

## · 基础研究 ·

## 活血通络方加不同引经药对股骨头坏死兔成骨相关因子的影响

王荣田<sup>1</sup>, 孔祥英<sup>2</sup>, 田能<sup>2</sup>, 林娜<sup>2</sup>, 陈卫衡<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**【摘要】** 目的: 观察活血通络方配伍不同引经药对股骨头坏死兔血清骨钙素(BGP)、骨形态发生蛋白-2(BMP-2)含量及股骨头 BMP-2 mRNA 表达的影响, 探讨其防治股骨头坏死的作用机制。方法: 健康雄性日本大耳白兔 98 只, 体重 2.2~2.8 kg。84 只兔经液氮冷冻左侧股骨头法建立股骨头坏死模型后, 随机分为 6 组, 每组 14 只: 模型组, 活血通络方组, 以及活血通络方分别加牛膝、独活、细辛、桔梗组(分别简称活骨、牛膝、独活、细辛、桔梗组)。另外 14 只设为伪手术组。造模后药物组分别给予相应的中药, 模型和伪手术组给予生理盐水灌胃, 所有动物皮下注射重组人粒细胞集落刺激因子( $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连续 7 d)。实验 2、4 周时分别取材, 放射免疫法和酶联免疫法分别检测血清 BGP 和 BMP-2 含量, 左侧股骨头行苏木精-伊红染色观察组织病理学改变, 原位杂交法检测 BMP-2 mRNA 表达。结果: 与伪手术组相比, 模型组股骨头空骨陷窝率显著增多, 2 周时血清 BGP 升高, 4 周时血清中 BMP-2 含量及股骨头 BMP-2 mRNA 降低。与模型组相比, 活骨组空骨陷窝率降低, 2、4 周时血清 BGP、BMP-2 含量及股骨头 BMP-2 mRNA 的表达均升高。与活骨组比较: 牛膝组 4 周时空骨陷窝率显著减少, 血清 BGP、BMP-2 及股骨头 BMP-2 mRNA 升高; 桔梗组空骨陷窝有降低趋势, 且 2、4 周时血清 BGP 降低, 2 周时血清 BMP-2 降低, 4 周时股骨头 BMP-2 mRNA 降低; 独活组 2 周时血清 BMP-2 含量和股骨头 BMP-2 mRNA 的表达升高; 细辛组各项指标未见明显改变。结论: 引经药牛膝可以进一步提高活血通络方上调血清 BGP、BMP-2 含量和股骨头内 BMP-2 mRNA 表达的作用, 这可能是其促进骨成有效防治股骨头坏死的机制之一。

**【关键词】** 股骨头坏死; 骨钙素; 骨形态发生蛋白受体, II 型; 中草药

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.07.015

**Effects of promoting blood circulation to remove meridian obstruction combined with medicinal guides on related osteogenesis factors in rabbits with femoral head necrosis**

WANG Rong-tian, KONG Xiang-ying, TIAN Neng, LIN Na\*, and CHEN Wei-heng#. \*Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; #Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

**ABSTRACT Objective:** To observe effects of blood circulation promoting compounds combined with medicinal guides on content of bone glaprotein (BGP), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and expression of BMP-2 mRNA in rabbits with femoral head necrosis, and explore its mechanism. **Methods:** Ninety-eight healthy Spragur-Dawley male rabbits were collected and weighted 2.2 to 2.8 kg. Eighty-four rabbits were built femoral head necrosis model by freezing left femoral head in liquid nitrogen, then randomly divided into 6 groups, 14 in each group. The 6 groups included model group, promoting blood circulation to remove meridian obstruction group, promoting blood circulation to remove meridian obstruction combined with achyranthes bidentata group, radix angelicae pubescentis, asarum group, and platycodon grandiflorum group, other 14 rabbits were sham operation group. While drug groups were administrated corresponding Chinese herb after molding, model group and shamp operation group were given saline. Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor ( $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) were injected into all rabbits for 7 days. Samples were taken on the second and fourth week, the content of BGP and BMP-2 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELSA) and radioimmunoassay (RIA), histopathological changes of left femoral head were observed by Hematoxylin and Eosin staining (HE), and expression of BMP-2 mRNA were tested by fluorescence in situ hybridization. **Results:** Compared with sham operation group, the rate of empty lacunae femoral head were obviously increased in model group, and the content of BGP were increased on the second week, and BMP-2 and BMP-2 mRNA were decreased on the fourth week. Compared with model group, the content of BGP, BMP-2 and BMP-2 mRNA were higher both of the second and fourth week in promoting blood circulation to remove meridian obstruction group. The rate of empty la-

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 30672770)

Fund program: National Natural Science Foundation of China; General Program (No. 30672770)

通讯作者: 林娜 E-mail: linna888@163.com; 陈卫衡 E-mail: drchenweiheng@163.com

cunae femoral head were lower in achyranthes bidentata group, BGP, BMP-2 and BMP-2 mRNA were higher on the fourth week. The rate of empty lacunae femoral head were lower in platycodon grandiflorum group, and BGP were decreased on the second and fourth week, BMP-2 were lower on the second week, while BMP-2 mRNA were decreased on the fourth week; the content of BMP-2 and BMP-2 mRNA were increased in radix angelicae pubescentis group on the second week; while there was no change in asarum group. **Conclusion:** Radix angelicae pubescentis can increase the content of BGP, BMP-2 and expression of BMP-2 mRNA, which is an effective mechanism of preventing femoral head necrosis.

