

双合汤对酒精性股骨头坏死的干预作用

刘华, 魏爱淳*, 秦广珍, 管晓军, 包海林
(海安县中医院, 江苏 海安 226600)

[摘要] **目的:**探讨双合汤对酒精性股骨头坏死(AOFH)的干预作用。**方法:**将 60 只中国白兔随机分成正常组,模型组,美多巴组($0.125 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),双合汤低、中、高剂量组($9, 18, 27 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。除正常组外,各组给予中国白酒(乙醇含量 56%) $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ig,在造模的同时,各给药组均 ig 给药,正常组、模型组给予生理盐水,预防性 ig 给药 8 周后取血测定血液流变学指标及血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白(HDL),低密度脂蛋白(LDL),骨钙素(BGP),血管内皮生长因子(VEGF),骨形态发生蛋白-2(BMP-2)的水平。采血后,处死实验动物,观察组织病理学的变化。采用 RT-PCR 技术检测股骨头组织中过氧化物酶体增殖子活化受体 γ (PPAR γ)mRNA 与成骨基因骨钙素(OC)mRNA 的表达。**结果:**与正常组比较,模型组中 TC, TG, LDL 的水平及血液流变学指标均显著升高($P < 0.01$), HDL, BGP, VEGF, BMP-2 的水平均显著下降($P < 0.01$)。与模型组比较,双合汤中、高剂量组可显著降低 TC, TG, LDL 的水平及血液流变学指标与升高 HDL, BGP, VEGF, BMP-2 的水平($P < 0.01$)。模型组中空骨陷窝率、最大脂肪细胞平均直径均显著高于正常组($P < 0.01$),成骨细胞计数显著低于正常组($P < 0.01$)。双合汤中、高剂量组空骨陷窝率、最大脂肪细胞平均直径均明显低于模型组($P < 0.01$),成骨细胞计数均明显高于模型组($P < 0.01$)。模型组中 PPAR γ mRNA 表达值显著高于正常组($P < 0.01$), OC mRNA 表达值显著低于正常组($P < 0.01$)。双合汤中剂量组中 PPAR γ mRNA 表达值明显低于模型组($P < 0.01$), OC mRNA 表达值明显高于模型组($P < 0.01$)。**结论:**使用双合汤干预能有效改善酒精引起的高脂血症,改善血液流变学,降低血液黏度,有效抑制酒精诱导的兔股骨头内骨髓基质细胞的成脂分化,维持其成骨分化,从而防治 AOFH。

[关键词] 酒精性股骨头坏死; 双合汤; 脂质; 血黏度; 基因

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0141-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016050141

Intervention Effects of Shuanghe Tang on Alcohol-induced Psteonecrosis of Femoral Head

LIU Hua, WEI Ai-chun*, QIN Guang-zhen, GUAN Xiao-jun, BAO Hai-lin
(Haian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haian 226600, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the interventional effect of Shuanghe Tang on alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head (AOFH). **Method:** Totally 60 Chinese white rabbits were randomly divided into the normal group, the model group, the madopar group, and low, medium and high-dose Shuanghe Tang groups. Except for the normal group, all of the remaining groups were lavaged with Chinese liquor (alcohol content 56%) $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Meanwhile, each drug-treated group was lavaged with drugs. The normal group and the model group were given normal saline. After 8 weeks of reventive administration, the rabbits were sacrificed to collect blood for determination of the index of hemorheology, serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), bone glaprotein (BGP), vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). The rabbits were killed after blood collection, and histopathological changes were detected. The expression levels of PPAR γ mRNA and OC mRNA in femoral heads

[收稿日期] 20150226(013)

[基金项目] 江苏省南通市市级科技计划项目(HS13933)

[第一作者] 刘华, 硕士, 主治医师, 从事创伤骨科、关节外科的基础与临床研究, Tel: 18934506146, E-mail: LHSS666@163.com

