DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20230524.001
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?urlId=46.1049.R.20230524.1216.002&uniplatform=NZKPT

全杜仲胶囊在犬股骨头坏死修复过程中对VEGF/bFGF的调控作用和对Bcl-2/Bax及Caspase-3蛋白表达的影响

孙瑞妍[1],尹鹏开[1],魏 巍[2],邓小磊[3],侯德才[3]✉
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110000;2.辽宁中医药大学附属第二医院,辽宁 沈阳 110000;3.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110000)

[摘要] **目的**:探究全杜仲胶囊对犬股骨头坏死的修复治疗作用。**方法**:将12只比格犬随机分成正常组、模型组、全杜仲胶囊组、仙灵骨葆胶囊组,每组3只。除正常组其余各组均通过液氮交替冷冻建立股骨头坏死模型。正常组与模型组在造模期间不予任何干预,全杜仲组在造模当天即开始进行全杜仲灌胃;仙灵骨葆胶囊组在造模当天即进行仙灵骨葆胶囊灌胃,每日1次,连续12周。比较各组第12周血管VEGF、bFGF的水平表达量,并采用Micro CT测量BMD、BS/BV、BV/TV、Tb.Th、Tb.N的比值,以及用免疫反应检测出Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白的表达量。**结果**:(1)与正常组比较,模型组造模第12周后血清VEGF、bFGF水平降低($P<0.05$);与模型组比较,仙灵骨葆胶囊组、全杜仲胶囊组造模第12周血清VEGF、bFGF水平均升高,结果具有统计学差异($P<0.05$),全杜仲胶囊组水平最高,其次是仙灵骨葆胶囊组。(2)与正常组比较,模型组BMD、BS/BV、BV/TV、Tb.Th、Tb.N均将低,Tb.Sp升高,结果均具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,仙灵骨葆胶囊组,全杜仲胶囊组BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N均升高,BS/BV、Tb.Sp降低($P<0.05$)。(3)全杜仲胶囊组和仙灵骨葆胶囊组能显著提高狗股骨头中bcl-2蛋白的表达,与模型组比较有明显差异($P<0.05$)。全杜仲胶囊组和仙灵骨葆胶囊组能明显降低狗股骨头中bax蛋白的表达,与模型组比较有显著差异($P<0.05$)。全杜仲胶囊组和仙灵骨葆胶囊组能明显降低狗股骨头中caspase-3蛋白的表达,与模型组有显著差异($P<0.05$)。**结论**:全杜仲胶囊可通过升高血清中VEGF、bFGF表达含量,提高bcl-2的表达量,抑制bax的表达量,并且降低caspase-3的表达量,对治疗股骨头缺血性坏死起着协同的作用,存在潜在的作用靶点。

[关键词] 股骨头缺血性坏死;动物造模;比格犬;全杜仲胶囊;仙灵骨葆胶囊
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2023)13-0974-09

Regulation of Quan Du Zhong capsule on VEGF/bFGF and expression of Bcl-2/Bax and Caspase-3 protein in the repairing process of canine femoral head necrosis

SUN Rui-yan[1], YIN Peng-kai[1], WEI Wei[2], DENG Xiao-lei[3], HOU De-cai[3]✉
(1. *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110000, *China*; 2. *Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110000, *China*; 3. *Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110000, *China*)

[*Foundation Project*]:*Liaoning Provincial Science and Technology Plan Project* (2017225043)
[*Author*]:*SUN Rui-yan*, *E-mail*: 877178632@qq.com.
[*Correspondence to*]:*HOU De-cai*, *PhD Supervisor*, *Professor*, *Chief Physician*, *E-mail*: *lnzyhdc*@163.com.
Received: 2023-03-07 *Revised*: 2023-05-20 *JHMU*, 2023;29(13):988-996

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To explore the repair and treatment effect of Quan Du Zhong capsule on necrosis of femoral head in dogs. **Methods**: Totally 12 beagles were randomly divided into normal group, model group, Quan Du Zhong capsule group and

[基金项目] 辽宁省科学技术计划项目(2017225043)
[作者简介] 孙瑞妍,E-mail:877178632@qq.com。
[通讯作者] 侯德才,博士生导师,教授,主任医师,E-mail:lnzyhdc@163.com。
[收稿日期] 2023-03-07 [修回日期] 2023-05-20 网络出版时间:2023-05-25 11:14:34