**KEYWORDS** Femur head necrosis; Osteocalcin; Bone morphogenetic protein receptors, type II; Drugs, Chinese herbal

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(7):591-596 www.zggszz.com

股骨头坏死是由多种原因引起股骨头血供中断或受损引起骨细胞及骨髓成分死亡和随后修复的病理过程。在其修复过程中,骨形态发生蛋白(BMPs)不但能够刺激骨髓基质细胞分化为成骨细胞,而且能促进成骨细胞的生长,其中 BMP-2 是骨组织形成过程中最关键的调节因子<sup>[1]</sup>。骨钙素(BGP)是由成骨细胞产生和分泌的一种具有骨代谢调节激素作用的因子<sup>[2]</sup>,被认为是骨形成功能的良好标志<sup>[3]</sup>。活血通络方又名活骨 II 方,是笔者临床治疗股骨头坏死的经验方<sup>[4-5]</sup>,应用中常依据病情在此基础方中加入不同作用引经药以提高疗效。为了进一步探讨相关作用机制,本研究通过动物实验来验证活血通络方配伍不同引经药后是否通过促进 BGP 和 BMP-2 的表达而发挥治疗作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康雄性日本大耳白兔 98 只,体重 2.2~2.8 kg,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:scxk(京)2005-0002。动物单笼适应性喂养 1 周,除实验时间外,可自由进食和饮水。饲养环境:温度 22~25 ℃,湿度 40%~60%。

**1.2 实验药物** 活血通络方(由北黄芪 30 g、当归 10 g、赤芍 12 g、桃仁 10 g、红花 10 g、地龙 10 g、桂枝 6 g 等 9 味中药组成),以及牛膝 15 g,细辛 3 g,独活 15 g 和桔梗 15 g,均由中国中医科学院望京医院提供。将中药饮片置于锅内,加相当于药材 7 倍量的自来水,浸泡 2 h,煮沸 30 min,过滤;再加药渣 5 倍量的自来水继续煎煮,煮沸 20 min,过滤;合并 2 次滤液,于水浴锅上浓缩成 1 ml 药液中含 1 g 生药的水煎液<sup>[6]</sup>。

**1.3 主要试剂** 重组人粒细胞集落刺激因子(山东格兰百克生物有限公司,批号 20080503);5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU)(美国 Sigma 公司,批号 20071109)。小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(Zymed 公司,批号 20080624);SDF-1 抗体(批号 20081216),SABC 检测试剂盒(批号 20090105)和 BMP-2 原位杂交试剂盒(批号 20090311)均由武汉博士德生物工程技术有限公司提供。兔 BMP-2 靶基因的 mRNA 的

序列为:① 5'-AGCAT GTTCG GTCTG AAGCA GAGAC CCACC CCTAG-3';② 5'-GCACC CAGAT GAACA CAGCT GGTCA CAAAT CAGGC-3'。BMP-2 ELISA 试剂盒,武汉中美生物(USNlife 公司盒子,批号 20090301);BGP 放射免疫试剂盒(解放军总医院科技开发中心放免所,批号 20090120)。其他试剂均为国产分析纯。

**1.4 实验仪器** 爱华牌 BMJ-1 生物组织包埋机、轮转式切片、展片机、烤片机均由天津天利航空机电有限公司生产,ThermoMultiskan-3 型酶标仪芬兰生产,Sn-695B 型免疫计数器,上海核所日环光电仪器有限公司。LeicaDM6000B 显微镜,德国 Leica Microsystem Wetzlar GmbH 生产。

**1.5 动物分组及模型制备** 84 只兔经液氮冷冻左侧股骨头法建立股骨头坏死模型后,随机分为 6 组:模型组,活血通络方组,以及活血通络方分别加牛膝、独活、细辛、桔梗组(分别简称活骨、牛膝、独活、细辛、桔梗组)。另外 14 只设为伪手术组。

实验动物在 3%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉下,剃去切口周围体毛,常规消毒、铺巾,沿左侧股骨大粗隆依次切开皮肤、皮下各层,暴露并钝性分离肌肉层。“T”形切开发节囊,显露股骨头,不切断圆韧带。内旋左侧肢体使股骨头半脱位,充分暴露股骨头,用无菌纱布围绕在股骨头周围以保护股骨头以外的组织。用适当大小的纱布团蘸液氮,湿敷股骨头 3 min,后用温生理盐水复温冷冻组织,复位后分层缝合。伪手术组动物暴露股骨头后给以盐水湿敷。

**1.6 药物干预** 造模后活骨、牛膝、细辛、独活和桔梗组,分别给予活血通络方及分别加牛膝 15 g,细辛 3 g,独活 15 g,桔梗 15 g 复方灌胃(6 ml·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),连续 4 周;伪手术组和模型组同体积生理盐水灌胃。术后所有动物肌注青霉素钠 20 万单位,连续 7 d,预防感染。

