

· 基础研究 ·

# 激素性股骨头坏死和酒精性股骨头坏死的病理学差异及其分子机制研究

沈莹珊<sup>1</sup>, 何敏聪<sup>2</sup>, 庄至坤<sup>3</sup>, 何晓铭<sup>2</sup>, 李子祺<sup>2</sup>, 郑越生<sup>4</sup>, 何伟<sup>2</sup>, 魏秋实<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405;

2. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510240;

3. 泉州市正骨医院, 福建 泉州 362000;

4. 广州中医药大学金沙洲医院, 广东 广州 510168)

**摘要 目的:**探讨激素性股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)和酒精性 ONFH 的病理学差异及其分子机制。

**方法:**纳入接受人工全髋关节置换术治疗的 ONFH 患者的股骨头 60 个,根据患者发生 ONFH 的病因,将股骨头分为激素性 ONFH 组和酒精性 ONFH 组。将股骨头做冠状面逐层切片后,观察 2 组股骨头的分区情况及病理特点;于股骨头正中切片上分别取坏死区、硬化区、正常区的骨组织,处理后采用扫描电镜观察 2 组股骨头不同区域骨组织的结构特点;分离股骨头坏死区、硬化区、正常区的骨组织,采用蛋白印迹法检测 2 组股骨头各区骨组织中血小板-内皮细胞粘附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)、内皮粘蛋白(endomucin, EMCN)、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)-BB、表皮生长因子样结构域 8(epidermal growth factor-like domain 8, EGFL8)及骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)的表达量。**结果:**股骨头切片显示,激素性 ONFH 组股骨头坏死区与硬化区交界处有新鲜肉芽组织,酒精性 ONFH 组股骨头坏死区与硬化区交界处无新鲜肉芽组织,有纤维组织填充。扫描电镜图像显示,激素性 ONFH 组股骨头的坏死区骨细胞胞体呈现粗糙、溶解样,周围有树突包裹,有骨小管分布;硬化区骨细胞胞体较正常骨细胞略小,树突缩短、数量减少,有骨小管分布;正常区有丰富的骨小管分布。酒精性 ONFH 组股骨头的坏死区骨细胞萎缩,甚至消失,未见树突与骨小管分布;硬化区骨细胞萎缩、体积较小,树突稀疏,骨小管小、数量少;正常区骨小管较小、数量较少。激素性 ONFH 组股骨头坏死区、硬化区、正常区骨组织中 PECAM-1、EMCN、EGFL8,坏死区、硬化区骨组织中 PDGF-BB,硬化区骨组织中 BMP-2 的蛋白表达量均高于酒精性 ONFH 组(PECAM-1:  $1.970 \pm 0.053$ ,  $0.493 \pm 0.076$ ,  $t = 0.453$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.797 \pm 0.047$ ,  $0.467 \pm 0.025$ ,  $t = 1.910$ ,  $P = 0.000$ ;  $2.207 \pm 0.045$ ,  $1.443 \pm 0.118$ ,  $t = 4.993$ ,  $P = 0.000$ ; EMCN:  $1.277 \pm 0.038$ ,  $1.077 \pm 0.025$ ,  $t = 1.087$ ,  $P = 0.002$ ;  $2.220 \pm 0.106$ ,  $0.270 \pm 0.036$ ,  $t = 4.655$ ,  $P = 0.000$ ;  $2.400 \pm 0.046$ ,  $0.473 \pm 0.126$ ,  $t = 2.494$ ,  $P = 0.000$ ; EGFL8:  $4.443 \pm 0.313$ ,  $1.043 \pm 0.091$ ,  $t = 4.106$ ,  $P = 0.000$ ;  $1.833 \pm 0.096$ ,  $0.090 \pm 0.030$ ,  $t = 2.969$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.553 \pm 0.110$ ,  $0.130 \pm 0.010$ ,  $t = 8.892$ ,  $P = 0.021$ ; PDGF-BB:  $1.413 \pm 0.040$ ,  $0.223 \pm 0.006$ ,  $t = 4.654$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.980 \pm 0.036$ ,  $0.193 \pm 0.015$ ,  $t = 2.579$ ,  $P = 0.000$ ; BMP-2:  $0.417 \pm 0.023$ ,  $0.270 \pm 0.036$ ,  $t = 0.810$ ,  $P = 0.004$ ),坏死区骨组织中 BMP-2 的蛋白表达量低于酒精性 ONFH 组( $0.343 \pm 0.070$ ,  $1.160 \pm 0.056$ ,  $t = 0.116$ ,  $P = 0.000$ );激素性 ONFH 组股骨头正常区骨组织中 PDGF-BB、BMP-2 的蛋白表达量与酒精性 ONFH 组比较,组间差异均无统计学意义( $0.250 \pm 0.056$ ,  $0.287 \pm 0.031$ ,  $t = 1.062$ ,  $P = 0.374$ ;  $0.263 \pm 0.025$ ,  $0.320 \pm 0.036$ ,  $t = 0.604$ ,  $P = 0.089$ )。**结论:**与激素性 ONFH 相比,酒精性 ONFH 的股骨头坏死区与硬化区交界处无新鲜肉芽组织、有纤维组织填充,坏死区、硬化区的骨细胞明显萎缩,各区骨小管更小、数量更少,这种病理学差异与股骨头不同区域骨组织中血管生成蛋白和骨代谢相关蛋白的表达有关。

