

基于 VEGF-Notch-Noggin 信号通路探索健脾活骨方促进成血管-成骨耦联治疗大鼠激素性股骨头坏死的作用机制

严倩倩¹, 李群¹, 王佳琳¹, 赵清玉¹, 李晓萱¹, 郑楚沛¹, 陈卫衡², 林娜^{1*}, 刘春芳^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 北京中医药大学 第三附属医院, 北京 100029)

[摘要] 观察健脾活骨方(JPHGF)对大鼠激素性股骨头坏死(SONFH)成血管-成骨耦联的促进作用,并从血管内皮生长因子(VEGF)-Notch-Noggin 信号通路探索其作用机制。将 120 只 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,健脾活骨方低、中、高剂量(2.5、5、10 g·kg⁻¹)组和健骨生丸(1.53 g·kg⁻¹)组。除正常组外,每组第 1、2 天尾静脉注射 20 μg·kg⁻¹ 脂多糖,每天 1 次;第 3~5 天均臀部肌肉注射 40 mg·kg⁻¹ 甲泼尼龙琥珀酸钠,每天 1 次;同时正常组给予等体积生理盐水。造模 4 周后灌胃给药。通过检测机械痛、冷痛敏、血液流变学指标、凝血四项指标及股骨头病理和影像学分析评价 JPHGF 对 SONFH 大鼠的治疗作用;采用墨汁灌注和微血管造影灌注观察大鼠股骨头微血管分布情况;采用免疫荧光法检测大鼠股骨头血小板内皮细胞黏附分子-1(CD31)、内皮黏蛋白(EmcN)、成骨细胞特异性转录因子(Osterix)的表达情况及 CD31、Noggin 蛋白的共表达情况;采用免疫组化法检测大鼠股骨头 I 型胶原蛋白(collagen I)和 Notch-1 蛋白的表达;采用蛋白免疫印迹法检测大鼠股骨头 VEGF 和 Noggin 蛋白的表达。结果显示,JPHGF 可显著升高 SONFH 大鼠机械痛阈值和减少冷痛敏反应抬脚次数,显著增加股骨头的骨小梁面积,降低脂肪细胞数、空骨陷窝率,改善股骨头影像学坏死情况,增加股骨头髓腔内墨汁灌注血管面积和 Microfil 灌注血管体积;改善血液流变和凝血功能,增加股骨头内 CD31、EmcN、Osterix 蛋白的表达以及 CD31 与 Noggin 蛋白共表达水平,同时促进 collagen I、Notch-1、VEGF、Noggin 蛋白的表达。上述结果表明,JPHGF 通过激活 VEGF-Notch-Noggin 信号通路促进成血管-成骨耦联,有效治疗大鼠 SONFH,从“成血管-成骨耦联”角度阐述 JPHGF 功效内涵,为其临床应用提供实验依据。

[关键词] 健脾活骨方;激素性股骨头坏死;成血管-成骨耦联;H 型血管

Mechanism of Jianpi Huogu Formula in promoting angiogenesis-osteogenesis coupling to treat steroid-induced osteonecrosis of femoral head in rats via VEGF-Notch-Noggin signaling pathway

YAN Qian-qian¹, LI Qun¹, WANG Jia-lin¹, ZHAO Qing-yu¹, LI Xiao-xuan¹, ZHENG Chu-pei¹, CHEN Wei-heng²,

LIN Na^{1*}, LIU Chun-fang^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] This study aimed to observe the promoting effect of Jianpi Huogu Formula (JPHGF) on angiogenesis-osteogenesis coupling in rats with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH), and to explore its mechanism of action through the vascular endothelial growth factor (VEGF)-Notch-Noggin signaling pathway. A total of 120 Sprague-Dawley rats were randomly divided

[收稿日期] 2025-08-17

[基金项目] 北京市自然科学基金面上项目(7232304);国家自然科学基金重点项目(82030122);国家自然科学基金面上项目(82474548)

[通信作者] *刘春芳,博士,研究员,主要从事中药药理研究,E-mail:chunfang666@126.com; *林娜,博士,研究员,主要从事中药药理研究,E-mail:linna888@163.com

[作者简介] 严倩倩,硕士研究生,E-mail:anqingyqq@126.com

into a normal group, a model group, low-, medium-, and high-dose JPHGF groups (2.5, 5, and 10 g·kg⁻¹), and a Jiangusheng Pills group (1.53 g·kg⁻¹). Except for the normal group, all rats were injected with lipopolysaccharide (20 μg·kg⁻¹) via the tail vein once daily on days 1 and 2, followed by intramuscular injection of methylprednisolone sodium succinate (40 mg·kg⁻¹, gluteal muscle) once daily from days 3 to 5. The normal group received an equivalent volume of normal saline. Four weeks after model establishment, the rats were administered the corresponding drugs by gavage. The therapeutic effects of JPHGF on SONFH rats were evaluated by measuring mechanical pain threshold, cold pain sensitivity, hemorheological parameters, four coagulation indices, and by pathological and imaging analyses of the femoral head. The microvascular distribution of the femoral head was observed by ink perfusion and Microfil angiography. Immunofluorescence was used to detect the expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), endothelial mucin (Emcn), and the osteoblast-specific transcription factor Osterix, as well as the co-expression of CD31 and Noggin proteins in the femoral head. Immunohistochemistry was employed to detect the expression of type I collagen (collagen I) and Notch-1 proteins, while Western blot was used to measure the expression levels of VEGF and Noggin proteins in the femoral head. The results showed that JPHGF significantly increased the mechanical pain threshold and reduced the number of foot lifts in response to cold stimulation in SONFH rats. It markedly increased trabecular bone area, reduced the number of adipocytes and the percentage of empty lacunae, improved imaging manifestations of femoral head necrosis, and increased the vascular area in ink perfusion and the vessel volume in Microfil perfusion within the medullary cavity of the femoral head. JPHGF also improved hemorheological parameters and coagulation function, upregulated the expression of CD31, Emcn, and Osterix proteins, enhanced the co-expression of CD31 and Noggin proteins, and promoted the expression of collagen I, Notch-1, VEGF, and Noggin proteins. These findings indicate that JPHGF promotes angiogenesis-osteogenesis coupling by activating the VEGF-Notch-Noggin signaling pathway, thereby effectively treating SONFH in rats. This study elucidates the pharmacological connotation of JPHGF from the perspective of "angiogenesis-osteogenesis coupling" and provides an experimental basis for its clinical application.

[Key words] Jianpi Huogu Formula; steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; angiogenesis-osteogenesis coupling; type H blood vessels

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20250919.401

激素性股骨头坏死 (SONFH) 是一类由于糖皮质激素使用不当导致的、可致残的难治性骨科疾病,其病理特征为骨细胞缺血、坏死、骨小梁断裂,股骨头塌陷^[1],尚没有理想的治疗药物,有关 SONFH 发病机制仍未完全明确。研究证实,血管生成与骨生成在时空上存在密切关系^[2-3],骨再生过程中 H 型血管的作用逐渐彰显出来,这种骨形成与血管新生之间的相互耦合联系则被称为“成血管-成骨耦联”。有报道称糖皮质激素能够抑制 H 型血管生成,导致成血管-成骨耦联作用减弱,从而在 SONFH 发病过程中发挥重要作用^[4-5]。因此从“成血管-成骨耦联”角度研究 SONFH 治疗药物具有重要意义。

健脾活骨方 (JPHGF) 来源于北京中医药大学第三附属医院陈卫衡教授临床多年来用于治疗早中期股骨头坏死的经验方,由苓桂术甘汤和四物汤加减化裁而成。研究表明 JPHGF 体内可以升高股骨头坏死大鼠的血小板内皮细胞黏附分子-1 (CD31) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达,体外能够有效抑制激素引起的血管内皮细胞功能障碍,具有促进坏死股骨头血管和骨生成作用^[6-11],表明了其在

预防和治疗 SONFH 方面的潜在机制和效果。然而,关于 JPHGF 是否具有促进 SONFH 成血管-成骨耦联的作用尚不清楚。本研究采用糖皮质激素联合脂多糖 (LPS) 建立 SONFH 大鼠模型^[12],评估 JPHGF 对 SONFH 的改善作用,观察其对 SONFH 股骨头成血管-成骨耦联的影响,并探索相关的作用机制,研究结果将从“血-骨耦联”角度阐述 JPHGF 功效内涵,为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 120 只 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 220~250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SYXK (京) 2019-0003;饲养于中国中医科学院中药研究所实验动物中心,屏障环境,实验期间自由摄食饮水,温度 22~24 ℃,湿度 40%~60%。本实验操作均符合中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理委员会要求和标准 (伦理号 2022B171)。