Xianlinggubao capsule group, with three in each group. In addition to the normal group, the other groups established the femoral head necrosis model by liquid nitrogen alternative freezing. The normal group and the model group did not have any intervention during the modeling period, and the Quan Du Zhong group began to receive the Quan Du Zhong by gavage on the day of modeling; Xianlinggubao capsule group was given Xianlinggubao capsule by gavage once a day for 12 consecutive weeks on the day of modeling. The levels of VEGF and bFGF in the blood vessels of each group at the 12th week were compared, and the ratios of BMD, BS/BV, BV/TV, Tb. Th, Tb. N were measured by Micro CT, and the expressions of Bcl-2, Bax, Caspase-3 proteins were detected by immune reaction.**Results**: 1. Compared with the normal group, the level of serum VEGF and bFGF in the model group decreased after 12 weeks of modeling ($P<0.05$); Compared with the model group, the levels of serum VEGF and bFGF water in the Xianlinggubao capsule group and the Quan Du Zhong capsule group increased on average at the 12th week of modeling, with statistical difference ($P<0.05$). The level of the Quan Du Zhong capsule group was the highest, followed by the Xianlinggubao capsule group. 2. Compared with the normal group, BMD, BS/BV, BV/TV, Tb.Th and Tb.N in the model group were lower, and Tb.SP were higher, the results were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the model group, the BMD, BV/TV, Tb. Th and Tb. N of Xianlinggubao capsule group and the total eucommia capsule group increased, while the BS/BV and Tb. SP decreased ($P<0.05$). 3. The Quan Du Zhong capsule group and Xianlinggubao capsule group could significantly increase the expression of bcl-2 protein in the femoral head of dogs, which was significantly different from the model group ($P<0.05$). The expression of bax protein in the femoral head of dogs in the Quan Du Zhong capsule group and the Xianlinggubao capsule group was significantly reduced compared with the model group ($P<0.05$). The expression of caspase-3 protein in the femoral head of dogs was significantly reduced in the Quan Du Zhong capsule group and Xianlinggubao capsule group, which was significantly different from the model group ($P<0.05$).**Conclusion**: Quan Du Zhong capsule can increase the expression of VEGF and bFGF in serum, increase the expression of bcl-2, inhibit the expression of bax, and reduce the expression of caspase-3, which plays a synergistic role in the treatment of avascular necrosis of the femoral head, and has potential targets.

[**KEYWORDS**] Avascular necrosis of the femoral head; Animal experimentation; Dog; Quan Du zhong; Xianling gubao Capsule

股骨头坏死(ONFH)又称股骨头缺血性坏死,是一种慢性多因素疾病,致残率极高,预后较差,属中医学“骨痹”、“骨蚀”、“骨痿”等范畴。流行病学调查显示男性发病率高于女性,体重超标者或长期从事体力劳动的人发病率较高[1],好发于20~40岁中青年人[2]。长期劳损、外力创伤、长期大量使用激素、长期饮酒、长期暴露于辐射、超重等都是造成股骨头缺血性坏死的主要原因,如不及时处理,会造成关节功能障碍,从而降低患者的生存质量,降低病人的预期寿命。多年来,临床研究对ONFH的机制不断进行探索。祖国医学认为“邪气聚集,则气机不足”。这表明机体的多种病因都会导致机体的脏腑机能、血液、津液的失调,从而导致机体的抵抗力下降。坏死后股骨头下的软骨会受到损伤,造成血液循环不畅,经络不通[3]。现代医学理论按病因将此病并分为3类[4]:(1)因骨折引起的创伤性股骨头坏死;(2)先天发育不良导致;(3)长期过大量应用激素、贫血、过度饮酒等导致的非创伤性股骨头坏死。该病多见于患侧髋关节疼痛,腹股沟区疼痛最常见,多见于在股骨头的小动脉上,到了后期,由于过度劳累,疼痛加剧,甚至出现跛行的症状。当前,有大量的科学证据表明,中医药能延缓病情的发展过程,尤其是对早中期的患者疗效甚好。因此,本研究拟通过构建比格犬创伤性ONFH模型,研究全杜仲胶囊对ONFH的治疗作用,为临床上防治ONFH提供新的方案。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本实验共选用12只SPF级雄性比格犬,年龄16~24月,体重9.6~12.3 kg。实验动物许可证号SCXK(辽)2014-0003。所有实验动物均单独饲养于3.5 m^2的犬舍里,每日按时消毒、喂养,可自由活动。本实验方案已通过辽宁中医药大学附属医院动物实验伦理委员会审查(编号:21000092019051)。

1.2 实验药物

造模用药:盐酸替来他明盐酸唑拉西泮50(法国VirBac集团,批号:83887902);注射用灭菌用水(中国大冢制药有限公司,国药准字:H12020025);液氮:青霉素(华北制药股份有限公司,国药准字:H20033934);硫酸庆大霉素注射液(辰欣药业股份有限有限公司,国药准字:H37021973));注射用阿托品(天津金耀药业有限公司、国药准字H12020382);氯胺酮注射液(浙江九旭药物有限公司,国药准字H20023609);头孢曲松钠(上海罗氏制药有限公司,国药准字H10983037)。

实验用药:全杜仲胶囊由辽宁中医药大学附属医院药剂科提供,每粒装0.48 g(相当于原药材2.5

g)。仙灵骨葆胶囊由辽宁中医药大学附属医院药剂科提供,规格:0.5 g/粒。

1.3 实验试剂与仪器

1.3.1 实验试剂 苏木素伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术,批号:C0105);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:100092008);二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号:10023418);异丙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:40049962);过硫酸铵(北京索莱宝科技有限公司,批号:A8090);犬血管内皮生长因子A(VEGFA)ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:ml024667);犬碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:ml061095);高灵敏度化学发光检测试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,批号:CW0049);BCA蛋白测定试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,批号:CW0014);PMSF(北京索莱宝科技有限公司,批号:P0100);丽春红染色试剂(康为世纪生物科技有限公司,批号:CW0057S);RIPA蛋白裂解液(强)(康为世纪生物科技在限公司,批号:CW2333);2×SuperStain上样缓冲液(康为世纪生物科技有限公司,批号:CW2636);Rabbit antibody(北京博奥森生物技术有限公司);TRIzon Reagent(康为世纪生物科技有限公司,批号:CW0580);ANti-Bcl2L2(博奥森,批号:bs-5903R);ANti-Bax(博奥森,批号:hs-28034R);ANti-Caspase-3(博奥森,批号:bs-0081R)。

