

脂联素与大鼠激素性股骨头坏死的修复★

黄俊, 尹宗生

Effects of adiponectin on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats

Huang Jun, Yin Zong-sheng

Abstract

Second Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Huang Jun★, Studying for master's degree, Physician, Second Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China xiyuandudu@yahoo.cn

Correspondence to: Yin Zong-sheng, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, Chief physician, Second Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China yinzongsheng@sina.com.cn

Received: 2009-10-11
Accepted: 2009-12-11

安徽医科大学第一附属医院骨科, 安徽省合肥市 230032

黄俊★, 男, 1986年生, 安徽肥东县人, 安徽医科大学在读硕士, 医师, 主要从事股骨头缺血坏死的研究。xiyuandudu@yahoo.cn

通讯作者: 尹宗生, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 安徽医科大学第一附属医院, 安徽省合肥市 230032 yinzongsheng@sina.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)15-02680-04

收稿日期: 2009-10-11
修回日期: 2009-12-11
(20091011002/W·Z)

BACKGROUND: Animal experiment has demonstrated that adiponectin affected proliferation and differentiation of osteoblasts and osteoclasts. The clinical research found that adiponectin has certain correlation to bone density, however, the mechanisms remains poorly understood.

OBJECTIVE: To evaluate the effect of direct injection of recombinant rat adiponectin into the hip joint on steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rats.

METHODS: Sprague Dawley female rats were randomly divided into 4 groups. All rats were established the early steroid-induced avascular necrosis of femoral head models by peritoneal injecting prednisolone acetate except those in the control group, which were received isodose physiological saline. Then, the rats in the low dose group and high dose group were injected with 1 μ g or 10 μ g of recombinant adiponectin into the right hip, respectively; those in the saline group were injected with isodose physiological saline. The right femoral head of all rats were examined by X-ray at 4 weeks after the injection. The extent of necrosis and repair were observed under a light microscope. Trabecular bone area, empty bone lacuna rate, vascular number were analyzed and the expression of tumor necrosis factor α (TNF- α) of the femoral head was detected by immunohistochemical method.

RESULTS AND CONCLUSION: The results of X-ray examination showed that control group and high dose group were normal, bone density of femoral head was uneven and trabecular bone was fuzzy in the saline group and low dose group. Bones of control group were hard, bones of saline group were significantly osteoporosis, bone hardness of low dose group and high dose group were between control group and saline group. Light microscopy showed that trabecular bone, bone lacunae, vascular number of control group were normal, and saline group were significantly abnormal compared with control group ($P < 0.01$); High dose group was significantly superior to the results of saline group ($P < 0.01$), the differences between low dose group and saline group were not significant ($P > 0.05$), the expression of TNF- α in the saline group was higher than the other groups ($P < 0.01$). The results demonstrated that, direct injection of recombinant rat adiponectin into hip joint can promote the repair of steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rats in a dose-dependent correlation.

Huang J, Yin ZS. Effects of adiponectin on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(15): 2680-2683. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 动物实验表明脂联素影响成骨细胞和破骨细胞的增殖和分化, 临床研究发现脂联素和骨密度存在着一定的相关性, 但具体作用机制尚不清楚。

目的: 评价髋关节内直接注射重组大鼠脂联素对激素性股骨头缺血性坏死修复的影响。

方法: 将SD大鼠随机分成4组。空白对照组腹腔注射生理盐水, 其余大鼠腹腔注射醋酸泼尼松龙诱导早期激素性股骨头缺血坏死的模型。随后将低剂量组、高剂量组大鼠右侧髋关节内分别注入1 μ g、10 μ g的重组脂联素; 生理盐水组注入等量的生理盐水; 空白对照组不作任何处理。4周后行X射线平片观察, 光镜下观察股骨头坏死和修复的程度。分析骨小梁面积、空骨陷窝数、软骨下骨血管数量, 免疫组织化学检测股骨头肿瘤坏死因子 α 表达情况。

