

·基础研究·

液氮冷冻法制备兔股骨头坏死模型新方法及其效果评估

李玉龙 焦龙兵 郑连生

【摘要】 目的 通过改良的手术路径,应用液氮冷冻法制备兔股骨头坏死模型,建立模拟人股骨头坏死病理变化的实验动物模型,为股骨头坏死的基础研究提供动物模型。**方法** 选取10只健康雌性新西兰大白兔,月龄(3.0±0.2),体重(3.2±0.4)Kg,选取左侧股骨头为实验组,右侧股骨头为空白对照。使用股骨头坏死髓芯减压手术路径,沿股骨颈方向钻入2.0 mm克氏针,将液氮冷冻仪探针插入孔道进入股骨头区域,对股骨头进行冷冻—复温2个循环,冷冻、复温时间均为半分钟,缝合切口后放回原笼位。于术后4周处死实验动物,取出股骨头观察股骨头大体变化,并即刻行股骨头X线等影像学检查,最后行病理切片检查。**结果** 所有实验动物术后均无死亡。通过对实验兔双侧股骨头大体形态观察,实验组股骨头软骨下骨颜色变深,呈暗红色,负重区有小片状坏死灶。X线结果示实验组与对照组相比,股骨头无明显的骨质密度改变。micro-CT示实验组股骨头软骨下骨小梁稀疏、紊乱,出现多处骨小梁连续性中断。MRI示实验组股骨头表现为以高信号为主的片状的高、低混合信号区。病理组织切片结果可以发现软骨变薄、细胞排列紊乱,骨小梁变细、排列紊乱,脂肪细胞融合,空骨陷窝形成等。10只实验兔的左侧股骨头均出现早期坏死的表现,成功率100%。**结论** 本实验通过新的手术路径用液氮冷冻法成功制备了兔股骨头坏死的模型,手术创伤小,无需切关节囊和脱位股骨头,操作简单,可作为兔股骨头坏死造模的新方法。

【关键词】 兔; 股骨头坏死模型; 液氮冷冻法; 新方法

A new method of building rabbit femoral head necrosis model by liquid nitrogen freezing and the evaluation of the effect Li Yulong, Jiao Longbing, Zheng Liansheng. Department of Orthopedics, Beijing Hepingli Hospital, Beijing 100013, China

Corresponding author: Zheng Liansheng, Email: zhengliansheng225@163.com

【Abstract】 Objectives The aims of this study were establishment of rabbit's ONFH models by liquid nitrogen freezing method that can simulate human's pathological changes. **Methods** Ten healthy New Zealand female rabbits were used in this study, month-age (3.0±0.2), weight (3.2±0.4)Kg. We selected the left side to be the operated side and considered the right side as the control. The rabbits were anesthetized by ear marginal intravenous injection, then be fixed on the fixation shelf. The skin incision was made on the lateral of left hip joint. And then we chose the appropriate bone landmark as the point for starting drill. Then the hole was drilled toward the femoral head with a appropriate femoral neck anteversion and abduction angle with a 2.0 mm kirschner wire. The femoral head were frozen by liquid nitrogen freezing equipment, followed by re-warming with warm saline two cycle. Ten rabbits were sacrificed post-operation for the fourth week to observe the shape and color of femoral head. Then X-ray, micro-CT, MRI and histopathological sections were performed to test the results. **Results** All the rabbits survived post-operation. The color of left femoral head gets dark, and we also found sheet necrosis area under the articular cartilage in the weight-bearing area. X-ray showed there is no apparent change in bone mineral density. Micro-CT showed thin disorganized trabecular bone. MRI showed mixed-signal of hyperintense signal and hypointense signal in operated femoral head. Histopathological examination showed obvious evidences of ONFH, including empty lacunae, integrated fat cells, disorganized trabecular bone and so on. All the left femoral heads appeared early stage osteonecrosis.

Conclusions We have prepared rabbit ONFH model successfully by the new method with smaller trauma and more simply operation that don't need capsulotomy and dislocating the femoral head, which could be a new standard method of preparing the rabbit femoral head necrosis model.

