



# 不同治法方药对激素性股骨头坏死鸡成骨 相关因子的影响

孔祥英<sup>1</sup>, 万蓉<sup>1</sup>, 李莉<sup>2</sup>, 林诗富<sup>2</sup>, 郭炜<sup>1</sup>, 林娜<sup>1\*</sup>, 孔焕宇<sup>2</sup>, 陈卫衡<sup>2\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 中国中医科学院 望京医院, 北京 100102)

**[摘要]** 目的:通过观察健脾化痰、活血通络(健脾)与补肾壮骨、活血通络(补肾)2种不同治法方药对激素性股骨头坏死鸡成骨因子骨形成蛋白(BMP)2、转化生长因子(TGF) $\beta_1$ 及其下游蛋白 Smads 的影响,比较探讨其防治股骨头坏死的作用机制。**方法:**48 只来杭鸡经胸肌注射甲基氢化泼尼松建立激素性股骨头坏死模型后,随机分为模型组、健脾组和补肾组,另 16 只来杭鸡设为正常对照组,4 个实验组在造模同时分别灌胃生理盐水和相应中药。给药 8 周和 16 周后取双侧股骨头,免疫组织化学法检测 BMP2, TGF $\beta_1$  和 Smad4, 7 蛋白表达。**结果:**与正常组相比,模型组股骨头 BMP2, TGF $\beta_1$  和 Smad4 阳性细胞计数显著减少, Smad7 明显增加;与模型组相比,健脾组 8 周时 BMP2, TGF $\beta_1$  和 Smad4 阳性细胞计数显著增多, Smad7 明显减少,与补肾组在 16 周时的作用相类似。**结论:**健脾与补肾 2 种不同治法方药均能通过调节股骨头内成骨因子 BMP2, TGF $\beta_1$  和 Smad4, 7 蛋白表达来促进股骨头的修复,防治股骨头坏死;健脾方药比补肾方药起效时间更早。

**[关键词]** 股骨头坏死; BMP2; TGF $\beta_1$ ; Smads

激素性股骨头坏死是由大剂量应用激素造成股骨头活性成分(骨细胞、骨髓造血细胞及脂肪细胞)死亡的病理过程<sup>[1]</sup>,其中骨坏死和骨的修复与重建相伴发生。在股骨头坏死修复与重建中,成骨因子如骨形成蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2)和转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factors  $\beta_1$ , TGF $\beta_1$ ) 发挥着极其重要的作用,而 Smads 蛋白是其胞内信号转导的主要转录因子。本研究通过观察健脾化痰、活血通络(简称健脾)与补肾壮骨、活血通络(简称补肾)2种不同治法方药对鸡股骨头局部 BMP2, TGF $\beta_1$  及 Smads 表达的影响,比较探讨其防治激素性股骨头坏死的特点及机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康来杭鸡,雌性,1.80~2.30 kg,由北京梅里来维通实验动物技术有限公司提供,合格证号 SYXK1100-0022。

**1.2 药品与试剂** 健脾化痰、活血通络方由茯苓

15 g、白术 12 g、太子参 20 g、法半夏 10 g、赤芍 10 g、桂枝 10 g、当归 10 g、川芎 10 g 等组成;补肾壮骨、活血通络方由独活 15 g、寄生 20 g、补骨脂 15 g、肉桂 10 g、杜仲 15 g、菟丝子 15 g、当归 10 g、川芎 8 g 等组成。2 方分别用水煎煮制成含生药  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的粗提物备用,由中国中医科学院中药研究所提供;甲基氢化泼尼松琥珀酸钠购自比利时法玛西亚普强公司(批号 LH1208);兔抗 BMP2, TGF $\beta_1$ , Smad4 和 Smad7 抗体及 SABC 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

**1.3 仪器** TSJ-1 型自动组织脱水机、BMJ-1 生物组织包埋机、QPJ-C 轮转式切片机、ZPJ-1A 展片机、KPJ-1A 烤片机均为爱华公司产品;BX60 光学显微镜为 Olympus 公司产品。

## 2 方法

**2.1 动物分组与给药** 来杭鸡 64 只,随机分为以下 4 组:正常组、模型组、健脾组和补肾组,每组 16 只。激素性股骨头坏死模型的制备参照王心生<sup>[2]</sup>的方法并稍加改进,即胸肌注射  $5.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  甲基氢化泼尼松,每周 1 次,连续 16 周。造模的同时健脾组和补肾组分别灌胃给予健脾化痰活血通络方药 ( $6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 及补肾壮骨活血通络方药 ( $9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),每周给药 6 次,共 16 周;正常组

**[稿件编号]** 20101222004

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30472131)