**关键词** 股骨头坏死;激素类;饮酒;病理学特点;显微镜检查,电子,扫描;印迹法,蛋白质

## Pathological differences between steroid-induced and alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head and their molecular mechanisms

SHEN Yingshan<sup>1</sup>, HE Mincong<sup>2</sup>, ZHUANG Zhikun<sup>3</sup>, HE Xiaoming<sup>2</sup>, LI Ziqi<sup>2</sup>, ZHENG Yuesheng<sup>4</sup>, HE Wei<sup>2</sup>, WEI Qiushi<sup>2</sup>

1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China

基金项目:国家自然科学基金项目(81873327, 81904226);广东省自然科学基金项目(2017A030313698)

通讯作者:魏秋实 E-mail:weiqshi@126.com

2. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510240, Guangdong, China
3. Quanzhou Orthopedic-Traumatological Hospital, Quanzhou 362000, Fujian, China
4. Jinshazhou Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510168, Guangdong, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the pathological differences between steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (ONFH) and alcohol-induced ONFH, and to explore their molecular mechanisms. **Methods:** Sixty femoral heads from ONFH patients who underwent artificial total hip arthroplasty were enrolled in the study and were divided into steroid-induced ONFH group and alcohol-induced ONFH group according to the etiology of ONFH. The femoral heads were sectioned in coronal plane layer by layer, and their subregion and pathological characteristics were observed. The bone tissues from the necrotic zone, sclerotic zone and normal zone of the femoral head were harvested from the median section of the femoral head, and their structural characteristic were observed in the 2 groups using a scanning electron microscope after processing. The bone tissues from the necrotic zone, sclerotic zone and normal zone were isolated, and the protein expression levels of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), endomucin (EMCN), platelet-derived growth factor (PDGF)-BB, epidermal growth factor-like domain 8 (EGFL8) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in the bone tissues of each zone were detected using Western blot. **Results:** The femoral head sections showed that there were fresh granulation tissues at the junction of the necrotic zone and sclerotic zone in the steroid-induced ONFH group, while no fresh granulation tissues were observed, but fibrous tissues were found in alcohol-induced ONFH group. The scanning electron microscopy images showed that, in steroid-induced ONFH group, the osteocytes in the necrotic zone displayed as rough, dissolved cell bodies surrounded by dendrites, with distributed bone canaliculi. The osteocytes in the sclerotic zone displayed as slightly smaller cell bodies compared with that of normal osteocytes, with shorter and fewer dendrites and distributed bone canaliculi. The abundant bone canaliculi were found in the normal zone. While in alcohol-induced ONFH group, the osteocytes in the necrotic zone were atrophied or even disappeared, and no dendrites or bone canaliculi were observed. The osteocytes in the sclerotic zone were also atrophied, manifesting as a smaller volume with sparse dendrites and small and few bone canaliculi, meanwhile, smaller and fewer bone canaliculi were found in the normal zone. The PECAM-1, EMCN and EGFL8 in the bone tissues of the necrotic zone, sclerotic zone and normal zone, and PDGF-BB in the bone tissues of the necrotic zone and sclerotic zone, and BMP-2 in the bone tissues of the sclerotic zone were all highly expressed in the steroid-induced ONFH group compared to alcohol-induced ONFH group (PECAM-1:  $1.970 \pm 0.053$  vs  $0.493 \pm 0.076$ ,  $t = 0.453$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.797 \pm 0.047$  vs  $0.467 \pm 0.025$ ,  $t = 1.910$ ,  $P = 0.000$ ;  $2.207 \pm 0.045$  vs  $1.443 \pm 0.118$ ,  $t = 4.993$ ,  $P = 0.000$ ; EMCN:  $1.277 \pm 0.038$  vs  $1.077 \pm 0.025$ ,  $t = 1.087$ ,  $P = 0.002$ ;  $2.220 \pm 0.106$  vs  $0.270 \pm 0.036$ ,  $t = 4.655$ ,  $P = 0.000$ ;  $2.400 \pm 0.046$  vs  $0.473 \pm 0.126$ ,  $t = 2.494$ ,  $P = 0.000$ ; EGFL8:  $4.443 \pm 0.313$  vs  $1.043 \pm 0.091$ ,  $t = 4.106$ ,  $P = 0.000$ ;  $1.833 \pm 0.096$  vs  $0.090 \pm 0.030$ ,  $t = 2.969$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.553 \pm 0.110$  vs  $0.130 \pm 0.010$ ,  $t = 8.892$ ,  $P = 0.021$ ; PDGF-BB:  $1.413 \pm 0.040$  vs  $0.223 \pm 0.006$ ,  $t = 4.654$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.980 \pm 0.036$  vs  $0.193 \pm 0.015$ ,  $t = 2.579$ ,  $P = 0.000$ ; BMP-2:  $0.417 \pm 0.023$  vs  $0.270 \pm 0.036$ ,  $t = 0.810$ ,  $P = 0.004$ ), while the BMP-2 in the bone tissues of the necrotic zone was lowly expressed in the steroid-induced ONFH group compared to the alcohol-induced ONFH group ( $0.343 \pm 0.070$  vs  $1.160 \pm 0.056$ ,  $t = 0.116$ ,  $P = 0.000$ ). There was no statistical difference in the protein expression levels of PDGF-BB and BMP-2 in the bone tissues of normal zone between steroid-induced ONFH group and alcohol-induced ONFH group ( $0.250 \pm 0.056$  vs  $0.287 \pm 0.031$ ,  $t = 1.062$ ,  $P = 0.374$ ;  $0.263 \pm 0.025$  vs  $0.320 \pm 0.036$ ,  $t = 0.604$ ,  $P = 0.089$ ). **Conclusion:** Compared to steroid-induced ONFH patients, the fibrous tissues can be observed, but the fresh granulation tissues can not be observed at the junction of the necrotic zone and sclerotic zone of the femoral head in alcohol-induced ONFH patients, moreover, the osteocytes in the necrotic zone and sclerotic zone are significantly atrophied and the bone canaliculi in each zone are smaller and fewer. These pathological differences are related to the expression of vascular growth proteins and bone metabolism-related proteins in the bone tissues of different zones of the femoral head.

