

活血通络胶囊对激素性股骨头坏死囊性变 成血管修复的影响

杨晓强¹, 肖欢², 田佳庆¹, 方伟华¹, 彭鹏¹, 肖方骏¹, 何伟³, 何敏聪³, 魏秋实³

(1. 广州中医药大学第三临床医学院, 广东 广州 510006;

2. 毕节市中医医院, 贵州 毕节 551700;

3. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510378)

摘要 目的:探讨活血通络胶囊对激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)囊性变成血管修复的影响。**方法:**①将从全髋关节置换术中收集的一部分 SONFH 囊性变组织制备成单细胞悬液,采用单细胞转录组学分析囊性变组织中的细胞组分。将另一部分 SONFH 囊性变组织制成病理切片,采用苏木素-伊红染色法观察囊性变中血管形态,并采用免疫荧光法观察囊性变中血管内皮细胞特异性蛋白的表达情况。②分别按照每天 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量以浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的活血通络胶囊溶液和 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水给大鼠灌胃,获取低、中、高剂量活血通络胶囊含药血清及空白血清。③取生长良好的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),分为空白血清组和低、中、高剂量含药血清组,空白血清组细胞常规培养,低、中、高剂量含药血清组细胞分别采用低、中、高剂量活血通络胶囊含药血清干预。干预 48 h 后,通过细胞计数试剂盒-8 法测定活血通络胶囊含药血清对 HUVECs 增殖能力的影响。④将 HUVECs 分为对照组、地塞米松组和活血通络组,对照组细胞常规培养,地塞米松组细胞采用地塞米松干预,活血通络组细胞采用地塞米松和中剂量活血通络胶囊含药血清干预。干预至细胞长满后进行细胞划痕实验,观察活血通络胶囊含药血清对 HUVECs 迁移能力的影响。⑤HUVECs 分组与干预方法同④,干预 7 d 后进行成血管实验,观察活血通络胶囊含药血清对 HUVECs 成血管能力的影响。**结果:**①SONFH 囊性变组织中细胞组分分析结果。SONFH 囊性变组织中存在内皮细胞及具有血管生成功能的内皮细胞亚群。②SONFH 囊性变组织病理学观察结果。苏木素-伊红染色结果显示,SONFH 囊性变组织中存在椭圆形的血管腔,血管内膜稍增厚、弹力纤维增生分层。免疫荧光染色结果显示,SONFH 囊性变组织内存在血管内皮细胞特异性蛋白(CD31 蛋白和血管内皮生长因子蛋白),且可见明显的管形。③HUVECs 相对增殖率测定结果。各组 HUVECs 相对增殖率比较,差异有统计学意义[0%, $(0.15 \pm 0.83)\%$, $(18.70 \pm 6.10)\%$, $(24.9 \pm 15.10)\%$, $F=7.541$, $P=0.001$];低剂量含药血清组 HUVECs 相对增殖率与空白血清组的差异无统计学意义($P=0.999$),中剂量含药血清组和高剂量含药血清组 HUVECs 相对增殖率均高于空白血清组($P=0.046$, $P=0.006$),中剂量含药血清组 HUVECs 相对增殖率与高剂量含药血清组的差异无统计学意义($P=0.782$)。④HUVECs 迁移率测算结果。地塞米松组 HUVECs 迁移率(10%)明显低于对照组(26%),活血通络组 HUVECs 迁移率(24%)明显高于地塞米松组(10%)。⑤HUVECs 形成的管形分支数测算结果。每个放大 40 倍视野下,各组 HUVECs 形成的管形分支数比较,差异有统计学意义[(112.20 ± 7.96) 个, (83.40 ± 14.02) 个, (122.40 ± 14.59) 个, $F=2.980$, $P=0.001$];地塞米松组 HUVECs 形成的管形分支数少于对照组和活血通络组($P=0.006$, $P=0.001$),对照组 HUVECs 形成的管形分支数与活血通络组的差异无统计学意义($P=0.292$)。**结论:**活血通络胶囊可通过提高血管内皮细胞的增殖、迁移和成血管能力,促进 SONFH 囊性变的成血管修复。

关键词 股骨头坏死;囊性变;成血管细胞;人脐静脉内皮细胞;活血通络;成血管修复

Effects of Huoxue Tongluo Jiaonang(活血通络胶囊) on angiogenesis repair of cystic lesions of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head

YANG Xiaoliang¹, XIAO Huan², TIAN Jiaqing¹, FANG Weihua¹, PENG Peng¹, XIAO Fangjun¹, HE Wei³, HE Mincong³, WEI Qiushi³

基金项目:国家自然科学基金项目(8227150353, 82004392);广东省基础与应用基础研究基金项目(2023A151010551);广东省中医学骨伤研究院开放课题重点项目(GYH202101-01, GYH202101-04);毕节市科学技术局 2022 年度“揭榜挂帅”项目(毕科合重大专项[2022]1 号);中国博士后科学基金第 75 批面上资助项目(2024M750819);中医证候全国重点实验室研究生项目(SKLKY2024A0003)

通讯作者:魏秋实 E-mail:weiqishi@126.com

1. The Third Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2. Bijie Traditional Chinese Medicine Hospital, Bijie 551700, Guizhou, China

3. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510378, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To explore the effects of Huoxue Tongluo Jiaonang(活血通络胶囊, HXTLJN) on angiogenesis repair of cystic lesions of steroid-induced osteonecrosis of femoral head(SONFH). **Methods:** ①The tissues collected from the site of cystic lesions during the total hip arthroplasty in patients with SONFH were acquired, one part was made into single-cell suspension to analyze the cellular components in cystic lesions tissues based on the single cell transcriptomics, while, the other part was made into pathological sections to observe the vascular morphology and detect the expression of vascular endothelial cells (VECs)-specific proteins in cystic lesions tissues by using hematoxylin-eosin (HE) staining and immunofluorescence method, respectively. ②Twelve rats were selected and randomized into 4 groups. The rats in any three groups were intragastric administrated with HXTLJN solution at concentration of 1, 2 and 4 mg/mL in daily dosage of 20, 40 and 80 mg/kg, respectively, while, the ones in the last group with normal saline in daily dosage of 20 mL/kg, for making low-, medium-, and high-dose HXTLJN medicated serum and blank serum, respectively. ③The well-growned human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were fetched and divided into blank serum group, and low-, medium-, and high-dose medicated serum groups. The HUVECs in blank serum group were cultured in the conventional Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), while the ones in low-, medium-, and high-dose medicated serum groups were intervened with low-, medium-, and high-dose HXTLJN medicated serum, respectively. After 48-hour intervention, the effect of HXTLJN medicated serum on the proliferation ability of HUVECs was determined by using the cell counting kit-8 (CCK8) assay. ④The HUVECs were further divided into control group, dexamethasone (DEX) group and Huoxue Tongluo(活血通络, HXTL) group. The HUVECs in control group were cultured in the conventional DMEM, while the ones in DEX group were intervened with DEX, and the ones in HXTL group with DEX and medium-dose HXTLJN medicated serum. After the cells reached 100% confluence, the effect of HXTLJN medicated serum on the migration ability of HUVECs was observed by employing a cell scratch assay. ⑤The grouping and intervention methods for HUVECs were the same as those in item ④. After 7-day intervention, the effect of HXTLJN medicated serum on the angiogenesis ability of HUVECs was observed by a tube formation assay. **Results:** ①The results of analysis on the cellular components in the SONFH-associated cystic lesions tissues. The endothelial cells and endothelial cell subsets with angiogenesis function existed in the SONFH-associated cystic lesions tissues. ②The results of observation on histopathological changes in SONFH-associated cystic lesions tissues. The results of HE staining showed that the oval-shaped vascular lumens, with slightly thickened vascular intima and hyperplastic, layered elastic fibers, were presented in the SONFH-associated cystic lesions tissues. The results of immunofluorescence staining revealed that the VEC-specific proteins (CD31 and vascular endothelial growth factor) existed in the SONFH-associated cystic lesions tissues, and the obvious tubular structures were observed. ③The results of detection on the relative proliferation rate of HUVECs. The difference was statistically significant among the groups in the relative proliferation rate of HUVECs (0% , 0.15 ± 0.83 , 18.70 ± 6.10 , $24.9 \pm 15.10\%$, $F = 7.541$, $P = 0.001$). The relative proliferation rate of HUVECs were higher in medium- and high-dose medicated serum groups compared to blank serum group ($P = 0.046$, $P = 0.006$), while, the comparisons between low-dose medicated serum group and blank serum group, as well as between medium-dose medicated serum group and high-dose medicated serum group revealed no significant differences ($P = 0.999$; $P = 0.782$). ④The results of calculation on migration rate of HUVECs. The migration rate of HUVECs was significantly lower in DEX group (10%) compared to control group (26%), while, it was obviously higher in HXTL group (24%) compared to DEX group (10%). ⑤The results of calculation on the number of tube-like branches formed by HUVECs. Under the 40-fold magnification fields, the difference was statistically significant among the groups in the number of tube-like branches formed by HUVECs (112.20 ± 7.96 , 83.40 ± 14.02 , 122.40 ± 14.59 branches, $F = 2.980$, $P = 0.001$). The tube-like branches formed by HUVECs were less in DEX group compared to control group and HXTL group ($P = 0.006$, $P = 0.001$), while, the comparison between control group and HXTL group revealed no significant difference ($P = 0.292$). **Conclusion:** The HXTLJN can promote the angiogenesis repair in SONFH-associated cystic lesions by enhancing the proliferation, migration, and angiogenesis capabilities of VECs.

Keywords femur head necrosis; cystic lesions; hemangioblasts; human umbilical vein endothelial cells; activating blood dredging collaterals; angiogenesis repair

激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)是骨科领域常见的难治性疾病之一,好发于中青年人群。该病与长期大量应用糖皮质激素密切相关,极易导致股骨头塌陷和继发性骨关节炎^[1]。课题组在长期进行中医药治疗 SONFH 的研究中发现,股骨头内的囊性变对疾病的预后具有重要的影响^[2-3]。关于囊性变的影像学特点^[4]、囊性变的位置^[5]等研究表明,囊性变与股骨头塌陷之间关系密切。但是,有研究^[6]发现,在行股骨头旋转截骨术后,股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)患者的囊性变区域内出现了不同程度的新骨长入。同时,课题组在长期的临床实践中也观察到,囊性变区域确实存在骨修复现象。囊性变既能导致股骨头力学性能下降,成为股骨头塌陷的始动因素;又能激发某种骨修复机制,从而促进新骨的形成。骨骼是高度血管化的组织,无论是通过膜内骨化还是软骨内骨化,血管生成与侵入在骨骼发育和修复过程中都起着至关重要的作用。血管生成与骨生成是紧密相连的,对于骨形成和维持骨稳态至关重要^[7]。

活血通络胶囊具有活血祛瘀、补肾强骨、理气止痛的功效。采用活血通络胶囊治疗 ONFH,不仅能改善患者的临床症状,还能延缓股骨头塌陷^[8-10]。鉴于 ONFH 囊性变的双重作用,本研究采用体外实验探讨活血通络胶囊对 SONFH 囊性变成血管修复的影响,以为活血通络胶囊治疗 SONFH 提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

2 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只,体质量(200 ± 10)g,由广州中医药大学实验动物中心提供[生产许可证号:SCXK(粤)2022-0063]。动物饲养及实验均在广州中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房进行[使用许可证号:SYXK(粤)2023-0347],温度 25 ℃、空气湿度 37%。实验方案经广州中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,伦理批件号:20220120002。

1.2 实验细胞及药物

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),购自赛百慷(上海)生物科技股份有限公司。活血通络胶囊(粤药制字 Z20071224)由广州中医药大学第一附属医院提供,其药物组成:木豆叶、当归尾、川芎、赤芍、熟地黄、桃仁、红花。

