

· 基础研究 ·

辛伐他汀防治激素所致股骨头坏死的实验研究*

吴望喜¹ 周谋望^{1,2}

摘要 **目的:**研究降脂药物对激素所致股骨头坏死的防治。**方法:**选用金黄地鼠 42 只随机分 3 组;各组均予以相同饮食喂养, a 组, 正常对照组; b 组, 肌注甲泼尼龙并口服辛伐他汀; c 组, 单给甲泼尼龙处理。实验周期 21 周, 在给药前和给药后第 4、8、11、15、17、21 周检测血脂变化, 取肝脏和股骨头标本进行 HE 染色, 油红 O 染色, 并进行细胞凋亡检测。**结果:**c 组肝脏出现大面积胞浆疏松样变, 脂肪变性, 股骨头出现连片空骨陷窝; b 组肝脏未见脂肪变性, 股骨头未见连片空骨陷窝。c 组骨细胞凋亡较 b 组多。**结论:**辛伐他汀具有一定防治激素所致股骨头坏死的作用。

关键词 股骨头坏死; 辛伐他汀; 皮质激素; 细胞凋亡

中图分类号:R683.4, R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2007)-01-0028-03

The experiment of simvastatin preventing the femoral head necrosis due to corticosteroid/WU Wangxi, ZHOU Mouwang//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(1):28—30

Abstract Objective: To research the effect of simvastatin on preventing the femoral head necrosis due to high dose corticosteroid treatment. **Method:** Forty-two Syrian golden hamsters were divided into 3 groups: group a, common diet, no treatment; group b, methylprednisolone and simvastatin treated; group c, just methylprednisolone given. The experiment was performed in 21 weeks. The changes of blood lipid (cholesterol and triglyceride) and the femoral head pathological morphology by HE and oil red O stains were detected. **Result:** The livers appeared fat degeneration in group c and none in group b. The femoral head had more empty lacunae apoptosis in group c than in group b. **Conclusion:** The simvastatin provide the effect on preventing the femoral head necrosis due to high dose corticosteroid treatment.

Author's address Sports Medicine Department, Peking University Third Hospital, Beijing, 100083

Key words femoral head necrosis; simvastatin; corticosteroid; cell apoptosis

导致股骨头坏死的原因有多种, 如创伤、感染、长期大量饮用酒精或服用激素。由于在应急情况如 SARS 和一些难治疾病中激素的大量应用, 在非创伤性股骨头坏死中由激素导致的股骨头坏死目前已占首位。激素所致股骨头坏死机制有血脂代谢紊乱学说、血管损伤和栓塞学说、骨质疏松学说, 以及近年出现的细胞凋亡学说等, 但各家研究仍有很大出入, 并且防治研究很少, 因此对激素所致股骨头坏死进行深入防治研究仍具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

以在血脂代谢方面与人比较接近的金黄地鼠为研究动物^[1]。选用成熟期叙利亚金黄地鼠(北京维通利华公司)42 只, 雄性, 体重 80—120g, 随机分 3 组, 每组 14 只, 均予以相同饮食喂养。a 组, 正常对照组, 生理盐水 0.3ml 臀肌注射, 2 次/周, 饲养 21 周; b 组, 给予甲泼尼龙(法玛西亚生产), 1.56mg/100g^[2], 臀肌注射, 2 次/周, 持续 21 周, 并给予辛伐他汀(上海罗氏生产), 10mg/kg, 以 1ml 生理盐水溶解, 灌胃给药, 1 次/日, 持续 21 周; c 组, 单用甲泼尼龙(用药

方式、剂量同 b 组), 持续 21 周。

1.2 血生化检查

在给药处理前(第 0 周)、给药处理后第 4 周、第 8 周、第 11 周、第 15 周、第 17 周、第 21 周分次从眼内眦采血 1ml (禁食 12h 后次晨空腹采血), 检测血中甘油三酯(TG)、总胆固醇(T-CHO)变化。

