

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.35.001 [http://www.crter.org]
陈跃平, 高辉, 陈亮, 董盼锋, 尹庆水. 乙醇对股骨头髓内脂肪细胞的作用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(35):6221-6227.

乙醇对股骨头髓内脂肪细胞的作用**☆

陈跃平¹, 高辉¹, 陈亮¹, 董盼锋¹, 尹庆水² (¹广西中医药大学附属瑞康医院骨科, 广西壮族自治区南宁市 530011; ²解放军广州军区总医院骨科医院, 广东省广州市 510010)

文章亮点:

1 近年来, 国内外很多学者深入研究了股骨头坏死的发病机制, 提出许多学说, 包括脂质代谢紊乱学说、血管内凝血学说、血液循环的机械损伤学说、骨内压增高学说、骨髓间充质干细胞成骨和成脂分化学说、细胞毒性和细胞损伤学等学说。其中脂质代谢紊乱学说在众多观点中较为成熟。

2 文章从分子水平观察在乙醇作用下脂肪细胞结构功能的变化, 以期进一步阐明酒精性股骨头缺血性坏死的发生机制。结果显示, 乙醇能够促进髓内脂肪细胞大量增殖肥大。

3 分析原因可能是长期过量饮酒后导致股骨头髓内脂肪细胞快速大量增殖, 同时脂肪细胞较正常肥大, 从而使相对封闭的骨髓内压力显著增高, 微小血管因受压而变细, 最终导致血流受阻或者中断, 从而形成股骨头缺血性坏死。提示乙醇直接诱发脂肪细胞大量增殖、肥大可能是股骨头缺血性坏死的发病机制。

关键词:

骨关节植入物; 骨关节损伤基础实验; 乙醇; 股骨头坏死; 脂肪细胞; 大白兔; 脂质代谢紊乱; 脂滴; 肥大; 骨内压; 省级基金

摘要

背景: 乙醇已成为股骨头缺血性坏死的致病因素, 其所致的骨髓内脂质代谢异常可能是股骨头缺血性坏死起病的重要原因, 但机制尚未完全明确。

目的: 从分子水平观察在乙醇作用下脂肪细胞结构功能的变化, 以期分析酒精性股骨头坏死的发病机制。

方法: 采用原代脂肪细胞体外培养技术, 取大白兔股骨头髓内脂肪组织, 分离获取脂肪细胞, 以油红O染色行细胞表型鉴定。取传代稳定的髓内脂肪细胞, 将盖玻片切割成10 mm×10 mm, 种植前置入24孔培养板孔内, 分为乙醇组和对照组, 每组24孔, 每孔为1个样本。对照组不加乙醇, 乙醇组加入0.15 mol/L乙醇, 分别于4, 6, 8, 10 d更换培养液, 换液时不再加入乙醇, 均培养至10 d。培养终止后, 取出盖玻片行油红O染色, 光镜下观察脂肪细胞形态并计数。

结果与结论: 随着时间延长, 乙醇组脂肪细胞数量明显多于对照组($P < 0.001$), 2组小脂滴均逐渐增多、增大, 但乙醇组更明显。培养4, 6, 8, 10 d的髓内脂肪细胞数量乙醇组分别为(200.90±24.60), (1 102.30±76.73), (1 160.30±28.37), (1 199.70±44.74)个/cm²; 对照组分别为(99.80±10.82), (0.40±94.71), (1 000.20±41.85), (1 059.80±26.79)个/cm², 脂肪细胞数量随乙醇作用的时间延长而增多。提示乙醇能够促进髓内脂肪细胞增殖肥大, 这可能是长期酗酒后股骨头骨髓内脂肪组织增多, 骨内压增加, 血流灌注减少, 导致缺血, 从而发生股骨头坏死的主要原因。

Alcohol affects the femoral head intramedullary adipocytes

Chen Yue-ping¹, Gao Hui¹, Chen Liang¹, Dong Pan-feng¹, Yin Qing-shui² (¹Department of Orthopedics, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Orthopedic Hospital, General Hospital of Guangzhou Military Region of PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Alcohol has become pathogenic factors of avascular necrosis, and the alcohol induced abnormal lipid metabolism in bone marrow may be the important reason for the onset of avascular necrosis, but the mechanism is not clear yet.

OBJECTIVE: To observe the changes of structure and function of fat cells under the action of alcohol, in order to analyze the pathogenesis of alcoholic femoral head necrosis.

