

• 基础研究 •

恒古骨伤愈合剂对激素性坏死股骨头内 VEGF 基因表达的影响

赵宏斌¹, 胡敏², 王维琦³, 李林芝¹

(1. 昆明医学院第一附属医院骨科, 云南 昆明 650032 2. 昆明市卫生学校; 3. 昆明医学院第三附属医院)

【摘要】 目的: 研究中药恒古骨伤愈合剂对兔坏死股骨头内 VEGF 基因表达的影响。方法: 成年新西兰大白兔分为 4 组: A 组(空白对照组), B 组(正常兔服用恒古骨伤愈合剂), C 组(造模后不喂恒古骨伤愈合剂), D 组(造模后喂恒古骨伤愈合剂), 每组 24 只。以大肠杆菌内毒素(LPS)(10 μg/kg 体重)间隔 24 h 静注 2 次加甲基强的松龙(MPS)肌注 3 次制作兔股骨头坏死模型后, B 组和 D 组用恒古骨伤愈合剂, A 组和 C 组用等量生理盐水, 按计算出的药量灌胃, 1 次/2 d, 于喂药至第 4、8、12 周时取股骨头行免疫组化、原位杂交并提取总 RNA 行实时荧光定量 PCR, 动态观察兔股骨头内 VEGF 基因表达的变化特点。**结果:** 喂药至第 4、8 周时, 比较 D 组与 C 组股骨头内 VEGF 基因表达量的差别无统计学意义。喂药至第 12 周时, D 组与 C 组股骨头内 VEGF 基因表达量的差别具有统计学意义($P = 0.042 < 0.05$)。B 组与 A 组比较差别无统计学意义。**结论:** LPS 加 MPS 制作的兔股骨头坏死模型中股骨头内 VEGF 基因表达受抑制。中药恒古骨伤愈合剂可促进坏死股骨头内源性 VEGF 基因的表达, 以用药时间长者效果明显。恒古骨伤愈合剂对正常兔股骨头内 VEGF 基因的表达无影响。

【关键词】 恒古骨伤愈合剂; 股骨头坏死; 免疫组织化学; 原位杂交; 荧光; 血管内皮生长因子

Effects of the VEGF gene expressions of Osteoking in the treatment of femoral head necrosis ZHAO Hong-bin*, HU Min, WANG Wei-qi, LI Lin-zhi* *Orthopaedic Department of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan, China*

ABSTRACT Objective To study the effects of vascular endothelial growth factor(VEGF) gene expressions of Osteoking in the treatment of femoral head necrosis(FHN). **Methods** Rabbits were divided into 4 groups randomly group A (blank control group), group B (normal rabbit fed with Osteoking), group C (model group without feeding Osteoking), group D (model group fed with Osteoking). There were 24 rabbits in each group. Rabbit model of FHN was established with the method of twice intravenous injection with LPS(10 μg/kg body weight at a time interval of 24 hours) and 3 times intramuscular injection with Methylprednisolone (MPS) (20 mg/kg body weight at a time interval of 24 hours). Once every 2 days the stomach in group B and D were irrigated with Osteoking while A and C with normal saline. After the treatment with Osteoking the changes in VEGF gene expressions were compared with each group. At the 4th, 8th and 12th week, 8 rabbits were put to death in each group. Then we took out both femoral heads, make immunohistochemistry, in situ hybridization and extract total RNA for real time Q-PCR. The dynamic changes of the VEGF gene expressions were successfully detected inside the femoral head of rabbits. **Results** There were no significant difference in expressions of the VEGF gene between model group without feeding Osteoking and model group fed with Osteoking at the 4th week and 8th week ($P > 0.05$), but there were obviously difference at the 12th week ($P = 0.042$). The expressions had no difference in blank control group and normal rabbit fed with Osteoking group at different time. **Conclusion** The VEGF gene expressions are restrained in LPS and MPS model. Osteoking can stimulate the endogenous VEGF gene expressions of FHN; and the longer the time it has been used, the better the effect is obvious. Osteoking has no effect to the femoral head VEGF gene expressions for normal rabbit.

