

- (11):1237-1244
- 8 Nicolas MM, Wu Y, Middleton LP, *et al.* Loss of myoepithelium is variable in solid papillary carcinoma of the breast [J]. *Histopathology*, 2007, 51(5):657-665
- 9 杨光之, 李静, 金华, 等. 乳腺表现为扩张性侵袭的乳头状癌的病理解形态学观察 [J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(2):81-85
- 10 Jukkola A, Bloigu R, Soini Y, *et al.* c-erbB-2 positivity is a factor for poor prognosis in breast cancer and poor response to hormonal or chemotherapy treatment in advanced disease [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(3):347-354
- 11 Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, *et al.* Panelmembers meeting high lights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005 [J]. *Ann Oncol*, 2005, 16:1569-1583
- 12 Shabnam J, Chen XW, Lee LS, *et al.* Pleomorphic solid and cystic papillary carcinoma of the breast two cases occurring in young women [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2004, 8:126-129
- (收稿日期:2014-01-13)
- (修回日期:2014-02-01)

淫羊藿配合髓芯减压术治疗兔激素性股骨头坏死的实验研究

刘志国 马文海 李 杰

摘 要 目的 观察淫羊藿配合髓芯减压术对兔激素性股骨头坏死的治疗效果并探讨其作用机制。**方法** 用改进的马血清加甲基泼尼松龙的方法诱导制备兔激素性股骨头坏死动物模型。将动物分为正常对照组、模型组、手术组(髓芯减压术)、中药组(淫羊藿)、综合组(髓芯减压术+淫羊藿)。治疗后对各组股骨头的骨密度、病理组织学、IGF1、BMP2 mRNA 和蛋白的表达进行检测。**结果** 与对照组相比,模型组骨密度明显下降,中药组、手术组、综合组均有所改善,综合组改善效果最好。HE 染色综合组骨小梁饱满,排列规则整齐,骨细胞基本正常,造血细胞丰富,脂肪细胞较少。IGF1mRNA 和蛋白水平,模型组高于对照组。BMP-2 mRNA 和蛋白水平,模型组较对照明显下降。IGF1、BMP-2 mRNA 和蛋白的表达,中药组与综合组,手术组与模型组相比均无明显差异;而在中药组和综合组的表达显著高于模型组和手术组,且 IGF1 与 BMP-2 mRNA 及蛋白在股骨头的表达呈明显正相关。**结论** 淫羊藿可上调成骨相关蛋白 IGF1 和 BMP-2 的表达,其与髓芯减压术相结合可有效促进兔激素性股骨头坏死的损伤修复。

关键词 激素性股骨头坏死 淫羊藿 髓芯减压术 IGF1 BMP-2

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A

Study of Epimedium Combined with Core Decompression for Steroid-induced Femoral Head Necrosis in Rabbits. Liu Zhiguo, Ma Wenhai, Li Jie. *The Third Department of Orthopedics, The First Central Hospital of Baoding, Hebei 071000, China*

Abstract Objective To study the effect and the mechanism of epimedium combined with core decompression for steroid-induced femoral head necrosis in rabbits. **Methods** The rabbit models of steroid-induced femoral head necrosis were established by the modified method of horse serum plus methylprednisolone and rabbits were divided into control, model, operation (core decompression), Chinese-medicine(epimedium) and integration group(core decompression + epimedium). After treatment, the bone mineral density, pathological changes, mRNAs and proteins expressions of IGF1, BMP-2 of femoral head were examined. **Results** Compared with model group, the bone mineral density of the femoral head were improved in operation, Chinese medicine, integration group, and the improvement in integration group was much better than other two groups. Results of HE staining showed that in integration group bone trabecula was plump and in regular arrangement, osteocyte tend to be normal, hematopoietic cells were abundant and fat cells were less. Compared with control group, in model group, the expressions of IGF1 mRNA and protein were increased and the expressions of BMP-2 mRNA and protein were decreased. The expressions of IGF1, BMP-2 mRNA and protein in integration and Chinese medicine group were higher than those in model and operation group, and had no obvious difference between integration and Chinese medicine group, model and operation group. In addition, there was a positive correlation between IGF1 and BMP-2 in femoral head. **Conclusion** Epimedium could up-regulate the expressions of IGF1 and BMP-2. It combined with core decompression plays an important role in the reparation of steroid-induced femoral head necrosis.

