

# 中药对股骨头缺血坏死修复过程中血管内皮生长因子基因表达的影响

刘日光, 沈冯君, 尹培荣, 易诚青

(贵阳医学院附属医院骨科, 贵州 贵阳 550004)

**摘要** 目的: 探讨具有活血补肾作用的中药丹仙康骨胶囊对股骨头缺血坏死修复过程中血管内皮生长因子(VEGF)基因表达的影响。方法: 采用手术方法制作兔股骨头缺血坏死模型, 应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫组化、微血管灌注及组织形态学方法观察中药丹仙康骨胶囊治疗兔股骨头坏死过程中血管内皮生长因子基因(VEGFmRNA)表达、血管生成及骨组织修复情况。结果: 股骨头坏死模型组 4 周时可见有坏死骨周围 VEGFmRNA 表达呈阳性, 但随着时间的推移而减少, 至 8、12 周时 VEGFmRNA 表达均为阴性, 再生血管密度低, 只见少量间充质细胞增生及新骨形成; 丹仙康骨胶囊治疗组至 8、12 周时 VEGFmRNA 表达呈强阳性, 并可见明显血管增生, 血管密度显著增高, 大量新骨形成。结论: 活血补肾的丹仙康骨胶囊能促进股骨头缺血坏死修复过程中 VEGFmRNA 的表达、血管的再生和新骨的形成。

**关键词** 股骨头坏死; 血管生成因子; 基因表达; 中药疗法

**Effects of Danxian Kanggu capsule on the vascular endothelial growth factor expression during the repair of avascular necrosis of femoral head** LIU Rìguang, SHEN Fengjun, YIN Peirong, YI Chengqing. Department of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College (Guizhou Guiyang, 550004, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effects of Danxian Kanggu(DXKG) capsules extracted from Chinese drugs on the vascular endothelial growth factor expression during the repair of avascular necrosis of femoral head and explore the mechanism of anti-osteonecrosis of DXKG capsules. **Methods:** The model of avascular necrosis of femoral head was produced by operation on rabbit's femoral neck. VEGFmRNA expression were measured by both RT-PCR and immunohistochemistry. Histological study and microvascular perfusion were used for examination of osteogenesis and angiogenesis. **Results:** Compared with model group, DXKG group showed follow changes obviously: vascular endothelial growth factor expression significantly increased; Area dyed by ink increased; Numbers of empty bone lacuna decreased; Fibroblasts multiplied in the margin of marrow; Osteoblasts multiplied around the necrosis of trabecula. **Conclusion:** The anti-osteonecrosis effect of DXKG capsule may be passing through its increasable effect on vascular endothelial growth factor expression and production in osteoblasts.

**Key words** Femur head necrosis; Angiogenesis factor; Gene expression; Treatment with Chinese herbs

为了探索寻求中药治疗股骨头缺血坏死的可行性, 进一步阐明中药防治骨坏死的作用机制, 本研究观察了治疗股骨头缺血坏死的经验方制剂“丹仙康骨胶囊”对股骨头坏死修复过程中血管内皮生长因

子(VEGF)基因表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 动物分组** 选取健康成年中国家兔 25 只, 雌雄不限, 体重(2.0±0.5)kg, 随机分为股骨头缺血坏死对照组(A组)10只(其中1只因造模时局部出血较多而死亡)和丹仙康骨胶囊治疗组(B组)15只。

**1.2 造模方法** 参照文献[1]用戊巴比妥 35 mg/kg 静脉麻醉, 常规消毒铺巾, 取兔髋关节外侧入路暴露

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(2001-3049)

通讯作者: 刘日光 Tel: 0851-6855119-3379 E-mail: liuriguang5629519@tom.com

髌关节,在股骨颈基底部钻一直径 1.6 mm 的孔,用刮匙环形搔刮骨髓,切断髌关节关节囊与股骨头圆韧带。实验动物均以左侧股骨头造成坏死,右侧作自身对照。术后 1 周两组家兔均每次肌注青霉素  $10 \times 10^4$  U,每天 2 次,以预防感染。

**1.3 实验药物与给药方法** 丹仙康骨胶囊(由丹参、仙灵脾、骨碎补等 9 味中药组成,有效成份为丹参与淫羊藿甙)由贵阳中医学院微量元素研究所加工提供,每粒 0.35 g(合含生药 12 g),批号 9809013,成人日用量为 0.084 g/kg。丹仙康骨胶囊治疗组给该药剂量为临床用药量的 8 倍灌胃,即 0.67 g/kg,每日 1 次,对照组给等容量的生理盐水灌胃,连续 12 周。

