

· 论 著 ·

下肢伸直襁褓体位对股骨近端发育影响的实验研究

周春芳¹ 王恩波² 杜 勇¹ 杨艳果¹ 卢光新¹

【摘要】 目的 利用新生大鼠模拟婴儿下肢伸直襁褓体位建立动物模型,探讨该体位对股骨近端发育的影响。**方法** 用医用胶带将 45 只新生 Wistar 大鼠幼鼠(雌性 24 只,雄性 21 只)双下肢、髋关节缠绕固定 10 d,模拟婴儿生后双下肢伸直襁褓体位,作为实验组;另选 45 只新生幼鼠(雌性 24 只,雄性 21 只)双下肢不予处置,作为对照组。于第 10 天随机处死实验组、对照组幼鼠各 16 只,常规制备石蜡切片,番红 O-固绿染色观察组织形态。余下幼鼠继续喂养 8 周后,通过大体标本及 X 线摄片,观察股骨近端变化。**结果** 实验组股骨近端组织切片染色发现股骨头变小,前倾角变大,大量结缔组织增生,细胞形态、数量、排列明显异常。大体外观及 X 线摄片见实验组股骨头外观不规则、表面不光滑,股骨颈变短、增粗,股骨颈周围软组织增生,前倾角变大($P < 0.05$),股骨颈干角减小,大粗隆肥大,股圆韧带增粗变长,髋臼指数较对照组明显增大($P < 0.05$);实验组髋关节脱位率(49/50)明显高于对照组($P < 0.01$)。**结论** 本实验成功制作了大鼠下肢伸直襁褓体位的动物模型,该体位可干扰股骨近端发育,甚至导致髋关节脱位。

【关键词】 髋关节/畸形;股骨;动物试验

The empirical study of the developmental influence of proximal femoral arisen from the posture of straight-leg swaddle. ZHOU Chun-fang¹, WANG En-bo², Du-Yong¹, et al. 1. Department of Neurosurgery, People's Hospital of Hubei Medical College, Shiyan, 442000, China. 2. Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, 110004, China.

【Abstract】 Objective Through establishing a model of newborn rat's posture of straight-leg swaddle, this study observed the developmental influence of proximal femoral arisen from this posture. **Methods** The hip joints and lower limbs of 45 Wistar rats (24 male and 21 female) were fixed to extending position with adhesive tape for 10 days (experiment group), the other 45 newborn rats (24 male and 21 female) without treatment on legs and hips were used as the control group. On day 10th, the 16 newborn rats from both experimental group and control group were randomly killed, followed by performing the paraffin sections using the routine method and subsequently observing the histomorphology by Safranin O/fast green staining. The remaining rats continue to be fed for 8 weeks, and were killed, the assessment of dysplastic proximal femoral were done by the gross morphology and x-ray photography. **Result** The histological section of proximal femora from experimental group show that the morphological, number and arrangement of the cells were apparently abnormal; and their femoral head became irregular and unsmooth; collum femoris became tubbiness, surrounded by more soft tissue, the anteverted angle of femoral neck of dislocated hip was greater than that of the normal hip ($P < 0.05$); greater trochanter became accrescent, femoral neck shaft angle grow down, ligamentum teres femoris was hyperplastic and hypertrophia; the acetabular index has significant difference between the experimental group and the control group ($P < 0.05$); The hip dislocation rate (49/50) of experimental group was obviously higher than that of the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The model of newborn rat's posture of straight-leg swaddle was established successfully, and showed that this posture was easy to result in proximal femoral dysplasia, even leading to dislocation of hip joint.