Key words Steroid - induced femoral head necrosis; Epimedium; Core decompression; IGF1; BMP - 2

激素性股骨头坏死 (steroid - induced femoral head necrosis) 是肾上腺皮质类固醇药物性股骨头坏死的简称,随着临床大量激素药物的应用,其发生率呈逐年升高的趋势。目前,手术与中医药治疗各有利弊,探讨如何将西医手术和中医药的治疗优势有机结合,寻求一种疗效确切、费用低、不良反应小的综合疗法,对于提高治疗激素性股骨头坏死的疗效,减轻患者和社会经济负担具有重要意义。本研究应用中药淫羊藿配合髓芯减压术治疗动物激素性股骨头坏死,观察该疗法对股骨头骨组织再生的影响,揭示其治疗激素性股骨头坏死的机制。

材料与方法

1. 实验动物:健康雄性新西兰大白兔 60 只,年龄 5 ~ 6 个月,体重 2.5 ~ 3.5 kg,由白求恩国际和平医院动物实验室提供 [实验动物许可证号: SYXK - (军) 2012 - 017]。

2. 主要仪器及试剂:马血清 (北京元亨圣马生物技术研究), 甲基泼尼松龙 (美国辉瑞生物制药公司), 中药淫羊藿成品 (贵州同仁堂药业有限公司), 反转录试剂盒 (MBI Fermentas 公司), 兔抗 BMP - 2 多克隆抗体和兔抗 IGF1 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体 (美国 Sigma 公司), OMNI TH 组织均质仪 (美国 OMNI 公司), PCR 仪 (德国 Effendorf 公司), 电泳仪 (美国 Bio - Rad 公司), 半干电转仪 (北京君意东方电泳设备有限公司), 柯达计算机 X 线摄影成像系统 (900 CR), Lunar prodigy 型双能 X 线骨密度仪 (美国 GE 公司)。

3. 动物模型制作及分组:将动物随机分为正常对照组 ($n = 12$) 和激素模型组 ($n = 48$)。按照王伟等^[1]造模方法造模,兔耳缘静脉注射马血清 10ml/kg,间隔 3 周后,马血清量减为 6 ml/kg,间隔 2 周后,腹腔注射甲基泼尼松龙 45mg/kg, 1 次/天,连续 3 天。注射激素期间,每只动物每次腹腔注射青霉素 10 万单位,1 次/天,连续 7 天。经 X 线检测证实造模成功后,将模型动物随机分为模型组、手术组 (髓芯减压术)、中药组 (淫羊藿)、综合组 (髓芯减压术 + 淫羊藿),每组各 12 只。

4. 动物处理:手术组:在大转子上用 2mm 细钻头向股骨头内钻孔,以不越过股骨头软骨面为界。彻底清除髓腔后关闭切口,术后肌内注射青霉素 10 万单位预防感染,1 次/天,共 1 周。中药组:将淫羊藿加水文火煎熬至生药质量浓度为 1g/ml,每天给予淫羊藿煎液 6ml/kg 喂养,连续 8 周。综合组:在髓芯减压术的基础上配合喂养淫羊藿。术后 10 周末,取出双侧股骨头,经 DEPC 处理的 PBS 液冲洗后,一侧股骨头放入液氮中冻存,用于 PCR 及 Western blot 法检测。另一侧用于病理组织学检测。

5. X 线检查:于末次激素注射后 4 周末,两组各取 6 只动

物,氯胺酮复合麻醉后,拍双髋正位 X 线片。

6. 病理组织学观察:组织经固定、脱钙、脱水、透明后,石蜡包埋,切片行 HE 染色观察。

7. RT - PCR:采用高速均质仪进行组织粉碎处理,提取总 RNA 并反转录为 cDNA,进行 PCR 扩增,产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因的表达。所用引物见表 1。

表 1 目的基因检测所用引物

基因	引物序列 (5'→3')	引物大小 (bp)
IGF1	TATTTCAACAAGCCACG	205
	TCTTCAAATGTACTTCCTTCTG	
BMP - 2	CGAAACACAAACAGCGGAAAC	97
	GCCACAATCCAGTCGTTCCA	
GAPDH	TGACAACGAATTTGGCTACAG	83
	GGT GGT TTG AGG GCT CTT ACT	

8. Western blot 法检测:于粉末状骨组织中加入 PIPA 裂解液,提取总蛋白,取等量蛋白进行 SDS - PAGE 凝胶电泳,转膜后,膜室温封闭 1h,加入一抗 (IGF1 1:200; BMP - 2 1:500 稀释),4℃ 杂交过夜。将膜转移到辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体中 (1:10000 稀释),室温杂交 1h。曝光、显影及定影。

