

· 药理 ·

基于VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt信号通路研究健脾活骨方对酒精性股骨头坏死血管损伤的修复作用机制

方罗昌婷^{1,2}, 汪倩倩², 孙丛丛², 李群², 杨超², 王潇潇², 胡智星², 刘春芳^{2*}, 林娜^{2*}
(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:本研究旨在观察健脾活骨方(JPHGP)对实验性酒精性股骨头坏死(AONFH)血管损伤的修复作用,并基于血管内皮细胞生长因子(VEGF)/血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路探索其作用机制。方法:实验采用46%酒精度红星二锅头10 mL·kg⁻¹·d⁻¹灌胃建立AONFH大鼠模型,观察JPHGP不同剂量组(2.5、5.0、10.0 g·kg⁻¹)的干预作用,选择健骨生丸(JGS, 1.5 g·kg⁻¹)为阳性药物;给药8周后,Micro-CT扫描分析股骨头骨计量学,墨汁灌注观察股骨头骨髓内微血管面积,苏木素-伊红(HE)染色法观察病理学改变程度,免疫组化和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测股骨头中血小板-内皮细胞黏附分子31(CD31)、VEGF、VEGFR2、PI3K、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)和抑癌基因(PTEN)的蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠股骨头骨小梁断裂变细,空骨陷窝增多,脂肪细胞数量明显增多和直径显著变大($P<0.01$),Micro-CT影像学结果显示骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),骨表面积体积比(BS/BV)和骨小梁分离度(Tb.Sp)均显著升高($P<0.01$),墨汁灌注结果表明股骨头髓腔内微血管面积显著减少($P<0.01$);与模型组比较,JPHGP作用后能降低AONFH大鼠股骨头的空骨陷窝率、脂肪细胞面积和直径,Micro-CT影像学结果显示JPHGP低剂量组BV/TV、Tb.Th、Tb.N均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),BS/BV显著降低($P<0.01$),BMD呈升高趋势,Tb.Sp呈下降趋势,但差异均无统计学意义,JPHGP中、高剂量组的BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),BS/BV、Tb.Sp明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),并明显升高股骨头髓腔内微血管面积($P<0.05$, $P<0.01$),扩大股骨头髓腔内微血管面积;与正常组比较,模型组大鼠均显著下调CD31、VEGF、VEGFR2、PI3K、p-Akt和上调PTEN的表达含量($P<0.01$),与模型组比较,JPHGP作用后中、高剂量组显著升高大鼠股骨头CD31、PI3K、p-Akt表达含量($P<0.01$),降低PTEN蛋白的表达水平($P<0.01$),同时JPHGP作用后上调VEGF、VEGFR2表达含量($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:JPHGP对AONFH股骨头血管损伤具有修复作用,其机制可能与激活VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt信号通路有关,相关研究结果将为JPHGP的临床应用提供一定科学依据和参考。

[关键词] 健脾活骨方;酒精性股骨头坏死(AONFH);血管内皮细胞生长因子(VEGF)/血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)08-0186-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230506

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230210.1608.016.html>

[网络出版日期] 2023-02-13 11:23:21

Repair Mechanism of Jianpi Huogu Prescription on Vascular Injury in Alcohol-induced Osteonecrosis of Femoral Head Based on VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt Signaling Pathway

FANG-LUO Changting^{1,2}, WANG Qianqian², SUN Congcong², LI Qun², YANG Chao², WANG Xiaoxiao², HU Zhixing², LIU Chunfang^{2*}, LIN Na^{2*}

(1. Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China)

[收稿日期] 2022-12-29

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(82030122);国家自然科学基金面上项目(81973888);北京市自然科学基金面上项目(7232304);中国中医科学院科技创新工程项目(C12021A03808)

[第一作者] 方罗昌婷,在读硕士,从事中药药理研究,E-mail:1186524189@foxmail.com

[通信作者] *刘春芳,研究员,从事中药药理研究,Tel:010-64014411-2869,E-mail:chunfang666@126.com;

*林娜,研究员,博士生导师,从事中药药理研究,Tel:010-64014411-2869,E-mail:linna888@163.com

Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the repair effect of Jianpi Huogu prescription (JPHGP) on vascular injury in experimental alcohol-induced osteonecrosis of femoral head (AONFH), and to explore its mechanism based on vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGFR2/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. **Method:** In the experiment, 46% vol Red Star Erguotou ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$) was used to establish the AONFH rat model, and the intervention effect of JPHGP at different doses (2.5, 5.0, $10.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) was observed. Jiangusheng pill (JGS, $1.53 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) was selected as the positive control. After 8 weeks of administration, the bone histomorphometry of the femoral head was analyzed by Micro-CT imaging, and the area of medullary microvessels in the femoral head was detected by ink perfusion. The pathological change was observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. The protein expressions of Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), VEGF, VEGFR2, PI3K, phosphor-Akt (p-Akt) and phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) in the femoral head were determined by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** Compared with normal group, the model group presented the fracture and thinning of trabeculae in the femoral head, increased empty bone lacunae, and elevated number and diameter of adipocytes ($P < 0.01$). Micro-CT imaging revealed a decrease in bone mineral density (BMD), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) and trabecular number (Tb.N) ($P < 0.05$, $P < 0.01$) while an increase in bone surface-to-volume ratio (BS/BV) and trabecular separation (Tb.Sp) ($P < 0.01$). The results of ink perfusion showed that the area of medullary microvessels in the femoral head was reduced ($P < 0.01$). Compared with model group, JPHGP lowered the empty bone lacunae rate as well as the number and diameter of adipocytes in the femoral head of AONFH rats. Micro-CT imaging indicated that JPHGP low-dose group had elevated BV/TV, Tb.Th and Tb.N ($P < 0.05$, $P < 0.01$) while decreased BS/BV ($P < 0.01$), and there was an upward trend in BMD while a downward trend in Tb.Sp, but without statistical difference. In addition, JPHGP medium- and high-dose groups had a rise in BMD, BV/TV, Tb.Th and Tb.N ($P < 0.05$, $P < 0.01$), a decrease in BS/BV and Tb.Sp ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and enlarged area of medullary microvessels in the femoral head ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expressions of CD31, VEGF, VEGFR2, PI3K, p-Akt in the model group were lower than those in the normal group ($P < 0.01$), and after medium and high doses of JPHGP treatment, the expressions of CD31, PI3K and p-Akt in the femoral head of rats were up-regulated ($P < 0.01$) while the protein expression of PTEN was down-regulated ($P < 0.01$). Moreover, JPHGP up-regulated the expressions of VEGF and VEGFR2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** JPHGP can repair the vascular injury in AONFH, and its mechanism may be related to the activation of VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt signaling pathway. This study provides certain scientific basis and reference for the clinical application of JPHGP.

