

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.019

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.019

通血健骨丸对兔缺血性坏死股骨头 HIF-1 α , VEGF 和 BMP-2 表达的影响

王江伟¹, 魏道德², 王丽³, 李松伟⁴

(1. 驻马店魏道德骨科医院康复科, 河南 驻马店 463000; 2. 驻马店魏道德骨科医院风湿免疫科, 河南 驻马店 463000;
3. 驻马店魏道德骨科医院疼痛科, 河南 驻马店 463000; 4. 河南省中医院风湿免疫科, 河南 郑州 450002)

[摘要] 目的: 探究通血健骨丸对兔缺血性坏死股骨头中低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α), 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein, BMP-2)表达的影响。方法: 臀肌注射醋酸泼尼松龙诱导兔缺血性股骨头坏死模型, 正常对照组不做任何处理, 造模后, 观察正常对照组和模型组一般生理状况, 肉眼和X射线检查其股骨头的形态, HE染色检查病理学变化; 将构建的模型分成4组, 命名为模型组、通血健骨丸低剂量组、通血健骨丸中剂量组和通血健骨丸高剂量组, 通血健骨丸组按照低、中、高剂量分别给予300, 400, 500 mg/kg的通血健骨丸, 正常对照组和模型组给予等量容积生理盐水, 灌胃治疗; 应用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western印迹检测HIF-1 α , VEGF和BMP-2表达情况。结果: 建模后, 模型组食量减少, 精神萎靡, 活动范围局限; 模型组股骨头表面凹陷、骨密度不均一、负重区囊性变、关节间隙狭窄, 软骨下脂肪细胞增大、骨小梁变细、骨细胞萎缩; 模型组HIF-1 α , VEGF和BMP-2的表达量显著低于正常对照组($P < 0.05$); 通血健骨丸组HIF-1 α , VEGF和BMP-2的表达量显著高于模型组($P < 0.05$); 且随着通血健骨丸剂量增加, HIF-1 α , VEGF和BMP-2的表达量显著提高($P < 0.05$), 呈剂量依赖性。结论: 通血健骨丸能够促进兔缺血性坏死股骨头中HIF-1 α , VEGF和BMP-2上调表达, 进而促进骨骼修复。

[关键词] 通血健骨丸; 缺血性股骨头坏死; 低氧诱导因子1 α ; 血管内皮生长因子; 骨形态发生蛋白2

Effect of blood invigorating bone pill on HIF-1 α , VEGF and BMP-2 expression of rabbits with avascular necrosis of femoral head

WANG Jiangwei¹, WEI Daode², WANG Li³, LI Songwei⁴

(1. Department of Rehabilitation, Weidaode Orthopedics Hospital in Zhumadian, Zhumadian Henan 463000;

2. Department of Rheumatology and Immunology, Weidaode Orthopedics Hospital in Zhumadian, Zhumadian Henan 463000;

3. Department of Pain, Weidaode Orthopedics Hospital in Zhumadian, Zhumadian Henan 463000;

4. Department of Rheumatology and Immunology, Henan Traditional Chinese Medicine Hospital, Zhengzhou Henan 450002, China)

收稿日期 (Date of reception): 2017-09-21

通信作者 (Corresponding author): 李松伟, Email: LSW19671136@163.com

基金项目 (Foundation item): 河南省医学科技攻关计划项目 (201504152). This work was supported by the Henan Medical Science and Technology Research Project, China (201504152).

Abstract **Objective:** To explore the influence of blood invigorating bone pill on hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein (BMP-2) expression of rabbits with avascular necrosis of femoral head. **Methods:** The model of rabbit with avascular necrosis of femoral head was induced with prednisolone acetate by gluteal injection, and the normal control group were not given any treatment. After modeling, general physiological condition of normal control group and model group were observed, and the morphology of femoral head was examined by using naked eye and X-ray. The model were divided into four groups, and named for model group, blood invigorating bone pill low dose group, blood invigorating bone pill medium-dose group, and blood invigorating bone pill high dose group, with 300, 400, 500 mg/kg, respectively. The normal control group and model group were given the same volume of normal saline, and gastric lavage treatment. HIF-1 α , VEGF and BMP-2 expression was detected by using real time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot. **Results:** After modeling, there was less appetite, less mental activity, and limited range of activities in the model group. In the model group, the surface of femoral head was depressed, the bone density was uneven, the weight-bearing area was cystic, the joint space was narrow, the subchondral fat cells increased, the trabecular bone became thin and the bone cells atrophied. HIF-1 α , VEGF and BMP-2 expression in the model group were significantly lower than those in the normal control group ($P<0.05$). HIF-1 α , VEGF and BMP-2 expression in the blood strengthening bone pill group were significantly higher than those in the model group ($P<0.05$), HIF-1 α , VEGF and BMP-2 increased significantly with with the increase in the amount of blood strengthening bone pill ($P<0.05$), showing dose-dependent. **Conclusion:** Blood invigorating bone pill can promote HIF-1 α , VEGF and BMP-2 up-regulation expression of rabbits with avascular necrosis of the femoral head, and then promote bone repair.

