

米酒对兔股骨头成骨细胞 破骨细胞及 骨内压影响的动态观察

黄思城, 李宏宇, 席立成, 韦明照, 王宏润

基金项目: 广西自然科学基金项目(编号:2014GXNSFAA118186)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院骨科(黄思城,李宏宇,韦明照,王宏润); 545005 广西,柳州市工人医院骨科(席立成)

作者简介: 黄思城(1991-),男,在读硕士研究生,研究方向:关节外科、创伤骨科疾病的诊治。E-mail:394964941@qq.com

通讯作者: 李宏宇(1966-),男,医学博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:关节外科、创伤骨科疾病的诊治。E-mail:lihongyu36@sohu.163com

[摘要] **目的** 观察米酒对兔股骨头成骨细胞、破骨细胞及骨内压的影响。**方法** 将64只兔按随机数字表法分为实验组和对照组各32只。实验组采用插胃管方式给兔灌米酒,3次/周,剂量10 ml/(kg·d)。对照组采用同样方式灌等量生理盐水,灌胃前、灌胃1、3、6个月时间点分别在实验组、对照组中随机选取兔各8只,测量兔左后肢股骨头骨内压。空气栓塞法处死兔,取右后肢股骨头作为标本,经固定、脱钙、脱水、包埋等步骤,切成5 μm厚的切片,行HE染色,光镜下计算成骨细胞、破骨细胞的数量。**结果** 灌胃前、灌胃后1个月,两组成骨细胞、破骨细胞数量及骨内压相比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。灌胃后3个月、6个月,实验组成骨细胞数量较对照组少($P < 0.05$),破骨细胞数量较对照组多($P < 0.05$),骨内压较对照组高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 长期灌服米酒(>3个月)可使兔股骨头成骨细胞数量减少,破骨细胞数量增多,骨内压上升。

[关键词] 兔; 米酒; 成骨细胞; 破骨细胞; 骨内压

[中图分类号] R 683.42 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)02-0150-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.02.09

Dynamic effects of rice wine on osteoblasts, osteoclasts and intraosseous pressure of rabbit femoral head

HUANG Si-cheng, LI Hong-yu, XI Li-cheng, et al. Department of Orthopedics, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of rice wine on osteoblasts, osteoclasts and intraosseous pressure of rabbit femoral head. **Methods** Sixty-four rabbits were randomly divided into experimental group and control group according to random number table method, with 32 cases in each group. The experimental group was given rice wine in a dose of 10 ml/(kg·d) by inserting stomach tube, 3 times a week. The control group was given the same amount of normal saline in the same way. Eight rabbits were randomly selected from the two groups respectively before and 1, 3, 6 months after experiment. The rabbits were sacrificed by air embolization after the internal pressure of the femoral head of left hind limbs was measured, and then the femoral head of right hind limbs was taken as specimens. The specimens underwent fixation, decalcification, dehydration, embedding and other steps, cutting to 5 μm, HE staining, and the number of osteoblasts and osteoclasts were calculated under light microscope. **Results** There were no significant differences in the number of osteoblasts, osteoclasts and intraosseous pressure between the two groups before and one month after intragastric administration ($P > 0.05$). The number of osteoblasts was significantly less, and the number of osteoclasts was significantly more, and the intraosseous pressure was significantly higher in the experimental group than those in the control group 3 and 6 months after intragastric administration ($P < 0.05$). **Conclusion** Long-term oral administration of rice wine (more than 3 months) can decrease the number of osteoblasts, increase the number of osteoclasts and raise the intraosseous pressure in the femoral head of rabbits.

