

# 活骨灌注液不同给药途径对激素性股骨头坏死 相关炎性因子表达的影响

徐西林<sup>1</sup> 赵军<sup>1</sup> 杨福彪<sup>1</sup> 于长岁<sup>1</sup> 张晓峰<sup>1△</sup> 申意伟<sup>1</sup> 吕航<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**观察活骨灌注液不同给药途径对兔激素性股骨头坏死(SONFH)的治疗作用,为临床治疗股骨坏死提供新的治疗方案。**方法:**雄性新西兰大白兔随机分为空白组(15只)和造模组(60只)。造模组行兔股骨头坏死动物造模后(采用 Matsui 造模方法,末次腹腔注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 4 周后开始治疗)再随机分为 4 组:耳缘静脉组(E)、灌胃组(W)、外敷组(F)、模型组(M)各 15 只。空白组(K)正常饲养,不给予任何药物治疗。耳缘静脉组给予活骨灌注液 10 mg/kg,1 周 2 次;灌胃组给予活骨灌注液 7.8 mg/kg,每日 1 次;外敷组给予双后肢上部内侧外敷透皮贴剂,每次 7.5 g/贴,每 3 日 1 次。治疗 12 周后,采用苏木精-伊红染色观察股骨头病理学变化及 MRI 检查证明造模成功,采用 ELISA 法检测血清 IL-1 $\beta$ , IL-6 及 IL-8 水平。**结果:**ELISA 法检测结果:模型组中的 IL-1 $\beta$ , IL-6 及 IL-8 含量测定相对正常组有明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组相比,不同给药途径中,IL-1 $\beta$ , IL-6 及 IL-8 蛋白含量均有不同程度的降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。苏木精-伊红染色观察显示:模型组股骨头软骨膜脱失,骨髓腔内脂肪细胞明显增多,关节腔内水肿,骨内压增高。活骨灌注液组方的不同给药途径均可以不同程度改变股骨头的病理变化,包括软骨层增生、骨小梁结构规整、软骨陷窝数量减少、骨髓腔内脂肪细胞明显减少、水肿及骨内压明显减轻。**结论:**活骨灌注液不同给药途径均能够对 SONFH 的病理变化起到治疗作用,活骨灌注液耳缘静脉给药方法对兔 SONFH 的治疗作用效果显著。

**[关键词]** 活骨灌注液;激素性股骨头坏死;补肾活血法;给药途径

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)10-0010-04

## Effects of Different Routes of Administration on the Expression of Steroid-induced Osteonecrosis of the Femoral Head-associated Inflammatory Factors by Huogu Perfusion Fluid

XU Xilin<sup>1</sup> ZHAO Jun<sup>1</sup> YANG Fubiao<sup>1</sup> YU Changsui<sup>1</sup>  
ZHANG Xiaofeng<sup>1△</sup> SHEN Yiwei<sup>1</sup> LYU Hang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150001, China.

**Abstract Objective:** To observe the therapeutic effect of four different administration routes of living bone perfusion solution on steroid-induced necrosis of femoral head (SONFH) in rabbits, and to provide a new therapeutic scheme for clinical treatment of femoral necrosis. **Methods:** Male New Zealand white rabbits were randomly divided into two groups: blank group ( $n=15$ ) and model group ( $n=60$ ). The rabbits in the model group were randomly divided into 5 groups: auricular vein group (E), gastric perfusion group (W), external application group (F) and model group (M) with 15 animals each. The model of steroid-induced osteonecrosis of femoral head was established by Matsui, and the treatment began 4 weeks after the last intraperitoneal injection of methylprednisolone succinate sodium. The blank group (K) was raised normally and no drug treatment was given. The auricular vein was given live bone perfusion solution 10 mg/kg, twice a week, gastric perfusion group was given live bone perfusion fluid 7.8 mg/kg, once a day. The external application group was given transdermal patch on the upper and medial side of the upper hindlimb, Every 7.5 g/post, once every 3 d. After 12 weeks of treatment, the pathological and imaging changes of femoral head were observed by HE staining and electron microscope.