## 1.7 观察项目与方法

**1.7.1 血清 BGP 和 BMP-2** 给药 2、4 周后,心脏采血,常规分离血清,分别按 BGP 放射免疫试剂盒的标准流程和 ELISA 试剂盒说明,检测血清 BGP 和

BMP-2 水平。

**1.7.2 组织病理学观察** 给药后的第 2、4 周, 每组 6 只动物处死取左侧股骨头, 4%多聚甲醛溶液固定 72 h, 5%盐酸甲酸溶液脱钙, 梯度酒精脱水, 常规石蜡包埋、切片, 行 HE 染色。光镜下观察股骨头组织病理学改变, 并计数空骨陷窝率。

**1.7.3 原位杂交检测股骨头组织 BMP-2 mRNA 的表达** 取股骨头石蜡切片, 脱蜡至水, 3%双氧水处理, 蛋白酶 K 消化, 预杂交后, 加入标记探针, 40 °C 湿盒中杂交过夜。杂交后梯度 SSC 洗涤, 封闭, 顺序滴加一抗和二抗, PBS 洗涤, DAB 显色, 封片后显微镜下观察 mRNA 表达分布情况。以 PBS 代替探针作为阴性对照。选取以负重区域及周边的软骨, 骨皮质、骨小梁及骨髓处各取 3 处共 9 个区, 在 200 倍视野下进行图像采集分析。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。所有定量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。实验设计为多因素非平衡的组合类型, 将组别拆分成 2 个组合进行比较, 即模型组与伪手术组比较, 模型组、活骨组、牛膝组、细辛组、独活组和桔梗组之间比较。分别采用成组设计定量资料的  $t$  检验和单因素方差分析, 先进行正态性分析, 符合要求后各组间差异分别采用单因素方差分析, 组间比较用单因素方差分析, 有差异的组间两两比较用  $q$  检验。

**2 结果**

**2.1 不同引经药对股骨头坏死模型兔股骨头组织病理形态学的影响** 与伪手术组相比, 造模 2 周时, 骨小梁变细、稀疏, 部分断裂和坏死, 骨细胞可见核皱缩和核边聚现象, 空骨陷窝可达 38.3%; 4 周时骨小梁周边成骨细胞较少, 破骨细胞增多, 空骨陷窝率进一步增多至 45.9% ( $P < 0.01$ )。各中药治疗组空骨陷窝明显低于模型组; 其中与活骨组相比, 4 周时牛膝组空骨陷窝率明显减少, 细辛和独活组无明显影响, 桔梗组空骨陷窝率有升高的趋势。结果见表 1。

**2.2 不同引经药对股骨头坏死模型兔血清 BGP 的影响** 与伪手术组比较, 2 周时模型组血清中 BGP 含量升高, 与 4 周时相比差异有统计学意义。与模型组比较, 活骨组 2、4 周时血清 BGP 含量均升高。与活骨组比较, 牛膝组 2、4 周时血清 BGP 含量均升高, 而桔梗组降低。结果见表 2。

**2.3 不同引经药对股骨头坏死模型兔血清和股骨头组织 BMP-2 的影响** 与伪手术组比较, 模型组 2 周时血清 BMP-2 含量差异无统计学意义, 4 周时降低; 股骨头中 BMP-2 mRNA 的表达 2 周时升高, 4 周时降低。与模型组比较, 活骨组血清中含量和股

表 1 不同引经药对股骨头空骨陷窝率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab.1 Effects of different messenger drugs on the rate of empty lacunae femoral head ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	2 周	4 周
伪手术组	10.4±2.6	11.6±4.1
模型组	38.3±4.0 <sup>a1</sup>	45.9±3.3 <sup>a2</sup>
活骨组	14.1±3.8 <sup>b1</sup>	21.9±2.0 <sup>b6</sup>
牛膝组	12.8±3.6 <sup>b2</sup>	11.5±2.0 <sup>b7c1</sup>
细辛组	12.5±3.2 <sup>b3</sup>	12.7±4.3 <sup>b8</sup>
独活组	17.6±7.2 <sup>b4</sup>	12.9±3.4 <sup>b9</sup>
桔梗组	23.8±5.6 <sup>b5</sup>	30.1±6.8

注: 与伪手术组比较, <sup>a1</sup> $t=-14.9$ , <sup>a2</sup> $t=-15.92$ ,  $P$  均  $< 0.01$ 。与模型组比较, <sup>b1</sup> $q=12.67$ , <sup>b2</sup> $q=5.06$ , <sup>b3</sup> $q=10.83$ , <sup>b4</sup> $q=13.54$ , <sup>b5</sup> $q=7.61$ , <sup>b6</sup> $q=6.45$ , <sup>b7</sup> $q=6.38$ , <sup>b8</sup> $q=6.84$ , <sup>b9</sup> $q=7.20$ ,  $P < 0.01$ 。与活骨组比较, <sup>c1</sup> $q=4.88$ ,  $P < 0.01$