1.3 实验试剂及仪器

HUVECs 专用培养基、鼠抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、鼠抗血小板内皮细胞黏附分子、柠檬酸钠抗原修复液、封闭山羊血清液(武汉博士德生物工程有限公司),Matrigel 基质胶(康宁生命科学有限公司),浓度 100 nmol · L⁻¹的地塞米松溶液(上海源叶生物科技有限公司),乙二胺四乙酸脱钙液、4% 多聚甲醛(山东四和生物科技有限公司),苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液、细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK)-8、Calcein 溶液(碧云天生物技术有限公司),细胞培养板(无锡耐思生命科技股份有限公司),采血针(江西富尔康实业集团有限公司),离心机(赛默飞世尔科技公司),倒置荧光显微镜[徕卡显微系统(上海)贸易有限公司]。

2 方法

2.1 SONFH 囊性变组织中细胞组分分析

从全髋关节置换术中收集 SONFH 囊性变组织,将收集到的一部分 ONFH 囊性变组织采用酶解法制备成单细胞悬液。利用 Illumina 测序平台对单细胞悬液进行高通量测序,获得各细胞的基因表达矩阵。采用 R 语言中的 Seurat 包对获取的细胞数据进行过滤、标准化处理,对处理得到的结果进行 *t*-分布领域嵌入算法降维聚类分析。借助 Seurat 包中的 find markers 功能,对囊性变的各细胞组分进行手动注释,确定囊性变中的细胞类型。对内皮细胞进行 GO 分析和 KEGG 分析,并结合内皮细胞特异性表达基因,对内皮细胞进行亚群注释。

2.2 SONFH 囊性变组织病理学观察

2.2.1 SONFH 囊性变组织病理标本切片制作 将获取的另一部分 SONFH 囊性变组织放入盛有少量生理盐水的标本袋中,冰上保存。待修剪后放入组织固定盒,倒入适量 4% 多聚甲醛固定 12 ~ 24 h,蜡块包埋。将预冷的蜡块固定在石蜡切片机上,切成厚度 4 μm 的切片。将切片平铺于载玻片上后,放置 65 ℃ 烤片机上烤 1 h,再放置烘箱内烘烤 2 h,备用。

2.2.2 SONFH 囊性变中血管形态观察 将一部分 SONFH 囊性变石蜡切片依次放入二甲苯和乙醇中按梯度进行脱蜡后,将其用苏木素溶液对细胞核染色 2 ~ 3 min,自来水清洗。再浸入伊红溶液中染色 1 min,自来水洗涤。自然风干后中性树胶封片。显微镜下观察 SONFH 囊性变中血管形态并拍照。

2.2.3 SONFH 囊性变中血管内皮细胞特异性蛋白表达情况观察 将另一部分 SONFH 囊性变切片放入沸腾的枸橼酸盐缓冲液中充分浸泡 10 min, 自然冷却后置于摇床上, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 冲洗 3 次, 每次 5 min。用 0.01% Triton-X-100 室温透膜 20 min, 去除多余水分, 用免疫组化笔圈绕组织, 加入封闭液室温反应 30 min。将 2 种一抗 (兔抗 CD31 和鼠抗 VEGF, 均以 1:50 稀释) 混合后 4 ℃ 过夜孵育, 洗涤后加入混合二抗 (山羊抗兔 FITC 和山羊抗鼠 CY3, 均以 1:100 稀释), 室温避光孵育 2 h。将二抗充分洗涤后用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚染色剂进行封片染核, 荧光显微镜观察血管内皮细胞特异性蛋白 (CD31 和 VEGF 蛋白) 表达情况并拍照。

2.3 活血通络胶囊含药血清制备

采用随机数字表法将 12 只大鼠随机分为 4 组, 每组 3 只, 分别按照每天 20 mL · kg⁻¹、40 mL · kg⁻¹、80 mL · kg⁻¹ 体质量以浓度 1 mg · mL⁻¹、2 mg · mL⁻¹、4 mg · mL⁻¹ 的活血通络胶囊溶液和 20 mL · kg⁻¹ 生理盐水灌胃 [大鼠给药量按照“人和动物间体表面积折算的等效剂量比值”^[11] (换算系数 6.25) 计算], 每天早晚各灌胃 1 次, 连续给药 7 d。于末次灌药后 2 h, 将各组大鼠吸入 2.5% 异氟烷进行麻醉, 采集各组大鼠腹主动脉血, 以 3000 r · min⁻¹ 离心 10 min (离心半径 15 cm), 取上清液。将上清液灭活后, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分别获取低、中、高剂量活血通络胶囊含药血清及空白血清, -80 ℃ 冰箱保存备用。

2.4 活血通络胶囊含药血清对 HUVECs 增殖能力的作用效果观察

取生长状态良好的 HUVECs 以 3 × 10³ 个 · 孔⁻¹ 接种于 96 孔培养板中, 每孔培养基为 100 μL, 放入含 5% 二氧化碳的 37 ℃ 细胞培养箱中培养 12 h。将细胞分为 4 组: 空白血清组细胞每孔加入 100 μL 专用培养基, 低、中、高剂量含药血清组细胞每孔分别加入 10 μL 的低、中、高剂量活血通络胶囊含药血清和 90 μL 的专用培养基培养。每组设置 6 个复孔, 放入培养箱继续培养 48 h。培养结束后吸弃培养基, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 检测液的专用培养基, 孵育 2 h 后, 使用酶标仪在波长 450 nm 处测量 HUVECs 光密度 (optical density, OD) 值, 利用 OD 值计算 HUVECs 相对增殖率。细胞相对增殖率 = (低、中或