【Key words】 Rabbit; Femoral head necrosis model; Liquid nitrogen freezing; New method

股骨头坏死是骨科常见疾病之一,目前临床上股骨头坏死的治疗方法很多,但是尚未发现一种效果确切的治疗方法。随着病程的进展,坏死的股骨头最终会发生塌陷,患者不得不接受髋关节置换手术^[1]。目前股骨头坏死的发病机制尚不十分明确,虽然国内外学者进行了大量深入的研究,并提出了很多学说,但均未取得突破性进展^[2-3]。究其原因,可能缺少一种可以模拟人类股骨头坏死病理变化过程的动物模型。建立理想的股骨头坏死动物模型,是研究该疾病病理变化、诊疗方法的实验基础。目前文献报道的股骨头坏死动物建模方法主要包括激素诱导法、酒精诱导法、液氮冷冻法等。其中,前两种方法的成功率很难达到100%。目前报道的液氮冷冻法制备动物模型时,都需要手术方法切开髋部的肌肉及关节囊暴露股骨头,创伤大,对股骨头本身血供也有影响。本文从髓芯减压的手术入路获得灵感,设计了一种微创的股骨头坏死建模方法。

材料与方法

一、实验对象与方法

1.实验动物:成年的雌性新西兰大白兔10只,月龄 (3.0 ± 0.2) ,体重 (3.2 ± 0.4) Kg。

2.主要实验仪器:本实验用的液氮冷冻仪主要由3部分组成:冷冻探头、液氮传送管、液氮储存器(分别为图1~3),使用原理如下:液氮储存器的把手外侧有一小孔,其孔道与储存器内部相通。液氮储存器中倒入1/2~2/3的液氮,旋紧储存器瓶盖,液氮会从把手侧方的孔道内慢慢挥发。使用时,将把

手外侧的小孔堵住,储存器中液氮上方的压力会随着液氮的气化而逐渐增加,液氮被驱赶到传送管中,最终从探头中喷出(图4)。

3.实验方法:正式试验前先对兔股骨标本进行观察,测量股骨颈长度、前倾角及外展角等(图5),以帮助术中定位,然后取一只成年兔行预实验,探索克氏针进针点、进针方向及进针深度,术后处死试验动物后取出完整股骨,观察孔道方向及深度是否合适,并做相应调整。术前动物常规称重并记录,耳缘静脉注射10%水合氯醛溶液1.5 ml/Kg麻醉。麻醉后将实验兔四肢捆绑固定于动物固定架,剃毛机剃除术野兔毛,络合碘消毒术野3次、铺一次性无菌洞巾。2%盐酸利多卡因皮下浸润麻醉,取左髋关节外侧切口(以大转子为顶点,远端沿股骨干方向延伸约2.5 cm),逐层分离皮下筋膜,切开臀肌与股外侧肌间隙(图6),显露大转子及远端股骨干,拉钩牵开并保护两侧肌肉。2%盐酸利多卡因骨膜下局部浸润麻醉,切开、刮除大转子下方1 cm以内骨膜,显露进针点(大转子正下方约0.5 cm)(图7),选择合适的角度以直径2.0 mm克氏针沿股骨颈钻孔(图8),进针深度为2.7 cm。液氮冷冻仪中装入150 ml液氮,将探针插入股骨颈,匀速喷出液氮气体30秒(图9),温盐水复温30秒,再重复一次此步骤。缝合肌肉层及皮肤(图10),消毒包扎。

二、观察及评价指标

(一)股骨头大体形态观察

耳缘静脉麻醉后空气栓塞法处死,取出双侧股骨,观察实验组及对照组股骨头形态、颜色等大体观,观察软骨面是否光滑、是否有软骨剥脱等情况。



图1~4 液氮冷冻仪拆解及整体图。图1 冷冻探头;图2 液氮传送管;图3 液氮储存器;图4 整体观及工作原理图

(二)股骨头X线射片检查

取下动物股骨后即刻行股骨头X线正位片检查,读片观察股骨头外形、骨小梁结构、骨质密度、囊性变等情况。

(三)股骨头micro-CT检查

在股骨头X线检查后即刻,将股骨头固定于micro-CT检查台上,行股骨头micro-CT检查,读片观察股骨头形态、股骨头内骨小梁结构、软骨下骨是否有囊性变等情况。

