

股密葆方对大鼠激素性股骨头坏死脂质代谢影响的实验研究

吉万波 刘冠虹 刘锦涛 姜宏 张志刚*

苏州市中医医院骨伤科, 江苏 苏州 215009

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 12-1580-05

摘要: 目的 探讨股密葆方对大鼠激素性股骨头坏死的脂质代谢的影响,以揭示其作用的部分机制。方法 清洁级 SD 大鼠 50 只,分为空白组(A组)、模型组(B组)、股密葆方高、中、低剂量组(C、D、E组),每组 10 只,雌雄各半。应用大肠杆菌内毒素联合激素注射的造模方法构建动物模型。每组按实验设计行药物干预。于第 4 周末进行相关数据的观察和比较。结果 与模型组相比,股密葆方可以降低总胆固醇(TG)、血清甘油三脂(TC)、低密度脂蛋白(LDL)的水平,提高高密度脂蛋白(HDL)水平,与模型组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。透射电镜结果显示,模型组骨细胞结构破坏,胞浆内充满了脂肪滴,无完整的细胞结构,胞核碎裂消失,骨细胞变性坏死;中药组的骨细胞内细胞器结构较模型组完整,髓腔内脂肪栓子较模型组少见。结论 脂质代谢紊乱与激素性股骨头坏死关系密切,股密葆方可以调节激素性股骨头坏死大鼠模型的脂质水平,降低血脂,改善高脂血症,一定程度上延缓股骨头坏死的进展。

关键词: 股骨头坏死;脂质代谢;透射电镜;股密葆方;大鼠;动物实验

Lipid metabolism research on Gumibao Recipe in treating Steroid-induced Necrosis of the Femoral Head in rats

Ji Wanbo, Liu Guan hong, Liu Jingtao, Jiang Hong, Zhang Zhigang*

Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou 215009, China

Corresponding author: ZHANG Zhigang, Email: ji1840@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Gumibao Recipe on lipid metabolism in Steroid-induced Necrosis of the Femoral Head (SINFH) in rats, in order to explore its partial mechanisms for treating Steroid-induced Necrosis of The Femoral Head. **Methods** Fifty SD rats were randomly assigned to five groups: blank control group, model group, Gumibao Recipe groups (High, medium and low-dose groups, 10 rats in each group, with half male and half female). SINFH models were established according to S. Okazaki's technique. All the interventions lasted for 4 weeks by gavage. The data on lipid metabolism were determined. **Results** Compared with the model group, Gumibao Recipe could reduce the serum levels of TC, TG, LDL and enhanced the level of HDL ($P < 0.05$). TEM ultrastructure observation showed that compared with the model group, the bone cell morphological of Gumibao recipe was better. **Conclusion** Lipid metabolism disorder is closely related to SINFH, and Gumibao recipe could regulate lipid metabolism, improve dyslipidemia, and delay the development of SINFH.

Key words: Femur head necrosis; Gumibao recipe; Lipid metabolism; Transmission electron microscopy; Rats; Animal experimentation

激素性股骨头坏死的发病机制目前有以下学说:细胞毒性学说、脂肪代谢紊乱学说、骨质疏松学说、微血管损伤学说等。过量或长时间激素的使用,导致血脂升高,引起高脂血症,血液趋于凝滞状态,

股骨头微小动脉内形成脂肪栓子,直接造成局部淤血,诱发股骨头缺血;同时,高脂血症可造成骨髓内脂肪细胞肥大和脂肪组织增生,使骨内压升高^[1]。基于以上理论,纠正脂质代谢紊乱,改善高脂血症状态,能减轻股骨头内静脉回流压力,可以有效延缓或阻止激素性股骨头坏死的发生和发展。血液高凝状态与中医“痰”相关,补肾中药可以促进骨基质的合

基金项目: 苏州市中西医结合学会基金项目(SYSD2014162)

* 通讯作者: 张志刚, Email: ji1840@126.com

成,活血化瘀、益气补肾法是临床治疗股骨头坏死的常用治法,在临床上疗效得到肯定。本实验通过建立大鼠激素性股骨头坏死模型,运用益气补肾化瘀方股密葆进行干预治疗,观察动物模型中超微结构及血清脂质水平的变化,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 50 只,体重 (200 ± 20) g,雌雄各半,鼠龄 7~8 w。

