

## • 基础研究 •

# 活血化瘀中药联合血管内皮生长因子基因转移促进股骨头坏死处新生血管形成的实验研究

李峻辉, 吴亚玲, 叶建红, 宁亚功, 于海鹰, 彭仲杰, 栾晓文  
(成都军区昆明总医院全军中医中心, 云南 昆明 650032)

**【摘要】** 目的: 观察活血化瘀中药联合血管内皮生长因子(VEGF)基因转移对促进股骨头缺血坏死处新生血管形成情况。方法: 日本大耳兔 40只, 随机分为对照组、模型组、中药组、基因组和综合组。治疗 8周后采用免疫组织化学方法观察股骨头滑膜 VEGF阳性细胞率及数字减影血管造影股骨头血管数目改变情况。结果: 模型组 VEGF阳性细胞表达率减低, 与对照组、基因组、综合组比较, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 与中药组比较, 有统计学差异( $P < 0.05$ ), 综合组 VEGF阳性细胞表达率较高, 与中药组及基因组比较, 有统计学差异( $P < 0.05$ )。血管数目: 在 A区, 各组与模型组比较, 均无统计学差异; 在 B区, 各组较模型组血管数目均有增加, 对照组、基因组、综合组与模型组比较, 有统计学差异( $P < 0.05$ )。综合组与基因组比较有统计学差异( $P < 0.05$ ), 中药组虽然血管数目较模型组多, 但是无统计学意义。结论: 活血化瘀中药及 VEGF基因转移均可促进股骨头缺血坏死处局部新生血管形成和侧支循环的建立, 尤以活血化瘀中药联合基因疗法效果为好, 为临床应用活血化瘀中药联合基因疗法治疗股骨头缺血性坏死提供实验依据。

**【关键词】** 股骨头坏死; 血管内皮生长因子类; 免疫组织化学; 活血祛瘀药

**Experimental study on the traditional Chinese blood activating herbs and VEGF gene transfer for promoting vascularization in vascular necrotic of femoral head** LI Jun-hui, WU Ya-ling, YE Jian-hong, NING Ya-gong, YU Hai-ying, PENG Zhong-jie, LUAN Xiaowen. *Kunming General Hospital of Chengdu Military, Kunming 650032 Yunnan, China*

**ABSTRACT Objective** To study the effects of the traditional Chinese blood activating herbs and VEGF gene transfer on promoting the vascularization in avascular necrotic of femoral head. **Methods** Forty Japanese flap eared rabbits were randomly divided into control group, model group, Chinese herb group, gene group and combined group. The rate of VEGF positive cells expression in synovium of femoral head was assessed with immunohistochemical method and the vascular numbers were measured with Digital subtraction angiography. **Results** The rate of VEGF positive cells expression in model group was lower than those in Chinese herb group ( $P < 0.05$ ) and other groups ( $P < 0.01$ ), the rate of VEGF positive cells expression in combined group was higher than those in Chinese herb group and gene group ( $P < 0.05$ ). The number of blood vessels in A area had no statistic differences between model group and other three groups while in B areas, the number obviously increased in control group, gene group and combined group compared with that in model group ( $P < 0.05$ ), and the number of blood vessels in combined group was larger than that in gene group ( $P < 0.05$ ), the number in Chinese herb group was larger than that in model group but there was no statistic difference between these two groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The traditional Chinese blood activating herbs and VEGF gene transfer can promote the vascularization and establishment of collateral circulation in the avascular necrotic of femoral head. The combination of above two methods is especially effective, which provides an experimental basis for the traditional Chinese blood activating herbs and VEGF gene transfer for the treatment of avascular necrosis of femoral head.

**Key words** Femur head necrosis; Vascular endothelial growth factors; Immunohistochemistry; Blood stasis remove drugs  
Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(6): 391-393 www.zggssz.com

为探讨活血化瘀中药联合血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因转移治疗股骨头缺血坏死的作用机制, 对其促进股骨头缺血坏死处局部新生血管形成数量进行了实验观察, 并与单纯中药、单纯基因治疗方法进

行了比较, 现将实验结果报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验药品与试剂** 活血化瘀中药为丹参、当归、没药、元胡、牛膝、三七、土鳖虫等, 由成都军区昆明总医院中药房提供, 上述诸药水煎浓缩为含生药浓度 1 g/ml 的中药液。经过纯化的重组 VEGF 基因的真核表达载体 (pdNA/VEGF), 由

