

# 普伐他汀联合髓芯减压术治疗激素性兔股骨头坏死的实验研究

乐锦波 杜远立 向选平 茹能 邓娟娟 武斌

**【摘要】 目的** 研究普伐他汀联合髓芯减压术治疗激素性兔股骨头坏死对组织病理学、骨形态发生蛋白2(BMP2)和血管内皮生长因子(VEGF)mRNA表达水平的影响。**方法** 45只实验大白兔制作成激素性股骨头坏死模型后随机分为三组:髓芯减压术治疗组(A组),普伐他汀联合髓芯减压术治疗组(B组)和模型组(C组),每组各15只。观察各组各时期兔股骨头毛细血管数、管径、骨陷窝空缺百分比以及BMP2、VEGF mRNA表达水平。**结果** A、B两组第4周BMP-2、VEGF mRNA表达水平( $7.4 \pm 1.1, 8.0 \pm 1.0; 0.118 \pm 0.027, 0.129 \pm 0.023$ )与C组比较无统计学差异( $7.2 \pm 0.8; 0.117 \pm 0.024$ ) ( $P > 0.05$ )。而B组第8周和第12周BMP-2、VEGF mRNA表达水平( $10.5 \pm 2.4, 13.8 \pm 3.2; 0.341 \pm 0.047, 0.562 \pm 0.059$ )明显高于A组( $8.0 \pm 1.7, 8.8 \pm 2.0; 0.137 \pm 0.033, 0.149 \pm 0.048$ )、C组( $7.6 \pm 1.6, 7.7 \pm 1.8; 0.126 \pm 0.035, 0.131 \pm 0.041$ ) ( $P < 0.05$ );且随治疗时间延长,B组BMP-2、VEGF mRNA表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。**结论** 普伐他汀联合髓芯减压术可明显上调股骨头BMP-2、VEGF mRNA的表达水平,是治疗激素性股骨头坏死的有效方法。

**【关键词】** 减压术,外科; 股骨头坏死; 骨形态发生蛋白受体, II型; 血管内皮生长因子类; 普伐他汀

**Experimental study of pravastatin combined with core decompression on treatment of corticosteroid-induced femoral head osteonecrosis in rabbits** LE Jin-bo, DU Yuan-li, XIANG Xuan-ping, RU Neng, DENG Juan-juan, WU Bin. Department of Orthopedics, The People's Hospital of Sanxia University, The NO. 1 People's Hospital of Yichang City, Yichang 443000, China

Corresponding author: LE Jin-bo, Email: lejinbo088@126.com

**【Abstract】 Objective** To observe the expression levels of BMP2, VEGF mRNA and histopathology of pravastatin combined with core decompression on treatment of corticosteroid-induced femoral head osteonecrosis in rabbits. **Methods** 45 experimental rabbits were made to the model of steroid-induced osteonecrosis and were randomly divided into 3 groups: core decompression treatment group (group A), pravastatin combined with core decompression treatment group (group B) and the model group (group C), every group was 15 rabbits. The capillary number, diameter, percentage of vacant lacunae, BMP2 and VEGF mRNA in the femoral head at different periods were observed. **Results** The expression of BMP-2 and VEGF mRNA in groups A, B ( $7.4 \pm 1.1, 8.0 \pm 1.0; 0.118 \pm 0.027, 0.129 \pm 0.023$ ) at 4 weeks showed no significant difference with groups C ( $7.2 \pm 0.8; 0.117 \pm 0.024$ ) ( $P > 0.05$ ), while the expression of BMP-2 and VEGF mRNA in group B ( $10.5 \pm 2.4, 13.8 \pm 3.2; 0.341 \pm 0.047, 0.562 \pm 0.059$ ) at 8 weeks and 12 weeks were significantly higher than that of group A ( $8.0 \pm 1.7, 8.8 \pm 2.0; 0.137 \pm 0.033, 0.149 \pm 0.048$ ), group C ( $7.6 \pm 1.6, 7.7 \pm 1.8; 0.126 \pm 0.035, 0.131 \pm 0.041$ ) ( $P < 0.05$ ), and with prolonged treatment, the expression of BMP-2 and VEGF mRNA in group B were significantly higher ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The treatment of pravastatin combined with core decompression can significantly increased the expression levels of BMP-2, VEGF mRNA in femoral head. It is an effective method to treat the femoral head necrosis.