**Keywords** femur head necrosis; hormones; alcohol drinking; pathological characteristics microscopy, electron, scanning; Blotting, Western

股骨头坏死 (osteonecrosis of femoral head, ONFH) 是骨科常见的难治性疾病。股骨头内微循环障碍是导致骨细胞坏死并形成空骨陷窝的主要原因; 随着时间推移, 骨小梁发生微骨折, 进而导致股骨头塌陷<sup>[1]</sup>。ONFH 早期无临床症状, 随着疾病进展患者会出现髋关节疼痛、功能障碍, 甚至发生下肢残疾。

长期或过量饮酒、使用激素是导致 ONFH 发生的重要原因, 但 ONFH 的具体发病机制尚未完全明确<sup>[2]</sup>。激素性 ONFH 和酒精性 ONFH 的病因不同, 但临床症状、分期和影像学表现具有相似性<sup>[3]</sup>。前期研究结果表明, 激素性 ONFH 与酒精性 ONFH 患者股骨头坏死区的病理和结构特征存在差异<sup>[4]</sup>。为了进一步探讨

激素性 ONFH 和酒精性 ONFH 的病理学差异及其分子机制,我们进行了此项研究,现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 试验材料** 股骨头(来自于 2017 年 1 月至 2018 年 12 月在广州中医药大学第一附属医院接受人工全髋关节置换术治疗的 ONFH 患者),保存于广州中医药大学髋关节研究中心  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱。试验方案经广州中医药大学第一附属医院伦理委员会审查通过,伦理批件号:K[2019]072。

**1.1.1 股骨头纳入标准** ①股骨头来源患者符合《股骨头坏死临床诊疗规范》中的 ONFH 诊断标准<sup>[5]</sup>;②ONFH 病因为过量饮酒或过量使用激素;③ONFH 的 ARCO 分期<sup>[6]</sup>为Ⅲ期、Ⅳ期;④股骨头外形、内部无缺损。

**1.1.2 股骨头排除标准** ①股骨头来源患者有糖尿病、心血管疾病、高血压、HIV 感染等慢性病史者;②病例资料不全者。

**1.2 试验试剂** 兔抗小鼠血小板-内皮细胞粘附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)、内皮粘蛋白 (endomucin, EMCN)、血小板衍生生长因子 (Platelet derived growth factor, PDGF)-BB、表皮生长因子样结构域 8 (epidermal growth factor-like domain 8, EGFL8)、骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) G 二抗(北京博奥森生物技术有限公司),增强化学发光显色液(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

