

## 激素性骨坏死与血管内皮细胞功能状态关系的实验研究

西北工业大学医院骨二科(西安 710072) 高培国 范成杰 王坤正\* 武永刚\* 刘国年

**摘要** 目的: 探讨内皮细胞损伤在激素性骨坏死发生发展中的作用机制及相互关系。方法: 选用中国白兔随机分 3 组。A 组: 马血清加用甲基强的松龙组; B 组: 单用四甲基强的松龙组; C 组: 对照组。A、B 组分别于用药前及最后一次用激素后 3、7、21d 测定血浆内皮素(ET)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)和血栓调节蛋白(TM)。结果: A 组血浆中 ET、ICAM-1 及 TM 于最后一次用激素后 3d 呈不同程度的增高, 1 周时显著性增高, 3 周时无明显变化, 单用激素组变化不明显。结论: 激素治疗变态反应性疾病过程中, 引起血液中 ET、ICAM-1 及 TM 增高, 打破了正常细胞因子间的平衡状态, 引起微血管收缩, 血流瘀滞及血液高凝, 进而引起骨内微循环中微血栓形成, 引起骨组织缺血、缺氧, 形成骨坏死。

**关键词** 骨坏死/病理生理学 @ 内皮素 @ 细胞间粘附分子 血栓调节蛋白 兔

### 材料和方法

1 动物模型的复制及分组 健康成年中国大耳白色家兔(由西安医科大学实验动物中心提供), 共 56 只, 雌雄各半, 体重 2.6~3.2kg, 平均 2.9kg, 随机分为 3 组。A 组: 20 只, 激素与马血清共用组, 将马血清(郑州华美公司) 10ml/kg, 经耳缘静脉注射药物, 间隔 3 周时间。相同方法、剂量, 再次经耳缘静脉注射马血清, 间隔 2 周后, 将甲基强的松龙 45mg/kg·d (Upjohn 公司) 连续 5d 腹腔内注射。B 组: 20 只, 单纯注射甲基强的松龙 45mg/kg·d, 连续 5d 腹腔内注射。C 组: 16 只, 腹腔内注射生理盐水作对照。3 组动物均分笼饲养, 自由饮水, 标准饮食。定期采集样品或处死后采集标本。注射甲基强的松龙的动物, 每天每只腹腔内注射青霉素 10 万 U, 预防感染。

### 2 血管内皮细胞相关因子的检测

2.1 检测指标、试剂和方法: 血浆内皮素(ET)和血栓调节蛋白(TM), 其含量测定均采用放射免疫法, 单位分别为 pg/ml 和 ng/ml, 试剂盒均购置北京东亚放射免疫研究所。血浆细胞间粘附分子-1(ICAM-1)水平, 采用酶联免疫法测定, 药盒由德国 Boehringer 公司提供。

2.2 标本收集: A、B 两组动物各 8 只均于用药前及最后一次用激素后 3d、1W、3W 行心内

穿刺抽全血标本, 测定上述各项指标。取 2% EDTA-Na<sub>2</sub> 抗凝血标本 1.0ml 分离血浆, -30 冻存, 以备测定 ICAM-1。另取抗凝血标本 2.0ml, 3000r/min 离心 10min, 取血浆-70 冻存, 以备测定 ET-1 和 TM。

### 2.3 检测过程

2.3.1 TM 测定: 采用放射免疫法<sup>[1]</sup>, 包被 SZ-57IgG 的放射免疫小杯每孔加入 1~20 稀释的血浆或 TM 标准液 200 $\mu$ l, 反应后加入 I<sup>125</sup>-SZ-53 IgG 200 $\mu$ l, 最后用计数仪测定每孔结合的放射性强度及 M 含量。

2.3.2 ICAM-1 测定: 采用 ELISA 法<sup>[2]</sup>, 将抗 ICAM-1 单抗取 5 $\mu$ l 加 1240 $\mu$ l 包被缓冲液, 加入酶标板中, 4 过夜。加封闭缓冲液, 37 放置 30min, 系列稀释的标准 ICAM-1 或待测样品, 加 1~200 稀释的兔抗 ICAM-1 抗体, 再加辣根过氧化酶标记羊抗兔抗体, 加底物 OPD 显色, 用 2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 酶联读数仪 490nm 读取 OD 值, 从标准曲线上查出各样标本 ICAM-1 含量。

2.3.3 ET-1 测定: 采用放射免疫法测定。具体为: 先将标准 ET 和各血浆标本与 ET 抗体, 加入含有 TritonX-100 的放射免疫分析缓冲液中, 混匀后 4 孵育过夜, 次日各管中加入 I<sup>125</sup>-ET 混匀, 4 孵育过夜, 第 3 天分别在各管中加入第二抗体和正常兔血清, 混匀, 室温再孵育 2h, 离心分离结合和游离的 I<sup>125</sup>-ET, 在  $\gamma$  计数仪上测每管

