

加味青娥丸对激素性股骨头坏死小鼠局部 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR mRNA}/\text{RAS}$ 信号转导通路的影响

帅波¹ 杨功旭² 沈霖^{1△} 杨艳萍¹ 孙敏² 马陈¹ 徐晓娟¹ 夏雪¹

[摘要] 目的:观察加味青娥丸对激素性股骨头坏死小鼠局部 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR mRNA}/\text{RAS}$ 信号转导通路的影响,以探讨加味青娥丸治疗激素性股骨头坏死的机制。方法:8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠随机分 5 组,每组 12 只,即空白对照组(A 组)、激素性骨坏死模型组(B 组)、青娥丸加味组(C 组)、骨化三醇干预组(D 组)及血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)干预组(E 组),治疗半年后,运用 micro-CT 检测并经三维重建获得股骨头颈局部骨组织微观结构,检测股骨头颈局部 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR mRNA}/\text{RAS}$ 系统(ACE, Ang II mRNA)表达情况。结果:空白对照组(A 组)骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数目(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)较模型组(B 组)显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),结构模型指数(SMI)、骨小梁间隙(Tb. Sp)、骨表面积体积比(BS/BV)较模型组(B 组)明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),模型组股骨头局部骨小梁稀疏,孔隙率增高,结构紊乱,部分骨小梁结构不完整,表明模型成功。治疗后 C 组、D 组及 E 组 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR mRNA}$ 表达均较模型组高,差异有统计学意义($P<0.05$),而 ACE 及 Ang II mRNA 表达较模型组低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:加味青娥丸可能通过调节 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR mRNA}/\text{RAS}$ 信号转导通路而对股骨头坏死疾病的进展起到一定的治疗作用。

[关键词] 激素性股骨头坏死;青娥丸;活性维生素 D;维生素 D 受体;肾素-血管紧张素系统

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)07-0001-05

Effect of Modified Qing'e Pill on Local $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR mRNA}/\text{RAS}$ Signal Transduction Pathway in Steroid-induced Ischemic Necrosis of Femoral Head in Mice

SHUAI Bo¹ YANG Gongxu² SHEN Lin^{1△} YANG Yanping¹
SUN Min² MA Chen¹ XU Xiaojuan¹ XIA Xue¹

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

² Hubei provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430074, China.

Abstract Objective: To observe the effects of modified Qing'e Pill on the local signal transduction pathway of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR mRNA}/\text{RAS}$ in mice of steroid-induced ischemic necrosis of femoral head, and to explore the mechanism of modified Qing'e pill in the treatment of steroid induced necrosis of femoral head. **Methods:** All 60 SPF male C57BL/6 mice, 8-weeks-old, were randomly divided into 5 groups, 12 rats in each group: control group (group A), steroid induced osteonecrosis model group (group B), Qing'e pill group (group C), calcitriol intervention group (group D) and inhibitor of angiotensin converting enzyme (ACEI) intervention group (group E). Six months later, micro-CT detection and three-dimensional reconstruction were used to obtain the local bone tissue of femoral head, and the level of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, VDR mRNA and RAS system (ACE and Ang II mRNA) in the femoral head were detected. **Results:** The bone volume fraction (BV/TV), the number of trabeculae (Tb. N) and the thickness of the trabecular bone (Tb. Th) in the

blank control group A increased significantly compared with the model group (group B) ($P<0.05$), but the structure model index (SMI), trabecular space (Tb. Sp) and bone surface area volume ratio (BS/BV) were significantly lower ($P<0.05$). In the model group, the local trabecular bone of the femoral head was sparse, the porosity was increased, the structure was disturbed and some trabecular structures were incomplete. The expressions of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and VDR mRNA

基金项目:国家自然科学基金项目(81403257, 81473492,81273907)

¹ 华中科技大学同济医学院附属协和医院(武汉,430022)

² 湖北省中医院

△通信作者 E-mail:shenlinhb@sina.com

本文帅波、杨功旭为共同第一作者

NA in group C, group D and group E were higher than those in model group ($P < 0.05$). The expression of ACE and Ang II mRNA in group C, D and E was lower than that in model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Modified Qing'e pill is effective for treating the steroid-induced ischemic necrosis of femoral head through the local signal transduction pathway of $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR mRNA/RAS}$.

