

于海洋,卢增鹏,汪海燕,等. 激素性股骨头坏死中 Hif-1 α /VEGF 信号轴和 H 型血管改变的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 759-766.

Yu HY, Lu ZP, Wang HY, et al. Changes in Hif-1 α /VEGF signal axis and type-H vessels in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 759-766.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.004

激素性股骨头坏死中 Hif-1 α /VEGF 信号轴和 H 型血管改变的实验研究

于海洋^{1,2}, 卢增鹏^{1,2}, 汪海燕^{2,3}, 曹盼举⁴, 姚川江^{1,2}, 曹林忠^{1,2},
田杰祥^{1,2}, 张晓刚^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院, 兰州 730000; 3. 成都中医药大学, 成都 610000; 4. 宝鸡市中医医院, 陕西 宝鸡 721000)

【摘要】 目的 观察 Hif-1 α /VEGF 信号轴和骨中特异性 H 型血管在 SINFH 模型大鼠股骨头中的改变, 探究其在骨坏死发生中的改变及意义。方法 30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为空白组(CG)、模型组(MG)、去铁胺组(DFO), 每组 10 只。MG 组及 DFO 组采用甲强龙联合脂多糖法行 SINFH 造模, CG 组及 MG 组腹腔注射生理盐水, DFO 组予腹腔注射 250 mg/(kg·d) 甲磺酸去铁胺。造模 6 周后, 运用 Micro-CT 分析观察股骨头微观结构变化, HE 染色观察股骨头组织病理变化, 免疫荧光染色分析股骨头中 H 型血管改变, RT-PCR 分析股骨头中 Hif-1 α /VEGF 信号轴相关因子的表达。结果 Micro-CT 分析显示, MG 组、DFO 组股骨头均出现骨小梁稀疏, 但 MG 组骨小梁出现断裂情况, 且股骨头软骨下囊性变形成。HE 染色显示, 与 CG 组比, MG 组和 DFO 组均出现明显的股骨头坏死($P < 0.01$)。免疫荧光染色显示, 与 CG 组比较, MG 组股骨头中 H 型血管量显著下降($P < 0.05$), 与 MG 组比较 DFO 组股骨头中 H 型血管量显著增加($P < 0.01$)。与 CG 组比, MG 组 Osterix⁺成骨(祖)细胞量均出现下降($P < 0.01$), 与 MG 组比, DFO 组 Osterix⁺成骨(祖)细胞量增加($P < 0.01$)。RT-PCR 分析显示, 与 CG 比较 MG 组大鼠股骨头 Hif-1 α 、VEGF、Osterix、Runx2(mRNA)表达下降($P < 0.01$), 与 MG 组比, DFO 组 Hif-1 α 、VEGF、Osterix、Runx2(mRNA)表达升高($P < 0.01$)。结论 在 SINFH 大鼠模型中, 激素诱导 Hif-1 α /VEGF 信号轴调控障碍, 以及特异性 H 型血管发生损害, 提示骨特异的 H 型血管损害可能是激素性股骨头坏死的关键发病机制之一。

【关键词】 激素性股骨头坏死; H 型血管; Hif-1 α /VEGF 信号轴; 实验研究

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0759-08

Changes in Hif-1 α /VEGF signal axis and type-H vessels in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head

YU Haiyang^{1,2}, LU Zengpeng^{1,2}, WANG Haiyan^{2,3}, CAO Panju⁴, YAO Chuanjiang^{1,2}, CAO Linzhong^{1,2},
TIAN Jiexiang^{1,2}, ZHANG Xiaogang^{1,2*}

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81960832, 81860859), 甘肃省科技计划资助/自然科学基金(21JR11RA161), 甘肃省中医药管理局(GZKP-2021-17, GZKP-2020-31), 甘肃中医药大学附属医院院内课题(gzfy-2021-04), 宝鸡市卫生健康委员会科研项目(2020-026), 张晓刚全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81960832, 81860859), Gansu Provincial Science and Technology Program/Natural Science Foundation (21JR11RA161), Gansu Administration of Traditional Chinese Medicine (GZKP-2021-17, GZKP-2020-31), Project in Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine (gzfy-2021-04), Scientific Research Project of Baoji Health Committee (2020-026), Zhang Xiaogang National Famous Traditional Chinese Medicine Expert Inheritance Studio Construction Project ([2022]75).

