同等学力申请硕士学位



**硕 士 学** 位 论 **文**

**论文题目：大鼠激素性股骨头坏死模型评价及侧耳不同提取物对其整体药效作用的实验研究**

**作者姓名：朱晓飞指导教师：童培 建**

**学科专业：中医学** 中医骨伤科学所在学院：第一临床医学院

提交日期2012年5 月

**浙江中医药大学研究Th学位论文原创性声明**

本人郑重声明：本人所提交的学位论文《大鼠激素性股骨头坏死模型评价及侧耳不同提取物对其整体药效作用的实验研究》是本人在导师的指导下，进行的研究工作及取得的研究成果。除文中已经加以标注引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明和致谢。

本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：朱晓飞 签字日期：2012 年 05 月16 日

**学位论文版权使用授权书**

本学位论文作者完全了解浙江中医药大学有关保留、使用学位论文的规定，同意浙江中医药大学保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权浙江中医药大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1、保密□，在 年解密后适用本授权书。

2、不保密□。

（请在以上相应方框内打“√”）

学位论文作者签名：朱晓飞 指导教师签名：

签字日期：2012年05月16日 签字日期：年 月 日

目 录

[摘要](#_Toc686608367) 3

**[Abstract](#_Toc686608368)** 3

[前言](#_Toc686608369) 5

[第一部分 急性/慢性激素性股骨头坏死大鼠模型的建立与评价引言](#_Toc686608370) 5

[一、 实验一急性大鼠激素性股骨头坏死模型的建立与评价](#_Toc686608371) 5

[第一节 材料与方法](#_Toc686608372) 5

[第二节 实验结果](#_Toc686608373) 6

[二、 实验二慢性大鼠激素性股骨头坏死模型的建立与评价](#_Toc686608374) 6

[第一节 材料与方法](#_Toc686608375) 6

[第二节 实验结果](#_Toc686608376) 6

[三 、 分析与讨论](#_Toc686608377) 7

[第二部分 激素性股骨头坏死对大鼠行为学的影响](#_Toc686608378)[引言](#_Toc686608378) 7

[第一节 材料与方法](#_Toc686608379) 7

[第二节 实验结果](#_Toc686608380) 8

[第三节 分析与讨论](#_Toc686608381) 9

[第三部分 侧耳子实体水提物对SANFH大鼠的药效作用研究](#_Toc686608382) 10

[引 言](#_Toc686608383) 10

[第一节 材料与方法](#_Toc686608384) 10

[第二节 实验结果](#_Toc686608385) 11

[第三节 分析与讨论](#_Toc686608386) 12

[第四部分 侧耳子实体醇提物对](#_Toc686608387)**[SANFH](#_Toc686608387)**[大鼠的药效作用研究引言](#_Toc686608387) 13

[第一节 材料与方法](#_Toc686608388) 13

[第二节 实验结果](#_Toc686608389) 14

[第三节 分析与讨论](#_Toc686608390) 15

[总结](#_Toc686608391) 15

[参考文献](#_Toc686608392) 16

[附图](#_Toc686608393) 18

[文献综述](#_Toc686608394) 23

摘要

**大鼠激素性股骨头坏死模型评价及侧耳不同提取物对其整体药效作用的实验研究**

**目的**①通过不同的激素应用时间分别建立雌、雄大鼠的急性和慢性激素性股骨头坏死模型，以检验外源激素条件以及动物体内激素代谢拮抗作用对该模型的影响，为激素性股骨头坏死模型的标准化提供科学依据；②通过对激素性股骨头坏死模型大鼠动物行为学的观察，探究股骨头坏死通过引起肾阳虚影响动物行为学指标的作用；③应用急性早期激素性股骨头坏死模型分别评价侧耳子实体水提物和醇提物基于中医理论防治股骨头坏死的药效作用，为抗激素性股骨头坏死的特色中药新药的开发研究提供新的科研思路。

**方法**①Wistar大鼠40只，雌雄各半，分为正常组（雌性、雄性）和模型组（雌性、雄性），每组10只，通过激素（甲基强的松龙）联合内毒素短期注射（3次、3天）和长期注射（12次、12周），分别建立模型大鼠的急性与慢性激素性股骨头坏死模型，以组织病理学实验进行比较分析和模型验证；②应用动物行为学实验综合评价上述模型大鼠的一般行为学、抓力、自主活动、悬尾时间等指标，并与正常组大鼠进行比较；③通过短期激素注射建立大鼠早期激素性股骨头坏死模型，分别用5g/kg生药剂量的侧耳水提物和醇提物灌胃给药，每天一次，以阿仑膦酸钠为阳性对照药，连续灌胃6周，每周

观察大鼠一般体征，第6周进行动物行为学观察，而后用水合氯醛麻醉处死各组大鼠，取完整股骨头进行组织病理学观察（HE染色），综合比较各组间差异。

**结果**①模型组大鼠一般行为学表现未见异常，组织病理学结果显示雌/雄大鼠在短期和长期激素应用后均表现为软骨表面台阶样改变、表面纤维结缔组织增生、软骨细胞排列紊乱、软骨细胞数减少、软骨基质不均匀、骨小梁稀疏变窄或断裂分解成云片状、骨细胞肿大、空骨陷窝增多、骨髓弥漫性坏死和溶解、骨髓大面积脂肪细胞化等病理改变，雌鼠和雄鼠病理学表现无显著差别，都能用激素联合内毒素构建股骨头坏死模型；短期和长期激素应用都能引起大鼠股骨头病理改变，其中长期模型的病理表现更显著，可见骨髓被大量脂肪细胞所取代；②模型组大鼠造模7天后出现体重减轻的一般生理学改变，抓力、自主活动和悬尾时间等行为学指标均较正常组有显著下降（*P*<0.05、

*P*<0.01），说明激素性股骨头坏死能对动物行为学指标产生影响；③侧耳水提物能明显改善股骨头坏死模型大鼠的抓力、自主活动以及悬尾时间（*P*<0.05、*P*<0.01），能从组

1

织病理方面改善软骨细胞排列情况、增加骨小梁区域面积、抑制骨小梁断裂、减少空骨陷窝、抑制骨髓脂肪细胞化，较模型组有明显改善，甚至接近正常组水平；侧耳醇提物对模型组动物行为学指标改善作用不明显，只对悬尾时间有作用，其组织病理学表现不如侧耳水提物，仍可见软骨表面台阶样改变、软骨细胞数减少、软骨基质不均匀、骨髓大面积脂肪细胞化等病灶，相较模型组而言无显著变化；阳性药阿仑膦酸钠对模型大鼠行为学指标没有改善作用，在组织病理方面的药效作用也不明显。

**结论：**①短期激素应用和长期激素应用均能造成股骨头坏死模型，且不受雌鼠体内激素代谢拮抗作用影响，短期急性模型比长期慢性模型更贴近早期股骨头坏死症状；②激素性股骨头坏死能改变动物行为学指标，可能与肾阳虚证有关；③侧耳水提物对激素性股骨头坏死早期模型有显著治疗作用，且能改善大鼠行为学指标，发挥整体药效作用；侧耳醇提物对模型大鼠没有治疗作用，也没有明显改善行为学指标的效果，说明侧耳抗股骨头坏死相关的药效物质主要是水溶性成分，集中在其水提物中。

**主题词**激素性股骨头坏死，侧耳，水提物，组织病理，动物行为学

2

**Abstract**

**The evaluation of steroid-induced avascular necrosis of femoral head of rats and the pharmacodynamic study of the extracts from *Pleurotus ostratus***

**Objective:** ①First, we set up the model of rats' femoral head necrosis by different time of hormones, and the rats is separated with male and female. So we can inspect the effection of exogenous hormones conditions and its antagonist role in vivo to the models of steroid-induced avascular necrosis of femoral head (SANFH). Our study will provide the

Scientific proof to make the standardization of the model of SANFH; ②By observing the

Ethology of the rat-model of SANFH, we can explore if the animal of femoral necrosis will have the symptoms of deficiency of the kidney-yang, than it will lead to the changment of animal ethology. ③Using the acute and early model of SANFH, we can evaluate the

Pharmacodynamic effects of the aqueous extracts and ethanol extract from *Pleurotus ostratus*, and it is based on the theory of Prevention and control the ANFH by TCM. By this way we can explore more characteristic and efficient Chinese herbal medicine, and it is a researching ideas that others can reference.

**Method:** ①In our study, 40 Wistar-rats were needed, male and female were each divided into half. These rats were divided into the normal group (male and female) and the model group (male and female), every group had 10 rats. We used the joint injections of hormone (methylprednisolone) and endotoxin to set up the model of rat femoral head necrosis. In this part the models were divided into Short-term injection (3times,3days) and Long-term injection (12times,12days). At last, we analysed and confirmed these models by

Histopathology;②We evaluated the general behavior、grip strength、spontaneous activity、

Tail suspense and other indexes of model and normol rats, and compared each other;③We set up the model of rat of SANFH by Short-term methylprednisolone injection, then gived these rats aqueous extracts and ethanol extract from *Pleurotus ostratus* respectively by stomach, 5g crude drug per kg.,1time a day, and take the alendronate sodium tablets as a comparison, it lasted 6 weeks. We observed the rats' general symptoms every week, and test their behavior at

Sixth week. Then excuted these rats with chloral hydrate, then got the intact femeral head to

3

Observe by histopathology (HE). And compared the differences between each group.

**Result:** ①The general behavior of model group had no abnormal, the male and female rats after short-term and long-term hormone injuction had the same histopathology shows that cartilage surface step changing, proliferation of surface fibrous connective tissues, cartilage cell disordered, chondrocyte reduced, asymmetrical of cartilage matrix, trabecular bone was rarefaction narrowed or broke into like cloud sheet, bone cell swelling, empty of the bone lacunae increased, bone marrow diffuse necrosis and dissolved, large area of bone marrow to be the fat cells. The male and female rats had no obviously differences, and they can set up the model of SANFH by the joint injections of hormone and endotoxin; The short-term and long-term hormone used would cause the femoral necrosis, and the long-term model was more significantly, we could see the bone marrow was replaced by large area of the fat cells;

②The model group showed loss of weight after 7days with hormone used, and the grip

Strength、spontaneous activity、tail suspense and other indexes of animal ethology are fall down significantly than the normal group(PP<0.05、P<0.01), it was showed that the SANFH could impact the indexes of animal ethology; ③The aqueous extracts from *Pleurotus ostratus*

Could improve the symptoms of Histopathology contrast with model group even closed to the normol group, such as cartilage cells' arrangement, increased the area of bone trabecula, inhibit the fracture of bone trabecula, reduce the empty osteocyte lacunae, inhibit the bone marrow replace to the fat cells; The improvement from The ethanol extracts from *Pleurotus ostratus* to the indexes of animal ethology were not obviously, The ethanol extracts from *Pleurotus ostratus* were only effected to tail suspense, and the performance of histopathology was not more optimistic than the model group that used the aqueous extracts, it still showed

That cartilage surface step changing、chondrocyte reduced, asymmetrical of cartilage matrix,

Large area of bone marrow to be the fat cells and other changes, and it's had no significant changes compared with model group. The positive group used alendronate sodium tablets had no improvement to the indexes of animal ethology, and it' pharmacodynamic effects in histopathology were not obviously, too.

