

## • 实验研究 •

# 温阳补肾方对激素性股骨头坏死模型兔血清中成骨、成血管因子及 H 型血管标志物的影响

宋红梅<sup>1</sup> 谢文博<sup>1,2</sup> 林菲菲<sup>3</sup> 吴毅泽<sup>2</sup> 王和鸣<sup>2△</sup>

**[摘要]** **目的:**观察温阳补肾方对兔激素性股骨头坏死血清中的成血管因子低氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子(VEGF),成骨因子骨形态发生蛋白 2(BMP2)、成骨细胞特异基因(Osterix)及 H 型血管标志物血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)、内皮黏蛋白(EMCN)的影响,探讨温阳补肾方逆转激素性股骨头坏死的作用机制。**方法:**选用 27 只健康雄性新西兰大白兔,随机分成正常组、模型组、中药组(温阳补肾方临床等效剂量组)、基因沉默组(miR-130a 抑制剂)。在造模成功后,从正常组中随机抽取 1 只,造模组中随机抽取 2 只,用于模型鉴定。采用 ELISA 试剂盒检测兔血清中低氧诱导因子、血管内皮生长因子、骨形态发生蛋白 2、Osterix、CD31、内皮黏蛋白浓度。**结果:**兔血清中低氧诱导因子、血管内皮生长因子、骨形态发生蛋白 2、Osterix、CD31、内皮黏蛋白的浓度,模型组明显低于正常组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );中药组明显高于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );基因沉默组明显低于正常组和中药组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**大量糖皮质激素的应用可下调血管内皮生长因子、低氧诱导因子、骨形态发生蛋白 2、Osterix、CD31、内皮黏蛋白的表达,从而造成骨质破坏和血供受损,导致股骨头坏死。温阳补肾方能调控成血管相关因子血管内皮生长因子、低氧诱导因子,成骨相关因子骨形态发生蛋白 2、Osterix, H 型血管标志物 CD31、内皮黏蛋白,使以上各项指标的浓度均增高,促使股骨头内部新生血管增多,增强股骨头内营养供给,从而增强骨组织的自我修复能力,这可能是温阳补肾方能够逆转激素性股骨头坏死的原因之一。

**[关键词]** 激素性股骨头坏死;温阳补肾方;血小板-内皮细胞黏附分子;内皮黏蛋白;低氧诱导因子;血管内皮生长因子;骨形态发生蛋白 2;成骨细胞特异基因

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)10-0006-06

**DOI:**10.20085/j.cnki.issn1005-0205.231002

## Effect of Wenyang Bushen Formula on Osteogenic and Angiogenic Factors and H-type Vascular Markers in Rabbit Serum in a Model of Hormone-Induced Femoral Head Necrosis

SONG Hongmei<sup>1</sup> XIE Wenbo<sup>1,2</sup> LIN Feifei<sup>3</sup> WU Yize<sup>2</sup> WANG Heming<sup>2△</sup>

<sup>1</sup> The Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China;

<sup>2</sup> Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

<sup>3</sup> Fuzhou Changle District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350299, China.

**Abstract Objective:** To observe the effects of Wenyang Bushen formula on the serum of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF), osteogenic factor bone morphogenetic protein-2 (BMP2), osterix and H-type vascular markers platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) and Endomucin (EMCN) in rabbits with hormone-induced femoral head necrosis, and to explore the mechanism of Wenyang Bushen formula in correcting and

reversing hormone-induced femoral head necrosis. **Methods:** 27 healthy male New Zealand white rabbits were randomly divided into normal group, model group, traditional Chinese medicine group (clinical equivalent dose group of Wenyang Bushen prescription) and gene silencing group (miR-130a inhibitor). After successful modeling, 1 animal was randomly

基金项目:国家自然科学基金项目(81973879)

<sup>1</sup> 福建中医药大学附属第二人民医院(福州, 350003)

<sup>2</sup> 福建中医药大学

<sup>3</sup> 福州市长乐区中医院

<sup>△</sup>通信作者 E-mail: whm27@126.com

selected from the normal group and 2 animals were randomly selected from the modeling group for model identification. The concentrations of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, BMP2, osterix, CD31 and EMCN in rabbit serum were determined by ELISA kit.