METHODS: Primary adipocytes *in vitro* culture technique was used to obtain rabbit femoral head intramedullary adipose tissue, and then the fat cells were separated, and the phenotype was identified with oil red O staining. The passaged stable intramedullary fat cells were collected. Coverslip was cut into 1 cm × 1 cm in size, and placed in the 24-well culture plate before planting. The cells were randomly divided into alcohol group and control group, 24 holes (each hole for a sample) in each group. The control group was without alcohol, while the alcohol group was added with 0.15 mol/L alcohol. At 4, 6, 8 and 10 days, the culture medium was replaced. Medium was

陈跃平☆, 男, 1970年生, 湖南省益阳市人, 南方医科大学在读博士, 硕士生导师, 主任医师, 教授, 主要从事骨与关节损伤研究。

chenyueping007@126.com

通讯作者: 尹庆水, 主任医师, 教授, 博士生导师, 解放军广州军区总医院骨科医院, 广东省广州市 510010
gz_yqs@medmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)35-06221-07

收稿日期: 2013-05-07
修回日期: 2013-05-29
(201303205/G·C)

Chen Yue-ping☆, Studying for doctorate, Master's supervisor, Chief physician, Professor, Department of Orthopedics, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
chenyueping007@126.com

Corresponding author: Yin Qing-shui, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Orthopedic Hospital, General Hospital of Guangzhou Military Region of PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China
gz_yqs@medmail.com

Supported by: Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region Science and Technology Department, No. 2010GXNSFA013223*; Key Projects of Guangxi Zhuang Autonomous Region Health Department, No. Zhong2010096*

Received: 2013-05-07
Accepted: 2013-05-29

changed and no longer adding alcohol, and then cultured for 10 days. When the culture terminated, the coverslip was removed for oil red O staining. Finally, the morphology and the number of the fat cells were observed under light microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: With time prolonging, the number of fat cells in the alcohol group was significantly more than that in the control group ($P < 0.001$). The lipid droplets in the two groups were gradually increased and enlarged, but more significant in the alcohol group. The number of intramedullary fat cells in the alcohol group after cultured for 4, 6, 8 and 10 days was respectively (200.90±24.60), (1 102.30±76.73), (1 160.30±28.37) and (1 199.70±44.74)/cm²; the number of intramedullary fat cells in the control group was respectively (99.80±10.82), (0.40±94.71), (1 000.20± 41.85) and (1 059.80±26.79)/cm², the number of fat cells increased with the time of alcohol influence. Alcohol can promote the intramedullary fat cells to increase and enlarge, and this may be the main reason for femoral head necrosis, as long-term alcoholism can lead to bone marrow fat tissue increasing, intraosseous pressure increasing and perfusion reducing, thus resulting ischemia.

Key Words: bone and joint implants; basic experiment of bone injury; alcohol; femoral head necrosis; fat cells; rabbit; dyslipidosis; lipid droplet; enlargement; intraosseous pressure, provincial grants-supported paper

Chen YP, Gao H, Chen L, Dong PF, Yin QS. Alcohol affects the femoral head intramedullary adipocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(35):6221-6227.

0 引言

股骨头缺血性坏死是股骨头血供中断或骨细胞变性导致的有活力成分(成骨细胞、骨髓间充质干细胞、脂肪细胞以及骨髓造血细胞)死亡及之后的修复,最终股骨头出现结构改变、股骨头部分塌陷、髋关节活动受限的疾病^[1]。

目前认为股骨头缺血性坏死是一个复杂的过程,是多种危险因素一起作用的结果^[2-3]。通常认为乙醇和激素的大量摄入是导致股骨头坏死最常见的病因,约占股骨头坏死全部病例的40%^[4]。酒精性股骨头坏死临床很常见^[5],长期过量饮酒可导致股骨头髓内脂肪细胞快速大量增殖,同时脂肪细胞较正常肥大,从而使相对封闭的骨髓内压力显著增高,微小血管因受压而变细,最终导致血流受阻或者中断^[6]。但其机制尚不清楚,国内外类似报道较少见。

近年来,国内外很多学者深入研究了股骨头坏死的发病机制,提出许多学说,包括脂质代谢紊乱学说、血管内凝血学说、血液循环的机械损伤学说、骨内压增高学说、骨髓间充质干细胞成骨和成脂分化学说、细胞毒性和细胞损伤学等学说^[7-11]。其中脂质代谢紊乱学说在众多观点中较为成熟。

文章通过大白兔股骨头细胞体外培养,观察乙醇对大白兔股骨头脂肪细胞的作用,进一步探讨股骨头缺血性坏死时什么原因造成骨髓内脂肪细胞增多,阐明酒精性股骨头缺血性坏死的发病机制。

1 材料和方法

设计: 细胞学水平, 体外观察对比实验。

时间及地点: 于2012年1月至12月在广西大学生命科学实验中心实验室完成。

材料:

实验动物: 选用健康2月龄新西兰大白兔1只, 体重2.0-2.5 kg, 由广西中医药大学动物实验中心提供, 许可证号: SCXK(桂)2012-002。实验过程中对动物的处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定^[12]。

