

非功能体位外固定对仔兔髋关节发育影响的研究

王道喜 刘利君 谢晓丽 刘芳 陈小亮 蒋欣 唐学阳

【摘要】 目的 观察非功能体位制动对髋关节形态及头臼软骨发育的影响,分析其可能的发生机制,以探讨蛙腿位石膏固定治疗发育性髋关节发育不良(Developmental Dysplasia of the Hip, DDH)产生头臼坏死和畸形等并发症的原因和机制。**方法** 取 40 只 4 周龄新西兰仔兔,均为雌性,随机抽样分组,实验组 20 只,对照组 20 只。采用长条形石膏将实验组兔绕过背部将双后肢固定于髋外展 80°,屈膝 90°体位,制作髋关节非功能位制动模型;对照组不予处理。两组在同样条件下饲养。于固定前与固定 4 周后行骨盆正位 X 线扫描,测量髋臼指数,观察头臼发育情况。并行常规 HE 染色检测实验组与对照组之间髋臼骨软骨组织病理学变化,采用 TUNEL 法观察软骨细胞的凋亡。应用 SPSS15.0 软件,使用配对 *t* 检验、方差检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。**结果** 实验组固定 4 周后骨盆正位 X 线片显示 5 髋臼指数较前降低,最大降低 10°,与对照组比较无统计学意义。TUNEL 染色发现实验组肥大细胞层凋亡的软骨细胞很少,实验组与对照组软骨细胞总凋亡率分别为 18.8% 和 31.3%,差异有统计学意义。**结论** 长条形石膏固定大白兔双髋于非功能位置模型成功,较长时间的非功能位石膏固定,可导致兔髋关节臼、头颈形态结构发生一系列改变,组织学上可表现为软骨细胞凋亡机制异常,关节软骨组织退变。提示人类闭合复位蛙腿位石膏固定治疗 DDH 导致类似的病理变化也可能与固定后软骨细胞凋亡机制紊乱有关。

【关键词】 髋关节/生长和发育;动物,实验

Experimental studies on acetabular cartilage of childhood rabbit after nonfunctional-posture immobilization. WANG Dao-xi, LIU Li-jun, XIE Xiao-li, et al. Department of Pediatric Surgery West China Hospital Sichuan University, Sichuan, 610041, China

【Abstract】 Objective To observe the influence of small rabbits hip, including growing rule of hip, pathology changes of acetabular cartilage, by immobilizing into nonfunctional-posture. Try to find out developing rule of the hip during treatment as DDH and the reason caused it. **Methods** Got 40 female NEW Zland rabbits, and random sampled into 2 groups, one was test group and the other was control group. The posterior limbs of test group were immobilized by plaster to cause treating model like DDH. Another 20 white rabbits untreated as control group. At the beginning and after 4 weeks, x-Ray was made to examine the hip status in both groups and measured the Acetabular Index (AI). In the end, the acetabulum was harvested in two groups. Firstly, checked the gross morphology of the hip in two groups, made specimen of the hip, made paraffin slice and HE stain. Then observe pathohistologic features through microscope, compared in two groups. Adopt TUNEL stain to invest apoptosis status by counting apoptotic bodies. Use SPSS15.0 software package to test the difference of the gross looking, acetabular index and chondrocyte apoptotic ratio between the treated group and the control group. **Results** The Acetabular Index got reduced in 5 treated rabbits after 4 weeks, and nothing changed in control group. The gross acetabular sample harvested from the treated group showed a normal shape, like ellipse shape away from the normal spherical shape. And acetabulum became deeper and narrower. It was tested no significant difference between the 2 groups through statistics testing. The cartilage upper the joint became thinner, turned grey, the head of the femur got flat, collodiaphyseal angle and back rake also had great change in some

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2012.04.011

作者单位:四川大学华西医院小儿外科(四川省成都市, 610041), 通讯作者:唐学阳, E-mail: tangxueyang100@163.com, 本研究为四川省科技厅科技攻关项目“小儿发育性髋脱位治疗对髋关节软骨及骨骺影响的临床与基础研究, 2009sz0179”资助项目。

test. After HE staining, we observed lots of fibrous tissue appearing upper cartilage, and cartilage cells arranged in disorder, lost normal column structure. With TUNEL method, it was found apoptotic cells reduced in test group compared with control group. **Conclusion** This research indicated that a successful animal model was established by immobilizing their posterior limbs in non-functional posture, just like the treating method of DDH in human. It is obviously that it could cause a series of changes in acetabulum, head and neck of femur after a long time immobilizing the hip in nonfunction posture. Apoptosis Mechanism of cartilage cells gets abnormal, and articular cartilage gets degenerated. We could conclude that the mechanism also exist in treating of DDH in human, and it is one of the important reasons of lots of sequela, such as traumatic arthritis, arthralgia, deformity of the head and neck of femur.

