

内热针治疗兔激素性股骨头坏死的机制

马良辰^{1,2}, 田富宝², 徐玉娟², 田心保³, 陶莹², 陈梦莹², 连佳伟², 林瑞珠³, 朱宁³<https://doi.org/10.12307/2024.549>

投稿日期: 2023-09-21

采用日期: 2023-11-01

修回日期: 2023-12-01

在线日期: 2023-12-20

中图分类号:

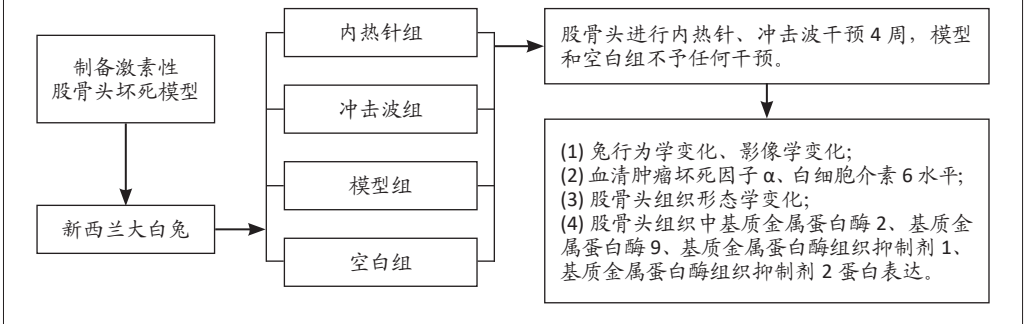
R459.9; R318; R245

文章编号:

2095-4344(2024)27-04353-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 内热针调控骨重塑失衡和炎症反应治疗激素性股骨头坏死



文题释义:

内热针疗法: 是在传统温针灸及银质针基础上, 融入现代软组织外科学的一种创新特色疗法, 通过对针芯内的电热丝进行恒温加热, 能够精确调控治疗温度, 具有抗炎、降低肌肉张力、改善局部血供等作用, 对各种软组织及骨关节疼痛疾病均具有较好的疗效。

基质金属蛋白酶: 是自然界进化中高度保守的一类蛋白酶, 属于锌依赖性内肽酶家族, 参与骨基质降解的同时, 促进破骨细胞的迁移和黏附, 从而介导骨重塑失衡的发生。

摘要

背景: 内热针疗法是将针刺疗法和热疗相结合的新型治疗技术, 对激素性股骨头坏死有很好的临床效果, 但作用机制仍不完全清晰。

目的: 探讨内热针疗法治疗兔激素性股骨头坏死的可能作用机制。

方法: 32只新西兰兔采用随机数字表法分为空白组、模型组、内热针组、冲击波组, 每组8只。模型组、内热针组、冲击波组采用甲泼尼龙琥珀酸钠联合大肠杆菌内毒素造模。内热针组对兔臀部进行内热针干预, 每周1次, 每次20 min; 冲击波组对兔臀部进行冲击波干预, 每周1次, 每次2 000下; 空白组和模型组不给予任何治疗。干预4周后进行实验兔采血及双侧股骨头取材, 采用ELISA法检测血清中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6水平; 苏木精-伊红染色观察各组实验兔股骨头骨组织形态学变化并计算空骨陷窝率; 免疫组织化学染色和蛋白免疫印迹法检测骨组织中基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9、基质金属蛋白酶组织抑制剂1、基质金属蛋白酶组织抑制剂2的蛋白表达。

结果与结论: ①与空白组相比, 造模兔出现摄食减少、精神萎靡、活动减少等表现; 与模型组相比, 内热针及冲击波治疗后实验兔的上述表现均明显改善; ②与空白组相比, 模型组的股骨头组织形态学明显恶化且空骨陷窝率升高($P < 0.001$); 内热针组及冲击波组的股骨头组织形态学较模型组明显改善且空骨陷窝率降低($P < 0.001$); ③与空白组相比, 模型组的血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6水平明显升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 内热针组及冲击波组的血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6水平明显降低($P < 0.05$); ④与空白组相比, 模型组实验兔股骨头组织中基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9蛋白表达水平明显升高($P < 0.001$), 基质金属蛋白酶组织抑制剂1、基质金属蛋白酶组织抑制剂2的蛋白表达水平明显降低($P < 0.001$); 与模型组相比, 内热针组及冲击波组实验兔股骨头组织中基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9蛋白表达水平明显降低($P < 0.001$), 基质金属蛋白酶组织抑制剂1、基质金属蛋白酶组织抑制剂2的蛋白表达水平明显升高($P < 0.001$); ⑤结果表明, 内热针可能通过调控基质金属蛋白酶/基质金属蛋白酶组织抑制剂及血清炎症因子水平, 促进坏死股骨头的修复, 从而达到治疗早期激素性股骨头坏死的目的。

关键词: 激素性股骨头坏死; 内热针; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶组织抑制剂; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素6

Mechanisms underlying internal heat-type acupuncture in the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rabbits

Ma Liangchen^{1,2}, Tian Fubao², Xu Yujuan², Tian Xinbao³, Tao Ying², Chen Mengying², Lian Jiawei², Lin Ruizhu³, Zhu Ning³

¹Department of Geriatric and Special Need Medicine, ²Department of Rehabilitation Medicine, Ningxia Medical University General Hospital, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ³Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Ma Liangchen, Master candidate, Attending physician, Department of Geriatric and Special Need Medicine, Ningxia Medical University General Hospital, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhu Ning, Master, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Rehabilitation Medicine, Ningxia Medical University General Hospital, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