(四)股骨头核磁共振检查

在股骨头micro-CT检查后即刻,将股骨头固定于MRI检查台,行股骨头MRI检查,读片观察股骨头有无囊性变、新月征、塌陷等表现。

(五)股骨头病理组织切片检查

将股骨置入福尔马林溶液固定72 h后,使用30%甲酸脱钙,然后使用梯度浓度的乙醇脱水,二甲苯透明处理,石蜡包埋后切片,厚度为4 μm ,常规HE染色,使用光学显微镜分别在低倍镜和高倍视野下观察骨小梁结构变化、是否有空骨陷窝、脂肪细胞增生肥大、骨细胞灶性坏死等。

三、结果

(一)动物一般情况

所有动物术中及术后均无死亡,术后30 min内均可清醒,1 h后可站立,3 h后可进食、水。伤口缝

线均可自行脱落,切口均一期愈合。所有试验动物处死前活动均正常,精神状态良好,进食进水正常,体重呈上升趋势。

(二)股骨头大体形态观察结果

实验组和对照组的股骨头形态均正常,软骨表面无剥脱,股骨头无塌陷。对照组股骨头表面软骨颜色正常,软骨下骨颜色呈淡红色,但实验组股骨头软骨下骨颜色变深,呈暗红色,关节软骨略薄,负重区的小片状坏死灶以及软骨皱缩(图11)。

(三)股骨头X线射片结果

双侧股骨头X线结果显示,对照组股骨头外形呈规则的圆形,软骨下骨骨质密度均一,无囊性变及硬化带(图12)。实验组股骨头外形规则,软骨下骨骨密度与对照组无明显差异,无囊性变(图13)。

(四)股骨头micro-CT结果

双侧股骨头micro-CT结果显示,对照组软骨下骨小梁排列整齐、均一,密度均匀,无囊性变及股骨头塌陷(图14)。实验组股骨头软骨下骨小梁较稀疏,骨小梁间距增大,且多处骨小梁连续性中断,最外层骨质较对照组薄,骺板较对照组变薄(图15)。

(五)股骨头MRI结果

双侧股骨头的核磁共振对照结果显示,对照组股骨头形态规则,软骨以及软骨下骨信号均匀(图16)。实验组股骨头呈现不规则的片状的低信号和高信号混合表现,以高信号为主,前外侧可见条带状低信号影(图17)。

(六)股骨头组织病理切片结果

病理组织切片结果显示,对照组股骨头软骨面光滑,细胞染色均匀,排列整齐,呈条带状,软骨与软骨下骨之间的潮线平滑无间断(图18、19),骨小梁排列整齐,基质及细胞核染色均匀,无空骨陷窝,无脂肪细胞融合、坏死(图20、21)。而实验组股骨头软骨基质不均,细胞排列杂乱无序,软骨与软骨下骨分界不清,部分潮线断裂、消失,软骨下微血管数量减少(图22、23),骨小梁变细,排列紊乱,形态不规则,骨陷窝变大、变空,骨细胞坏死,细胞核固缩,间质内造血细胞减少,脂肪细胞肥大、融合,髓腔内少量纤维组织增生(图24、25)。

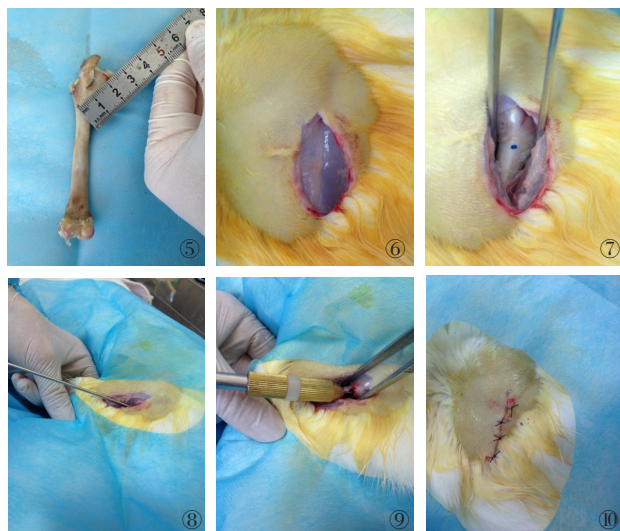


图5~10 手术步骤。图5 术前取兔股骨头标本,测量股骨颈长度、前倾角及外展角;图6 手术切口及肌间隙;图7 逐层分离皮下筋膜及肌间隙,显露进针点(蓝色标记),保护两侧肌肉;图8 以合适的角度、深度钻入克氏针(手持部位为膝关节);图9 用液氮冷冻仪冷冻股骨头;图10 逐层缝合肌肉、皮肤

