

金骨片对激素性股骨头坏死 BMP-2 表达的影响

★ 陈光友 邓友章 江中潮 段渠 (成都中医药大学临床医学院 成都 610075)

摘要:目的:探讨金骨片防治激素性股骨头坏死过程中骨形成蛋白 2(BMP-2)表达的影响及促进骨折愈合的作用机理。方法:将日本大耳兔分为 5 组,正常组、模型组、阳性对照组、高剂量组、低剂量组;除正常组外,其余各组给予甲基强的松龙 10 mg/kg 注射,同时对阳性对照组、高剂量组、低剂量组给予相应的药物防治干预,7 周后处死动物采用组织病理学观察和免疫组织化学方法检测,分析 5 组动物股骨头 BMP-2 的表达。结果:免疫组织化学染色显示,正常组 BMP-2 的表达高于其他组,差异有显著性意义($P < 0.05$);高剂量组和阳性对照组的 BMP-2 的表达明显强于低剂量组和模型组,差异有显著性意义($P < 0.05$);低剂量组强于模型组,差异有显著性意义($P < 0.05$)。结论:金骨片防治激素性股骨头坏死过程中促进 BMP-2 表达,这可能是金骨片防治激素性股骨头坏死作用的机制之一。

关键词:骨成型蛋白-2;免疫组织化学;股骨头坏死

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**B

Experimental Study on the Effects of Jinggu Tablets on the Expression of BMP-2 in Steroid-induced Necrosis of the Femoral Head

CHEN Guang-you, DENG You-zhang, JIANG Zhong-chao, DUAN Qu

Clinical Medical College, Chengdu university of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075

Abstract: Objective: The Experimental Study on the Effects of Jinggu Tablets on the Expression of BMP-2 in the prevention and cure of steroid-induced necrosis of the femoral head, and to explore its mechanisms in the prevention and cure of steroid-induced necrosis of the femoral head. Methods: Fifty rabbits were randomly divided into 5 groups; normal control group (N group), model control group (M group), positive control group (P group), high dose of Jinggu Tablet (H group), low dose of Jinggu Tablet (L group). The rabbits of M, P, H and L group were disposed with injection of solu-medrol injection 10mg/kg, once 3 days, at the time H and L groups were treated with Jinggu tablets, once 1 day, and P group was treated with Zuogui pills, once 1 day. 42 days later, all the rabbits were sacrificed. The pathological change of the femoral head were observed by HE staining under microscope. The protein expression of BMP-2 were determined by immunohistochemical staining method. Results: The expression levels of BMP-2 in G and P group were highest than M, L and N groups. Conclusion: Jinggu tablets can promote the expression level of BMP-2 of callus tissue in steroid-induced necrosis of the femoral head, This may be one of the mechanisms of Jinggu tablets to prevention and cure of steroid-induced necrosis of the femoral head.

key words: Bone morphogenetic protein; Immunohistochemical; Necrosis of the femoral head

激素性股骨头缺血性坏死是一种难治疾病,使用中药治疗可获得满意的效果,本实验选择常用的补肾活血化痰法进行研究,通过观察其对股骨头病理组织相关细胞因子影响,探讨其对激素性股骨头缺血性坏死的防治机理。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂 中药金骨片(成都中医药大学院内制剂)由成都中医药大学药房提供,主要由三七、川芎、补骨脂、川断、骨

碎补、川牛膝、独活等配方制成。甲基强的松龙粉针剂由比利时 Pfizer 生产,进口药品注册证号 H20060052。左归丸由北京同仁堂生产,国药准字 Z11020735。兔 BMP-2 I 抗购于武汉博士德,编号 BA0585。

1.2 动物和主要仪器 健康的日本大耳白兔,雌雄不拘,体重 2~3 kg,华西实验动物中心提供实验动物,饲养期间给兔颗粒饲料,由成都中医药大学实验中心提供,自由饮水,通

风,单笼饲养,适应性喂养 1 周。电脑组织切片机:L223490 型号,西域机电系统有限公司生产。BX41 OLYMPUS 显微镜。

1.3 动物分组 50 只动物以随机数字表法分为 5 组,即正常组、模型组、阳性对照组、低剂量组、高剂量组,每组 10 只动物。

1.4 造模和给药 模型组、阳性对照组、高剂量组、低剂量组,按照 Miyanishi^[4] 等给予甲强龙 20 mg/kg,臀部肌注,每周 2 次;同时阳性对照组给予左归丸 2.5 g/(kg·d)灌胃,低剂量组金骨片 2.5 g/(kg·d)灌胃,高剂量组给予金骨片 5 g/(kg·d)灌胃,所有动物每周 2 次肌注青霉素 16 万 U 和链霉素 15 万 U 预防感染。

1.5 取材 7 周后用空气栓塞法处死后,立即取出双侧股骨头沿冠状面剖开,用 20 倍 4% 多聚甲醛液固定 24 h 后脱钙,常规脱水包埋切片,进行组织病理学观察和免疫组化检测。

