

· 基础研究 ·

右归饮防治人工关节假体周围骨溶解的实验研究

蔡运火¹, 赵鹏¹, 毛强¹, 鲍航行¹, 王金法¹, 胡森锋¹, 肖鲁伟¹, 童培建²

(1.浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2.浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

【摘要】 目的:观察右归饮和鲑鱼降钙素防治人工关节假体周围骨溶解的效果。方法:将 8 周龄大的 32 只 SD 雄性大鼠, 体重(250±20) g, 随机分为 4 组:空白对照组、模型组、鲑鱼降钙素组和右归饮组, 每组 8 只。空白对照组不做处理, 另 24 只大鼠水合氯醛麻醉后, 经髌旁内侧面入路行双膝关节手术暴露, 从股骨髁间窝钻孔至股骨髓腔, 将包含高密度聚乙烯颗粒的凝胶注入孔中, 然后放入钛钉, 用骨蜡封闭窗口后逐层缝合。造模完成后, 空白对照组和模型对照组均用生理盐水灌胃, 右归饮组灌服右归饮汤剂, 降钙素组则采用臀大肌注射鲑鱼降钙素。给药 10 周后处死大鼠, 取大鼠动脉血和双侧股骨组织进行血生化、影像形态学、组织病理学和分子基因生物学检测。结果:右归饮组和降钙素组破骨细胞激活的关键基因表达均受抑制。右归饮组 OPG、Ca、ALP 血清水平显著高于降钙素组($P<0.01$); 右归饮组血清 RANKL 含量显著低于降钙素组($P<0.01$); 两组 RANK、Trap5b、P 水平差异无统计学意义。结论:右归饮和降钙素均有延缓和治疗人工关节假体周围骨吸收的功效, 且右归饮比鲑鱼降钙素更能促进成骨形成。右归饮促进成骨, 抑制破骨的功效为人工关节假体周围骨溶解提供了一个新的治疗手段。

【关键词】 关节; 假体; 降钙素; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2012.12.010

Experimental study on *Yougui* recipe (右归饮) in preventing osteolysis surrounding artificial prosthesis CAI Yun-huo, ZHAO Peng, MAO Qiang, BAO Hang-xing, WANG Jin-fa, HU Miao-feng, XIAO Lu-wei, TONG Pei-jian*. *Zhejiang Province Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To explore effects of *Yougui* recipe (右归饮) and salmon calcitonin acetate in preventing osteolysis surrounding artificial prosthesis. **Methods:** Thirty-two SD male rats with weighted (250±20) g, aged 8 weeks, were randomly divided into four groups: blank group, model group, salmon calcitonin acetate group and *Yougui* recipe (右归饮) group, and 8 rats in each group. Blank group did not undergo any process, other 24 rats underwent anesthesia by chloral hydrate, their knee joints were exposed through medial patellar side, drilling from femoral condyle nest to marrow cavity, high density of polyethylene particles were injected into hole, titanium nail were put into, bone wax closed the window, then suturing step by step. After the molding, saline were used to gavaged in blank group and model group, *Yougui* recipe (右归饮) for *Yougui* recipe (右归饮) group, salmon calcitonin maximus injection for calcitonin group. After 10 weeks' mediation, rats were executed, and arterial blood and bilateral femoral organization were collected to biochemical, imaging morphology, tissue pathology and molecular biology detection. **Results:** The key gene expression of activating osteoclast were inhibited in *Yougui* recipe (右归饮) group and calcitonin group. The level of OPG, Ca, ALP in *Yougui* recipe (右归饮) group were higher than calcitonin group ($P<0.01$); the content of RANKL were lower ($P<0.01$). There were no significance meaning in RANK, Trap5b, P between two groups. **Conclusion:** Both of *Yougui* recipe (右归饮) and calcitonin can slow and treat surrounding osteolysis of artificial joint prosthesis, and *Yougui* recipe (右归饮) has better effect in promoting bone formation. The effect of *Yougui* recipe (右归饮) in promoting bone formation, inhibiting osteoclasts to provide a new method to treating surrounding osteolysis of artificial joint prosthesis.

