

• 基础研究 •

滋阴清热中药对生长延滞中骺板软骨细胞血管内皮生长因子表达的影响

沈欢嗣, 陈朝蔚, 李玉梅, 陈永强
(上海市中医医院骨伤科, 上海 200071)

【摘要】 目的: 通过检测滋阴清热中药对地塞米松诱导的生长延滞中骺板软骨细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响,探讨滋阴清热中药拮抗地塞米松诱导的生长延滞机制。**方法:** 1 月龄新西兰兔 30 只,随机分为 3 组:正常对照组、地塞米松组和中药治疗组,每组 10 只。地塞米松组和中药治疗组给予地塞米松 5 mg/kg,每天肌肉给药。中药治疗组给予混有滋阴清热中药的颗粒饲料,正常组及地塞米松组均给予普通饲料,分别在给药第 6、12 周时处死。TUNEL 染色法检测细胞凋亡指数。免疫组织化学染色测定生长板软骨细胞中 VEGF 表达的阳性指数,实时荧光定量 PCR 检测 VEGF mRNA 在各组的表达。**结果:** 6、12 周地塞米松组软骨细胞凋亡指数大于正常组,差异有统计学意义($P<0.01$)。6、12 周中药治疗组软骨细胞凋亡指数小于地塞米松组,差异有统计学意义($P<0.01$)。6、12 周地塞米松组 VEGF 的阳性指数、VEGF mRNA 表达水平明显低于正常组,差异有统计学意义($P<0.01$),中药治疗组 VEGF 阳性指数、VEGF mRNA 表达水平明显高于地塞米松组,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论:** 滋阴清热中药可减少因长期大剂量使用糖皮质激素导致的软骨细胞凋亡; 滋阴清热中药可能是通过调控生长板软骨细胞中 VEGF 而减轻地塞米松对生长板的抑制作用。

【关键词】 滋阴清热; 中草药; 地塞米松; 生长面; 骺软骨; 血管内皮生长因子类

Effects of Nourishing yin clearing heat (滋阴清热) Chinese herbal medicine on vascular endothelial growth factor in the epiphyseal cartilage of growth retardation SHEN Huan-si, CHEN Chao-wei, LI Yu-mei, CHEN Yong-qiang. Department of Orthopaedics and Traumatology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of Nourishing yin clearing heat(滋阴清热) Chinese herbal medicine on vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth retardation induced by Dexamethasone and observe its mechanisms. **Methods:** Thirty one-month-old New Zealand white rabbits were randomly divided into normal group, dexamethasone-treated group and Nourishing yin clearing heat(滋阴清热) Chinese herbal medicine-treated group. The rabbits in dexamethasone group and Nourishing yin clearing heat (滋阴清热) Chinese herbal medicine-treated group received dexamethasone (5 mg/kg·d). The rabbits were sacrificed at the 6th and 12th week after administration, and then rabbit tibia articular was removed. ① Using TUNEL stain to detect apoptotic index. ② Using immunohistochemical stain to detect the positive index of the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in the epiphyseal cartilage of growth. ③ Using fluorescent quantitative PCR to detect the expression intensity of VEGF mRNA in each group. **Results:** At the 6th and 12th week after administration, there were significant difference in apoptotic index and cell proliferation index between dexamethasone group and normal group ($P<0.01$, dexamethasone group more than normal group). Immunohistochemical stain and fluorescent quantitative PCR indicated that the expression of VEGF and VEGF mRNA in dexamethasone group was significantly decreased as compared with that in normal group ($P<0.01$), and also obviously lower than Chinese herbal medicine-treated group ($P<0.01$). **Conclusion:** VEGF has an important role during the growth retardation induced by Dexamethasone. Nourishing yin clearing heat (滋阴清热) Chinese herbal medicine can reduce the growth retardation induced by Dexamethasone through increasing the VEGF expression in growth plate chondrocytes and then increase angiogenesis.