[Key words] Rabbit; Rice wine; Osteoblast; Osteoclast; Intraosseous pressure

长期大量饮酒可造成髌关节疼痛、功能障碍,严重影响患者生活质量,即酒精性股骨头坏死。酒精性股骨头坏死发病机制尚不明确,主要有脂质紊乱学说、微循环障碍学说、骨内高压学说^[1]。长期大量饮酒可使股骨头骨密度降低,骨脆性增加,同时骨内压上升,微血管受压迫,微循环障碍,骨组织细胞进行性缺血,最终导致股骨头坏死。当前国内外关于米酒对兔股骨头成骨细胞、破骨细胞及骨内压影响的动态观察鲜有报道。本研究旨在动态观察长期灌服米酒对兔股骨头成骨细胞、破骨细胞及骨内压的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料 (1)实验动物:选用标准雄性新西兰大白兔 64 只(体重 2.5 ~ 3.0 kg,兔龄 5 ~ 6 个月,由广西医科大学动物实验中心供应,许可证编号 2016-0004)。研究得到动物实验中心伦理委员会批准。(2)米酒、主要仪器及试剂:广西中南部特殊米酒(酒精度 25%,市场购买)。光学显微镜(BH-2 型,日本 Olympus 公司),石蜡切片机(德国 Leica 公司),包埋机(德国 Lecia 公司),电子分析天平(日本 Sartortel 公司),BL-420 生物机能实验系统(成都泰盟),穿刺针(上海埃斯),YH-4 生理压力传感器(杭州雷琪)。苏木素伊红染色试剂盒(武汉博士德),4%多聚甲醛(武汉博士德),10%乙二胺四乙酸二钠盐(武汉博士德),肝素钠注射液(北京鼎国),二甲苯(北京索莱宝)等其他试剂。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组及干预方法 按随机数字表法将 64 只兔分为实验组和对照组各 32 只。(1)实验组:取仰卧位,将兔四肢固定,用绳子套住上、下颌牙,用适当的力度分别向头、下肢方向牵拉,兔张开口后插胃管,用 50 ml 注射器灌注米酒,3 次/周(星期一、星期三和星期六),剂量 10 ml/(kg · d)。(2)对照组:用同样方式灌注等量生理盐水。两组兔均专人管理,采用单笼喂养方式,饲养条件、管理条件一致。

1.2.2 骨内压测量方法 在灌胃前、灌胃后 1、3、6 个月随机选取两组兔各 8 只,测量两组兔左后肢股骨头骨内压。仪器准备:输液管制成三通装置,并将肝素钠注射液 12 500 U 稀释后抽入 20 ml 注射器中,连接三通装置的一端,生物机能实验系统连接另一端,备用。操作方法:用氯胺酮注射液(0.10 ml/kg)肌注麻醉后固定在手术台上,消毒大转子对应周围皮肤,切开长 1 ~ 1.5 cm 切口,暴露大转子和股骨粗隆,骨穿刺针平行股骨颈穿入股骨头髓腔内,导针退

至三通管开口(导针不完全退出,预防针管与外界环境相通,造成骨内压降低,影响实验数据),关闭穿刺阀门,连接备用的三通装置的另一端,保持穿刺针、压力传感器与兔心脏在同一水平,检查各路通畅后,打开穿刺针阀门开始测压,记录压力数据和曲线,连续测量 15 ~ 30 min,以压力平衡后的均值作为该部位的骨内压数值。

1.2.3 股骨头 HE 染色 检测骨内压后,用空气栓塞法处死兔,取右后肢股骨头,将股骨头沿冠状面剖开,用咬骨钳等工具去除负重区软骨,并做成 5 mm × 4 mm × 2 mm 小块,迅速用 4%多聚甲醛固定 24 ~ 48 h,10%乙二胺四乙酸二钠盐脱钙,7 d 更换一次脱钙液,脱钙至针刺无明显阻力感即可,酒精脱水、石蜡包埋,5 μm 厚切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,苏木精液染色,盐酸乙醇分化,伊红染色,酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜下观察。每张切片在 200 倍镜下观察,随机选择 5 个视野,计算视野内破骨细胞与成骨细胞的数量,取平均值。

1.3 统计学方法 应用 SPSS20.0 统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

兔存活情况:对照组兔 22 周时死 1 只,实验组兔 15 周、21 周时各死 1 只,故对照组、实验组在灌胃 6 个月分别纳入 7 只、6 只兔进行实验检测。

2.1 两组股骨头骨内压检测结果比较 灌胃前、灌胃后 1 个月,两组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);灌胃 3 个月、6 个月,实验组均高于对照组同时点骨内压(*P* < 0.05)。实验组的骨内压在灌胃 3 个月、6 个月与灌胃前、灌胃 1 个月比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),灌胃 6 个月与灌胃 3 个月骨内压比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。随灌胃时间延长,骨内压逐渐上升。见表 1。

