

# 骨髓脂肪细胞在激素性骨坏死发生过程中的时序变化特点

盛辉 张戈 张颖恺 陈俊伟 李广文 王洪复 梁国穗 秦岭

**摘要：**目的 血管外脂肪堆积如何参与激素性骨坏死的发病机制目前仍然不清楚。本课题应用建立的激素性骨坏死家兔模型研究骨髓脂肪细胞在骨坏死发生过程中组织病理形态学上的时序变化特点。方法 32 只 28 ~ 32 周龄成年新西兰大白兔分为正常对照组(  $n = 16$  )和激素处理组(  $n = 16$  )。激素处理组动物接受 1 次耳静脉内毒素注射和连续 3 次肌肉糖皮质激素注射诱导骨坏死,正常对照组注射相应剂量的生理盐水。各组动物在最后一次注射糖皮质激素 2 周(早期)和 4 周(晚期)以后分别处死 8 只动物,获取双侧近端股骨,应用组织形态计量学技术分别测定股骨髓内脂肪细胞密度、脂肪细胞直径和脂肪细胞面积,同时进行骨坏死的组织病理学评价。结果 激素处理早期组和晚期组骨髓脂肪细胞密度分别明显高于正常对照组 67.1% 和 54.4%,但是早期组与晚期组之间差异不显著。激素处理晚期组骨髓脂肪细胞直径明显高于正常对照组,但是早期组骨髓脂肪细胞直径与正常对照组比较有减小趋势。激素处理早期组和晚期组骨髓脂肪细胞面积都分别明显高于正常对照组 44% 和 83.6%,且晚期组亦显著高于早期组。脂肪细胞直径的频数分布显示,正常对照组峰值介于 40 ~ 50  $\mu\text{m}$ ,激素处理早期组较正常对照组增多的脂肪细胞直径介于 30 ~ 40  $\mu\text{m}$ ,晚期组较正常对照组增多的脂肪细胞直径介于 50 ~ 60  $\mu\text{m}$ 。组织病理学评价显示早期组骨坏死发生率为 25%(2/8),晚期组骨坏死发生率为 87.5%(7/8)。结论 在激素性骨坏死发生过程中,早期血管外脂肪堆积表现为大量生成的小脂肪细胞,后期血管外脂肪堆积表现为脂肪细胞出现肥大。

**关键词：**激素性骨坏死；脂肪细胞；脂肪生成；脂肪转运

## The temporal change of bone marrow fat cells in the process of steroid-associated osteonecrosis development

SHENG Hui, ZHANG Ge, ZHANG Yingkai, et al. Department of Orthopaedics and Traumatology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China

**Abstract :** **Objective** How does the extravascular fat deposition contribute to the steroid-associated osteonecrosis (ON) development still remains unclear. This study aimed to explore the time course change of bone marrow fat cells histopathologically based on our established ON model. **Methods** Thirty-two adult rabbits were divided into normal control group(  $n = 16$  ) and steroid-treatment group(  $n = 16$  ). The rabbits in steroid-treatment group were injected with once lipopolysaccharide and three times of methylprednisolone to induce ON. The rabbits in the normal control group were injected with 0.9% normal saline accordingly. And they were sacrificed in week 2(  $n = 8$  ) and week 4(  $n = 8$  ) after steroid administration respectively. The bilateral femora were harvested and processed for bone marrow fat cell density, fat cell diameter and fat cells area percentage analysis histomorphometrically, and the ON incidence was also evaluated histopathologically. **Results** The fat cells density in steroid-treatment early and late group increased by 67.1% and 54.4% than the normal control group, but there was no significant difference between the treatment-early and -late groups; The fat cells diameter in late group was much larger than the control group, but the fat cell diameter in the early group was smaller than the control group; The fat cells area percentage in the early and late group increased by 44% and 83.6% than the control group. The fat cells size

基金项目：香港政府科研资助委员会(RGC)项目(CUHK4503/06M)与香港科技创新基金(ITS)项目(ITS/012/06)

作者单位：香港,香港中文大学威尔斯亲王医院矫形外科及创伤学系(盛辉、张戈、张颖恺、梁国穗、秦岭);

