

固精收涩为使药。纵观全方,标本兼治,扶正祛邪兼顾,清补兼施,用药精当,益气健脾、滋阴补肾,清热利湿、活血祛湿,正合慢性肾小球肾炎蛋白尿脾肾两虚、湿热内蕴,兼夹瘀血的病因病机,故临床治疗肾小球肾炎蛋白尿取得了较好的疗效。

参考文献:

- [1] 王立范,曲占利,金春花,等. 肾炎消白颗粒对阿霉素肾病大鼠尿蛋白排泄量的影响[J]. 中医药信息 2011 28(2): 71-73.
- [2] 于梅,迟继铭,张岩岩,等. 肾炎消白颗粒对早期糖尿病肾病患者尿白蛋白及血清 TGF- β 1 的影响[J]. 中医药信息 2012 29(1): 43-44.
- [3] 李霞,于梅,裴裕,等. 肾炎消白颗粒对早期糖尿病肾病大鼠 CTGF 的表达影响[J]. 中医药信息 2013 30(3): 53-54.
- [4] Lehtonen S, Zhao F, Lehtonen E. CD2-associated protein directly in-

teracts with the actin cytoskeleton[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002 283: F734-F743.

- [5] Smeets B, Dijkman HB, Te Loeke NA, et al. Podocyte changes upon induction of albuminuria in Thy-1.1 transgenic mice[J]. Nephrol Dial Transplant 2003 18(12): 2524-2533.
- [6] Cortes P, Mendez M, Riser BL, et al. F-actin fiber distribution in glomerular cells: structural and functional implications[J]. Kidney Int, 2000 58(6): 2452-2461.
- [7] Michaud JL, Lemieux LI, Dube M, et al. Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4[J]. J Am Soc Nephrol 2003 14(5): 1200-1211.
- [8] Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis[J]. Nat Genet 2000 24(3): 251-256.

IGF-1、FGF-b 在中药活骨注射液对兔缺血性股骨头坏死表达变化实验研究

张文进¹, 张晓峰², 李超¹, 徐西林^{2*}, 吕航², 段洪超², 王春龙²

(1. 黑龙江中医药大学 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:目的: 观察中药活骨注射液对缺血性股骨头坏死 IGF-1、FGF-b 的表达。方法: 将新西兰大白兔 90 只随机分为空白组(30 只)、造模组(60 只)。造模组造模成功后,再随机分为模型组、实验组各 30 只。空白组不给予任何药物治疗;模型组、实验组每 3 天髋关节腔灌注一次。造模组术后 2 周开始给药。各组按 1 周、3 周、6 周、9 周、12 周时间点分批处死,每批每组处死 6 只,进行检测。采用 Real-time PCR、免疫组化观察在股骨头缺血性坏死修复过程中 IGF-1、FGF-b 的表达变化。结果: Real-time PCR 法检测不同时间点 IGF-1、FGF-b 表达,IGF-1、FGF-b 的表达随着时间推移各组表达量逐渐升高。免疫组化法检测不同时间点 IGF-1、FGF-b 表达,IGF-1、FGF-b 的表达随着时间推移各组表达量逐渐升高。RT-PCR、免疫组化法都可以作为观察缺血性股骨头坏死变化过程的检测方法,并且具有重要价值,虽然检测方向不同,但其两者的优缺点互补。差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 活骨注射液对 IGF-1、FGF-b 有着血管再生作用,对于治疗缺血性股骨头坏死早期治疗有显著地效果。

关键词: 促生长因子; 成纤维生长因子; 缺血性股骨头坏死; 关节腔灌注; 活骨素注射液

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2392(2015)05-0047-04

缺血性股骨头坏死是骨科至今尚未攻克的疑难疾病之一。近几十年来由于交通伤的高发、激素的广泛应用、酗酒等原因,股骨头坏死的患病率呈明显的上升趋势,疾患发病年龄也随之年轻化。如若治疗不及时,致残率非常高,所以探寻缺血性股骨头坏死早期治疗

及早期诊断至关重要。在总结以往工作经验的基础上^[1],我们对兔股骨头坏死进行中药活骨注射液关节腔灌注,观察 IGF-1、FGF-b 的动态表达,在总结报告如下。

收稿日期: 2015-06-17 修回日期: 2015-07-30

基金项目: 国家自然科学基金(81173276); 哈尔滨市科技创新人才项目(2011RFXYS070)