乙醇作用于大白兔股骨头髓内脂肪细胞实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
苏州安泰洁净工作台	SW-CJ-IFD
低速离心机	上海安亭, TDL-80-2B
倒置光学显微镜	OPTEC, BDS200
细胞恒温培养箱	Thermo scientific, HERACELL150i
水平摇床	北京六一, WD-9405B
胎牛血清	Hyclone, Cat.No.SH30087.01
DMEM-高糖培养基	Hyclone, Cat.No.SH30023.01B
DMEM-低糖培养基	Hyclone, Cat.No.SH30021.01B
DMEM-F12 培养基	Hyclone, Cat.No.SH30023.01B
199 基础培养基	Hyclone, Cat.No.SH30253.01B
青链霉素、胰蛋白酶、D-Hanks 液、TE 酶、PBS 磷酸钾缓冲液	碧云天
胶原酶 I 型	Sigma, 9001-12-1.SC013001
乙醇	Sigma, 79-14-1. S12473701

实验方法:

细胞培养: 取2.0-2.5 kg新西兰大白兔, 无菌下取双侧股骨头髓内脂肪组织, 将肉眼可见的血管和纤维组织去除干净, 用PBS反复洗涤以去除血块。用组织剪剪成0.5-1.0 mm大小, 加入 I 型胶原酶1 g/L, 37 °C水浴箱振荡(120 r/min)消化70 min左右, 当出现乳糜样浓稠液体时停止消化, 同时加入5 mL PBS, 轻轻吹打使之混匀, 使用250 μm孔径的尼龙网把细胞过滤到离心管中, 并且加入10 mL FBS反复洗细胞4次。以1 500 r/min的转速离心6 min, 用吸管去除上清液, 加入PBS 10 mL洗涤细胞, 再次离心、去除上清液, 重复此步骤2次。再用10 mL含体积分数10%新生牛血清的高糖DMEM细胞培养液洗涤

并重悬细胞, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种到每孔2 mL的6孔板中, 用大小为10 mm×10 mm经聚赖氨酸处理过的无菌盖玻片盖上。放入37 °C, 体积分数5%CO₂饱和湿度培养箱中培养。

根据细胞贴壁情况进行换液, 每天在倒置显微镜下统计细胞数量并观察细胞形态变化^[13-14]。

脂肪细胞特殊染色与计数: 取传代稳定的髓内脂肪细胞, 种植入24孔培养板孔内, 随机分为乙醇组和对照组, 每组12孔(每孔为1个样本), 乙醇组加入0.15 mol/L乙醇, 对照组不加乙醇。

将盖玻片切割成10 mm×10 mm盖上培养孔, 分别于第4, 6, 8, 10天更换培养液, 乙醇组在以后换液时不再加入乙醇, 2组均培养至10 d, 取出盖玻片行油红O染色^[15], 然后置于光镜下统计细胞数量并观察细胞形态变化。

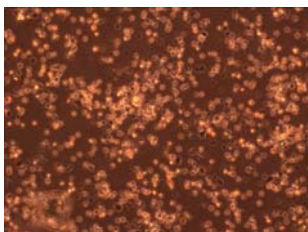
主要观察指标: 乙醇组与对照组脂肪细胞生长曲线, 乙醇组与对照组细胞油红O染色结果。

统计学分析: 文章中所有数据均由第二作者分析统计, 采用SPSS 18.0统计学软件处理, 细胞数量用 $\bar{x} \pm s$ 表示。*t*检验比较两组间样本均数, 显著性检验标准 α 值取0.05。

2 结果

2.1 细胞形态学观察结果 见图1, 2。

在倒置显微镜下观察骨髓髓内细胞呈大小不等的圆形细胞, 以造血细胞为主, 随着每次的换液被大量清除, 部分随着培养时间延长逐渐死亡, 其余细胞于24-48 h后开始贴壁, 贴壁的圆形细胞即为髓内脂肪细胞, 见图1。



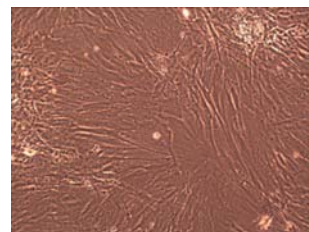
注: 在倒置显微镜下观察, 脂肪细胞内可见小圆脂滴。

图1 应用199基础培养基分离培养第1天兔髓内脂肪细胞形态(油红O染色, ×100)

Figure 1 Morphology of rabbit intramedullary fat cells at 1 d after isolated and cultured with 199 basic culture medium (Oil red O staining, ×100)

