

健脾补肾方对家兔激素性股骨头坏死 模型脂质代谢的影响

李玉彬,谢利民*,李 理,徐颖鹏,于 潼,刘家伟,王志勇
(中国中医科学院广安门医院骨科,北京 100053)

[摘要] 目的:探讨健脾补肾方防治激素性股骨头坏死的作用机制。方法:采用激素性股骨头坏死(SINFH)模型,以蒸馏水作为空白对照,观察各实验组治疗后的病理形态学变化,并对各实验组血脂指标进行动态监测。结果:健脾补肾方能明显改善家兔 SINFH 模型组织形态学,12 周时股骨头标本 HE 染色证明各治疗组空骨陷窝率和髓腔脂肪面积与模型组比较差异显著或非常显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);健脾补肾方可纠正激素造成的脂质代谢紊乱状况,各治疗组与模型组比较,在治疗后的 4 周和(或)8 周和(或)12 周,各项血脂指标差异显著或非常显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:健脾补肾方对 SINFH 的防治机理可能与纠正激素造成的脂质代谢紊乱有关。

[关键词] 健脾补肾方;股骨头坏死;激素;脂质代谢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0090-04

糖皮质激素长期或短期内大剂量使用可引起股骨头缺血性坏死已被大量临床和实验研究所证实。随着糖皮质激素越来越广泛的应用,激素性股骨头坏死(steroid-induced necrosis of the femoral head, SINFH)的发病率呈逐年上升趋势,已超过创伤性股骨头坏死占股骨头坏死的首位。SINFH 发展到晚期(塌陷后)修复比较困难,患者不可避免需接受人工全髋关节置换(THR)。但由于 SINFH 患者大多为青壮年,且本病患者股骨近端存在的骨质疏松,使得 THR 后效果较其他髋关节疾病行 THR 后的效果要差,此时患者大多需要接受 2 次或 3 次手术,严重影响病人的生活质量。健脾补肾方是我们多年来治疗股骨头坏死的经验方,在临床获得较好疗效,为探讨本方防治 SINFH 的作用机理,我们将其对 SINFH 家兔脂质代谢的影响进行了实验观察,现将实验结果报告如下。

1 材料

1.1 实验动物 健康成年 24~28 周龄新西兰大白兔 50 只,雄性,体重(2.50 ± 0.32) kg,由北京富豪实验动物养殖中心提供,合格证编号:SCXK(京)2005-0009。所有动物单笼标准饲料喂养,自由饮

水,室温控制在 $16\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 29\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间,湿度维持在 40%~60%,自然光照明。

1.2 药品与试剂 健脾补肾方由茯苓 12 g,白术 9 g,甘草 6 g,元胡 6 g,补骨脂 9 g,骨碎补 12 g,红花 6 g 等 8 位药组成,由中国中医科学院广安门医院免煎药房提供,含生药 $1\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。注射用甲泼尼龙琥珀酸钠,瑞士辉瑞公司,批号:P02460;注射用青霉素钠,华北制药股份有限公司,批号:D0709203;注射用硫酸链霉素,华北制药股份有限公司,批号:060401。

1.3 主要仪器与设备 OLYMPUS 全自动生化仪,型号:AU2700,日本 OLYMPUS;Image-pro plus 图形分析系统,版本:4.5,美国 Media Cybernetics 公司。

2 方法

2.1 实验动物分组 将所有动物随机(随机数字表法)分为空白对照组、模型组、健脾补肾高、中、低剂量组,共 5 组,每组 10 只。

2.2 造模方法 模型组及各观察组按 Matsui^[1]方法结合前期预实验结果复制家兔 SINFH 模型,即仅于整个实验周期的前 3 d 以甲泼尼龙琥珀酸钠 $20\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 臀肌 im,连续 3 d,同时予青霉素 2 万 u $\cdot \text{kg}^{-1}$ im,每周 2 次,预防感染。

2.3 给药 各治疗组于造模后第 1 d 即分别以高($5.52\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、中($2.76\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、相当于 60 kg 体重成人每千克所需剂量的 2.3 倍^[2]、低

[收稿日期] 2009-08-13

[通讯作者] *谢利民, Tel: (010) 88001130; E-mail: drxlm@126.com

(1.38 g · kg⁻¹ · d⁻¹) 剂量 ig 健脾补肾方汤药,连续 12 周。模型组与空白对照组 ig 蒸馏水 5 g · kg⁻¹ · d⁻¹,连续 12 周。