表 1 两组股骨头成骨细胞、破骨细胞及骨内压检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

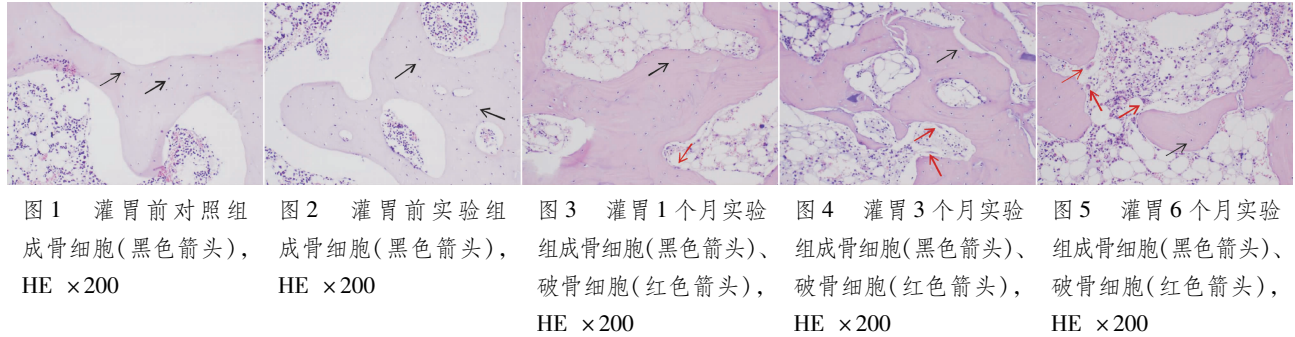
组 别	例数	成骨细胞 (个/视野)	破骨细胞 (个/视野)	骨内压 (mmHg)
实验组	30			
灌胃前	8	67.54 ± 5.67	1.51 ± 0.47	19.04 ± 3.32
灌胃 1 个月	8	63.38 ± 5.23	1.88 ± 0.63	20.78 ± 3.46
灌胃 3 个月	8	56.45 ± 4.35 ^{※△☆}	2.62 ± 1.14 ^{※△☆}	27.38 ± 4.59 ^{※△☆}
灌胃 6 个月	6	41.37 ± 5.86 ^{※△☆★}	4.43 ± 1.76 ^{※△☆★}	36.75 ± 5.49 ^{※△☆★}
对照组	31			
灌胃前	8	67.13 ± 5.48	1.55 ± 0.38	19.32 ± 3.17
灌胃 1 个月	8	65.75 ± 4.73	1.83 ± 0.56	20.04 ± 3.06
灌胃 3 个月	8	64.87 ± 4.32	1.69 ± 0.35	19.58 ± 3.32
灌胃 6 个月	7	65.94 ± 5.08	1.72 ± 0.43	19.42 ± 3.59

注:与对照组同一时间点比较,※*P* < 0.05;与同组灌胃前比较,△*P* < 0.05;与同组灌胃 1 个月比较,☆*P* < 0.05;与同组灌胃 3 个月比较,★*P* < 0.05

2.2 光镜下观察结果 灌胃前、灌胃后 1 个月,两组骨小梁结构完整,排列整齐,极少空骨陷窝,脂肪细胞较少;灌胃 3 个月,实验组骨小梁变细,少量空骨陷窝和不连续性骨碎片,对照组无明显变化;灌胃 6 个月,实验组骨小梁稀疏,部分断裂,形态不规则,较多空骨陷窝、骨碎片及纤维组织,脂肪细胞增生肥大,压迫部分血管,脂肪细胞与骨小梁之间可见较多单核细胞、淋巴细胞,对照组无明显变化。