作者简介: 张文进(1975-),男,博士研究生,副主任医师,研究方向: 中西医结合治疗骨坏死、骨与关节病及脊柱疾病。

* 通讯作者: 徐西林(1975-),男,副主任医师,主要从事中西医结合治疗骨病临床工作。

1 材料与方法

1.1 实验动物

由哈尔滨医科大学动物实验中心提供的健康 6 月龄新西兰大白兔 90 只(许可证: scxk2006-010), 体重(2100±100)g, 雌雄各半, 所有动物单笼喂养, 通风, 自由饮水进食, 普通草料喂养。

1.2 主要仪器及药品试剂

活骨注射液(内含生药: 丹参 3g, 川芎 2g 等) 委托哈尔滨医科大学附属第二医院制剂室制备。仪器: Roche 480II Real-time PCR 仪, 东胜龙梯度 PCR 仪, 三洋超低温冰箱, 国产振荡混匀器, 离心机。试剂: RNA 提取试剂盒为北京天恩泽柱式软骨 RNAOUT(正式实验用) 和 qiagen 的组织提取试剂盒(预实验用), 反转录试剂盒购自 TAKARA(大连宝生物, 货号: RR037A), Real-time PCR 试剂盒购自 TAKARA(大连宝生物, 货号: RR820A), 引物由 TAKARA 设计合成, DEPC, 氯仿等为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组

90 只新西兰大白兔适应性喂养 2 周后, 精确称重, 随机分为 2 组, 即: 空白组(30 只)、造模组(60 只)。造模组造模成功后, 再用抽签法随机分为 2 组: 模型组(生理盐水组)、实验组(活骨注射液组), 每组 30 只实验用兔。

1.3.2 动物模型的建立及处理措施

1.3.2.1 造模方法

按照沈霖、林燕萍、王拥军液氮冷冻法诱导兔的股骨头坏死, 用 30 mg/kg 戊巴比妥或 50 mg/kg 腹腔内麻醉后, 取髋关节前外斜形切口, 长约 4 cm, 随后依次切开皮肤、皮下组织、深筋膜, 暴露大转子前内侧分离直达髋关节囊, T 形切开髋关节囊, 使股骨头暴露, 用与股骨头大小相当的纱布团浸透液氮, 冷冻股骨头上端, 持续 10s, 用温盐水纱布将股骨头上端复温后复位, 缝合切口各层。术后每天青霉素肌注 20 万 U, 每天 2 次, 预防感染。

1.3.2.2 治疗方案

根据标准体重动物的公斤体重剂量换算公式, 换算人-兔的生药量^[2]。造模术后 2 周后开始分组治疗, 空白组正常饲养, 不给予任何药物治疗。模型组给予 9% 生理盐水 0.70mL/次, 每 3 日 1 次髋关节腔灌注。实验组给予活骨注射液每 3 日 1 次髋关节腔灌

注, 剂量 0.70mL/次。各组按 1 周、3 周、6 周、9 周、12 周时间点分批处死动物, 每批每组处死 6 只, 进行检测。

1.3.2.3 实验方案

各组按 1 周、3 周、6 周、9 周、12 周时间点分批处死动物, 每批每组处死 6 只, 取出的股骨头劈成两半, 一半放入戊二醛固定液中保存, 进行免疫组化检测, 一半放入液态氮中保存, 进行 RT-PCR 检测。

免疫组化过程: 术后取兔骨(股骨头)组织(每组每个时相点各 6 只), 置福尔马林溶液中固定后, 石蜡包埋、切片。流水冲洗 30min, 去除多余固定液; 脱水: 入 70%、80%、90%、100% (一) 和 100% (二) 中酒精各 1h; 透明: 入二甲苯(一)中 15min, 二甲苯(二)中 10min; 浸蜡: 将透明后的组织放入恒温箱中已溶化的石蜡(一)、石蜡(二)和石蜡(三)中, 每个 1h; 包埋: 将浸过的组织按顺序包埋成块, 以备切片。