**Results:** The concentrations of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, BMP2, osterix, CD31 and EMCN in rabbit serum were significantly lower in model group than that in normal group ( $P<0.05$ ), significantly higher in traditional Chinese medicine group than that in model group ( $P<0.05$ ), and significantly lower in silent group than that in normal group and traditional Chinese medicine group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The use of a large number of glucocorticoids could down-regulate the expression of VEGF, HIF- $\alpha$ , BMP2, Osterix, CD31, and EMCN, further cause bone destruction and impaired blood supply, and lead to osteonecrosis of femoral head. Wenyang Bushen formula can regulate angiogenesis-related factors VEGF and HIF- $\alpha$ , osteogenesis-related factors BMP2 and Osterix, and H-type vascular markers CD31 and EMCN, increase the concentrations of the above indicators, and angiogenesis in the femoral head, enhance the internal nutrition supply of femoral head, thereby enhancing the self-repair ability of bone tissue, redress the lesion, which may be one of the mechanisms of Wenyang Bushen formula on the treatment of steroid-induced avascular necrosis of femoral head.

**Keywords:** hormone-induced femoral head necrosis; Wenyang Bushen formula; platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31); endomucin-1 (EMCN); hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ ); vascular endothelial growth factor (VEGF); bone morphogenetic protein-2 (BMP2); osterix

激素性股骨头坏死(Steroid-induced Avascular Necrosis of Femoral Head, SANFH)是最常见的激素副作用,随着激素的应用本病的发病率日渐升高<sup>[1-2]</sup>,属中医“痹证”中的骨痹、“痿证”中的骨痿,病机为肾阳虚衰、血脉瘀滞<sup>[3]</sup>,故本病的治则为补肾强骨、活血化瘀<sup>[4]</sup>。王和鸣老师据此拟定温阳补肾方,通过温肾通脉,以求强筋壮骨。本课题的前期研究证明温阳补肾方能减少骨质破坏、促使新骨生成<sup>[5-7]</sup>。本研究进一步观察温阳补肾方在活血化瘀方面的疗效,探讨此方治疗激素性股骨头坏死的机制,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物和分组** 普通级雄性新西兰大白兔 27 只,体质健康,体重为 2.74~3.45 kg,统一由上海市松江区车墩实验动物良种场有限公司提供。在实验开始前,以标准条形饲料适应性喂养 2 周。

通过随机数字表法将以上新西兰大白兔分为正常组 7 只、造模组 20 只,结束适应性喂养后开始造模。造模成功后从正常组随机抽取 1 只大白兔,造模组随机抽取 2 只,进行模型鉴定。正常组余下 6 只大白兔,造模组余下 18 只。再次通过随机数字表法将造模组大白兔细分为模型组、中药组(温阳补肾方临床等效剂量组)和基因沉默组(miR-130a 抑制剂组),每组各 6 只。

**1.1.2 实验药品和试剂** 温阳补肾方由巴戟天 15 g、黄芪 15 g、骨碎补 9 g、丹参 9 g、淫羊藿 9 g、郁金 9 g、牛膝 9 g、鹿角胶 6 g、三七 3 g、甘草 3 g 组成,由福建省第二人民医院提供;马血清,北京索莱宝科技有限公司,货号为 925T051;miR-130a 抑制剂,广州锐博生物科技有限公司,批号为 NO116;甲基强的松龙,国药集团化学试剂有限公司,批号为 DD4077;注射用青霉素

钠,江西省科达动物药业有限公司,批号为 20200910;兔 CD31 分子(CD31)ELISA 检测试剂盒、兔 Osterix 蛋白(OSX)ELISA 检测试剂盒、兔血管内皮细胞生长因子(VEGF)ELISA 检测试剂盒、兔低氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ELISA 试剂盒、兔骨形态发生蛋白 2 (BMP2)ELISA 检测试剂盒、兔内皮黏蛋白(EMCN) ELISA 检测试剂盒,上海江莱生物科技有限公司,批号分别为 JL61391、JL51410、JL10136、JL22086、JL16961、JL51401。

