

· 论 著 ·

## 普伐他汀对酒精性股骨头坏死干预作用的实验研究\*

黄可<sup>1</sup>, 唐毓金<sup>2△</sup>

(1. 桂林医学院研究生学院 2010 级, 广西桂林 541004;

2. 右江民族医学院附属医院脊柱骨病外科, 广西百色 533000)

**摘要:**目的 研究普伐他汀对酒精性股骨头坏死(AOFA)发生的干预作用,探讨酒精性股骨头坏死的发病机制。方法 将 30 只家兔随机分为 3 组。实验组 12 只,给予烈性白酒(乙醇含量 50%)10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,普伐他汀 2 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>口服。模型组 12 只,给予烈性白酒(乙醇含量 50%)10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃。对照组 6 只,不予任何处理。试验持续时间 12 周,试验前、后测量血脂及血流变化情况。实验后将家兔处死行肝脏及股骨头常规病理学检查及股骨头透射电镜观察。结果 模型组血脂明显升高,血液黏稠度增加,肝细胞气球样变,并出现股骨头坏死。肝脏及股骨头病理改变较轻。对照组未见上述改变。结论 使用普伐他汀干预能有效降低乙醇引起的高脂血症、血小板黏附及红细胞聚集,防止骨细胞的损伤,从而预防 AOFH 的发生。

**关键词:**股骨头坏死;高胆固醇血症;血黏度

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.09.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)09-0974-03

Experiment study on intervention effects of pravastatin on alcoholic osteonecrosis of femoral head<sup>\*</sup>Huang Ke<sup>1</sup>, Tang Yujin<sup>2△</sup>

(1. Postgraduate, grade 2010, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541004, China; 2. Department of Spinal Orthopedic Surgery, First Affiliated Hospital, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

**Abstract: Objective** To study the interventional effect of pravastatin sodium on alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head(AOFH), and to discuss the pathogenesis of alcoholic avascular necrosis. **Methods** 30 healthy mature Chinese white rabbits were randomly divided into three groups. The experimental group(12 cases) was lavaged with high liquor(alcohol content 50%) 10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, meanwhile, oral pravastatin sodium 2 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> for 12 weeks. The model group(12 cases) was given with alcohol as that the experimental group without pravastatin sodium. The control group(6 cases) was given with no any treatment. The experiment lasted for 12 weeks. The blood lipid and hemarheology were measured before and after experiment. The rabbits were killed by air embolism after experiment, the liver were taken for the routine histopathological observation and the femoral head was taken for the routine histopathologic observation and transmission electron microscopic observation. **Results** The blood lipid and blood viscosity in the model group were increased obviously, osteonecrosis of the femoral head and liver cell ballooning degeneration appeared in model group. The pathological change of liver and femoral head was mild. The above changes were not seen in the control group. **Conclusion** Using pravastatin intervention can effectively reduce alcohol-induced hyperlipidemia, platelet adhesion and red cell aggregation, prevent bone cell damage, so as to prevent the occurrence of AOFH.

**Key words:** osteonecrosis of the femoral head; hypercholesterolemia; blood viscosity

缺血性股骨头坏死分为创伤性和非创伤性,非创伤性股骨头坏死(nontraumatic osteonecrosis of femoral head, NONFH)的主要原因为激素和乙醇诱发多见。国内外对乙醇可引起股骨头坏死报道较多,其发生可能与过量饮酒导致的肝脏细胞损伤、脂质代谢紊乱、血液高凝状态、乙醇所致的骨细胞凋亡及微血管内皮细胞损害有关<sup>[1-3]</sup>。本研究观察降脂药物普伐他汀,对家兔酒精性股骨头坏死(alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head, AOFH)的预防作用,以探索一种对长期饮酒人群有效预防 AOFH 的方法。

