

电针对兔激素性股骨头坏死血清HIF-1 α 、VEGF、BMP2、Osterix的影响

宋红梅¹, 廖 林¹, 谢文博², 林菲菲³, 王和鸣^{4*}

¹福建中医药大学附属第二人民医院推拿科, 福建 福州

²福建中医药大学针灸推拿学院, 福建 福州

³福州市长乐区中医院康复科, 福建 福州

⁴福建中医药大学骨伤学院, 福建 福州

收稿日期: 2024年11月27日; 录用日期: 2024年12月21日; 发布日期: 2024年12月31日

摘 要

目的: 观察电针对兔激素性股骨头坏死血清中成血管因子HIF-1 α 、VEGF; 成骨因子BMP2、Osterix; H型血管标志物CD31; 骨破坏相关因子MMP13的影响, 探索电针治疗激素性股骨头坏死的治疗作用及机制。方法: 选取健康雄性新西兰大白兔18只, 随机分成正常组、模型组、电针组(电针环跳穴、髀关穴), 每组6只。运用qRT-PCR试剂盒检测兔血清中HIF-1 α 、VEGF、BMP2、Osterix含量。运用免疫荧光染色检测H型血管标志物CD31、骨破坏相关因子MMP13表达情况。结果: HIF-1 α 、VEGF、BMP2、Osterix的含量, 模型组浓度明显低于正常组($P < 0.05$), 电针组浓度明显高于模型组($P < 0.05$)。免疫荧光染色中, 模型组CD31的表达明显低于正常组, 电针组CD31的表达明显高于模型组; 模型组的MMP13表达量明显高于正常组, 电针组的MMP13表达量明显低于模型组。结论: 大量糖皮质激素的运用可下调VEGF、HIF- α 、BMP2、Osterix、CD31的表达, 从而造成骨质破坏和血管破坏, 导致股骨头坏死。电针能调控成血管相关因子VEGF、HIF- α , 成骨相关因子BMP2、Osterix, H型血管标志物CD31, 使VEGF、HIF- α 、BMP2、Osterix、CD31浓度均增高, 促进股骨头内血管新生, 骨破坏相关因子MMP13表达量下降, 从而增强骨组织自身修复能力。这可能是电针治疗激素性股骨头坏死的机制之一。

关键词

激素性股骨头坏死, 电针, 成血管相关因子VEGF、HIF- α , 成骨相关因子BMP2、Osterix, H型血管标志物CD31, 骨破坏相关因子MMP13

Effect of Electroacupuncture on Serum HIF-1 α , VEGF, BMP2, and Osterix in Rabbits with Steroid-Induced Femoral Head Necrosis

Hongmei Song¹, Lin Liao¹, Wenbo Xie², Feifei Lin³, Heming Wang^{4*}

*通讯作者。

文章引用: 宋红梅, 廖林, 谢文博, 林菲菲, 王和鸣. 电针对兔激素性股骨头坏死血清 HIF-1 α 、VEGF、BMP2、Osterix 的影响[J]. 临床个性化医学, 2024, 3(4): 2691-2696. DOI: 10.12677/jcpm.2024.34382

¹Department of Massage, The Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

²School of Acupuncture and Massage, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

³Department of Rehabilitation, Changle District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

⁴School of Orthopedics and Traumatology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