KEYWORDS Joints; Prostheses and implants; Calcitonin; Rats

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(12): 1010-1015 www.zggszz.com

随着人口老龄化加快, 膝骨性关节炎、老年骨质疏松性髌部骨折越来越多, 其致残率、致死率较高, 对此类老年患者, 现在多采取内固定或人工关节假

体置换术。而人工假体置换术后的假体周围骨吸收是目前骨科临床非常棘手的问题之一, 大部分患者必须接受翻修手术, 老年患者更是平添二次手术风险, 加上老年人骨量大量丢失, 使得翻修难度加大^[1]。笔者前期研究发现右归饮有较强地抑制骨吸收, 减少骨量的丢失作用^[2], 常用于骨质疏松症治

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30873276)

Fund Program: Natural Science Foundation of China (No. 30873276)

通讯作者: 童培健 E-mail: tongpeijian@163.com

疗,但有关右归饮防治此类患者关节置换术后假体松动的报道较少。如何在治疗原发病的同时,防止假体的无菌性松动发生,是值得探索的课题。而降钙素作为钙磷代谢的重要调控激素之一,是强有力的破骨细胞抑制剂,可直接、快速且广泛地抑制骨吸收,为此笔者就右归饮与鲑鱼降钙素进行对比研究。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组 雄性 8 周龄 SD 大鼠 32 只,体重 (250±20)g,购于浙江中医药大学实验动物中心。随机分为 4 组:A 组为空白对照组,B 组为模型对照组,C 组为鲑鱼降钙素组,D 组为右归饮组,每组 8 只。

1.2 实验试剂 反转录试剂盒 (TAKARA, DRR-037);定量试剂盒 (TAKARA, DRR041);荧光定量实时 PCR 仪 (Bio Rad 公司,美国)。Trizol (美国 Invitrogen 公司);DEPC (美国 Amresco 分公司);氯仿、异丙醇、75%乙醇 (DEPC 水配制)(购于上海生工);倒置相差显微镜 (Nikon 公司,日本);DNA 引物合成,上海博亚生物工程有限公司。台式自动平衡离心机 (北京医用离心机厂);大鼠骨保护素 (OPG)ELISA 检测试剂盒 (CK-E30510R),大鼠细胞核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL)ELISA 检测试剂盒 (CK-E30391R),大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (TRACP-5b)ELISA 检测试剂盒 (CK-E30288R),大鼠核因子 κ B 受体活化因子 (RANK)ELISA 检测试剂盒 (CK-E90999R),意大利 Giotto 乳腺钼靶机,鲑鱼降钙素 (诺华制药)。

1.3 右归饮制备 《景岳全书》原方组成:熟地 30 g,炒山药 6 g,山茱萸 3 g,枸杞 6 g,姜杜仲 6 g,制附子 6 g,肉桂 4.5 g,炙甘草 4.5 g。肉桂先提取挥发油,余药按传统方法煎煮 (第 1 次加 10 倍水煮 1.5 h,第 2 次加 8 倍水煮 1 h),提取液加肉桂油后浓缩、乙醇沉淀,取液体后回收乙醇,再浓缩至每毫升含生药 2.63 g,由浙江省中医院中药制剂室制剂。

1.4 高密度聚乙烯颗粒 (HDPE) 直径为 (4.73±2.11) mm HDPE,经 95%乙醇清洗消毒后,溶于 2% 大鼠血清,然后与 17.5%已灭菌的凝胶混合,终浓度为 10 mg/ml 聚乙烯颗粒。在该凝胶中聚乙烯颗粒数量大约为 1.9×10^8 /ml。

1.5 假体周围骨溶解大鼠模型的造模 空白对照组 8 只大鼠不做处理,另 24 只大鼠水合氯醛麻醉,剂量为 0.3 ml/100 g,经髌旁内侧入路进行双膝关节手术暴露,从股骨髁间窝钻孔至股骨髓腔,直径约 1.5 mm,深度约 1.5 cm。将含高密度聚乙烯颗粒的凝胶注入孔中,剂量为 100 μ l/只,然后放入钛钉 (直径 1.2 mm、长 1.5 cm),用骨蜡封闭窗口后逐层缝合,术

后 3 d 常规使用青霉素预防感染。按 100 g 大鼠 2 万单位剂量臀大肌注射,无一例感染发生。

1.6 干预措施 术后抗生素使用 3 d 之后,开始给药。右归饮治疗组,大鼠灌胃给药,剂量均按人日用临床剂量,经人——大鼠体表面积比值折算成相当于人临床剂量 22.5 倍量给药,以每 100 g 大鼠灌胃 2 ml 计算给药量;降钙素组给鲑鱼降钙素 16 U/kg,臀大肌肌肉注射;空白组和模型组大鼠按每 2 ml/100 g 生理盐水灌胃,均为隔日 1 次,共 10 周。