Key words Nourishing yin clearing heat (滋阴清热); Drugs, Chinese herbal; Dexamethasone; Growth plate; Epiphyseal cartilage; Vascular endothelial growth factors

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(1): 14-17 www.zggszz.com

基金项目:上海市教委重点学科建设项目资助(编号:05cz34)

通讯作者:陈永强

糖皮质激素具有强大的抗炎、抗免疫和抗休克的作用,广泛应用于自身免疫性疾病、哮喘等疾病的治疗。国内外研究表明长期大剂量应用糖皮质激素有抑制生长的作用,研究多从糖皮质激素对机体代谢作用以及垂体-生长轴等方面予以阐述^[1]。临床上采用滋阴清热中药能减轻因长期大剂量使用糖皮质激素导致的生长延滞^[2]。但具体机制仍不是十分清楚,我们通过检测滋阴清热中药对地塞米松诱导的生长延滞中骺板软骨细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响,探讨滋阴清热中药拮抗地塞米松诱导的生长延滞机制。

1 材料与方 法

1.1 动物及试剂 1 月龄新西兰大白兔 30 只雌雄兼用,体质量(1.0±0.4) kg,由上海中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(沪)2004-0004,清洁级。随机分为 3 组:正常对照组、地塞米松组和中药治疗组,每组动物 10 只。除正常组外其余组均按地塞米松 5 mg/kg 体重,每天肌肉给药,同时中药组给予中药口服,地塞米松组和正常对照组则不给予中药。滋阴清热中药组成:生地 10 g,龟板 10 g,由上海市中医院制剂科提供。中药水煎浓缩后与兔饲料混合均匀,制成定量颗粒饲料,予 40 g/d (相当于生药 6 g/kg·d,按体表面积折算)。正常组和地塞米松组予 40 g/d 普通饲料。动物分别于第 6、12 周各处死一半,取材。VEGF 第一抗体购于美国 Santa Cruz 公司。

1.2 标本采集 取左侧胫骨上段,置于 4%多聚甲醛固定,100 g/L 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙 5 周,每周换液 1 次。脱钙达到终点后,磷酸盐缓冲液充分冲洗,常规石蜡包埋。取右侧胫骨骺板组织立即将标本放入液氮罐内,24 h 后取出,即刻放入-80℃低温冰箱内保存。

2 观察项目与方法

2.1 胫骨生长板软骨细胞凋亡指数 方法:常规脱蜡至水,双氧水、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗,枸橼酸缓冲液(0.01 M, pH 6.0),微波炉处理 15 min,冷却, PBS 冲洗;20 μg/ml 蛋白酶 K 37℃消化 15 min, PBS 冲洗;0.3% H₂O₂-甲醇中 25 min, PBS 冲洗;TUNEL 反应混合液中 37℃90 min, PBS 冲洗;5%封闭羊血清室温 20 min;链霉菌素-辣根-过氧化物酶 37℃孵育 30 min, PBS 洗;DAB 显色,充分洗涤,苏木素复染,温水中蓝化,阴性对照为省去 TdT 酶的 Bio-11-dUTP 液。切片脱水、封片,将上述切片依次经 85%的乙醇 2 min;95%的乙醇 2 min;100%的乙醇 5 min, 2 次;二甲苯 10 min, 2 次。中性树胶封片,光镜下观察结果。

2.2 胫骨生长板切片 VEGF 染色强度分析 方法:免疫组织化学实验,常规 7 μm 石蜡切片,贴在涂有切片黏合剂的干净载玻片上,58℃烘烤 18 h,常规二甲苯脱蜡至水。0.1 mol/L pH 7.4 PBS 洗 3 min×3 次,抗原修复(antigen retrieval, AR) 95℃20 min,自然冷却, PBS 洗 3 min×3 次。按 1:50 稀释 VEGF 一抗,4℃过夜, PBS 洗 3 min×3 次,0.3% H₂O₂ 抑制内源性过氧化物酶, Envision 37℃30 min, PBS 洗 3 min×3 次;0.05% DAB+0.03% H₂O₂ 显色 8~12 min,流水冲洗终止反应;苏木素衬染 30 s,水洗蓝化(37℃),0.5%盐酸乙醇分化,水洗

