

## 髋关节脱位法联合液氮冷冻法建立兔早中期创伤性股骨头坏死动物模型观察

王祺<sup>1</sup>, 王上增<sup>2</sup>, 余鹏<sup>3</sup>, 游明灿<sup>4</sup>

(1. 河南中医药大学, 河南郑州 450046; 2. 河南省中医院, 河南郑州 450002; 3. 上海市第二康复医院, 上海 201900; 4. 郑州大学第一附属医院, 河南郑州 450052)

**摘要:**【目的】观察髋关节脱位法联合液氮冷冻法建立兔股骨头坏死动物模型的效果。【方法】选取健康成年雄性日本大耳白兔28只, 在无菌条件下使用外科手术法暴露股骨头, 采用髋关节脱位法联合液氮冷冻法建立股骨头坏死模型。分别于造模后4、8周观察兔股骨头形态, 并给予X线及MRI检查。在术后4、8周分别处死12、13只兔子, 取造模侧股骨头观察骨小梁和髓腔的组织形态学变化。【结果】所有实验兔术后无明显感染迹象。造模后8周股骨头组织学结果发现空骨陷窝率增加, 为8%~12%, 超过正常兔股骨头软骨下区空骨陷窝率, 符合股骨头坏死的判断标准, 提示造模成功。【结论】采用髋关节脱位联合液氮冷冻法建立兔创伤性股骨头坏死模型, 操作简单, 动物死亡率较低, 稳定可靠, 可重复性好。

**关键词:** 创伤性股骨头坏死; 髋关节脱位; 液氮冷冻; 动物模型; 兔

中图分类号: R332

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)10-2236-05

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.10.032

## Observation of Animal Model of Early- and Middle-Stage Traumatic Femoral Head Necrosis in Rabbits by Hip Joint Dislocation Method Combined with Liquid Nitrogen Freezing

WANG Zhen<sup>1</sup>, WANG Shang-Zeng<sup>2</sup>, YU Peng<sup>3</sup>, YOU Ming-Can<sup>4</sup>

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046 Henan, China; 2. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002 Henan, China; 3. Shanghai Second Rehabilitation Hospital, Shanghai 201900, China; 4. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052 Henan, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of establishing model of femoral head necrosis in rabbits by using hip joint dislocation method combined with liquid nitrogen freezing method. **Methods** Twenty-eight healthy adult male Japanese rabbits were selected to expose the femoral head by using surgical procedures to establish an model of femoral head necrosis by hip joint dislocation combined with liquid nitrogen freezing. Week 4, 8 after the modeling, the morphological features of the femoral head of the rabbits was observed, and X-ray and MRI examination was carried out. Week 4, 8 after the operation, 12 and 13 rabbits were sacrificed respectively to take the femoral head of the modeling side to observe the histomorphological changes of trabecular bone and medullary cavity. **Results** All experimental rabbits showed no sign of infection after operation. Week 8 after modeling, the histological results of femoral head necrosis showed that the rate of hollow bone lacunae was increased, being 8% to 12%, more than that of normal rabbit femoral head subchondral area, meeting the criteria for femoral head necrosis, showing successful modeling. **Conclusion** Hip joint dislocation combined with liquid nitrogen freezing for establishing a rabbit model of traumatic femoral head necrosis is easy to operate, with low mortality rate, which is stable and reliable, and demonstrates good repeatability.

收稿日期: 2021-03-05

作者简介: 王祺(1994-), 女, 硕士研究生; E-mail: 739394033@qq.com

通讯作者: 王上增(1974-), 男, 教授, 硕士研究生导师; E-mail: wshangz74@163.com

基金项目: 河南省中医管理局基金资助项目(编号: 2016ZY2067); 河南省中医管理局基金资助项目(编号: 2019GDZX091); 河南省中医管理局专项科学研究项目(编号: 2019ZY2035); 河南省中医管理局基金资助项目(编号: 20-21ZY2010)

