

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.24.015

活血通络汤对激素性股骨头缺血性坏死模型兔
股骨细胞因子表达的影响袁斓¹, 陈惠娜², 江蓉星^{*}, 潘姗姗¹, 邹俊¹, 郭小平¹, 丁志清¹

(1. 成都中医药大学附属医院, 四川省成都市金牛区十二桥路 39 号, 610075; 2. 成都里来生物科技有限公司)

摘要 目的 探讨活血通络汤治疗激素性股骨头缺血性坏死的可能作用机制。方法 96 只日本大耳兔随机分为预防 + 治疗组、治疗组、模型组、空白组, 每组 24 只。采用臀部肌肉注射醋酸泼尼松龙 8 mg/kg 方法制备激素性股骨头缺血性坏死模型。从第 2 周开始, 预防 + 治疗组喂服活血通络汤饲料, 其余各组喂服普通饲料, 每日 1 次, 连续 1 周。从第 3 周开始, 预防 + 治疗组和治疗组均喂服活血通络汤饲料, 模型组、空白组均喂服等量普通饲料, 每日 1 次, 连续 6 周。采用免疫组织化学法测定兔股骨组织中碱性磷酸酶 (APK)、骨钙素 (BGP)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 及血小板源性生长因子 B (PDGF-B) 的表达情况。结果 与空白组比较, 模型组股骨组织 TGF- $\beta 1$ 、bFGF、BGP、BMP-2、PDGF-B 含量明显降低, APK 含量明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 预防 + 治疗组、治疗组股骨组织 TGF- $\beta 1$ 、bFGF、BGP、PDGF-B 含量明显升高, APK 含量明显降低, 预防 + 治疗组 BMP-2 含量明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 活血通络汤可能通过上调骨组织中 BGF、TGF- $\beta 1$ 、bFGF、PDGF 表达, 下调 APK 表达, 从而促进骨坏死的修复。

关键词 激素性股骨头缺血性坏死; 活血通络汤; 细胞因子

激素性股骨头缺血性坏死 (SANFH) 是由于激素使用不当, 使股骨头血供受损, 继而引起股骨头缺血性坏死, SANFH 占非创伤性股骨头缺血性坏死的首位^[1]。股骨头坏死的根本原因是股骨头内血液循环障碍、骨内压增高, 随着病程的发展造成血供障碍进一步加重, 引发股骨头坏死, 这是一个恶性循环的过程^[2]。活血通络汤是我们多年来结合临床实践及前辈经验研制而成, 前期研究已经证实活血通络汤能够促进早期 SANFH 模型家兔骨的修复与重建^[3]。本实验采用免疫组化法测定骨痂中调控成骨细胞增殖分化的细胞因子非组织特异性碱性磷酸酶 (APK)、骨钙素 (BGP)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的表达, 以阐释活血通络汤治疗 SANFH 的可能作用机理。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性日本大耳兔 96 只, 清洁级二级, 体

重 2.0 ~ 2.5 kg, 由四川大学华西医院动物实验室提供, 实验动物许可证号: SCXK (川) 2009 - 09。

1.2 药物

活血通络汤组成: 黄芪 40 g, 丹参 20 g, 地龙 10 g, 当归 30 g, 川芎 16 g, 牛膝 15 g, 巴戟天 30 g, 鸡内金 10 g。将药材适当粉碎后, 过 6 号筛, 将所得中药粉末加工成中药饲料 (中药所占比例为 20%); 醋酸泼尼松龙注射液 (批号: 131102, 浙江仙琚制药股份有限公司); 注射用青霉素钠 (批号: A1311002, 哈药集团制药总厂); 硫酸庆大霉素注射液 (批号: 20131112, 四川省长征药业股份有限公司)。

1.3 试剂和仪器

BGP 兔多克隆抗体 (批号: bs-4917R)、APK 兔多克隆抗体 (批号: bs-200188R)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 兔多克隆抗体 (批号: bs-0086R)、bFGF 兔多克隆抗体 (批号: bs-0217R)、血小板源性生长因子 B (PDGF-B) 抗体 (批号: bs-0185R) 均购于北京博奥森生物技术有限公司,

基金项目: 国家自然科学基金 (81373663)

* 通讯作者: 453768680@qq.com, 18081066705

骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 抗体 (批号: E-70089), Abcam 公司。低温离心机 (型号: C2500, 湖南湘仪实验仪器厂), 旋涡混合器 (型号: XH-B, 江苏康健医疗用品有限公司), 转轮式切片机 (徕卡-2016, 德国徕卡公司), 全自动封闭式组织脱水机 (型号: TSJ-II, 常州市中威电子仪器有限公司), 包埋机 (型号: BMJ-III, 常州郊区中威电子仪器厂)。