2.4 观察指标

2.4.1 血脂的检测 在首次给药后的 1,4,8 和 12 周,ig 后 12 h,耳缘静脉采血以酶法检测血清甘油三酯(TG)和总胆固醇(CHO);采用一步法检测高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)。

2.4.2 股骨头组织形态学观察 所有动物于造模给药 12 周后,取双侧股骨头切片行 HE 染色。各片以软骨下骨为读片区,光镜观察 HE 切片中骨小梁、成骨细胞、破骨细胞、骨细胞、髓腔脂肪细胞的变化。在 Image-pro plus4.5 图形分析系统下定量观察,求出空骨陷窝率以及脂肪组织面积。空骨陷窝率的计算方法如下:在股骨头软骨下区 HE 染色的骨组织切片上,任选 10 个视野,每个视野内记数全部的骨陷窝数和空骨陷窝数,(空骨陷窝数/全部骨陷窝数) × 100% 求出空骨陷窝率。

2.5 统计方法 采用 SPSS 12.0 软件进行数据统计分析,计量资料数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间计量资料数据比较采用单因素方差分析,组间股骨头坏死率的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 在实验的前 2 周,模型组与治疗组所有动物少食少动,精神萎靡,体重逐渐下降,皮下

脂肪明显减少,皮毛干枯缺乏光泽且呈加重趋势。2 周后各治疗组动物饮食逐渐恢复,皮下脂肪与体重逐渐增加,精神好转,活动增多,皮毛逐渐恢复正常光泽。正常对照组动物正常饮食饮水,体重逐渐增加。整个实验过程中,家兔死亡 2 只(中剂量组和高剂量组各 1 只),均为灌胃操作方法失误,导致药液误入气道急性窒息而死。

3.2 血脂的检测结果 各治疗组及模型组在第 1 周时,TG,CHO,HDL 及 LDL 水平与正常对照组比较,无统计学意义($P > 0.05$);第 4 周时各治疗组和模型组 TG,CHO 及 LDL 水平均达到各自所检测时间点的最高水平,之后逐渐下降,至第 12 周时,高、中剂量组上述各项指标几乎达到正常水平($P > 0.05$);4 周时 HDL 则达到了检测时间点的最低水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),之后逐渐升高,12 周几乎达到正常水平($P > 0.05$)。模型组与正常对照组比较,4 周、8 周和 12 周时各项指标差异显著或非常显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各治疗组与模型组比较,在治疗后的 4 周和(或)8 周和(或)12 周,各项指标差异显著或非常显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各治疗组的治疗作用具有剂量依赖性。详见表 1~4。

3.3 组织形态学结果 给药 12 周各组动物空骨陷窝率及髓腔脂肪组织面积比较见表 5。模型组空骨陷窝率和髓腔脂肪面积明显高于正常对照组($P < 0.01$),而各治疗组与模型组比较差异显著或非常显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组动物 TG 水平的比较 (mmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g · kg ⁻¹)	n	1 周	4 周	8 周	12 周
正常对照组	—	10	0.61 ± 0.20	0.65 ± 0.13 ²⁾	0.59 ± 0.18 ²⁾	0.66 ± 0.17 ¹⁾
模型组	—	9	0.69 ± 0.27	1.97 ± 0.38	1.58 ± 0.12	1.13 ± 0.22
健脾补肾组	5.52	9	0.72 ± 0.19	1.61 ± 0.36 ¹⁾	1.04 ± 0.22 ¹⁾	0.76 ± 0.21 ¹⁾
	2.76	10	0.67 ± 0.09	1.84 ± 0.23	1.12 ± 0.19 ¹⁾	0.73 ± 0.18 ¹⁾
	1.38	10	0.68 ± 0.17	2.04 ± 0.35	1.23 ± 0.20	0.77 ± 0.25 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 各组动物 CHO 水平的比较 (mmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g · kg ⁻¹)	n	1 周	4 周	8 周	12 周
正常对照组	—	10	0.64 ± 0.19	0.55 ± 0.17 ²⁾	0.68 ± 0.23 ²⁾	0.64 ± 0.09 ¹⁾
模型组	—	9	0.79 ± 0.21	2.17 ± 0.34	1.61 ± 0.32	1.20 ± 0.19
健脾补肾组	5.52	9	0.65 ± 0.19	1.77 ± 0.33 ¹⁾	1.14 ± 0.22 ¹⁾	0.67 ± 0.15 ²⁾
	2.76	10	0.70 ± 0.25	1.94 ± 0.30	1.22 ± 0.09 ¹⁾	0.88 ± 0.21 ¹⁾
	1.38	10	0.67 ± 0.14	2.00 ± 0.25	1.33 ± 0.26	0.87 ± 0.25 ¹⁾