**Keywords:** traumatic femoral head necrosis; hip joint dislocation; liquid nitrogen freezing; animal model; rabbits

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head)是静脉堵塞或股骨头血供的损坏或中断,最终导致股骨头细胞死亡,甚至股骨头塌陷的病理生理过程<sup>[1-2]</sup>,与髋关节局部的骨、脂肪代谢等因素密切相关,多为股骨头缺血性坏死(avascular necrosis of the femoral head)或者是股骨头无菌性坏死(aseptic necrosis of the femoral head),治疗难度较大,发病率逐年上升,且致残率较高。目前,股骨头坏死病因仍未完全明确,尚缺少有效的治疗方法。对于晚期股骨头坏死患者,骨坏死区域塌陷或骨折时,需要采取髋关节置换的手术方式来获得更好的疗效<sup>[3]</sup>。除却病因、疾病进展过程复杂之外,本病也缺乏理想化的动物模型。因此,建立合适的股骨头坏死动物模型,对于进一步研究股骨头坏死的合理治疗方案具有重要意义,本研究采用髋关节脱位联合液氮冷冻法建立兔创伤性股骨头坏死模型,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 SPF级4个月龄雄性日本大耳白兔28只,体质量2.0~2.5 kg,购于河南康达实验动物有限公司,动物质量合格证号:SCXK(豫)2016-0002。饲养于河南中医药大学实验中心动物房,分笼标准饲料喂养,自由进水,室温为20~26℃。本动物实验操作方案已经河南中医药大学第二附属医院伦理委员会审议批准[IACUC号:20161201],实验过程中遵循“3R”原则。

1.2 药物、试剂与仪器 乌拉坦溶液、注射用水合氯醛、苏木素-伊红(HE)染色试剂(北京索莱宝科技有限公司);青霉素钠(华北制药股份有限公司);多聚甲醛溶液(常州市海拓实验仪器有限公司)。5605-IEC X射线机(德国西门子公司);3.0T Singna HDxt核磁共振(MRI)(美国GE公司);BH-2光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。

### 1.3 兔创伤性股骨头坏死模型的制备

1.3.1 造模前准备 适应性喂养1周后,观察实验动物无异常即可开始实验。所有兔均选择右侧

髋关节进行模型制备。用蒸馏水配制20%的乌拉坦溶液对动物进行麻醉,正式制备模型前给所有兔称质量,每只兔麻醉剂量为5 mL/kg(可视具体情况增加1~2 mL),麻醉方式为耳缘静脉麻醉。

1.3.2 模型制备 麻醉成功后,将兔侧卧位固定在操作台上,备皮。确定切口,暴露股骨头,寻找体表骨性标志,确定股骨大转子。沿股骨大转子内侧缘行长约5 cm的弧形手术切口,切开皮肤后,剥离浅筋膜,剥离深筋膜,暴露臀大肌后使用弯钳钝性分离臀大肌,显露并拨开臀中肌,显露臀小肌与梨状肌,显露股骨大转子。沿大转子切断部分梨状肌肌肉附着,暴露髋关节关节囊,“T”形切开发节囊,内收内旋右下肢。暴露股骨头,切断股骨头圆韧带,脱位股骨头,并将股骨颈近端骨膜组织全部切除。

1.3.3 液氮冷冻 固定股骨头,使用一次性无菌棉签蘸取液氮置于股骨头负重区,大约停留8 s后撤离,冷冻后使用温生理盐水(约40℃)对局部复温。如此反复操作3次后,使用生理盐水冲洗关节腔,使用可吸收缝合线依次缝合肌肉、深筋膜、浅筋膜及皮肤。缝合完毕后使用碘伏纱布消毒,消毒后无菌敷料加压包扎。

1.3.4 造模后处理 造模后当天即开始使用20万IU青霉素钠肌肉注射预防术后感染,持续使用5 d。造模后定期对手术切口进行清洁换药,2 d/次。换药时密切观察切口愈合情况,直至切口愈合。最终成功造模兔25只。造模后4、8周分别处死12、13只兔。定期观察造模后兔精神状态、活动、二便等一般情况。

