

# 右归饮加减方对兔激素性股骨头坏死的干预作用及其机制研究

刘 铨<sup>1</sup> 金 翔<sup>1</sup> 杜 斌<sup>1</sup> 孙光权<sup>1</sup> 马陆涵<sup>2</sup> 薛 鹏<sup>3</sup> 于恒恒<sup>4</sup>

(1.南京中医药大学附属医院,江苏南京210029;2.南京江宁区东山医院,江苏南京211100;

3.苏州市相城人民医院,江苏苏州215131;4.徐州市丰县人民医院,江苏徐州221700)

**摘要** 目的:观察右归饮加减方对激素性股骨头坏死的治疗作用并探索其治疗机制。方法:采用大剂量马血清联合地塞米松制造早期股骨头坏死兔模型。将12只造模成功的白兔随机分为模型组和右归饮组,另随机选取同批次大白兔6只作为空白对照组,分别给予右归饮加减方水煎液和纯净水灌胃干预6周。比较3组白兔基础代谢率变量;取各组白兔股骨头,显微CT(MicroCT)对比骨小梁密度;制作股骨组织切片,苏木精伊红(HE)染色,光镜下观察骨小梁形态,比较空骨陷窝数;丽春红-品红(MASSON)染色观察成骨细胞数;抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色观察破骨细胞数;血管内皮生长因子(VEGF)免疫组化染色观察血管新生情况。结果:右归饮组基础代谢率变量及股骨头组织HE染色的骨细胞数均较模型组显著升高,而空骨陷窝数显著低于模型组,差异均有统计学意义( $P$ 均=0.000);MicroCT显示右归饮组股骨头单位体积内骨小梁体积/总体积、骨小梁的厚度/间隙、骨小梁数均较模型组显著提高( $P=0.004, P=0.000, P=0.001$ );MASSON染色显示右归饮组白兔股骨头内成骨细胞数明显高于模型组( $P<0.05$ );TRAP染色提示破骨细胞数空白对照组最低但与右归饮组无统计学差异,均显著低于模型组( $P<0.01$ );VEGF免疫组化显示右归饮组股骨头血管新生阳性区面积明显大于空白对照组和模型组( $P<0.05, P<0.01$ )。结论:右归饮加减方能显著提高激素性股骨头坏死模型白兔的基础代谢和骨密度,其作用机制可能是促进成骨并抑制破骨活性,显著提高股骨头内血管新生能力。

**关键词** 右归饮;实验性股骨头坏死;胃组织;骨小梁;骨密度;新西兰大白兔;实验研究

中图分类号 R681.805 文献标志码 A 文章编号 1672-397X(2019)09-0081-05

糖皮质激素的大量使用已经被证实可能引起激素性股骨头坏死(SANFH)<sup>[1]</sup>。该病患者通常为中青年,一旦坏死进展,股骨头发生塌陷,则患者丧失劳动能力,只能进行关节置换挽救部分关节功能,为家庭和社会经济带来沉重的负担<sup>[2]</sup>。SAHFH患者常因大量使用糖皮质激素导致肾上腺皮质功能不全,临床表现出畏寒肢冷、面色皑白、腰膝酸软等肾阳虚症候,部分患者伴有淡漠懒动、心悸失眠、脉象细涩等心气不足表现。我们前期使用右归饮加减作为主方搭配其他保髋手术治疗该类患者,获得了较好的疗效<sup>[3]</sup>。本研究基于临床实践进行动物实验,初步探究右归饮加减方干预SANFH的部分现代医学机制,为其治疗早期SANFH提供理论依据,现将结果报道如下。

## 1 实验材料

1.1 实验动物 清洁级雄性新西兰大白兔24只,体重2.4~3.0kg,兔龄4~5个月,采购于南京青龙山实验动物中心(动物合格证号:SYXK-201720702),

