

· 基础研究 ·

右归饮对大鼠激素性股骨头坏死行为学的影响

胡淼锋¹, 周晓成¹, 单乐天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:探讨补肾助阳中药右归饮对大鼠激素性股骨头坏死行为学的影响。方法:将 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为空白对照组、模型组、右归饮治疗组。采用内毒素和甲基强地松龙注射诱导造成激素性股骨头坏死后,右归饮治疗组给予右归饮灌胃(10 ml/kg),空白对照组和模型组以等量生理盐水灌胃。6 周后对其进行抓力、自主活动、悬尾、旷场实验和水迷宫实验等行为学观察。结果:与右归饮组比较,模型组大鼠抓力减小,自主活动减少,悬尾活动时间变少,在旷场实验中 10 min 运动总距离明显减少,在水迷宫实验中逃避潜伏期时间明显较长,总的活动距离减少。结论:右归饮可改善激素性大鼠股骨头坏死的行为学变化。

【关键词】 股骨头坏死; 右归饮; 运动活动; 补肾壮阳

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2013.01.013

Effects of Yougui Recipe (右归饮) on the behavioral changes in rat of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head HU Miao-feng, ZHOU Xiao-cheng, SHAN Le-tian, XIAO Lu-wei, and TONG Pei-jian*. * Zhejiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the effect of Yougui Recipe, a kidney-supplementing and yang-activating formula which on the behavioral changes of rat of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head (SANFH). **Methods:** Thirty Wistar rats were involved and were randomly divided into the blank control group (group A), the model group (group B) and the Yougui Recipe group (group C). SANFH models were established by injection of colibacillus endotoxin and prednisolone intramuscularly. Group C was lavaged with Yougui Recipe (10 ml/kg), while group A and group B were lavaged with the same amount of saline. The behavior of catch force, independent activities, the tail suspension, field experiment and water cleans maze experiment were observed after 6 weeks. **Results:** Compared with Yougui Recipe, rats in model group: catch force and independent activity decreases; the tail suspension activities was less time. In the desert field experiments, the total distance in 10 min movement reduced significantly. In the water maze experiment, incubation period of escape had a long time obviously, total distance of activities reduced. **Conclusion:** Yougui Recipe can relieve the ethologic change of rat model of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head.

KEYWORDS Femur head necrosis; Yougui Recipe; Motor activity; Reinforcing kidney-yang

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(1):50-53 www.zggszz.com

前期实验说明运用激素和内毒素联合方法能使大鼠模型符合激素性股骨头坏死动物模型^[1],且以证明激素性股骨头坏死与肾阳虚之间关系密切^[2]。右归饮为补肾助阳的代表方,本实验用右归饮进行早期干预,通过观察对大鼠相关行为学指标的影响,为补肾助阳中药右归饮防治激素性股骨头坏死提供相关的行为学实验证据。

1 材料与方

1.1 药物 右归饮按照《景岳全书》原方由熟地黄、炒山药、山茱萸、枸杞子、姜杜仲、制附子、肉桂、炙甘草组成。提取浓缩后每克细粉含生药 2.5 g,每 10 ml

含细粉 2.64 g,浙江省中医院中药制剂室制剂。大肠杆菌内毒素 L2880(美国 Sigma 公司),甲基强地松龙(美国 Pfizer 公司)。

1.2 动物与分组 清洁级健康雄性 Wistar 大鼠,8~10 周,体质量(200±10) g,由浙江中医药大学动物实验中心提供(生产许可证 SCXK 沪 2008-0016)。所有动物提前购入,适应性饲养 7 d,每笼 5 只,室温 21~23℃,相对湿度维持在 30%~40%,喂常规颗粒饲料及饮用水。

1.3 右归饮的制备 右归饮由熟地 30 g,山药 6 g,山茱萸 3 g,枸杞 6 g,姜制杜仲 6 g,制附子 9 g,肉桂 4.5 g,甘草 4.5 g 组成。按照前期确定的最佳提取工艺^[3],确定右归饮的最佳提取工艺条件为:加 10 倍水浸泡 1 h,煎煮,每次 1.5 h,煎煮 2 次。称取 30 倍处方量,按最佳工艺提取后所得提取液趁热 4 层纱

基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81072820)

Fund program: Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81072820)

通讯作者:童培建 E-mail:tongpeijian@163.com

布过滤后,放冰箱内冷藏 12 h,以 4 000 r/min,3 ℃ 下离心 15 min,共 2 次。合并上清液后加热,溶液趁热放置冰箱内冷藏 20 h,再以 4 000 r/min,3 ℃ 下离心 15 min,共 2 次。合并上清液,浓缩到密度为 1.35,于 60 ℃ 减压干燥箱内干燥。干燥物碾细,过 120 目筛即得。密封保存于干燥器内。

