

· 基础研究 ·

强骨饮对假体周围骨溶解模型大鼠骨密度的影响及其作用机制研究

孙龙泰¹, 姚华海¹, 王晓洛¹, 崔龙慷¹, 吴连国²

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005)

摘要 目的:探讨强骨饮对假体周围骨溶解模型大鼠骨密度的影响及其作用机制。**方法:**选取 30 只成年雄性 SD 大鼠, 随机分为空白组、模型组和强骨饮组, 每组 10 只。空白组不进行造模; 模型组和强骨饮组大鼠右侧股骨植入高密度聚乙烯颗粒和钛棒, 制备聚乙烯颗粒诱导的假体周围骨溶解模型。造模手术 3 d 后, 强骨饮组大鼠以制备好的强骨饮药液灌胃, 每周 3 次, 连续给药 11 周。空白组和模型组均不进行药物干预。造模后 12 周, 取大鼠静脉血用 ELISA 法测定血清抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (tartrate resistant acid phosphatase 5b, TRACP5b) 水平, 取右侧股骨进行骨密度检测, 并以 ELISA 法测定股骨组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 水平。**结果:**实验过程中各组大鼠日常行为无差别, 精神状况良好, 反应灵敏, 体质量逐渐增加。模型组和强骨饮组大鼠术后 1 周切口愈合。实验全过程中各组均无大鼠死亡。3 组大鼠血清 TRACP5b 水平比较, 差异有统计学意义 $[(1.83 \pm 0.42) \text{U} \cdot \text{L}^{-1}, (2.40 \pm 0.43) \text{U} \cdot \text{L}^{-1}, (1.90 \pm 0.28) \text{U} \cdot \text{L}^{-1}, F=9.323, P=0.002]$ 。模型组血清 TRACP5b 水平高于空白组和强骨饮组 ($P=0.001; P=0.002$)。3 组大鼠股骨骨密度比较, 差异有统计学意义 $[(0.162 \pm 0.009) \text{g} \cdot \text{cm}^{-2}, (0.119 \pm 0.010) \text{g} \cdot \text{cm}^{-2}, (0.140 \pm 0.007) \text{g} \cdot \text{cm}^{-2}, F=74.323, P=0.000]$ 。模型组股骨骨密度低于空白组和强骨饮组 ($P=0.000; P=0.000$)。3 组大鼠股骨组织中 TNF- α 水平比较, 差异有统计学意义 $[(70.21 \pm 8.83) \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}, (175.32 \pm 14.95) \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}, (129.73 \pm 12.86) \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}, F=160.242, P=0.000]$ 。模型组股骨组织 TNF- α 水平高于空白组和强骨饮组 ($P=0.000; P=0.000$)。**结论:**强骨饮可以增加假体周围骨溶解模型大鼠的骨密度, 其机制可能是通过减轻炎症反应, 抑制破骨细胞活性, 从而减少假体周围骨吸收。

关键词 关节成形术, 置换; 强骨饮; 骨质溶解; 假体失效; 骨密度; 大鼠, Sprague-Dawley; 动物实验

Effect of Qianggu Yin (强骨饮) on bone density of peri-prosthetic osteolysis rat models and its mechanism of action

SUN Longtai¹, YAO Huahai¹, WANG Xiaoluo¹, CUI Longkang¹, WU Lianguo²

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

2. The Second Affiliated Hospital of Zhengjiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the effects of Qianggu Yin (强骨饮, QGY) on bone density of peri-prosthetic osteolysis rat models and its mechanism of action. **Methods:** Thirty adult male SD rats were selected and randomly divided into blank group, model group and QGY group, 10 cases in each group. High density polyethylene (HDPE) particles and titanium rods were implanted into the right femurs of rats in model group and QGY group to build the peri-prosthetic osteolysis models induced by HDPE particles. At 3 days after the molding operation, the rats in QGY group were intragastric administrated with prepared QGY, 3 times a week for consecutive 11 weeks. No drug intervention were performed on rats in blank group and model group. At 12 weeks after the modeling, the venous blood were fetched out and the serum levels of tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRACP5b) were measured by using ELISA. The right femurs were taken from rats for detecting the bone densities, and the levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) in femoral tissues were measured by using ELISA.