1.3.2 实验仪器 SHZ-88型水浴恒温振荡器(其林贝尔仪器制造有限公司);SpectraMaxi3型多功能全波长酶标仪(由美国MD公司制造)、ST16R型冷冻高速离心机(由Thermo公司制造);TAB-120FR型全自动生化分析仪(由日本东芝公司制造);Leica(品牌)BOND-MAX(型号)全自动免疫组化染色剂;ASP 6025型全自动脱水机(由Leica公司制造)、RM2235型手动石蜡切片机(由Leica公司制造)、EG1150H型包埋机(由Leica公司制造)、HI1220型烘片机(由Leica公司制造)、全自动生化分析仪(日本日立7180型)、M8数字扫描显微成像系统(Precipoint,德国);垂直板电泳装置(美国,Bio-Rad);Trans-Blot SD半干转印(Bio-Rad,美国),化学发光成像系统(上海天能科技有限公司/5200)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组及造模 利用随机数字表法,将12只比格犬分成4组,分别是正常组3只、模型组3只、全杜仲胶囊组3只和仙灵骨葆胶囊组3只。采用侧卧位,将髂后上棘与大粗隆连线的中点为圆弧做切点,按顺序切开皮肤、皮下组织以及筋膜,再将筋膜切开,使其在远端完全展露出来。顺着肌纤维的方向分开,使外旋肌群充分暴露,使股骨外侧旋转,切开外旋肌的一小段肌腱,在股骨节囊上套上无菌的漏斗套,用无菌纱布保护周围的软组织,每一次注入氮,直到液氮完全挥发,然后用生理盐水复温。

1.4.2 手术方法及给药 手术区域常规酒精消毒,以一侧大转子为中心铺无菌洞巾,于股骨干前缘作弧形切口;切开皮肤,暴露股三角区,将与关节囊连在一起的脂肪分离,将关节囊露出来,沿股骨颈向下暴露股骨大转子,定好位并进针。使用骨科磨钻将克氏针从股骨大粗隆下两厘米左右位置进针,沿股骨颈方向钻至股骨头内进行病灶清除术。术后冲洗,分层缝合,用无菌敷料覆盖手术区域,绷带重新固定,送回,并每日一次肌注头孢美唑钠预防局部感染。正常组和模型组造模期间不予任何干预。按《中药药理学研究方法学(第3版)》中人体和动物表面积折算等效剂量比值表转换。予以全杜仲胶囊组一日1次,1次2粒全杜仲胶囊;仙灵骨葆胶囊组一日1次,1次2粒仙灵骨葆胶囊,连续用药12周。开始造模的第一天即开始进行灌胃。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 犬股骨头组织HE染色 用4%多聚甲醛固定犬股骨头标本24 h以上,按照苏木素-伊红(HE)染色常规方法进行。75%、85%、95%、100%梯度进行酒精脱水、二甲苯透明、石蜡浸泡包埋,组织块切片、二甲苯脱蜡、100%、95%、85%、75%梯度酒精复水、苏木精染色、70%盐酸酒精分化,伊红复染、中性树胶封片后,在光学显微镜下进行组织形态观察。

1.5.2 血清血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维生长因子(BFGF)检测 各组造模12周后,比格犬耳缘静脉取血,采用ELISA法,按标准操作。

1.5.3 Micro CT检测 应用Micro CT,对股骨头扫描拍片,并用自带软件计算出骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、单位体积骨组织的面积大小(BS/BV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁空隙(Tb.Sp)。

1.5.4 免疫组化法检测bcl-2、bax、caspase-3的表达量 取犬股骨头病理的蜡块切片,(先4%多聚甲醛/0.1 mol PBS (pH7.0~7.6)固定60 min, PBS冲洗2 min,冲洗两次,在5 ℃下进行组织脱水,用石蜡将样品包埋并切片,厚度8 μm,用玻片完成裱片,在75 ℃的烤片箱中烤1 h。将所要制备的一抗试剂容

器放入试剂架中，再将二抗组合试剂架和一抗组合试剂架放在操作台上。

使用Image J软件对各组的平均光密度(average optical density，AOD)值分析，使用公式AOD=IOD/Area进行蛋白的定量比较分析，用平均光密度值(AOD)来表示各组中不同蛋白表达的相对含量。

1.6 统计方法

用SPSS 22.0软件进行统计分析。数据以($\bar{x}\pm s$)表示，组间采用单因素方差分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组造模第12周股骨头组织病理学观察

HE染色结果显示，正常组(A)犬股骨头钙化组织严密，骨小梁排列整齐。模型组(B)犬股骨头钙化组织比例低，骨小梁松散排列无规则。全杜仲组(C)、仙灵骨葆胶囊组(D)犬骨小梁组织多且排列紧密。并且全杜仲组比仙灵骨葆组的犬股骨头骨小梁更加排列紧密。见图1。