3-5 d后, 细胞体积增大, 伸出突起由圆形变为梭形或者纺锤形, 形态与成纤维细胞相似, 细胞数量开始增

殖, 见图2。



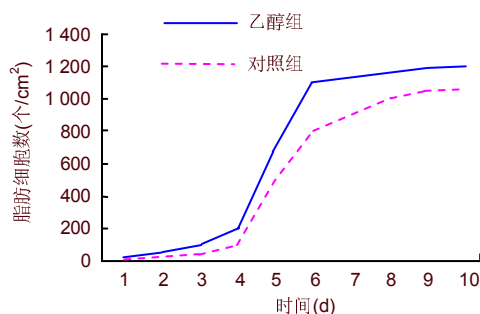
注: 髓内脂肪细胞呈圆形或梭形, 形态与成纤维细胞相似, 细胞数量开始增殖。

图2 应用199基础培养基分离培养第10天兔髓内脂肪细胞形态(油红O染色, ×200)

Figure 2 Morphology of rabbit intramedullary fat cells at 10 d after isolated and cultured with 199 basic culture medium (Oil red O staining, ×200)

10 d后原代细胞培养结束。多次传代后, 细胞形态仍保持不变, 增殖旺盛。

2.2 乙醇组与对照组脂肪细胞的生长曲线 结果见图3。



注: 乙醇组在传代髓内脂肪细胞培养孔中加入0.15 mol/L乙醇, 对照组不加乙醇。随着培养时间延长, 乙醇组脂肪细胞数量明显多于对照组($P < 0.001$), 脂肪细胞数量随乙醇作用的时间延长而增多。

图3 乙醇组与对照组培养4, 6, 8, 10 d髓内脂肪细胞的生长曲线

Figure 3 Growth curve of intramedullary fat cells in the alcohol group and the control group after cultured for 4, 6, 8 and 10 d

随着时间延长, 乙醇组脂肪细胞数量明显多于对照组, 2组小脂滴均逐渐增多、增大, 但乙醇组的表现更明显。在4, 6, 8, 10 d, 髓内脂肪细胞数量乙醇组分别为 (200.90 ± 24.60) , $(1\ 102.30 \pm 76.73)$, $(1\ 160.30 \pm 28.37)$, $(1\ 199.70 \pm 44.74)$ 个/cm²; 对照组分别为 (99.80 ± 10.82) , (0.40 ± 94.71) , $(1\ 000.20 \pm 41.85)$, $(1\ 059.80 \pm$

26.79)个/cm², 脂肪细胞数量随乙醇作用的时间延长而增多($P < 0.001$), 见表1。

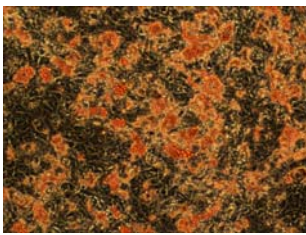
表1 培养4, 6, 8, 10 d 乙醇组及对照组髓内脂肪细胞的数量

Table 1 Number of intramedullary fat cells in the alcohol group and the control group after cultured for 4, 6, 8 and 10 d ($\bar{x} \pm s$, quantity/cm²)

组别	4 d	6 d	8 d	10 d
乙醇组	200.90±24.60	1 102.30±76.73	1 160.30±28.37	1 199.70±44.74
对照组	99.80±10.82	790.40±94.71	1 000.20±41.85	1 059.80±26.79
<i>t</i>	141.51	65.47	100.26	71.98
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 乙醇组在传代髓内脂肪细胞培养孔中加入 0.15 mol/L 乙醇, 对照组不加乙醇。随着培养时间延长, 乙醇组脂肪细胞数量明显多于对照组($P < 0.001$), 提示乙醇能够促进髓内脂肪细胞增殖肥大。

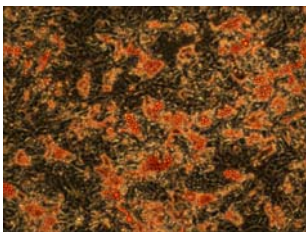
2.3 乙醇组与对照组细胞油红O染色结果 见图4, 5。



注: 对照组传代髓内脂肪细胞培养时不加乙醇。橘红色的小脂滴即为脂肪细胞, 胞核被脂滴挤于细胞中央或一侧。

图4 对照组兔髓内脂肪细胞形态(油红O染色, ×200)

Figure 4 Morphology of rabbit intramedullary fat cells in the control group (Oil red O staining, ×200)



注: 乙醇组在传代髓内脂肪细胞培养孔中加入 0.15 mol/L 乙醇。橘红色的小脂滴即为脂肪细胞, 较对照组更大。

图5 乙醇处理组兔髓内脂肪细胞形态(油红O染色, ×200)

Figure 5 Morphology of rabbit intramedullary fat cells in the alcohol group (Oil red O staining, ×200)

