

· 药理 ·

## 健脾活血方对激素性股骨头坏死血管 内皮生长因子表达的影响

田 能<sup>1</sup>, 孔祥英<sup>1</sup>, 万 蓉<sup>1</sup>, 林 娜<sup>1\*</sup>, 李 莉<sup>2</sup>, 陈卫衡<sup>2</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院骨伤科研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**通过观察健脾活血方对激素性股骨头坏死(SONFH)鸡股骨头内血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,探讨其防治 SONFH 的作用机制。**方法:**胸肌注射甲基化泼尼松建立 SONFH 模型,64 只来航鸡随机平均分为正常组、模型组、洛伐他汀组和健脾活血组;实验 8 周和 16 周翼下静脉采血测定血清总胆固醇(CHO)和甘油三酯(TG)的含量,并取双侧股骨头行 HE 染色观察其组织病理学改变,用免疫组织化学法检测股骨头内 VEGF 的表达水平。**结果:**实验 8 周和 16 周,模型组股骨头出现空骨陷窝率和脂肪面积明显增多等病理改变,与正常组相比,股骨头内 VEGF 表达明显减少( $P < 0.05$ ),血清 CHO、TG 水平明显升高;洛伐他汀与健脾活血方能不同程度改善由激素引起的股骨头坏死组织形态学改变,升高股骨头内 VEGF 的表达,减低血清 TG、CHO 水平(与模型组比较  $P < 0.05$ )。**结论:**健脾活血方可上调股骨头内 VEGF 的表达,这可能是其有效改善股骨头微循环障碍,防治 SONFH 的作用机制之一。

**[关键词]** 激素性股骨头坏死;健脾活血;总胆固醇;甘油三酯;血管内皮生长因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0048-04

## Effect of Jianpi Huoxue Decoction on the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Steroid-induced Osteonecrosis of the Femoral Head

TIAN Neng<sup>1</sup>, KONG Xiang-ying<sup>1</sup>, WAN Rong<sup>1</sup>, LIN Na<sup>1\*</sup>, LI Li<sup>2</sup>, CHEN Wei-heng<sup>2</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Jianpi Huoxue Decoction on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the femoral head of chicken with Steroid-induced Osteonecrosis of the Femoral Head (SONFH), as well as to explore the mechanism of prevention and treatment for SONFH. **Methods:** The animal model of SONFH was established with injection of methylprednisolone in chest muscle of chickens. 64 Leghorn chickens were randomly divided into normal control group, model group, lovastatin group and Jianpi Huoxue group, 16 in each group. At 8<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> weeks, blood samples were obtained to determine the level of serum total cholesterol (CHO) and triglycerid (TG), then femoral heads of both sides were taken off to observe the histopathological changes with hematoxylin and eosin staining and the expression of VEGF with immunohistochemical method. **Results:** At 8<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> weeks, in model group, relatively typical pathological changes were observed in the femoral head, the ratio of empty lacuna and fat area increased obviously, Compared with normal group, the level of serum

**[收稿日期]** 2009-06-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上资助项目(30472131,30873394)

**[通讯作者]** \*林 娜, Tel:(010)64011692; E-mail:Linna888@163.com

CHO and TG increased and the expression of VEGF decreased significantly ( $P < 0.05$ ); Both lovastatin and Jianpi Huoxue Decoction could improve the morphological changes of steroid-induced femoral head necrosis at different levels, increased the expression of VEGF, decreased the level of serum CHO and TG (Compared with model group,  $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Jianpi Huoxue Decoction can up-regulate the expression of VEGF, this may be one of the mechanisms for improvement in microcirculation in femoral head and the preventive and therapeutic effect for SONFH.

[**Key words**] steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; Jianpi Huoxue; CHO; TG; VEGF

激素性股骨头坏死 (Steroid-induced Osteonecrosis of the Femoral Head, SONFH) 是由大剂量应用激素造成股骨头活性成分 (骨细胞、骨髓造血细胞及脂肪细胞) 死亡的病理过程<sup>[1]</sup>, 血脂代谢紊乱是其主要的病理机制之一。血脂增高可引起广泛性血管损伤<sup>[2]</sup>, 导致血管内皮功能紊乱, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 分泌减少, 抑制骨形成、修复及血管再生功能。健脾活血方是我们治疗 SONFH 的经验用方, 具有较好的临床疗效<sup>[3]</sup>。本实验通过鸡激素性股骨头坏死模型, 观察健脾活血方对股骨头形态改变、血清总胆固醇 (CHO)、甘油三酯 (TG) 含量和股骨头血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的影响, 以探讨健脾活血方对 SONFH 的防治作用和机制, 为其临床的合理应用及进一步研发提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 实验动物** 雌性健康来航鸡 64 只, 16 月龄, 体重 1.80 ~ 2.30 kg, 由北京梅里来维通实验动物技术有限公司提供。

