

· 药理 ·

## 复方巴戟天合剂对激素性股骨头坏死大鼠 血管内皮生长因子表达的影响

孙克民<sup>1\*</sup>, 王和鸣<sup>2</sup>, 林久茂<sup>3</sup>

(1. 广东省深圳平乐骨伤科医院, 广东 深圳 518010; 2. 福建中医药大学, 福州 350108;  
3. 福建中西医结合研究院重点实验室, 福州 350108)

[摘要] 目的: 探讨复方巴戟天合剂对激素性股骨头缺血性坏死大鼠血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF mRNA)表达的影响。方法: SD 大白鼠 72 只, 随机分成正常组、模型组、对照组、治疗组。除正常组外, 第 1~4 周各组均每周 2 次 im 醋酸强的松龙  $24.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 第 4~8 周每周 1 次 im 醋酸强的松龙  $24.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 建立大鼠激素性股骨头缺血性坏死模型, 每日给药 1 次, 于实验后第 4, 8, 12 周分 3 批处死动物, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 VEGF mRNA 的表达。结果: 模型组造模第 4, 8 周时 VEGF mRNA 的表达逐渐减弱, 第 12 周稍有升高, 但仍较正常组低( $P < 0.05$ ); 治疗组在各时期与模型组比较均有升高( $P < 0.05$ ), 治疗第 12 周与第 8 周比较有显著性差异( $P < 0.05$ )。结论: 复方巴戟天合剂可增加股骨头内 VEGF mRNA 的表达, 可起到与仙灵骨葆胶囊相近的治疗效果。

[关键词] 复方巴戟天合剂; 股骨头坏死; 实验研究; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)07-0117-04

## Effect of Complex Bajitian Mixture on Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Rat with Steroid-induced Osteonecrosis of Femoral Head

SUN Ke-min<sup>1\*</sup>, WANG He-ming<sup>2</sup>, LIN Jiu-mao<sup>3</sup>

(1. Shenzhen Pingle Orthopaedic Hospital, Shenzhen 518010, China;  
2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China;  
3. Fujian Academy of Integrative Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Complex Bajitian mixture on the expression of VEGF mRNA in SD rats with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. **Method:** Seventy-two adult SD rats were randomized into four groups: normal control group, model group, positive control group and therapeutic group. Rat model of osteonecrosis of femoral head was established by injecting glucocorticoid. Each group was given drugs by gastric infusion one time a day. The rats were killed in the fourth, eighth and twelfth week respectively. The expression of VEGF mRNA was evaluated by RT-PCR. **Result:** The expression of VEGF mRNA was increased significantly after treatment on the 12<sup>th</sup> week compared to the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Complex Bajitian mixture can up-regulate the expression of VEGF mRNA. The therapeutic effect is close with the Xianling Gubao capsule.

[Key words] Complex Bajitian mixture; steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; experimental research; vascular endothelial growth factor

[收稿日期] 20101010(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30271630)

[通讯作者] \* 孙克民, 医学博士, 主治医师, 主要从事关节疾病及股骨头坏死研究, Tel: 0755-82366915, E-mail: skm613@163.com

目前对激素性股骨头缺血性坏死病理机制的研究都以各种原因所致血管病变为着眼点,重点讨论各种原因对血管的损害,补肾活血中药在临床治疗股骨头缺血性坏死中有显著疗效,国内学者已经研究激素性股骨头缺血性坏死股骨头局部血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 表达的变化及意义,他们提出激素性股骨头缺血性坏死后血管修复能力下降,血管内皮细胞的功能受到破坏影响,增加股骨头局部 VEGF 的表达,可能有助于股骨头坏死的修复。复方巴戟天合剂是福建中医学院王和鸣教授治疗股骨头缺血性坏死的有效方剂<sup>[1]</sup>,已有学者验证仙灵骨葆胶囊治疗股骨头缺血性坏死具有确切疗效<sup>[2]</sup>,我们应用仙灵骨葆胶囊作为对照,建立大鼠激素性股骨头缺血性坏死模型,应用复方巴戟天合剂治疗,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 VEGF mRNA 的表达,观察复方巴戟天合剂对激素性股骨头缺血性坏死的预防和治疗作用。