【Key words】 Hip Joint/AB; Femur; Animal Experimentation

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2012.03.005

作者单位:1,湖北医药学院附属人民医院(湖北省十堰市,442000);2,中国医科大学附属盛京医院小儿骨科(辽宁省沈阳市,110004),通讯作者:卢光新, E-mail: sylgx1325@sina.com,基金项目:国家自然科学基金项目(项目号 30700877)

发育性髋关节发育不良(development dysplasia of the hip, DDH)是小儿常见的四肢畸形之一,是患儿出生时或在发育过程中髋臼陡浅或股骨头脱出髋

白之外的现象^[1]。DDH 的病因及发病机制至今不明,一些学者通过流行病学调查发现双下肢伸直襁褓体位是髋臼发育异常的重要危险因素之一^[2]。而迄今为止,除本实验小组成员之外,尚未有模拟双下肢伸直襁褓体位动物模型相关研究的报道,为了探讨这一因素对股骨近端发育的影响,本实验制备了大鼠双下肢伸直襁褓体位动物模型,对大鼠股骨近端进行大体外观、组织形态学及 X 线摄片观察,以期临床发育性髋关节发育不良的预防和治疗打开一些新的思路。

材料与方法

一、实验动物及主要试剂

实验动物为 Wistar 新生幼鼠,体重 6~7 g,无特定病原体级(specific pathogen free, SPF)(由中国医科大学附属盛京医院小儿先天畸形实验室动物部提供),实验幼鼠置于无菌层流室动物洁净饲养柜中,由各自母鼠喂养,所有操作均在无菌层流环境中进行。翻红 O,固绿,多聚甲醛,EDTA,二甲苯,苏木素,冰醋酸(购自美国 Sigma 公司);盐酸酒精(由本实验室自行配制)。

二、动物模型制备及分组

随机选取 45 只 Wistar 大鼠新生幼鼠(雌性 24 只,雄性 21 只),在出生后 6~8 h 用宽约 0.4~0.5 cm 的普通型医用胶带将幼鼠双下肢、双髋关节缠绕固定 10 d,具体部位为髋关节骶尾部固定一道胶布,踝关节至膝关节固定一道(鼠尾亦固定在其中),使幼鼠呈髋关节内收伸直、双下肢并拢位,膝关节可活动,作为实验组;随机选取 45 只新生幼鼠(雌性 24 只,雄性 21 只),双下肢不予处置,作为对照组(图 1)。实验组固定幼鼠时,注意手法轻柔,避免暴力性脱位,每日于固定时间松解固定胶带 1 次,松解 1~3 min 后重新固定,避免由于幼鼠生长而产生的胶带对下肢的压力。

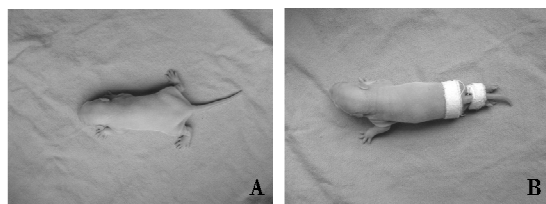


图 1 A, 对照组 Wistar 大鼠幼鼠; B, 模拟婴儿双下肢伸直襁褓体位大鼠幼鼠的动物模型。

三、组织形态学观察

于第 10 天随机选取实验组、对照组幼鼠各 16

只(雌雄各半),以空气栓塞处死幼鼠,取股骨近端标本,置于 4% 多聚甲醛中固定 2 d,再置于 20% EDTA 中脱钙 10 d,常规石蜡包埋,蜡块以 5 μ m 厚切片,翻红 O-固绿特殊染色,染色步骤如下:切片经二甲苯、梯度酒精脱蜡至水,苏木素染色 3 min,1% 盐酸酒精分化 15 s,双蒸水洗涤。0.1% 固绿水溶液染色 3 min,1% 冰醋酸洗涤去除残留固绿;0.1% 番红 O 染色 3 min。95% 乙醇、无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在光学显微镜下进行组织形态学观察。

四、大体外观及 X 线片观察

将余下实验组幼鼠(29 只)双下肢的固定医用胶带松开,与余下对照组(29 只)幼鼠分别置于无菌层流室动物洁净饲养柜中自由活动,摄食。8 周末,以空气栓塞处死动物,比较实验组与对照组大鼠体重、身长(鼻尖至尾骨根距离)。将处死大鼠自髋关节上 2 cm 至踝关节的鼠毛减去(减少拍 X 线片干扰),按俯卧位(老鼠活动时体位),左右对称摆在钢板上,尾巴与脊柱成直线,X 线机距大鼠约 25 cm 垂直拍摄骨盆正位 X 线片,测量髋臼指数、前倾角、颈干角、关节转子间距(articular trochanteric distance, ATD)值。解剖大鼠,取股骨近端标本,打开双侧髋关节囊,肉眼观察是否存在髋关节脱位,是否存在假臼,并观察髋臼变化。