4

**Conclusion:** ①The use of hormone by short-term and long-term can all make the femoral necrosis, and aren't effected by hormone's antagonist role in female-rats' vivo. Short-term and acute model's symptoms is closer to the early stage of ANFH's than long-term chronic model's;

②The SANFH can change the indexes of the animal ethology, maybe it's related to the

Symptoms of deficiency of the kidney-yang;③The aqueous extracts from *Pleurotus ostratus* has significantly treatment to early stage of SANFH, and improves the indexes of the animal ethology, and gives play to the whole therapeutic effects; the ethanol extract from *Pleurotus ostratus* neither has treatment to the model rats nor improves the indexes of the animal ethology. It's explain that effective component of *Pleurotus ostratus* main concentrate in the ethanol extract, and it's water-soluble.

**Subject Words:** steroid-induced avascular necrosis of femoral head, *Pleurotus ostratus*，

Aqueous extracts, histopathology, animal ethology

5

前言

股骨头坏死（Osteonecrosis of the Femoral Head, ONFH）又称缺血性股骨头坏死，是股骨头血液供应阻断后的最终病理结果，为骨科领域最常见的疑难疾病之一。在我国，糖皮质激素是引起股骨头坏死的主要原因之一，而激素性股骨头坏死（Steroid-induced avascular necrosis of femoral head, SANFH）发病率占非创伤性股骨头坏死的首位。激素性股骨头坏死随着病情发展能引起软骨下骨和关节面的塌陷，进而引起严重的髋关节疼痛及功能障碍，最终迫使患者接受人工关节置换，带来严重的身心损害和经济负担。早期干预是股骨头坏死的治疗关键，可应用药物代替手术以达到治愈或延缓病情的效果。目前国内外对该病的药物治疗研究仍处在探索阶段，临床上仍未找到适合于早期干预的特效药物。因此迫切需要扩大筛选范围，对更多药用物质的进行探索研究。

根据中医理论，股骨头坏死属“骨痹”、“骨痿”、“骨蚀”范畴。在形态与病理机制方面类似于《灵枢・刺带真邪篇》所描述的“骨蚀”以及《素问痿论》中的“骨痿”；在症状体征方面又与“骨痹”相符。中医整体观认为，股骨头坏死尤其是激素性股骨头坏死是药毒损肾蚀骨的结果，患者多表现肾阳虚。临床上，许多医家都采用补肾壮阳、益骨生髓、舒筋活络等治法治疗股骨头坏死，并取得显著疗效。因此，运用上述中医治法开展抗股骨头坏死的中药研究具有广泛的应用前景和科学意义。相较西药而言，中药具有药效缓和稳定、作用靶点多、副作用少、依赖性小等优势。研究中药抗股骨头坏死，充分发挥上述优势特点，能为理想药物的筛选和开发提供新的思路和方法，并进一步为中药治疗早期股骨头坏死的广泛应用提供科学依据。

侧耳（*Pleurotus ostreatus*）又称糙皮侧耳，始载于明代《广菌谱》，是真菌类担子菌纲白蘑科的食药用真菌，以子实体入药，其子实体为人们日常食用的平菇。作为药食同源的一味中药，侧耳味甘性温，归肝肾经，具有补肾壮阳、舒筋活络、补胃理气、追风散寒等功效，主治腰腿疼痛、经络不舒、手足麻木、腰膝无力等病证。现代药理研究表明，侧耳还具有增强免疫、抗肿瘤、降血脂以及防治动脉粥样硬化等活性，但其对股骨头坏死的药效作用未见报道。基于中医理论，侧耳补肾壮阳、舒筋活络等功效能用于改善“骨痹”兼肾阳虚等证，暗示其具有治疗股骨头坏死的药效潜力，亟待进一步研究。

本研究从中医理论对证用药的角度，提出食源中药侧耳可治疗早期股骨头坏死的假说。通过建立动物模型，开展相关药效学研究以验证上述假说，为抗股骨头坏死中药新药的开发提供实验和理论基础。

6

# 第一部分 急性/慢性激素性股骨头坏死大鼠模型的建立与评价引言

自1957年Pietuograndi和Mastromarino首先报道由于使用皮质类固醇药物引起缺血性股骨头坏死后，激素性股骨头坏死越来越受到关注和重视，但其真正的病理机制尚未完全清楚。因此，复制出接近临床激素性股骨头坏死的动物模型，对于观察股骨头坏死的病理变化、探讨其发病机理以及开展药物干预研究都有重要的意义。然而，由于实验动物种类和性别、激素种类和剂量、激素注射时间、前凝血状态等因素的不同，目前仍没有标准的激素性股骨头坏死动物模型。据此，本研究在前期工作基础上将应用激素联合内毒素的造模方法，根据激素注射时间长短分别建立雌/雄大鼠的急性和慢性激素性股骨头坏死模型并进行评价验证，为该疾病的药物干预研究提供支持，也为早期激素性股骨头坏死模型的标准化制定奠定基础。

## 一、 实验一急性大鼠激素性股骨头坏死模型的建立与评价

### 第一节 材料与方法

#### （一）实验材料

##### **1.**实验动物

成年健康清洁级Wistar大鼠，体重200±10g，雌雄各半，浙江中医药大学实验动物中心提供，在清洁级动物实验条件下饲养：正压屏障系统，空气经过3级过滤，空气洁净度达万级；室温21~23°C；相对湿度30~70%; 12/12小时日夜交替循环光照，每日自由摄取自来水和标准饲料，每个标准笼饲养5只。

##### **2.**实验药品

大肠杆菌内毒素，（0.5ml/瓶，生产批号：L2880，生产厂家：Sigma公司，美国），用生理盐水配成2μg/ml的溶液，备用。

甲基强地松龙，（0.5g/瓶，生产批号：X09312，进口药品注册证号：H20080285，生产厂家：Pfizer公司，美国），用生理盐水配成4μg/ml的溶液，备用。

##### **3.**实验器材

大鼠灌胃针；注射器；组织脱水机；组织包埋机；Leica SM 2500硬组织切片机；冷冻切片机；Olympus SZX 12体视显微镜；AXiovert 200荧光倒置显微镜；烧杯；量

7

桶；水浴锅；电子天平等。

#### （二）实验方法

##### **1.**动物选择与分组

取成年健康清洁级Wistar大鼠40只，雌雄各半，适应性喂养1周后精确称重，采用随机数字表法分组、编号，分别设雄性对照组、雌性对照组、雄性急性模型组、雌性急性模型组，每组10只。

##### **2.**模型制备

模型组20只Wistar大鼠按20μg/kg剂量经腹腔注射大肠杆菌内毒素2次，每次须间隔24h。第2次注射大肠杆菌内毒素24h后，再按40mg/kg剂量经大鼠双侧臀肌注射甲基强的松龙，连续注射3次，每次间隔24h，总共观察6周。

##### **3.**标本制备

模型制备后第6周末根据大鼠体重，以4ml/kg剂量腹腔注射水合氯醛进行麻醉，同时备皮、消毒、固定。解剖后迅速取出连同大、小转子在内的大鼠双侧股骨头，尽量除去周围软组织后，肉眼观察股骨头形态、关节软骨色泽及外形等。将股骨头从冠状面切开，投入10%的中性甲醛溶液（0.1 mol/l, pH7.4）中保存，用于组织病理学观察。

##### **4.**一般行为学和病理学指标检测

一般行为学：每周对各组大鼠进行一般状态的观察和生理学指标的检测，包括状态、毛色、摄食、饮水等。组织病理学：将冠状面切开的样本在中性甲醛溶液中固定至少3天，然后置于100g/l EDTA-Tris缓冲液中脱钙，每周更换脱钙液1次，以大头针能无阻力刺进骨密质为完全脱钙标准。脱钙完全后，再逐级脱水，用二甲苯透明，石蜡包埋切片，并沿冠状位切开，切片厚度约为4μm，切片后进行常规HE染色，光学显微镜下观察。

### 第二节 实验结果

大鼠造模后，一般行为学表现未见异常，其精神状态、毛色、摄食、饮水量等指标与正常组没有显著差异。股骨头标本形态观察发现，正常组股骨头表面光滑、有光泽、无皱缩、软骨厚度基本正常、软骨与下方骨质连续，股骨头表面无异常着色区、骨质坚硬、骨质均匀；而急性激素性股骨头坏死模型组股骨头标本显示其软骨表面不光滑、色暗而有部分皱缩、软骨厚度变薄、表面有异常着色区、且骨质硬度减小。组织病理学结

8

果显示：①雌/雄大鼠正常组均可见软骨表面光滑，软骨基质均匀，各层细胞排列均匀整齐，无纤维性增生或明显软骨钙化；骨小梁完整规则、无稀疏变窄，其中的骨细胞清晰可见，无断裂或云片状病变，骨细胞正常，少见空骨陷窝（图1）；②雌/雄大鼠模型组病理特征相同，其股骨头结构完整，部分软骨表面呈台阶样改变，偶见软骨下骨质或纤维组织覆盖于骨质上；软骨细胞排列紊乱，软骨细胞数减少，软骨基质不均匀，软骨表面呈现纤维结缔组织增生，偶现片状软骨钙化；骨小梁稀疏、变细变窄、断裂或被分解成云片状，骨细胞肿大、空虚骨陷窝增多；骨髓出现大片灶性或弥漫性坏死、溶解，或被脂肪细胞所取代，髓腔内脂肪细胞增大、融合呈泡状（图2）。

## 二、 实验二慢性大鼠激素性股骨头坏死模型的建立与评价

### 第一节 材料与方法

#### （一）实验材料

##### **1.**实验动物

成年健康清洁级Wistar大鼠，体重200±10g，雌雄各半，浙江中医药大学实验动物中心提供，在清洁级动物实验条件下饲养：正压屏障系统，空气经过3级过滤，空气洁净度达万级；室温21~23°C；相对湿度30~70%; 12/12小时日夜交替循环光照，每日自由摄取自来水和标准饲料，每个标准笼饲养5只。

##### **2.**实验药品

大肠杆菌内毒素，（0.5ml/瓶，生产批号：L2880，生产厂家：Sigma公司，美国），用生理盐水配成2μg/ml的溶液，备用。

甲基强的松龙，（0.5g/瓶，生产批号：X09312，进口药品注册证号：H20080285，生产厂家：Pfizer公司，美国），用生理盐水配成4μg/ml的溶液，备用。

##### **3.**实验器材

大鼠灌胃针；注射器；组织脱水机；组织包埋机；Leica SM 2500硬组织切片机；冷冻切片机；Olympus SZX 12体视显微镜；AXiovert 200荧光倒置显微镜；烧杯；量桶；水浴锅；电子天平等。