### 1.4 兔股骨头坏死模型评价指标与方法

1.4.1 影像学观察 造模后4、8周分别对兔进行X线摄片观察股骨头情况;造模后4、8周分别进行兔双髋关节MRI检查观察双侧股骨头情况。

1.4.2 组织学观察 使用空气栓塞法分批处死兔,无菌条件下手术取出右侧股骨头,置入40 g/L多聚甲醛溶液中固定浸泡24 h后放入EDAT脱钙液

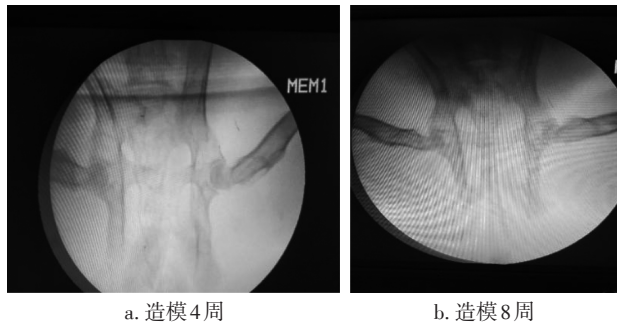
中进行脱钙。脱钙成功后，用石蜡切片机对包埋后的股骨头组织标本进行切片。对切片进行脱蜡和HE染色。最后，应用光学显微镜观察脑组织病理形态，计算空骨陷窝率，计算方法：镜下随机选取5个视野，空骨陷窝率 = 空骨陷窝总计数/骨陷窝总计数。以术后造模侧股骨头组织学表现可见软骨剥脱、镜下观察到空骨陷窝率增加为判断造模成功的标准。

## 2 结果

**2.1 造模动物一般情况** 造模过程中因麻醉剂过量致兔死亡2只，因手术时间较长致兔死亡1只，余存活良好。无感染动物病例。造模后2周内，兔精神状态较术前萎靡，日常活动减少，不活跃，饮食量较术前减少，体质量减轻，二便正常。造模2周后，一般情况较前好转，但较术前仍欠佳。观察可得，兔在被抓取时有明显的惧怕感。造模4周时，造模兔有不同程度的跛行，患肢力量减弱，弹跳无力。造模后8周，造模兔无法弹跳，跛行较前加重，患肢力量明显减弱。

**2.2 造模后兔股骨头X线表现** 图1结果显示：造模后4周，患侧股骨头表面光整，股骨头弥漫性骨质疏松，骨小梁稍模糊，出现局限性骨密度增高，骨质硬化，股骨头周围骨质变薄。造模后8周，患侧间隙未见明显变窄，股骨头轻度变形，股骨头形态尚可，股骨头密度不均匀，可见囊性破坏，股骨头颈增宽，髌臼边缘增生。

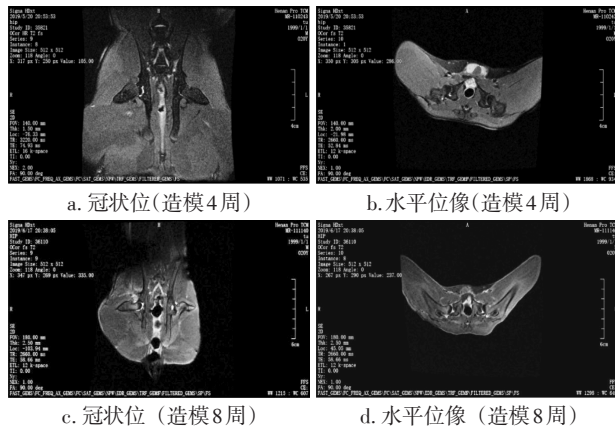
**2.3 造模后MRI情况** 图2结果显示：造模后4周，双侧髋关节形态可，右侧股骨头负重区软骨变薄，可见稍长T1长T2信号，右侧髋关节间隙可见少量条片状液体信号影。造模后8周，双侧髋关节形态尚可，右侧股骨头负重区可见表面软骨脱



a. 造模4周 b. 造模8周

图1 造模后兔股骨头X线检查表现

Figure 1 X-ray performance of rabbit femoral head after modeling



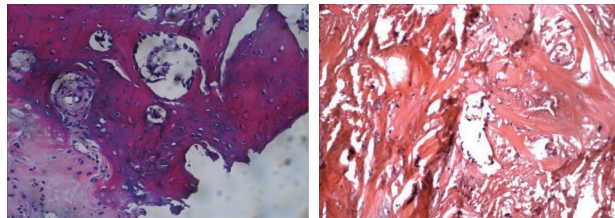
a. 冠状位(造模4周) b. 水平位像(造模4周)  
c. 冠状位(造模8周) d. 水平位像(造模8周)