The levels of serum IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 were detected by ELISA. **Results:** The contents of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, in the model group were significantly higher than those in the normal group ( $P < 0.01$ ), and those in the model group were signifi-

基金项目:哈尔滨市科学技术局创新人才项目(2017RAXXJ047)

<sup>1</sup> 黑龙江中医药大学附属第二医院(哈尔滨,150001)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail: hlj542833@sina.com

cantly higher than those in the normal group ( $P < 0.01$ ). HE staining observation showed that in the model group, perichondrium of femoral head was lost, adipocytes in bone marrow cavity increased significantly, intra-articular edema and intra-osseous pressure increased. The pathological changes of femoral head could be changed by different administration routes of Huogu perfusion solution, including cartilage layer hyperplasia, regular trabecular structure, reduction of cartilage lacunae, decrease of adipocytes in bone marrow cavity, and decrease of edema and intraosseous pressure. **Conclusion:** The results showed that different routes of administration of bone-activating perfusate could treat the pathological changes of SONFH, and the therapeutic effect of auricular vein administration of bone-activating perfusate on SONFH in rabbits was significant.

**Keywords:** Huogu perfusion solution; steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; tonifying kidney and activating blood circulation method; administration route

激素性股骨头坏死(SONFH)是一种常见的骨科疾病,具有高度致残性特点。若未及时干预治疗,近80%的患者进展为股骨头塌陷,出现永久性残疾<sup>[1]</sup>,因此保留髋关节功能至关重要。研究显示 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 与 SONFH 密切相关<sup>[2]</sup>。活骨灌注液是以“补肾活血”为原则的有效方剂,前期研究<sup>[3]</sup>表明活骨灌注液关节腔内灌注给药能有效改善 ONFH。但口服及静脉输液等给药是否有效? 本实验通过口服等不同给药途径对 SONFH 以及对相关炎症因子的影响进行研究。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

选用健康新西兰大白兔 6 个月龄 75 只,雄性,体重(3.0  $\pm$  0.2)kg(实验动物由哈尔滨医科大学动物实验中心提供),许可证号 SCXK(黑)2014002,实验动物均单笼饲养,普通喂养。

### 1.2 药物与试剂

活骨灌注液(内含生药丹参 3 g, 川芎 2 g, 骨碎补 2 g, 哈尔滨医科大学附属第二医院制剂室),活骨灌注液外敷贴剂(黑龙江中医药大学中药教研室制备),马血清(Hyclone 公司),注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(天津金耀药业有限公司, H20103047),注射用青霉素(哈药集团制药总厂),兔抗多克隆一抗、二抗 PV6001(北京中山), DAB 显色剂,兔 IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒(ml027836),兔 IL-6 ELISA 试剂盒(ml027844),兔 IL-8 ELISA 试剂盒(ml027376)。

### 1.3 实验仪器

可见分光光度计,水浴锅,可调式移液枪,1 mL 玻璃比色皿,莱卡 2135 型切片机, Moticam 3000 显微摄影成像系统,一恒电热恒温箱医用微波炉,扫描电镜(S3400N),DNM-9602 型酶标仪, DNX-96 型洗板机, TGL-16G 台式离心机。

### 1.4 方法

**1.4.1 动物分组及造模** 雄性新西兰大白兔随机分为两组,即空白组(15 只)、造模组(60 只)。造模组行兔股骨头坏死动物造模后再随机分为 4 组:耳缘静脉

组(E)、灌胃组(W)、外敷组(F)、模型组(M)各 15 只。首先适应喂养 2 周,再精准称重,采用 Matsui<sup>[4]</sup>造模法,所有清洁级的实验动物均选用马血清 8 mL/kg 经耳缘静脉注射,第 1 次注射完毕之后间隔 2 周,予以马血清第 2 次耳缘静脉注射。第 2 次的给药剂量 4 mL/kg,随后间隔 2 周,注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 45 mg/kg 的给药剂量,连续 3 d 腹腔注射。激素造模期间,所有实验动物给予青霉素 16  $\times$  10<sup>4</sup> U 预防感染,2 次/d,臀肌注射。造模过程中未出现动物死亡。

**1.4.2 药物干预** 活骨灌注液给药剂量的计算:灌胃组和耳缘静脉组的给药剂量按照成人每日给药剂量与家兔的体表面积公式折算得出。方案为随机分为 4 组:空白组、模型组正常饲养,不给予任何药物治疗。灌胃组给予活骨灌注液 7.8 mg/kg(溶于 10 mL 0.9%氯化钠溶液)灌胃,1 次/d,连续 12 周。耳缘静脉组给予活骨灌注液 10 mg/kg(溶于 2 mL 0.9%氯化钠溶液)耳缘静脉注射,1 周 2 次,连续 12 周。外敷组给予双后肢上部内侧外敷透皮贴剂,每 3 日 1 次,每次 7.5 g/贴。其中静脉给药过程中观察动物行为,和其他组别未见明显异常。