【作者简介】 于海洋(1983—), 男, 在读博士研究生, 副主任医师, 研究方向: 中医骨伤科学。Email: doctoryhy@163.com

【通信作者】 张晓刚(1960—), 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医骨伤科学, 生物力学, 非创伤性股骨头坏死。

Email: zxg0525@163.com

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000. 3. Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610000. 4. Baoji Hospital of Chinese Medicine, Baoji 721000)

Corresponding author: ZHANG Xiaogang. E-mail: zxc0525@163.com

【Abstract】 Objective To observe the changes in the hypoxia-inducible factor 1α (Hif- 1α)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling axis and specific type H vessels in the femoral head of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH) model rats and explore the role of these changes in the development of osteonecrosis. **Methods** Thirty specific pathogen-free grade male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group (CG), model group (MG) and deferoxamine group (DFOG), with 10 rats in each group. The MG and DFOG were treated with methylprednisolone combined with lipopolysaccharide for SONFH modeling, the CG and MG received intraperitoneal injections of normal saline, and the DFOG received intraperitoneal injections of 250 mg/kg deferoxamine mesylate. Six weeks after modeling, micro-computed tomography was performed to observe the microstructural changes of the femoral head, hematoxylin/eosin staining was used to observe the histopathological changes of the femoral head, immunofluorescence staining was used to analyze the changes of type H vessels in the femoral head, and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to analyze expression of HIF- 1α /VEGF signaling axis-related factors in the femoral head. **Results** Micro-computed tomography analysis showed that the femoral head in the MG and DFOG had sparse bone trabeculae, but the bone trabeculae in the MG exhibited fractures and the femoral head showed subchondral cystic degeneration. Hematoxylin/eosin staining showed that compared with the CG, both the MG and DFOG had obvious femoral head necrosis ($P < 0.01$). Immunofluorescence staining showed that compared with the CG, the amount of type H vessels in the femoral head was significantly lower in the MG ($P < 0.05$) and significantly higher in the DFOG ($P < 0.01$). Compared with the CG, the amount of osterix⁺ osteoblast (progenitor) cells was significantly lower in the MG ($P < 0.01$) and significantly higher in the DFOG ($P < 0.01$). RT-PCR showed that the expression of HIF- 1α , VEGF, osterix, and Runx2 (mRNA) in the femoral head was significantly lower in the MG than CG ($P < 0.01$) and significantly higher in the DFOG than MG ($P < 0.01$). **Conclusions** Steroid-induced HIF- 1α /VEGF signaling axis dysregulation and specific type H vessel damage were observed in this SONFH rat model, suggesting that bone-specific type H vessel damage may be a key pathogenetic factor of SONFH.

【Keywords】 SINFH; type-H vessels; Hif- 1α / VEGF signaling axis; experimental study

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖皮质激素诱导的股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of femoral head, SINFH)是糖皮质激素使用后最严重的副作用之一^[1]。我国流行病学调查显示,累计非创伤性骨坏死患者达 812 万例,主要发病人群为青壮年,糖皮质激素是非创伤性骨坏死的高危因素,糖皮质激素使用是股骨头坏死仅次于创伤的第二大诱因^[2-3]。当前国内外学者对 SINFH 展开了大量研究,虽然提出了多种发病机制假说,如脂质代谢紊乱、炎症免疫因素、骨质疏松、骨髓间充质干细胞分化障碍、骨内压增高、血管内凝血、细胞凋亡、基因多态性和激素细胞毒性理论等^[4-6],但仍未完全明确其病理机制。研究发现人和动物干骺端和骨膜内存在的骨内特殊微血管——H 型血管(CD31^{hi}Emcn^{hi})具有正向骨形成作用,对骨祖细胞和成骨细胞的分布、生存、激活具有重要的意义,在成血管成骨偶联中具有重要的地位,对骨量维持

和机械强度具有重要作用。进一步研究发现在人类的股骨头中同样分布着 H 型血管^[7-8],但其在 SINFH 发病中的具体作用未见报道。

人体不同解剖部位的骨改建速度差异很大,基础条件下股骨头的松质骨骨转率是股骨远端松质骨骨转率的三倍多^[9]。这一特点决定了股骨头对营养和氧气分配的高需求,骨细胞的正常功能严重依赖为成骨系统提供微环境的血液供应系统。H 型血管是新陈代谢专门化的骨微环境的关键组成部分,具有获得营养和氧气的特权,从而具有促进血管周围细胞(包括前骨祖细胞、骨祖细胞、成熟的和超成熟的成骨细胞)生长的潜力^[10]。糖皮质激素可以直接损伤内皮细胞,导致内皮细胞凋亡,损害新血管的形成,最终对骨的血液供应系统造成损害^[11]。股骨头血供主要来源于纤细且易受损的支持带血管^[11],股骨头部位代谢活跃^[9],血供脆弱,决

