

红花提取物对激素性股骨头缺血坏死兔股骨头组织 ERK、JNK 和 P38 蛋白表达的影响

万 甜¹ 吴敏瑞¹ 齐振熙^{2*}

(1. 福建中医药大学骨伤学院, 福建省福州市闽侯上街大学城华佗路 1 号, 350122;

2. 福建中医药大学中西医结合学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(465744)

* 通讯作者: zqx@fjtc.edu.cn, (0591)22861659

[摘要] 目的 探讨红花提取物对激素性股骨头缺血坏死的可能作用机制。方法 将 40 只成年新西兰大白兔随机分为正常对照组、模型对照组、髓芯减压组、生理盐水+髓芯减压组、红花提取物+髓芯减压组, 每组 8 只。除正常对照组外, 其余各组建立激素性股骨头坏死模型。造模成功后, 正常对照组和模型对照组不予处理, 髓芯减压组仅行髓芯减压术, 生理盐水+髓芯减压组采用髓芯减压术配合髓腔内注射生理盐水, 红花提取物+髓芯减压组采用髓芯减压术配合髓腔内注射羟基红花黄色素 A(7.2 mg/kg)。1 周后处死兔, 取出患侧股骨头, 采用免疫印迹法检测组织中 ERK、JNK 和 P38 蛋白表达。结果与正常对照组比较, 模型对照组 ERK1 和 ERK2 表达明显降低, JNK 和 P38 表达明显升高($P < 0.05$); 与模型对照组比较, 髓芯减压组、生理盐水+髓芯减压组和红花提取物+髓芯减压组 ERK1 和 ERK2 表达明显升高, JNK 和 P38 表达明显降低($P < 0.05$); 与髓芯减压组比较, 红花提取物+髓芯减压组 ERK1 和 ERK2 表达升高明显, JNK 和 P38 表达降低明显($P < 0.05$)。结论 红花提取物可通过激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)相关通路, 增高 ERK 的磷酸化水平, 降低 JNK 和 P38 的磷酸化水平, 促进股骨头髓腔内细胞增殖、分化, 抑制其凋亡, 从而减轻激素导致股骨头缺血坏死的损伤, 促进坏死股骨头的修复。

[关键词] 股骨头缺血坏死; 红花提取物; 羟基红花黄色素 A; 髓芯减压术; 丝裂原活化蛋白激酶

Effects of Safflower Extract on the Expressions of ERK, JNK and P38 in Femoral Head Tissue of Rabbits With Steroid-Induced Avascular Necrosis

WAN Tian, WU Minrui, QI Zhenxi

(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Province 350122)

ABSTRACT Objective To research the possible mechanism of safflower extract for steroid-induced avascular necrosis.

Methods Forty adult New Zealand white rabbits were randomized into the normal control group, model control group, core decompression group, normal saline + core decompression group and safflower extract + core decompression group, with 8 in each. The models of steroid-induced avascular necrosis were established in all groups except the normal control group. There was no treatment in the normal control group and model control group after modeling. The core decompression group was given the core decompression. The normal saline + core decompression group was given normal saline and core decompression. The safflower extract + core decompression group was given 7.2 mg/kg safflower yellow A and core decompression. The rabbits were sacrificed one week later. The femoral head in the affected side was removed and the expressions of ERK, JNK and P38 were detected with Western Blotting. **Results** Comparing with the normal control group, the expressions of ERK1 and ERK2 were significantly decreased but the expressions of JNK and P38 were significantly increased in the model control group ($P < 0.05$). Comparing with the model control group, the expressions of ERK1 and ERK2 were significantly increased but the expressions of JNK and P38 were significantly decreased in the core decompression group, normal saline + core decompression group and safflower extract + core decompression group ($P < 0.05$). Comparing with the core decompression group, the expressions of ERK1 and ERK2 were significantly increased but the expressions of JNK and P38 were significantly decreased in the safflower extract + core decompression group ($P < 0.05$). **Conclusion** Safflower extract can reduce the damage and promote the repair of steroid-induced avascular necrosis by activating the mitogen-activated protein kinase pathway, increasing the phosphorylation level of ERK, reducing the phosphorylation levels of JNK and P38 and promoting cell proliferation and differentiation and inhibiting cell apoptosis of femoral intramedullary.