Keywords: steroid-induced ischemic necrosis of femoral head; Qing'e pill; $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$; Vitamin D receptor(VDR); Remin-Angiotensin system

笔者早前的多项临床研究显示补肾活血方青娥丸加味可有效改善早期股骨头缺血性坏死(Ischemic Necrosis of Femoral Head, INFH)患者脂质代谢水平、血黏度、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)及骨转换标志物如 β -I型胶原羧基端肽(β -C-Terminal Telopeptide of Type I Collagen, β -CTx)、N-端骨钙素(N-MID Osteocalcin)、总I型胶原氨基端延长肽(Total Procollagen Type I Intact N-terminal Propeptide, Total PINP, TPINP)等相关因子水平,并可有效改善局部微循环及局部骨转换状态,缓解局部骨髓水肿及其引起的相关临床症状,可能是该方治疗早期 INFH 的疗效机制之一^[1-3]。笔者的另一项研究进一步显示加味青娥丸能够提高患者血清 $25(\text{OH})\text{D}_3$, $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平,参与骨组织局部骨代谢的调节和坏死区骨组织的重建修复^[4,5]。近年来较多研究显示骨组织局部的肾素-血管紧张素系统(Renin-Angiotensin System, RAS)部分组分参与了局部骨代谢的调控^[6]。笔者在近期的一个实验中,研究了去卵巢骨质疏松小鼠经服用血管紧张素转换酶抑制剂后,对骨组织局部核因子 κB 受体活化因子配体(Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand, RANKL)和骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)mRNA表达的影响,并采用 micro-CT 检测治疗效果,结果提示血管紧张素转换酶抑制剂能部分改善小鼠骨组织负转换状态,调节骨转换^[7]。笔者临床研究的结果同时发现循环中的RAS组分与 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平密切相关,血浆中的肾素水平、血管紧张素II(Angiotensin II, Ang II)水平与 $25(\text{OH})\text{D}_3$, $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平负相关^[8]。另一项研究显示维生素D受体(Vitamin D Receptor, VDR),即VDR(-/-)或Cyp27B1(-/-)小鼠的循环血中存在相对较高含量肾素,尤其在心、肾等局部RAS活性呈现明显升高趋向^[9],这可能是因为 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的生成受到抑制或其生物学效应被阻断造成的。因此可以推断 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 是RAS的重要负内分泌调控因子,主要作用途径可能是抑制肾素基因转录。在本实验中,研究了激素性股骨头坏死小鼠分别服用青娥丸加味/骨化三醇/血管紧张素转换酶抑制剂后,对股骨头颈骨组织局部 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /

VDR mRNA/RAS 相关因子如血管紧张素转化酶(Angiotensin Converting Enzyme, ACE)及Ang II mRNA表达的影响,并采用 micro-CT 检测治疗效果,从而推测加味青娥丸可能通过调节 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR mRNA/RAS}$ 信号转导通路而对股骨头坏死疾病的进展起到一定的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 试验动物处理与分组

8周龄SPF级C57BL/6雌性小鼠60只,平均体质量为 $(20.0 \pm 6.2)\text{g}$,所有动物由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供(质量合格证号NO. 0237269;湖北省实验动物设施许可证号SYXK(鄂)2010-0057)。正常喂养1个月后,随机分5组,每组12只,即正常对照组(A组)、激素性股骨头坏死模型组(B组)、青娥丸加味组(C组)、骨化三醇干预组(D组)、血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)治疗组(E组),后四组小鼠均为激素性股骨头坏死小鼠。