饲养于南京中医药大学动物实验中心,实验全程对待实验动物遵循实验动物使用及关怀指南。本研究经由南京中医药大学附属医院动物伦理委员会批准。

1.2 药品与试剂 右归饮加减方药物组成:熟地黄25g、炮附子5g、肉桂5g、淮山药15g、山茱萸10g、菟丝子15g、枸杞子15g、当归10g、盐制杜仲15g、鹿角胶15g,中药饮片由江苏省中医院中药房提供。马血清(规格500mL, Hyclone);地塞米松磷酸钠注射液(1mL, 5mg, 湖北药业有限公司);青霉素G(80万单位, 利康药业);庆大霉素(8万单位, 利康药业);泮托拉唑(40mg, 奥德赛制药);苦味酸(国药集团化学试剂有限公司);苏木素、伊红、丽春红-品红、苯胺蓝及副品红试剂(四季青公司);免疫组化所用一抗及二抗由江苏省中医院病理科提供。

1.3 实验仪器 3.0T核磁共振(MRI, Siemens), 倒置相差显微镜(上海光学仪器厂), MicroCT

(Siemens Inveon), 石蜡包埋及脱水机(武汉俊杰电子公司, JB-P5), 石蜡超薄切片机(武汉俊杰电子公司, RM2016), Image-pro plus 6.0 (IPP)。

## 2 实验方法

**2.1 造模** 所有实验兔入组前均饲养1周排除隐匿性疾病, 单笼颗粒饲料饲养。随机选出6只兔不进行任何造模干预。另外12只兔采用高剂量马血清静脉注射联合地塞米松肌注的方法诱导股骨头坏死模型。具体步骤: 连续3周, 每周经耳缘静脉注射1次马血清(20mL/kg); 最后1次马血清注射完后当日开始肌肉注射地塞米松10mg/kg, 每日1次, 左右臀肌交替注射4d。其间予青霉素80万单位及庆大霉素8万单位肌肉注射预防感染, 泮托拉唑40mg静脉注射保护胃黏膜。注射结束后, 对造模白兔进行3.0T髋关节MRI检查, 所有造模兔出现T1低信号、T2高信号、压脂像高信号的骨髓内水肿和早期股骨头坏死迹象, 造模成功。

**2.2 分组与干预** 将12只造模成功的兔随机分为右归饮组和模型组, 每组6只; 另6只未进行任何干预的兔为空白对照组。根据体重等量换算及前期本研究组对右归饮进行的高效液相色谱-四杆飞行时间质谱血清含药浓度定量, 右归饮组予每日1次右归饮灌胃, 每次10mL/kg(含生药约5g)。右归饮的制备方法如下: 除鹿角胶以外其余各药饮片水煎至250mL, 兑入鹿角胶, 调整生药浓度为0.5g/mL。模型组与空白对照组均予纯净水10mL/kg每日1次灌胃。3组均干预6周。

## 2.3 观察指标

**2.3.1 基础代谢率变量(VBMR)测定** 造模结束及干预结束当天对每只兔采用Read公式变量部分进行计算,  $VBMR=0.75 \times (\text{脉率} + 0.74 \times \text{脉压差})$ 。

**2.3.2 取材及组织细胞学项目检测** 干预完成并测定VBMR后, 以水合氯醛过量麻醉法将各组白兔处死, 完整取出左侧股骨头, 去除附着的肌肉和软组织, 将标本放进50mL离心管内, 加入4%多聚甲醛, 在离心管管壁上标注分组及编号、取材时间, 以备检测。

**2.3.2.1 骨细胞数及空骨陷窝百分比** 将股骨头沿冠状面剖开, 10%EDTA脱钙后冠状面切取2mm厚组织, 脱水、石蜡包埋后切成厚3~4 $\mu$ m的切片, 脱蜡, HE染色, 光镜下观察骨小梁形态。200倍镜下随机选择10个视野, 以表格法计数每个视野的骨细胞数, 而后40倍镜下每100个骨细胞计算空骨陷窝所占百分比。