1.7 观察项目与方法

1.7.1 生化指标检测 治疗 10 周后,经水合氯醛麻醉,打开腹腔,找到腹主动脉,用无菌注射器取血 5~10 ml,注入干燥试管中,将血液于低温条件 (4 $^{\circ}$ C)下放置 4 h 后,离心 (3 000 r/min) 15 min 后取上层血清,均采用酶联免疫法 (ELISA 法)检测 TRACP-5b、Ca、P、ALP、OPG、RANKL、RANK 水平。

1.7.2 钼靶 X 线摄片 治疗 10 周后,经水合氯醛麻醉,将大鼠的右侧股骨全段取出,将股骨软组织全部剃净,将所有大鼠的右侧股骨放在一张无铅白纸硬板,并做好标记,行正位摄片。

1.7.3 组织病理学检测 治疗 10 周后将所有动物处死,取出股骨全段,10%中性甲醛溶液固定 48 h,流水冲洗 24 h,然后经 EDTA 脱钙液脱钙,直至大头针能刺进骨头里面;脱钙完成后,流水冲洗 24 h,接着就是系列乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋、沿股骨正中冠状面作 5 μ m 薄片、烘片,然后行 HE 染色,树胶封片,最后于光镜下观察骨细胞、软骨细胞、骨小梁以及髓腔的其他结构。

1.7.4 ATP6i、IL-1、IL-6 基因检测 ①采用 Real-time PCR 法检测:大鼠股骨破骨细胞 ATP6i 基因表达,炎性刺激因子 IL-1、IL-6 基因表达及 B-ACTIN 见表 1。②操作步骤。a. RNA 提取操作步骤:取出大鼠左侧股骨标本,液氮研磨,加入预冷 TRIzol 试剂 300 μ l 混匀,室温放置 5 min;加入氯仿 0.2 ml,用力振摇,室温放置 2~3 min;最大转速 12 000 g 离心 15 min,吸取上层水相,移置另一离心管;加入 0.5 ml 异丙醇,将管中液体轻轻混匀,室温静置 10 min;4 $^{\circ}$ C 最大转速 12 000 g 离心 10 min,弃上清;加入 75%乙醇 1 ml,充分洗涤沉淀后于 4 $^{\circ}$ C、10 000 g 离心 5 min,弃上清,室温干燥;加入 20 μ l 的 DEPC 水溶解。b. cDNA 合成操作步骤:可参考 TAKARA RT 试剂盒。短暂离心后,加入如下组分:5 \times 第一链反应缓冲液 2 μ l、Oligo dT 引物 0.5 μ l、逆转录酶 0.5 μ l,总 RNA 2 μ l,采用 DEPC 水补齐到 10 μ l;轻轻混匀后,混合物在 37 $^{\circ}$ C 中放置 20 min;85 $^{\circ}$ C 加热 15 s 终止反应,至冰上进行后续试验或冷冻保存。c. PCR 反应步

骤;PCR 反应体系见表 2,PCR 反应条件为 94 ℃ 5 min,再将反应条件变为 94 ℃ 15 s,60 ℃ 50 s,循环扩增 40 次。60 ℃检测荧光值。

表 1 实时定量 PCR 引物列表

Tab.1 Real-time quantitative PCR primer list

编号	基因	引物序列(5'→3')	产物(bp)	Tm 值
1	ATP6i	cgagtgaggaaggagtgagtg aagaggaaggggaatgtgatg	181	60
2	IL-1	ctgtgactctgtgggatgatg gggatitgtcgtgtgtgt	210	60
3	IL-6	ataccaccacaacagaccag gaactccagaagaccagagca	248	60
4	B-ACTIN	caccgcgagtagacaaccttc cccataccaccatcacacc	207	60

表 2 PCR 反应体系

Tab.2 Polymerase chain reaction (PCR) system

PCR 成分	2×SYBR	上下游引物 各(10μM)	cDNA 模板	ddH2O 补充体 积至
体积(μl)	12.5	0.5	2	25

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本的两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐性采用 LSD 法,方差不齐采用 Dunnett's T3,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生化指标检测结果 见表 3-4。模型组、降钙素组和右归饮组大鼠血清 OPG 水平明显低于与空白组($P < 0.01$);降钙素组与右归饮组大鼠血清 OPG 水平明显高于模型组($P < 0.01$);降钙素组大鼠血清 OPG 水平低于右归饮组($P < 0.05$)。模型组、降钙素组和右归饮组大鼠血清 RANKL 水平均明显高于空白组($P < 0.01$);降钙素组与右归饮组大鼠血清 RANKL 水平明显低于模型组($P < 0.01$);降钙素组大鼠血清 RANKL 水平高于右归饮组($P < 0.01$)。模型组、降钙素组和右归饮组大鼠血清 RANK 水平显著高于空白组($P < 0.01$);右归饮组和降钙素组大鼠血清 RANK 水平低于模型组($P < 0.01$);降钙素组与右归

