

中药复方干预激素性股骨头坏死的实验研究

吕岫华¹ 刘伟¹ 艾萍¹ 李晓萌¹ 杨韧¹ 黄嘉锦¹ 任崇芳¹ 于雪峰²

(1 北京工业大学生命科学与生物工程学院,北京,100124; 2 南昌大学第四附属医院,南昌,330003)

摘要 目的:探讨激素性股骨头坏死游离脂肪酸的代谢变化及中药复方的预防干预作用。方法:应用高效液相色谱检测动物模型血浆和股骨头组织中的游离脂肪酸。结果:在 3 周和 5 周的时间点上,动物血浆和股骨头组织中的游离脂肪酸代谢出现紊乱。结论:游离脂肪酸代谢异常是激素性股骨头坏死的重要病理基础;中药可以早期预防干预激素性股骨头坏死。

关键词 中药;激素;股骨头坏死;游离脂肪酸

Experimental Study on Traditional Chinese Medicine Intervention on Femoral Head Necrosis

Lyu Xiuhua¹, Liu Wei¹, Ai Ping¹, Li Xiaomeng¹, Yang Ren¹, Huang Jiajin¹, Ren Chongfang¹, Yu Xuefeng²

(1 College of Life Science & Biotechnology, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;

2 The 4th Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330003, China)

Abstract Objective: To investigate the free fatty acid metabolic changes in animal model of femoral head necrosis, and identify the preventive effect of Chinese herbal compound to this disease. **Methods:** The free fatty acid contents in plasma and femoral head tissues of animal models were detected with high performance liquid chromatography (HPLC). **Results:** On the third and fifth week, the animal plasma and tissues of the femoral head appeared free fatty acid metabolism disorder. **Conclusion:** Abnormal metabolism of free fatty acid is an important pathological basis of femoral head necrosis; and traditional Chinese medicine can prevent early stage of femoral head necrosis.

Key Words Traditional Chinese medicine; Hormone; Femoral head necrosis; Free fatty acids

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.05.031

股骨头坏死是致残率极高的常见病、多发病^[1],且具有发病原因多、病理改变复杂的特点。临床实践表明,尽管其病因复杂^[2-3],但糖皮质激素的应用是导致股骨头坏死的主要原因之一^[4-6],而脂类代谢异常又是其不可或缺的重要病理基础^[7]。因此我们通过激素诱导动物股骨头坏死模型,探讨血浆、股骨头组织中游离脂肪酸代谢的变化情况以及中药复方预防干预的有效性。

1 实验仪器材料和方法

1.1 实验仪器材料 仪器 Agilent 1290 UPLC,安捷伦公司产品;中药复方饮片购买于北京同仁堂药业有限公司;辛伐他汀,山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司生产,国药准字 H20083840;注射醋酸泼尼松龙溶液,上海通用药业股份有限公司生产,国药准字 H31021288;注射青霉素钠,华北制药集团有限责任公司生产,国药准字 H13024308;实验动物购买于中

国医学科学院动物研究所;游离脂肪酸标准品购买于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 48 只兔子采用随机数字表随机化分为 4 组:A 组阳性对照组 15 只;B 组空白对照组 3 只;C 组中药干预组 15 只;D 组西药干预组 15 只。

1.2.2 实验方法 阳性对照组、中药干预组、西药干预组,均于左臀部肌肉注射醋酸泼尼松龙溶液 0.5 mL(12.5 mg)/只;右臀部肌肉注射青霉素 0.1 mL(4 万单位)/只,1 次/d,连续 7 d。中药干预组:中药复方粉末稀释溶液 10 g/只,1 次/d,口服灌胃,直到实验结束前一天为止。西药干预组:辛伐他汀片溶解液 80 mg/只,1 次/d,口服灌胃,直到实验结束前一天为止。空白对照组:同等剂量肌注和口服灌胃生理盐水。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81241141)

作者简介:吕岫华(1960—),女,黑龙江人,博士,副教授,研究方向:病毒肿瘤病的防治、中医养生与康复、中药毒理学, E-mail:lvxiuhua@bjut.edu.cn

通信作者:于雪峰(1958—),男,黑龙江人,博士,教授,博士生导师,研究方向:骨与关节疾病治疗与康复、脑瘫的治疗与康复, E-mail:yxfl_1958@sina.com

