

• 基础研究 •

# 活血化瘀中药对激素性股骨头缺血坏死模型鼠 TGF-β<sub>1</sub> 表达的实验研究

齐振熙<sup>1</sup>, 康靖东<sup>2</sup>, 李树强<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:**观察活血化瘀中药对激素性股骨头缺血性坏死大鼠转化生长因子 β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>)表达的影响,进一步探讨其防治激素性股骨头坏死的作用机制。**方法:**采用清洁级 SD 大鼠 40 只,随机分为空白组 4 只和模型组 36 只,模型组每周 2 次腹腔注射醋酸泼尼松龙 24.5 mg/kg,经 6 周诱导出早期激素性股骨头缺血坏死的模型,空白组每周 2 次腹腔注射同等剂量的生理盐水。6 周后处死空白组 4 只和模型组 4 只,进行光、电镜观察,确定造模成功。随后将其余 32 只模型组大鼠再随机分为治疗组 16 只和对照组 16 只,分别灌服桃红四物汤和生理盐水,于灌胃后第 6、8 周检测血清中 TGF-β<sub>1</sub> 的含量;检测股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub>mRNA 的转录及股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 的表达。**结果:**①图像分析仪分析:治疗组股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 较对照组表达明显增强,两组有明显差异(P<0.01)。②血清 TGF-β<sub>1</sub> 含量检测:治疗组血清中 TGF-β<sub>1</sub> 的表达增强,与对照组相比有明显差异(P<0.01)。③股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的转录:治疗组在第 6 周时表达即增强,在第 8 周时表达又降低,而对照组在第 6 周时表达减少,在第 8 周时未检测到 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的表达,两组有明显差异(P<0.05, P<0.01)。 **结论:**活血化瘀中药可促进激素性股骨头缺血坏死模型鼠股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的转录水平以及股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 的表达,促进坏死股骨头的修复。

**【关键词】** 股骨头坏死; 泼尼松龙; 转化生长因子 β; 活血祛瘀剂

**Effect on transforming growth factor - β<sub>1</sub> of glucocorticoid-induced avascular necrosis of femoral head in rats by treatment of activating blood circulation of Chinese herbal medicine** QI Zhen-Xi\*, KANG Jing-dong, LI Shu-qiang. \*Department of Technological Industry, Fujian TCM College, Fuzhou 350003, Fujian, China

**ABSTRACT Objective:**To establish rat models of Steroid - avascular necrosis of femoral head,observe the effects of activating blood circulation of chinese herbal medicine on genetic expression of transforming growth factor-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>). To interpret the mechanism of the effect on Steroid-vascular necrosis of femoral head by activating blood circulation, and offer a effective method to clinical. **Methods:**Cleaner-40 SD rats, half males and half females, weight (200±20) g, were randomly divided into 2 groups:4 rats were in common group and 36 rats were in medel group. The rats in medel group were administered with 24.5 mg/kg hydrocortisone twice a week peritoneal injection for 6 weeks induced to femur head necrosis. The rats in common group were through gluteus injection as control. There were 4 rats were killed in each group after 6 weeks, to be assure that the model were succed. All surplus rats were divided into treatment group and control group;the treatment group were administrated with activating blood circulation of Chinese herbal medicine 12.3 ml/kg per day,the control group were administrated with sodium chloride 12.3 ml/kg per day. Then, after 6 and 8 weeks, killed the animal and detected all indexes. **Results:**1.The expression of TGF-β by immunohistochemistry and image analysis;the expression of femoral head TGF-β increased significantly in treatment group than in control group and two group had significant differences. 2.Serum levels of TGF-β<sub>1</sub>;in the treatment group serum expression of TGF-β<sub>1</sub> increased, compared with the control group had significant difference (P<0.01). 3.The femoral head local TGF-β<sub>1</sub> mRNA transcription;treatment group in the first six weeks, expressed that the increase in the first eight weeks, expressed also reduced, and the control group in the first six weeks, expressed a decrease in the first eight weeks, was not detected to TGF-β<sub>1</sub> mRNA expression of difference between the two groups was significant (P<0.01). TGF-β<sub>1</sub> mRNA in serum and the femoral head with local expression of TGF-β<sub>1</sub> in consistency. **Conclusion:**Rat abdominal cavity prednisolone acetate injection plus intermittent standing avascular necrosis modeling stability, good repeatability. *Taohongsiwu* through the promotion of hormone-ischemic necrosis of the femoral head rat model of

