

构建双足类大型鸟类鸕鹚股骨头坏死模型

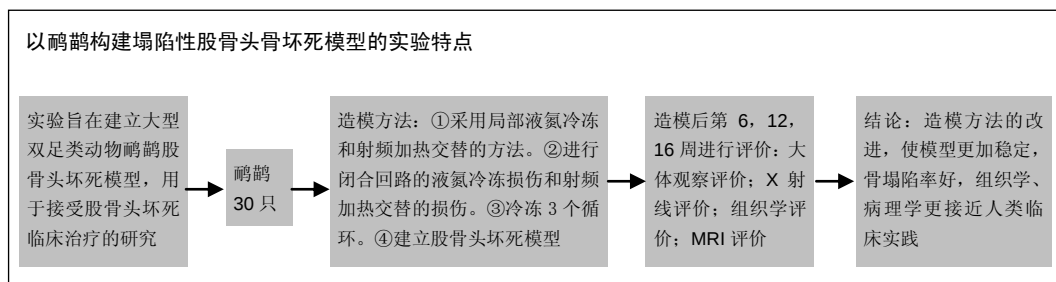
曲春涛(天津市红桥医院, 天津市 300131)

引用本文: 曲春涛. 构建双足类大型鸟类鸕鹚股骨头坏死模型[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(5):611-615.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.05.001

ORCID: 0000-0002-6133-9409(曲春涛)

文章快速阅读:



曲春涛, 男, 1983 年生, 天津市人, 汉族, 2015 年天津医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事关节外科研究。

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)05-00611-05

稿件接受: 2015-12-21

http://www.crter.org

文题释义:

鸕鹚: 学名 *Dromaius novaehollandia*, 是鸟纲鸕鹚科唯一的物种, 以擅长奔跑而著名, 是澳洲地区的特产, 世界上第二大的鸟类, 体型仅次于非洲鸵鸟, 因此也被称作澳洲鸵鸟, 尤加利鸟, 翅膀比非洲鸵鸟和美洲鸵鸟更加退化, 足为 3 趾, 是世界上最古老的鸟种之一。

股骨头坏死动物模型: 理想的动物模型所制造的股骨头骨坏死区域应位于与人类股骨头相同的位置, 接近软骨面、与周围的活骨相连续, 而且要保证股骨头的修复过程中承载正常应力; 其次理想的动物模型应该能够模拟人股骨头坏死的整个病理进程, 即从早期组织学改变到晚期股骨头塌陷。

摘要

背景: 虽然对股骨头坏死动物模型的建立已经进行了许多研究, 然而到目前为止仍难以模拟出理想的股骨头坏死的动物模型, 尤其是股骨头塌陷模型。

目的: 建立双足类大型鸟类动物鸕鹚股骨头坏死模型, 用于更好模拟人类股骨头坏死的治疗研究。

方法: 成年鸕鹚 30 只, 建立液氮冷冻并射频加热交替损伤股骨头坏死模型。冷冻 3 个循环, 采用局部液氮冷冻和射频加热交替的方法, 进行闭合回路的液氮冷冻损伤和射频加热交替的损伤, 造模后第 6, 12, 16 周进行大体观察、X 射线、组织学检查和 MRI 检查, 评价鸕鹚股骨头缺血坏死模型建模效果。

结果与结论: 经过液氮冷热交替法进行造模的鸕鹚于 12-18 周逐步出现股骨头坏死征象和影像学表现, 通过 X 射线, 组织学检查和 MRI 检查可见其股骨头坏死过程符合人类股骨头坏死病变的病理过程, 且模型具有良好的可重复性。结果提示, 采用液氮冷热交替法成功建立了鸕鹚塌陷性股骨头骨坏死模型, 具有较好的塌陷率, 可以用于骨坏死的机制研究和治疗评价。

关键词:

实验动物: 骨软骨损伤与修复动物模型; 鸕鹚; 液氮冷热交替法; 股骨头坏死; 重复性; 动物模型

主题词:

鸕鹚科; 股骨头坏死; 模型; 动物; 组织工程

Establishing a large double-foot bird emu model of femoral head necrosis

Abstract

BACKGROUND: There are many studies on the establishment of animal models of femoral head necrosis, but it is difficult to simulate an ideal animal model of femoral head necrosis, especially collapse models.

OBJECTIVE: To establish femoral head necrosis model of double-foot large bird emu so as to simulate femoral head necrosis in human.

