

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.14.020

右归饮对激素性股骨头坏死大鼠血液骨矿物质盐及骨密度的影响

宋才渊^{1,2,3}, 沈兴潮^{1,2}, 吕帅杰^{1,2}, 鲍航行², 金红婷^{1,3}, 肖鲁伟^{1,3}, 童培建^{1,2,3*}

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053; 2. 浙江省中医院; 3. 浙江省骨伤研究所)

摘要 目的 探讨右归饮治疗激素性股骨头坏死的可能作用机理。方法 30 只 SD 大鼠随机分成正常对照组、右归饮组、激素模型组, 每组 10 只。激素模型组和右归饮组采用腹腔内注射大肠杆菌内毒素联合肌肉注射甲泼尼龙琥珀酸钠建立激素性股骨头坏死模型, 正常对照组给予等量生理盐水注射。右归饮组在造模的同时每天给予右归饮 20 g/(kg·d) 灌胃, 连续 8 周, 激素模型组和正常对照组予等容积生理盐水灌胃。观察各组大鼠一般情况, 于第 4、8 周末行骨 X 线及骨密度检测, 第 8 周末测定血清钙、磷水平。结果与正常对照组比较, 激素模型组和右归饮组大鼠第 2 周开始至第 8 周体重均明显降低 ($P < 0.05$); 从第 3 周至第 8 周右归饮组大鼠体重较激素模型组明显升高 ($P < 0.05$)。激素模型组大鼠第 4、8 周股骨干、股骨头、脊柱骨密度水平较正常对照组明显下降, 而右归饮组第 4 周时股骨干、股骨头和第 8 周时股骨干、股骨头、脊柱骨密度水平较激素模型组明显升高 ($P < 0.01$)。与正常对照组比较, 右归饮组和激素模型组血清钙、磷水平均降低 ($P < 0.01$); 与激素模型组比较, 右归饮组血清钙、磷水平升高 ($P < 0.01$)。结论

右归饮能明显提高激素性股骨头坏死模型大鼠的骨密度, 其机理可能与改善血清钙、磷水平有关。

关键词 激素性股骨头坏死; 右归饮; 矿物质盐; 骨密度

临床上自身免疫系统疾病、器官移植、肾病综合征等内科疾病不可避免地需要长期激素治疗, 因此糖皮质激素导致的股骨头坏死在骨科临床非常常见。激素性股骨头坏死可严重致残, 并且治疗较为困难^[1], 目前其共识是尽可能修复股骨头坏死, 推迟人工关节置换的手术时间^[2]。在这些相关内科疾病治疗离不开糖皮质激素的前提下, 寻找一条既能允许合理应用激素, 又能预防激素性股骨头坏死的方法十分必要^[3]。中医学认为, 机体体质虚弱、肝肾精血不足是骨质疏松的潜在原因, 病变涉及肝、脾、肾三脏, 故补益肝肾、益骨生髓、活血化瘀成为治疗股骨头坏死的基本法则^[4]。浙江省中医院长期应用右归饮预防和治疗激素性股骨头坏死取得较好的疗效, 可以缓解患者症状、延缓疾病进程^[5-6]。本实验通过建立激素性股骨头坏死大鼠模型同时给予右归饮治疗, 观察大鼠血液骨矿物质盐及骨密度的变化, 从而探讨右归饮治疗激素性股骨头坏死中骨代谢的相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠 30 只, SPF 级, 6 周龄, 体重 (200 ± 10) g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 实验动物许可证号: ACXK(沪) 2013-0016。

1.2 药物、试剂、仪器

右归饮制备: 原方由熟地黄 30 g、炒山药 6 g、山萸肉 3 g、枸杞子 6 g、姜杜仲 6 g、炮附片 9 g、肉桂 4.5 g、炙甘草 4.5 g 组成, 称取 30 倍量处方, 加 1 L 水浸泡 1 h 后, 加 10 倍水于密闭式高压自动煎药锅内煎煮, 提取 2 次; 所得提取液过滤后合并, 放冰箱内冷藏 12 h, 以 4000 r/min、3℃ 下离心 15 min, 共 2 次, 合并上清液, 加热至沸腾, 放置冰箱内冷藏 12 h, 再以 4000 r/min、3℃ 下离心 15 min, 共 2 次, 合并上清液, 浓缩至 1.35 g/ml, 于 60℃ 减压干燥, 干燥物碾细, 过 120 目筛后得到右归饮细粉。右归饮制备由浙江中医药大学药制剂室统一完成。大肠杆菌内毒素 (美国 Sigma 公司, 批号: L2880); 水合氯醛 (青岛宇龙海藻有限公司, 批号: H37022673); 注射用甲泼尼龙龙