乙醇组乙醇作用于细胞五六天, 细胞内首先出现小

圆脂滴, 对照组细胞内脂滴出现很少且最晚。

随着时间延长, 2组小脂滴均逐渐增多、增大, 但乙醇组更明显。

油红O染色显示, 光镜下可见脂滴染为橘红色, 胞核被脂滴挤于细胞中央或一侧, 见图4, 5。

3 讨论

实验结果发现, 无乙醇作用时, 髓内脂肪细胞也会增殖变肥大, 但是, 乙醇作用于细胞时, 脂肪细胞数量明显增加, 随着乙醇的作用时间延长, 脂肪细胞无论是增长的速度, 还是增殖的数量以及肥大的程度都高于对照组。

酒精性股骨头缺血性坏死致残率极高, 常累及中青年, 呈进展性和致残性发展^[16], 如早期不能得到及时有效的治疗, 80%以上的患者将在4年内发生股骨头塌陷, 关节间隙变窄, 最终导致坏死性骨关节炎, 患者髋关节功能障碍而致残不得行人工髋节置换^[17]。长期过量饮酒是股骨头缺血坏死的高危因素。日本学者Mastsuo等^[18]研究发现, 饮酒发生股骨头缺血性坏死的相对危险度为7.8, 并存在明显的剂量效应关系, 每周饮酒量小于400 mL、400-1 000 mL和大于1 000 mL的相对危险度分别为3.3, 9.8和17.9。此后进行了一项全国性多中心病例对照研究显示偶尔饮酒者发生股骨头缺血性坏死的相对危险度为3.2, 经常饮酒者为13.1, 而且存在明显的量效关系。每周饮酒<320, 320-799和800 g以上者的相对危险度分别为2.8, 9.4和14.8^[19]。酒精性股骨头坏死发病机制仍不清楚。

近年来, 国内外学者对股骨头坏死发病机制进行了深入研究, Rico等^[20]报道酒精性股骨头坏死是乙醇刺激肾上腺分泌糖皮质激素过多所致, 可知乙醇和激素可能通过一共同途径引起骨坏死。黄永镇等^[21]采用灌胃法给予家兔烈性白酒, 发现过量饮酒后内源性糖皮质激素分泌增加, 使P蛋白表达上调和Bcl-2蛋白表达下调, 是引起骨细胞凋亡的重要原因之一。乙醇中毒可导致高脂血症, 熊腾滨等^[22]在给家兔大剂量烈性酒后2个月三酰甘油, 3个月胆固醇开始升高, 灌酒6个月三酰甘油和胆固醇明显升高。当血液循环中的脂肪物质增多, 聚集成脂肪球, 使血流速度降低, 脂肪球容易堵塞微血管, 引起股骨头内微血管栓塞, 导致股骨头缺血^[23]。李晓等^[24]观察乙醇诱导的早期股骨头缺血性坏死兔动物模型, 发现酒精性骨坏死存在高血脂, 肝脏病理切片上看到以小叶中央区受累为主的肝细胞脂肪变性, 长期给兔大剂量烈性酒造成乙醇中毒, 股骨头软骨下骨细胞内出现脂质沉积, 髓内脂肪细胞数目增多、体积增大。

然而更多的证据表明, 骨髓间充质干细胞成脂分化在酒精性骨坏死发生过程中起到重要作用, 有学者报道

比较酒精性股骨头缺血性坏死和股骨颈骨折患者的股骨近端骨髓间充质干细胞成脂分化能力和成骨分化能力^[25],发现股骨头缺血性坏死患者间充质干细胞成骨分化能力低于股骨颈骨折的患者,而成脂分化能力明显比后者高,从而证明骨髓间充质干细胞成骨成脂分化能力的改变可能是股骨头缺血性坏死的发病机制之一。韩国学者研究使用性能染色对股骨头缺血性坏死病例股骨近端骨髓间充质干细胞的成脂分化能力进行检测^[26],发现股骨头缺血性坏死病例股骨近端骨髓间充质干细胞的数量明显降低,同时其成脂能力显著提高,而成骨能力明显下降,从而得出结论,乙醇可能是通过降低了骨髓间充质干细胞的增殖活性或者改变分化方向而引起股骨头缺血性坏死,可能也是导致发生股骨头缺血性坏死的机制之一。

酒精性股骨头坏死的发生与多种基因相关^[27]。研究表明,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 是一种成脂转录因子,在成脂作用和脂肪细胞分化中,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 起着关键性调节作用^[28]。乙醇能够增加间充质干细胞内过氧化物酶体增殖物激活受体 γ mRNA的表达,诱导间充质干细胞向脂肪细胞分化,同时减少其成骨细胞分化^[27]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的高表达与酒精性股骨头坏死的发生密切相关^[29]。有细胞学实验研究观察中药葛根素对乙醇诱导骨髓间充质干细胞成脂分化的作用,结果显示,乙醇组髓内脂肪细胞数量,成脂转录因子(过氧化物酶体增殖物激活受体 γ mRNA)的表达以及细胞内三酰甘油含量均低于对照组;成骨基因的表达、骨钙素含量以及碱性磷酸酶活性明显高于模型组^[22]。