Keywords avascular necrosis; safflower extract; ERK; JNK; P38

活血化癥法被广泛应用于激素性股骨头缺血坏死的治疗^[1-2],活血化癥中药的作用机制也成为目前研究的热点。本研究观察活血化癥中药红花的最有效水溶性部位——羟基红花黄色素 A^[3]对激素性股骨头缺血坏死模型兔丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径中 ERK、P38 和 JNK 蛋白表达的影响,MAPK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可被多种环境刺激活化成为有生物学作用的磷酸化形式,MAPK 途径中 ERK、P38 和 JNK 磷酸化激活后进入细胞核,调节转录因子,影响基因转录、蛋白合成和细胞骨架结构,可介导细胞增殖、分化、凋亡^[4]。本研究从影响骨细胞增殖、分化、凋亡的角度探讨红花提取物对激素性股骨头缺血坏死的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年新西兰大白兔 40 只,雌雄不限,体重(1.1±0.2)kg,由福建中医药大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SYXK(闽)2005-0004。

1.2 药物与试剂

羟基红花黄色素 A(上海源叶生物科技有限公司,批号:20120809);醋酸泼尼松龙注射液(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 110705);注射用青霉素钠(北京悦康凯悦制药有限公司,批号:1109011);硫酸庆大霉素(福州海王福药制药有限公司,批号:110730);硫苯妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20110208);BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:P00105);ECL 化学发光试剂盒(Pierce 公司,批号:ECL0012);鼠抗兔 p-ERK1 单克隆抗体(Abcam 公司,批号:ab88480);鼠抗兔 p-ERK2 单克隆抗体(Abcam 公司,批号:ab73272);鼠抗兔 p-P38 单克隆抗体(Enzo Life Sciences 公司,批号:03011123);P38 抑制剂(Cell Signaling Technology 公司,批号:5633);鼠抗兔 p-JNK 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:990599W)。

1.3 主要仪器

酶标仪(型号:ZS-3 板式,北京市新风机电技术有限公司);电泳仪(型号:DG-300C,北京鼎国昌盛生物技术有限公司);双垂直电泳槽(型号:DYCZ-24DN,北京市六一仪器厂);转印电泳槽(型号:DY-CZ-40D 型,北京市六一仪器厂);超声波细胞粉碎机(型号:JY92-II,上海新芝生物技术研究);台式高

速冷冻离心机(型号:TGL-20M 型,长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

1.4 造模方法

动物适应性喂养 1 周,采用贺氏造模法^[5]结合直立饮水制备兔典型激素性股骨头缺血坏死模型。右侧臀肌肌肉注射醋酸泼尼松龙,每只 7.5 mg/kg,每周 2 次。造模期间将饮水瓶悬吊,迫使动物长时间下肢直立饮水,造成其股骨头机械负重;正常对照组右侧臀肌注射等量生理盐水,每周 2 次。所有动物左侧臀肌注射青霉素钠 16 万单位预防感染,每周 2 次,共 6 周。

1.5 动物分组及给药方法

按照抽签法将动物随机分为正常对照组、模型对照组、髓芯减压组、生理盐水+髓芯减压组、红花提取物+髓芯减压组,每组 8 只。髓芯减压组仅行髓芯减压术,动物俯卧位固定,40 mg/kg 硫苯妥钠腹腔注射麻醉,后侧入路暴露股骨头,用直径 3.5 mm 钻头从股骨颈的内后侧,向股骨头内钻入 4 mm,到达关节软骨下,然后植入明胶海绵,缝合伤口;红花提取物+髓芯减压组采用髓芯减压术配合髓腔内注射羟基红花黄色素 A(7.2 mg/kg);生理盐水+髓芯减压组采用髓芯减压术配合髓腔内注射等量生理盐水。术后连续 3 天,臀肌肌肉注射硫酸庆大霉素 2 ml,每日 1 次,预防术后感染,各组均治疗 1 周。正常对照组和模型对照组不予处理。