**1.3 试验仪器** RM2016 型组织切片机(德国徕卡公司),E-1010 离子溅射仪、S-3000N 型扫描电子显微镜(日本日立),WD-9413B 型凝胶成像系统(北京六一仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 分组方法** 根据股骨头来源患者发生 ONFH 的病因,将股骨头分为激素性 ONFH 组和酒精性 ONFH 组。

**2.2 股骨头组织切片观察方法** 将股骨头于室温下解冻后,采用 RM2016 型组织切片机于冠状面进行逐层切片,切片厚度 5 mm。拍照记录所有切片的截面,观察 2 组股骨头的分区情况及特点。

**2.3 股骨头不同区域骨组织扫描电镜观察方法** 取

股骨头正中切片,根据分区情况在切片的坏死区、硬化区、正常区分别随机切取 1 个规格为 5 mm × 5 mm × 5 mm 的骨组织,每组选取 3 个股骨头。将获得的骨组织以生理盐水反复冲洗,于 10% 福尔马林溶液中固定 48 h 以上;酒精逐级脱水后,采用环氧树脂溶液包埋;将包埋的标本置于室温真空釜中 24 h,使树脂完全凝固。切除多余的树脂,用砂纸将标本表面打磨光滑。超声清洗后,将标本置于 37% 磷酸溶液中约 20 s,依次用蒸馏水、5% 过氧化钠溶液洗涤。洗涤后置于室温下过夜干燥。将干燥的标本用导电胶粘在样本台上,置于 E-1010 离子溅射仪中对样品表面进行喷金。喷金后,在 S-3000N 扫描电镜下观察并拍摄照片,分析 2 组股骨头不同区域骨组织的结构特点。

**2.4 股骨头不同区域骨组织中血管生成蛋白和骨代谢相关蛋白表达量检测方法** 取 1 个股骨头的所有切片,分离坏死区、硬化区和正常区的骨组织。将坏死区、硬化区和正常区的骨组织分别加入预冷的研磨钵中,加入含有苯甲基磺酰氟的放射免疫沉淀法裂解液,于冰浴下研磨成匀浆,离心后取上清液。采用二喹啉甲酸法测定各样品蛋白浓度。调整样品蛋白浓度使蛋白上样量一致后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后,将凝胶上的蛋白湿转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。将 PVDF 膜置于 TBST 中洗涤,用 5% 脱脂奶粉于室温下封闭 60 min。加入兔抗鼠 PECAM-1、EMCN、PDGF-BB、EGFL8、BMP-2、GAPDH 一抗(1:5000),于 4℃ 孵育 2 h, TBST 洗膜;加入山羊抗兔 Ig G 二抗,常温孵育 2 h, TBST 洗膜;加入增强化学发光液显影。采用 WO-9413B 型凝胶成像系统拍照,并采用系统自带软件 Gelpro32 提取蛋白条带灰度值,以 GAPDH 作为参考,计算目标蛋白表达量。每组各随机选取 3 个股骨头进行该试验。

**2.5 数据统计方法** 采用 SPSS24.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。2 组股骨头来源患者的性别、ARCO 分期的组间比较采用  $\chi^2$  检验,年龄及坏死区、硬化区、正常区的 PECAM-1、EMCN、PDGF-BB、EGFL8、BMP-2 的蛋白表达量的组间比较均采用  $t$  检验;检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

**3.1 分组结果** 共纳入股骨头 60 个,激素性 ONFH 组和酒精性 ONFH 组各 30 个。2 组股骨头来源患者的

基线资料比较,差异无统计学意义,有可比性(表 1)。

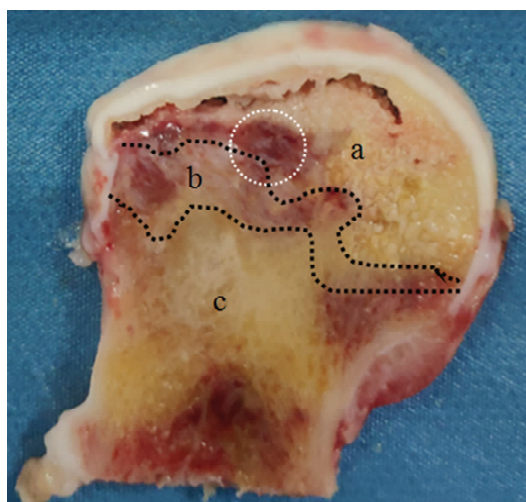
**3.2 股骨头组织切片观察结果** 股骨头切片显示,2 组股骨头均可分为坏死区、硬化区和正常区,均出现骨小梁连续性中断、骨小梁吸收区域内有囊变被肉芽组织取代;坏死区呈淡黄色,组织致密;硬化区呈灰白色,质地坚硬;激素性 ONFH 组股骨头坏死区与硬化区交界处有新鲜肉芽组织,酒精性 ONFH 组股骨头坏死区与硬化区交界处无新鲜肉芽组织,有纤维组织填充(图 1)。

