

提高激素性股骨头坏死兔模型动物存活率的实验研究

李 超 尚希福 李 旭 付代杰

摘要 目的 应用内毒素脂多糖(LPS)联合甲基强的松龙(MPS)建立兔股骨头坏死模型,探讨提高兔存活率的方法。方法 将64只新西兰大白兔随机等分为4组:模型组(A组)、庆大霉素组(B组)、庆大霉素+泮托拉唑组(C组)和对照组(D组),每组各16只。A组、B组和C组兔建立股骨头坏死模型:单次经耳缘静脉注射LPS($10\text{ }\mu\text{g/kg}$);24 h后于臀肌注射MPS(20 mg/kg),共3次,注射间隔24 h。D组臀肌注射同等剂量的生理盐水作为对照。B组和C组于最后1次注射MPS后连续7 d以 $4\times 10^4\text{ U/d}$ 臀肌注射庆大霉素注射液,C组同时连续7 d以 40 mg/d 臀肌注射泮托拉唑注射液。结果 造模期间A组、B组和C组分别有8只、5只和2只动物死亡,A、B组动物死亡原因主要为呕吐、腹泻、消化道出血等,C组动物死亡原因不明。4组动物的死亡数量差异有统计学意义($P<0.05$);最后一次注射MPS 6周后,3组动物存活率分别为50.0%、68.6%、87.5%。实验期间D组未出现动物死亡。A组、B组和C组存活下来的动物经组

织病理学观察均显示造模成功。结论 在建立兔激素性股骨头坏死模型期间的同时,应用庆大霉素预防感染和泮托拉唑护胃,可以显著提高实验动物的存活率。

关键词 激素性股骨头坏死;动物模型;内毒素脂多糖;甲基强的松龙;庆大霉素;泮托拉唑

中图分类号 R 681.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1726-04

兔是最常用的激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)动物模型^[1-5],主要是由于其发病机制和病理改变与人类相似程度较高,同时具有良好的可重复性,因此在科研中应用广泛。现阶段,在SONFH造模过程中主要有两大障碍:较低的造模成功率和较高的动物死亡率。激素联合免疫方法,如内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)^[3-4]、异体血清^[5]等,能显著提高动物模型的骨坏死率;造模期间动物死因主要是激素严重的副作用,如免疫抑制会诱发感染、降低胃黏膜抵抗力会诱发消化性溃疡等,故针对激素副作用的一些预防措施是必要的。该研究拟在SONFH造模的同时预防性应用抗生素(庆大霉素)和抑酸剂

2014-08-27 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金(编号: KJ2013A160)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院骨科,合肥 230001

作者简介:李 超 男 硕士研究生;

尚希福 男 教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: shangxifu@163.com

cells (hMSCs) and its differentiation along osteoblasts to find the important functional protein candidates and elucidate the molecular mechanism in the process of differentiation into osteoblasts. **Methods** hMSCs were cultured and induced into osteoblast *in vitro*. The total protein extracts were obtained with cell lysis buffer from undifferentiated hMSCs and osteogenic induced hMSCs on day 3. Using proteomic approaches based on two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and 2-DE gel analysis software, differently expressed protein spots that had an altered abundance ratio of greater than 2.0 fold were selected after being recognized and tested. The selected different protein spots were identified and analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and bioinformatics. **Results** hMSCs were induced into osteoblast *in vitro* successfully. The total protein extracts were separated effectively with 2-DE. By MALDI-TOF-MS analysis and database searching, 38 proteins were identified including 22 up-regulated, 16 down-regulated in osteogenic induced hMSC for 3 days relative to undifferentiated hMSCs. The identified proteins that participated metabolism, development process, catalytic reaction and enzyme regulation respectively possessed 29%, 32%, 44% and 16% according to molecular function and biological process by Gene Ontology analysis. **Conclusion** Proteomic analysis can identify the proteins with variance of osteogenic differentiation of hMSCs, meantime, provide a comprehensive reference to understand molecular mechanism of osteogenic differentiation.