1.3 病理形态学观察

在第 21 周时处死全部动物, 取肝脏、股骨头标本, 以 10% 甲醛溶液生理盐水固定 24h。肝脏标本做石蜡 HE 染片, 另取一部分新鲜肝脏做冰冻切片油红 O 染色。股骨头再以 17% 甲酸-甲醛液脱钙 72h, 每 24h 换液 1 次, 以针刺检查脱钙终点。脱好钙的股骨头以矢状面剖为两半, 一半常规石蜡包埋, 制作 HE 切片, 观察细胞学形态并计算空骨陷窝数; 另一半作冰冻切片, 做油红 O 染色, 具体操作参考 Jones。

* 首都发展基金资助(SF04-1-02)

1 北京大学第三医院运动医学研究所康复医学中心, 100083

2 通讯作者: 周谋望(北京大学第三医院运动医学研究所康复医学中心, 100083)

作者简介: 吴望喜, 男, 住院医师, 硕士研究生

收稿日期: 2006-05-17

J.P 和 Darrell E. Fisher^[3]的方法,脱好钙的股骨头用 OCT 包埋,冰冻切片厚 30 μ m,蒸馏水洗 1min,60% 异丙醇浸 1min,0.5%油红 O 染液中浸染 15min,再置 60%异丙醇浸洗至背景无色为止,流水冲洗,蒸馏水洗 1 次,苏木素复染 2min,蒸馏水洗,甘油明胶封片。

1.4 细胞凋亡检测

以股骨头石蜡片进行细胞凋亡检测,用 TUNNEL 试剂盒(北京中杉金桥)检测,DAB 显色,按照试剂盒说明书操作。阴性对照,经过修复和阻断的样品加入 50 μ l 试剂 2 代替 TUNNEL 反应混合物,从标记以下同上述步骤;阳性对照,样品用 1 μ g/ μ l DNase I 液 50 μ l 处理,使之产生 DNA 链缺口,DNA 片段,从标记步骤以下同上。随机选取 3 个高倍视野统计阳性细胞数进行计算。

1.5 统计学分析

血生化测得的甘油三酯、胆固醇数据,光镜下计算得的空骨陷窝率和凋亡细胞阳性率均用 SPSS11.5 统计软件进行处理,计算均值, P 值取 0.05,用单因素方差检验各组差异。

2 结果

2.1 各组血脂变化

见图 1—2。血中 TCHO 变化,TCHO-a、TCHO-b、TCHO-c 分别为 a、b、c 组血总胆固醇。可见 c 组血总胆固醇比正常 a 组高,其中 P_{ca} 在第 15 周时 P 值 <0.05 ,第 17 周时 P 值 <0.01 ,存在显著差异。而 b 组与正常 a 组相比,各检测点 $P_{ba}>0.05$,没有显著差异。b 组与 c 组相比,血 TCHO 均降低,并且 P_{bc} 在第 11、15、17 周时 P 值 <0.01 ,存在显著差异,说明辛伐他汀有降低血胆固醇的作用。

血中 TG 变化,TG-a、TG-b、TG-c 分别为 a、b、c 组血总甘油三酯。c 组与 a 组比较,整体上 TG 呈下降趋势, P_{ca} 在第 4、15、21 周时 P 值 <0.05 ,在第 11 周时 $P<0.01$,有显著差异。c 组与 b 组比较, P_{cb} 除在

第 11 周时($P<0.01$)有显著差异外,其他 6 个检测点没有显著性差异。而 b 组与 a 组相比, P_{ba} 在第 21 周时 P 值 <0.05 ,其他 6 个检测点亦没有显著差异。

2.2 病理形态学改变

2.2.1 HE 染色:光镜观察病理形态学改变。①肝脏。a 组:肝小叶分界清楚,汇管区,中央静脉周围未见坏死,肝细胞形态正常;b 组:部分肝小叶分界不清,正常小叶区和病变区混存,病变小叶内大量肝细胞胞浆疏松样变,但没有脂肪样变性;c 组:大部肝小叶病变中有少量正常结构区,病变肝细胞胞浆疏松样变严重,出现脂肪样变性(见图 3—5,见后置彩色插页 1)。②股骨头。a 组:软骨区细胞形态正常,无软骨塌陷,骨小梁结构正常,没有骨坏死表现,髓腔内少量脂肪细胞分布;b 组:软骨区细胞出现核固缩,骨小梁结构正常,有部分骨细胞核固缩,但没有可见连片的空骨陷窝;c 组:软骨区细胞出现核固缩,部分标本骨小梁变细,大量骨细胞出现核固缩,出现连片的空骨陷窝,髓腔内脂肪空泡增多,增大。根据股骨头 HE 片随机选取 3 个高倍视野 (40 $\times$)统计各组空骨陷窝数,计算其平均值。