**1.2 药品与试剂** 健脾活血方: (由茯苓、桂枝、白术、党参、法半夏、当归、川芎等组成), 由中国中医科学院中药研究所提供, 药物制成水煎液 (1 mL 药液中含 1 g 生药); 洛伐他汀片, 购自北京万生药业有限责任公司, 批号 20050304; 甲基氢化泼尼松琥珀酸钠, 购自比利时法玛西亚普强公司, 批号 LH1208; VEGF 单克隆抗体和 SABC 检测试剂盒购自北京博士德公司。CHO 与 TG 试剂盒, 购自北京百化康泰临床试剂有限公司。

**1.3 实验仪器** AU400 型全自动生化仪、TSJ-1 型自动组织脱水机、BMJ-1 生物组织包埋机、QPJ-C 轮转式切片机、ZPJ-1A 展片机、KPJ-1A 烤片机均为爱华公司产品; BX60 光学显微镜为 Olympus 公司产品。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 参照王心生<sup>[4]</sup>造模方法, 进行部分改良, 通过胸肌注射甲基氢化泼尼松 ( $5.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每周 1 次, 连续 16 周), 制备激素性股骨头坏死鸡模型, 并按体重分层随机分为模型组 (ig 同体积生理盐水)、洛伐他汀组 (阳性药,  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 和健脾活血组 ( $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 相当于临床等效剂量的 0.8 倍), 其余 16 只 ig 同体积生理盐水设为正常对照组。连续 ig 16 周。所有动物 im 青霉素 2 万  $\text{U} \cdot \text{kg}^{-1}$  和链霉素  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每周 2 次, 以预防感染。

**2.2 血脂检测** 采用 OLYMPUS 全自动生化仪。给药后 8、16 周鸡翼下静脉取 4 mL 全血, 酶法测定血清 CHO 和 TG 的含量。

**2.3 组织病理学观察** 给药后 8、16 周取材, 每组每个时间点各取 8 只动物断颈处死, 取双侧股骨头, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 ~ 72 h, 然后以 12.5% EDTA-2Na 溶液脱钙, 梯度酒精脱水, 常规石蜡包埋、切片, 切片厚度为 5  $\mu\text{m}$ , 进行 HE 染色。光镜下观察股骨头组织病理学改变。

**2.4 免疫组化染色** 取组织石蜡切片, 脱蜡至水, 3% 双氧水处理后蒸馏水洗涤, 37  $^{\circ}\text{C}$  复合酶消化。PBS 洗涤, 血清封闭, 滴加 I 抗 (浓度 1:50), 置 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 用即用型 SABC 检测试剂盒进行股骨头内 VEGF 免疫组织化学染色, 应用 SPOT MIS 图像处理分析系统, 在 400 倍视野下, 进行阳性细胞计数。

**2.5 统计学方法** 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较用单因素方差分析, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 3 结果

**3.1 健脾活血方对 SONFH 鸡股骨头组织病理形态的影响** 激素注射 8 周时, 骨小梁稀疏, 脂肪细胞明显增生、肥大, 空骨陷窝率与脂肪面积较正常组增多 ( $P < 0.05$ ), 16 周时骨小梁稀疏、断裂, 部分坏死, 脂

肪细胞融合成大片空泡状,空骨陷窝率与脂肪面积明显增多( $P < 0.01$ )。与模型组相比,洛伐他汀组与健脾活血组 8 周与 16 周脂肪面积均明显减少( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),健脾活血组骨小梁排列尚规则、致密,8 周和 16 周空骨陷窝率均减少( $P < 0.05$ ),洛伐他汀组 8 周空骨陷窝率减少( $P < 0.05$ ),16 周无明显差异。

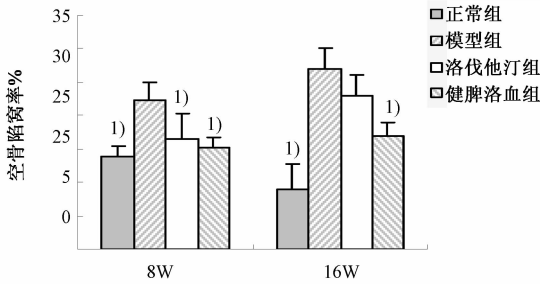


图 1 各组鸡股骨头空骨陷窝率比较

注:与模型组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (以下同)。

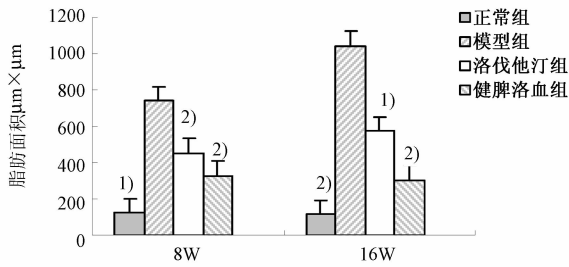


图 2 各组鸡股骨头脂肪面积比较

**3.2 健脾活血方对 SONFH 鸡血清 CHO, TG 含量的影响** 结果见表 1。给药后 8 周和 16 周,与正常组相比,模型组动物血清 CHO 和 TG 均明显升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );与模型组相比,洛伐他汀组与健脾活血组动物血清 CHO 和 TG 均明显降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