[通讯作者] * 魏爱淳, 主任中医师, 从事骨病、腰腿痛的基础与临床研究, Tel: 13301478499, E-mail: jshawac@163.com

were analyzed by RT-PCR. **Result:** Compared with the normal group, the level of TC, TG, LDL and the index of hemorheology in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), and the levels of HDL, BGP, VEGF and BMP-2 were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the level of TC, TG, LDL and the index of hemorheology were significantly decreased in the medium and high-dose Shuanghe Tang groups, and the level of HDL, BGP, VEGF, BMP-2 and Osteoblast count were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the empty bone lacuna rate and average diameter of the max adipocyte in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), and the osteoblasts count was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the empty bone lacuna rate and average diameter of the max adipocyte were significantly decreased in the medium and high-dose Shuanghe Tang group ($P < 0.01$), and the osteoblasts count was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the expression of PPAR γ mRNA in the model group was significantly increased ($P < 0.01$), and the expression of OC mRNA was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of PPAR γ mRNA was significantly decreased in the medium dose Shuanghe Tang group ($P < 0.01$), and the expression of OC mRNA was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Shuanghe Tang can effectively relieve alcohol-induced hyperlipidemia, improve hemorheology and reduce blood viscosity, inhibit adipogenic differentiation of marrow stromal cells induced by alcohol, and maintain osteogenic differentiation in femoral head in rabbits, so as to prevent and treat AOFH.

[**Key words**] alcohol-induced osteonecrosis of femoral head; Shuanghe Tang; lipid; blood viscosity; gene

酒精性股骨头坏死 (alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head, AOFH) 是导致非创伤性股骨头坏死 (osteonecrosis of the femoral head, ONFH) 的最为常见的因素之一, 其是由于乙醇过量的摄入而导致的^[1]。AOFH 的西医治疗主要以行人工全髋关节置换术为主, 虽然近年来手术技术与假体材质发展迅猛, 但医源性损害不可避免^[2], 同时由于 AOFH 发病大部分为青壮年, 远期还面临着多次的翻修术。祖国医学对非创伤性 ONFH 的治疗, 以“痰瘀同治”为基本治则, 在缓解疼痛、改善功能等方面, 取得了较为满意的疗效^[3]。“双合汤”出自清代名医沈金鳌所著《杂病源流犀浊》, 此方有活血化瘀、祛痰通络的作用, 笔者在临床上将此应用于 AOFH 多年, 收益患者较多。本实验拟通过中国白兔 AOFH 模型, 探讨双合汤对 AOFH 的防治作用及其可能的机制。

1 材料

1.1 动物 健康成年中国白兔 60 只, 体重 (2.5 ± 0.3) kg, 雌雄各半, 由南通大学实验动物中心提供, 许可证号 SYXK(苏)2012-0031。

1.2 药物及试剂 双合汤由本院中药房提供, 其处方组成为桃仁 6 g, 当归 9 g, 白芍 9 g, 川芎 9 g, 红花 6 g, 陈皮 9 g, 半夏 9 g, 茯苓 9 g, 白芥子 9 g, 地黄 9 g, 生姜 6 g, 甘草 6 g, 竹沥 30 g, 将上药加水浸没 180

min 后煎煮 2 次, 第 1 次加 8 倍的水煎煮 90 min, 滤取煎液, 药渣加 6 倍量的水煎煮 60 min, 两次煎液合并, 减压浓缩至每毫升药液相当于 1 ~ 2 g 生药, 备用。中国白酒 (北京红星股份有限公司, 乙醇体积分数 56%)。阳性药美多巴 (0.25 g/片), 由上海罗氏制药有限公司提供。总胆固醇 (TC, 批号 14063), 甘油三酯 (TG, 批号 14218), 高密度脂蛋白 (HDL, 批号 14059), 低密度脂蛋白 (LDL, 批号 14205) 测定试剂盒, 均购自上海奥斯生物试剂公司。骨钙素 (BGP, 批号 20140220), 血管内皮生长因子 (VEGF, 批号 201408), 骨形态发生蛋白-2 (BMP-2, 批号 201412) 测定试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所。过氧化物酶体增殖子活化受体- γ (PPAR γ), 成骨基因骨钙素 (OC) 及内参照基因 β -actin 引物均由南通大学神经再生重点实验室设计, 并均由上海鼎安生物科技有限公司合成, 序列分别为 PPAR γ 上游引物 5'-GTCCTTCCCGCTGA CCAAAG-3', 下游引物 5'-GTCATGAAGCCTTGT CCCTC-3'; OC 上游引物 5'-ATTCTGCCTCTCTG ACCTGG-3', 下游引物 5'-TTGGAGCAGCTGTGCC GTCC-3'; β -actin 上游引物 5'-TGTCACCAACTGGG ACGATA-3', 下游引物 5'-AGGTCTTTACGGATGTC AACG-3'。逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR, 批号 RP1413), Trizol 试剂盒 (批号 T1406), 均为上海鼎安生物科技有限公司。