METHODS: A total of 30 adult emus were frozen in liquid nitrogen and received radiofrequency heating alternately to simulate femoral head necrosis models. After 3 cycles of freezing, local frozen in liquid nitrogen and method of radiofrequency heating was alternated for closed loop liquid nitrogen freezing injury and radiofrequency heating injury. At 6, 12 and 16 weeks after model establishment, gross observation, X-ray, histology examination and MRI were conducted. Effects of model induction of avascular necrosis of the femoral head were evaluated.

RESULTS AND CONCLUSION: After liquid nitrogen cold-hot alternating method, emu at 12-18 weeks gradually suffered from femoral head necrosis signs and imaging findings. X-ray films, histological examination and MRI examination showed the avascular necrosis of femoral head was consistent with the pathological process of human femoral head necrosis, and the model had good repeatability. These results indicate that the use of liquid nitrogen cold-hot alternating method has successfully established the model of femoral head necrosis, with a good

Qu Chun-tao (Hongqiao Hospital, Tianjin 300131, China)

Qu Chun-tao, Master, Attending physician, Hongqiao Hospital, Tianjin 300131, China

Subject headings: Dromaiidae; Femur Head Necrosis; Models, Animal; Tissue Engineering

collapse rate, and can be used for mechanism research and treatment evaluation of osteonecrosis.

Cite this article: Qu CT. Establishing a large two-leg bird model of femoral head necrosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2016;20(5):611-615.

0 引言 Introduction

股骨头坏死是骨科临床常见疾病，多见于30-40岁青壮年，发病率逐年升高，其中多数患者都将进展为股骨头塌陷，需要进行人工关节置换手术。保守治疗效果不佳^[1]。目前股骨头坏死的治疗主要分为改善股骨头供血及微循环、诱导骨与软骨再生、促进股骨头坏死修复以及加强或替代软骨下骨的力学效能防止塌陷^[2]。人工关节置换手术早期疗效可靠，但远期仍有松动等情况，需要进行翻修，股骨头坏死的病因及发病机制、治疗方法的选择及其疗效尚存在很大争议^[3]。

建立理想的股骨头坏死动物模型，是了解股骨头坏死病因、发病机制以及治疗方法的重要手段^[4]。虽然对股骨头坏死动物模型的建立已经进行了许多研究，然而到目前为止仍难以模拟出理想的股骨头坏死的动物模型，尤其是塌陷模型^[5]。目前该病治疗手段的进展缓慢，与缺乏一种能够真实模拟人类股骨头缺血性坏死全病程的骨坏死动物模型有一定关系。

近年来，鸕鹚作为一种双足负重，身高、体质量及股骨头受力情况均与人类类似的动物，通过冷冻方法已经实现股骨头的塌陷而受到关注，鸕鹚股骨头的负重集中于顶端，且受力为沿股骨干的方向，均与人类相似，这种双足类动物与四足动物的髋关节生物力学的差异是造成不同股骨头是否塌陷的关键性因素。

本实验利用液氮冷热交替的方法造成组织坏死，利用射频消融装置在鸕鹚身体上进行造模来建立典型的股骨头坏死塌陷模型。实验参考改良式的直接向股骨头打隧道后液氮喷射直接冷冻方法的方法进行造模，这种方法采用临床用于肿瘤冷冻治疗的闭合回路冷冻探针进行冷冻造模，术后每日观察日常饮食及步态，详细记录有无感染迹象及异常死亡等状况。术后第6、12及16周时分别通过核磁共振和CT对3组动物髋关节进行检查，观察骨坏死进展情况至出现股骨头塌陷。根据一中心骨科使用的冷热交替治疗系统，定制对于鸕鹚股骨头缺血性坏死造模的研究所用探针，以期建立较高塌陷率和良好一致的股骨头缺血坏死全病程动物模型。