五、统计学方法

所有数据通过 SPSS 13.0 统计软件进行分析。实验组和对照组髋臼指数、前倾角、颈干角、ATD 值及体重、身长以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行两样本 t 检验,对实验组与对照组髋关节脱位率、股骨近端发育不良发生率进行四格表的卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

第 8 周末,实验组 Wistar 大鼠有 4 只死亡,剩余雌性 14 只,雄性 11 只;对照组有 1 只死亡,剩余雌性 16 只,雄性 12 只。

一、大体外观

实验组与对照组大鼠体重、身长(鼻尖至尾骨根距离)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),其中实验组雄鼠体重为(265 ± 9)g,雌鼠为(205 ± 6)g,雄鼠体长为(17.5 ± 1.2)cm,雌鼠为(17.0 ± 1.0)cm;对照组雄鼠体重(266 ± 7)g,雌鼠为(204 ± 8)g,雄鼠体长为(18.0 ± 1.0)cm,雌鼠为(17.0 ± 1.2)

cm。对照组股骨近端外观正常,实验组股骨近端有明显改变:股骨头变小,非球状,表面不光滑,脱于髋臼外,大多数会在真臼顶部边缘出现假臼,股骨颈增粗、变短,股骨颈周围软组织增多,圆韧带拉长或消失,大粗隆增大隆起(图 2)。

二、X 线片观察

骨盆正位 X 线片显示,实验组共脱位 49 髋(49/50),其中单侧脱位 1 髋;雌鼠脱位 28 髋(28/

28),雄鼠脱位 21 髋(21/22),雌、雄鼠脱位率无显著差异($P > 0.05$)。对照组 56 髋均未脱位。实验组与对照组脱位率比较,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。实验组骨盆正位 X 线片可见股骨头外观不规则,股骨颈变短、增粗,前倾角变大,大粗隆增大隆起,股骨颈干角减小,髋臼指数实验组较对照组明显增大($P < 0.05$),单侧髋脱位大鼠合并脊柱侧弯与骨盆倾斜(图 3,表 1)。

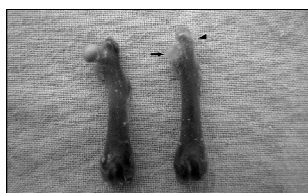


图 2 左侧为 8 周龄对照组 Wistar 大鼠股骨近端,右侧为实验组 Wistar 大鼠股骨近端大体外观,实验组股骨头变小,呈椭圆形,大转子增大隆起。

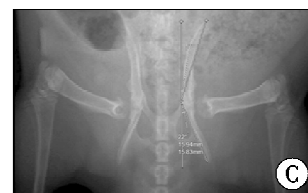
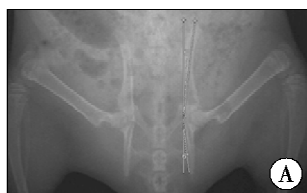


图 3 A 为对照组骨盆正位 X 线片,B、C 为实验组骨盆正位 X 线片;A 图显示髋关节发育正常;B 为单侧髋关节脱位;C 为双侧髋关节脱位。

表 1 8 周后实验组与对照组髋臼指数、前倾角、颈干角、ATD 值比较

组别		髋臼指数($^{\circ}$)	前倾角($^{\circ}$)	颈干角($^{\circ}$)	ATD 值
对照组	雌鼠	45.02 ± 1.26	9.55 ± 2.37	133.56 ± 3.25	4.35 ± 1.37
	雄鼠	45.96 ± 0.76	10.25 ± 2.56	134.56 ± 2.86	4.55 ± 1.16
实验组	雌鼠	$68.03 \pm 1.73^*$	$15.43 \pm 3.67^{\star}$	$93.54 \pm 5.42^{\star\star}$	$2.34 \pm 2.45^{\blacktriangle}$
	雄鼠	$69.14 \pm 1.83^*$	$16.15 \pm 3.73^{\star}$	$94.54 \pm 4.73^{\star\star}$	$2.36 \pm 2.26^{\blacktriangle}$