#### （二）实验方法

9

##### **1.**动物选择与分组

取成年健康清洁级Wistar大鼠20只，雌雄各半，适应性喂养1周后精确称重，采用随机数字表法分组、编号，分别设雄性慢性模型组、雌性慢性模型组，每组10只。

##### **2.**模型制备

模型组20只Wistar大鼠按20μg/kg剂量经腹腔注射大肠杆菌内毒素2次，每次须间隔24h。第2次注射大肠杆菌内毒素24h后，再按40mg/kg剂量经大鼠双侧臀肌注射甲基强的松龙，连续注射12次，每次间隔7d，总共观察6周。

##### **3.**标本制备

模型制备后第6周末根据大鼠体重，以4ml/kg剂量腹腔注射水合氯醛进行麻醉，同时备皮、消毒、固定。解剖后迅速取出连同大、小转子在内的大鼠双侧股骨头，尽量除去周围软组织后，肉眼观察股骨头形态、关节软骨色泽及外形等。将股骨头从冠状面切开，投入10%的中性甲醛溶液（0.1 mol/l, pH7.4）中保存，用于组织病理学观察。

##### **4.**一般行为学和病理学指标检测

一般行为学：每周对各组大鼠进行一般状态的观察和生理学指标的检测，包括状态、毛色、摄食、饮水等。组织病理学：将冠状面切开的样本在中性甲醛溶液中固定至少3天，然后置于100g/l EDTA-Tris缓冲液中脱钙，每周更换脱钙液1次，以大头针能无阻力刺进骨密质为完全脱钙标准。脱钙完全后，再逐级脱水，用二甲苯透明，石蜡包埋切片，并沿冠状位切开，切片厚度约为4μm，切片后进行常规HE染色，光学显微镜下观察。

### 第二节 实验结果

长期慢性造模后，大鼠一般行为学表现未见异常。股骨头标本形态观察发现，慢性激素性股骨头坏死模型组标本显示其软骨表面不光滑、色晦暗而有皱缩、软骨厚度明显变薄、有部分软骨表面剥落、表面有明显异常着色区、且骨质硬度减小。组织病理学结果如图3所示：长期激素造模的雌鼠和雄鼠股骨头均出现软骨细胞大量减少、排列紊乱，软骨基质不均匀，出现许多肥大细胞，软骨表面有纤维结缔组织增生，偶见片状软骨钙化；骨小梁稀疏、变细、变窄、断裂或被分解成云片状，骨细胞肿大、空虚骨陷窝增多；骨髓几乎全被脂肪细胞所取代，髓腔内脂肪细胞增大、融合呈泡状（图3）。

10

## 三 、 分析与讨论

#### （一）激素联合内毒素造模的科学性

激素是非创伤性骨坏死的一个明确主因，其诱发机制可能与骨髓基质细胞向脂肪细胞诱导分化以及成骨细胞分化减少有关。随着大量激素的使用，血管内膜炎症发生、骨髓内脂肪细胞增生肥大、骨组织局部炎性水肿引起的骨内压增高能通过相互作用，共同导致股骨头坏死。然而，单纯应用激素只能造成骨质疏松，并不会必然导致激素性股骨头坏死，除非患者存在潜在的激素易感性疾病。在临床上，感染性休克、肾病综合征、系统性红斑狼疮等是容易导致激素性股骨头坏死的疾病，这些疾病的共同特点是在激素使用前已存在前凝血状况。研究人员发现，利用Shwartzman反应首先造成动物的前凝血状态，再使用大剂量激素能造成典型的激素性股骨头坏死模型，并且符合临床特征。内毒素能使机体处于高凝状态或引发凝血过程，这种异常的凝血状态能迅速被激素激活而引起血管内凝血和局部缺血，加上股骨头的血供处于循环末端，致使股骨头成为激素性股骨头坏死的优发部位。因此，激素联合内毒素造模能更贴切临床激素性股骨头坏死发生过程，适用于骨坏死相关的实验研究。

#### （二）动物以及激素因素对激素性股骨头坏死模型的影响

由于激素性股骨头坏死模型没有统一标准，易受到动物、激素以及其他因素影响，本章对激素诱导时间以及动物性别这两个因素开展研究，结果表明，动物性别对模型成功率的影响不显著，无论是雌鼠还是雄鼠，都能用激素联合内毒素的方法造成急性或慢性股骨头坏死模型；短期（3次）或长期（12次）激素造模法都能成功引起大鼠激素性股骨头坏死，但不同诱导时间对疾病模型的程度有一定影响，长期应用激素构建的慢性模型在组织病理学上表现更显著，随处可见骨髓出现大片坏死，被髓腔内大量的脂肪细胞所取代（图3）。由于没有股骨头塌陷等明显组织病理学晚期特征，我们认为上述两种造模方法一般可用于制造早、中期激素性股骨头坏死动物模型。其中短期应用激素造成的急性模型可代表临床更早期阶段。本章研究将为激素性股骨头坏死动物模型的标准化制定提供科学依据。

11

# 第二部分 激素性股骨头坏死对大鼠行为学的影响引言

行为学研究是以动物的行为表现来研究疾病症状以及药物整体作用的实验方法。中

医临床辩证认为激素性股骨头坏死的本质为肾阳虚，阳虚的症状有腰酸、四肢发冷、畏寒，也就是说表现为“寒”的症状，此外肾阳虚还会使大脑皮层兴奋性减弱，引起情绪消沉。虽然动物无法表现人的思维、认识与心境，但神经精神活动（情绪）的基础——神经解剖、生理及生化与人是相似的，所以动物的行为可以用来表现药物对精神活动的作用。本实验选择抓力作为反映激素性股骨头坏死模型大鼠肾阳虚腰膝酸软的一个指标，采用大鼠抓力测定仪进行量化观察；选择自主活动和悬尾时间反映阳虚精神活动状态的指标，采用大鼠自主活动检测装置和悬尾测试仪进行量化观察，研究激素性股骨头坏死模型的上述行为学指标是否发生改变。

### 第一节 材料与方法

#### （一） 实验材料

##### **1.** 实验动物

成年健康清洁级Wistar大鼠，体重200±10g，雌雄各半，浙江中医药大学实验动物中心提供，在清洁级动物实验条件下饲养：正压屏障系统，空气经过3级过滤，空气洁净度达万级；室温21~23°C；相对湿度30~70%; 12/12小时日夜交替循环光照，每日自由摄取自来水和标准饲料，每个标准笼饲养5只。

##### **2.** 实验药品

大肠杆菌内毒素，（0.5ml/瓶，生产批号：L2880，生产厂家：Sigma公司，美国），用生理盐水配成2μg/ml的溶液，备用。

甲基强的松龙，（0.5g/瓶，生产批号：X09312，进口药品注册证号：H20080285，生产厂家：Pfizer公司，美国），用生理盐水配成4μg/ml的溶液，备用。

##### **3.** 实验器材

LP123型电子天平（常熟市衡器厂）；YSL-13A大小鼠抓力测定仪（ft东省医学科学院设备供应维修站）；YLS-18A悬尾测试仪（济南益延科技发展有限公司）等。

#### （二） 实验方法

##### **1.** 动物选择与分组

12

取成年健康清洁级Wistar大鼠40只，雌雄各半，适应性喂养1周后精确称重，采用随机数字表法分组、编号，分别设雄性正常组、雌性正常组、雄性模型组、雌性模型组，每组10只。

##### **2.** 模型制备

模型组20只Wistar大鼠按20μg/kg剂量经腹腔注射大肠杆菌内毒素2次，每次须间隔24h，第2次注射大肠杆菌内毒素24h后，再按40mg/kg剂量经大鼠双侧臀肌注射甲基强的松龙，连续注射3次，每次间隔24h。

##### **3.** 检测指标

3.1体重：造模7天后连续观察大鼠体重变化。

3.2抓力：抓力量化“腰膝酸软”：抓持动物尾根处，待动物用力抓住抓力板时及时加力后拉，测到最大抓力，测定三次，取其平均值。

3.3自主活动时间将动物置于自主活动仪预适应10min后，记录5 min内活动次数。

3.4悬尾时间将大鼠置悬尾测试仪上，测定悬尾活动时间。

**1.** **体重**

### 第二节 实验结果

如图4所示，与正常组大鼠比较，模型组大鼠在激素造模7天后体重明显下降，而后呈缓慢增长趋势，总体模型组大鼠体重低于正常组。雄鼠与雌鼠之间无差异。

**2. 抓力**

由表1可知，与正常组大鼠比较，模型组大鼠抓力组显著降低（P<0.05）。

**表 1** 正常组与模型组大鼠的抓力比较

Table 1 Comparison of grip strength between normal and model rats.

| 组别 | 抓力/g |
| --- | --- |
| 正常组 | 738.13±120.49 |
| 模型组 | 609.25±39.96 △ |

注：与正常组比较，△P<0.05

**3. 自主活动**

由表2可知，与正常组大鼠比较，模型组大鼠自主活动次数显著降低（P<0.01）。

13

**表 2** 正常组与模型组大鼠的抓力比较

Table 2 Comparison of spontaneous activity between normal and model rats.

| 组别 | 自主活动/次 |
| --- | --- |
| 正常组 | 104.10±23.22 |
| 模型组 | 78.50±12.95 △△ |

注：与正常组比较，△△P<0.01

**4. 悬尾时间**

由表3可知，与正常组大鼠比较，模型组大鼠悬尾时间明显缩短（P<0.05）。

**表 3** 正常组与模型组大鼠的悬尾时间比较

Table 3 Comparison of tail-suspension time between normal and model rats.

| 组别 | 悬尾时间/s |
| --- | --- |
| 正常组 | 180.50±62.72 |
| 模型组 | 120.11±68.30 △ |

注：与正常组比较，△P<0.05

### 第三节 分析与讨论

《医经精义》曰：“肾藏精，精生髓，髓生骨，故骨者肾之所含也；髓者，肾精所生，精足则髓足；髓在骨内，髓足则骨强。”立足于机体的整体辩证理论出发，外源性激素造成的大鼠肾阴虚状态是暂时作用，为标；而肾阳虚为根本病证，为本。

《灵枢・本神》曰：“肾藏精，精舍志”。肾藏精，是指精为神之宅，“志”藏于肾精，且受它的涵养，故有精舍志。《素问・调经论》谓：“肾藏志”。肾藏志是指人的部分情志活动与肾有密切的相关性。“志”在中医学理论中内涵有广义和狭义之分，广义之“志”泛指人各种情志活动，亦包括人体所有心理活动；狭义之“志”，主要指意志、记忆、部分情志活动等。现一般指狭义之“志”。中医认为，肾阳虚会导致肾精不足，而肾精不足会使情志活动出现异常，表现为精神萎靡不振，意志消沉，神情呆滞，行动迟钝，对外界事物分析、识别能力下降等。

本实验模型组大鼠抓力较正常组大鼠显著下降，说明模型组大鼠出现腰膝酸软，暗示其存在肾阳虚症状；自主活动次数可反应动物精神状态，一般认为自主活动次数减少反应中枢神经系统受到“抑制”，增加则反应中枢神经系统受到“兴奋”，本实验模型组大鼠自主活动次数较正常组大鼠明显减少，表明大鼠中枢神经受到抑制；悬尾时间亦是