1.3 仪器 AU400 型全自动生化分析仪和 BX53 型光学显微镜(日本 Olympus 公司), TDL80-2B 型台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司), Anthos2010 型全自动绘图酶标仪(奥地利 Anthos 公司), LBY-N6 型全自动血液流变仪(北京普利生仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 按随机数字表法, 将中国白兔分成正常组、模型组、美多巴组、双合汤低剂量组、双合汤中剂量组、双合汤高剂量组, 共 6 组, 每组 10 只。

2.2 模型制作及给药 参照刘忠堂等^[4]的方法制作兔 AOFH 模型, 每组兔均在同样条件下单独分笼饲养, 标准自由饮食, 饲养 1 周, 适应环境后开始实验, 采用 *ig* 法, 除正常组外其余各组均给予同种中国白酒 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量 *ig*。在采用以上剂量白酒 *ig* 的同时, 低、中、高剂量组 ($9, 18, 27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 分别给予双合汤 *ig*, 每日早晚各 1 次, 每次分别为 50, 100, 150 mL; 美多巴组给予美多巴 *ig*, 每日早晚各 1 次, 每次为 $0.125 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 正常组、模型组均以生理盐水 *ig*, 每日早晚各 1 次, 每次 100 mL。

2.3 标本收集 兔给药 8 周后, 均在禁食 12 h 后, 于兔耳中心静脉取血 12 mL, 分别装入 4 支真空采血管, 每支管中 3 mL。1 号管以肝素抗凝后, 待测定血液流变学指标。2, 3, 4 号管, 均以 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 分离出血清, 待测定血清 TC, TG, HDL, LDL, BGP, VEGF, BMP-2。采血后, 以空气栓塞法处死实验动物, 取双侧股骨头沿冠状面切开, 10% 福尔马林溶液固定, 待组织病理学观察。分别随机取正常组、模型组、美多巴组、双合汤中剂量组各 5 只中国白兔, 沿冠状面切开股骨头, 在软骨下 0.3 cm 处切取 $1.0 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm}$ 的骨块, 均匀压碎, 立即加 Trizol 试剂, 充分匀浆, 使骨细胞裂解完全, 分别转入离心管中, 标记, 液氮保存待成脂与成骨分化基因表达检测。

2.4 观察指标及测定方法 采用全自动生化分析仪测定 TC, TG, HDL, LDL 的水平。全自动血液流变仪测定血液流变学指标即全血高切黏度 (200 s^{-1}), 全血低切黏度 (3 s^{-1}), 血浆黏度, 红细胞聚集指数 (Arbe), 血沉方程 *K* 值 (*K*)。采用酶联免疫吸附实验检测 BGP, VEGF, BMP-2 的水平, 具体检测过程按照试剂盒中说明书进行操作。将股骨头标本以 5% 稀硝酸脱钙, 常规石蜡包埋, 制成厚 $4 \mu\text{m}$ 切片, HE 染色, 检测如下指标: 空骨陷窝率, 以其来表示骨细胞坏死病理变化, 即在高倍镜下, 随机选 10 个视野,