注:与对照组相同性别的大鼠同一检测指标相比,* $P < 0.05$, $\star P < 0.05$, $\star\star P < 0.05$, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

三、组织形态学观察

标本经番红 O-固绿染色后,软骨组织被染成红色,骨组织被染成蓝色。对照组标本股骨头与大粗隆未出现次级骨化中心,股骨头与大粗隆内软骨细胞层排列规则,细胞大小基本一致,空骨陷窝形态正常,分布适中。实验组标本股骨头变小,股骨头外被软组织难以剥离,前倾角变大,大粗隆中有次级骨化中心出现,股骨头内的骨软骨细胞数目减少,排列欠规则,分布不均匀,少数细胞形态异常,形成较多的空骨陷窝(图 4)。

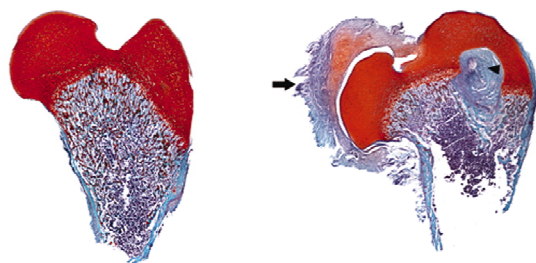


图 4 番红 O-固绿染色结果,左侧为对照组 Wistar 大鼠股骨近端染色结果,右侧为实验组 Wistar 大鼠股骨近端染色结果,黑色箭头为实验组股骨头周围有大量软组织,黑三角形为实验组大转子有次级骨化中心出现。

讨论

发育性髋关节脱位在世界各地均有发生,流行病学研究表明,习惯背婴儿的地区,如朝鲜、香港和非洲等地发育性髋关节脱位的发病率非常低^[3]。相反,位于寒冷地区习惯双下肢捆绑式襁褓的一些民族,如意大利北部、加拿大、北美印第安人等 DDH 发病率明显增高,因此,有学者认为双下肢伸直襁褓体位是髋关节发育不良的危险因素之一,并推断人类生后髋关节伸直内收体位会导致髋关节发育不良^[2]。

关于髋关节发育不良动物模型的制作方法已有过报道^[4,5]。实验方法主要为通过外科手术如切除髋臼软骨、切除髋关节囊、切断股骨头圆韧带、克氏针固定双膝关节等造成实验动物髋关节脱位,但此方法造成了创伤,且不符合临床实际情况。Wilkinson 等采取伸直位固定膝关节造成动物呈伸膝曲髋位,成功制作出髋脱位动物模型,但此方法造成髋关节屈曲、双下肢固定不能轻微活动,不适于模拟伸直

襁褓体位^[6]。为了尽量接近人类生后襁褓体位的自然状态,本实验从 Wistar 幼鼠出生即开始施加实验条件,Wistar 幼鼠第 2 周可以断母乳,因此 10 d 龄幼鼠相当于人类婴儿期,在生后 10 d 内,本实验在无创、无暴力损伤情况下固定髋关节及双下肢,且间歇松解固定胶带,一方面模拟了婴儿生后双下肢伸直襁褓体位,又允许髋、膝关节轻微屈伸活动,更贴近人类出生后直腿襁褓的自然状态。实验动物由各自母鼠喂养至幼鼠生后第 8 周,此时幼鼠已经成熟,适合模拟青春期人类。人类髋关节于青春期已经发育成熟,此时髋关节的形态已经固定,在以后的发育中,不会再有很大改变,因此本实验检测了 8 周龄后的模型大鼠髋关节损伤程度,期望对人类襁褓体位导致 DDH 有所提示。本实验中的处理方式最大程度模拟人类襁褓体位,且该模型为无创性襁褓体位模型制作方法,优于以往经外科手术制作的有创性髋脱位动物模型,比 Wilkinson 等制作的髋脱位动物模型更接近人类襁褓体位。造模 10 d 后,实验组幼鼠取股骨近端标本进行染色观察,发现模拟襁褓体位的幼鼠股骨近端发生了明显的病理改变,股骨头内的骨软骨细胞数目减少,排列欠规则,分布不均匀,少数细胞形态异常,形成较多的空骨陷窝;饲养 8 周后,通过大体观察和 X 线拍片检查发现,实验组幼鼠在生长发育过程中,髋关节脱位率明显高于对照组($P < 0.01$),实验组大鼠多数股骨头脱于髋臼外,股骨头小而呈不规则椭圆形,表面不光滑,股骨颈变短增粗,股骨颈周围软组织增多,股圆韧带增粗变长,大粗隆增大;股骨颈干角减小,ATD 值明显减小,有的 ATD 值甚至呈负值。由此可见,该体位可导致大鼠髋臼发育障碍、髋关节脱位,从而进一步证实婴儿生后双下肢伸直襁褓体位可以导致发育性髋关节脱位。