宁夏医科大学总医院, ¹老年与特需医学科, ²康复医学科, 宁夏回族自治区银川市 750004; ³宁夏医科大学, 宁夏回族自治区银川市 750004

第一作者: 马良辰, 女, 1990年生, 宁夏回族自治区银川市人, 汉族, 宁夏医科大学在读硕士, 主治医师, 主要从事肌内骨路疾患康复研究。

通讯作者: 朱宁, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 宁夏医科大学总医院康复医学科, 宁夏回族自治区银川市 750004

<https://orcid.org/0009-0006-4698-4879>(马良辰)

基金资助: 国家自然科学基金地区科学基金项目(81760904), 项目负责人: 朱宁; 宁夏医科大学总医院“国家自然科学基金项目孵育计划”, 项目负责人: 朱宁; 国家自然科学基金地区科学基金项目(82360987), 项目负责人: 林瑞珠

引用本文: 马良辰, 田富宝, 徐玉娟, 田心保, 陶莹, 陈梦莹, 连佳伟, 林瑞珠, 朱宁. 内热针治疗兔激素性股骨头坏死的机制

[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(27):4353-4359.



Abstract

BACKGROUND: Internal heat-type acupuncture therapy is a new treatment technique that combines acupuncture therapy with hyperthermia. It has good clinical effects on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, but the mechanism of action is still not fully clear.

OBJECTIVE: To explore the possible mechanism of internal heat-type acupuncture therapy in treating steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rabbits.

METHODS: Thirty-two New Zealand rabbits were randomly divided into blank group, model group, internal heat-type acupuncture group and shock wave group using a random number table method, with 8 rabbits in each group. The model group, internal heat-type acupuncture group and shock wave group were modeled using methylprednisolone sodium succinate combined with *Escherichia coli* endotoxin. The internal heat-type acupuncture group received an internal heat-type acupuncture intervention on the buttocks of rabbits, once a week, for 20 minutes each time. The shock wave group received shock wave intervention on the buttocks of rabbits, once a week, with 2 000 beats per session. The blank group and model group were not given any treatment. After 4 weeks of intervention, blood samples and bilateral femoral head samples were collected from experimental rabbits. The levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in serum were detected by ELISA; the histomorphology of the femoral head was observed using hematoxylin-eosin staining and the rate of empty lacunae was calculated; the protein expressions of matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, matrix metalloproteinase tissue inhibitor 1, and matrix metalloproteinase tissue inhibitor 2 were detected by immunohistochemistry and western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the blank group, the model rabbits showed reduced food intake, mental fatigue, and decreased activity; compared with the model group, the above performance of the experimental rabbits was significantly improved after internal heat-type acupuncture and shock wave treatment. Compared with the blank group, the histomorphology of the femoral head in the model group deteriorated significantly and the rate of empty bone lacuna increased ($P < 0.001$), while the histomorphology of the femoral head in the internal heat-type acupuncture group and shock wave group was significantly improved compared with the model group, and the rate of empty bone lacuna was reduced ($P < 0.001$). The serum levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in the model group were significantly higher than those in the blank group ($P < 0.05$), while the serum levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in the internal heat-type acupuncture group and the shock wave group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the expression levels of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 in the femoral head of the model group were significantly increased, while the expression levels of matrix metalloproteinase tissue inhibitor 1 and matrix metalloproteinase tissue inhibitor 2 were significantly decreased ($P < 0.001$); compared with the model group, the protein expression levels of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 were significantly decreased, while the protein expression levels of matrix metalloproteinase tissue inhibitor 1 and matrix metalloproteinase tissue inhibitor 2 were significantly increased in the internal heat-type acupuncture group and the shock wave group ($P < 0.001$). Overall, these findings indicate that internal heat-type acupuncture may promote the repair of the necrotic femoral head by regulating the levels of matrix metalloproteinases/matrix metalloproteinase tissue inhibitors and serum inflammatory factors, thus treating early steroid-induced osteonecrosis of the femoral head.

Key words: steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; internal heat-type acupuncture; matrix metalloproteinase; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81760904 (to ZN); Incubation Program of National Natural Science Foundation of Ningxia Medical University General Hospital (to ZN); the National Natural Science Foundation of China (Regional Program), No. 82360987 (to LRZ)

How to cite this article: MA LC, TIAN FB, XU YJ, TIAN XB, TAO Y, CHEN MY, LIAN JW, LIN RZ, ZHU N. Mechanisms underlying internal heat-type acupuncture in the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rabbits. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(27):4353-4359.

0 引言 Introduction

激素性股骨头坏死是一种致残性骨科疾病，是因激素类药物长期使用，减少了骨细胞及股骨头的血供，导致股骨头骨组织缺血坏死、结构改变，从而引起股骨头塌陷、髋关节疼痛及功能障碍^[1-2]。激素性股骨头坏死的致残率较高，且主要累及中青年人群，给患者、家庭乃至社会带来了严重的经济负担^[3-4]。因此，对激素性股骨头坏死发病机制及防治措施的研究具有必要性和迫切性。

尽管临床糖皮质激素的使用与激素性股骨头坏死的发生密切相关，但确切的机制仍不清楚^[5]。研究发现，细胞外基质中的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 及其特异性抑制因子基质金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMP) 以及炎性因子与激素性股骨头坏死的发生密切相关^[6-7]。在激素性股骨头坏死的病理过程中，糖皮质激素能够促进 MMP-2 和 MMP-9 的表达，抑制 TIMP-1、TIMP-2 的表达，即出现 MMPs/TIMPs 失衡并释放大量的炎性因子，使破骨细胞生成增加、活性增强，从而加速骨细胞的凋亡以及骨基质的降解，致使骨吸收增加，导致骨小梁变细、疏松、萎缩甚至断裂，最终导致激素性股骨头坏死的发生^[8]。其中，MMP-2 和 MMP-9 大量表达于破骨细胞，在骨吸收过程中被认为是对降解骨基质有机物成分起主要作用的蛋白酶^[9]，而 TIMPs 是针对 MMPs 的天然内生抑制剂^[10]；其次，炎性因子肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 6 能够刺激破骨细胞生成与活化、抑制成骨细胞活性，从而影响骨代谢和骨平衡^[11-12]。