Results: There were no difference in the daily actions of rats between the 3 groups during the course of experiment. The rats were in good mental states and rapid response and their body masses gradually increased. The incisions of rats in model group and QGY group were healed at 1 week after the surgery. No rats died in each group during the experiment. There was statistical difference in the serum levels of

基金项目: 浙江省一流学科(B类)建设项目; 浙江省科技厅公益技术应用研究计划项目(2016C33128); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(20133322120004)

通讯作者: 吴连国 E-mail: mdwu8535@126.com

TRACP5b between the 3 groups ($1.83 \pm 0.42, 2.40 \pm 0.43, 1.90 \pm 0.28$ U/L, $F = 9.323, P = 0.002$). The serum levels of TRACP5b were higher in model group compared to blank group and QGY group ($P = 0.001; P = 0.002$). There was statistical difference in the femoral bone density between the 3 groups ($0.162 \pm 0.009, 0.119 \pm 0.010, 0.140 \pm 0.007$ g/cm²), $F = 74.323, P = 0.000$. The femoral bone densities were lower in model group compared to blank group and QGY group ($P = 0.000; P = 0.000$). There was statistical difference in the TNF- α levels in femoral tissues between the 3 groups ($70.21 \pm 8.83, 175.32 \pm 14.95, 129.73 \pm 12.86$ pg/ml, $F = 160.242, P = 0.000$). The TNF- α levels in femoral tissues were higher in model group compared to blank group and QGY group ($P = 0.000; P = 0.000$). **Conclusion:** QGY can alleviate the inflammatory reaction and inhibit the cytoactive of osteoclasts and accordingly reduce peri-prosthetic bone resorption, which may be its mechanisms of action for increasing bone density of peri-prosthetic osteolysis rat models.

Key words arthroplasty, replacement; Qianggu Yin; osteolysis; prosthesis failure; bone density; rats, Sprague-Dawley; animal experimentation

假体周围骨溶解是导致人工关节置换术后假体无菌性松动的最主要原因^[1]。假体周围骨溶解是通过假体周围产生的磨损颗粒诱导炎症反应,促使破骨细胞分化成熟,从而导致假体周围骨量丢失,最后发生骨溶解^[2-3]。我们前期的临床研究表明,强骨饮能有效抑制骨吸收,减少骨量丢失^[4]。因此推测其可以增加假体周围骨密度,抑制假体周围骨质吸收,从而缓解假体周围骨溶解。为此,本研究探讨了强骨饮对假体周围骨溶解模型大鼠骨密度的影响及其作用机制,以期临床防治假体周围骨溶解提供新的思路。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 250~300 g,由浙江中医药大学动物实验中心提供,实验动物合格证号:SCXK(沪)2013-0016。实验方案通过医学动物实验伦理委员会审查通过。

1.2 药物与试剂 强骨饮药物组成及按照大鼠体表面积换算后的剂量分别为秦艽 230 mg·kg⁻¹、忍冬藤 210 mg·kg⁻¹、鹿角霜 210 mg·kg⁻¹、川芎 210 mg·kg⁻¹、黄芪 210 mg·kg⁻¹、骨碎补 210 mg·kg⁻¹、防风 210 mg·kg⁻¹、露蜂房 180 mg·kg⁻¹、肉桂 180 mg·kg⁻¹、鸡血藤 150 mg·kg⁻¹、杜仲 150 mg·kg⁻¹、川续断 150 mg·kg⁻¹。先提取肉桂挥发油备用,其余药物按传统方法煎煮(煎煮 2 次,第 1 次加 10 倍水煎煮 1.5 h,第 2 次加 8 倍水煎煮 1 h),提取药液加肉桂油后浓缩、乙醇沉淀,取液体后回收乙醇,再浓缩至每毫升含生药 2~3 g。10% 甲醛溶液(浙江衢州巨化试剂有限公司),青霉素(华北制药集团有限责任公司,国药准字 H13020657),10% 水合氯醛(北京生东科技有限公司),大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(tartrate resistant acid phosphatase 5b, TRACP5b)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

1.3 造模材料 高密度聚乙烯颗粒(SHAMROCK, 颗粒平均直径 4~6 μ m),室温称量后加入 95% 乙醇浸泡消毒,离心 10 min(离心半径 9 cm),去上清,超净台风干后溶于含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基,然后与 17.5% 已灭菌包装电泳凝胶混合、搅拌,称重后去皮,制成浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的高密度聚乙烯颗粒凝胶备用(高密度聚乙烯颗粒数量约 1.9×10^8 个·mL⁻¹)。直径 1.2 mm、长度 1.5 cm 的钛棒(Ti-6Al-4V 太空级,浙江科惠医疗器械公司)。