1.4 动物分组及造模给药方法 将 30 只大鼠随机分成空白对照组(A 组)、模型组(B 组)和右归饮治疗组(C 组),每组 10 只。适应性喂养 1 周后,B、C 组分别给内毒素 20 μg/kg 注射 2 次(每次间隔 24 h),甲基强地松龙 40 mg/kg 连续注射 3 次(每次间隔 24 h);A 组以等量生理盐水连续注射 5 次(每次间隔 24 h)。同时 C 组按 10 ml/kg 的量给右归饮灌胃,每日 1 次;A、B 组予生理盐水 10 mL/kg 灌胃,每日 1 次,共 6 周。6 周后对其相关的行为学进行观察。

1.5 行为学检测

1.5.1 一般状态观察 每日给药前,仔细观察大鼠的精神状态、姿势、皮毛色泽、活动度等全身情况。

1.5.2 旷场实验 灌胃 6 周结束后在环境安静,高 40 cm,长、宽均为 80 cm,周壁、底面为黑色,底面用白线划分为面积相等的 25 块正方形敞箱中进行。实验前先置大鼠于测试实验室内适应 10 min。操作者握住大鼠尾根部 1/3 处,轻轻将大鼠放入旷场箱的中央区内,开始同步录像、计时,每只动物测定 1 次,每次测定 10 min。将大鼠置于敞箱底面的中心方格内,记录大鼠的平均速度及运动总长度以观察其活动度。每次实验均在 7:00~12:00 am 进行。

1.5.3 水迷宫实验 利用啮齿类动物在水中有强烈的逃避水环境的动机,学会逃避水环境的过程体现动物的学习能力;根据周围环境进行空间定位,有目的地游往水中安全的地方(平台),体现动物的空间记忆能力。主要由摄像机、广角变焦镜头、监视器、图像采集卡及 smart 软件等记录显示系统组成。迷宫中平台置于第 4 象限且固定不变,水池里的水面高出站台 2 cm,水温控制在(22±0.5) ℃。灌胃结束 6 周后在隔音安静的房间内进行,水池、日光灯、鼠笼等实验室各种物件的位置保持不变。实验采用每日训练 1 次。若动物 2 min 尚未找到站台,将动物拿到站台上并使它上面停留 20 s。训练 4 d 后进行水迷宫测试,记录其逃避潜伏期(大鼠找到平台的时间),平均速度,活动总距离作为记忆能力、活动度的指标。

1.5.4 自主活动次数测定 在灌胃 6 周结束后进行大鼠自主活动的检测。应用大鼠自主活动程序仪测定大鼠的自发活动并计数,当计算机进入测定程序后,将大鼠放入自主活动箱中,每个活动箱中 1 只,由计算机自动记录大鼠的活动情况。实验时,

每只大鼠放入活动箱内,适应 3 min 后,记录每只大鼠 3、5 min 内的活动次数。

1.5.5 悬尾不动时间的测定 灌胃结束后,于自主活动测定结束后进行悬尾不动时间的测定。参照 Steru 等^[4]方法,将大鼠尾端 2 cm 的部位固定在 1 根水平木棍上,使大鼠呈倒挂状态,其头部离水平面 5~6 cm,用木板隔开相邻大鼠的视线,记录每只大鼠在 5 min 内的悬尾活动时间。

1.5.6 抓力的测定 在灌胃结束后用抓力测定仪对其进行抓力测试,分别测 2 次,记录其最大值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17 统计软件处理,数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用成组设计定量资料的 *t* 检验进行数据处理。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般形态观察结果 造模前各组大鼠毛色、进食等方面均无明显差异。造模第 1 周造膜组大鼠逐步转化为神态倦怠、烦躁、易激惹、毛发枯黄散乱无光泽、活动频率少且较缓慢;与模型组大鼠相比,灌胃 6 周结束时右归饮组大鼠毛色有明显好转,进食可,活动频率明显。

2.2 旷场实验结果 10 min 活动总距离正常组大鼠大于模型组大鼠,右归饮组大鼠大于模型组大鼠。行动平均速度正常组、模型组及右归饮组大鼠未见明显差别。结果见表 1。

2.3 水迷宫实验结果 随着训练时间的延长,各组大鼠的逃避潜伏期均逐渐缩短。从表 1 结果可知,在训练的第 4 天,模型组大鼠的逃避潜伏期长于正常组大鼠,水中平均速度慢于正常组大鼠,总活动距离也长于正常组大鼠;与模型组相比,右归饮组大鼠的逃避潜伏期缩短,在水中平均速度快于模型组大鼠,总活动距离少于模型组大鼠。