基金项目: 云南省自然科学基金青年项目(编号: 2002C0025Q)

通讯作者: 李峻辉 Tel 0871-4774641

北京大学医学部心血管研究所刘国庆教授惠赠。质粒(大量)抽提试剂盒(10次),购自上海华舜生物工程公司。兔抗人 VEGF 抗体(Biological公司, USA)。醋酸泼尼松龙注射液(每支 125 mg/5 ml),浙江医药股份有限公司生产(批号 030103)。

**1.2 实验动物与分组** 健康成年 24 周以上日本大耳兔 40 只,雌雄不拘,体重(2.5±0.2) kg 本院实验动物中心提供,合格证号:滇实动证第 2003013 号。40 只动物采用随机数字表分为 5 组:对照组、模型组、中药组、基因组和综合组,各 8 只。

**1.3 pcDNA/VEGF 质粒的筛选和提取** 将 pcDNA/VEGF 质粒转入大肠杆菌中,大肠杆菌就获得了重组质粒的 Amp 抗性,因而能在 LB 培养基(含 Amp 50 μg/ml)中生长,而未转化的大肠杆菌则不能生长。携带空质粒的大肠杆菌 LacZ 基因表达,β-半乳糖苷酶和 X-gal 反应,菌落呈淡蓝色;而携带重组质粒的大肠杆菌 LacZ 基因不能表达,菌落呈白色。通过筛选后抽提,获得大量纯化 pcDNA/VEGF 质粒。

**1.4 动物模型制作** 除对照组外,模型组、中药组、基因组和综合组均按文献<sup>[1]</sup>方法造模。成功后,对照组、模型组用生理盐水 25 g/kg 灌胃,每天 2 次。中药组用上述中药液 25 g/kg 灌胃,每天 2 次。基因组将重组 pcDNA/VEGF<sub>121</sub>质粒髌关节腔内注射,每只 200 μg 每 2 周 1 次;股动脉注射,每只 200 μg 每 4 周 1 次。综合组为中药灌胃+基因治疗。共治疗 8 周。

### 1.5 观察指标与方法

**1.5.1 免疫组织化学** 取股骨头滑膜组织,10% 甲醛固定,石蜡包埋切片。免疫组化采用链霉菌抗生物素蛋白过氧化酶(SP)法染色,染色方法按试剂盒说明书步骤进行。用 HPRS-1000 彩色病理图文报告系统观察股骨头滑膜 VEGF 的表达情况,滑膜细胞胞浆及胞膜呈棕褐色者为阳性细胞,40 倍光镜下随机观察 10 个视野,计数滑膜细胞数和 VEGF 阳性细胞数,得出 VEGF 阳性细胞率。

**1.5.2 数字减影血管造影观察** 采用腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠 0.5 ml/kg 麻醉,局部切口,显露股动脉,20 号针头穿刺成功后,应用 Hydscr 1000 型高分辨率数字减影系统,用优维显 10 ml 以 1 ml/s 的速度注入,并以每秒 10 幅的速度连续摄片。参照文献方法<sup>[2-3]</sup>略加改良,按照区域划分来观察股骨头供血血管数目变化情况:A 区为股骨头至大粗隆下缘之间区域,B 区为大粗隆下缘以下区域。分别计数上述 2 个区域的血管数。

**1.6 统计学方法** 实验数据用均数±标准差表示,采用 SPSS 12.0 统计软件包进行各组间方差分析及 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 免疫组织化学** 模型组 VEGF 阳性细胞表达率(1.67±0.59)明显减低,与对照组(5.42±1.88)、基因组(4.26±0.89)、综合组(4.57±1.02)比较,差异有显著性意义( $P < 0.01$ ),与中药组(3.32±0.48)比较,有统计学差异( $P < 0.05$ )。综合组 VEGF 阳性细胞表达率较高,与中药组及基因组比较,有统计学差异( $P < 0.05$ )。

**2.2 数字减影血管造影观察** 模型组见部分造影剂中断,血管直径变小,终末小血管数目减少;中药组见部分造影剂中断现象改善,血管直径增宽,终末小血管数目增多;基因组和综

合组见部分造影剂中断现象明显改善,血管直径增宽,终末小血管数目明显增多,尤以综合组明显。各组血管计数:在 A 区,各组与模型组比较,差异均无显著性意义;在 B 区,各组较模型组血管数目均有增加,对照组、基因组、综合组与模型组比较,有统计学差异( $P < 0.05$ ),综合组与基因组比较有统计学差异( $P < 0.05$ ),中药组虽然血管数目较模型组多,但是无统计学意义。见表 1。

