

# 补肾活血方对激素性股骨头缺血性坏死小鼠 肾素-血管紧张素系统经典轴的影响

帅波<sup>1</sup> 马陈<sup>1</sup> 沈霖<sup>1△</sup> 杨艳萍<sup>1</sup> 卢俊杰<sup>1</sup> 杨功旭<sup>2</sup> 孙敏<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:初步探讨补肾活血方对激素性股骨头缺血性坏死(INFH)小鼠肾素-血管紧张素系统(RAS)经典轴血管紧张素转换酶(ACE)/血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)/血管紧张素Ⅱ-1型受体(AT1R)的影响。方法:将60只SPF级C57BL/6雄性小鼠随机分5组,即健康对照组、激素性INFH模型组、补肾活血方组、骨化三醇组及阿利吉仑组。治疗3个月后,ELISA法检测循环血中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>及AngⅡ的含量,并检测股骨头局部VDR、ACE、AT1R mRNA表达情况,行免疫组化分析。结果:与模型组相比,健康对照组、补肾活血方组、骨化三醇组及阿利吉仑组循环血中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>含量明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而AngⅡ含量明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与模型组相比,健康对照组、补肾活血方组、骨化三醇干预组及阿利吉仑组骨组织局部VDR mRNA的表达明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而ACE、AT1R表达明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。免疫组化结果显示:模型组骨组织中ACE及AT1R阳性表达较其他各组高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而VDR阳性表达较其他各组低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:激素性INFH小鼠RAS经典轴ACE/AngⅡ/AT1R被激活,补肾活血方可激活1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/VDR信号通路,并能抑制激活的RAS经典轴ACE/AngⅡ/AT1R,这可能是补肾活血方防治激素性INFH的部分机制。

**[关键词]** 激素性股骨头坏死;补肾活血方;维生素D受体mRNA;血管紧张素;血管紧张素转换酶

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)06-0001-05

## Efficacy of Bushen Huoxue Recipe on ACE/AngⅡ/AT1R of RAS Classical Axis in Steroid Induced Ischemic Necrosis of Femoral Head in Mice

SHUAI Bo<sup>1</sup> MA Chen<sup>1</sup> SHEN Lin<sup>1△</sup> YANG Yanping<sup>1</sup>

LU Junjie<sup>1</sup> YANG Gongxu<sup>2</sup> SUN Min<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China;

<sup>2</sup> Department of Orthopaedics, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430074, China.

**Abstract Objective:** To study the efficacy of Bushen Huoxue recipe on ACE/AngⅡ/AT1R of steroid induced ischemic necrosis of femoral head (INFH) in mice. **Methods:** All 60 SPF C57BL/6 male mice were randomly divided into 5 groups: control group, steroid induced INFH model group, Bushen Huoxue recipe group, calcitriol intervention group and aliskiren intervention group. The levels of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and AngⅡ in the circulating blood were detected by ELISA method; the

expression of VDR, ACE, AT1R mRNA in the femoral head was detected, and immunohistochemistry was performed three months after treatment. **Results:** Compared with the model group, the content of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in the circulating blood of the healthy control group, Bushen Huoxue recipe group, calcitriol intervention group and aliskiren group was increased significantly ( $P<0.05$ ), while the content of AngⅡ was decreased significantly ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the expression of VDR mRNA in bone tissue of healthy control group, Bushen Huoxue recipe

基金项目:国家自然科学基金(81974546,82174182,82004201)

中央高校基本科研业务费专项资金资助项目

(2019kfyRCPY093)

<sup>1</sup> 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科  
(武汉,430022)

<sup>2</sup> 湖北省中医院骨科

△通信作者 E-mail:shenlinhb@sina.cn

帅波和马陈为共同第一作者

group, calcitriol intervention group and aliskiren group was increased significantly ( $P < 0.05$ ), while the expression of ACE and AT1R was decreased significantly ( $P < 0.05$ ). The immunohistochemistry results were showed that the expression of ACE and AT1R in bone tissue of model group was higher than that of other groups ( $P < 0.05$ ), while the expression of VDR was lower than that of other groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** ACE/Ang II/AT1R of RAS classic axis in steroid induced INFH mice is activated, Bushen Huoxue recipe can activate  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /VDR signal pathway and inhibit the activated ACE/Ang II/AT1R of RAS classic axis, which may be part of the mechanism of Bushen Huoxue recipe in the prevention and treatment of steroid induced INFH.