14

反应大鼠情志活动状态的一指标，其时间越长，说明大鼠的抗抑郁越强，本实验模型大鼠悬尾时间较正常组大鼠明显降低，再次提示大鼠中枢神经受抑制。通过测定大鼠抓力

———量化大鼠“腰膝酸软”，自主活动与悬尾时间———量化“精神萎靡不振”，从整体评价大鼠的情志活动状态可知，模型大鼠可能肾阳虚，且由肾阳虚情志活动受到抑制。本研究首次阐述了激素性股骨头坏死对动物行为学的影响，并从中医理论予以解释，为激素性股骨头坏死及其相关药物的整体评价奠定基础。

15

# 第三部分 侧耳子实体水提物对SANFH大鼠的药效作用研究

引 言

股骨头坏死的早期保守治疗是对抗该疾病的最佳策略，可避免人工关节置换所带来的一系列问题。然而目前临床尚未开发出相关特效药，无法满足其保守治疗的需求。中医理论认为，股骨头坏死尤其激素性股骨头坏死是药毒损肾蚀骨的结果，患者多表现肾阳虚。临床上，许多医家都采用补肾壮阳、益骨生髓、舒筋活络等治法治疗股骨头坏死，取得一定疗效。作为保守治疗的主要手段，中药具有药效作用缓和，副作用小等优势。侧耳作为常见的食药用菌类中药，具有补肾壮阳、舒筋活络、补胃理气等功效，适用于

“骨痹”等证的治疗。据此，本研究建立激素性股骨头坏死早期模型，以中医对证用药为原则，从行为学和组织病理学角度评价侧耳子实体对股骨头坏死的药效作用。为探索开发抗股骨头坏死的特色高效中药新药提供科学依据。

### 第一节 材料与方法

#### （一） 实验材料

##### **1.** 实验动物

成年健康清洁级Wistar大鼠，体重200±10g，雌雄各半，浙江中医药大学实验动物中心提供，在清洁级动物实验条件下饲养：正压屏障系统，空气经过3级过滤，空气洁净度达万级；室温21~23°C；相对湿度30~70%；12/12小时日夜交替循环光照，每日自由摄取自来水和标准饲料，每个标准笼饲养5只。

##### **2.** 实验药品

2.1造模药

大肠杆菌内毒素，（0.5ml/瓶，生产批号：L2880，生产厂家：Sigma公司，美国），用生理盐水配成2μg/ml的溶液，备用。

甲基强的松龙，（0.5g/瓶，生产批号：X09312，进口药品注册证号：H20080285，生产厂家：Pfizer公司，美国），用生理盐水配成4μg/ml的溶液，备用。

2.2受试药

受试药为真菌类担子菌纲白蘑科的食药用真菌侧耳的子实体，购至东北某野生菌生产基地。水提液制备工艺：取侧耳子实体干品加10倍量水浸泡1h，煎煮1.5h/次，提取

2次，将所得提取液趁热用四层纱布过滤，而后旋蒸浓缩得到1 g/ml浓度的侧耳水提物，

16

放置4ºC冰箱冷藏，备用。

阿仑膦酸钠（商品名福善美，杭州默沙东药厂生产），用双蒸水配成1mg/kg灌胃给药，备用。

##### **3.** 实验器材

大鼠灌胃针；注射器；组织脱水机；组织包埋机；Leica SM 2500硬组织切片机；冷冻切片机；Olympus SZX 12体视显微镜；AXiovert 200荧光倒置显微镜；LP123型电子天平（常熟市衡器厂）；YSL-13A大小鼠抓力测定仪（ft东省医学科学院设备供应维修站）；YLS-18A悬尾测试仪（济南益延科技发展有限公司）

#### （二） 实验方法

##### **1.** 动物选择与分组

取成年健康清洁级Wistar大鼠80只，雌雄各半，适应性喂养1周后精确称重，采用随机数字表法分组、编号，分别设正常组、模型组、阿仑膦酸钠组、侧耳水提物组，雌雄各半，每组20只。

##### **2.** 模型制备

除正常组外所有大鼠按20μg/kg剂量经腹腔注射大肠杆菌内毒素2次，每次须间隔

24h。第2次注射大肠杆菌内毒素24h后，再按40mg/kg剂量经大鼠双侧臀肌注射甲基强地松龙，连续注射3次，每次间隔24h。

##### **3.** 给药方法

各组动物每日灌胃一次，灌胃容积均为1ml/100g，连续6周。正常对照组和模型对照组给予相应体积的水。侧耳子水提物组剂量以5g生药/kg灌胃给药，阿仑膦酸钠组剂量以1mg/kg灌胃给药。

##### **4.** 检测指标

4.1一般行为学：每周对各组大鼠进行一般状态的观察和生理学指标的检测，包括状态、毛色、摄食、饮水、体重等。

4.2抓力：抓力量化“腰膝酸软”：抓持动物尾根处，待动物用力抓住抓力板时及时加力后拉，测到最大抓力，测定三次，取其平均值。

4.3自主活动时间：将动物置于自主活动仪预适应10min后，记录5 min内活动次数。

4.4悬尾时间：将大鼠置悬尾测试仪上，测定悬尾活动时间。

4.5组织病理学：将冠状面切开的样本在中性甲醛溶液中固定至少3天，然后置于100g/l EDTA-Tris缓冲液中脱钙，每周更换脱钙液1次，以大头针能无阻力刺进骨密质为完全

17

脱钙标准。脱钙完全后，再逐级脱水，用二甲苯透明，石蜡包埋切片，并沿冠状位切开，切片厚度约为4μm，切片后进行常规HE染色，光学显微镜下观察。

##### **1.** 一般行为学

### 第二节 实验结果

各组行为学表现未见异常，其精神状态、毛色、摄食、饮水量等指标没有显著的组间差异。如图5所示，模型组大鼠体重在第7天明显降低，而各给药组对体重的改善作用并不明显。

**2. 抓力**

由表4可知，与正常组比较，模型组大鼠抓力显著降低（*P*<0.05），与模型组比较，阿仑膦酸钠组大鼠抓力无明显变化，侧耳水提物组大鼠抓力显著改善（*P*<0.05），接近正常水平。结果见表4、图6。

**表4** 侧耳水提物对激素性股骨头坏死大鼠抓力的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 剂量/g·kg -1 | 抓力/g |
| 正常组 | — | 738.13±120.49 |
| 模型组 | — | 609.25±39.96 △ |
| 阿仑膦酸钠组 | 0.001 | 567.40±81.22 |
| 侧耳水提物组 | 5 | 671.00±72.51 \* |

**Table 4.** Effect of *Pleurotus ostreatus* on the grip strength of SANFH rats.

注：与正常组比较，△P<0.05；与模型组比较，\*P<0.05

**3. 自主活动时间**

由表5 可知，与正常组比较，模型组大鼠自主活动次数显著降低（*P*<0.01），与模型组比较，阿仑膦酸钠组大鼠自主活动次数无明显变化，侧耳水提物组明显改善大鼠自主活动，活动次数显著升高（*P*<0.05）。结果见表5、图7。

**表5** 侧耳水提物对激素性股骨头坏死大鼠自主活动的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 剂量/g·kg -1 | 自主活动/次 |
| 正常组 | — | 104.10±23.22 |
| 模型组 | — | 78.50±12.95 △△ |
| 阿仑膦酸钠组 | 0.001 | 84.10±17.42 |
| 侧耳醇提物组 | 5 | 98.60±13.33 ＊＊ |

**Table 5.** Effect of *Pleurotus ostreatus* on the spontaneous activity of SANFH rats.

注：与正常组比较，△△P<0.01；与模型组比较，\*\*P<0.01

18

**4. 悬尾时间**

由表6 可知，与正常组比较，模型组大鼠悬尾时间显著降低（*P*<0.05），与模型组比较，阿仑膦酸钠组大鼠悬尾时间无明显变化，侧耳水提物组对大鼠悬尾时间有明显改善作用，能显著延长悬尾时间（*P*<0.05）。结果见表6、图8。

**表6** 侧耳水提物对激素性股骨头坏死大鼠悬尾时间的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 剂量/g·k g-1 | 悬尾时间/s |
| 正常组 | — | 180.50±62.72 |
| 模型组 | — | 120.11±68.30 △ |
| 阿仑膦酸钠组 | 0.001 | 167.20±58.08 |
| 侧耳水提物组 | 5 | 186.80±83.11 ＊ |

**Table 6.** Effect of *Pleurotus ostreatus* on the tail-suspension time of SANFH rats.

注：与正常组比较，△P<0.05；与模型组比较，\*P<0.05

**5. 组织病理学**

如图9所示，正常组：软骨表面光滑、软骨细胞排列整齐、软骨基质均匀、无纤维化增生（图9A），骨小梁完整无断裂或云片状改变、排列规则、骨细胞正常且清晰可见、

Zhi ku quan 20150807

无空骨陷窝，骨髓正常、髓腔无异常空泡（图9B）；模型组：软骨表面部分纤维化、软

骨基质不均一、软骨细胞稀疏且排列紊乱（图9C），骨小梁呈断裂或云片状、结构紊乱、骨细胞肿大、空骨陷窝增多，髓腔可见脂肪细胞（图9D）；阿仑膦酸钠组：软骨表面完整、软骨细胞稀疏且排列紊乱（图9E），骨小梁变窄、骨细胞肿大且排列紊乱、空骨陷窝增多，髓腔可见大面积空泡（图9G）；侧耳水提物组：软骨表面光滑、软骨细胞未见减少且排列整齐、软骨基质均匀且无纤维化病变（图9H），骨小梁完整、无变窄或断裂、结构排列整齐、骨细胞正常可见、无空骨陷窝，骨髓、髓腔正常（图9I）。

### 第三节 分析与讨论

目前，中医药防治股骨头坏死的作用越来越受到重视。本研究中，药食同源的侧耳作为补肾壮阳、舒经活络中药，其水提物能对激素性股骨头坏死大鼠模型发挥显著作用，能逆转股骨头坏死的病理发展，表现为软骨、骨小梁、骨细胞、髓腔等结构较模型组有较大改善，甚至与正常组无异。此外，侧耳水提物对模型大鼠的行为学指标也有显著改善作用，提示其能发挥整体药效作用。股骨头坏死在临床上缺乏特效药，因而本研究选用骨质疏松症常用药阿仑膦酸钠为阳性对照药。结果显示，尽管阿仑膦酸钠能有效治疗

19

骨质疏松，但却对激素性股骨头坏死模型无显著药效作用，不仅不能逆转股骨头坏死的病理改变，对股骨头坏死引起的行为学异常也无明显改善作用，其药效作用远不及侧耳水提物。综上所述，本实验为激素性股骨头坏死的防治提供了新的思路，在此基础上，可进一步开发研究抗股骨头坏死的中药新药。