表 1 各组分血管计数情况

Tab 1 The number of blood vessels in A or B area

组别 Groups	动物数 <i>n</i>	血管计数区域	
		Area of the vascular numbers	
		A 区 A area	B 区 B area
对照组 Control group	8	3.96±1.12	10.56±2.87 <sup>△</sup>
模型组 Model group	8	3.18±1.07	6.43±2.25
中药组 Chinese herb group	8	3.25±0.93	8.24±1.88
基因组 Gene group	8	3.84±1.22	10.03±3.54 <sup>*</sup>
综合组 Combined group	8	4.37±1.85	10.82±3.69 <sup>*△</sup>

注:与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 与基因组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$

Note Compared with model group <sup>\*</sup> $P < 0.05$  Compared with gene group, <sup>△</sup> $P < 0.05$

## 3 讨论

应用 VEGF 基因治疗缺血性疾病的研究近年来进展很快<sup>[4-5]</sup>。VEGF 基因局部转移,可调节血管生成的环节,包括细胞外基质的降解、内皮细胞迁移、增生和管腔形成,可独自诱导新生血管生成<sup>[6]</sup>。由于其半衰期很短,故在实际应用中极不稳定且造价高,不宜广泛推广。而基因疗法将外源性 VEGF 基因移入体内,可以持续表达 VEGF 蛋白,从而起到治疗作用,恰好弥补 VEGF 半衰期短这一代谢特点的不足。股骨头缺血性坏死是缺血性疾病的一种,故将基因转移技术运用到股骨头坏死的治疗中。实验结果显示:模型组 VEGF 阳性细胞表达率明显减低,证实 VEGF 基因的真核表达载体 pcDNA/VEGF 经大量抽提后,纯度很高,治疗后在股骨头滑膜细胞中高效表达,从而促进了新生血管的形成和侧支循环的建立。股骨头血管数目:在 A 区,模型组的血管数较对照组减少,经中药或(和)基因治疗后数量增加但均无统计学意义,可能是因为在 A 区,分布的是髂内动脉,旋股内、外侧动脉及其大的血管分支,其血管直径大,VEGF 对其影响不大。而在 B 区,分布的是细小血管分支,由于股骨头缺血性坏死特殊的发病机制,这些细小血管分支变得模糊、堵塞甚至消失,经治疗后,中药、基因各组较模型组血管数目均有增加,其中基因组的血管数目明显多于模型组,已接近对照组,综合组的血管数目略超过对照组,而单纯中药组虽然血管数目较模型组多,但无统计学意义,这与临床上的治疗效果有出入,可能是因为中药治疗的时间未达到疗程的需要。另外,综合组的血管数目略超过对照组,而单纯基因组的血管数目略少于

对照组,可能是因为活血化瘀中药对于基因治疗缺血性血管病有一定的协同作用,其机制尚不清楚,需进一步研究。

实验结果表明:活血化瘀中药联合 VEGF 基因转移可以促进股骨头缺血坏死处局部新生血管形成和侧支循环的建立,为临床应用活血化瘀中药联合基因疗法治疗股骨头缺血性坏死提供实验依据。

#### 参考文献

- 1 高根得,周林宽,许林微,等.骨通、安妥明与维生素 C 预防激素性股骨头坏死的对比研究.中国骨伤,1992,5(5):5-6.
- 2 陈俊,吴大哲,黄观静,等.介入治疗股骨头缺血性坏死 21 例近期疗效分析.中国医学影像学杂志,2002,10(5):352-353.
- 3 崔新建,王兆欣,孙立润,等.血管内介入治疗股骨头缺血性坏死的

研究.中国医学影像技术,2003,19(1):89-91.

- 4 Yang C, Yang SH, Du J, et al Experimental study of vascular endothelial growth factor gene therapy for avascular necrosis of the femoral head. Journal of Huazhong Univ Sci Technol (Med Sci), 2003, 23(3): 297-299, 316.
- 5 Radke S, Batmann A, Jatzke S, et al Expression of the angiogenic and angiogenic proteins CYR61, CTGF, and VEGF in osteonecrosis of the femoral head. J Orthop Res, 2006, 24(5): 945-952.
- 6 Marti HJ, Bemaud M, Belkil A, et al Hypoxia induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. Am J Pathol, 2000, 156: 956-957.