Keywords blood invigorating bone pill; avascular necrosis of femoral head; hypoxia inducible factor 1 α ; vascular endothelial growth factor; bone morphogenetic protein 2

股骨头坏死是临床常见的难治性骨科疾病之一^[1],是由激素、酒精和股骨颈骨折不良愈合引发的^[2],临床主要表现为股骨头变形、跛行、疼痛和功能障碍,其致残率高,严重影响患者的身体健康^[3]。因此,探寻有效的治疗股骨头坏死的方案已经成为骨科医生研究的热点问题。西医对股骨头坏死的治疗局限在非手术介入疗法和手术介入疗法,主要包括针刺疗法、电激疗法和关节置换疗法,前者加重患者的痛苦,后者价格昂贵且存在一定的局限性^[4]。而中医学对股骨头坏死的病因及发病机制有独到的见解,祖国医学^[5]认为,缺血性股骨头坏死应归于“骨蚀”“骨痿”“骨痹”的范畴,其主要发病原因是气血淤滞、气血不通。通血健骨丸药方中含有鹿角胶、血竭、乳香、没药、党参、熟地和野丹参等药物,具有活血化瘀,滋补肝肾,益气养血,祛风除湿的功效,能够主治股骨头缺血性坏死和各型骨坏死。本研究以新西兰大耳兔缺血性股骨头坏死模型为研究对象,探究通血健骨丸对兔缺血性坏死股骨头中低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor 1 α ,

HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein, BMP-2)表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康雄性新西兰大耳白兔80只,4~5月龄,体重(2.0 \pm 0.2) kg,购自北京金牧阳实验动物养殖有限公司,许可证号:SYXK(京)2015-0008。

1.1.2 主要试剂与仪器

通血健骨丸由鹿角胶、血竭、乳香、没药、党参、熟地和野丹参等药物打粉过80~100分目筛,泛制成丸,由驻马店魏道德骨科医院提供;醋酸泼尼松龙注射液(国药准字H42021216)购自华中药业股份有限公司(襄阳);RNA提取试剂盒和反转录试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;TaqDNA聚合酶购自英国NEB公司;鼠抗兔HIF-1 α , VEGF, BMP-2多克隆抗体购自武汉博士德生

物工程有限公司; 光学显微镜和显微摄影仪购自日本Olympus公司; Ultracut-E型超薄切片机购自米力光国际贸易有限公司(上海); 3K15超低温离心机购自德国Sigma公司; SW-CJ-2D2G2F2FD双人净化工作台购自苏州苏净仪器自控设备有限公司; 引物序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 动物造模

随机选取10只新西兰大耳白兔作为正常对照组, 其余70只新西兰大耳白兔臀肌注射醋酸泼尼松龙8 mg/kg^[6], 每周2次, 共注射8周, 并注射青霉素4 \times 10⁴ U预防感染, 正常对照组注射等量容积0.9%的生理盐水, 注射结束后放回笼内饲养。

1.2.2 缺血性股骨头坏死模型鉴定

1.2.2.1 一般生理状况及股骨头形态观察

造模后, 观察正常对照组和模型组新西兰大耳白兔的一般生理状况, X线检查其股骨头的形态; 检查结束后, 各取1只正常对照组和模型组新西兰大耳白兔, 采用空气栓塞法将其处死, 置于75%酒精中消毒2~3 min, 将新西兰大耳白兔固定于平板上, 于超净台内取出后腿股骨头, 肉眼观察正常对照组和模型组新西兰大耳白兔股骨头形态。

1.2.2.2 HE 染色及病理学观察

将取出的股骨头放入4%多聚甲醛溶液中固定24 h, 然后放入25%甲酸脱钙液进行脱钙处理^[7], 脱钙完成后用预冷的PBS溶液洗涤2~3次, 分别用70%, 80%, 90%, 95%, 100%的乙醇进行梯度脱水, 二甲苯透明处理, 组织浸蜡包埋, 用切片机切4 μ m厚切片, 然后脱蜡, 用100%, 95%, 90%, 80%, 70%的乙醇和蒸馏水逐级复水, 用苏木精染色5 min, 用二甲苯透明处理、中性树胶封片。在显微镜下观察正常对照组和模型组新西兰大耳白兔股骨头病理学变化。

1.2.3 动物分组

将建立的缺血性股骨头坏死模型新西兰大耳白兔随机分成4组, 依次命名为模型组、通血健骨丸低剂量组、通血健骨丸中剂量组和通血健骨丸高剂量组, 通血健骨丸组按照低、中、高剂量分别给予300, 400, 500 mg/kg的通血健骨丸灌胃治疗, 正常对照组和模型组给予等量容积0.9%生理盐水灌胃治疗, 每组治疗时间均为2周。