## 1 材料

**1.1 药物组成** 复方巴戟天合剂由福建中医药大学国医堂制剂室提供。组成:巴戟天 9 g,丹参 9 g,仙灵脾 9 g,黄芪 15 g,骨碎补 9 g,川断 12 g,三七 3 g,郁金 9 g,甘草 3 g。将药物制成水煎液(1 mL 药液中含 2.58 g 生药),密封备用。仙灵骨葆胶囊,贵州同济堂制药股份有限公司,批号 050414099。醋酸强的松龙,江苏扬州制药厂生产,批号 970397。

**1.2 动物** SD 大鼠 72 只(清洁级 30 d 龄),雌雄各半,每只体重(280 ± 20)g,购自福建医科大学实验动物中心(闽验证字 20050001,合格证号 2005C03,清洁级)。动物进入实验中心后适应性饲养 3 d,给予普通饲料饲养、自由活动、自由饮水、通风、光照充足、温度在 21 ℃,相对湿度控制在 70% ~ 80%,动物的饲养在福建中医学院动物实验中心进行。

**1.3 试剂** 血管内皮生长因子(VEGF)反转录试剂盒(Fermentas MBI 公司,lot 0004401);RNA 提取试剂 TRIzol Reagent (Invitrogen Cat No. 15596-026);引物(上海博亚生物技术有限公司合成)。

**1.4 仪器** Du650 紫外分光光度计(美国 BECKMAN 公司);9600DNA 扩增仪(美国 PE 生物系统公司);WD-9403c 紫外透射分析仪(北京六一仪器厂);GEL DOC 2000 凝胶成像系统(美国);三恒多用电泳仪(北京六一仪器厂);MDF-U4086 s 超低温冰箱(日本三洋公司);64R 低温高速离心机

(美国 BECKMAN 公司);MILLI-Q 超纯水装置(美国密理伯公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模及分组** 72 只 SD 大鼠随机分为 4 组:正常组、模型组、阳性药对照组、治疗组,每组 18 只。除正常组外,第 1 ~ 4 周各组均每周 2 次 im 醋酸强的松龙 24.5 mg·kg<sup>-1</sup>,第 4 ~ 8 周每周 1 次注射醋酸强的松龙 24.5 mg·kg<sup>-1</sup>造模,第 8 ~ 12 周不再注射醋酸强的松龙。造模期间采用大鼠两腿直立方式饮水和进食。

**2.2 给药方法** 造模同时给药。正常组:生理盐水 10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;模型组:生理盐水 10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;对照组:仙灵骨葆胶囊混悬液(1.2 g·mL<sup>-1</sup>)12 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;治疗组:复方巴戟天合剂 25.8 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。每组在第 4,8,12 周各处死 6 只。

**2.3 总核糖核酸(RNA)的提取** 将股骨头坏死组织称质量 100 mg 后置于无 Rnase 经 -80 ℃ 预冷的研钵中;加入 RNA 快速制备试剂 TRIZOL 1 mL,研磨,转移至 EP 管,颠倒混匀 10 下,室温 5 min;加氯仿 1/5 体积(0.2 mL);颠倒混匀 10 下,室温 5 min;4 ℃ 离心 12 000 × g × 15 min;转上层水相(约 400 μL)于另一 1.5 mL EP 管中;加等体积异丙醇(400 μL),混匀室温 10 min;4 ℃ 离心 12 000 × g × 10 min;弃上清,加冰预冷的 75% 乙醇(用 DEPC 水配)1 mL;4 ℃ 离心 7 500 × g × 5 min;弃上清,空气干燥 5 ~ 10 min;溶于 DEPC 水中至 50 μL。取 1 μL 稀释至 100 μL, Du650 紫外分光光度计上检测 RNA 的吸光度 A<sub>260 nm</sub>, A<sub>280 nm</sub>,并换算出总 RNA 浓度。