表 3 各组动物 HDL 水平的比较 (mmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g · kg ⁻¹)	n	1 周	4 周	8 周	12 周
正常对照组	—	10	0.38 ± 0.10	0.45 ± 0.15 ²⁾	0.40 ± 0.17 ²⁾	0.39 ± 0.13 ¹⁾
模型组	—	9	0.40 ± 0.15	0.12 ± 0.05	0.17 ± 0.09	0.25 ± 0.12
健脾补肾组	5.52	9	0.37 ± 0.11	0.19 ± 0.07 ¹⁾	0.26 ± 0.08 ¹⁾	0.33 ± 0.11 ¹⁾
	2.76	10	0.46 ± 0.10	0.15 ± 0.04	0.23 ± 0.07 ¹⁾	0.39 ± 0.10 ¹⁾
	1.38	10	0.39 ± 0.08	0.13 ± 0.06	0.20 ± 0.11	0.34 ± 0.14 ¹⁾

表 4 各组动物 LDL 水平的比较 (mmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g · kg ⁻¹)	n	1 周	4 周	8 周	12 周
正常对照组	—	10	0.41 ± 0.08	0.42 ± 0.13 ²⁾	0.39 ± 0.11 ²⁾	0.46 ± 0.10 ¹⁾
模型组	—	9	0.39 ± 0.12	1.67 ± 0.42	0.98 ± 0.20	0.76 ± 0.18
健脾补肾组	5.52	9	0.43 ± 0.16	1.17 ± 0.39 ¹⁾	0.70 ± 0.19 ¹⁾	0.49 ± 0.15 ¹⁾
	2.76	10	0.46 ± 0.15	1.28 ± 0.35 ¹⁾	0.89 ± 0.21	0.51 ± 0.16 ¹⁾
	1.38	10	0.37 ± 0.07	1.46 ± 0.33	1.01 ± 0.17	0.55 ± 0.13 ¹⁾

表 5 给药 12 周各组动物空骨陷窝率及髓腔脂肪组织面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g · kg ⁻¹)	n	空骨陷窝率 (%)	髓腔脂肪组织面积 (μm ²)
正常对照组	—	10	8.54 ± 1.49 ²⁾	162.3 ± 29.0 ²⁾
模型组	—	9	29.30 ± 6.92	873.7 ± 90.4
健脾补肾组	5.52	9	9.31 ± 1.80 ²⁾	180.1 ± 27.3 ²⁾
	2.76	10	12.30 ± 3.05 ²⁾	221.5 ± 31.9 ²⁾
	1.38	10	18.27 ± 4.45 ¹⁾	516.5 ± 53.3 ¹⁾

4 讨论

现代医学关于 SINFH 的早期发病机理主要包括脂肪代谢紊乱学说、骨内脂肪栓塞学说、骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 成脂分化、微血管内凝血学说 (高凝-低纤溶学说)、骨内压增高学说、骨质疏松学说等, 目前对于 SINFH 发病机制的许多假设与推测都建立在脂质代谢紊乱这一学说的基础上。因此 SINFH 患者的脂肪代谢紊乱学说逐渐成为研究热点。

哺乳动物体内的脂肪组织的动用有赖于神经和激素的调节, 生长激素、糖皮质激素能促进脂肪组织的分解。过量的皮质激素在体内使用后, 引起肝脏和组织细胞对胰岛素作用产生耐受性, 导致血液中的葡萄糖不能为细胞所利用, 使能量来源依靠脂肪和蛋白质分解, 导致皮下脂肪大量动员, 引起血中 TG, CHO 含量升高, 导致高脂血症。如 Matsui 等^[1]给日本大耳白兔单次注射醋酸甲基泼尼松龙 20 mg · kg⁻¹, 4 周后血液学检查证实出现高脂血症, 组织病理学检查符合骨坏死的表现, 同时兔股骨近端发