1 材料和方法 Materials and methods

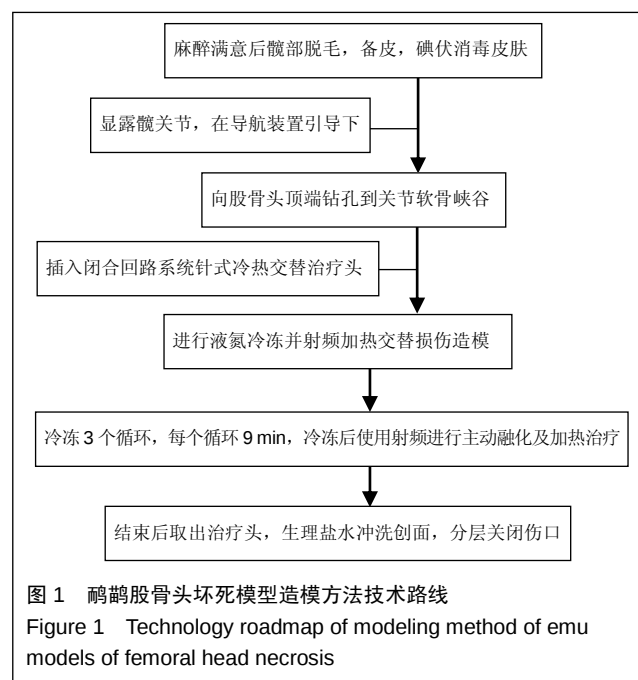
1.1 造模动物及材料 实验于2012年6至10月在西青区红光农场完成。

实验动物：健康成年雄性鸕鹚30只，月龄均大于12个月，体质量(50.0±4.6) kg。

器材：液氮冷冻仪存储及输送系统、射频消融仪、控制、温度采集系统均为上海交通大学研发；西门子3.0 MR、西门子1.5 MR、双源CT、螺旋CT，X光机为天津市

第一中心医院放射科提供，Micro-CT为解放军总医院骨科研究所提供。切片机，高倍显微镜及图像分析系统等为本院移植外科实验室提供。冷热交替治疗头为专为本研究制定，在使用闭合回路液氮冷冻头基础上，同时具有射频发生装置，以实现冷热交替，后端为真空保护段。

1.2 股骨头坏死模型造模方法 技术路线见图1。造模前12 h禁食水，造模前30 min硫酸阿托品1 mg肌肉注射。给予30 mg盐酸氯胺酮和10 mg/kg盐酸噻拉唑联合肌肉注射诱导麻醉，盐酸氯胺酮6 mg/(kg·min)静脉点滴维持麻醉，青霉素80万U肌肉注射预防感染。麻醉满意后髋部脱毛，备皮，碘伏消毒皮肤，铺无菌巾单，以大转子处为中心，给予静脉缓慢注入唑来膦酸5 mg，显露髋关节，在导航装置引导下向股骨头顶端钻孔到关节软骨峡谷，插入闭合回路系统针式冷热交替治疗头，进行液氮冷冻并射频加热交替损伤造模(图2，3)，冷冻3个循环，每个循环9 min，冷冻后使用射频进行主动融化及加热治疗，结束后取出治疗头，生理盐水冲洗创面，分层关闭伤口^[6]，术后自由饮食及活动。



1.3 造模成功的检测标准 经造模后鸕鹚无感染迹象及异常死亡等状况，可正常进食，自主活动。分别经影像学及组织学检测验证。

1.4 分组 30只雄性鸕鹚分成3批，分别于第6、12、16周各处死3至4只并进行观察。

1.5 造模后处理 造模后每日观察日常饮食及步态，详细记录有无感染迹象及异常死亡等状况。造模后第6、12及16周时分别通过核磁共振和CT对3组动物髋关节进行检



图2 鸕鹚造模现场手术过程中
Figure 2 Operation of emu modeling



图4 鸕鹚造模后16周股骨头X射线检查
Figure 4 X-ray film of a emu model at 16 weeks after model establishment

图注：可见股骨头高度变低，透光度不均，骨小梁结构紊乱，形成塌陷。

查，观察骨坏死进展情况至出现股骨头塌陷。最终得到24只股骨头坏死模型。

1.6 主要观察指标

1.6.1 大体形态观察 观察鸕鹚一般情况、伤口情况，大体观察股骨头外形、表面软骨、关节液情况。

1.6.2 X射线片 造模后第6, 12, 16周分批次观察股骨头坏死、修复及塌陷情况。

1.6.3 组织学检查 硝酸脱钙，石蜡包埋，制成5 μm 厚切片，苏木精-伊红染色，光镜下观察。

1.6.4 MRI检查 造模后第6, 12, 16周按照批次进行麻醉后，取半卧位，下肢屈曲，用交代固定，使用Siemens Magnetom Vision 1.5T超导型MRI扫描仪，关节线圈，常规SE序列T1W1(TR、TE=490、14 ms)，T2W1(TR/TE=2 632/96 ms)；矩阵128*256；视野14 cm*14 cm；层厚3 mm，无间隔。T1W1表现为点状、细线状、片状低信号或T2W1表现为点状、细线状、片状高信号可确认为出现股骨头坏死。

