

## · 基础研究 ·

# 活血化瘀中药对激素性股骨头缺血坏死血管内皮生长因子表达的影响

齐振熙<sup>1</sup>, 陈磊<sup>2</sup>

(1. 福建中医学院科技产业处, 福建 福州 350003; 2. 福建中医学院骨伤系)

**【摘要】**目的:通过观察活血化瘀中药对激素性股骨头缺血坏死血管内皮生长因子(VEGF)的表达,探讨活血化瘀防治激素性股骨头缺血坏死的作用机制。方法:30只成年新西兰大白兔采用抽签法随机分为2组,正常对照组5只和激素造模组25只。激素造模组每周2次臀肌注射7.5 mg/kg醋酸氢化泼尼松,6周后从激素造模组中抽签随机抽取5只与正常对照组5只同时处死,观察组织病理学变化和VEGF表达。再将其余激素造模组动物(20只)采用抽签法随机分为治疗1、2组与对照1、2组,每组5只。治疗1、2组用桃红四物汤(当归、川芎、赤芍、桃仁、红花、生地)7 ml/kg灌胃,每天1次,对照1、2组等量生理盐水灌胃。于10周后处死治疗1组和对照1组动物,13周后处死治疗2组和对照2组动物,检测VEGF表达。结果:造模后VEGF的表达明显增加,与正常对照组比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ ),但随时间推移,其表达越来越弱。与治疗组比较对照组的VEGF表达明显减弱,有统计学差异( $P < 0.001$ )。结论:活血化瘀中药间接地促进了VEGF的表达,可以有效地改善股骨头微循环障碍。

**【关键词】** 股骨头坏死; 激素类; 活血祛瘀药; 血管内皮生长因子类

**Effect of traditional Chinese blood-activating and stasis-eliminating herbs on the expression of vascular endothelial growth factor in rabbits with glucocorticoid-induced femoral head necrosis** QI Zhen-xi<sup>1</sup>, CHEN Lei<sup>2</sup> Department of Technological Industry of Fujian College of TCM, Fuzhou 350003, Fujian, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of traditional Chinese blood-activating and stasis-eliminating herbs on the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in rabbits with glucocorticoid-induced femoral head necrosis, as well as to explore the mechanism of prevention and treatment of osteonecrosis of traditional Chinese blood-activating and stasis-eliminating herbs **Methods:** In the study, 30 New Zealand white rabbits were randomly divided into 6 groups: control group (5 rabbits) and glucocorticoid-induced model group (25 rabbits). The rabbits in model group were administered with hydroxyprogesterone acetate by intramuscular injection (twice a week) for 6 weeks, then 5 rabbits in the model group were selected randomly and killed and as well as the 5 rabbits in the control group, observe the histopathological changes and the expression of VEGF. Other 20 rabbits in the model group were divided into four groups randomly: treatment group 1 (5 rabbits), treatment group 2 (5 rabbits), control group 1 (5 rabbits) and control group 2 (5 rabbits). The rabbits in treatment group 1 were administered with Chinese herbs *Taohong Siwu* decoction (桃红四物汤) for 4 weeks at a dose of 7 ml/kg, once a day, and then killed. The rabbits in treatment group 2 were administered with Chinese herbs *Taohong Siwu* decoction (桃红四物汤) for 7 weeks at a dose of 7 ml/kg, once a day, and then killed. The rabbits in control group 1 were administered with normal saline for 4 weeks at a dose of 7 ml/kg, once a day, and then killed. The rabbits in control group 2 were administered with normal saline for 7 weeks at a dose of 7 ml/kg, once a day, and then killed. Then the expression of VEGF was detected. **Results:** The expression of VEGF increased significantly after 6 weeks compared with the common group ( $P < 0.01$ ), but its expression became weaker and weaker and eventually decreased significantly compared with treatment groups in 10 weeks and 13 weeks ( $P < 0.001$ ). **Conclusion:** The traditional Chinese blood-activating and stasis-eliminating can indirectly promote the expression of VEGF and improve the microcirculation of avascular necrosis of femoral head.