讨 论

一、实验背景

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head,

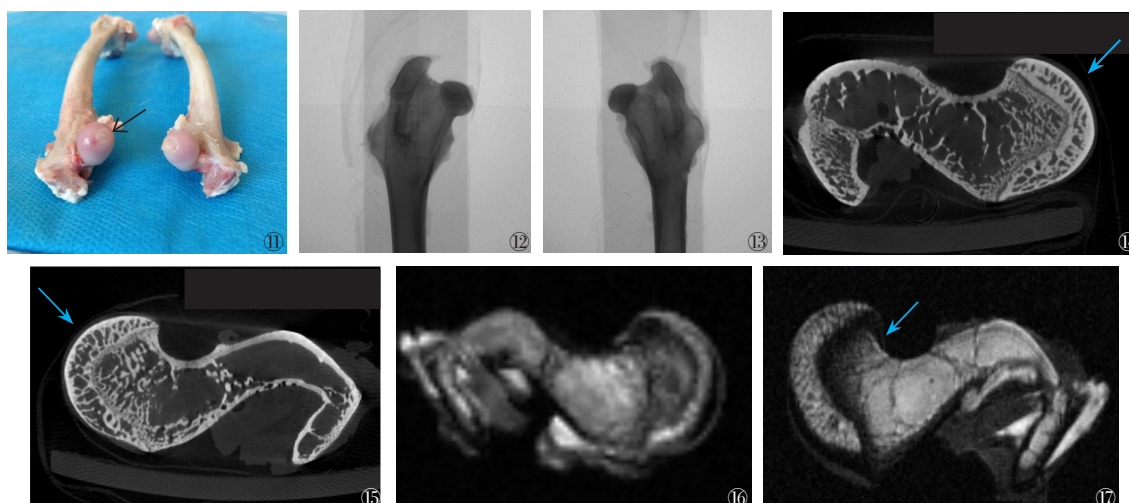


图11 双侧股骨头大体形态比较。实验组股骨头软骨下骨颜色暗红,黑色箭头示片状坏死灶 图12~13 双侧股骨头X线结果。图12 对照组股骨头形态规则,软骨下骨质密度均一,无囊性变;图13 实验组股骨头形态、密度与对照组无明显差异 图14~15 双侧股骨头micro-CT结果(蓝色箭头指示软骨下骨)。图14 对照组股骨头软骨下骨小梁排列整齐、均一,密度均匀;图15 实验组股骨头软骨下骨小梁排列紊乱、稀疏,多处骨小梁连续性中断,最外层骨质及骺板较对照组变薄 图16~17 双侧股骨头MRI结果。图16 对照组股骨头形态规则,软骨以及软骨下骨信号均匀;图17 实验组股骨头呈现片状不规则的高、低混合信号区,以高信号为主(蓝色箭头)