2 结果 Results

2.1 造模成功动物数量及过程 实验选用鸕鹚30只，实验过程中2只意外死亡，4只因感染脱失，进入结果分析24只。



图3 液氮冷热交替法制备鸕鹚动物模型
Figure 3 Preparation of eum models by alternating hot and cold liquid nitrogen method

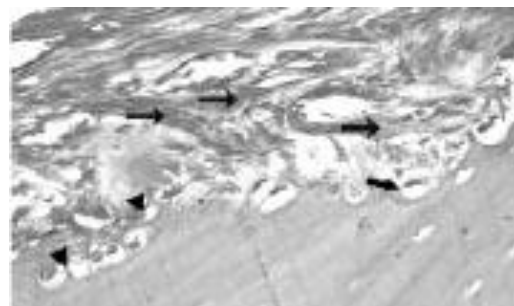


图5 鸕鹚股骨头组织学结果(苏木精-伊红染色, $\times 400$, 箭头指空骨塌陷)
Figure 5 Histological results of the femoral head of emu (hematoxylin-eosin staining, $\times 400$; arrows show empty bone collapse)

图注：骨陷窝内骨细胞填充，骨髓内大量细胞存在；可见塌陷侧空骨陷窝，骨髓纤维化，骨小梁边缘形态不规则。

2.2 模型方法的改进 参考改良式的直接向股骨头打隧道后液氮喷射直接冷冻方法的方法进行造模，这种方法采用临床用于肿瘤冷冻治疗的闭合回路冷冻探针进行冷冻造模，造模后每日观察日常饮食及步态，详细记录有无感染迹象及异常死亡等状况。造模后第6, 12及16周时分别通过核磁共振和CT对3组动物髋关节进行检查，观察骨坏死进展情况致出现股骨头塌陷。根据一中心骨科使用的冷热交替治疗系统，定制鸕鹚股骨头缺血性坏死造模的研究所用探针，以期建立较高塌陷率和良好一致的股骨头缺血坏死全病程动物模型。

2.3 模型稳定性良好 近年来，鸕鹚作为一种双足负重，身高、体质量及股骨头受力情况均与人类类似的动物，通过冷冻方法已经实现股骨头的塌陷而受到关注，鸕鹚股骨头的负重集中于顶端，且受力为沿股骨干的方向，均与人类相似，这种双足类动物与四足动物的髋关节生物力学的差异是造成不同股骨头是否塌陷的关键性因素。实验利用液氮冷热交替的方法造成组织坏死，利用射频消融装置在鸕鹚身体上进行造模来建立典型的股骨头坏死塌陷模型。

2.4 大体形态 术后鸕鹚精神状态良好，切口一期愈合，摄食未见减少，发育速度正常。饲养过程中未见异常死亡，未出现股骨头脱位，6周陆续有鸕鹚开始显现跛

行, 于奔跑状态下出现术后8周跛行加重, 于劳累状态下或正常行走时可见, 跑跳时经常滑倒。至造模后16周单侧发生坏死12只, 双侧发生坏死12只。

2.5 X射线影像学改变 造模后第6周X射线显示鸬鹚股骨头外形尚规则, 软骨下骨密度不均匀, 可见略有增加和减少, 可见软骨下月牙形阴影, 股骨头标本松脆, 易于凿切。造模后12周可见股骨头软骨下轮廓不规整, 骨密度明显增加和减少, 广泛的囊性变形成, 出现硬化区, 股骨头关节面出现皱缩, 承重区略有塌陷。第16周股骨头明显塌陷变形, 高度变低, 透光度不均, 骨小梁结构紊乱, 关节软骨剥脱。见图4。

2.6 组织学结果 组织学显示病理改变与人股骨头早期至晚期病理改变非常一致, 大致表现为软骨下小血管数量明显减少, 血管壁有内膜增生, 中层平滑肌细胞结构紊乱、模糊。大量骨小梁吸收和碎裂, 排列紊乱, 骨细胞死亡, 髓腔内出现纤维肉芽组织, 软骨下髓腔内有新、旧的出血迹象。这些病理变化在造模后6周后就已明显, 并持续到造模后16周, 部分鸬鹚失去了关节面光滑结构, 由于大量的骨小梁吸收而出现软骨下骨折坏死骨小梁间隙有明显纤维肉芽组织增生, 包绕坏死骨小梁, 骨小梁萎缩及紊乱, 缺损区出现致密结蹄组织, 缺损壁硬化骨形成。见图5。