**Keywords:** steroid induced ischemic necrosis of femoral head; Bushen Huoxue recipe; VDR mRNA; angiotensin; angiotensin converting enzyme

笔者前期研究显示补肾活血方可以通过改善循环血及骨组织局部  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  含量及 VDR mRNA 表达水平从而起到补肝肾强筋骨的作用<sup>[1-2]</sup>, 对早期股骨头缺血性坏死 (Ischemic Necrosis of Femoral Head, INFH) 患者有很好的临床疗效<sup>[3-4]</sup>。而活性维生素 D 可通过改善局部肾素-血管紧张素系统 (Renin-Angiotensin System, RAS) 治疗激素性骨质疏松症 (Osteoporosis, OP)<sup>[5]</sup>。有研究显示骨组织局部肾素-血管紧张素系统经典轴血管紧张素转换酶 (Angiotensin Converting Enzyme, ACE)/血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II)/血管紧张素 II-1 受体 (Angiotensin Type 1 Receptor, AT1R) 可调节局部骨转换状态<sup>[6]</sup>、促进局部微循环生态<sup>[7]</sup>, 调节局部氧化应激反应<sup>[8]</sup> 及改善局部炎症反应<sup>[9]</sup> 等。由此笔者大胆推测补肾活血方是否可通过激活  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /VDR 信号通路, 进而调控肾素-血管紧张素系统经典轴 ACE/Ang II/AT1R 防治激素性股骨头缺血性坏死。本研究初步探讨补肾活血方对激素性股骨头缺血性坏死小鼠肾素-血管紧张素系统经典轴 ACE/Ang II/AT1R 的影响, 为后续研究及临床诊治提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物模型制备、分组及干预

将 60 只雌性 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠随机分为 5 组, 每组 12 只, 即正常对照组 (A 组)、激素性股骨头缺血性坏死组 (B 组)、补肾活血方组 (C 组)、骨化三醇干预组 (D 组)、肾素阻滞剂阿利吉仑 (Aliskiren) 组 (E 组)。除 A 组外其余四组小鼠均先制备成股骨头缺血性坏死模型<sup>[10]</sup>: 即按  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  静脉推注脂多糖, 1 次/d, 连续 2 d, 然后按  $20 \text{mg}/\text{kg}$  肌注甲强龙, 1 次/d, 连续 3 d, A 组小鼠按同样剂量及方式注射生理盐水对照。注射后 1 周, A、B、C、D、E 组小鼠分别每天分别灌服生理盐水、生理盐水、补肾活血方水溶剂、骨化三醇水溶剂及阿利吉仑水溶剂  $0.5 \text{mL}$ , 1 次/d, 药物使用剂量按人鼠表面积比率换算等效计量法<sup>[11]</sup> 计算出。3 个月后处死, 心脏取血离心备用, 并小心取出双侧股骨头, 除净附着的相关组织后用湿布包裹备

用。实验动物由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 公司许可证号为 SCXK(京)2016-0006, 动物质量合格证号为 110011211102495574, 实验单位使用许可证号为 SYXK(鄂)2016-0057。

### 1.2 ELISA 法检测循环血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 及血管紧张素 II (Ang II) 的含量

将取出的血液标本离心  $15 \text{min}$  ( $4^\circ\text{C}$ ,  $4\,000 \text{r}/\text{min}$ ), 并将分开的一部分标本保存于  $-70^\circ\text{C}$  冰箱内备用, 统一采用 ELISA 法测定血清  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  及 Ang II 的表达情况。

### 1.3 RT-PCR 法检测股骨头局部 VDR、ACE、AT1R mRNA 表达情况

总 RNA 抽提、反转录、定量 PCR 操作及结果处理按照笔者前期的方法操作<sup>[5,11]</sup>。

### 1.4 骨组织免疫组化检测及图像分析

骨组织免疫组化分别按照组织脱水、组织透明、浸蜡、包埋、切片和烤片、脱蜡、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭、加一抗、加酶标二抗、加显色剂、复染、脱水、封片、镜检拍照等步骤操作。图像采用 MIQAS 医学图像定量分析系统进行数据分析: 图片中的阳性表达即为棕黄色染色区域, 调整显微镜 10 倍视野, 随机选取 3 个区, 记录阳性产物数目/总面积, 每组取 8 张切片, 计算平均值后即最终阳性细胞数目比率 (百分比)。