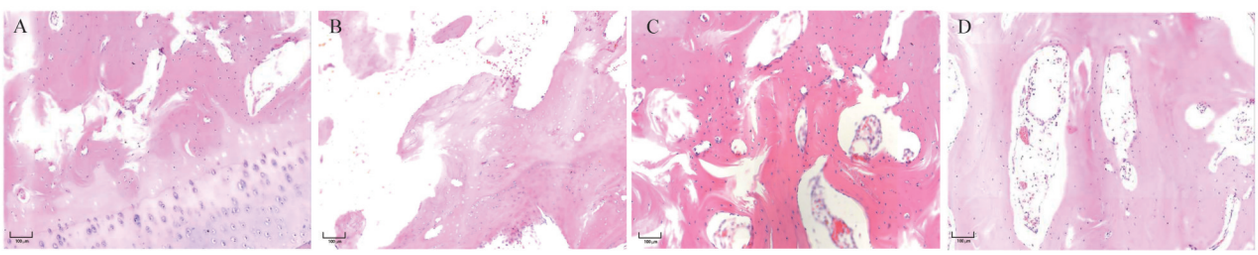


图1 各组犬股骨头组织HE染色结果(×100)

Fig 1 HE staining results of femoral head tissue in dogs of each group(×100)

2.2 各组造模第12周VEGF水平

全杜仲胶囊能明显上调狗股骨头的血管内皮生长因子；与正常组比较，模型组造模第12周后血清VEGF水平降低($P<0.05$)；正常组较模型组表达较高，但无明显优势；与模型组比较，仙灵骨葆胶囊组、全杜仲胶囊组造模第12周血清VEGF水平均升高($P<0.05$)，且2个治疗组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)，全杜仲胶囊组水平最高，其次是仙灵骨葆胶囊组。见表1。

表1 各组VEGF-A表达量(pg/mL，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Expression level of VEGF-A in each group(pg/mL，$\bar{x}\pm s$)

组别	VEGF-A(pg/mL)
正常组	477.50±33.06
模型组	359.80±31.16**
全杜仲胶囊组	525.40±35.82$^{\triangle\triangle}$
仙灵骨葆胶囊组	509.80±64.35$^{\triangle\triangle}$

注：与正常组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

2.3 各组造模第12周碱性BFGF水平

全杜仲胶囊能明显上调狗股骨头的BFGF；与正常组比较，模型组造模第12周后血清BFGF水平降低($P<0.05$)；正常组较模型组表达较高，但无明显优势；与模型组比较，仙灵骨葆胶囊组、全杜仲胶囊组造模第12周血清BFGF水平均升高($P<0.05$)，且2个治疗组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)，全杜仲胶囊组水平最高，其次是仙灵骨葆胶囊组。见表2。

表2 各组BFGF-A表达量(pg/mL，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Expression levels of BFGF-A in each group(pg/mL，$\bar{x}\pm s$)

组别	BFGF(pg/mL)
正常组	73.17±6.01
模型组	51.58±3.34**
全杜仲胶囊组	96.67±5.40$^{\triangle}$
仙灵骨葆胶囊组	92.92±5.52$^{\triangle\triangle}$

注：与正常组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

2.4 各组造模第12周股骨头Micro CT扫描情况比较参数指标

由表3可得出，与正常组比较，模型组BMD、BS/BV、BV/TV、Tb.Th、Tb.N均将低，Tb.Sp升高，比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较，仙灵骨葆胶囊组，全杜仲胶囊组BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th升高，Tb.Sp、BS/BV降低，比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表3　各组造模第12周股骨头Micro CT扫描情况比较参数指标($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Comparative parameter indicators of Micro CT scanning of femoral head in each group at week 12 of modeling($\bar{x}\pm s$)

参数指标	正常组	仙灵骨葆胶囊组	全杜仲胶囊组	模型组
BMD(mg/cm^{-3})	1042.360±47.280	958.357±83.280	943.000±57.670	819.370±49.230
BS/BV(1/mm)	18.670±2.590	11.630±1.870	11.320±2.410	13.680±1.830
BV/TV(%)	75.320±5.680	68.290±5.810	67.390±5.950	48.927±4.490
Tb.Th(mm)	0.480±0.040	0.370±0.050	0.340±0.040	0.260±0.030
Tb.Sp(mm)	0.120±0.030	0.160±0.030	0.190±0.040	0.298±0.060
Tb.N(1/mm)	1.710±0.060	1.670±0.080	1.490±0.170	1.240±0.200

2.5　各组造模第12周bcl-2蛋白相对表达量比较

全杜仲胶囊组和仙灵骨葆胶囊组能显著提高狗股骨头中bcl-2蛋白的表达，与模型组比较有差异，具有统计学意义($P<0.05$)。见图2、表4。

表4　Bcl-2表达量($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Bcl-2 expression level($\bar{x}\pm s$)

组别	BCL-2(pg/mL)
正常组	1.426±0.138
模型组	0.562±0.0649**
全杜仲胶囊组	0.804±0.0952$^{\triangle}$
仙灵骨葆胶囊组	0.827±0.130$^{\triangle\triangle}$

注：与正常组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

表5　Bax表达量($\bar{x}\pm s$)