**1.1.3 实验仪器** 酶标仪,美国伯乐公司 DHG-9091A;漩涡混合器,德国 IKA;KH-BL 型包埋机,备案号鄂孝感械备 20170019 号;黏附载玻片,货号为 80312-3161,规格为 25 mm $\times$ 75 mm,1.00~1.20 mm;显微镜盖玻片,货号为 80340-1630,规格为 24 mm $\times$ 50 mm,0.13~0.16 mm。

### 1.2 方法

**1.2.1 模型建立和鉴定** 本研究采用马血清联合甲基强的松龙的方法进行造模<sup>[8]</sup>。造模后从正常组随机选取 1 只兔子,造模组随机选取 2 只用于模型鉴定。对选取的兔子行空气栓塞法处死,取双侧股骨头,经冠状面分成两份,一份冰冻备用,一份用 10% 中性福尔马林溶液(0.1 mol/L, pH=7.4)固定 48 h,再置于 10% EDTA-Tris 缓冲液中脱钙处理,隔天更换脱钙液,确认完全脱钙后流水冲洗、乙醇逐级脱水及二甲苯透明处理,接着石蜡包埋切片,厚度为 4  $\mu$ m,常规苏木精-伊红(HE)染色。光镜下观察切片中骨细胞及骨小梁的病理改变,若切片提示骨细胞核固缩或偏移、部分核深染,骨小梁内异常骨细胞比例增多且骨小梁结构松散,骨细胞未见于骨陷窝内,同时观测到明显增加的空骨陷窝,则提示实验造模成功。

**1.2.2 给药剂量和方法** 正常组与模型组用生理盐水灌胃,灌胃量为 3 mL/kg,1 次/d。中药组采用温阳补肾方灌胃,灌胃剂量的计算根据 Meeh-Rubner 公式<sup>[9]</sup> ( $A(\text{体表面积}, \text{m}^2) = [K(\text{系数}) \times W(\text{体重}, \text{g}) \times 2/3] \times 10^{-4}$ ) 及人与兔用药剂量的换算公式,计算结果为新西兰大白兔正常干预所需药量是人干预药量的 3.22 倍。温阳补肾方的成人用药剂量为 2 g/(kg · d),故中药组给予 6.44 g/(kg · d) 温阳补肾方灌胃。miR-130a 基因沉默组腹腔注射 25 mg/kg miR-130a 抑制剂锁核酸(Locked Nucleic Acid, LNA)-anti-miR-130a。以上各组灌胃持续干预 12 周。

**1.2.3 取材方法** 取材前先禁食 24 h,接着对大白兔行腹腔内推注麻醉,麻醉剂选用水合氯醛,麻药量为 5 mL/kg。麻醉后从大白兔腹主动脉抽取血液,并用离心机分离出血清冻存,然后进行股骨头取材,取材步骤参照模型鉴定。

### 1.3 观察内容和检测指标

**组织病理学观察:**取大白兔两侧股骨头进行苏木精-伊红染色,在光镜下观察股骨头各组织的病理改变并计算空骨陷窝率。

**应用 ELISA 试剂盒检测兔血清中 CD31、EMCN、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、BMP2、osterix 浓度。**

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS25.0 软件分析所得数据。定量资料符合正态分布,采用单因素方差分析,以  $\bar{x} \pm s$  形式表示;

不符合正态分布,采用多个独立样本比较的秩和检验,显著性水平  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 组织病理学观察

**2.1.1 股骨头 HE 染色** 正常组:骨小梁结构完整,未见断裂、缺失等骨坏死表现,排列致密规则。股骨头软骨层光滑均匀,未见薄弱化改变,各层细胞排列整齐均匀,软骨细胞丰富,骨细胞未见形态异常,细胞核居于骨陷窝内,仅有少数分散的空骨陷窝。骨髓细胞大量分布于骨髓腔中,脂肪细胞的形态及大小均未见明显异常(见图 1)。

**模型组:**可观测到软骨面裂纹,软骨层较正常组更薄。骨小梁结构松散不完整,细长而窄,排列不规则,甚至出现缺失和断裂。与正常组相比,模型组的软骨细胞、骨细胞明显减少,空骨陷窝明显增多,并且可见呈肥大化改变的脂肪细胞大量分布于髓腔内,骨髓细胞减少(见图 2)。