Received: Nov. 27th, 2024; accepted: Dec. 21st, 2024; published: Dec. 31st, 2024

Abstract

Objective: To observe the effect of electroacupuncture on angiogenic factors HIF-1 α and VEGF; osteogenic factors BMP2 and Osterix; H-type vascular marker CD31; and bone destruction-related factor MMP13 in the serum of rabbits with steroid-induced femoral head necrosis, and to explore the therapeutic effect and mechanism of electroacupuncture in the treatment of steroid-induced femoral head necrosis. **Methods:** Eighteen healthy male New Zealand white rabbits were randomly divided into a normal group, a model group, and an electroacupuncture group (electroacupuncture at Huantiao acupoint and Biguan acupoint), with 6 rabbits in each group. The levels of HIF-1 α , VEGF, BMP2, and Osterix in rabbit serum were detected by qRT-PCR kit. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of H-type vascular marker CD31 and bone destruction-related factor MMP13. **Results:** The concentrations of HIF-1 α , VEGF, BMP2, and Osterix in the model group were significantly lower than those in the normal group ($P < 0.05$), and the concentrations in the electroacupuncture group were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). In immunofluorescence staining, the expression of CD31 in the model group was significantly lower than that in the normal group, and the expression of CD31 in the electroacupuncture group was significantly higher than that in the model group; the expression of MMP13 in the model group was significantly higher than that in the normal group, and the expression of MMP13 in the electroacupuncture group was significantly lower than that in the model group. **Conclusion:** The use of a large amount of glucocorticoids can downregulate the expression of VEGF, HIF- α , BMP2, Osterix, and CD31, thereby causing bone destruction and vascular destruction, leading to femoral head necrosis. Electroacupuncture can regulate angiogenesis-related factors VEGF, HIF- α , osteogenic-related factors BMP2, Osterix, and H-type vascular marker CD31, increasing the concentrations of VEGF, HIF- α , BMP2, Osterix, and CD31, promoting angiogenesis in the femoral head, and reducing the expression of bone destruction-related factor MMP13, thereby enhancing the self-repair ability of bone tissue. This may be one of the mechanisms of electroacupuncture treatment of steroid-induced femoral head necrosis.

Keywords

Steroid-Induced Femoral Head Necrosis, Electroacupuncture, Angiogenesis-Related Factors VEGF, HIF- α , Osteogenic-Related Factors BMP2, Osterix, H-Type Vascular Marker CD31, Bone Destruction-Related Factor MMP13

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

激素性股骨头坏死(Steroid-induced Avascular Necrosis of Femoral Head, SANFH)是临床应用激素的副作用之一,随着激素在临床的广泛运用,本病的发病率也越来越高,在非创伤性股骨头坏死中占首位[1],术后,双侧髋关节功能易受影响,导致致残率高,严重影响患者的运动功能和生活质量。针灸对本病有

一定的治疗作用,但其机理有待进一步研究。本研究通过观察电针对激素性股骨头坏死模型兔血清中成血管因子 HIF-1 α 、VEGF;成骨因子 BMP2、Osterix 的表达变化,揭示电针治疗激素性股骨头坏死的机制,为防治激素性股骨头坏死提供实验依据,现报告如下。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

健康雄性新西兰兔 21 只,体重 2.74~3.45 kg,由上海市松江区车墩实验动物良种场有限公司提供,兔于恒温恒湿的清洁环境里饲养,温度(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为(55 $\pm$ 5)%,以标准条形饲料喂养,饮食自由,实验开始前适应性喂养 2 周。

2.2. 实验药品及试剂

马血清(Solarbio, No.925T051)、甲基强的松龙(DD4077)、青霉素(科达, 20200910)、0.9%生理盐水(200218A24);RNAiso Plus (TaKaRa, 9109), NovoScript $^{\circledR}$ Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) (Novoprotein, E047-01A), NovoStart $^{\circledR}$ SYBR qPCR SuperMix Plus (Novoprotein, E096-01B), DEPC 处理水(美仑生物 P.N.: MA0018), GAPDH、HIF-1 α 、VEGF、BMP2、Osterix 引物由福州尚亚生物合成。

2.3. 实验仪器

移液器(德国 eppendorf);微型离心机(中国湘仪);低温高速离心机(美国贝克);漩涡混合器(德国 IKA);普通 PCR 仪(美国 BIO-RAD);荧光定量 PCR 仪;安徽中医学院针灸经络研究所研制的 PCE-88A 型电针仪。

2.4. 方法

2.4.1. 分组

健康新西兰大白兔 21 只,在福建中医药大学实验动物中心饲养。随机分成 2 组:正常组 7 只、造模组 14 只。首先进行适应性喂养 2w,之后开始造模。造模后从各组新西兰大白兔中随机抽取正常组 1 只,造模组 2 只,用于模型鉴定。余下正常组 6 只,再将造模组 12 只随机分为 2 组:模型组、电针组各 6 只。

2.4.2. 模型建立

按文献[2]用改进的马血清联合甲基强的松龙的办法,精准称重,将造模组新西兰大白兔按 10 ml/kg 的剂量经兔耳缘静脉注射马血清。间隔 3 周,按 6 ml/kg 的剂量再次注射马血清。再间隔 2 周后,按 45 mg/kg 的剂量腹腔注射甲基强的松龙,连续 3 d,每天一次。注射激素期间,每天每只大白兔腹腔注射青霉素 10 万单位,连续 7 d,预防感染。按照相同方法,正常组全部用 0.9%氯化钠溶液代替注射。