[Keywords] Jianpi Hugu prescription; alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head (AONFH); vascular endothelial growth factor(VEGF)/VEGFR2/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway

酒精性股骨头坏死(AONFH)是由过量饮酒引起的一种难治性骨科疾病,致残率高,严重影响患者日常生活。酒精是仅次于激素诱导非创伤性股骨头坏死的第二大致病因素^[1-5]。有关AONFH的发病机制主要有脂类代谢紊乱、骨内高压增高、骨质疏松、骨细胞脂肪变性坏死、血管损伤等不同学说^[6-8],其中长期饮酒引起的血管损伤、血供中断被认为是酒精导致AONFH的关键病理环节。目前临

床治疗AONFH以减轻症状、改善功能、延缓病情进展为主要目标。血管修复的主要机制涉及血管内皮细胞生长因子(VEGF)/血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2)激活,从而进一步促进血管内皮细胞的有丝分裂和通透性。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)是VEGF/VEGFR2的下游信号,其与血管扩张和超渗透性有关,还增强血管内皮细胞增殖、迁移和管腔形成^[9-11]。因此,采取有效的手段

促进坏死区域血管新生、恢复血供和促进新的骨组织生成,是治疗AONFH的关键。

健脾活骨方是本课题组北京中医药大学陈卫衡教授在长期的临床实践中用于治疗早中期非创伤性股骨头坏死的效验方,由茯苓、赤芍、党参、白术、桂枝、熟地黄、鹿角胶等组成,具有健脾化痰、活血通络、补肾生骨的功效。前瞻性和回顾性临床研究显示,健脾活骨方治疗早中期非创伤性股骨头坏死疗效肯定,且在改善髋关节功能及提高生活质量方面略优于或相当于手术治疗^[12-13]。药理研究显示,健脾活骨方能明显纠正血脂代谢紊乱、改善血液高凝状态、抑制骨吸收、促进骨形成和修复,同时体外抑制激素致血管内皮细胞功能损伤^[14-17]。然而,健脾活骨方对酒精致股骨头坏死的血管损伤作用和机制如何至今尚不清楚。为了进一步指导临床的合理用药和新药研发,本实验拟通过体内酒精诱导SD大鼠建立AONFH模型后,进行Micro-CT扫描、墨汁灌注和苏木素-伊红(HE)染色等实验,观察健脾活骨方对酒精所致大鼠股骨头坏死模型微血管循环损伤的影响,并从VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt信号轴通路探索其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,120只,雌雄各半,体质量230~250 g,由北京市维通利华实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0011。实验动物饲养于中国中医科学院基础理论研究所实验动物中心,温度22~24℃,每日日光灯照明12 h,湿度40%~60%,自由饮水饮食。本实验通过了中国中医科学院基础理论研究所实验动物福利伦理委员会审查,编号为2021B121。

1.2 试剂 红星二锅头(46%酒精度,北京红星股份有限公司,货号GB/T20822),健骨生丸(北京匡达制药厂,货号Z10970030),苏木素、伊红(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号分别为15111830、15111828),二甲苯、无水乙醇、异丙醇、甲醇、中性树脂、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)(北京化工厂,货号分别为20150504、20150918、20150904、20140823、20150304、20140627),多聚甲醛(天津市华东试剂厂,货号20150623),石蜡(上海永华石蜡有限公司,货号20150313),Recombinant Human VEGF₁₆₅(美国Peprotech公司,货号100-20),兔抗Akt抗体、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、兔抗PI3K抗体、兔抗抑癌基因(PTEN)抗体、兔抗VEGFR2抗体(美国Cell Signaling Technology公

司,货号分别为9272s、2118s、4249s、9188s、9698),兔抗VEGF抗体(美国Proteintech Group公司,货号19003-1-AP),CD31抗体、PVDF膜(美国EMD Millipore Corporation公司,货号分别为MAB1393、EI90391),蛋白Marker(北京全式金技术有限公司,货号DM121-01),Bradford试剂盒(北京天根生化科技有限公司,货号PA012),SDS-PAGE凝胶配制试剂盒Beyotime(英国Biotechnology公司,货号p0012A),RIPA裂解液、封闭专用脱脂奶粉、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、ECL发光液、5×上样缓冲液、一抗稀释液(普利莱基因技术有限公司,货号分别为C1053、P1622、P1265、P1260、P1010、B1007、C1240),甲醛溶液(上海子起生物科技有限公司,货号Z2613211)。