在众多机制中,脂质代谢紊乱学说在众多观点中较为成熟。股骨头髓腔血管脂肪栓塞以及脂肪填塞导致血管受压变细、闭塞已在动物实验中证实^[30]。长期饮用大剂量烈性酒后可发生脂肪肝及高脂血症。当周围循环中的脂肪物质增多,聚集成脂肪球,血流滞缓,容易栓塞于股骨头内微血管,导致股骨头缺血。此外,乙醇在体内代谢过程中产生的毒性作用可使自由基生成增多,导致主要清除剂之一的超氧化物歧化酶活性下降,使过氧化脂质的反应增强,膜受体、蛋白酶和离子通道功能障碍,通过影响细胞膜的通透性导致血管内皮细胞损伤,小动脉发生纤维变性和粥样硬化,导致股骨头局部缺血^[31]。作为一种细胞毒性因子,乙醇在细胞损伤或死亡中可能起着直接或间接的决定性作用。长期摄入乙醇后,软骨下骨细胞内出现大量脂肪物质沉积,乙醇诱导骨髓间充质干细胞成脂分化,导致骨细胞缺血、缺氧,使其代谢活动降低,三酰甘油及脂肪酸的氧化均难以进行,脂肪利用减少,并且使骨髓基质细胞成骨作用降低,则修复坏死骨的成骨细胞数量减少,最终导致股骨头坏死、塌陷^[32-33]。

随着研究的深入,国内外有学者开始对影响脂质代谢的酶系进行研究,其中肝脂肪酶是脂质代谢过程中的关键酶之一,它可以调节血液中的血脂浓度。主要参与高密度脂蛋白的重构和乳糜微粒残骸、低密度脂蛋白的代谢以及胆固醇逆向转运^[34]。有研究表明,肝脂肪酶含量与其启动子区域基因的变异有关,进而影响血脂浓度,而血脂浓度的改变又与外周血管病变等多种疾病相关^[35-36]。可作为配体调节高密度脂蛋白及含载脂蛋白B的脂蛋白中的胆固醇和磷脂,从而影响这些脂蛋白的大小和密度,促进高密度脂蛋白及含载脂蛋白B的脂蛋白残骸的摄取^[37]。张义福等^[38]的研究表明,股骨头坏死病程中肝脂肪酶活性与血脂状态及骨坏死程度呈负相关关系:肝脂肪酶活性下降出现血脂代谢紊乱,骨坏死改变明显,活性上调后则这种改变减轻。股骨头缺血性坏死的产生可能与机体内肝脂肪酶活性下调有关,糖皮质激素或者乙醇可能是通过某种机制抑制了肝脂肪酶的活性而诱发高脂血症,后者的长期存在造成股骨头髓腔脂肪细胞增多,脂肪栓塞,最终造成股骨头坏死病变的形成。肝脂肪酶活性增强剂能有效增强酶活性,改善骨股骨头缺血性坏死病程中的高血脂状态,减少髓腔脂肪细胞及脂肪栓子的数量,抑制或延缓股骨头坏死病变的形成。

本文结果提示,随着时间延长,乙醇组脂肪细胞数量明显多于对照组,2组小脂滴均逐渐增多、增大,但乙醇组更明显。在4, 6, 8, 10 d 的髓内脂肪细胞数量乙醇组分别为(200.90±24.60), (1 102.30±76.73), (1 160.30±28.37), (1 199.70±44.74)个/cm²;对照组分别是(99.80±10.82), (0.40±94.71), (1 000.20±41.85), (1 059.80±26.79)个/cm²(表1),脂肪细胞数量随乙醇作用的时间延长而增多($P < 0.001$)。乙醇组乙醇作用于细胞五六天,细胞内首先出现小圆脂滴,对照组细胞内脂滴出现很少且最晚。随着时间延长,2组小脂滴均逐渐增多、增大,但乙醇组更明显。由此推断出酒精性股骨头坏死时,乙醇作用于股骨头髓内脂肪细胞,不仅可以直接促进其增殖肥大而且能促进其生长的速度。