**基因沉默组:**与模型组相比,基因沉默组的股骨头软骨层变得更薄,骨小梁的破坏和断裂也愈加明显,软骨细胞和骨细胞进一步减少,并可见大量空骨陷窝,而骨髓细胞几乎不可见(见图 3)。

**中药组:**各个骨组织形态与正常组接近。骨小梁排列规则,软骨细胞较模型组和基因沉默组增多,软骨层增厚,各层细胞分布均匀,偶见少量空骨陷窝(见图 4)。

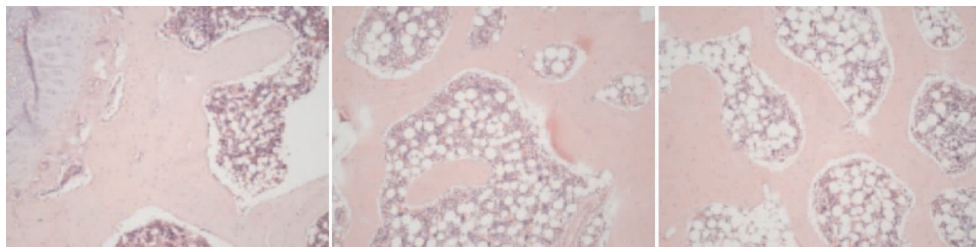


图 1 正常组股骨头 HE 染色(骨细胞、脂肪细胞形态正常,空骨陷窝罕见,×100)

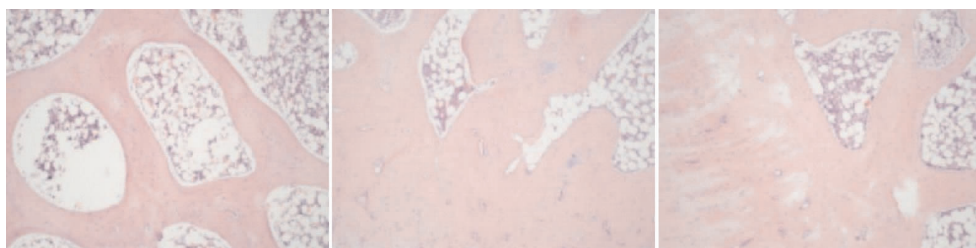


图 2 模型组股骨头 HE 染色(空骨陷窝数量较正常组明显增多,脂肪细胞增多,骨细胞减少,×100)

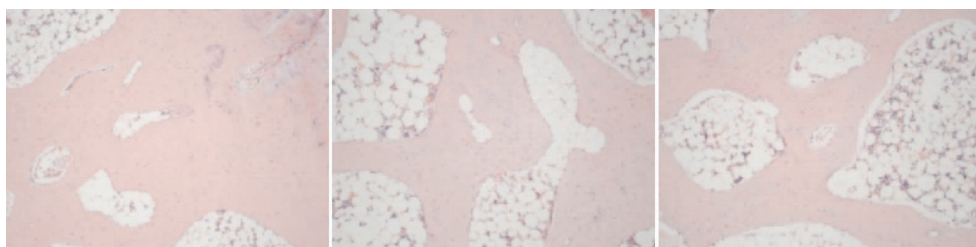


图 3 基因沉默组股骨头 HE 染色(与模型组相比空骨陷窝进一步增多,脂肪细胞大量分布,骨髓细胞罕见,×100)

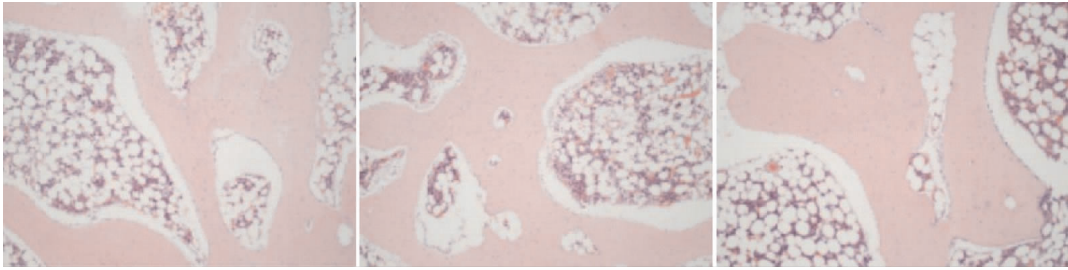


图 4 中药组股骨头 HE 染色(各骨组织形态与正常组接近,偶见少量空骨陷窝,×100)