**2.3.2.2 骨小梁体积/总体积、骨小梁的厚度/间隙、骨小梁数目** 使用MicroCT进行骨小梁扫描, 扫描设定参数电压80kV, 电流500 $\mu$ A, 分辨率中等, 像素40.5 $\mu$ m。对股骨头内部进行同向性断层扫描, 获取图片, 软件整合并重建后输出图像。分别记录并计算每个股骨头内骨小梁体积/总体积比值(Bv/Tn, Bone Volume/Total Volume)、骨小梁的厚度/间隙比值(Tn/SP, Trabecular Thickness/Trabecular Spacing), 统计骨小梁数目(Tb.N, Trabecular Number)。

**2.3.2.3 成骨细胞数目** 将石蜡切片脱蜡后依次使用自来水和蒸馏水各冲洗30s, 使用Weigert苏木精液染核5~10min, 盐酸酒精分化, 充分水洗后使用丽春红-品红染色液(MASSON)浸染5~10min, 以2%冰醋酸水溶液浸洗片刻后以1%磷钼酸水溶液分化3~5min, 直接用苯胺蓝染色液染5min, 以0.2%冰醋酸水溶液浸洗片刻后固封。显微镜镜检并采集图像进行分析。每张切片随机挑选至少3个200倍视野进行拍照, 拍照时尽量让组织充满整个视野, 保证每张照片的背景光一致, 应用Image-Pro Plus 6.0软件计数每个视野内的成骨细胞个数。

**2.3.2.4 破骨细胞数目** 制备抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)孵育液, 将切片置于TRAP孵育液内37 $^{\circ}$ C孵育50min, 镜下观察破骨细胞呈酒红色为止, 蒸馏水漂洗, 加入Harris苏木素染3~8min, 自来水冲洗, 1%的盐酸酒精分化数秒, 自来水冲洗, 0.6%氨水返蓝, 流水冲洗, 脱水透明, 中性树脂胶封片。显微镜镜检并采集图像进行分析。分析软件及分析方法同MASSON染色, 应用Image-Pro Plus 6.0软件计数每个视野内的破骨细胞个数。

**2.3.2.5 新生血管数** 采用血管内皮生长因子(VEGF)免疫组织化学染色。切片二甲苯及梯度酒精复蜡脱水, 蒸馏水清洗2min, 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中95 $^{\circ}$ C高温修复15min, 自然冷却至室温, PBS缓冲液冲洗3次, 每次3min。将切片放入3% $H_2O_2$ 封闭液常温下孵育15min, PBS缓冲液冲洗3次, 每次3min, 完成后使用山羊血清(博士德, AR0009)孵育20min。一抗孵育: 滴加一抗(1:400, VEGF antibody, BA0407), 4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜, PBS冲洗3次共15min。二抗孵育: 使用HRP标记的山羊抗兔二抗(MaxVision<sup>TM</sup> HRP-Polymer anti-Mouse IHC Kit, KIT-5001)孵育20min, PBS冲洗3次共15min, 使用DAB显色液(DAB Kit, DAB-0031)

显色1min,蒸馏水阻断显色。最后使用梯度酒精及二甲苯脱水透明,中性树胶封固,晾干。每张切片在200倍镜下选择3个视野,应用Image-Pro Plus 6.0软件设定标准参照色后,计算新生血管阳性区域面积。

### 3 实验结果

**3.1 各组白兔基础代谢率变量比较** 造模后,造模白兔出现明显的食欲减退、蜷缩懒动、毛发脱落等改变,经过右归饮干预,白兔的基础活动量有所改善,食欲有所增进。各组白兔基础代谢率变量比较见表1。

**3.2 干预后各组白兔空骨陷窝百分比及Bv/Tn、Tn/SP、Tb.N比较** HE染色后光镜下空白对照组白兔股骨头可见大量新生骨细胞,骨小梁结构完整;模型组白兔股骨头可见大量脂肪细胞浸润,骨小梁破碎;右归饮组白兔股骨头骨小梁虽有部分断裂,但结构完整,可见修复,空骨陷窝数量较模型组显著减少,见图1。MicroCT显示右归饮干预6周后兔股骨头内骨小梁结构致密,数量及厚度均显著优于模型组,见图2。干预后各组白兔股骨头骨细胞数、空骨陷窝百分比及Bv/Tn、Tn/SP、Tb.N比较见表2。