Note: Compared with sham operation group, <sup>a1</sup> $t=-14.9$ , <sup>a2</sup> $t=-15.92$ ,  $P < 0.01$ . Compared with model group, <sup>b1</sup> $q=12.67$ , <sup>b2</sup> $q=5.06$ , <sup>b3</sup> $q=10.83$ , <sup>b4</sup> $q=13.54$ , <sup>b5</sup> $q=7.61$ , <sup>b6</sup> $q=6.45$ , <sup>b7</sup> $q=6.38$ , <sup>b8</sup> $q=6.84$ , <sup>b9</sup> $q=7.20$ ,  $P < 0.01$ . Compared with activating blood group, <sup>c1</sup> $q=4.88$ ,  $P < 0.01$

表 2 不同引经药对血清 BGP 的影响 ( $\bar{x} \pm s, ng/ml, n=6$ )

Tab.2 Effects of different messenger drugs on BGP

( $\bar{x} \pm s, ng/ml, n=6$ )

组别	2 周	4 周
伪手术组	3.31±0.56	3.01±0.32
模型组	3.95±0.59 <sup>a1</sup>	3.39±0.19
活骨组	4.62±0.499 <sup>b1</sup>	4.89±0.65 <sup>b5</sup>
牛膝组	5.32±0.29 <sup>b2c1</sup>	5.45±0.53 <sup>b6c3</sup>
独活组	5.04±0.39 <sup>b3</sup>	5.26±0.45 <sup>b7</sup>
细辛组	4.87±0.61 <sup>b4</sup>	4.93±0.24 <sup>b8</sup>
桔梗组	4.06±0.46 <sup>c2</sup>	4.37±0.25 <sup>b9c4</sup>

注: 与伪手术组比较, <sup>a1</sup> $t=2.74$ ,  $P < 0.05$ 。与模型组比较, <sup>b1</sup> $q=3.87$ , <sup>b4</sup> $q=4.83$ ,  $P$  均  $< 0.05$ ; <sup>b2</sup> $q=6.33$ , <sup>b3</sup> $q=5.47$ , <sup>b5</sup> $q=8.93$ , <sup>b6</sup> $q=12.33$ , <sup>b7</sup> $q=10.56$ , <sup>b8</sup> $q=9.16$ , <sup>b9</sup> $q=5.52$ ,  $P$  均  $< 0.01$ 。与活骨组比较, <sup>c1</sup> $q=3.84$ , <sup>c2</sup> $q=3.97$ , <sup>c3</sup> $q=3.28$ , <sup>c4</sup> $q=4.01$ ,  $P$  均  $< 0.05$

Notes: Compared with sham operation group, <sup>a1</sup> $t=2.74$ ,  $P < 0.05$ . Compared with model group, <sup>b1</sup> $q=3.87$ , <sup>b4</sup> $q=4.83$ ,  $P < 0.05$ ; <sup>b2</sup> $q=6.33$ , <sup>b3</sup> $q=5.47$ , <sup>b5</sup> $q=8.93$ , <sup>b6</sup> $q=12.33$ , <sup>b7</sup> $q=10.56$ , <sup>b8</sup> $q=9.16$ , <sup>b9</sup> $q=5.52$ ,  $P < 0.01$ . Compared with activating blood group, <sup>c1</sup> $q=3.84$ , <sup>c2</sup> $q=3.97$ , <sup>c3</sup> $q=3.28$ , <sup>c4</sup> $q=4.01$ ,  $P < 0.05$

骨头中的表达 2、4 周时均升高。与活骨组比较, 牛膝组血清中 BMP-2 的含量 4 周时升高, 而股骨头中 BMP-2 mRNA 的表达 2、4 周时均升高; 独活组血清中含量和股骨头中的表达 2 周时升高; 桔梗组中含量及股骨头中的表达 2、4 周时均降低。结果见表 3 及图 1。

**3 讨论**

骨髓干细胞在股骨头坏死的修复过程中扮演着重要的角色, 促进其归巢和成骨分化是有效防治 ONFH 的策略。活血通络方是笔者在临床治疗中期经脉痹阻型 ONFH 的经验方<sup>[4-5]</sup>, 在应用中常根据病情在此方中加入不同的引经药以提高疗效。笔者前

表 3 不同引经药对血清 BMP-2 含量及股骨头 BMP-2 mRNA 的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Tab.3 Effects of different messenger drugs on BMP-2 level and BMP-2 mRNA expression( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	血清 BMP-2(pg/ml)		股骨头 BMP-2(IOD)	
	2 周	4 周	2 周	4 周
伪手术组	637.28±77.22	667.65±17.31	0.359±0.012	0.361±0.015
模型组	659.17±45.91	601.68±52.94 <sup>a1</sup>	0.380±0.09a2	0.345±0.007 <sup>a3</sup>
活骨组	746.45±50.43 <sup>b1</sup>	704.55±22.82 <sup>b5</sup>	0.393±0.002 <sup>b9</sup>	0.402±0.009 <sup>b13</sup>
牛膝组	757.02±18.46 <sup>b2</sup>	763.02±9.22 <sup>b6,3</sup>	0.406±0.008 <sup>b10,4</sup>	0.417±0.012 <sup>b14,6</sup>
独活组	801.79±82.76 <sup>b3,1</sup>	736.02±41.190 <sup>b7</sup>	0.387±0.011 <sup>b11,5</sup>	0.388±0.014 <sup>b15</sup>
细辛组	735.32±53.55 <sup>b4</sup>	709.40±59.13 <sup>b8</sup>	0.405±0.011 <sup>b12</sup>	0.415±0.012 <sup>b16</sup>
桔梗组	668.38±73.02 <sup>c2</sup>	639.84±23.23	0.385±0.008	0.386±0.013 <sup>b17,7</sup>