2.4.3. 模型鉴定

模型组注射激素后 4 周,随机处死 4 只动物,取出双侧股骨头,从冠状面剖开,其中一半用 10%中性福尔马林溶液(0.1M, 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,石蜡包埋切片,切片厚为 4 μ m,常规 HE 染色。光镜下观察股骨近端骨组织和骨髓组织的骨小梁、骨髓造血组织、成骨细胞、骨细胞、脂肪细胞的病理改变。若观察到骨细胞部分核深染,较多的细胞核固缩,核偏位。骨小梁内正常骨细胞数量减少,骨陷窝内骨细胞消失,空骨陷窝数明显增多,提示造模成功。

2.4.4. 干预

正常组与模型组生理盐水 10 ml/d 灌胃;电针组选穴:环跳、髀关(穴位定位参照是《实验动物常用

穴位名称与定位》中兔的穴位定位), 参照《实验针灸学》, 应用 PCE-88A 型程控电针治疗仪(安徽中医学院针灸经络研究所研制), 连接于环跳穴与髌关穴, 频率 2~100 Hz, 疏密波 1~2 mV。强度由后腿的轻微振动决定, 持续 15 分钟。疗程为每日电针治疗 1 次, 5 次为 1 个疗程, 疗程之间间隔 2 天, 共治疗 4 个疗程。分别在针刺时和疗程结束后检测相关指标。

2.4.5. 指标检测

应用应用 qRT-PCR 检测成血管相关因子 HIF-1 α 、VEGF 和成骨相关因子 BMP2、Osterix 水平; 应用免疫荧光染色检测 H 型血管标志物 CD31、MMP13 表达情况。

2.5. 统计学方法

所得数据采用 SPSS 25.0 for Windows 统计软件包进行分析, 正态分布定量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示, 采用单因素方差分析, 不符合正态分布, 采用多个独立样本比较的秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 成血管相关因子 VEGF、HIF- α

qRT-PCR 检测血清 HIF-1 α 、VEGF 浓度如下表 1。

Table 1. qRT-PCR detection of serum HIF-1 α and VEGF concentrations

表 1. qRT-PCR 检测血清 HIF-1 α 、VEGF 浓度

组别	数量	HIF-1 α (pg/mL)	VEGF (pg/mL)
正常组	6	1.00 $\pm$ 0.08 $\triangle \star \square$	1.00 $\pm$ 0.07 $\blacktriangle \star \blacksquare$
模型组	6	0.31 $\pm$ 0.02 $\bigcirc \star \square$	0.31 $\pm$ 0.01 $\bullet \star \blacksquare$
电针组	6	0.48 $\pm$ 0.03 $\bigcirc \triangle \square$	0.66 $\pm$ 0.02 $\bullet \blacktriangle \blacksquare$
F 值		384.79	628.55
P 值		0.00	0.00

注: 与正常组组内比较, $\bigcirc P < 0.05$, $\bullet P < 0.05$, 差异具有统计学意义; 与模型组组内比较, $\triangle P < 0.05$, $\blacktriangle P < 0.05$, 差异具有统计学意义; 与中药组组内比较, $\star P < 0.05$, $\star P < 0.05$, 差异具有统计学意义; 与沉默组组内比较, $\square P < 0.05$, $\blacksquare P < 0.05$, 差异具有统计学意义。

3.2. 成骨相关因子 BMP2、Osterix

qRT-PCR 检测血清 BMP2、Osterix 浓度如下表 2。

Table 2. qRT-PCR detection of serum BMP2 and Osterix concentrations

表 2. qRT-PCR 检测血清 BMP2、Osterix 浓度

组别	数量	BMP2 (ng/mL)	Osterix (ng/mL)
正常组	6	1.00 $\pm$ 0.07 $\triangle \star \square$	1.00 $\pm$ 0.09 $\blacktriangle \star \blacksquare$
模型组	6	0.36 $\pm$ 0.02 $\bigcirc \star \square$	0.42 $\pm$ 0.02 $\bullet \star \blacksquare$
电针组	6	0.74 $\pm$ 0.02 $\bigcirc \triangle \square$	0.75 $\pm$ 0.02 $\bullet \blacktriangle \blacksquare$
F 值		153.74	330.36
P 值		0.00	0.00