9. 统计学方法:所有统计学分析借助于 SPSS 13.0 完成,实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,行单因素方差分析 (one - way ANOVA),多样本组间比较采用 SNK - q 检验,两变量之间的关系采用相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. X 线检查结果:正常对照组股骨头形态完整,关节面清晰,股骨头骨密度均匀 (图 1A)。激素模型组股骨头关节面模糊,可见骨密度减低,囊性变,骨硬化等表现 (图 1B)。



图 1 注射激素后 4 周双侧 X 线表现

A. 正常对照组; B. 激素模型组

2. IGF1 和 BMP - 2 mRNA、蛋白的表达: IGF1mRNA 和蛋白水平,模型组显著高于对照组,可能是机体的自发修复反应促使其表达升高。BMP - 2 mRNA 和蛋白水平,模型组较对照组明显下降,说明

激素可抑制 BMP - 2 基因转录及蛋白表达。IGF1、BMP - 2 mRNA 和蛋白的表达,中药组与综合组,手术组与模型组相比较均无明显差异,说明髓芯减压术并不能够促进 IGF1 和 BMP - 2 的表达,而两者在中药组和综合组的表达则显著高于模型组和手术组,说明淫羊藿可以明显促进 IGF1、BMP - 2 基因的转录及蛋白表达(图 2、图 3)。并且,IGF1 与 BMP - 2 mRNA ($r = 0.706, P < 0.01$) 及蛋白($r = 0.792, P < 0.01$) 在股骨头的表达呈明显正相关。

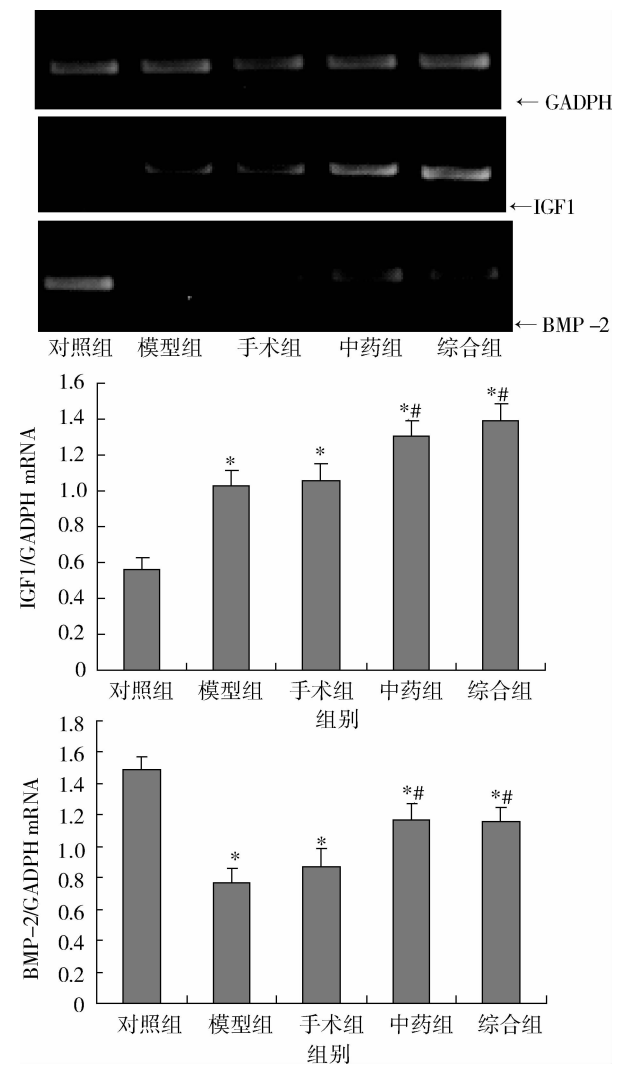


图 2 RT - PCR 检测股骨头骨组织中 IGF1 和 BMP - 2mRNA 的表达
与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$