**3.3 各组白兔股骨头成骨细胞及破骨细胞数比较** 干预6周后,MASSON染色右归饮组与空白对照组均可见大量成骨细胞,其中右归饮组转蓝区域明显,提示新生骨修复活跃,模型组成骨细胞数目较少,与其他2组相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),且红色陈旧骨区域较多,蓝染较少,提示骨修复能力下降,见图3、表3。Trap染色右归饮组可见散在破骨细胞,密度较稀疏,较空白对照

表1 各组白兔基础代谢率变量比较  $\text{kJ} \cdot \text{M}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$

组别	动物数(只)	造模前	干预前	干预后	$t$ (干预前后)	$P$ (干预前后)
模型组	6	199.01±4.49	154.79±9.32	161.60±7.72	-4.147	0.091
右归饮组	6	198.74±5.28	157.75±10.19	189.33±6.86	-11.478	0.000
$t$		-0.720	0.245	11.232		
$P$		0.946	0.816	0.000		

注:空白对照组基础代谢率等同于其他组白兔造模前,故未列出。

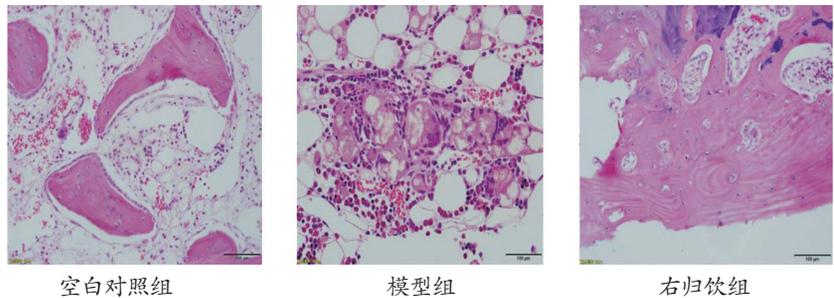


图1 干预后各组白兔股骨头组织病理(HE染色,×200)

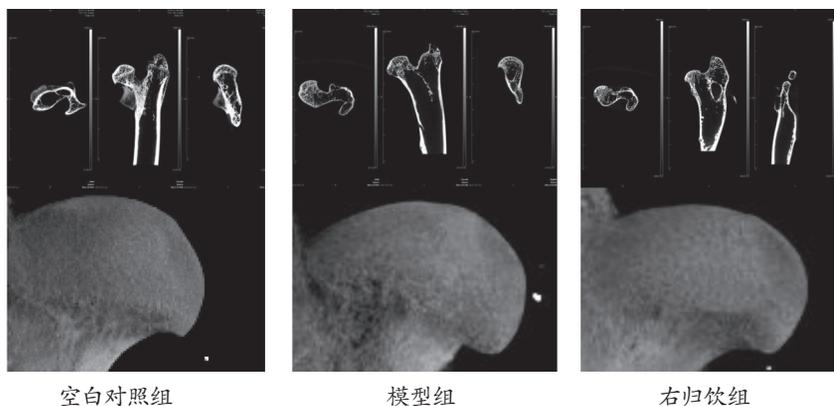


图2 干预后各组白兔股骨头MicroCT图(×20)

表2 干预后各组白兔股骨头骨细胞数、空骨陷窝百分比及Bv/Tn、Tn/SP、Tb.N比较

组别	动物数(只)	骨细胞数(个/HP)	空骨陷窝数(%/HP)	BV/TN(%)	TN/SP(%)	Tb.N(个)
模型组	6	10.56±4.04	9.90±1.62	27.50±2.17	13.38±8.34	36.58±3.77
右归饮组	6	16.98±3.70	4.49±0.97	33.89±1.71	21.01±5.39	45.98±7.80
$t$		6.784	-12.360	2.715	6.098	3.930
$P$		0.000	0.000	0.004	0.000	0.001

