

hypertriglyceridemia and uric acid production in primary gout. Metabolism, 1989, 38(7): 698-701.

[9] 杜明瑞, 郭志忠, 冯福海. 四妙散为主方治疗痛风性关节炎疗效与安全性的系统评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 13(21):

212-216.

[10] 刘孟渊. 加味四妙散治疗高尿酸血症及急性痛风性关节炎的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(4): 675-677.

(编辑: 邹元平)

通络生骨胶囊促进兔激素性股骨头坏死修复的机制研究

陈 达, 陈晓波, 白昱旻, 王 鼎, 黄世金, 魏秋实, 陈雷雷, 方 斌, 张庆文, 何伟(广州中医药大学, 广东广州 510405)

摘要: **目的** 研究通络生骨胶囊促进新西兰兔激素性股骨头坏死修复的机制。**方法** 20 只新西兰兔随机分为 3 组: 正常组 6 只、模型组和中药组(通络生骨胶囊组)各 7 只, 采用内毒素(LPS)联合甲强龙(MPS)的方法制备激素性股骨头坏死模型, 最后一次肌肉注射 MPS 后 24 h, 中药组给予 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 通络生骨胶囊混悬液灌胃, 空白组和模型组灌服等体积超纯水, 连续 16 周。实验第 16 周进行髋关节 MRI 检测和组织病理学检测以评估建模效果, 采用实时荧光定量-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测兔股骨头 ABCB1、RUNX2、OPN、PPAR γ 的 mRNA 表达水平, 采用 Western Blot 检测兔股骨头 ABCB1、RUNX2、OPN、PPAR γ 的蛋白表达水平。**结果** 与正常组相比, 模型组的 ABCB1 和 RUNX2 的 mRNA 表达下调、ABCB1 的蛋白表达下调、PPAR γ 的 mRNA 表达上调。与模型组相比, 中药组的 ABCB1 和 RUNX2 的 mRNA 和蛋白表达均上调, PPAR γ 的 mRNA 表达下调。**结论** 通络生骨胶囊促进新西兰兔激素性股骨头坏死的修复可能与调节 ABCB1、RUNX2、PPAR γ 基因的功能有关。

关键词: 股骨头坏死; 糖皮质激素; 通络生骨胶囊; ABCB1 基因

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)03-0000-0

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2016.03.0

Effect and Mechanism of Tongluo Shenggu Jiaonang on Glucocorticoid-induced Osteonecrosis of Femoral Head in Rabbits

CHEN Da, CHEN Xiaobo, BAI Yuyang, WANG Ding, HUANG Shijin, WEI Qiushi, CHEN Leilei, FANG Bin, ZHANG Qingwen, HE Wei (Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of Tongluo Shenggu Jiaonang on Glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral head in rabbits. **Methods** Twenty new zealand rabbits were randomly divided into three groups, normal control (6), model group (7) and treatment group (7). Lipopolysaccharide (LPS) and methylprednisolone (MPS) were combined to develop the model of femur head necrosis. The treatment groups were given Tongluo Shenggu Jiaonang 0.3 g/kg , while the normal group and model group with equal volume of normal saline through administration by gavage for 16 weeks as control. MRI scanning of the hips and HE staining of femoral heads were taken to evaluate the osteonecrosis, while real time PCR and western blot assay for the bone tissues from femoral

收稿日期: 2016-01-07

作者简介: 陈达, 男, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 股骨头坏死的基础与临床研究。Email: 184996973@qq.com。通信作者: 何伟, 博士, 教授, 研究方向: 股骨头坏死的基础与临床研究。Email: hewei1123@21cn.com。

基金项目: 国家自然科学基金(81173284; 81302990; 81302994; 81473696); 广东省自然科学基金(2015A030313353, 2015A030306037); 广东省科技计划项目(2011B060300029; 2011B061300079); 广州市科技计划项目(201510010228); 广州中医药大学第一临床医学院优秀博士论文培育项目(YB201401)。

head were taken to measure the mRNA and protein expression of ABCB1, RUNX2, OPN and PPAR γ . Results mRNA expression of ABCB1 and RUNX2, protein level of ABCB1 were down-regulated and mRNA expression of PPAR γ was up-regulated in model group compared to in normal group. While mRNA expression and protein level of ABCB1 and RUNX2 were both up-regulated, but mRNA expression of PPAR γ was down-regulated in treatment group compared to in model group. Conclusion The mechanism of Tongluo Shenggu Jiaonang on repairing Glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral head may be relative to functional regulation of ABCB1、RUNX2、PPAR γ genes in rabbits.