1.2 JPHGF 组成和制备 组成:茯苓,赤芍,党参,白术,当归,川芎,桂枝,熟地黄,川牛膝等。所有饮片购自安国市昌达中药材饮片有限公司,批号

1609001G143V, 经安国市昌达中药材饮片有限公司许琪中药师鉴定符合 2020 年版《中国药典》一部检验标准。制备: 将除鹿角外的 10 种药物按 JPHGF 处方比例加水煎煮 3 次, 每次 1 h, 合并水煎液, 过滤, 浓缩; 然后将鹿角加入浓缩液中融化、浓缩、干燥, 制成干燥粉备用。

1.3 试剂 注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(MPS) 购自美国 Pfizer Manufacturing Belgium NV 公司, 批号 EL9706; LPS 购自美国 Sigma Aldrich 公司, 货号 L2880; 苏木素-伊红(HE) 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, 货号 G1120; 印度墨汁购自福州飞净生物科技有限公司, 货号 PH1714; Microfil[®] 血管造影剂购自美国 Flow Tech, Inc. 公司, 货号 MV-130; CD31 抗体购自美国 Bio-Techne 公司, 货号 AF3628; 成骨细胞特异性转录因子(Osterix) 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 货号 SC-393325; 内皮黏蛋白(Emcn) 抗体购自美国赛默飞世尔科技公司, 货号 PA5-115178; Notch-1 抗体购自美国 ImmunoWay 公司, 货号 YC006; Noggin 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, 货号 A8305; VEGF 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 19003-1-AP; I 型胶原蛋白(collagen I) 抗体购自武汉塞维尔生物技术有限公司, 货号 GB11022-3。健骨生丸(JGSW) 购自北京匡达制药厂, 批号 202201。

1.4 仪器 BX50 型正置显微镜(日本 Olympus 公司); 1176 型 Micro-CT 仪(德国 Bruker 公司); Aesthesio 型 VonFrey 纤维丝测痛仪(上海玉研科学仪器有限公司); BIO-CHP 型冷热板测痛仪(法国 Bioseb 公司); CKX31 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 120 只 SD 大鼠随机分为 6 组, 每组 20 只, 雌雄各半, 随机分为正常组, 模型组, JPHGF 低、中、高剂量(2.5、5、10 g·kg⁻¹) 组, 阳性药 JGSW(1.53 g·kg⁻¹) 组。除正常组外每组第 1、2 天尾静脉注射 20 μg·kg⁻¹ LPS, 每天 1 次; 第 3~5 天均臀部肌肉注射 40 mg·kg⁻¹ MPS, 每天 1 次^[13]; 同时正常组给予等体积生理盐水, 以组织病理学显示股骨头大量空骨陷窝形成, 同时 Micro-CT 扫描显示股骨头骨小梁稀疏、断裂, 骨密度显著降低为造模成功的标志。造模 4 周后灌胃给药, 每组 10

只大鼠给药 4 周后取材, 其余大鼠给药 8 周后取材。造模及给药流程见中国知网本文增强出版附加材料。根据药品使用说明书和课题组前期研究基础^[11,14], 本研究采用 JGSW 作为阳性对照药。

2.2 行为学检测 分别在给药第 4、8 周检测机械痛阈值和冷痛敏反应。机械痛阈值检测: 将大鼠单独置于测痛笼中适应 15 min, 用不同力的 VonFrey 纤维丝垂直刺激大鼠右后足跖中部, 如果大鼠短时间内出现缩足、抬足或舔足, 则记为阳性反应, 采用“up-down”方法^[15]计算 50% 缩足阈值。冷痛敏反应检测: 将冷热板测痛仪预冷至 4℃, 逐一将大鼠置于冷板上, 放入瞬间开始计时, 到大鼠出现抬足或舔足等反应开始, 随后继续观察, 记录 5 min 内大鼠于冷板上出现抬足反应的次数。

2.3 Micro-CT 检测骨计量参数 取材固定 24 h 后采用 Micro-CT 仪对股骨头进行扫描, 采用 SkyScan 1176 系统对样本进行扫描, 扫描精度 9.02 μm, 扫描电压 65 kV, 扫描电流 385 μA。采用 NRecon 软件对图片数据进行重构, Dataviewer 软件观察各层面结构, CTan 软件分析骨计量参数。

2.4 HE 染色 股骨头 Micro-CT 扫描后, 进行脱钙、包埋、切片和 HE 染色处理。在显微镜下对股骨头骨小梁结构和脂肪细胞进行观察, 随机抽取 3 个视野进行骨小梁面积比和脂肪细胞计数。此外, 随机选取 5 个视野, 每个视野计算 50 个骨陷窝中的空骨陷窝数, 计算空骨陷窝率(空骨陷窝数/总骨陷窝数×100%)。

2.5 血管生成评估 采用微血管造影灌注(Microfil 灌注)与墨汁动脉灌注法评估血管生成状态。Microfil 灌注法: 大鼠麻醉后, 经肝素生理盐水冲洗循环系统, 随后依据造影剂说明书操作向大鼠血管系统内注入 Microfil 溶液, 灌注后大鼠置于 4℃ 环境过夜; 次日, 分离股骨头, 经 10% 中性福尔马林固定后, 置于 10% EDTA 溶液中进行脱钙处理, 以备 Micro-CT 扫描, 使用 CTan 软件分析血管体积比。墨汁灌注法: 大鼠经肝素生理盐水冲洗循环系统后, 通过心脏穿刺向循环系统内注入 5% 墨汁溶液, 直至内脏器官均匀黑染; 随后摘取股骨头, 经固定与脱钙处理后, 制备病理切片, 在光学显微镜观察切片中股骨头内部的血管结构, 在高倍镜观察下随机选择 5 个不同的视野, 利用 ImageJ 图像分析软件对股骨头血管面积进行量化分析。

2.6 血液流变学指标测定 于大鼠腹主动脉取血,抗凝,检测红细胞聚集指数、血浆黏度、全血低切相对指数、全血高切相对指数、全血黏度切变率。

2.7 凝血功能检测 于大鼠腹主动脉取血,抗凝,检测凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)。

2.8 免疫组化分析 第 2 批处死大鼠左侧股骨头固定 48 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋切片,脱蜡至水,将切片放入 3% H_2O_2 封闭液常温孵育 10 min,PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 3 min,完成后使用 5% BSA 封闭液 37 ℃ 孵育 1 min。滴加一抗(collagen I, 1:1 000;Notch-1, 1:150)4 ℃ 孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。二抗 37 ℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 15 min,使用 DAB 显色液(DAB 显色 1 min,PBS 阻断显色)。最后使用梯度乙醇及二甲苯脱水,透明中性树胶封固,晾干。每张切片在 100 倍镜下选择 3 个视野,用 ImageJ 软件分析计算结果。

2.9 免疫荧光分析 取第 2 批处死大鼠股骨头石蜡切片,常规脱蜡、水化,热修复,室温孵育 Triton X-100 15 min 以提高组织通透性,加入 10% 驴血清室温条件下封闭 15 min,滴加 CD31、Emcn、Osterix、Noggin 一抗(1:200),4 ℃ 过夜。37 ℃ 复温 45 min,滴加荧光素标记相应的二抗,37 ℃ 孵育 2 h,PBST 洗 3 次,每次 5 min。室温 DAPI 染核 5 min,PBS 洗 3 次,封片。荧光显微镜对切片进行观察,每组选取 4 张切片,用 ImageJ 软件进行荧光相对面积分析。

2.10 蛋白免疫印迹分析 使用 RIPA 裂解液提取各组股骨头总蛋白,根据 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,电泳分离蛋白,转膜,PVDF 膜置于 5% 脱

脂奶粉中,室温孵育 2 h。加入一抗(VEGF, 1:700;Noggin, 1:2 000; β -actin, 1:10 000)4 ℃ 孵育过夜。洗膜后,加入对应二抗,室温孵育 2 h。ECL 发光液曝光显影,用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以 β -actin 为内参,计算蛋白相对表达量。