2.1.2 各组空骨陷窝率对比 各组空骨陷窝率对比,见表 1。

表 1 各组空骨陷窝率对比( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	空骨陷窝率
正常组	0.03±0.01 <sup>1)2)3)</sup>
模型组	0.12±0.03 <sup>2)3)4)</sup>
中药组	0.09±0.03 <sup>1)3)4)</sup>
基因沉默组	0.19±0.04 <sup>1)2)4)</sup>
<i>F</i>	62.78
<i>P</i>	<0.01

注:1)与模型组比较,  $P<0.05$ ; 2)与中药组比较,  $P<0.05$ ; 3)与基因沉默组比较,  $P<0.05$ ; 4)与正常组比较,  $P<0.05$ 。

2.2 血清中成骨、成血管因子及 H 型血管标志物的浓度对比

2.2.1 成血管相关因子 VEGF 和 HIF- $\alpha$  浓度 成血管相关因子 VEGF 和 HIF- $\alpha$  浓度见表 2。

表 2 血清 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 浓度( $\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}, n=6$ )

组别	HIF-1 $\alpha$	VEGF
正常组	7.52±0.57 <sup>1)3)5)</sup>	56.73±4.31 <sup>2)4)6)</sup>
模型组	4.91±0.42 <sup>3)5)7)</sup>	39.55±3.15 <sup>4)6)8)</sup>
中药组	6.30±0.45 <sup>1)5)7)</sup>	45.76±2.81 <sup>2)6)8)</sup>
基因沉默组	3.35±0.57 <sup>1)3)7)</sup>	25.70±4.66 <sup>2)4)8)</sup>
<i>F</i>	75.55	74.00
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:与模型组比较, 1)  $P<0.05$ , 2)  $P<0.05$ ; 与中药组比较, 3)  $P<0.05$ , 4)  $P<0.05$ ; 与基因沉默组比较, 5)  $P<0.05$ , 6)  $P<0.05$ ; 与正常组比较, 7)  $P<0.05$ , 8)  $P<0.05$ 。

2.2.2 成骨相关因子 BMP2 和 osterix 浓度 成骨相关因子 BMP2 和 osterix 浓度见表 3。

表 3 血清 BMP2 和 osterix 浓度( $\bar{x}\pm s, \text{ng/mL}, n=6$ )

组别	BMP2	osterix
正常组	3.20±0.32 <sup>1)3)5)</sup>	1.73±0.09 <sup>2)4)6)</sup>
模型组	1.90±0.23 <sup>3)5)7)</sup>	0.79±0.14 <sup>4)6)8)</sup>
中药组	2.67±0.16 <sup>1)5)7)</sup>	1.24±0.14 <sup>2)6)8)</sup>
基因沉默组	1.22±0.27 <sup>1)3)7)</sup>	0.49±0.09 <sup>2)4)8)</sup>
<i>F</i>	72.15	128.93
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:与模型组比较, 1)  $P<0.05$ , 2)  $P<0.05$ ; 与中药组比较, 3)  $P<0.05$ , 4)  $P<0.05$ ; 与基因沉默组比较, 5)  $P<0.05$ , 6)  $P<0.05$ ; 与正常组比较, 7)  $P<0.05$ , 8)  $P<0.05$ 。

2.2.3 H 型血管标志物 CD31 和 EMCN 浓度 H 型血管标志物 CD31 和 EMCN 浓度见表 4。

表 4 血清 CD31 和 EMCN 浓度( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	CD31/( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	EMCN/( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
正常组	138.65±8.25 <sup>1)3)5)</sup>	2.33±0.30 <sup>2)4)6)</sup>
模型组	83.98±2.99 <sup>3)5)7)</sup>	1.22±0.09 <sup>4)6)8)</sup>
中药组	110.85±3.11 <sup>1)5)7)</sup>	1.57±0.25 <sup>2)6)8)</sup>
基因沉默组	69.78±11.99 <sup>1)3)7)</sup>	0.77±0.16 <sup>2)4)8)</sup>
<i>F</i>	96.45	56.01
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:与模型组比较, 1)  $P<0.05$ , 2)  $P<0.05$ ; 与中药组比较, 3)  $P<0.05$ , 4)  $P<0.05$ ; 与基因沉默组比较, 5)  $P<0.05$ , 6)  $P<0.05$ ; 与正常组比较, 7)  $P<0.05$ , 8)  $P<0.05$ 。