PCR 过程分为三步: 第一, 取标本(骨组织), DNA 变性(90℃~96℃): 双链 DNA 模板在热作用下, 氢键断裂, 形成单链 DNA; 第二, 退火(60℃~65℃): 系统温度降低, 引物与 DNA 模板结合, 形成局部双链; 第三, 延伸(70℃~75℃): 在 Taq 酶(在 72℃左右, 活性最佳)的作用下, 以 d-NTP(脱氧核糖核苷三磷酸)为原料, 以 5'-3' 端的方向延伸, 合成与模板互补的 DNA 链。

引物序列: IGF-1(5'-3') CTGTCCTCCTCG-CATCTCTTCT; IGF-1(3'-5') GAAATAAAAGCCCCGTGCTCCAC。FGF-b(5'-3') GAGCGACCCACACATCAAATTAC; FGF-b(3'-5') CCAGCAGTCTTC-CATCTTCCTT。β-actin(5'-3') TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA; β-actin(3'-5') CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG。

1.4 统计学处理

对实验数据进行统计学处理采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析, 计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 具有极显著统计学意义。

2 结果

Real-time PCR、免疫组化法检测不同时间点 IGF-1、FGF-b 表达, 模型组与空白组在构建模型的第 1、3、6、9、12 周时, 模型组与空白组股骨头中 IGF-1、FGF-b 的表达量很明显低于实验组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1~4。

表 1 各组兔不同时间点股骨头组织中 FGF-b mRNA 表达结果比较(n = 30 ,每组每个时间点各 6 只 $\bar{x} \pm s$)

	1 周	3 周	6 周	9 周	12 周
空白组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型组	1.097 ± 0.197	0.837 ± 0.213	0.885 ± 0.217	0.768 ± 0.163	0.672 ± 0.192
实验组	1.202 ± 0.182	1.394 ± 0.174 [▲]	1.976 ± 0.181 ^{##▲▲}	2.062 ± 0.159 ^{##▲▲}	3.208 ± 0.199 ^{##▲▲}

注:与空白组比较,[#]P < 0.05,^{##}P < 0.01;与相同时间点的盐水处理组比较,[▲]P < 0.05,^{▲▲}P < 0.01

表 2 各组兔不同时间点股骨头组织中 IGF-1 mRNA 表达结果比较(n = 30 ,每组每个时间点各 6 只 $\bar{x} \pm s$)

	1 周	3 周	6 周	9 周	12 周
空白组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型组	1.009 ± 0.200	1.248 ± 0.168 ^{##}	1.180 ± 0.182	0.995 ± 0.176	0.797 ± 0.213
实验组	1.085 ± 0.176	1.274 ± 0.193 ^{##▲}	1.829 ± 0.218 ^{##▲}	1.895 ± 0.183 ^{##▲▲}	2.032 ± 0.154 ^{##▲▲}

注:与空白组比较,[#]P < 0.05,^{##}P < 0.01;与相同时间点的盐水处理组比较,[▲]P < 0.05,^{▲▲}P < 0.01

表 3 各组兔不同时间点股骨头组织中 FGF-b 蛋白表达结果比较(n = 30 ,每组每个时间点各 6 只 $\bar{x} \pm s$)

	1 周	3 周	6 周	9 周	12 周
空白组	655.39 ± 68.63	654.59 ± 69.96	659.51 ± 70.16	650.19 ± 19.21	657.55 ± 66.73
模型组	727.92 ± 64.21	598.94 ± 87.89	554.79 ± 117.57	556.73 ± 95.16	512.62 ± 90.69
实验组	786.78 ± 110.57	841.18 ± 100.96 ^{##▲▲}	1119.29 ± 197.25 ^{##▲▲}	1449.18 ± 216.95 ^{##▲▲}	2140.08 ± 237.64 ^{##▲▲}

注:与空白组比较,[#]P < 0.05,^{##}P < 0.01;与相同时间点的盐水处理组比较,[▲]P < 0.05,^{▲▲}P < 0.01

表 4 各组兔不同时间点股骨头组织中 IGF-1 蛋白表达结果比较(n = 30 ,每组每个时间点各 6 只 $\bar{x} \pm s$)

	1 周	3 周	6 周	9 周	12 周
空白组	802.02 ± 141.73	804.12 ± 120.36	808.52 ± 101.56	806.08 ± 196.36	807.02 ± 132.41
模型组	809.49 ± 71.79	1050.65 ± 120.04 ^{##}	903.15 ± 94.81	840.79 ± 116.13	638.51 ± 67.07 [#]
实验组	832.22 ± 120.37	1093.37 ± 182.49 ^{##}	1487.07 ± 192.57 ^{##▲▲}	1522.64 ± 119.93 ^{##▲▲}	1645.47 ± 205.68 ^{##▲▲}