基金项目: 浙江省中医药重点研究计划(2011ZZ005)

* 通讯作者: tongpeijian@163.com, 13906503677

琥珀酸钠 (Pfizer Manufacturing BeLgium NV 公司, 批号: A07056); 注射用青霉素钠 (华北制药股份有限公司, 批号: F3117217)。全自动生化分析仪 (日本日立株式会, 7020 型); 双能 X 线骨密度测量仪 (美国 Lunar 公司, DXA 机型)。

1.3 动物分组及处理方法

30 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常对照组、右归饮组、激素模型组, 每组 10 只。激素模型组和右归饮组大鼠腹腔内注射大肠杆菌内毒素 $97.92 \mu\text{g/kg}$, 每 24 h 1 次, 连续 2 次, 末次注射后 24 h, 肌肉注射甲泼尼龙琥珀酸钠 24.5 mg/kg , 同时注射青霉素钠 8 万 U/只预防感染, 每周 2 次, 连续注射 6 周, 建立激素性股骨头坏死模型^[7-9]。正常对照组给予等量生理盐水注射。右归饮组在造模的同时每天给予药物浓度为 2 g/ml 的右归饮 10 ml/kg 灌胃, 每天 1 次, 连续 8 周。激素模型组和正常对照组予等容积生理盐水。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 一般形态学观察 每周称体重 1 次, 观察并记录大鼠毛发光泽度、食量、大小便、活动度、步态、精神状况等变化。

1.4.2 X 射线观察 第 4、8 周末, 各组大鼠 10% 水合氯醛腹腔注射, 麻醉后大鼠卧位放置, 固定四肢, 做 X 射线摄影检查。观察股骨头外形、密度及骨小梁变化。

1.4.3 骨密度测定 第 4、8 周末, 各组大鼠水合氯醛麻醉后大鼠卧位放置, 固定四肢, 采用双能 X 线骨密度测量仪检测左侧股骨干、股骨头和脊柱 3 个区骨密度。

1.4.4 血清钙、磷水平测定 第 8 周末各组动物采血前禁食 12 h, 于清晨空腹状态下经心脏采血 5 ml , 置入真空洁净促凝管, 3000 r/min 离心 15 min 分离血清, 全自动生化分析仪测定血清钙、磷水平。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计处理, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠 X 射线观察结果

第 4 周各组大鼠骨 X 线表现均无明显改变。第 8 周 X 线表现为: 正常对照组大鼠髋关节间隙成一均匀弧形, 股骨头呈球形, 密度均一, 关节面光滑圆润; 激素模型组大鼠髋关节间隙变狭, 股骨头密度不均, 出现斑块状高密度区域, 股骨头变平, 骨小梁模糊; 右归饮组大鼠与激素模型组相比, 关节间隙、股骨头大体形态得到改善, 股骨头密度较均一, 斑块状高密度区域减少。

2.2 各组大鼠血清钙、磷水平比较

表 1 示, 与正常对照组比较, 右归饮组和激素模型组血清钙、磷水平均降低 ($P < 0.01$); 右归饮组和激素模型组比较, 血清钙、磷水平均有升高 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血清钙、磷水平比较 (mmol/L , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	钙	磷
正常对照组	10	2.248 ± 0.057	3.448 ± 0.552
激素模型组	10	$2.050 \pm 0.057^*$	$2.703 \pm 0.179^*$
右归饮组	10	$2.151 \pm 0.029^{*\Delta}$	$3.040 \pm 0.144^{*\Delta}$

注: 与正常对照组比较, $* P < 0.01$; 与激素模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠一般情况