**[通信作者]** \* 林娜, Tel: (010) 64011692, E-mail: linna888@163.com; \* 陈卫衡, Tel: (010) 84739367

**[作者简介]** 孔祥英,助理研究员, E-mail: kongu0051@163.com



**3.3 Smad4 和 Smad7 的表达** 正常组股骨头软骨细胞、骨细胞及骨髓细胞内均可见 Smad4 和 Smad7 棕色阳性颗粒表达。模型组 8 周时 Smad4 表达量明显减少、Smad7 显著增多 ( $P < 0.05$ ), 16 周时上述变化趋势更明显 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 健脾和补肾组 Smad4 表达量明显增高, Smad7 显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且随时间延长, 上述变化趋势更明显; 其中补肾组 16 周时 Smad4 表达量明显高于健脾组 ( $P < 0.05$ ), 甚至高于正常组水平, 见表 2。

表 2 鸡股骨头 Smad4 和 Smad7 阳性细胞计数比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	Smad4		Smad7	
	8 周	16 周	8 周	16 周
正常	368 ± 144	434 ± 125	222 ± 78	221 ± 83
模型	267 ± 103 <sup>1)</sup>	350 ± 80 <sup>2)</sup>	378 ± 172 <sup>1)</sup>	318 ± 106 <sup>2)</sup>
健脾	367 ± 125 <sup>3)</sup>	384 ± 86 <sup>5)</sup>	282 ± 95 <sup>3)</sup>	262 ± 105
补肾	344 ± 145	500 ± 131 <sup>4)</sup>	305 ± 80	218 ± 59 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

近年的流行病学研究发现, 激素已超过乙醇, 成为非创伤性股骨头坏死的首位致病因素<sup>[3]</sup>。目前, 有关激素导致股骨头坏死的机制尚未完全被阐明, 但其中脂质代谢紊乱等学说已得到学者的认识<sup>[4]</sup>。研究表明糖皮质激素既能干预脂代谢, 形成高脂血症, 导致骨内微血管脂肪栓、骨细胞缺血坏死, 还能直接对骨细胞发挥细胞毒作用, 加速骨破坏, 抑制骨的修复和再生。因此, 调节血脂代谢、促进骨修复成为目前防治激素股骨头坏死的主要策略之一。

宋氏认为血中升高的血脂和脂蛋白代谢紊乱为中医所称的“无形之痰”, 是血中痰浊的生化学物质基础<sup>[5]</sup>。前期的临床研究发现, 激素性股骨头坏死早期的表现符合“痰瘀互结”的证候特点<sup>[6]</sup>, 临床应用健脾化痰、活血通络方药防治股骨头坏死早期患者取得了较好的疗效<sup>[7-8]</sup>。为了明确这一治法与以往常用的补肾法<sup>[9-10]</sup>在临床应用中的区别, 本研究采用激素性股骨头坏死鸡模型, 从骨修复的角度比较探讨两者的作用特点和机制。

骨修复是多种细胞因子共同调节的病理生理过程。BMP2 是诱导成骨活性最强的细胞因子, TGFβ<sub>1</sub> 可诱导成骨细胞的趋化、刺激成骨细胞增生, 还协同 BMP2 的成骨诱导活性, 促进骨痂的形成和骨缺损

的修复。BMPs 和 TGFβ<sub>1</sub> 等均属于 TGFβ 家族成员, 其下游胞内信号传导是由 TGFβ 受体唯一的胞内激酶底物 Smads 蛋白介导的<sup>[11]</sup>。Smad4 蛋白是通用型 Smads, TGFβ 超家族的所有因子的胞内信号传导都必须通过 Smad4 介导转位至核内<sup>[12]</sup>。Smad7 是 Smads 家族的抑制型蛋白, 可与 R-Smads 竞争性结合受体, 阻断 TGFβ 的胞内信号传导。

本研究中, 模型鸡股骨头内 Smad4 表达明显减少, 而 Smad7 表达增多, 同时 TGFβ<sub>1</sub>, BMP2 的表达也明显减少, 且随着激素应用时间延长, 这种变化趋势更明显。提示了激素不但可以直接作用于骨细胞, 抑制 Smad4 蛋白合成, 上调 Smad7 阳性表达, 从而抑制 TGFβ 信号传导, 降低骨修复能力, 还可以通过影响脂代谢, 使骨髓内脂肪组织增生和脂肪细胞肥大, 骨内压升高, 加速病程发展。因此, 模型鸡股骨头可见骨小梁上骨细胞坏死增多, 骨小梁周沿的成骨细胞数量稀少, 脂肪细胞数目及面积增加等组织病理变化。实验中健脾和补肾方药均能逆转由激素导致的上述变化, 通过调节多种骨修复调控因子的表达发挥股骨头坏死的防治作用, 但两者的作用特点略有不同: 健脾组发挥作用的时间较早 (8 周), 补肾组需到 16 周效果才明显。分析其机制, 可能是由于健脾方药一方面能调节激素导致的脂代谢紊乱, 及早改善股骨头局部的供血状态, 防止骨细胞的坏死; 另一方面能直接作用于股骨头内活性细胞, 促进成骨因子分泌, 维持其成骨能力。相比之下, 补肾中药虽能明显促进骨髓基质细胞向成骨细胞的分化<sup>[13-14]</sup>, 但由于基质细胞的分化及新生成骨细胞的成熟需要较长时间, 而补肾方对脂代谢的调节能力总体上不如健脾方, 故到疾病的相对后期才显示出对骨修复的作用。