基金项目:福建省卫生厅科技项目(编号:WZY0611)  
通讯作者:齐振熙 Tel:0591-87249005 E-mail:zxqi@fjtc.edu.cn

TGF- $\beta_1$  mRNA transcription, and promote expression of TGF- $\beta_1$ .

**Key word** Femur head necrosis; Prednisolone; Transforming growth factor beta; Blood act stasis remov agents

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(8): 596-598 www.zggszz.com

活血化癥法被广泛应用于激素性股骨头缺血坏死的治疗, 本文采用醋酸泼尼松龙加间断立位制备激素性股骨头缺血性坏死大鼠模型, 观察桃红四物汤对成模大鼠 TGF- $\beta_1$  表达的影响, 进一步阐明活血化癥法对该病的防治机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 清洁级 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体重(200±20) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物合格证号: SYXK(沪)2003-0003。

**1.2 动物造模与分组** 用抽签法随机分组, 分为空白组 4 只和模型组 36 只, 每次实验均精确称重。本研究参照贺氏造模法<sup>[2]</sup>, 模型组腹腔注射醋酸泼尼松龙 24.5 mg/kg, 同时注射青霉素钠 14 万 U/只, 每周 2 次, 连续 6 周。空白组腹腔注射等剂量的生理盐水、青霉素。造模期间正常普通饲料喂养, 饮水瓶悬吊, 使动物下肢直立饮水。6 周后, 空白组和模型组各处死 4 只, 进行标本大体形态及光镜、透射电镜观察, 检测造模结果。造模成功后再随机将其余动物分成两组: 治疗组 16 只, 对照组 16 只。

**1.3 给药方法** 活血化癥中药为经典方剂桃红四物汤, 由当归、川芎、赤芍、桃仁、红花、生地等组成。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, 按照人与大鼠体表面积换算加工成 1 ml 含生药 0.75 g, 高温封瓶, 4℃保存备用。用前 12 h 取出, 室温放置, 按 9.2 g/kg(即 12.3 ml/kg)灌胃服用。治疗组 16 只桃红四物汤 12.3 ml/kg/d(相当于生药 9.2 g/kg/d)灌胃, 对照组 16 只生理盐水 12.3 ml/kg/d 灌胃, 分别于第 6、8 周各抽取 8 只取材, 检测 TGF- $\beta_1$  的表达。

**1.4 实验试剂** 反转录试剂盒、TRIZOL 试剂(厦门华美); Taq 酶(上海博亚); 酶联免疫吸附法试剂盒(天津津盛); TGF- $\beta_1$ 、 $\beta$ -actin 引物, Oligo 5.0 软件程序设计, 由 Invitrogen 公司合成; 即用型快速免疫组化 MaxVision™ 试剂(产品编号: KIT-5004/5005/5006)、胃蛋白酶 Pepsin(产品编号: DIG-3009)(福州迈新生物技术开发有限公司)。

## 1.5 观察指标与方法

**1.5.1 酶联免疫吸附法检测血清 TGF- $\beta_1$  的表达** 取酶标板, 依照次序对应分别加入 100  $\mu$ l 的标准品和质控品于空白微孔中; 分别标记样品编号, 加入 100  $\mu$ l 样品于空白微孔中; 每孔加入 50  $\mu$ l 的酶标记溶液; 20℃孵育反应 90 min; 洗板机清洗 5 次, 每次静立 15 s(浓缩洗液与医用蒸馏水 1:20 倍稀释); 每孔加入底物 A、B 液各 50  $\mu$ l; 20℃孵育反应 15 min; 每孔加入 50  $\mu$ l 的终止液, 终止反应。于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值。结果于波长 450 nm BT 半自动生化分析仪上读取各孔的 OD 值。