结果与结论: 空白对照组X射线片无异常发现, 生理盐水组、低剂量组显示股骨头密度不均骨小梁模糊; 高剂量组股骨头形态和骨密度均正常。大体所见空白对照组骨质硬, 生理盐水组骨质明显疏松, 低剂量组、高剂量组骨质硬度介于空白对照组、生理盐水组之间。光镜显示空白对照组股骨头软骨、骨小梁、骨细胞、空骨陷窝、毛细血管数及骨髓造血组织均正常, 而生理盐水组明显异常, 与空白对照组比较差异有显著性意义($P < 0.01$); 高剂量组结果显著优于生理盐水组($P < 0.01$), 低剂量组结果与生理盐水组差异无显著性意义($P > 0.05$), 生理盐水组肿瘤坏死因子 α 的表达高于其余3组($P < 0.01$)。结果表明, 髋关节内直接注射重组脂联素可促进激素性股骨头缺血性坏死的修复, 且具有剂量依赖性。

关键词: 重组脂联素; 股骨头坏死; 激素类副作用; 肿瘤坏死因子 α

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.15.005

黄俊, 尹宗生. 脂联素与大鼠激素性股骨头坏死的修复[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(15):2680-2683. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

Mont等^[1]指出细胞因子是未来治疗股骨头坏死最有潜力的生物制剂。脂联素是一种脂肪细胞因子, 目前国内外关于脂联素与骨代谢的研究

日渐增多, 动物实验表明脂联素影响成骨细胞和破骨细胞的增殖和分化, 临床研究发现脂联素和骨密度存在着一定的相关性, 但具体作用机制尚不清楚。实验通过动物实验研究将重组脂联素直接注入激素性股骨头坏死模型大鼠髋关节内, 来探索脂联素对激素性股骨头坏死修复的影响。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2009-03/08在安徽医科大学实验动物中心及第一附属医院中心实验室完成。

材料:

药品	来源
大鼠脂联素球状区活性重组蛋白	北京爱迪博生物科技有限公司
肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF α)	北京中杉金桥生物技术有限公司
免疫组织化学试剂盒、醋酸 泼尼松龙注射液(批号 081206)	浙江仙琚制药股份有限公司
注射用青霉素钠(批号 A080700411)	哈药集团制药总厂

健康成年雌性SD大鼠32只, 体质量约250 g, 由安徽医科大学动物实验中心提供。实验过程中对动物处置符合2006年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[2]。

实验方法:

股骨头坏死模型的制备、动物分组和重组脂联素的注射方法: SD大鼠适应性喂养1周, 随机分为4组: 空白对照组、生理盐水组、低剂量组、高剂量组, 每组8只。采用齐振熙等^[3]使用的造模法, 予治疗组腹腔注射醋酸泼尼松龙24.5 mg/kg, 同时注射青霉素钠14万U/只, 2次/周, 连续6周。造模期间, 正常普通饲料喂养, 饮水瓶悬吊, 使动物下肢直立饮水。6周后在体积分数为10%水合氯醛3 mL/kg腹腔麻醉下, 手术暴露低剂量组、高剂量组大鼠右侧髋关节, 分别将50 μ L的1 μ g和10 μ g的重组脂联素注入关节腔内, 生理盐水组以同样注射方法注射等量的生理盐水, 空白对照组不作处理, 术后4周行影像学及组织形态学观察。

苏木精-伊红染色股骨头组织形态学观察: 将32只大鼠在术后第4周末处死, 取出右侧股骨头, 观察股骨头大体情况。用体积分数为4%甲醛固定24 h, 6%的EDTA溶液脱钙14 d。系列乙醇脱水, 常规石蜡包埋, 切片厚为5 μ m。石蜡切片脱蜡和水化后, 苏木精-伊红染色, 光镜下观察软骨有无坏死灶, 任选5个400倍视野, 每个视野计数50个骨陷窝, 重复计数5次, 求出空缺陷陷窝的百分比。观察软骨下血管数, 并求出平均值。400倍镜下随机选取5个视野拍照, 经ipp6.0图像分析软件计算单位视野骨小梁面积百分比。

股骨头局部TNF- α 免疫组织化学SP法检测结果: 将切片脱蜡至水, 流水冲洗5 min, 放入湿盒内双蒸水冲洗5 min $\times$ 2次, 滴加体积分数为3% H₂O₂室温孵育10 min, 双蒸水冲洗3 min $\times$ 3次, 放入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液