**2.4 VEGF 扩增引物合成** 所用 PCR 引物由上海博亚生物有限公司合成。VEGF 引物:5'-CGA AGT GGT GAA GTT CAT GGA TG-3'(上游),5'-TTC TGT ATC AGT CTT TCC TGG TGA G-3'(下游),其扩增产物长 535 bp;β-actin 引物:5'-GTT CGC CAT GGA TGA CGA TAT C-3'(上游),5'-GCC AGA TCT TCT CCA TGT CGT C-3'(下游),扩增产物 265 bp。

**2.5 反转录反应** RNA 提取液 2 μL,0.05 g·μL<sup>-1</sup>,Oligo(dT)<sub>15</sub> 2 μL,DEPC 水 9 μL,70 ℃ 预变性 5 min,立即置冰中 5 min;混匀,离心,加 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP mix 2 μL,5 × Reaction 缓冲液 4 μL,20 U·μL<sup>-1</sup> Rnasin 1 μL,混匀,离心,37 ℃ :5 min,加 200 u·μL<sup>-1</sup> M-MLV 1 μL 40 ℃ :60 min,70 ℃ :10 min,冰水浴,-20 ℃ 保存。

**2.6 PCR 反应** 20  $\mu\text{L}$  反应体系中包括 VEGF 上、下游引物各 0.2  $\mu\text{L}$  或  $\beta$ -actin 上、下游引物各 0.2  $\mu\text{L}$ ,模板 cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP 0.2  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 0.2  $\mu\text{L}$ , 加 DEPC 水 16.2  $\mu\text{L}$  至总体积 20  $\mu\text{L}$ , 95  $^{\circ}\text{C}$ :5 min, 立即冰水浴, 离心后进行 PCR 循环;循环参数为 95  $^{\circ}\text{C}$ :5 min 预变性, 94  $^{\circ}\text{C}$ :30 s, 54  $^{\circ}\text{C}$ :40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ :30 s, 循环 35 次, 72  $^{\circ}\text{C}$ :7 min 延伸。

**2.7 电泳** Marker 加 DEPC 水 4  $\mu\text{L}$  + 溴芬蓝 1  $\mu\text{L}$  + Ladder 1  $\mu\text{L}$ 。PCR 产物 6  $\mu\text{L}$  + 溴芬蓝 1  $\mu\text{L}$  反复吸打混匀后进行电泳。电流为 50 mA, 电源 100 V, 电泳 60 min。电泳结果通过凝胶图像分析系统对条带进行 PCR 定量;样本 VEGF mRNA 产物的 PCR 定量与  $\beta$ -actin 产物的 PCR 定量的比值, 为该样本 VEGF mRNA 在组织中的相对含量。

**2.8 统计学分析** 结果采用 SPSS10.0 统计软件包处理, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计方法为重复测量方差分析,  $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

正常组各时期 VEGF mRNA 的表达较强, 组间无显著性差异;模型组造模第 4 周时 VEGF mRNA 的表达减弱, 在 8 周时表达最低, 与正常组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ );第 12 周稍有升高, 但仍较正常组低 ( $P < 0.01$ );复方巴戟天合剂组在各时期与模型组比较均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 治疗第 12 周与第 8 周比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ );复方巴戟天合剂组与仙灵骨葆胶囊组间比较无显著性差异。见表 1。

表 1 VEGF mRNA 电泳条带灰度值比较

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$(\bar{x} \pm s, n = 6)$ INT/ $\text{mm}^2$		
		4 周	8 周	12 周
正常	-	1.01 $\pm$ 0.20	1.02 $\pm$ 0.21	0.99 $\pm$ 0.15
模型	-	0.41 $\pm$ 0.19 <sup>1)</sup>	0.37 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>	0.68 $\pm$ 0.16 <sup>1)</sup>
仙灵骨葆	12	0.76 $\pm$ 0.19 <sup>2)</sup>	0.53 $\pm$ 0.14 <sup>2)</sup>	0.73 $\pm$ 0.09 <sup>2,3)</sup>
复方巴戟天合剂	25.8	0.87 $\pm$ 0.31 <sup>2)</sup>	0.52 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	0.92 $\pm$ 0.34 <sup>2,3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与同组第 8 周比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