1.2 药物及试剂

中药复方股密葆方由补骨脂 10 g、牛膝 10 g、续断 10 g、黄芪 30 g、丹参 15 g、制首乌 10 g、肉苁蓉 10 g、杜仲 10 g、牡蛎 30 g 组成,购自于华润三九医药股份有限公司;TC、TG 试剂盒,购于 SIEMENS 公司,批号:YZB/USA 0249-2009、YZB/USA 0668-2010;HDL、LDL 试剂盒,购于日本积水化学工业株式会社,批号 YZB/JAP 4094-2008、YZB/JAP 4114-2008;大肠埃希杆菌内毒素(LPS)购于 Sigma,批号:LPS-2880;甲基强的松龙购于辉瑞公司,批号:H20080284。

1.3 造模方法及分组

实验大鼠按体重根据随机数字表法,分为 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组,每组 10 只。造模方法参照 Okazaki 等^[2]:大鼠尾静脉连续两天注射 LPS 2 mg/kg,每天一次,最后一次注射 LPS 后,连续 3 d 腹腔注射甲基强的松龙 20 mg/kg,每天一次。最后一次注射甲强龙 2 w 后空白组和模型组各取 2 只取材,病理切片观察,证实造模成功。(因注射 LPS 后造成大量实验动物死亡,尸检发现内脏和血管弥漫性出血,后 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组各存活 6 只、6 只、7 只、6 只、6 只,共计 31 只大鼠。)

1.4 干预方法

病理切片观察证实造模成功后,A 组及 B 组每日准时灌服生理盐水 2 mL;中药复方组灌服同等剂量的混悬液,每日一次。

1.5 脂代谢指标检测

于药物干预的第 4 周末,大鼠腹主动脉采血,行相关数据检测。

1.6 透射电镜观察

实验股骨头标本冰面上取材,股骨头取材完成后迅速置于 2.5% 的戊二醛内固定 4 h 以上,置入 10% 的 EDTA 液中进行脱钙处理。脱钙完成后切薄片,2.5% 的戊二醛内固定,梯度乙醇脱水,再予

100% 丙酮:包埋液(环氧树脂)包埋,烘干,行透射电镜观察超微结构变化。

1.7 HE 染色

大鼠股骨头标本行苏木精-伊红染色(HE),观察股骨头大体形态学变化。

1.8 统计学方法

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学处理,各组之间的参数的比较采用单因素方差分析和两两比较 q 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。并使用 GraphPad Prism 5 进行作图。

2 结果

2.1 HE 染色

2 w A 组,骨小梁排列规则,未见脂肪细胞增生及肥大,潮线连续。见图 1;2 w B 组,骨小梁稀疏变窄,骨细胞核固缩、边聚,数量减少,骨髓水肿,髓内脂肪栓子及血栓形成,脂肪细胞肥大。见图 2;4 w C 组,软骨下骨小梁结构基本正常,骨陷窝较少见,髓内可见少量脂肪栓子,骨细胞固缩,核边聚。见图 3;4 w E 组,骨小梁细长,连续性欠佳,可见少量核固缩,部分边聚,骨陷窝数量较少,部分区域血栓形成。见图 4。

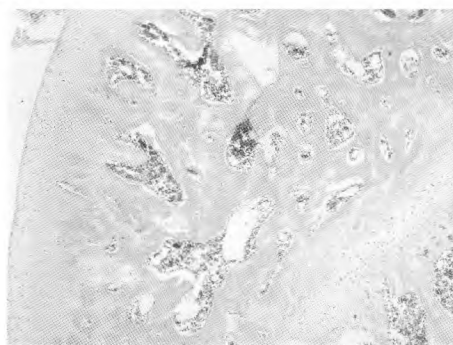


图 1 A 组 2 w HE 染色 (40 $\times$)

Fig. 1 Group A HE staining at 2 weeks (40 $\times$)