图2 造模后兔股骨头MRI检查情况

Figure 2 MRI performance of rabbit femoral head after modeling

落，可见稍长T1长T2信号。

**2.4 股骨头组织学观察** 图3结果显示：造模后4周，光镜下可见骨小梁稀疏、排列紊乱，骨小梁变细、部分断裂，呈不规则现象，骨陷窝空虚，骨细胞减少，造血细胞减少，骨小梁周围骨细胞减少。造模后8周，光镜下可见骨小梁间隙变大，骨小梁破坏严重，坏死区空骨陷窝明显增多，骨小梁间骨髓组织脂肪细胞增多，可见部分坏死骨细胞，骨细胞核固缩、碎裂，骨小梁周围成骨细胞稀少甚至消失。



a. 造模4周 b. 造模8周

图3 造模后兔股骨头组织学图像(HE染色, ×200)

Figure 3 Histological features of rabbit femoral head after modeling (by HE staining, ×200)

造模后8周组织学发现空骨陷窝率增加，为8%~12%，超过正常兔股骨头软骨下区空骨陷窝率，符合达到股骨头坏死的标准，提示造模成功。具体结果见表1。

表1 造模后兔股骨头组织空骨陷窝率

Table 1 The rate of empty osseous lacunae in the femoral head after rabbit modeling ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

时间	兔数(只)	空骨陷窝率
造模后4周	12	8.09 ± 3.04
造模后8周	13	11.85 ± 1.49

### 3 讨论

股骨头坏死在临床中是造成患者疼痛,甚至残疾的重要病因,严重影响了患者的生产能力和活动能力<sup>[4]</sup>。对于股骨头坏死动物模型的制备,主要以激素型股骨头坏死、乙醇摄入型股骨头坏死和创伤性股骨头坏死为主。目前,激素型、乙醇摄入型股骨头坏死动物模型制备技术都相对成熟,激素型股骨头坏死动物模型的制备方法主要有单一激素使用、激素联合内毒素或动物血清等方法。酒精性股骨头坏死动物模型的制备方法主要为局部酒精注射方式。创伤性股骨头坏死近年来在临床也较多见,其动物模型制备方法主要有外科手术下头颈部血管结扎、破坏髓内外血供、股骨颈骨折、物理诱导等方式。曲春涛<sup>[5]</sup>利用导航装置钻孔后对鹌鹑行液氮冷冻和射频加热交替的方法处理从而获得创伤性股骨头坏死动物模型,但是,制作导航装置会增加实验费用,加大实验负担。Vélez等<sup>[6]</sup>、Swiontkowski等<sup>[7]</sup>通过血管结扎、股骨颈骨折等方法来获得股骨头坏死模型,这都需要外科手术技术来实现,学习曲线较长,加大实验难度,且每个人手术技术有差异,重复性一般。Wang等<sup>[8]</sup>研究发现,不同周期冷冻方法直接影响股骨头坏死造模效果。液氮冷冻股骨头坏死具有造模周期短、动物死亡率低的优点,因而成为相对较常采用的创伤性股骨头坏死造模方法。本实验方法通过髌关节脱位联合液氮冷冻股骨头的造模方法较王江泳等<sup>[9]</sup>、杨述华等<sup>[10]</sup>的实验方法造模成功率高,且更早出现股骨头坏死;与周正丽<sup>[11]</sup>的造模方法比较,因加入了兔髌关节MRI对造模结果进行评价,评价方法更加客观多样,更具参考性。