**Key words** Femur head necrosis; Hormones; Blood activating and stasis removing drugs; Vascular endothelial growth factors

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(9): 601-602 www.zggszz.com

基金项目:福建省自然科学基金课题(编号:C0510024)

通讯作者:齐振熙 Tel: 0591-87249005 E-mail: zqxj@fjtc.edu.cn

活血化瘀中药可对抗激素的作用,对激素性股骨头缺血坏死早期有明显的防治作用<sup>[1]</sup>。本研究拟通过观察活血化瘀中药对激素性股骨头缺血性坏死血管内皮生长因子(Vas-

cular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响,进一步探讨和阐明其防治激素性股骨头缺血坏死的作用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物 健康成年新西兰大白兔 30只,雌雄不拘,体重 2.0~2.5 kg,平均(2.29 ±0.23) kg,清洁级,由浙江动物中心提供。

1.2 动物造模与分组 按抽签法将动物随机先分为 2组,正常对照组 5只和激素造模组 25只。适应性喂养 1周,采用贺西京等<sup>[2]</sup>造模法,每次实验均精确称重。激素造模组每周 2次臀肌注射醋酸氢化泼尼松,每只 7.5 mg/kg,正常对照组每周 2次注射等量生理盐水,所有动物每周 2次肌注青霉素 16万单位和链霉素 15万单位预防感染。6周后,从激素造模组中抽签随机抽取 5只与正常对照组 5只同时处死,观察组织病理学和 VEGF表达。再将其余激素造模组动物(20只)按抽签法随机分为治疗 1组、治疗 2组、对照 1组、对照 2组,每组各 5只。

1.3 给药方法 活血化瘀中药为经典方剂桃红四物汤,由当归、川芎、赤芍、桃仁、红花、生地组成。由福建中医学院附属第二人民医院制剂中心一次加工完成,制成水煎剂,每 1 ml 含生药 0.75 g,高温封瓶,4 保存备用。用前 12 h取出,放至室温,按 5.25 g/kg(即 7 ml/kg)灌胃服用。治疗 1、2组桃红四物汤 7 ml/kg灌胃,每天 1次;对照 1、2组等量生理盐水灌胃。于 10周后处死治疗 1组和对照 1组动物,13周后处死治疗 2组和对照 2组动物,检测 VEGF表达。

1.4 实验试剂 VEGF鼠抗人单克隆抗体,产品编号:MAB-0243。克隆号:JH121。由福州迈新生物技术开发有限公司提供。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 组织病理学观察 取一侧的股骨头,入 10%甲醛溶液中固定 1周,再以 5%硝酸脱钙,系列乙醇脱水,常规石蜡包埋、切片、HE染色,于光镜下观察骨小梁、骨细胞、髓腔及造血细胞形态、结构和数量的变化。高倍镜下任选 10个视野,每个视野计数 50个骨陷窝,求出空骨陷窝数的百分比。

1.5.2 VEGF免疫组化检测 取出股骨头,用中性甲醛溶液固定,脱钙,梯度乙醇脱水,石蜡包埋切片。脱蜡和水化后,用 PBS(pH 7.4)冲洗 3次,每次 3 min。EDTA(pH 9.0)修复,水浴 20 min。每张切片加 50 μl 3%的过氧化氢溶液,室温下孵育 10 min。PBS冲洗 3 × 3,甩去 PBS液,每张切片加 50 μl 的一抗,4 过夜。PBS冲洗 3 × 5,甩去 PBS液,每张切片加 50 μl 的聚合物增强剂,室温下孵育 20 min。PBS冲洗 3 × 3,甩去 PBS液,每张切片加 50 μl 二抗,室温下孵育 30 min。PBS冲洗 3 × 3,甩去 PBS液,每张切片加 100 μl 新鲜配制 AEC显色液,显微镜下观察 3~10 min,阳性显色为红色。蒸馏水冲洗,苏木素复染,0.1%盐酸分化,自来水冲洗,PBS冲洗返蓝。用水性封片剂封片。免去第一抗体作为阴性对照。每组每次取 7~10张切片,每张切片拍 1张照片,用 Motic Images Advanced 3.1 图像分析软件进行分析,所得灰度数据与表达强弱成反比。