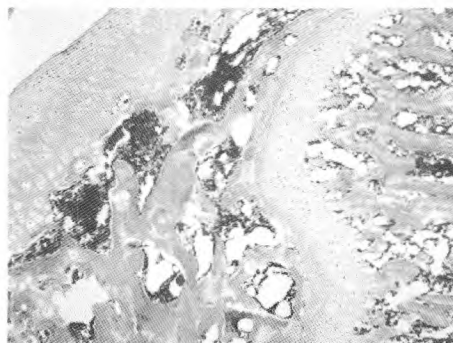


图 2 B 组 2 w HE 染色 (40 $\times$)

Fig. 2 Group B HE staining at 2 weeks (40 $\times$)

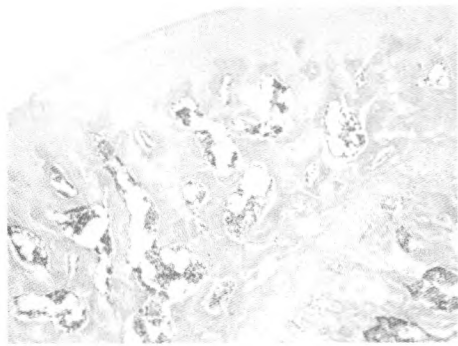


图 3 C 组 4w HE 染色 (40 ×)
Fig. 3 Group C HE staining at 4 weeks (40 ×)

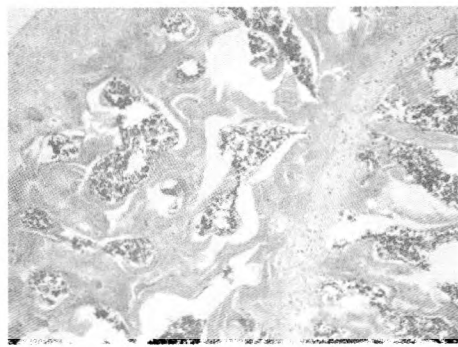


图 4 E 组 4 w HE 染色 (40 ×)
Fig. 4 Group E HE staining at 4 weeks (40 ×)

2.2 透射电镜

2 w A 组,骨细胞胞核清晰,细胞器结构正常。见图 5;2 w B 组,骨细胞发生变性坏死,细胞核固缩,碎裂,边聚,骨陷窝增大,细胞浆内可见脂肪滴堆积。见图 6;4 w B 组,胞浆内充满了脂肪滴,无正常的细胞器,骨细胞变性坏死。见图 7;4 w E 组,细胞核膜消失,骨细胞核边缘轻度钙化,脂肪滴少见。见图 8。