表 1 各组鸡血清 CHO 和 TG 水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 ( $g \cdot kg^{-1}$ )	CHO( $mmol \cdot L^{-1}$ )		TG( $mmol \cdot L^{-1}$ )	
		8 周	16 周	8 周	16 周
正常组	—	4.2 ± 0.8 <sup>1)</sup>	3.7 ± 0.9 <sup>1)</sup>	4.2 ± 0.6 <sup>1)</sup>	4.9 ± 1.9 <sup>1)</sup>
模型组	—	5.6 ± 0.5	6.0 ± 1.1	7.6 ± 1.3	9.1 ± 0.8
洛伐他汀组	0.004	4.2 ± 0.6 <sup>1)</sup>	3.6 ± 0.6 <sup>1)</sup>	4.1 ± 0.8 <sup>2)</sup>	5.8 ± 1.7 <sup>2)</sup>
健脾活血组	6.0	3.8 ± 0.8 <sup>2)</sup>	3.6 ± 0.7 <sup>1)</sup>	4.2 ± 1.0 <sup>1)</sup>	4.8 ± 1.5 <sup>2)</sup>

**3.3 健脾活血方对 SONFH 鸡股骨头内 VEGF 表达的影响** 结果见表 2 和图 3。股骨头软骨细胞、骨细胞、成骨细胞、髓腔部分造血细胞内可见棕色阳性颗粒表达。与正常组相比,模型组 8 周和 16 周阳性细

胞计数均明显减少( $P < 0.01$ );与模型组相比,洛伐他汀与健脾活血治疗 8 周与 16 周阳性细胞计数均显著增多( $P < 0.01$ )。

表 2 各组鸡股骨头 VEGF 阳性细胞计数比较(单位:个; $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量( $g \cdot kg^{-1}$ )	8 周	16 周
正常组	—	62.7 ± 8.7 <sup>2)</sup>	63.3 ± 3.9 <sup>2)</sup>
模型组	—	43.5 ± 9.6	44.8 ± 6.8
洛伐他汀组	0.004	63.0 ± 6.1 <sup>2)</sup>	66.7 ± 2.1 <sup>2)</sup>
健脾活血组	6.0	61.2 ± 5.7 <sup>2)</sup>	68.0 ± 2.4 <sup>2)</sup>

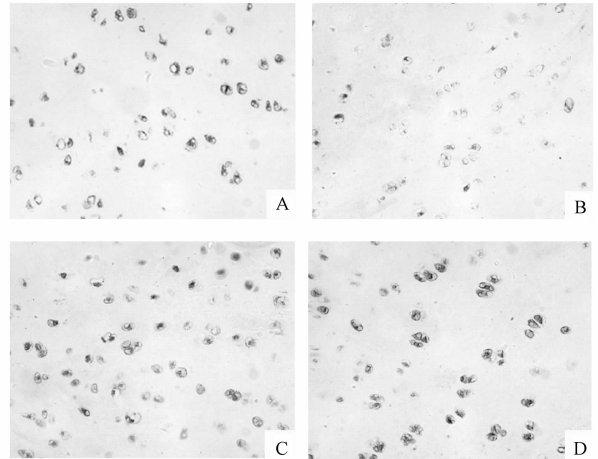


图 3 实验 8 周健脾活血方对股骨头内 VEGF 表达的影响 ×400

A. 正常组; B. 模型组; C. 洛伐他汀组; D. 健脾活血组

#### 4 讨论

中医把 SONFH 归属于“骨痹”与“骨痿”等范畴,认为其病因病机主要为瘀阻、寒湿、内损、劳损和肝肾亏虚等,故多以活血化瘀、温经通络、补气益血、补益肝肾或补肾壮骨等为其治则治法<sup>[5~6]</sup>。我们通过长期临床观察,发现大量使用激素后,正气损伤,脾胃虚弱不能运化水谷精微,停而为湿,聚而为痰,由痰致瘀,因瘀致痹,因此认为“痰”、“瘀”是 SONFH 的主要病因,“痰瘀同病”为其早期证候特征<sup>[7~8]</sup>。且在此理论指导下应用健脾化痰、活血通络法治疗 SONFH,取得了良好的临床疗效<sup>[3]</sup>。