ONFH)是一个复杂的病理过程,早期由于股骨头血供受损导致骨细胞坏死,随后发生骨细胞的修复。病程中期,大面积的骨细胞坏死导致空骨陷窝的形成,继而发生囊性变(主要发生在负重区)^[4]。后期,再加上髋关节的负重,导致股骨头开始塌陷、变形,进而出现髋关节疼痛及活动功能受限^[5-6]。目前的研究表明,导致ONFH的原因主要包括髋关节创伤^[3]、酗酒及长期大量的激素应用^[7]。原因不明的ONFH称为特发性股骨头坏死^[8-9]。到目前为止,关于股骨头坏死的病因及发病机制的研究尚未完全清楚。虽然治疗方法多种多样,但是至今没有一种可以明确保住股骨头的治疗方法^[10],相当一部分患者最终需要接受股骨头置换或者全髋关节置换术^[11-14]。所以,对于股骨头坏死的研究仍待进一步进行,而建立一种简便的、标准化的、模拟人体股骨头坏死病理变化的动物模型就显得尤为重要。2009年9月中华医学会骨关节外科股骨头坏死动物模型研讨会提出股骨头坏死动物模型制备必须具备以下两方面的特征:一是要求病理学上具备微血管栓塞、脂肪细胞增生肥大、骨细胞灶性坏死等特征性改变。第二是在股骨头坏死后期出现股骨头的塌陷^[15-16]。本研究制备的兔股骨头坏死动物模型,在术后4周有微血管改变、脂肪细胞坏死及骨细胞的灶性死亡的表现,但未出现股骨头塌陷的表现,主要原因是兔为四足动物,且术后均在动物笼位内饲养,未放任其自由活动、奔

跑等。当单侧下肢出现疼痛时,兔会保护性的患肢不负重,再加上活动空间小、活动受限,出现股骨头塌陷的几率极小^[17-19]。本研究采用的液氮冷冻新方法制备的兔股骨头坏死模型满足股骨头坏死动物模型制备要求的关键特征。

二、实验结果与创新点

兔在股骨头坏死模型建造中应用较为广泛,因为资源获取方便、价格合理、体型大小合适,适合外科方法建模;液氮冷冻法较激素诱导法、酒精诱导法等具有建模周期短、成功率高、可重复性好等优点,所以本研究采用液氮冷冻的方法制备兔股骨头坏死模型。先前报道的液氮冷冻法制备兔股骨头坏死模型方法都是采用了切开关节囊在股骨头表面进行冷冻处理的方法,有的甚至要切断股骨头圆韧带、脱位股骨头。这种方法对动物的创伤较大,切开关节囊以后关节的稳定性大大降低,兔活动量大容易发生脱位;且该方法是从外向里对股骨头进行冷冻处理,首先破坏的而且破坏最严重的就是股骨头的软骨面,并不是模拟了正常的股骨头坏死病理变化过程(先累及负重区的软骨下骨,最后累及关节面),所以实验结果中软骨面的破坏以及股骨头塌陷很可能是液氮直接对股骨头软骨的冻伤作用,而并非软骨下骨囊性变以后负重活动而导致的。本研究较以前报道的液氮冷冻法制备股骨头坏死动物模型方法相比,具有以下特点:第一,手术创伤小。手术切口只