\* 西安交通大学第二医院

沉淀物的 cpm 值,以标准 ET 为横坐标, B/B<sub>0</sub> 百分数为纵坐标,绘制标准曲线,再根据曲线计算出每管标本血浆 ET 浓度。

结果

1 各组用药前后血浆中 TM、ET 及 ICAM-1 的含量见表 1、2、3。

表 1 各组用药前后血浆中 TM 含量 (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ , n = 8)

组别	用药前	第 2 次注射 马血清后 24hr	最后一次注射激素后		
			3d	1W	3W
A 组	21.65 ± 7.02	29.39 ± 6.18 <sup>#</sup>	32.20 ± 9.41 <sup>#</sup>	58.82 ± 10.09 <sup>#</sup>	50.91 ± 8.68 <sup>#</sup>
B 组	21.40 ± 6.98		24.84 ± 5.65	25.19 ± 10.04	31.53 ± 7.14 <sup>#</sup>

注: 用药后与用药前组比较<sup>#</sup> P < 0.05, A 组与 B 组比较, P < 0.05 以下相同

表 2 各组用药前后血浆中 ET 含量 (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ , n = 8)

组别	用药前	第 2 次注射 马血清后 24hr	最后一次注射激素后		
			3d	1W	3W
A 组	45.67 ± 9.53	41.76 ± 8.11	50.81 ± 9.60	63.36 ± 11.02 <sup>#</sup>	79.39 ± 12.54 <sup>#</sup>
B 组	44.37 ± 10.00		52.79 ± 8.97	54.69 ± 10.20	63.74 ± 9.44 <sup>#</sup>

表 3 各组用药前后血浆中 ICAM-1 含量 (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ , n = 8)

组别	用药前	第 2 次注射 马血清后 24hr	最后一次注射激素后		
			3d	1W	3W
A 组	11.84 ± 2.34	18.78 ± 4.90	15.71 ± 5.31	21.92 ± 8.64 <sup>#</sup>	18.71 ± 7.44 <sup>#</sup>
B 组	12.02 ± 2.16		13.40 ± 3.16	14.99 ± 5.56	15.28 ± 4.82

讨论

我们的实验检测了不同时期血浆 ET-1、ICAM-1 及 TM 的含量,以便进一步分析骨坏死不同时期血管内皮细胞的功能状态。本实验中选择内皮素目的是测定内皮细胞损伤后血管活性肽的变化,目前已知 ET 是作用最强和效应最持久的内源程序性血管活性肽。其血管收缩的强度是血管紧张素的 10 倍,去甲肾上腺素的 100 倍<sup>[3]</sup>。我们的实验显示给家兔肌注大剂量甲基强的松龙后可使血浆中 ET-1 水平明显升高,给药时间越长 ET-1 水平升高越明显。激素组使机体内脂质代谢紊乱,产生高脂血症是造成血管内皮损伤,内皮素分泌释放增加的主要原因。因为高脂血症时血中低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白增多与血管内皮细胞上的受体结合通过三磷酸肌醇细胞内信息传递系统促进内皮细胞合成和释放;它们也可以直接损伤血管内皮细胞使其内皮素释放增多;氧化型低密度脂蛋白还可刺激巨噬细胞合成和分泌内皮素。王坤正<sup>[4]</sup>发现给家兔注射皮质激素后血中总胆固醇和甘油三酯明显升高,股骨头

内血管内皮细胞可见脂质沉积。降脂药 Clinofibrate 不仅抑制高脂血症的发生,亦明显降低血浆内皮素水平。股骨头骨内 ET-1 大量增加可使股骨头内微循环发生障碍,最终导致股骨头骨细胞及骨组织坏死。大剂量使用激素后,一方面血中脂类物质增多,血液粘滞度增加,股骨头内血管脂肪栓塞。另一方面,股骨头局部 ET-1 增多,使股骨头内的血管收缩、舒张失去平衡,出现强烈而持久的血管收缩,引起股骨头骨组织缺血、缺氧、酸中毒。而组织损伤后释放出凝血溶酶、TNF、IL-1 等物质反过来又刺激血管内皮细胞的 ET mRNA 的表达,使内皮素合成和释放增多,进一步引起血管收缩形成恶性循环。

细胞间粘附分子-1 (ICAM-1, CD<sub>45</sub>) 是一种糖蛋白,主要表达于内皮细胞,也表达在淋巴细胞和其它白细胞上。正常状态下成低水平表达,受细胞因子的作用后表达增强,在发生免疫反应和炎症部位的血管内皮细胞表达增强,从而促进白细胞由血管内游至血管外。白细胞在这些区域的聚集一方面对血管产生机械梗阻作用,导致迟发性缺

血后低灌注,加重局部骨组织缺血;另一方面白细胞本身对 endothelial 细胞产生毒性作用<sup>[5]</sup>。白细胞颗粒内还含有蛋白水解酶,弹性蛋白酶等,可降解几乎所有的细胞外基质成份,袭击完整的细胞,导致内皮细胞脱落,骨内微循环再次遭受严重的破坏。