(收稿日期:2006-07-20 本文编辑:李为农)

## • 病例报告 •

### 髌骨“8”字张力带内固定术后并发股四头肌肌腱断裂 3例

黄健林,何晖

(梧州市中医院骨科,广西 梧州 543000)

关键词 髌骨;骨折;骨折固定术,内;腱损伤;手术后并发症

**Treatment of 3 patients with tendon rupture of quadriceps femoris after internal fixation with tension bandage in “8” shape for patellar fracture** HUANG Jian-lin, HE Hui Department of Orthopaedics, the TCM Hospital of Wuzhou, Wuzhou 543000 Guangxi China

**Key words** Patella Fractures Fracture fixation, internal Tendon injuries Postoperative complications

Zhongguo Gushang / China J Orthop & Trauma 2007, 20(6): 393 www.zggssz.com

自 1999 年以来采用“8”字张力带内固定术治疗髌骨骨折 325 例,其中有 3 例术后发生股四头肌肌腱断裂。男 2 例,女 1 例。年龄分别为 35、38 及 23 岁。2 例粉碎性骨折,1 例横断骨折。1 例新鲜骨折,2 例陈旧骨折。3 例术后 3~5 d 时复查 X 线片均对位对线良好,术后 2~4 d 时即开始进行患膝关节功能锻炼,在 2 个月左右复查 X 线片时均已示骨折临床愈合。3 例患者分别于术后 65、102、72 d 不慎再次跌倒,发现膝关节肿胀,伸膝无力,复查 X 线片未见髌骨再次骨折,内固定无松动,查体见髌骨上极股四头肌肌腱附着处凹陷,浮髌试验阳性。3 例均再次手术,术中见股四头肌肌腱于髌骨上极钢丝“8”字张力带缠绕处断裂,予肌腱修补术及术后患膝功能位制动 1 个月后,指导患者进行患膝关节屈伸功能锻炼。门诊随访 4~6 个月,髌骨骨折达骨性愈合,股四头肌肌腱愈合良好,膝关节功能完全恢复。

#### 讨论

3 例均为青壮年患者,且术后均有再次跌倒病史,再次手术时均见股四头肌肌腱于髌骨上极处断裂。因此,我们分析认为:造成“8”字张力带钢丝内固定术后出现股四头肌肌腱断裂的原因,是由于内固定的克氏钉比较接近髌骨软骨面,使缠绕的张力带钢丝对髌骨上极处股四头肌肌腱夹压,导致夹压处的肌腱部分坏死,而患者于再次跌倒时股四头肌保护性强力收缩,应力于钢丝夹压处过于集中,产生类似于折断易折

安瓿的作用,最后导致局部股四头肌肌腱断裂。有学者<sup>[1]</sup>认为克氏钉位置应固定在髌骨前、中、后的中部,这样克氏钉位于硬骨质内不易伤及关节面,对于粉碎性骨折克氏钉位置可偏后些,后 1/3 比前、中 1/3 的骨质都要坚硬,一旦固定不致移位。“8”字张力带钢丝中心交叉跨越髌骨前面构成立体三角形结构,结构平稳,固定完整,能有效克服张力和骨块旋转分离倾向,不易出现骨折移位。它们不但对横断骨折有良好固定作用,同时通过克氏钉、钢丝不同作用对有较大骨块的粉碎性骨折也能提供足够的固定强度<sup>[2]</sup>。本组 3 例患者髌骨均无再次骨折,也证实了“8”字张力带钢丝内固定的可靠性。从导致本组患者所出现的并发症的原因来考虑,我们认为对于髌骨骨折,如克氏钉固定的位置偏后,在作“8”字张力带钢丝内固定时,可将钢丝呈横“8”字缠绕固定或将钢丝上段穿过股四头肌肌腱,如此也可构成立体三角形结构且不会对股四头肌肌腱造成夹压及对局部软组织产生切割作用。如果是简单的横断骨折,也可作胥氏张力带钢丝固定<sup>[2]</sup>。

#### 参考文献

- 1 胡广州,王建霞,刘宁富.髌骨骨折张力带内固定的松脱.中国矫形外科杂志,1998,5(1):39.
- 2 郑季南,唐农轩.髌骨横断骨折不同改良方式张力带钢丝固定的生物力学测试.中国矫形外科杂志,1999,6(4):268-270.

(收稿日期:2007-03-09 本文编辑:王宏)