### 1.5 统计学方法

本研究试验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 实验数据分别采用方差分析、配对/独立样本  $t$  检验等常规统计学方法分析, 并在 SPSS16.0 软件中完成。  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠循环血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 及 Ang II 含量比较

如图 1 所示, 股骨头缺血性坏死组循环血中  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  含量明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ( $t = 7.928$ ,  $P < 0.001$ ), 而 Ang II 含量明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $t = 3.038$ ,  $P = 0.006$ )。补

肾活血方组、骨化三醇组及阿利吉仑组循环血中  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  含量明显高于股骨头缺血性坏死组,差异有统计学意义( $t=6.978, P<0.001; t=7.439, P<0.001; t=7.315, P<0.001$ ),但与正常对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ );而 Ang II 含量明显低于股骨头缺血性坏死组,差异有统计学意义( $t=3.687, P=0.001; t=2.622, P<0.016; t=4.209, P<0.001$ ),但与正常对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

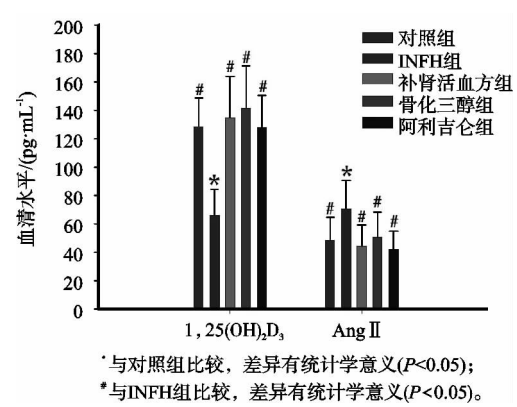


图 1 各组小鼠循环血中  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  及 Ang II 含量比较

## 2.2 各组小鼠股骨头局部 VDR、ACE、AT1R mRNA 表达情况比较

如图 2 所示,股骨头缺血性坏死组骨组织局部 VDR mRNA 的表达明显低于正常对照组,差异有统计学意义( $t=4.587, P<0.001$ ),而 ACE、AT1R mRNA 表达明显高于对照组,差异有统计学意义( $t=2.752, P=0.012; t=3.177, P=0.004$ )。补肾活血方组、骨化三醇组及阿利吉仑组骨组织局部 VDR mRNA 的表达明显高于股骨头缺血性坏死组,差异有统计学意义( $t=5.002, P<0.001; t=5.249, P<0.001; t=5.017, P<0.001$ ),但与正常对照组差异无统计学意义,差异有统计学意义( $P>0.05$ );而 ACE、AT1R mRNA 表达明显低于股骨头缺血性坏死组,差异有统计学意义( $t=3.100, P=0.005; t=3.306, P=0.003; t=3.508, P=0.002; t=3.160, P=0.005; t=3.477, P=0.002; t=3.872, P<0.001$ ),但与正常对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 2.3 各组小鼠股骨头局部骨组织免疫组织化学检测结果

免疫组化图片如图 3 所示,具体阳性表达面积百分比见图 4。股骨头缺血性坏死组骨组织局部 VDR 阳性表达面积百分比明显低于正常对照组,差异有统计学意义( $t=8.811, P<0.001$ ),而 ACE、AT1R 阳性表达面积百分比明显高于对照组,差异有统计学意义( $t=3.820, P<0.001; t=3.133, P=0.005$ )。补肾活血方组、骨化三醇组及阿利吉仑组骨组织局部 VDR