Keywords: femur head necrosis; glucocorticoid; Tongluo Shengguo Jiaonang; ABCB1 gene

激素性股骨头坏死是一种因为长期和(或)大量使用糖皮质激素后引起的股骨头无菌性坏死,其发病机制目前尚未明确,可能与基因组的表观遗传学的改变密切相关,包括基因多态性^[1]以及甲基化水平改变^[2]等。课题组前期研究发现激素性股骨头坏死与ABCB1的基因G2677T/A位点的多态性相关^[3],文献报道ABCB1的CpG岛呈高甲基化状态患者的患病率更高^[2]。基因多态性表现为特定位点的单核苷酸差异,药物的治疗作用不能改变DNA的序列,但可以通过DNA甲基化干扰转录因子在DNA上的识别^[4]或使蛋白和甲基化的区域结合^[5]而抑制基因的表达,相反地,去甲基化则恢复基因的表达。本文在以往研究的ABCB1基因多态性辩证的基础上^[3],通过动物实验,观察ABCB1基因表达与激素性股骨头坏死的关系以及通络生骨胶囊对ABCB1基因的作用,进一步明确通络生骨胶囊治疗激素性股骨头坏死的表观遗传学机制,为药物的进一步研发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 通络生骨胶囊,浙江海正药业股份有限公司,批号:661404;内毒素(LPS),美国sigma公司,批号:L2880(from 055: B5);注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(MPS),美国辉瑞公司,批号:Z07412;MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (9767)、PrimeScriptTM RT Master Mix(Perfect Real Time)(RR036)、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)(RR820),日本TAKARA公司;Protease Inhibitor Cocktail Set III(539134),德国Calbiochem公司;吐温20(T104863)、氯化钾(P112133)、三(羟甲基)氨基甲烷(T110601)、冰乙酸(A116167)、氯化钠(C111547)、乙二醇四乙酸(E112487)、甘氨酸(A110752)、甲醇(M116115)、异丙醇(I112011)、甘油(G116208)、EGTA(E104434)、曲拉通X-100

(T109027)、氟化钠(S111591)、过硫酸铵(A112450)、十二烷基硫酸钠(S108346),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Deoxychlate(D6750),美国Sigma公司;30%丙烯酰胺预混液(AS0500),美国Labtide公司;ECL发光液(32106),美国Pierce公司;Immobilon-P PVDF膜(IPVH00010),美国Millipore公司;转印滤纸(170-3931)、预染marker(1610374),美国BIO-RAD公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0012)、HRP山羊抗小鼠IgG二抗(A0216)、HRP山羊抗兔IgG二抗(A0208),中国上海碧云天生物技术有限公司;RUNX2(sc101145)抗体、OPN抗体(sc73631)、PPAR γ 抗体(sc7273),美国Santa Cruz公司;ABCB1(13978)、GAPDH(5174),美国CST公司。

1.2 动物 新西兰兔,普通级,雌雄各半,体质量2.5~3 kg,由南方医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2011-0015,动物合格证号:No. 44002100005081。

1.3 仪器 T100 Thermal Cycler、CFX96 Touch 荧光定量PCR仪、Mini-PROTEAN Tera System、PowerPac Basic、ChemiDoc MP 凝胶成像仪,美国BIO-RAD公司;ELix10+ MilliQ-B超纯水系统,美国Millipore公司;Multiskan GO 酶标仪,美国Thermo Scientific;TP1020自动脱水机、Autos全自动染色机,德国Leica公司;BX53显微镜,日本OLYMPUS公司;3.0 T MRI扫描仪,美国GE health care公司。