**3.3 股骨头不同区域骨组织扫描电镜观察结果** 扫描电镜图像显示,激素性 ONFH 组股骨头的坏死区可见骨小梁排列稀疏、紊乱,出现断裂、塌陷;骨细胞胞

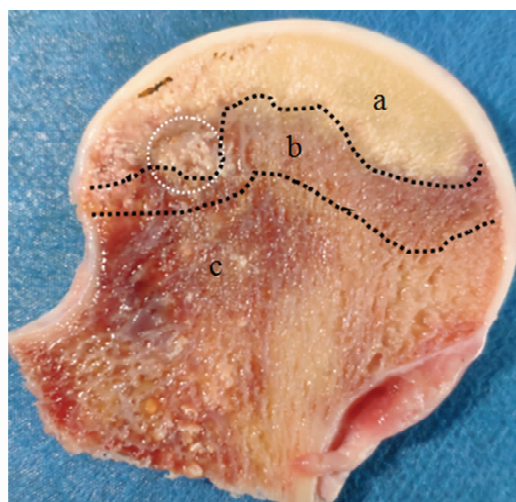
体呈现粗糙、溶解样,周围有树突包裹,有骨小管分布[图 2(1)]。硬化区骨小梁排列整齐,密度大于坏死区;骨细胞胞体较正常骨细胞略小,树突缩短、数量减少,有骨小管分布[图 2(2)]。正常区骨基质分布规则;骨细胞大而完整,有丰富的树突包裹,有丰富的骨小管分布[图 2(3)]。酒精性 ONFH 组股骨头的坏死区骨小梁排列稀疏、紊乱,可见明显断裂、塌陷;骨细胞萎缩,甚至消失,未见树突与骨小管分布[图 3(1)]。硬化区骨小梁排列稍紊乱,密度大于坏死区;骨细胞萎缩、体积较小,树突稀疏,骨小管小、数量少[图 3(2)]。正常区骨基质分布规则;骨细胞大而完整,有丰富的树突包裹,骨小管较小、数量较少[图 3(3)]。

表 1 2 组股骨头来源患者的基线资料

组别	样本量/例	性别/例		年龄/ $(\bar{x} \pm s, \text{岁})$	ARCO 分期/例	
		男	女		Ⅲ期	Ⅳ期
激素性股骨头坏死组	30	17	13	$45.630 \pm 9.676$	16	14
酒精性股骨头坏死组	30	23	7	$47.730 \pm 8.678$	10	20
检验统计量		$\chi^2 = 2.700$		$t = 386.500$	$\chi^2 = 2.443$	
P 值		0.100		0.347	0.118	



(1) 激素性股骨头坏死



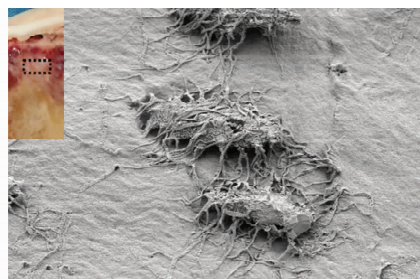
(2) 酒精性股骨头坏死

a 为坏死区, b 为硬化区, c 为正常区, 黑色虚线为各区分界线; (1) 中白色虚线圈处显示坏死区和硬化区之间有新鲜肉芽组织; (2) 中白色虚线圈处显示坏死区与硬化区之间无新鲜肉芽组织, 有纤维组织填充。

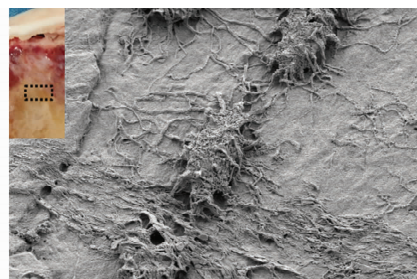
图 1 股骨头坏死患者股骨头冠状面切片



(1) 坏死区



(2) 硬化区



(3) 正常区

图 2 激素性股骨头坏死患者股骨头扫描电镜图片(×1000)



**3.4 股骨头不同区域骨组织中血管生成蛋白和骨代谢相关蛋白的表达量检测结果** 激素性 ONFH 组股骨头坏死区、硬化区、正常区骨组织中 PECAM-1、EMCN、EGFL8, 坏死区、硬化区骨组织中 PDGF-BB, 硬化区骨组织中 BMP-2 的蛋白表达量均高于酒精性