2.11 统计学分析 统计数据采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件分析,实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验对 2 组间进行比较,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),非正态分布的数据进行非参数检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 JPHGF 改善 SONFH 大鼠机械痛和冷痛敏反应 机械痛测试结果见表 1。给药 4 周后,与正常组相比,模型组大鼠机械痛阈值显著降低($P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 各剂量组和阳性药 JGSW 组机械痛阈值有不同程度的升高,JPHGF 给药剂量越高作用越明显,其中 JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。给药 8 周后,与正常组相比,模型组大鼠机械痛阈值显著降低($P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组机械痛阈值显著升高($P<0.001$)。冷痛敏反应检测结果见表 1。给药 4 周后,与正常组相比,模型组大鼠 5 min 内抬脚次数显著增加($P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组大鼠 5 min 内抬脚次数显著降低($P<0.001$)。给药 8 周后,与正常组相比,模型组大鼠 5 min 内抬脚次数显著增加($P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组大鼠 5 min 内抬脚次数显著降低($P<0.01$)。

表 1 JPHGF 对 SONFH 大鼠机械痛和冷痛敏的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

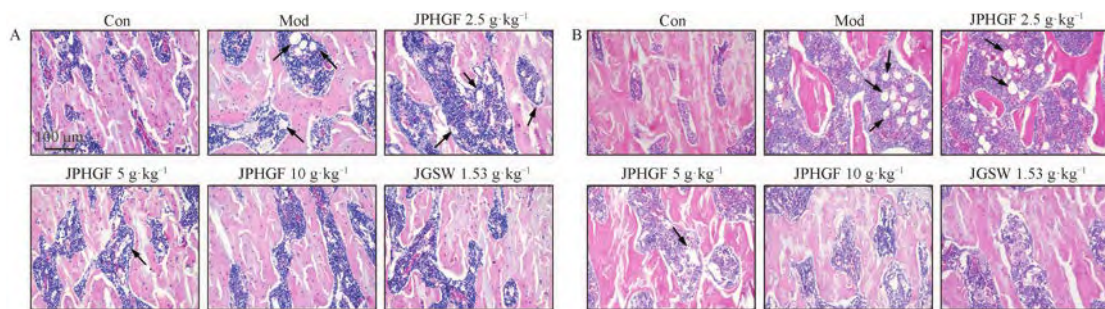
Table 1 Effect of JPHGF on mechanical pain and cold pain sensitivity in SONFH rats($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	50%缩足阈值/g		5 min 内抬脚次数	
		第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周
Con	—	12.97 $\pm$ 1.60	12.57 $\pm$ 1.42	6.75 $\pm$ 0.46	5.11 $\pm$ 1.36
Mod	—	6.18 $\pm$ 1.71 ³⁾	5.51 $\pm$ 1.98 ³⁾	12.50 $\pm$ 2.51 ³⁾	11.86 $\pm$ 2.12 ³⁾
JPHGF	2.5	6.38 $\pm$ 1.92	6.49 $\pm$ 2.38	11.00 $\pm$ 1.66	10.22 $\pm$ 1.48
	5	8.34 $\pm$ 1.78 ⁴⁾	8.80 $\pm$ 1.57 ⁶⁾	8.50 $\pm$ 1.69 ⁶⁾	7.71 $\pm$ 3.64 ⁵⁾
	10	9.78 $\pm$ 1.84 ⁶⁾	10.70 $\pm$ 2.02 ⁶⁾	7.30 $\pm$ 2.11 ⁶⁾	7.57 $\pm$ 2.07 ⁵⁾
JGSW	1.53	8.80 $\pm$ 1.92 ⁵⁾	9.78 $\pm$ 1.63 ⁶⁾	8.17 $\pm$ 1.47 ⁶⁾	7.86 $\pm$ 1.35 ⁵⁾

注:Con. 正常组;Mod. 模型组;JPHGF. 健脾活骨方组;JGSW. 健骨生丸组(图 1~7、表 2~9 同)。与正常组相比¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$,³⁾ $P<0.001$;与模型组相比⁴⁾ $P<0.05$,⁵⁾ $P<0.01$,⁶⁾ $P<0.001$ (表 2~9 同)。

3.2 JPHGF 抑制 SONFH 大鼠股骨头组织病理学改变 SONFH 大鼠股骨头组织 HE 染色和组织病理半定量评分结果见图 1、表 2。给药 4 周后,与正常组相比,模型组大鼠股骨头骨小梁变稀疏,脂肪细胞数量显著增多($P<0.001$),空骨陷窝率显著上升($P<0.001$),骨小梁面积显著减少($P<0.01$);与模型组相比,JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组空骨陷窝率显著减少($P<0.01, P<0.001$),

JPHGF 高剂量组骨小梁面积显著增加($P<0.05$)。给药 8 周后,与正常组相比,模型组大鼠股骨头骨小梁断裂变细,细胞核发生固缩,脂肪细胞数量和空骨陷窝率显著增加($P<0.001$),骨小梁面积显著减少($P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组脂肪细胞数目和空骨陷窝率显著降低($P<0.05, P<0.001$),骨小梁面积显著增加($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。



A. 给药 4 周;B. 给药 8 周(图 2、3 同)。箭头指示脂肪细胞。

图 1 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头组织病理变化的影响(HE 染色, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of JPHGF on the pathological changes of femoral head tissue in SONFH rats(HE staining, $\times 200$)

表 2 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头组织病理半定量评分的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of JPHGF on the semi-quantitative score of femoral head tissue histopathology in SONFH rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	脂肪细胞个数		空骨陷窝率/%		骨小梁面积占比/%	
		第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周
Con	-	7.33 $\pm$ 1.03	7.17 $\pm$ 0.75	14.00 $\pm$ 1.79	15.00 $\pm$ 2.10	43.27 $\pm$ 3.52	43.73 $\pm$ 2.21
Mod	-	12.50 $\pm$ 1.38 ³⁾	20.00 $\pm$ 1.27 ³⁾	27.67 $\pm$ 2.66 ³⁾	32.67 $\pm$ 6.15 ³⁾	34.60 $\pm$ 2.39 ²⁾	32.03 $\pm$ 4.85 ³⁾
JPHGF	2.5	11.50 $\pm$ 2.07	17.50 $\pm$ 2.81	25.17 $\pm$ 0.98	29.33 $\pm$ 6.89	35.83 $\pm$ 6.52	35.26 $\pm$ 3.10
	5	11.00 $\pm$ 2.19	12.17 $\pm$ 2.14 ⁶⁾	23.33 $\pm$ 1.63 ³⁾	26.33 $\pm$ 2.67 ⁴⁾	37.75 $\pm$ 3.46	37.47 $\pm$ 2.92 ⁴⁾
	10	10.17 $\pm$ 1.47	10.17 $\pm$ 1.72 ⁶⁾	22.00 $\pm$ 1.79 ⁶⁾	21.67 $\pm$ 1.97 ⁶⁾	41.69 $\pm$ 4.72 ⁴⁾	41.27 $\pm$ 3.77 ⁶⁾
JGSW	1.53	10.17 $\pm$ 1.60	10.67 $\pm$ 0.82 ⁶⁾	21.17 $\pm$ 1.84 ⁶⁾	22.00 $\pm$ 1.79 ⁶⁾	40.76 $\pm$ 5.24	40.48 $\pm$ 4.66 ⁵⁾

3.3 JPHGF 抑制 SONFH 大鼠股骨头影像学改变

Micro-CT 和骨组织形态计量学分析结果见图 2、表 3。给药 4 周后,与正常组比较,模型组大鼠股骨头骨小梁稀疏、排列不规则,骺线不明显,骨密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁数量(Tb. N)和骨体积分数(BV/TV)均显著降低($P<0.001$),骨小梁分离度(Tb. Sp)和骨表面积体积比(BS/BV)显著升高($P<0.001$);与模型组比较,JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组骨修复程度增强,BMD、Tb. Th 和 BV/TV 均显著升高($P<0.01, P<0.001$),Tb. Sp 和 BS/BV 均显著降低($P<0.05, P<0.01, P<0.001$),JPHGF 高剂量组 Tb. N 显著升高($P<0.05$)。给药 8

周后,与正常组比较,模型组大鼠股骨头骨小梁稀疏、变薄、断裂,骺线不明显,软骨下囊性变形成,骨计量学参数 BMD、Tb. Th、Tb. N、BV/TV、Tb. Sp 和 BV/TV 均发生显著变化($P<0.001$);与模型组比较,各给药组骨小梁稀疏、囊性病变区域减少,JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组 BMD、Tb. Th、Tb. N 和 BV/TV 显著升高($P<0.05, P<0.01, P<0.001$),Tb. Sp 和 BS/BV 显著降低($P<0.01, P<0.001$)。