蓝化。常规树脂封片。观察反应:阳性产物为棕黄色或呈棕褐色,背景为紫蓝色。每个标本取 5 张切片,每张切片 OLYMPUS BH2 显微镜下放大 100 倍,随机取 5 个视野,采用 IMS 细胞图像分析系统,医学图像分析软件,阳性强度用阳性指数表示。

2.3 VEGF mRNA 表达

方法:实时荧光聚合酶链反应定量(PCR)测定。

2.3.1 试剂与仪器 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(Fermentas 公司)。实时荧光定量 PCR 仪为 Rotor Gene3000 (Corbett 公司),荧光染料试剂盒(TaKaRa 公司)。

2.3.2 引物设计 根据 GeneBank 中新西兰大白兔 VEGF 基因设计 5' 端引物(5'-cagtgcaaaagacagtggaag-3')和 3' 端引物(5'-ccctgtatggtggtgatgtt-3'),扩增产物全长 107 bp,以新西兰大白兔 β-actin 作为内参,5' 端引物(5'-atggggcctgggtca-3'),3' 端引物(5'-gctcgatgggtacttcagg-3')扩增产物全长 88 bp。由 TaKaRa 生物工程公司合成。

2.3.3 组织总 RNA 提取 取-80℃冷冻保存的骺板,剪取 50~80 mg 放入研钵中,加入少量液氮,迅速研磨,加入 1 ml Trizol。经氯仿处理后离心,上清用异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤沉淀物,弃乙醇,干燥后用 DEPC 处理去离子水 10 μl 溶解 RNA,取 1:50 稀释后于核酸蛋白分子仪中检测 OD 定量 RNA 浓度,测得提取样品 RNAOD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间。

2.3.4 逆转录步骤 得到模板 cDNA 加入 2 μg 的总 RNA, DEPC 处理去离子水;OligoDT 1 μl;总体积为 12 μl,70℃5 min,取出插入冰水中,加入 5×Buffer 4 μl;RNA 酶抑制剂 1 μl;dNTP 2 μl;37℃5 min。加入 M-MLV 1 μl,最终体积 20 μl。42℃60 min;25℃10 min;70℃10 min;停止反应,放入-20℃冰箱保存。

2.3.5 检测目的基因与内参基因的扩增效率 用目的基因与内参基因 cDNA 模板按 10 倍梯度进行稀释,制成标准模板系列,自每个稀释模板中取样 2 μl;10 μl Master Mix;0.4 μl 10 uM 上游引物;0.4 μl 10 uM 下游引物;7.2 μl DEPC 水混合成总体积 20 μl 反应体系,行实时荧光定量 PCR。扩增条件为:95℃15 s,60℃15 s,72℃30 s,45 cycles。两组标准曲线的 M 值即斜率为-2.298 和-2.214,两者的差值<0.1,这组内参基因和目的基因可以用 Comparative Delta-delta Ct 法进行相对定量。

2.3.6 目的基因与内参基因 Ct 值的测定 将逆转录得到的 cDNA 样品中各取 2 μl,加入和上面完全相同的反应体系中,在同样的反应条件下行 PCR 扩增。测定各样品的 Ct 值。对荧光 PCR 产物进行电泳鉴定。用 Comparative Delta-delta Ct 法进行相对定量并通过以下公式^[3]分析相对基因表达差异。

$$\text{amount of target} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = (C_{T, \text{Target}} - C_{T, \text{Actin}})_{\text{处理}} - (C_{T, \text{Target}} - C_{T, \text{Actin}})_{\text{对照}}$$