饮组血清 RANK 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。大鼠血清 TRACP-5b 水平,模型组、降钙素组和右归饮组均显著高于空白组($P < 0.01$);降钙素组和右归饮组明显低于模型组($P < 0.01$);右归饮组与降钙素组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。大鼠血清 Ca 水平,模型组、降钙素组和右归饮组均显著低于空白组($P < 0.01$);降钙素组和右归饮组均高于模型组($P < 0.01$);右归饮组高于降钙素组($P < 0.01$)。大鼠血清 P 水平,模型组、降钙素组和右归饮组均低于空白组($P < 0.05$);降钙素组和右归饮组均高于模型组($P < 0.01$);右归饮组与降钙素组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。大鼠血清 ALP 的水平,模型组、降钙素组和右归饮组均显著低于空白组($P < 0.01$);降钙素组和右归饮组均高于模型组($P < 0.05$);右归饮组高于降钙素组($P < 0.05$)。

表 3 4 组大鼠血清 OPG、RANKL、RANK 含量比较

($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Tab.3 Comparison of content of OPG, RANKL, RANK among four groups($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	动物数	OPG	RANKL	RANK
空白组	8	622.38±24.26*	18.633±0.611*	29.980±1.440*
模型组	8	374.13±21.25	26.895±0.707	46.113±0.655
降钙素组	8	442.61±4.96* ^{#△△}	21.763±0.721* ^{#△}	39.179±1.834* [#]
右归饮组	8	463.00±19.99* [#]	18.970±0.750* [#]	38.755±2.723* [#]

注:与模型组相比,* $P < 0.01$;与空白组相比,[#] $P < 0.01$;与右归饮组相比,[△] $P < 0.01$,^{△△} $P < 0.05$

Note:Compared with model group,* $P < 0.01$;compared with blank group,[#] $P < 0.01$;compared with Yougui recipe(右归饮) group,[△] $P < 0.01$,^{△△} $P < 0.05$

2.2 钼靶 X 线片结果 从钼靶 X 线片上可以得出,空白对照组股骨钼靶摄片示正常骨 X 线表现,无骨质破坏,骨皮质完整,骨量分布均匀(图 1)。模型组钼靶摄片可见假体周围有衬性 X 线透光区,为骨溶解征象,表示假体周围有大量的骨流失(图 2)。鲑鱼降钙素组股骨钼靶摄片,相对模型组透光区明显减弱,骨溶解明显减少,且假体周围有骨痂生长(图 3)。右归饮组股骨钼靶摄片 X 线表现,相对于模型组,假体周围钻孔区域有大量的骨痂生长,且有骨

表 4 4 组大鼠血清 Trap5b、Ca、P、ALP 含量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Comparison of content of Trap5b, Ca, P, ALP among four groups($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	Trap5b(U/L)	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)	ALP(IU/L)
空白组	8	3.66±0.102*	2.71±0.157*	3.04±0.468*	278.87±74.45*
模型组	8	4.28±0.171	2.10±0.117	2.17±0.109	96.77±16.43
降钙素组	8	3.86±0.104* [#]	2.33±0.020* ^{#△}	2.42±0.032* [#]	141.20±10.56* ^{#△△}
右归饮组	8	3.85±0.040* [#]	2.48±0.020* [#]	2.54±0.050* [#]	168.67±6.42* [#]

注:与模型组相比,* $P < 0.01$,** $P < 0.05$;与空白组相比,[#] $P < 0.01$;与右归饮组相比,[△] $P < 0.01$,^{△△} $P < 0.05$

Note:Compared with model group,* $P < 0.01$,** $P < 0.05$;compared with blank group,[#] $P < 0.01$;compared with Yougui recipe(右归饮) group,[△] $P < 0.01$,^{△△} $P < 0.05$



图 1 空白组股骨钼靶摄片,正常骨 X 线表现,无骨质破坏 图 2 模型组钼靶摄片,可见假体周围有衬性 X 线透光区,为骨溶解征象 图 3 降钙素组股骨钼靶摄片,相对模型组透光区明显减弱,骨溶解明显减少,且假体周围有骨痂生长 图 4 右归饮组股骨钼靶摄片 X 线表现,相对于模型组,假体周围钻孔区域有大量的骨痂生长,周围吸收明显改善