1.2.3 组织取材 血样的采集及处理:实验动物分别于第3周,第5周取材,麻醉后,心脏取血,各实验组取肝素抗静脉血,离心分离血浆,取 100 μL 血浆,加入 300 μL 甲醇,涡旋 3 min 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 13 000 r/min 离心 20 min 取上清液 300 μL ,在通风橱内以氮气吹干,后加入 150 μL 甲醇复溶。超声 3 min,涡旋 3 min 再离心 13 000 r/min 5 min 取上清 100 μL 进样分析。

股骨头组织的采集及处理:分别于3周,5周不同时间点,在麻醉下做完 MRI 扫描后,取左侧股骨头放入液氮中保存,操作时先将股骨头包裹,用锤子砸碎,后在液氮中于研钵内研磨成碎屑,称取部分其余继续冻存于液氮中,加入 400 mL 甲醇,超声 5 min,涡旋 3 min 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 13 000 r/min 离心 20 min 取上清 300 μL ,在通风橱内以氮气吹干,后加入 150 μL 甲醇复溶,再次混匀,13 000 r/min 离心 5 min 取上清 100 μL 进行分析。

1.2.4 检测方法 影像学检测:核磁共振检测由首都医科大学附属天坛医院小动物影像中心协助完成。核磁共振仪器为 Bruker 公司产品,Range of Bo 7.0 T;Range of RT bore size 31 cm;Gradient coil BGA 20-S;Optional or insert BGA 12-S;Gradient Strength 290 mT/m;Slewrates 1160T/m/s。脂类检测:色谱柱为 zorbax SB C18 Rapid Resolution (2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 μm)柱流动相为 85% 乙腈 0.1% 甲酸等度洗脱,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.2 mL/min,进样量为 5 μL 。

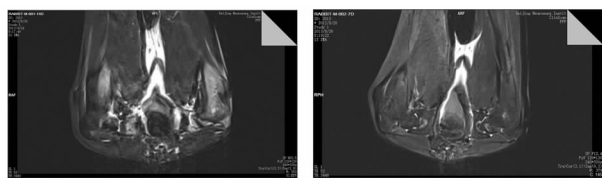


图 1

图 2

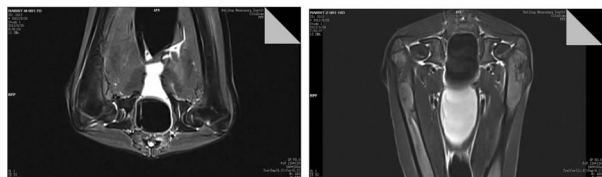


图 3

图 4

2 结果

2.1 影像学检测结果 图 1 为模型组,加权像上分别可见不均匀的低信号区,呈环状、带状及高信号关节腔积液影响;股骨头形态轮廓及关节软骨无明显改变。图 2 图 3 分别为中药组、西药组 5 周时的影像学变化,可以发现加权像上可见高信号关节腔积液影响;股骨头形态轮廓及关节软骨无明显改变及

股骨头呈不均匀的中等信号;股骨头形态轮廓及关节软骨无明显改变。图 4 为对照组,除了加权像上股骨头呈不均匀的中等信号、中心信号偏低外,股骨头形态轮廓及关节软骨无明显改变。

2.2 游离脂肪酸检测结果 参照标准品的出峰时间计算,可以检测出正常对照组组织中的游离脂肪酸含量,不难看出模型组、中药组、西药组中的游离脂肪酸均出现紊乱状态,且随着时间的推移和药物的作用,又在不断的变化之中。