注:与伪手术组比较,<sup>a1</sup>t=2.90,<sup>a2</sup>t=2.27,<sup>a3</sup>t=-3.23,*P*均<0.05。与模型组比较,<sup>b1</sup>q=3.89,<sup>b4</sup>q=4.03,<sup>b9</sup>q=3.83,<sup>b12</sup>q=3.74,*P*均<0.05;<sup>b2</sup>q=4.34,<sup>b3</sup>q=6.25,<sup>b5</sup>q=6.45,<sup>b6</sup>q=7.207,<sup>b7</sup>q=6.84,<sup>b8</sup>q=6.47,<sup>b10</sup>q=7.94,<sup>b11</sup>q=7.53,<sup>b13</sup>q=11.74,<sup>b14</sup>q=14.85,<sup>b15</sup>q=14.47,<sup>b16</sup>q=9.00,<sup>b17</sup>q=8.47,*P*均<0.01。与活骨组比较,<sup>c1</sup>q=4.36,<sup>c2</sup>q=3.99,<sup>c3</sup>q=4.89,<sup>c4</sup>q=4.01,<sup>c5</sup>q=4.39,<sup>c6</sup>q=4.56,<sup>c7</sup>q=4.10,*P*均<0.05

Notes:Compared sham operation group, <sup>a1</sup>t=2.90, <sup>a2</sup>t=2.27, <sup>a3</sup>t=-3.23, *P*<0.05. Compared with model group, <sup>b1</sup>q =3.89, <sup>b4</sup>q = 4.03, <sup>b9</sup>q=3.83, <sup>b12</sup>q=3.74, *P*均<0.05; <sup>b2</sup>q =4.34, <sup>b3</sup>q =6.25, <sup>b5</sup>q =6.45, <sup>b6</sup>q =7.207, <sup>b7</sup>q =6.84, <sup>b8</sup>q =6.47, <sup>b10</sup>q =7.94, <sup>b11</sup>q =7.53, <sup>b13</sup>q =11.74, <sup>b14</sup>q =14.85, <sup>b15</sup>q =14.47, <sup>b16</sup>q =9.00, <sup>b17</sup>q =8.47, *P*<0.01. Compared with activating blood group, <sup>c1</sup>q=4.36, <sup>c2</sup>q=3.99, <sup>c3</sup>q=4.89, <sup>c4</sup>q=4.01, <sup>c5</sup>q=4.39, <sup>c6</sup>q=4.56, <sup>c7</sup>q=4.10, *P*<0.05