1.3 仪器 5415R型高速低温离心机(德国Eppendorf公司),PowerPac™ Basic型电泳仪、Mini-PROTEAN® Tetra Cell型电泳槽(美国Bio-Rad公司),RM2255型石蜡切片机、HI1210型摊片机(德国Leica公司),RS0800604-0063型微计算机断层扫描设备(Micro-CT,英国GE Healthcare公司),BX51型显微镜(日本Olympus公司),BT-300型博莱特血流变仪(博莱特通有限公司),brand型移液枪(上海巴玖实业有限公司),Fusion FX5 Spectra型凝胶成像仪(法国Vilber公司),MK3型全自动酶标仪、CH1210B1210型冰冻切片机(美国Thermo Scientific公司),LG-PABER-I型血小板聚集凝血分析仪(北京世帝科学仪器公司)。

2 方法

2.1 药物的制备 健脾活骨方组成为茯苓5 g、赤芍5 g、党参5 g、白术5 g、桂枝5 g、熟地黄5 g、鹿角胶5 g(烊化)等,购自安国市昌达中药材饮片有限公司,批号1609001G143V,经安国市昌达中药材饮片有限公司许琪等鉴定符合2015年版《中华人民共和国药典》一部检验标准。健脾活骨方粉末制备:去除鹿角胶外其他各药,加10倍量水提取3次,每次1 h,提取液合并,减压浓缩至稠膏,鹿角胶烊化后与上述浸膏合并,干燥保存。

2.2 实验动物分组、造模及给药 实验建立正常组、模型组、健脾活骨方低、中、高剂量组和健骨生丸组6组。除正常组外,其余各组采用酒精灌胃方法造模,每日上午给予大鼠46% vol红星二锅头(给药量10 mL·kg⁻¹)1次,每周连续灌胃6 d,停1 d,共12周,建立大鼠AONFH模型,共12周,正常组给予等量生理盐水对照处理^[10]。灌酒4周开始,药物组

造模同时开始给药(即每日上午造模,下午给药),健脾活骨方低、中、高剂量组分别给予健脾活骨方 $2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于0.5倍临床等效剂量)、 $5.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于1倍临床等效剂量)和 $10.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于2倍临床等效剂量),健骨生丸组给予药性药健骨生丸 $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于1倍临床等效剂量),给药体积为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药8周后进行取材。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色法观察股骨头组织的病理学状态 将双侧股骨头,置于4%多聚甲醛溶液中固定48~72 h后,用10%的EDTA-2Na溶液脱钙,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋、切片(厚度 $5\sim 7\ \mu\text{m}$),进行HE染色。光镜下观察,高倍镜下任选5个视野,每个视野内计数50个骨陷窝,计算空骨陷窝的百分比。用SPOT MIS图像处理分析系统,分析骨髓内脂肪面积和直径。

2.4 Micro-CT影像学观察股骨头形态 采用GE Healthcare公司RS0800604-0063 Micro-CT系统对样品进行扫描,扫描分辨率为 $25\ \mu\text{m}$,单次扫描时间72 min,采用GEHC Microviw软件进行样本的三维重建,并进行骨计量学骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、骨表面积体积比(BS/BV)和骨小梁分离度(Tb.Sp)的分析。

2.5 墨汁灌注标本切片透明观察 参照文献[18]进行墨汁灌注血管造影,将股骨头于4%多聚甲醛溶液固定48~72 h,10%的EDTA-2Na溶液脱钙,乙醇逐级脱水, $10\ \mu\text{m}$ 冠状面连续切片,二甲苯透明后封片。Olympus光学显微镜下观察股骨头内血管形态;在高倍镜下任选5个视野,用Image Pro Plus 5.0图像处理分析系统,分析骨髓内血管面积。

2.6 免疫组化染色 取组织石蜡切片,脱蜡至水,微波修复,5% BSA室温封闭10 min,滴加按抗体说明书比例稀释一抗(CD31, 1:50; VEGF, 1:200 稀释; VEGFR2, 1:1 600), $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜,DAB显色,苏木

素 $2\sim 3\ \text{min}$,自来水洗2遍,乙醇逐级脱水,二甲苯透明后封片。在高倍镜下,应用SPOT MIS图像处理分析系统,进行表达水平的统计。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测股骨头中PI3K、p-Akt、VEGF、PTEN蛋白表达水平 取大鼠股骨头,用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液研磨组织并提取蛋白,进行Bradford法定量后变性,配置浓度为10%的SDS-PAGE上样凝胶,上样、电泳、转膜、封闭、按抗体说明书比例稀释一抗(1:1 000) $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜、洗涤、二抗(1:3 000)室温孵育2 h,显影,凝胶成像仪成像,利用Image J软件对结果进行分析。

2.8 统计学分析 采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析,采用单因素方差分析进行组间比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对AONFH大鼠股骨头组织病理学的影响 股骨头HE染色结果显示,与正常组比较,模型组大鼠股骨头骨小梁断裂变细,空骨陷窝增多,细胞核固缩,脂肪细胞数量明显增多和直径明显变大,给予健脾活骨方治疗后这些病理变化得到明显改善。进一步组织病理半定量评分结果显示,模型组空骨陷窝率和脂肪细胞面积明显增加,脂肪细胞最大直径明显增大,健脾活骨方能剂量依赖性降低空骨陷窝率和脂肪细胞面积、脂肪细胞最大直径。健骨生丸组对大鼠股骨头病理学的影响与健脾活骨方中剂量组的疗效相近。见图1。