(pH=6.0)中行微波抗原修复, PBS(pH 7.2~7.4)冲洗3 min $\times$ 3次, 滴加山羊血清工作液室温孵育15 min, 然后倾去多余血清, 滴加适当比例稀释(1:300)的兔抗鼠的TNF- α 一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 次日PBS冲洗3 min $\times$ 3次。滴加生物素标记山羊抗兔二抗工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育15 min, PBS冲洗3 min $\times$ 3次, 滴加辣根酶标记链霉亲和素工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育15 min, PBS冲洗3 min $\times$ 3次, 滴加DAB显色剂显色约3 min, 镜下观察显色情况, 棕黄色为阳性显色, PBS冲洗3 min $\times$ 3次, 苏木精复染约5 s。流水冲洗5 min, 放入90 $^{\circ}$ C烤箱中烤干。中性树脂封固镜下观察。400倍镜下随机选取5个视野拍照, 图像经ipp6.0图像分析软件计算免疫组织化学阳性积分吸光度值(IA)。

主要观察指标: ①X射线平片检查。②股骨头大体形态观察。③股骨头组织形态学观察及免疫组织化学检测结果。

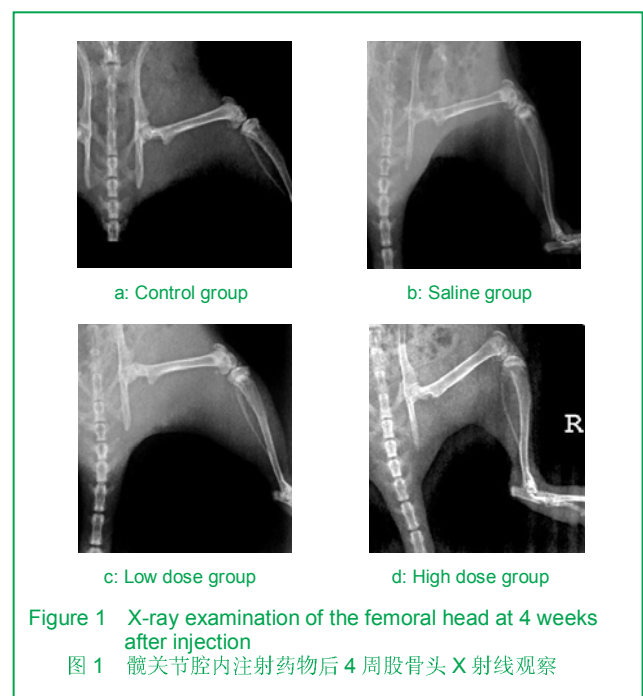
设计、实施、评估者: 设计为第一作者, 实施干预及评估(盲法评估)为第一、二作者。

统计学分析: 由第二作者应用SPSS 13.0软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用SD大鼠32只, 分为4组, 每组8只, 无脱失, 全部进入结果分析。

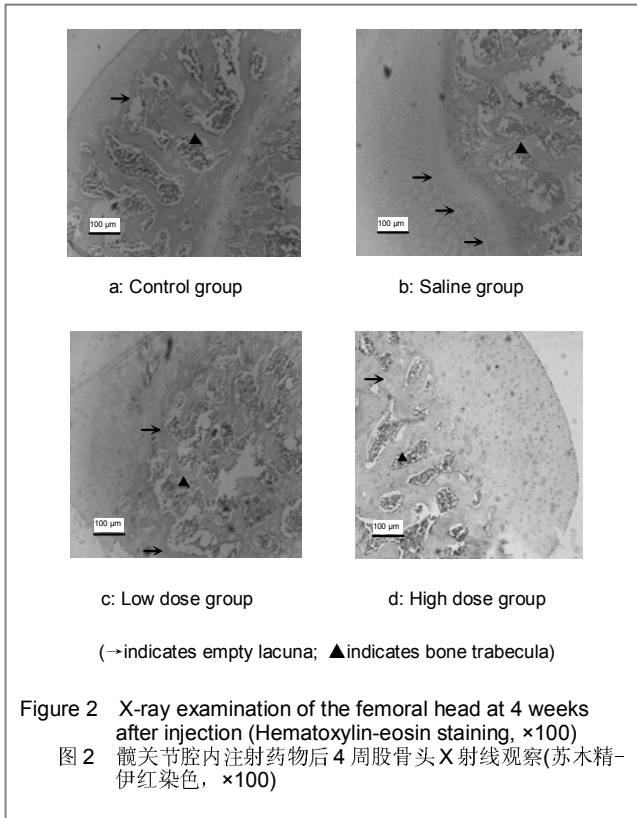
2.2 影像学观察 空白对照组X射线片无异常发现; 生理盐水组、低剂量组显示股骨头密度不均骨小梁模糊; 高剂量组股骨头形态和骨密度均正常。见图1。