目前，针对激素性股骨头坏死的治疗方式包括体外冲击波、药物等传统治疗方法。其中，冲击波疗法作为指南推荐的治疗方法，可有效改善早中期股骨头坏死患者的临床症状，归因其镇痛、修复损伤组织等作用原理^[13]，但最佳剂量尚未得到科学验证^[14]。因此该研究将冲击波疗法设置为对照治疗组，在验证其治疗股骨头坏死有效的同时，探讨内热针治疗方法的疗效及部分作用机制。

近年来，已有的动物实验发现温针灸和电针可有效调控 MMPs/TIMPs、肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 6 的表达，进而发挥维持骨稳态的作用^[15-16]。而内热针疗法是一种以现代软组织外科学为基础，将针刺疗法和热疗有机结合的新型治疗方法，能够抑制痉挛变性肌肉的肌张力和无菌性炎症，改善局部血液循环，对激素性股骨头坏死有较好的临床治疗效果^[17-18]，但其具体作用机制尚不完全清楚。团队前期的动物实验表明，内热针对激素性股骨头坏死动物模型有确切治疗效果^[19]。该研究观察内热针对兔激素性股骨头坏死模型骨组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 蛋白表达及血清中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 水平的影响，探讨内热针治疗激素性股骨头坏死的部分作用机制，为激素性股骨头坏死的临床治疗提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 10 月至 2023 年 7 月在宁夏医科大学动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物及分组 6月龄健康清洁级新西兰雄性兔32只, 体质量为(2.5±0.5) kg, 全部购自西安交通大学医学院动物实验中心, 生产许可证号: SCXK(陕)2022-01。饲养于宁夏医科大学动物实验中心, 饲养过程中单笼饲养, 允许实验兔自由摄取饲料及饮用水, 光照条件为昼夜交替(12 h/12 h), 实验室温度维持在20–24 °C, 设定湿度为(50±15)%。所有实验兔适应性喂养1周后检查健康状况无异常, 采用随机数字表法分为4组, 即空白组、模型组、内热针组及冲击波组, 每组8只, 除空白组外, 其余实验兔制备激素性股骨头坏死兔模型。

该实验经宁夏医科大学总医院伦理委员会批准(批准号: KYLL-2023-0170)。

1.3.2 主要试剂和仪器 注射用甲泼尼松龙琥珀酸钠(福安药业集团湖北人民制药有限公司, 批号: 600-10); 大肠杆菌内毒素(Sigma, 批号: 0000174045); 注射用青霉素钠[石药集团中诺药业(石家庄)有限公司, 批号: 1000-50]; MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 抗兔多克隆抗体(ABclonal, 批号分别为: A11144、A2095、A1389、A1558); 二抗山羊抗兔(Servicebio, 批号: GB23303); BCA蛋白定量检测试剂盒(Servicebio, 批号: G2026); 苏木精与伊红染色液(Servicebio, 批号: G1003); 10%EDTA脱钙液(Servicebio, 批号: G1105); PBS(上海道鹏, 批号: 2242276); 40 g/L多聚甲醛(北京雷根生物技术有限公司, 批号: 0706A23); 2%戊巴比妥钠溶液(银川市伟博鑫生物科技有限公司); RM2235型石蜡切片机(Leica公司, 德国); BX51型显微镜(Olympus公司, 日本); 凝胶成像系统(ABI, 美国); 内热针(直径为0.5 mm, 针总长100 mm, 针体长65 mm, 针柄长35 mm, 针柄直径2.2 mm); 内热针治疗仪(济宁市佳科医疗科技有限公司); 冲击波治疗仪(SONOTHERA型, 韩国)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验模型建立 实验兔适应性喂养7 d后, 采用激素联合大肠杆菌内毒素的造模方法, 对内热针组、冲击波组和模型组共24只实验兔进行造模。首先耳缘静脉注射大肠杆菌内毒素(10 μg/kg)2次, 每次间隔24 h, 第2次注射大肠杆菌内毒素后, 立即肌肉注射甲泼尼松琥珀酸钠(右臀)20 mg/kg, 每间隔24 h注射1次, 共注射3次, 每周2次右侧臀肌注射青霉素40万U/只, 以预防感染^[20]。空白组8只实验兔注射等量生理盐水。造模4周后每组各麻醉处死1只兔, 进行组织形态学及影像学检查鉴定模型。

若出现以下2个方面的变化即可视为造模成功: ①组织形态学^[21]: 骨小梁内空骨陷窝增多, 呈弥漫性, 骨细胞出现核固缩, 骨小梁周围组织可见骨髓细胞坏死, 脂肪细胞肥大; ②影像学^[22]: 关节软骨下出现硬化区, 伴或不伴有关节面塌陷。

1.4.2 内热针及冲击波治疗方法 造模4周后进行治疗干预。

①内热针组: 参考文献[20]进行内热针进针布点, 主要在髌

组织工程实验动物造模过程中的相关问题:

造模目的 探究内热针疗法对兔激素性股骨头坏死模型股骨头组织 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 蛋白表达及血清中肿瘤坏死因子α、白细胞介素6水平的影响, 及其可能作用机制

借鉴已有标准 参照文献[20]的方法建立兔激素性股骨头坏死模型
施动物造模

动物来源及品系 清洁级新西兰兔购自西安交通大学医学院动物实验中心

造模技术描述 耳缘静脉注射大肠杆菌内毒素10 μg/kg, 24 h后重复给药1次, 在第2次注射大肠杆菌内毒素后, 立即右臀肌注射甲泼尼松琥珀酸钠20 mg/kg, 共3次, 每次间隔24 h, 每周2次右臀肌注射青霉素40万U/只, 以预防感染