Key words Osteoking; Femoral head necrosis; Immunohistochemistry; In situ hybridization; fluorescence; Vascular endothelial growth factor; VEGF

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(11): 757-759 www.zggssz.com

基金项目: 1. 国家自然科学基金资助项目(编号: 30460162);

2. 云南省教育厅科学研究基金(编号: 04y848c)

通讯作者: 赵宏斌 Tel 0871-5360473 E-mail zhaohongbin@vip.km169.net

恒古骨伤愈合剂是源自云南的国药准字药物, 主要由三七、人参、红花、杜仲等配制成, 股骨头坏死(femoral head necrosis, FHN)是其治疗适应证之一。为了探索中药恒古骨伤愈

合剂治疗 FHN 的作用机制, 我们通过免疫组化、原位杂交和实时荧光定量 PCR (real time Q-PCR) 等技术, 研究了恒古骨伤愈合剂对 FHN 修复过程中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor VEGF) 基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药物 恒古骨伤愈合剂 (由三七、黄芪、人参、红花、杜仲、鳖甲、陈皮等配方制成, 每毫升生药含量 0.36 g), 规格 25 ml 瓶 (云南克雷斯特天然药物制药厂, 批号: 20050513)。大肠杆菌内毒素 (lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111:B4, L-3012 Purified by chromatography LPS, SIGMA, USA), 甲基强的松龙粉剂 (Methylprednisolone, MPS, HARMACIA NV/SA, 批号: LK0984)。生理盐水 (昆明南疆制药有限公司, 批号: 20050201)。

1.1.2 动物 健康成年新西兰大白兔 150 只, 体质量 2.5~3.5 kg 雌雄不限, 由昆明医学院实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (滇) 2005-0008 实验动物使用许可证号: SYXK (滇) 2005-0004。实验兔均在昆明医学院实验动物中心饲养用药, 饲养期间给兔颗粒饲料 (由昆明医学院实验动物中心提供), 自由饮水, 通风, 单笼饲养, 适应性喂养 2 周。

1.1.3 仪器 CM 2000C 型北航医学病理图像分析仪。高速离心机 (Eppendorf Centrifuge 5804R 德国), 紫外分光光度计 (Eppendorf Biophotometer 德国), 电泳槽 (DYI-III 型, 北京市六一仪器厂), Opticon 荧光定量 PCR 仪 (美国 MJ Research 公司)。

1.1.4 试剂 VEGF (MAB-243) SP 免疫组织化学试剂盒 (鼠抗人, 福州迈新公司), 二甲苯、梯度乙醇、PBS (迈新编号: PBS-0060)、苏木精。VEGF mRNA 寡核苷酸探针杂交试剂盒 (武汉博士德公司, 适用种属: 人、大鼠、兔、小鼠组织)。Trizol (Invitrogen, 美国, 批号: 15596-018), DNase I (RNase Free 5 μl/μl 大连宝生生物工程有限公司), RNase Inhibitor (40 μl/μl 美国 Promega 公司), 10× Buffer RT (德国 Qiagen 公司), dNTP (5 mM, 德国 Qiagen 公司), Qmimicript RT (40 μl/μl 德国 Qiagen 公司), RNase Free water (德国 Qiagen 公司)。SYBR Green Supermix 荧光定量染料 (加拿大 Bio-Rad Laboratories)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 适应性喂养 2 周, 精确称重, 以查随机数字表法随机分成 4 组, 分别为空白对照组 (A 组) 24 只, 正常兔服用恒古骨伤愈合剂组 (B 组) 24 只; 模型组 (C 组, 造模后不喂恒古骨伤愈合剂), 加恒古骨伤愈合剂组 (D 组, 造模后喂恒古骨伤愈合剂) 共 102 只。4 组兔体质量和雌雄数经 *t* 检验差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2.2 造模 参照 Yamamoto 等^[1]的方法和我们预实验的结果, 除 A 组和 B 组外, C 组及 D 组均先给兔按 10 μg/kg 体重静脉注射 LPS 2 次, 注射间隔 24 h, 于第 2 次注射 LPS 后开始, 连续 3 d 按 20 mg/kg 体重间隔 24 h 肌肉注射 MPS, 每次注射前均需称重。至造模 4 周末共死亡兔子 49 只, 剩余 53 只再以查随机数字表法随机抽取 5 只经组织学观察证实均有股骨头坏死。最后剩余 48 只兔再以查随机数字表法随机分为 C 组和 D 组, 每组 24 只。