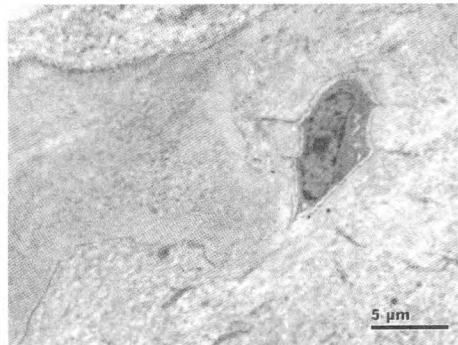


图 5 A 组 2 w 透射电镜
Fig. 5 Transmission electron microscope at 2 weeks in Group A

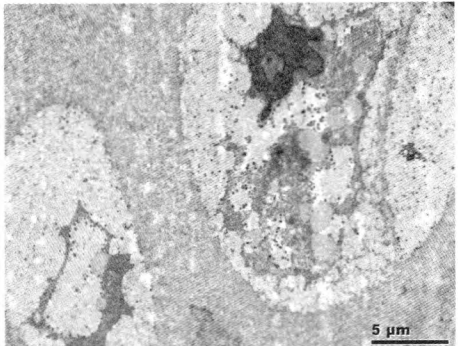


图 6 B 组 2 w 透射电镜
Fig. 6 Transmission electron microscope at 2 weeks in Group B

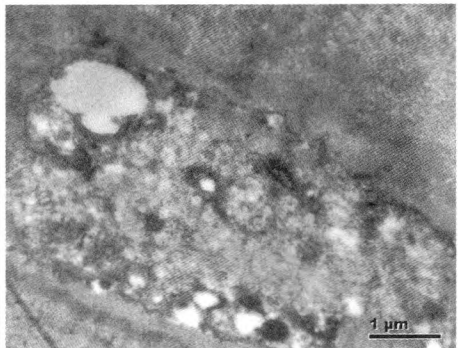


图 7 B 组 4 w 透射电镜
Fig. 7 Transmission electron microscope at 4 weeks in Group B

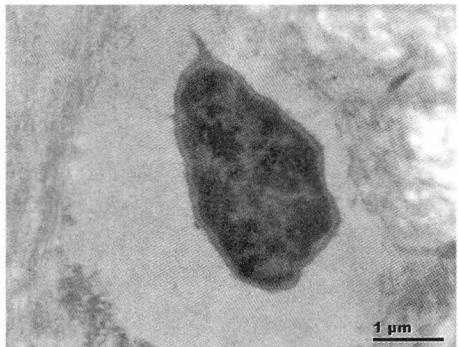


图 8 E 组 4 w 透射电镜
Fig. 8 Transmission electron microscope of 4 weeks in Group E

2.3 血脂检测结果(表 1)

3 讨论

大剂量激素使用后,血脂水平增高,继而导致微血管内脂肪栓塞,脂肪分布异常,在髓腔内聚集,导致髓腔内高压^[3]。同时,由于血脂增高,脂肪分解

表 1 4 w 各组大鼠血清 TC、TG、HDL、LDL 水平比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 1 The levels of TC, TG, HDL, LDL in each group at 4 weeks($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	例数	TC	TG	HDL	LDL
A 组	6	0.56 ± 0.02 **	1.63 ± 0.12 *	1.53 ± 0.12 **	0.27 ± 0.24 *
B 组	6	0.73 ± 0.05	2.17 ± 0.13	1.03 ± 0.08	0.32 ± 0.26
C 组	7	0.54 ± 0.02 **	1.51 ± 0.17 **	1.71 ± 1.44 **	0.25 ± 0.03 *
D 组	6	0.54 ± 0.05 **	1.70 ± 0.17	1.64 ± 0.13 **	0.16 ± 0.02 **
E 组	6	0.45 ± 0.03 **	1.40 ± 0.21 **	1.67 ± 0.04 **	0.19 ± 0.02 **

注:与 B 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

引起血中游离脂肪酸增多,合并骨内和血内前列腺素 E_2 增多,造成股骨头内小血管炎和脂肪栓子形成,损伤血管内皮细胞,导致或加重股骨头缺血^[4]。血液中的脂肪栓子容易附着终末动脉管壁,压嵌入小血管,导致骨内微循环栓塞。股骨头的微循环是循环系统的终末分支,终末血管呈 90°向股骨头表面方向行走,而软骨下扩展为血窦,然后呈 180°向相反方向折回,终止于骨静脉^[5],此处终末动脉与迂曲拱形终末毛细血管相连,致该处更易血液粘滞,脂肪栓子极易停留,造成股骨头内微循环障碍,进而引起组织缺氧、代谢紊乱和水肿,组织缺血水肿又引起骨内压继发性升高,进而加重缺氧缺血,形成恶性血环,最终导致股骨头缺血坏死^[6]。