注:与空白组比较,[#]P < 0.05,^{##}P < 0.01;与相同时间点的盐水处理组比较,[▲]P < 0.05,^{▲▲}P < 0.01

3 讨论

股骨头缺血性坏死在骨科领域比较常见,且为骨科的难治性疾病之一^[3]。有资料显示股骨头坏死已经位居髋关节疾病发病率的首位^[4],早期治疗的关键在于早期诊断、早期治疗^[5]。怎样保证坏死区域的血流及血管再生,对于股骨头坏死的治疗有着至关重要的作用^[6]。

IGF-1 是一种含有 70 个氨基酸残基与胰岛素有相似结构的多肽,它几乎存在于所有哺乳动物组织中,促进骨细胞增殖、分化和募集,抑制细胞凋亡,刺激骨胶原的转录与 DNA 的合成,抑制胶原的降解,增加骨基质沉积,还能增加成骨对磷的吸收,且对羟基磷灰石促进成骨细胞活性的作用有增强效应。Kanatani 等发现磷酸盐能显著增加细胞的 DNA 合成,并且高浓度磷酸盐能增强细胞内 IGF-1 和 IGF-1mRNA 的表达,因此,磷酸盐对骨形成的促进作用是部分通过增加

IGF-1 活性实现的。Sakata 等发现 IGF-1 可明显促进正常大鼠骨祖细胞的增殖和分化,增强 ALP 的活性和骨的矿化,而对骨骼负重减少的大鼠则无此效应,因此,应用 IGF1 可向骨缺损区提供大量的成骨细胞而加速愈合。但是,有研究表明,单独使用 IGF-1 而不与任何载体结合时,并不能提高骨的再生能力,因为 IGF-1 植入体内较易吸收,不能在有效时间作用于更多靶细胞,对于较大骨缺损不能提供支架作用。因此,选择一个适当的承载 IGF-1 的载体成为当前研究的热点问题^[7]。FGF-b 突出的特点是促进毛细血管再生作用,在所知的血管生长因子中它的作用最强。FGF-b 可以刺激毛细血管内皮生长因子迁移和增殖,形成毛细血管芽,促进新的血管形成,同时,释放至少两种间质降解酶:纤溶酶原激活剂和胶原酶,对损伤部位的细胞外基质进行降解,是毛细血管向损伤区长入,为组织的修复提供营养,运送足量钙质,并将骨折早期

机体急性非特异性反应产生的降钙素、 $24,25-(\text{OH})_2\text{-D}$ 运到损伤区。早期骨愈合中高能量代谢状态提示了此时对骨血供及能量物质需求的提到。骨折愈合时新生血管的长入尚可将大量间充质细胞带入损伤区,间充质细胞进一步转化为成骨细胞。FGF-b 是 FGF 家族中对骨生成细胞作用较强的多肽因子,其丝裂原作用表现为刺激性地增加了 DNA 合成和细胞分裂。体外研究已发现 FGF-b 对骨膜起源的细胞、骨生成细胞、胶原合成细胞的分裂与增殖有刺激作用,体内研究也证实,局部或全身应用 FGF-b 均可引起成骨细胞增殖,加速骨形成。骨内血管系统与坏死的进程之间有相互作用关系。

近年来中药对缺血性股骨头坏死早期治疗有很好的疗效。祖国中医学将股骨头坏死归属为“骨蚀”“骨痹”“骨痿”范畴之内,情志所伤、劳伤过度等因素作用于肾,导致肾阳不振,真阴受损,导致筋脉失于濡养,遂成痿证,因此肾虚为本病之本,六淫侵袭为本病之标^[8]。前期,实验研究表明活骨注射液对缺血性股骨头坏死有很好的作用。活骨注射液主要由丹参和川芎等中药材构成。丹参具有活血化瘀、调经、凉血消痛、安神的功效;川芎可活血行气、祛风止痛、通经活络。活骨注射液具有活血化瘀、补肾壮骨之功。