1.2.3 给药 经人与兔体表面积用药量的换算, 计算出每只兔子所需恒古骨伤愈合剂的剂量。于造模第 5 周开始, B 组和 D 组用恒古骨伤愈合剂按算出的剂量灌胃 1 次/2 d, A 组及 C 组用算出中药剂量的等量生理盐水灌胃, 1 次/2 d 造模及给药期间均未给文中所述之外的其他药物。

1.2.4 取材 于给药第 4、8、12 周末, 各组各取 8 只兔, 用大量空气栓塞法处死后取出双侧股骨头, 一侧置于液氮罐中保存作 PCR 检测用, 另一侧沿冠状面剖开, 分别进行免疫组化和原位杂交检测。

1.2.5 免疫组化检测 用石蜡切片免疫组织化学 SP 法, 按其规程操作。综合阳性着色深浅和阳性细胞数判定 VEGF 表达强度。

1.2.6 原位杂交检测 按试剂盒说明书的规程操作。综合阳性着色深浅和阳性细胞数判定 VEGF 表达强度。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测

(1) 从液氮中取股骨头, 置于无菌的研钵研成粉末状后, 转入离心管, 以 Trizol 试剂加入该管后, 按 Trizol 法的操作规程提取兔股骨头总 RNA。

(2) 引物设计及合成: VEGF 上游引物: 5'-GTGGACATCTTCCAGGAGTACC-3', 下游引物: 5'-GATCCGCATGATCTGCATGCTG-3'。β-actin 上游引物: 5'-CGCTGGACTTCGAGCAGGAG-3', 下游引物: 5'-CAGGAAGGAGGGCTGGAA-CA-3'。

以上引物均由上海生工生物工程公司合成、纯化。

(3) 实时荧光定量 PCR: 加入 250 ng/μl 的 cDNA 模板 2 μl, 10 μl SYBR Green I 荧光染料, 上下游引物各 0.5 μl, 双蒸水 7 μl, 每个反应体系 20 μl 加入定量 PCR 仪专用毛细管内。将毛细管放入 MJ Research Opticon 荧光定量反应仪, 按如下条件进行 PCR 反应: 95 °C 变性 4 min, 58 °C 30 s, 72 °C 40 s, 76 °C 2 s 检测荧光, 共 40 个循环。同时, 做 53~95 °C 范围内的溶解曲线。

1.3 数据的收集及统计学处理 数据的收集主要由 Opticon 自带软件完成。通过软件可以计算出所有标准品和样品的起始循环数 (CT), 并且根据标准品 CT 值绘制出标准曲线, 再根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 由标准曲线计算出样本的初始拷贝数。使用 SPSS 10.0 版统计软件, 采用单因素方差分析进行组间数据的比较。

2 结果

2.1 免疫组化结果 棕褐色反应产物为阳性定位在血管内皮细胞。A、B 两组及其在不同时相点股骨头内 VEGF 的表达相似, 均为阳性。C 组股骨头内 VEGF 的表达在造模后各时点均为阴性。D 组股骨头内 VEGF 的表达在服药到第 4、8 周时为阴性; 至服药到第 12 周时, 结果为弱阳性 (图 1-2)。

2.2 原位杂交结果 与免疫组化结果相似。A 组和 B 组股骨头内 VEGF mRNA 的表达无差异, 均为阳性。C 组均为阴性。D 组服药到第 4、8 周时均为阴性, 到第 12 周时结果为弱阳性 (图 3-4)。