在每个视野中记数 50 个骨陷窝并数出其中的空骨陷窝数, 然后求出空骨陷窝占的百分比; 成骨细胞计数, 在高倍镜下, 任选 10 个视野, 通过墨染程度, 来进行成骨细胞计数; 最大脂肪细胞平均直径: 在高倍镜下, 随机选 10 个视野, 测量每个视野中最大脂肪细胞直径, 求其平均值。采用 RT-PCR 技术检测股骨头组织细胞中 PPAR γ 与 OC mRNA 的表达, 按照 RT-PCR 试剂盒中说明书步骤进行操作, 待 PCR 扩增产物经电泳分离后, 使用凝胶成像扫描系统对产物条带与 β -actin 条带吸光度比值作半定量分析。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据之间的差异采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 检验水平取双侧 0.05, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对白兔血清 TC, TG, HDL, LDL 水平的影响 模型组中 TC, TG, LDL 的水平均显著高于正常组 ($P < 0.01$); 模型组中 HDL 的水平显著低于正常组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 双合汤低剂量组与美多巴组可降低 TC, TG, LDL 与升高 HDL 的水平 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 双合汤中、高剂量组可显著降低 TC, TG, LDL 与升高 HDL 的水平 ($P < 0.01$)。双合汤中、高剂量组中 TC, TG, HDL, LDL 的水平与正常组比较差异均无统计学意义。见表 1。

3.2 对白兔血液流变学指标的影响 模型组中 200 s^{-1} , 3 s^{-1} , 血浆黏度, Arbe, *K* 均显著高于正常组 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 双合汤低剂量组与美多巴组可降低 200 s^{-1} , 3 s^{-1} , 血浆黏度, Arbe, *K* ($P < 0.05$)。与模型组比较, 双合汤中、高剂量组可显著降低 200 s^{-1} , 3 s^{-1} , 血浆黏度, Arbe, *K* ($P < 0.01$)。双合汤中、高剂量组中 200 s^{-1} , 3 s^{-1} , 血浆黏度, Arbe, *K* 与正常组比较无显著差异。见表 2。

3.3 对白兔血清 BGP, VEGF, BMP-2 水平的影响 模型组中 BGP, VEGF, BMP-2 的水平均显著低于正常组 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 双合汤低剂量组与美多巴组可升高 BGP, VEGF, BMP-2 的水平 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 双合汤中、高剂量组可显著升高 BGP, VEGF, BMP-2 的水平 ($P < 0.01$)。双合汤中、高剂量组中 BGP, VEGF, BMP-2 的水平与正常组比较差异均无统计学意义。见表 3。

3.4 对白兔股骨头病理组织学的影响 模型组空骨陷窝率、最大脂肪细胞平均直径均显著高于正常组 ($P < 0.01$); 模型组成骨细胞计数显著低于正常

表 1 双合汤对兔血清 TC, TG, HDL, LDL 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Shuanghe Tang on TC, TG, HDL, LDL levels in rabbits serum ($\bar{x} \pm s, n = 10$) mmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL	LDL
正常	-	1.26 ± 0.33	1.03 ± 0.25	0.59 ± 0.17	0.31 ± 0.11
模型	-	2.63 ± 0.51 ¹⁾	2.27 ± 0.36 ¹⁾	0.28 ± 0.09 ¹⁾	0.66 ± 0.19 ¹⁾
美多巴	0.125	1.98 ± 0.35 ²⁾	1.56 ± 0.35 ²⁾	0.38 ± 0.11 ²⁾	0.48 ± 0.15 ²⁾
双合汤	9	2.01 ± 0.39 ²⁾	1.53 ± 0.33 ²⁾	0.39 ± 0.12 ²⁾	0.46 ± 0.14 ²⁾
	18	1.28 ± 0.36 ³⁾	1.01 ± 0.24 ³⁾	0.62 ± 0.19 ³⁾	0.29 ± 0.09 ³⁾
	27	1.25 ± 0.34 ³⁾	1.05 ± 0.26 ³⁾	0.61 ± 0.18 ³⁾	0.32 ± 0.12 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