1.1.1 正常对照组 正常对照组(A组)的所有小鼠连续2d静脉推注安慰剂生理盐水($10\text{ }\mu\text{g/kg}$),然后连续三次肌注安慰剂生理盐水(20 mg/kg),两次注射时间间隔为24h,1周后A组小鼠每天灌服安慰剂生理盐水 0.5 mL ,1次/d。

1.1.2 激素性股骨头坏死模型组 后四组所有小鼠均先行造模药物干预^[10],即连续2d静脉推注脂多糖(LPS, Sigma, $10\text{ }\mu\text{g/kg}$),然后连续三次肌注甲强龙(MPS, Pfizer, 20 mg/kg),两次注射时间间隔为24h。造模药物干预后1周, B组小鼠每天灌服生理盐水 0.5 mL ,1次/d。

1.1.3 青娥丸加味组 造模药物干预后1周, C组所有小鼠每天灌服青娥丸加味水溶剂 0.5 mL ,1次/d。青娥丸的剂量按人鼠表面积比率换算等效计量法^[11]计算出治疗组小鼠每次服用量,配成 0.5 mL 溶液灌服,以下小鼠服用药物剂量计算方法亦同。

1.1.4 骨化三醇组 造模药物干预后1周, D组所有小鼠每天灌服骨化三醇水溶剂 0.5 mL 。

1.1.5 血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)治疗组 造模药物干预后1周, E组所有小鼠每天灌服ACEI水溶剂 0.5 mL 。

模型建立后对双侧股骨头颈局部进行 micro-CT

检测以评估骨坏死的发生情况。各组小鼠术后不使用抗生素等药物干预,在同一条件下喂养,任其自由活动及食宿。所有小鼠灌药 3 个月后处死,立即小心取出双侧股骨(尤其保存好近端),除净附着的血液、肌肉和软组织,然后用生理盐水浸湿的纱布包裹并标记备用。

1.2 Micro-CT 测定

将股骨样本置于 Micro-CT 检测系统(仪器由武汉大学口腔医院提供,Locus SP 型,美国 GE 公司)的检测试管内,设定仪器图像分辨率为 $2\,048\times1\,024$,像素点的尺寸设定为 $20\text{Lm}\times20\text{Lm}$,层间距为 20Lm (各相关扫描参数为:电压 60 kV ,电流 $400\text{ }\mu\text{A}$,使用 360° 旋转扫描,角度增益为 2,持续时间为 142 s)。使用系统附带的 COBRA 软件进行检测,相关参数包括:1)骨小梁间隙(Trabecular Spacing, Tb. Sp);2)骨小梁的体积(Bone Volume, BV)、样本的体积(Totalvolume, TV)与骨体积分数(BV/TV);3)骨小梁厚度(Trabecular Thickness, Tb. Th);4)结构模型指数(Structure Model Index, SMI);5)骨小梁数目(Trabecular Number, Tb. N);6)骨表面积体积比(Bone Surface/Bone Volume, BS/BV)等指标^[12]。

1.3 骨组织局部 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /VDR mRNA/RAS 系统(ACE, Ang II mRNA)的检测

1.3.1 局部 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 含量的测定 将取出的干净的股骨头颈骨组织置于碎冰操作台上,吸干表面液体后将其置入盛有液氮的研钵内快速研成粉末状,称重后迅速将粉末移入匀浆器中,并按质量(g)/体积(mL)1/5 加入 PBS 缓冲液进行匀浆,将组织匀浆液离心 20 min ($20\text{ }^\circ\text{C}\,4\,000\text{ r/min}$),取上清再次离心 10 min 后备用。检测操作过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 总 RNA 抽提 将上述研钵内余下的骨组织粉末快速移入匀浆器中,并按比例加入适量 TR Izol(按 100 mg 组织+ 2 mL TR Izol 换算)溶液,低温下进行匀浆后将液体快速转移到灭菌的离心管内。再加入 $250\text{ }\mu\text{L}$ 三氯甲烷,反复颠倒离心管后静置 3 min ,离心 8 min 。取上清液加入 0.8 倍体积的异丙醇,反复颠倒混匀后放置 15 min ,离心 10 min ,管底的白色沉淀即为 RNA。吸除上清后,加入 1.5 mL 75% 乙醇洗涤沉淀,然后在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 5 min 。吸尽上清后将离心管置于超净台上吹 3 min ,加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 无 RNA 酶的水溶解 RNA。