Key words hMSCs; osteogenic differentiation; proteomics; mass spectra identification; bioinformatics

(泮托拉唑), 并进行动态观察和横向比较, 旨在探讨提高动物模型存活率的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 64 只健康成年的雄性新西兰大白兔, 体重 2.0 ~ 2.4 kg, 平均 2.2 kg, 由安徽医科大学附属省立医院实验动物中心提供。实验动物单笼饲养, 自由摄食饮水; 饲养环境通风良好, 阳光充足。实验前常规适应性喂养 2 周。实验动物随机等分为 4 组: 模型组(A 组)、庆大霉素组(B 组)、庆大霉素 + 泮托拉唑组(C 组) 和对照组(D 组), 每组各 16 只。

1.2 主要试剂与仪器 LPS 购自美国 Sigma 公司, 规格为 10 mg; 甲基强的松龙(methylprednisolone, MPS) 购自嘉兴玛雅试剂有限公司, 规格为 1 g; 硫酸庆大霉素注射液购自安阳九州药业有限责任公司, 规格为 2 ml : 4 单位; 注射用泮托拉唑钠注射液购自成都天台山制药有限公司, 规格为 40 mg。组织病理学观察所用仪器如脱水机、切片机、自动染色机和光学显微镜等由安徽医科大学附属省立医院病理科提供。

1.3 建立兔激素性股骨头坏死模型 A 组、B 组和 C 组兔参照 Qin et al^[4] 的造模方法建立激素性股骨头坏死模型: 单次经耳缘静脉注射 LPS(10 μ g/kg); 24 h 后于臀肌注射 MPS(20 mg/kg), 共 3 次, 注射间隔 24 h。D 组兔注射同等剂量的生理盐水作为对照。B 组和 C 组于最后一次注射 MPS 后连续 7 d 以 4×10^4 U/d 臀肌注射庆大霉素注射液, C 组同时连续 7 d 以 40 mg/d 臀肌注射泮托拉唑注射液。

1.4 主要观察指标

1.4.1 一般情况 观察各组动物的精神状态、步态、食量、大小便、毛发等。

1.4.2 死亡情况 记录各组动物的死亡时间和数量, 解剖死亡的动物并分析其死因。

1.4.3 组织病理学观察 最后一次注射 MPS 6 周后, 用空气栓塞法将各组存活下来的动物处死, 取右侧股骨头作为实验标本。观察标本的大体情况, 如股骨头外观、软骨面完整性以及光滑度、厚度等, 沿正中冠状面劈开并立即用 10% 福尔马林固定液固定, 送往病理科脱钙、石蜡包埋、切片、HE 染色, 在光学显微镜下观察股骨头坏死情况(激素性股骨头坏死评定标准: 正常成年兔股骨头软骨下区空骨陷窝百分率为 8% ~ 12%, 超过此数目即提示骨坏

死^[6-7]) , 并于 10×40 高倍镜视野下, 同一张切片随机选 10 个视野计数空骨陷窝数和骨陷窝数, 计算出空骨陷窝百分率, 取平均值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。4 组动物死亡数量比较采用 χ^2 检验。4 组动物空骨陷窝百分率和骨坏死率比较采用方差分析。

2 结果

2.1 一般情况 A、B、C 3 组动物从注射 LPS 后第 1 天开始至 1 周末前均出现精神萎靡、食量减少、大便不成形、脱毛等现象, 其中 A 组有 5 只兔出现了呕吐和腹泻、2 只兔出现血便, B 组有 2 只兔出现了血便; 1 周末至 6 周末前 3 组动物精神状态逐渐恢复, 食量逐渐增加, 大小便好转, 其中 A 组有 3 只兔出现了呕吐和腹泻、3 只兔出现了血便, B 组有 2 只兔出现了血便; 6 周末时 3 组动物均出现不同程度的站立困难、活动减少、跛行等现象。D 组动物实验期间精神状态良好, 食量及大小便正常, 未出现腹泻、血便、脱毛、跛行等现象。

2.2 死亡情况 造模期间 A 组、B 组和 C 组分别有 8 只、5 只和 2 只动物死亡, A、B 组动物死亡原因主要为呕吐、腹泻、消化道出血等, C 组动物死亡原因不明。4 组动物的死亡数量差异有统计学意义($\chi^2 = 12.800, P < 0.05$); 最后一次注射 MPS 6 周后, A、B、C 3 组动物存活率分别为 50.0%、68.6%、87.5%。实验期间 D 组未出现动物死亡。见图 1、2 表 1。

表 1 各组动物的死亡数量(只)

组别	1 周末	2 周末	3 周末	4 周末	5 周末	6 周末	合计
A	0	2	3	3	0	0	8
B	0	1	2	2	0	0	5
C	0	0	1	1	0	0	2
D	0	0	0	0	0	0	0