表 2 双合汤对兔血液流变学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Shuanghe Tang on hemodynamic indexes in rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	200 s ⁻¹ /mPa·s	3 s ⁻¹ /mPa·s	血浆黏度/mPa·s	Arbe	K
正常	-	2.23 ± 0.27	8.86 ± 1.09	1.48 ± 0.31	3.84 ± 0.42	29.76 ± 9.38
模型	-	4.08 ± 0.39 ¹⁾	14.88 ± 1.6 ¹⁾	2.91 ± 0.25 ¹⁾	7.06 ± 0.51 ¹⁾	56.93 ± 16.42 ¹⁾
美多巴	0.125	3.17 ± 0.32 ²⁾	11.16 ± 1.33 ²⁾	2.04 ± 0.27 ²⁾	5.68 ± 0.46 ²⁾	40.49 ± 12.78 ²⁾
双合汤	9	3.11 ± 0.31 ²⁾	11.12 ± 1.32 ²⁾	2.06 ± 0.28 ²⁾	5.71 ± 0.47 ²⁾	41.37 ± 12.91 ²⁾
	18	2.31 ± 0.28 ³⁾	8.91 ± 1.11 ³⁾	1.53 ± 0.33 ³⁾	3.91 ± 0.43 ³⁾	30.89 ± 9.67 ³⁾
	27	2.32 ± 0.29 ³⁾	8.89 ± 1.10 ³⁾	1.51 ± 0.32 ³⁾	3.93 ± 0.43 ³⁾	31.07 ± 9.99 ³⁾

表 3 双合汤对兔血清 BGP, VEGF, BMP-2 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Shuanghe Tang on BGP, VEGF, BMP-2 levels in rabbits serum ($\bar{x} \pm s, n = 10$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BGP	VEGF	BMP-2
正常	-	5.46 ± 0.66	46.8 ± 9.4	658.7 ± 45.5
模型	-	3.12 ± 0.35 ¹⁾	24.5 ± 5.3 ¹⁾	461.3 ± 31.6 ¹⁾
美多巴	0.125	4.08 ± 0.48 ²⁾	34.3 ± 7.9 ²⁾	553.4 ± 38.7 ²⁾
双合汤	9	4.01 ± 0.44 ²⁾	32.9 ± 7.3 ²⁾	547.2 ± 37.3 ²⁾
	18	5.35 ± 0.61 ³⁾	44.8 ± 8.9 ³⁾	649.7 ± 43.8 ³⁾
	27	5.38 ± 0.62 ³⁾	45.0 ± 9.1 ³⁾	651.2 ± 44.3 ³⁾

组($P < 0.01$)。双合汤低剂量组与美多巴组空骨陷窝率、最大脂肪细胞平均直径均低于模型组($P < 0.05$);双合汤低剂量组与美多巴组成骨细胞计数均高于模型组($P < 0.05$)。双合汤中、高剂量组空骨陷窝率、最大脂肪细胞平均直径均明显低于模型组($P < 0.01$);双合汤中、高剂量组成骨细胞计数均明显高于模型组($P < 0.01$)。双合汤中、高剂量组空骨陷窝率、成骨细胞计数、最大脂肪细胞平均直径与正常组比较差异均无统计学意义。见表 4。

3.5 对白兔股骨头组织细胞成脂与成骨分化基因表达的影响 模型组中 PPAR γ mRNA 表达值显著高于正常组($P < 0.01$);模型组中 OC mRNA 表达值显著低于正常组($P < 0.01$)。美多巴组中 PPAR γ mRNA 表达值低于模型组($P < 0.05$);美多巴组中 OC mRNA 表达值高于模型组($P < 0.05$)。双合汤中剂量组中 PPAR γ mRNA 表达值明显低于模型组($P < 0.01$);双合汤中剂量组中 OC mRNA 表达值明显高于模型组($P < 0.01$)。双合汤中剂量组中