3 讨论

首先,激素的使用导致人体经脉壅塞、气血不通、髓海瘀阻,髓死而骨枯;其次,激素久用耗伤肾之阴精,肝肾同源,致肝阴亏耗,后天之本由于先天之精的亏耗而失养,脾胃气虚导致推动血行的能力下降,气为血之帅,故最终致使血脉瘀滞。有研究表明<sup>[10]</sup>对健康大鼠使用糖皮质激素可使骨量减少、骨吸收增强,最终增加脆性、降低骨生物结构的稳定性,造成股骨头坏死、骨折概率增高。综合当前研究,总结应用糖皮质激素导致的骨改变的特征,大致可概括为骨内高压、血流异常、凝血障碍及血栓形成,这些现象相当于中医证型中血瘀证的改变。温阳补肾方的具体组成为巴戟天、淫羊藿、骨碎补、鹿角胶、丹参、郁金、三七、黄芪、牛膝、甘草。其中巴戟天为君药,温补肾阳,有强筋骨、祛风湿之功效。淫羊藿、骨碎补、鹿角胶皆为臣药,补益肝肾、填精益髓,辅助巴戟天行温阳补肾之责。丹参、郁金、三七有活血祛瘀之功效,黄芪可补气升阳举陷,四种药物补气活血并举,均为佐药。牛膝可补肾强骨、逐瘀通经,具有引血下行之功效,可使药效直达病所;甘草调和诸药、甘缓止痛,两者共为使药。诸药配合,活血与补肾并重,温阳与化瘀并举,共奏补益肝肾、强筋壮骨之功效。通过对大量临床病例的观察,发现在应用温阳补肾方后,激素性股骨头坏死患者的病情得到明显缓解,说明该方对激素性股骨头坏死有确切疗效。

研究表明激素性股骨头坏死的发生机制可能为糖皮质激素的过度使用,引发了成骨细胞和破骨细胞的



凋亡,造成了血管内皮损伤,使血液处于高凝状态,导致了血管炎和血管栓塞等<sup>[11]</sup>。近年发现在骨组织内有一种特殊的、CD31 和内皮黏蛋白高表达的血管亚型,称为 H 型血管,故认为 CD31 和内皮黏蛋白作为 H 型血管标志物,其浓度的高低可反映 H 型血管数量的多少。有研究<sup>[12]</sup>通过免疫荧光分析小鼠股骨干骺端 H 型血管的形成,结果显示在应用糖皮质激素后,小鼠股骨干骺端 H 型血管表达下降;体外细胞实验发现,糖皮质激素能够直接抑制内皮细胞形成血管。综上所述,血管的损伤是最终导致股骨头坏死的原因之一。因此,如何促进血管和骨质的修复成为扭转病程的关键,而 H 型血管和 miR-130a 在血管生成过程中起重要作用,能促进骨生成及血管再生,从而逆转股骨头坏死的进程。H 型血管对于介导血管的生长、维持血管周围骨祖细胞的数量、偶联成血管和成骨过程有重要作用。H 型血管与骨量的关系紧密,H 型血管密度的高低与骨量的多少成正比,可作为观察骨密度的早期标记<sup>[13]</sup>。有研究通过使用柚皮苷对骨质疏松大鼠进行治疗,得出以下结论:柚皮苷可以通过促进 H 型血管生成,来调节骨代谢、改善骨密度。H 型内皮细胞通过旁分泌等途径,促进软骨内成骨的进程,从而发挥促成骨功能;同时,H 型内皮细胞的自我调控也与成血管、成骨过程密切相关<sup>[14]</sup>。因此,可从生成 H 型血管入手来增加骨量、提高骨密度,使骨病变进程逆转,达到治疗股骨头坏死的目的。miR-130a 则被认为在血管生成方面起着重要作用,可能是通过激活血管内皮细胞的 PTEN/PI3K/AKT 信号通路,从而促使血管新生<sup>[15-16]</sup>。血管内皮生长因子不仅可以促进骨组织的血管生成,为血管生成提供信号,还能够调节骨生成,促进血管内皮生长因子等细胞因子的分泌,可以加速股骨头的再血管化和再骨化进程<sup>[17-18]</sup>。低氧诱导因子对血管生成的调节作用是通过调控血管内皮生长因子的转录与表达实现的。Osterix 是迄今为止发现的唯一一个成骨细胞特异性转录因子,在干细胞向成骨细胞分化过程中起决定性作用<sup>[19]</sup>。骨形态发生蛋白 2 可促进成骨相关细胞的存活和再生,最终促进骨形成,有研究表明促进骨形态发生蛋白 2 的过表达能够增强骨髓间充质干细胞成骨分化<sup>[20]</sup>。因此,对于温阳补肾方的治疗效果的评估,可通过对成血管相关因子血管内皮生长因子和低氧诱导因子,成骨相关因子骨形态发生蛋白 2 和 osterix,H 型血管标志物 CD31 和内皮黏蛋白的观察进行解读。