**1.4.3 动物取材** 以空气栓塞法处死后取出坏死股骨头,将兔子备皮后,使用碘伏进行消毒,铺盖无菌巾,在髋关节的后外侧部切开长约 3 cm 的切口,依次切开分离筋膜和肌肉等组织,直至暴露髋臼及股骨头,分离股骨头周围组织后将股骨头从髋臼处脱位,使用咬骨钳取出股骨头,即刻放入液氮中保存。

**1.4.4 ELISA 法检测** 兔子固定后,行心脏采血约 5 mL 于静脉采血管中,3 000 r/min 离心 10 min,收集血清,后按 1.4.3 节方法处死取材。对血清按相关试剂盒方法进行血清 IL-1 $\beta$ , IL-6 及 IL-8 的检测。

**1.4.5 苏木精-伊红染色** 4 周后正常组和模型组分别随机处死 3 只,取股骨头于 10%福尔马林固定 1 周后,脱钙处理后行常规石蜡包埋切片苏木精-伊红(HE)染色,进行组织病理学检查。骨组织经 10%ED-TA 脱钙后修块,按以下方法脱水、透明、浸蜡和包埋。流水冲洗 60 min,乙醇逐级脱水,二甲苯透明后包埋

以备切片,切片厚6 μm。

1.5 统计学方法

实验结果用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色

空白组:正常,软骨膜和静止区成软骨细胞(长梭形)多,软骨增生期细胞不是很发达,骨细胞及细胞核染色均匀。

模型组:软骨膜已脱失,软骨增生期里的软骨陷窝内大多数没有细胞;空骨陷窝形成明显,见骨小梁断裂破坏间距增大,排列紊乱,并可见肥大的脂肪细胞位于髓腔中,说明该造模方法成功。

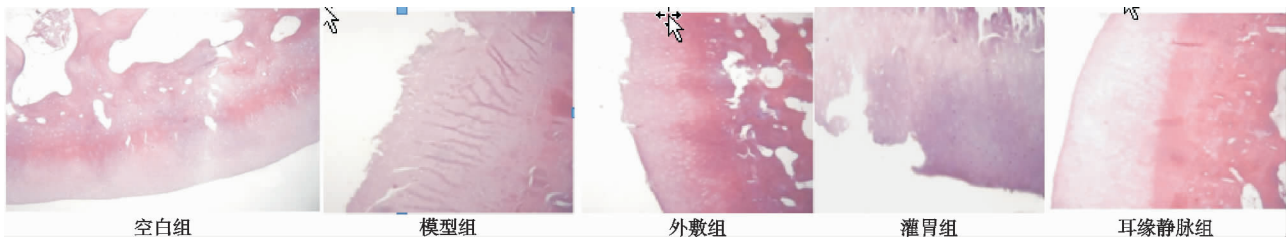


图1 光镜观察(100×)

2.2 ELISA 检测 SONFH 中 IL-1β,IL-6 及 IL-8

结果显示:模型组中的 IL-1β,IL-6 及 IL-8 含量测定相对空白组有上升趋势,与空白组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );其余不同给药途径中,耳缘静脉组中的 IL-1β,IL-6 及 IL-8 含量测定明显低于外敷组和灌胃组。其中,外敷组与模型组的 IL-1β,IL-6 及 IL-8

外敷组:软骨膜破坏,软骨增生期陷窝内有的细胞正常,有的不正常,空骨陷窝形成,同视野数目较多,见骨小梁稀疏部分断裂间距增大,排列较紊乱,髓腔中可见少量肥大的脂肪细胞。

灌胃组:软骨膜已脱落,未见静止软骨细胞,增生区软骨中都有软骨细胞,空骨陷窝形成但同视野数目相对减少,见骨小梁稀疏部分断裂间距增大但较外敷组好转,排列稍紊乱,髓腔中可见少量肥大的脂肪细胞。

耳缘静脉组:可见静止期软骨细胞,但静止区较薄,空骨陷窝形成但同视野数目相对减少,部分缺失,见骨小梁稍稀疏变细,排列稍紊乱,同视野中髓腔部分肥大的脂肪细胞缺失。

含量比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );灌胃组与模型组的 IL-1β,IL-6 及 IL-8 含量比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );耳缘静脉组与模型组的 IL-1β,IL-6 及 IL-8 含量比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );检测结果如表 1 所示。