2.3 大体标本观察 空白对照组、低剂量组、高剂量组股骨头形态基本完整, 生理盐水组骨质明显疏松并见

软骨有黄色坏死灶, 高剂量组骨质较空白对照组略显疏松但切割阻力大, 表明骨质较生理盐水组更硬。低剂量组骨质情况介于生理盐水组、高剂量组之间。

2.4 光镜下组织学观察 见图2。



4组空缺骨陷窝率、血管数及单位视野骨小梁面积百分比检查结果见表1。

表1 各组大鼠股骨组织形态学观察 Table 1 Comparison of histomorphometry of femoral head in each group (x±s, n=8)		
Group	Percentage of empty lacuna (%)	Percentage of trabecula (%)
Control	10.275±2.108 ^a	0.377 4±0.069 3
Saline	30.600±6.060	0.219 2±0.019 9
Low dose	23.900±3.459 ^c	0.221 1±0.348 8
High dose	12.900±3.214 ^d	0.351 2±0.047 7

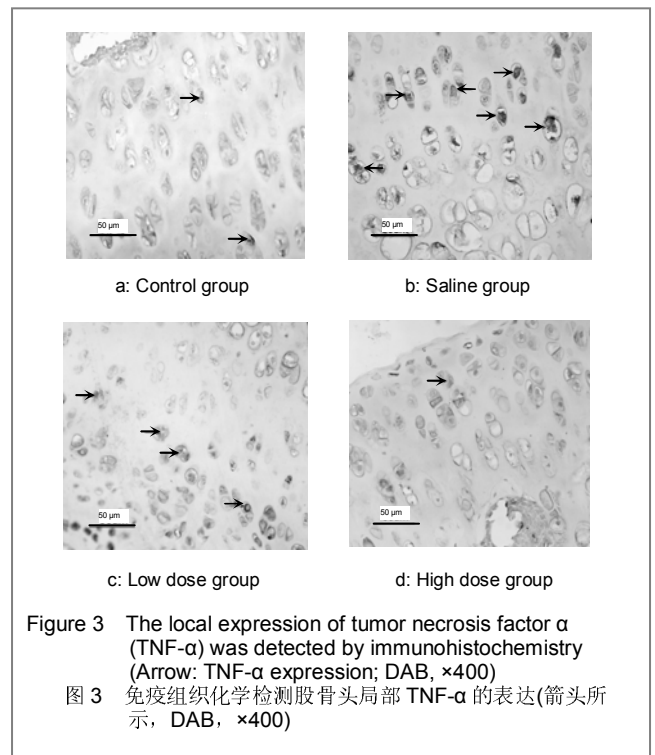
Group	Number of blood vessels	IA of TNF-α
Control	5.88±1.13	20 678.38±5 518.97
Saline	1.75±0.71	196 085.00±47 515.38
Low dose	2.00±.926 ^c	97 140.39±21 208.9 ^b
High dose	3.75±1.165 ^d	66 722.46±11 767.99 ^b

IA: integral absorbance; TNF-α: tumor necrosis factor α; ^aP < 0.01, ^cP > 0.05, ^dP < 0.01, ^bP < 0.01, vs. saline group

空白对照组股骨头软骨层厚薄均匀, 成骨活跃, 骨小梁结构清晰、粗大, 排列规则整齐, 致密均匀, 骨细胞清晰可见, 偶见空骨陷窝, 髓腔内可见增生活跃的骨髓组织, 造血细胞丰富, 空骨陷窝率为(10.275±

2.108)%。生理盐水组股骨头软骨层增生肥大, 软骨下骨小梁结构模糊, 稀疏变细, 结构紊乱, 部分有断裂现象, 空骨陷窝明显增多, 软骨下区骨髓大部分为脂肪组织代替, 脂肪细胞增多, 空骨陷窝率为(30.600± 6.060)%, 与空白对照组比较差异有非常显著性意义(P < 0.01)。低剂量组股骨头坏死较生理盐水组轻微, 但两组无显著差异(P > 0.05)。高剂量组骨小梁排列较规则, 空骨陷窝明显较生理盐水组少, 差异具有显著性意义 (P < 0.01)。