## 1 材料与方

1.1 实验动物及材料 健康成年中国家兔 30 只,体质量

1.5~2.0 kg(右江民族医学院实验动物中心提供)。采用随机数字表法分为 3 组。实验组 12 只,采用灌胃法,给予烈性白酒(乙醇含量 50%)10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,同时给予普伐他汀 2 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>口服。模型组 12 只,采用灌胃法,给予烈性白酒(乙醇含量 50%)10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。对照组 6 只,不予任何处理。各组动物分笼饲养,自由取食、饮水,12 周后空气栓塞处死。

1.2 血液学检查 血脂检查:采用日立 7600 型生化分析仪分别测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、极低密

\* 基金项目:广西壮族自治区教育厅科研项目(200502074)。 作者简介:黄可(1986~),在读研究生,主要从事脊柱、骨病的研究工作。

△ 通讯作者, Tel:18777610265; E-mail: tangyujin196709@163.com。

表 1 实验前、后各组血脂指标检测结果( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

组别	n	时间	TC	TG	HDL	LDL	VLDL
实验组	12	实验前	1.21±0.40	0.83±0.23	0.47±0.11	0.33±0.25	0.45±0.15
模型组	12		1.34±0.34	1.10±0.32	0.62±0.22	0.27±0.16	0.44±0.08
对照组	6		1.16±0.17	0.97±0.21	0.46±0.15	0.26±0.14	0.46±0.10
实验组	12	实验后	1.60±0.47*	0.92±0.62*	0.61±0.26*	0.46±0.28*	0.46±0.28*
模型组	12		2.58±0.66 <sup>△▲</sup>	2.52±1.43 <sup>△▲</sup>	0.39±0.14 <sup>△▲</sup>	0.94±0.47 <sup>△▲</sup>	0.75±0.25 <sup>△▲</sup>
对照组	6		1.20±0.34	0.84±0.34	0.45±0.08	0.27±0.17	0.47±0.20

\*:  $P < 0.05$ , 与同期模型组比较; <sup>△</sup>:  $P < 0.05$ , 与同期对照组比较; <sup>▲</sup>:  $P < 0.05$ , 与实验前同组比较。

度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL); 血液黏度检查: 采用血流变自动检测仪测定血浆黏度、全血高切还原黏度、全血低切还原黏度、红细胞聚集指数、全血高切相对指数、全血低切相对指数、红细胞变形指数、血小板黏附率。

**1.3 组织病理学检查** 家兔采用空气栓塞处死, 取肝脏标本, 置于 10% 中性甲醛溶液中固定 24 h, 做常规石蜡切片, HE 染色观察。取股骨头标本置于 10% 中性甲醛溶液固定 48 h, 后置于 Plank-Rychlo 液脱钙 2 周, 常规石蜡包埋, 制成厚 4  $\mu$ m 切片, 常规 HE 染色, 置光学显微镜下观察。股骨头坏死发生率计算: 根据光学显微镜下 HE 染色观察, 股骨头坏死发生率 = 各组观察到存在坏死的动物数/本组动物数  $\times 100\%$ 。

**1.4 透射电镜细胞微观察** 每组取 2 只家兔空气栓塞处死, 在股骨头软骨下 2~3 mm 处取 2 mm  $\times$  2 mm  $\times$  2 mm 骨块, 3% 戊二醛 4  $^{\circ}$ C 环境下固定 24 h, 10% 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 4  $^{\circ}$ C 环境下脱钙 8 周, 1% 锇酸后固定, 常规包埋切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, 透射电镜观察。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS17.0 软件进行统计学数据处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 单组样本前、后比较采用配对样本  $t$  检验, 试验后样本比较采用方差分析, 股骨头坏死发生率的比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

试验中因误吸及肺部感染致实验组家兔死亡 1 只。

**2.1 血脂成分分析结果** 实验组 TC、TG、HDL、LDL、VLDL 改变差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 模型组 TC、LDL 较实验前明显升高( $P < 0.05$ )、HDL 较实验前明显降低( $P < 0.05$ )、TG、VLDL 较实验前升高( $P < 0.05$ ); 对照组各项指标与实验组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。实验组 TC、TG、