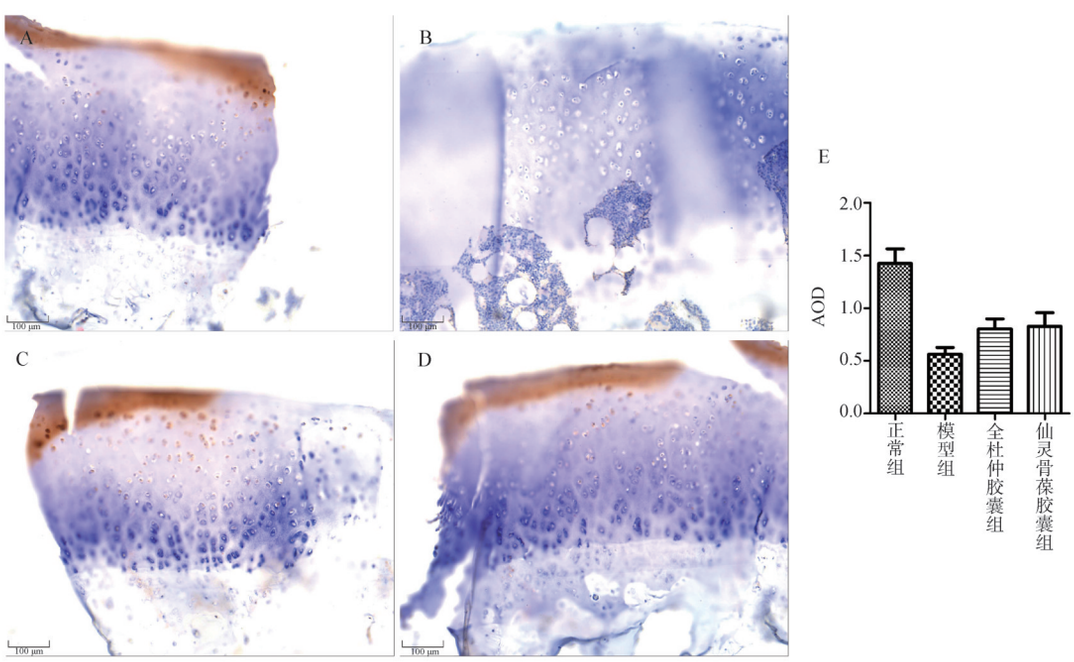
Tab 5　Bax expression level($\bar{x}\pm s$)

组别	bax(pg/mL)
正常组	0.737±0.143
模型组	1.767±0.188**
全杜仲胶囊组	1.127±0.121$^{\triangle}$
仙灵骨葆胶囊组	1.051±0.119$^{\triangle\triangle}$

注：与正常组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

2.6　各组造模第12周bax蛋白相对表达量比较

全杜仲胶囊组和仙灵骨葆胶囊组能明显降低狗股骨头中bax蛋白的表达，与模型组比较有差异，具有统计学意义($P<0.05$)。见图3、表5。



A：正常组；B：模型组；C：全杜仲组；D：仙灵骨葆组；E：BCL-2在各组中平均光密度值(AOD)的表达，模型组与正常组相比，$P<0.05$，治疗两组与模型组相比，$P<0.01$

图2　Bcl-2免疫组化图以及Bcl-2在各组中平均光密度的表达

Fig 2　Immunohistochemical map of Bcl-2 and expression of average optical density of Bcl-2 in each group

表6 caspase-3表达量

Tab 6 Caspase-3 expression level

组别	caspase-3(pg/mL)
正常组	0.9241±0.05142
模型组	1.7770±0.1630**
全杜仲胶囊组	1.0740±0.0915△
仙灵骨葆胶囊组	1.0370±0.1517△△

注:与正常组相比,**$P<0.01$;与模型组相比,△$P<0.05$,△△$P<0.01$。

2.7 各组造模第12周caspase-3相对表达量比较

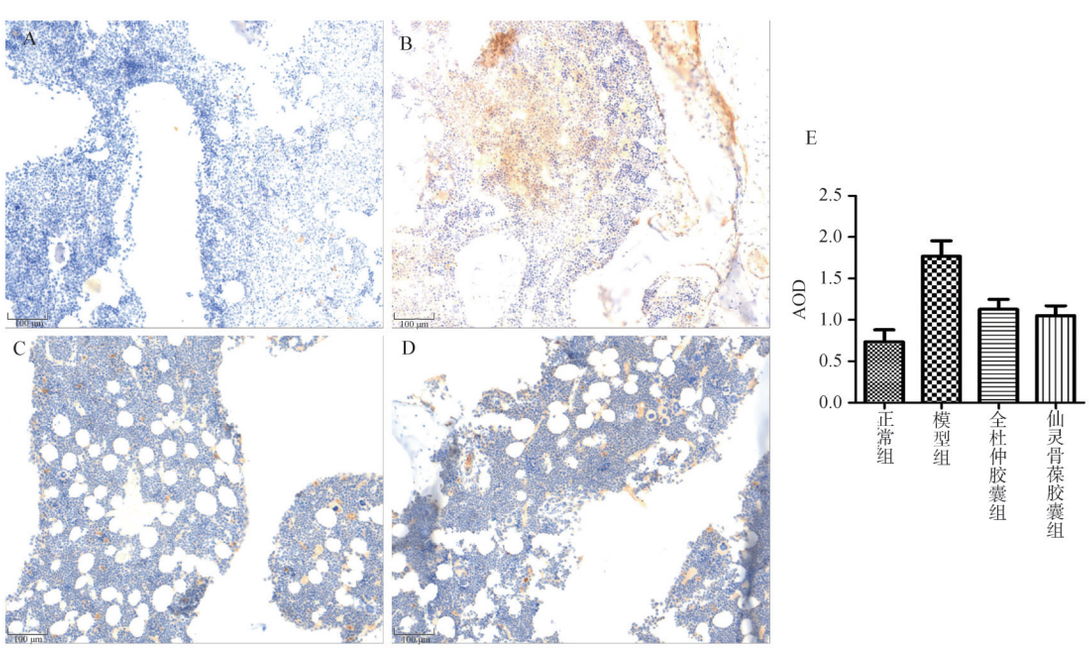
全杜仲胶囊组和仙灵骨葆胶囊组能明显降低狗股骨头中caspase-3蛋白的表达,与模型组比较有差异,具有统计学意义($P<0.05$)。见图4、表6。