表1 血清中细胞因子检测结果(̄x±s,n=8)

组别	IL-1β/(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-8/(pg·mL <sup>-1</sup> )
空白组	108.78±10.83	147.92±25.88	194.67±14.73
模型组	158.62±9.82 <sup>1)</sup>	197.03±24.08 <sup>1)</sup>	261.35±13.40 <sup>1)</sup>
外敷组	140.43±10.23 <sup>1)2)</sup>	163.00±20.99 <sup>2)</sup>	215.20±8.18 <sup>1)2)</sup>
灌胃组	136.56±10.48 <sup>1)2)</sup>	157.47±18.86 <sup>2)</sup>	215.20±6.92 <sup>1)2)</sup>
耳缘静脉组	128.59±6.48 <sup>1)2)</sup>	150.61±19.00 <sup>2)</sup>	213.77±9.44 <sup>1)2)</sup>

注:与空白组相比较,1) $P < 0.01$ ;与模型组相比较,2) $P < 0.01$ 。

3 讨论

ONFH 的发病机制尚不明确,认为长期大量应用糖皮质激素可以使骨髓中的脂肪细胞增大,引起骨内压增高和局部股骨头的缺血,最终可导致 SONFH 的发生和发展。

病理学结果显示:模型组股骨头软骨膜脱失,骨髓腔内脂肪细胞明显增多,关节腔内水肿,骨内压增高。活骨灌注液组方的不同给药途径均可以不同程度改变股骨头的病理变化,包括软骨层增生,骨小梁结构规整,软骨陷窝数量减少,骨髓腔内脂肪细胞明显减少,水肿及骨内压明显减轻,表明活骨灌注液不同给药途径均能够对 SONFH 的病理变化起到治疗作用,其中以活骨灌注液耳缘静脉给药改善作用最为显著。

SONFH 的发病机制中,炎性细胞因子分泌紊乱参与该病的发生与进展<sup>[6]</sup>。据报道 T 细胞或 B 细胞诱导的炎性细胞因子,可以调节破骨细胞和成骨细胞之间的平衡,并与股骨头发病机制相关<sup>[7]</sup>。研究发现 IL-1β,IL-6 及 IL-8 与 SONFH 的发病密切相关<sup>[2]</sup>。IL-1β 特点是诱导软骨细胞退变的常见炎症因子,可导致软骨退变和相关基因的表达和病理变化<sup>[8]</sup>。IL-6 是一种肌细胞因子,当人体肌肉在运动过程中,该因子从骨骼中释放出来,并参与运动过程代谢调节<sup>[9]</sup>。研究表明,当人体内被注入一定量的 IL-6 时,会增加全身胰岛素刺激葡萄糖的摄取和氧化,并激发机体对葡萄糖的生成和摄取<sup>[10]</sup>。同时还发现,当人体输入 IL-6 时能加速全身脂肪分解和脂肪氧化的过程<sup>[11]</sup>。

体外应用 IL-6 培养小鼠脂肪组织时,证明可以增加脂肪的分解<sup>[12]</sup>。此外 IL-6 可以增加激素敏感脂肪酶在人体脂肪组织中 mRNA 的含量,总之 IL-6 在诱导脂肪组织分解中起着重要作用。IL-8 最初被描述为一种趋化因子,即促炎因子,由单核-巨噬细胞及中性粒细胞分泌产生,能激活和趋化中性粒细胞、T 细胞,主要功能是具有吸引多形性白细胞的浸润作用<sup>[13]</sup>,而血管内皮生长因子是主导介质<sup>[14]</sup>。此外,在激素环境的刺激下,中性粒细胞对 IL-8 重复激活、释放,并可加快局部炎症反应。IL-1 $\beta$  通过激活白细胞介素-1 受体,继而触发细胞内信号转导通路。IL-1R1 在所有的细胞中都有表达,它能激活多个核转录因子移位<sup>[15]</sup>。因此,IL-1 $\beta$  能激活 JNK 蛋白激酶,其作用靶点是 MAPK 家族通路。本实验结果显示:模型组中的 IL-1 $\beta$ ,IL-6 及 IL-8 含量测定相对空白组有上升趋势,与空白组比较有明显差异;不同给药途径中,IL-1 $\beta$ ,IL-6 及 IL-8 含量均有不同程度的降低,与模型组相比较有明显差异,表明 IL-1 $\beta$ ,IL-6 及 IL-8 等炎症因子大量产生,通过炎症反应加速了 SONFH 发病和进展过程。活骨灌注液可以通过抑制或阻断炎症级联反应,改善 SONFH 病理进程,而其中以活骨灌注液耳缘静脉给药改善作用最为显著。