**1.5.2 免疫组化法检测股骨头局部 TGF- $\beta_1$  的表达** 石蜡切片, 常规脱蜡脱水。蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。3% $H_2O_2$  去离子室温孵育 10 min, PBS 冲洗, 2 min×3 次。滴加封闭用正常山羊血清工作液, 室温孵育 15 min 后倾去。滴加 1:100 的一抗工作液, 4℃过夜。PBS 冲洗, 3 min×3 次。甩去 PBS 液, 滴加生物

素标记山羊抗兔 IgG, 室温下孵育 15 min。PBS 冲洗, 3 min×3 次。甩去 PBS 液, 滴加辣根酶标记链霉卵蛋白素工作液(S-A/HRP), 室温下孵育 15 min。PBS 冲洗, 3 min×3 次。甩去 PBS 液, 加 2 滴新鲜配置的 DAB 显色, 3 min。自来水充分冲洗。判定标准: 光镜下观察, 以棕褐色反应物代表抗原定位。TGF- $\beta_1$  阳性染色, 每张切片随机选取 5 个高倍视野, 使用 Motic Image Advanced 3.2 软件采集图像, 以阳性染色强度和阳性细胞数百分比两个方面进行判断。采用 IHS 评分法, 方法如下: ①阳性染色强度: 阴性(0 分), 淡染(1 分), 染色清晰(2 分), 染色强烈(3 分)。②阳性细胞数:  $\leq 10\%$ (0 分),  $\leq 25\%$ (1 分),  $\leq 50\%$ (2 分),  $> 50\%$ (3 分)。两项指标相乘分数作为最后判定分数。

**1.5.3 反转录-聚合酶链反应检测股骨头局部 TGF- $\beta_1$  mRNA 转录** (1)总 RNA 提取: 取股骨头区组织样本 50 mg 于冰上预冷的研钵内, 克氏钳夹碎, 迅速加入 Trizol 1 ml 变性液, 充分匀浆 3~4 min 后移入 1.5 ml EP 管内, 室温静置 5 min; 加入 200  $\mu$ l 氯仿、电震动 20 s, 室温静置 2~3 min; 12 000 r/min×10 min, 4℃离心, 取上层水相移至新 EP 管中; 加入 500  $\mu$ l 已预冷的异丙醇, 颠倒数次, 室温静置 10 min; 12 000 r/min×10 min, 4℃离心; 弃上清; 加入 1 ml 75%乙醇(DEPC 水配置)吹打悬起 RNA, 提取 RNA。视沉淀的 RNA 的量用 DEPC 水 30~80  $\mu$ l 溶解 RNA; 核酸蛋白分析仪测定所提 RNA 的浓度和纯度: 取 2  $\mu$ l 稀释 100 倍稀释液于专用比色皿中, 核酸蛋白分析仪上测定浓度, 含量为 1.5~2.0  $\mu$ g/ $\mu$ l; OD 260/OD 280, 均在 1.8~2.0 之间。(2)反转录: 按照 Promega A3500 试剂盒换算得如下反应体系: 10×buffer 2  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 10 mM dNTP 2  $\mu$ l, 500 U/ml Random Primer 1  $\mu$ l, 40 u/ml RNA inhibitor 0.5  $\mu$ l, 25 U/ml AMV 0.6  $\mu$ l, 总 RNA 1  $\mu$ g, 共计 20  $\mu$ l, 加样后放入 PCR 扩增仪里反转录, 程序设定为: 25℃×10 min, 42℃×60 min, 99℃×5 min, 4℃保存。反应完即得到逆转录产物 cDNA。(3)PCR: TGF- $\beta_1$ 、 $\beta$ -actin 引物设计如下: TGF- $\beta_1$ : 上游 5'-CCACC TGCAA GACCA TCGAC-3', 下游 5'-TGCTT CCCGA ATGTC TGACG-3';  $\beta$ -actin: 上游 5'-GAGGC ATCCT GACCC TGAAG-3', 下游 5'-CATCA CAATG CCACT GGTACG-3'; 50  $\mu$ l PCR 体系的组成: 10×buffer 5  $\mu$ l(含镁离子), 10 mM dNTP 1  $\mu$ l, 引物 1  $\mu$ l, Taq 酶 0.5  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l, DEPC 处理水补至 50  $\mu$ l, 反应条件: 94℃灭活逆转录酶 3 min, 94℃变性 30 s, 54℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循环, 4℃保存产物。(4)电泳与成像分析: 1.5%琼脂糖凝胶的制作: 电子天平称量 0.4 g 琼脂糖至小三角烧瓶内, 加入 27 ml 1×Tris-乙酸(TAE)电泳缓冲液, 将胶煮沸, 振荡, 并反复加热 3~5 次, 振荡。使琼脂糖充分融化, 冷至稍不烫手, 加入 1.5  $\mu$ l EB, 轻轻震荡混匀, 倒入已安置好梳子的水平微型电泳槽中, 使胶自然冷却至完全凝固; 慢慢拔出梳子, 以防破坏胶面及加样孔即可使用; 加样: 加 1×电泳缓冲液没过胶面约 1 mm, 将 DNA 样品同 6×溴酚兰电泳加样液混合后, 慢慢将混合物加至凝胶孔中。电泳: 80 V, 30~60 min; 成像系统成像分析: 凝胶图像成像