1.2.4 qRT-PCR 检测 HIF-1 α , VEGF, BMP-2 mRNA 表达情况

将取出的股骨头用灭菌咬骨钳咬碎, 用RNA提取试剂盒提取总RNA, 用反转录试剂

盒将RNA反转成cDNA, 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。根据NCBI中提交的HIF-1 α (NM_001082782.1), VEGF(AY196796.1), BMP-2(AF041421.1)的cDNA序列设计引物, HIF-1 α 上游引物F1: 5'-GATTCACCATGGAGGGC-3', 下游引物R1: 5'-AGTTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG-3'; VEGF上游引物F2: 5'-CTTGCTGCTC-TACCTCCAC-3', 下游引物R2: 5'-CTTTGGTCTG-CATTCACATTTGT-3'; BMP-2上游引物F3: 5'-TGGAGGCTCTTTCAATGGA-3', 下游引物R3: 5'-GAAGAAATCGTGTTTTATTGAATACTTTGGC-3'; GAPDH上游引物F: 5'-CGTTGGCTTCC-CAGAACATCAT-3', 下游引物R: 5'-CATCGGACACATTGGGGGTAG-3', 以GAPDH为内参, 进行qRT-PCR。PCR的反应体系为: 5 \times 缓冲液10 μ L, TaqDNA聚合酶1 μ L, 上游引物F 2 μ L, 下游引物R 2 μ L, 10 mmol/L dNTP mix 1 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 33 μ L; PCR的反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 64 $^{\circ}$ C延伸15 s(HIF-1 α , VEGF, BMP-2 mRNA和GAPDH), 40个循环, 延伸时读取吸光度(D)值。采用最大二阶导数法(2^{- $\Delta\Delta$ Ct})对数据进行统计, 计算HIF-1 α , VEGF, BMP-2 mRNA的相对表达。 $\Delta\Delta$ Ct=(实验组目的基因Ct平均值-实验组内参基因Ct平均值)-(对照组目的基因Ct平均值-对照组内参基因Ct平均值)。

1.2.5 Western 印迹检测 HIF-1 α , VEGF 和 BMP-2 蛋白表达情况

将取出的股骨头用灭菌咬骨钳咬碎, 加入2 mL细胞裂解液[150 mmol/L NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 50 mmol/L Tris(pH8.0)]提取总蛋白, 取40 μ L蛋白质样品加入1.5 mL离心管中, 加入10 μ L 10 \times 上样缓冲液, 混匀后置入100 $^{\circ}$ C水浴锅中煮沸10 min, 12 000 r/min离心10 min。以GAPDH为内参, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每孔上样体积20 μ L, 电泳结束后, 半干转膜仪转膜50 min, 滴加鼠抗兔HIF-1 α , VEGF, BMP-2多克隆抗体, 置于4 $^{\circ}$ C下过夜, 滴加二抗37 $^{\circ}$ C放置1 h。加入ECL发光剂进行显影, 利用自动凝胶成像系统采集图像。采用Gel-Pro analyzer4软件对聚丙烯酰胺凝胶电泳图目的条带进行扫描, 分析HIF-1 α , VEGF, BMP-2的蛋白表达水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件进行统计学分析, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组采用单因素方差分析, 两组间比较采用t检验, 以P<0.05为

差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缺血性股骨头坏死模型鉴定

2.1.1 一般生理状况观察

正常对照组新西兰大耳白兔正常摄食, 精神状态良好, 能正常行走, 皮毛光滑; 模型组新西兰大耳白兔食量明显减少, 精神萎靡, 行动不便、活动范围局限, 皮毛无光泽。

2.1.2 X线检查股骨头形态

造模结束后, X线检查结果显示: 正常对照组未见明显异常, 股骨头完整, 骨密度均匀, 关节面清晰; 模型组股骨头有明显凹陷, 骨质结构不

清晰, 骨头密度不均一, 且股骨头负重区出现明显囊性变, 关节间隙狭窄(图1)。

2.1.3 肉眼观察股骨头形态

造模结束后, 兔股骨头大体样本显示: 正常对照组股骨头软骨面光滑、平整, 股骨头剖面颜色较深。模型组股骨头表面凹陷、软骨变薄且表面粗糙、软骨表面颜色暗淡无光泽、软骨下面可见明显出血、坏死(图2)。

2.1.4 HE染色检查股骨头病理学变化

造模结束后, HE染色结果显示: 正常对照组未见明显异常; 模型组软骨组织下脂肪细胞增大甚至形成大泡, 骨小梁变细, 骨细胞萎缩(图3)。以上结果提示, 兔缺血性股骨头坏死模型已成功构建, 可以此为研究对象进行分组和给药治疗。