注: 与正常组组内比较, $\bigcirc P < 0.05$, $\bullet P < 0.05$, 差异具有统计学意义; 与模型组组内比较, $\triangle P < 0.05$, $\blacktriangle P < 0.05$, 差异具有统计学意义; 与中药组组内比较, $\star P < 0.05$, $\star P < 0.05$, 差异具有统计学意义; 与沉默组组内比较, $\square P < 0.05$, $\blacksquare P < 0.05$, 差异具有统计学意义。

3.3. H 型血管标志物 CD31、Emcn

3.3.1. 免疫荧光检测 CD31

CD31 为 H 型血管标志物，荧光显微镜下，CD31 呈蓝色。由图 1 可知，模型组的 CD31 表达量明显少于正常组，电针组的 CD31 表达量明显多于模型组。免疫荧光结果提示电针对促进 H 型血管生成有积极作用，从而治疗激素性股骨头坏死。

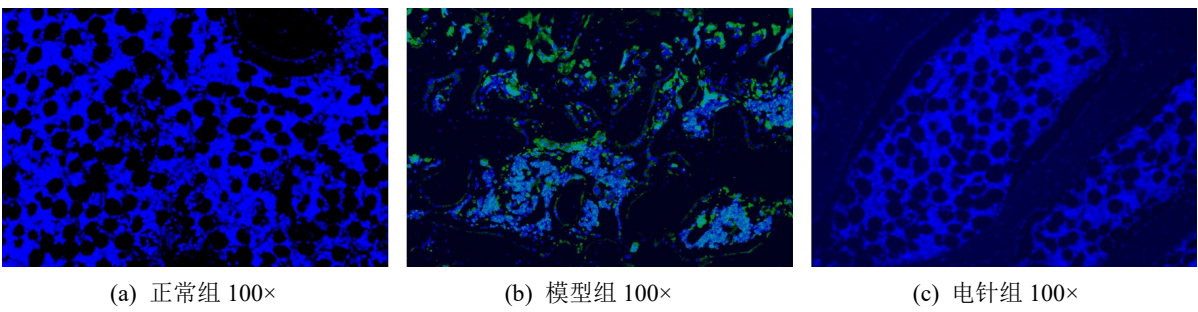


Figure 1. Immunofluorescence detection of CD31 expression
图 1. 免疫荧光检测 CD31 表达

3.3.2. 免疫荧光检测 MMP13

研究表明，MMP13 的过度表达与骨破坏有关[3]。从图 2 可知，模型组的 MMP13 表达量明显高于正常组，电针组的 MMP13 表达量明显低于模型组。免疫荧光结果提示电针可促进骨组织再生，调低骨破坏相关因子 MMP13，对治疗激素性股骨头坏死有明确作用。

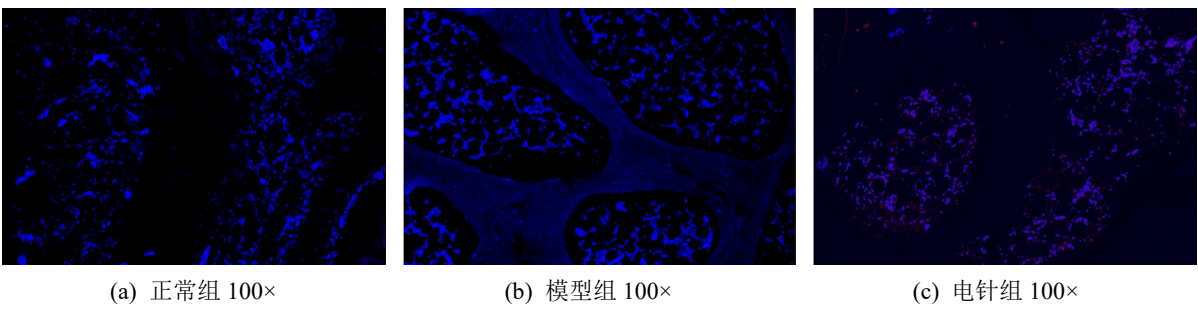


Figure 2. Immunofluorescence detection of MMP13 expression
图 2. 免疫荧光检测 MMP13 表达

4. 讨论

传统医学将股骨头坏死归为“骨痹”、“骨蚀”、“骨萎”范畴。肾阳亏虚、血脉瘀阻为本病病机[4]。首先，激素作用于机体，导致经脉气血壅塞不通、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，致肝肾亏耗，肾精耗匮，导致脾胃失养，从而推动血行的能力下降，致使血脉瘀滞。现代医学认为糖皮质激素可引起骨内高压、血流变异常、凝血障碍及血栓形成，等同于中医学“血瘀”证的变化[4]。故治疗原则应是活血化瘀，协调营养系统，促进循环。