1.4 分组与造模肌肉注射

适应性喂养 1 周后, 所有大耳兔按照体重大小依次排序编号, 查询随机数字表分为空白组、模型组、预防 + 治疗组、治疗组, 每组 24 只。除空白组外, 其余各组参考文献 [4] 从第 3 周开始按 8 mg/kg 剂量臀部肌肉注射醋酸泼尼松龙注射液建立激素性股骨头缺血性坏死模型, 空白组兔臀部肌肉注射等量的 0.9% 氯化钠注射液。全部动物预防性肌肉注射青霉素钠 8 万 U/kg、硫酸庆大霉素注射液 4 万 U/只。每周 2 次, 连续注射 6 周。

1.5 给药

预防 + 治疗组从第 2 周开始喂服中药饲料 50 g/kg (相当于中药 10 g/kg), 其余各组喂服普通饲料相当于 50 g/kg, 每日 3 次, 保证不断食, 连续 1 周。从第 3 周开始, 预防 + 治疗组继续喂服中药饲料 50 g/kg, 治疗组停止喂服普通饲料, 开始喂服中药饲料 50 g/kg, 模型组和空白组连续喂服普通饲料 50 g/kg, 每日 3 次, 连续 6 周。

1.6 观测指标及方法

于第 8 周处死动物, 截取右侧股骨头, 迅速放入 10% 甲醛中固定。利用免疫组织化学方法检测治疗前后各组标本中 TGF- β 1、bFGF、BGP、BMP-2、PDGF-B、APK 在局部组织中的表达, 用 Image Pro Plus 6.0 软件分析其平均光密度值 (OD 值)。

1.7 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件分析数据, 数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 方差齐者组间进行 LSD 检验, 方差不齐者进行 Tamhane's T_2 检验。

2 结果

2.1 各组大耳兔股骨组织 TGF- β 1、bFGF、BGP、BMP-2、PDGF-B 和 APK 蛋白表达比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组股骨组织 TGF- β 1、bFGF、BGP、BMP-2、PDGF-B 含量明显降低, APK 含量明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 预防 + 治疗组、治疗组股骨组织 TGF- β 1、bFGF、BGP、PDGF-B 含量明显升高, APK 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 预防 + 治疗组 BMP-2 含量明显升高 ($P < 0.05$); 预防 + 治疗组与治疗组各项指标比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

中医学认为, SANFH 是由于邪毒内犯损伤经络, 导致气血瘀阻, 骨髓失其润养, 终至髓死骨枯。有研究结果显示, 肾虚实际上内分泌系统失调的表现, 肾虚患者往往存在下丘脑-垂体-性腺分泌系统功能紊乱, 性腺激素水平下降, 进而导致成骨与破骨细胞功能失衡^[5]。我们认为, SANFH 的主要病机是瘀血阻络, 血行不畅或停滞, 故主要治法应为活血化瘀通络, 又由于“肾主骨生髓”, 骨的生长发育均依赖肾脏精气的滋养与推动。本研究所用活血通络汤方中黄芪、当归益气血, 丹参、地龙、川芎活血通络, 气行则血行, 牛膝、巴戟天补肾, 全方共奏补肾活血化瘀通络之功效。

APK 和 BGP 是由成熟的成骨细胞分泌, 是成

表 1 各组大耳兔股骨组织中细胞因子相关蛋白表达比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	TGF- β 1	bFGF	BGP
空白组	24	0.2862 $\pm$ 0.0135	0.2718 $\pm$ 0.0127	0.1713 $\pm$ 0.0120
模型组	24	0.2621 $\pm$ 0.0121 **	0.2594 $\pm$ 0.0105 **	0.1545 $\pm$ 0.0084 *
预防 + 治疗组	24	0.2710 $\pm$ 0.0108 $\Delta\Delta$	0.2705 $\pm$ 0.0110 $\Delta\Delta$	0.1613 $\pm$ 0.0081 Δ
治疗组	24	0.2707 $\pm$ 0.0123 Δ	0.2695 $\pm$ 0.0105 $\Delta\Delta$	0.1600 $\pm$ 0.0119 Δ
组别	兔数	BMP-2	PDGF-B	APK
空白组	24	0.2497 $\pm$ 0.0208	0.2216 $\pm$ 0.0135	0.2661 $\pm$ 0.0102
模型组	24	0.2377 $\pm$ 0.0161 *	0.2137 $\pm$ 0.0107 *	0.2891 $\pm$ 0.0199 *
预防 + 治疗组	24	0.2477 $\pm$ 0.0135 Δ	0.2212 $\pm$ 0.0091 Δ	0.2749 $\pm$ 0.0104 Δ
治疗组	24	0.2424 $\pm$ 0.0139	0.2200 $\pm$ 0.0103 Δ	0.2754 $\pm$ 0.0117 Δ