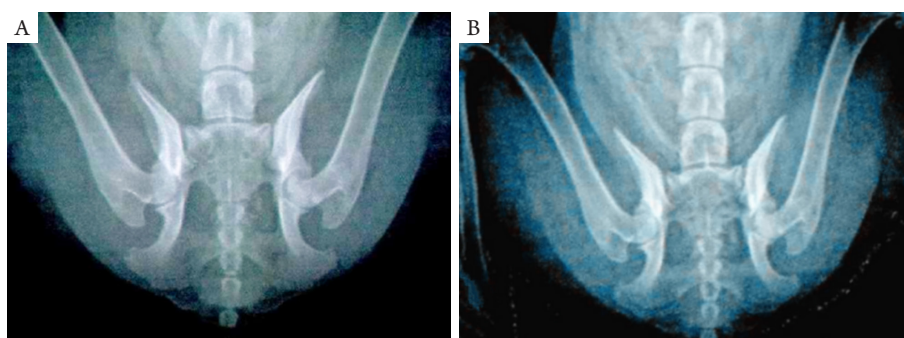


图1 X线检查兔蛙式位股骨头形态

Figure 1 X-ray examination showing rabbit femoral head shape in frog position

(A)正常对照组; (B)模型组。

(A) Normal control group; (B) Model group.

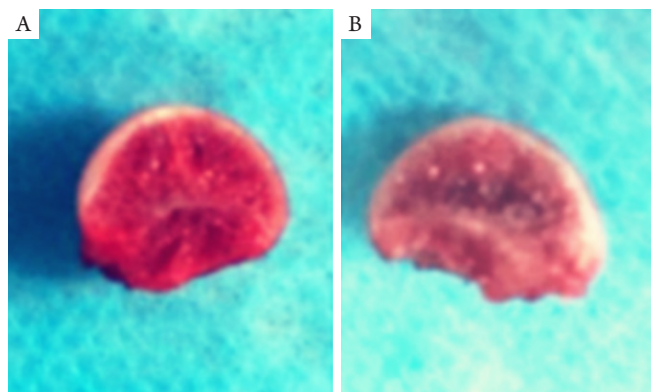


图2 兔股骨头形态学观察

Figure 2 Morphological observation of rabbit femoral head

(A)正常对照组; (B)模型组。

(A) Normal control group; (B) Model group.

2.2 HIF-1 α , VEGF, BMP-2 mRNA 表达情况

模型组股骨头中HIF-1 α , VEGF, BMP-2 mRNA的表达量显著低于正常对照组($P<0.05$); 通血健骨丸组股骨头中HIF-1 α , VEGF, BMP-2 mRNA的表达量显著高于模型组($P<0.05$); 且随着通血健骨丸剂量增加, 股骨头中HIF-1 α , VEGF, BMP-2 mRNA的表达量显著提高($P<0.05$), 呈剂量依赖性(图4)。

2.3 HIF-1 α , VEGF, BMP-2 蛋白表达情况

模型组股骨头中HIF-1 α , VEGF, BMP-2蛋白的表达量显著低于正常对照组($P<0.05$); 通血健骨丸组股骨头中HIF-1 α , VEGF, BMP-2蛋白的表达量显著高于模型组($P<0.05$); 且随着通血健骨丸剂量增加, 股骨头中HIF-1 α , VEGF, BMP-2蛋白的表达量显著提高($P<0.05$), 呈剂量依赖性(图5)。

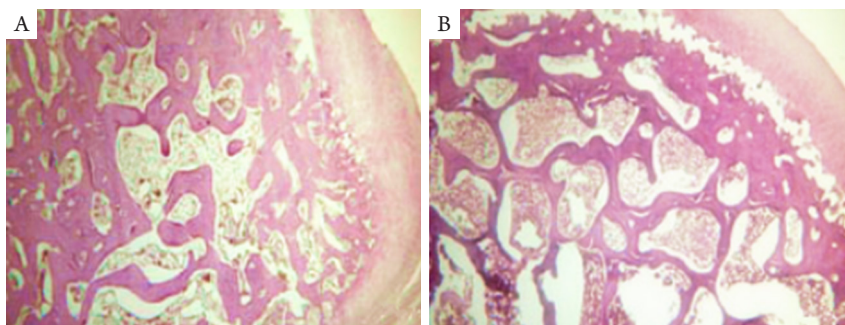


图3 HE染色检查股骨头病理学变化($\times 400$)

Figure 3 Pathological changes of femoral head examined by HE staining ($\times 400$)

(A)正常对照组; (B)模型组。

(A) Normal control group; (B) Model group.