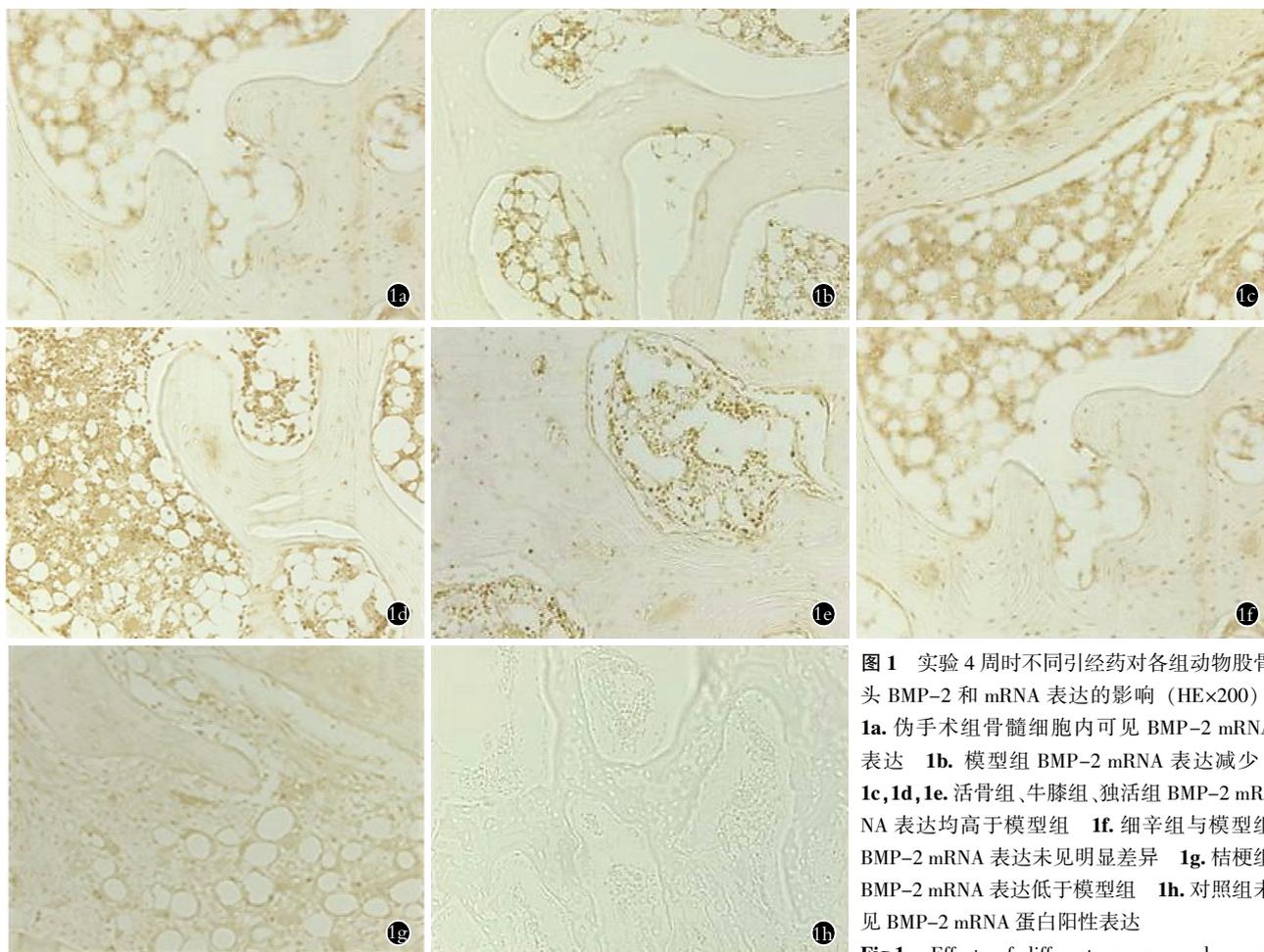


图 1 实验 4 周时不同引经药对各组动物股骨头 BMP-2 和 mRNA 表达的影响 (HE×200)  
**1a.** 伪手术组骨髓细胞内可见 BMP-2 mRNA 表达 **1b.** 模型组 BMP-2 mRNA 表达减少 **1c, 1d, 1e.** 活骨组、牛膝组、独活组 BMP-2 mRNA 表达均高于模型组 **1f.** 细辛组与模型组 BMP-2 mRNA 表达未见明显差异 **1g.** 桔梗组 BMP-2 mRNA 表达低于模型组 **1h.** 对照组未见 BMP-2 mRNA 蛋白阳性表达

BMP-2 and BMP-2 mRNA expression in femoral head at the fourth week (HE×200) **1a.** Bone marrow cell of sham operation group showed BMP-2mRNA expression **1b.** BMP-2 mRNA expression was decreased in model group **1c, 1d, 1e.** BMP-2 mRNA expression in activating,radix angelicae pubescentis and achyranthes bidentata group were higher than model group **1f.** There were no significant difference between asarum and model group **1g.** BMP-2 mRNA expression in platycodon grandiflorum group was lower than model group **1h.** BMP-2 mRNA protein expression was negative in sham operation group

期的实验研究结果显示<sup>[7]</sup>,利用重组人粒细胞集落刺激因子将液氮冷冻性 ONFH 兔骨髓干细胞动员到

外周血,给予活血通络方有一定促骨髓干细胞归巢到股骨头的作用,且这一作用在加入引经药牛膝后

得到加强。那么,引经药牛膝提高促骨髓干细胞归巢于股骨头的的作用机制如何,是否与促进成骨功能有关。

本实验发现,模型组 2 周起股骨头空骨陷窝增多,骨小梁变细、稀疏,4 周时病变加重,骨小梁部分断裂和坏死,提示液氮冷冻能致模型动物股骨头坏死。口服活血通络方后,股骨头局部的病理变化明显改善,组织中 BMP-2 mRNA 表达以及血清 BMP-2、BGP 含量均明显升高,加上引经药牛膝后上述作用更显著。已知骨坏死的修复过程受到多种因子的调控,BMPs 是最主要的诱导成骨分化因子,参与骨形成的各个阶段<sup>[8]</sup>,其中 BMP-2 是骨组织形成过程中最关键的调节因子<sup>[1,9]</sup>。BMP-2 从两方面促进骨形成:一是促进成骨细胞分化;二是促进其他成骨因子的表达<sup>[10]</sup>。而 BGP 是由成骨细胞产生和分泌的具有骨代谢调节激素作用的因子,在骨质合成时,尤其是骨损伤后骨质合成的早期,血清骨钙素可以增高。若骨钙素水平下降,则提示成骨细胞活性下降及骨转移率降低<sup>[11]</sup>。血清中骨钙素浓度可特异性地反映成骨细胞的活性,用于判断成骨细胞活性受抑制的程度,是骨形成功能的良好标志<sup>[3]</sup>。本研究结果提示,牛膝能加强活血通络方提高治疗股骨头坏死的疗效,可能与促进局部和系统中的骨组织形成关键调节因子 BMP-2 的表达,BMP-2 表达增强后一方面促进了成骨细胞的分化,另一方面也提高了其他成骨因子如 BGP 等的水平。