1.6 统计学处理 以上各项检测指标均应用 SPSS 11.0 for windows软件包进行统计处理,两组之间比较行 Independent-samples T-test检验。

2 结果

2.1 组织病理学变化 正常对照组股骨头软骨层较厚,成骨活跃,软骨下骨小梁排列规则整齐,致密饱满,骨细胞清晰可见,核较大,多位于中央,偶见骨陷窝空虚,髓腔内可见增生活跃的骨髓组织,造血细胞丰富,空骨陷窝数为(14.50 ± 1.72)%。激素造模组股骨头软骨层较薄,软骨下骨小梁变细,间距增大,结构紊乱,部分有断裂现象,小梁中大部分骨细胞坏死,骨陷窝空虚现象明显增多,软骨下区骨髓几乎完全为脂肪组织代替,脂肪细胞增多,体积增大,有的融合成泡状,造血细胞数量减少,空骨陷窝计数高达(27.50 ± 5.40)%,与正常对照组比较有统计学差异(t=19.748, P<0.001)。

2.2 VEGF检测结果 激素造模组表达值 90.39 ± 4.31,与正常对照组表达值 97.58 ± 0.56比较灰度指数减小,表达增强(t=3.694, P<0.01)。对照 1组表达值 117.68 ± 7.04,与正常对照组比较灰度指数增大,表达减弱,差异有显著性意义(t=6.366, P<0.001)。对照 2组表达值 133.53 ± 4.96,与正常对照组比较灰度指数增大,表达减弱(t=16.109, P<0.001)。治疗 1组表达值 98.06 ± 0.65,与对照 1组比较灰度指数减小,表达增强(t=6.207, P<0.001)。治疗 2组表达值 97.55 ± 0.74,与对照 2组比较灰度指数减小,表达增强(t=16.047, P<0.001)。对照 1组表达值 117.68 ± 7.04,与激素造模组比较灰度指数增大,表达减弱(t=8.057, P<0.001)。对照 2组表达值 133.53 ± 4.96,与激素造模组比较灰度指数增大,表达减弱(t=15.807, P<0.001)。对照 1组表达值 117.68 ± 7.04,与对照 2组比较灰度指数增大,表达减弱(t=4.117, P<0.01)。

3 讨论

3.1 VEGF的表达与股骨头缺血性坏死 本研究中发现正常的家兔股骨头中有 VEGF的表达,而大剂量使用激素后早期股骨头内 VEGF的表达增高,说明股骨头坏死早期血管受损,促使大量 VEGF分泌来进行血管修复,但随着时间的延长,这种表达增强的趋势越来越弱,比正常状态下减弱很多。故而认为激素很可能是通过抑制 VEGF的表达而使股骨头缺血性坏死的血管无法再生,减少血供,导致骨细胞死亡,继而发生股骨头缺血性坏死。

3.2 活血化瘀法与 VEGF的表达 既往的研究表明,运用不同的治则(活血化瘀法、渗湿化痰法和补肾壮骨法)来防治激素性股骨头缺血性坏死,活血化瘀法作用较为显著<sup>[1]</sup>。活血化瘀中药可对抗激素的作用,抑制激素性股骨头缺血性坏死的发生和发展。本研究结果显示活血化瘀治疗组在灌药 4、7周后,灰度系数保持与正常状态下相近的水平,故而认为其作用并不是使 VEGF表达增强,而是随时间的推移,逐渐拮抗激素促使 VEGF继续减弱的趋势,从而间接地促进了 VEGF表达,促使血管生成,减轻和改善骨组织的缺血状况,使激素性股骨头缺血性坏死症状得到控制。

参考文献

1 齐振熙,曹阳.不同治法防治激素性股骨头缺血性坏死的实验研究.中国骨伤,2002,15(2):77-78.  
2 贺西京,毛履真,王坤正,等.肾上腺糖皮质激素引起股骨头缺血性坏死的机制实验研究.中华骨科杂志,1992,12:440-442.

(收稿日期:2006-10-13 本文编辑:李为农)