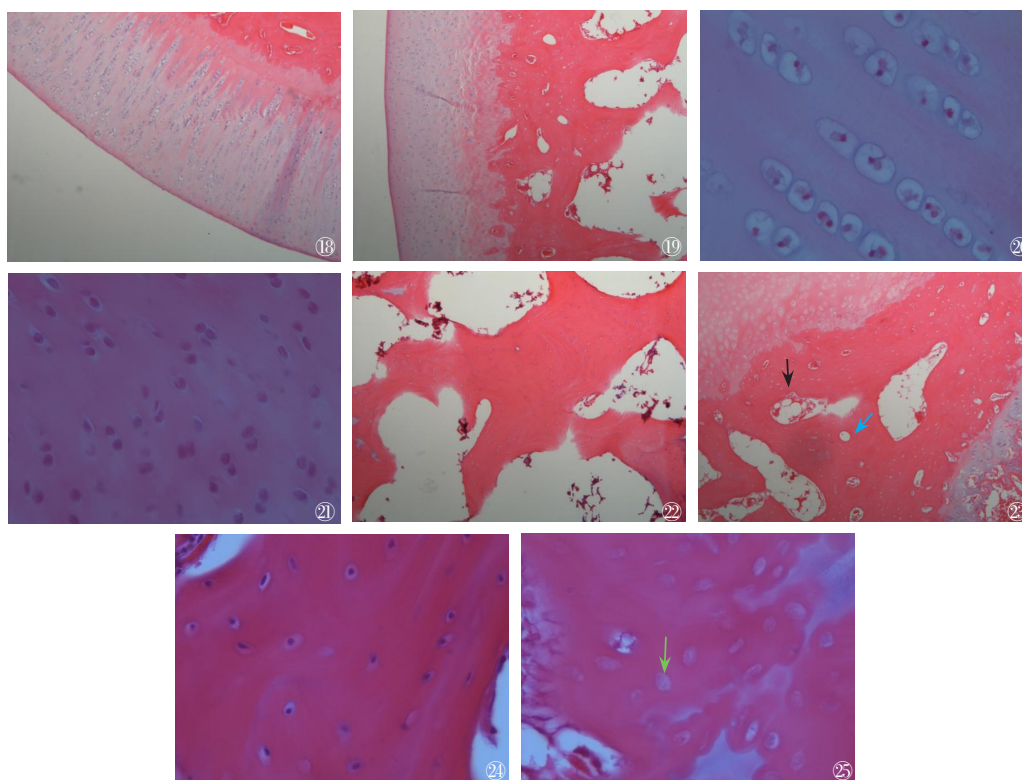


图18~25 双侧股骨头病理组织切片。图18 对照组股骨头软骨(5倍):软骨面光滑,细胞排列整齐,呈条带状;图19 实验组股骨头软骨(5倍):软骨基质不均匀,细胞排列杂乱、无序,软骨与软骨下骨界限不清;图20 对照组股骨头软骨(40倍):软骨细胞染色均匀,排列整齐;图21 实验组股骨头软骨(40倍):软骨细胞排列杂乱、无序;图22 对照组股骨头软骨下骨(5倍):骨小梁排列整齐,基质及细胞核染色均匀,无空骨陷窝;图23 实验组股骨头软骨下骨(5倍):骨小梁变细,排列紊乱,形态不规则,骨陷窝空化(蓝色箭头),脂肪细胞肥大、融合(黑色箭头);图24 对照组股骨头软骨下骨(40倍):基质及细胞核染色均匀,无细胞核固缩;图25 实验组股骨头软骨下骨(40倍):骨陷窝变空,几乎观察不到均染的细胞核(绿色箭头)

有2~3 cm,手术路径是臀肌与股外侧肌的间隙,没有破坏肌肉所以手术失血量极少。第二,不需要切关节囊、切断股骨头圆韧带、脱位股骨头。股骨头的血供主要来源于旋股内外侧动脉、股骨头圆韧带内的小凹动脉以及内骺动脉等,以上的几步操作本身就严重的破坏了股骨头的血液供应,所以股骨头坏死的结果肯定不完全是液氮的作用,而相当一部分是模拟了创伤性股骨头坏死的建模方法(通过手术方式破坏股骨头血供)。本方法最主要的优点是不需要切关节囊、切断股骨头圆韧带、脱位股骨头,最大程度的保留了股骨头的血供^[20]。本研究中的手术操作对关节囊、股骨头圆韧带等没有任何破坏作用,对股骨头血供的影响也较小,保证了研究结果的准确性。

本实验于造模后4周对兔双侧股骨头进行大体像观察、X线射片、micro-CT、MRI和组织病理切片

检查。研究结果表明,术后4周实验组股骨头软骨下骨颜色变深,呈暗红色,负重区有小片状坏死灶。X线结果显示,实验组与对照组股骨头对比无明显的骨质密度改变,形态规则。micro-CT示实验组股骨头形态规则,密度无明显减低,但软骨下骨小梁稀疏、紊乱。MRI示实验组股骨头呈不规则的低信号和高信号混合表现。病理组织切片结果可以发现骨小梁变细、排列紊乱,脂肪细胞肥大、融合,空骨陷窝形成等。本研究从多个角度证明了该方法建造股骨头坏死模型成功,股骨头大体观、X线、micro-CT、MRI和组织病理切片检查结果均有早期股骨头坏死表现。

三、本研究的不足与展望

因本实验设计只是进行早期的影像学和病理学观察,旨在先验证此手术方法制备模型的可行性。目前动物样本较少,标本切片不足,暂没有足够大量的观察窗进行量化比较,但目前观察到的病理变化