1.4 动物分组、模型复制及给药 新西兰兔20只,随机分为3组,即空白组、模型组和中药组,模型组和中药组每组7只,空白组6只。激素性股骨头坏死的造模方法参照Yamamoto等^[6]的方法,LPS 10 μ g $\cdot$ kg⁻¹耳缘静脉注射1次,24 h后臀部肌肉注射MPS 40 mg $\cdot$ kg⁻¹,间隔24 h连续注射6次。空白组注射等体积生理盐水。通络生骨胶囊用超纯水制备成混悬液,按照人的临床等效剂量换算,兔的临床等效剂量

为 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。最后一次注射 MPS 的 24 h 后, 中药组给予通络生骨胶囊混悬液灌胃, 空白组和模型组灌服等体积超纯水, 连续 16 周。灌胃 16 周后进行 MRI 检测, 截取股骨头进行 HE 染色、RT-qPCR 及 Western Blot 实验。

1.5 股骨头 MRI 扫描 麻醉前禁食 12 h。戊巴比妥 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 耳缘静脉注射进行麻醉, 麻醉时静脉注射必须缓慢, 同时观察肌肉的紧张度、角膜反射和对皮肤疼痛的反应。麻醉中采取保温措施, 保持气道通畅和组织的营养, 进行双侧髋关节的 MRI 扫描。MRI 扫描在广州中医药大学第一附属医院进行, 生成的图像文件保存为 DICOM 格式, 通过移动硬盘拷贝至计算机工作站。MRI 检查完成后将新西兰兔运送回动物房, 苏醒后常规饲养。

1.6 组织病理学检测 截取股骨头, 剔除周围肌肉及韧带组织, 沿正中冠状面剖开, 用 10 % 中性甲醛溶液 (PH7.4) 固定 48 h, 再置于 10 % EDTA-Tris 缓冲液中脱钙, 隔天更换脱钙液, 直至完全脱钙以后, 流水冲洗, 逐级乙醇脱水, 二甲苯透明处理 2 h, 石蜡包埋、切片, 切片厚度为 $4 \mu\text{m}$, 常规 HE 染色。光镜下观察骨髓腔内骨髓细胞、骨小梁及骨细胞形态及空骨陷窝等。

1.7 荧光定量 PCR 检测 ①样品制备: 将研磨钵用液氮预冷, 从液氮中取出股骨头, 称重后迅速放入研磨钵中, 研磨至粉末状, 按 50 mg 骨组织 / mL 裂解液制备样品。②RNA 提取: 按照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 说明书的步骤提取总 RNA。Thermo Scientific μDrop Plate 测定 A260、A280、A230 并计算 RNA 的浓度、纯度; ③逆转录反应: 按照 PrimeScript™ RT Master Mix 说明书合成 cDNA; ④RT-qPCR 反应: 在生工生物工程(上海)股份有限公司合成以下引物: ABCB1: 上游引物: TTGACAGC TACAGCACGGAG, 下游引物: TCCAATAGCACTGTT CCGGC; RUNX2: 上游引物: GTTACAGTGGATGGA CCCCCG, 下游引物: GGATGAGGAATGCGCCCTAA; OPN: 上游引物: AACAAGAGACCCTCCCGAGT, 下游引物: TCGGCATCGTCGGATTTCATT; PPAR γ : 上游引物: TAAGGTGAGGAGGCAGAACTG, 下游引物: TGGCTTCTTTTCAGACCTCGGC; GAPDH: 上游引物: GATTGTCAGCAACGCATCCT, 下游引物: AAGGCCATGCCAGTGAGTTT。按下列组份配制 PCR 反应液 (在冰上进行): SYBR® Premix Ex Taq II $12.5 \mu\text{L}$, PCR Forward Primer ($10 \mu\text{M}$) $1 \mu\text{L}$, PCR Reverse Primer ($10 \mu\text{M}$) $1 \mu\text{L}$, DNA 模板 $2 \mu\text{L}$, dH_2O $8.5 \mu\text{L}$,