**【Key words】** Decompression, surgical; Femur head necrosis; Bone morphogenetic

protein receptors, type II; Vascular endothelial growth factors; Pravastatin

股骨头缺血性坏死是目前临床医学领域的一个研究难点。流行病学调查显示此疾病病残率高, 临床治疗也比较困难, 已引起人们的广泛关注<sup>[1]</sup>。采用髓芯减压术治疗股骨头缺血坏死疾病, 具有降低股骨头内压力, 促进股骨内血管化, 防止出现股骨头缺血坏死和进行性骨破坏现象等多种功能作用, 既往大量应用于股骨头缺血性坏死疾病的治疗中<sup>[2]</sup>。最近有研究结果发现, 普伐他汀能调节骨组织代谢过程, 改善骨质疏松现象。因此, 本实验拟探讨普伐他汀联合髓芯减压术治疗激素性兔股骨头坏死对组织病理学、骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 和血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 表达水平的影响。

## 材料与方 法

1. 实验动物: 选择 45 只健康成年新西兰实验大白兔, 全部为雄性, 普通级, 重量为  $(3.0 \pm 0.5)$  kg, 均购自华中科技大学附属同济医学院动物实验中心, 并由专人进行喂养。

2. 实验药物和化学试剂: BMP-2 抗体购自北京中山生物技术公司; 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物技术公司; 逆转录酶、Taq 酶和 dNTP 均购自 Promega 公司; VEGF 和 GAPDH 上下游引物由上海生物工程公司合成。

3. 激素性兔股骨头坏死模型制作及实验分组: 45 只新西兰实验大白兔均按 7.5 mg/kg 剂量的泼尼松龙臀部肌内注射, 每日 1 次, 共注射 12 周。造模成功以后随机分为三组, 每组 15 只。组别依次为髓芯减压术治疗组 (A 组); 造模成功后采用髓芯减压术治疗; 普伐他汀联合髓芯减压术治疗组 (B 组); 造模成功后采用普伐他汀 + 髓芯减压术联合治疗, 灌胃普伐他汀 (1.2 mg/kg), 临用前以 5 ml 蒸馏水配制成混悬液; 模型组 (C 组); 造模成功后不做特殊处理。治疗第 4 周、第 8 周和第 12 周分别处死各组实验大鼠 5 只, 取血清和股骨头坏死部位。根据 ARCO 分期标准对股骨头坏死模型进行诊断及分期。

4. 组织病理学检查: 将兔股骨头取出, 沿着股骨头冠状面方向将其完全剖开, 用戊尔醛溶液加以固定处理, 再经过 5% 浓度的硝酸溶液进行脱钙处理。在股骨头表面取出 10 块骨组织, 用石蜡块予以包埋处理以后进行切片处理, 共切片 10 张, HE 染色处理以后, 在显微镜下观察各组织切片的骨小梁、骨陷窝等具体情况, 任选 5 个高倍视野, 每个视野需要计数 50 个骨陷窝, 求出空缺骨陷窝所占百分比, 并观察血管数, 求出平均值。

5. 免疫组化染色方法检测 BMP-2 表达水平: 采用免疫组化染色方法半定量检测各组各时期股骨头 BMP-2 表达水平。BMP-2 实验浓度为 1:100, 均设有空白对照 (磷酸盐缓冲液) 和阴性对照 (正常兔血清)。以细胞质、膜或间质等部位出现棕黄色颗粒或线状沉积为表达阳性。采用免疫组化图像分析软件在低倍镜下计算阳性面积百分比 (%), 每张切片随机选取 5 个视野, 取其平均值。