高剂量活血通络胶囊组 OD 值 - 对照组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。

2.5 活血通络胶囊含药血清对 HUVECs 迁移能力的作用效果观察

取 HUVECs 以 1 × 10⁵ 个 · 孔⁻¹ 接种于 6 孔培养板中, 设置对照组、地塞米松组和活血通络组。地塞米松组细胞置于加入 2 mL 含 100 nmol · L⁻¹ 地塞米松溶液的 HUVECs 专用培养基中培养, 活血通络组细胞置于加入 2 mL 含 100 nmol · L⁻¹ 地塞米松溶液和中剂量活血通络胶囊含药血清的 HUVECs 专用培养基中培养, 对照组细胞置于加入 2 mL HUVECs 专用培养基中培养。干预至细胞长满后用 200 μL 枪头垂直于孔板做与预先画好的板底标记线垂直的划痕线, 将划痕线与标记线的交点作为固定检测点。吸弃旧培养基, 用 PBS 润洗 3 次。加入 2 mL 不含胎牛血清及内皮细胞培养添加剂的培养基后, 立即镜下定点拍照, 继续于恒温箱中培养 18 h 后, 再次镜下定点拍照。各组分别选取 1 孔, 每孔中均选取位于中央的 3 个视野对划痕进行拍照, 采用 Image J 软件测量划痕面积, 并据此计算细胞迁移率。细胞迁移率 = (0 h 划痕面积 - 18 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积 × 100%。

2.6 活血通络胶囊含药血清对 HUVECs 成血管能力的作用效果观察

取 HUVECs 以 1 × 10⁵ 个 · 孔⁻¹ 接种于 6 孔培养板中, 设置对照组、地塞米松组和活血通络组, 3 组细胞干预方法同 2.5。干预 7 d 后进行成血管实验。实验前 1 d 将 Matrigel 基质胶在 4 ℃ 环境下过夜后, 于冰上进行实验。用预冷的移液枪头在每孔中垂直加入 150 μL Matrigel 基质胶, 避免产生气泡, 放置在 37 ℃ 培养箱中 45 min。待 Matrigel 基质胶凝固后, 将各组干预后的 HUVECs 以 3 × 10⁴ 个 · 孔⁻¹ 接种于 48 孔板, 于培养箱中继续培养 4 h 后, 加入 150 μL 浓度为 6.25 μg · μL⁻¹ 的 Calcein 溶液进行染色, 镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件测算 HUVECs 形成的管形分支数。

2.7 数据统计

采用 GraphPad Prism (V9.5.1) 软件进行数据统计分析。各组大鼠 HUVECs 相对增殖率、HUVECs 形成的管形分支数的组间整体比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 α = 0.05。

3 结果

3.1 SONFH 囊性变组织中细胞组分分析结果

利用各细胞的特异性表达基因对 SONFH 囊性变组织中的细胞组分进行注释,结果显示囊性变中存在内皮细胞、软骨细胞、成纤维细胞、T 细胞、巨噬细胞、肥大细胞、单核细胞、破骨细胞[图 1(1)]。囊性变内部各细胞组分经单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)降维聚类后,分为 15 个 clusters,利用内皮细胞特异性表达的基因进行筛选,其中 cluster1、cluster4、cluster10、cluster15 为高表达内皮细

胞特异性基因,将其注释为内皮细胞[图 1(2)]。GO 分析结果显示 SONFH 囊性变中的内皮细胞具有血管生成功能[图 1(3)]。进一步对内皮细胞进行细胞亚群分析,结果显示囊性变中的内皮细胞中存在静脉内皮细胞、淋巴内皮细胞、毛细血管内皮细胞、动脉内皮细胞,以及具有血管生成功能的内皮细胞[图 1(4)]。

3.2 SONFH 囊性变组织病理学观察结果

HE 染色结果显示,SONFH 囊性变组织中存在椭圆形的血管腔,血管内膜稍增厚、弹力纤维增生分层(图 2)。

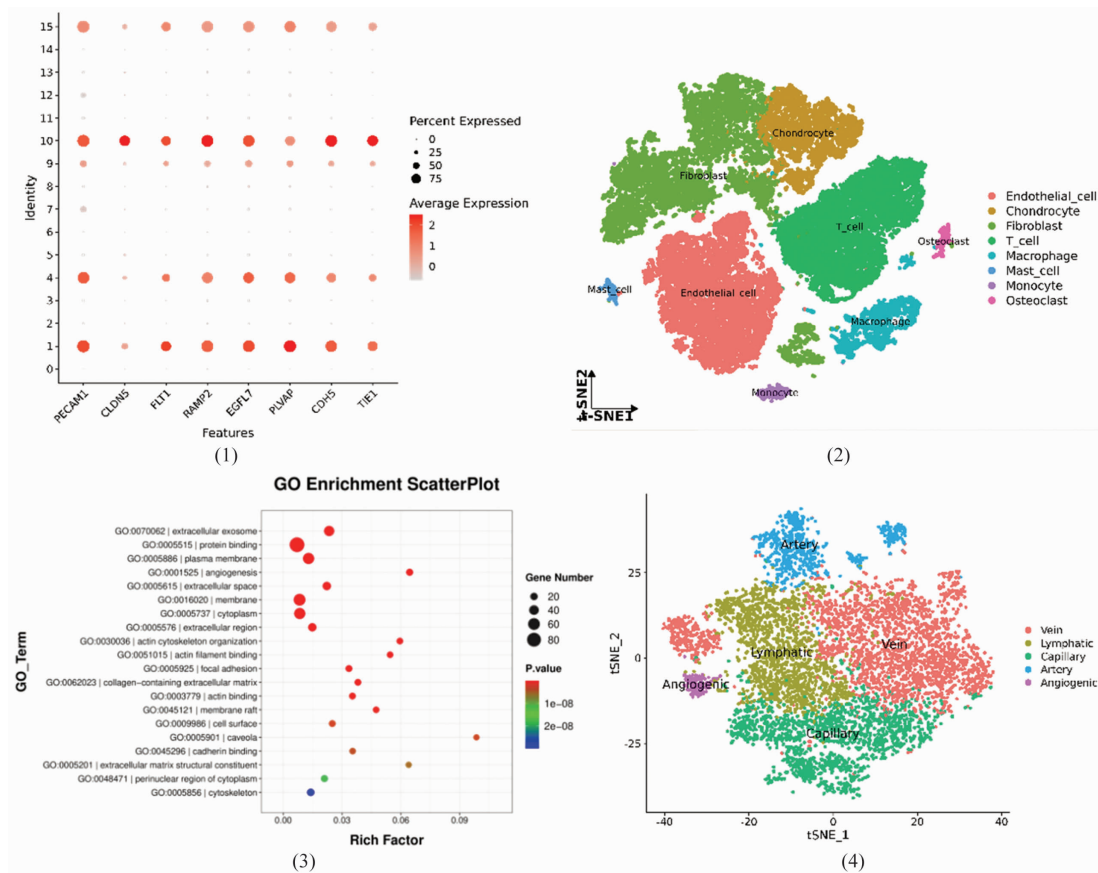
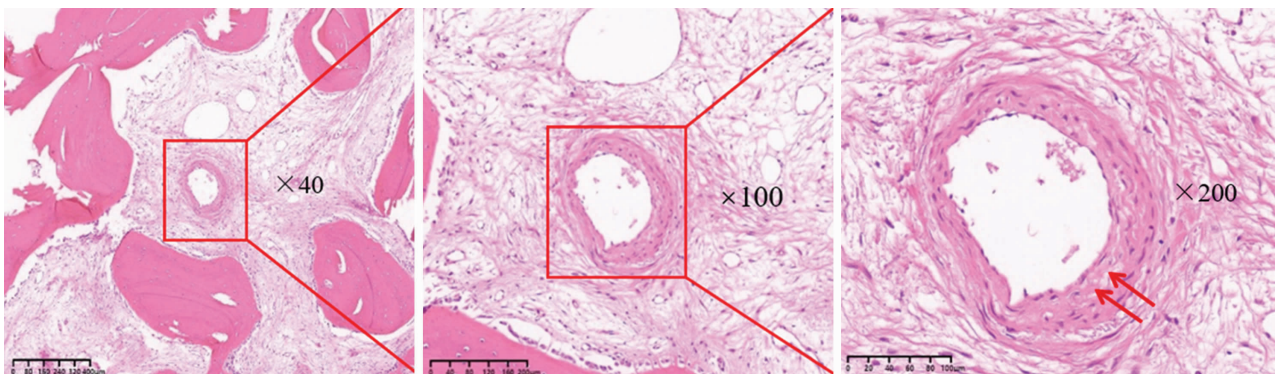