Zhi ku quan 20150807

20

# 第四部分 侧耳子实体醇提物对**SANFH**大鼠的药效作用研究引言

侧耳子实体俗称平菇，也是常见的食用菌，传统上并不像普通中药一般以水煎液服入，而是以吞服为主。侧耳水提物多含有大极性分子，包括真菌多糖等成分，但无法提出所有极性成分。因此，本实验在侧耳水提过后进一步采用醇提的方法，可获得剩余活性物质。通过本研究能对侧耳所有活性成分在抗股骨头坏死方面的潜力进行评价，为侧耳药用价值的开发提供支持。

### 第一节 材料与方法

#### （一） 实验材料

##### **1.** 实验动物

成年健康清洁级Wistar大鼠，体重200±10g，雌雄各半，浙江中医药大学实验动物中

心提供，在清洁级动物实验条件下饲养：正压屏障系统，空气经过3级过滤，空气洁净度达万级；室温21~23°C；相对湿度30~70%；12/12小时日夜交替循环光照，每日自由摄

Zhi ku quan 20150807

取自来水和标准饲料，每个标准笼饲养5只。

##### **2.** 实验药品

2.1造模药

大肠杆菌内毒素，（0.5ml/瓶，生产批号：L2880，生产厂家：Sigma公司，美国），用生理盐水配成2μg/ml的溶液，备用。

甲基强的松龙，（0.5g/瓶，生产批号：X09312，进口药品注册证号：H20080285，生产厂家：Pfizer公司，美国），用生理盐水配成4μg/ml的溶液，备用。

2.2受试药

受试药为真菌类担子菌纲白蘑科的食药用真菌侧耳的子实体，购至东北某野生菌生产基地。醇提液制备工艺：取侧耳子实体干品加10倍量水浸泡1h，煎煮1.5h/次，提取

2次，用四层纱布过滤回收剩余药渣，加入10倍量95%乙醇煮沸提取1h/次，提取2次，

所得提取液趁热用四层纱布过滤，而后旋蒸浓缩得到1 g/ml浓度的侧耳醇提物，放置 4

ºC冰箱冷藏，备用。

阿仑膦酸钠（商品名福善美，杭州默沙东药厂生产），用双蒸水配成1mg/kg灌胃给药，备用。

21

##### **3.** 实验器材

大鼠灌胃针；注射器；组织脱水机；组织包埋机；Leica SM 2500硬组织切片机；冷冻切片机；Olympus SZX 12体视显微镜；AXiovert 200荧光倒置显微镜；LP123型电子天平（常熟市衡器厂）；YSL-13A大小鼠抓力测定仪（ft东省医学科学院设备供应维修站）；YLS-18A悬尾测试仪（济南益延科技发展有限公司）

#### （二） 实验方法

##### **1.** 动物选择与分组

取成年健康清洁级Wistar大鼠80只，雌雄各半，适应性喂养1周后精确称重，采用随机数字表法分组、编号，分别设正常组、模型组、阿仑膦酸钠组、侧耳醇提物组，雌雄各半，每组20只。

##### **2.** 模型制备

除正常组外所有大鼠按20μg/kg剂量经腹腔注射大肠杆菌内毒素2次，每次须间隔

24h。第2次注射大肠杆菌内毒素24h后，再按40mg/kg剂量经大鼠双侧臀肌注射甲基强地松龙，连续注射3次，每次间隔24h。

##### **3.** 给药方法

各组动物每日灌胃一次，灌胃容积均为1ml/100g，连续6周。正常对照组和模型对照组给予相应体积的水。侧耳醇提物组剂量以5g生药/kg灌胃给药，阿仑膦酸钠组剂量以1mg/kg灌胃给药。

##### **4.** 检测指标

4.1 一般行为学 每周对各组大鼠进行一般状态的观察和生理学指标的检测，包括状态、毛色、摄食、饮水、体重等。

4.2 抓力 抓力量化“腰膝酸软”：抓持动物尾根处，待动物用力抓住抓力板时及时加力后拉，测到最大抓力，测定三次，取其平均值。

4.3 自主活动时间 将动物置于自主活动仪预适应 10min 后，记录 5 min 内活动次数。

4.4 悬尾时间 将大鼠置悬尾测试仪上，测定悬尾活动时间。

4.5 组织病理学 将冠状面切开的样本在中性甲醛溶液中固定至少3 天，然后置于100g/l EDTA-Tris 缓冲液中脱钙，每周更换脱钙液 1 次，以大头针能无阻力刺进骨密质为完全脱钙标准。脱钙完全后，再逐级脱水，用二甲苯透明，石蜡包埋切片，并沿冠状位切开， 切片厚度约为 4 μm，切片后进行常规 HE 染色，光学显微镜下观察。

22

##### **1.** 一般行为学

### 第二节 实验结果

各组行为学表现未见异常，其精神状态、毛色、摄食、饮水量等指标没有显著的组间差异。如图10所示，模型组大鼠体重在第7天明显降低，而各给药组尤其是侧耳醇提物组对体重没有改善作用。

**2. 抓力**

由表7可知，与正常组比较，模型组大鼠抓力显著降低（*P*<0.05），与模型组比较，阿仑膦酸钠组大鼠抓力无明显变化，侧耳醇提物组大鼠抓力略有升高，但无统计学意义

（*P*> 0.05）。

**表7** 侧耳醇提物对激素性股骨头坏死大鼠抓力的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 剂量/g·kg -1 | 抓力/g |
| 正常组 | — | 738.13±120.49 |
| 模型组 | — | 609.25±39.96 △ |
| 阿仑膦酸钠组 | 0.001 | 567.40±81.22 |
| 侧耳醇提物组 | 5 | 616.00±83.78 |

**Table 7.** Effect of *Pleurotus ostreatus* on the grip strength of SANFH rats.

注：与正常组比较，△P<0.05

**3. 自主活动时间**

由表8 可知，与正常组比较，模型组大鼠自主活动次数显著降低（*P*<0.01），与模型组比较，阿仑膦酸钠组和侧耳醇提物组大鼠自主活动次数均无明显变化。

**表8** 侧耳醇提物对激素性股骨头坏死大鼠自主活动的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 剂量/g·kg -1 | 自主活动/次 |
| 正常组 | — | 104.10±23.22 |
| 模型组 | — | 78.50±12.95 △△ |
| 阿仑膦酸钠组 | 0.001 | 84.10±17.42 |
| 侧耳醇提物组 | 5 | 90.50±18.04 |

**Table 8.** Effect of *Pleurotus ostreatus* on the spontaneous activity of SANFH rats.

注：与正常组比较，△△P<0.01

**4. 悬尾时间**

由表9 可知，与正常组比较，模型组大鼠悬尾时间显著降低（*P*<0.01），与模型组比较，阿仑膦酸钠组大鼠悬尾时间无明显变化，侧耳醇提物组大鼠悬尾时间有所升高

（*P*<0.05）。

23

**表9** 侧耳醇提物对激素性股骨头坏死大鼠悬尾时间的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 剂量/g·kg -1 | 悬尾时间/s |
| 正常组 | — | 180.50±62.72 |
| 模型组 | — | 120.11±68.30 △ |
| 阿仑膦酸钠 | 0.001 | 167.20±58.08 |
| 侧耳醇提组 | 5 | 175.20±54.54 ＊ |

**Table 9.** Effect of *Pleurotus ostreatus* on the tail-suspension time of SANFH rats.

注：与正常组比较，△P<0.05；与模型组比较，\*P<0.05

**5. 组织病理学**

如图11所示，侧耳醇提物组软骨表面不规则、有纤维化增生、软骨基质不均一、软骨细胞稀疏且排列紊乱（图11G），骨小梁断裂且结构紊乱、骨细胞肿大、空骨陷窝明显增多，髓腔内充斥大量脂肪细胞（图11H）。与模型组相比说明其病理状况无明显改善，与正常组有显著差异。

### 第三节 分析与讨论

侧耳作为药食同源的食用菌，往往以吞服的方式被吸收，因此除侧耳水提物内的水溶性有效成分外，还有不少小极性活性物质被机体吸收。为了验证水溶性成分以外的物质成分对股骨头坏死的可能作用，本研究对水提后的药渣进行醇提处理，得到侧耳醇提物。然而，药效学研究表明，侧耳醇提物对激素性股骨头坏死大鼠模型没有明显改善作用，无论在组织病理学还是动物行为学方面，均较模型组无明显差异。因此本研究证明，侧耳对激素性股骨头坏死的药效物质成分主要在其水提物中，可能与真菌多糖等大极性分子有关，为侧耳抗股骨头坏死的药效物质基础研究以及相关新产品开发奠定基础。

24

总结

（1）激素联合内毒素能成功构建大鼠激素性股骨头坏死模型；

（2）雌、雄大鼠对同一造模方法的反应相同，激素性股骨头坏死模型不受雌鼠激素代谢的拮抗作用干扰；

（3）短期和长期应用激素都能造成大鼠股骨头坏死，其中短期模型代表临床更早期病理阶段。

（4）激素性股骨头坏死能改变动物行为学指标，可能与肾阳虚证有关；

（5）侧耳水提物对激素性股骨头坏死早期模型有显著治疗作用，且能改善大鼠行为学指标，发挥整体药效作用；

（6）侧耳醇提物对激素性股骨头坏死大鼠模型没有治疗作用，也没有明显改善行为学指标的效果，说明侧耳抗股骨头坏死相关的药效物质主要是水溶性成分，集中在其水提物中。

25

参考文献

[1] Malizos KN, Karantanas AH, Varitimidis, et al. Osteonecrosis of the femoral head: etiology, imaging and treatment[J]. Eur J Radiol, 2007, 63(1): 16-28.

[2] Mont MA, Hungerford DS. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg Am, 1995, 77(3): 459-474.

[3] Seguin C, Kassis J, Busque L, et a1. Non-traumatic necosis of bone (osteonecrosis) is associated with endothelial cell activation but not thrombophilia [J]. Rheumatology(Oxford), 2008, 47(8): 1151-1155.

[4] Calder JD, Buttery L, Revell PA, et a1. Apoptosis-a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg Br, 2004, 86(8): 1209-1213.

[5] Drescher W, Schneider T, Becker C, et a1. Selective reduction of bone blood flow by short-term treatment with high-dose methylprednisolone. An experimental study in pigs[J]. J Bone joint surg Br, 2001, 83(2): 274-277.

[6] Mont MA, Marulanda GA, Jones LC, et a1. Systematie analysis of classification systems for osteonecrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg(Am), 2006, 88(Suppl 3): 16-26.

[7] Ficat RP, Arlet J. Necrosis of the femoral head [M] //Hungerford DS. Ischemia and necrosis of bone. Baltimore: William and Wilkins, 1980: 53-74.

[8] Assosiation Research Circulation Osseous. Committee on Terminology Classification[J]. ARCO News, 1992, 4(1): 41-46.

[9] Lieberman JR, Berry DJ, Mont MA, et a1. Osteonecrosis of the hip: management in the 21st century[J]. Insr Course Lect, 2003, 52: 337-355.

[10] Kang JS, Park S, Song JH, et a1. Prevalence of osteoneerosis of the femora1 head: a nationwide epidemiologic analysis in Korea[J]. J Arthroplasty, 2009, 24(8): 1178-1183.

[11] 孙凯, 陈卫衡, 刘建文. 股骨头坏死分期探讨[J]. 中华中西医学杂志, 2006, 4(12): 20-21.