注:HE染色后,骨细胞数为200倍镜下每标本10个视野计数,空骨陷窝百分比为40倍镜下每标本10个视野计数,MicroCT计数为每标本股骨头中心所有含骨小梁区域的总计数(原始放大20倍,图像软件2次放大最大倍数200倍)。

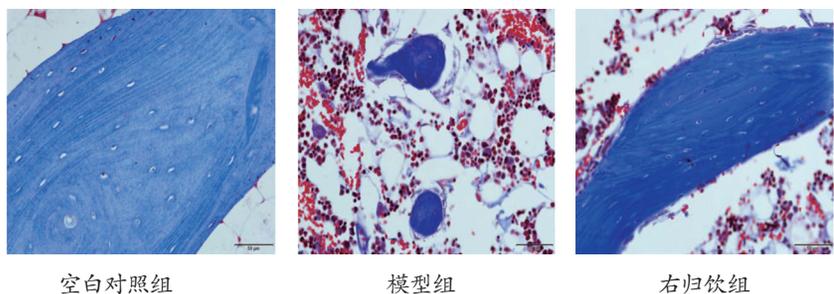


图3 干预后各组白兔股骨头MASSON染色图(×200)

组稍多,差异无统计学意义,可能提示骨重建较活跃,2组破骨细胞数目明显少于模型组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),见图4、表3。

3.4 各组白兔股骨头新生血管数比较 右归饮干预后,VEGF免疫组化可见大量血管新生现象,以高倍视野下 $16\times 16$ 格计数板共256格计数,单位区域内血管新生显著高于空白对照组和模型组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),表现为骨小梁内部可见染色阳性区域,其比例高于空白对照组和模型组,见图5、表3。

## 4 讨论

糖皮质激素通过多重途径导致SANFH已被大量研究证实,而这些病理过程并非独立影响股骨头,而是造成全身的多系统问题。如糖皮质激素的使用引起胰岛素水平升高,导致脂肪再分布,微循环中脂类增多,阻断骨内微循环,同时患者体重增加,进一步加重股骨头负担<sup>[4]</sup>;又如糖皮质激素对前列腺素和甲状腺素具有拮抗作用,导致患者血运障碍的同时,常伴畏寒怕冷、懒言少动等症状<sup>[5]</sup>。本病患者中医辨证多属肾阳虚证。肾为先天之本,主骨生髓,肾精为人体先天之精,对骨骼强健起到主宰作用,因此我们临床常从肾论治。右归饮为经典补肾阳方。本研究所用的右归饮加减方中以肉桂、附子、鹿角胶三者共为君药,肉桂辛甘大热,与附子配伍,温壮元阳命门之火,鹿角胶甘咸微温,益精填血,温煦真元,三者相辅相成,共奏补肾助阳之功;熟地黄滋阴养血,山茱萸益肾固元,枸杞子肝肾同滋,山药补脾养元,与桂、附、鹿角胶相配伍,取其“阴中求阳”之意,同为臣药;菟丝子、杜仲补益肝肾强腰膝,当归养血和血,共为佐药。诸药合用,阴阳互求,使阳得阴助而化生无穷,先天与后天共养,使精气充足而源源不竭。已有报道了右归饮可能对SANFH具有一定的干预作用<sup>[6-7]</sup>,这与肾主骨生髓的理论有一定契合,然而基于现代医学理论,SANFH的治疗目标除骨修复外尚需血运重建<sup>[8]</sup>,右归饮干预的靶点是否涉及血运重建,其干预作用与中医传统理论能否找到新的契合点,目前该类研究报道尚较少。