共 $25 \mu\text{L}$ 体系。反应条件: 95°C 预变性 30 s; PCR 反应: 95°C 5 s, 60°C 30 s, 循环 40 次。反应结束后自动生成溶解曲线; 结果以 C_q 值表示, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_q}$ 法对目的基因进行相对定量分析。

1.8 Western Blot 实验 ①样品制备: 将研磨钵用液氮预冷, 从液氮中取出股骨头, 称重后迅速放入研磨钵中, 研磨至粉末状, 按 50 mg 骨组织 / $200 \mu\text{L}$ RIPA 裂解液制备样品。BCA 法测量总蛋白浓度。②SDS-PAGE: 分别制备 10 % 分离胶、5 % 浓缩胶, 待凝胶聚合后, 小心拔出梳子, 放入电泳槽内, 注入电泳缓冲液。每组取 $30 \mu\text{g}$ 样品裂解液, 与上样缓冲液按 1 : 5 充分混匀, 置沸水浴中加热 5 min, 冷却后用微量移液器吸取样品与预染蛋白 marker 点样, 80 V 电压进行电泳。待预染蛋白 marker 前沿迁移出胶底板后, 停止电泳, 取出凝胶。③转膜: PVDF 膜预先在甲醇中浸泡 5 min, 在半干转膜槽上, 夹子黑面朝下, 从下至上依次放转膜缓冲液浸湿的滤纸、凝胶、PVDF 膜和另一块浸湿的滤纸, 形成“三明治”, 保持整个装置内湿润, 并避免产生气泡, 350 mA 转膜 3 h。④封闭: 取出转膜后的 PVDF 膜置于盛有 5 % 脱脂奶粉的封闭液的平皿中, 置于摇床上室温封闭 1 h。⑤抗体孵育: 倾倒封闭液, 加入一抗 (ABCB1 按 1 : 1000 稀释, GAPDH 按 1 : 2000 稀释, RUNX2、OPN、PPAR γ 按 1 : 500 稀释), 摇床上室温振荡孵育 2 h 或者 4°C 孵育过夜。回收一抗, 用 TBST 洗涤 3 ~ 5 次, 每次 10 min。加入相应 HRP 标记的二抗 (1 : 1000), 置摇床上室温振荡孵育 2 h。TBST 洗涤 3 ~ 5 次, 每次 10 min。⑥化学发光、显影: 将 ECL 发光显色试剂盒中的显色剂 A 和 B 等体积混合后, 加在 PVDF 膜上充分接触反应 2 min 后, 将 PVDF 膜移至另一保鲜袋中, 去尽残液, 包好, 避免产生气泡, 放入凝胶成像系统中进行成像分析。先曝光约 3 ~ 5 min, 根据信号的强弱适当调整曝光时间, 保存图像, 分析结果, 使用 image-pro plus 软件进行半定量分析。

1.9 统计学处理方法 采用 R 软件 (版本号: 3.2.3) 进行统计分析, 计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 先做方差齐性检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 法, 计数资料的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 股骨头坏死模型评价 14 只新西兰兔用于复制激素性股骨头坏死模型, 其中 2 只在注射内毒素后 24

h 死亡, 12 只存活, 存活率为 85.71 %。股骨头坏死造模成功的评价参照 Yamamoto 等的评价方法^[7]: 出现骨髓细胞碎片、骨小梁空骨陷窝或骨小梁内骨细胞核固缩, 伴随着周围骨髓细胞的坏死。正常组未见骨坏死, 模型组有 4 只出现坏死征象, 坏死发生率为 (4/6)66.67 %; 中药组有 2 只出现坏死征象, 坏死发生率为 (2/6)33.3 %。中药组与模型组的股骨头坏死率比较采用卡方检验, $P < 0.05$, 差异有统计学意义, 说明通络生骨胶囊可有效地预防激素性股骨头坏死的发生, 促进股骨头坏死的修复, 减少坏死的发生率。如图 1 所示, A 为正常组股骨头的病理征象。B 为模