动物数量级分组 32只新西兰兔分为空白组、模型组、内热针组、冲击波组, 每组8只
方法

造模后实验观察 ①实验兔行为学变化; ②实验兔影像学变化; ③股骨头骨组织形态学变化; ④股骨头骨组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 的蛋白表达; ⑤血清中肿瘤坏死因子α、白细胞介素6水平
指标

造模后动物处理 干预4周后进行行为学评价及影像学检查, 之后腹主动脉采血, 然后麻醉处死各组实验兔, 取双侧股骨头骨组织, 进行相关指标检测

伦理委员会批准 动物实验方案通过宁夏医科大学总医院医学科伦理审查委员会批准(批准号: KYLL-2023-0170)

关节的关节囊体表投影扇形区域的“内弧”及“外弧”均匀间隔2 cm交错布点, 共布2排。扇形的“内弧”: 两端为大转子的前后缘中点(相当于转子间线、转子间嵴的中点), 最凸处为大转子尖; 扇形的“外弧”: 与“内弧”平行, 经过髁后上棘与大转子间连线的中外1/3交点, 前端在转子间线中点与髁前上棘连线上, 后端在转子间嵴中点与髁管裂孔连线上。在“内弧”距中点1 cm布2点, 在“外弧”中点及距中点2 cm左右两侧各布1点, 共计5点, 见图1A。以标记点为中心进行常规消毒后进针, 进针深度达骨膜为止。进针结束后将内热针导线接头与每根针末端连接, 加热温度42 °C, 治疗20 min, 每周1次, 共干预4周。②冲击波组: 将实验兔股骨头区剃毛, 涂抹耦合剂, 进行冲击波治疗, 冲击波能流密度0.22 mJ/mm², 每次2 000下, 每周1次, 干预4周^[23], 见图1B。③空白组及模型组实验兔不予干预。4周后对实验兔进行行为学评价及影像学检查并麻醉处死各组实验兔进行取材。

1.4.3 取材方法 使用2%戊巴比妥钠对实验兔进行麻醉(2 mL/kg), 麻醉效果满意后, 以实验专用固定器固定实验兔后, 经腹主动脉采血, 采血过程严格无菌操作, 每只兔采血2 mL, 于室温下静置30 min后, 以3 000 r/min离心15 min, 将上清液吸取于已标记好的EP管中, 放于-80 °C冰箱保存用于后续ELISA检测。取出双侧股骨头并去除骨组织周围的肌肉和韧带, 先行大体观察并记录, 然后用PBS冲洗, 将左侧股骨头放入40 g/L多聚甲醛溶液中固定48 h, 10%EDTA脱钙4周, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 常规切片, 进行苏木精-伊红染色以及免疫组织化学染色。将右侧股骨头液氮冻存, 然后置于-80 °C冷冻冰箱中用于Western blot检测。

1.4.4 行为学评价 观察各组实验兔的精神状态、进食情况、活动情况等方面的变化。

1.4.5 形态学观察 取石蜡包埋块，切片 4 μm，脱蜡后，常规苏木精-伊红染色，光镜下观察股骨头骨组织结构改变情况。计算空骨陷窝率：每张切片在 ×200 倍镜下随机选 3 个不重复区域，计数每个区域 50 个骨陷窝中的空骨陷窝数目，由此计算空骨陷窝率：空骨陷窝率 = 空骨陷窝数 / 50 × 100%。测定 3 个区域空骨陷窝率，取平均值。

1.4.6 影像学评估 在造模后及干预后，各组实验兔取仰卧位固定，用 X 射线机拍摄实验兔双侧股骨头 X 射线片，观察股骨头影像学变化。

1.4.7 ELISA 检测 将在 -80 °C 冰箱保存的实验兔血清取出，遵循 ELISA 试剂盒说明书步骤测定肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 水平。每组重复检测 3 次，使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度值，绘制标准曲线，计算各组样品相应因子浓度水平。

1.4.8 免疫组织化学染色 取已烘干的各组实验兔的股骨头骨组织标本切片，进行脱蜡、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、加一抗 (MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 一抗) 及山羊抗兔二抗，进行 DAB 显色、复染细胞核等处理，显微镜下观察染黄色或棕黄色为阳性，用 Image-Pro Plus 6.0 软件定量测定 3 个随机视野中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 蛋白的阳性染色面积，采用积分吸光度值对以上蛋白进行定量分析。

1.4.9 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测 将实验兔股骨头骨组织从 -80 °C 冰箱取出，经研磨机离心处理后，首先用 PBS 冲洗细胞两三次，最后一次清洗完，倒掉 PBS，加入适当体积的裂解液，经离心后收集股骨头骨组织总蛋白，测量蛋白浓度，制备分离胶和浓缩胶后上样，经过电泳及转膜后，加入 5% 的牛奶，放置脱色摇床上，室温下封闭 30 min，分别加入 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2、GAPDH 一抗 (1 : 500)，4 °C 孵育摇床过夜 (摇床慢摇)，TBS-T 洗涤 3 次，将山羊抗兔二抗按照 1 : 5 000 进行稀释，与膜共同在室温下孵育 30 min，然后 ECL 显影、定影、洗片、凝胶、成像。采用 AIWBwell™ 分析软件得出蛋白条带的灰度值，以 GAPDH 为内参蛋白，以目标蛋白与内参蛋白的灰度比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.5 主要观察指标 ①各组兔的行为学表现；②各组兔双侧股骨头的影像学变化；③各组兔血清肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 水平；④各组兔股骨头骨组织病理学变化；⑤各组兔股骨头骨组织 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 及 TIMP-2 的蛋白表达。