注: TGF- β 1, 转化生长因子 β 1; bFGF, 碱性成纤维细胞生长因子; BGP, 骨钙素; BMP-2, 骨形态发生蛋白 2; PDGF-B, 血小板源性生长因子 B; APK, 碱性磷酸酶; 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

骨细胞早期成熟的标志。BGP 是一种维持骨正常矿化,促进非结晶磷酸钙盐转化为羟磷酸灰石的非胶原蛋白,BGP 总量 2/3 沉积在骨基质中^[8]。本研究结果显示,预防+治疗组与治疗组 APK、BGP 表达高于模型组,表明活血通络汤可有效促进成骨细胞成熟。

新骨组织的形成依赖于血管的生成,爬入坏死区血管可带入效应细胞或成骨细胞诱导因子,促进前成骨细胞转化为骨细胞,而血管的生成受 TGF- β 1 和 bFGF 等多种血管生成因子的调控^[9]。TGF- β 1 可以抑制破骨细胞的活性,刺激成骨母细胞的增值和活化^[8],抑制骨间充质干细胞向脂肪细胞转化,对软骨的生长和分化也起着关键性的作用^[8],并能促进已被募集来的成骨细胞合成 I 型胶原、骨连接素和骨桥蛋白,利于骨基质的合成与积累,可通过内皮细胞自分泌机制促进血管生成^[10]。bFGF 是一种毛细血管增值刺激剂,促进毛细血管向骨移植物中延伸,使早期组织中软骨岛数量增多^[11],并可直接刺激内皮细胞增生,促进内皮细胞产生蛋白酶,调节内皮细胞表面整合素表达,并促进内皮细胞迁移,是重要的血管生成因子之一^[12]。本研究结果显示,模型组股骨组织 TGF- β 1、bFGF 含量明显低于空白组,提示激素抑制了 TGF- β 1 和 bFGF 的表达,从而导致股骨头血运减少。而预防+治疗组和治疗组可上调 TGF- β 1 和 bFGF 的表达,从而促进血管生成,提高血运。

目前证明 BMP-2 激活的信号通路有 SMAD 通路和 MAPK 通路,SMAD 通路可激活 OSX 转录,MAPK 通路可激活 RUNX2 转录,进而促进成骨细胞分化^[13-14]。敲除 OSX 基因的小鼠胚胎面骨、颅骨、锁骨、肋骨、肢体股骨发育不良,存在骨小梁缺失,OSX 在成骨过程中起到关键作用^[15];RUNX2 突变失活严重影响成骨细胞分化,剔除 RUNX2 基因的小鼠骨骼中未检测到 OSX 表达,而剔除 OSX 基因小鼠骨骼中可检测出 RUNX2 表达,提示 RUNX2 位于成骨细胞分化路径上游,OSX 位于下游^[16]。本研究中治疗组大耳兔股骨 BMP-2 表达量高于模型组,但无统计学意义,预防+治疗组家兔股骨 BMP-2 表达量显著高于模型组,提示预防使用活血通络汤可上调 BMP-2 表达量,而单纯治疗对 BMP-2 表达影响有限。

血小板源性生长因子(PDGF)在伤口愈合和骨折修复过程中起到重要作用。研究证明,PDGF 能促进间充质干细胞增殖,其受体蛋白缺失会导致

骨骼、生殖器官发育不良^[17]。PDGF-B 可促进成骨细胞增殖,诱导血管内皮生长因子(VEGF)表达,促进局部血液循环重建^[18]。本研究中预防+治疗组、治疗组大耳兔股骨组织中 PDGF-B 表达量高于模型组,提示活血通络汤治疗和预防 SANFH 可能与促进成骨细胞增殖有关。

综上所述,SANFH 模型兔在活血通络汤预防或治疗后,bFGF、TGF- β 1、PDGF- β 、BGP 均有不同程度的升高,提示活血通络汤具有促进调控成骨细胞相关因子表达增加的作用,可能是其治疗 SANFH 作用机制之一。