型组出现股骨头坏死的病理征象, 可见部分骨小梁断裂, 骨细胞核固缩, 骨小梁空骨陷窝, 骨髓细胞坏死。C 为中药组股骨头病理征象, 可见成骨活动较为活跃, 骨小梁形态较好。

2.2 股骨头的 MRI 扫描 各组 MRI 扫描如图 2 所示, 正常组股骨头外形为半圆形, 灰度信号均匀; 模型组股骨头坏死的股骨头外形变扁, 股骨头内出现大范围密度减低区, 提示为股骨头坏死区; 中药组股骨头外形正常, 股骨头内近骨骺处有小块低密度区, 大部分骨组织灰度值正常, 提示股骨头坏死修复较好。

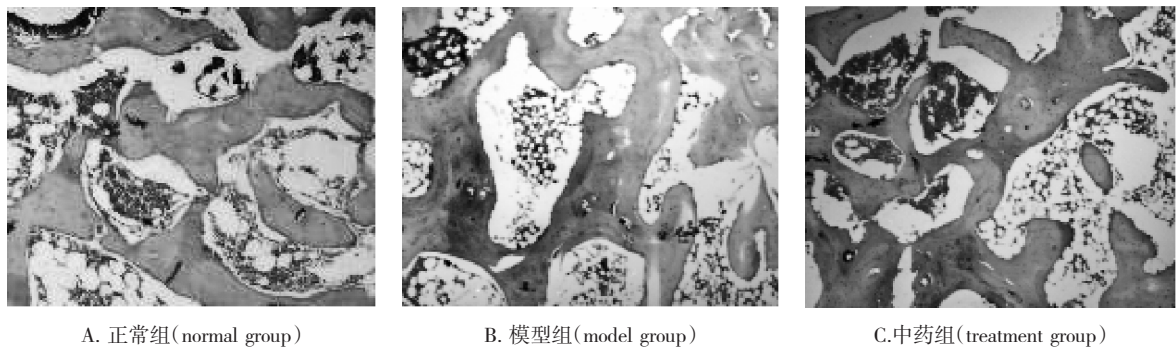


图 1 股骨头 HE 染色图像(200 ×)
Figure 1 HE staining of femoral head(200 ×)

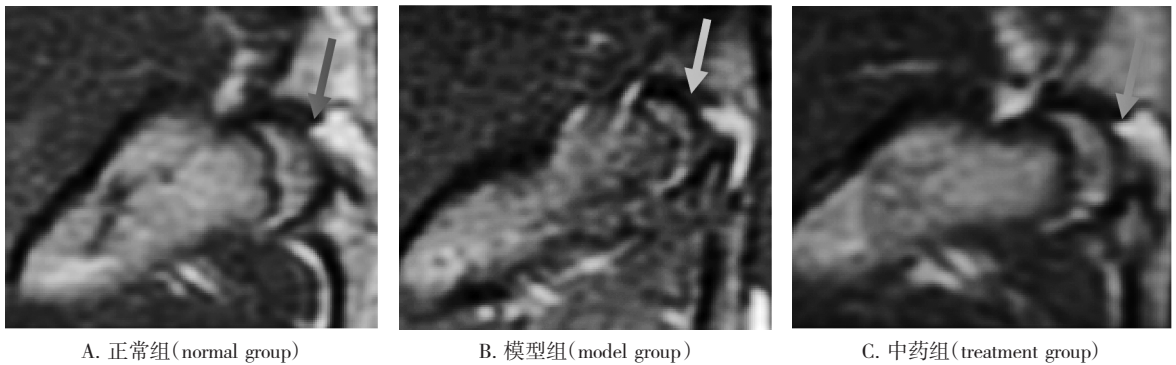


图 2 股骨头 MRI 图像
Figure 2 Magnetic Resonance Imaging of femoral head

2.3 通络生骨胶囊对 ABCB1、RUNX2、OPN、PPAR 基因 mRNA 表达的影响 见表 1。股骨头坏死模型组的 ABCB1、RUNX2 基因的 mRNA 表达下调, 但 PPAR γ 基因 mRNA 表达上调, 与正常组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。中药组 ABCB1、RUNX2 基因的 mRNA 表达上调, 但 PPAR γ 基因 mRNA 表达下调, 与模型组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。说明通络生骨胶囊可以恢复股骨头坏死过程中 ABCB1 和 RUNX2mRNA 的表达, 抑制 PPAR γ 基因 mRNA 的表达。