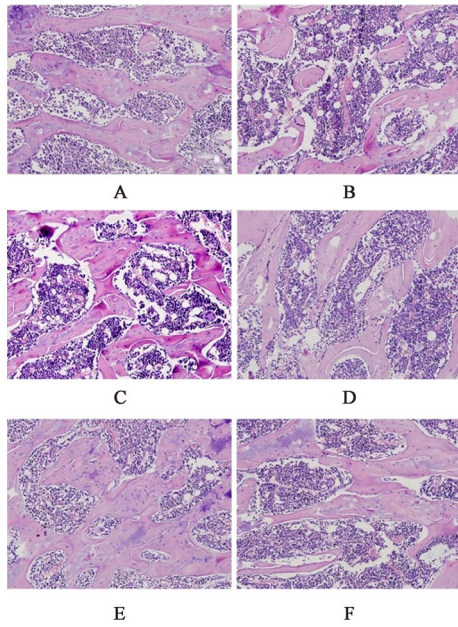
3.2 对AONFH大鼠股骨头影像学改变的影响 正常组股骨头表面光滑、完整、骨小梁致密;模型组股骨头表面凹凸不平、外形不完整,有明显塌陷或囊变,断板上骨组织稀疏;经健脾活骨方不同剂量和健骨生丸治疗后股骨头表面光滑度、外形完整性和断板上骨组织稀疏度均有不同程度的改善。进一步骨计量学分析结果显示,与正常组比较,模型组

表1 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头组织病理学的影响($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 1 Effect of JPHGP on histopathology of AONFH in rats ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	空骨陷窝率/%	脂肪细胞面积/ μm^2	脂肪细胞直径/ μm
正常组		16.7 \pm 4.7	142.0 \pm 25.5	21.7 \pm 2.1
模型组		42.3 \pm 3.2 ²⁾	477.7 \pm 44.8 ²⁾	57.0 \pm 6.1 ²⁾
健脾活骨方低剂量组	2.5	29.1 \pm 9.5	424.6 \pm 63.1 ⁴⁾	48.2 \pm 9.7
健脾活骨方中剂量组	5.0	22.3 \pm 9.3 ⁴⁾	387.5 \pm 92.3 ³⁾	40.3 \pm 9.3 ⁴⁾
健脾活骨方高剂量组	10.0	18.1 \pm 7.6 ⁵⁾	217.3 \pm 65.6 ⁴⁾	22.3 \pm 5.5 ⁴⁾
健骨生丸组	1.5	21.0 \pm 3.6 ⁴⁾	346.4 \pm 88.6 ³⁾	37.1 \pm 7.6 ⁵⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表6同)



注:A.正常组;B.模型组;C.健脾活骨方低剂量组;D.健脾活骨方中剂量组;E.健脾活骨方高剂量组;F.健骨生丸组(图2-图6同)

图1 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头组织病理学的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Jianpi Huogu prescription (JPHGP) on histopathology of AONFH in rats (HE,×200)

BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),BS/BV、Tb.Sp显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,健脾活骨方低剂量组BV/TV、Tb.Th、Tb.N均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),BS/BV显著降低($P<0.01$),BMD呈升高趋势,Tb.Sp呈下降趋势,但差异均无统计学意义,健脾活骨方中和高剂量组的BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N均明显升高($P<0.05$, $P<$

0.01),BS/BV、Tb.Sp明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);健骨生丸治疗组BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N也均显著升高($P<0.01$),BS/BV、Tb.Sp明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见图2、表2。

3.3 对AONFH大鼠股骨头微血管循环的影响 光镜下观察墨汁灌注大鼠股骨头组织切片,结果可见正常组股骨头髓腔内大量黑色灌注墨汁;与正常组比较,模型组股骨头髓腔内灌注墨汁面积显著减少($P<0.01$);与模型组比较,健脾活骨方各剂量组墨汁灌注面积明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),健骨生丸组墨汁灌注面积显著升高($P<0.01$)。见图3、表3。

3.4 对AONFH大鼠股骨头CD31表达水平的影响

免疫组化结果表明,与正常组比较,模型组股骨头CD31阳性表达显著减少($P<0.01$);与模型组比较,健脾活骨方治疗后中、高剂量组显著升高CD31阳性表达水平($P<0.01$),健脾活骨方低剂量组CD31阳性表达呈升高趋势,但差异无统计学意义,健骨生丸组也明显升高CD31的阳性表达水平,且作用与健脾活骨方中剂量组相近。见图4、表4。

3.5 对AONFH大鼠股骨头中VEGF和VEGFR2表达水平的影响 股骨头免疫组化结果表明,与正常组比较,模型组VEGF和VEGFR2阳性表达显著减少($P<0.01$);与模型组比较,健脾活骨方各剂量组VEGF和VEGFR2阳性表达呈剂量依赖性增加($P<0.05$, $P<0.01$),健骨生丸组对VEGF和VEGFR2的蛋白表达作用与健脾活骨方中剂量组相近。见图5、表5。