也证实出现股骨头坏死的表现。后期会进行后续的动物实验,且观察时间会延长,届时再观察各个阶段的病理表现,再进行量化比较会更加完善。

参 考 文 献

- Lai SW, Liao KF. Real-World database examining the association between avascular necrosis of the femoral head and diabetes in Taiwan [J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(1): 39-43.
- Ren X, Shao Z, Fan W, et al. Untargeted metabolomics reveals the effect of lovastatin on steroid-induced necrosis of the femoral head in rabbits [J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 497.
- Wang Y, Ma JX, Yin T, et al. Correlation between reduction quality of femoral neck fracture and femoral head necrosis based on biomechanics [J]. *Orthop Surg*, 2019, 11(2): 318-324.
- Cheng HJ. Extracorporeal shockwave therapy modulates the expressions of proinflammatory cytokines IL33 and IL17A, and their receptors ST2 and IL17RA, within the articular cartilage in early avascular necrosis of the femoral head in a rat model [J]. 2021: 9915877.
- Zhao K, Zhang F, Quan K, et al. Insufficient blood supply of fovea capitis femoris, a risk factor of femoral head osteonecrosis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 414.
- Rong K. Alendronate alleviated femoral head necrosis and upregulated BMP2/EIF2AK3/EIF2A/ATF4 pathway in liquid Nitrogen treated rats [J]. 2021: 1717-1724.
- Huang, Z. Hyper-activated platelet lysates prevent glucocorticoid-associated femoral head necrosis by regulating autophagy [J]. 2021: 111711.
- Chen K, Liu Y, He J, et al. Steroid-induced osteonecrosis of the femoral head reveals enhanced reactive Oxygen species and hyperactive osteoclasts [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(11): 1888-1900.
- Cohen-Rosenblum A, Cui Q. Osteonecrosis of the femoral head [J]. *Orthop Clin North Am*, 2019, 50(2): 139-149.
- Hua KC, Yang XG, Feng JT, et al. The efficacy and safety of core decompression for the treatment of femoral head necrosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 306.
- Tan Y, He HY, Wan ZH, et al. Study on the outcome of patients with aseptic femoral head necrosis treated with percutaneous multiple small-diameter drilling core decompression: a retrospective cohort study based on magnetic resonance imaging and equivalent sphere model analysis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 264.
- Xu M, Motomura G, Ikemura S, et al. Proximal femoral morphology after transtrochanteric posterior rotational osteotomy for osteonecrosis of the femoral head: A three-dimensional simulation study [J]. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2020, 106(8): 1569-1574.
- Yamamoto T, Y Iwamoto. [Corticosteroids treatments and osteonecrosis of the femoral head] [J]. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 2015, 106(3): 47-53.
- Zhu Z, Li S, Yu H, et al. Correlation between continuation of glucocorticoid treatment and risk of femoral head collapse: A retrospective cohort study of patients with glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral head after hip-preserving interventions [J]. *Orthopade*, 2021, 50(2): 143-149.
- Jiang W. A simple method for establishing an ostrich model of femoral head osteonecrosis and collapse [J]. 2015: 74.
- Yan YQ, Xu RJ. Effects of erythropoietin for precaution of steroid-induced femoral head necrosis in rats [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2018, 19(1): 282.
- Lijun Shi, Tianli Mao, Pan Luo, et al. [Effect of icariin on early steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rabbits] [J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2020, 34(2): 206-212.
- Tudisco C, Botti F, Bisicchia S, et al. Ischemic necrosis of the femoral head: an experimental rabbit model [J]. *J Orthop Res*, 2015, 33(4): 535-541.
- Wang X, Li J, Man D, et al. Early detection of steroid-induced femoral head necrosis using (99m)Tc-Cys-Annexin V-based apoptosis imaging in a rabbit model [J]. *Mol Med*, 2020, 26(1): 120.
- Zhang XL, Wang YM, Chu K, et al. The application of PRP combined with TCP in repairing avascular necrosis of the femoral head after femoral neck fracture in rabbit [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(4): 903-909.

(收稿日期:2022-04-26)

(本文编辑:吕红芝)

李玉龙, 焦龙兵, 郑连生. 液氮冷冻法制备兔股骨头坏死模型新方法及其效果评估 [J/CD]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2022, 8(5): 263-268.