图 1 A、B 组死亡动物的胃

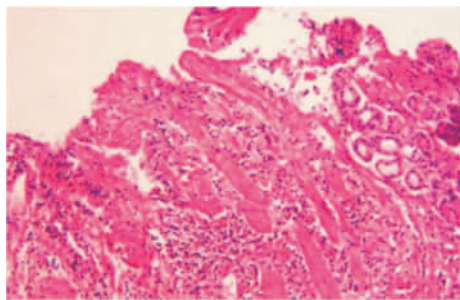


图2 A、B组死亡动物的胃组织切片 HE×100

2.3 组织病理学观察 最后一次注射 MPS 6 周后,观察 A、B、C 3 组动物的股骨头标本示股骨头外形欠圆阔,软骨面色泽较暗、有不同程度的剥脱,剖面见软骨厚度不均匀、部分区域不同程度的变薄,软骨下见坏死骨组织。D 组动物的股骨头标本外形正常,软骨面完整无缺损,色泽正常,剖面见软骨厚度均匀一致,未见坏死骨组织。光学显微镜下示 A、B、C 3 组动物的股骨头标本均呈现出典型的骨坏死组织学表现:骨髓腔内脂肪细胞增生,骨小梁变细、断裂、结构不清,骨细胞核固缩,骨陷窝空缺,可见大量纤维结缔组织。D 组动物的股骨头标本光镜下显示为正常的股骨头组织,骨髓腔内脂肪细胞数量较少,骨小梁完整、致密、排列正常,骨细胞核位于中央,骨陷窝内骨细胞形态正常。4 组动物的空骨陷窝百分率差异有统计学意义($F = 1.006.013, P < 0.05$)。见图 3、表 2。

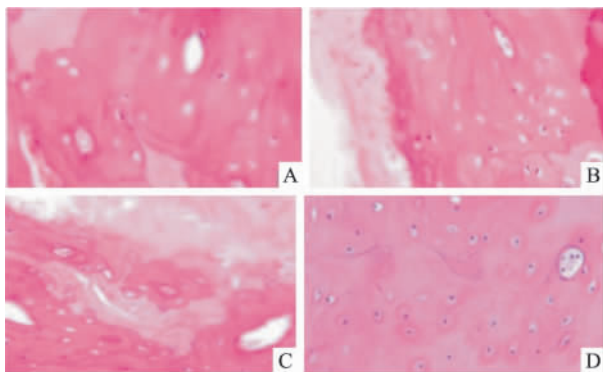


图3 股骨头组织病理学观察 HE×200

A: 模型组; B: 庆大霉素组; C: 庆大霉素 + 泮托拉唑组; D: 对照组

表2 各组动物的空骨陷窝百分率和骨坏死率

组别	空骨陷窝百分率($\bar{x} \pm s, \%$)	骨坏死率(%)
A	$35 \pm 4^*$	100 [*]
B	$34 \pm 6^*$	100 [*]
C	$33 \pm 5^*$	100 [*]
D	5 ± 1	0

与 D 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

各种 SONFH 动物造模方法都存在造模时间长、成功率低、死亡率高等问题。激素联合 LPS 法虽然缩短了造模时间并且提高了造模成功率,但应用这种方法的动物死亡率特别高^[8],故如何降低动物死亡率是值得探讨的问题。糖皮质激素具有免疫抑制和降低胃黏膜抵抗力等副作用;LPS 是一种强烈的致炎因子,作用于机体后会引发内毒素血症^[9],因此过量的使用激素和 LPS 对机体是不利的。为了达到降低动物死亡率的效果,本研究在造模的同时加以应用抗生素(庆大霉素)和抑酸剂(泮托拉唑)这两种辅助药物。A 组未进行辅助用药,B 组只应用抗生素,这两组分别有 8 只和 5 只动物相继死亡,死亡原因主要为呕吐、腹泻、消化道出血等,并且都在第 2~4 周内发生,此期间也是动物状态和体质变化最大的时期,到第 5 周后存活的动物都能较好地适应,表明激素和 LPS 对个体的作用是有差异的^[10]。C 组同时应用抗生素和抑酸剂,但仍然有 2 只动物相继死亡,解剖后未发现明显的消化性溃疡和体内感染等异常现象,死亡原因不明,笔者认为这两种辅助药物没能完全纠正由激素和 LPS 引起并持续存在的代谢紊乱,效果仍是有限的,有待进一步深入探讨。