HDL、LDL、VLDL 与模型组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 1。

**2.2 血液流变学分析结果** 实验结束后, 实验组全血高切还原黏度、全血高切相对指数及全血低切相对指数较实验前升高( $P < 0.05$ )。模型组血浆黏度、全血高切还原黏度、全血低切还原黏度、红细胞聚集指数、血小板黏附率、全血低切相对指数较实验前升高( $P < 0.05$ )。模型组血浆黏度、全血高切还原黏度、全血低切还原黏度及红细胞聚集指数与实验组和对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 2。

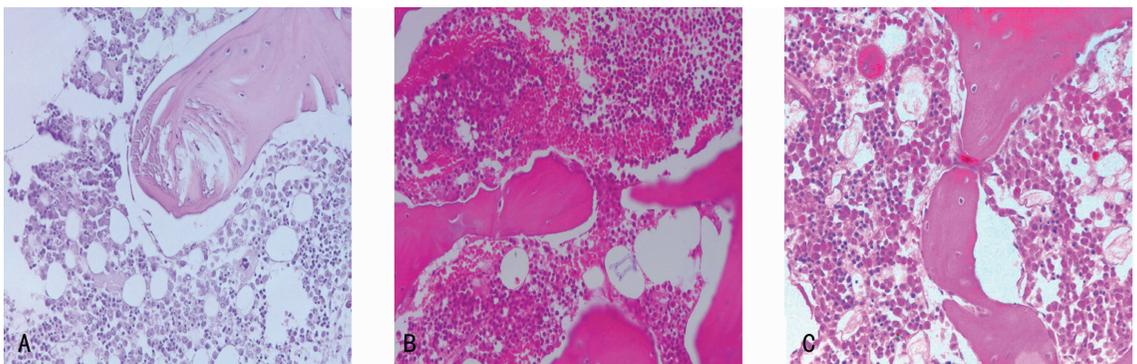
**2.3 组织病理学观察**

**2.3.1 肝脏** 光学显微镜下模型组家兔肝细胞见明显的脂肪颗粒, 在肝细胞内聚集成气球样变性, 部分肝细胞发生凝固性坏死, 周围炎性细胞浸润。实验组见肝细胞轻度水肿。对照组未见明显的病理学改变。

**2.3.2 股骨头** 肉眼见模型组家兔股骨头表面失去光泽, 未见软骨凹陷及明显的坏死改变, 实验组和对照组形态无变化。光学显微镜下, 模型组骨髓细胞可见明显凝固性坏死, 髓内骨髓细胞减少, 脂肪组织增多, 脂肪细胞肥大, 骨小梁钙质脱失、疏松, 部分骨小梁崩裂, 空骨陷窝增多; 实验组镜下病理改变较模型组轻微; 对照组未见镜下改变(图 1)。

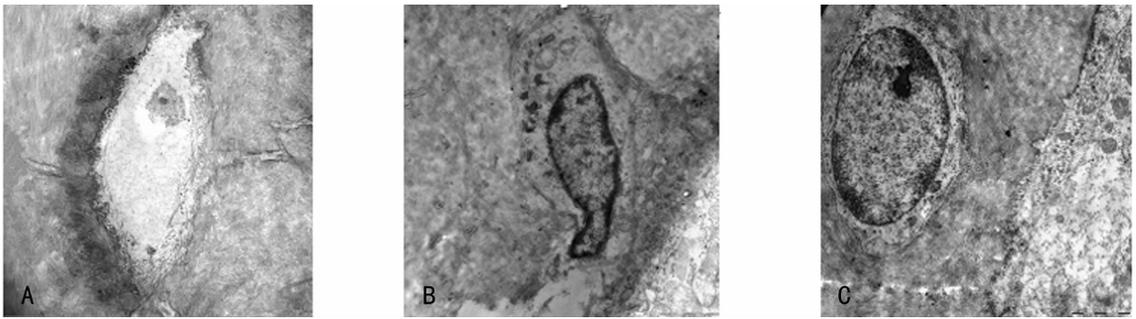
**2.3.3 骨细胞** 模型组透射电镜下观察家兔骨细胞细胞膜结构消失, 胞质内细胞器溶解, 细胞核膜不清、核固缩, 仅留下细胞轮廓; 实验组骨细胞微观改变不明显, 与对照组比较基本无变化(图 2)。