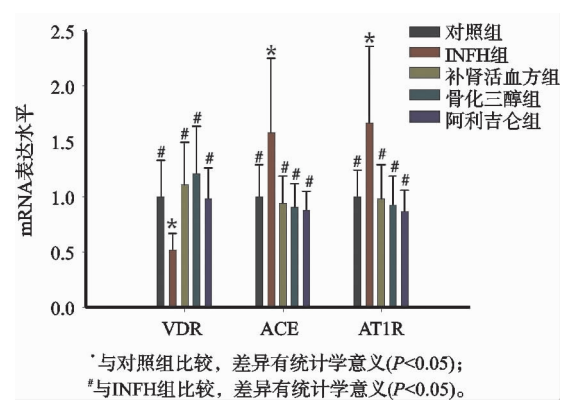


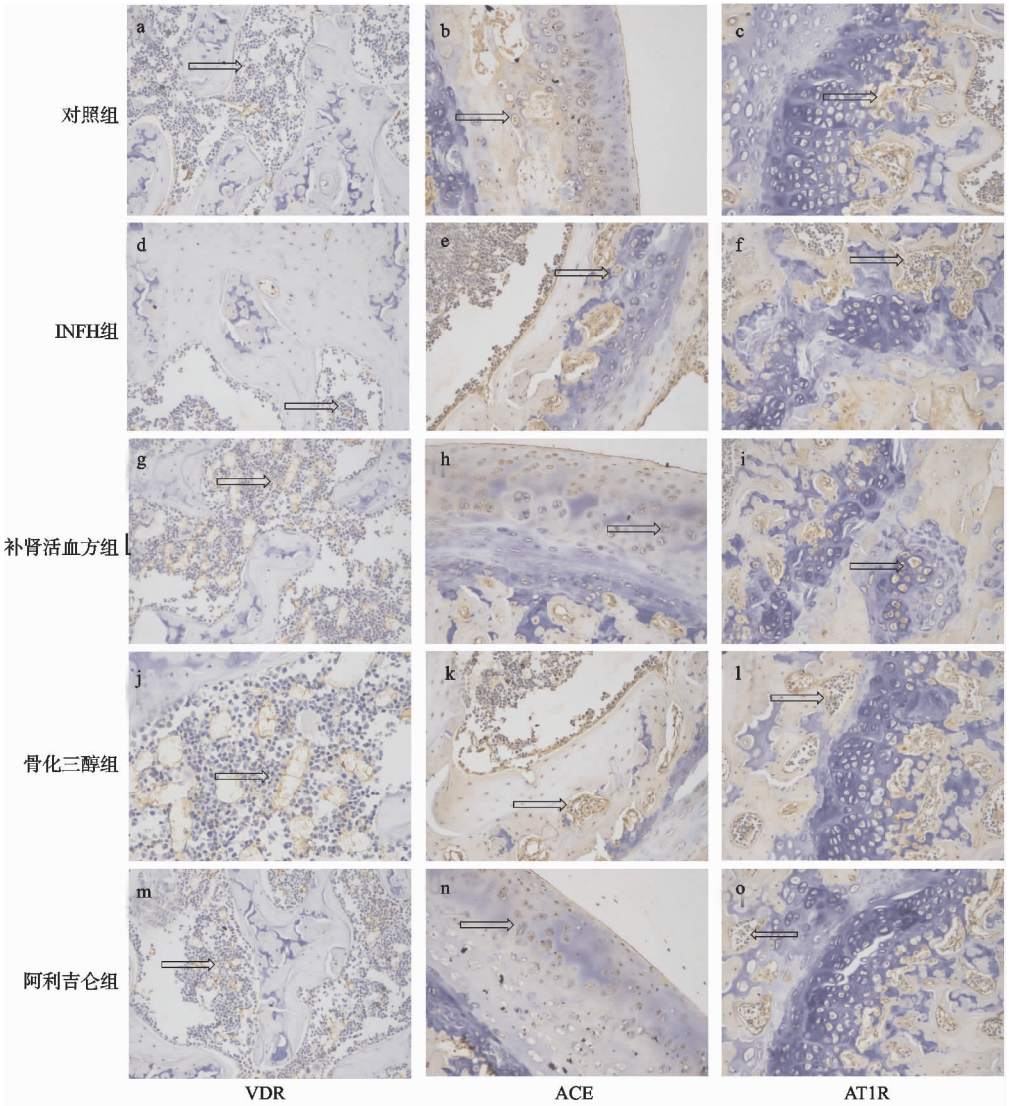
图 2 各组小鼠股骨头局部 VDR、ACE、AT1R mRNA 表达情况比较

阳性表达面积百分比明显高于股骨头缺血性坏死组,差异有统计学意义( $t=7.273, P<0.001; t=7.525, P<0.001; t=7.821, P<0.001$ ),但与正常对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ );而 ACE、AT1R 阳性表达面积百分比明显低于股骨头缺血性坏死组,差异有统计学意义( $t=3.029, P=0.006; t=2.681, P=0.014; t=4.782, P<0.001; t=3.662, P=0.001; t=4.382, P<0.001; t=4.993, P<0.001$ ),但与正常对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