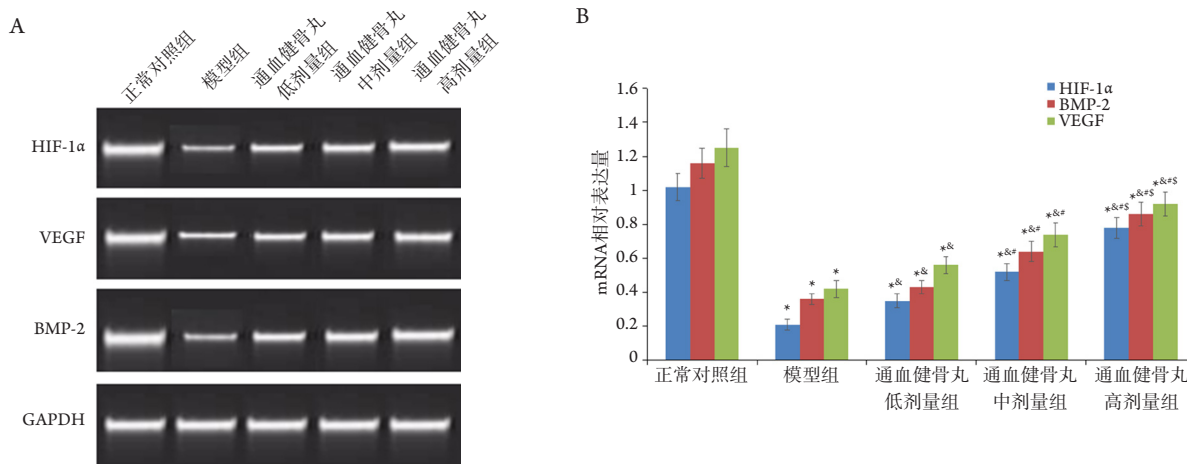


图4 HIF-1 α , VEGF, BMP-2 mRNA表达情况

Figure 4 Expression of HIF-1 α , VEGF and BMP-2 mRNA

与正常对照组相比, $*P<0.05$; 与模型组相比, $^{\S}P<0.05$; 与通血健骨丸低剂量组相比, $^{\#}P<0.05$; 与通血健骨丸中剂量组相比, $^{\$}P<0.05$ 。

Compared with the normal control group, $*P<0.05$; compared with the model group, $^{\S}P<0.05$; compared with the low dose group of tongxue jianggu pill, $^{\#}P<0.05$; compared with the medium dose group of blood invigorating bone pill, $^{\$}P<0.05$.

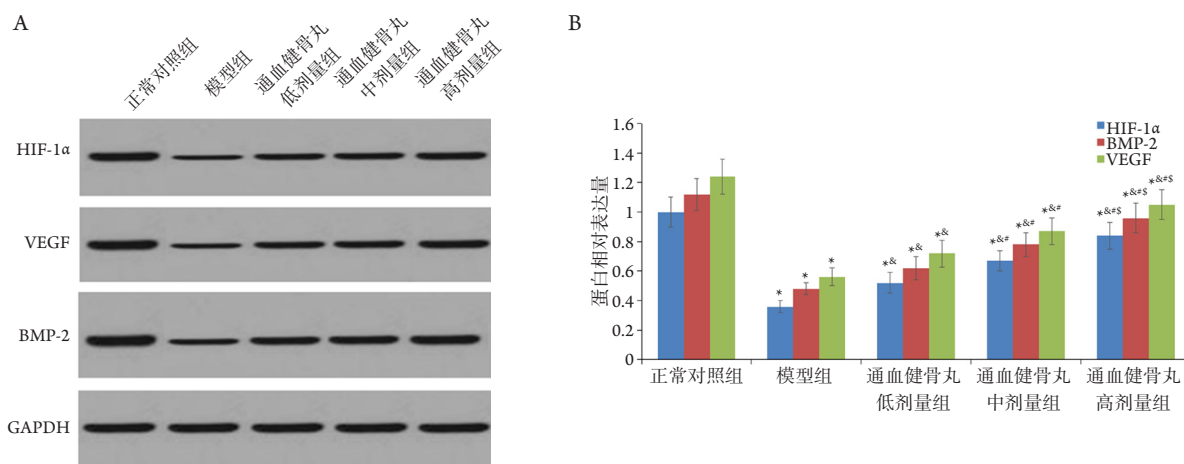


图5 HIF-1 α , VEGF, BMP-2蛋白相对表达量

Figure 5 Relative protein expression of HIF-1 α , VEGF and BMP-2

与正常对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, $\&S P < 0.05$; 与通血健骨丸低剂量组相比, $\&F P < 0.05$; 与通血健骨丸中剂量组相比, $\&S P < 0.05$ 。

Compared with the normal control group, * $P < 0.05$; compared with the model group, $\&S P < 0.05$; compared with the low dose group of tongxue jiangu pill, $\&F P < 0.05$; compared with the medium dose group of blood invigorating bone pill, $\&S P < 0.05$.