1.6 统计学分析 数据经 SPSS 26.0 统计学软件进行分析。计量资料在统计分析前进行正态性及方差齐性检验，若为正态性分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间的差异采用单因素方差分析，组间两两比较用 LSD 检验；若数据不符合正态性分布，即采用秩和检验对数据进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义， $P < 0.001$ 为差异有非常显著性意义。文章统计学方法已经宁夏医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 此次实验使用 32 只新西兰兔，实验过程中实验兔无意外死亡，全部进入结果分析。

2.2 激素性股骨头坏死兔模型的建立 使用糖皮质激素联合大肠杆菌内毒素的造模方法建立激素性股骨头坏死兔模型后，将空白组及模型组的 2 只实验兔通过 X 射线片检查进行影像学评估，见图 2A, B。与空白组比较，模型组股骨头上出现弧形硬化带，边缘相对模糊，股骨头周围骨质密度减低；每组各麻醉处死 1 只实验兔，取股骨头标本，常规苏木精-伊红染色进行组织病理学检查，见图 2C, D，模型组骨小梁变细、疏松，部分骨小梁可见断裂，骨小梁中空骨陷窝呈弥漫性，空骨陷窝率增多，同时可见骨细胞减少，骨髓脂肪细胞肥大，部分脂肪细胞融合成泡状物等异常。

2.3 各组实验兔干预前后一般状态 与空白组相比，造模兔出现摄食减少、精神萎靡、活动减少等表现；与模型组相比，内热针及冲击波治疗后实验兔的上述表现均明显改善。

2.4 各组实验兔影像学改变 X 射线片检查结果显示，与空白组相比，模型组股骨头出现弧形硬化带，边缘相对模糊，股骨头周围骨组织透光度增加，见图 3A, B；经内热针及冲击波干预后，实验兔股骨头未见明显弧形硬化带，股骨头周围骨组织透光度减低，见图 3C, D。

2.5 各组实验兔血清肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 6 水平与空白组相比，模型组实验兔血清肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 6 水平明显升高，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)；与模型组相比，内热针组及冲击波组实验兔血清肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 水平明显降低，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 | 各组实验兔血清肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, pg/mL)

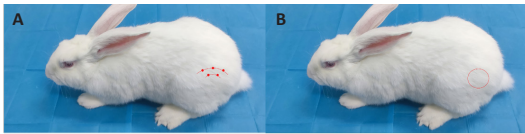
Table 1 | Comparison of serum tumor necrosis factor-α and interleukin-6 levels in experimental rabbits

| 组别 | 肿瘤坏死因子 α | 白细胞介素 6 |
|------|----------------------------|---------------------------|
| 空白组 | 542.99±69.00 | 106.18±31.22 |
| 模型组 | 909.84±103.08 ^a | 161.84±5.13 ^a |
| 冲击波组 | 535.06±228.65 ^b | 88.13±25.04 ^b |
| 内热针组 | 576.13±109.06 ^b | 111.91±30.64 ^b |

表注：与空白组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ 。

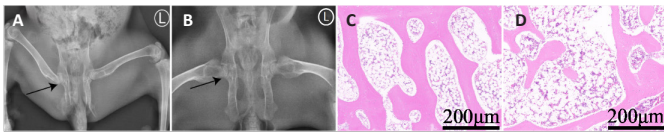
2.6 各组实验兔股骨头骨组织病理学改变 空白组兔骨小梁饱满，排列整齐致密，骨小梁间骨髓细胞丰富，脂肪细胞少、形态正常，骨小梁内骨细胞丰富，散在空骨陷窝，空骨陷窝率低；与空白组相比，模型组兔骨小梁稀疏变细，可见骨小梁断裂，骨髓脂肪细胞肥大、部分融合成囊状，骨小梁中骨细胞减少，空骨陷窝率显著升高 ($P < 0.001$)；与模型组相比，内热针组及冲击波组兔骨小梁排列相对致密规则，骨髓腔内骨髓细胞丰富，脂肪细胞无明显肥大，空骨陷窝率明显降低 ($P < 0.001$)，见图 4。

2.7 各组实验兔股骨头骨组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 及 TIMP-2 的蛋白表达 免疫组织化学染色结果显示，与空白



图注：图 A 为内热针布点示意图；B 为冲击波布点示意图。
图 1 | 实验兔布点位置示意图

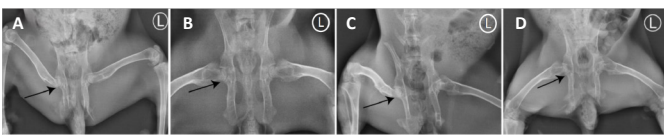
Figure 1 | Schematic diagram of the location of predetermined points on the experimental rabbit



图注：图 A, B 为空白组、模型组 X 射线片，黑色箭头所指为病变部位；C, D 为空白组、模型组股骨头苏木精 - 伊红染色 ($\times 200$)。

图 2 | 影像学 X 射线片检查及苏木精 - 伊红染色证实激素性股骨头缺血性坏死造模成功

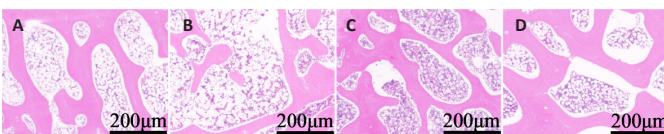
Figure 2 | Successful modeling of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head confirmed by imaging radiographs and hematoxylin-eosin staining



图注：图 A-D 分别为空白组、模型组、冲击波组、内热针组，黑色箭头所指为病变部位。

图 3 | 各组兔股骨头 X 射线片比较

Figure 3 | X-ray observation of the femoral head in rabbits



图注：图 A-D 分别为空白组、模型组、冲击波组、内热针组股骨头骨组织形态学 (苏木精 - 伊红染色, $\times 200$)；E 为各组骨组织空骨陷窝率。与空白组相比, $^a P < 0.001$ ；与模型组相比, $^b P < 0.001$ 。