2.4 统计学分析 应用 SPSS 12.0 软件处理,定量数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,6 周与 12 周正常对照组、地塞米松组和中药治疗组各组间比较用二因素设计定量资料的方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 胫骨生长板软骨细胞凋亡指数 6、12 周地塞米松组、

表 1 滋阴清热中药对兔胫骨生长板 VEGF 影响 ($\bar{x}\pm s$, 兔数=10)

Tab.1 The influence of *Nourishing yin clearing heat* (滋阴清热) Chinese herbal medicine on VEGF in the epiphyseal cartilage of rabbit tibia ($\bar{x}\pm s$, rabbits=10)

组别	VEGF 阳性指数		VEGF mRNA		细胞凋亡指数	
	6 周	12 周	6 周	12 周	6 周	12 周
正常对照组	1.50±0.55 **	1.29±0.39 **	1.05±0.27 **	0.98±0.07 **	0.23±0.04 **	0.23±0.06 **
地塞米松组	0.79±0.20	0.72±0.16	0.49±0.17	0.35±0.23	0.62±0.07	0.62±0.10
中药治疗组	1.09±0.26 **	1.05±0.28 **	0.85±0.62 **	0.79±0.47 **	0.33±0.02 **	0.33±0.03 **

注:与地塞米松组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Note: Compared with Dexamethasone group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

中药治疗组软骨细胞凋亡指数均大于正常组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 6、12 周中药治疗组软骨细胞凋亡指数小于地塞米松组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见表 1。

3.2 胫骨生长板切片 VEGF 染色强度分析 VEGF 主要表达在肥大区和矿化区。6 周与 12 周地塞米松组 VEGF 染色强度的阳性指数明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 6 周与 12 周中药治疗组 VEGF 染色强度的阳性指数明显高于地塞米松组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见表 1。

3.3 各组 VEGF mRNA 表达 地塞米松组与中药治疗组生长板 VEGF mRNA 基因的表达水平在 6 周与 12 周时均较正常对照组降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 6 周与 12 周中药治疗组 VEGF mRNA 基因表达较正常对照组明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见表 1。

4 讨论

目前国内外对糖皮质激素诱导生长延滞的治疗仅限于治疗药物剂量和疗程的个体化, 以避免长期大量应用糖皮质激素引起的生长延滞^[4-6]。祖国医学在长期的临床实践中发现长期服用糖皮质激素, 其临床多表现为阴虚内热诸症, 在治疗中采用滋阴清热的中药能减轻因长期大剂量使用糖皮质激素导致的生长延滞^[2], 但具体机制仍不是十分清楚。

糖皮质激素所致生长延滞的本质是骨骼纵向生长过程受抑^[7]。软骨内成骨是长骨生长的基本机制, 骨骼纵向生长是生长板内软骨内成骨过程的结果, 血管发生是软骨内骨化的关键过程^[8]。抑制生长板的血管侵入, 最终影响生长板的软骨内骨化而导致生长延滞。干骺端血管的侵入与细胞外基质的矿化、肥大软骨细胞的程序化死亡、细胞外基质降解以及骨化是相互伴随而进行的。

VEGF 是一类重要的血管源性因子, 能够诱导新生血管的形成及增加血管的通透性, 近年来国内外大量研究表明生长板软骨细胞中有大量 VEGF 表达^[9-10], 其表达部位主要集中在肥大层和临时钙化区, 进一步研究证实 VEGF 是调节骺板肥大细胞凋亡、影响干骺端的血管正常侵入和骨-软骨交界处的骨形成不可缺少的因子^[11]。

本实验通过 TUNEL 染色法检测细胞凋亡指数, 地塞米松应用 12 周后与 6 周相比较, 无论是地塞米松组还是中药治疗组其软骨细胞凋亡指数呈增大趋势, 提示了长时间应用糖皮质激素可导致软骨细胞过度凋亡, 阻碍骨骼的生长, 这与 Chrysis 等^[7]研究结论相吻合。同时发现实验 6、12 周后, 中药治疗组软骨细胞凋亡指数均小于地塞米松组, 差异具有统计