2.2.1 标准曲线 见图 5。

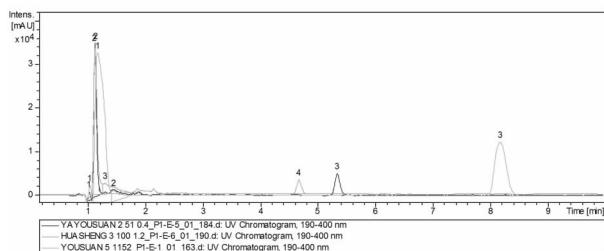


图 5

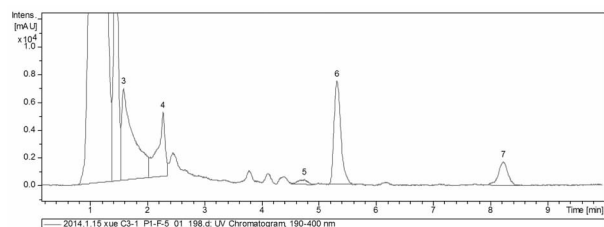


图 6

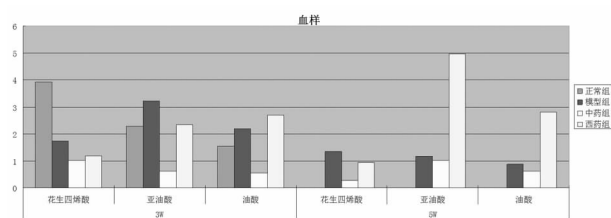


图 7

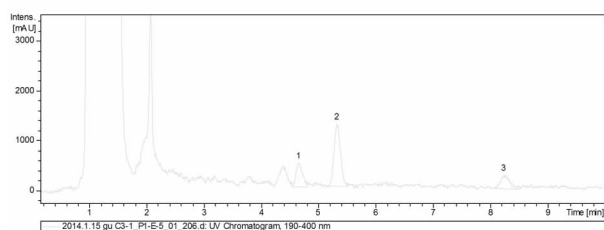


图 8

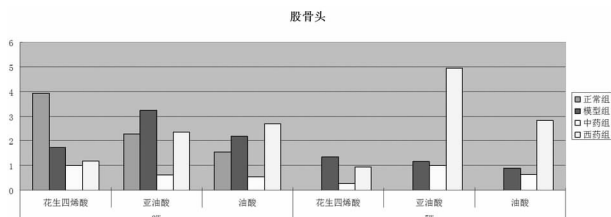


图 9

2.2.2 血浆样品含量测定 见图 6、图 7。

2.2.3 股骨头样品含量测定 见图 8、图 9。

3 讨论

无论在临床上还是实验动物研究均提示,短期内应用大剂量激素可引起股骨头坏死^[1],已是不争的事实;而股骨头血液循环障碍引起组织缺氧、水肿、骨内压升高,是导致股骨头缺血性坏死的主要原因之一^[2]。从大量研究资料可以看出,针对激素性股骨头坏死血脂异常的检测大都集中在胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白^[8-9]等方面,而涉及血浆中游离脂肪酸检测的报道并不多见。

3.1 游离脂肪酸代谢异常是激素性股骨头坏死的重要病理基础 血脂是血浆中脂肪的总称^[10],包括脂肪和类脂,而其中的游离脂肪酸是血脂中不可或缺的重要组成部分。花生四烯酸、亚油酸、油酸均是血浆中的游离脂肪酸范畴。其原型及代谢产物有众多生物学功能^[11-12],在许多疾病的病理生理中起着重要的作用。花生四烯酸是人体中含量最高,分布最广泛的一种不饱和脂肪酸,尤其是在脑和神经组织中含量较多。就调节血脂作用来讲,花生四烯酸与脂类代谢有密切的关系,其降脂作用是亚油酸和亚麻酸的 4 倍,主要是通过促进肝内 β -氧化限速酶肉碱脂酰转移酶的活性和过氧化物体 β -氧化,加速体内脂肪的氧化分解,从而减少脂肪在体内的堆积并降低血脂(降低胆固醇、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白、升高高密度脂蛋白)。因此游离脂肪酸的含量多少可以直接或间接的反映血脂代谢的状况。

实验结果表明,3 周时,模型组血浆中的花生四烯酸、亚油酸、油酸与对照组比较均升高;由于激素的药理作用导致动物机体的血脂代谢异常^[13-14],随着时间的延长,机体血脂代谢不断进行调整。在第 5 周时,模型组血浆中花生四烯酸、亚油酸、油酸的含量又均明显低于正常对照组,说明激素导致股骨头坏死疾病形成以后体内血脂代谢出现紊乱状态,不仅影响胆固醇、三酰甘油等变化,同时也涉及到花生四烯酸等游离脂肪酸的改变。股骨头组织样品检测结果为 3 周时,模型组中除了花生四烯酸低于正常对照组外,亚油酸、油酸含量均高于正常对照组;而 5 周时,包括模型组在内的所有组别,3 种游离脂肪酸的含量均在异常且较低的水平(另文报道),不难发现,尽管动物机体血浆和股骨头组织中的游离脂肪酸含量不同、代谢速度及对药物的敏感性有差异,但是由激素导致股骨头坏死性疾病中,不同组织的脂类代谢紊乱是相一致的。可以发现,花生四烯