正常对照组大鼠毛色光滑、眼睛明亮、行动活泼、粪便正常; 激素模型组第 2 周后出现精神萎靡、畏寒倦卧、反应迟钝、体毛干枯脱落、食欲下降、消瘦、活动迟缓、嗜睡等表现, 并且随用药天数的增加而加重, 伴小便清长、大便溏薄; 右归饮组大鼠食欲基本正常, 无体毛干枯脱落, 无竖毛现象, 反应较灵活, 大小便基本正常。表 2 示, 与正常对照组比较, 激素模型组和右归饮组大鼠第 2 周开始至第 8 周体重均明显降低 ($P < 0.05$); 从第 3 周至第 8 周右归饮组大鼠体重较激素模型组明显升高 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠不同时间骨密度水平比较

表 3 示, 与正常对照组同时间点比较, 激素模型组大鼠第 4、8 周股骨干、股骨头、脊柱骨密度水平明显下降, 右归饮组第 4 周股骨头和第 8 周时

表 2 各组大鼠不同时间体重比较 (g , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周	第 8 周
正常对照组	10	200.14 ± 0.77	229.70 ± 4.57	255.80 ± 3.04	283.33 ± 2.78	310.51 ± 3.78	342.77 ± 3.89	355.23 ± 3.99	368.80 ± 4.11
激素模型组	10	200.20 ± 1.09	$223.30 \pm 3.40^*$	$239.30 \pm 3.16^*$	$255.21 \pm 2.11^*$	$283.44 \pm 3.35^*$	$306.32 \pm 3.67^*$	$321.32 \pm 3.78^*$	$336.42 \pm 4.22^*$
右归饮组	10	200.03 ± 1.22	$224.80 \pm 4.34^*$	$247.80 \pm 3.29^{*\Delta}$	$265.67 \pm 4.22^{*\Delta}$	$294.76 \pm 5.43^{*\Delta}$	$321.56 \pm 4.11^{*\Delta}$	$336.45 \pm 4.33^{*\Delta}$	$349.34 \pm 3.91^{*\Delta}$

注: 与正常对照组同时间点比较, $* P < 0.05$; 与激素模型组同时间点比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 各组大鼠不同时间股骨头、脊柱、股骨干骨密度比较 (g/cm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	股骨干	股骨头	脊柱
正常对照组	第 4 周	10	0.490 $\pm$ 0.014	0.239 $\pm$ 0.012	0.221 $\pm$ 0.021
	第 8 周	10	0.516 $\pm$ 0.022	0.244 $\pm$ 0.008	0.236 $\pm$ 0.020
激素模型组	第 4 周	10	0.414 $\pm$ 0.011 [*]	0.190 $\pm$ 0.008 [*]	0.182 $\pm$ 0.013 [*]
	第 8 周	10	0.375 $\pm$ 0.020 ^{*▲▲}	0.160 $\pm$ 0.007 ^{*▲▲}	0.156 $\pm$ 0.011 ^{*▲}
右归饮组	第 4 周	10	0.477 $\pm$ 0.008 [△]	0.213 $\pm$ 0.020 ^{*△}	0.204 $\pm$ 0.024
	第 8 周	10	0.468 $\pm$ 0.007 ^{*△}	0.204 $\pm$ 0.123 ^{*△}	0.197 $\pm$ 0.015 ^{*△}

注: 与正常对照组同时间点比较, * $P < 0.01$; 与激素模型组同时间点比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组第 4 周比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

股骨干、股骨头、脊柱骨密度水平也明显下降 ($P < 0.01$)。与激素模型组同时间点比较, 右归饮组第 4 周时股骨干、股骨头和第 8 周时股骨干、股骨头、脊柱骨密度水平均明显升高 ($P < 0.01$)。与本组第 4 周比较, 第 8 周时激素模型组大鼠股骨干、股骨头、脊柱骨密度水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而右归饮组大鼠股骨干、股骨头、脊柱骨密度水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