学意义 ($P<0.01$), 提示滋阴清热中药可减少因长期大剂量使用糖皮质激素导致的软骨细胞凋亡。

实时荧光定量 PCR 检测地塞米松组与中药治疗组生长板 VEGF mRNA 基因的表达水平在 6 周与 12 周时均较正常对照组降低 ($P<0.01$), 这说明 VEGF mRNA 在糖皮质激素阻碍骨骼生长的发生发展可能有一定的意义; 6 周与 12 周中药治疗组 VEGF mRNA 基因表达较地塞米松组明显升高, 同时免疫组化染色结果表明在中药治疗组 VEGF 表达水平较地塞米松组显著升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), VEGF 主要表达在肥大区和矿化区, 提示滋阴清热中药有可能通过上调生长板软骨细胞中 VEGF, 介导血管侵入骺板, 进而调节骺板肥大细胞凋亡、基质改建从而起到促进骨的线性生长作用。

临床中应用滋阴清热中药可减轻糖皮质激素导致的生长延滞, 结合本实验结果说明滋阴清热中药有可能通过调节生长板软骨细胞中 VEGF 的表达, 影响干骺端的血管生成, 达到减轻地塞米松诱导的生长延滞作用, 从而促进骨的线性生长。滋阴清热中药减轻地塞米松诱导的生长延滞作用是否通过调节其他相关基因以及影响相关信号传导途径仍有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] van Buul-Offers SC, Smink JJ, Gresnigt R, et al. Thyroid hormone, but not parathyroid hormone, partially restores glucocorticoid-induced growth retardation. *Pediatr Nephrol*, 2005, 20(3): 335-341.
- [2] 沈丕安. 现代中医免疫病学. 北京: 人民卫生出版社, 2006. 246-248.
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2⁻[Delta Delta C(T)] method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [4] 卢立肖, 张宇. 强的松对肾病综合征患儿身高及骨龄的影响. *实用医学杂志*, 2007, 23(6): 895-896.
- [5] Raff H. Neonatal dexamethasone therapy: short-and long-term consequences. *Trends Endocrinol Metab*, 2004, 15(8): 351-352.
- [6] Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Le Thi Hong D, et al. Questions about dexamethasone use for the prevention of anti-SSA related congenital heart block. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62(10): 1010-1012.
- [7] Chrysis D, Ritzén EM, Säwendahl L. Growth retardation induced by dexamethasone is associated with increased apoptosis of the growth plate chondrocytes. *J Endocrinol*, 2003, 176(3): 331-337.
- [8] Takahashi M, Saha PK, Wehrli FW. Skeletal effects of short-term exposure to dexamethasone and response to risedronate treatment studied in vivo in rabbits by magnetic resonance micro-imaging and

· 基础研究 ·

枢椎后路 3 种螺钉固定技术生物力学测试的对比研究

胡勇¹, 何贤峰¹, 马维虎¹, 徐荣明¹, 阮永平¹, 冯建翔¹, 杨述华²

(1. 宁波市第六医院脊柱外科, 浙江 宁波 315040; 2. 华中科技大学附属协和医院骨科)

【摘要】 目的:评价单皮质和双皮质枢椎椎弓根螺钉、枢椎侧块螺钉和枢椎椎板螺钉的固定强度,为临床选择后路螺钉的固定方式提供生物力学依据。**方法:**利用 30 具新鲜尸体枢椎标本,进行单皮质和双皮质的枢椎椎弓根螺钉、枢椎侧块螺钉、枢椎椎板螺钉固定,测试比较其螺钉拔出强度。**结果:**双皮质枢椎椎弓根螺钉的拔出力量最大,为(1 255.8±381.9) N;单皮质枢椎椎弓根螺钉[(901.8±373.3)N]、双皮质枢椎侧块螺钉[(776.1±306.8) N]和双皮质枢椎椎板螺钉[(640.8±302.9) N]之间差异无统计学意义。**结论:**枢椎后路螺钉固定宜首选椎弓根螺钉,枢椎侧块螺钉和枢椎椎板螺钉可作为枢椎后路补充固定技术,且以双皮质骨固定为宜。