目前 DDH 的发病机理尚不十分清楚,目前认为有两个主要因素:遗传因素和机械因素^[7-8]。而本研究的造模机理应归于后者。自 Klisic^[9]提出发育性髋脱位(DDH)的概念以来,学者们更加重视髋臼及股骨头间相互机械应力的刺激,股骨近端的最终形状很大程度上依赖于头臼的相互作用。本实验通过固定幼鼠双下肢,使髋关节活动受限,虽然保持头臼同心,但是失去了头臼间正常的相互作用,股骨近端髌板失去正常应力刺激,髌板受力不均,从而使髌板的正常发育和分化受到影响,纵行生长髌板受影响最为明显,生长缓慢,股骨颈峡部髌板和大转子髌

板受影响较小,最终导致髋臼、股骨头失去正常形态的发育,出现髋关节脱位。松紧适宜的髋关节的股骨头软骨对髋臼的压力保证了髋臼正常发育,但过大的压力又会抑制其发育。同样,髋臼对股骨头的压力也对股骨头的球状外形起到了重要作用。近端股骨与髋臼的发育息息相关,二者良好的发育才能形成一个良好匹配的髋关节。

本研究通过模拟婴儿生后双下肢伸直襁褓体位,成功建立了基于这一危险因素的发育性髋关节发育不良的动物模型,且从大体外观、组织形态学及 X 线片几个方面证实了该因素的影响及其程度。这将为更进一步研究 DDH 发病的分子生物学机理及改进治疗方法提供良好的动物模型,同时为临床预防和治疗该疾病也提供了一定的理论依据。

参考文献

- 1 Storer SK, Skaggs DL. Developmental dysplasia of the hip [J]. American Family Physician, 2006, 74 (8): 1310-1316.
- 2 Dezateux C, Rosendahl K. Developmental dysplasia of the hip [J]. Lancet, 2007, 369 (9572): 1541-1552.
- 3 Solomon L, Warwick DJ, Nayagam S. Apley's Concise System of Orthopaedics and Fractures [M]. third ed. Hodder-Arnold, London, 2005: 410.
- 4 Greenhill BJ, Hainau B, Ellis RD, et al. Acetabular changes in an experimental model of developmental dysplasia the hip (DDH) [J]. J Pediatr Orthop, 1995, 15 (6): 789-793.
- 5 Smith WS, Ireton RJ, Coleman CR. Sequelae of experimental dislocation of a weight-bearing ball-and socket joint in a young growing animal; gross alterations in bone and cartilage [J]. J Bone Joint Surg Am, 1958, 40: 1121-1127.
- 6 Delgado BE, Albinana CJ, Miralies F. Why dose pelvic deformity occur in experimental dislocation of the growing hip [J]. J Pediatr Orthop, 1992, 12 (3): 76-83.
- 7 Stevenson DA, Mineau G, Kerber RA, et al. Familial predisposition to developmental dysplasia of the hip [J]. J Pediatr Orthop, 2009, 29: 463-466.
- 8 Stein-Zamir C, Volovik I, Rishpon S, et al. Developmental dysplasia of the hip: risk markers, clinical screening and outcome [J]. Pediatr Int, 2008, 50: 341-345.
- 9 Klisic PJ. Congenital dislocation of the hip: a misleading term: brief report [J]. J Bone Joint Surg Br, 1989, 71: 136.