活骨灌注液的成分是由骨碎补、丹参、川芎等中药组合而成的复方制剂,具备活血祛瘀、壮肾健骨之效果。活骨灌注液选用耳缘静脉给药手段,特点是药物可以循环全身,并无口服药物的首过效应,有利于药物长时间发挥作用,符合缺血性股骨头坏死病程特点,更具有高效、直接的作用。本实验证实了活骨灌注液耳缘静脉给药的优越性,虽本实验未见动物不良反应,但局限于样本量较小,需要大样本量的实验研究。另外由于复方中药制剂成分复杂,临床实际静脉给药时副作用较大,虽暂不能为相关临床运用提供指导,但结合临床疗效的观察<sup>[16]</sup>,可为后期进一步观察关节腔内灌注给药对于 SONFH 股骨头病变组织的相关炎症因子表达的影响提供相关实验基础。

## 参考文献

- [1] KURODA Y, MATSUDA S AND AKIYAMA H. Joint-preserving regenerative therapy for patients with early-stage osteonecrosis of the femoral head[J]. *Inflamm Regen*, 2016, 36: 4.
- [2] LI J K, CHENG L, ZHAO Y P, et al. ADAMTS-7 exhibits elevated expression in cartilage of osteonecrosis of femoral head and has a positive correlation with TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65[J]. *Mediators Inflamm*, 2015: 196702.
- [3] 刘泽霖,徐西林,张晓峰. 活骨注射液治疗股骨头缺血性坏死组织形态学实验研究[J]. *中医药学报*, 2013, 41(2): 30-32.

- [4] 张翔,董晓俊,吴泱,等. 早期激素性股骨头缺血性坏死动物模型的建立研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2018, 26(2): 67-71.
- [5] ZHAO D, WANG B, GUO L, et al. Will a vascularized greater trochanter graft preserve the necrotic femoral head? [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468 (5): 1316-1324.
- [6] SAMARA S, KOLLIA P, DAILIANA Z, et al. Predictive role of cytokine gene polymorphisms for the development of femoral head osteonecrosis[J]. *Dis Markers*, 2012, 33(4): 215-221.
- [7] CHEN B, LIU Y, CHENG L. IL-21 enhances the degradation of cartilage through the JAK-STAT signaling pathway during osteonecrosis of femoral head cartilage[J]. *Inflammation*, 2018, 41 (2): 595-605.
- [8] TANG W, LU Y, TIAN Q Y, et al. The growth factor progranulin binds to tnfr receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice[J]. *Science*, 2011, 332 (6028): 478-484.
- [9] KNUDSEN J G, GUDIENSEN A, BERTHOLDT L, et al. Skeletal muscle IL-6 regulates muscle substrate utilization and adipose tissue metabolism during recovery from an acute bout of exercise [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (12): e0189301.
- [10] CAREY A L, STEINBERG G R, MACAULAY S L, et al. Interleukin-6 increases insulin stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase[J]. *Diabetes*, 2006, 55(10): 2688-2697.
- [11] WOLSK E, MYGIND H, GRONDAHL T S, et al. IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle[J]. *AJP-Endocrinology and Metabolism*, 2010, 299(5): 208-216.
- [12] WAN Z, RITCHIE I, BEAUDOIN M S, et al. IL-6 indirectly modulates the induction of glyceroneogenic enzymes in adipose tissue during exercise[J]. *PloS One*, 2012, 7(7): e41719.
- [13] CARLOS ALFARO, MIGUEL F, SANMAMED, et al. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up[J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 60: 24-31.
- [14] MARTIN D, GALISTEO R, GUTKIND J S. CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NF- $\kappa$ B through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(10): 6038-6042.
- [15] PALOMO J, DIETRICH D, MARTIN P, et al. The interleukin (IL)-1 cytokine family-Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases[J]. *Cytokine*, 2015, 76(1): 25-37.
- [16] 张文进, 张晓峰, 孙志华, 等. 中西医结合治疗早期股骨头缺血性坏死的临床观察[J]. *中医药信息*, 2016, 33(2): 89-91.

(收稿日期: 2019-04-09)