**1.4 组织形态观察** A、B 两组均于术后 4、8、12 周分 3 批处死取材,在静脉全麻下分离出腹主动脉,在恒定压力下灌注墨汁右旋糖酐溶液 20~30 ml 之后 10 min 处死,取出双侧股骨头。大体观察后,4% 多聚甲醛固定,10% 的 EDTA 脱钙,石蜡包埋。100~200  $\mu$ m 厚的切片用冬青油制作透明标本,在低倍光镜下观察微血管情况,在目镜测微尺下测定 10 个视野内微血管墨染程度;5  $\mu$ m 厚的切片,作常规 HE 染色与免疫组化检测。

**1.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)** 取坏死区周围骨组织约 5 mg 置于 Trizol 液中进行匀浆提取总 RNA,5  $\mu$ g RNA 经 AMV 逆转录酶及 Oligd T 引物(Promega 公司)42 $^{\circ}$ C60 min 逆转录成 cDNA,随后进行 PCR。目的基因 VEGF 引物序列为<sup>[2]</sup>:正链引物 5'-CCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACC-3';负链引物 5'-GAAGCTCATCTCTCCTATGTGCTGGC-3',抗增产物大小为 196 bp,该对引物可识别所有 VEGF 异构体,并跨过内含子,从而可排除基因组 DNA 的影响。PCR 反应体系为 25  $\mu$ l,酶和脱氧核苷三磷酸(dNTP)为 Promega 产品,变性、退火与延伸条件分别为 95、60 及 72 $^{\circ}$ C 各 1 min,共 35 个循环确保抗增产物处于对数增长期(GeneAmp System, Biometra 公司)。以  $\beta$ -actin 为内参照(产物大小 150 bp)。用未经逆转录 RNA 及双蒸水作空白对照。抗增产物 3% 琼脂糖溴化乙锭进行电泳分离,紫外灯下观察,利用计算机 DNA 定量系统对 VEGF 和  $\beta$ -actin 条带进行象素值测定,并算出二者比值。

**1.6 免疫组化检测** 行连续切片,置于多聚赖氨酸包埋的载玻片上。经二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水后,于湿盒中依次进行下列反应:采用 SABC 法检测

VEGFmRNA 的表达,所有抗体及试剂由武汉博士德公司提供。I 抗为兔 VEGF 多克隆抗体,按 1:30 加在切片上,37 $^{\circ}$ C 反应 20 min 后,加入 SABC,37 $^{\circ}$ C 反应 1 h 后,再按 1:100 加 II 抗(生物素化羊抗鼠 IgG),37 $^{\circ}$ C 反应 20 min 后加入 SABC,于 37 $^{\circ}$ C 反应 20 min, PBS 洗 2 次, DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水透明、封片、显微镜观察拍照。

## 2 实验结果

**2.1 免疫组化检测 VEGFmRNA 的表达结果** 造模 4 周后, A 组可见股骨头坏死骨小梁周围有部分细胞染成棕黄色,为强阳性,说明股骨头缺血坏死后周围活细胞的 VEGF 表达增高;随着时间的延长, A 组至 8、12 周时,均未见有 VEGF 的表达。中药在治疗 4 周后,免疫组化检测股骨头内大部分细胞胞浆染成棕黄色,呈强阳性,而且直至 8、12 周时仍可见部分细胞染成棕黄色。这说明股骨头缺血坏死后,由于缺氧可引起暂时性的 VEGF 表达增加,有利于血运的重建。活血补肾中药能促进坏死骨周围活细胞较长时间高表达 VEGFmRNA。

**2.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测结果** A、B 两组在造模 4 周时,以及 B 组在 8 与 12 周时,其扩增产物均有 196 bp 条带,和 VEGF 相符,说明股骨头缺血坏死后在短时间内有 VEGFmRNA 表达,中药丹仙康骨胶囊可促进 VEGFmRNA 的表达。

**2.3 组织形态学观察** 光镜下所见从治疗后 4 周起, B 组股骨头内微血管密度较 A 组明显增高,墨染面积增宽;邻近钻孔周缘未分化间充质细胞及毛细血管开始增殖,并迅速充满坏死股骨头骨髓间隙; A 组坏死股骨头墨染程度减少,血管密度减低,骨陷窝空虚,骨细胞与骨髓细胞坏死,未见有血管及间充质细胞增殖。造模后第 8 周 A 组出现毛细血管与间充质细胞的增殖; B 组坏死股骨头表面可见新生的交织骨,但未见有破骨细胞的聚集、吸收和清除死骨,髓腔内毛细血管增生旺盛,墨染程度加深,分布较均匀。造模后 12 周 B 组坏死骨小梁吸收 80% 左右,被大量新生骨所替代,髓腔墨染程度接近正常,可见到树状血管充盈; A 组则骨细胞及骨髓细胞坏死仍明显,仅有少量新生骨覆盖坏死骨小梁表面。

## 3 讨论

Carlevaro 等<sup>[3]</sup>研究发现 VEGF 在软骨内血管生成和软骨细胞分化中具有重要的作用。VEGF 不仅对成骨有影响,而且与破骨作用也非常密切。Nakagawa 等<sup>[4]</sup>报道 VEGF 促进破骨细胞骨吸收与延长

成熟破骨细胞的存活。

从本实验结果可以看出丹仙康骨胶囊抗骨坏死的作用,可能是通过促进坏死股骨头内 VEGF 在较长时间内呈高表达,从而促进毛细血管的再生与修复,改善病变股骨头的血运;促进成骨细胞的分化与增殖,加速坏死股骨头的修复过程,从而发挥良好的抗创伤性股骨头缺血坏死作用。

#### 参考文献

1 沈冯君,刘日光,沈骏.化痰活血汤治疗股骨头缺血坏死的实验研

究.中国骨伤,2000,13(3):169.