2.4 自主活动次数 表 1 结果显示:模型组大鼠 3、5 min 内自主活动次数均少于正常组大鼠;与模型组比较,右归饮组大鼠自主活动次数 3 min 未见明显差异,但 5 min 内自主活动次数多于模型组大鼠。

2.5 悬尾实验 表 1 结果显示:模型组大鼠悬尾不动时间短于正常组大鼠,右归饮组大鼠悬尾不动时间长于模型组大鼠。

2.6 抓力实验 表 1 结果显示:模型组大鼠抓力小于正常组大鼠,右归饮组大鼠抓力大于模型组大鼠。

3 讨论

激素性股骨头坏死(steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, SANFH)是由于长期小剂量或短期大剂量使用激素,引起的以股骨头局部区域骨小梁和骨髓坏死为特征的疾病。SANFH 属中医

表 1 各组大鼠相关行为学比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab.1 The behavioral changes in rats of all groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	旷场实验		水迷宫实验			自主活动		悬尾 (min)	抓力 (mN)
	活动总距离 (cm)	平均速度 (cm/s)	潜伏期 (S)	平均速度 (cm/s)	总活动距离 (cm)	3 min 内活动 次数	5 min 内活动 次数		
正常组	17 171.33±	34.72±	14.58±	98.17±	956.27±	63.40±	104.10±	2.780±	907.40±
	3 488.55	7.54	5.55	40.89	482.45	14.09	23.22	0.992	52.79
模型组	11 166.43±	28.88±	40.28±	59.18±	2 148.09±	44.66±	68.22±	1.159±	720.70±
	992.90	6.85	27.42	13.98	1 366.25	17.92	28.23	0.913	112.53
右归饮	17 392.28±	32.04±	18.69±	78.07±	1 193.38±	61.20±	105.70±	2.940±	856.06±
	2 080.30	3.80	8.17	21.40	501.19	16.53	21.59	0.897	63.62
t1 值	-5.235	-1.811	2.904	-2.853	2.601	-2.553	-3.005	-3.823	-4.750
P1 值	0.000	0.087	0.009	0.011	0.018	0.021	0.008	0.001	0.000
t2 值	-8.541	-1.677	2.385	-2.336	2.151	-2.092	-3.232	-4.405	-3.315
P2 值	0.000	0.111	0.028	0.031	0.048	0.052	0.006	0.000	0.004

注:t1, P1 为模型组与正常组比较;t2, P2 为模型组与右归饮组比较

Note:t1, P1 is model group compared with normal group;t2, P2 is model group compared with Yougui drink group

“骨痹”、“骨痿”、“骨蚀”的范畴,其病机主要为肾虚血瘀、骨枯髓减^[5]。临床许多医家都采用补益肝肾和益骨生髓的方法取得良好效果^[6]。右归饮出自明代张介宾的《景岳全书》,作为温补肾阳的代表方剂,具有温补肾阳、益骨生髓的功效。方中熟地益肾填精;山药健脾固肾益精;山茱萸补肝肾益固精;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。中医认为“肾主骨生髓”,右归饮就是通过补肾助阳、壮骨生髓,达到防治股骨头坏死的目的。

由实验结果可以看出,在经过 1 周的激素和内毒素造膜后,股骨头坏死模型组大鼠普遍出现神态倦怠、激惹、毛发无光泽、四肢活动无力次数减少等表现,说明激素和内毒素对大鼠造成了一定程度的损害。右归饮组大鼠一般状况明显好转,说明右归饮起到了干预调节的作用。

旷场实验和水迷宫实验是较为经典的测定大鼠探究行为及学习记忆能力行为的方法^[7]。在旷场实验中,SANFH 模型组大鼠的 10 min 运动总长度比正常组减少,说明因为股骨头坏死使本能活动受限、启动活动的潜伏期长、动作迟缓等致使在心理上已经处于绝望和行为退缩状态,最终自主活动能力和探究能力明显下降。实验结果发现右归饮能提高模型大鼠 10 min 运动总长度。水迷宫实验显示,与正常组相比,SANFH 大鼠逃避潜伏期明显延长,说明 SANFH 模型大鼠的空间学习记忆能力明显下降。而右归饮组大鼠逃避潜伏期时间短于模型组,说明右归饮能改善 SANFH 大鼠的空间学习记忆能力。SANFH 大鼠与肾虚关系密切,肾主骨生髓通于脑,SANFH 大鼠其探究及学习记忆能力相对较差,

在旷场实验中右归饮与模型组平均速度无明显差异,通过水迷宫实验可从侧面反应在不负重情况下右归饮可改善其运动速度,同样说明模型组大鼠速度已经受到造模影响,右归饮组总的活动长度比模型组少,是因其潜伏期短,反应了右归饮对其都有较明显改善作用。