图 1 激素性股骨头坏死囊性变组织中细胞组分分析结果



红色方框圈处为血管腔,红色箭头所示为弹力纤维增生分层。

图 2 激素性股骨头坏死囊性变组织苏木素-伊红染色结果

免疫荧光染色结果显示,4',6-二脒基-2-苯基吲哚对细胞核染色呈蓝光[图 3(1)],CD31 蛋白表达区呈红色[图 3(2)],VEGF 蛋白表达区呈绿色[图 3(3)],CD31 和 VEGF 蛋白共表达区呈黄色[图 3(4)];囊性变中可见明显的管形[图 3(2)至图 3(4)]。

3.3 不同浓度活血通络胶囊含药血清干预后 HUVECs 相对增殖率测定结果

各组 HUVECs 相对增殖率比较,差异有统计学意义;低剂量含药血清组 HUVECs 相对增殖率与对照组的差异无统计学意义($P=0.999$),中剂量含药血清组和高剂量含药血清组 HUVECs 相对增殖率均高于空白血清组($P=0.046, P=0.006$),中剂量含药血清组 HUVECs 相对增殖率与高剂量含药血清组的差异无统计学意义($P=0.782$)。见表 1。

3.4 活血通络胶囊含药血清干预后 HUVECs 迁移率测算结果

地塞米松组 HUVECs 迁移率明显低于对照组,活血通络组 HUVECs 迁移率明显高于地塞米松组(图 4、表 2)。

3.5 活血通络胶囊含药血清干预后 HUVECs 形成的管形分支数测算结果

每个放大 40 倍视野下,3 组 HUVECs 形成的管形分支数比较,差异有统计学意义[(112.20 ± 7.96)个, (83.40 ± 14.02)个, (122.40 ± 14.59)个, $F=2.980, P=0.001$];地塞米松组 HUVECs 形成的管形分支数均少于对照组和活血通络组($P=0.006, P=0.001$),对照组 HUVECs 形成的管形分支数与活血通络组的差异无统计学意义($P=0.292$)。见图 5。