**2.3.4 股骨头坏死发生率** 实验组、模型组及对照组股骨头坏死发生率分别为 9.1% (1/11)、83.3% (10/12) 和 0 (0/6)。模型组与实验组、对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



A: 模型组; B: 实验组; C: 对照组。

图 1 光学显微镜下家兔股骨头组织( $\times 200$ )



A: 模型组; B: 实验组; C: 对照组。

图 2 透射电镜下 3 组家兔骨细胞( $\times 15\ 000$ )表 2 3 组家兔实验前、后血液流变学检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	血浆黏度 (mPa·s)	全血高切 还原黏度 (mPa·s)	全血低切 还原黏度 (mPa·s)	红细胞 聚集指数	全血高切 相对指数	全血低切 相对指数	红细胞 变形指数	血小板 黏附率(%)
实验组	12	实验前	1.26±0.13	5.04±1.08	32.96±10.46	4.54±0.60	2.24±0.28	10.09±1.29	0.81±0.15	36.67±0.59
模型组	12		1.25±0.12	5.53±1.18	31.09±4.83	4.00±0.29	2.92±0.58	11.65±2.38	0.80±0.09	36.13±0.29
对照组	6		1.26±0.11	4.98±0.90	29.93±1.99	4.12±0.13	2.73±0.64	11.25±2.68	0.76±0.06	36.25±0.13
实验组	12	实验后	1.26±0.05*	6.07±0.59*▲△	41.72±3.84*▲△	4.66±0.24*△	2.67±0.26▲	12.47±1.56*▲	0.87±0.04△	36.79±0.24△
模型组	12		1.43±0.13▲△	6.84±0.41▲△	47.58±4.04▲△	5.07±0.36▲△	3.00±0.40	14.82±2.34▲△	0.86±0.05△	37.07±0.44▲△
对照组	6		1.24±0.15	5.36±0.37	29.81±1.33	3.98±0.17	2.93±0.39	11.68±1.62	0.79±0.09	36.11±0.17

\* :  $P < 0.05$ , 与同期模型组比较; △ :  $P < 0.05$ , 与同期对照组比较; ▲ :  $P < 0.05$ , 与实验前同组比较。

### 3 讨论

**3.1 普伐他汀可以防止乙醇引起的股骨头坏死** 酒精性股骨头坏死的发生机制尚不清楚, 研究认为是由多种因素综合作用的结果。乙醇可导致高脂血症、脂肪肝和脂质代谢紊乱, 股骨头髓内脂肪细胞肥大, 骨细胞凋亡<sup>[4-6]</sup>。本研究发现, 模型组家兔 TC、TG、LDL 较实验前明显升高, HDL 较实验前明显降低, VLDL 较实验前升高。对照组并无上述改变。此结果与相关学者关于酒精性股骨头坏死, 脂代谢紊乱的结果相似<sup>[7-8]</sup>。另外, 病理检查发现模型组有 83% (10/12) 的家兔发生了不同程度的骨小梁塌陷、崩解、骨细胞死亡等, 而同期实验组、对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明降脂药普伐他汀对乙醇所致股骨头坏死的发生有预防作用。

**3.2 普伐他汀能抑制血小板聚集, 防止骨坏死** 长期饮酒可出现血液高凝状态、血栓形成, 导致骨髓腔内血流减少, 引起缺血、坏死。帅波等<sup>[9]</sup>研究发现, NONFH 患者血小板颗粒数量及血小板表面膜糖蛋白 GP II b/III a (PAC-1) 活化率明显增高。这些物质在介导血小板活化及血栓形成的过程中起重要作用<sup>[10]</sup>。本研究发现, 给予家兔高浓度乙醇灌胃 3 个月后, 其血浆黏度、全血高切还原黏度、全血低切还原黏度、血小板黏附率、红细胞聚集指数明显增加, 与实验前比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明大量活化的血小板刺激血液高凝状态产生, 最终导致血栓形成, 引起骨缺血、骨坏死<sup>[11]</sup>。实验组的家兔预防性口服普伐他汀片, 发现其血小板黏附率、红细胞聚集指数、血浆黏度、全血高切还原黏度、全血低切还原黏度稍有升高, 但与实验前比较差异有统计学意义。说明普伐他汀可抑制乙醇引起的血小板活化, 从而抑制血小板聚集及血栓形成, 防止骨坏死。