3 讨论

目前,在髋关节疾病中,ONFH是最常见的一种。多种原因可造成股骨头缺血,进而发生坏死、塌陷等病变,如果不及时治疗,后期会发展成骨关节炎。此病发病率高,已日益成为全球健康问题,目前尚无理想疗法。当疾病发展到晚期时,通常要进行髋关节置换术,虽手术效果显著,但植入体的寿命是有限的,可能要进行翻修而且手术费用也很高[5],所以这类患者在疾病晚期往往会对手术治疗望而却步。另一方面,也有部分患者因为自身基础疾病的原因,无法进行手术。再加上手术带来的继发性创伤是不可避免的。故目前,对于治疗青少年ONFH,髋关节置换手术并不是一个良好的治疗方案。临床需找到更好的预防和治疗方法,逆转早期的ONFH。

仙灵骨葆胶囊常被用于骨伤科疾病,含有淫羊藿、丹参、续断、补骨脂、地黄以及知母等成分,具有补益肝肾、强筋壮骨、活血通络的作用。赵丁岩等[6]通过实验结果推测出淫羊藿苷可以干预股骨头坏死的进展。贾丙申等[7]通过对大鼠实验,发现淫羊藿苷对股骨头坏死有明显的改善作用,可以修复坏死的组织。并有研究证明仙灵骨葆胶囊可以改善髋关节的血液循环及其功能,降低患者疼痛感,改善骨代谢的水平。所以本实验将仙灵骨葆胶囊作为阳性药物对照,来探讨全杜仲胶囊对ONFH的治疗作用[8,9]。

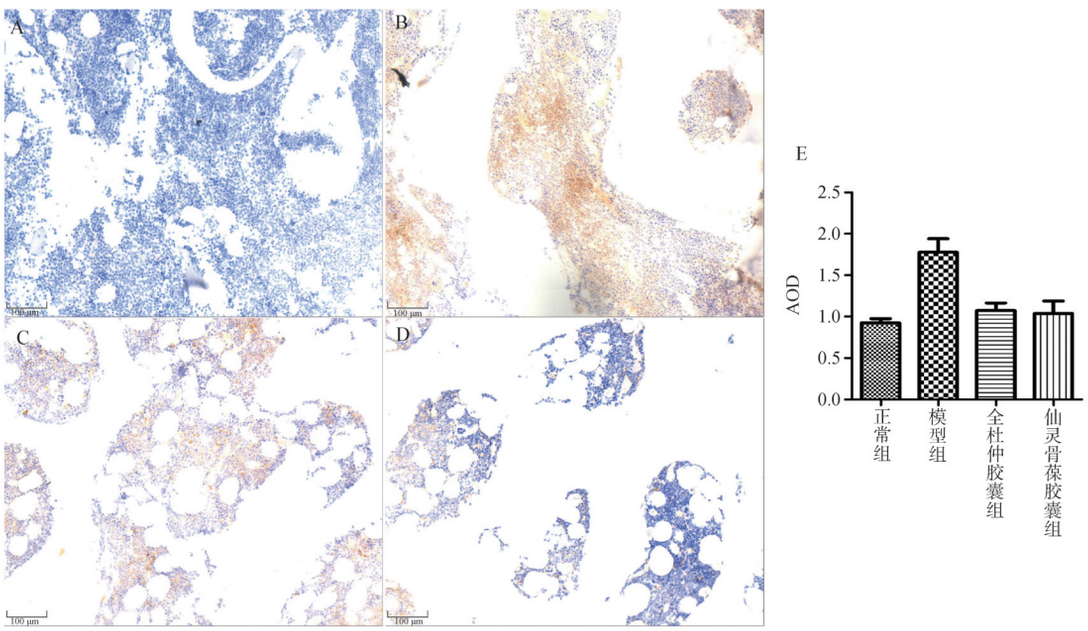
《神农本草经》将杜仲称为药中上品。临床上杜仲价值高,被广泛应用。杜仲胶因其高抗拉的特点,能形成一种极佳的"骨骼粘合剂"。《神农本草经》曾记载杜仲性温,有强筋壮骨、补益肝肾、补益腰膝、祛除酸痛等作用[10],其化学组成主要有木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类、黄酮类、多糖类、杜仲胶和抗真菌蛋白等[11],能有效地治疗骨折、骨质疏



A:正常组;B:模型组;C:全杜仲组;D:仙灵骨葆组;E:BAX在各组中平均光密度值(AOD)的表达,模型组与正常组相比,$P<0.05$,治疗两组与模型组相比,$P<0.01$

图3 Bax免疫组化图以及Bax在各组中平均光密度的表达

Fig 3 Immunohistochemical map of Bax and expression of average optical density of Bax in each group