酸、亚油酸、油酸等游离脂肪酸的异常变化也是激素性股骨头坏死形成的重要病理基础之一。

3.2 中药可以早期预防干预激素性股骨头坏死 激素性股骨头坏死所致的血脂代谢异常,通过西药他汀类的调解可以改善血脂的代谢情况,疗效肯定,但是西药降脂药物和其他化学药物一样,均有不同程度的毒不良反应,且降脂药物具有停药后的反弹现象^[15-17]。

因此我们根据多年的临床实际,实效和理论相结合,形成骨蚀灵复方,实验结果提示,中药组、模型组和正常对照组比较,激素应用 3 周后,花生四烯酸、亚油酸、油酸三种游离脂肪酸的血浆含量均出现明显的紊乱状态,中药组和西药组比较,花生四烯酸含量基本相同;亚油酸和油酸均低于西药组。5 周后,模型组的三种游离脂肪酸均明显低于正常对照组,说明生物机体都有一定的自我修复功能,但这种能力是有一定的限度;西药组仍然均高于正常组;中药组虽然未达到正常标准,但相对比较接近正常对照组。说明动物机体在中药的协助下逐渐恢复血脂代谢的功能。

实验中发现,动物大量使用激素后,出现明显的体征,包括体毛枯萎、精神萎靡、严重腹泻等表现,且死亡率很高,本次实验模型组的死亡率达 70%,但在中药组中腹泻症状轻于模型组,且死亡率也明显低于模型组为 58%。因此中药骨蚀灵复方预防干预激素性股骨头坏死的脂肪代谢紊乱及其他药理作用有待进一步的深入研究和探讨。

4 结论

激素性股骨头坏死脂肪代谢紊乱学说已有悠久的历史,但大都从血浆中胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白等方面进行研究,且侧重于脂肪三酰甘油脂酶与脂代谢^[18],本文则从游离脂肪酸的角度进行研讨。实验结果发现,短期内大量应用激素导致股骨头坏死后,血浆和股骨头组织中的花生四烯酸、油酸、亚油酸等游离脂肪酸均出现代谢紊乱状态,且应用中药骨蚀灵复方具有早起预防干预激素性股骨头坏死的作用。脂肪代谢紊乱存在于肾病等多种疾病中^[19],且内容繁杂,激素性股骨头坏死与基因多态性等相关内容^[20],将是我们下一步的主要研究方向。

参考文献

- [1] 梁永胜,雷仲民,孔庆括,等. II 期股骨头坏死与血脂异常关系的临床意义[J]. 医学信息,2012,25(7):32-33.
- [2] 杨治,朱养均,尚保生,等. 骨灵颗粒对兔股骨头坏死核心结合生