Fig.1 Femoral mammography radiography of blank group,normal bone X-ray performance,no bone destruction Fig.2 Mammography radiography of model group showed lining X-ray photic zone around prosthesis,stands for osteolysis Fig.3 Mammography radiography of calcitonin group showed photic zone were weakened than model group,osteolysis significantly reduced,callus growth around prosthesis Fig.4 Mammography radiography of Yougui recipe(右归饮) group showed a large number of callus growth around prosthesis,and absorption obviously improved

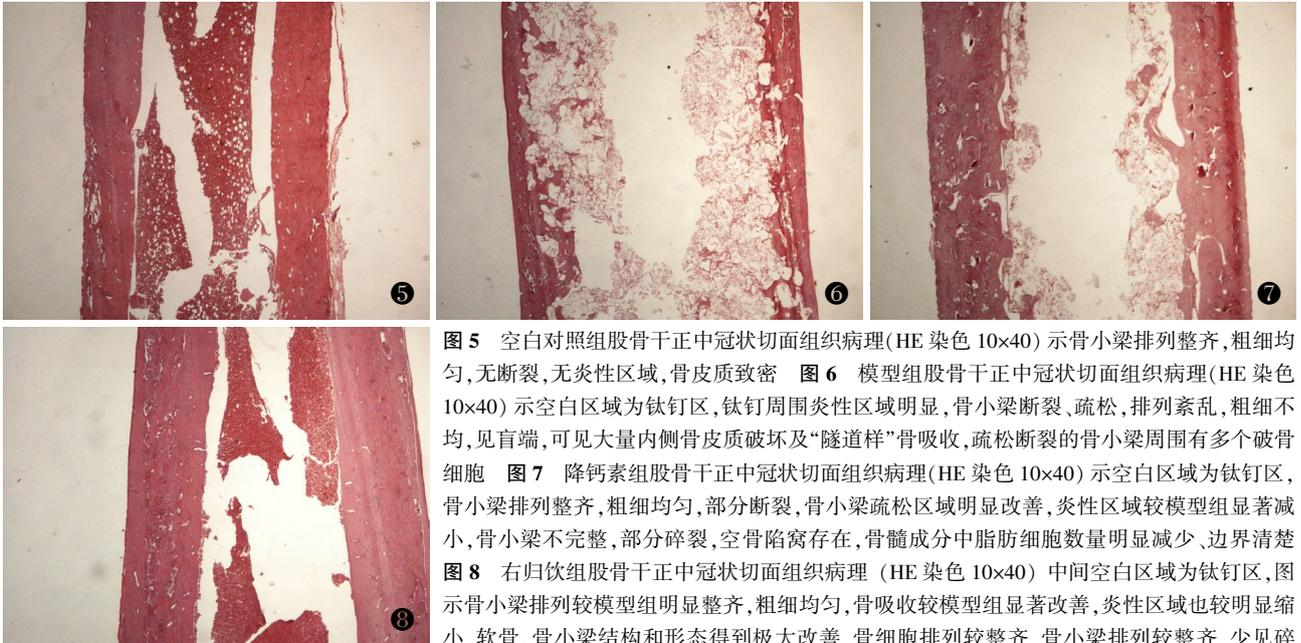


图 5 空白对照组股骨干正中冠状切面组织病理(HE 染色 10×40)示骨小梁排列整齐,粗细均匀,无断裂,无炎性区域,骨皮质致密 图 6 模型组股骨干正中冠状切面组织病理(HE 染色 10×40)示空白区域为钛钉区,钛钉周围炎性区域明显,骨小梁断裂、疏松,排列紊乱,粗细不均,见盲端,可见大量内侧骨皮质破坏及“隧道样”骨吸收,疏松断裂的骨小梁周围有多个破骨细胞 图 7 降钙素组股骨干正中冠状切面组织病理(HE 染色 10×40)示空白区域为钛钉区,骨小梁排列整齐,粗细均匀,部分断裂,骨小梁疏松区域明显改善,炎性区域较模型组显著减小,骨小梁不完整,部分碎裂,空骨陷窝存在,骨髓成分中脂肪细胞数量明显减少、边界清楚 图 8 右归饮组股骨干正中冠状切面组织病理(HE 染色 10×40)中间空白区域为钛钉区,图示骨小梁排列较模型组明显整齐,粗细均匀,骨吸收较模型组显著改善,炎性区域也较明显缩小,软骨、骨小梁结构和形态得到极大改善,骨细胞排列较整齐,骨小梁排列较整齐,少见碎裂,部分骨小梁内骨细胞数减少,有空虚骨陷窝,但较模型组少,髓腔内造血细胞丰富