A：正常组；B：模型组；C：全杜仲组；D：仙灵骨葆组；E：caspase-3在各组中平均光密度值（AOD）的表达，模型组与正常组相比，$P<0.05$，治疗两组与模型组相比，$P<0.01$

图4　caspase-3免疫组化图以及caspase-3在各组中平均光密度的表达

Fig 4　Immunohistochemical map of caspase-3 and expression average optical density of caspase-3 in each group

松等骨疾病。刘东通过观察数例膝骨关节炎患者，全杜仲胶囊能有效地改善膝关节功能，缓解疼痛[12]。张文博等[13]通过对M2巨噬细胞上清液和杜仲总黄酮结合的研究，认为其可作为组织材料工程的辅助工具。

ONFH动物模型的建立是实验成功的基础，目前已有很多实验动物和造模方式，犬的生理特征、组织和解剖结构与人类相似，可比性高，且液氮冷冻法备的犬股骨头坏死模型被广泛采用，利用液氮低温能引起股骨头周围的血管痉挛，破坏内皮细胞，进而导致ONFH[14]。故此次实验选用12只比格犬为模型动物，通过液氮灌注建立ONFH模型并给予全杜仲胶囊进行干预。通过HE染色，结果显示：造模第12周HE染色显示，正常组犬股骨头钙化组织严密，骨小梁排列整齐。模型组犬股骨头钙化组织比例低，骨小梁松散排列无规则[15]。以上结果均提示成功建立ONFH模型。

细胞凋亡是细胞的主动性死亡，为了维持机体平衡。成骨细胞在骨组织的形成、代谢及矿化中起着关键作用。当骨骼被损伤时，成骨细胞会迅速生成新的骨组织，来对骨损伤进行修复。如果成骨细胞坏死，这个过程受阻，就会导致ONFH，进而导致其功能受到影响。成骨细胞和破骨细胞之间存在着一种复杂的凋亡平衡，若失衡会影响一系列的反应，所以维持二者的动态平衡极其重要。因此，控制成骨细胞死亡是抑制股骨头坏死的关键一步。细胞凋亡是受多种基因调控，目前，bcl-2和bax是一对调控凋亡的基因，bcl-2可以抑制凋亡，而bax则可以抑制bcl-2发挥作用。bcl-2与bax结合，从而形成同源二聚物[16]。大部分研究发现这两种蛋白之间的比例在一定程度上是决定细胞凋亡的重要因素。在细胞凋亡信号的刺激下，bax活化，在线粒体上形成一种二聚体，提高了线粒体的膜通透性，从而导致了细胞的凋亡。caspase-3在细胞凋亡过程中同样起着关键作用。研究证明降低caspase-3的激活，就可以有效地抑制细胞凋亡的进行。通过检测全杜仲胶囊对bcl-2、bax、caspase-3表达的影响，发现全杜仲胶囊能升高bcl-2，降低bax，降低caspase-3从而抑制了凋亡过程。从实验结果可以推测全杜仲胶囊可抑制破骨细胞的活性，增强骨细胞存活，从而促进骨的增生。

ONFH是因为血液供应减少，从而缺氧导致坏死。要延缓ONFH的进程，可以通过释放VEGF，导致血管生成和成骨来实现[17]。VEGF最早名为

血管通透因子,在1983年由Senger等[18]从肿瘤细胞中分离出来的。VEGF具有促进血管内皮生成、提高通透性和增殖的作用,是最强的促血管形成因子。骨与血管的关系十分密切,且血管发育早于骨[19]。杨操等[20]的实验结果表明,基因转染可促进骨组织中的血管再生,从而使骨骼的再生得到进一步的改善。同时,VEGF具有促进血管通透性的作用,可作为一种促进骨折修复的新方法[21]。毕锴等[22]通过对家兔实验,证明在骨折治疗过程中,不同组织表达都有促进VEGF、bFGF的表达作用,分期治疗骨折。进一步的临床应用将为骨折的治疗提供一种可行的、无创的治疗方法。并且研究表明,VEGF可以明显提高骨内微循环的面积和数量,从而提高骨内血液供应,为骨代谢提供必需的营养[23]。bFGF同样在骨细胞增殖、局部血液重建方面起着重要的作用。这些生长因子都可以促进新生的血管再生,促进修复坏死部位。仙灵骨葆胶囊的药理学研究结果显示,仙灵骨葆胶囊能促进骨生成[24],加快骨痂矿物化的重塑速度,对VEGF水平进行上调来修复股骨头微血管,从而保护骨细胞来抑制ONFH发生的情况。通过ELISA法检测犬股骨头内VEGF含量,明显看出VEGF、bFGF在模型组坏死的狗股骨头中低于全杜仲组和仙灵骨葆组。全杜仲胶囊与仙灵骨葆胶囊具有类似的作用,可以有效抗骨坏死,改善股骨头局部血运情况来治疗ONFH。

综上所述,全杜仲胶囊可以通过升高血清中VEGF、bFGF表达含量,提高bcl-2蛋白,抑制bax蛋白,并且降低caspase-3蛋白,减少细胞凋亡的发生,稳定机体内环境,从而延缓股ONFH的进展。后续实验将在此基础上,进一步结合临床治疗效果,为更有效地预防和治疗ONFH提供新的思路。

作者贡献度说明:

孙瑞妍、尹鹏开:实验操作、数据收集及撰写文章;邓小磊、魏巍:实验设计、造模指导;侯德才:提出实验方案,文章修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 韩杰,谢小中,金万清,等.股骨头缺血性坏死保守治疗研究进展_韩杰[J].辽宁中医药大学学报,2022,24(10):15-18.