【Key words】 Hip Joint/GD; Animals, Laboratory

DDH 的治疗原则是早期诊断, 早期治疗^[1-3]。对于 18 个月以内的患儿应尽量采取保守治疗, 即闭合复位后石膏固定治疗; 而 2 岁以上患儿多需要开放手术加石膏制动治疗^[4-5]。大量随访资料显示, 适龄 DDH 患儿经过闭合复位石膏固定治疗后多数可以获得头臼中心性复位, 但仍有部分患儿发生一系列后遗症, 常见的有创伤性骨关节炎、股骨头缺血性坏死、髋内翻等, 甚至有患儿最终不得不行全髋关节置换术 (Total hip arthroplasty, THA)^[6-8]。目前国内文献未发现关于髋关节脱位石膏固定治疗后后遗症的病理学研究报道。研究主要集中在脱位前髋臼发育不良的病因探讨, 以及治疗后股骨头缺血性坏死的临床随访, 甚少关注经过复位治疗后头臼病理改变。DDH 可说是一种终身性疾病, 虽然经过前期干预后可以达到解剖上的头臼复位, 但由于治疗的干预, 特别是采用蛙腿位石膏固定也可能导致一系列结构功能上的并发症, 临床上愈重视。因为医学伦理的限制, 人 DDH 石膏固定治疗后髋关节骨软骨病理改变及机制得不到详细研究, 因此, 有必要采用动物实验方法模拟小儿 DDH 蛙腿位石膏固定, 进行相应研究。

材料和方法

一、髋关节非功能位石膏固定动物模型的建立

取 4 周龄雌性新西兰大白兔 40 只, 体重 0.7 ~ 1.0 kg, 随机分为实验组 20 只, 对照组 20 只。采用 5% 水合氯醛 1.5 ~ 2.5 mL/kg 腹腔注射麻醉后用灌注石膏条绕过背部对兔的双后肢行髋外展 80° 屈膝 90° 外固定 (图 1)。4 周后自耳缘静脉注入空气, 处死动物, 剥除软组织取得双侧髋关节标本。

二、观测指标

1. X 线片观测髋臼指数及头臼发育情况: 固定前和固定 4 周后行骨盆正位 X 线检查, 分别测量两

组动物双侧髋臼指数、头臼关节面直径及头臼发育情况、头臼包容性。

2. 常规 HE 染色: 头、白软骨组织先脱钙 3 ~ 4 周, 然后切片, 常规苏木精-伊红染色, 于光学显微镜下观察骨组织及软骨细胞的形态和分布。

3. TUNEL 法检测软骨细胞凋亡情况: 采用 TUNEL 法检测头臼软骨细胞凋亡, 计数每张切片软骨细胞的凋亡率 (连续 10 个高倍视野中凋亡软骨细胞数/所有软骨细胞数 × 100%)^[9-10]。比较实验组与对照组是否存在差异。

三、统计学处理

运用 SPSS15.0 统计软件, 髋臼指数、股骨颈干角及前倾角的数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 实验组组内、组间 (实验组和对照组) 比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。不同标本凋亡率组间 (实验组和对照组) 比较采用方差齐性检验后, 证实可以用成组配对检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一、骨盆正位 X 线片

固定 4 周后, 实验组 5 只动物髋臼指数较固定前降低, 而对照组髋臼指数无明显改变 (表 1), 无继发髋脱位, X 线片见实验组髋臼及边缘模糊粗糙, 甚至向下倾斜, 头髁密度不均, 类似于人类 DDH 治疗后股骨头周围密度改变 (图 2 ~ 5)。实验组固定 4 周后髋臼指数与固定前相比增大, 与对照组相比也有减小, 组内及两组间比较数据见表 1, 差异无统计学意义 (表 1)。

两组组间固定后 AI 比较采用成组设计的样本均数配对 *t* 检验, $t = 1.535$, $t_{0.10, 19} = 1.729$, $t < t_{0.10, 19}$, $P > 0.10$, 90% CI (21.58, 32.62), 两组差异无统计学意义。