1.3.3 相关试剂及试剂盒 Trizol Reagent:目录号为 15596-026,生产商为 Invitrogen Life Technologies 公司。定量 PCR 试剂盒:FastStart Universal SYBR Green Master(Rox),目录号为 04913914001,生产商为 Roche。引物设计:由 Invitrogen Biotechnology Co., LTD 中国公司合成。

1.3.4 引物序列,见表 1。

表 1 引物序列	
基因	引物序列(5'-3')
β -actin	F:AGACCTCTATGACAACACAGTGCTG R:TCATCGTACTCCTGCTTGCTGA
VDR mRNA	F:CTGGATCTGAACGGAGAGGATTCT R:AAGACTGGTTGGAGCGTAACATGA
ACE mRNA	F:TCTCGGTCTCCACTCCTGAACA R:AAGTGGGTTTCGTTTCGGGTA
Ang II mRNA	F:GCTAAGGACCCCACTGTTGCTA R:TGTAGATGCCATTTCGTGGTGTG

注: β -actin,内参基因;VDR,维生素 D 受体;ACE,血管紧张素转换酶;Ang II,血管紧张素 II。

1.3.5 结果处理 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法 $A=\text{CT}$ (目的基因,待测样本)− CT (内标基因,待测样本), $B=\text{CT}$ (目的基因,对照样本)− CT (内标基因,对照样本), $K=A-B$,表达倍数= $2-K^{[6]}$ 。

1.4 统计学方法

所有数据结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,运用方差分析、独立样本 t 检验等统计方法进行检验分析, $P<0.05$ 差异有统计学意义,数据运用 SPSS16.0 软件进行分析。

2 结果

2.1 小鼠股骨 Micro-CT 三维重建

造模成功后股骨头颈部的三维重建结构参数分析结果显示:局部骨质密度明显降低,骨微结构严重破坏,股骨头完整性严重受损,股骨头局部弥散分布空陷窝,局部骨小梁变细、稀疏,连接性明显较对照组差,骨小梁棒状结构多于板状结构,局部有较大的骨小梁空隙形成(见图 1)。骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度较对照组显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),结构模型指数、骨小梁间隙、骨表面积体积比较对照组明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

加味青娥丸治疗组及 ACEI 组较模型组小鼠股骨头局部骨小梁结构有明显改善,具体表现为局部骨小梁数量增多,排列较为平行、方向一致,孔隙率明显减低,骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数目(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)较模型组显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),结构模型指数(SMI)、骨小梁间隙(Tb. Sp)、骨表面积体积比(BS/BV)较模型组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。各治疗组及对照组股骨头 Micro CT 参数差异无统计学意义(见表 2)。

2.2 骨组织局部 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /VDR mRNA/RAS 系统(ACE, Ang II mRNA)的检测结果分析

治疗后模型组小鼠(B 组)骨组织局部 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 含量明显低于其他各组,差异有统计学意义($F=31.440, P<0.001$),而青娥丸治疗组(C 组),骨化三醇治疗组(D 组)及 ACEI 治疗组(E 组)的骨组织

局部 1,25(OH)₂D₃ 含量与对照组差异无统计学意义($t=0.530, P=0.597; t=1.274, P=0.205; t=0.379, P=0.705$)。治疗后模型组小鼠(B组)骨组织局部 VDR mRNA 含量明显低于其他各组,差异有统计学意义($F=38.306, P<0.001$),而青娥丸治疗组(C组),骨化三醇治疗组(D组)骨组织局部 VDR mRNA 含量与对照组差异无统计学意义($t=1.885, P=0.062; t=1.117, P=0.266$)(见图 2)。