1.6 观察指标及方法

处死动物取出患侧股骨头,采用免疫印迹法检测股骨头组织中 ERK、JNK 和 P38 蛋白的表达。称取股骨头组织约 100 mg,加入 1000 μ l RIPA 裂解液,在冰上进行匀浆,超声粉碎,4℃,12000 r/min,离心 10 min,收集上清液,按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明进行蛋白定量测定,检测 ERK1、ERK2、JNK 和 P38 蛋白的表达,12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜上;一抗稀释浓度按不同比例(ERK1 的比例是 1:1000,ERK2 的比例是 1:2500,JNK 的比例是 1:1000,P38 的比例是 1:5000),4℃过夜孵育;ECL 化学发光试剂盒显影,洗片。以 β -actin(1:200 稀释)杂交作为内对照,胶片经扫描仪扫描后获得图像。用 Quantity one 软件计算目的蛋白条带与 β -actin 的灰度比值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用

单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组兔股骨头组织 ERK1、ERK2 蛋白表达比较

以 β -actin 作为对照, ERK1、ERK2 蛋白的电泳图, 见图 1。表 1 示, 与正常对照组比较, 模型对照组、髓芯减压组、生理盐水+髓芯减压组和红花提取物+髓芯减压组 ERK1、ERK2 表达均明显降低 ($P<0.05$); 与模型对照组比较, 髓芯减压组、生理盐水+髓芯减压组和红花提取物+髓芯减压组 ERK1、ERK2 表达均明显升高 ($P<0.05$); 与髓芯减压组比较, 红花提取物+髓芯减压组 ERK1、ERK2 表达均明显升高 ($P<0.05$)。

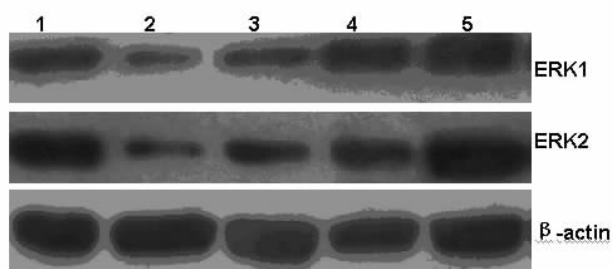


图 1 各组兔股骨头 ERK1、ERK2 蛋白电泳图

注: 1. 正常对照组; 2. 模型对照组; 3. 髓芯减压组; 4. 生理盐水+髓芯减压组; 5. 红花提取物+髓芯减压组

表 1 各组兔股骨头 ERK1、ERK2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	ERK1	ERK2
正常对照组	8	0.953±0.358	1.261±0.357
模型对照组	8	0.329±0.122*	0.394±0.151*
髓芯减压组	8	0.561±0.225*△	0.732±0.234*△
生理盐水+髓芯减压组	8	0.618±0.257*△	0.816±0.222*△
红花提取物+髓芯减压组	8	0.848±0.304*△▲	1.118±0.199*△▲

注: 与正常对照组比较, * $P<0.05$; 与模型对照组比较, △ $P<0.05$; 与髓芯减压组比较, ▲ $P<0.05$

2.2 各组兔股骨头组织 JNK 和 P38 蛋白表达比较

以 β -actin 作为对照, JNK 和 P38 蛋白的电泳图, 见图 2。表 2 示, 与正常对照组比较, 模型对照组、髓芯减压组、生理盐水+髓芯减压组和红花提取物+髓芯减压组 JNK 和 P38 表达均明显升高 ($P<0.05$); 与模型对照组比较, 髓芯减压组、生理盐水+髓芯减压组和红花提取物+髓芯减压组 JNK 和 P38 表达均明显降低 ($P<0.05$); 与髓芯减压组比较, 红花提取物+髓芯减压组 JNK 和 P38 表达均明显降低 ($P<0.05$)。