高血脂为中医所称的“无形之痰”,是血中痰浊的生化物质基础<sup>[9]</sup>。长期或大量使用激素致血脂代谢紊乱,血液中 CHO 和 TG 升高,形成高脂血症,进而引起血管内皮细胞损伤,导致 VEGF 分泌减少。VEGF 是一种特异性作用于血管内皮的多功能细胞因子,主要由内皮细胞、软骨细胞、骨细胞、成骨细胞等分泌,其不仅能促进微血管的内皮细胞增生,还可增加微血管内皮细胞的通透性,使大分子物质如纤

维蛋白原等更易进入细胞外基质中,允许和支持新生血管和基质细胞的内向生长<sup>[10]</sup>。研究显示<sup>[11-12]</sup>在骨创伤修复过程中,VEGF 不仅可以诱导新生血管的形成,保证骨再生过程中所需的血供;还直接参与了纤维性骨痂的转化、软骨骨痂和硬骨骨痂直至成熟骨痂的形成等各阶段。可见 VEGF 不仅是促血管形成因子,也是重要的骨生长因子。因此,血脂代谢紊乱导致 VEGF 分泌及功能异常,阻碍了股骨头缺血坏死区骨组织的重建与修复。

我们在实验中也发现:应用激素后鸡股骨头内骨小梁稀疏,空骨陷窝增多,脂肪细胞增生、肥大,脂肪面积明显增多;同时,血清 CHO 和 TG 升高,股骨头内 VEGF 表达明显下降。这提示激素导致血脂代谢紊乱,股骨头内微循环障碍,VEGF 分泌减少,血管生成作用减弱,血供不足,骨的活性成分发生了缺血坏死。健脾活血方能降低鸡血清中的 TG 和 CHO,同时上调股骨头内 VEGF 的表达,明显改善模型组中出现的股骨头组织病理结构。分析其机制可能一方面通过降低血脂保护血管内皮,维持 VEGF 分泌及功能正常;另一方面增强软骨细胞、骨细胞、成骨细胞等细胞活性,促进其分泌 VEGF。以上两种途径共同促进了血管的修复和新生,改善股骨头局部的血液供应,扭转其缺血状态,促进了骨组织修复与重建。

洛伐他汀是临床常用降血脂药。我们的结果显示洛伐他汀主要在早期对 SONFH 组织病理改变有改善作用,而后期效果不显著。而健脾活血方在给药 8 周和 16 周对预防骨小梁稀疏、断裂和坏死,抑制脂肪增生和肥大,降低空骨陷窝作用相当,表现出对 SONFH 具有较好的长期防治效果。这可能因其从多途径促进了 VEGF 的分泌增多,使股骨头缺血区侧枝循环建立,有效改善股骨头微循环障碍,从而

对 SONFH 起到了较好的防治作用。

### [参考文献]

- [1] 史风雷,陈峰,郑志永. 激素性骨坏死的发病机制及中医药防治[J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11(15): 1519.
- [2] Tselepis AD, Elisaf M, Goudevenos J, *et al.* Lipid profile in patients with microvascular angina[J]. *Eur J Clin Invest*, 1996, 26: 1150.
- [3] 陈卫衡,刘道兵,张强. SARS 后股骨头坏死的证候特点及治疗方案优化研究(下)[J]. 中国中医药现代远程教育,2006,4(11):54.
- [4] 王心生,康文成,许振华. 激素性股骨头缺血坏死动物模型的研制[J]. 中华实验外科杂志, 1993, 10(3): 136.
- [5] 王萍,高红艳. 辨证分型治疗激素性股骨头坏死 117 例[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(1): 36.
- [6] 沈朝萍. 股骨头坏死的治疗[J]. 山东中医药杂志, 2001, 20(6): 355.
- [7] 汪晓燕,陈卫衡,宋剑南. 非创伤性股骨头坏死及其证候与血脂代谢的关系[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(5): 368.
- [8] 陈卫衡,张强,周卫,等. SARS 后骨坏死早期中医证候规律初探[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(2):140.
- [9] 陈卫衡. 股骨头坏死“痰瘀同治”的理论基础[J]. 江苏中医药, 2008, 40(5): 3.
- [10] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. *Endocr Res*, 1997, 18(4): 4.
- [11] 初同伟,王正国,朱佩芳,等. 骨折愈合过程中 VEGF 及其受体的表达[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(5): 344.
- [12] Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signaling in transformation and differentiation [J]. *Mol Pathol*, 2001, 54(3): 133.