治疗后模型组小鼠(B组)骨组织局部 ACE mRNA 含量明显高于其他各组,差异有统计学意义($F=26.788,$

$P<0.001$),而青娥丸治疗组(C组),骨化三醇治疗组(D组)及 ACEI 治疗组(E组)的骨组织局部 ACE mRNA 含量与对照组差异无统计学意义($t=0.076, P=0.940; t=0.440, P=0.660; t=0.197, P=0.844$)。治疗后模型组小鼠(B组)骨组织局部 AngII mRNA 含量明显高于其他各组,差异有统计学意义($F=11.486, P<0.001$),而青娥丸治疗组(C组),骨化三醇治疗组(D组),及 ACEI 治疗组(E组)骨组织局部 AngII mRNA 含量与对照组差异无统计学意义($t=1.339, P=0.183; t=0.710, P=0.479; t=0.206, P=0.837$)(见图 2)。

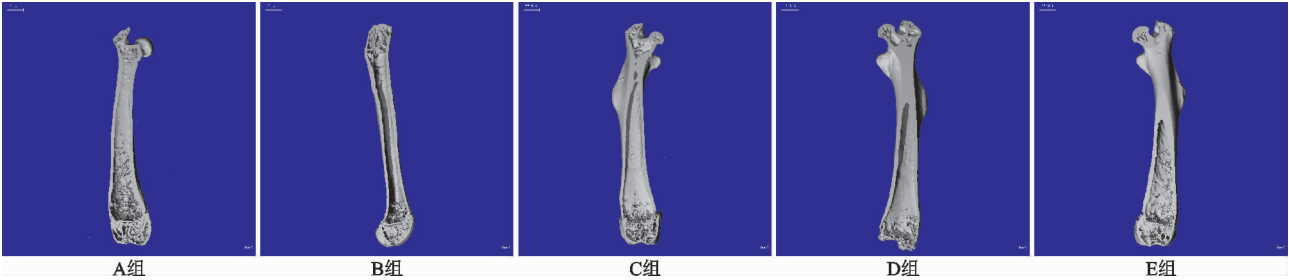


图 1 各组小鼠股骨近端三维重建结构图
表 2 三维重建后各组骨小梁结构参数分析($n=24$)

参数	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F	P
BV/TV	0.397±0.031	0.168±0.027 ¹⁾	0.379±0.029 ²⁾	0.386±0.028 ²⁾	0.381±0.026 ²⁾	286.596	<0.001
SMI	0.612±0.074	1.132±0.182 ¹⁾	0.593±0.046 ²⁾	0.616±0.069 ²⁾	0.586±0.042 ²⁾	143.243	<0.001
Tb. N	3.133±0.198	2.942±0.288 ¹⁾	3.217±0.163 ²⁾	3.192±0.172 ²⁾	3.187±0.159 ²⁾	7.357	<0.001
Tb. Th(mm)	0.182±0.009	0.175±0.006 ¹⁾	0.184±0.008 ²⁾	0.181±0.009 ²⁾	0.183±0.008 ²⁾	4.601	0.002
Tb. Sp(mm)	0.301±0.019	0.324±0.022 ¹⁾	0.312±0.021 ²⁾	0.308±0.018 ²⁾	0.311±0.019 ²⁾	4.244	0.003
BS/BV(1/mm)	17.828±1.674	19.342±1.943 ¹⁾	18.023±1.516 ²⁾	18.144±1.683 ²⁾	17.994±1.587 ²⁾	3.158	0.017