PPAR γ mRNA 与 OC mRNA 表达值与正常组比较差异均无统计学意义。见表 5。

4 讨论

长期酗酒已成为导致非创伤性 ONFH 的最为常见因素之一,但 AOFH 确切的发病机制尚不清楚,近年来,已提出了多种学说如:脂质代谢紊乱学说、骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)成脂分化学说、骨细胞脂肪变性学说、脂肪栓塞及局部血管内凝血学说、骨内高压等学说。酒精中毒是 AOFH 的一个确定的病因^[5],陈跃平等^[6]研究表明乙醇能够促进髓内脂肪细胞增殖肥大,并认为这可能为长期酗酒后股骨头骨髓内脂肪组织增多,骨内压增加,血流灌注减少,从而导致 ONFH 的主要原因。本研究结果显示,模型组中 TC, TG, LDL 的水平均显著高于正常组,模型组中 HDL 的水平显著低于正常组,此结果与 Glueck 等^[7]研究的结果相似,说明 AOFH 中存在脂质代谢紊乱。陈跃平等^[6]认

表 4 双合汤对白兔股骨头病理组织学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of Shuanghe Tang on femoral head pathological histology in rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	空骨陷窝率/%	成骨细胞计数/个	最大脂肪细胞平均直径/μm
正常	-	10.63 ± 3.25	12.83 ± 3.43	41.25 ± 2.22
模型	-	23.94 ± 6.31 ¹⁾	5.93 ± 1.78 ¹⁾	48.39 ± 2.41 ¹⁾
美多巴	0.125	16.86 ± 4.83 ²⁾	9.03 ± 2.41 ²⁾	44.42 ± 2.31 ²⁾
双合汤	9	17.04 ± 4.91 ²⁾	8.94 ± 2.37 ²⁾	44.61 ± 2.33 ²⁾
	18	11.19 ± 3.48 ³⁾	11.95 ± 3.29 ³⁾	41.74 ± 2.29 ³⁾
	27	11.01 ± 3.37 ³⁾	12.23 ± 3.38 ³⁾	41.49 ± 2.25 ³⁾

表 5 双合汤对白兔股骨头组织细胞中 PPAR γ 与 OC mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effects of Shuanghe Tang on PPAR γ and OC mRNA in femoral head cells rabbit ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PPAR γ mRNA	OC mRNA
正常	-	0.66 ± 0.02	1.03 ± 0.18
模型	-	1.34 ± 0.04 ¹⁾	0.48 ± 0.12 ¹⁾
美多巴	0.125	1.03 ± 0.03 ²⁾	0.75 ± 0.14 ²⁾
双合汤	18	0.73 ± 0.02 ³⁾	0.95 ± 0.16 ³⁾

为酒精的毒副作用通过影响肝细胞线粒体的结构与功能,而引起脂质分解代谢功能降低,同时,酒精可刺激脂质的合成,最终形成高脂血症,当循环中脂肪物质增多,聚集成脂肪球,血液黏稠度增高,血流淤滞,栓塞于股骨头内微血管,最终形成 AOFH。本研究结果显示,模型组中血液流变学指标均显著高于正常组,此结果与 Suh 等^[8]研究的结果相似,说明 AOFH 中存在血液黏稠度增加。陈镇秋等^[9]认为酒精能导致脂肪细胞在血管内积聚而引起脂质代谢紊乱与血液流变学异常,出现高血脂与血液高凝状态,引起骨内微循环障碍,触发血管内凝血机制,最终导致 AOFH 的发生。AOFH 的发生与多种基因有关,而 PPAR γ 是 AOFH 发病的一个重要靶基因^[10], PPAR γ 是一种成脂转录因子,其在成脂作用与脂肪细胞分化中起着关键性的调控作用。本研究结果显示,模型组中 PPAR γ mRNA 表达明显高于正常组,同时 OC mRNA 表达明显低于正常组,这与 Wang 等^[10]研究的结果一致。Wang 等^[10]认为乙醇可上调鼠、兔及人的 MSCs 内 PPAR γ mRNA 表达,下调 OC mRNA 表达,诱导 MSCs 向脂肪细胞分化,同时抑制其成骨细胞分化,由此导致股骨头内脂肪堆积、成骨减少,股骨头内缺血,最终导致 ONFH。