该研究中 A、B、C 3 组存活下来的动物经组织病理学观察均显示造模成功,且空骨陷窝百分率的差异无统计学意义,说明上述两种辅助药物未起到预防 SONFH 发生的作用,对造模的成功率无影响;同时说明此两种药物仅能发挥降低动物死亡率的作用。

综上所述,激素联合 LPS 能成功建立兔 SONFH 模型,庆大霉素等抗生素和泮托拉唑等抑酸剂能在一定程度上预防造模过程中兔发生感染和消化性溃疡,显著提高兔的存活率。

参考文献

- [1] Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi K A, et al. Vitamin E prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits [J]. Acta Orthop, 2010, 81(1): 154-60.
- [2] Iwakiri K, Oda Y, Kaneshiro Y, et al. Effect of simvastatin on steroid-induced osteonecrosis evidenced by the serum lipid level and hepatic cytochrome P4503A in a rabbit model [J]. J Orthop Sci, 2008, 13(5): 463-8.

- [3] Guan X Y, Han D. Role of hypercoagulability in steroid-induced femoral head necrosis in rabbits [J]. *J Orthop Sci*, 2010, 15(3): 365–70.
- [4] Qin L, Zhang G, Sheng H, et al. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone [J]. *Bone*, 2006, 39(4): 863–71.
- [5] Wen Q, Ma L, Chen Y P, et al. A rabbit model of hormone-induced early avascular necrosis of the femoral head [J]. *Biomed Environ Sci*, 2008, 21(5): 398–403.
- [6] Conradie M M, de Wet H, Kotze D D, et al. Vanadate prevents glucocorticoid-induced apoptosis of osteoblasts *in vitro* and osteocytes *in vivo* [J]. *J Endocrinol*, 2007, 195(2): 229–40.
- [7] Eberhardt A W, Yeager-Jones A, Blair H C. Regional trabecular bone matrix degeneration and osteocyte death in femora of glucocorticoid-treated rabbits [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(3): 1333–40.
- [8] Powell C, Chang C, Gershwin M E. Current concepts on the pathogenesis and natural history of steroid-induced osteonecrosis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2011, 41(1): 102–13.
- [9] 张志辉, 李玲, 刘晓倩, 等. 急性细菌脂多糖暴露对小鼠血糖的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(2): 142–5.
- [10] 陈冠儒, 王萧枫, 王利明, 等. 兔激素性股骨头坏死造模中的致死因素与干预分析 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2012, 22(5): 342–4.

The experimental study of improving the survival rate of rabbits in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head models

Li Chao, Shang Xifu, Li Xu, et al

(Dept of Orthopaedics, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To establish rabbit model of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head using lipopolysaccharide (LPS) and methylprednisolone (MPS), and to investigate methods of improving the survival rate of rabbits. **Methods** A total of 64 New Zealand white rabbits were randomly and equally divided into four groups: model group (A group), gentamycin group (B group), gentamycin + pantoprazole group (C group) and control group (D group). Rabbits in A group, B group, C group were received one intravenous of LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 24 h later, three injections of MPS (20 mg/kg) were given intramuscularly at a time interval of 24 h to establish models of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. Rabbits in D group were only injected with the same dose of saline *via* the gluteus as controls. Then rabbits in B group, C group were injected with gentamycin (4×10^4 U/d) *via* the gluteus for 7 consecutive days after the last injection of MPS. Simultaneously, Rabbits in C group received intramuscular injection with pantoprazole (40 mg/d). **Results** During the evolution of the animal model, the death number in A group, B group, C group were 8, 5, 2, respectively. The main causes of death in A and B group were vomiting, diarrhea, gastrointestinal bleed, etc. However, animals in C group died of unknown reasons. Significant differences in the death number were detected in four groups ($P < 0.05$). Six weeks after the last injection of MPS, the survival rates in A group, B group, C group were 50.0%, 68.6%, 87.5%, respectively. There were no dead rabbits in D group. Models were successfully established in the surviving rabbits of A group, B group, C group by the method of histopathology. **Conclusion** The combined use of gentamycin for infection prevention and pantoprazole for gastric mucosa protection can significantly improve the survival rate of rabbits during the establishment of rabbit model of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head.

Key words steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; animal model; lipopolysaccharide; methylprednisolone; gentamycin; pantoprazole