### 4 讨论

激素性股骨头坏死是一种临床常见的医源性疾病。长期或间断大量使用激素可引起股骨头缺血性坏死, 已逐渐被人们重视。袁捷等<sup>[3]</sup>采用每周 1 次

肌肉注射醋酸强的松龙成功制造了大鼠股骨头坏死模型, 国外 Wang<sup>[4]</sup>等也以本法诱导出股骨头缺血坏死早期模型。我们采用肌肉注射醋酸强的松龙诱导大鼠股骨头坏死模型, 结果发现, 短期内股骨头软骨下骨密度降低, 血液流变学、血脂明显异常, 表现为全血黏度、血浆黏度及总胆固醇明显升高。光镜和电镜下观察组织形态学, 发现明显的骨组织坏死改变, 证实大鼠股骨头缺血性坏死造模成功。

VEGF 重要的生物学功能就是诱导血管生成, 有强烈的内皮细胞促有丝分裂作用, 还有增加血管通透性、改变血管内皮的基因表达, 促使血管内皮分泌组织因子、胶原酶等的作用, 是一种强有力的血管生长因子, 其他促血管生成因子的血管生成作用也是通过增强 VEGF 的表达及生成来实现的<sup>[5]</sup>。VEGF 可特异性作用于内皮细胞, 发挥其增殖和生成血管的作用。最近有学者进行 VEGF 基因治疗促进血管再生的研究, 可望为肢体缺血性疾病的治疗提供新的方法<sup>[6]</sup>。血管生成的方式有血管新生和血管发生两种, 一般认为 VEGF 既参与血管发生又参与血管新生。VEGF 与受体结合后能促进内皮细胞的分裂、增生、游走、迁移, 从而促进新生血管形成<sup>[7]</sup>。在股骨头缺血、坏死后, 机体将产生修复反应, 内皮细胞形成的毛细血管生长到坏死组织中, 进行骨质的修复与改建。VEGF 不仅对成骨有影响, 而且与破骨作用关系也非常密切。Nakagawa 等<sup>[8]</sup>报道 VEGF 可促进破骨细胞骨吸收与延长成熟破骨细胞的存活。

由于股骨头自然修复过程缓慢, 且坏死区只有部分能被修复, 因此采取有效手段促进坏死区血管再生和新骨形成是治疗股骨头缺血性坏死的关键。国内学者已经研究激素性股骨头缺血性坏死股骨头局部 VEGF mRNA 表达的变化及意义, 提出激素性股骨头缺血性坏死后血管修复能力下降, 血管内皮细胞的功能受到破坏影响, 增加股骨头局部 VEGF 的表达, 可能有助于股骨头坏死的修复。本实验研究发现正常组各时期 VEGF mRNA 的表达较强, 造模第 4 周时 VEGF mRNA 的表达减弱, 随着时间的推移, 在第 8 周时表达最低, 第 12 周停止应用激素时又可见稍有修复, 但仍然较正常组低。治疗组在各时期与模型组比较均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 治疗第 12 周与第 8 周比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 治疗组与对照组间比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