复旦大学放射医学研究所(盛辉、王洪复),香港中文大学利希慎临床实验室(陈俊伟、李广文)

通讯作者：秦岭,Email:lingqin@cuhk.edu.hk

frequency profile showed most of the increased fat cells were small-sized cells ranging from 30 to 40  $\mu\text{m}$  in diameter in the early group, but the large-sized cells ranging from 50 to 60  $\mu\text{m}$  in the late group. **Conclusion** The marrow fat cells featured increase in the number of small-sized fat cells in the early stage and enlargement in the size of fat cells in the late stage in steroid-associated ON development. These results indicate the active adipogenesis in the early stage and excessive lipogenesis in the late stage.

**Key words:** Steroid-associated osteonecrosis; Fat cells; Adipogenesis; Fat transport

糖皮质激素是临床治疗许多炎症、自身免疫性疾病的常用药物,但是其存在一个严重的并发症,即骨坏死。最近,对 SARS 康复患者的研究显示,接受糖皮质激素治疗的患者骨坏死发生率高达 30%,使激素性骨坏死成为目前医学研究的热点课题之一<sup>[1]</sup>。激素性骨坏死的发病机制存在各种理论学说,如血管外脂肪堆积挤压血管学说、血管内血液高凝学说、血管内脂肪栓塞学说等<sup>[2]</sup>。其中,血管外脂肪堆积挤压血管学说,即激素性骨坏死的患者组织病理学检查结果显示存在明显的骨髓脂肪堆积,但是血管外脂肪堆积如何参与激素性骨坏死的发病机制仍然缺乏证据<sup>[3-5]</sup>。特别是骨髓脂肪细胞与激素性骨坏死在组织病理学上的时序变化的联系仍然不清楚<sup>[5,6]</sup>。本项研究基于已经建立的高发生率的激素性骨坏死家兔模型<sup>[5]</sup>,应用组织形态计量学方法与经典的骨坏死评价标准,研究骨髓中的脂肪细胞在激素性骨坏死发生过程中的动态变化规律,旨在提供血管外脂肪堆积与激素性骨坏死之间联系的证据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型与分组

32 只 28~32 周龄成年新西兰大白兔随机分为正常对照组( $n=16$ )和激素处理组( $n=16$ )。激素性骨坏死动物造模按照本单位已经建立的方法<sup>[5]</sup>,即 1 次静脉内毒素注射( $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Escherichia coli 0111:B4, Sigma-Aldrich),再连续 3 次肌内甲基强的松龙注射( $20 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Pharmacia and Upjohn, USA),注射时间间隔为 24 h。对照组动物接受相应剂量的生理盐水。动物在标准兔笼中饲养,接受正常饮食,活动不受限制。各组动物在最后一次注射糖皮质激素 2 周(早期)和 4 周(晚期)后分别处死 8 只动物,收集双侧股骨标本。

### 1.2 标本收集与处理

动物麻醉后,过量的戊巴比妥钠处死,收集双侧股骨标本,10%福尔马林缓冲液中固定 72 h,75%的乙醇继续固定 1 周,然后用 9%甲酸脱钙 4 周,系列乙醇脱水后石蜡包埋。股骨近端 1/3 用脱钙切片机

沿冠状面切成 4  $\mu\text{m}$  厚薄片,HE 染色,树脂封片显微镜观察。

### 1.3 骨髓中脂肪细胞组织形态学计量

双侧近端股骨的切片每张上下左右随机选择 4 个 100 倍光镜视野,每侧选取 2 张切片进行计量,每个兔标本选取 4 个切片的 16 个视野进行骨髓中所有脂肪细胞的定量测定。骨髓中脂肪细胞密度、脂肪细胞直径和脂肪细胞面积应用 Image-Pro Plus 5.1 组织形态计量软件进行自动选取和分析。脂肪细胞密度即单位骨髓面积(骨小梁除外)内脂肪细胞的数量,脂肪细胞直径即骨髓内脂肪细胞的平均直径,脂肪细胞面积即单位骨髓面积(骨小梁除外)脂肪细胞所占的面积比<sup>[5]</sup>。