2 马剑雄,何伟伟,赵杰,等.股骨头坏死发病机制研究的最新进展[J].中国组织工程研究,2017,21(27):4397-4402.

3 闫宇龙,侯德才,邓小磊,等.中医药治疗股骨头缺血性坏死的研究进展[J].海南医学院学报,2019,25(22):1756-1760.

4 Toshikazu K, Keiichiro U, Masazumi S, et al. Clinical and basic research on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in Japan[J]. J Orthop Sci, 2016, 21(4):407-413.

5 徐鑫,时利军,高福强.股骨头坏死临床诊疗技术专家共识(2022年)_徐鑫[J].中国修复重建外科杂志:1-8.

6 赵丁岩,郭万首,俞庆声,等.淫羊藿苷对激素诱导损伤人股骨头微血管内皮细胞蛋白质表达谱的影响[J].中国组织工程研究,2016,20(15):2140-2147.

7 贾丙申,于鹏,焦拓,等.淫羊藿苷联合GM6001治疗酒精性股骨头坏死大鼠的作用机制及对OPG/RANK/RANKL通路的影响[J].现代药物与临床,2022,37(8):1681-1688.

8 王峰,宋景光,苑宏飞.髓芯减压术联合复方仙灵骨葆胶囊在股骨头坏死患者治疗中的效果观察[J].当代医学,2022,28(8):24-27.

9 宰苗苗.髓芯减压术后应用热敷散外敷联合仙灵骨葆胶囊治疗股骨头坏死的疗效观察[J].实用中西医结合临床,2021,21(22):71-72.

10 程江雪,程虎印,郭东艳,等.关于2020年版《中华人民共和国药典》(一部)部分植物药材来源或性状描述的商榷[J].中国中医药信息杂志,2021,28(7):5-10.

11 王娟娟,秦雪梅,高晓霞,等.杜仲化学成分、药理活性和质量控制现状研究进展[J].中草药,2017,48(15):3228-3237.

12 刘东.全杜仲胶囊联合针灸治疗膝骨关节炎的临床观察_刘东[J].中国合理用药探索,2018,15(12):5-8,13.

13 张文博,张贤.缺氧培养下M2型巨噬细胞上清液及杜仲总黄酮对成骨细胞生物行为学的影响[J].中国组织工程研究,2017,21(12):1819-1825.

14 楼鹏强,魏巍,侯德才.股骨头坏死动物模型评价方法的优缺点及展望[J].中国组织工程研究,2021,25(32):5210-5214.

15 吴智恒,吴睿哲,荣尚,等.基于BMP/Smads/Runx2信号通路探讨桃红四物汤对创伤性股骨头坏死模型大鼠成骨化表达和病理形态学的影响[J].中医药导报,2022,28(9):7-13.

16 Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer[J]. Open Biology, 2018, 8(5):180002.

17 Hong GJ, Lin NA, Chen LL, et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and the risk of osteonecrosis of the femoral head: Sys-

tematic review[J]. Biomed Rep, 2016, 4(1):92-96.
18 Zha Y, Li YW, Lin TY, et al. Progenitor cell-derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects [J]. Theranostics, 2021, 11 (1): 397-409.
19 秦宇星,任前贵,李子龙,等.骨微血管内皮细胞在股骨头坏死中的作用机制及前景_秦宇星(1)[J].中国组织工程研究, 2023, 27(6): 955-961.
20 杨操,杨述华,杜靖远,等.血管内皮生长因子基因转染促进股骨头坏死修复[J].临床骨科杂志, 2004, (1): 90-93.
21 钱洲曜,王勇平.血管内皮生长因子有望成为加速骨折愈合的全新治疗手段[J].中国组织工程研究, 2020, 24(17): 2759-2769.
22 毕锴,温建民,孙永生,等.中医骨折三期治疗对家兔骨折愈合中VEGF与BMP-2表达影响的实验研究[J].中国中医基础医学杂志, 2012, 18(12): 1344-1347.
23 谢兴文,李建国,黄晋,等.血管内皮生长因子防治骨质疏松的研究进展[J].中国骨质疏松杂志, 2019, 25(7): 1030-1033.
24 陈刚,李峰,高泉阳,等.仙灵骨葆胶囊治疗股骨头坏死...eta分析和GRADE评价_陈刚[J].药物评价研究, 2023, 46(1): 169-179.

[本文编辑] 宋睿璞 谭贝加 朱 昊

(上转第987页)

19 Feng Y, Li B, Li SJ, et al. Skp2/p27 axis regulates chondrocyte proliferation under high glucose induced endoplasmic reticulum stress[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(17): 9129-9138.
20 Shin HJ, Kim H, Oh S, et al. AMPK-Skp2-CARM1 signalling cascade in transcriptional regulation of autophagy[J]. Nature, 2016, 534(7608): 553-557.
21 Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(2): 132-141.
22 Rockel JS, Kapoor M. Autophagy: Controlling cell fate in rheumatic diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(9): 517-531.

[本文编辑] 宋睿璞 谭贝加 朱 昊