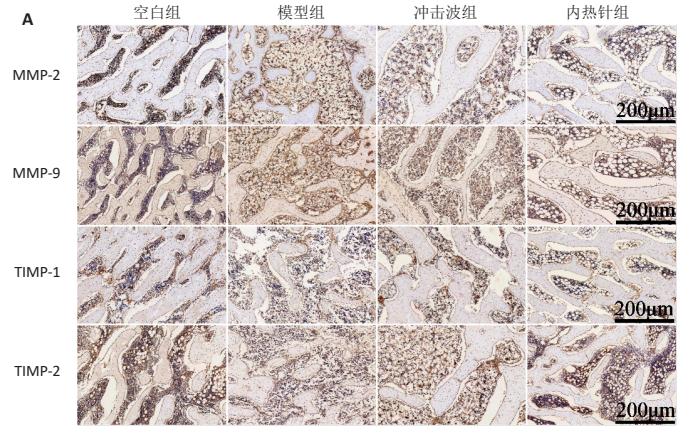
图 4 | 各组兔股骨头骨组织形态学及空骨陷窝率

Figure 4 | Histomorphological detection and the rate of empty lacunae in rabbits

组相比, 模型组兔股骨头组织中 MMP-2、MMP-9 阳性细胞较多, TIMP-1、TIMP-2 阳性染色较少; 经内热针及冲击波治疗后, 这一趋势则完全相反。Western blot 结果显示, 与空白组相比, 模型组股骨头骨组织中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显升高 ($P < 0.001$), TIMP-1、TIMP-2 的蛋白表达明显降低 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 内热针组及冲击波组股骨头骨组织中 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达明显降低 ($P < 0.001$), 而 TIMP-1、TIMP-2 的蛋白表达明显升高 ($P < 0.001$), 见图 5, 6。

3 讨论 Discussion

股骨头坏死的特征是骨髓和骨细胞死亡, 该病可能导致髋关节逐渐破坏。股骨头坏死可分为创伤性股骨头坏死和非创伤性股骨头坏死, 而非创伤性股骨头坏死是主要类型^[24]。激素性股骨头坏死是由于糖皮质激素的大量使用而引起的,



图注：图 A 为各组兔股骨头骨组织免疫组织化学染色 ($\times 200$)；B-E 分别为股骨头骨组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 及 TIMP-2 的蛋白相对表达量。与空白组相比, $^a P < 0.001$ ；与模型组相比, $^b P < 0.001$ 。MMP: 基质金属蛋白酶; TIMP: 基质金属蛋白酶组织抑制剂。

图 5 | 各组兔股骨头骨组织免疫组织化学染色及定量分析

Figure 5 | Immunohistochemical staining and quantitative analysis of rabbit femoral head tissue

Figure 5 | Immunohistochemical staining and quantitative analysis of rabbit femoral head tissue

Figure 5 | Immunohistochemical staining and quantitative analysis of rabbit femoral head tissue



图注：图 A 为 Western blot 检测电泳图；B 为蛋白的相对表达量分析。与空白组相比, $^a P < 0.001$ ；与模型组相比, $^b P < 0.001$ 。MMP: 基质金属蛋白酶; TIMP: 基质金属蛋白酶组织抑制剂。

图 6 | Western blot 检测各组兔股骨头骨组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 及 TIMP-2 的蛋白相对表达量

Figure 6 | Western blot detection of the relative protein expressions of matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, matrix metalloproteinase tissue inhibitor 1, and matrix metalloproteinase tissue inhibitor 2 in rabbit femoral head tissue

Figure 6 | Western blot detection of the relative protein expressions of matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, matrix metalloproteinase tissue inhibitor 1, and matrix metalloproteinase tissue inhibitor 2 in rabbit femoral head tissue

Figure 6 | Western blot detection of the relative protein expressions of matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, matrix metalloproteinase tissue inhibitor 1, and matrix metalloproteinase tissue inhibitor 2 in rabbit femoral head tissue

其发病率占非创伤性股骨头坏死的首位^[25]。

当前, 激素性股骨头坏死的病因及发病机制仍不完全清楚, 对于该疾病的治疗, 尤其是早期激素性股骨头坏死的治疗方法各有利弊^[26]。内热针是一种在传统银质针基础上发展而来的新型非药物治疗方式^[27], 具有消除炎症反应、松解肌肉痉挛、增加局部血液供应等作用^[28], 对各种软组织及骨关节疼痛疾病都具有较好的疗效^[17], 对激素性

股骨头坏死亦有很好的临床效果。近期有研究表明,内热针治疗早期股骨头坏死,可缓解患者疼痛、改善功能障碍并提高患者生活质量^[18, 29],但对其作用机制的认识还较缺乏。团队前期研究发现内热针通过调控 MMP 介导异常骨重塑,从而改善骨结构和功能^[30]。另有研究发现,内热针可降低第三腰椎横突综合征大鼠血清的炎症因子水平^[31]。基于上述研究,该实验进一步探讨了内热针对激素性股骨头坏死的可能作用机制。

此次研究采用甲泼尼龙琥珀酸钠联合大肠杆菌内毒素对实验兔进行造模,经苏木精-伊红染色及影像学 X 射线片检查证实模型制备成功。造模成功后,观察内热针及冲击波对激素性股骨头坏死的治疗作用,发现治疗组实验兔较模型组摄食增多、精神好转、活动增多。治疗组实验兔 X 射线片检查显示股骨头未见明显弧形硬化带;组织学结果也显示病理改变明显改善。以上结果提示,内热针疗法及冲击波治疗对实验兔激素性股骨头坏死有确切的治疗效果。