2.3 两组股骨头成骨细胞和破骨细胞检测结果比较 灌胃前、灌胃后 1 个月,两组成骨细胞、破骨细胞

数量比较差异无统计学意义($P > 0.05$) (见图 1~3);灌胃后 3 个月、6 个月,实验组成骨细胞数量低于同时点对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),破骨细胞高于同时点对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$) (见图 4,5)。实验组灌胃 3 个月、6 个月的破骨细胞、成骨细胞数量与灌胃前、灌胃 1 个月比较差异有统计学意义($P < 0.05$),灌胃 6 个月与灌胃 3 个月比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。随灌胃时间延长,实验组成骨细胞数量逐渐减少,破骨细胞数量逐渐增多。见表 1。



3 讨论

3.1 成骨细胞是一种主要来源于骨髓间充质干细胞(BMSCs),负责骨基质的生成、分泌和矿化,参与骨形成、调控破骨细胞生物学功能的重要细胞^[2]。成骨细胞数量和功能降低,骨修复能力减弱,不利于微骨折愈合。研究表明,酒精能促进 BMSCs 过氧化物酶体增殖激活受体(PPAR γ)的表达,而 PPAR γ 的高表达使 BMSCs 向成骨细胞成骨分化的能力减弱,而加强了向成脂方向分化的能力^[3]。Chen 等^[4]研究发现,酒精能抑制 Wnt/ β -Catenin 信号通路,激活肿瘤坏死因子 α 信号通道,抑制 BMSCs 的成骨分化。酒精能激活基因 p21 与 p53,降低成骨细胞的数量和功能,骨修复能力减弱^[5]。本实验结果显示,在短时间内(< 1 个月),米酒灌胃对兔股骨头成骨细胞数量无明显影响,但灌胃 3 个月、6 个月时,成骨细胞数量较对照组少,且随着灌胃时间延长,数量逐渐减少,提示长期米酒灌胃可显著减少成骨细胞数量,这可能是与长期饮酒降低了 BMSCs 数量有关^[6-8]。

3.2 破骨细胞是一种具有降解骨组织中的有机物和无机矿物,并能调控骨髓造血系统、骨基质形成的多核细胞^[9-11]。破骨细胞发挥骨吸收作用的机制是通过封闭的褶皱缘区上的 H⁺-ATP 酶,将质子分泌到细胞外骨吸收区域,膜上氯离子通道在胞外的酸性微环境下分泌 Cl⁻,然后 H⁺ 和 Cl⁻ 结合形成 HCl,溶解羟基磷灰石晶体,在 HCl 和蛋白溶解酶作用下发

挥溶解骨基质功能。有研究认为,酒精可使骨细胞凋亡速度加快,直接或间接促进破骨前体细胞分化与招募,破骨细胞生成增多,骨吸收的活性增强,这与骨丢失密切相关^[11,12]。酒精也可以增加破骨细胞的活性,这可能与活性氧有关^[13]。Lee 等^[14]认为,破骨细胞和成骨细胞两者的数量和生物学功能存在密切关系,成骨细胞数量减少将减弱对破骨细胞的形成、生物学功能的抑制作用。本实验结果显示,灌胃时间短时,米酒对兔股骨头破骨细胞数量无显著影响,但灌胃 3 个月、6 个月时,破骨细胞数量逐渐增多,提示长期米酒灌胃可增加兔股骨头破骨细胞的数量,这可能与长期饮酒激活了骨细胞凋亡相关的肿瘤坏死因子、p53 及 B 细胞淋巴瘤家族等基因相关,或可能与成骨细胞减少进而对破骨细胞的抑制作用减弱有关^[15]。

3.3 骨内压是指骨髓腔内动静脉血流动力产生的压力,是反映骨微循环状态和骨内血流动力学的可靠指标。长期大量饮酒可造成骨内压升高,但其具体机制尚无统一观点。陈跃平^[6]认为酒精可引起骨髓脂肪细胞大量增生、肥大,而骨髓腔密闭、容积恒定,造成骨内压上升,同时增生、肥大的脂肪细胞压迫髓腔内的微循环血管,既引起骨内血流减少和骨组织细胞缺血、缺氧,又使静脉回流受阻,有毒代谢产物排出障碍,积聚于微血管中,此时毛细血管通透性增加,渗出增多,骨髓间质水肿,进一步增加了