国内学者通过体内实验发现,股骨头坏死患者体内血脂代谢紊乱,总胆固醇、甘油三脂、低密度脂蛋白水平升高,高密度脂蛋白、载脂蛋白 A1 水平降低。当这些产物升高超过血浆载脂蛋白的结合代偿能力时,血液呈高凝状态,红细胞变形能力下降,股骨头血管内出现凝血且形成血栓,发生微循环障碍,骨细胞因缺血缺氧发生变性坏死。Logistic 多因素回归中总胆固醇、低密度脂蛋白等进入最终模型,认为是导致股骨头坏死发生的独立危险因素^[6]。本实验病理切片显示模型组骨髓腔内充满脂肪栓塞和红细胞聚集,透射电镜发现骨细胞胞浆内充满脂肪滴,导致股骨头内微循环障碍,骨细胞内正常细胞器结构破坏,发生变性坏死。股密葆方由补骨脂、牛膝、续断、黄芪、丹参、制首乌、肉苁蓉、杜仲、牡蛎组成。黄芪甘温益气,本方重用为君药,以发挥补气行血以化瘀之功用,研究发现黄芪^[7]可降低高脂血症小鼠血清甘油三脂、总胆固醇、低密度脂蛋白水平,升高高密度脂蛋白水平,减轻脂质过氧化作用。国内袁浩教授^[8]指出,股骨头坏死以血瘀为定论,以活血化瘀为治疗大法,只有瘀去才能新骨生,本方以丹参为臣药,丹参破宿血,补新血,通利关节,何首乌固精填精益肾,强筋骨,何首乌提取物二苯乙炔苷具有明显降低血清总胆固醇和低密度脂蛋白的含量,降低血压粘滞度,改善血液循环^[9]。牡蛎主收敛,并含有多种微量元素,增加骨质。杜仲、续断、牛膝补肝肾,强筋骨。诸药合用以发挥益肾活血化瘀之功效。本实验检测脂质代谢 4 个指标:TC、TG、HDL、LDL,中药组可以降低 TC、TG、LDL 水平,同模型组比较具有统计学意义,同时可以升高 HDL 水平,其中中药低剂量组效果最明显。其中原因有待后续实验进一步研究。透射电镜及病理切片观察:模型组骨细胞内大量空骨陷窝,胞浆内充满脂肪滴,骨细胞核固缩,变性、坏死;治疗组股骨头内骺板下血管丰富,骨细胞核形态较模型组完整。笔者推断,中药复方股密葆能调节脂质代谢,抑制激素引起高脂血症,改善骨内微循环障碍。

本研究仅从脂质代谢角度探讨了股密葆方治疗激素性股骨头坏死的机制,观测的靶点还有待全面化。同时由于脂肪代谢紊乱如何导致激素性股骨头坏死的中间环节多而复杂,本实验仅选取几个技术指标,其中的分子学机制尚不清楚。由于中药复方具有多靶点的作用优势,提高中药的利用率以发挥中药复方的最大效益是未来研究的重点。

- Hu M, Zhao HB, Dong XL, et al. Ultra-structural evaluation of repairing steroid-induced necrosis of femoral head with pravastatin in rabbits. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2010, 14(37):6861-6864. (in Chinese)
- [5] 邱贵兴, 高鹏. 奈特简明骨科学彩色图谱. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 190.
- Qiu GX, Gao P. Netter's concise atlas of orthopaedic anatomy. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007: 190. (in Chinese)
- [6] 李坤庆, 熊南平, 王爱兵, 等. 脂类代谢异常对股骨颈骨折患者外科治疗后发生股骨头坏死的诊断效果. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2016, 13(1):108-112.
- Li KQ, Xiong NP, Wang AB, et al. The diagnose effect of abnormal lipid metabolism for the femoral head necrosis after femoral neck fracture operation. *J Hunan Normal Univ (Medsci)*, 2016, 13(1):108-112. (in Chinese)
- [7] 刘超, 张学武. 黄芪对高脂血症小鼠血脂及脂质过氧化的影响. *时珍国医国药*, 2007, 18(7):1648-1649.
- Liu C, Zhang XW. Effects of astragalus on serum lipids and lipoperoxidation in experimental hyper lipidemic mice. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2007, 18(7):1648-1649. (in Chinese)
- [8] 徐传毅. 袁浩教授从血瘀证论治激素性股骨头坏死经验. *中医药学刊*, 2003, 21(2):194-195.
- Xu CY. Professor Y's experience on treating steroid-induced necrosis of the femoral head base on the stagnation of blood. *Study Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2003, 21(2):194-195. (in Chinese)
- [9] 赵玲, 李雅莉, 张丽, 等. 二苯乙烯苷对高胆固醇血症致 β -淀粉样肽增高大鼠模型的影响. *中国药理学通报*, 2005, 21(1):49-52.
- Zhao L, Li YL, Zhang L, et al. Effects of tetrahydroxystilbene-glucoside on rat model of β -amyloid increase induced by hypercholesterolemia. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2005, 21(1):49-52. (in Chinese)
- (收稿日期: 2016-07-23; 修回日期: 2016-09-01)