注:1) $P<0.05$ 与 A 组;2) $P<0.05$ 与 B 组。

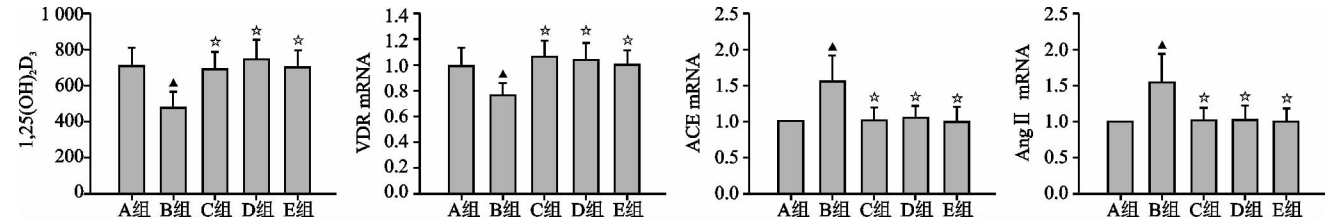


图 2 三维重建后各组骨小梁结构参数分析

3 讨论

非创伤性 INFH 在中医理论中归属“骨蚀、骨痹”范畴。患者长期使用激素类药物可损伤肾气,气虚可致血运无力成瘀,血脉痹阻不通,久则骨失所养,形成“骨痹、骨蚀”。本病大多可辩证为肾虚血瘀证(实质为本虚标实),治宜补肾活血,强筋健骨。结合前期的相关研究及长期的临床实践,笔者采用古方青娥丸加丹参治疗本病,疗效确切。方中杜仲性味甘温,入肝肾经,能补肾、强壮筋骨,补骨脂性温暖水脏,阴中生阳壮火益土,胡桃肉入肾,补肾固精、通润血脉,大蒜辛温走窜,行滞通络,四药合为青娥丸,再加用丹参活血化瘀,诸药相得益彰,共凑内充肾气、调达气血之功。经临床验证,本方在缓解患髌疼痛,促进患髌关节功能改

善方面疗效明显,但具体机制有待进一步研究^[2,3]。
本试验中的小鼠运用 Micro-CT 对其股骨头颈骨组织局部微观结构进行定量检测,有利于多角度的比较。结构参数中 BV/TV 能反映松质骨样本内骨组织体积的含量;Tb. Th, Tb. N, Tb. Sp 这些指标反映了骨小梁的几何形态特性。在实验中看到股骨头坏死区松质骨的骨小梁数量减少,空间间隙增加,骨小梁之间的连接遭到破坏。运用青娥丸加味、骨化三醇及 ACEI 药物治疗的小鼠,其股骨头颈局部骨小梁数量明显减少,空间间隙增加,骨小梁之间的连接遭到破坏等情况较未使用药物干预的模型组好,表明青娥丸加味、骨化三醇及 ACEI 药物在一定程度上可以缓减激素性股骨头坏死的进程。

近年来骨组织局部 RAS 与骨代谢的调控已然成为研究热点^[13], Ang II 可通过上调成骨细胞表面的 RANKL 从而间接增强破骨细胞前体细胞的分化成熟并活化其破骨作用,同时 Ang II 能促进尿钙的排泄,降低血钙并增加甲状旁腺激素的水平,增强骨吸收作用^[14]。笔者的一项研究显示去卵巢骨质疏松小鼠经服 ACEI 药物后,可通过调控骨组织局部 RANKL, OPG mRNA 表达,从而改善去卵巢骨质疏松小鼠骨组织负转换状态而防治骨质疏松症^[7]。笔者另一项临床研究结果显示在激素性骨质疏松症患者骨组织局部部分 RAS 组分与其 BMD 有一定的相关性,且局部 RAS 组分可能通过 RANKL/OPG 信号传导通路调节骨代谢^[6],据此,骨组织 RAS 组分是调控骨代谢的一个重要局部调节系统。临床研究也发现,血循环中 RAS 活性与体内 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平密切相关^[8,9]。经大型群组研究发现,血浆肾素含量、Ang II 含量与 $25(\text{OH})\text{D}_3$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平负相关^[14]。之前的研究表明,与体内 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 正常水平相比($\geq 30.0 \text{ ng/mL}$), $25(\text{OH})\text{D}_3$ 不足($15.0 \sim 29.9 \text{ ng/mL}$)与缺乏($< 15.0 \text{ ng/mL}$)都显著诱导体内 Ang II 高水平状态。因此 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 是 RAS 的重要负内分泌调控因子^[8],主要作用途径是抑制肾素基因转录。VDR(—/—)或 Cyp27B1(—/—)小鼠由于局部组织 RAS 活性升高,其相应地受 RAS 调控的局部生理功能也发生病理变化^[9,15]。以上结果表明,维生素 D 可抑制局部 RAS 介导的病理生理功能。