骨内压,形成恶性循环,最终可能造成股骨头缺血性坏死。本实验结果显示,米酒灌胃 >3 个月时,兔骨内压较对照组增高,并随灌胃米酒时间延长而逐渐上升,同时光镜下脂肪细胞增生、肥大,压迫血管,这可能是骨内压升高的原因之一。

综上所述,长期摄入米酒(>3 个月),一方面使股骨头破骨细胞增加而成骨细胞减少,抑制了坏死骨组织的成骨能力,加快了病变骨细胞周围的骨基质溶解的进程,导致死骨的清除和骨重建效率降低,骨脆性增加;另一方面,骨内压上升,造成微循环受损,甚至血流中断,大量骨组织细胞缺血、缺氧,甚至坏死,两者共同影响,最终可能导致股骨头坏死。

参考文献

- Gou WL, Lu Q, Wang X, et al. Key pathway to prevent the collapse of femoral head in osteonecrosis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015,19(15):2766-2774.
- 陈俊宇,王建忠.成骨细胞、破骨细胞与酒精性股骨头坏死的关联性:预防与靶向治疗的新思路[J].中国组织工程研究,2016,20(46):6963-6969.
- Li J, Wang Y, Li Y, et al. The effect of combined regulation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and calcitonin gene-related peptide on alcohol-induced adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Mol Cell Biochem,2014,392(1-2):39-48.
- Chen Y, Chen L, Yin Q, et al. Reciprocal interferences of TNF- α and Wnt1/ β -catenin signaling axes shift bone marrow-derived stem cells towards osteoblast lineage after ethanol exposure[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32(3):755-765.
- Chen Y, Gao H, Yin Q, et al. ER stress activating ATF4/CHOP-TNF- α signaling pathway contributes to alcohol-induced disruption of

- osteogenic lineage of multipotential mesenchymal stem cell[J]. Cell Physiol Biochem, 2013,32(3):743-754.
- 陈跃平.酒精对特发性股骨头坏死骨髓成骨微环境作用机制研究[D].广州:南方医科大学,2014.
- Han N, Li Z, Cai Z, et al. P-glycoprotein overexpression in bone marrow-derived multipotent stromal cells decreases the risk of steroid-induced osteonecrosis in the femoral head[J]. J Cell Mol Med, 2016,20(11):2173-2182.
- Song H, Tao L, Wang F, et al. Effect of bone mesenchymal stem cells transplantation on the micro-environment of early osteonecrosis of the femoral head[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11):14528-14534.
- Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, et al. Reprint of: The Great Beauty of the osteoclast[J]. Arch Biochem Biophys, 2014,561:13-21.
- Lymperi S, Ersek A, Ferraro F, et al. Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo[J]. Blood, 2011,117(5):1540-1549.
- Oury F, Ferron M, Huizhen W, et al. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis[J]. J Clin Invest, 2015,125(5):2180.
- Al-Dujaili SA, Lau E, Al-Dujaili H, et al. Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation in vitro[J]. J Cell Biochem,2011,112(9):2412-2423.
- 陈亦轩,朱道宇,殷俊辉,等.酒精性股骨头坏死研究进展[J].国际骨科学杂志,2018,39(1):28-32.
- Lee SW, Kwak HB, Chung WJ, et al. Participation of protein kinase C beta in osteoclast differentiation and function[J]. Bone, 2003, 32(3):217-227.
- 黎金焕,陈跃平.骨细胞凋亡在酒精性股骨头缺血性坏死中的作用[J].中国组织工程研究,2016,20(15):2241-2247.

[收稿日期 2018-08-16][本文编辑 余军 吕文娟]

本刊应用“科技期刊学术不端文献检测系统”的通知

各位作者:

本刊已从2011年起对所有来稿应用知网的“科技期刊学术不端文献检测系统”(AMLC)进行“学术不端文献”自动检测,凡论文存在有抄袭、复制(>30%)、一稿多投等学术不端行为者一律不予采用。

· 本刊编辑部 ·