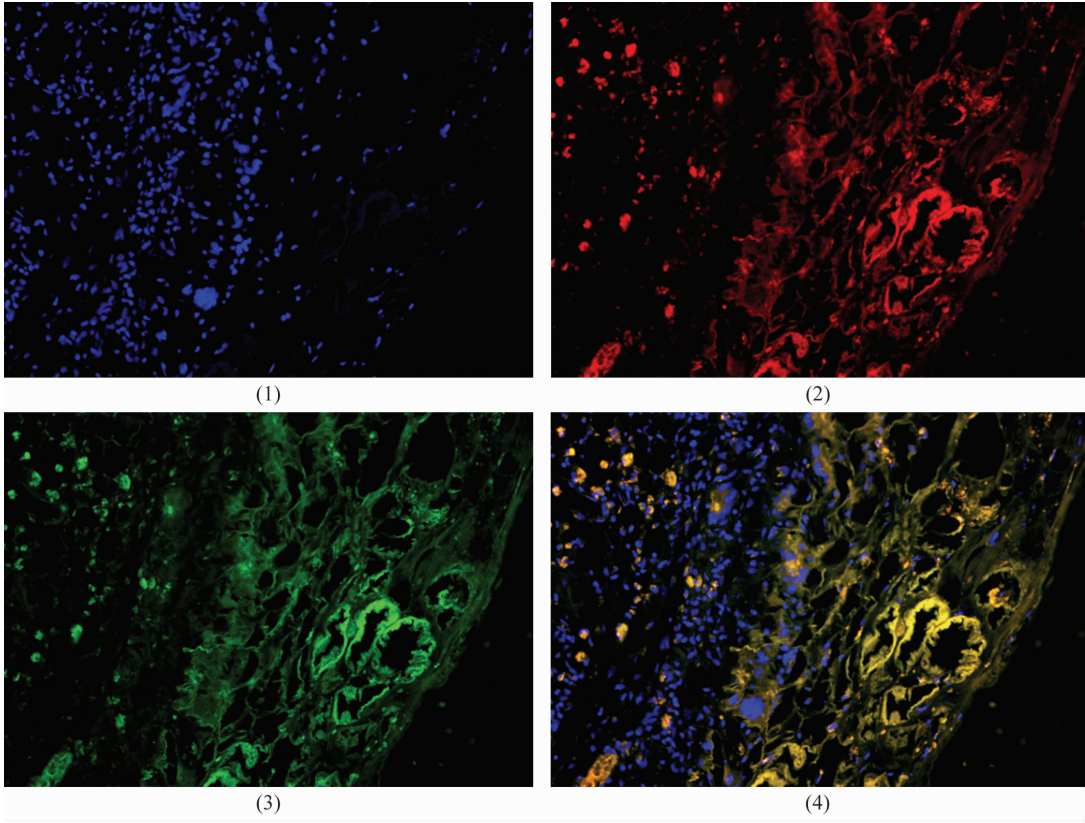


图 3 激素性股骨头坏死囊性变组织免疫荧光染色结果(×200)

表 1 不同浓度活血通络胶囊含药血清干预后 HUVECs 相对增殖率

组别	样本量/孔	HUVECs ¹⁾ 相对增殖率/($\bar{x} \pm s, \%$)
空白血清组	6	0
低剂量含药血清组	6	0.15 ± 0.83
中剂量含药血清组	6	18.70 ± 6.10
高剂量含药血清组	6	24.90 ± 15.10
<i>F</i> 值		7.541
<i>P</i> 值		0.001

注:1)人脐静脉内皮细胞。

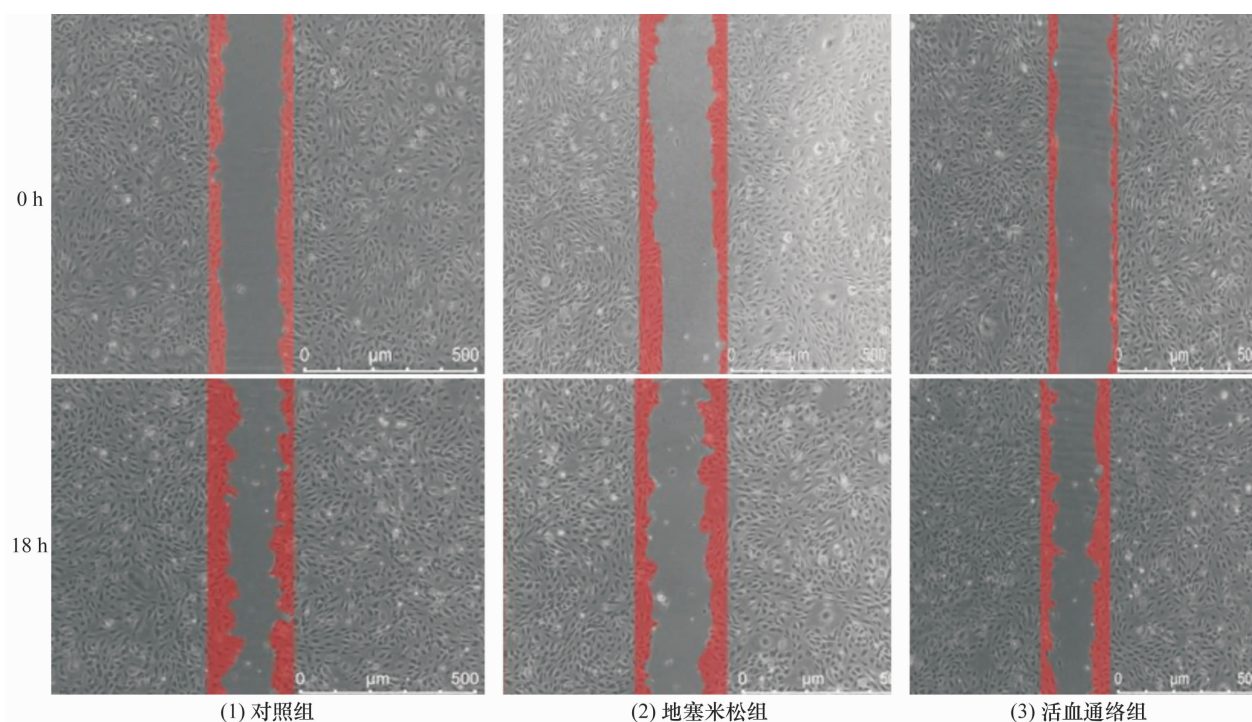
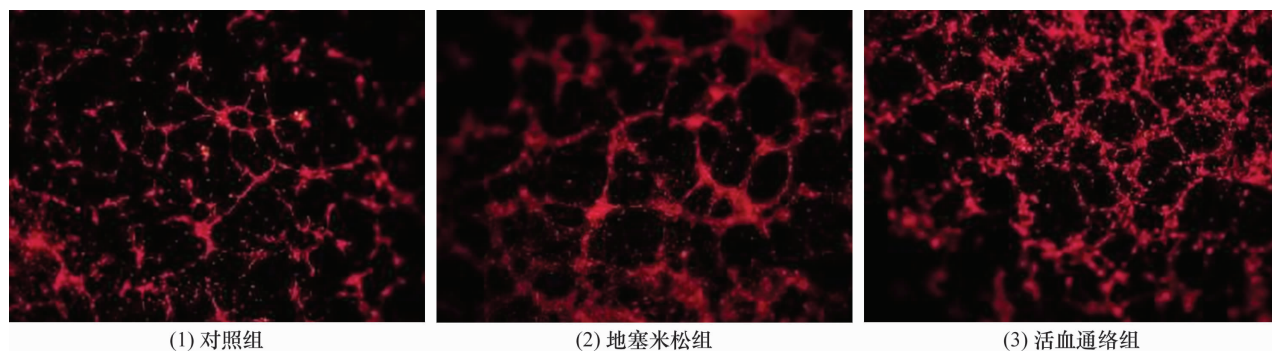


图 4 3 组人脐静脉内皮细胞迁移结果

表 2 3 组人脐静脉内皮细胞划痕面积与迁移率

组别	样本量/孔	划痕面积/ μm^2		细胞迁移率/%
		0 h	18 h	
对照组	1	639 601.09	476 215.37	26
地塞米松组	1	521 026.17	471 525.06	10
活血通络组	1	724 283.24	550 137.18	24