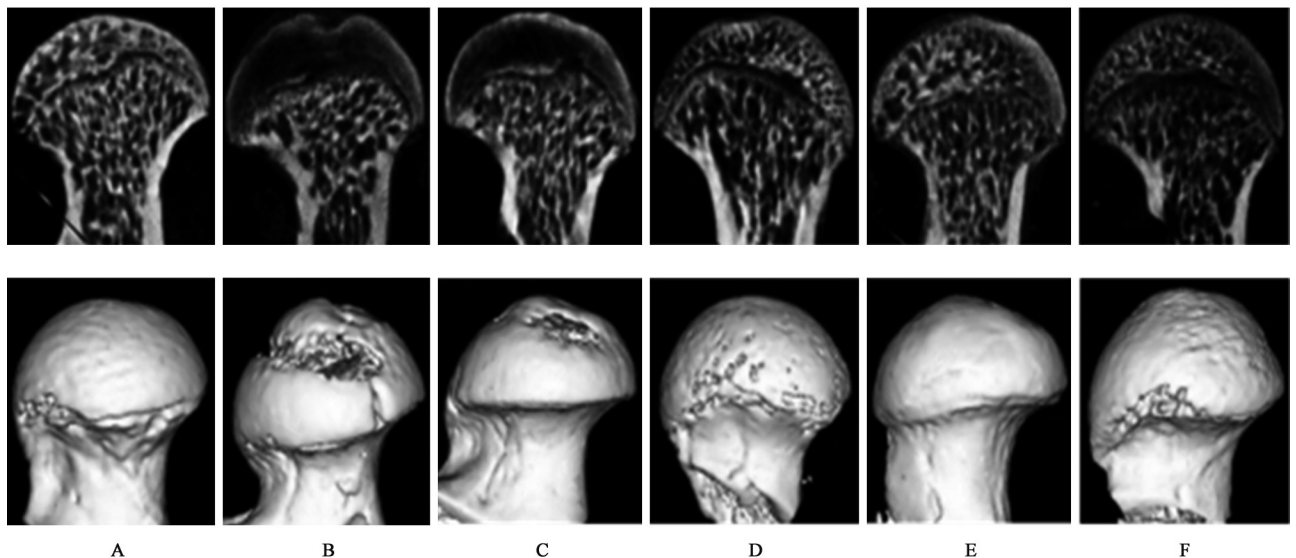


图2 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头的Micro-CT影像学影响

Fig. 2 Effect of JPHGP on Micro-CT imaging of AONFH in rats

表2 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头的Micro-CT影像学影响($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 2 Effect of JPHGP on Micro-CT imaging of AONFH in rats ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BMD/mg·cc ⁻¹	BS/BV/1/mm	BV/TV/%	Tb.N/1/mm	Tb.Th/mm	Tb.Sp/mm
正常组		493.9±90.0	0.6±0.3	84.0±20.1	7.6±1.6	0.55±0.09	0.023±0.019
模型组		231.7±117.1 ²⁾	4.5±1.0 ²⁾	54.4±20.2 ¹⁾	2.6±1.0 ²⁾	0.16±0.08 ²⁾	0.084±0.071 ²⁾
健脾活骨方低剂量组	2.5	364.4±182.4	2.8±1.1 ⁴⁾	82.2±23.8 ³⁾	7.1±2.7 ⁴⁾	0.39±0.22 ³⁾	0.054±0.040
健脾活骨方中剂量组	5.0	504.7±240.7 ⁴⁾	2.6±0.9 ⁴⁾	83.6±21.5 ³⁾	8.7±3.0 ⁴⁾	0.43±0.17 ³⁾	0.042±0.045 ³⁾
健脾活骨方高剂量组	10.0	562.2±206.0 ⁴⁾	1.6±0.5 ⁴⁾	93.6±15.6 ⁴⁾	8.2±3.3 ⁴⁾	0.48±0.20 ⁴⁾	0.020±0.016 ⁴⁾
健骨生丸组	1.5	534.8±140.6 ⁴⁾	2.5±0.8 ⁴⁾	93.0±12.3 ⁴⁾	7.3±2.9 ⁴⁾	0.45±0.13 ⁴⁾	0.037±0.029 ³⁾

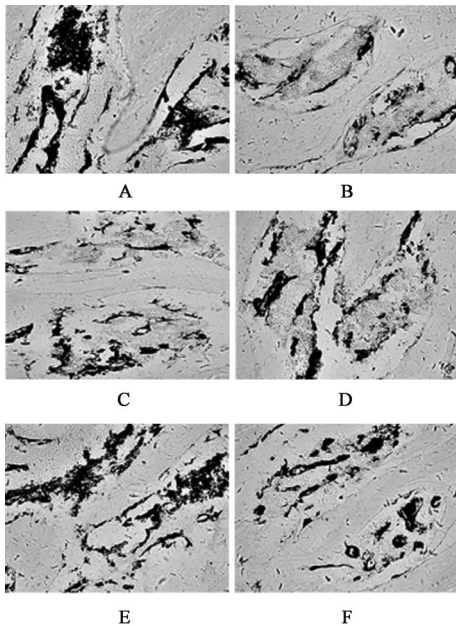


图3 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头墨汁灌注的影响(正置显微镜,×400)

Fig. 3 Effect of JPHGP on ink perfusion of AONFH in rats (orthomicroscope, ×400)

表3 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头墨汁灌注的影响($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 3 Effect of JPHGP on ink perfusion of AONFH in rats ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血管面积/μm ²
正常组		361.6±29.2
模型组		187.5±15.8 ²⁾
健脾活骨方低剂量组	2.5	228.5±12.0 ³⁾
健脾活骨方中剂量组	5.0	240.9±22.8 ⁴⁾
健脾活骨方高剂量组	10.0	345.0±35.3 ⁴⁾
健骨生丸组	1.5	235.9±26.2 ⁴⁾

3.6 对AONFH大鼠股骨头中PI3K、p-Akt和PTEN表达水平的影响 与正常组比较,模型组PI3K和p-Akt蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,健脾活骨方中高剂量组中PI3K和p-Akt蛋白表达均

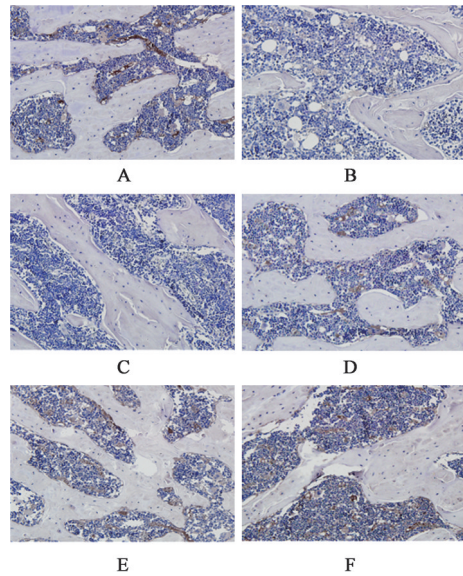


图4 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头CD31表达水平的影响(免疫组化,×100)