表 1 各组 ABCB1、RUNX2、OPN、PPAR γ 基因 mRNA 的表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of Tongluo Shenggu Jiaonang on mRNA expression of ABCB1, RUNX2, OPN and PPAR γ in femoral head of rabbits

	ABCB1	RUNX2	OPN	PPAR
正常组	1.27 $\pm$ 0.39	1.05 $\pm$ 0.20	1.10 $\pm$ 0.47	1.07 $\pm$ 0.43
模型组	0.22 $\pm$ 0.06*	0.36 $\pm$ 0.18*	0.90 $\pm$ 0.48	2.56 $\pm$ 0.49*
中药组	2.28 $\pm$ 0.83**	2.31 $\pm$ 0.92**	1.00 $\pm$ 0.35	0.46 $\pm$ 0.11**

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ** $P < 0.05$ 。

2.4 通络生骨胶囊对 ABCB1、RUNX2、OPN、

PPAR γ 蛋白表达的影响 见图 3、表 2。模型组 ABCB1 的蛋白表达水平比正常组降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而中药组的 ABCB1 蛋白表达升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明在股骨头坏死时 ABCB1 蛋白功能降低, 而中药可促进 ABCB1 的蛋白表达。与正常组比较, 模型组和中药组 RUNX2

的蛋白均升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明发生股骨头坏死时, 机体启动了修复反应, RUNX2 蛋白表达升高以促进修复; 而中药组比模型组的 RUNX2 表达明显升高 ($P < 0.001$), 说明中药可有效促进 RUNX2 的蛋白功能发挥。各组间 OPN 和 PPAR 的蛋白表达水平, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

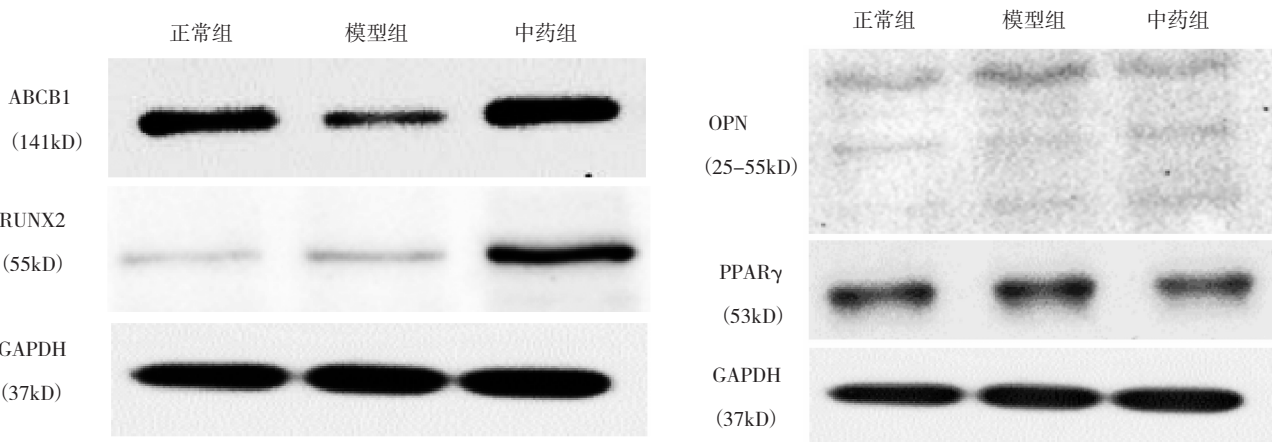


图 3 ABCB1、RUNX2、OPN、PPAR 在股骨头中的蛋白表达
Figure 3 Protein expression of ABCB1、RUNX2、OPN、PPAR genes