2.7 MRI扫描结果 鸬鹚经造模后于造模后第6周出现股骨广泛水肿现象, 除股骨中段少量水肿外均集中于股骨头。部分鸬鹚股骨头内出现类似双线征表现。第12周开始出现明显股骨头形态改变及关节间隙改变。至16周已有部分鸬鹚出现股骨头塌陷合并半轻度脱位的骨坏死晚期表现。

3 讨论 Discussion

实验通过冷热交替法制作鸬鹚股骨头坏死模型, 经过12-18周引起股骨头坏死, 顺利模拟出与人类病程相似的各种影像学表现, 从股骨头坏死的早期组织学改变到出现髋关节炎性改变甚至髋关节半脱位的晚期表现以及髋关节周围组织信号的不明显改变也显现出良好的骨坏死修复能力。

实验造模方法规范, 为国内外认证的经典方法。人类股骨头塌陷的病理表现多位于软骨下方, 关节负重区, 与坏死模型相一致, 同时也可看到病灶为局限型。鸬鹚作为此次实验的对象, 与人类双足负重类似, 股骨头应力分布与人类髋关节的测量数据相类似^[7]。

股骨头的力学负荷是产生股骨头塌陷的原因, 血管内凝血是股骨头坏死发病过程中的重要因素^[8], 液氮冷热交替法制备鸬鹚股骨头缺血坏死模型引起股骨头内血管痉挛、血管内凝血及血管内皮细胞损伤, 继而出现股骨头内髓腔出血, 复温后血管再通血诱发缺血再灌注损伤, 导致股骨头缺血坏死^[9]。

液氮冷热交替法制备鸬鹚动物模型能够较为全面的反映出人类股骨头坏死演变过程, 可以更加深入的研究股骨头缺血性坏死的发病机制, 为研究提供了可靠的手段。通过实验可以看到这种方法制作的动物模型基本符合实验预期, 冷热交替系统在未来也会有很好的应用前景^[10]。利用冷热交替法建立鸬鹚股骨头缺血坏死模型, 可以实现周围组织无明显损伤的情况下, 建立一致性相对较高的塌陷率和股骨头坏死从早期到晚期的全程模型, 对股骨头坏死的治疗及预防方法的比较建立了良好的基础。虽然鸬鹚体型大, 来源有限, 难易饲养^[11], 一定程度上限制了模型的建立, 但鸬鹚仍然不失为一种新型的具有独特优势的动物模型。

近年来较为成功的股骨头坏死双足类动物模型有很多^[12], 目前尚无一种造模方法可以满足所有需求来完全模拟人股骨头坏死的病理演变过程^[13]。目前缺乏股骨头坏死的动物模型, 这一领域的研究还具有广大的前景。

髋关节是人体重要的负重关节, 其所承受的应力是股骨头坏死病程演变的决定性因素, 也正是因为如此, 双足类动物较四足类动物更能模拟出人得病程演变过程。

目前国内所建立的股骨头坏死动物模型大多使用四足类动物, 尤其是以大白兔、犬、鼠为多见, 尽管可以从四足类动物模型中得到一定的实验依据, 但毕竟四足类动物可以保护性的在不同程度上减轻受累关节的负重, 这就势必难以模仿出承受人体髋关节生物应力的模型^[14]。

很多学者在实验过程中采用组织学病理学进行诊断, 但多采用有创操作, 对股骨头坏死的演变过程造成破坏, 无法顺利模拟出股骨头坏死的病理演变过程, 并不利于模型后续研究^[15]。

如何制备动物模型来模拟人类最复杂的病变-股骨头坏死仍然是一项长期的课题, 随着研究领域的不断拓展, 试验方法的不断演进, 必然能够创造出更加符合人体股骨头坏死病理演变规律的动物模型^[16]。

实验的创新之处在于参考改良式的直接向股骨头打隧道后液氮喷射直接冷冻方法的方法进行造模^[17], 这种方法采用临床用于肿瘤冷冻治疗的闭合回路冷冻探针进行冷冻造模, 根据一中心骨科使用的冷热交替治疗系统, 定制鸬鹚股骨头缺血性坏死造模的研究所用探针, 以期建立较高塌陷率和良好一致的股骨头缺血坏死全病程动物模型^[18]。

鸬鹚作为一种双足负重, 身高、体质量及股骨头受力情况均与人类类似的动物, 通过冷冻方法已经实现股骨头的塌陷而受到关注, 鸬鹚股骨头的负重集中于顶端, 且受力为沿股骨干的方向, 均与人类相似, 这种双足类动物与四足动物的髋关节生物力学的差异是造成不同股骨头是否塌陷的关键性因素^[19]。