经典的肾素-血管紧张素系统调控和维持着机体体液内环境的稳定,肾素-血管紧张素系统组分主要包括肾素及其受体、ACE、血管紧张素原(AGT)、Ang II 及其受体等。肾素-血管紧张素系统经典轴 ACE/Ang II/AT1R 中最重要的效应分子 Ang II 与组织局部的 AT1R 等结合,可发挥改善局部微循环障碍<sup>[6]</sup>,促炎症反应<sup>[7]</sup>,介导氧化应激反应<sup>[8]</sup>及调节骨代谢<sup>[9]</sup>等方面的作用。那么提出假设在股骨头缺血性坏死股骨头局部肾素-血管紧张素系统经典轴是否也存在上述作用有待进一步证实。

本研究中发现股骨头缺血性坏死组小鼠循环血中 Ang II 含量及骨组织局部 ACE、AT1R mRNA 的表达均高于正常对照组,这也初步说明肾素-血管紧张素系统经典轴 ACE/Ang II/AT1R 在股骨头缺血性坏死的发病机制中可能发挥作用。近年来骨组织局部肾素-血管紧张素系统与骨代谢的调控已然成为研究热点,笔者前期研究结果显示骨质疏松症模型小鼠经血管紧张素转化酶抑制剂药物治疗后,使其负骨转换状态改善,可能是通过 RANKL/OPG 信号通路调控<sup>[11]</sup>。笔者另一项前期研究结果也显示激素性骨质疏松症患者骨局部肾素-血管紧张素系统组分与骨密度有一定的相关性<sup>[12]</sup>。由此,笔者有理由推测骨局部肾素-血管紧张素系统是一个重要的骨代谢局部调节系统,可能从骨转换方面调控激素性股骨头缺血性坏死的病理



INFH组骨组织中ACE及AT1R表达较其他各组高，而VDR表达较其他各组低(如箭头所示棕色或紫色深染区为阳性表达区)

图 3 各组局部骨组织免疫组化染色

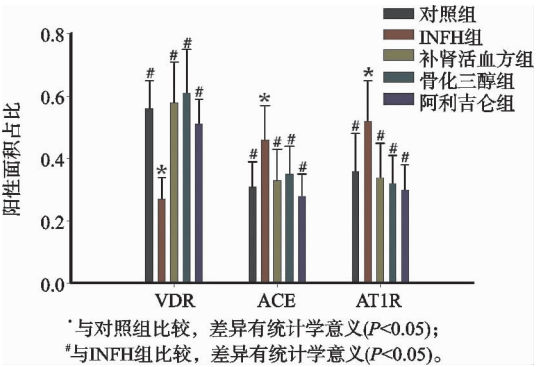


图 4 各组阳性表达所占面积百分比的比较

进程,本研究为后续进一步研究奠定了基础。

笔者前期研究显示补肾活血方可以通过改善循环血及骨组织局部 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 含量及 VDR mRNA 表达水平从而起到补肝肾强筋骨的作用,对早期股骨头缺血性坏死患者有很好的临床疗效<sup>[1-2]</sup>。而活性维生素 D 可抑制肾素-血管紧张素系统介导的病理生理功能,如有临床研究显示血中肾素-血管紧张素系统部

分组分含量与 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 水平密切相关<sup>[13]</sup>。类似的大型群组研究也得出血浆肾素、Ang II 含量与 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 水平有一定的负相关性<sup>[14]</sup>。反之,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 也可通过抑制肾素基因转录从而成为肾素-血管紧张素系统的重要内分泌负调控因子<sup>[13]</sup>,笔者的前期研究通过 micro-CT 扫描的各参数表明补肾活血方、骨化三醇、ACE 药物能明显改善激素性股骨头缺血性坏死小鼠的骨微结构,机制可能与 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/VDR 信号通路及肾素-血管紧张素系统经典轴 ACE/Ang II/AT1R 相关<sup>[15]</sup>。本研究中发现补肾活血方、骨化三醇组小鼠循环血及骨组织局部 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 含量及 VDR mRNA 表达水平明显高于激素性股骨头缺血性坏死组,而循环血及骨组织局部的 Ang II 含量及 ACE、AT1R mRNA 表达水平明显低于激素性股骨头缺血性坏死组,表明补肾活血方与骨化三醇均可激活激素性股骨头缺血性坏死小鼠体内的 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/VDR 信号通路,此信号通路激活