Fig.5 Femoral median coronary tissue pathology in blank group (HE 10×40)showed aligned bone trabeculae,even thickness,no fault,no inflammatory area,bone cortex density Fig.6 Femoral median coronary tissue pathology in model group (HE 10×40)showed blank areas were titanium and surrounding by inflammatory area,bone trabecular fractured and loosen,osteoporosis,arranging disorderly,uneven thickness,blind and medial cortical were seen and destoried,bone absoption,osteoclast surrounding bone trabeculae Fig.7 Femoral median coronary tissue pathology in calcitonin group (HE 10×40)showed blank areas were titanium,aligned bone trabeculae,even thickness,partial fracture,and loosen of bone trabeculae improved obviously,inflammatory area was smaller than model group,uncomplete bone trabeculae,partial fracture,empty bone lacuna existed,the number of adi [ocyte of bone marrow decreased,.boundary clear Fig.8 Femoral median coronary tissue pathology in Yougui recipe(右归饮) group (HE 10×40)showed blank areas were titanium,aligned bone trabeculae,even thickness,bone absoption improved obviously,inflammatory area decreased significantly,the structure and formation of cartilage,bone trabeculae improved greatly,aligned bone cell and bone trabeculae,less fracture,and partial bone cell of bone trabeculae decreased,empty bone lacuna existed but less than model group,hematopoietic cell riched

痂跨过钛钉生长,钛钉周围吸收明显改善(图 4)。降钙素组与右归饮组没有明显差异。

2.3 组织病理学结果 空白对照组(图 5)软骨表面光滑,各层细胞排列整齐,软骨基质均匀,骨小梁完整,排列规则,骨小梁中的骨细胞清晰可见,无骨

小梁稀疏变窄,无断裂或云片状改变,骨细胞正常,空骨陷窝少见。模型组(图 6)软骨部分脱落或成台阶样改变,软骨层变薄,软骨细胞排列紊乱,软骨基质不均匀,骨小梁稀疏变细、变窄、结构紊乱、碎裂严重,骨细胞陷窝空疏,微骨折,骨细胞核固缩,或见纤

表 5 3 组大鼠 ATP6i、IL-1、IL-6 基因相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)
Tab.5 Expression of ATP6i, IL-1, IL-6 among three groups($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	ATP6i 相对表达量	IL-1 相对表达量	IL-6 相对表达量
模型组	8	4.247 0±0.992 2	6.986 5±1.604 0	6.553 2±1.693 1
降钙素组	8	1.962 3±0.141 3**	3.246 5±0.201 2**	2.430 8±0.415 7**
右归饮组	8	1.265 2±0.091 6*	2.301 9±0.182 8*	1.361 0±0.186 5*

注:与模型组相比,* $P<0.01$;与右归饮组相比,# $P<0.05$ 。

Note: Compared with model group, * $P<0.01$; compared with *Yougui* recipe(右归饮) group, # $P<0.05$

维组织覆盖于骨质上。空虚骨陷窝增多。鲑鱼降钙素组(图 7)软骨、骨小梁的结构和形态得到部分改善,骨小梁不完整,部分碎裂,空骨陷窝存在,骨髓成分中脂肪细胞数量减少、边界清楚。右归饮组(图 8)软骨、骨小梁结构和形态得到很大改善,软骨细胞排列较整齐,骨小梁排列较整齐,少见碎裂,部分骨小梁内骨细胞数减少。有空虚骨陷窝,但较模型组少,髓腔内造血细胞丰富。

2.4 ATP6i、IL-1、IL-6 基因的表达变化 见表 5。以空白组大鼠的基因表达量为 1, 作为对照组。在 ATP6i 基因的表达量上, 降钙素组和右归饮组与模型组比较, 两组 ATP6i 基因表达量较模型组明显下调($P<0.01$);降钙素组与右归饮组比较,右归饮组 ATP6i 基因表达量较降钙素组下降明显($P<0.05$)。在 IL-1 基因表达量上,降钙素组和右归饮组与模型组比较,两者 IL-1 基因表达量较模型组明显下调($P<0.01$);右归饮组 IL-1 基因表达量较降钙素组下调明显($P<0.05$)。在 IL-6 基因表达量上,降钙素组和右归饮组与模型组相比,两者 IL-6 基因表达量较模型组明显下调($P<0.01$);右归饮组 IL-6 基因表达量较降钙素组下调明显($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 实验背景 近年研究发现核激活因子受体配体-核激活因子受体-骨保护素-核因子- κ B(ligand of receptor activator of nuclear factor- κ B-receptor activator of nuclear factor- κ B-osteoprotegerin-nuclear factor- κ B, RANKL-RANK-OPG-NF- κ B)系统是破骨细胞分化过程中的一个重要信号传导通路。包括:核激活因子受体配体(ligand of receptor activator of NF- κ B, RANKL), 其受体是位于破骨细胞膜上的核激活因子受体(receptor activator Of NF- κ B, RANK);及 RANKL 的假性受体骨保护素(osteoprotegerin, OPG)。随着医生对 RANKL-RANK-OPG-NF- κ B 系统对破骨细胞分化调控机制上的认识深入,加之原位杂交显示 RANKL/RANK mRNA 也在这些假膜巨噬细胞上表达,说明 RANKL-RANK-OPG-NF- κ B 系统是关节置换术后的骨溶解中重要的信号通路。其主要机制是:①成骨细胞及骨髓基质细胞表达 RANKL,与破骨细胞前体细胞或破骨细胞表面上的