系统拍摄成像, 图形分析系统分析 TGF-β<sub>1</sub> 和 β-actin 扩增条带的吸光面积分值, 计算结果。每个样本 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 表达水平均以 TGF-β<sub>1</sub> /β-actin 比值表示。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 进行数据处理, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间行独立样本 *t* 检验。结果以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 阳性指数结果 对照组与治疗组比较阳性指数减少, 表达减弱, 差异有统计学意义 (*t*<sub>6</sub>=4.266, *t*<sub>8</sub>=8.021, *P*<0.01); 治疗 6 周后, 治疗组股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 表达增强, 且随治疗时间的延长 (治疗 8 周后), 股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 阳性指数逐渐增加, TGF-β<sub>1</sub> 表达逐渐增强, 而对照组股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 表达减弱, 且随时间的延长, 股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 阳性指数逐渐减小, TGF-β<sub>1</sub> 表达逐渐减弱, 与治疗组趋势恰好相反, 在同一时期对照组与治疗组比较, 两组差异有统计学意义 (*t*<sub>6</sub>=4.266, *t*<sub>8</sub>=8.021, *P*<0.01) (见表 1)。注: *t*<sub>6</sub>、*t*<sub>8</sub> 分别表示第 6、8 周时统计的 *t* 值, 下同。

表 1 股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 阳性指数结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 The positive exponent of TGF-β<sub>1</sub> in femoral head

组别	病例数	时间(周)	视野(个)	阳性染色强度×阳性细胞数
治疗组	8	6	40	4.20±0.64
		8	40	4.60±0.68
对照组	8	6	40	2.35±1.33*
		8	40	1.65±0.63*

注: 与同期的治疗组比较, \**P*<0.01

Note: As compared with treatment group in same time, \**P*<0.01

2.2 血清 TGF-β<sub>1</sub> 检测结果 对照组与治疗组比较血清中 TGF-β<sub>1</sub> 含量减少, 差异有统计学意义 (*t*<sub>6</sub>=3.792, *t*<sub>8</sub>=5.64, *P*<0.01); 治疗 6 周后, 治疗组血清中 TGF-β<sub>1</sub> 含量增多, 且随治疗时间延长 (治疗 8 周后), 血清中 TGF-β<sub>1</sub> 含量逐渐增加, 而对照组血清中 TGF-β<sub>1</sub> 含量减少, 且随时间延长, 血清中 TGF-β<sub>1</sub> 含量逐渐减小, 与治疗组趋势恰好相反。在同一时期对照组与治疗组比较, 两组差异有统计学意义 (*t*<sub>6</sub>=3.792, *t*<sub>8</sub>=5.64, *P*<0.01) (见表 2)。