ONFH 组, 坏死区骨组织中 BMP-2 的蛋白表达量均低于酒精性 ONFH 组; 激素性 ONFH 组股骨头正常区骨组织中 PDGF-BB、BMP-2 蛋白表达量与酒精性 ONFH 组比较, 组间差异均无统计学意义(表 2 至表 6)。蛋白印迹法检测结果见图 4。

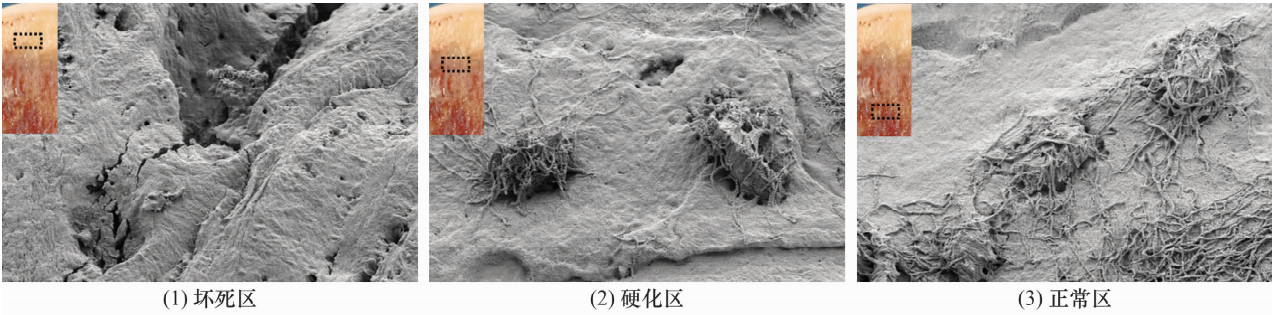


图 3 酒精性股骨头坏死患者股骨头扫描电镜图片(×1000)

表 2 2 组股骨头不同区域骨组织中血小板-内皮细胞粘附分子-1 蛋白表达量

组别	样本量/个	血小板-内皮细胞粘附分子-1 蛋白表达量( $\bar{x} \pm s$ )		
		坏死区	硬化区	正常区
激素性股骨头坏死组	3	1.970 ± 0.053	0.797 ± 0.047	2.207 ± 0.045
酒精性股骨头坏死组	3	0.493 ± 0.076	0.467 ± 0.025	1.443 ± 0.118
t 值		0.453	1.910	4.993
P 值		0.000	0.000	0.000

表 3 2 组股骨头不同区域骨组织中内皮粘蛋白表达量

组别	样本量/个	内皮粘蛋白表达量( $\bar{x} \pm s$ )		
		坏死区	硬化区	正常区
激素性股骨头坏死组	3	1.277 ± 0.038	2.220 ± 0.106	2.400 ± 0.046
酒精性股骨头坏死组	3	1.077 ± 0.025	0.270 ± 0.036	0.473 ± 0.126
t 值		1.087	4.655	2.494
P 值		0.002	0.000	0.000

表 4 2 组股骨头不同区域骨组织中血小板衍生生长因子-BB 蛋白表达量

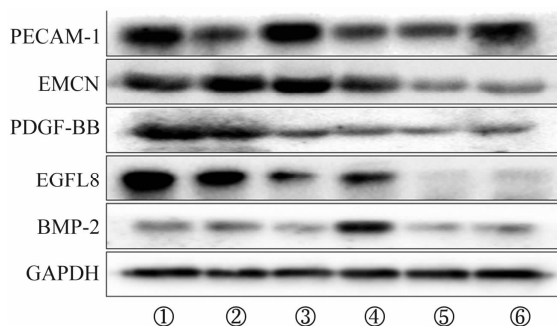
组别	样本量/个	血小板衍生生长因子-BB 蛋白表达量( $\bar{x} \pm s$ )		
		坏死区	硬化区	正常区
激素性股骨头坏死组	3	1.413 ± 0.040	0.980 ± 0.036	0.250 ± 0.056
酒精性股骨头坏死组	3	0.223 ± 0.006	0.193 ± 0.015	0.287 ± 0.031
t 值		4.654	2.579	1.062
P 值		0.000	0.000	0.374

表 5 2 组股骨头不同区域骨组织中表皮生长因子样结构域 8 蛋白表达量

组别	样本量/个	表皮生长因子样结构域 8 蛋白表达量( $\bar{x} \pm s$ )		
		坏死区	硬化区	正常区
激素性股骨头坏死组	3	4.443 ± 0.313	1.833 ± 0.096	0.553 ± 0.110
酒精性股骨头坏死组	3	1.043 ± 0.091	0.090 ± 0.030	0.130 ± 0.010
t 值		4.106	2.969	8.892
P 值		0.000	0.000	0.021