3. 骨密度:与对照组相比,模型组骨密度明显下降。中药组、手术组、综合组均较模型组有所改善,其改善效果综合组 > 中药组 > 手术组(表 2)。

4. HE 染色结果:对照组:骨小梁完整,排列规则整齐,骨细胞清晰可见,骨髓造血细胞丰富,脂肪细胞

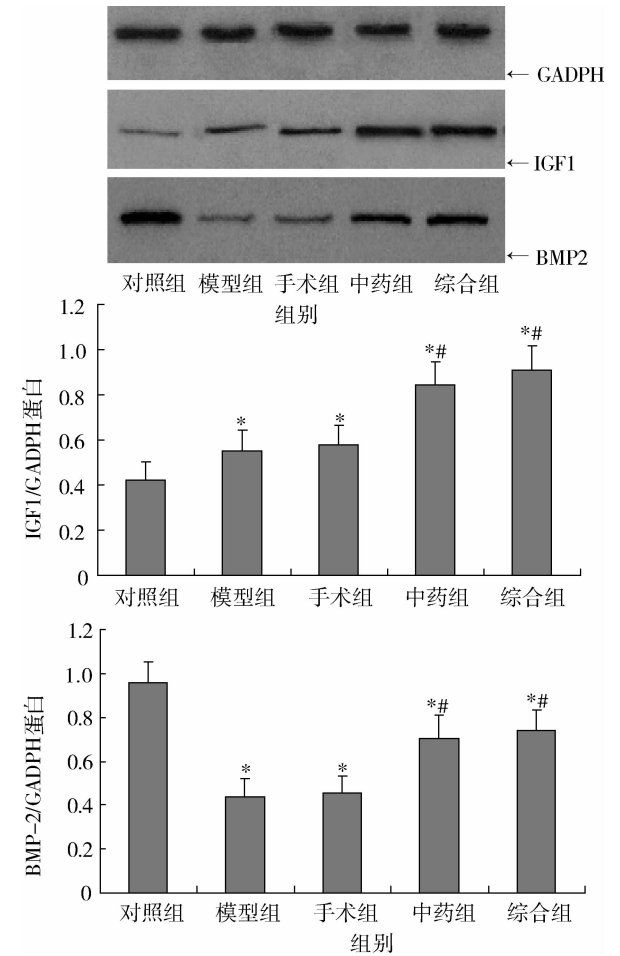


图 3 Western blot 法检测股骨头骨组织中 IGF1 和 BMP2 蛋白的表达

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$

表 2 各组股骨头骨密度的改变 ($\bar{x} \pm s, n = 12, \text{g/cm}^2$)					
组次	组别	骨密度值		<i>F</i>	<i>P</i>
1	模型组	0.161 ± 0.023		4.357	<0.01
2	手术组	0.215 ± 0.029			
3	中药组	0.239 ± 0.025			
4	综合组	0.265 ± 0.021			
5	对照组	0.276 ± 0.027			
对比组	1 与 5	2 与 5	3 与 5	4 与 5	1 与 2
<i>q</i>	6.442	5.343	4.811	3.485	3.159
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.05
对比组	1 与 3	1 与 4	2 与 4	3 与 4	2 与 3
<i>q</i>	3.964	6.027	3.768	3.526	3.618
<i>P</i>	<0.05	<0.01	<0.05	<0.05	<0.05

较少(图 4A)。模型组:骨小梁稀疏,萎缩,断裂,骨细胞固缩或消失,骨髓造血细胞减少,脂肪细胞增生肥大(图 4B)。综合组:骨小梁饱满,排列规则整齐,无断裂,骨细胞基本正常,造血细胞丰富,脂肪细胞较少(图 4C)。手术组:骨小梁不完整,变细,部分碎裂,

可见少量新生骨细胞,造血细胞较模型组增多,仍有较多脂肪细胞(图4D)。中药组:骨小梁较为饱满,

排列较规则,可见部分新生骨细胞,造血组织增生,但是数量明显少于综合组,可见部分脂肪细胞(图4E)。

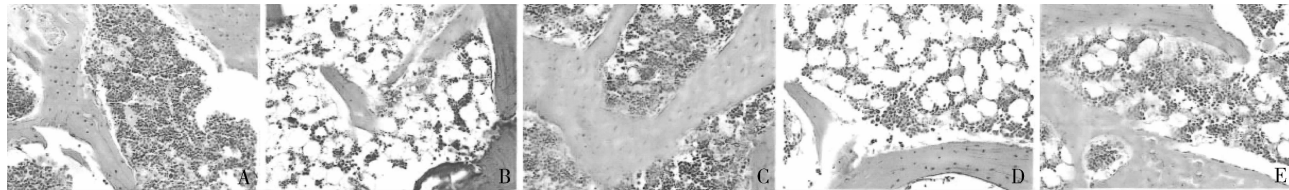


图4 各组股骨头病理组织学观察(HE, ×100)