黄立新等^[11]应用美多巴治疗早期 AOFH 的患者,通过随访 27.8 个月,患者临床症状、X 射线与 MRI 表现均有明显改善。吕智等^[12]研究结果显示

美多巴的主要成分即左旋多巴能使血浆内生长激素明显升高,从而促进坏死股骨头内的新骨形成,由此增强坏死股骨头的力学性能。因此本研究选用美多巴作为阳性药进行研究。ONFH 属祖国医学中“骨痹”、“痰浊”、“骨蚀”范畴。在临床中,笔者将 ONFH 的患者辨证分型为 3 型,分别为气滞血瘀型、痰瘀痹阻型、肝肾亏虚型。笔者把 AOFH 归属于痰瘀痹阻型,嗜酒无度损伤脾胃,导致脾失健运,肝失疏泄,湿热内蕴,痰浊郁结,瘀血阻滞。陈卫衡等^[2]经过多年的研究提出了“脾虚生痰,由痰致瘀,因瘀致痹”的非创伤性 ONFH 的病机学说以及健脾化痰与活血通络的“痰瘀同治”的基本原则。在临床上,对于 AOFH,笔者使用双合汤加减治疗。目前,尚未见双合汤治疗 AOFH 的报道。

本研究发现,与模型组比较,双合汤中、高剂量组可显著降低 TC, TG, LDL 的水平与升高 HDL 的水平,说明双合汤具有降低血脂的作用;与模型组比较,双合汤中、高剂量组可显著降低血液流变学指标,说明双合汤能有效改善 AOFH 兔的血液流变学,降低血液黏度。骨坏死的修复过程受多种因子的调节,而 BMP-2 是骨组织形成过程中最为关键的调控因子,其不仅刺激 MSCs 分化为成骨细胞、促进成骨细胞的生长,还能促进 VEGF 的表达,从而在骨组织中创造出有利于血管化的环境^[13]。BGP 是由成骨细胞产生与分泌的一种非胶原蛋白, BGP 大部分沉积在骨基质中,其 1/3 进入血循环中,血清中 BGP 的水平可特异性反映成骨细胞的活性, Nelson 等^[14]认为 BGP 是骨形成功能的良好标志。血管再生是骨组织再生过程中的关键环节,而 VEGF 则是机体内促进血管生长主要的升长因子, Peng 等^[15]认为 VEGF 主要通过促进血管新生与成骨细胞分化而参与了骨形态发生蛋白的诱导成骨,从而促进骨坏死的修复。本研究结果显示,与模型组比较,双合汤中、高剂量组可明显升高 BGP, VEGF, BMP-2 的水平;双合汤中、高剂量组空骨陷窝率、最大脂肪细胞

平均直径均明显低于模型组,同时成骨细胞计数均明显高于模型组,说明双合汤通过提高骨组织的修复能力来防治 AOFH。陈群群等^[16]将 AOFH 辨证为痰瘀蕴结型 ONFH,并认为 PPAR γ 信号转导途径是痰瘀蕴结型 ONFH 脂代谢异常进行的主要信号转导途径,酒精通过上调 PPAR γ mRNA 的表达,继而导致脂代谢紊乱的发生,最终导致 ONFH。本研究发现,双合汤中剂量组 PPAR γ mRNA 表达值明显低于模型组,同时 OC mRNA 表达值明显高于模型组,提示双合汤能阻断 MSCs 内 PPAR γ 的表达,遏制其成脂分化,保持其成骨分化,促进骨坏死的修复,从而防治 AOFH。