- 长因子 a1 表达影响的实验研究[J]. 陕西中医学院学报, 2011, 34(1): 72-73.
- [3] 高辉, 张杰, 曹玉净. 活血化瘀中药在股骨头坏死治疗中的应用进展[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(10): 82-85.
- [4] 路萍, 张雄军, 王永志, 等. 激素性股骨头坏死介入治疗的临床疗效分析[J]. 云南医药, 2011, 32(2): 217-219.
- [5] 刘会怡, 潘昌如, 潘平. 辛伐他汀治疗早期激素引起缺血性股骨头坏死[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2012, 18(2): 178-180.
- [6] 李志锐, 王玉, 陈继凤. 激素性股骨头坏死模型骨髓间充质干细胞的生物学特性评估[J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(5): 525-528.
- [7] 邵阳, 赵晓艳, 马勇. 激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(8): 88-90.
- [8] 张成龙, 尹华, 章建华. 股骨头坏死动物模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(3): 58-61.
- [9] 陈泽荣, 王和鸣. 激素性股骨头坏死研究述评[J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(3): 5-9.
- [10] 朱大年. 人体生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [11] 潘丽娟, 杨庆利, 闵平, 等. 高油酸花生对大白鼠血脂水平影响的研究[J]. 花生学报, 2009, 38(3): 6-9.
- [12] 王炜, 张伟敏. 单不饱和脂肪酸的功能特性[J]. 中国食物与营养, 2005(4): 44-46.
- [13] 张辉, 刘俊峰, 黄军华. 辛伐他汀治疗激素性股骨头坏死患者的效果观察及对循环内皮祖细胞功能的影响[J]. 临床研究, 2013, 10(22): 67-69.
- [14] 谢林, 王坤正. 骨、脂肪、神经三者相互作用在激素性股骨头坏死中作用的探讨[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2013, 7(3): 390-392.
- [15] 邹存珍, 刘磊, 李滨. 浅析血脂异常的内科治疗[J]. 世界最新医学信息文摘, 2013, 13(7): 166.
- [16] 李根林, 张华, 徐玉叶. 血脂异常的调脂策略[J]. 中国实用医药, 2013, 8(19): 204-205.
- [17] 李自成, 联合调脂治疗血脂异常的策略[J]. 岭南心血管病杂志, 2013, 19(1): 12-13.
- [18] 刘晓华, 魏丽, 贾伟平. 脂肪甘油三酯脂酶与脂代谢的研究新进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2009, 17(11): 872-874.
- [19] 刘圣山, 慢性肾病患者高尿酸血症与脂质代谢异常的关系[J]. 临床研究, 2013, 8(11): 55-56.
- [20] 高明. 脂代谢相关基因多态性与缺血性脑卒中[J]. 微循环学杂志, 2014, 24(2): 80-83.

(2014-02-14 收稿 责任编辑: 徐颖)

(上接第 752 页)

属起步阶段, 在未来的研究中应总结经验, 突破已有研究局限, 修补本研究的不足之处, 严密设计细节, 对中医振腹治疗 T2DM 的机制进行更为深入的实验研究。

参考文献

- [1] 王金涛. 松振法推拿治疗糖尿病 18 例[J]. 现代中西医结合杂志, 1999, 8(11): 502.
- [2] 陈永珍, 张萍青, 刘雪梅, 等. 振腹配合点穴治疗女子运动员原发性痛经的疗效观察[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4): 808-809.
- [3] 张敏尚, 王山, 刘玉泉. 针灸配合振腹治疗阳痿 104 例[J]. 中国针灸, 2005, 25(6): 431-432.
- [4] 杜世华. 振腹法治疗便秘 20 例[J]. 浙江中医杂志, 2007, 42(4): 209-210.
- [5] 顾英俊. 以振颤法为主治疗肠功能紊乱症[J]. 按摩与导引, 2001, 17(5): 24-25.
- [6] 于长生, 于晓光. 振腹配合推拿治疗顽固性心绞痛临床观察[J]. 按摩与导引, 2005, 21(9): 3-4.
- [7] 郭俊海. 振腹法治疗糖尿病初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 224-225.
- [8] 李多多. 单纯振腹手法对调节 2 型糖尿病患者血糖水平的临床研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [9] 杨小红, 王素莉, 张伟程. 中医药对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞功能的早期保护研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2010, 22(3): 268-272.
- [10] 沙向阳, 王纳新, 邓欣. 糖尿病治疗新药-长效化胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 及其类似物的研究进展[J]. 海峡药学, 2011, 23(10): 1.
- [11] 向朝峰, 段滨红, 杨玉芝, 等. GLP-1 治疗长病程肥胖合并 2 型糖尿病及 visfatin 变化的相关性研究[J]. 中国校医, 2014, 28(4): 280-282.
- [12] 吴美芬, 陈晓铭, 武革, 等. 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞 PDX-1 基因表达及 GLP-1 的干预作用[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(11): 1699-1701.
- [13] 周迎生, 高妍, 李斌, 等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J]. 中国实验动物学报, 2005, 9(13): 153-157.
- [14] 王保伟, 李颖, 刘晓红. 高脂饲料喂养时间及链脲佐菌素剂量对实验型糖尿病大鼠造模的影响[J]. 卫生研究, 2011, 40(1): 99-106.
- [15] 宏达, 臧福科. 大成推拿术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 694.

(2014-06-10 收稿 责任编辑: 张文婷)