1.4 实验仪器 Osteocore 双能 X 线骨密度仪(Medilink);SW-CJ-1F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);TGL-168 离心机(上海安亭科学仪器厂);KS-250F 超声波细胞粉碎仪(海曙科生超声设备有限公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 将 30 只大鼠随机分为空白组、模型组和强骨饮组,每组 10 只。所有大鼠在同一条件下饲养,喂食普通颗粒饲料。空白组则不进行造模处理。模型组和强骨饮组大鼠按 0.03 mL·kg⁻¹ 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉。麻醉起效后,将大鼠固定在动物手术台上,剃毛、备皮,常规消毒后铺无菌单。经右侧髂窝旁内侧入路,依次切开皮肤、皮下组织、深筋膜和关节囊,逐层分离,显露膝关节,将髌骨进行前外侧脱位,屈曲膝关节,暴露股骨髁。以股骨髁间窝为进针点,平行股骨长轴,用低速电钻向股骨骨髓腔钻一骨隧道(直径 1.5 mm、深度 15 mm)。在骨隧道内植入制备好的高密度聚乙烯颗粒凝胶,每侧 100 μ L,再植入钛棒,然后以骨蜡封闭骨隧道。在关节腔注入高密度聚乙烯颗粒后逐层缝合切口^[5]。术后按 2000 单位·kg⁻¹ 肌肉注射青霉素,每天 1 次,连续 3 d。

2.2 药物干预 造模手术 3 d 后,强骨饮组大鼠按 15 mL·kg⁻¹ 以制备好的强骨饮药液灌胃,每周 3 次,

连续给药 11 周。空白组和模型组均不进行药物干预。

2.3 实验指标观察 造模后 12 周,麻醉下在大鼠下腔静脉取血,离心 10 min(离心半径 9 cm),取血清置于 -20 ℃ 冰箱冷藏备用,标本采集完后采用 ELISA 法检测大鼠血清中 TRACP5b 的水平。取血后用颈椎脱臼法处死大鼠,取右侧股骨,剃净周围软组织置于 -20 ℃ 冰箱冷藏备用。将股骨标本从冰箱中取出后,放置至与室温温度一致,用双能 X 线骨密度检测仪扫描整个股骨标本,记录下骨密度数据。骨密度测定完成后取部分股骨组织,液氮下研碎成粉,加入适量 PBS 后在超声波细胞粉碎仪中粉碎,离心 10 min(离心半径 9 cm)取上清测定蛋白浓度,5 倍稀释蛋白上清后采用 ELISA 法检测 TNF- α 水平。

2.4 数据统计分析 采用 SPSS17.0 软件进行数据统计分析。3 组大鼠血清 TRACP5b 水平、股骨骨密

度及股骨组织中 TNF- α 水平的组间总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

实验过程中各组大鼠日常行为无差别,精神状况良好,反应灵敏,体质量逐渐增加。模型组和强骨饮组大鼠术后 1 周切口愈合。实验全过程中各组均无大鼠死亡。

3 组大鼠血清 TRACP5b 水平比较,差异有统计学意义。模型组血清 TRACP5b 水平高于空白组和强骨饮组($P=0.001$; $P=0.002$)。3 组大鼠股骨骨密度比较,差异有统计学意义。模型组股骨骨密度低于空白组和强骨饮组($P=0.000$; $P=0.000$)。3 组大鼠股骨组织中 TNF- α 水平比较,差异有统计学意义。模型组股骨组织 TNF- α 水平高于空白组和强骨饮组($P=0.000$; $P=0.000$)。见表 1。

表 1 3 组大鼠血清抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 水平、股骨骨密度及股骨组织中肿瘤坏死因子- α 水平 $\bar{x} \pm s$

组别	样本量 (只)	血清抗酒石酸酸性 磷酸酶 5b 水平($U \cdot L^{-1}$)	股骨骨密度 ($g \cdot cm^{-2}$)	股骨组织中肿瘤坏死 因子- α 水平($pg \cdot mL^{-1}$)
空白组	10	1.83 ± 0.42	0.162 ± 0.009	70.21 ± 8.83
模型组	10	2.40 ± 0.43	0.119 ± 0.010	175.32 ± 14.95
强骨饮组	10	1.90 ± 0.28	0.140 ± 0.007	129.73 ± 12.86
F 值		9.323	74.323	160.242
P 值		0.002	0.000	0.000