糖皮质激素的长期使用将增强破骨细胞活性,促使成骨细胞和骨细胞凋亡或坏死,骨平衡被打破,导致骨重塑失衡,股骨头内骨小梁受到破坏造成骨折,最终发生股骨头坏死^[32]。MMPs 能够促使破骨细胞的迁移和黏附,同时能够直接参与骨基质降解,促进骨重塑失衡的发生^[33]。其中 MMP-2 和 MMP-9 在骨重塑过程中发挥重要作用^[34]。TIMPs 可以抑制 MMPs 酶原的活化,通过与 MMPs 特异性结合来延迟进一步的生理进展^[35]。赵红星等^[7]研究表明,糖皮质激素可以使大鼠股骨头骨组织中 MMPs 表达升高, TIMPs 表达降低,从而上调破骨细胞的活性,使成骨细胞的分化受到抑制,加快骨基质的降解,最终引起股骨头坏死的发生。王建忠等^[36]研究发现,激素性股骨头坏死患者股骨头骨组织中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达增高, TIMP-1、TIMP-2 蛋白表达降低,同样提示激素性股骨头坏死的发生可能与长期使用糖皮质激素所致的 MMPs/TIMPs 系统改变相关。该研究发现模型组实验兔股骨头组织中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平明显升高, TIMP-1、TIMP-2 蛋白表达水平明显降低。内热针组及冲击波组实验兔上述趋势则相反。这表明 MMPs/TIMPs 参与激素性股骨头坏死的发生,且内热针治疗激素性股骨头坏死的部分机制可能与改变 MMPs/TIMPs 有关。

另有研究发现,炎症因子在激素性股骨头坏死骨重塑失衡过程中亦发挥重要作用,其中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 的作用尤为显著^[37]。肿瘤坏死因子 α 使股骨头局部发生炎症反应以及骨细胞的坏死,导致破骨细胞活性增强,并抑制成骨细胞生成,使骨细胞代谢失衡,加重股骨头的坏死^[38]。此外,高水平的肿瘤坏死因子 α 可以促进白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 等促炎因子的释放,使局部炎症反应进一步增加^[39]。而白细胞介素 6 是一种炎症因子,同时也是重要的破骨细胞调节因子之一,能促进破骨细胞的生成并抑制成骨细胞的活性和功能^[40]。同时,白细胞介素 6 还可以通过影响 MMPs/TIMPs 系统来调节骨代谢^[41]。杨国柱等^[42]在动物

实验中研究发现,激素性股骨头坏死模型大鼠关节液中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 水平明显升高,予以治疗后上述炎症因子水平明显降低,表明肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 在激素性股骨头坏死的发生机制中发挥重要作用。在该研究中,模型组兔血清肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 6 水平明显升高,内热针组及冲击波组兔血清肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 6 水平明显降低,同样提示激素性股骨头坏死的发生可能与肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 有关,且内热针可能通过下调肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 水平抑制炎症反应、改善骨重塑失衡,从而达到治疗激素性股骨头坏死的目的。

此外,该研究对比了内热针疗法与指南推荐的冲击波治疗的效果,结果显示内热针组与冲击波组之间不具有显著性差异,说明两种治疗方式对于激素性股骨头坏死模型的作用相当,因此,内热针疗法是治疗早期激素性股骨头坏死的重要方式之一。

综上所述,内热针疗法通过改善 MMPs/TIMPs 失衡及下调血清炎症因子水平,达到治疗早期激素性股骨头坏死的目的,同时也为内热针在临床上应用于激素性股骨头坏死的治疗提供了实验依据。

作者贡献: 朱宁、林瑞珠负责实验设计,田富宝负责实验造模,徐玉娟、陶莹、陈梦莹、连佳伟负责实验实施,马良辰负责实验实施和论文撰写,田心保负责实验数据分析处理。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] HUANG C, WEN Z, NIU J, et al. Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head: Novel Insight Into the Roles of Bone Endothelial Cells in Pathogenesis and Treatment. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:777697.
- [2] FANG S, LI Y, CHEN P. Osteogenic effect of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *Drug Des Devel Ther.* 2018;13:45-55.
- [3] LIU Q, WU Y, LI S, et al. Ursolic acid alleviates steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in mouse by inhibiting apoptosis and rescuing osteogenic differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2023;475: 116649.
- [4] REN GW, WEN SB, HAN J, et al. Network-Based Pharmacology and Bioinformatics Study on the Mechanism of Action of Gujiansan in the Treatment of Steroid-Induced Avascular Necrosis of the Femoral Head. *Biomed Res Int.* 2022;2022:8080679.
- [5] LI H, ZHANG Y, HAO Y, et al. Proanthocyanidins Inhibit Osteoblast Apoptosis via the PI3K/AKT/Bcl-xL Pathway in the Treatment of Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in Rats. *Nutrients.* 2023; 15(8):1936.