(上接第 1575 页)

【参 考 文 献】

- [1] 麻红艳, 叶山东. 糖尿病与骨质疏松关系的研究进展. *国际老年医学杂志*, 2015, 36(6):270-273.
- Ma HY, Ye SD. The research progress of relationship between diabetes and osteoporosis. *International gerontology miscellaneous*, 2015, 36(6):270-273. (in Chinese)
- [2] 章细华, 朱成童. 老年性骨质疏松疼痛采用益肾强骨汤治疗的临床效果分析. *当代医学*, 2015, 21(35):154-155.
- Zhang XH, Zhu CT. Senile osteoporosis pain with kidney strong bone soup treatment the clinical effect of analysis. *Journal of modern medicine*, 2015, 21(35):154-155. (in Chinese)
- [3] 严红梅, 张振海, 孙娥, 等. 中药治疗骨质疏松症的研究进展. *中草药*, 2014, 21(8):1174-1178.
- Yan HM, Zhang ZH, Sun E, et al. The research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of osteoporosis. *Chinese herbal medicine*, 2014, 21(8):1174-1178. (in Chinese)
- [4] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南(2011). *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2011, 4(1):2-17.
- The Chinese medical association of osteoporosis and bone mineral salt disease branch. Guidance of diagnosis and treatment of primary osteoporosis (2011). *Chinese disease, osteoporosis and bone mineral salt*, 2011, 4(1):2-17. (in Chinese)
- [5] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行). 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- Zheng XY. Traditional Chinese medicine new medicine clinical research guiding principles (trial). Beijing: China medical science and technology press, 2002. (in Chinese)
- [6] 许东晖, 谢江海, 梅雪婷, 等. 我国海龙的研究进展. *中国海洋药物杂志*, 2005, 24(2):51-56.
- Xu DH, Xie JH, Mei XT, et al. The progress of dragon in China. *Journal of China Marine medicine miscellaneous*, 2005, 24(2):51-56. (in Chinese)
- [7] 牛银波, 潘亚磊, 李晨睿, 等. 续断防治骨质疏松的研究进展. *中国药理学通报*, 2013, 29(7):892-894.
- Niu YB, Pan YL, Li CR, et al. Radix dipsaci research progress of prevention and treatment of osteoporosis. *Chinese pharmacological bulletin*, 2013, 29(7):892-894. (in Chinese)
- [8] 李娜, 曲晓波, 姜宗文, 等. 动物药整理研究—鹿角胶. *杏林中医药*, 2014, 34(1):74-76.
- Li N, Qu XB, Jiang ZW, et al. Animal studies medicine-antler glue. *Journal of almond shaped of traditional Chinese medicine*, 2014, 34(1):74-76. (in Chinese)
- [9] 杨慧洁, 吴琦, 杨世海. 金毛狗脊化学成分与药理活性研究进展. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(15):230-234.
- Yang HJ, Wu Q, Yang SH. Golden retriever dog ridge chemical constituents and pharmacological activity research progress. *China experimental formula tuition*, 2010, 16(15):230-234. (in Chinese)
- [10] 董佳梓, 鞠宏大, 贾朝娟, 等. 桑寄生、枸杞子、桑椹对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用及其机理探讨. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(6):483-486.
- Dong JZ, Ju DH, Jia CJ, et al. Mulberry parasitism, compose the 2nd child, mulberry akin to go to ovarian the treatment of osteoporosis in rats and its mechanism study. *China foundation of traditional Chinese medicine medical journal*, 2010, 16(6):483-486. (in Chinese)
- [11] 王凤霞, 吉爱国. 药用土鳖虫化学成分及药理作用研究进展. *中国生化药物杂志*, 2009, 30(1):61-65.
- Wang FX, Ji AG. Medicinal eupolyphaga chemical components and pharmacological activity research progress. *Journal of China biochemical drugs miscellaneous*, 2009, 30(1):61-65. (in Chinese)
- (收稿日期: 2016-06-01; 修回日期: 2016-06-26)