表 2 各组 ABCB1、RUNX2、OPN、PPAR γ 基因蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=3$)(相对于 GAPDH)

Table 2 Effect of Tongluo Shenggu Jiaonang on protein expression of ABCB1, RUNX2, OPN and PPAR γ in femoral head of rabbits

	ABCB1	RUNX2	OPN	PPAR
正常组	0.923 $\pm$ 0.008	0.011 $\pm$ 0.001	0.152 $\pm$ 0.002	0.335 $\pm$ 0.007
模型组	0.149 $\pm$ 0.003*	0.023 $\pm$ 0.003*	0.159 $\pm$ 0.005	0.325 $\pm$ 0.007
中药组	1.088 $\pm$ 0.028**	0.400 $\pm$ 0.010**	0.150 $\pm$ 0.002	0.295 $\pm$ 0.044

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ** $P < 0.05$ 。

3 讨论

激素性股骨头坏死的药物防治缺乏特效的西药, 而中医药在实验与临床研究中已显示具有良好的前景^[8]。激素性股骨头坏死在中医学属于“骨蚀”的范畴, 中医目前主要从“瘀”的病理因素认识其发病机理^[9]。股骨头坏死的症候虚实错杂, 兼夹痰湿、肝肾亏虚等, 但脉络瘀阻起着重要作用, 贯穿疾病的始终。因此活血化瘀法是激素性股骨头坏死的基本治疗原则。

我们在临床过程中发现中药可以预防激素性股骨头坏死的发生^[10]。通络生骨胶囊是广州中医药大学袁浩教授在挖掘民间用药经验的基础上结合多年的临床实践筛选出来的可以有效治疗股骨头坏死的中药制剂, 其主要作用机理是活血化瘀、消肿止痛^[11]。我们

前期的研究证实, 通络生骨胶囊的有效成分可以在骨髓间充质干细胞(MSCs)的体外培养中抑制激素诱导下 MSCs 的成脂分化, 促进成骨分化^[12]。然而通络生骨胶囊通过何种方式影响糖皮质激素对 MSCs 的分化作用尚不明确。因此, 我们需要深入研究该药在激素性股骨头坏死的生物学作用, 以便于进一步的研发。

糖皮质激素在体内代谢的过程复杂, 但其在体内发挥药理作用的很重要的一个环节是通过细胞膜将其转运到细胞内与相关受体结合。P 糖蛋白(P-gp)是一种膜蛋白, 又称转运蛋白, 将药物基质从细胞内转运到细胞外, 在药物吸收和分布中起重要作用。我们前期的研究发现了编码 P 糖蛋白的多药耐药基因 1 的外显子 ABCB1-21 的多态性和股骨头坏死的发生相关, 瘀证为主要证型^[3]。本文在以往研究的 ABCB1 基因多态性辩证的基础上, 通过动物实验, 观察 ABCB1 基因表达与激素性股骨头坏死的关系以及通络生骨胶囊对 ABCB1 基因的作用, 进一步明确通络生骨胶囊治疗激素性股骨头坏死的可能表观遗传学机制。本研究发现通络生骨胶囊可降低新西兰兔激素性股骨头坏死的发生率, 促进股骨头坏死的修复。与正常组相比, 模型组的 ABCB1 和 RUNX2 的 mRNA 表达下调、ABCB1 的蛋白表达下调、PPAR γ 的 mRNA 表达上调。而与模型组相比, 中药组的 ABCB1 和

RUNX2 的 mRNA 和蛋白表达均上调, PPAR γ 的 mRNA 表达下调。说明通络生骨胶囊可能是通过促进 ABCB1 和 RUNX2 的 mRNA 和蛋白的表达, 抑制 PPAR γ 的 mRNA 的表达而发挥作用, 与我们的前期研究结果相符。由此我们可以推测通络生骨胶囊可能在 ABCB1 的 mRNA 的上游过程对该基因的进行表达调控, 是一种转录前调控, 包括甲基化修饰、非编码 RNA 等表观遗传学调控, 活血祛瘀法可能对表观遗传起调控作用, 这有待于我们下一步进行更加深入的研究。