# 杜仲对紫外线致 ESF-1 细胞光老化保护作用的研究

徐艳明, 张宁, 井丽巍, 陈巧云, 祁永华, 李建民\*

(黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

**[摘要]** 目的:研究杜仲抗紫外线致 ESF-1 细胞光老化作用,并初步探讨其作用机制。方法:杜仲 70% 乙醇提取物上 D101 大孔树脂制备不同浓度乙醇梯度洗脱部位,采用  $40 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  的 UVA 或  $70 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$  的 UVB 照射 ESF-1 细胞后,立即加入不同浓度的杜仲 50% 乙醇洗脱部位,24 h 后 MTT 法测定细胞活性,试剂盒法测定细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA)含量。结果:杜仲 50% 乙醇大孔树脂洗脱部位  $250, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的给药浓度能使 UVA 诱导的光老化细胞活性明显增强( $P < 0.05$ ),细胞培养液中 LDH 活力明显降低( $P < 0.05$ ),其中  $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的给药浓度能使细胞培养液中 SOD 活力明显升高( $P < 0.05$ ),MDA 含量明显降低( $P < 0.05$ ); $125, 250, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的给药浓度能使 UVB 诱导的光老化细胞活性明显增强,其中  $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的给药浓度能使细胞培养液中 LDH 活力明显降低( $P < 0.05$ ),SOD 活力明显升高( $P < 0.05$ ),MDA 含量明显降低( $P < 0.05$ )。结论:杜仲 50% 乙醇大孔树脂洗脱部位对 UVA 和 UVB 致 ESF-1 细胞光老化具有良好的保护作用,推测其机制为通过提高 SOD 活力、加速氧自由基的清除和减少氧自由基的产生,使细胞的脂质过氧化损伤程度降低;同时,可能通过抗氧化作用,维持了细胞膜结构和功能的完整性,使 LDH 的漏出减少。

**[关键词]** 杜仲;紫外线;光老化;ESF-1 细胞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0120-04

**[收稿日期]** 20101027(003)

**[基金项目]** 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11541332,1154G15);黑龙江省中医药管理局课题(ZHY08-Z33,ZHY10-W05);黑龙江省科技厅青年科学基金(QC08C11);黑龙江中医药大学校科研基金(200919)

**[第一作者]** 徐艳明,硕士研究生,主要从事中药新药研究与开发,Tel:0454-6103864,E-mail:xuyanming428@126.com

**[通讯作者]** \*李建民,硕士,副教授,主要从事中药药效物质基础研究,Tel:0454-6105555,E-mail:ljm\_1030@126.com

提示激素可降低 VEGF mRNA 的表达,停止应用激素后 VEGF mRNA 的表达增强。治疗组与对照组 VEGF mRNA 的表达趋势同模型组,但与模型组间有显著性差异( $P < 0.05$ )。提示复方巴戟天合剂可增加 VEGF mRNA 的表达,可起到与仙灵骨葆胶囊相近的治疗效果。激素性股骨头缺血性坏死后血管修复能力下降,血管内皮细胞的功能受到破坏影响,增加股骨头局部 VEGF 的表达,可能有助于股骨头坏死的修复。

## [参考文献]

[1] 李文顺,孙克民,王和鸣,等. 复方巴戟天合剂治疗股骨头缺血性坏死的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2006, 14(2): 9.

[2] 江中潮,邓友章,汪国友,等. 仙灵骨葆胶囊治疗股骨头缺血性坏死 30 例的临床观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2006, 14(增刊): 56.

[3] 袁捷,林吉,徐传毅,等. 络生骨胶囊预防激素性股骨头缺血性坏死的药效学实验[J]. 中药新药与临

床药理, 2005, 16(3): 185.

[4] Wang G T. The Effect of core decompression on femoral head blood flow in steroid induced avascular necrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg(Am), 1985, 67(1): 121.

[5] 陈希哲,杨连甲. 血管内皮生长因子与骨的形成及修复[J]. 中华骨科杂志, 2001, 21(7): 440.

[6] Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia[J]. Circulation, 1998, 97(4): 1114.

[7] 王建华,尹庆水,黄清春,等. 血管内皮生长因子促血管形成作用及其调控[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(2): 210.

[8] Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, et al. Vascular endothelial growth factor directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts[J]. Fabs Letters, 2000, 473(3): 161.

[责任编辑 聂淑琴]