3 讨论

股骨头坏死是一种血液循环障碍性疾病^[8], 主要包括创伤性股骨头坏死和非创伤性股骨头坏死, 前者是由股骨颈骨折引起的, 后者属于慢性缺血坏死, 是由酒精和激素所致。激素能引起骨代谢异常, 进而引发骨坏死, 但其作用机制尚未完全清楚。由于激素的滥用, 股骨头坏死发病率在我国逐年攀升, 每年的新增病例已达10万~20万, 我国的发病人数已达700多万人^[9]。股骨头坏死轻则导致患者髋关节疼痛、行动不便, 重则致残, 给患者、家庭和社会带来极大负担。因此, 探寻高效的治疗股骨头坏死的治疗方案已经成为骨科医学工作者的研究热点。

激素性股骨头坏死以髋关节疼痛、股骨头凹陷为主要症状^[10]。有研究^[11]表明: 激素引起股骨头缺血性坏死, 人和动物的反应是一致的。本研究以新西兰大耳兔为研究对象, 采用臀肌注射醋酸泼尼松龙的方法构建兔缺血性股骨头坏死模型发现, 模型组食量减少, 行动不便, 活动范围局限; 模型组股骨头表面凹陷、骨密度不均一、负重区囊性变、关节间隙狭窄, 软骨变薄、表明粗糙、软骨下脂肪细胞增大、骨小梁变细、骨细胞萎缩。以上结果提示, 兔缺血性股骨头坏死模型构建成功, 可以此模型作为研究对象进行分组和药物治疗。

西医治疗股骨头坏死大都着眼于对抗炎症方面, 不能从根本上遏制病因, 因此, 西医治疗股骨头坏死存在一定局限性; 而中医对股骨头坏死的治疗具有较好的临床效果^[12-14], 因此, 采用中药在该病的发病早期及时干预, 对于改善患者症状具有独特的优势。中医学认为, 股骨头坏死是由气血淤滞、肝肾亏损引起的, 因此, 应以活血化瘀、强肝补肾作为医治的关键^[15]。通血健骨丸是由鹿角胶、血竭、乳香、没药、石菖蒲、土元、白芷、水蛭、独活、桃仁、怀牛膝、大云、白芍、山萸肉、骨碎补、熟地、黄芪、野丹参、透骨草、党参20味中药材打磨成粉、泛制成丸, 具有活血化瘀, 滋补肝肾, 益气养血, 祛风除湿的功效, 能够主治股骨头缺血性坏死和各型骨坏死。然而通血健骨丸对兔缺血性坏死股骨头中HIF-1 α , VEGF, BMP-2表达的影响尚未见报道, 本研究以兔缺血性股骨头坏死模型为研究对象, 探究通血健骨丸对HIF-1 α , VEGF, BMP-2表达的影响。

临床治疗股骨头坏死疗效分析以新血管生成和骨骼修复为主要评判指标, 新血管的生成与VEGF密切相关, 骨骼修复离不开BMP-2的参与。HIF-1 α 在血管生成和骨骼修复过程中起重要作用^[16-17]。丁浩^[18]的研究表明: 上调间充质干细胞中HIF-1 α 的表达水平, 可以促进骨坏死区域骨骼的修复和新生血管的形成, 进而促进骨骼修复; 李卫哲等^[19]

研究表明: HIF-1 α 是一种转录调节基因, 在缺血条件下, 氧气供应不足, HIF-1 α 能够调控 VEGF 的表达, 并诱导新生血管的生成; 陈博等^[20]研究表明: 用 HIF-1 α 基因转染鼠骨骼肌细胞, 可以促进 VEGF 的分泌, 进而促进新血管的生成; 潘珊珊等^[21]和颜冰等^[22]研究表明: 随着骨骼和血管的逐渐修复, VEGF 的表达水平逐步提高; 徐英杰等^[23]研究表明: BMP-2 表达水平升高可以促进兔早期激素性股骨头坏死组织的骨骼修复; 张雁儒等^[24]和石正松等^[25]研究表明: 上调间充质干细胞中 BMP-2 的表达水平可以促进兔股骨头坏死的骨骼修复。本研究表明, 通血健骨丸组股骨头中 HIF-1 α , VEGF, BMP-2 的表达量显著高于模型组 ($P < 0.05$); 且随着通血健骨丸剂量增加, 股骨头中 HIF-1 α , VEGF, BMP-2 的表达量显著提高 ($P < 0.05$), 呈剂量依赖性。结合以往研究推测, 通血健骨丸可能通过促进 HIF-1 α , VEGF, BMP-2 的合成分泌, 从而促进兔股骨头坏死的骨骼修复。

综上所述, 通血健骨丸能够促进骨骼修复, 这一过程可能与股骨头中 HIF-1 α , VEGF, BMP-2 表达的上调有关。然而骨骼修复过程十分复杂, 通血健骨丸对缺血性股骨头修复的相关机制还需深入探究, 以期为其临床应用提供更充分的理论依据。

