较深棕黄色条

带状分布纤维,沉淀物呈棕褐色;“++++”为超强阳性反应,骨组织(包括软骨组织、骨小梁、骨髓、骨内微血管)内可见大量深棕色条带状分布纤维,骨小梁中可见到较多团块状不规则阳性着色。

六、统计学分析

应用 SPSS 12.0 版统计软件进行数据处理,实验结果为等级资料,采用等级序值法进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

实验期间,造模组有 2 只、超短波组有 1 只兔因厌食而死亡。

正常组切片电镜下观察显示:骨小梁中可见大量团块状着色。造模组切片电镜下观察显示:骨小梁中少见阳性着色。超短波组切片电镜下观察显示:着色的股骨头标本中,靠近软骨处可见条带状纤维分布,软骨细胞胞浆呈棕黄色,骨小梁内骨细胞胞浆着色,骨小梁中可见到少量团块状不规则阳性着色。

各组兔 I 型胶原蛋白 SABC 法免疫组织化学染色结果显示:正常组有 3 个标本出现强阳性反应,大部分(17 个标本)为中等阳性反应;造模组无强阳性反应者,仅 1 个标本呈中等阳性反应,15 个标本呈弱阳性反应;超短波组有 2 个标本呈超强阳性反应,14 个标本呈强阳性反应,2 个标本呈中等阳性反应。统计学分析显示,组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),具体数据见表 1。

表 1 各组免疫组织化学染色结果比较(例)

组 别	标本数	染色强度				
		++++	+++	++	+	-
正常组	20	0	3	17	0	0
造模组	16	0	0	1	15	0
超短波组	18	2	14	2	0	0
合计	54	2	17	20	15	0

讨 论

激素诱导型 ANFH 是指因大剂量应用激素而造成股骨头成分(骨细胞、骨髓造血细胞和脂肪细胞)死亡,从而引起的病理过程。到目前为止,许多动物实验研究表明,应用马血清可导致骨内脂肪代谢失调及轻度骨内小动脉炎^[8,9]。激素作用可加重潜在的血管炎^[10]。Nakata 等^[11]预先采用马血清造成动物血管炎,再用大剂量激素成功地诱导出典型的骨坏死模型。小动脉是血管炎的靶器官,免疫复合物沉积在血管壁能引起血管炎,皮质类固醇能抑制胶原和弹性蛋白的生物合成,加重已发生血管炎的血管收缩、血小板聚集和内皮细胞坏死,在小动脉断裂和栓塞的基础上引发

骨组织缺血性坏死。

胶原蛋白是一类存在于所有哺乳动物中的纤维状、大分子蛋白质,在哺乳动物体内由结缔组织细胞和其他类型的细胞(如肝脏、肺、脾及脑组织细胞)所分泌。作为骨骼与皮肤的主要组成部分,胶原蛋白是哺乳动物细胞中最丰富的蛋白质,约占整个细胞总蛋白的 1/4。在骨骼中,胶原的成分占有机质的 90%,胶原纤维为骨钙的沉积提供了网状基质。Martin 等^[12]发现,在牛的皮质骨中,纵向排列的胶原纤维数量是骨强度的最好预测指标。同时,骨的胶原纤维也是骨质矿化的部位。I 型胶原蛋白是最为人们了解、也是在组织中分布最为广泛的胶原蛋白。I 型胶原基因的表达与成骨活动关系密切,其 mRNA 的出现早于碱性磷酸酶和骨钙素,是成骨细胞早期分化的特异性分子标记,其合成与骨形成有相关性^[13]。除此之外,胶原在形成特定的细胞外微环境中也起着主要作用,而这些微环境对于维持细胞的完整性及传递细胞外信号非常关键。

免疫组织化学检测利用抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),并对其进行定位、定性及定量的研究。免疫组织化学检测在现代生物学领域中应用广泛,尤其在医学的基础和临床研究中发挥着重要的作用,它的突出优点在于特异性强、敏感性高及定位准确等。I 型胶原蛋白的分泌程度与免疫反应染色强度呈正相关,本实验即依据免疫组织化学的结果来判断组织中 I 型胶原蛋白的含量。

本实验结果显示,造模组动物标本中 I 型胶原蛋白免疫组织化学染色强度较正常组低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。因此我们推测,造模组股骨头内骨小梁表面的成骨细胞合成 I 型胶原的能力减弱,导致成骨细胞活性下降,使骨坏死后得不到有效的修复。有文献亦证明,激素能直接抑制成骨细胞的活性而影响骨修复^[14]。成骨细胞是糖皮质激素作用的主要位点,糖皮质激素对 I 型胶原蛋白合成的抑制作用可通过多种途径发生在多个不同的水平。如在蛋白质水平,无论在体内组织还是在体外培养的细胞中,糖皮质激素都能抑制 I 型胶原蛋白的合成,且其抑制作用存在时间-剂量效应关系^[15]。

以往的研究表明,超短波具有早期治疗股骨头坏死的作用^[3,4]。本研究结果发现,超短波组股骨头缺血性坏死程度较造模组轻,免疫组织化学染色强度较造模组高,2 组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。因此我们推测,超短波可减弱或逆转甲基强的松龙对 I 型胶原 mRNA 的抑制作用,这可能与超短波对 I 型胶原的启动序列有正调控作用有关,超短波还可能通过促进成骨细

胞的活性,来维持成骨细胞的良好功能状态。

总之,我们的研究发现,激素可抑制 I 型胶原蛋白的分泌,而超短波治疗后, I 型胶原染色明显加深,股骨头坏死程度减轻,提示超短波的干预可能延缓或逆转了股骨头坏死的进展。我们推测超短波治疗在激素诱导型 ANFH 的骨重建和修复的过程中起着促进骨组织有机成分增加,进而延缓或逆转股骨头坏死的作用,其具体机制还有待于进一步研究。

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-PG12 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: 485-487.
- [6] 刘大维, 初同伟, 张良, 等. EDTA 微波脱钙骨免疫组化. *第三军医大学学报*, 2003, 24: 77-78.
- [7] 程昌志, 张正治, 潘险峰, 等. 胰岛素样生长因子基因转染对大鼠肌腱细胞生长的促进作用. *中华实验外科杂志*, 2004, 21: 62-64.
- [8] Kawai K, Tamaki A, Hirohata K. Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. *J Bone Joint Surg*, 1985, 67: 755-762.
- [9] Wang GJ, Dughman SS, Reger SI, et al. The effect of core decompression on femoral head blood flow in steroid induced avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg*, 1985, 67: 121-124.
- [10] Jones JP, Engleman EP, Najarian JS, et al. Systemic fat embolism after renal homotransplantation and treatment with corticosteroids. *N Engl J Med*, 1965, 273: 1453-1458.
- [11] 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.
- [12] Martin RB, Ishida J. The relative effects of collagen fiber orientation, porosity, density and mineralization on bone strength. *J Biomech*, 1989, 22: 419-426.
- [13] Turner RT, Spelsberg TC. Correlation between mRNA levels for bone cell proteins and bone formation in long bones of maturing rats. *Am J Physiol*, 1991, 261: 348-353.
- [14] 徐传毅, 何伟, 方斌, 等. 生脉成骨方对股骨头坏死 I 型胶原表达的调节作用研究. *现代中西医结合杂志*, 2003, 12: 574-576.
- [15] Delany AM, Dong Y, Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J Cell Biochem*, 1994, 56: 295-302.

(修回日期: 2006-11-20)

(本文编辑: 吴 倩)