Fig. 4 Effect of JPHGP on CD31 expression levels of AONFH in rats(IHC, ×100)

表4 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头CD31表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 4 Effect of JPHGP on CD31 expression levels of AONFH in rats ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD31(×10 ³)
正常组		578.5±385.4
模型组		22.4±43.7 ²⁾
健脾活骨方低剂量组	2.5	97.4±34.7
健脾活骨方中剂量组	5.0	450.8±118.1 ⁴⁾
健脾活骨方高剂量组	10.0	654.3±278.3 ⁴⁾
健骨生丸组	1.5	612.4±229.6 ⁴⁾

呈剂量依赖性显著升高($P<0.01$),健脾活骨方低剂量组呈升高趋势,但差异无统计学意义,健骨生丸组对PI3K和p-Akt蛋白的表达作用与健脾活骨方中剂量组相近。与正常组比较,模型组PTEN蛋白表达显著升高,差异有显著统计学意义($P<0.01$);与模

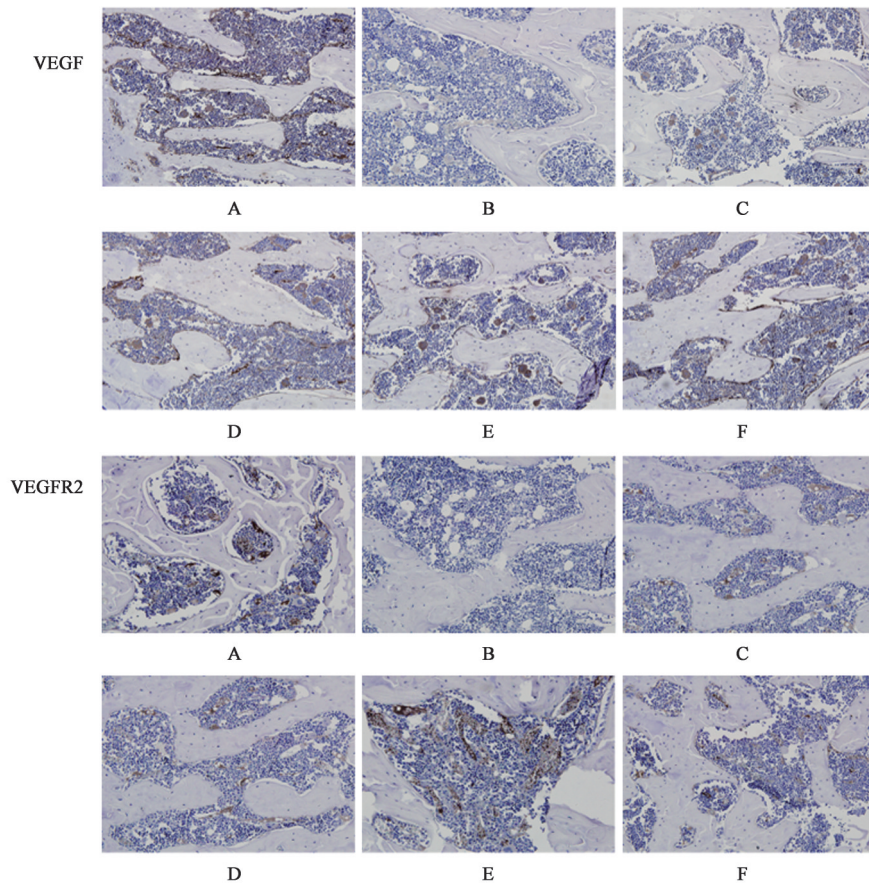


图5 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头中VEGF、VEGFR2表达水平的影响(免疫组化,×100)

Fig. 5 Effect of JPHGP on VEGF and VEGFR2 expression levels of AONFH in rats (IHC,×100)

表5 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头中VEGF、VEGFR2表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of JPHGP on VEGF and VEGFR2 expression levels of AONFH in rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGF(1×10 ⁴)	VEGFR2(×10 ³)
正常组		563.0±248.1	1 286.0±599.8
模型组		3.1±1.9 ²⁾	18.1±23.8 ²⁾
健脾活骨方低剂量组	2.5	396.1±214.9 ³⁾	662.3±290.7 ³⁾
健脾活骨方中剂量组	5.0	467.0±294.2 ⁴⁾	732.3±248.7 ⁴⁾
健脾活骨方高剂量组	10.0	672.5±132.2 ⁴⁾	1 209.0±585.1 ⁴⁾
健骨生丸组	1.5	535.0±348.3 ⁴⁾	818.8±292.6 ⁴⁾

型组比较,健脾活骨方中、高剂量组中PTEN的蛋白表达均呈剂量依赖性降低,差异有显著统计学意义($P<0.01$),健脾活骨方低剂量组呈降低趋势,但差异无统计学意义。与正常组比较,模型组Akt蛋白表达差异无统计学意义;与模型组比较,健脾活骨方各剂量组Akt蛋白表达差异无统计学意义。见图6、表6。

4 讨论

长期酗酒患者的血液黏滞度显著增加,并伴有

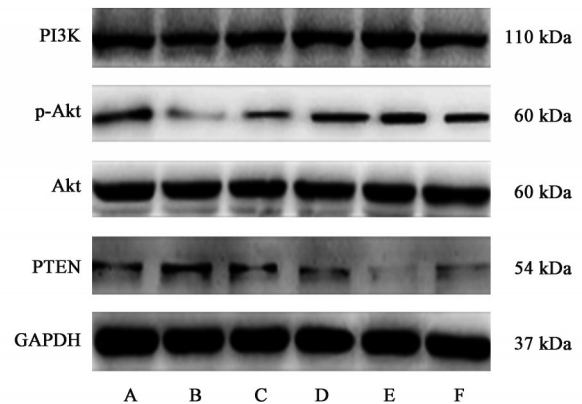


图6 各组大鼠股骨头中PI3K、Akt、p-Akt和PTEN表达水平电泳

Fig. 6 Electrophoresis of PI3K, Akt, p-Akt and PTEN expression levels of rats

血管内皮细胞损伤、成骨细胞脂肪变性、脂质代谢紊乱等病理改变,使患者股骨头内微血管减少,骨内压显著升高,最终导致股骨头坏死^[11-12]。研究药物干预AONFH的作用和机制需要合适的动物模型来提高临床转化的成功率。多篇研究报道长期灌胃不同浓度(含酒精45%、50%、56%等)的白酒均可诱导建立AONFH^[19-27]。本研究通过SD大鼠长期灌