脂肪细胞增殖肥大后,首先造成脂肪细胞在股骨头内大量堆积,由于股骨头是一个相对密闭不能舒张的腔隙,使得股骨头髓内压力显著升高,微小血管因受压而变细,最终导致血流受阻或者中断,从而使动脉灌注量明显减少,静脉回流发生障碍,导致局部缺血,组织代谢产物增多积聚,微小血管反射性通透能力增加,从而使血浆大量外渗,股骨头内发生骨髓水肿,进一步促进缺血加重,继而使相对密闭的股骨头微循环出现障碍,从而使大量骨细胞因缺血缺氧而死亡,最终形成股骨头缺血性坏死。王大伟等^[39]研究显示,过度酗酒诱使股骨头骨髓内脂肪细胞肥大、增生,逐渐压迫和取代红骨髓,

并引起髓内压力持续增高, 髓内血窦、毛细血管、小静脉受挤压, 影响骨组织内动脉血供, 导致股骨头骨细胞死亡。其次, 当脂肪细胞在股骨头内大量堆积可以使骨发生脂肪变性, 轻则导致骨细胞功能减退, 骨基质生成, 减少, 骨小梁变细、稀疏, 重则骨细胞固缩、死亡, 骨陷窝空虚。血脂升高时进入骨细胞体内交换的脂质相应增多, 缺血缺氧状态下三酰甘油水解和脂肪酸氧化难以进行, 代谢活动减低, 脂肪利用减少, 当脂质进入骨细胞速率超过其代谢速度时, 脂质在细胞内堆积损伤骨细胞。王义生等^[40]采用灌胃法给予小鼠烈性白酒6个月时, 组织学改变为股骨头内脂肪细胞增殖、肥大, 脂肪增多, 髓内造血组织减少, 空骨陷窝增多, 骨小梁变细、稀疏, RT-PCR技术检测到股骨头组织内成脂转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体 γ mRNA呈明显高表达, 成骨基因骨钙素mRNA呈低表达。因此作者认为乙醇直接诱发脂肪细胞大量增殖、肥大可能是股骨头缺血性坏死的病理学机制。

总之, 乙醇能够促进髓内脂肪细胞大量增殖肥大, 这可能是长期过量饮酒后导致股骨头髓内脂肪细胞快速大量增殖, 同时脂肪细胞较正常肥大, 从而使相对封闭的髓内压力显著增高, 微小血管因受压而变细, 最终导致血流受阻或者中断, 从而形成股骨头缺血性坏死。乙醇直接诱发脂肪细胞大量增殖、肥大可能是股骨头缺血性坏死的发病机制。

致谢: 感谢广西大学生命科学实验中心各老师对本实验的指导。

基金资助: 广西壮族自治区科技厅自然科学基金(2010GXNSFA013223); 广西壮族自治区卫生厅重点课题(重2010096)。

作者贡献: 第一作者构思并设计文章, 所有作者共同起草, 经通讯作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

学术术语: 肝脂肪酶-肝脂肪酶是脂质代谢过程中的关键酶之一, 它可以调节血液中的血脂浓度。主要参与高密度脂蛋白的重构和乳糜微粒残骸、低密度脂蛋白的代谢以及胆固醇逆向转运。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

[1] 董晓俊. 股骨头坏死[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 33.

- [2] 崔永锋, 王利明. 股骨头坏死修复过程中断的原因分析[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(11):1473-1476.
- [3] 张慧慧, 宋炎成, 蔡道章. 基因多态性和股骨头坏死的相关研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2008, 16(11):833-836.
- [4] Tang WM, Chiu PKY. Avascular necrosis of femoral head: a short review. 2006;9(1):98-101.
- [5] Wang Y, Yin L, Li Y, et al. Preventive effects of puerarin on alcohol induced osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 2008; 466(5):1059-1067.
- [6] Suh KT, Kim SW, Roh HL, et al. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 2005;(431):220-225.
- [7] Trueta J. The Normal vascular anatomy of the femoral head in adult man. Clin Orthop Relat Res. 1997;(334):6-14.
- [8] Bj Érkman A, Svensson PJ, Hillarp A, et al. Factor V leiden and prothrombin gene mutation: risk factors for osteonecrosis of the femoral head in adults. Clin Orthop Relat Res. 2004; (425):168-172.
- [9] Glueck CJ, Freiberg RA, Sieve L, et al. Enoxaparin prevents progression of stages I and II osteonecrosis of the hip. Clin Orthop Relat Res. 2005;(435):164-170.
- [10] Lee JS, Lee JS, Rob HL, et al. Alterations in the differentiation ability of mesenchymal stem cells in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: comparative analysis according to the risk factor. J Orthop Res. 2006;24(4): 604-609.
- [11] Suh KT, Kmi SW, Roh HL, et al. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 2005;(431):220-225.
- [12] 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.
- [13] 杨浩, 吴迪, 李世和, 等. 家兔脂肪基质干细胞的分离培养及多向分化诱导[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(14):2601-2606.
- [14] 王清富, 陈庄洪, 蔡贤华, 等. 兔脂肪干细胞的多向诱导分化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(49):9162-9167.
- [15] 张亮, 官泉生, 彭婉芬, 等. 冷冻切片结合油红O染色在动脉粥样硬化小鼠模型中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(2): 210-211.
- [16] Jones LC, Hungerford DS. The pathogenesis of osteonecrosis. Instr Course Lect. 2007;56(2):179-196.
- [17] Ficat RP. Idiopathic bone necrosis of the femoral head. Early diagnosis and treatment. J Bone Joint Surg(Br). 1985;67(1):3-9.
- [18] Matsuo K, Hirohata T, Sugioka Y, et al. Influence of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status on idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop Relat Res. 1988;(234):115-123.
- [19] 樊粤光, 袁港, 何伟, 等. 692例股骨头缺血坏死病因调查分析[J]. 广州中医学院报, 1999, 11(1):29-31.
- [20] Rico H, Gomez-Castresana F, Cabranes JA, et al. Increased blood cortisol in alcoholic patients with aseptic necrosis of the femoral head. Calcif Tissue Int. 1985;37:585-587.
- [21] 黄永镇, 骆旭东, 郭坤亮, 等. 内源性糖皮质激素对酒精性股骨头缺血坏死骨细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 贵州医药, 2004, 28(12):1059-1062.
- [22] 熊腾滨, 王义生. 酒精性股骨头缺血性坏死研究新进展[J]. 河南医学研究, 2003, 12(3):286-288.
- [23] Wang Y, Li Y, Mao K, et al. Alcohol induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 2003;(410):213-224.