A. 对照组;B. 模型组;C. 综合组;D. 手术组;E. 中药组

讨 论

激素性股骨头坏死占非创伤性股骨头坏死的首位,并有逐年增高的趋势。建立激素性股骨头坏死的动物模型对探索成功的治疗模式是必不可少的。用马血清致动物出现Ⅲ型变态反应,此后应用糖皮质激素抑制胶原和弹性纤维的合成,导致小动脉断裂或栓塞。同时,激素诱导骨髓脂肪化,脂肪细胞增生肥大,成骨细胞减少,髓内压升高,血管受压,脂肪损害血管内皮细胞,局部血栓形成,或脂肪栓塞都可促使骨坏死的发生。本实验参照王伟等^[1]的方法,用改进的马血清加甲基泼尼松龙的方法诱导制备兔激素性股骨头坏死动物模型,其影像学改变符合临床典型的股骨头坏死的特征,且具有简便、动物病死率低、成功率高等优点。

胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)由骨骼细胞分泌,具有调节骨保护素,抑制破骨细胞的分化成熟,减少骨吸收,系统调节骨形成和骨吸收的偶联,加速骨转化。IGF1还可刺激骨骼Ⅰ型胶原蛋白合成,加快骨基质的沉积,降低胶原蛋白的分解和抑制胶原蛋白酶的合成,有效促进骨细胞的有丝分裂和成骨细胞的分化,增强碱性磷酸酶活性和钙盐沉着^[2]。同时,IGF1对软骨细胞形态发生和有丝分裂以及功能代谢都有广泛影响^[3]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是目前应用最多的一类促骨生长因子。其中BMP-2是公认的最主要的骨形成调控因子,其诱导成骨的生物学作用和长期效果也已被证实。

研究发现,BMP-2的表达受多种因子如Menin、Smurf1和Cthrc1等的调节^[4]。梁冬春等^[5]以不同浓度的IGF1刺激分离培养的大鼠成骨细胞,发现IGF1可在转录水平增加大鼠成骨细胞中BMP-2的表达,并呈明显的剂量依赖关系。笔者通过检测兔激素性股骨头坏死治疗前后IGF1、BMP2 mRNA及蛋白的表

达,发现两者表达呈明显正相关,由此推测在骨修复过程中,IGF1对BMP2的表达可能具有正向调节的作用。

髓芯减压术(core decompression)通过降低骨内高压,排出坏死组织,刺激减压孔周围的血管形成,增强坏死骨的爬行替代,使坏死灶得以消除。但研究认为,Ⅰ期的患者经过髓芯减压治疗后,临床效果好,Ⅱ、Ⅲ期的治疗效果不好^[6]。该手术只能缓解疼痛的症状,一旦发生股骨头坏死,其病理过程将持续发展,最终全髋置换术将不可避免。笔者研究发现,髓芯减压术后,IGF1和BMP-2的表达没有发生改变。可见,单纯髓芯减压术并不能缓解激素对坏死骨组织自我修复的抑制作用,具有一定的局限性,若能结合其他促进股骨头隧道内血管再生及骨形成的治疗,必将加快股骨头的修复。中药淫羊藿具有温肾壮阳、强筋骨、祛风湿的功效,广泛应用于肾虚所致的腰膝酸软、筋骨衰弱失用等,其主要化学成分为黄酮类化合物、木脂素及生物碱,其中淫羊藿总黄酮主要参与骨代谢,具有促进体外成骨细胞增殖及分化成熟、抑制破骨细胞的活性。研究发现,在治疗激素性股骨头坏死方面,淫羊藿可以降低血液流变学的各项指标、保证组织有效灌注、改善股骨头的局部微循环;降低血液内甘油三酯和总胆固醇的水平,有效改善股骨头内环境,促进损伤修复。有效抑制皮质激素对OPG/RANKL/RANK系统的影响,使OPG/RANKL比值接近正常,阻止由于OPG/RANKL表达异常导致的破骨细胞异常活化^[7-9]。笔者研究发现,中药组与模型组,综合组与手术组相比,IGF1和BMP-2表达明显升高,新生骨组织、骨髓造血细胞、骨密度增加,提示淫羊藿通过上调IGF1和BMP-2的表达而加快激素性股骨头坏死的修复。