3.4 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头微血管的保护作用 墨汁灌注结果见图 3、表 4。给药 4 周后,与正常组相比,模型组大鼠股骨头髓腔内墨汁灌注面积显著减少($P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 低、

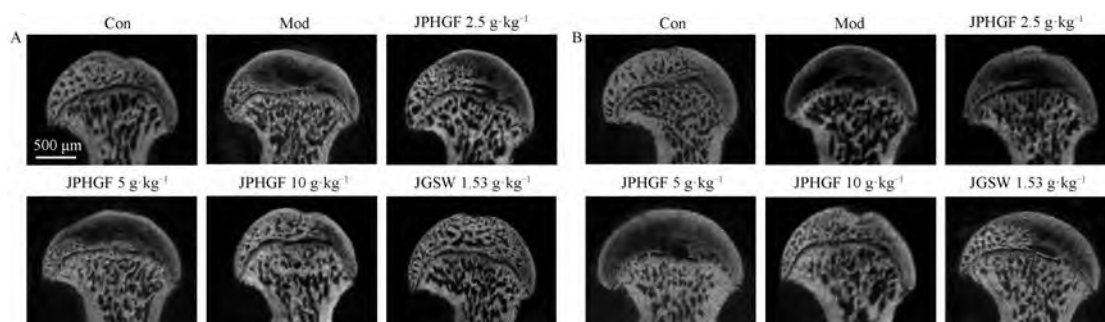


图 2 SONFH 大鼠股骨头组织的 Micro-CT 影像学变化

Fig. 2 Micro-CT imaging changes of femoral head tissue in SONFH rats

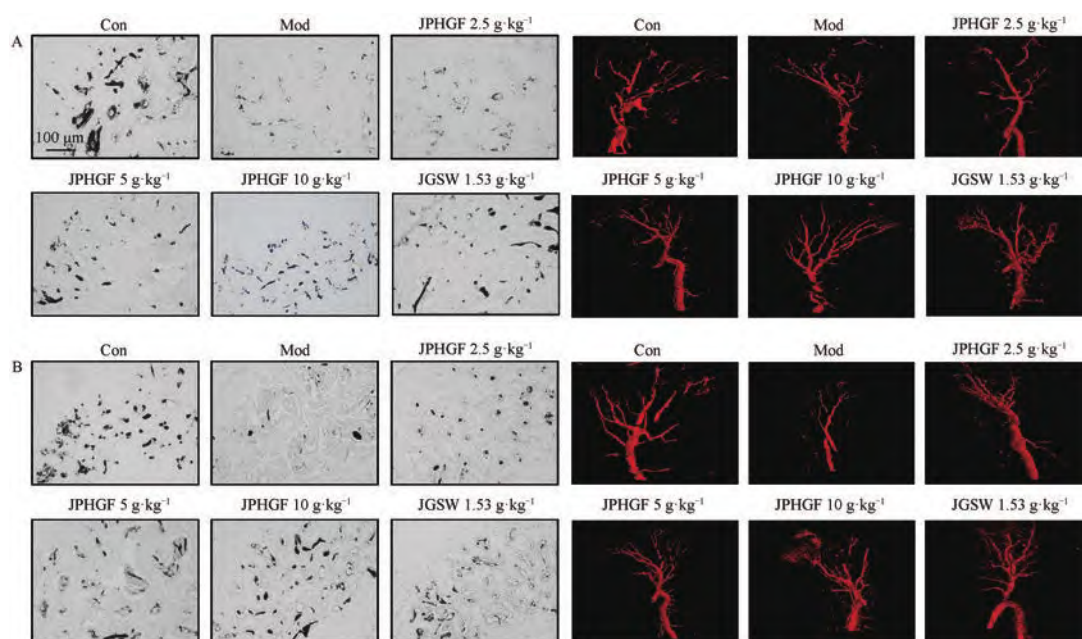
表 3 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头骨计量指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 3 Effect of JPHGF on bone metrology index of femoral head in SONFH rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	BMD/%		Tb. Th/mm		Tb. N/mm ⁻¹	
		第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周
Con	—	0.60±0.05	0.58±0.11	0.23±0.02	0.22±0.04	5.67±0.68	5.05±0.14
Mod	—	0.44±0.03 ³⁾	0.39±0.06 ³⁾	0.13±0.01 ³⁾	0.12±0.02 ³⁾	4.64±0.18 ³⁾	4.21±0.27 ³⁾
JPHGF	2.5	0.47±0.03	0.45±0.07	0.16±0.01	0.16±0.01	4.82±0.27	4.49±0.47
	5	0.51±0.01 ⁵⁾	0.52±0.05 ⁴⁾	0.18±0.01 ⁶⁾	0.18±0.02 ⁵⁾	5.12±0.27	4.73±0.30 ⁴⁾
	10	0.56±0.02 ⁶⁾	0.56±0.05 ⁵⁾	0.18±0.01 ⁶⁾	0.21±0.04 ⁶⁾	5.23±0.16 ⁴⁾	5.02±0.19 ⁶⁾
JGSW	1.53	0.52±0.04 ⁵⁾	0.55±0.08 ⁵⁾	0.18±0.02 ⁶⁾	0.19±0.03 ⁵⁾	5.12±0.43	4.66±0.20 ⁴⁾
组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	BV/TV/%		Tb. Sp/mm		BS/BV/mm ⁻¹	
		第 4 周	第 8 周	第 4 周	8 周	第 4 周	第 8 周
Con	—	90.55±3.09	86.18±4.48	0.08±0.01	0.08±0.00	13.15±3.24	14.15±2.69
Mod	—	73.80±2.82 ³⁾	74.83±3.58 ³⁾	0.10±0.01 ³⁾	0.12±0.02 ³⁾	21.22±2.61 ³⁾	26.01±2.72 ³⁾
JPHGF	2.5	77.31±3.59	78.57±3.52	0.10±0.02	0.10±0.01 ⁴⁾	19.46±1.57	21.40±2.34
	5	84.60±3.50 ⁶⁾	83.50±6.54 ⁵⁾	0.08±0.00 ⁴⁾	0.09±0.01 ⁵⁾	16.58±1.73 ⁵⁾	17.66±4.13 ⁶⁾
	10	85.06±1.94 ⁶⁾	84.95±2.26 ⁵⁾	0.08±0.01 ⁵⁾	0.08±0.01 ⁶⁾	15.39±1.52 ⁶⁾	15.11±1.49 ⁶⁾
JGSW	1.53	84.84±2.61 ⁶⁾	83.16±4.77 ⁴⁾	0.08±0.01 ⁴⁾	0.09±0.02 ⁵⁾	15.92±1.31 ⁶⁾	17.48±4.24 ⁶⁾

中、高剂量组和 JGSW 组墨汁灌注面积显著增加 ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。给药 8 周后,与正常组相比,模型组大鼠股骨头髓腔内墨汁灌注面积显著减少 ($P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 各剂量组和 JGSW 组墨汁灌注面积均显著增加 ($P<0.05, P<0.001$),且 JPHGF 剂量越高,效果越好。类似的,Microfil 灌注结果也显示,JPHGF 各给药组和 JGSW 组可以显著增加 SONFH 大鼠股骨头内的微血管体积 ($P<0.001$)。上述结果提示 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头微循环血管具有保护作用。

3.5 JPHGF 对 SONFH 大鼠血液流变和凝血功能的改善作用 血液高黏及高凝状态与 SONFH 的发生密切相关,凝血功能异常会导致股骨头内血管微血栓形成,造成股骨头内血供减少,最终导致股骨头坏死^[16-17]。血液流变学检测结果见表 5。给药 4 周后,与正常组相比,模型组大鼠全血高切/低切相对