表 6 2 组股骨头不同区域骨组织中骨形态发生蛋白-2 蛋白表达量

组别	样本量/个	骨形态发生蛋白-2 蛋白表达量( $\bar{x} \pm s$ )		
		坏死区	硬化区	正常区
激素性股骨头坏死组	3	0.343 ± 0.070	0.417 ± 0.023	0.263 ± 0.025
酒精性股骨头坏死组	3	1.160 ± 0.056	0.270 ± 0.036	0.320 ± 0.036
<i>t</i> 值		0.116	0.810	0.604
<i>P</i> 值		0.000	0.004	0.089



PECAM-1 为血小板-内皮细胞粘附分子-1; EMCN 为内皮粘蛋白; PDGF-BB 为血小板衍生生长因子-BB; EGFL8 为表皮生长因子样结构域 8; BMP-2 为骨形态发生蛋白-2; GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶; ①②③分别为激素性股骨头坏死组股骨头的坏死区、硬化区和正常区; ④⑤⑥分别为酒精性股骨头坏死组股骨头的坏死区、硬化区和正常区。

图 4 2 组股骨头不同区域骨组织中血管生成蛋白和骨代谢相关蛋白表达量蛋白印迹法检测结果

#### 4 讨 论

激素性 ONFH 和酒精性 ONFH 的病理转归特点对临床上 ONFH 的精确诊断具有重要意义<sup>[7]</sup>。骨组织内有丰富的管道系统,包括纵向的中央管和横向管道,其中中央管管内包含血管、神经和组织液,构成了血管系统与骨细胞物质交换的通路<sup>[8]</sup>。此外,骨小管与中央管相通,形成了骨细胞间的微循环网络,构成了骨细胞物质交换的基础<sup>[9]</sup>。扫描电镜是观察骨显微结构的重要方法<sup>[10]</sup>。我们采用扫描电镜观察了激素性和酒精性 ONFH 患者股骨头坏死区、硬化区和正常区的纤维结构,结果显示激素性 ONFH 患者股骨头的 3 个区内均有骨细胞分布,且形态基本完整,周围有丰富的骨小管分布;而酒精性 ONFH 患者股骨头的坏死区内骨细胞萎缩,甚至消失,硬化区和正常区内的骨细胞周围骨小管变小、数量减少。血管生成和骨形成具有密切关系,研究发现 H 型血管具有诱导骨形成的能力,而 H 型血管内的 EMCN 和 PECAM-1 具有较高的表达量<sup>[11]</sup>。血管生成还受到血管内皮生长因子、BMP 等的调控<sup>[12]</sup>。相关研究发现,由破骨前体

细胞分泌的 PDGF-BB 能够诱导骨组织内的血管生成及骨形成过程<sup>[13-15]</sup>。EGF 家族在成骨细胞中高表达,在破骨细胞、成骨细胞和内皮细胞交流过程中发挥重要作用,能够促进内皮细胞增殖并沿血管聚集<sup>[12]</sup>。我们研究发现,激素性 ONFH 患者股骨头 3 个区的骨组织中 PECAM-1、EMCN、EGFL8 的蛋白表达量均高于酒精性 ONFH,激素性 ONFH 患者股骨头坏死区和硬化区的 PDGF-BB 的蛋白表达量高于酒精性 ONFH。因此,激素性 ONFH 组股骨头坏死区与硬化区之间的新鲜肉芽组织可能与 PECAM-1、EMCN、EGFL8、PDGF-BB 的表达有关;而酒精性 ONFH 的病理过程中血管生成相关因子的表达量较低,导致血管生成不足,并产生了大量的纤维组织。

中医理论认为血瘀是 ONFH 的基本证候,前期研究结果也表明“血瘀证”贯穿于 ONFH 的整个发病过程<sup>[16-19]</sup>。络脉学说认为经络运行气,络脉运行血,气血相互作用,进而发挥“行气血而营阴阳”的作用<sup>[20-21]</sup>。基于络脉学说及激素性和酒精性 ONFH 患者股骨头标本的病理学特点,我们认为激素的使用导致毒邪内蕴、耗气伤阴、阻滞气机,虽然激素性 ONFH 股骨头内的血管和肉芽组织积累,但气虚运血无力,最终形成血瘀;而过量饮酒导致湿热内蕴于脾,脾气长期亏损,运化紊乱,体内形成水湿,阻碍脾胃,进而气血生化乏源而致血运不佳,骨骼失其荣养,气络和血络因阻塞或闭塞导致血液运行不畅,气血两虚,以致瘀塞日久,形成血瘀。因此,基于络脉学说的基本病机<sup>[22-23]</sup>,我们认为激素性 ONFH 的病理演变过程为络气虚滞-络脉瘀阻-络息成积,而酒精性 ONFH 的病理演变过程为络虚不荣-络脉瘀塞-络息成积。