- [24] 李晓,于学忠,陈晓亮,等. 酒精性股骨头缺血性坏死脂类代谢异常的临床与实验研究[J].中国矫形外科杂志,2003,11(18):加页5-加页7.
- [25] Suh KT, Kim SW, Roh HL, et al. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol induced osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 2005; 431: 220-225.
- [26] Suh KT, Kim SW, Roh HL, et al. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res.2005;(431):220-225.
- [27] Wang Y, Yin L, Li Y, et al. Preventive effects of puerarin on alcohol induced osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 2008;466(5):1059-1067.
- [28] Duque G, Macoritto M, Kremer R. 1,25(OH)₂D₃ inhibits bone marrow adipogenesis in senescence accelerated mice (SAM-P/6) by decreasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARgamma2).Exp Gerontol. 2004;39(3): 333-338.
- [29] 王义生,李月白,殷力,等.酒精性骨坏死发病机制和葛根素对其预防作用[J].中华显微外科杂志.2006,29(3):209-212.
- [30] Kiyokazu F, Rieko K, Harumichi S, et al. Glucocorticoid induces micro-fat embolism in the rabbit: a scanning electron microscopic study. J Orthop Res. 2006;24(4):675-683.
- [31] Meye C, Schumann J, Wagner A, et al. Effects of homocysteine on the levels of caveolin-1 and eNOS in caveolae of human coronary artery endothelial cells. Atherosclerosis. 2007; 190(2):256 -263.
- [32] Shapiro F, Connolly S, Zurakowski D, et al. Femoral head deformation and repair following induction of ischemic necrosis: a histologic and magnetic resonance imaging study in the piglet. J Bone Joint Surg Am. 2009;91(12):2903-2914.
- [33] 王大伟,潘华,李红波,等.三七总皂苷对酒精诱导骨髓基质干细胞分化影响的实验研究[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(8):1410-1413.
- [34] 林慧,林穗金.人类肝脂肪酶基因研究概述[J].医学综述.2012, 18(7):992-994.
- [35] Yabu Y, Noma K, Nakatani K, et al. C-514T polymorphism in hepatic lipase gene promoter is associated with elevated triglyceride levels and decreasing insulin sensitivity in nondiabetic Japanese subjects. Int J Mol Med. 2005;16(3): 421-425.
- [36] 傅毅,倪坑华,应雅韵,等. 肝脂酶基因启动子-514C/T多态性与脑梗死的关系[J].中华神经科杂志,2006, 39(11):758-761.
- [37] Zambon A, Deeb SS, Bensadoun A, et al. In vivo evidence of a role for hepatic lipase in human apoB-containing lipoprotein metabolism, independent of its lipolytic activity. J Lipid Res. 2000;41(12):2094-2099.
- [38] 张义福,刘建,孟国林,等.兔激素性股骨头坏死病程中肝脂肪酶改变的意义[J].第四军医大学学报,2006,27(8):737-740.
- [39] 王大伟,史宝明,张爽.构建酒精性股骨头坏死动物模型的理论依据及造模方法[J].中国组织工程研究与临床康复, 2010,12(50): 9413-9416.
- [40] 王义生,刘沛霖,殷力,等. 葛根素对乙醇性股骨头坏死的预防作用[J].中华试验外科杂志,2007,24(4):479-481.