图 1 采用上述方法建立髋关节模型。图 2 实验组于实验开始时行双侧髋关节外展内旋位外固定。图 3 对照组固定前双侧股骨头骨骺及三角软骨骨骺未闭合,髋关节位置良好。图 4 实验组双髋治疗位置固定 4 周后观察双髋间隙模糊毛糙,头骺密度不均,股骨头周围毛糙,有关节炎早期表现。图 5 对照组未行固定 4 周后,健侧髋关节间隙良好,头臼关系佳。

表 1 实验组与对照组髋臼指数 (AI) 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	固定前	固定 4 周后
实验组	20	27.16° ± 2.92°	26.52° ± 4.96° *
对照组	20	27.13° ± 3.61°	27.32° ± 5.35°

注: * 实验组组内比较采用配对设计的均数检验, $t = 1.884$, $t_{0.05,19} = 2.093$, $t < t_{0.05,19}$, $P > 0.05$, 95% CI (24.54, 29.83), 固定前均值 27.16 在可信区间内, 实验组内差异无统计学意义。

二、大体观察

实验组较对照组髋关节囊紧张、增厚, 外展外旋

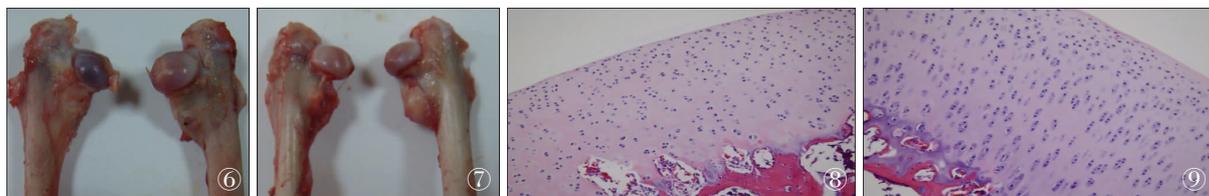


图 6 实验组见股骨头颜色灰暗, 颈干角约 90°, 无明显后倾角。图 7 对照组见股骨头形状规则, 股骨头颜色光滑, 颈干角平均 110°, 后倾角约 5°。图 8 实验组 HE 染色, 软骨细胞排列较乱, 无极性排列, 细胞外基质空泡样结构增多 (HE × 200)。图 9 对照组 HE 染色, 软骨中增殖层软骨细胞呈柱状排列, 结构清晰 (HE 染色 × 200)。

表 2 两组颈干角及后倾角

组别	例数	颈干角	后倾角
实验组	20	107° ± 12°	8° ± 7°
对照组	20	110° ± 15°	10° ± 5°

注: 两组组间颈干角比较采用成组设计的样本均数配对 t 检验, $t = 2.021$, $t_{0.05,19} = 2.093$, $t < t_{0.05,19}$, $P > 0.05$, 95% CI (94.8, 125.1), 两组差异无统计学意义, 后倾角配对 t 检验, $t = 1.552$, $t_{0.05,19} = 2.093$, $t < t_{0.05,19}$, $P > 0.05$, 95% CI (16.3, 0.4), 两组差异无统计学意义。

四、TUNEL 法观察软骨细胞的凋亡

实验组观察到各层凋亡的软骨细胞明显减少, 少许凋亡细胞主要分布于软骨的静息层和增殖层, 在底部的肥大细胞层中, 几乎见不到凋亡的软骨细胞。软骨细胞样细胞增多、肥大, 成堆出现于一个软骨陷窝内。对照侧标本可见凋亡软骨细胞均匀散布于各层软骨细胞中, 但主要存在于肥大细胞带上层与增殖细胞带之间, 增殖层中也可以见到凋亡细胞, 在静息层中的凋亡细胞很少。高倍视野下可以发现肥大层的凋亡软骨细胞大部分与凋亡细胞同时存在于一个软骨陷窝内 (图 10, 11)。

活动范围缩小。股骨头变扁, 不规则, 表面呈不均匀暗灰色。圆韧带存在, 髋臼窝变深, 关节软骨不规则, 关节内无明显软组织填塞, 有 2 例股骨干后倾角改变至前倾约 5° (图 6 ~ 7, 表 2)。