本实验在参照Wen等<sup>[12]</sup>以及李玉龙<sup>[13]</sup>的造模方法基础上,结合髌关节脱位法制备兔创伤性股骨头坏死动物模型,术中切断了兔股骨头圆韧带、脱位股骨头后,使用液氮冷冻法直接冷冻股骨头表面,冷冻位置更加精确;再使用温生理盐水对其进行复温,可以很好地损伤股骨头,有效缩短股骨头坏死的疾病进程,同时,缩短造模手术时长,节省了实验周期。此造模方法虽不能模拟创伤性股骨头坏死疾病的发病进程,无法进行创伤性股骨头坏死病因学的研究,但对于后续临床治疗性研究以及对比不同治疗方式疗效,可以起到

很大的作用。

术后4周X线片显示,患侧股骨头表面光滑,可见股骨头弥漫性骨质疏松,骨小梁稍模糊,出现局限性骨密度增高,骨质硬化,股骨头周围可见骨质变薄。拍摄MRI结果显示:双侧髌关节形态可,右侧股骨头负重区软骨变薄,可见稍长T1长T2信号,右侧髌关节间隙可见少量条片状液体信号影。组织学显示:骨小梁稀疏、排列紊乱,骨小梁变细、部分破裂,呈不规则现象,骨陷窝空虚,骨细胞减少,造血细胞减少,骨小梁周围骨细胞减少;造模术后4周造模侧股骨头骨质轻度破坏,局部周围组织发生水肿,但MRI检查未显示发生坏死。光镜下观察组织学特点,可见骨小梁变细、部分破裂,说明经过液氮处理的股骨头局部骨组织被破坏,但并未出现坏死。

术后8周X线片可见,患侧间隙未见明显变窄,股骨头轻度变形,股骨头形态尚可,股骨头密度不均匀,可见囊性破坏,股骨颈增宽,髌臼边缘增生。拍摄MRI结果显示:右侧股骨头负重区可见表面软骨脱落,可见稍长T1长T2信号。组织学显示:骨小梁间隙变大,骨小梁破坏严重,坏死区空骨陷窝明显增多,骨小梁间骨髓组织脂肪细胞增多,可见部分坏死骨细胞,骨细胞核固缩、碎裂,骨小梁周围成骨细胞稀少甚至消失。股骨头坏死包括了骨头内部的病理改变,这些改变在MRI信号出现前就已存在,目前,MRI检查在临床早期发现诊断股骨头坏死中较敏感<sup>[14]</sup>。本实验X线摄片及MRI检查可发现造模侧关节出现股骨头坏死早期表现,如软骨脱落、股骨头形态变化、局部骨组织密度变化不均等。组织学观察则更为直观,造模术后第8周组织学的表现符合股骨头坏死诊断。通过影像学和组织学观察后发现此方法对于创伤性股骨头坏死动物模型制备较为合适。

在选择合适的动物模型及造模方式时,所选择的动物应易于喂养,造模方法应难度较低,整体可重复性好。已有选择鹌鹑作为实验造模动物<sup>[5]</sup>,该双足动物在下肢负重、负重质量上和人类有更高的相似度,相对来说可以更好地模拟人类双足活动的特点,但因其价格昂贵、饲养困难,且对较大体积的动物进行造模操作时难度较大,故不作为实验造模动物的首选。兔为四足动物,其繁殖力强、易于获得、饲养简单,较实验动物

犬等价格低廉<sup>[4,16]</sup>，且临床早中期股骨头坏死患者诊断明确之后需减少负重，兔为四足动物，后肢负重较少，也利于研究股骨头坏死的后续治疗方法及疗效<sup>[17]</sup>，是目前研究的较好选择。但此动物模型制备方法在模拟股骨头坏死疾病发生发展方面还存在不足，家兔与人的股骨近端形态学、血管分布等都有一定的差异，兔股骨头更小、股骨颈更短，颈干角较人类小，且兔股骨头颈结合部骨小梁分布相对疏松，以及股骨颈干交界处无骨小梁分布，更有利于滋养动脉穿过从而到达股骨头，更有利于股骨头缺血性坏死的修复等，这些与人类有较大差异。目前，我们尚未寻找到完美的模型动物，这也就需要在以后的研究中寻找更为合适、更为接近人类解剖结构的动物模型进行研究<sup>[18]</sup>。