指数、红细胞聚集指数、血浆黏度、各条件全血黏度切变率均显著升高 ($P<0.05, P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 高剂量组上述血液流变学指标显著降低 ($P<0.05, P<0.01$)。给药 8 周后,与正常组相比,模型组大鼠各血液流变学指标显著升高 ($P<0.001$),JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组上述血液流变学相关指标均得到显著抑制 ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。凝血功能评估方面,给药 4 周后,与正常组相比,模型组大鼠 PT、APTT 及 TT 显著缩短 ($P<0.001$),FIB 显著升高 ($P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 高剂量组和 JGSW 组上述指标显著改善 ($P<0.05, P<0.01$)。给药 8 周后,与正常组相比,模型组大鼠 PT、APTT 及 TT 显著缩短 ($P<0.001$),FIB 显著升高 ($P<0.001$),JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组这 4 项指标显著改善 ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。上述结果表明 JPHGF 可以改善

图 3 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头内血管损伤的影响($\times 200$)Fig. 3 Effect of JPHGF on the vascular injury of femoral head in SONFH rats($\times 200$)表 4 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头血管面积和体积的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 4 Effect of JPHGF on the area and volume of femoral head vessels in SONFH rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	血管面积占比/%		血管体积占比/%	
		第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周
Con	—	5.02 $\pm$ 0.80	4.50 $\pm$ 0.53	9.67 $\pm$ 1.23	9.22 $\pm$ 1.21
Mod	—	1.86 $\pm$ 0.36 ³⁾	1.67 $\pm$ 0.28 ³⁾	3.64 $\pm$ 0.36 ³⁾	3.69 $\pm$ 0.56 ³⁾
JPHGF	2.5	2.65 $\pm$ 0.18 ⁴⁾	2.42 $\pm$ 0.44 ⁴⁾	5.67 $\pm$ 0.45 ⁶⁾	6.22 $\pm$ 0.52 ⁶⁾
	5	3.00 $\pm$ 0.44 ⁵⁾	3.15 $\pm$ 0.44 ⁶⁾	6.26 $\pm$ 0.53 ⁶⁾	6.73 $\pm$ 0.44 ⁶⁾
	10	3.48 $\pm$ 0.54 ⁶⁾	3.71 $\pm$ 0.43 ⁶⁾	8.14 $\pm$ 0.80 ⁶⁾	8.71 $\pm$ 0.89 ⁶⁾
JGSW	1.53	3.36 $\pm$ 0.53 ⁶⁾	3.41 $\pm$ 0.50 ⁶⁾	7.43 $\pm$ 0.73 ⁶⁾	8.14 $\pm$ 0.80 ⁶⁾

SONFH 大鼠的微血管循环异常。

3.6 JPHGF 促进 SONFH 大鼠股骨头成血管-成骨耦联 免疫荧光结果显示,与正常组相比,模型组大鼠股骨头 Osterix⁺染色面积、CD31+Emcn⁺共染色面积以及 CD31+Emcn+Osterix⁺共染色面积显著减少 ($P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组 Osterix⁺染色面积、CD31+Emcn⁺共染色面积以及 CD31+Emcn+Osterix⁺共染色面积显著增加 ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$),同时,JPHGF 高剂量组对上述指标的改善作用优于 JGSW 组,这些数据表明 JPHGF 在促进 SONFH 大鼠成血管-成骨耦联中发挥重要作用,见图 4、表 6。

3.7 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头 collagen I 表达的影响 免疫组化结果显示,与正常组相比,模型组

大鼠股骨头 collagen I 表达显著降低 ($P<0.001$);与模型组比较,JPHGF 低、中、高剂量组和 JGSW 组大鼠股骨头 collagen I 表达均显著增加 ($P<0.01, P<0.001$),见图 5、表 7。

3.8 JPHGF 对 VEGF-Notch-Noggin 信号通路的影响 与正常组相比,模型组 Notch-1、VEGF 和 Noggin 蛋白表达显著降低 ($P<0.05, P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 中、高剂量组和 JGSW 组 Notch-1、VEGF 和 Noggin 蛋白表达显著升高 ($P<0.01, P<0.001$),见图 6、表 8。与正常组相比,模型组 CD31 和 Noggin 蛋白共表达水平显著下降 ($P<0.001$);与模型组相比,JPHGF 中、高剂量组 CD31 和 Noggin 蛋白共表达水平显著升高 ($P<0.001$),JGSW 也有类似作用 ($P<0.05$),见图 7、表 9。

表 5 JPHGF 对 SONFH 大鼠血液流变学和凝血功能的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 Effect of JPHGF on hemorheology and coagulation function of SONFH rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	红细胞聚集指数		血浆黏度/mPa·s		全血低切相对指数	
		第4周	第8周	第4周	第8周	第4周	第8周
Con	—	5.90±0.50	5.88±0.19	1.31±0.05	1.29±0.02	22.43±2.33	21.32±1.46
Mod	—	8.02±0.72 ³⁾	7.57±0.28 ³⁾	1.77±0.04 ³⁾	1.69±0.09 ³⁾	26.57±4.11 ¹⁾	25.02±0.10 ³⁾
JPHGF	2.5	7.41±0.80	7.12±0.40	1.68±0.15	1.58±0.04 ⁴⁾	24.49±2.89	23.07±1.23
	5	7.12±0.57	6.94±0.28 ⁵⁾	1.67±0.10	1.55±0.04 ⁵⁾	24.14±1.54	22.55±1.21 ⁴⁾
	10	6.99±0.57 ⁴⁾	6.56±0.30 ⁶⁾	1.59±0.04 ⁵⁾	1.40±0.04 ⁶⁾	22.45±2.23 ⁴⁾	22.02±1.89 ⁵⁾
JGSW	1.53	7.06±0.46 ⁴⁾	6.84±0.39 ⁵⁾	1.42±0.10 ⁴⁾	0.19±0.03 ⁶⁾	24.20±1.03	22.52±1.33 ⁴⁾
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	全血高切相对指数		全血黏度切变率(1 s ⁻¹)		全血黏度切变率(50 s ⁻¹)	
		第4周	第8周	第4周	第8周	第4周	第8周
Con	—	3.31±0.32	3.24±0.19	16.30±1.16	17.07±1.70	5.29±0.18	5.49±0.19
Mod	—	4.36±0.25 ³⁾	4.09±0.22 ³⁾	20.38±1.43 ³⁾	21.32±2.19 ³⁾	6.73±0.16 ³⁾	6.64±0.23 ³⁾
JPHGF	2.5	4.28±0.37	3.73±0.16	19.31±2.04	18.87±1.05 ⁴⁾	6.40±0.35	6.21±0.31
	5	4.06±0.16	3.62±0.28 ⁴⁾	18.64±1.36	18.27±0.90 ⁵⁾	6.29±0.31	6.06±0.29 ⁵⁾
	10	3.81±0.12 ⁵⁾	3.46±0.27 ⁵⁾	17.94±1.14 ⁴⁾	17.30±0.90 ⁶⁾	6.04±0.46 ⁵⁾	5.64±0.25 ⁶⁾
JGSW	1.53	3.98±2.20	3.57±0.40 ⁵⁾	18.38±1.01	17.90±0.95 ⁶⁾	6.14±0.43 ⁴⁾	5.76±0.40 ⁶⁾
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	全血黏度切变率(100 s ⁻¹)		全血黏度切变率(200 s ⁻¹)		PT/s	
		第4周	第8周	第4周	第8周	第4周	第8周
Con	—	4.71±0.26	4.94±0.55	3.89±0.20	3.73±0.30	16.63±0.85	16.93±1.11
Mod	—	5.61±0.26 ³⁾	5.86±0.32 ³⁾	4.67±0.39 ³⁾	4.99±0.31 ³⁾	13.48±1.17 ³⁾	13.62±1.18 ³⁾
JPHGF	2.5	5.25±0.24	5.54±0.21	4.47±0.20	4.48±0.30 ⁴⁾	14.81±1.18	14.14±1.71
	5	5.18±0.38	5.22±0.30 ⁴⁾	4.34±0.17	4.36±0.22 ⁵⁾	14.95±0.98	15.73±0.70 ⁴⁾
	10	4.96±0.26 ⁵⁾	5.09±0.43 ⁵⁾	4.16±0.30 ⁵⁾	4.11±0.33 ⁶⁾	15.42±1.06 ⁴⁾	16.62±1.19 ⁶⁾
JGSW	1.53	5.02±0.36 ⁵⁾	5.11±0.30 ⁵⁾	4.34±0.24	4.22±0.26 ⁶⁾	15.24±1.11 ⁴⁾	16.49±0.95 ⁶⁾
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	APTT/s		FIB/g·L ⁻¹		TT/s	
		第4周	第8周	第4周	第8周	第4周	第8周
Con	—	13.80±1.08	14.54±1.01	3.22±0.31	3.54±0.43	32.99±1.30	33.39±2.05
Mod	—	9.38±0.54 ³⁾	10.98±1.64 ³⁾	4.21±0.33 ³⁾	4.81±0.31 ³⁾	28.67±1.54 ³⁾	27.88±1.67 ³⁾
JPHGF	2.5	9.94±1.14	11.27±1.30	3.84±0.22	4.05±0.35 ⁴⁾	30.59±1.39	29.92±0.87
	5	10.51±1.78	12.94±1.04 ⁴⁾	3.79±0.19	3.85±0.50 ⁵⁾	31.06±1.09	31.76±2.37 ⁵⁾
	10	11.91±1.26 ⁵⁾	14.06±1.19 ⁶⁾	3.60±0.41 ⁵⁾	3.71±0.49 ⁶⁾	31.89±1.80 ⁴⁾	32.83±2.39 ⁶⁾
JGSW	1.53	11.73±1.05 ⁵⁾	13.92±1.19 ⁵⁾	3.69±0.30 ⁴⁾	3.82±0.32 ⁵⁾	31.83±2.66 ⁴⁾	32.03±1.44 ⁵⁾