参考文献:

- [1] Gong L L, Fang L H, Wang H Y, et al. Genetic risk factors for glucocorticoid-induced osteonecrosis: a meta-analysis [J]. *Steroids*, 2013, 78(4): 401-408.
- [2] Sun Z, Yang S, Ye S, et al. Aberrant CpG islands' hypermethylation of ABCB1 in mesenchymal stem cells of patients with steroid-associated osteonecrosis[J]. *J Rheumatol*, 2013, 40(11): 1913-1920.
- [3] He W, Li K. Incidence of genetic polymorphisms involved in lipid metabolism among Chinese patients with osteonecrosis of the femoral head[J]. *Acta Orthop*, 2009, 80(3): 325-329.
- [4] Jombo G, Gyoh S K. Unusual presentations of cutaneous leishmaniasis in clinical practice and potential challenges in diagnosis: a comprehensive analysis of literature reviews[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2010, 3(11): 917-921.
- [5] Ballestar E, Esteller M. Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2005, 83(3): 374-384.
- [6] Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, et al. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1995(316): 235-243.
- [7] Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, et al. Cytochrome P4503A activity affects the gender difference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits[J]. *Int J Exp Pathol*, 2014, 95(2): 147-152.
- [8] 周正新. 中药干预修复激素性股骨头坏死: 基础实验与临床应用转化的距离[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(29): 4726-4730.
- [9] 魏秋实, 何伟, 张庆文, 等. 股骨头坏死中医证型分布规律的文献研究和系统评价[J]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2013, 7(03): 369-372.
- [10] 罗月中, 李芸, 李勇, 等. 补肾健骨法预防肾病综合征患者激素性股骨头坏死临床研究[J]. *中医正骨*, 2011, 23(01): 3-6.
- [11] 袁捷, 张军, 林吉, 等. 通络生骨胶囊治疗股骨头坏死的临床研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2004, 15(6): 429-431.
- [12] 刘少军, 邓彦, 王海彬. 通络生骨胶囊对骨髓基质干细胞成骨和成脂肪双向分化的影响[J]. *四川中医*, 2008, 26(03): 22-24.

(编辑: 修春)

补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞体外迁移及 CXCR4 表达的研究

罗毅文¹, 王 斌¹, 吴志方¹, 黄永铨², 刘亚梅³, 陈东风⁴, 蔡 炎¹, 罗 辉¹ (1. 广州中医药大学附属骨伤科医院, 广东 广州 510240; 2. 广东省中医院, 广东 广州 510120; 3. 广州中医药大学中医诊断学教研室, 广东 广州 510405; 4. 广州中医药大学解剖教研室, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 筛选补肾活血汤促进大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)体外迁移的活性部位并研究其对 CXCR4 蛋白表达的影响。**方法** 补肾活血汤采用索氏提取法, 得到石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇及水提物 4 个部位。全骨髓贴壁法培养法培养 BMSCs, 取第三代(P3)BMSCs 进行实验。补肾活血汤 4 个部位按照 10, 50, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度梯度对 BMSCs 进行 Transwell 实验, 筛选出有效部位。使用 Western blot 和细胞免疫荧光检测补肾活血汤有效部位对 CXCR4 蛋白表达的影响。**结果** Transwell 结果显示, 补肾活血汤石油醚部位具有明显促进大鼠 BMSCs 体外迁移的作用, 以 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度最佳($P < 0.05$)。Western blot、细胞免疫荧光结果显示, 补肾活血汤石油醚部位呈浓度依赖性上调大鼠 BMSCs 的 CXCR4 蛋白表达 ($P < 0.05$)。**结论** 补肾活血汤促进大鼠 BMSCs 体外迁移的有效部位为石油醚部位, 其相关机制可能与上调 CXCR4 蛋白表达, 激活 SDF-1/CXCR4 信号轴有关。

收稿日期: 2015-12-29

作者简介: 罗毅文, 男, 教授, 研究方向: 中医药治疗骨伤科疾病。Email: gzhluyw@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金(81473699、81273783)