参考文献

- Zhao DW, Hu YC. Chinese experts' consensus on the diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults[J]. *Orthop Surg*, 2012, 4(3): 125-130.
- 潘树义, 李航, 赵振广. 激素性股骨头坏死与高压氧治疗[J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2013, 20(4): 283-286.
PAN Shuyi, LI Hang, ZHAO Zhenguang. Steroid-induced osteonecrosis of the femoral head and hyperbaric oxygen therapy[J]. *Chinese Journal of Nautical Medicine and Hyperbaric Medicine*, 2013, 20(4): 283-286.
- 农峰, 唐毓金, 赵凯丽, 等. 激素性股骨头坏死与相关单核苷酸基因多态性关系的研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2017, 31(7): 722-725.
NONG Feng, TANG Yujin, ZHAO Kaili, et al. Relationship between steroid-induced osteonecrosis of the femoral head and related single nucleotide polymorphism[J]. *Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy*, 2017, 31(7): 722-725.
- 张书钦. 686 髋股骨头坏死中、西医治疗的回顾性研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2010.
ZHANG Shuqin. Clinical studies on 686 hips of Osteonecrosis of the femoral head with integrated traditional Chinese and Western medicine treatment[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2010.
- 吕辉. 活血生骨汤联合健骨生丸治疗中老年激素性股骨头坏死 41 例[J]. *中医研究*, 2017, 30(5): 32-34.
LÜ Hui. Treatment of 41 cases of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by activating blood and activating bone decoction combined with strengthening bone and activating pill[J]. *Traditional Chinese Medicinal Research*, 2017, 30(5): 32-34.
- 史国号. 补肾活血生骨法对激素性股骨头坏死家兔血清中 NO 含量影响的实验研究[D]. 咸阳: 陕西中医学院, 2012.
SHI Guohao. Experimental study on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head of rabbit serum NO content influence by Bushenhuoxue students [D]. Xianyang: ShaanXi University Of Chinese Medicine, 2012.
- 韩杰, 王世鑫, 莫坚, 等. 三七总皂苷对激素性股骨头缺血性坏死模型兔骨组织血管内皮生长因子和骨形态形成蛋白-2 mRNA 表达的影响[J]. *广西医学*, 2016, 38(5): 611-614.
HAN Jie, WANG Shixin, MO Jian, et al. Effects of total saponins of 37 on the expression of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 mRNA in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head of rabbits[J]. *Guangxi Medical Journal*, 2016, 38(5): 611-614.
- 谢海霞. 中西医结合护理在人工关节置换术治疗股骨头坏死患者中的应用效果分析[J]. *国际护理学杂志*, 2016, 35(17): 2346-2349.
XIE Haixia. Application of integrated traditional Chinese and Western medicine in the treatment of osteonecrosis of the femoral head by artificial joint replacement[J]. *International Journal of Nursing*, 2016, 35(17): 2346-2349.
- 王帅, 邢更彦. 体外冲击波在非创伤性股骨头坏死治疗中的应用[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2014, 6(6): 8-11.
WANG Shuai, XING Gengyan. Effects of application of wave on non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in the treatment of extracorporeal shock[J]. *Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science. Electronic Version*, 2014, 6(6): 8-11.
- 孟东方, 李慧英, 阮志磊, 等. 淫羊藿对激素性股骨头坏死兔模型血钙血磷的影响[J]. *中医学报*, 2015, 30(4): 545-547.
MENG Dongfang, LI Huiying, RUAN Zhilei, et al. Effect on the blood calcium and serum inorganic phosphorus of rabbit model of hormone osteonecrosis by epimedium[J]. *China Journal of Chinese Medicine*, 2015, 30(4): 545-547.
- Guan XY, Han D. Role of hypercoagulability in steroid-induced femoral head necrosis in rabbits[J]. *J Orthop Sci*, 2010, 15(3): 365-370.
- 罗祥飞, 徐通, 江蓉星, 等. 从“扶正与祛邪”理论认识股骨头坏死的中医辨治[J]. *中国中医药信息杂志*, 2015, 22(5): 116-117.
LUO Xiangfei, XU Tong, JIANG Rongxing, et al. Understanding of