后可能通过负反馈调节机制调节肾素-血管紧张素系统经典轴 ACE/Ang II/AT1R, 从而使其进一步发挥生物学效应而影响股骨头缺血性坏死的进程。本实验中阿利吉仑组中的  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  含量及 VDR mRNA 表达水平也明显升高, 这可能与肾素-血管紧张素系统及  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  的负反馈调节机制相关。总之, 补肾活血方可明显激活激素性股骨头缺血性坏死小鼠体内的  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /VDR 信号通路, 进而抑制肾素-血管紧张素系统经典轴 ACE/Ang II/AT1R, 共同阻滞激素性股骨头缺血性坏死的病理进程。本研究不足之处: 未能全面研究肾素-血管紧张素系统经典轴对局部炎症因子的影响, 对局部氧化应激反应的影响, 以及对局部微循环产生的影响。此初步结论可为后续研究及临床诊治提供新的思路。

# 参考文献

- [1] SHUAI B, YANG Y, SHEN L, et al. Effects of Qing'e formula on the expression of bone metabolic markers and VDR mRNA in postmenopausal osteoporosis patients [J]. Chin Med, 2014, 5(3): 145-152.
- [2] 帅波, 沈霖, 郭向飞, 等. 密骨胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠体内  $25(\text{OH})\text{D}_3$  和  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  含量及肾脏 VDR mRNA 表达的影响 [J]. 中西医结合研究, 2009, 1(4): 177-181.
- [3] 帅波, 沈霖, 杨艳萍, 等. 补肾活血方治疗早期缺血性股骨头坏死患者的临床研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(1): 11-14.
- [4] SHUAI B, YANG Y, SHEN L, et al. Effect of Qing'e pill plus salvia on non-traumatic osteonecrosis of the femoral head of idiopathic type in earlier stage: a case report of a twelve-month of period [J]. Chin Med, 2014, 5(2): 113-117.
- [5] SHEN L, MA C, SHUAI B, et al. Effects of  $1,25$  dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  on the local bone reninangiotensin system in a murine model of glucocorticoidinduced osteoporosis [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 13(6): 3297-3304.
- [6] ABUHASHISH H M, AHMED M M, SABRY D, et al. Angiotensin (1-7) ameliorates the structural and bio-

chemical alterations of ovariectomy-induced osteoporosis in rats via activation of ACE-2/Mas receptor axis [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 2293.

- [7] METTA S, UPPALA S, BASALINGAPPA D R, et al. Association of angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with risk of ischemic heart disease in a population of smokers in southern India [J]. Journal of Clinical & Diagnostic Research, 2015, 9(4): 1-4.
- [8] LI Y, CAO Y, ZENG Z, et al. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells by inhibiting JNK/NF- $\kappa$ B pathways [J]. Scientific Reports, 2015, 5(3): 8209.
- [9] LI Y, ZENG Z, CAO Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 prevents lipopolysaccharide induced rat acute lung injury via suppressing the ERK1/2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27911.
- [10] 李雄, 袁浩, 贝美莲, 等. 大量激素冲击应用与长期应用对股骨头坏死影响的动物实验 [J]. 骨与关节损伤杂志, 1999, 14(4): 242.
- [11] 帅波, 沈霖, 杨艳萍, 等. 血管紧张素转换酶抑制剂对去卵巢骨质疏松小鼠骨组织结构的影响 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2015, 8(3): 229-235.
- [12] SHUAI B, YANG Y P, SHEN L, et al. Local renin-angiotensin system is associated with bone mineral density of glucocorticoid-induced osteoporosis patients [J]. Osteoporosis International, 2015, 26(3): 1063-1071.
- [13] LI Y C, QIAO G, USKOKOVIC M, et al. Vitamin  $\text{D}_3$ : a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure [J]. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2004, 89/90: 387-392.
- [14] 鞠云枫, 杨留才.  $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$  在调节 RAS 中的作用研究 [J]. 中国医药导报, 2009, 6(36): 21-22.
- [15] 帅波, 杨功旭, 沈霖, 等. 加味青娥丸对激素性股骨头坏死小鼠局部  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /VDR mRNA/RAS 信号转导通路的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(7): 1-5.

(收稿日期: 2021-12-12)