本研究结果证明了健脾化痰、活血通络和补肾壮骨、活血通络 2 种不同治法方药均可通过调节股骨头内成骨因子 BMP2, TGFβ<sub>1</sub> 和 Smad4, 7 蛋白表达来促进坏死股骨头的修复, 其中健脾化痰、活血通络方药发挥作用的时间较早。这为指导临床不同时期股骨头坏死的合理用药提供了初步的理论参考。

#### 【参考文献】

- [1] 史风雷, 陈峰, 郑志永. 激素性骨坏死的发病机制及中医药防治[J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11(15): 1519.
- [2] 王心生, 康文成, 许振华. 激素性股骨头缺血坏死动物模型的研制[J]. 中华实验外科杂志, 1993, 10(3): 136.
- [3] 刘铁钢, 陈卫衡. 非创伤性股骨头坏死的流行病学研究[J].



- 当代医学, 2008, 14(24):64.
- [4] 王坤正,毛履真,胡长根,等. 激素性股骨头坏死发病机制的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1994,32(9):515.
- [5] 宋剑南. 从生物化学角度看痰及痰瘀相关[J]. 中国中医基础医学杂志,2000, 6(3):40.
- [6] 陈卫衡. 股骨头坏死“痰瘀同治”的理论基础[J]. 江苏中医药, 2008,40(5):3.
- [7] 陈卫衡,刘道兵,张强,等. SARS后股骨头坏死的证候特点及治疗方案优化研究(上)[J]. 中国中医药现代远程教育, 2006,4(10):55.
- [8] 陈卫衡,许锐,欧彤文,等. 中药预防激素性股骨头坏死临床初步研究[J]. 北京中医药,2008,27(10):761.
- [9] 李雄,袁浩. 袁浩教授对股骨头坏死中医理论治的学术思想[J]. 中国中医骨伤科,1999(1):47.
- [10] 赵万军,肖鲁伟,童培建,等. 右归饮、鹿马片预防激素性股骨头坏死的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2000, 8(5):9.
- [11] Osawa H, Nakajima M, Kato H, et al. Prognostic value of the expression of Smad6 and Smad7, as inhibitory Smads of the TGF-beta superfamily, in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*,2004, 24(6):3703.
- [12] Lianjia Y, Yan J. Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions [J]. *Clin Orthop*,1990,257:249.
- [13] 李显澎,范海蛟,樊粤光,等. 补肾法诱导骨髓间充质干细胞定向成骨分化的研究进展[J]. 中医药导报, 2007,13(12):81.
- [14] 吴承亮,季卫锋,俞索静,等. 右归饮对家兔激素性股骨头坏死骨髓脂肪化的影响[J]. 中医正骨, 2006,18(7):4.

## Effect of different treating principles and formulas on expression of osteogenic factors in steroid-induced osteonecrosis of femoral head of chicken

KONG Xiangying<sup>1</sup>, WAN Rong<sup>1</sup>, LI Li<sup>2</sup>, LIN Shifu<sup>2</sup>, GUO Wei<sup>1</sup>, LIN Na<sup>1\*</sup>, KONG Huanyu<sup>2</sup>, CHEN Weiheng<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of two treating principles and formulas, which are named 'invigorating spleen to remove phlegm and promoting blood circulation to remove meridian obstruction' (Jianpi) and 'invigorate the kidney and promoting blood circulation to remove meridian obstruction' (Bushen), on the expression of osteogenic factors in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH), such as bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ) and Smads, as well as to explore and compare their mechanisms of prevention and treatment of SONFH. **Method:** Animal model of SONFH was established by injection with methylprednisolone in chest muscle on chickens. 48 SONFH chickens were randomly assigned to model, Jianpi and Bushen group. Another 16 normal chickens served as control group. At the 8<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> week, the expression of BMP2, TGF $\beta_1$ , Smad4 and Smad7 of bilateral femoral heads were detected with immunohistochemistry. **Result:** The expression of BMP2, TGF $\beta_1$  and Smad4 decreased, and Smad7 increased significantly in model group compared with control group. The expression of BMP2, TGF $\beta_1$ , Smad4 increased and Smad7 decreased significantly in Jianpi group at the 8<sup>th</sup> week compared with model group, and the same changes in Bushen group at the 16<sup>th</sup> week. **Conclusion:** Both Jianpi and Bushen formulas exerted preventive and therapeutic activity on SONFH through regulating the expression of BMP2, TGF $\beta_1$ , Smad4 and Smad7 to promote bone repair. Notably Jianpi formula took effect earlier than Bushen formula.

[Key words] steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; bone morphogenetic protein 2; transforming growth factor  $\beta_1$ ; Smads

doi:10.4268/cjcmm20110521

[责任编辑 张宁宁]