2.3 股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 转录 对照组与治疗组比较股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 转录减弱, 差异显著 (*t*<sub>6</sub>=2.958, *P*<0.05; *t*<sub>8</sub>=10.669, *P*<0.01); 治疗 6 周后, 治疗组股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 转录增强, 且随治疗时间的延长 (治疗 8 周后), 股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 转录逐渐增强, 而对照组股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 转录减弱, 且随时间的延长, 股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 转录逐渐减弱, 与治疗组趋势恰好相反, 在同一时期对照组与治疗组比较, 两组差异有统计学意义 (*t*<sub>6</sub>=2.958, *P*<0.05; *t*<sub>8</sub>=10.669, *P*<0.01) (见表 2)。

3 讨论

3.1 活血化瘀中药促进 TGF-β<sub>1</sub> 的表达 TGF-β 是一组具有多功能性的多肽, 在血小板和骨组织含量最为丰富。其生物学作用非常广泛, 可促进各类软组织损伤修复、促进血管生长;

表 2 血清 TGF-β<sub>1</sub> 检测及股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 表达结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Expression of TGF-β<sub>1</sub> in serum and femoral head

组别	病例数	时间(周)	血清 TGF-β <sub>1</sub> (pg/ml)	TGF-β <sub>1</sub> mRNA
治疗组	8	6	45.83±5.62	0.66±0.21
		8	51.66±10.31	0.73±0.17
对照组	8	6	36.53±4.57*	0.42±0.09*
		8	29.60±5.89*	0.10±0.04*

注: 与同期的治疗组比较, \**P*<0.01, \**P*<0.05

Note: As compared with treatment group in same time, \**P*<0.01, \**P*<0.05

参与体内许多炎症反应和组织修复; 参与骨与软骨的形成。本研究结果显示通过桃红四物汤治疗后, 治疗组股骨头缺血性坏死 SD 大鼠血清中 TGF-β<sub>1</sub> 的含量开始增加, 且随着治疗时间的延长呈逐渐增加的趋势。而对照组动物体内 TGF-β<sub>1</sub> 含量较低, 且随着时间的延长, 其血清中 TGF-β<sub>1</sub> 的含量逐渐下降。两组动物血清中 TGF-β<sub>1</sub> 含量的同期比较, 差异有统计学意义 (*P*<0.01)。免疫组化检测股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 的表达, 治疗组与对照组同期比较阳性指数明显增大, 且随治疗时间的延长呈逐渐增大的趋势。而对照组股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 表达趋势与治疗组恰好相反, 随时间的延长其阳性指数则逐渐减小。免疫组化检测结果与血清中 TGF-β<sub>1</sub> 含量趋势基本一致, 表明桃红四物汤可以促进激素性股骨头缺血性坏死大鼠股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 的表达, 增加动物血清中 TGF-β<sub>1</sub> 的含量。

3.2 活血化瘀中药促进 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的转录 短期内大剂量应用激素造成股骨头区血液供应中断, 局部出现缺血, 致使骨的活性成份坏死。骨缺血坏死后随着机体对坏死区修复的激活, 修复细胞产生 TGF-β<sub>1</sub> 的量逐渐增多。本研究显示给予激素性股骨头缺血坏死 SD 大鼠桃红四物汤治疗后, 股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的转录显著, 且随治疗时间的延长, 转录水平逐渐增高; 而对照组 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的转录量显著降低, 且随时间和延长, 转录水平逐渐下降, 两组转录趋势恰好相反。表明桃红四物汤可以促进激素性股骨头缺血坏死大鼠股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的转录。随着治疗时间的延长, 其可拮抗激素导致的 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 转录持续减弱的趋势, 间接地促进 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的转录, 具有正向调高 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 转录水平, 同时减缓转录下降速度, 延长局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 高转录时间的作用, 从而促进激素性股骨头缺血坏死大鼠股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 的高表达。

综合上述研究结果, 表明活血化瘀中药可促进激素性股骨头缺血坏死模型鼠股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的转录水平以及股骨头局部 TGF-β<sub>1</sub> 的表达, 促进坏死股骨头的修复。

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(6): 440-442.

(收稿日期: 2008-12-25 本文编辑: 桑志成)