表6 健脾活骨方对AONFH大鼠股骨头中PI3K、Akt、p-Akt和PTEN表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of JPHGP on PI3K, Akt, p-Akt and PTEN expression levels of AONFH in rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K/GAPDH	p-Akt/GAPDH	Akt/GAPDH	PTEN/GAPDH
正常组		0.915±0.035	0.437±0.018	0.676±0.009	0.813±0.025
模型组		0.579±0.027 ²⁾	0.233±0.009 ²⁾	0.687±0.007	1.220±0.069 ²⁾
健脾活骨方低剂量组	2.5	0.652±0.036	0.287±0.021	0.694±0.007	1.034±0.050
健脾活骨方中剂量组	5.0	0.867±0.044 ⁴⁾	0.339±0.012 ⁴⁾	0.678±0.007	0.879±0.063 ⁴⁾
健脾活骨方高剂量组	10.0	0.921±0.036 ⁴⁾	0.388±0.021 ⁴⁾	0.685±0.011	0.199±0.023 ⁴⁾
健骨生丸组	1.5	0.851±0.027 ⁴⁾	0.340±0.024 ⁴⁾	0.683±0.005	0.862±0.038 ⁴⁾

胃46%酒精度二锅头诱导建立AONFH模型,结果显示,连续12周灌酒模型大鼠呈现股骨头内骨细胞坏死、脂肪细胞变性、骨小梁稀疏甚至断裂、骨密度降低等组织病理学和影像学改变,提示成功建立AONFH大鼠模型。健脾活骨方是由苓桂术甘汤和四物汤加减而成,以“健脾活血”为治法的组方。本课题组前期研究证实健脾活骨方对激素性股骨头坏死的良好疗效。本研究基于AONFH大鼠模型,观察健脾活骨方对AONFH的治疗作用。股骨头组织病理学和Micro-CT检测结果显示,健脾活骨方能显著改善AONFH大鼠骨小梁断裂变细情况,降低空骨陷窝率、脂肪细胞数量和直径,改善塌陷或囊变情况,增加骨密度,提示健脾活骨方能有效治疗AONFH,这与前期研究的激素性股骨头坏死的结果相似^[15-16]。

墨汁灌注实验能较好的显示体内毛细血管分布情况,常应用于显示血管形态分布情况^[18]。墨汁灌注过程中,墨汁通过左心室进入血液循环,到达各器官和组织,器官和组织的染色过程能基本反映其生理性血液灌流过程,光镜下观察到的黑色线条显示为微血管^[28]。CD31是一种内皮细胞连接分子,参与体内多种生理过程,并能介导多种配体相互作用。CD31抗原广泛分布在血管的各种细胞上,免疫组化检测其表达情况可作为机体血管生成的标志^[29-31]。研究显示饮酒损伤脾胃,致气血生化无源,气血两虚,与激素性股骨头坏死比较,酒精所致的股骨头坏死患者股骨头内血运更少。为了观察“健脾活血”治法的健脾活骨方是否对股骨头坏死微血管损伤具有修复作用,笔者采用墨汁灌注实验检测股骨头内微血管形态和免疫组化检测股骨头内CD31的表达情况。结果显示,健脾活骨方能明显改善AONFH大鼠股骨头内墨汁灌注的微血管面积,提高股骨头内CD31的阳性表达水平,提示健脾活骨方对酒精所致的股骨头血管损伤具有保护作用。

VEGF是重要的促血管生成分子,与受体结合后,激活下游PI3K/Akt等信号通路,诱导多个血管生成相关基因的转录,从而发挥促进内皮细胞迁移和侵袭等功能^[32]。研究显示酒精所致的股骨头坏死患者股骨头内VEGF表达量降低。为了探索健脾活骨方改善股骨头坏死血管损伤的作用是否与激活VEGF及其下游的PI3K/Akt信号通路相关,笔者观察了股骨头内VEGF、VEGFR2及PI3K、p-Akt和PTEN的表达水平。结果显示,健脾活骨方能上调AONFH大鼠股骨头中VEGF、VEGFR2、PI3K、p-Akt蛋白的表达水平,同时降低PTEN的蛋白表达水平,但对Akt无明显影响。提示健脾活骨方可能通过调控VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt信号通路,促进股骨头损伤血管的修复,从而治疗AONFH。

综上所述,本研究通过AONFH大鼠模型证明了健脾活骨方对AONFH股骨头血管损伤具有修复作用,其机制可能与激活VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt信号通路有关,相关研究结果将有助于阐明其“健脾活血”的生物学内涵,为临床应用提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 汤朔,侯德才. 股骨头坏死动物模型构建:如何更接近临床应用[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(29): 4691-4696.
- [2] 陈志伟,王振涛,李泰贤,等. 酒精相关性股骨头坏死的发病特征分析[J]. 中医正骨, 2017, 29(12): 23-25, 30.
- [3] 周占国,郭浩山,关涛,等. 股骨头坏死病因的相关因素分析[J]. 中医正骨, 2020, 32(1): 7-10.
- [4] 谢斌,张小磊,王荣田,等. 酒精性股骨头坏死的发病特点分析[J]. 中国医刊, 2015, 50(11): 48-50.
- [5] 陈卫衡,林娜,王胜,等. 非创伤性股骨头坏死与激素、酒精的相关性研究[J]. 中国医药导报, 2006, 3(32): 16-18.
- [6] 熊智超. 调身通痹汤联合体外冲击波治疗早中期酒