2.5 免疫组织化学观察 TNF-α在软骨细胞、骨小梁周边成骨细胞、破骨细胞及骨髓细胞包浆内均有表达, 在这些部位看到棕黄色染色为阳性显色, 见图3。



空白对照组TNF-α表达较少, 生理盐水组骨细胞以及造血细胞胞浆中广泛表达, 低剂量组和高剂量组骨细胞, 造血细胞胞浆中也有表达, 但都少于生理盐水组。

3 讨论

股骨头缺血性坏死病因至今尚未完全明了, 除创伤外, 应用激素是目前临床较为公认的一种股骨头缺血性坏死病因, 但激素致病的具体机制不甚清楚, 现有的机制假说有: 脂质代谢紊乱导致脂肪栓塞学说、骨内高压及静脉淤滞学说、骨质疏松学说、炎症因子致微血管损伤学说、骨细胞脂肪变性坏死学说、微骨折学说、细胞凋亡学说、细胞毒作用学说等。这些机制都会直接或间接的破坏成骨细胞, 致软骨下出现死骨, 死骨形成后, 周围新骨形成的速度跟不上骨吸收的速度, 软骨下骨量丢失不能够得到有效的修复, 最终导致股骨头负重区关节面塌陷^[4-5]。Bailey

等^[6]测定坏死股骨头生物力学的结果表明, 塌陷的人体股骨头松质骨力学性能明显降低。由此可见, 在股骨头坏死修复过程中, 软骨下区破骨细胞介导的骨吸收与成骨细胞介导的骨重建之间的平衡是决定股骨头力学性能的最重要环节, 预防股骨头塌陷关键就在于加速成骨、抑制破骨, 增强股骨头局部骨修复能力。

目前, 在基础及临床研究中, 利用各种生长因子(如骨形态发生蛋白、胰岛素样生长因子1、碱性成纤维细胞等)促进骨折愈合取得了较好的效果。因此, 在股骨头缺血性坏死的修复过程中, 同样也可利用各种细胞因子来促进新骨形成。脂联素是一种脂源性细胞因子, 与骨代谢关系密切, 体内含量丰富, 血清中的浓度高达5~30 µg/L, 约占总血清蛋白的0.01%以上, Berner等^[7]最先在人类的股骨和胫骨成骨细胞中发现了脂联素及其受体AdipoR1/2的表达, 在体外重组脂联素可促进小鼠成骨细胞的增殖。进一步研究表明, 重组脂联素分别通过AdipoR/JNK和AdipoR/p38促进成骨细胞的增殖和分化, 且具有时间和剂量的依赖性^[8]。Luo等^[9]报道在成骨细胞、破骨细胞及单核细胞共培养体系中, 脂联素通过AdipoR1/p38 MAPK路径诱导人类成骨细胞RANKL的表达, 抑制OPG的表达, 间接诱导破骨细胞分化。同时脂联素还可以抑制骨髓巨噬细胞及CD14⁺人外周血单核细胞向破骨细胞的分化^[10]。由此可见, 脂联素可直接或间接的影响成骨细胞和破骨细胞的增殖和分化, 且作用机制较为复杂, 目前认为脂联素可能从3个不同的途径影响骨代谢: 即骨髓局部产生的脂联素以自分泌或旁分泌的途径促进骨形成, 而循环中的脂联素则以内分泌的途径抑制骨形成, 脂联素通过影响胰岛素信号通路间接促进骨的形成^[11]。