4 讨论

JPHGF 是陈卫衡教授治疗非创伤性股骨头坏死 30 多年的临床经验方,为“健脾化痰、活血通络”治法的代表方药,方中茯苓、赤芍共为君药,前者健脾化痰除湿,后者活血通络止痛,起“痰瘀同治”之功效;党参、白术、陈皮、当归、川芎、桂枝共为臣药,助君药益气健脾、化痰祛浊、活血通络,再加熟地黄、鹿角佐药,意在专攻病位兼肾之证,配上使药川牛膝引药下行,既能补肾又能直达病位。现代药理学研究表明,茯苓、党参、白术、熟地黄、鹿角具有促进成骨作用^[18-22],当归和川芎具有促进成骨和成血管的双重作用^[23-25]。为观察 JPHGF 是否能促进 SONFH 大鼠成血管-成骨耦联,本研究通过建立 SONFH 大鼠模型探索其相关作用及机制。行为学检测结果显示,模型组大鼠机械痛降低和冷刺激时 5 min 内抬

脚次数增多;JPHGF 给药后,大鼠机械痛阈值升高和抬脚次数下降,且剂量越高改善作用越明显,说明 JPHGF 能够剂量依赖性缓解 SONFH 大鼠的疼痛症状。组织病理学及影像学结果显示模型组大鼠股骨头骨小梁断裂变细,空骨陷窝增多,细胞核固缩,脂肪细胞数量明显增多及骨小梁面积减少,骺线不明显,软骨下囊性变形成,骨密度下降,提示模型构建成功。JPHGF 给药后可以缓解 SONFH 大鼠股骨头囊性病变,增加骨密度,并抑制股骨头空骨陷窝、脂肪细胞和骨小梁结构的病理和形态学异常,且剂量越高,改善趋势越明显,提示 JPHGF 可以有效减轻过度激素使用导致的股骨头坏死。

SONFH 的具体病理机制尚不明确,但普遍认为其病理基础是骨内微循环障碍,而微血管损伤则是骨内微循环障碍的重要因素^[26]。因此,股骨头缺血

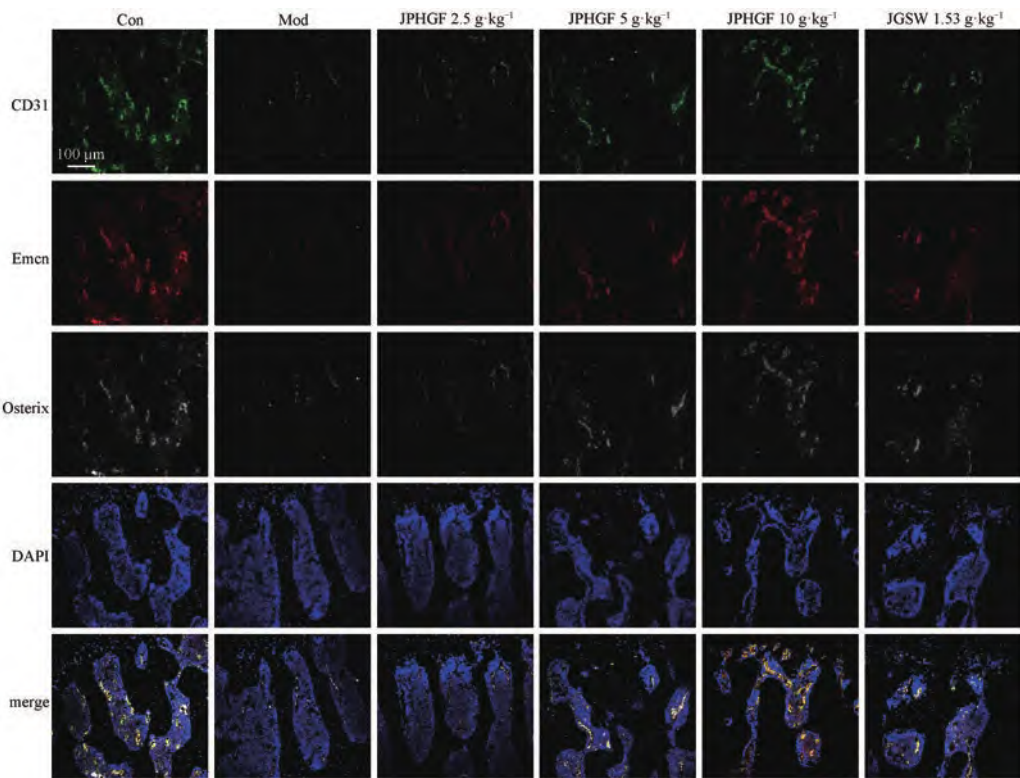


图 4 JPHGF 对 SONFH 大鼠成血管-成骨耦联的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 4 Effect of JPHGF on the angiogenic-osteogenic coupling of SONFH rats(immunofluorescence,×200)

表 6 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头 CD31、Emcn 和 Osterix 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 6 Effect of JPHGF on the protein expression of CD31, Emcn, and Osterix in the femoral head of SONFH rats($\bar{x}\pm s, n=4$)				
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Osterix ⁺ 相对荧光面积	CD31+Emcn ⁺ 相对荧光面积	CD31+Emcn+Osterix ⁺ 相对荧光面积
Con	—	1.00±0.18	1.00±0.06	0.96±0.12
Mod	—	0.32±0.05 ³⁾	0.32±0.01 ³⁾	0.27±0.08 ³⁾
JPHGF	2.5	0.42±0.03	0.38±0.05	0.37±0.04
	5	0.52±0.03 ⁴⁾	0.57±0.02 ⁶⁾	0.51±0.09 ⁵⁾
	10	0.69±0.05 ⁶⁾	0.70±0.02 ⁶⁾	0.75±0.11 ⁶⁾
JGSW	1.53	0.56±0.12 ⁵⁾	0.61±0.05 ⁶⁾	0.54±0.05 ⁵⁾

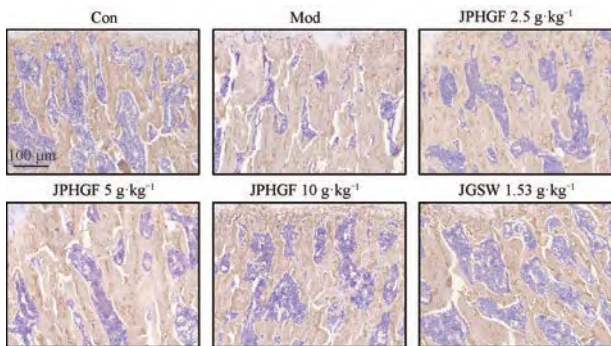


图 5 免疫组化检测 SONFH 大鼠股骨头 collagen I 蛋白表达(×200)