**3.3 普伐他汀可防止乙醇对骨细胞的损害** 乙醇对骨组织的毒性作用可直接引起股骨头坏死<sup>[12-13]</sup>。有研究发现, 缺血性

股骨头坏死的血管再生和新骨形成的能力明显减弱。乙醇可刺激股骨头局部血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、骨形态发生蛋白 mRNA 表达降低, 引起股骨头坏死<sup>[14]</sup>。王维军等<sup>[15]</sup>研究认为, 大量饮酒后可见股骨头内骨细胞减少、骨髓间充质干细胞增殖活性降低及分化方向改变, 骨化减少, 导致骨坏死。本研究发现, 光学显微镜下模型组骨小梁钙质明显脱失、稀疏, 部分骨小梁崩解, 骨髓内骨细胞密度显著降低, 髓内脂肪细胞明显增多。透射电镜下观察见模型组动物骨细胞膜结构消失, 胞质内细胞器溶解, 细胞核膜不清、核固缩, 仅留下细胞轮廓。对照组并无上述改变。说明乙醇可刺激骨细胞凋亡, 引起股骨头坏死。同期实验组骨细胞并无明显改变。说明普伐他汀能够在一定程度上预防乙醇引起的骨细胞凋亡、坏死, 防止股骨头坏死。

综上所述, 本研究采用普伐他汀可有效预防乙醇引起的家兔高脂血症、降低血小板活化及红细胞聚集, 防止小血管栓塞, 防止乙醇引起的骨细胞凋亡, 对酒精性股骨头坏死的发生有一定的预防作用。

### 参考文献:

- [1] 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]. J Bone Joint Surg Am, 2009, 91(12): 2903-2914.
- [2] 王少华, 王义生, 李月白. siRNA 腺病毒载体预防兔酒精性股骨头坏死的动物实验研究[J]. 中国骨与关节外科, 2010, 3(1): 62-67.
- [3] 王大伟, 史宝明, 张爽. 构建酒精性股骨头坏死动物模型理论依据及造模方法[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(50): 9413-9416.