实验利用液氮冷热交替的方法造成组织坏死, 利用射频消融装置在鸬鹚身体上进行造模来建立典型的股骨头坏死塌陷模型^[20]。此实验模型具有较强的稳定性, 更接近人

类疾病模式,其构建具有转化医学意义^[21]。

作者贡献: 设计、实施、评估者均为第一作者,盲法评估。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验动物在氯胺酮麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度,文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 马坤,顾建平.股骨头坏死动物模型制作方法的研究进展[J].中国介入影像与治疗学,2009,6(3):286-289.
- [2] Hungerford DS. Osteonecrosis: avoiding total hip arthroplasty. J Arthroplasty. 2013;17(4 Suppl 1):121-124.
- [3] Parsons SJ, Steele N. Osteonecrosis of the femoral head: Part 1- Aetiology, pathogenesis, investigation, classification. Current Orthop.2007;21: 457-463.
- [4] Mont MA, Rajadhyaksha AD, Hungerford DS. Outcomes of limited femoral resurfacing arthroplasty compared with total hip arthroplasty for osteonecrosis of the femoral head.J Arthroplasty.2001;16(8 Suppl 1): 134-139.
- [5] Yuan B, Liu Z. Treatment of osteonecrosis of the femoral head: combination of operation and multiple cellular mediators. Med Hypotheses.2007;68(3): 502-505.
- [6] 范猛,汪爱媛,王玉,等.局部冷热交替损伤建立鹌鹑股骨头坏死塌陷模型[J].中国医学科学院学报,2011,33(4):375-381.
- [7] 姜文学.仿生脉冲电磁场治疗股骨头坏死的实验研究[J].中华骨科杂志,2007,2(5):389-391.
- [8] Varitimidis SE, Dimitroulias AP,Karachalios TS, et al. Outcome after tantalum rod implantation for treatment of femoral head osteonecrosis. ACTA ORTHOPAEDICA. 2009; 80: 20-25.
- [9] Malizos K,Karantanas A,Varitimidis S,et al. Osteonecrosis of the femoral Head. Etiology, imaging and treatment. Eur J Radiol. 2012;63(1):16-28.
- [10] 吕维富,侯昌龙,鲁东,等.采用经导管动脉栓塞术建立猪股骨头缺血性坏死模型[J].中国介入影响与治疗学,2011,8(5): 439-442.
- [11] 严子才.骨髓基质干细胞移植在兔激素性股骨头坏死模型中成骨及成血管作用的评价[D].中国医科大学:影像医学及核医学. 2009.
- [12] 李亮,魏杰,袁家长,等.非创伤性股骨头缺血坏死动脉融通术介入治疗的意义[J].安徽医学, 2015,35(2):181-184.
- [13] Mont MA,Hunberford DS.Non-Traumatic avascular necrosis of the femoral head.Bone Joint Surg(Am). J Bone Joint Surg Am. 1995;77(3):459-474.
- [14] Conzemius MG, Brown TD, Zhang Y, et al. A new animal model of femoral head osteonecrosis: one that progresses to human-like mechanical failure. J Orthop Res.2002; 20: 303-309.
- [15] 李子荣,张念非,岳德坡,等.激素性股骨头坏死动物模型的诱导和观察[J].中华外科杂志,2005,33(8):485-487.
- [16] 刘培林,夏仁云,张士杰.股骨头缺血性坏死造模的实验研究[J].中国矫形外科杂志,2001,9(8):889-891.
- [17] Soucacos PN,Beris AE,Malizos K,et al.Treatment of avascular necrosis of the femoral head with vascularized fibular transplant.Clin Orthop.2001;5(386):120-130.
- [18] 范猛,汪爱媛,王玉,等.局部冷热交替损伤建立鹌鹑股骨头缺血性坏死塌陷模型[J].中国医学科学院学报, 2011,33(4): 375-381.
- [19] Jones JP Jr.Fat embolism,intravascular coagulation,and osteonecrosis.Clin Orthop Relat Res.1993;292:294-308.
- [20] 牛敬才,尚希福,孔荣,等.一种新型的股骨头坏死动物模型[J].中国临床保健杂志, 2006,9(2):137-139.
- [21] Suehiro M,Hirano T,Mihara K,et al.Etiologic factors in femoral head osteonecrosis in growing rats.J Orthop Sci. 2000;5(1): 2-56.