6. RT-PCR 方法检测 VEGF mRNA 表达水平: 利用 Trizol 提取液提取股骨头总 RNA, 测定 A260/A280 值。取 2  $\mu$ g 总 RNA, 42  $^{\circ}$ C 温度下逆转录处理 90 min。PCR 条件为: 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 40 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 共 30 个循环。GAPDH 内参照 PCR 方法相同。将 PCR 反应产物与 2  $\times$  上样缓冲液按 1:1 的比例进行混合, 然后在 1% 浓度的琼脂糖凝胶, 10 V/cm 条件下进行电泳, 在紫外透射反射分析仪下观察 PCR 结果。取 5  $\mu$ l 体积的 PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳。凝胶图像分析系统检测其 PCR 条带灰度, VEGF/GAPDH 比值表示 VEGF mRNA 的相对表达水平。

引物序列见下: VEGF (153 bp), 上游引物: 5'-GTGGACATCTTCCAGGAGTACC-3', 下游引物: 5'-GATCCGCATGATCTGCATGGTG-3'; GAPDH (115 bp), 上游引物: 5'-CGCTGGACTTCGAGCAGGAG-3', 下游引物: 5'-CAGGAAGGAGGGCTGGAACA-3'。

7. 统计学分析: SPSS 10.0 统计软件进行数据分析, 采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 组织学病变情况比较: A 组骨陷窝空缺百分率明显低于 C 组 ( $P < 0.05$ ), 但显著高于 B 组 ( $P < 0.05$ ); 而 A 组毛细血管数和管径明显高于 C 组 ( $P < 0.05$ ), 但显著低于 B 组 ( $P < 0.05$ )。见表 1 及图 1。

2. 各组股骨头 BMP-2 表达水平: A、B 两组第 4 周 BMP-2 表达水平与 C 组比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 而 B 组第 8 周和第 12 周 BMP-2 表达水平明显高于 A、C 组 ( $P < 0.05$ ), 且随治疗时间延长, B 组 BMP-2 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 2 及图 2。

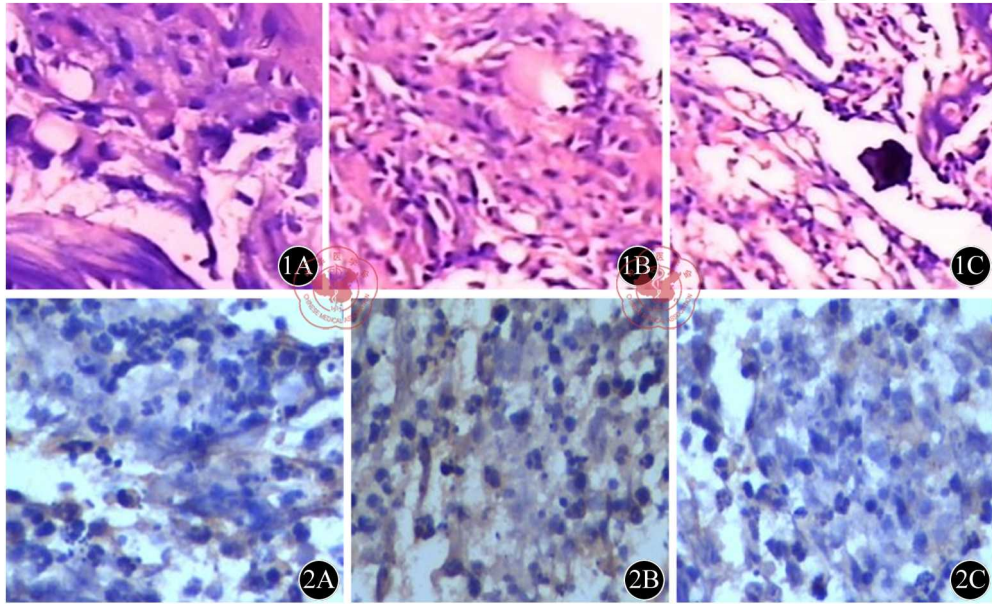


图1 1A: A组HE染色(×200); 1B: B组HE染色(×200); 1C: C组HE染色(×200)