4 讨论

假体周围骨溶解已经成为人工关节置换术后最不容忽视的问题之一^[6]。引起假体周围骨溶解的原因是假体周围的磨损颗粒,在假体产生磨损微粒的过程中,诱导了与骨吸收相关的生化介质分泌,这些生化介质通过多种途径使破骨细胞性骨吸收功能得到增强,引发假体周围骨质吸收,发生骨溶解,最终引起假体松动^[7-11]。本研究仅选择雄性大鼠进行研究,有 2 方面的原因:①选择单一性别大鼠可排除交配、发育等因素对实验结果的干扰;②雌性动物生理周期造成的体内激素变化比较大,容易影响实验结果。

对于假体周围骨溶解造成的假体松动,除通过手术对假体进行翻修以外,使用药物进行预防也很值得研究。临床和实验研究已证实,强骨饮具有补益气血、强筋健骨的功效,可以明显抑制破骨细胞活性^[12]。方中杜仲、鹿角霜、骨碎补、续断温补肾阳,活筋强骨;肉桂、川芎、黄芪、鸡血藤、忍冬藤益气活血通经,使气行血运,滋养筋骨;防风、蜂房、秦艽蠲痹强骨。

TNF- α 是一种强有力的骨吸收诱导剂,可使破骨细胞活性增强。炎症因子中的 TNF- α 通过刺激 RANKL 参与骨溶解,使其与破骨细胞表面的受体结合,促使破骨细胞活化、分化,从而破坏骨质^[13]。骨密度是反映骨质状况的一项重要指标,能直观反映骨矿物的丢失情况。TRACP5b 是一种公认的反映破骨细胞活性和骨吸收的良好标志物^[14-16],用 ELISA 法检测血液中 TRACP5b 的水平,可反应破骨细胞的活跃程度。本研究通过给大鼠右侧股骨植入高密度聚乙烯颗粒和钛棒制备聚乙烯诱导的假体周围骨溶解大鼠模型。与空白组相比,模型组大鼠股骨骨密度下降明显,血清 TRACP5b 水平显著上升,证实本研究建立的聚乙烯颗粒诱导假体周围骨溶解大鼠模型有效。与模型组相比,造模后 12 周时强骨饮组大鼠的股骨骨密度明显增高,血清 TRACP5b 水平和骨组织中 TNF- α 水平明显降低。这提示强骨饮可以减轻聚乙烯颗粒诱导的假体周围骨溶解模型大鼠的炎症反应、抑制破骨细胞活性、增加骨密度。

本研究的结果提示,强骨饮可以增加假体周围骨溶解模型大鼠的骨密度,其机制可能是通过减轻炎症反应,抑制破骨细胞活性,从而减少假体周围骨吸收。本研究观察时间较短,观察指标较少,也没有与其他药物进行比较,因此强骨饮对假体周围骨溶解模型大鼠骨密度的长期作用效果、其他可能的作用机制、安全性及与其他药物的疗效差异将是今后研究的方向。