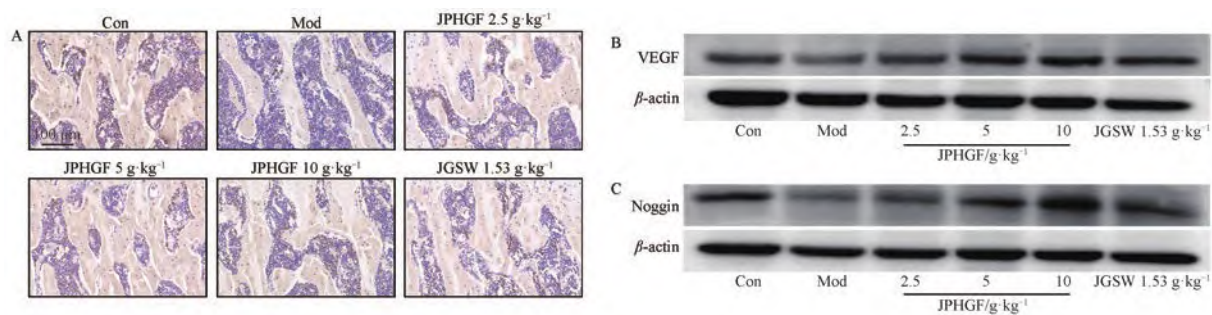
Fig. 5 Immunohistochemistry detection of the expression of collagen I protein in the femoral head of SONFH rats(×200)

表 7 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头 collagen I 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 7 Effect of JPHGF on the expression of collagen I protein in the femoral head of SONFH rats($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	collagen I 蛋白相对表达
Con	—	0.09±0
Mod	—	0.07±0 ³⁾
JPHGF	2.5	0.08±0 ⁵⁾
	5	0.08±0 ⁶⁾
	10	0.09±0 ⁶⁾
JGSW	1.53	0.09±0 ⁶⁾

坏死治疗的关键是促进坏死区血管的新生,重建血供和修复血管进而促进骨修复。墨汁灌注和 Microfil



A. Notch-1 蛋白免疫组化检测($\times 200$);B. VEGF 蛋白免疫印迹检测;C. Noggin 蛋白免疫印迹检测。

图 6 SONFH 大鼠股骨头 Notch-1、VEGF 和 Noggin 蛋白表达的检测

Fig. 6 Detection of the expression of Notch-1, VEGF, and Noggin proteins in the femoral head of SONFH rats

表 8 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头 Notch-1、VEGF 和 Noggin 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 8 Effect of JPHGF on the protein expression of Notch-1, VEGF, and Noggin in the femoral head of SONFH rats($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Notch-1 蛋白相对表达	VEGF 蛋白相对表达	Noggin 蛋白相对表达
Con	—	0.16 ± 0.01	1.07 ± 0.02	1.02 ± 0.05
Mod	—	$0.10\pm 0.01^{3)}$	$0.70\pm 0.05^{1)}$	$0.61\pm 0.08^{3)}$
JPHGF	2.5	0.11 ± 0.01	0.87 ± 0.34	0.71 ± 0.10
	5	$0.12\pm 0.01^{5)}$	$1.14\pm 0.17^{5)}$	$0.88\pm 0.03^{6)}$
	10	$0.14\pm 0.01^{6)}$	$1.24\pm 0.09^{6)}$	$0.98\pm 0.03^{6)}$
JGSW	1.53	$0.13\pm 0.01^{5)}$	$1.19\pm 0.06^{5)}$	$0.87\pm 0.02^{6)}$

注:Notch-1 检测样本量 4;VEGF 和 Noggin 检测样本量 3。

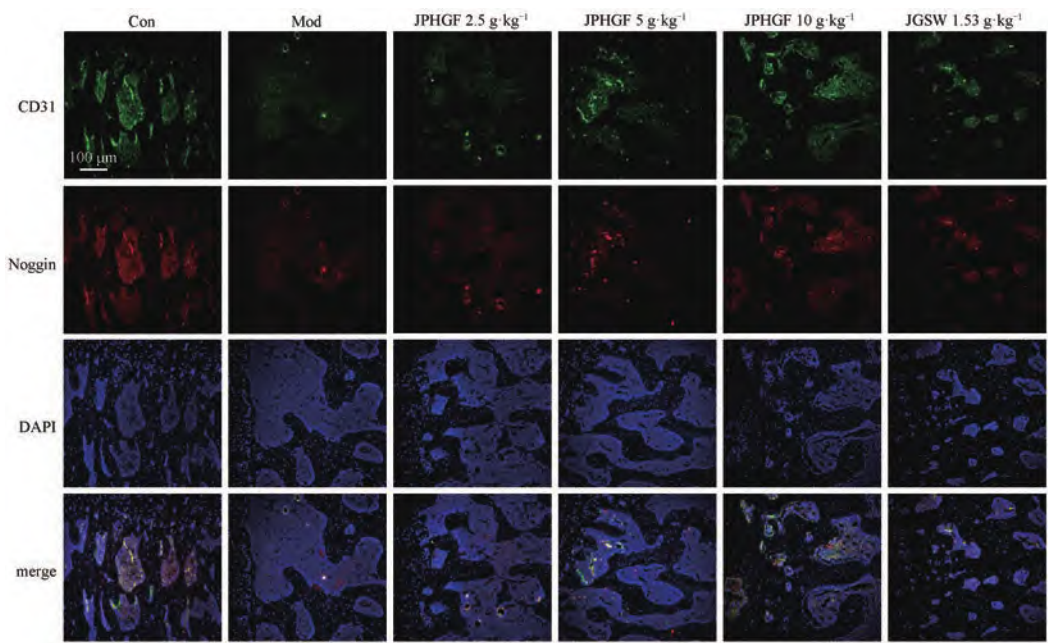


图 7 免疫荧光检测 SONFH 大鼠股骨头 CD31 和 Noggin 蛋白的共表达($\times 200$)

Fig. 7 Immunofluorescence detection of the co-expression of CD31 and Noggin proteins of the femoral head in SONFH rats($\times 200$)

成像技术可有效显示组织器官内血管结构形态,用于动物实验中血管状态观察,从而对血管结构和功

能进行评估。本研究表明,模型组大鼠股骨头血管面积和体积下降,经 JPHGF 治疗后大鼠股骨头内血

表 9 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头 CD31 和 Noggin 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 9 Effect of JPHGF on the expression of CD31 and Noggin proteins in the femoral head of SONFH rats($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CD31 ⁺ 相对荧光面积	Noggin ⁺ 相对荧光面积	CD31+Noggin ⁺ 相对荧光面积
Con	—	1.00±0.11	1.00±0.18	1.00±0.10
Mod	—	0.23±0.04 ³⁾	0.23±0.05 ³⁾	0.27±0.04 ³⁾
JPHGF	2.5	0.43±0.11	0.45±0.09	0.38±0.03
	5	0.68±0.13 ⁶⁾	0.57±0.12 ⁵⁾	0.55±0.04 ⁶⁾
	10	0.84±0.03 ⁶⁾	0.83±0.10 ⁶⁾	0.79±0.03 ⁶⁾
JGSW	1.53	0.49±0.07 ⁴⁾	0.51±0.06 ⁴⁾	0.42±0.04 ⁴⁾

管面积和体积增加,提示 JPHGF 对 SONFH 大鼠股骨头内的微血管具有保护作用。进一步,随着 SONFH 微血管损伤的进行性发展,最常见的病理改变是血管内凝血及微循环血栓^[27]。因此,本研究完成了血液流变学和凝血四项检测。结果表明,模型组红细胞聚集指数、血浆黏度、全血低/高切相对指数、全血黏度切变率和血浆 FIB 异常升高,血浆 PT、TT、APTT 异常降低,JPHGF 治疗后改善了 MPS 诱导的大鼠血液流变学异常和凝血异常,表明 JPHGF 具有促进 SONFH 大鼠微血管循环的作用。

H 亚型血管是一种新发现的骨内血管,主要分布于股骨干骺端和骨内膜,表现为 2 种内皮细胞标记抗体 CD31、Emcn 强阳性,其周围聚集大量 Osterix 阳性骨祖细胞,这些细胞能分泌 VEGF 促进血管生成^[28-29]。同时,Osterix 能够直接上调 collagen I 的转录水平,而 collagen I 是成骨分化的重要标志^[30]。故 H 型血管生成与骨量、骨强度具有明显相关性^[31-32],在成血管-成骨耦联中具有重要作用,可以改善股骨头坏死^[33]。课题组前期研究表明,JPHGF 能够升高股骨头坏死大鼠 CD31 和 VEGF 的表达,具有潜在的血管保护作用,因此本研究对 JPHGF 是否通过 H 型血管调控成血管-成骨耦联进行探索。结果显示,模型组大鼠股骨头 Emcn、CD31 弱阳性染色,提示 H 型血管明显减少,血管周围仅见少量 Osterix 骨祖细胞,与 collagen I 表达降低的结果一致;给药后,JPHGF 中、高剂量组大鼠股骨头 Emcn、CD31、Osterix、collagen I 表达显著增加,表明 JPHGF 能促进坏死股骨头中 H 型血管形成并促进坏死骨修复。