三、HE 染色观察

治疗组和对照组髋关节比较, 软骨细胞大小不一, 细胞排列紊乱, 对照组见正常细胞柱状排列, 而治疗组该排列消失, 软骨细胞周围基质中空泡样结构增多 (图 8 ~ 9)。

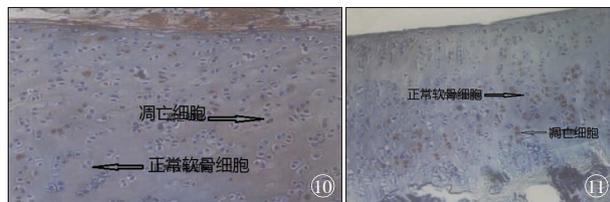


图 10 实验组静息层和增殖层表层仅见少量凋亡细胞, 肥大层几乎不见凋亡软骨细胞 (TUNEL 法, × 200)。图 11 对照组凋亡软骨细胞多数于肥大软骨细胞与增殖层邻近处, 较密集。 (TUNEL 法, × 200)。

两组每只实验兔各取一髋关节的头、臼软骨切片, 每张切片随机采用 10 个高倍视野, 计数凋亡细胞, 统计每只兔单髋的软骨细胞凋亡率 (凋亡率 = 10 个不同高倍视野下的凋亡软骨细胞 / 总的软骨细胞数 × 100%), 并绘制成图如下 (图 12)。

讨论

一、动物模型选择的特点

国内外对于软骨损伤和骨关节炎的实验研究,

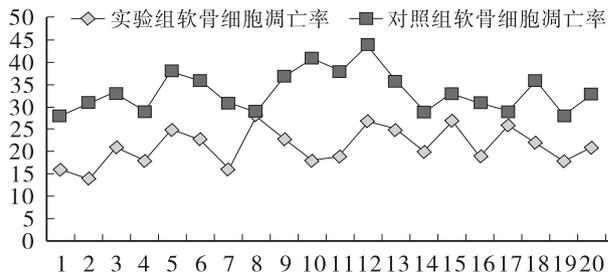


图 12 两组软骨细胞凋亡率比较,采用 SPSS15.0 统计分析,样本方差齐性检验,设定 $\alpha = 0.10$ (双侧),算得 $F = 2.13$, $F_{0.10/2,20} = 2.15$, $P > 0.10$,不能认为方差不齐,采用配对 t 检验进行两成组样本均数比较,设定 $\alpha = 0.05$,计算 $t = 2.180$ $t_{0.05/2,19} = 2.539$, $P < 0.05$,两组差异有统计学意义。

大多数以兔和大鼠为实验动物,而兔的关节软骨更接近人的关节软骨,很多学者指出人类髌臼与兔髌臼组织形态比较相似^[11-15]。本实验共采用 44 只仔兔,实验组死亡 4 只,死亡率 9%。分析其死亡原因,可能由于髌人字石膏制动后,动物腹部受束缚,影响进食,最终导致死亡。本实验总体死亡率较低,符合一般动物建模要求。

实验中观察非功能体位石膏外固定后,实验组股骨头变形,表面不光滑,髌臼指数、颈干角及前倾角有改变,分析可能与外固定后头臼软骨受力方向改变,和长期受异常应力刺激的影响,骨髓随应力改变而发生组织结构改变。此实验由于条件有限,样本量少,观察时间短,最后统计结果未发现显著差异。对大体组织结构改变的研究需要对大样本仔兔行解剖学研究,制定客观解剖学数据和测量方法,在此基础上进行进一步实验方可得出科学的结果。尽管本模型不是人类 DDH 动物模型,但其非功能位固定类似于人类 DDH 复位蛙腿位石膏固定体位,因此,本模型可以作为研究髌关节脱位治疗后并发症、后遗症的动物模型。

二、头臼形态改变的原因分析

实验组大体标本中观察到股骨头颜色暗黑,股骨头失去正常球形,变得扁平,颈干角及前倾角可能有改变,髌臼加深,过度包绕股骨头,髌臼及软骨变薄。虽然此实验最后未发现髌臼指数变化有统计学意义,但 X 线检查发现少数实验组髌臼指数实验后较前下降。分析其原因可能是髌臼及股骨头所承受的机械应力改变导致:髌臼长期只受股骨头某一固定部位的机械压力刺激,髌臼表面的机械压应力分布不均,只有该部位对髌臼着力点处的机械压应力增加,而其它部位应力均减小。这种特定体位下,引起髌臼及股骨头间应力形式及方向改变,可能最终