本研究选用成血管相关因子血管内皮生长因子和低氧诱导因子,成骨相关因子骨形态发生蛋白 2 和 osterix,H 型血管标志物 CD31 和内皮黏蛋白作为观察对象,旨在观察用药前后及 miR-130a 基因沉默前后

兔血清中各指标浓度的变化,以进一步探究温阳补肾方逆转激素性股骨头坏死的作用机制。

本实验结果表明:1)空骨陷窝率的数据显示,模型组空骨陷窝率明显高于正常组,提示本实验造模成功;中药组空骨陷窝率明显低于模型组,提示温阳补肾方对激素性股骨头坏死疗效确切;基因沉默组空骨陷窝率明显高于正常组,提示沉默 miR-130a 基因的表达会导致股骨头坏死。2)成血管因子低氧诱导因子和血管内皮生长因子数据显示,模型组低氧诱导因子和血管内皮生长因子浓度明显低于正常组,中药组浓度明显高于模型组,基因沉默组浓度明显低于正常组和中药组,表明温阳补肾方对促进血管生成起积极作用。3)成骨因子骨形态发生蛋白 2 和 osterix 数据提示,模型组骨形态发生蛋白 2 和 osterix 浓度明显低于正常组,中药组浓度明显高于模型组,基因沉默组浓度明显低于正常组和中药组,表明温阳补肾方对促进骨质生成起积极作用。4)H 型血管标志物 CD31 和内皮黏蛋白数据提示,模型组 CD31 和内皮黏蛋白浓度明显低于正常组,中药组浓度明显高于模型组,基因沉默组浓度明显低于正常组和中药组,表明温阳补肾方对刺激 H 型血管标志物的表达有正向作用。

综上所述,温阳补肾方可使 H 型血管标志物的表达提高,通过促进血管形成,改善坏死股骨头内部的循环与代谢,从而促使骨质新生,实现激素性股骨头坏死股骨头的修复,扭转激素性股骨头坏死进程,是逆转激素性股骨头坏死的机制之一。

## 参考文献

- [1] WU H, CHEN G C, ZHONG G B. Mechanism of vascular endothelial cell-derived exosomes modified with vascular endothelial growth factor in steroid-induced femoral head necrosis[J]. Biomedical Materials (Bristol), 2023, 18(2): acb412.
- [2] CHEN D, ZHONG D M, MEI R H. Screening and identification of potential key biomarkers for glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2023, 18(1): 28.
- [3] 赵万军, 肖鲁伟, 周辉, 等. 激素性股骨头坏死中医病机学实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2005, 13(2): 23-27.
- [4] 骆帝, 梁学振, 阎博昭, 等. 补肾活血胶囊对激素性股骨头坏死大鼠骨破坏的修复[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(2): 184-191.
- [5] 宋红梅, 吴斌, 魏迎辰, 等. 温阳补肾方对兔激素性股骨头坏死血清 OPG、RANK、RANKL 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(12): 1-3.
- [6] 宋红梅, 魏迎辰, 吴斌, 等. 温阳补肾方对兔激素性股骨头坏死组织通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(1): 302-305.
- [7] 宋红梅, 吴斌, 魏迎辰, 等. 温阳补肾方对激素性股骨头坏