在上述研究的基础上, 有人将携有脂联素基因的腺病毒载体, 经颈静脉注入小鼠体内, 结果发现松质骨体积明显高于空白转染组^[10], 初步证实了脂联素在体内可促进骨的生成, 本试验采取髋关节腔内注射不同浓度的脂联素来观察脂联素对激素性股骨头坏死修复的影响, 以进一步了解脂联素与骨代谢的关系。髋关节腔内注射的优点在于脂联素的局部浓度高, 且能直接作用于股骨头。实验结果显示脂联素治疗组股骨头坏死情况要轻于生理盐水组, 空骨陷窝数较生理盐水组减少, 骨小梁面积百分比也大于生理盐水组, 且高剂量组的效果优于低剂量组。此外袁普卫等^[12]在动物研究中发现血清中TNF-α水平的升高可能是激素性股骨头缺血性坏死的重要因素。TNF-α可以活化中性粒细胞介导炎症反应, 使股骨头血管内皮细胞受损, 发生血管内凝血, 影响股骨头血供。脂联素是一种具有多种生物学作用的细胞因子, 除影响骨代谢以外, 还能抑制TNF-α对NF-κB的活化作用^[13], 减少关节炎模型小鼠关节内炎症因子的水平, 阻止炎症对关节的破坏^[14]。实验采用免疫组织化学

的方法检测各组股骨头TNF-α的表达情况, 初步证实激素造模后TNF-α表达较空白对照组显著增加, 脂联素干预组TNF-α表达显著减少, 从而减轻了炎症对关节软骨及血管的破坏, 有利于股骨头坏死的修复。

4 参考文献

- [1] Mont MA, Jones LC, Einhorn TA, et al. Osteonecrosis of the femoral head potential treatment with growth and differentiation factors. Clin Orthop.1998;355(Suppl):314-335.
- [2] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals.2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30
- [3] Qi ZX,Kang JD.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.2009;13(11):2040-2043.
齐振熙,康靖东.桃红四物汤干预激素性股骨头缺血坏死组织局部微血管密度的变化[J].中国组织工程研究与临床康复,2009, 13(11): 2040-2043.
- [4] Kenzora JE, Steele RE, Yosipovitch ZH, et al. Experimental osteonecrosis of femoral head in adult rabbits. Clin Orthop.1978; 130 : 8-46.
- [5] Zhou Q,Shi GH,Yang L,et al.Zhonghua Waike Zazhi. 2002;40(6): 458-461.
周强,石国华,杨柳,等.复合多孔生物材料在股骨头坏死模型中诱导成骨的观察[J].中华外科杂志,2002,40(6):458-461.
- [6] Bailey AJ, Mansell JP, Sims TJ, et al. Biochemical and mechanical properties of subchondral bone in osteoarthritis. Biorheology.2004; 41: 349- 358.
- [7] Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, et al.Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. Bone.2004;35: 842-849.
- [8] Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ et al. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. Experimental Cell Res.2005;309:99-109.
- [9] Luo XH, Guo LJ, Xie H, et al. Adiponectin Stimulates RANKL and Inhibits OPG Expression in Human Osteoblasts Through the MAPK Signaling Pathway. J Bone Miner Res. 2006;21(10):1648-1656.
- [10] Oshima K, Nampei A, Matsuda M, et al.Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005; 331 :520-526.
- [11] Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, et al.Regulation of Bone Formation by Adiponectin Through Autocrine/Paracrine and Endocrine Pathways. J Cellular Biochemistry.2006;99:196-208.
- [12] Yuan PW,Liu DY,He XJ,et al.Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi. 2004;12(6):454-455.
袁普卫,刘德玉,贺西京,等.激素性股骨头缺血性坏死血清中TNF-α变化的实验研究[J].中国矫形外科杂志,2004,12(6):454-455.
- [13] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adiponectin, an Adipocyte-Derived Plasma Protein, Inhibits Endothelial NF-κB Signaling Through a cAMP-Dependent Pathway. Circulation. 2000;102:1296-1301.
- [14] Kosuke Ebina, Kazuya Oshima, Morihiro Matsuda, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. Biochemical and Biophysical Research Communications.2009;378:186-191.

来自本文课题的更多信息一

利益冲突: 无利益冲突。

课题的意义: 实验初步探讨了髋关节腔内注射重组脂联素对激素性股骨头缺血性坏死修复的影响,结果提示脂联素具有一定的促激素性股骨头坏死修复的作用,为预防和治疗临床骨代谢性疾病提供新的思路。

设计或课题的偏倚与不足: 实验仅为初步动物实验研究,脂联素的最佳干预时期、最佳治疗剂量以及如何才能使脂联素长期持续的局部高表达等问题尚待解决.关于脂联素影响骨代谢的机制还需进一步的深入研究。