图 5 3 组人脐静脉内皮细胞成血管荧光染色图 ($\times 40$)

4 讨 论

目前,SONFH 被公认为是糖皮质激素应用的一种常见并发症。相关流行病学调查^[12-14]明确指出,各种激素的使用是导致 ONFH 发生的主要因素之一。一项针对 2200 名 ONFH 患者病因分析的研究^[15]发现,近 51% 的患者曾有激素使用史,且该病的发生与激素应用的时间长短和剂量大小密切相关。近年来,ONFH 的发病率呈逐年上升趋势^[16]。目前,糖皮质激素在临床上仍被广泛应用于多种疾病的治疗中,尤其在处理疑难杂症和危重病方面发挥着关键作用。中

医药治疗方案作为 SONFH 非手术治疗的重要组成部分,已在临床上得到广泛应用,并取得了满意的疗效^[17]。因此,深入探究 SONFH 的病理发展规律,并探索相应的中医药治疗方法,对提升该病的治疗效果和改善患者生活质量具有重要的作用。

课题组前期通过文献研究、系统评价、专家问卷调查、临床证候调查、理论探讨与辨析等多维度方法,对 SONFH 的中医证候进行了深入研究。研究从理论、基础、临床 3 个层面明确了血瘀证为 ONFH 的重要中医证候,并发现“成骨-成血管耦联”机制与中医

理论中的“瘀去-新生-骨合”存在高度的契合性。这些研究成果^[18-20]为活血通络法作为 SONFH 的基本治疗原则提供了坚实的理论支撑。活血通络法治疗 SONFH 不仅能改善患者的临床症状,还能有效延缓股骨头塌陷的进程^[7,9,21]。囊性变在 SONFH 的病程发展中具有特殊的临床意义。SONFH 囊性变常见于股骨头的中外侧柱,其位置与股骨头内压力骨小梁的位置大致吻合。相较于内侧柱的囊性变,外侧柱的囊性变面积通常更大;且随着囊性变位置向内移动,外侧柱的囊性变面积会随着减小^[22]。因此,深入解析囊性变的科学内涵,能够为活血通络法治疗 SONFH 提供有力依据,从而使中医药在治疗 SONFH 中发挥更好的治疗效果。本研究基于 scRNA-seq 结果及囊性变病理切片观察结果,在体外应用活血通络胶囊含药血清干预 HUVECs,分析活血通络胶囊对 HUVECs 的增殖、迁移和成血管能力的影响,初步评估了活血通络胶囊在促进囊性变成血管修复中的作用。

我们将 scRNA-seq 技术应用于 SONFH 囊性变的研究中,通过生物信息学分析囊性变单细胞水平的转录组数据,结果发现囊性变中存在内皮细胞、软骨细胞、免疫细胞等多种细胞类型。进一步分析内皮细胞的转录特征,我们发现在囊性变中存在静脉内皮细胞、淋巴内皮细胞、毛细血管内皮细胞、动脉内皮细胞,以及具有血管生成能力的内皮细胞。SONFH 囊性变组织 HE 染色及免疫荧光染色结果显示,囊性变中存在椭圆形的血管腔,部分血管内膜稍增厚,出现弹力纤维增生分层。这表明囊性变中既存在血管新生,也存在血管损伤。因此,维持血管新生与细胞凋亡的动态平衡,是囊性变成血管修复的关键。长期使用糖皮质激素类药物易导致股骨头内部出现血管内凝血、静脉瘀滞、骨内压增高、动脉受损甚至闭塞等问题^[23]。血管损伤的修复与新生是组织修复、再生过程中极其重要的生物学表现。因此,恢复股骨头内部血管的正常形态及功能是防止 ONFH 进一步发展的关键^[24]。

活血通络胶囊含药血清可在体外促进 HUVECs 的增殖。另外,细胞划痕实验通过人为制造的划痕模拟内皮细胞损伤,可以反映血管内膜损伤后愈合的情况。本研究发现,在活血通络胶囊含药血清的干预下,经激素处理的 HUVECs 迁移能力明显降低。既往研究^[25]也表明,激素可显著抑制骨微血管内皮细胞的迁移和增殖。活血通络组 HUVECs 迁移能力增强,

说明活血通络胶囊能够促进内皮细胞损伤的修复。内皮细胞增殖、迁移等生物学行为是血管生成的标志之一,在血管生成早期起到重要作用^[26]。Matrigel 基质胶常用于体外血管形成实验,其中的生长因子和细胞外基质相互作用,在无血清培养条件下可在二维平面模拟血管形成过程^[27]。经激素处理的 HUVECs 成血管能力减弱,血管增生时的分支数减少,而活血通络胶囊含药血清干预后可明显增加血管的分支数。研究结果显示,活血通络胶囊能显著促进 HUVECs 的增殖、迁移及成血管能力,而这些功能通常与血管新生和修复过程密切相关。为了更深入地探索活血通络胶囊治疗 SONFH 的作用机理,课题组计划在未来扩大 scRNA-seq 的样本量,以深入分析囊性变中不同细胞类型的特性及其相互作用,从而更全面地揭示囊性变成血管修复的机制。

本研究存在以下局限性:①体外实验难以完全还原体内环境,且细胞行为受多种因素影响。②scRNA-seq 的样本有限。③HUVECs 与囊性变内部固有的内皮细胞,在生物学功能上可能存在一定差异,因此在囊性变成血管修复过程中,HUVECs 不能完全代表其内部本身固有的内皮细胞。