图2 免疫组化染色。2A: A组BMP-2表达(×200); 2B: B组BMP-2表达(×200); 2C: C组BMP-2表达(×200)

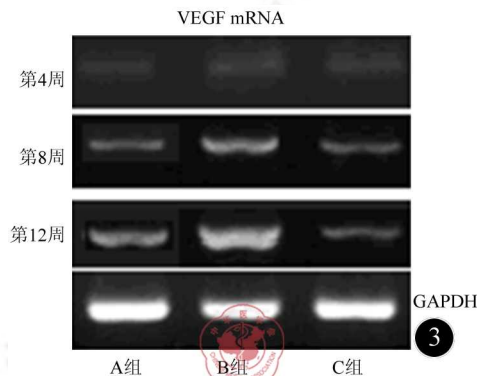


图3 三组股骨头VEGF mRNA表达情况

表1 各组组织学病变情况比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	血管数	血管直径( $\mu\text{m}$ )	骨陷窝空缺百分率(%)
A组	5	$7.5 \pm 1.2^{ab}$	$8.5 \pm 1.2^{ab}$	$27.6 \pm 7.5^{ab}$
B组	5	$8.6 \pm 1.4^a$	$9.8 \pm 1.3^a$	$18.7 \pm 5.7^a$
C组	5	$6.2 \pm 1.5$	$7.2 \pm 1.4$	$36.1 \pm 7.4$

注:与 C 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 B 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

3. 各组股骨头 VEGF mRNA 表达情况: A、B 两组第 4 周 VEGF mRNA 表达水平与 C 组比较无明显差异性 ( $P > 0.05$ ), 而 B 组第 8 周和第 12 周 VEGF mRNA 表达水平明显高于 A、C 组 ( $P < 0.05$ ), 且随治疗时间延长, B 组 VEGF mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 3 和图 3。

表2 各组股骨头 BMP-2 的表达情况(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	第4周	第8周	第12周
A组	5	7.4 ± 1.1	8.0 ± 1.7 <sup>b</sup>	8.8 ± 2.0 <sup>b</sup>
B组	5	8.0 ± 1.0	10.5 ± 2.4 <sup>a</sup>	13.8 ± 3.2 <sup>a</sup>
C组	5	7.2 ± 0.8	7.6 ± 1.6	7.7 ± 1.8

注:与C组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与B组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;B组组内各时间段两两比较, $P < 0.05$

表3 各组股骨头 VEGF mRNA 表达情况( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	第4周	第8周	第12周
A组	5	0.118 ± 0.027	0.137 ± 0.033 <sup>b</sup>	0.149 ± 0.048 <sup>b</sup>
B组	5	0.129 ± 0.023	0.341 ± 0.047 <sup>a</sup>	0.562 ± 0.059 <sup>a</sup>
C组	5	0.117 ± 0.024	0.126 ± 0.035	0.131 ± 0.041

注:与C组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与B组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;B组组内各时间段两两比较, $P < 0.05$

## 讨 论

长时间或大剂量采用激素药物治疗后,本研究模型大鼠股骨头髓腔内可有大量的脂肪细胞生成,髓腔出现明显的脂肪化现象,骨髓内压力显著上升,造成局部的微循环状态出现障碍,骨组织细胞分化能力不足,成骨细胞的活性能力及数目同时出现下降。与此同时本研究显示股骨头的 BMP-2 表达水平明显降低,骨组织修复和重建的能力均相应减弱,而联合治疗组股骨头 BMP-2 表达水平则明显升高。