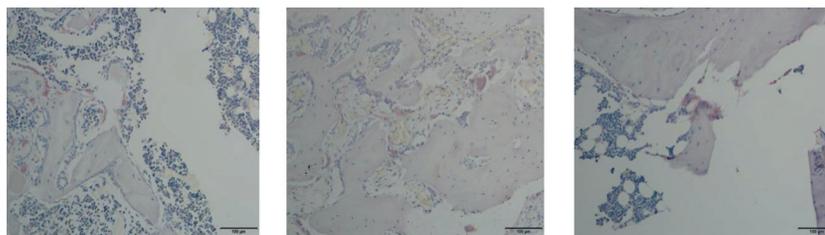


图4 干预后各组白兔股骨头Trap染色图( $\times 200$ )

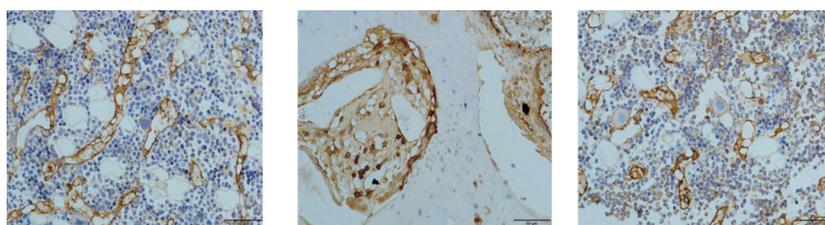


图5 干预后各组白兔股骨头VEGF免疫组化图( $\times 200$ )

表3 各组白兔股骨头成骨细胞数、破骨细胞数和VEGF阳性区面积比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本数	成骨细胞数(个/HP)	破骨细胞数(个/HP)	VEGF 阳性区面积(格/256格)
空白对照组	18	24.46 $\pm$ 6.12	1.72 $\pm$ 0.45	88.15 $\pm$ 5.05
模型组	18	9.77 $\pm$ 4.55**	6.11 $\pm$ 1.90**	75.09 $\pm$ 7.97*
右归饮组	18	21.90 $\pm$ 3.74#	3.03 $\pm$ 0.87##	117.12 $\pm$ 9.33**

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

本研究观察到,造模后SANFH兔模型均表现食量减少、蜷缩少动、心率下降、血压降低等低基础代谢率体征,符合中医肾阳虚表现,由于心肾同源,模型兔均伴有一定的心气虚表现,右归饮加减方进行6周干预后兔模型基础代谢率变量较对照组显著提高,心率血压明显恢复,基本恢复到基线水平,肾阳足则心得温煦,达到了补肾助阳,同养心肾的效果。此外,本研究通过HE染色、MicroCT、MASSON及Trap染色观察右归饮加减方对股骨头内骨修复的影响,结果显示右归饮加减方能显著提高成骨细胞活性及数量,降低破骨细胞数目,显著提高骨小梁密度及厚度,减少空骨陷窝比例,对SANFH早期模型的骨修复具有较理想的干预效果。有研究表明糖皮质激素能够诱导骨髓间充质干细胞(MSCs)向脂肪细胞分化<sup>[9]</sup>,同时会通过一系列复杂的机制阻碍其向成骨细胞方向分化<sup>[10]</sup>。本研究各组白兔股骨头组织MASSON及Trap染色后,我们发现右归饮组白兔股骨头破碎骨表面成骨细胞增多而未染色的空泡样脂肪细胞及破骨细胞相对减少,因此我们猜测右归饮对SANFH骨修复的机制可能通过诱导MSCs分化而实现<sup>[11]</sup>,这与中医肾主骨生髓的理念十分契合。肾阳足则先天之本得以温煦,肾精得宣,充养骨骼。另