2.3 实时荧光定量 PCR 结果 D 组在服药后第 4、8 周时与 C 组比较, 两组股骨头内 VEGF mRNA 表达量的差别均无统计学意义 ($P > 0.05$); 服药后第 12 周时, 差别具有统计学意义 ($P = 0.042 < 0.05$) (见表 1)。

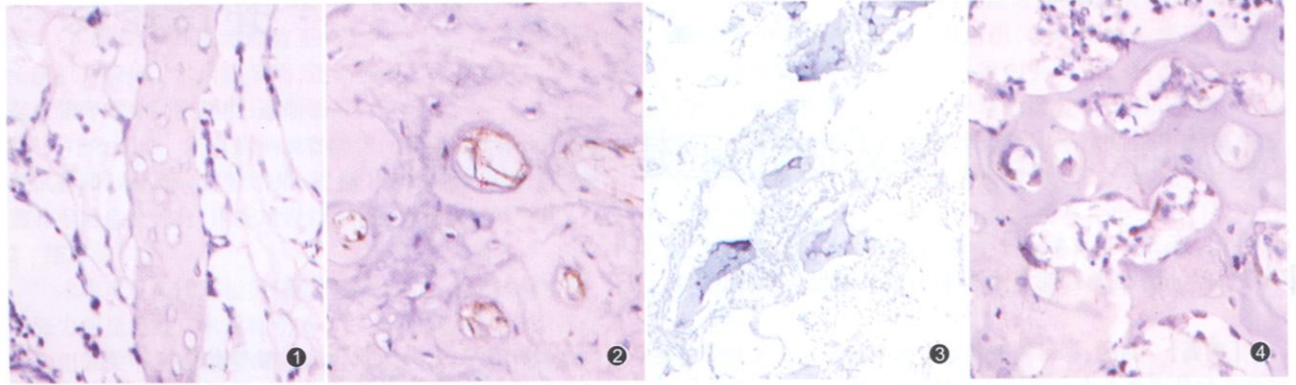


图 1 C 组第 12 周 VEGF 的表达阴性 (SP × 400) 图 2 D 组第 12 周 VEGF 的表达弱阳性 (SP × 400) 图 3 C 组第 12 周 VEGF mRNA 的表达阴性 (× 100) 图 4 D 组第 12 周 VEGF mRNA 的表达弱阳性 (× 200)

Fig 1 The expressions of the VEGF in group C (model group without feeding Osteoking) at the 12th week were negative (immunohistochemistry SP × 400) Fig 2 At the 12th week the VEGF were slight expression in group D (model group fed with Osteoking) (immunohistochemistry, SP × 400) Fig 3 At the 12th week, negative expression of the VEGF mRNA in group C (in situ hybridization, × 100) Fig 4 At the 12th week, slight expression of the VEGF mRNA in group D (in situ hybridization, × 200)

表 1 造模后服中药组 (D 组) 与模型组 (C 组) VEGF mRNA 表达量 (n = 8)

Tab 1 Expression of VEGF mRNA of two groups (C, D)

组别	4 周	8 周	12 周
C 组	6.02 ± 1.18	7.37 ± 0.76	7.44 ± 1.00
D 组	5.98 ± 0.81	6.86 ± 0.91	8.52 ± 1.06 [*]