### 1.4 骨坏死的组织病理确定

骨坏死的组织学定义为骨小梁中大量骨细胞死亡空陷窝的形成或核固缩现象伴周围脂肪组织的坏死<sup>[5,7]</sup>。两侧股骨中一侧发生骨坏死,即为骨坏死阳性。

### 1.5 统计学处理

不同组别之间脂肪细胞密度、直径和面积的差异用 SPSS 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 统计软件处理,采用方差分析方法进行检验。实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 骨髓脂肪细胞密度

正常对照组骨髓脂肪细胞密度为  $149 \pm 15/\text{mm}^2$ ,激素处理早期组为  $249 \pm 25/\text{mm}^2$ ,较对照组增加 67.1% ( $P < 0.01$ );激素处理晚期组为  $230 \pm 23/\text{mm}^2$ ,较对照组增加 54.4% ( $P < 0.01$ ),显示激素处理组脂肪细胞数量明显增多;激素处理早期组与晚期组骨髓脂肪细胞密度差异无显著性 ( $P > 0.05$ ) (图 1)。

### 2.2 骨髓脂肪细胞直径

骨髓脂肪细胞的平均直径在正常对照组为  $42.6 \pm 3.6 \mu\text{m}$ ,激素处理早期组为  $38.2 \pm 3.1 \mu\text{m}$ ,早期组脂肪细胞平均直径变小,差异有统计学意义 ( $P$

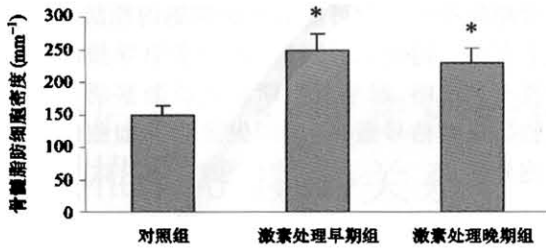


图 1 骨髓中脂肪细胞的密度在不同组别中的变化

注:与对照组比较\* $P < 0.01$

$< 0.05$ );激素处理晚期组脂肪细胞直径为  $52.9 \pm 4.1 \mu\text{m}$ ,晚期组脂肪细胞平均直径明显增大( $P < 0.01$ ),与对照组比较差异有明显统计学意义( $P < 0.01$ )(图 2)。

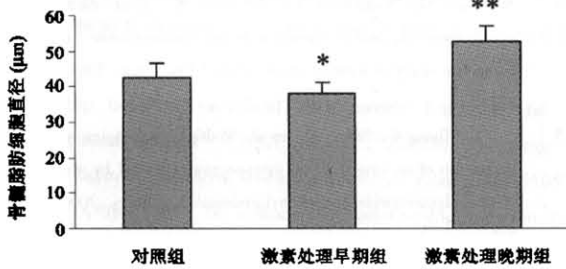


图 2 骨髓中脂肪细胞平均直径在不同组别中的变化

注:与对照组比较\*\* $P < 0.05$ , \* $P < 0.01$

### 2.3 骨髓脂肪细胞面积

正常对照组骨髓脂肪细胞面积比为  $23.2\% \pm 3.9\%$ ,激素处理早期组为  $33.4\% \pm 4.7\%$ ,比对照组增加  $44\%$  ( $P < 0.01$ );激素处理晚期组为  $42.6\% \pm 5.3\%$ ,比对照组增加  $83.6\%$  ( $P < 0.01$ );激素处理早期组与晚期组比较差异有明显统计学意义( $P < 0.01$ )(图 3)。

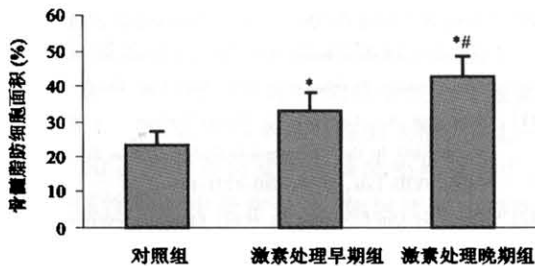


图 3 骨髓脂肪细胞面积比在各组中的变化

注:与对照组比较\* $P < 0.01$ ;与早期处理组比较\* $P < 0.01$

### 2.4 不同直径骨髓脂肪细胞的频数分布

骨髓不同直径脂肪细胞的频数分布结果显示,

正常对照组脂肪细胞直径的频数峰值主要集中在  $40 \sim 50 \mu\text{m}$ ,激素处理早期组脂肪细胞直径的频数峰值集中在  $30 \sim 40 \mu\text{m}$ ,激素处理晚期组脂肪细胞直径的频数峰值集中在  $50 \sim 60 \mu\text{m}$ (图 4、图 5)。