综上所述,髓芯减压术可以缓解疼痛,延缓骨坏死的进展,但不能很好地促进坏死骨组织的自我修

复,而中药淫羊藿可促进骨生长。两者相结合可有效增加股骨头的损伤修复,为临床上治疗激素性股骨头坏死提供了一种较为有效的方法。

参考文献

- 1 王伟,刘利英,王坤正,等. 激素性股骨头坏死模型的建立及其发病机理的探讨[J]. 西安交通大学学报, 2007, 28(5): 544 - 547
- 2 浮煜,贺西京,王宇强,等. 仙仲注射液对兔早期膝关节炎形态学及胰岛素样生长因子-1 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(3): 237 - 240
- 3 Abdallah BM. Osteoblast differentiation of NIH3T3 fibroblasts is associated with changes in the IGF-1/IGFBP expression pattern[J]. Cell Mol Biol Lett, 2006, 11(4): 461 - 474
- 4 王霖霞,李玉坤. BMP-2 信号通路成骨细胞分化[J]. 国际骨科学, 2009, 30(2): 132 - 136

- 5 梁冬春,王宝利,左爱军,等. 胰岛素样生长因子 1 对成骨细胞中 BMP2、BMP7 基因表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(1): 45 - 47
- 6 Aigner N, Schneider W, Eberl V, et al. Core decompression in early stages of femoral head osteonecrosis - an MRI controlled study[J]. Int Orthop, 2002, 26(1): 31 - 35
- 7 李慧英,王义生. 淫羊藿对激素性股骨头坏死大鼠血液流变学及骨密度的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(7): 1226 - 1228
- 8 李慧英,孟东方. 淫羊藿提取液对激素性股骨头坏死的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 50(14): 9395 - 9398
- 9 王建忠,高鸿雁,王坤正,等. 淫羊藿对激素性股骨头坏死骨组织 OPG/RANKL mRNA 表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(10): 1714 - 1717 (收稿日期:2013-08-27) (修回日期:2013-09-30)

胸段食管癌喉返神经旁淋巴结转移对颈淋巴结转移的预测价值

杨 扬 王 启 刘延凤 许瑞彬

摘 要 **目的** 探讨胸段食管癌喉返神经旁淋巴结转移对颈淋巴结转移的预测价值。**方法** 回顾性分析 2000 年 1 月 ~ 2013 年 8 月因胸段食管癌接受三野根治术的 64 例患者临床病理资料及随访结果。**结果** 食管癌位于胸上段时,无论喉返神经旁淋巴结有无转移,颈部淋巴结转移率均类似 ($P > 0.05$)。食管癌位于胸中段、胸下段时,当喉返神经旁淋巴结有转移时,颈部淋巴结转移率较高,当喉返神经旁淋巴结无转移时,则颈部淋巴结转移率较低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。喉返神经旁淋巴结、纵隔淋巴结和腹部淋巴结转移数 > 4 个是颈部淋巴结转移的独立预测因素。长期随访结果表明喉返神经旁淋巴结无转移的患者其 5 年生存率为 51%,喉返神经旁淋巴结有转移的患者其 5 年生存率为 32%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 喉返神经旁淋巴结对颈部淋巴结转移有预测价值。

关键词 食管癌 三野根治术 淋巴结转移

[中图分类号] R735 [文献标识码] A

Thoracic Recurrent Laryngeal Lymph Node Metastases Predict Cervical Node Metastases in Selected Patients with Thoracic Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Yang Yang, Wang Qi, Liu Yanfeng, et al. Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital, Yanan University, Shaanxi 716000, China

Abstract Objective To investigate whether recurrent laryngeal nerve lymph nodes (RLN LNs) are considered sentinel nodes for cervical LN metastases of esophageal cancer. **Methods** We retrospectively analyzed medical records of 64 patients with thoracic esophageal cancer who underwent three-field lymphadenectomy from January 2000 to August 2013, focusing on lymph node status and survival rates. **Results** The rate of cervical LN metastases did not differ significantly between RLN LN+ (for metastasis) and RLN LN- in patients with upper thoracic esophageal tumors. However, in a subgroup of patients with middle/lower thoracic esophageal tumors, cervical LN metastases were significantly more common in patients with positive rather than negative RLN LNs. RLN metastasis and the number of lymph nodes metastasis > 4 could strongly indicate the cervical LN positivity. Negative RLN LNs was associated with longer survival than RLN LN positive patients. **Conclusion** Metastasis to RLN LNs is a reliable indicator of cervical LN metastasis in middle/lower thoracic esophageal cancer.

Key words Esophageal carcinoma; Three-field lymphadenectomy; Lymph node metastases