VEGF 是血管内皮细胞的重要调节因子,在血管生成过程中起着中心调控作用,是血管发育和新生血管形成过程中最重要的因素^[34-35]。内皮 Notch-Noggin 通路可由 VEGF 激活,从而促进 H 型血管的生长,对成血管-成骨耦联机制有关键作用^[29,36-37]。

为观察 JPHGF 是否通过 VEGF-Notch-Noggin 信号通路调控 H 型血管促进成血管-成骨耦联,本研究对相关指标进行了检测。结果显示,模型组大鼠 Notch-1、VEGF、Noggin 表达均显著下降,JPHGF 中、高剂量组 Notch-1、VEGF、Noggin 表达显著增加。CD31 可定位血管内皮细胞,内皮细胞可以分泌 Noggin,免疫荧光结果提示,JPHGF 可升高 SONFH 大鼠 CD31 与 Noggin 共表达水平,证实了在 JPHGF 治疗 SONFH 的过程中,VEGF-Notch-Noggin 信号通路被激活,且与 H 型血管密切相关。以上结果说明,JPHGF 可激活 SONFH 大鼠股骨头中 VEGF-Notch-Noggin 信号通路。

综上所述,本研究通过 MPS 联合 LPS 建立大鼠 SONFH 模型,证明了 JPHGF 能减轻 SONFH 大鼠疼痛,改善股骨头组织病理学和影像学病变,调节血液流变学、凝血异常以及微血管循环,促进成血管-成骨耦联,有效治疗 SONFH,其作用机制与激活 VEGF-Notch-Noggin 信号通路密切相关(见中国知网本文增强出版附加材料)。本研究结果为 JPHGF 治疗 SONFH 的临床应用和科学研究提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 张杰,曹建泽,刘永飞,等.激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2024,32(7):620.
- [2] PENG Y, WU S, LI Y, et al. Type H blood vessels in bone modeling and remodeling[J]. Theranostics, 2020,10(1):426.
- [3] SHEN Z, DONG W, CHEN Z, et al. Total flavonoids of *Rhizoma Drynariae* enhances CD31^{hi}Emcn^{hi} vessel formation and subsequent bone regeneration in rat models of distraction osteogenesis by activating PDGF-BB/VEGF/RUNX2/OSX signaling axis[J]. Int J Mol Med, 2022, 50(3):112.
- [4] 郭雪峰,于睿,任艳玲,等.基于“成骨-成血管耦联”理论探讨中医药防治激素性股骨头坏死的科学内涵[J].中华中医药学刊,2024,42(7):56.
- [5] 张鑫,张晓峰,徐西林,等.激素对 H 型血管的抑制作用与骨质疏松症发病的探讨[J].中国骨质疏松杂志,2022,28(5):706.

- [6] 徐腾腾,王金霞,明瑞蕊,等. 健脾活骨方对糖皮质激素致血管内皮细胞功能损伤的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6):1625.
- [7] KONG X, LI X, ZHANG C, et al. Aqueous fraction of Huogu Formula promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through the BMP and Wnt signaling pathways[J]. Rejuvenation Res, 2016, 19(6): 509.
- [8] CHEN W H, KONG X Y, WAN R, et al. Effects of Huogu I Formula on correlated factors of bone regeneration in chickens with steroid-induced necrosis of femoral head[J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(5):378.
- [9] JIANG Y, LIU D, KONG X, et al. Huogu I formula prevents steroid-induced osteonecrosis in rats by down-regulating PPARgamma expression and activating wnt/LRP5/beta-catenin signaling[J]. J Tradit Chin Med, 2014, 34(3):342.
- [10] KONG X, LI X, ZHANG C, et al. Ethyl acetate fraction of Huogu formula inhibits adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells via the BMP and Wnt signaling pathways[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(4):480.
- [11] 方罗昌婷,汪倩倩,孙丛丛,等. 基于 VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt 信号通路研究健脾活骨方对酒精性股骨头坏死血管损伤的修复作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(8): 186.
- [12] 吴秀丽,阎晓霞,任之强,等. 激素性股骨头坏死动物模型的造模方式和评价标准[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(21): 4560.
- [13] 李文茜,田亮玉,张谨,等. 基于 VEGF/PI3K/Akt 通路基因表达探讨骨坏死康复丸对激素性股骨头坏死大鼠血管新生的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2024, 41(8):2127.
- [14] 王丽丽,李群,胡智星,等. 基于氧化脂质代谢组 and 转录组学整合策略探索健脾活骨方治疗大鼠激素性股骨头坏死的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(11):190.
- [15] DIXON W J. Efficient analysis of experimental observations[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980, 20:441.
- [16] 邓振军,郑志永,徐谦,等. 激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(86):57.
- [17] 成衍男,潘振宇. 激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J]. 临床外科杂志, 2023, 31(4):301.
- [18] LEE S, CHOI E, YANG S M, et al. Bioactive compounds from sclerotia extract of *Poria cocos* that control adipocyte and osteoblast differentiation[J]. Bioorg Chem, 2018, 81:27.
- [19] 刘进进. 党参多糖对去卵巢大鼠骨质疏松的影响及机制研究[D]. 兰州:兰州大学, 2023.
- [20] 姜宇. 白术多糖对铅镉联合致骨骼衰老的防护作用[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2022.
- [21] 林日阳,秦军燕,吴锋,等. 熟地、鳖甲对大鼠成骨细胞增殖、碱性磷酸酶蛋白和核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(3):194.
- [22] 柴金莲,孙铁锋,李威,等. 鹿角胶对激素性股骨头坏死模型大鼠的治疗作用:粪便代谢组学分析[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(29):6187.
- [23] YANG Y, CHIN A, ZHANG L, et al. The role of traditional Chinese medicines in osteogenesis and angiogenesis [J]. Phytother Res, 2014, 28(1):1.
- [24] 鲁巍,郭睿,赵刚. 中药川芎对成骨细胞作用最佳浓度的体外实验[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(37):5483.
- [25] MENG H, GUO J, SUN J Y, et al. Angiogenic effects of the extracts from Chinese herbs: *Angelica* and *Chuanxiong*[J]. Am J Chin Med, 2008, 36(3): 541.
- [26] PAZDERSKA A, CROWTHER S, GOVENDER P, et al. Spontaneous resolution of avascular necrosis of femoral heads following cure of Cushing's syndrome[J]. Endocrinol Diabetes Metab Case Rep, 2016, 2016: 160015.
- [27] SUN H, ZHANG W, YANG N, et al. Activation of cannabinoid receptor 2 alleviates glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral head with osteogenesis and maintenance of blood supply [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(11): 1035.
- [28] KUSUMBE A P, RAMASAMY S K, ADAMS R H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone [J]. Nature, 2014, 507(7492): 323.
- [29] RAMASAMY S K, KUSUMBE A P, WANG L, et al. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone[J]. Nature, 2014, 507(7492):376.
- [30] 潘秋辉,马纪,于永春,等. 转录因子 Osterix 对成骨细胞 Col1a1 基因的反式激活作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(11):921.
- [31] WANG L, ZHOU F, ZHANG P, et al. Human type H vessels are a sensitive biomarker of bone mass [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(5):e2760.
- [32] GAO F, MAO T, ZHANG Q, et al. H subtype vascular endothelial cells in human femoral head: an experimental verification[J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(4):1497.
- [33] 马金辉,任岩松,王佰亮,等. H 亚型血管在股骨头坏死中的作用机制研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2021, 35(11):1486.
- [34] BAUTCH V L. VEGF-directed blood vessel patterning: from cells to organism[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(9): a6452.
- [35] XIE K, WEI D, SHI Q, et al. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(5):297.
- [36] 邹宇辉,岳志健. 血管生成中 DLL4/Notch 信号通路的作用及其与 VEGF、NO 的关系[J]. 广东医学, 2011, 32(8):1082.
- [37] DI MAGGIO N, BANFI A. The osteo-angiogenic signaling crosstalk for bone regeneration: harmony out of complexity[J]. Curr Opin Biotechnol, 2022, 76:102750.

[责任编辑 马超一]