- [6] 朱道宇, 杨前昊, 高悠水, 等. TLR4 通路及激素性股骨头坏死关系的研究进展 [J]. 中国骨与关节杂志, 2019,8(1):75-79.
- [7] 赵红星, 黄媛霞, 徐海斌, 等. 股骨头坏死早期大鼠股骨头骨组织中基质金属蛋白酶及其相关抑制剂的表达 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2017,38(2):231-234.
- [8] 王建忠, 王坤正, 周荣兴, 等. 长期应用糖皮质激素对大鼠股骨头骨组织骨保护素 /NF- κ B 受体活化因子配基 - 基质金属蛋白酶 / 基质金属蛋白酶组织抑制剂系统的影响 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2011,25(4):402-407.
- [9] MESZAROS E, MALEMUD CJ. Prospects for treating osteoarthritis: enzyme-protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity. *Ther Adv Chronic Dis.* 2012;3(5):219-229.
- [10] DE ALMEIDA LGN, THODE H, ESLAMBOLCHI Y, et al. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2022;74(3):712-768.
- [11] 李涛, 江蓉星, 王敏, 等. 活血通络汤在家兔激素性股骨头坏死模型中对 AKP、BGP、TNF- α 影响的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(3):641-644.
- [12] TAKEUCHI T, YOSHIDA H, TANAKA S. Role of interleukin-6 in bone destruction and bone repair in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2021;20(9):102884.
- [13] 邢更彦, 张浩冲, 刘水涛, 等. 中国骨肌疾病体外冲击波疗法指南 (2019 年版) [J]. 中国医学前沿杂志 (电子版), 2019,11(4):1-10.
- [14] WANG CJ, HUANG CC, YIP HK, et al. Dosage effects of extracorporeal shockwave therapy in early hip necrosis. *Int J Surg.* 2016;35:179-186.
- [15] 张艳玲, 刘君伟, 李春, 等. 基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨温针灸改善膝关节炎软骨质损伤的机制 [J]. 针刺研究, 2022,47(12):1088-1094.
- [16] 鲍杰伟, 施凤飞, 邱全河, 等. 电针对腰椎间盘退变模型大鼠炎症因子表达的影响 [J]. 中国医药, 2022,17(11):1671-1675.
- [17] 张运玉, 倪李鑫, 符维艳, 等. 内热针的现状与趋势分析 [J]. 中国疗养医学, 2022,31(10):1025-1028.
- [18] 黄丽萍, 王刚, 高谦, 等. 内热针治疗早期股骨头缺血性坏死的临床疗效观察 [J]. 解放军医学院学报, 2020,41(12):1202-1205.
- [19] 田心保, 许建峰, 黄媛, 等. 内热针干预激素性股骨头缺血性坏死模型大鼠抑制破骨及促进新骨形成 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(17):2642-2648.
- [20] 席源, 罗高斌, 魏桂清, 等. miR-206 靶向 Cx43 调控 ERK1/2 通路在兔激素性股骨头坏死中的作用 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2021, 39(2):154-160.
- [21] XU J, GONG H, LU S, et al. Animal models of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head—a comprehensive research review up to 2018. *Int Orthop.* 2018;42(7):1729-1737.
- [22] LARSON E, JONES LC, GOODMAN SB, et al. Early-stage osteonecrosis of the femoral head: where are we and where are we going in year 2018? *Int Orthop.* 2018;42(7):1723-1728.
- [23] 邓紫婷, 文丽, 贾英. 体外冲击波对兔膝关节软骨组织中转化生长因子 β 1 和白介素 1β 表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2022,44(1):18-24.
- [24] LIU F, WANG W, YANG L, et al. An epidemiological study of etiology and clinical characteristics in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head. *J Res Med Sci.* 2017;22:15.
- [25] FANG L, ZHANG G, WU Y, et al. SIRT6 Prevents Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:6360133.
- [26] 曾祥洪, 梁博伟. 股骨头坏死保髋治疗的新策略 [J]. 中国组织工程研究, 2021,25(3):431-437.
- [27] 刘洋, 刘飞, 王俊华. 内热针与温针灸对寒湿型腰痛症: 随机对照研究 [J]. 中医学临床杂志, 2019,11(6):125.
- [28] 陈冬, 庄金刚, 程肖芳. 内热针疗法治疗慢性软组织损伤性疼痛研究概述 [J]. 上海针灸杂志, 2019,38(6):699-702.
- [29] 董俊球, 胡云, 刘名锋. 内热针治疗股骨头缺血性坏死 48 例 [J]. 实用中医药杂志, 2017,33(8):969-970.
- [30] 朱仕强, 许建峰, 黑晓燕, 等. 内热针干预膝骨性关节炎兔软骨下骨 I 型胶原、基质金属蛋白酶 3 和骨桥蛋白的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2021,25(17):2636-2642.
- [31] 骆小娟, 张照庆, 尹晶, 等. 内热针对第三腰椎横突综合征大鼠炎症反应及 Akt/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020,26(7):908-911.
- [32] 邓振军, 郑志永, 徐谦, 等. 激素性股骨头坏死发病机制的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018,18(86):57-58.
- [33] PAIVA KBS, GRANJEIRO JM. Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;148:203-303.
- [34] AZEVEDO A, PRADO AF, FELDMAN S, et al. MMPs are Involved in Osteoporosis and are Correlated with Cardiovascular Diseases. *Curr Pharm Des.* 2018;24(16):1801-1810.
- [35] KOU L, JIANG X, LIN X, et al. Matrix Metalloproteinase Inspired Therapeutic Strategies for Bone Diseases. *Curr Pharm Biotechnol.* 2021;22(4):451-467.
- [36] 王建忠, 武永刚, 王坤正. 激素性股骨头坏死患者骨组织 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 蛋白的表达 [J]. 中华关节外科杂志 (电子版), 2012,6(1):91-96.
- [37] WANG T, HE C. TNF- α and IL-6: The Link between Immune and Bone System. *Curr Drug Targets.* 2020;21(3):213-227.
- [38] 张佳音. TNF- α 与激素性股骨头坏死的关系研究进展 [J]. 内蒙古医学杂志, 2018,50(3):283-286.
- [39] 张楠心, 陈宣维, 林文平. 兔激素性股骨头坏死血清中肿瘤坏死因子 α 变化 [J]. 中国中医药资讯, 2010,2(1):24-25.
- [40] YOKOTA K, SATO K, MIYAZAKI T, et al. Characterization and Function of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6-Induced Osteoclasts in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2021;73(7):1145-1154.
- [41] 杜杰利, 陈俊宇, 李屹洲, 等. 在激素性骨坏死中 IL-6 与 OPG/RANK/RANKL 系统和 MMP/TIMP 系统的关系 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016,16(8):36-38.
- [42] 杨国柱, 周方策, 卢丽, 等. 护骨胶囊对激素性股骨头坏死大鼠炎症因子的影响 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2021,14(6):621-627.

(责任编辑: WL, MZH, ZN, LYJ)