在本实验中,激素性股骨头坏死小鼠分别服用青娥丸加味/骨化三醇/血管紧张素转换酶抑制剂后,经 micro-CT 扫描显示股骨近端局部骨小梁各参数明显优于模型对照组,表明青娥丸加味/骨化三醇/血管紧张素转换酶抑制剂对 INFH 局部骨修复均起到一定的治疗作用。青娥丸加味组中骨组织局部 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平及 VDR mRNA 水平明显高于模型对照组,这均与笔者前期研究结果一致^[3,6,7,16],与骨化三醇组相比无明显差异,且局部 ACE 与 Ang II mRNA 水平明显低于模型组。但本实验由于只是初期探索性研究,样本例数有限,未做横向相关性分析,故本实验也只能推测加味青娥丸可能通过调节 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /VDR mRNA/RAS 信号转导通路而对股骨头坏死疾病起到一定的治疗作用,更进一步详细的机制探讨有待更大样本量及更深入的实验研究,尤其是 RAS 系统相关骨组织局部微循环方面的研究。

参考文献

[1] 帅波,沈霖,杨艳萍,等.早期非创伤性股骨头坏死患者脂联素及相关因子与骨髓水肿及疼痛分级的相关性研究[J].中国疼痛医学杂志,2011,17(11):643-647.

[2] 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.

[3] 帅波,沈霖,杨艳萍,等.古方青娥丸加味干预早期非创伤性股骨头缺血性坏死骨转换标志物、血流变及炎症相关因子的变化[J].中国组织工程研究,2016,20(46):6907-6914.

[4] Shuai B, Yang YP, 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.

[5] 帅波,沈霖,杨艳萍,等.阿胶强骨口服液对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度、生物力学、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的影响[J].中国骨伤,2008,21(11):850-853.

[6] Shuai B, Yang YP, Shen L, et al. Local renin-angiotensin system is associated with bone mineral density of glucocorticoid-induced osteoporosis patients[J]. Osteoporos Int, 2015, 26(3):1063-1071.

[7] 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.

[8] Yang YP, Shuai B, Shen L, et al. Effect of Qing'e formula on circulating sclerostin levels in patients with postmenopausal osteoporosis[J]. J Huazhong Univ Sci Technology Med Sci, 2015, 35(4):525-530.

[9] Li YC, Qiao G, Uskokovic M, et al. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 89-90(1-5):387-392.

[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] Zhang FY, Yang FJ, Yang JL, et al. Renin inhibition improves ovariectomy-induced osteoporosis of lumbar vertebra in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(12):1994-1997.

[12] Shuai B, Shen L, Yang YP, et al. Assessment of the impact of zoledronic acid on ovariectomized osteoporosis model using micro-CT scanning[J]. PLoS ONE, 2015, 10(7):e0132104.

[13] Garcia P, Schwenzer S, Slotte JE, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation-role of a local renin-angiotensin system [J]. Br J Pharmacol, 2010, 159(8):1672-1680.

[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] Carrara D, Bernini M, Bacca A, et al. Cholecalciferol administration blunts the systemic renin-angiotensin system in essential hypertensives with hypovitaminosis D[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2014, 15(1):82-87.

[16] Shuai B, Yang YP, 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.

(收稿日期:2017-02-02)