[12] 何厚罗, 钱小路, 舒适. 中医治疗股骨头缺血性坏死临床研概况[J]. 河北中医, 2011, 33(2): 310-312.

[13] 李子荣, 张鹤ft. 股骨头坏死诊断与治疗的专家建议[J]. 中华骨科杂志, 2007, 27(2): 146-148.

[14] Boss JH, Misselevich I. Osteonecrosis of the femoral head of laboratory animals: the lessons learned from a comparative study of osteonecrosis in man and experimental animals[J]. Vet Pathol, 2003, 40(4): 345-354.

[15] Laporte DM, Mont MA. Moltifocal osteonecrosis[J]. J Rheumatol, 1998, 25(10): 1968-1974.

[16] Cruess RL. Osteonecrosis of bone. current concepts as to etiology and pathogenesis[J]. Clin Orthop Relat Res, l986, (208): 30-39.

[17] 赵金东, 吕松岑, 薛震. 激素性股骨头坏死动物模型的建立与评价[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2007, 6(4): 220-225.

[18] 王泳, 高春锦, 杨晋才, 等. 兔激素性股骨头坏死模型的建立[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(11): 2233-2234, 2239.26

[19] 张林波, 张桂珍, 杨海ft, 等. 激素性股骨头坏死动物模型的建立及影像学评价[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(3): 331-334.

[20] 杨建平, 王黎明, 徐燕, 等. 单次低剂量脂多糖联合甲基强的松龙诱导股骨头坏死的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(3): 271-275.

[21] 马信龙, 孙智超, 马剑雄. 改良型大鼠激素性股骨头坏死模型建立和相关评价[J]. 实用骨科杂志, 2009, 15(10): 760-763.

[22] 巩凡, 白志刚, 牛东生. 兔激素性股骨头坏死发生早期的性别差异[J]. 宁夏医学杂志, 2011, 33(3): 209-211.

[23] Ikemura S, Yamamoto T. Gender diference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits[J]. Rheumatology(Oxford), 2010, 49(6): 1128-1132.

[24] 贾卫斗, 杨搏贵. 股骨头负重区活检诊断早期股骨头坏死29例[J]. 人民军医, 1996, 39(2): 29.

[25] 陈宜, 祝云利, 吴海ft. 非创伤性股骨头坏死的国外研究治疗进展[J]. 中国矫形外科医学, 2010, 18(3): 230-233.

[26] 倪康裕, 杨瑞英, 郑国洪. 避开负重区空心钉内固定减少股骨头坏死的探讨[J]. 现代实用医学, 2006, 18(12): 894-895.

[27] 原晓景, 徐达传, 李立新, 等. 介入治疗早期激素性股骨头缺血性坏死12例[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2006, 21(6): 461-463.

[28] 路萍, 张雄军, 王永志, 等. 激素性股骨头坏死介入治疗的临床疗效分析[J]. 云南医药, 2011, 32(2): 217-219.

[29] 姚凤春, 张琼. 高压氧治疗激素使用后的股骨头坏死[J]. 中国康复, 201025(1): 53-54.

[30] 马瑛, 黄春燕. 股骨头坏死的高压氧治疗与护理[J]. 中外医学研究, 2009, 7(7): 120.

[31] Song WS, Yoo JJ, Kim YM, et a1. Results of multiple drilling compared with those of conventional methods of core decompression[J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 454: 139-146.

[32] 张念非, 李子荣, 杨连发, 等. 经股骨粗隆部旋转截骨术治疗股骨头坏死[J]. 中华外科杂志, 2004, 42(24): 1477-1480.

[33] Lieberman JR, Conduah A, Urist MR. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with core decompression and human bone morphogenetic protein[J ]. Clin Orthop Relat Res, 2004, (429): 139-145.

[34] 袁琼. 20例人工髋关节置换术后并发症的诊断治疗[J]. 按摩与康复医学, 2011, 2(12): 155.

[35] 杨镇源, 王刚, 刘德玉. 中医药治疗激素性股骨头坏死研究概况[J]. 光明医学, 2008, 23(9): 1393-1394.

[36] 金武勇, 孟庆才, 卢勇, 等. 中医辨证分期治疗股骨头坏死262例疗效观察[J]. 国医论坛, 2011, 26(2): 26-27.

[37] 江彬锋, 万剑利, 俞楠泽, 等. 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.

[38] 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): 115-117.27

[39] 吴承亮, 季卫锋, 俞索静. 右归饮对家兔激素性股骨头坏死骨髓脂肪化的影响[J]. 中医正骨, 2006, 18(7): 4-5.

[40] 徐强, 石义刚. 自拟壮骨液防治激素致股骨头缺血性坏死30例[J]. 中医药学报, 2003, 31(1): 49.

[41] Feng Y, Wu Z, Zhou X, et al. Knowledge discovery in traditional Chinese medicine: state of the art and perspectives[J]. Artif Intell Med, 2006, 38(3): 219-236.

[42] 《中华本草》编委会. 中华本草（第一卷）. 上海科学技术出版社, 1999, pp579.

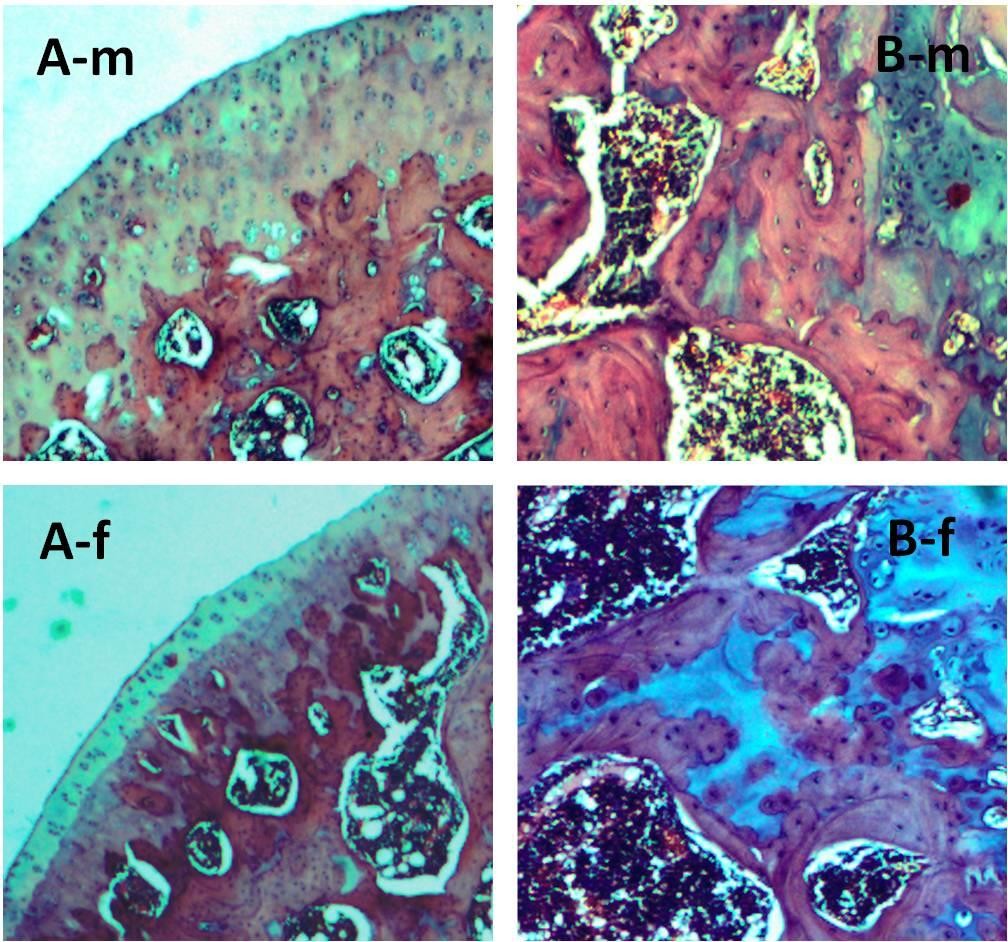
[43] 付连江, 沈会生. 侧耳治疗高血脂症的临床观察[J]. 中草药, 1999, 30(6): 447-448.

[44] Suseem SR, Mary Saral A, Neelakanda Reddy P, et al. Evaluation of the analgesic activity of ethyl acetate, methanol and aqueous extracts of Pleurotus eous mushroom[J]. Asian Pac J Trop Med, 2011, 4(2): 117-120.

[45] Jedinak A, Dudhgaonkar S, Wu QL, et al. Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF-κB and AP-1 signaling[J]. Nutr J, 2011, 10: 52. Han EH, Hwang YP, Kim HG, et al. Inhibitory effect of Pleurotus eryngii extracts on the activities of allergic mediators in antigen-stimulated mast cells[J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(6): 1416-1425.

28

## 附图



**图1** 正常组大鼠股骨头病理切片. 雄鼠: A-m, B-m; 雌鼠: A-f, B-f. HE×100

**Fig. 1.** Histopathological observation of normal rat femoral head (haematoxylin and eosin staining). Male: A-m, B-m; Female: A-f, B-f.

29



**图2** 急性激素性股骨头坏死模型大鼠股骨头病理切片. 雄鼠: A-m, B-m; 雌鼠: A-f, B-f. HE×100

**Fig. 2.** Histopathological observation of acute SANFH rat femoral head (haematoxylin and eosin staining).

Male: A-m, B-m; Female: A-f, B-f.

30



**图3**慢性激素性股骨头坏死模型大鼠股骨头病理切片. 雄鼠: A-m, B-m;雌鼠: A-f, B-f. HE×100 **Fig. 3.** Histopathological observation of chronic SANFH rat femoral head (haematoxylin and eosin staining). Male: A-m, B-m; Female: A-f, B-f.