实验中我们观察到单纯激素组变化不大,而 A 组在第二次注射马血清后 24h 发现 ICAM-1 明显增高。这可能与早期免疫排斥反应有关,在激素应用后 3d 虽然一次性降低,但后期又逐渐升高,晚期的升高可能由于一方面免疫复合物对 ICAM-1 的刺激作用,另一方面由于骨坏死动物高脂血症的存在,可以稳定地增加 ICAM-1 mRNA 的水平。另外,随着用药时间的延长骨组织局部微循环缺血,缺氧,促使内皮细胞合成促炎性因子如 IL-1、TNF- $\alpha$  等,两者均诱导 ICAM-1 表达。总之,ICAM-1 在马血清与激素诱导的骨坏死模型中可通过直接和间接途径参与骨内微循环的损害,从而使这种恶性循环进一步加重。血浆内升高的 ICAM-1 浓度能间接反应免疫活性程度,在预示和区分病情的严重程度方面具有重要的诊断、预后和治疗上的价值。

血栓调节蛋白(TM)是位于血管内皮细胞表面的蛋白质,它与凝血酶以化学计量 1:1 的比例形成可逆复合物,在该复合物形成后,凝血酶不再具有促凝活性,但却获得了比游离的凝血酶强 1000 倍的激活蛋白 C 的能力,活化的蛋白 C 与蛋白 S 存在的情况下可以使血液凝固因子 Va 及 VIIIa 活化,这样,通过催化蛋白 C 的激活, TM 在血管壁表面作为凝血调节剂具有重要的作用<sup>[6]</sup>,另外, TM 还能降解纤溶酶原激活物抑制剂,增加血中纤溶酶原激活物水平,促进纤溶。研究发现,血 TM 主要由损伤的血管内皮细胞将 TM 降解段释放到血中,而生理情况下,内皮细胞不分泌和释放 TM<sup>[7]</sup>。因此,血 TM 水平反映了血管内皮损伤的程度,是反应血管内皮损伤和破坏的一个标志。

实验中我们观察到 A 组在第 2 次注射马血清后 24h 血 TM 便升高,而在应用激素后 3d 升高不明显,随着用药时间的延长 TM 水平逐渐升高,这可能是由于马血清所致的变态反应使小血管壁损伤,开始应用激素时减轻了局部的炎症反应,激素的蓄积作用还没有发挥,随着用药时间的延长激素进一步使内皮细胞合成受到抑制,内皮细胞

损伤加重。同时在造模后期由于继发纤溶使部分血栓溶解,尤其动脉内血栓溶解,血管再通,坏死血管壁随再灌注破裂,缺血再灌注损伤通过氧自由基造成内皮细胞膜脂质过氧化,致使内皮细胞损伤加重,使骨髓内出血,进一步加重了股骨头的损害,而单纯应用激素组早期 TM 变化不明显,到用药后 1 周时其含量虽升高,但仍与用药前无显著性差异。检测血浆中 ET 及 TM 水平来结合其它影像学检查早期诊断骨坏死提供了实验依据。

血管内皮损伤、血流瘀滞和血液高凝 3 个因素是造成骨内微循环血栓形成的主要原因。内皮细胞损害最有可能激活血小板聚集和纤维蛋白血栓形成,以后逐渐波及小静脉、静脉、小动脉和骨外动脉。变态反应和激素所致血液高粘度、高凝、高脂血症和纤溶下降更具备了血栓形成的条件,加之缺血再灌注损伤和继发纤溶所致纤溶下降以及局部内皮素所致血管收缩, ICAM-1 诱导的白细胞在血管壁的粘附,使血管管腔更进一步狭窄,这些综合因素的作用使骨内微循环更容易形成血栓,造成骨髓和骨缺血,骨髓坏死和骨坏死。

#### 参考文献

- 1 周泉生,赵益明,许昌韶,等.血管内皮损伤及血栓疾病的血浆血栓调节蛋白测定.中华医学杂志,1993;73(3):174
- 2 杨贵贞.免疫生物工程纲要与技术.吉林科学技术出版社,1991;198~199
- 3 Kiowski W, Luscher TF, Linder L, et al. Endothelin-1 induced vasoconstriction in human Circulation, 1991; 83:469
- 4 王坤正,毛履真,胡长恨.激素性股骨头缺血坏死发病机理的实验研究.中华骨科杂志,1994;32(9):515
- 5 Sugito K, Morozumi K, Koide M, et al. Expression of ICAM-1 protein and ICAM-1 mRNA in human rejecting renal allografts. Transplant Proc, 1995; 27:911
- 6 Esmon NL. Thrombomodulin. Sem in Thromb Hemost, 1987; 13:454
- 7 Aso Y, Inukai T, Takemura Y, et al. Mechanisms of elevation of serum and urinary concentrations of soluble thrombomodulin in diabetic patients: possible application as a marker for vascular endothelial injury. Metabolism, 1998; 47:362

(收稿:2002-12-27)