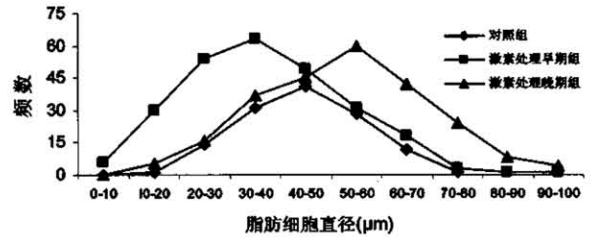


图 4 骨髓中不同直径脂肪细胞的频数分布在不同组别的差异

激素处理早期组增多的脂肪细胞主要是以小直径脂肪细胞为主,晚期组增多的脂肪细胞主要是以大直径脂肪细胞为主。

### 2.5 骨坏死发生率

激素处理早期组骨坏死的发生率为  $25\%$  ( $2/8$ ),晚期组为  $87.5\%$  ( $7/8$ ),对照组没有骨坏死发生。

### 3 讨论

本项实验首次探讨了骨髓脂肪细胞与激素性骨坏死之间在组织病理学上时序关联。研究结果表明随着骨髓血管外脂肪堆积(骨髓脂肪面积)从激素处理早期到晚期不断增大,骨坏死的发生率从早期到晚期也不断升高,提供了骨髓血管外脂肪堆积可能参与激素性骨坏死发病机制在时序关联上的证据。

在本项实验研究中,激素处理早期骨髓脂肪面积明显高于正常对照组,同时不仅骨髓脂肪细胞密度高于正常对照组,而且不同直径脂肪细胞的频数分布显示小尺寸的脂肪细胞数量亦明显高于正常对照组,提示激素处理早期血管外脂肪堆积可能与早期大量生成的脂肪细胞关联。在激素处理后期,骨髓脂肪面积明显高于正常对照组,也明显高于激素处理早期,伴随着相对于早期进一步升高的骨坏死发生率的同时,不仅骨髓脂肪细胞平均直径明显高于正常对照组,而且不同直径脂肪细胞的频数分布显示大尺寸的脂肪细胞亦明显高于正常对照组,尽管脂肪细胞密度明显大于正常对照组,但是相对于早期组差异无显著性,提示激素处理后期血管外脂肪堆积可能与早期大量生成的脂肪细胞直径增大关联。

体外研究报道指出糖皮质激素能够促进骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化<sup>[8,9]</sup>。最近本课题组的