H 型血管在血管生成过程中起重大作用[5]-[8]。股骨头坏死发病过程中存在骨生成与血管再生障碍[9] [10]，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[5]。H 型内皮细胞通过旁分泌等途径，募集、激活骨祖细胞，促进软骨内成骨，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[6]。

足少阳胆经体表循行经过髌,胃经下行大腿前侧,根据“经脉所过,主治所及”,取胆经环跳穴胃经髌关穴,同时环跳穴和髌关穴均为髌关节局部穴位。而电针主要用于治疗疼痛性疾病,疏密波能增加代谢,促进气血循环,改善组织营养。故本研究拟观察电针环跳穴与髌关穴前后兔血清中的成血管因子、成骨因子、H型血管标志物等的变化,以探索电针治疗激素性股骨头坏死的机制。

本实验结果表明:①成血管因子HIF-1 α 、VEGF数据显示,模型组HIF-1 α 和VEGF浓度明显低于正常组,电针组浓度明显高于模型组;表明电针对促进血管生成起积极作用。②成骨因子BMP2、Osterix数据提示,模型组BMP2和Osterix浓度明显低于正常组,电针组浓度明显高于模型组;表明电针对促进骨质生成起积极作用。③H型血管标志物CD31数据提示,模型组CD31表达量明显低于正常组,电针组CD31表达量明显高于模型组;表明电针对刺激H型血管标志物的表达有正向作用。④骨破坏因子MMP13数据提示,模型组的表达量明显高于正常组,电针组表达量明显低于模型组。表明电针可调低骨破坏相关因子MMP13的表达。

综上所述,电针可提高H型血管标志物的表达,通过促进股骨头内血管形成与骨质新生,抑制骨质破坏,从而促进SANFH股骨头的修复,扭转SANFH进程,是治疗激素性股骨头坏死的机制之一。

基金项目

国家自然科学基金项目(81973879);

福建省财政厅卫生健康省级补助资金(C2023003-财政专项)。

参考文献

- [1] 郭成龙,汪小敏,张晓刚,等. 激素性股骨头坏死的中医病因病机及其治疗进展[J]. 中医临床研究, 2021, 13(23): 143-146.
- [2] 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.
- [3] 黄际河,陈蔚东,秦泗通,等. 生物学因子 p-p38、MMP-3、MMP-13 对大鼠关节软骨的破坏作用[J]. 江苏医药, 2010, 36(2): 183-185.
- [4] 李非,李盛华,周明旺,等. 激素性股骨头坏死发病机制中医理论探析及中医体质研究现状[J]. 西部中医药, 2018, 31(2): 135-137.
- [5] 樊粤光,徐传毅,何伟,等. 生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死血管内皮细胞功能的调节及意义[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(9): 35-37.
- [6] 王峰,徐佳,孔令驰,等. H型内皮细胞在成血管-成骨偶联中的作用[J]. 中华创伤骨科杂志, 2020, 22(7): 641-644.
- [7] 樊佳煊,曹林忠. H型血管内皮细胞铁死亡对骨稳态影响及相关机制的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(10): 1449-1454.
- [8] S Song, S., Zhang, G., Chen, X., Zheng, J., Liu, X., Wang, Y., *et al.* (2023) Hif-1 α Increases the Osteogenic Capacity of ADSCs by Coupling Angiogenesis and Osteogenesis via the HIF-1 α /VEGF/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Journal of Nanobiotechnology*, **21**, Article No. 257. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02020-z>
- [9] 中国中医药研究促进会中医骨伤临床循证医学分会. 非创伤性股骨头坏死中西医结合诊疗专家共识[J]. 中医正骨, 2024, 36(9): 1-11.
- [10] Chi, C., Shao, S., Kuo, L., Huang, Y. and Lai, P. (2023) Using Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) to Rate the Certainty of Evidence of Study Outcomes from Systematic Reviews: A Quick Tutorial. *Dermatologica Sinica*, **41**, 3-7. <https://doi.org/10.4103/ds.ds-d-22-00154>