2 Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. VEGF couples herpetic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nat Med, 1999, 5(6): 623-628.

3 Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, et al. Vascular endothelial growth factor in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: autocrine role during endochondral bone formation. J Cell Science, 2000, 113(1): 59-69.

4 Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, et al. Vascular endothelial growth factor directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. Febs Letters, 2000, 473(3): 16F-164.

(收稿日期:2004-04-06 本文编辑:王宏)

## •手法介绍•

## 手法治疗胫骨远端三平面骨折 6 例

### Treatment of triplane fracture of the distal tibia with manipulation in 6 patients

张猛

ZHANG Meng

关键词 胫骨骨折; 骨科手法 Key words Tibial fractures; Orthopedic manipulation

胫骨远端三平面骨折,多发生于 13 岁以上的青少年,属于一种少见而特殊的损伤。自 1995-2001 年收治 6 例,采用手法复位、石膏托外固定治疗,疗效满意,报告如下。

#### 1 临床资料

本组 6 例,男 5 例,女 1 例;年龄 14~19 岁。左侧 4 例,右侧 2 例,均系踝部扭转暴力致伤。1 例无明显移位,5 例移位明显者合并腓骨下段骨折,骨折部位在骨骺线以上,呈前下至上长斜形或螺旋形,胫骨远端骨折块向外侧移位。

#### 2 治疗方法

对骨折无移位者即行超膝前后石膏托外固定。对 5 例明显移位者行手法整复,患者仰卧位,膝关节屈曲 90°,以使腓肠肌松弛,患足旋后,两助手分别握持小腿中上段及足部,对抗牵引,术者两手拇指置于外踝后外方,余指合抱于小腿下端,嘱远侧助手将患足轻度内旋,继而内收踝关节,与之同时术者两拇指推挤外踝并向内旋转,余指由内按压小腿下端向外,然后背屈踝关节,移位得以纠正,患踝以前后石膏托内翻、内旋并背屈位固定。为控制小腿的旋转,石膏应超过膝关节,膝关节置微屈位。4~6 周后解除固定,配合中药海桐皮汤熏洗患部,进行适当、主动的踝关节屈伸活动,8 周后逐渐负重行走。

#### 3 结果

本组 6 例患者,经治疗后均达到解剖复位或近解剖复位,随访时间最短 16 个月,最长 6 年。5 例无不适应症状,1 例诉剧烈运动后踝关节肿胀并轻度疼痛。6 例踝关节均活动正常,无踝关节畸形及双下肢不等长现象发生。

#### 4 讨论

Cooperman 对三平面骨折作了很有价值的研究,详细描述此类骨折的形状,指出骨折块包括两部分:内侧骨块包括胫骨干、内踝和骨骺前内侧部;外侧则为一和腓骨附着在一起的后侧干骺端骨折块<sup>[1]</sup>。

胫骨远端三平面骨折实质上是 Salter-Harris IV 型的特殊类型,具有 Salter-Harris II、III 型联合损伤的形态特征<sup>[2]</sup>。其正位 X 线片显示骨骺呈矢状面骨折,侧位片则为干骺端冠状面骨折,正侧位片可见骺板骨折水平通过骨骺外侧半,到达其后侧,使骨骺后移。确定三平面骨折的性质之所以重要是因为其解剖特殊性,它使大部分关节面受累,所幸此骨折多发生在骨骼即将成熟的青少年,因而对生长畸形影响不大。

鉴于此,根据胫骨远端三平面骨折的损伤机制和移位特点,逆创伤机制施行手法,利用杠杆原理,将骨折远端向近端对线对位,使骨折复位良好。应用超膝前后石膏托外固定,有利于维持断端的稳定,对踝部的侧方和旋转移位倾向,具有可靠的控制。4~6 周解除固定后,以海桐皮汤熏洗,起到理疗和中药的双重作用,通利关节,松解粘连,使踝关节保持良好的活动度,避免日后创伤性关节炎的发生。

#### 参考文献

1 柳用墨,李海平,孙材江,等译.儿童骨骼损伤.北京:人民卫生出版社,1987.397.

2 顾云伍,尚天裕.骨折·骨骺·软组织损伤治疗学.天津:天津科学技术出版社,1994.269.

(收稿日期:2003-07-17 本文编辑:王宏)