注: 与 C 组比较, * P = 0.042 < 0.05

Note: As compared with model group (C), * P < 0.05

3 讨论

3.1 VEGF 与骨修复密切相关, FHN 股骨头内 VEGF 表达量减少 VEGF 可特异地、直接地强烈刺激体内新生血管的生成^[2], 在骨的形成与修复改建中发挥着极重要的作用。VEGF 的表达受一系列激素、生长因子和细胞因子的调节, 其中缺氧是最主要的调节因素之一。Vadasz 等^[3]采用切断鼠股骨颈骨膜和圆韧带的股骨头坏死的模型也发现, 股骨头内 VEGF 早期为高表达。但因 FHN 病因的复杂性, 我们用低剂量 LPS (10 μg/kg 体重) 加 MPS 制作的兔 FHN 动物模型进行的研究证实坏死股骨头中 VEGF 的表达低, 组织修复能力下降。Li 等^[4]经体外研究发现, 糖皮质激素 (地塞米松, DEX) 可使 VEGF 蛋白降低 53%。樊粤光等^[5]用 LPS (50 μg/kg 体重) 加 MPS 的兔 FHN 模型研究后发现, 6 周时 VEGF mRNA 在血管壁周围的表达较强, 但是随着时间的推移, 表达逐渐减弱, 在 10 周时表达较低, 14 周时又可见稍有修复, 但仍然较正常组低。而我们通过免疫组化、原位杂交等检测结果均显示, 模型组股骨头内 VEGF 的表达在造模后各时点均未见阳性。用实时荧光定量 PCR 检测股骨头内 VEGF mRNA 的表达也较正常组大大降低, 说明 FHN 中 VEGF 的表达受到显著抑制, 血管再生极慢使骨修复能力明显下降。

3.2 中药恒古骨伤愈合剂对兔 FHN 模型中股骨头内 VEGF 的表达有促进作用, 用药时间长者表现明显 如果能增加内源性 VEGF 在股骨头的表达, 则可能形成较多的血管来满足 FHN 修复的需要。已有研究证实中药具有促进血管再生作用^[6]。樊粤光等^[7]采用原位杂交方法发现生脉成骨胶囊能够通过

VEGF 的作用来促进血管与骨的新生与改建。刘日光等^[8]以手术方法制作的兔股骨头缺血坏死模型, 观察到丹仙康骨胶囊能促进股骨头缺血坏死修复过程中 VEGF mRNA 的表达。这 2 种中成药都已应用在临床上治疗股骨头缺血坏死。

实验中我们直接提取出股骨头内 RNA, 使 FHN 的研究直接得到了较准确可靠的定量而不仅是定性结果。并通过免疫组化、原位杂交和实时荧光定量 PCR 等技术检测且相互印证后所得到的结果是相互吻合的, 即在低剂量 LPS (10 μg/kg 体重) 加 MPS 制作的兔 FHN 动物模型中, 股骨头内 VEGF 的表达在造模后各时间均受到明显抑制。恒古骨伤愈合剂可促进内源性 VEGF 在坏死股骨头内的表达, 其作用出现较晚, 喂药至第 12 周, 表达量才有明显增加。恒古骨伤愈合剂对正常股骨头内 VEGF 的表达无影响。

参考文献

- 1 Yamamoto T, Hirano K, Tsuboi H, et al. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. Clin Orthop Relat Res. 1995; 316(7): 235-243
- 2 Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular specific growth factors and blood vessel formation. Nature. 2000; 407(6801): 242-248
- 3 Vadasz Z, Misselevich I, Noman D, et al. Localization of vascular endothelial growth factor during the early reparative phase of the rat's vessels deprivation induced osteonecrosis of the femoral heads. Exp Mol Pathol. 2004; 77(2): 145-148
- 4 Li X, Jin L, Cui Q, et al. Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression. Osteoporos Int. 2005; 16(1): 101-108
- 5 樊粤光, 徐光毅, 何伟, 等. 激素性股骨头坏死病程中股骨头局部 VEGF mRNA 表达的变化及意义. 中国矫形外科杂志, 2002; 10(8): 784-786
- 6 何秀娟, 李萍, 邱全琰, 等. 几种外用中药成份对离体人脐静脉内皮细胞增殖的影响. 中国病理生理杂志, 2004; 20(5): 832-835
- 7 樊粤光, 徐传毅, 何伟, 等. 生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死血管内皮细胞功能的调节及意义. 中国中医基础医学杂志, 2002; 8(9): 35-37
- 8 刘日光, 沈冯君, 尹培荣, 等. 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. 中国骨伤, 2004; 17(12): 705-707.

(收稿日期: 2007-07-20 本文编辑: 李为农)