中医学认为, 激素类药物具有温补脾肾、补火助阳、回阳救逆的作用, 久用则耗伤肾精, 损伤真阴, 耗伤正气, 并可阴损及阳。在激素减量或停药后, 内源性激素因肾上腺皮质功能减退而分泌不足, 可出现畏寒肢冷、腰膝酸软等肾阳虚的症状^[1]。右归饮出自明代医家张介宾的《景岳全书》, 是温肾壮阳的经典方。方中肉桂、附子温里驱寒, 培补肾中元阳; 山萸肉、熟地黄、山药、枸杞子滋阴益肾, 填精补髓, 养肝补脾, 取“阴中求阳”之义; 再用杜仲补益肝肾, 壮腰膝。诸药合用以温补肾阳, 阴阳兼顾, 阴中求阳, 则元阳得以归原^[1]。既往实验研究证实, 右归饮能较好地预防激素性股骨头坏死的发生, 改善其肾阳虚状态^[2]。本实验通过给予实验大鼠长期大剂量激素肌肉注射, 大鼠第 2 周后出现精神萎靡、畏寒倦卧、反应迟钝、体毛干枯脱落、食欲下降、消瘦、活动迟缓、嗜睡等一系列类似肾阳虚的症状, 诸症随用药天数的增加而加重。右归饮组大鼠肾阳虚的症状明显改善, 体重的增加幅度也大于激素模型组, 证实了右归饮能较好地改善激素性股骨头坏死动物模型肾阳虚状态。

长期大量运用糖皮质激素会导致机体骨代谢方面发生异常, 这也是引起股骨头坏死的原因之一^[3]。X 射线摄片能够大体观察股骨头密度、关节外形、关节间隙等指标改变, 是评价激素性股骨头坏死较好的影像学指标^[4]。本研究结果显示, 右归饮组第 8 周 X 线表现与激素模型组相比, 关

节间隙、股骨头大体形态得到改善, 股骨头密度较均一, 斑块状高密度区域减少。骨密度是评价骨皮质厚度、骨小梁结构和骨量的重要影像学指标, 也是通过间接方法判断骨丢失程度的指标之一^[5]。实验结果发现, 右归饮能明显改善激素造模引起的股骨干、股骨头、脊柱等区域的骨密度降低现象。有学者认为, 股骨头缺血坏死发病期间经历了一个共同的骨质疏松的病理过程, 提示激素性股骨头坏死骨密度早期就发生明显变化^[6], 故尽早测定骨密度的改变对股骨头坏死的防治具有重要作用。

体内钙、磷等参与骨代谢的矿物质盐大部分存在于骨中, 其主要是促进骨矿的沉积和骨基质的合成^[7]。本研究结果显示, 激素模型组血钙、血磷明显低于正常对照组, 右归饮组虽然低于正常对照组, 但明显高于激素模型组。以上结果显示, 右归饮可以抑制破骨细胞活性, 促进成骨细胞生长分化、功能活性增强, 因此, 调节骨代谢可能是右归饮预防激素性股骨头坏死的机制之一。

参考文献

- [1] 毛强. 激素性股骨头坏死基因表达变化及右归饮调控作用的实验研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2011.
- [2] 王萧枫, 许兵, 童培建, 等. 右归饮协同干细胞转染 VEGF 移植修复激素性骨坏死的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(9): 1930-1933.
- [3] Erken HY, Ofluoglu O, Aktas M, et al. Effect of pentoxifylline on histopathological changes in steroid-induced osteonecrosis of femoral head: experimental study in chicken [J]. Int Orthop, 2012, 36(7): 1523-1528.
- [4] 李新建, 于兰英, 邓伟, 等. 淫羊藿防治激素性股骨头坏死的作用机制研究 [J]. 中医正骨, 2013, 25(11): 3-7.
- [5] 吴云刚, 肖鲁伟, 童培建. 右归饮对激素性股骨头坏死患者股骨近端骨髓骨活性影响的实验研究 [J]. 中国骨伤, 2009, 22(2): 115-117.
- [6] Wu CL, Mao Q, Jin HT, et al. Study on the effect of Youguiyin on regulating gene expression profile of the rats with femoral head necrosis induced by steroid [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(4): 269-275.
- [7] 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(医学版), 2007, 28(5): 544-547.
- [3] 吴承亮, 卢建华, 季卫锋, 等. 右归饮对家兔激素性股骨头坏死血脂的影响 [J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(6): 45-47.
- [4] 李瑞琦, 张国平, 李宜炯, 等. 提高激素性股骨头坏死模型成活率的方法 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(50): 8729-8734.
- [5] 夏炳江, 童培建, 肖鲁伟, 等. 大鼠激素性股骨头坏死肾阳虚型病证结合模型构建与评价的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 301-304.
- [6] 胡森峰, 周晓成, 单乐天, 等. 右归饮对大鼠激素性股骨头坏死行为学的影响 [J]. 中国骨伤, 2013, 26(1): 50-53.
- [7] 吴俊生. 右归饮预防激素性股骨头坏死机制的实验研究 [J]. 杭州: 浙江中医药大学, 2009.
- [8] 黄莉, 刘允, 魏秋实, 等. 补肾健脾化痰方对去势大鼠股骨区域性骨矿含量和骨密度的影响 [J]. 广东医学, 2014, 35(4): 489-492.
- [9] 徐英杰, 姚辛敏, 尹羽薇, 等. 生骨胶囊对兔早期激素性股骨头坏死骨修复作用影响的研究 [J]. 中医药学报, 2014, 42(2): 23-25.
- [10] 章建华, 尹华, 林婷, 等. 芪参健骨颗粒对激素性股骨头坏死大鼠骨组织的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(1): 1-4.
- [11] Hirahara K, Kano Y, Asano Y, et al. Osteonecrosis of the femoral head in a patient with Henoch-Schönlein purpura and drug-induced hypersensitivity syndrome treated with corticosteroids [J]. Acta Derm Venereol, 2013, 93(1): 85-86.
- [12] Xie XH, Wang XL, He YX, et al. Promotion of bone repair by implantation of cryopreserved bone marrow-derived mononuclear cells in a rabbit model of steroid-associated osteonecrosis [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(5): 1562-1571.