- 死模型兔股骨头形态学的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(3): 1-3.
  - [8] 王伟, 刘利英, 王坤正, 等. 激素性股骨头坏死模型的建立及其发病机理的探讨[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2007, 28(5): 544-547.
  - [9] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004(9): 1069-1072.
  - [10] 李捷, 刘玲萍, 陈宏, 等. 糖皮质激素作用下大鼠股骨远端松质骨超微结构改变: 扫描电镜观察结果[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(9): 1521-1524.
  - [11] 葛彦志, 黄培洁, 瞿杭波, 等. 基于生物信息学分析鉴定激素性股骨头坏死的关键生物标志物及相关免疫细胞浸润[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2022, 15(6): 467-474.
  - [12] 申前进, 吕珊, 阳文新, 等. 糖皮质激素通过抑制内皮细胞形成骨血管导致骨质疏松的实验研究[J]. 颈腰痛杂志, 2019, 40(6): 727-731.
  - [13] 上官文姬, 张跃辉, 岳江, 等. 柚皮苷通过 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号促进 H 型血管抗骨质疏松的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(12): 1755-1759.
  - [14] ZHOU J P, LI Y W, HE J H, et al. ROS scavenging graphene-based hydrogel enhances type H vessel formation and vascularized bone regeneration via zeb1/notch1 mediation[J]. Macromolecular Bioscience, 2023, 23(4): e2200502.
  - [15] XIAO Y S, LIU L L, ZHENG Y Z, et al. Kaempferol attenuates the effects of XIST/miR-130a/STAT3 on inflammation and extracellular matrix degradation in osteoarthritis[J]. Future Medicinal Chemistry, 2021, 13(17): 1451-1464.
  - [16] 郑森元, 刘芳, 赫晓磊, 等. 食管鳞癌细胞外泌体中-对血管新生的作用及其机制[J]. 中国癌症防治杂志, 2021, 13(1): 50-55.
  - [17] JABALEE J, FRANZ-ODENDAAL T A. Vascular endothelial growth factor signaling affects both angiogenesis and osteogenesis during the development of scleral ossicles[J]. Dev Biol, 2015, 406(1): 52-62.
  - [18] 吴云刚, 童培建, 肖鲁伟, 等. 激素性股骨头坏死介入治疗过程中 VEGF 表达的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2002, 10(4): 32-36.
  - [19] WIRTH F, HUCK K, LUBOSCH A, et al. Cdc42 in osterix-expressing cells alters osteoblast behavior and myeloid lineage commitment[J]. Bone, 2021, 153: 116150.
  - [20] 阮锋, 李贺伟, 龚艳琳, 等. 干扰环状核糖核酸 zeste 基因增强子同源物 2 促进骨髓间充质干细胞成骨分化的机制研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(10): 7-12.
- (收稿日期: 2023-03-14)
- 
- (上接第 5 页)
- [14] YAHIRO T, KATAOKA N, NAKAMURA Y, et al. The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation[J]. Scientific Reports, 2017, 10(7): 5031.
  - [15] BENNETT G J, OCHOA J L. Thermographic observations on rats with experimental neuropathic pain[J]. Pain, 1991, 45(1): 61-67.
  - [16] BITAR N E, POLLIN B, KARROUM E, et al. Thermoregulatory vasomotor tone of the rat tail and paws in thermoneutral conditions and its impact on a behavioral model of acute pain[J]. Journal of Neurophysiology, 2014, 112(9): 2185-2198.
  - [17] MEI J, RIEDEL N, GRITTNER U, et al. Body temperature measurement in mice during acute illness; implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 3526.
  - [18] VAINER B G. A novel high-resolution method for the respiration rate and breathing waveforms remote monitoring[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2018, 46(7): 960-971.
- (收稿日期: 2023-04-03)