有研究结果显示,激素性坏死股骨头内存在的成骨细胞其合成 BMP-2 的能力明显出现下降<sup>[3]</sup>。此外利用外源性 BMP-2 可对激素性股骨头坏死进行修复,但由于制备外源性 BMP-2 的过程较为复杂,且来源十分有限,移植进体内还需要合适的载体,故应用受到较大限制。因此,如何利用药物治疗来对机体内源性 BMP-2 表达水平发挥影响,促进其上调已经成为修复激素性坏死股骨头的一种治疗方向。他汀类药物除传统的降血脂药理作用以外,还可以明显刺激成骨细胞的快速增殖和定向分化,进而增加骨组织密度和促进骨组织的形成<sup>[4]</sup>。此外还可特异性的刺激成骨细胞中 BMP-2 基因,促其高水平表达,并诱导间充质干细胞向成骨细胞进行转化<sup>[5]</sup>。故本研究采用普伐他汀联合髓芯减压术对激素性兔股骨头坏死进行治疗。

改善股骨头局部的血液供应状态也是治疗股骨头缺血性坏死疾病的关键步骤,而血管内皮细胞生长因子作为一种特异性促进血管内皮细胞大量增生及血管生成的作用因子,具有明显的促血管生成的药理作用<sup>[6]</sup>。VEGF 除了促进局部血管大量增生的作用以外,还能上调成骨相关细胞因子的表达水平,明显提高成骨细胞的生物活性,加速新骨组织的形成过程和骨组织的修复重建过程<sup>[7]</sup>。此外研究还发现他汀类药物有促进血管内皮细胞产生 NO 的药理作用<sup>[8-9]</sup>,而 NO 具有调节 VEGF 促进血管生成的生理作用<sup>[10]</sup>。上述理论与本研究结果基本相符。

本研究结果提示普伐他汀联合髓芯减压术治疗组能明显缓解激素性股骨头坏死病理组织学表现,还能显著提高 BMP-2、VEGF mRNA 表达水平,较单一采用髓芯减压术治疗具有明显的治疗效果,为此种联合治疗方法在临床治疗提供了动物实验依据。

## 参 考 文 献

- [1] Lafforgue P. Osteonecrosis of the femoral head. Rev Prat, 2006, 56:817-825.
- [2] Aigner N, Schneider W, Eberl V, et al. Core decompression in early stages of femoral head osteonecrosis-an MRI-controlled study. Int Orthop, 2002, 26:31-38.
- [3] 曲志强,何慕舜,曾月东,等.骨形态发生蛋白与骨缺损的修复.中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13:345-348.
- [4] 胡敏,赵宏斌,董锡亮,等.普伐他汀干预激素性股骨头坏死兔模型的组织学变化:大体和光镜下比较和印证.中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14:5204-5207.

- [5] 胡敏,赵宏斌,梁红锁. 普伐他汀对激素性坏死股骨头内骨形成蛋白-2 表达的影响. 中国医药,2006,1:257-259.
- [6] 胡志明,王海彬,李祖国,等. 血管内皮细胞生长因子促进激素性股骨头坏死修复. 中国矫形外科杂志,2006,14:1179-1181.
- [7] 胡志明,周明乾,高基民. VEGF 与 TNFR 联合治疗股骨头坏死实验研究. 南方医科大学学报,2008,28:2177-2179.
- [8] 余强,胡大一. 辛伐他汀对心肌梗死大鼠缺血心肌毛细血管新生的影响. 中国新药与临床杂志,2004,23:328-331.
- [9] Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, et al. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. J Am Coll Cardiol, 1999, 33:234-241.
- [10] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J, 1999, 13:9-22.

(收稿日期:2011-07-13)

(本文编辑:张岚)

乐锦波,杜远立,向选平,等. 普伐他汀联合髓芯减压术治疗激素性股骨头坏死的实验研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5(21):6226-6230.