空骨陷窝率计算出 a 组为 5.80 ± 0.447 ,b 组为 9.00 ± 1.581 ,c 组为 20.20 ± 3.271 ;用单因素方差检验各组差异, $P_{ab}=0.034<0.05$, $P_{ac}<0.01$, $P_{bc}<0.01$ 。表明使用激素后,骨细胞坏死增加,而辛伐他汀具有抑制细胞坏死的作用。

2.2.2 油红 O 染色:a、b 组肝脏标本油红 O 脂肪染色阴性,c 组肝脏标本空泡改变用油红 O 脂肪染色出现阳性,股骨头髓腔内脂肪空泡染出阳性结果,但未见血管内脂肪栓子(图 6,见后置彩色插页 1)。

2.3 骨细胞凋亡检测结果

骨细胞凋亡阳性率:a 组为 2.80 ± 0.374 ,b 组为 7.40 ± 0.678 ,c 组为 16.60 ± 0.927 ;分析各组间差异, P_{ab} 、 P_{ac} 、 P_{bc} 均 <0.01 。表明使用激素后,骨细胞凋亡增加,而辛伐他汀具有抑制细胞凋亡的作用。

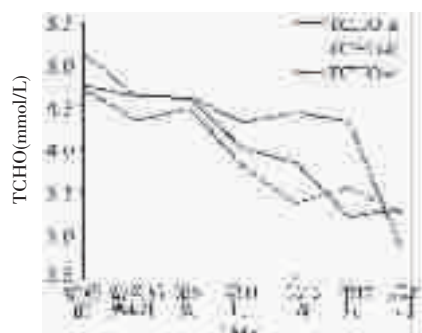


图 1 3 组不同时间点 TCHO 变化

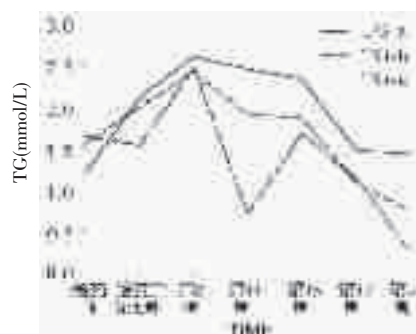


图 2 3 组不同时间点 TG 变化

3 讨论

目前血脂代谢紊乱学说已得到大家的广泛认可,该学说认为激素可导致血脂升高^[4-6],血中 TG、TCHO 升高超过血浆载脂蛋白的结合代偿能力,高脂血症使血液出现高凝状态,而游离的自由脂肪酸 FFA 可损伤血管壁,形成纤维蛋白血栓,堵塞股骨头内无扩张空间的小血管,使得骨细胞缺血缺氧出现死亡。也有学者认为血脂过多被骨细胞摄入或者骨细胞内脂质排除受阻而堆积,进而损害细胞内稳态出现骨细胞坏死。以往研究多报告血脂变化中 TG、TCHO 随着激素用量、时间增加而增高,因此我们选用辛伐他汀,从降胆固醇矫正血脂代谢紊乱方面来研究其防治激素所致股骨头坏死的作用。本实验中激素对血中 TCHO 水平有升高作用,但是应用激素后血中 TG 水平检测结果是降低的,这一点以往研究未有明确报道。既往有学者发现^[7],大剂量激素对血甘油三酯有抑制作用,但其具体机制未有明确解释。在 Wang^[8-9]对免激素性股骨头缺血坏死模型的系列研究实验中,其血中胆固醇是升高的,而血中甘油三酯报道是激素组与对照组相比未有明显改变,Iwamoto T^[10]的临床研究中也报道了同样结果。因此,在某些物种中激素所致的股骨头坏死,是否单由升高的血胆固醇所致?抑或由甘油三酯和胆固醇共同所致?需要进一步的研究。本实验中激素确实导致肝脏出现脂肪空泡变性(油红 O 染色出现阳性,多为甘油三酯),且股骨头髓腔内脂肪空泡增加增大。另外,在我们以前的研究中也证实股骨头骨细胞内有脂滴出现^[11]。因此,在长期大剂量激素作用下,细胞内外的脂质转运过程到底是如何进行的?其分子机制又如何?目前研究证实载脂蛋白 ApoE 基因多态性与个体血脂差异水平密切相关^[12],其中 ApoE2/2 的表达就能使总胆固醇、LDL-胆固醇降低和 TG 升高。因此,激素是否从基因分子水平就开始影响载脂蛋白或通过其代谢产物来影响脂质代谢,导致有些脏器(如肝脏)脂肪产生增多或摄入增加而排除或转移受阻,出现脂肪在局部器官增多堆积现象,需要我们进一步研究。股骨头中骨细胞死亡本实验证实既有骨细胞坏死又有骨细胞凋亡现象,但是究竟是骨细胞凋亡多还是骨细胞坏死多,目前没有比较精确的判别方法。Kabata^[13]和 Sato M^[14]的实验都认为激素性股骨头坏死骨细胞凋亡在早期就出现,激素与其细胞内受体结合启动了细胞凋亡程序,导致骨细胞出现凋亡。Weinstein RS^[15]对股骨头缺血性坏死的临床标本(其中长期激素治疗诱发者 5 例,酒精性 3 例,外伤性 1 例、镰状红细胞者 5 例)检测,发现激素性股