RANK 结合后促进破骨细胞的分化,从而引起骨溶解;②成骨细胞及骨髓基质细胞分泌表达 OPG 与 RANKL 竞争性结合,阻止 RANKL 与 RANK 之间的结合,从而抑制骨溶解的产生^[3]。随着假体周围骨溶解研究的深入,发现人工关节假体置入人体后,磨损和腐蚀可产生各种细小微粒,它们在机体内会激发各种免疫及吞噬细胞反应,在此过程中可分泌多种与骨吸收有关的生物化学介质,如 IL-1、IL-6、TNF- α 、PDGF-2、M-CSF、PGE2 和胶原酶等。通过影响 RANKL-RANK-OPG-NF- κ B 系统,实现增强破骨细胞的分化与活化,最终导致假体周围骨溶解。破坏假体与骨的结合强度。研究表明,假体松动患者血清和植入假体关节的关节滑液中炎性介质含量增高,这些炎性介质主要由假体周围伪膜组织产生。Grandjean 等^[4]用原位杂交技术确定假体周围伪膜样组织的细胞成份主要含有巨噬细胞、成纤维细胞、OC、巨细胞,还有不足 10%的 T-淋巴细胞。OC 占总数的 5%。Revell 等^[5]使用免疫组化和原位杂交技术研究假体周围伪膜,表明围绕假体的骨溶解损害区巨噬细胞、T 淋巴细胞亚群数量和 IL-1、IL-6、TNF- α 表达增加。巨噬细胞在磨屑刺激下产生的多种细胞因子作用 OC,从而引发骨溶解。OC 在骨溶解发生中起主导地位的观念已达成共识^[6]。OC 骨吸收的过程是粘附骨面→极化(吸收态)→破骨→脱离骨面移位至新的骨面。在骨骼的降解过程中,酸脱矿是关键环节,OC 的酸脱矿过程与其细胞膜上的质子泵—空泡型氢离子三磷酸腺苷酸酶(Vacuolar H⁺ATPase, V-ATPase)密切相关,质子泵分泌酸,使吸收微环境内的 PH 值达到 4.5 左右,骨矿物质在酸性环境中被溶解。其中编码跨膜通道 116kDa 亚基(a3 亚基)的基因—ATP6i 基因,对 V-ATPase 功能的发挥起决定性作用,ATP6i 突变所致 OC 功能障碍,不能使骨脱矿,从而形成吸收陷窝,且发生了严重的骨质硬化。由此可见,ATP6i 基因是破骨细胞分化成熟及骨吸收功能的关键基因靶点^[7-9]。巨噬细胞在磨屑刺激下产生的多种炎症刺激因子 IL-1、IL-6 作用 OC,促进 OC 的活化,从而加速骨溶解的过程。基于该背景,本实验通过聚乙烯、钛钉建立假体周围骨溶解动物模型方法来探讨假体周围骨溶解相关研究。降钙素是钙

磷代谢的重要调控激素之一,是强有力的破骨细胞抑制剂,能减少假体周围骨量丢失,促进骨矿化,提高骨密度,加快假体周围的骨形成,促进骨微结构改变;改善骨质量,增加骨强度,提高骨的生物力学特性和提高假体四周的支撑力,对假体无菌性松动有很好的预防和治疗作用,可直接、快速而广泛地抑制骨吸收。《医经精义》云:“肾藏精,精生髓,髓生骨,故骨者肾之所合也;髓者精之所生也,精足则髓足。髓在骨内,髓足则骨强”。右归饮方中熟地益肾填精;山药健脾固肾益精;山茱萸补肝益肾固精;肉桂温肾,补命门之火;附子峻补元阳,益火之源;枸杞子补肝肾,益精气;杜仲补肝肾,强筋骨,是温补肾阳的代表方剂。既往研究表明,右归饮能部分拮抗假体周围骨溶解的垂体-肾上腺轴的抑制状态,调整内环境,减少骨吸收,促进骨的形成,促使成骨-破骨耦联向成骨方向转化,同时右归饮能促进骨髓细胞增殖、抑制骨髓细胞脂肪化^[10]。