31



**图4** 激素性股骨头坏死模型对雌、雄大鼠体重的影响

**Fig.** **4.** Body weight of male and female rats in normal group and model group.



**图5** 侧耳水提物对激素性股骨头坏死模型大鼠体重的影响

**Fig.** **5.** Body weight of male and female rats with SANFH after treatments.



**图6** 侧耳水提物对股骨头坏死模型大鼠抓力的影响. 与正常组比较△P<0.05；与模型组比较\*P<0.05

**Fig.** **6.** Effect of *Pleurotus ostreatus* on the grip strength of SANFH rats.

32



**图7** 侧耳水提物对股骨头坏死模型大鼠自主活动的影响. 与正常组比较△△P<0.01；与模型组比较

\*\*P<0.01

**Fig.** **7.** Effect of *Pleurotus ostreatus* on the spontaneous activity of SANFH rats.



**图8** 侧耳水提物对激素性股骨头坏死模型大鼠悬尾时间的影响. 与正常组比较△P<0.05；与模型组比较\*P<0.05

**Fig.** **8.** Effect of *Pleurotus ostreatus* on the tail-suspension time of SANFH rats.

33



**图9**侧耳对激素性股骨头坏死大鼠的病理观察. 正常组：A-B；模型组：C-D； 阿仑膦酸钠组：E-G； 侧耳水提物组：H-I. HE×100

**Fig.** **9.** Histopathological observation of SANFH rat femoral head after treatments.

34



**图10** 侧耳醇提物对激素性股骨头坏死模型大鼠体重的影响

**Fig.** **10.** Body weight of male and female rats with SANFH after treatments.

35



**图11**侧耳对激素性股骨头坏死大鼠的病理观察. 正常组：A-B；模型组：C-D； 阿仑膦酸钠组：E-F； 侧耳醇提物组：G-H. HE×100

**Fig.** **11.** Histopathological observation of SANFH rat femoral head after treatments.

36

致谢

光阴似箭，时光飞逝，转眼间研究生生活即将结束。在这些年的学习生活中付出亦多，收获亦多。值此论文完成之际，首先要衷心感谢我的导师童培建教授。感谢导师在面对浩瀚的医学知识海洋时，授我以鱼的同时，更注重授我以渔，使我培养了一定的科研思路，开阔了视野，锻炼了学习、工作能力。在此，我向导师致以真挚的敬意和谢意！衷心感谢单乐天老师、金红婷老师在百忙之中对本课题设计及研究过程等提出了宝

贵的意见和悉心指导，您们那严谨的治学作风对我影响深刻，是我今后学习和工作上的榜样。

衷心感谢章娜英老师、孔丽娅老师、徐春男老师，在论文的撰写过程中热心的指导和帮助。

师恩深重，您们的言传身教将是我一生受用不尽的财富，实非一谢可达。唯有把

您们精湛的医术、高尚的医德、严谨的治学作风及对中医的热爱渗透于我今后的工作和学习之中，并伴我一生。

37

## 文献综述

**股骨头坏死的防治研究进展**

股骨头坏死（Avascular Necrosis of Femoral Head, ANFH）又称股骨头缺血性坏死，为常见的骨关节病，是股骨头血液供应被破坏所造成的最终结果，为骨伤科领域最常见的疑难疾病之一[1]。随着病情进展可引起软骨下骨和关节面的塌陷，晚期将引起严重的关节疼痛及功能障碍，最终不得不接受人工关节置换。给患者带来严重的身心损害和经济负担，引起了国内外学者的广泛关注[2]。

**1. 股骨头坏死的诊断**

股骨头坏死是一种发病率较高的进展性疾病，随着病情的进展，常继发股骨头塌陷和骨性关节炎，出现难以忍受的疼痛和关节强直。临床上将ANFH分为两类：创伤性股骨头坏死和非创伤性股骨头坏死。前者的发病机理较为明确，即由创伤直接破坏股骨头血供，导致骨细胞发生缺血、缺氧，直至骨细胞、骨髓细胞死亡。后者发病机制较为复杂，主要有下列学说：氧化应激及微血管代谢紊乱学说[3]、骨细胞凋亡学说[4]、脂肪代谢紊乱学说[5]等，如今尚无定论。学者们普遍认为成人股骨头坏死是严重影响人们生存质量的一种常见病，早期诊断并积极治疗，对改善临床症状、最大限度保护关节功能至关重要。

**1.1股骨头坏死分期**

股骨头坏死分期对于股骨头坏死规范化治疗具有重要意义。目前，常用的分期方法有三种[6]，分别是Ficat-Arlet分期、国际骨循环研究学会分期（Assosiation Research Circulation Osseous, ARCO）和宾夕法尼亚大学分期。

Ficat-Arlet分期是1980年Ficat 和Arlet 综合分析ANFH 患者的X 线表现、骨扫描和骨功能等方面的表现后提出的，其具体内容是[7]：0期，没有典型症状，X 线正常，但在MRI、T1WI有单线征，在T2WI上有双线征；I期，X线正常或轻微异常，仅仅是感到关节的隐痛或不适，骨功能性检查可能检测出阳性结果；Ⅱ期，X线片表现为股骨头硬化、囊性变、骨质疏松，髓芯活检肯定有组织病理学的改变，临床症状明显。过渡期介于Ⅱ期和Ⅲ期之间的过渡期病损，表现为软骨下骨折（半月征）、股骨头局灶性变扁；Ⅲ期：X 线片上出现新月征，股骨头外形异常，关节间隙正常，临床症状加

38

重；Ⅳ期，X线片示股骨头塌陷、扁平及关节间隙狭窄等骨关节炎特征，临床症状疼痛明显，髋关节各方向活动明显受限。

ARCO分期是1992年ARCO综合Ficat-Arlet分期和日本骨坏死研究会分期，并结合MRI检查对坏死区进行定量分析后提出了ANFH的ARCO分期。其具体内容是[8]：0期：X线表现正常，骨扫描冷区，活检示骨坏死；I期，骨扫描阳性、MRI阳性或两者均呈阳性；Ⅱ期，X 线片可见股骨头硬化、囊性变、骨质疏松，在X线片及

CT 片上无股骨头塌陷，骨扫描阳性及MRI 阳性，髋臼无改变；Ⅲ期，出现新月征；

Ⅳ期，X 线片示股骨头扁平，关节间隙狭窄，髋臼硬化、囊性变、臼缘骨赘。其中I～

Ⅲ期根据坏死部位和坏死区大小又分为A、B、C三个亚型，A型股骨头受累小于15％ ，

B型股骨头受累15％～30％，C型股骨头受累大于30％。

宾夕法尼亚大学分期是2002年宾夕法尼亚大学的学者们依据股骨头坏死的其他检查方法并结合MRI表现，提出的新分期方法。该分期根据软骨下骨塌陷范围、股骨头变形程度和髋臼是否发生改变将ANFH分为7期，其具体内容是[9]：0 期，X 线片无异常，骨扫描和MRI正常，活检示骨坏死；I 期，X 线正常，骨扫描和/或MRI异常；

Ⅱ期，股骨头透亮影和硬化改变；Ⅲ期，出现新月征，但头无扁平；Ⅳ期，股骨头扁平；V期，关节间隙狭窄和/或髋臼软骨发生改变；VI期，晚期关节炎。其中，根据骨坏死范围将I～V期分为轻度（小于15％）、中度（15％～30％）和重度（大于30％）三个亚型。

Ficat-Arlet分期阐述了骨的功能性检查是早期诊断所不可缺少的，但该体系未强调对坏死范围的测量和定量检查。ARCO分期将ANFH的临床分期与坏死病变部位、坏死面积大小定量分析结合，对指导临床选择治疗方法和判断疾病预后有一定的作用。由于MRI检查在ANFH早期诊断以及对坏死区大小进行定量方面有较好的灵敏度和特异性，可对ANFH进行更加精确的定量分析，所以宾夕法尼亚大学分期方法也被越来越多学者所接受。但有学者指出7期分法过于复杂，可重复性和一致性差[10]。另有学者提出建议，认为应该修改ANFH分期。例如，孙凯等[11]研究证实ANFH的发生发展与血浆中的脂蛋白密切相关，提出将其增加到传统ANFH中来，认为早期开展血脂及凝血指标检查可以起到预警作用，确诊后可指导临床用药，同时，他们将ANFH分期进行了修正：

0期，高危人群中血脂和凝血异常；Ⅰ期，有症状，理学检查正常，生化检查异常；Ⅱ期，X 线有骨密度改变；Ⅲ期，软骨下塌陷；Ⅳ期，股骨头变平，关节间隙正常；Ⅴ期，

39

骨性关节炎。期望对早期诊断和早期治疗有更大的帮助。

**1.2中医诊断**

根据ANFH的发病部位、病因病机及证候特征，股骨头坏死当属中医“骨痹”、“骨痰”、“骨蚀”、“骸骨病”、“历节风”等范畴。在形态与病理机制方面，类似于《灵枢・刺带真邪篇》所描述的“骨蚀”以及《素问痿论》中的“骨痿”；在症状体征方面又与“骨痹”相符。据《素问・痰论》之“足之不任身，…腰脊不举，发为骨痪”及《灵枢・刺节骨蚀真邪篇》之“虚邪之人于身也深，寒与热相传，久留而内著…内伤骨为骨蚀”。根据ANFH不同发展阶段、不同病理改变，不同证候表现，其相应病名也不同。早期以瘀血、气血闭阻为基本病机，称之为“骸骨痹”、“骨痹”；晚期有股骨头塌陷、缺损，称之为“骨蚀”；而早期与晚期之间有髓减骨枯，筋骨痪软，则称之为“骨痰”。

为了使中医能够受到国内外的一致认同，最主要的就是研究出一个诊治的量化标准，而这需要我们更长久的探索。对于ANFH，有学者[11]期望根据血浆中脂蛋白的变化来评价ANFH各个分型，研究显示在痰瘀阻络型中，HDL-C、LDL-C及apoAI、apoB数值在各组中最低；在经脉痹阻型中，TC、TG、LDL-C及apoB数值在各组中最高；而肝肾亏虚型以HDL-C 及apoAI 数值最高。各组比较差异有显著性意义（P<0.05或

P<0.01）。气滞血瘀型中，APIT最高，PT和FIB最低；痰瘀阻络型中，FIB最高；经脉痹阻型中，PLT最高。肝肾亏虚型以PT最高，P LT及APTT最高。

中医认为ANFH与肝肾关系最为密切，病因主要是先天不足、后天失养、肝肾亏虚、外伤瘀阻、寒湿痹阻。病机为气血瘀滞，经脉失养[12]。其中激素性股骨头坏死是药毒损肾蚀骨的结果，患者多表现出肾阳虚的症状。临床用药常常使用补肾助阳等治疗手段。

**2. SANFH模型建立**

很多因素都与股骨头坏死的发生相关，包括髋部创伤或手术、大剂量使用糖皮质激素、器官移植、系统性红斑狼疮和酗酒等，而在我国，糖皮质激素是引起股骨头坏死的主要原因之一，激素性股骨头坏死（Steroid-induced Avascular Necrosis of Femoral Head，

SANFH）占非创伤性股骨头坏死的首位[13]。临床和实验已研究证实长期或短期大量使用激素是引起ANFH的重要因素[14, 15]，而且人和动物对激素的反应是一致的[16]。因此，建立实验性动物模型是目前研究SANFH的重要手段之一。

赵金东等[17]通过设立A（对照组）、B（激素组）、C（激素+马血清组）、D（激素+

40

内毒素组），对中国大耳白兔SANFH模型进行评价。结果显示，在相同的实验条件下，激素加内毒素组造模出现时间最早、坏死效果最明显并且陷窝空虚率随时间的延长而增加。王泳等[18]使用“内毒素+激素”建立新西兰大白兔股骨头坏死的动物模型，结果显示模型组骨小梁内骨细胞核固缩，空骨陷窝增加，小梁间脂肪细胞增多、增大；髓腔内脂肪细胞增多、增大，造血组织明显减少。结论：小剂量“内毒素+激素”成功诱导兔股骨头坏死模型，这种动物模型操作简单，稳定可靠，重复性好，为研究激素性股骨头坏死的发病机制和治疗方法提供了帮助。张林波等[19]通过2种方法（单纯激素注射、马血清+激素联合注射），来建立兔SANFH 模型，结果显示“马血清+激素”联合注射可以缩短造模周期，能更好地复制SANFH坏死模型，优于单纯使用激素。