骨头坏死标本,软骨塌陷区、松质骨区存在大量凋亡细胞;外伤性、镰状红细胞病标本中缺乏凋亡细胞;酒精性骨坏死中仅有少许凋亡细胞存在。因此他们认为激素诱发的股骨头缺血性坏死,骨细胞不是死亡而是永久的凋亡。但是此研究中标本例数少,而且凋亡是否与其本身基础疾病相关,有待进一步的研究。另有研究认为,激素可导致骨髓基质干细胞向成脂细胞方面转化^[16],因此,可出现骨髓腔内脂肪空泡增加、增大现象,并进一步导致髓腔内压升高^[9],继而损害骨细胞。血管损伤和栓塞学说认为^[17],激素直接或间接损害血管内皮细胞,出现血管内血栓堵塞血管,而导致股骨头缺血坏死,并认为这可能是激素所致股骨头坏死的最终共同通路。由此看来,激素所致股骨头坏死并不是单一的过程,应该是多方面、多系统参与的损害。

本实验从肝脏、股骨头病理形态学上,看到激素(c 组)使肝细胞出现脂肪变性损害、出现脂肪空泡,股骨头中骨细胞核固缩、空骨陷窝增多,骨细胞凋亡增加,而辛伐他汀(b 组)能减少空骨陷窝的出现、降低骨细胞凋亡的程度并阻止肝细胞出现脂肪变性,说明其具有一定的防治激素所致股骨头坏死的作用。辛伐他汀是新一类的调节血脂药,其作用机制是抑制胆固醇合成限速酶,同时具有上调低密度脂蛋白受体作用,临床上主要用于高胆固醇血症,也有轻度降甘油三酯作用。近年国外相关研究发现,他汀类可提高 BMP-2 的表达以促进成骨作用,减少激素对 I 型胶原蛋白和骨钙素的抑制作用,抑制破骨细胞的活性^[18-19]。他汀类还具有抑制激素诱导骨髓基质细胞向脂肪细胞转化的作用^[20]。可见他汀类在防治激素所致股骨头坏死上也并不是单方面机制,而是在多方面发挥着作用。

参考文献

- [1] Kris-Etherton, Dietschy J. Design criteria for studies examining in individual fatty acid effects on cardiovascular diseases risk factors: human and animal studies[J]. Am J Clin Nutr, 1997, 65(suppl): 1590—1596.
- [2] Kazuo Kawai, Akihiko Tamaki, Kazushi Hirohata, et al. Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head[J]. The Journal of Bone Joint Surgery, 1985, 67-A, 5: 755—763.
- [3] Jones JP, Sakovich LA. A technic for staining bone fat (abstract) [J]. Arthritis Rheum, 1965, 448, 8.
- [4] Darrell E. Fisher, William H. Bickel, Keith Holley, et al. Corticosteroid-induced Aseptic Necrosis II. Experimental Study [J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 1972, 84 (5): 201—206.

(下转 47 页)