外我们通过VEGF染色观察右归饮对SANFH早期股骨头内修复中再血管化过程的干预效果,结果显示右归饮能显著提高SANFH模型白兔股骨头内的血管新生,骨小梁中VEGF阳性表达显著提升,其表达甚至高于空白对照组。现代研究表明,SANFH的修复障碍主要在于硬化带形成后坏死区无法形成有效血管新生,造成局部持续缺血坏死,进而力学塌陷<sup>[12]</sup>,因此右归饮促进股骨头内血管新生的作用十分关键。中医理论认为心主血脉,而血液的运行依赖心气的推动作用,肾阳为诸气温煦之元阳,右归饮补肾助阳,温煦气化,心脉得以温养,则脉络得通,四肢得养,契合了中医肾阳为诸阳之本和心肾同源的学术理念。

综上所述,右归饮加减方能有效改善SANFH兔模型的肾阳虚与心气虚症状,提高基础代谢率变量,同时显著提高股骨头内骨量,促进成骨修复,抑制破骨活性,显著改善股骨头内血管修复重建能力,其治疗肾阳虚型SANFH具有一定的理论依据,然而右归饮加减方具体通过何种通路发挥上述效用仍值得进一步研究,我们通过网络药理学靶点匹配发现其可能通过干预骨髓间充质干细胞自噬表达发挥作用,这是我们下一步的研究方向。此外,基于代谢组学我们已经初步使用高效液相色谱——四杆飞行时间质谱筛选了右归饮入血的部分可能有效成分,通过此技术并进行聚类试验,在右归饮的复方中找到其治疗SANFH的等效组分也是我们进一步研究的目标。

#### 参考文献

- [1] MOYA-ANGELER J, GIANAKOS A L, VILLA J C, et al. Current concepts on osteonecrosis of the femoral head[J]. World J Orthop, 2015, 6 (8): 590.
- [2] KARASUYAMA K, YAMAMOTO T, MOTOMURA G, et al. The role of sclerotic changes in the starting mechanisms of collapse: A histomorphometric and FEM study on the femoral head of osteonecrosis[J]. Bone, 2015, 81: 644.
- [3] 刘铎, 杜斌, 孙光权, 等. 带缝匠肌肌蒂髂骨瓣移植配合中

药治疗早中期股骨头坏死近期疗效观察[J]. 山东中医杂志, 2016, 35 (5): 409.

- [4] ZHAO F C, LI Z R, GUO K J. Clinical analysis of osteonecrosis of the femoral head induced by steroids[J]. Orthop Surg, 2012, 4 (1): 28.
- [5] ZHANG N F, LI Z R, WEI H Y, et al. Steroid-induced osteonecrosis: The number of lesions is related to the dosage[J]. J Bone Joint Surg Br, 2008, 90 (9): 1239.
- [6] 宋才渊, 沈兴潮, 吕帅杰, 等. 右归饮治疗激素性股骨头坏死的研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30 (4): 1204.
- [7] 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.
- [8] MOTOMURA G, YAMAMOTO T, YAMAGUCHI R, et al. Morphological analysis of collapsed regions in osteonecrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg Br, 2011, 93 (2): 184.
- [9] HOUDEK M T, WYLES C C, PACKARD B D, et al. Decreased osteogenic activity of mesenchymal stem cells in patients with corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. J Arthroplasty, 2016, 31 (4): 893.
- [10] YAN Z Q, HANG D H, GUO C G, et al. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head[J]. J Orthop Res, 2009, 27 (4): 442.
- [11] SONG H J, TAO L, WANG F, et al. Effect of bone mesenchymal stem cells transplantation on the micro-environment of early osteonecrosis of the femoral head[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8 (11): 14528.
- [12] PAK J, LEE J H, PARK K S, et al. Current use of autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells for orthopedic applications[J]. J Biomed Sci, 2017, 24 (1): 1.

第一作者: 刘铎(1990—), 男, 医学硕士, 住院医师, 研究方向为中医骨伤科学。

通讯作者: 金翔, 医学博士, 主任医师。  
1243778696@qq.com

收稿日期: 2019-01-09

编辑: 吴宁

扫码关注《江苏中医药》杂志微信服务号