本研究的结果显示,活血通络胶囊可通过提高血管内皮细胞的增殖、迁移及成血管的能力,促进 SONFH 囊性变的成血管修复。

参考文献

- [1] MOTTA F, TIMILSINA S, GERSHWIN M E, et al. Steroid-induced osteonecrosis [J]. J Transl Autoimmun, 2022, 5: 100168.
- [2] 何晓铭, 庞凤祥, 李子祺, 等. 基于“态靶结合”理论探讨股骨头坏死囊性变的辨治思路 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(2): 44-47.
- [3] 魏秋实, 何伟, 张庆文, 等. 围塌陷期股骨头坏死不同影像学表现研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2021, 35(9): 1105-1110.
- [4] GAO F, HAN J, HE Z, et al. Radiological analysis of cystic lesion in osteonecrosis of the femoral head [J]. Int Orthop, 2018, 42(7): 1615-1621.
- [5] LIU G B, LI R, LU Q, et al. Three-dimensional distribution of cystic lesions in osteonecrosis of the femoral head [J]. J Orthop Translat, 2019, 22: 109-115.
- [6] LAKHOTIA D, SWAMINATHAN S, SHON W Y, et al. Healing process of osteonecrotic lesions of the femoral head following transtrochanteric rotational osteotomy: a computed tomography-based study [J]. Clin Orthop Surg, 2017, 9(1): 29-36.

- [7] TUCKERMANN J, ADAMS R H. The endothelium-bone axis in development, homeostasis and bone and joint disease[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(10): 608–620.
- [8] WEI Q S, HONG G J, YUAN Y J, et al. Huo Xue Tong Luo capsule, a vasoactive herbal formula prevents progression of asymptomatic osteonecrosis of femoral head: a prospective study[J]. *J Orthop Translat*, 2018, 18: 65–73.
- [9] 沈莹姗, 陈镇秋, 何伟, 等. 基于“活血通络法”非手术保髋疗法在全身性多发骨坏死患者的运用[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(6): 1389–1392.
- [10] HE X M, HE M C, YANG P, et al. The therapeutic effect of Huo Xue Tong Luo capsules in Association Research Circulation Osseous(ARCO) stage II osteonecrosis of the femoral head: a clinical study with an average follow-up period of 7.95 years[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 773758.
- [11] 魏伟, 吴希美, 李元健. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 71–72.
- [12] CUI L, ZHUANG Q, LIN J, et al. Multicentric epidemiologic study on six thousand three hundred and ninety five cases of femoral head osteonecrosis in China[J]. *Int Orthop*, 2016, 40(2): 267–276.
- [13] TAN B, LI W, ZENG P, et al. Epidemiological study based on china osteonecrosis of the femoral head database[J]. *Orthop Surg*, 2021, 13(1): 153–160.
- [14] FUKUSHIMA W, FUJIOKA M, KUBO T, et al. Nationwide epidemiologic survey of idiopathic osteonecrosis of the femoral head[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(10): 2715–2724.
- [15] KUBO T, UESHIMA K, SAITO M, et al. Clinical and basic research on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in Japan[J]. *J Orthop Sci*, 2016, 21(4): 407–413.
- [16] BIRLA V, VAISH A, VAISHYA R. Risk factors and pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of femoral head—a scoping review[J]. *J Clin Orthop Trauma*, 2021, 23: 101643.
- [17] 张程, 何海军. 中医药防治股骨头坏死的优势与面临的挑战[J]. *中医正骨*, 2023, 35(11): 60–63.
- [18] 沈莹姗, 何晓铭, 赵雄, 等. 关于“血瘀证是股骨头坏死主要证候”的调查研究[J]. *中医正骨*, 2022, 34(4): 25–29.
- [19] 乌日莎娜, 沈莹姗, 袁颖嘉, 等. 基于“瘀去、新生、骨合”理论从细胞层面探讨祛瘀、活血及补肾中药治疗股骨头坏死的作用机制[J]. *中医正骨*, 2022, 34(4): 61–63.
- [20] 郭雪峰, 于睿, 任艳玲. 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/OL]. *中华中医药学刊*, 2023[2024-01-13]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20230915.1547.058>.
- [21] 何宪顺, 韦雨柔, 何敏聪, 等. 活血通络法对激素性股骨头坏死囊性变患者血清骨吸收/成血管/成骨蛋白调节作用的研究[J]. *中国全科医学*, 2024, 27(12): 1504–1510.
- [22] 田佳庆, 何敏聪, 韦雨柔, 等. 激素性股骨头坏死囊性变分布规律及病理特点[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(31): 4996–5001.
- [23] CHANG C, GREENSPAN A, GERSHWIN M E. The pathogenesis, diagnosis and clinical manifestations of steroid-induced osteonecrosis[J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102460.
- [24] HUANG C, WEN Z, NIU J, et al. Steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: novel insight into the roles of bone endothelial cells in pathogenesis and treatment[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 777697.
- [25] YU H, YUE J, WANG W, et al. Icaritin promotes angiogenesis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral heads: in vitro and in vivo studies[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7320–7330.
- [26] NOWAK-SLIWINSKA P, ALITALO K, ALLEN E, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays[J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(3): 425–532.
- [27] BELOGLAZOVA I, ZUBKOVA E, DERGILEV K, et al. New insight on 2D in vitro angiogenesis models: all that stretches is not a tube[J]. *Cells*, 2022, 11(20): 3278.

(收稿日期: 2024-04-06 本文编辑: 时红磊)

(上接第 39 页)

- [16] LIU Y, LI M, ZHANG M, et al. Femoral neck fractures: prognosis based on a new classification after superselective angiography[J]. *J Orthop Sci*, 2013, 18(3): 443–450.
- [17] ZHENG G S, QIU X, WANG B J, et al. Relationship between blood flow and collapse of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2022, 104(Suppl 2): 13–18.
- [18] HINES J T, JO W L, CUI Q, et al. Osteonecrosis of the femoral head: an updated review of ARCO on pathogenesis, staging and treatment[J]. *J Korean Med Sci*, 2021, 36(24): e177.
- [19] ZHANG Y, LIU Y W, SUN R B, et al. “Sclerotic Band” type of classification system and measurement of necrotic area for osteonecrosis of the femoral head[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(36): e22106.
- [20] 袁强, 林继红, 董一平, 等. 平均坏死面积指数和平均稳定指数与坏死股骨头塌陷进展的相关性分析[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2022, 30(10): 23–27.

(收稿日期: 2024-04-28 本文编辑: 吕宁)