Effect of *Yougui Yin* (右归饮) on the Blood Bone Mineral Salt and Bone Mineral Density in Rats with Femoral Head Necrosis

SONG Caiyuan^{1,2,3}, SHEN Xingchao^{1,2}, LÜ Shuaijie^{1,2}, BAO Hangxing², JIN Hongting^{1,3}, XIAO Luwei^{1,3}, TONG Peijian^{1,2,3}

(1. First Clinical Medical School, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang Province, 310053; 2. Traditional Chinese Medical Hospital of Zhejiang Province; 3. Institute of Orthopaedics and Traumatology of Zhejiang Province)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yougui Yin* in the treatment of steroid induced femoral head necrosis. **Methods** Thirty Sprague Dawley rats were randomly divided into normal control group, *Yougui Yin* group and hormone model group, with 10 rats in each group. Models of steroid induced necrosis of the femoral head were established by intraperitoneal injection of Escherichia coli endotoxin combined with intramuscular injection of methylprednisolone sodium succinate in hormone model group and *Yougui Yin* group. The normal control group received with the equal amount of saline injection. At the same time, *Yougui Yin* group was gavaged with 20 g/(kg · d) of *Yougui Yin* for 8 consecutive weeks, while the hormone model group and the normal control group were gavaged with the equal volume of physiological saline. The general situation of rats in each group was observed, bone X-ray and bone mineral density were tested at the 4th and 8th weekend, and the serum levels of calcium and phosphorus were detected by the 8th weekend. **Results** Compared with the normal control group, the body weight of the rats in the hormone model group and *Yougui Yin* group was significantly decreased ($P < 0.05$) from the beginning of the 2nd week till the 8th week. Compared with hormone model group, the body weight of the rats in *Yougui Yin* group increased significantly ($P < 0.05$) from the 3rd to the 8th week. The mineral density levels of femoral shaft, femoral head and spine bone decreased significantly in the rats in the model group in the 4th and 8th week. However, the mineral density level of the femoral shaft, femoral head in the *Yougui Yin* group was significantly higher than that in the hormone model group in the 4th week ($P < 0.01$), and the mineral density level of the femoral shaft, femoral head and spine bone in the *Yougui Yin* group in the 8th week was also significantly higher than that in the hormone model group ($P < 0.01$). Compared with the normal control group, the level of serum calcium and phosphorus in *Yougui Yin* group and the hormone model group were decreased ($P < 0.01$). Compared with the hormone model group, the level of serum calcium and phosphorus was elevated in *Yougui Yin* group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Yougui Yin* can significantly improve the bone mineral density in the femoral head necrosis model rats, and its mechanism may be related to the improvement of serum levels of calcium and phosphorus.

Keywords steroid induced femoral head necrosis; *Yougui Yin*; mineral salt; bone mineral density

(收稿日期: 2014-08-26; 修回日期: 2014-12-15)

编辑: 邓 媛