3.2 实验结果分析 右归饮组和降钙素组 ATP6i、IL-1、IL-6 基因表达量较模型组显著降低;且右归饮组较降钙素组 ATP6i、IL-1、IL-6 基因表达量明显下调,说明右归饮组比降钙素组有着更强的抑制破骨细胞的活性,拮抗假体周围磨损颗粒及炎性细胞因子的损害作用,抑制破骨细胞的形成和分化及骨吸收活性,促进破骨细胞的凋亡。在血清生化水平上,右归饮组和降钙素组 OPG、Ca、P、ALP 水平均明显高于模型组;在 RANKL、RANK、TRACP-5b 的生化指标上,右归饮组和降钙素组都明显低于模型组;在 OPG、Ca、ALP 血清水平上,右归饮组显著高于降钙素组;在血清 RANKL 含量上,右归饮组显著低于降钙素组;在 RANK、TRACP-5b、P 的生化水平上两者差异无统计学意义。从钼靶 X 线片和病理切片上,右归饮组和降钙素组比模型组有着很好的抑制骨吸收、促进骨形成的作用。从本实验结果不难得出右归饮组比降钙素能更好的抑制破骨细胞的吸收和促进成骨细胞的生成能力,改善假体周围骨溶解的平衡。

3.3 实验不足和展望 本研究表明右归饮能抑制假体周围的骨溶解。提示右归饮可拮抗假体周围的炎性细胞损害作用,抑制破骨细胞的形成、分化及骨吸收活性,促进破骨细胞的凋亡。为进一步临床应用右归饮治疗人工假体周围骨溶解提供了分子学、影像学、病理学及血生化依据,具有重要的临床价值,但对于右归饮确切的作用机制和临床应用及右归饮

治疗人工假体周围骨溶解的剂量和作用时间段需要更进一步的研究,加上右归饮为复方制剂,其成分复杂,所以对右归饮中单体进行深层次的实验研究,将会有着更广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 祖罡,毕大卫,费骏.全髋置换术后假体周围骨溶解[J].中国骨伤,2008,21(3):240-242.
Zu G, Bi DW, Fei J. Periprosthetic osteolysis following the total hip throplasty[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2008, 21(3):240-242. Chinese with abstract in English.
- [2] 童培建,许良,胡柏松,等.右归饮对激素性股骨头坏死大鼠体外诱导培养成骨细胞作用的研究[J].中国骨伤,2010,23(1):23-27.
Tong PJ, Xu L, Hu BS, et al. In vitro induction studies of *Yougui* drink (右归饮) on culture of steroid induced necrosis of femoral head rat osteoblast[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(1):23-27. Chinese with abstract in English.
- [3] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease[J]. Trends Mo Med, 2006, 12(1):17-25.
- [4] Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Jallot E, et al. Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro[J]. Biomaterials, 2006, 27(17):3195-3200.
- [5] Revell PA. The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses[J]. J Royal Society Interface, 2008, 5(28):1263-1278.
- [6] Holding CA, Findlay DM, Stamenkov R, et al. The correlation of RANK, RANKL and TNF α expression with bone loss volume and polyethylene wear debris around hip implants[J]. Biomaterials, 2006, 27(30):5212-5219.
- [7] Johansson MK, de Vries TJ, Schoenmaker T, et al. Hematopoietic stem cell - targeted neonatal gene therapy reverses lethally progressive osteopetrosis in oc/oc mice[J]. Blood, 2007, 109(12):5178-5185.
- [8] Del Fattore A, Cappariello A, Teti A. Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis[J]. Bone, 2008, 42(1):19-29.
- [9] Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 454(23):251-261.
- [10] 吴云刚,肖鲁伟,童培建.右归饮对激素性股骨头坏死患者股骨近端骨髓骨活性影响的实验研究[J].中国骨伤,2009,22(2):115-117.
Wu YG, Xiao LW, Tong PJ. Effects of *Yougui* drink(右归饮) on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in the proximal femur in steroid-induced avascular necrosis of femoral head[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2009, 22(2):115-117. Chinese with abstract in English.

(收稿日期:2012-05-25 本文编辑:王玉蔓)