现骨内脂肪栓塞。国内贺西京^[3]等经实验发现应用激素的动物脂肪代谢紊乱引起高脂血症和脂肪肝, 股骨头髓腔内脂肪细胞增大堆积, 股骨头的小血管内脂肪栓塞, 导致早期股骨头细胞坏死。我们的试验中, 模型组使用大剂量激素冲击后, 血中 TG, CHO 和 LDL 水平持续升高, 第 4 周时达到所检测时间点的最高水平, 以后逐渐下降, 至第 12 周时仍未降至正常水平。高脂血症可以引起血液黏滞度增加, 血流速度减慢, 微循环脂肪栓塞。大剂量的皮质激素除可导致高脂血症外, 还可使血中纤维蛋白原含量升高, 同时皮质激素可使红细胞增多, 致血黏度增加, 皮质激素还能刺激血小板大量生成, 使凝血功能增强^[4]。所以高脂血症时血液总是处于高凝低纤溶状态, 另外, 脂质分解产生的脂肪酸成分可损害血管内皮细胞, 造成血液处于血栓形成的高危状态。微循环中脂肪栓子和血栓共同作用阻断了股骨头的血供, 进而导致了股骨头缺血性坏死。

健脾补肾方在“肾主骨生髓”的理论指导下结合临床辩证应用于股骨头坏死患者的治疗, 取得了满意疗效。补肾中药改善激素引起的脂代谢紊乱, 防治 SINFH 的现代机理可能在于补肾中药对 MSCs 定向分化的影响。邓展生等^[5]将骨碎补醇提液和骨碎补的有效成分柚皮苷与人 MSCs 共同体外培养, 结果与空白对照组比较, 骨碎补醇提液和柚皮苷在促进人 MSCs 增殖的同时促进其向成骨细胞分化。吴云刚等^[6]观察温肾助阳经典名方右归饮含药血清对人 MSCs 定向分化的影响, 钙结节染色及细胞内碱性磷酸酶 (ALP) 含量测定表明右归饮对成骨细胞

的活性有促进作用,从而证明了该方对股骨头缺血性坏死疗效的确切性并阐明了作用机制。现已知成骨细胞和脂肪细胞均由 MSCs 分化而来, MSCs 向成骨细胞分化增加的同时向脂肪细胞的分化必然减少。我们在注重补肾的同时注意健脾药的应用,经临床验证应用于早期 SINFH 患者可以有效扭转骨坏死病情的进展,促进骨组织的修复,恢复股骨近端的生物力学。本方主要由骨碎补、补骨脂、元胡、红花、茯苓、白术、甘草等药组成,具有健脾化痰,活血祛瘀,补肾生髓的功效。在 SINFH 的辩证治疗过程中,我们尤为重视健脾益气,故方中重用茯苓、白术及甘草三味药,健脾之力颇大。中医病因学认为过度使用激素、饮食肥甘辛辣,伤及脾胃,脾虚则运化失职,湿聚成痰,痰湿阻于经络则血行不畅,瘀血由生。痰湿瘀血阻于脉络则股骨头失去营养发生坏死。我们认为,在 SINFH 的发病中,痰湿是最初的病理产物,而瘀血则是痰湿的继发产物或者说是中间病理产物。健脾益气中药可促进脾的运化功能,则痰无以生,脉络畅通。现代医学研究认为 SINFH 时高脂血症与中医的“痰瘀”之邪是紧密相关的。宋剑南等^[7]从生化角度提出了血中升高的血脂和脂蛋白代谢紊乱为中医所称的“痰浊”,是血中“痰浊”的生化物质基础;作为血液无形成分之一,血脂的含量增高是血液浓度增高的重要指标。高脂血症可使血液呈高凝和低纤溶状态,也是血瘀证的重要生化

基础。因此高脂血症与“痰浊、瘀血”有直接关系。因此具有健脾化痰,活血祛瘀,补肾生髓作用的健脾补肾方可较好的调节脂质代谢、改善血液高凝状态从而预防骨坏死的发生。

[参考文献]

- [1] Takuaki yamamoto, Takahiko irisa, Yoichi sugioka, *et al.* Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues[J]. Arthritis & Rhlumatism, 1997, 40 (11) : 2055.
- [2] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000; 332.
- [3] 贺西京, 毛履真, 王坤正, 等. 肾上腺糖皮质激素引起股骨头缺血坏死的机制实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1992, 12 (6) : 440.
- [4] 曹 凯, 安 洪, 黄 伟, 等. 激素诱导血清病动物骨坏死模型中的脂类代谢异常[J]. 中国实验动物学报, 2005, 13 (4) : 222.
- [5] 邓展生, 张 漩, 邹冬青, 等. 骨碎补各种提取成分对人骨髓间充质干细胞的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15 (6) : 2426.
- [6] 吴云刚, 张志平. 右归饮含药血清对人骨髓基质干细胞诱导为成骨细胞的影响[J]. 江西中医药, 2006, 37 (283) : 57.
- [7] 宋剑南. 从生物化学角度看痰及痰瘀相关[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6 (3) : 40.