【关键词】 枢椎; 椎弓根螺钉; 侧块螺钉; 椎板螺钉; 生物力学

Comparison study of biomechanical test among fixation techniques of three types screw of posterior approach for C₂
HU Yong, HE Xian-feng, MA Wei-hu, XU Rong-ming, RUAN Yong-ping, FENG Jian-xian, YANG Shu-hua. *Department of Spinal Surgery, the 6th Hospital of Ningbo, Ningbo 315040, Zhejiang, China*

ABSTRACT Objective:To evaluate the screw pull-out strength of posterior C₂ when the screw is fixed to C₂ through the trans-pedicle or lateral mass or trans-laminar unicortically or bicortically, so as to provide biomechanical basis for the clinical application of posterior C₂ screw fixation technique. **Methods:**The pedicle screw, the lateral mass screw or the laminar screw was separately anchored into 30 fresh C₂ specimens unicortically or bicortically. The screw pull-out strength of different fixation was tested and compared with the others. **Results:**The average pull-out strength of C₂ bicortical pedicle screw was (1 255.8±381.9) N, the strongest during all the methods. The mean pull-out strength of C₂ unicortical pedicle screw, C₂ bicortical lateral mass screw and C₂ bicortical laminar screw were(901.8±373.3) N, (776.1±306.8) N and (640.8±302.9) N respectively, with no statistical difference. **Conclusion:**Pedicle screw should be the first choice for the posterior fixation on axis. C₂ lateral mass screw fixation and C₂ laminar screw fixation can be another supplement choice and the screw had better be placed bicortically.

Key words Axis; Pedicle screw; Lateral mass screw; Laminar screw; Biomechanics

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(1):17-20 www.zggszz.com

枢椎螺钉具有承上启下的重要功能,在寰枢椎固定或枢椎与枕颈、中下颈椎的节段固定中,枢椎后路 3 种螺钉固定可提供良好的承接作用,尤其是枢椎椎弓根螺钉构成的固定系统具有理想的固定强度,为最终取得满意的融合率提供保障^[1-3]。胡勇等^[4]通过解剖学研究证实了枢椎后路 3 种螺钉固定技术的可行性,但枢椎后路 3 种螺钉固定技术的生物力学

两两对比研究尚缺乏理论依据。本研究通过生物力学测试比较枢椎椎弓根螺钉、枢椎侧块螺钉和枢椎椎板螺钉的拔出强度,以期为临床选择枢椎后路 3 种螺钉固定提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料 华中科技大学同济医学院解剖教研室提供的华中地区 30 套完整成年人新鲜枢椎标本(男性 18 个,女性 12 个),均为汉族,年龄 30~55 岁,平均 48 岁。X 线检查均无明显的骨质疏松、先天性畸形、骨折和肿瘤等病变。清除椎体

通讯作者:胡勇 E-mail:huyong610@163.com

spectroscopy. J Bone Miner Metab, 2006, 24(6):467-475.

[9] Brouwers JE, van Donkelaar CC, Sengers BG, et al. Can the growth factors PTHrP, Ihh and VEGF, together regulate the development of a long bone. J Biomech, 2006, 39(15):2774-2782.

[10] Bluteau G, Julien M, Magne D, et al. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. Bone, 2007, 40(3): 568-576.

[11] Evans KD, Oberbauer AM. Spatiotemporal localization of VEGF-A isoforms in the mouse postnatal growth plate. Anat Rec (Hoboken), 2008, 291(1):6-13.

(收稿日期:2008-07-16 本文编辑:李为农)