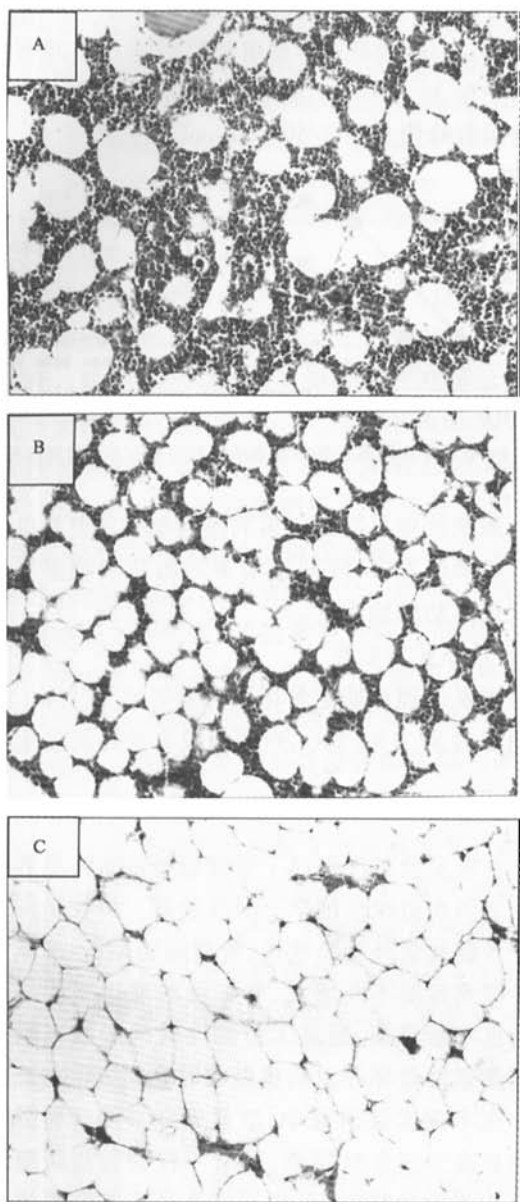


图 5 骨坏死发生过程不同阶段的代表性组织病理切片  
(HE 染色 20×)

(A) 正常对照组兔标本,骨髓中脂肪细胞数量较少,骨髓造血细胞空隙保留 (B) 激素处理早期组兔标本,骨髓脂肪细胞数量明显增多,以小尺寸脂肪细胞为主 (C) 激素处理晚期组兔标本,骨髓脂肪细胞增多脂肪细胞以大尺寸脂肪细胞为主,骨髓造血细胞空隙进一步减小。

研究也发现来源于激素性骨坏死兔的骨髓间充质干细胞在体外诱导培养时,其向脂肪细胞分化潜能也明显增强<sup>[10]</sup>,由此暗示激素处理早期大量生成的小尺寸的脂肪细胞可能来源于骨髓间充质干细胞在糖皮质激素诱导条件下的分化。骨坏死活体动物研究显示脂肪细胞直径的增大通常可由脂肪转运存在障碍解释<sup>[11,12]</sup>,由此提示激素处理后期大量出现的大

尺寸脂肪细胞至少可能与脂肪细胞内脂肪转运能力低下有关。因此,这些结果进一步引导提出一个假设性干预策略,即早期阻断糖皮质激素诱导的脂肪细胞生成的信号通路,后期促进脂肪细胞内控制脂肪胞外转运。

### 【参 考 文 献】

- [1] 李子荣,孙伟,屈辉,等. 皮质类固醇与骨坏死关系的临床研究. 中华外科杂志, 2005, 43: 1048-1053.
- [2] Assouline-Dayana Y, Chang C, Greenspan A, et al. Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. Semin Arthritis Rheum, 2002, 32: 94-124.
- [3] Koo KH, Dussault RG, Kaplan PA, et al. Fatty marrow conversion of the proximal femoral metaphysis in osteonecrotic hips. Clin Orthop Relat Res, 1999, 361: 159-167.
- [4] Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K. Bone marrow fat-cell enlargement in early steroid-induced osteonecrosis—a histomorphometric study of autopsy cases. Pathol Res Pract, 2005, 200: 807-811.
- [5] Qin L, Zhang G, Sheng H, et al. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone. Bone, 2006, 39: 863-871.
- [6] Miyanishi K, Yamamoto T, Irita T, et al. Bone marrow fat cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis. Bone, 2002, 30: 185-190.
- [7] Yamamoto T, Irita T, Sugioka Y, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum, 1997, 40: 2055-2064.
- [8] 盛辉,王洪复,高建军,等. 不同浓度地塞米松诱导大鼠间充质干细胞向成骨细胞的分化. 复旦学报(医学版), 2003, 30: 164-166.
- [9] Cui Q, Wang GJ, Balian G. Pluripotential marrow cells produce adipocytes when transplanted into steroid-treated mice. Connect Tissue Res, 2000, 41: 45-56.
- [10] Sheng H, Zhang G, Qin L, et al. Alterations in the differentiation potential of marrow mesenchymal stem cells in early steroid-associated osteonecrosis. J Orthop Surg Res, 2007 (accepted).
- [11] Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, et al. Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. FEBS Lett, 2006, 580: 4771-4776.
- [12] Zhang G, Qin L, Sheng H, et al. Epimedium-derived phytoestrogen exert beneficial effect on preventing steroid-associated osteonecrosis in rabbits with inhibition of both thrombosis and lipid-deposition. Bone, 2007, 40: 685-692.

(收稿日期: 2006-12-18)