导致股骨头及髌臼大体形态的对应变化。作者分析若加大仔兔石膏固定角度及延长石膏制动时间,精确测量仔兔髌臼指数的客观方法,髌臼指数改变会有显著差异。前述应力不均衡导致一系列髌结构形态学改变,可能与其产生的力学生物学改变有关。力学生物学指出骨组织具有力学适应性,即骨组织具有依据力学因素改变而塑形和重建的功能,特别是处于生长发育旺盛期的骨组织。力学因素始终作用于骨塑形过程,通过骨吸收与骨形成的相互作用来调节骨的形状、大小及有机组成。在这个过程中,细胞凋亡的机制有可能参与了骨吸收与骨形成的平衡性调节^[19-21]。

三、组织病理学改变分析

本实验 TUNEL 法观察到实验组凋亡的软骨细胞明显减少,在肥大细胞层很难见到凋亡的软骨细胞,只有静息层凋亡的软骨细胞与对照侧差异不大。对照组凋亡的软骨细胞主要分布于肥大细胞带及增殖层,静息细胞层可见少许散在分布。实验组与对照组软骨细胞凋亡率的差异有统计学意义。实验组出现凋亡率异常的原因,作者认为可能是当髌关节被石膏外固定于非功能体位,软骨受力不均匀时,软骨各区域受力状况的变化间接影响了软骨细胞的形态和力学生物学环境。从而使得软骨细胞周围透压力、流体静压、电能梯度和 pH 值等内环境改变。有研究发现这些改变又会影响激活凋亡的死亡受体,抑或影响间质中某些细胞因子(如 NO、PGE2、TNF2 α 等)并最终导致凋亡机制紊乱^[24-25]。

作者推测,肥大层软骨细胞的分化和凋亡受限,将有可能导致骨化过程受阻,逐渐导致骨性髌臼和股骨头发育障碍,最终软骨层变薄,出现头臼表面软骨颜色灰暗、变形等大体形态学的改变。同时,因软骨细胞的分化和代谢发生异常,软骨细胞分泌的胶原性质也发生改变,最终影响髌臼软骨的弹性,成为日后发生骨关节炎等后遗症的病理基础。