双合汤以桃红四物汤与二陈汤合并,并配以白芥子、竹沥祛痰而组成,共奏祛痰活血化瘀通络止痛之功效。现代药理研究证实,桃红四物汤具有保护血管内皮细胞与改善血管内皮细胞的分泌功能、通过改善血液流变学而降低血脂的作用^[17];徐世红等^[18]研究表明桃红四物汤具有促进 MSCs 增殖和成骨性分化活性的作用;二陈汤能有效调节脂质代谢紊乱^[19]。

综上,双合汤干预后 AOFH 兔股骨头的病理学改善明显,且双合汤能明显改善 AOFH 兔的脂质代谢紊乱与血液黏度、上调血清 BGP 与 VEGF 及 BMP-2 的水平、抑制酒精诱导 MSCs 成脂基因表达、对抗酒精对 MSCs 的成骨分化的抑制而增加成骨基因的表达,表明双合汤可能从根本环节上防治 AOFH。

[参考文献]

[1] Mutijima E, De Maertelaer V, Deprez M, et al. The apoptosis of osteoblasts and osteocytes in femoral head osteonecrosis: its specificity and its distribution[J]. Clin Rheumatol, 2014, 33(12): 1791-1795.

[2] 陈卫衡,周宇,何海军,等.健脾活骨方治疗早中期非创伤性股骨头坏死临床回顾性研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(8): 1054-1058.

[3] 刘道兵,王荣田,陈卫衡.从“痰瘀同病”论股骨头坏死的中医药治疗[J]. 中医杂志, 2013, 54(19): 1644-1646.

[4] 刘忠堂,王坤正,池永龙,等. PGE₂ 和 TXB₂ 在酒精性股骨头骨坏死中的意义[J]. 临床骨科杂志, 2002, 5(2): 90-93.

[5] Zalavras C G, Lieberman J R. Osteonecrosis of the femoral head: evaluation and treatment[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2014, 22(7): 455-464.

[6] 陈跃平,高辉,陈亮,等.乙醇对股骨头髓内脂肪细胞的作用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(35): 6221-6227.

[7] Glueck C J, Freiberg R A, Boppana S, et al. Thrombophilia, hypofibrinolysis, the eNOST-786C polymorphism, and multifocal osteonecrosis[J]. Bone Joint Surg Am, 2008, 90(10): 2220-2229.

[8] Suh K T, Kim S W, Roh H L, et al. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 431: 220-225.

[9] 陈镇秋,何伟,魏秋实.股骨头坏死中医证型与血液学指标的相关性研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(7): 2205-2208.

[10] Wang Y, Yin L, Li Y, et al. Preventive effects of puerarin on alcohol-induced osteonecrosis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2008, 466(5): 1059-1067.

[11] 黄立新,董天华,谢道海,等.美多巴治疗早期非创伤性股骨头坏死的近期疗效观察[J]. 中华骨科杂志, 2010, 30(7): 641-645.

[12] 吕智,刘小丽,董天华,等.左旋多巴对兔股骨头坏死模型实验修复过程的影响[J]. 中华骨科杂志, 1999, 19(6): 370-373.

[13] Samara S, Dailiana Z, Varitimidis S, et al. Bone morphogenetic proteins (BMPs) expression in the femoral heads of patients with avascular necrosis[J]. L Biol Rep, 2013, 40(7): 4465-4472.

[14] Nelson T J, Martinez-Fernandez A, Terzic A. Induced pluripotent stem cells: developmental biology to regenerative medicine[J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(12): 700-710.

[15] Peng H, Usas A, Olshanski A, et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(11): 2017-2027.

[16] 陈群群,王海彬,徐秋英,等.痰瘀蕴结型股骨头坏死脂代谢异常的信号转导途径研究[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(5): 647-652.

[17] 芮以融.桃红四物汤加减治疗糖尿病合并脂肪肝病疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 295-296.

[18] 徐世红,谢兴文,李宁,等.桃红四物汤含药血清对骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(9): 2713-2716.

[19] 丁珊珊,张媛媛,康洁,等.二陈汤对高脂饮食大鼠脂质代谢和 Caveolin-1 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(9): 2060-2062.

[责任编辑 周冰冰]