5 参考文献

- [1] SANTAMBROGIO L. Biomaterials in Regenerative Medicine and the Immune System[M]. Berlin: Springer International Publishing, 2015: 225 - 256.
- [2] JIN S, PARK JY, HONG JM, et al. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on titanium particle-induced TNF- α release and in vivo osteolysis[J]. Exp Mol Med, 2011, 43(7): 411 - 418.
- [3] LIU XQ, QU XH, WU CL, et al. The effect of enoxacin on osteoclastogenesis and reduction of Titanium particle-induced osteolysis via suppression of JNK signaling pathway[J]. Biomaterials, 2014, 35(22): 5721 - 5730.
- [4] 吴连国, 刘康, 黄俊俊, 等. 强骨饮对股骨颈骨折患者人工股骨头置换术后假体周围骨密度的影响[J]. 中医正骨, 2014, 26(4): 15 - 18.
- [5] 吴连国, 叶健, 吴风晴. 右归饮对聚乙烯颗粒诱导破骨细胞性骨溶解的抑制作用[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(11): 1 - 4.
- [6] GALLO J, GOODMAN SB, KONTTINEN YT, et al. Osteolysis around total knee arthroplasty: A review of pathogenetic mechanisms[J]. Acta Biomater, 2013, 9(9): 8046 - 8058.
- [7] JIANG X, SATO T, YAO Z, et al. Local delivery of mutant CCL2 protein - reduced orthopaedic implant wear particle - induced osteolysis and inflammation in vivo[J]. J Orthop Res, 2016, 34(1): 58.
- [8] BURTON L, PAGET D, BINDER NB, et al. Orthopedic wear debris mediated inflammatory osteolysis is mediated in part by NALP3 inflammasome activation[J]. J Ortho Res, 2013, 31(1): 73 - 80.
- [9] BAKER PN, JAMESON SS, DEEHAN DJ, et al. Mid-term equivalent survival of medial and lateral unicompartmental knee replacement: an analysis of data from a National Joint Registry[J]. J Bone Joint Surg Br, 2012, 94(12): 1641 - 1648.
- [10] NICH C, GOODMAN SB. Role of macrophages in the biological reaction to wear debris from joint replacements[J]. J Long Term Eff Med Implants, 2014, 24(4): 259 - 265.
- [11] SUÑER S, BLADEN CL, GOWLAND N, et al. Investigation of wear and wear particles from a UHMWPE/multi-walled carbon nanotube nanocomposite for total joint replacements[J]. Wear, 2014, 317(1/2): 163 - 169.
- [12] 徐伟锋, 叶健, 吴连国. 强骨饮对骨质疏松性股骨颈骨折患者全髋关节置换术后血清骨代谢生化指标和骨密度的影响[J]. 中医正骨, 2015, 27(2): 12 - 16.
- [13] ANDO K, MORI K, RÉDINI F, et al. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology[J]. Curr Drug Discov Technol, 2008, 5(3): 263 - 268.
- [14] TAMAKI J, IKI M, KADOWAKI E, et al. Biochemical markers for bone turnover predict risk of vertebral fractures in postmenopausal women over 10 years: the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Cohort Study[J]. Osteoporos Int, 2013, 24(3): 887 - 897.
- [15] IWADATE H, KOBAYASHI H, KANNO T, et al. Plasma osteopontin is correlated with bone resorption markers in rheumatoid arthritis patients[J]. Int J Rheum Dis, 2014, 17(1): 50 - 56.
- [16] KRUMPEL M, REITHMEIER A, SENGE T, et al. The small chemical enzyme inhibitor 5-phenylnicotinic acid/CD13 inhibits cell migration and invasion of tartrate-resistant acid phosphatase/ACP5-overexpressing MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Exp Cell Res, 2015, 339(1): 154 - 162.
- [17] HUANG F, WU D, MA G, et al. The use of tranexamic acid to reduce blood loss and transfusion in major orthopedic surgery: a meta-analysis[J]. J Surg Res, 2014, 186(1): 318 - 327.
- [18] 程涛, 黄家骏. 中药内服治疗急性软组织损伤的研究进展[J]. 中医正骨, 2017, 29(1): 39 - 41.
- [19] 赵佳盛, 张耘. 桃红四物汤治疗兔早期筋膜间隔综合征的疗效观察及作用机制研究[J]. 中医正骨, 2015, 4(4): 1 - 7.

(2017-07-03 收稿 2017-08-11 修回)

(2017-08-03 收稿 2017-08-21 修回)

(上接第 14 页)

- [11] MCMANUS KT, VELCHIK MG, ALAVI A, et al. Non-invasive assessment of postoperative bleeding in TKA patients with Tc-99m RNCs[J]. Innucl Med, 1987, 28: 565 - 568.
- [12] 朱云森, 江敏, 李俊. 氨甲环酸对老年股骨转子间骨折髓内固定术围手术期隐性失血的影响[J]. 中医正骨, 2015, 6(6): 16 - 18.
- [13] 雷金来, 丛雨轩, 庄岩, 等. 术前应用氨甲环酸对股骨近端防旋髓内钉固定治疗股骨转子间骨折隐性失血的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2017, 19(2): 103 - 108.

- [14] HUANG F, WU D, MA G, et al. The use of tranexamic acid to reduce blood loss and transfusion in major orthopedic surgery: a meta-analysis[J]. J Surg Res, 2014, 186(1): 318 - 327.
- [15] 程涛, 黄家骏. 中药内服治疗急性软组织损伤的研究进展[J]. 中医正骨, 2017, 29(1): 39 - 41.
- [16] 赵佳盛, 张耘. 桃红四物汤治疗兔早期筋膜间隔综合征的疗效观察及作用机制研究[J]. 中医正骨, 2015, 4(4): 1 - 7.