1.6 组织病理学观察 HE 染色于光镜下观察骨小梁、骨细胞髓腔及造血细胞形态、结构和数量的变化。高倍镜下任选 10 个视野,每个视野计数 50 个骨陷窝,求出空缺骨陷窝数的百分比。

1.7 图象分析方法 采集 BMP-2 免疫组织化学染色图像,用 Image-Pro Plus 5.0 分析软件进行图像分析,每张切片取 5 个视野测定切片中阳性产物的积分光密度(IOD 值),取平均值代表 BMP-2 的表达强度,IOD 值越大表示阳性产物表达越强。用 SPSS 12.0 版统计软件进行方差分析和组间数据的比较。

2 结果

2.1 一般情况 实验中正常组无死亡,模型组死 2 只,高剂量组死 1 只,对照组死 1 只,低剂量组死 1 只。对 7 周后处死的动物标本观察,组织形态学变化股骨头大体形态无明显改变。在制作标本时,股骨头外观均未见明显异常,无明显塌陷、坏死。模型组股骨头切面骨质较脆,易于切凿。提示:骨质疏松。光镜下观察模型组:坏死骨小梁变细,骨细胞核固缩,部分核消失,空骨陷窝数较多,髓内造血组织减少,脂肪增多,尤其以软骨内骨陷窝多见。空骨陷窝计数正常组与高剂量组、阳性对照组、模型组、低剂量组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 7 周后股骨头坏死空骨陷窝比较

Groups	n	空骨陷窝百分比(%)
正常组	10	12.5 ± 1.1
模型组	10	29.4 ± 2.5 *
阳性对照组	10	28.9 ± 2.3 *
低剂量组	10	29.1 ± 2.2 *
高剂量组	10	28.7 ± 2.4 *

注:与正常组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 免疫组化结果 各组动物免疫组化结果棕褐色反应产物为阳性物质,但是各组表达量上有差别,统计显示正常组的 BMP-2 表达最高,对照组和高剂量组高于低剂量组和模型组,低剂量组高于模型组,见表 2。

表 2 金骨片对激素性股骨头坏死 BMP-2 蛋白表达的影响

Groups	n	BMP-2
正常组	10	6.2310 ± 0.6393
模型组	10	2.3499 ± 0.4094 *
阳性对照组	10	4.3611 ± 0.6214 **
低剂量组	10	3.7273 ± 0.4262 **△
高剂量组	10	4.4956 ± 0.6069 ***◆

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, ★ $P < 0.05$;与阳性对照组比较, △ $P < 0.05$; ◆ 与低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

股骨头坏死的治疗是一个较为复杂的生物学修复过程,其不仅受到机体各种条件的影响,也受到局部多种生长因子的调节。骨组织中的再生中,血管再生是关键环节,VEGF 是机体内促进血管生长最重要的生长因子,它在由 BMP 介导的成骨过程中非常重要,它们可以通过联合方式促进骨的再生^[1,2]。日本学者 Kakudo 等^[3]也发现 BMP-2 可诱导未分化间充质细胞向软骨细胞和成骨细胞分化,并且使其表达 VEGF,在骨组织中创造一个有利于血管化的环境。Yeh 等^[5]研究认为 BMP 和 VEGF 联合应用的协同作用在于: VEGF 主要通过促进局部血管增生和成骨细胞分化而参与了 BMP 诱导的成骨活动,而 BMP 则通过提高成骨细胞 VEGF 的表达而在骨的形成和修复中发挥作用,它可刺激 VEGF 在体内表达,VEGF 不足可导致血管腔闭合,血管退化。以上研究表明 BMP 可影响而促进骨的修复。

金骨片实验的各组动物免疫组化结果统计显示正常组的 BMP-2 表达最高,对照组和高剂量组高于低剂量组和模型组,低剂量组高于模型组促进 BMP-2 和表达,说明金骨片对防治股骨头坏死起重要作用,推测是促进 BMP-2 表达,促进骨细胞的修复。影响 BMP-2 的表达是金骨片防治股骨头坏死的分子机制之一。

参考文献

- [1] Peng H, Usas A, Olshanski A, et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis[J]. J bone Miner Res, 2005, 20(11): 2 017-2 027.
- [2] Huang YG, Kaigier D, Rice KG, et al. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration[J]. J bone Miner Res, 2005, 20: 8 448 - 8 857.
- [3] Kakudo N, Kusumoto K, Wang YB, et al. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenetic protein-2[J]. Life Sci, 2006, 79(19): 1 847 - 1 855.
- [4] Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, et al. Effects of different corticosteroids on the development of osteonecrosis in rabbits[J]. J Rheumatology (Oxford), 2004, 4(3): 332 - 336.
- [5] Yeh LC, Lee JC. Osteogenic protein-1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 1999, 159(1-2): 113 - 124.

(收稿日期:2008-09-09)