参考文献

- [1] 陈星. 中医辨证分型治疗股骨头坏死 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 21(18): 340-342.
- [2] 石少辉, 李子荣. 血管生成在缺血性股骨头坏死修复中的作用 [J]. 中华全科医师杂志, 2007, 5(8): 479-481.
- [3] 钱智斌, 江蓉星, 王培荣. 活血通络汤对 SANFH 家兔血浆 ET、BGP 影响的实验研究 [J]. 西南国防医药, 2013, 12(11): 1161-1164.
- [4] 贺西京, 毛履真, 王坤正, 等. 肾上腺皮质激素引起股骨头缺血性坏死的机制实验研究 [J]. 中华骨科杂志, 1992, 6(12): 440.
- [5] 董杨, 柳普照, 宋海燕, 等. 基于血清激素水平和基因差异性表达探讨老年性聋与中医肾虚的相关性及其物质基础 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 26(10): 2544-2547.
- [6] BIKLE DD. Biochemical markers in the assessment of bone disease [J]. Am J Med, 1997, 103(5): 427-436.
- [7] 陈曦, 季天海, 杨劲松, 等. 咽喉部恶性黑色素瘤微血管密度与预后关系的探讨 [J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2001, 48(1): 47-49.
- [8] LANGDAHL BL, STENKJAER L, CARSTENS M, et al. A CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene is associated with reduced bone mass and increased risk of osteoporotic fractures [J]. Calcif Tissue Int, 2003, 73(3): 237-243.
- [9] PETROLL WM, LAKSHMAN N. Fibroblastic transformation of corneal keratocytes by rac inhibition is modulated by extracellular matrix structure and stiffness [J]. J Funct Biomater, 2015, 6(2): 222-240.
- [10] TATSUYAMA K, MAEZAWA Y, BABA H, et al. Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone [J]. Eur J Histochem, 2000, 44(3): 269-278.
- [11] GOLDFARB M. Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(2): 215-220.
- [12] DENG H, XU H, ZHANG X, et al. Protective effect of

- Ac-SDKP on alveolar epithelial cells through inhibition of EMT via TGF- β 1/ROCK1 pathway in silicosis in rat [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 294: 1-10. doi: 10.1016/j.taap.2016.01.010.
- [3] CELIL AB, HOLLINGER JO, CAMPBELL PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95(3): 518-528.
- [4] CELIL AB, CAMPBELL PG. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(36): 31353-31359.
- [5] ZHANG C. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx [J]. *J Orthop Surg Res*, 2010, 5: 37. doi: 10.1186/1749-799X-5-37.
- [6] LEE MH, KWON TG, PARK HS, et al. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309(3): 689-694.
- [7] SHAH P, KEPPLER L, RUTKOWSKI J. A review of platelet derived growth factor playing pivotal role in bone regeneration [J]. *J Oral Implantol*, 2014, 40(3): 330-340.
- [8] 郭涛, TGF- β 、PDGF 及 VEGF 等因子在眼眶爆裂性骨折后不同时间的表达及意义 [D]. 大连: 大连医科大学, 2007: 29.

Effect of *Huoxue Tongluo Decoction* (活血通络汤) on Expression of Cytokine in Femurs in Rabbit Model with Steroid-Induced Avascular Necrosis of Femoral Head

YUAN Lan¹, CHEN Huina², JIANG Rongxing¹, PAN Shanshan¹, ZOU Jun¹, GUO Xiaoping¹, DING Zhiqing¹

(1. Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075; 2. Chengdu Lilai Biotechnology Co., Ltd.)

ABSTRACT Objective To explore the probable mechanism of *Huoxue Tongluo Decoction* in treating steroid-induced avascular necrosis of femoral head. **Methods** Ninety-six Japanese big ear rabbits were randomly divided into prevention plus treatment group, treatment group, model group and blank group, with 24 in each. The steroid-induced avascular necrosis of femoral head model was established by gluteal intramuscular injection of prednisone acetate at a dose of 8 mg/kg. In the second week, the prevention plus treatment group was fed with *Huoxue Tongluo Decoction* diet, while the other groups were fed with normal diet, once a day, for a week. From the third week on, the prevention plus treatment group and the treatment group were fed with *Huoxue Tongluo Decoction* diet, while the model group and the blank group were fed with equivalent normal diet, once a day, for 6 weeks. The expression of alkaline phosphatase (AKP), osteocalcin (BGP), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), and platelet-derived growth factor B (PDGF-B) was detected with immunohistochemical method. **Results** The levels of TGF- β 1, bFGF, BGP, BMP-2 and PDGF-B were significantly lower, while the level of APK was significantly higher in model group compared with those in the blank group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The levels of TGF- β 1, bFGF, BGP, PDGF-B in prevention plus treatment group and treatment group were remarkably higher, while the APK was remarkably lower than those in the model group, and the level of BMP-2 in the prevention plus treatment group rose evidently ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Huoxue Tongluo Decoction* might promote the repair of osteonecrosis through up-regulating the expression of BGF, TGF- β 1, bFGF and PDGF and down-regulating the expression of APK in bone tissue.

Keywords steroid-induced avascular necrosis of femoral head; *Huoxue Tongluo Decoction*; cytokine

(收稿日期: 2016-04-21; 修回日期: 2016-07-02)

编辑: 王利菊