本研究结果表明,与激素性 ONFH 相比,酒精性 ONFH 的股骨头坏死区与硬化区交界处无新鲜肉芽组织、有纤维组织填充,坏死区、硬化区的骨细胞明显萎缩,各区骨小管更小、数量更少,这种病理学差异与股骨头不同区域骨组织中血管生成蛋白和骨代谢相关蛋白的表达有关。

## 参考文献

- [1] LAMB J N, HOLTON C, O'CONNOR P, et al. Avascular necrosis of the hip[J]. BMJ, 2019, 365: l2178.
- [2] KRENN V, MÜLLER S, KRENN V T, et al. Pathophysiology of aseptic femoral head necrosis: Pathogenesis and histopathological differential diagnosis [J]. Orthopade, 2018, 47(9): 710–716.
- [3] 中国医师协会骨科医师分会骨循环与骨坏死专业委员会, 中华医学会骨科分会骨显微修复学组, 国际骨循环学会中国区. 中国成人股骨头坏死临床诊疗指南(2020)[J]. 中华骨科杂志, 2020, 40(20): 1365–1376.
- [4] 魏秋实, 杨帆, 陈晓俊, 等. 激素性与酒精性股骨头坏死患者骨标本坏死区域病理与显微结构特点分析[J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(7): 866–872.
- [5] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 股骨头坏死临床诊疗规范[J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(1): 49–54.
- [6] GARDENIERS J W M. A new international classification of osteonecrosis of the ARCO committee on terminology and classification[J]. ARCO News Letter, 1992, 4: 41–46.
- [7] 何伟. 精确诊断前提下股骨头坏死非手术治疗实践[J]. 临床外科杂志, 2017, 25(8): 580–582.
- [8] 刘芳, 黄海, 杨槐, 等. 骨质疏松性股骨颈骨折扫描电镜观察[J]. 广东医学, 2010, 31(7): 843–845.
- [9] NANGO N, KUBOTA S, HASEGAWA T, et al. Osteocyte-directed bone demineralization along canaliculi[J]. Bone, 2016, 84: 279–288.
- [10] SASAKI M, KUROSHIMA S, AOKI Y, et al. Ultrastructural alterations of osteocyte morphology via loaded implants in rabbit tibiae[J]. J Biomech, 2015, 48(15): 4130–4141.
- [11] KUSUMBE A P, RAMASAMY S K, ADAMS R H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone[J]. Nature, 2014, 507(7492): 323–328.
- [12] CHIM S M, TICKNER J, CHOW S T, et al. Angiogenic factors in bone local environment[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2013, 24(3): 297–310.
- [13] GAO S Y, LIN R B, HUANG S H, et al. PDGF-BB exhibited therapeutic effects on rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw by enhancing angiogenesis and osteogenesis[J]. Bone, 2021, 144: 115117.
- [14] RAHMAN M M, MATSUOKA K, TAKESHITA S, et al. Secretion of PDGF isoforms during osteoclastogenesis and its modulation by anti-osteoclast drugs[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 462(2): 159–164.
- [15] XIE H, CUI Z, WANG L, et al. PDGF-BB secreted by pre-osteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis[J]. Nat Med, 2014, 20(11): 1270–1278.
- [16] 沈莹珊, 何晓铭, 赵雄, 等. 关于“血瘀证是股骨头坏死主要证候”的调查研究[J]. 中医正骨, 2022, 34(4): 25–29.
- [17] 徐传毅. 袁浩教授从血瘀证论治激素性股骨头坏死经验[J]. 中医药学刊, 2003, 21(2): 194–195.
- [18] 何伟, 徐传毅, 李雄, 等. 酒精性股骨头坏死血液流变学改变及意义[J]. 中医正骨, 2001, 13(10): 8–9.
- [19] 中华中医药学会. 股骨头坏死中医辨证标准(2019 年版)[J]. 中医正骨, 2019, 31(6): 1–2.
- [20] 吴以岭, 贾振华, 常丽萍, 等. 络病学说营卫理论指导血管病变防治研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 1–10.
- [21] 吴以岭. “络-血管系统”相关性探讨[J]. 中医杂志, 2007, 48(1): 5–8.
- [22] 吴相春, 来静, 吴以岭, 等. 络气郁滞证候对血管内皮的作用及机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(11): 823–824.
- [23] 贾振华, 高怀林, 谷春华, 等. 基于 3469 例血管病变患者证候分布规律的络病病变共性病机探讨[J]. 中医杂志, 2009, 50(10): 920–924.

(收稿日期: 2020-10-27 本文编辑: 吕宁)