总之,本研究表明,通过长条形石膏较长时间固定大白兔双髌于非功能位可导致兔髌关节臼、头颈形态结构发生一系列改变^[26-29],类似于采用蛙腿位石膏固定治疗 DDH 所产生的头臼软骨损害和畸形的后遗症,说明本实验建立的动物模型可以用来进一步研究有关蛙腿位石膏固定治疗 DDH 并发症和后遗症的相关研究。初步的病理学研究发现软骨细胞凋亡机制异常可能与这些髌臼与股骨头软骨损害和畸形的发生有关,具体机制还需要进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Clemente CD. Gray, s Anatomy, Thirtieth American dition [M]. Philadelphia: Lea& Febiger, 1985, 390 - 397.
- 2 Figen Govsa, Asin Ozer, Zuhul Ozgur. Morphologic features of the acetabulum [J]. Arch Orthop Trauma Surg, ,2005. 13 (3) 137 - 140.
- 3 Am stutz HC, Su EP, Le Duffm J. Surface arthroplasty in young patients with hip arthritis secondary to childhood disorders [J]. O rthop C linNorth Am, 2005, 36 (2) :223 - 230.
- 4 Ponseti IV. Growth and development of acetabulum in the normal child [J]. J Bone Jiont Surg, 1978, 60 (A) :575 - 585.
- 5 吴守义, 陈振海. 169 例胎儿、小儿髋关节形态学观察 [J]. 中华小儿外科杂志, 1983, 4 (3) :131 - 134.
- 6 Yoo MC. Cmentless total hip replacement with circumfer-entia acetabular medial wall displace-ment osteotomy in dys-plastichip [C]. Newtrends of joint reconstructive surgery sympo-sium, Beijing, 2002; 26 - 29.
- 7 Meszaros T, Kery L. Quantitative analysis of the growth of the hip joint [J]. A radiological study. Acta Orthop Scand, 1980, 51 (2) :275 - 283.
- 8 Armand M, Lepisto J, Tallroth K. Outcome of periacetabular osteot-omy: joint contact pressure calculation using standing AP radio-graphs, 12 patients followed for average 2 years [J]. Acta Or-thop, 2005, 76: 303 - 313.
- 9 于成文, 武乐斌, 滕剑波. 婴幼儿股骨前倾角的测量及临床意义 [J]. 医学影像学杂志, 2009, 19 (4) :486 - 489.
- 10 Roberto Rivas, Frederic shapiro. Structural stages in the de-velopment of the long bone and epiphyses. J Bone Joint Surg. 2002; 84 (A) :85 - 100.
- 11 刘天婧, 石永言, 赵群. 三维 CT 在股骨颈前倾角测量中的应用 [J]. 中国医科大学学报, 2010, 39 (1) :44 - 50.
- 12 ohn S. Kirkpatrick, John J. Callaghan. The relationship of the intrapelvic vasculature to the acetabulum [J]. Clin Or-thop, 1990, 256: 183 - 190.
- 13 王开明, 刘运敏, 陈秀云. 髋臼静脉的应用解剖 [J]. 局解手术学杂志, 2004, 13 (5) :298 - 299.
- 14 李钢, 朱明义, 陈洪涛. 发育性髋关节脱位治疗后并发症的防治体会 [J]. 中国实用医药, 2009, 4 (1) :101 - 102.
- 15 张志明, 马瑞雪, 吉士俊, 等. 实验性髋臼发育不良的病理形态学研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 9 (5) :480 - 482.
- 16 Gun-II Im, Do-Young Kim, Joo-Ho Shin. Degeneration of the acetabular cartilage in osteonecrosis of the femoral head [J]. Acta Orthop Scand, 2000, 71 (1) :28 - 30.
- 17 余希临, 沈先涛. 发育性髋关节脱位闭合复位时关节腔压力改变与股骨头缺血性坏死的关系 [J]. 中国矫形外科杂志, 2008, 8 (15) :1186 - 1188.
- 18 Minne Heeg, Jan D, Visser, Henk JM. Oostvogel. Injuries of the acetabular triradiate Cartilage and sarcoiliac joint [J]. J Bone Joint Surg (Br), 1988, 1: 34 - 370.
- 19 王红强, 吉士俊, 周永德, 等. 髋臼 Y 形软骨损伤对髋关节发育影响的实验研究 [J]. 中华骨科杂志, 2003, 23: 756 - 760.
- 20 李刚, 林清坚, 黄常红. 发育性髋关节脱位闭合复位后髋臼发育的研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22 (6) :657 - 661.
- 21 Keita Ito, Michael Leuning, Reinhold Ganz. Histopathologic features of the acetabular labrum in femoroacetabular im-pingement [J]. Clin Orthop, 2004, 429: 262 - 271.
- 22 Terjesen T, Halvorsen V. Long-term results after closed re-duction of latedetected hip dislocation: 60 patients followed up to skeletal maturity [J]. Acta Orthop, 2007, 78 (2) :236 - 246.
- 23 Kitoh H, Kitakoji T, Katoh M, et al. Prediction of acetabu-lar development after closed reduction by overhead traction in developmental dysplasia of the hip [J]. J Orthop Sci, 2006, 11 (5) :473 - 477.
- 24 Vallamshetla VR, Mughal E, O'Hara JN. Congenital dislo-cation of the hip. A re-appraisal of the upper age limit for treatment [J]. J Bone Joint Surg Br, 2006, 88 (8) :1076 - 1081.
- 25 Kinik H; Mergen E. Radical reduction for developmental dislocation of the hip (Cakirgil's procedure) [J]. Acta Or-thop Traumatol Turc, 2007, 41 (Suppl1) :47 - 53.
- 26 张铁. 发育性髋关节脱位保守治疗后残余畸形的量化评估 [J]. 内蒙古医学杂志, 2009, 41 (1) :60 - 63.
- 27 Senaran H, Bowen JR, Harcke HT. Vascular necrosis rate in early reduction after failed Pavlik harness treatment of developmental dysplasia of the hip [J]. J Pediatr Orthop, 2007, 27 (2) :192 - 197.
- 28 Forlin E, Munhoz da Cunha LA, Figueiredo DC. Treatment of devel-opmental dysplasia of the hip after walking age with open reduction, femoral shortening, and acetabular os-teotomy [J]. Orthop Clin North Am, 2006, 37 (2) :149 - 160.
- 29 张复文, 卜海富, 周健, 等. 发育性髋关节脱位幼儿站立行走后骨性干预治疗效果 [J]. 中国组织工程与临床康复, 2008, 12 (33) :6505 - 6508.