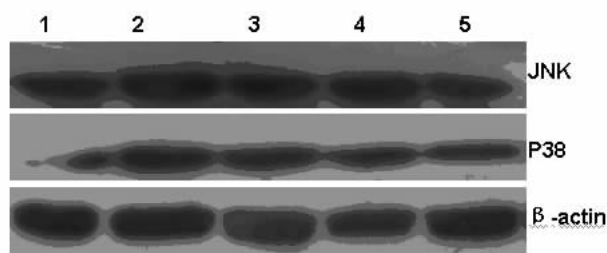


图 2 各组兔股骨头组织 JNK、P38 蛋白电泳图

注: 1. 正常对照组; 2. 模型对照组; 3. 髓芯减压组; 4. 生理盐水+髓芯减压组; 5. 红花提取物+髓芯减压组

表 2 各组兔股骨头 JNK 和 P38 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	JNK	P38
正常对照组	8	0.677±0.147	0.226±0.182
模型对照组	8	1.283±0.329*	0.935±0.334*
髓芯减压组	8	0.967±0.230*△	0.751±0.210*△
生理盐水+髓芯减压组	8	0.924±0.140*△	0.723±0.182*△
红花提取物+髓芯减压组	8	0.785±0.163*△▲	0.487±0.156*△▲

注: 与正常对照组比较, * $P<0.05$; 与模型对照组比较, △ $P<0.05$; 与髓芯减压组比较, ▲ $P<0.05$

3 讨论

中医学认为“坏死”是由气滞血瘀所致, 气血对骨的滋养是骨骼能维持正常形态和正常功能的关键, 而一旦瘀血阻滞, 脉络不通, 气血失去滋养, 骨则必然会枯朽、塌陷、坏死。“脉络不通, 不通则痛”, 综合股骨头坏死患者骨痛、跛行、功能障碍等症状, 莫不与此符合。袁浩教授认为, 各种原因导致的股骨头坏死的病理特点都是因为气血不通, 瘀滞而产生“瘀血”, 提出了以“瘀血”型为主的分类方法来指导辨证论治^[6], 这种观点是清代陈士铎“瘀去则新生”及王清任“瘀血”理论的进一步发挥。股骨头坏死由于血供不足, 血管生长困难, 坏死骨的吸收与新骨的形成过程将十分困难与缓慢。甚至坏死骨可长期存在而无法吸收, 只有活血破积, 祛瘀行气, 才能促进这一过程的完成。因此活血化瘀将贯穿股骨头坏死中医治疗的全过程。红花味辛、性温, 归心、肝经, 具有活血通经, 祛瘀止痛的功效。王涌海等^[7]采用复方红花注射液穴位注射治疗股骨头缺血坏死患者, 通过临床观察结合判定疗效证实了药物和疗法的实用性、合理性和有效性。李树强等^[8]已证实以红花为主的方药“桃红四物汤”对股骨头坏死早期的防治有明显疗效。随着红花活性成分提取、纯化的方法不断改进和成熟, 越来越多的学者开始应用其单一的活性成分羟基红花黄色素 A 进行缺血性损伤的

治疗研究。袁玉梅等^[9]将其应用于治疗脑缺血损伤,揭示了神经保护的部分机理,包括减轻缺血再灌注后的炎症反应,清除氧自由基,抗血小板聚集,抑制细胞凋亡等。鉴于此,本研究选择与炎症、细胞增殖、分化及凋亡等应激反应密切相关的 MAPK 信号通路,从影响骨细胞增殖、分化、凋亡的角度探讨红花提取物对激素性股骨头缺血坏死的作用机制。

MAPK 家族是介导细胞反应的重要信号系统,对丝裂素、激素、生长因子等生理刺激和缺血、缺氧、低糖、紫外线照射及 rNF 等病理刺激作出不同的反应,控制着细胞的适应、增殖、分化、存活和程序性细胞死亡等几乎所有生理功能和过程。MAPK 家族主要有 3 个成员:ERK、JNK 和 P38MAPK。ERK 通路主要在细胞增殖、分化中发挥重要作用,JNK、P38MAPK 通路是细胞应激反应诱导细胞凋亡的主要信号转导途径^[10]。激素性股骨头坏死发生的内在机制是十分复杂的,目前对其发病机制提出的学说主要有脂类代谢紊乱学说、骨细胞凋亡学说、血管内凝血学说、骨质疏松学说等^[11]。前期研究分别已从影响脂类代谢、血管生长等方面阐述活血化淤中药防治该病的作用机理^[12-13],本研究从影响骨细胞增殖、分化、凋亡的角度探讨激素性股骨头缺血坏死的治疗机理。