本实验中运用 Real-time PCR 方法,观察不同时间点缺血性股骨头坏死中 IGF-1、FGF-b 的表达,IGF-1 是生长激素产生生理作用过程中必须的一种活性蛋白多肽物质。现在已知的包括 IGF-1 和 IGF-2 两种。IGF-1 在婴儿的生长和在成人体内持续进行合成代谢作用上具有重要意义。生长激素的生理作用包括促进生长,且对于糖、脂、蛋白质代谢和无机盐代谢必不可少。IGF-1 是一类促进细胞生长、具有胰岛素样代谢效应的因子。碱性成纤维因子 (FGF-b) 在血管及成骨细胞再生方面也起着重要作用。FGF-b 突出的特点之一是促进毛细血管生成作用,它是已知的体内作用最强的血管生长因子之一。所以,股骨头缺血性坏死与 IGF-1、FGF-b 息息相关,研究 IGF-1、FGF-b 刻不容缓。由于 IGF-1、FGF-b 是细胞生长的上游调控因子,通过 IGF-1、FGF-b 表达的变化可以进一步探讨细胞生长发生的原因。FGF-b 的表达随着时间推移各组表达量逐渐升高,IGF-1 的表达随着时间推移各组表达量逐渐升高。治疗组表达高于模型组、空白组,说明活骨注射液

能通过促进 IGF-1、FGF-b 的表达增加,从而促进细胞血管生长的发生,延缓缺血性股骨头坏死的病理进程,从而防治股骨头坏死。

本实验结果显示:缺血性股骨头坏死注射活骨注射液通过两种检测方法观察 IGF-1、FGF-b,提示两种检测方法相比较,RT-PCR 较 IHC 敏感,尤其对于缺血性股骨头坏死。国内外许多实验已证实^[9-10],RT-PCR 方法的阳性率高于免疫组化检测的阳性率,本研究的结果与之一致。

中药治疗缺血性股骨头坏死,积累了丰富的临床经验,取得了显著的疗效,中药治疗缺血性股骨头坏死的实验研究同样也取得了明显的进展。运用现代实验技术,从分子生物学水平和基因水平准确分析具有预防、修复股骨头坏死的中药作用机理。实验研究应更系统化,对临床的应用和指导应具有针对性^[11]。通过该实验研究表明活骨注射液对 IGF-1、FGF-b 有着血管再生作用,对于治疗缺血性股骨头坏死早期治疗有显著地效果,为早期缺血性股骨头坏死患者提供了多种治疗方案。

参考文献:

- [1] 刘泽霖,徐西林,张晓峰.活骨注射液治疗股骨头缺血性坏死组织形态学实验研究[J].中医药学报,2013,41(2):30-32.
- [2] 徐叔云,卞如镰,陈修.药理学实验学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2005:203.
- [3] 帅波,沈霖,杨艳萍.缺血性股骨头坏死治疗前后 PMP、PAC-1、CD62P 微颗粒的表达[J].中国中医骨伤科杂志,2012,20(2):8-11.
- [4] 王玉泉,丁海霞,温孝明.运用中医“治未病”思想探讨股骨头坏死的防治策略[J].中国中医骨伤科杂志,2012,24(2):62-63.
- [5] 吕印格,王新,徐志强.早中期股骨头坏死的治疗研究进展[J].中国中医骨伤科杂志,2010,18(4):67-69.
- [6] Wei B F, GE X H. Treatment of Osteonecrosis of the femoral head with core decompression and bone grafting[J]. Hip Int, 2011, 21(2): 206-210.
- [7] 王德峰.异种脱蛋白骨复合 IGF-1 修复兔股骨头坏死的实验研究[D].泰安:泰山医学院,2007.
- [8] 付知勤.中西医结合治疗股骨头缺血性坏死临床观察[J].中医药学报,2013,41(2):71-73.
- [9] 喻启玲,左艳芳.⁶⁰Co γ 射线全身照射后大鼠脑 NOS 表达变化及其与神经再生的关系[J].局解手术学杂志,2003,12(2):132-134.
- [10] 丁勇,田嘉禾,杨武威.PET、RT-PCR、IHC 方法检测肿瘤转移灶的比较[J].中国医学影像学杂志,2002,10(6):405-407.
- [11] 师彬,孙国栋,王吉荣.中药治疗缺血性股骨头坏死的实验研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2010,5(4):56-59.