综上所述，本研究通过使用液氮冷冻法联合髓关节脱位法制备兔股骨头坏死模型，操作简单，造价低廉，可重复性好，动物死亡率低，对于后续临床治疗性研究以及对比不同治疗方式治疗创伤性股骨头坏死疗效可以起到支撑作用。但本实验中尚存在一定的不足：①未设置对照组，只研究了单种造模方法，未直接与其他造模方法进行直观比较；②模型评价未使用CT、骨扫描等技术进一步丰富实验资料；③模型适用于早中期股骨头坏死治疗的研究，可以相应缩短总体研究时长，但未能增加时间序列，观察股骨头坏死的早期修复过程。以上均有待下一步研究完善。

#### 参考文献：

- [1] WANG T, AZEDDINE B, MAH W, et al. Osteonecrosis of the femoral head: genetic basis[J]. *Int Orthop*, 2019, 43(3): 519-530.
- [2] 谢程欣, 王维, 余城墙, 等. 酒精性股骨头坏死动物模型的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(7): 139-144.
- [3] LEE B, LIM J Y, LEE D M, et al. Computed tomography staging of osteonecrosis of the femoral head[J]. *Surg Technol Int*, 2019, 35: 417-421.
- [4] XU J Z, GONG H P, LU S T, et al. Animal models of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head- a comprehensive research review up to 2018[J]. *Int Orthop*, 2018, 42: 1729-1737.
- [5] 曲春涛. 构建双足类大型鸟类鹌鹑股骨头坏死模型[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(5): 611-615.
- [6] VÉLEZ R, HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ A, CAMINAL M, et al. Treatment of femoral head osteonecrosis with advanced cell therapy in sheep[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2012, 132(11): 1611-1618.
- [7] SWIONTKOWSKI M F, TEPIC S, RAHN B A, et al. The effect of fracture on femoral head blood flow. Osteonecrosis and revascularization studied in miniature swine [J]. *Acta Orthop Scand*, 1993, 64(2): 196-202.
- [8] WANG D, WANG G W, LIU M, et al. A novel animal model of osteonecrosis of the femoral head induced using a magnetic resonance imaging-guided argon-helium cryotherapy system [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(6): 1525-1528.
- [9] 王江泳, 王保芝, 崔慧先, 等. 改良液氮冷冻法制备家兔股骨头坏死模型的形态学研究[J]. *河北医科大学学报*, 2008, 29(1): 5-7, 161.
- [10] 杨述华, 杨操, 许伟华, 等. 液氮冷冻建立兔股骨头缺血性坏死模型[J]. *中国矫形外科杂志*, 2001, 8(1): 54-55, 5.
- [11] 周正丽. 液氮冷冻兔股骨头坏死模型制备新方法及其可靠性评价[D]. 遵义: 遵义医学院, 2012.
- [12] WEN Q, JIN D, ZHOU C Y, et al. HGF-transgenic MSCs can improve the effects of tissue self-repair in a rabbit model of traumatic osteonecrosis of the femoral head [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37503.
- [13] 李玉龙. 液氮冷冻法制备兔股骨头坏死模型新方法及其效果评估[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [14] 范武, 于雪峰, 任向楠, 等. 中药骨蚀灵胶囊对早期兔激素性股骨头坏死的干预作用[J]. *实用医学杂志*, 2018, 13: 2141-2145.
- [15] 范猛, 姜文学, 汪爱媛, 等. 鹌鹑股骨头坏死两种修复方式骨显微结构变化的比较[J]. *中国医学科学院学报*, 2016, 38(1): 16-21.
- [16] TAKAOKA K, YOSHIOKA T, HOSOYA T, et al. The repair process in experimentally induced avascular necrosis of the femoral head in dogs [J]. *Arch Orth Trauma Surg*, 1981, 99: 109-115.
- [17] 牛敬才, 尚希福, 孔荣, 等. 一种新型的股骨头坏死动物模型[J]. *中国临床保健杂志*, 2006, 9(2): 137-139.
- [18] 戴亚辉, 梅炯. 家兔与人股骨近端的解剖学对照研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(2): 312-314.

【责任编辑：侯丽颖】