## 参考文献:

- [1] 王小宁,徐青,黄庆娟,等. 多层螺旋 CT 尿路造影诊断泌尿系病变的价值(附 40 例分析)[J]. 医学影像学杂志, 2004,14(5):395-398.
- [2] Joffe SA, Servaes S, Okon S, et al. Multidetector row CT urography in the evaluation of hematuria[J]. Radiographics, 2003,23(6):1441-1445.
- [3] 杨春明,朱育焱,毕建斌,等. 输尿管良性肿瘤的诊断与治疗[J]. 中国现代医学杂志, 2012,22(5):66-67.
- [4] Prunel P, Verhoest G, Boudry G, et al. Impact of low-dose CT in the diagnosis and treatment of renal colic in emergency department[J]. Prog Urol, 2010,20(9):633-637.
- [5] 庄启湘,胡春洪. 两种 64 层 CT 尿路成像方法对输尿管结石诊断的价值[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2008,6(4):54-57.
- [6] 赖振辉,李晓君,崔东,等. 多层螺旋 CT 泌尿系造影(MSCTU)对输尿管结石的临床应用价值[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2012,10(2):99-103.
- [7] 陈刚,吴小侯,尹志康,等. 多层螺旋 CT 平扫联合尿路重建在急性肾绞痛诊断中的临床应用[J]. 重庆医学, 2011,40(33):3357-3358.
- [8] Chlapoutakis K, Theocharopoulos N, Yarmenitis S, et al. Performance of computed tomographic urography in diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma, in patients presenting with hematuria: systematic review and meta-analysis[J]. Eur J Radiol, 2010,73(2):334-338.
- [9] 马存文,吴岩,梁岭,等. 多层螺旋 CT 尿路成像诊断上尿路先天性异常[J]. 中国医学影像技术, 2010,26(12):2354-2356.
- [10] Kemper J, Adam G, Nolte-Ernsting C. Modern diagnostic assessment of the upper urinary tract using multislice CT urography[J]. Rofo, 2006,178(11):1086-1094.
- [11] Nolte-Ernsting C, Cowan N. Understanding multislice CT urography techniques: many roads lead to rome[J]. Eur Radiol, 2006,16(12):2670-2686.
- [12] Kawamoto S, Horton KM, Fishman EK. Computed tomography urography with 16-channel multidetector computed tomography: a pictorial review[J]. J Comput Assist Tomogr, 2004,28(5):581-587.
- [13] Chow LC, Sommer FG. Multidetector CT urography with abdominal compression and three-dimensional reconstruction[J]. AJR Am J Roentgenol, 2001,177(4):849-855.
- [14] 叶素贞,李汉文,梁月屏,等. 16 层螺旋 CT 多平面重建在诊断前列腺癌中的应用[J]. 重庆医学, 2009,38(14):1790-1795.
- [15] 李振华,宫大鑫,孔垂泽. CT 尿路造影在肾盂输尿管癌诊断和分期中的价值[J]. 中国现代医学杂志, 2009,18(22):3369-3371.

(收稿日期:2012-11-01 修回日期:2013-01-19)

(上接第 976 页)

- [4] Wang Y, Yin L, Li Y, et al. Preventive effects of puerarin on alcohol-induced osteonecrosis [J]. Clin Orthop Relat Res, 2008,466(5):1059-1067.
- [5] 孙伟,王佰亮,李子荣,等. 酒精性股骨头坏死股骨干骺端骨髓间质干细胞细胞周期的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008,12(3):469-472.
- [6] Suh KT, Kim SW, Roh HL, et al. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis [J]. Clin Orthop Relat Res, 2005(431):220-225.
- [7] 石少辉,李子荣,孙伟,等. 酒精性和激素性股骨头坏死的发病与脂质代谢[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(17):3217-3220.
- [8] Glueck CJ, Freiberg RA, Boppana S, et al. Thrombophilia, hypofibrinolysis, the eNOST-786C polymorphism, and multifocal osteonecrosis[J]. Bone Joint Surg Am, 2008,90(10):2220-2229.
- [9] 帅波,沈霖,杨艳萍,等. 股骨头缺血性坏死患者血小板微颗粒及血小板膜糖蛋白 GP II b/III a、P 选择素表达的相关性研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2010,18(13):1107-1110.
- [10] Kang P, Shen B, Yang J, et al. Circulating platelet-derived microparticles may be a potential cause of microthrombosis in patients with osteonecrosis of the femoral head[J]. Thromb Res, 2008,123(2):367-373.
- [11] Jones JP. Alcoholism, hypercortisonism, fat embolism and osseous avascular necrosis [J]. Clin Orthop Relat Res, 2001(393):4-12.
- [12] Calder JD, BATTERY L, Revell PA, et al. Apoptosis—a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg Br, 2004,86(8):1209-1213.
- [13] Segin C, Kassis J, Busque L, et al. Non-traumatic necrosis of bone osteonecrosis is associated with endothelial cell activation but not thrombophilia[J]. Rheumatology, 2008,47(6):1151-1155.
- [14] Gong Z, Wenzeman FH. Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2004,28(3):468-479.
- [15] 王维军,李嗣生,牛东生,等. 股骨头缺血性坏死骨质含量与 VEGF、bFGF、BMP-2 mRNA 表达的相关性研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011,25(8):984-991.

(收稿日期:2012-09-26 修回日期:2013-01-21)