自主活动次数反映动物对新异环境的探究程度,SANFH 状态可导致自主活动阻抑现象,与 SANFH 患者表现出的主动性活动减少、生活被动等症状相似;悬尾不动时间主要反映动物的运动能力和疲劳状态,与 SANFH 患者出现的行动迟缓、疲乏无力等症状相似;抓力试验主要反应大鼠四肢的力量。本研究结果显示,与正常组相比,模型组大鼠自主活动次数减少、悬尾不动时间缩短、抓力减小,提示模型组大鼠出现类似于激素性股骨头坏死行为学改变,因此从行为学角度佐证了大鼠激素性股骨头坏死复制成功。本实验还发现,与模型组相比,右归饮组大鼠自主活动次数增多、悬尾不动时间延长、抓力增加,提示右归饮可以改善激素性股骨头坏死大鼠行为学。

根据行为学的结果和右归饮干预效果分析,激素性股骨头大鼠符合激素性股骨头坏死证候表现;补肾助阳中药右归饮对早期股骨头坏死有防治作用,能较明显的改善其行为学相关指标,为右归饮防治激素性股骨头坏死提供了相关的行为学动物实验证据。

参考文献

[1] 江彬锋,方剑利,肖鲁伟. 右归饮对大鼠激素性股骨头坏死局部脂联素表达的影响[J]. 中医正骨,2010,22(5): 11-14.
Jiang BF, Fang JL, Xiao LW. The influence of Yougui Recipe on the local adiponectin expression of steroid-induced osteonecrosis of

- femoral head of rat[J]. Zhong Yi Zheng Gu, 2010, 22(5): 11-14. Chinese.
- [2] 赵万军,肖鲁伟,周辉,等. 激素性股骨头坏死中医病机学实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2005, 13(4): 23-27.
Zhao WJ, Xiao LW, Zhou H, et al. Experimental research of the TCM pathogenesis in the steroid-induced femoral head of necrosis [J]. Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi, 2005, 13(4): 23-27. Chinese.
- [3] 俞楠泽,毛强,肖鲁伟,等. 正交试验法优选右归饮散剂的提取工艺[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(6): 1197-1198.
Yu NZ, Mao Q, Xiao LW, et al. Optimization of the processing technology for *Yougui* drink powder by orthogonal design[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Xue Kan, 2010, 28(6): 1197-1198. Chinese.
- [4] Steru L, Chermat R, Thierry B. The tail suspension test; a new method for screening antidepressants in mice[J]. Psychopharmacology, 1985, 85(3): 367-370.
- [5] 吴云刚,肖鲁伟. 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. Effects of *Yougui* Recipe 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.
- [6] 苗金波,焦宗乾,楚晓筭. 中西医结合治疗股骨头坏死 60 例[J]. 山西中医, 2010, 26(11): 23-24.
Miao JB, Jiao ZQ, Chu XS. Combining traditional Chinese and western medicine treatment avascular necrosis of the 60 cases [J]. Shan Xi Zhong Yi, 2010, 26(11): 23-24. Chinese.
- [7] 梁媛,郭晓玲,岳广欣. 逍遥散对肝郁脾虚证模型大鼠行为学变化的调节作用[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(5): 317-322.
Liang Y, Guo XL, Yue GX. Regulation of *Xiaoyao* Powder on behavioral changes of rat model of liver depression and spleen deficiency syndrome[J]. Bei Jing Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao, 2010, 33(5): 317-322. Chinese.

(收稿日期: 2012-06-17 本文编辑: 连智华)

2013 中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会脊柱微创技术学习班 暨湖南省中西医结合学会脊柱医学专业委员会学术年会征文通知

由中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会主办,湖南省南华大学第一附属医院承办的“2013 中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会脊柱微创技术学习班、湖南省中西医结合学会脊柱医学专业委员会学术年会”定于 2013 年 3 月 1 日~3 月 3 日在湖南省衡阳市召开。参会者授予医学继续教育 I 类学分。大会将邀请国内外知名脊柱疾病专家进行专题讲座及手术演示,欢迎广大中西医界同道积极参会。

征文内容:①中西医结合脊柱相关疾病的基础和临床研究;②脊柱外科、脊柱微创及非融合新技术;③脊柱外科并发症及处理;④脊柱外科中西医诊疗技术及其对比研究。

征文要求:①文稿必须具有科学性、先进性和实用性;②4000 字以内正文,附 500 字左右摘要 1 份,包括研究目的、方法、结果及结论;③论文请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮编、手机号码、工作电话和 E-mail 地址;④截稿日期:2013 年 2 月 10 日。

会务费:会议注册费 800 元。

稿件投递:E-mail: nhfy.jzkw@yahoo.com.cn。

咨询电话:0734-8279334(可接收传真)。

联系人:晏怡果(13787349736),许婷(15886480006),王文军(13017160433)。