目前，在研究SANFH过程中，运用“内毒素+激素”联合造模的方法较多。根据实验目的的不同，其他造模方法也可以作为参考。比如单次低剂量脂多糖联合甲基强的松龙诱导SANFH [20]，成功率较高、死亡率较低；马信龙等[21]成功建立疲劳状态下大鼠

SANFH模型，突出了机械负重在ANFH中的作用，但是可重复性差，得不到广泛运用。另外巩凡等[22]研究显示兔SANFH发生早期存在性别差异，雄性动物更易受激素影响发生骨损伤。Satoshi等[23]也得到相类似的结论，因此在设计实验方案时可以根据实际需要将实验动物性别作为一个参考对象。而对于SANFH 模型的评价，学者们一致认为

MRI能及早发现股骨头坏死改变，准确率较高，可以作为SANFH模型筛选的首选。其他如行为学实验、血脂检测、凝血等则可以作为参考指标。

**3. 股骨头坏死的治疗**

**3.1限制负重**

有报道[24]关于股骨头负重区活检诊断股骨头坏死准确率较高，因股骨头负重区承受压力大，其缺血性坏死早于股骨头中心。因此，限制负重可以有效减缓股骨头坏死的进程。然而，即使患者不负重，股骨头仍然承受着相当大的肌肉张力，会逐渐形成股骨头塌陷，因此对于股骨头坏死的治疗效果不甚明显。陈宜等[25]采用限制性负重治疗819例股骨头坏死，平均随访34个月，失败率为80％，在短期内转行全髋关节置换术（THA）。但国外有研究显示，早期、未有症状、坏死面积较小的股骨头坏死经限制性负重能够自愈。另外，尽可能减轻负重区的再度损伤是治疗过程中必须考虑到的问题，例如倪康裕

[26]对避开负重区空心钉内固定对股骨头坏死发病率的影响进行了探讨，结果显示避开负

重区空心钉固定可以明显减少股骨头坏死的发生率。

**3.2介入治疗**

41

股骨头的血液供应主要依靠关节囊和圆韧带的血管，一旦股骨颈骨折、髋关节脱位、酒精中毒、长期或短期大量注射糖皮质激素等，很容易造成供应股骨头血运的血管阻塞从而导致股骨头坏死的发生。介入治疗就是通过向股骨头坏死动脉快速注入溶栓、解痉及扩血管药，从而改善股骨头周围血供，达到治疗目的。经过研究以及临床统计发现

FicatⅠ、Ⅱ期患者是介入治疗的最佳适应症[27]。路萍等[28]于2006年2月-2010年7月期间收集整理了有明确大量使用激素病史的股骨头无菌性坏死的10例病例（男2例，女8例，年龄21-61岁），共13髋，动脉造影显示有异常表现者11髋（84.6％），通过介入治疗，其中7例患者再次行DSA血管造影，发现部分截断动脉再通，股骨头染色增强，供血得到改善。10例患者介入治疗后经随访（6-30个月），临床观察示患者疼痛减轻，功能和关节活动较治疗前有明显改善。治疗前和治疗后6个月髋关节Harris评分差异有统计学意义(t=9．57, P=0．000<0．001)，本组13髋治疗总有效率为84．6％。

**3.3高压氧治疗**

股骨头坏死是由于不同原因破坏股骨头的血液供应造成的结果。高压氧可以提供全身各器官和组织的氧分压，改善缺血部位的氧供应，近年来应用于股骨头坏死的治疗，其作用得到了广大学者的认可。姚凤春等[29]通过对48例具有激素性股骨头坏死临床和影像学特点的患者进行高压氧（HBO）使用疗效观察，结果显示：治疗36～120次后，48例患者中痊愈23例（47.9％），总有效率87.5％，其中股骨头坏死I、Ⅱ期患者的总有效率均明显高于Ⅲ期患者（96.0％、93.3％与42.9％, P<0.01）。提示SANFH 早期配合HBO治疗是一种有效方法。马瑛等[30]研究也显示高压氧治疗可改善骨坏死部位局部组织液的氧分压预防早期持续弥漫缺血，水肿造成骨细胞进一步丢失。高压氧的缩血管作用可减轻水肿使缺血得到更好灌注，血管扩张微循环改善，从而可以延缓关节置换的病程。

**3.4手术治疗**

手术治疗主要包括髓心减压、截骨、骨移植、关节置换等。髓芯减压治疗的目的是减轻股骨头内高压，改善血液循环，为股骨头内再血管化、再骨化创造条件[31]。截骨术

[32]的目的是将坏死的部位从负重区移出，将健康骨支撑的关节面移到负重区，预防股骨

头进一步坏死。截骨术对于那些年轻活动量较大、没有激素服用史、术前活动度较好、早期股骨头坏死尚未塌陷且单侧受累的患者效果最好，但运用此手术应谨慎，应严格选择适应症。骨移植是指去除股骨头内坏死骨后，用自体或同种异体松质骨填充，起到减压、支撑和骨诱导的作用[33]。关节置换是用人工关节替代疼痛且关节功能丧失的关节的

42

方法，目前是股骨头坏死晚期治疗的主流，但是关节置换所引起的脱位、关节周围骨化、深部感染、关节假体周围骨折等并发症越来越受重视[34]，如何在提高患者生活质量的同时减少并发症的发生，是每个临床和科研工作者需要长期探讨的课题。

**3.5中医药治疗**

中医药在ANFH的防治中起着越来越重要的作用。实验及临床研究证明，活血化瘀、温补肾阳以及降脂、抗凝等中药对本病病理变化有明显改善作用，而应用诸如益气化瘀、补肾活血和化湿祛瘀等药物最多，并贯穿于治疗过程的始终，体现了中医辨证论治的思想[35]。

金武勇等[36]采用辨证分期口服中药配合不负重下髋关节功能锻炼治疗，运用王继先辨证治疗方法：肝肾亏虚用六味地黄丸；气滞血瘀用自拟方（丹参、煅自然铜、当归、延胡索、白芷等）；痰瘀阻络用二陈汤加减；经脉痹阻用独活寄生汤加减。每周辨治1次，中药为1剂/天，水煎分服，3个月为1个疗程。治疗期间停用其他药物和方法，避免剧烈运动。治疗3-6个月后观察疗效。结果显示：治疗越早效果越好，可明显减少股骨头坏死的病残率，提高治愈率，而对骨坏死后期则不能治愈，只能在一定程度上改善症状。江彬锋等[37]研究发现右归饮能够通过刺激股骨头局部脂联素基因的表达，从而促进成骨细胞的增值分化，抑制破骨细胞的生长，对大鼠SANFH的病理变化起到较明显的改善作用。吴云刚等[38]亦发现右归饮对激素性股骨头坏死患者股骨近端骨髓间充质干细胞诱导分化的成骨细胞的增殖和活性起促进作用。吴承亮等[39]则研究表明右归饮可抑制股骨头髓腔内骨髓脂肪化，认为这可能是右归饮通过拮抗激素诱导骨髓基质细胞成脂分化同时促进成骨修复达到防治激素性股骨头坏死作用的机理。总而言之，补肾助阳方剂右归饮对于激素性股骨头坏死有明确的治疗作用。临床上利用补肾助阳、益骨生髓、舒筋活络等思想治疗ANFH也收到较好成效。例如徐强[40]自拟壮骨液（骨碎补、淫羊藿、黄芪各30g，当归25g，川芎、红花、丹参各20g，ft楂15g，甘草10g）防治激素致股骨头缺血性坏死30例，显效17例，有效10例，无效3例，总有效率90％。

对于本病的中医药防治，目前还处于试验研究之中，虽然已取得一定的成效，但是疗效只是局限于早期，对于晚期患者仍要借助西医手术治疗，以至于患者不得不承受一定的手术风险、副作用以及昂贵的费用，甚至有些患者选择放弃治疗。祖国医学博大精深，相信随着基础医学、实验研究的向前发展，加之循证医学理念引入，SANFH中医药治疗的研究将会取得更大的发展。相比较西药而言，中药具有药效缓和稳定、作用靶点

43

多、副作用少、依赖性小等优势[41]。特别是对于那些尚未达到手术指标或是暂时无法手术的患者，另外就是一部分选择放弃手术治疗的患者，具有较大的运用价值。运用上述中医治法开展抗股骨头坏死的中药新药研发具有广泛的应用前景和科学意义。研究中药抗股骨头坏死，充分发挥其优势特点，为理想药物的筛选和开发提供新的思路和方法，并进一步为中药治疗早期股骨头坏死的广泛应用提供科学依据。

**4. 侧耳子实体对股骨头坏死的疗效暗示**

侧耳（Pleurotus ostreatus）又称糙皮侧耳，始载于明代《广菌谱》，是真菌类担子菌纲白蘑科的食药用真菌，以子实体入药，其子实体为人们日常食用的平菇。作为药食同源的一味中药，随着研究的深入，侧耳含多种氨基酸、多肽、酶及其抑制剂、凝集素、多糖等，传统医学理论认为侧耳味甘性温，归肝肾经，具有补肾壮阳、舒筋活络、补胃理气、追风散寒等功效，主要治疗腰腿疼痛、经络不舒、手足麻木、腰膝无力等病证[42]。侧耳还可用于治疗高血脂症，且治疗效果高于安妥明[43]。近年来药理研究发现，侧耳还具有增强免疫、抗肿瘤、防治动脉粥样硬化、清除氧自由基以达到抗氧化之目的等作用。

Suseem等[44]研究发现侧耳水提物通过提高受试对象痛阈，降低其痛觉敏感性从而达到止痛的效果。Jedinak等[45]对侧耳提取物的抗炎作用进行体内外评估，最后得出其具有很好的抗炎功效，可以作为饮食治疗的主要选择。Han等[46]得到相类似的结论。股骨头坏死患者疼痛症状明显，后期亦有骨性关节炎的表现，由此我们是否可以认为侧耳子实体提取物对股骨头坏死具有一定的治疗作用，另外基于中医理论，侧耳补肾壮阳、舒筋活络等功效理论上能用于改善“骨痹”兼肾阳虚等证，亦暗示其具有治疗股骨头坏死的药效潜力。目前此方面的研究尚未展开，侧耳子实体对股骨头坏死的药效作用也未见报道。

ANFH的早期诊断与治疗至为关键，目前国内外对该病早期治疗药物的研究仍处在探索阶段，临床上尚未找到适合于早期干预的特效药物。因此迫切需要扩大筛选范围，对更多药用物质的进行探索研究。如前所述，许多医家都采用补肾壮阳、益骨生髓、舒筋活络等治法治疗股骨头坏死，并取得显著疗效。综上所述，目前对股骨头坏死的研究已经相当深入，遵循中医理论应用中药治疗早期股骨头坏死的研究时机亦已成熟。因此笔者提出假设，认为补肾壮阳、舒筋活络的食药用中药侧耳子实体提取物具有治疗股骨头坏死的药效潜力，值得深入研究。

44