本研究结果发现,股骨头缺血坏死后,ERK1、ERK2 表达显著降低,JNK 和 P38 表达显著升高,提示股骨头缺血坏死时,这 3 条通路均被激活。羟基红花黄色素 A 治疗后,ERK1、ERK2 水平有明显上升,JNK、P38 水平均有不同程度的下降,说明羟基红花黄色素 A 通过上调 ERK 的磷酸化水平,下调 JNK、P38 的磷酸化水平,促进或抑制相关通路的激活,进而促进股骨头髓腔内细胞增殖、分化,抑制其凋亡,从而减轻激素导致股骨头缺血坏死的损伤,促进坏死股骨头的修复。

参考文献

- [1] 齐振熙,康靖东,李树强.活血化淤中药对激素性股骨头缺血坏死模型 TGF- β 1 表达的实验研究[J].中国骨伤,2009,22(8):597.
- [2] 李韡,蔡大悦,黄伟章.自拟健骨汤治疗早期缺血性股骨头坏死 30 例[J].中医杂志,2011,52(20):1783-1784.
- [3] 金鸣,李金荣,吴伟.羟基红花黄色素 A 抗氧化作用的研究[J].中草药,2004,35(6):665-666.
- [4] 梁竹,王玉娟.丹参作用于丝裂原活化蛋白激酶信号通路的研究进展[J].中国药房,2012,23(47):4508.
- [5] 贺西京,毛履真,王坤正,等.激素性股骨头坏死与骨细胞

脂肪变性的实验研究[J].中华骨科杂志,1996,6(1):44-46.

- [6] 李雄,袁浩.袁浩教授对股骨头坏死中医药论治的学术思想[J].中国中医骨伤科杂志,1999,7(1):61.
- [7] 王涌海,于培俊.复方红花注射液治疗股骨头缺血性坏死 200 例[J].辽宁中医杂志,2000,27(9):419.
- [8] 李树强,于涛,齐振熙.桃红四物汤对激素诱导骨髓间充质干细胞成脂分化的干预作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(19):3539-3543.
- [9] 袁玉梅,钱晓东,曹恒斌.羟基红花黄色素 A 抗脑缺血损伤作用研究进展[J].医药导报,2012,31(8):1047.
- [10] 崔虎,关立克.丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)在动脉硬化中的意义[J].吉林医学,2013,34(1):132-133.
- [11] 邵阳,赵晓艳,马勇,等.激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J].中国中医骨伤科杂志,2012,20(8):88.
- [12] 于涛,齐振熙,余航,等.羟基红花黄色素 A 对激素诱导骨髓间充质干细胞成脂分化的干预作用[J].福建中医药大学学报,2011,21(6):24-27.
- [13] Qi ZX, Chrn L. Effect of Chinese drugs for promoting blood circulation and eliminating blood stasis on vascular endothelial growth factor expression in rabbits with glucocorticoid-induced ischemic necrosis of femoral head [J]. J Tradit Chin Med,2009,29(2):137-140.

(收稿日期:2013-05-17;修回日期:2013-09-05)

[编辑:邓 媛]

欢迎邮购医学光盘

四大经典 VCD《黄帝内经》《伤寒论》《金匱要略》《温病学》全套 2500 元,其中《金匱要略》单套 800 元,其余每套 600 元。四大基础 VCD《中医基础理论》、《中医诊断学》、《中药学》、《方剂学》全套 2700 元,单套 700 元。

“全国名老中医专家临床经验高级讲习班”自 1999 年以来举办多期,得到了 60 多位全国名老中医和专家的积极响应和大力支持。授课内容为全国名老中医和专家个人几十年临床经验的宝贵结晶。现已制作成光盘,可作为中医医疗、教育和研究机构收藏以及开展继续教育的培训教材,也可供中医医务工作者临床自学。第一期 1500 元(22DVD),第二期 1500 元(20 DVD),第三期 1130 元(16 DVD),第四期 980 元(16 DVD),第五期 1330 元(23 DVD),第六期 1050 元(16 DVD),第七期 710 元(13 DVD),第八期 700 元(11 DVD),第九期 850 元(10 DVD),第十期 680 元(10 DVD),第十一期 540 元(10 DVD)。总价 10970 元。

汇款地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社;收款人:北京医海林音像书店收,邮编:100700,联系人:张伟平,(010)64014411-3036;叶晨,(010)64013162。