- 精性股骨头坏死临床研究[D]. 南宁:广西中医药大学,2019.
- [7] 陈财,曾平,刘金富,等. 酒精性股骨头坏死的发病机制及其气滞血瘀型中医药治疗的研究进展[J]. 广西医学,2022,44(4):438-442.
- [8] 卫穗转,张小磊,谢斌,等. 酒精性股骨头坏死与血脂代谢的关系[J]. 中国临床研究,2016,29(12):1597-1600.
- [9] 武汀. 三七总皂苷对缺血致内皮紧密连接损伤及血管功能障碍的改善作用[D]. 北京:北京中医药大学,2016.
- [10] HE L, LIU C, SUN C, et al. Wu-Tou decoction inhibits angiogenesis in experimental arthritis by targeting VEGFR2 signaling pathway [J]. *Rejuvenation Res*, 2018,21(5):442-455.
- [11] YANG C, WANG J, CHEN L, et al. Tongluo Shenggu capsule promotes angiogenesis to ameliorate glucocorticoid-induced femoral head necrosis via upregulating VEGF signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 110:154629.
- [12] 陈卫衡,周宇,何海军,等. 健脾活骨方治疗早中期非创伤性股骨头坏死临床回顾性研究[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(8):1054-1058.
- [13] 陈卫衡,周宇,何海军,等. 健脾活骨方治疗早中期非创伤性股骨头坏死的前瞻性临床研究[J]. 中华关节外科杂志:电子版,2013,7(3):287-293.
- [14] KONG X, LI X, ZHANG C, et al. Ethyl acetate fraction of Huogu formula inhibits adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells via the BMP and Wnt signaling pathways[J]. *Int J Biol Sci*, 2017,13(4):480-491.
- [15] KONG X, LI X, ZHANG C, et al. Aqueous fraction of Huogu formula promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through the BMP and Wnt signaling pathways [J]. *Rejuvenation Res*, 2016, 19(6):509-520.
- [16] JIANG Y, LIU D, KONG X, et al. Huogu I formula prevents steroid-induced osteonecrosis in rats by down-regulating PPARgamma expression and activating wnt/LRP5/ beta-catenin signaling [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014,34(3):342-350.
- [17] CHEN W H, KONG X Y, WAN R, et al. Effects of huogu I formula (I) on correlated factors of bone regeneration in chickens with steroid-induced necrosis of femoral head[J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(5):378-384.
- [18] OKAZAKI S, NAGOYA S, TATEDA K, et al. Experimental rat model for alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Int J Exp Pathol*, 2013,94(5):312-319.
- [19] 彭普基,龙林生,彭昊. 酒精性股骨头坏死的发病机制及治疗进展[J]. 医学综述,2021,27(4):637-642.
- [20] 李明明,李海永,杨寿涛,等. 激素性和酒精性股骨头坏死组织形态学的对比分析[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2015,30(2):124-126.
- [21] MELONI M C, HOEDEMAEKER W R, FORNASIER V. Failed vascularized fibular graft in treatment of osteonecrosis of the femoral head. A histopathological analysis[J]. *Joints*, 2016,4(1):24-30.
- [22] 岳永彬. 黄芩苷 II 促成骨机制及对股骨头坏死兔脂联素、促黑素的影响[D]. 广州:广州中医药大学,2019.
- [23] 杨埜. Dkk-1/Wnt/ β -catenin 信号轴在酒精性股骨头坏死中的作用和机制研究[D]. 百色:右江民族医学院,2020
- [24] 陈涛. 大鼠酒精性股骨头坏死模型中骨细胞程序性坏死的研究[D]. 海口:海南医学院,2022.
- [25] 喻灿明. 不同酒精摄入量与股骨头缺血性坏死的相关性研究[D]. 福州:福建中医学院,2004.
- [26] 马慧,薛光辉,宋丽佳,等. 酒精性股骨头坏死动物模型的建立和观察[J]. 中外医疗,2013,32(8):29-30.
- [27] WANG Y, YIN L, LI Y, et al. Preventive effects of puerarin on alcohol-induced osteonecrosis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2008,466(5):1059-1067.
- [28] IKEMURA S, YAMAMOTO T, MOTOMURA G, et al. Lipid metabolism abnormalities in alcohol-treated rabbits: A morphometric and haematologic study comparing high and low alcohol doses [J]. *Int J Exp Pathol*, 2011,92(4):290-295.
- [29] LIU D, LI X, LI J, et al. Knee loading protects against osteonecrosis of the femoral head by enhancing vessel remodeling and bone healing [J]. *Bone*, 2015, 81:620-631.
- [30] KONDO T, TAKAHASHI M, YAMASAKI G, et al. Immunohistochemical analysis of CD31 expression in myocardial tissues from autopsies of patients with ischemic heart disease [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2022, 59:102127.
- [31] 刘春芳,王靖霞,何莲花,等. 风湿祛痛胶囊对 II 型胶原诱导性关节炎大鼠滑膜血管新生的影响[J]. 中国中药杂志,2019,44(7):1457-1463.
- [32] 李聪翀,张彦琼,李玮婕,等. 从 VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt 信号轴所介导的血管新生调控网络探索白虎加桂枝汤干预类风湿关节炎热证的作用及其机制 [J]. *药学报*, 2022,57(4):1044-1053.

[责任编辑 周冰冰]