活血通络方由补阳还五汤加减而成,方中黄芪、当归益气生血;桃仁、红花、赤芍活血化瘀;桂枝温经通脉、助阳化气、散寒止痛;地龙通经活络;川芎血中之气药,辛温走窜而行气,与地龙相配增强疏经通痹之功。诸药合用,共奏益气活血、疏经通痹之功。现代药理研究表明,黄芪具有改善血液流变学、提高成骨细胞的增殖和骨形成能力的作用<sup>[12-13]</sup>;当归、赤芍、桃仁、红花等活血化瘀类中药对成骨细胞的增殖与分化有明显的促进作用<sup>[14]</sup>;补阳还五汤具有扩张血管、改善微循环和血液流变学作用,能促进周围神经的再生及修复<sup>[15]</sup>。这与笔者前期已证明的活血通络方能有效改善股骨头坏死模型兔血液流变异常并促进骨修复的研究结果相符<sup>[16]</sup>。

相对于其他引经药而言,牛膝在实验中显示出对成骨因子表达及坏死股骨头骨修复能力最强,这可能与其自身的功能特点有关。牛膝为病证引经药,归肝、肾经,具有补肝肾、强筋骨、活血通经、引血下行功效,善治疾病位于下部者(《本草衍义补遗》称“引诸药下行”)。它的作用特点体现在以下几方面:一是补肾强骨,提高成骨因子分泌和表达水平,增强

骨组织修复能力;二是活血通经,改善 ONFH 血管内凝血状态,保护血管内皮及其功能;三是引药下行,增强活血通络方的治疗作用。现代药理研究已证实牛膝能有效地提高药物的靶向作用,如提高双氯芬酸钠在炎症靶点的组织分布<sup>[17]</sup>,促进三妙丸中的小檗碱在大鼠足关节部位的分布等<sup>[18]</sup>。本研究中牛膝所表现出的引经作用主要与促成骨因子的活性有关。

独活入肝肾经,细辛主归肺经,二者对活血通络方的疗效均没有明显影响,但实验中显示独活能在一定程度上提高活血通络方血清中 BMP-2 含量和股骨头 BMP-2 mRNA 的表达,相关原因有待进一步的研究。值得注意的是,在本研究中桔梗的作用方向与牛膝不同。与活血通络方相比,桔梗有降低股骨头坏死成骨修复的趋势,能明显抑制成骨因子 BMP-2 和 BGP 的表达和分泌,这一作用与桔梗入肺经,善“载药上行”的特性有关。先前研究从成分的趋向性分布、受体学说与归经关系的药效、化学等环节入手探讨桔梗引经报使的作用<sup>[19-21]</sup>,初步揭示了桔梗“引药入肺的”机制,这与本实验的研究结果相符。

综上所述,本研究证实了引经药牛膝能进一步加强活血通络方提高 ONFH 兔血清 BGP 和 BMP-2 水平,促进股骨头内 BMP-2 mRNA 表达的作用,这可能是其有效促成骨防治股骨头坏死的机制之一。

#### 参考文献

- [1] 李霖霞,李玉坤. BMP-2 信号通路成骨细胞分化[J]. 国际骨科学杂志,2009,30(2):132-135.  
Li LX, Li YK. BMP-2 signaling pathway and osteoblast differentiation[J]. Guo Ji Gu Ke Xue Za Zhi, 2009, 30(2): 132-135. Chinese.
- [2] Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Terzic A. Induced pluripotent stem cells; developmental biology to regenerative medicine[J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(12): 700-710.
- [3] 杨俊兴,方斌,徐传毅,等. 通络生骨胶囊对激素性股骨头坏死大鼠骨钙素、降钙素与骨密度的影响[J]. 广州中医药大学学报,2007,24(1):41-43.  
Yang JX, Fang B, Xu CY, et al. Effect of Tongluo Shenggu capsule on osteocalcin, calcitonin and bone mineral density of rats with glucocorticoid-induced avascular necrosis of femoral head[J]. Guang Zhou Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao, 2007, 24(1): 41-43. Chinese.
- [4] 陈卫衡,刘道兵,张强,等. SARS 后股骨头坏死的症候特点及治疗方案优化研究(下)[J]. 中国中医药现代远程教育,2006,4(11):54-57.  
Chen WH, Liu DB, Zhang Q, et al. Study of femoral head necrosis after SARS syndrome characteristics and optimization of treatment [J]. Zhongguo Zhong Yi Yao Xian Dai Yuan Cheng Jiao Yu, 2006, 4(11): 54-57. Chinese.
- [5] 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):761-763.  
Chen WH, Xu R, Ou TW, et al. Prevention of steroid-induced os-