- TCM treatment in experimental, avascular necrosis of the femoral head from "Fuzheng and Quxie" theory[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2015, 22(5): 116-117.
13. 邹海鹏, 陈卫衡. 中晚期股骨头坏死中医综合治疗的临床研究[J]. 北京中医药, 2010, 29(1): 43-45.
ZOU Haipeng, CHEN Weiheng. Clinical research of intermediate and late thighbone putrescence treated with Chinese medicine[J]. Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 29(1): 43-45.
 14. 卢江华. 中医治疗股骨头坏死78例[J]. 中国当代医药, 2010, 17(32): 91.
LU Jianghua. 78 cases of avascular necrosis of the femoral head treated with Chinese medicine[J]. China Modern Medicine, 2010, 17(32): 91.
 15. 赵宝祥. 中医辨证治疗股骨头坏死临床研究[J]. 中医学报, 2015, 30(8): 1208-1210.
ZHAO Baoxiang. Clinical research on traditional Chinese medicine syndrome differentiation and treatment of femoral head necrosis[J]. China Journal of Chinese Medicine, 2015, 30(8): 1208-1210.
 16. 徐涛涛, 劳杨骏, 廖菲, 等. HIF-1 α 信号通路及激素性股骨头坏死相关性研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(5): 730-733.
XU Taotao, LAO Yang Jun, LIAO Fei, et al. Progress in the study of the correlation between HIF-1 alpha signaling pathway and steroid induced osteonecrosis of the femoral head[J]. World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2015, 10(5): 730-733.
 17. 陈小丹, 何家才. 低氧诱导因子1 α 在骨损伤修复中的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(24): 4119-4121.
CHEN Xiaodan, HE Jiakai. Research progress of hypoxia inducible factor-1 in bone injury healing[J]. Medical Recapitulate, 2012, 18(24): 4119-4121.
 18. 丁浩. HIF-1 α 对间充质干细胞骨修复能力影响的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
DING Hao. Study on the effect of HIF-1 alpha on bone repair ability of mesenchymal stem cells[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2014.
 19. 李卫哲, 贾军, 杨希革. TRAP阳性细胞及HIF-1 α 、VEGF、FGF-2表达在老年股骨头坏死修复反应中的分布及其意义[J]. 中国老年学, 2009, 29(18): 2319-2321.
LI Weizhe, JIA Jun, YANG Xige. The distribution and significance of positive cells and HIF-1 α , VEGF, FGF-2 expression in the repair reaction of femoral head necrosis in elderly patients[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2009, 29(18): 2319-2321.
 20. 陈博, 陈剑秋. HIF-1 α 转染骨骼肌细胞的诱导产物VEGF对血管内皮细胞增殖的影响[J]. 天津医科大学学报, 2010, 16(3): 420-423.
CHEN Bo, CHEN Jianqiu. HIF-1 α gene transfected into skeletal muscle cells and the inducible VEGF effect on the proliferation of vascular endothelium cells[J]. Journal of Medical University of Tianjin, 2010, 16(3): 420-423.
 21. 潘珊珊. 活血通络汤在SANFH家兔造模过程中Dll4、Jagged1及VEGF干预股骨头坏死的作用机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
PAN Shanshan. Huoxue Tongluo Decoction, Dll4, Jagged1 and VEGF intervention mechanism of femoral head necrosis in the process of SANFH rabbit model[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
 22. 颜冰, 王和鸣. 活血补肾汤对兔激素性股骨头坏死VEGF的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(5): 1-4.
YAN Bing, WANG Heming. The effect of huoxue bushen decoction on expression of vegf in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head of rabbit[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics, 2010, 18(5): 1-4.
 23. 徐英杰, 尹羽薇, 肖正权, 等. 生骨胶囊对兔早期激素性股骨头坏死骨组织BMP-2、PPAR- γ 表达影响的研究[J]. 中医学报, 2015, 43(1): 19-22.
XU Yingjie, YIN Yuwei, XIAO Zhengquan, et al. Effects of Xu Yingjie Capsule on expression of BMP-2 and PPAR- in bone tissue of rabbits with steroid induced avascular necrosis of the femoral head[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2015, 43(1): 19-22.
 24. 张雁儒, 张辉, 卡卡, 等. BMP-2转染BMSCs复合镁合金棒修复兔股骨头坏死的实验研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2016, 34(5): 528-533.
ZHANG Yanru, ZHANG Hui, KA Ka, et al. BMSCs-BMP-2 composite with magnesium alloy rod in the repair of femoral head necrosis[J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 2016, 34(5): 528-533.
 25. 石正松, 李强, 宁寅宽, 等. Ad-BMP-2/BMSCs/DBM对兔股骨头坏死修复的实验研究[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(1): 59-63.
SHI Zhengsong, LI Qiang, NING Yinkuan, et al. Experimental study on the repair of femoral head necrosis in rabbits by Ad-BMP-2/BMSCs/DBM[J]. Journal of Medical University of Anhui, 2016, 51(1): 59-63.

本文引用: 王江伟, 魏道德, 王丽, 李松伟. 通血健骨丸对兔缺血性坏死股骨头HIF-1 α 、VEGF和BMP-2表达的影响[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(12): 2625-2632. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.019

Cite this article as: WANG Jiangwei, WEI Daode, WANG Li, LI Songwei. Effect of blood invigorating bone pill on HIF-1 α , VEGF and BMP-2 expression of rabbits with avascular necrosis of femoral head[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(12): 2625-2632. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.019