- teonecrosis of Chinese medicine clinical study[J]. Bei Jing Zhong Yi Yao, 2008, 27(10):761-763. Chinese.
- [6] 梁世香. 中药煎煮的基本方法与注意事项[J]. 今日药学, 2008, 18(1):38-39.
- Liang SX. Basic methods and precautions of Chinese medicinal decoction[J]. Jin Ri Yao Xue, 2008, 18(1):38-39. Chinese.
- [7] Kong XY, Wang RT, Tian N, et al. Effect of *Huogu* II formula (活骨 II) with medicinal guide *achyranthes bidentata* on the bone marrow stem cells directional homing to necrosis area after osteonecrosis of the femoral head in rabbit[J]. Chin J Inter Med, 2012, 18(10):761-768.
- [8] Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats[J]. Bone, 1998, 22(6):605-612.
- [9] 薛元锁, 时述山, 李亚非, 等. 激素性股骨头坏死病程中骨形态发生蛋白-2 的改变及其意义[J]. 中华实验外科杂志, 2000, 9(5):455-457.
- Xue YS, Shi SS, Li YF, et al. The change in bone morphogenetic protein-2 during experimental steroid-induced necrosis of femoral head and implication[J]. Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi, 2000, 9(5):455-457. Chinese.
- [10] 孙健, 余优成, 顾章愉, 等. BMP-2 对大鼠骨髓间充质干细胞成骨作用的影响[J]. 上海口腔医学, 2011, 20(4):352-357.
- Sun J, Yu YC, Gu ZY, et al. Effect of BMP-2 on osteogenesis of bone mesenchymal stem cells in rats[J]. Shang Hai Kou Qiang Yi Xue, 2011, 20(4):352-357. Chinese.
- [11] 张俐, 杨宗宇. 活血化瘀汤对大鼠骨折愈合过程中血清骨钙素和 I 型胶原表达的影响[J]. 中国骨伤, 2007, 20(8):527-528.
- Zhang L, Yang ZY. Effect of *Huoxue Huayu* decoction (活血化瘀汤) on expression of bone gamma carboxyglutamate prote in and collagen I in rat fracture healing[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2007, 20(8):527-528. Chinese with abstract in English.
- [12] 郭海玲, 王翔, 徐宇, 等. 黄芪调控体外培养大鼠成骨细胞 I 型胶原蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(7):1257-1261.
- Guo HL, Wang X, Xu Y, et al. Astragalus root injection regulates type I collagen expression of rat osteoblasts in vitro[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu, 2010, 14(7):1257-1261. Chinese.
- [13] 钟焕桦. 黄芪对糖尿病大鼠血糖和血液流变学特性的影响[J]. 汕头大学医学院学报, 2005, 18(2):96-98.
- Zhong HH. Effects of radix astragali on blood glucose concentration and rheology of rat with diabetes mellitus[J]. Shan Tou Da Xue Yi Xue Yuan Xue Bao, 2005, 18(2):96-98. Chinese.
- [14] 张俐, 曾勤, 李楠. 活血化瘀汤影响成骨细胞功能的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2004, 12(1):1-4.
- Zhang L, Zeng Q, Li N. Effects of *Huoxue Huayu* recipe on osteoblasts in vitro[J]. Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi, 2004, 12(1):1-4. Chinese.
- [15] 王松珍, 付利然. 补阳还五汤加减治疗糖尿病周围神经病变临床研究[J]. 中医学报, 2012, 167(27):510-511.
- Wang SZ, Fu LR. Clinical study on the treatment of diabetic peripheral nerve lesions by Buyang Huanwu Tang[J]. Zhong Yi Xue Bao, 2012, 167(27):510-511. Chinese.
- [16] 王荣田, 殷小杰, 林娜, 等. 活骨 II 方对股骨头坏死模型兔血流变学影响的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(1):50-53.
- Wang RT, Yin XJ, Lin N, et al. Effect of *Huogu* II Fang on model rabbits of osteonecrosis of femoral head in blood rheology[J]. Zhongguo Zhong Yi Yao Xin Xi Za Zhi, 2012, 19(1):50-53. Chinese.
- [17] 林月泉, 孙备, 杨士友, 等. 牛膝引药作用对双氯芬酸钠佐剂型关节炎大鼠的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(5):408-411.
- Li YQ, Sun B, Yang SY, et al. Therapeutic effect of radix *achyranthes bidentatae* guiding function on diclofenac induced adjuvant rats arthritis[J]. Zhong Yao Xin Yao Yu Lin Chuang Yao Li, 2009, 20(5):408-411. Chinese.
- [18] 孙备, 吕凌, 陆忠祥, 等. 三妙丸中牛膝对关节炎大鼠引药作用的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(24):2946-2949.
- Sun B, Lü L, Lu ZX, et al. Study on drug-guide effect of *achyranthes bidentatae* in *Sanmiao* pill in arthritic rats[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2008, 33(24):2946-2949. Chinese.
- [19] 林彦君, 章津铭. 新议桔梗“引经报使”理论研究思路与方法[J]. 中药与临床, 2011, 2(1):50-52.
- Lin YJ, Zhang JM. Discussion on the research thought and method of the "meridian guiding" theory of Platycodon Root[J]. Zhong Yao Yu Lin Chuang, 2011, 2(1):50-52. Chinese.
- [20] 刘萍, 邹鹏, 李外, 等. 指纹图谱技术考察桔梗在天王补心丸中的配伍意义[J]. 中国中药杂志, 2009, 33(2):156-160.
- Liu P, Zou P, Li W, et al. Role of radix platycodi in *Tianwang Buxinwan* decoction analyzed by fingerprints[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2009, 33(2):156-160. Chinese.
- [21] 李英伦, 崔恒敏, 陈红伟. 桔梗的“引经”作用对氟苯尼考药动学的影响[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(10):1203-1207.
- Li YL, Cui HM, Chen HW. Effect of platycodon grandiflorum on pharmacokinetics of florfenicol[J]. Zhongguo Shou Yi Xue Bao, 2008, 28(10):1203-1207. Chinese.

(收稿日期:2012-06-07 本文编辑:连智华)