定局部易出现缺氧情况。缺氧诱导因子(Hypoxia-inducible factors, Hif)是氧稳态的主要调节者,负责细胞应对低氧水平的能力。VEGF 是 Hif-1 α 下游基因。VEGF 作为一种特异的内皮细胞有丝分裂原和血管生成启动子,以旁分泌和自分泌的方式发挥着重要作用,可以促进 H 型血管生长^[10]。Hif-1 α 在常氧条件下被脯氨酸-4-羟化酶结构域(PHD)羟基化,然后被 Von Hippel-Lindau 蛋白迅速降解。在缺氧或缺铁状态下,PHD 活性受到抑制,Hif-1 α 会积聚并移位到细胞核内,激活大量的缺氧诱导因子靶基因,应用铁螯合剂除 PHD 抑制剂或基因沉默外,铁螯合剂还可通过降低细胞内 Fe²⁺ 浓度和抑制 PHD 活性来抑制缺氧诱导因子-1 α 的降解^[12-13]。

最新研究发现,缺氧反应主要调控因子 Hif-1 α 及其下游基因 VEGF 在股骨头坏死中发挥着重要的作用^[9,14-15]。在本研究旨在分析 SINFH 大鼠模型的 Hif-1 α /VEGF 信号通路改变和 H 型血管损害情况,为 SINFH 的防治提供一些新的方向和见解。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验选用 SPF 级 12 周龄 SD 雄性大鼠 30 只,体重(300 $\pm$ 30)g,由甘肃中医药大学实验动物中心提供【SCXK(甘)2020-0001】,常规充足饲料喂养,自由饮水,日光灯 12 h 明暗交替,室温 20 ~ 25 $^{\circ}$ C,相对湿度 40% ~ 52%,饲养于甘肃中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室【SYXK(甘)2020-0009】。本实验通过甘肃中医药大学动物伦理审查批准实施【2021-255】。

1.1.2 主要试剂与仪器

小型动物 Micro-CT (vivaCT 80, SCANCO Medical AG 公司瑞士);冰冻切片(Leica 2016, 德国);荧光显微镜(Leica DM2500, 德国);实时定量 PCR 仪(Iq5, Bio-Rad 美国);注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(H20030727, 荣生制药有限公司);注射用甲磺酸去铁胺(DFO)(H20140678, 瑞士诺华公司);小鼠抗大鼠 CD31 抗体(M1511-8, 华安生物);兔抗大鼠 Osterix 抗体(ER1914-47, 华安生物);山羊抗大鼠 Emcn 抗体(bs-5884R, Vioss);TRIeasyTM Total RNA Extraction Reagent (10606ES60, YESEN);Hyper ScriptTM III RT Super Mix for qPCR with Gdna Remover (R202-02, 新贝生物);2 $\times$ S6 Universal SYBR qPCR

Mix(Q204-01, 新贝生物)。

1.2 方法

1.2.1 激素性股骨头坏死动物分组与模型干预

大鼠适应性喂养 1 周后按随机数字法分为 3 组,空白组(CG),模型组(MG)和去铁胺组(DFO),每组各 10 只。MG 和 DFO 组大鼠腹腔内注射腹腔注射脂多糖(LPS 20 μ g/kg),每次间隔 24 h,连续 2 次;末次注射后 24 h 后,两侧臀肌交替注射甲强龙(40 mg/kg)3 次,每次间隔 24 h;同时 DFO 组予腹腔注射甲磺酸去铁胺(250 mg/kg),直至处死动物。其余两组予等量生理盐水注射。为预防感染,予臀肌注射青霉素 4 万单位/鼠,每周 2 次。

1.2.2 Micro-CT 分析

造模 6 周后,大鼠腹腔注射过量戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉后放血,取左侧股骨头,甲醛固定 24 h。运用小型动物 Micro-CT 进行股骨头扫描(分辨率 10.5 μ m, 100 kV, 98 μ A),观察股骨头骨小梁结构、股骨头形态以及软骨下囊性变形成情况。

1.2.3 HE 染色

左侧股骨头 4%甲醛固定 48 h 后 10% EDTA 脱钙,之后修剪至适宜大小,置入包埋盒中,流水冲洗 30 min。梯度乙醇脱水。再将组织块置于二甲苯中置换酒精,将股骨头石蜡包埋。苏木精伊红(HE)染色,中性树胶封片。在 400 倍光学显微镜下观察干燥后的封片,观察骨小梁结构和骨细胞陷窝。参照股骨头坏死诊断标准:股骨头中空骨陷窝形成或成骨细胞、骨细胞核固缩,伴有骨髓中周围其余细胞坏死^[16]。出现大于 1 处坏死病灶认定为出现 SINFH。计算 3 组激素性股骨头坏死的发生率。

1.2.4 免疫荧光染色

左侧股骨头 4%甲醛固定 48 h 后 10% EDTA 脱钙,之后修剪至适宜大小,梯度乙醇脱水,二甲苯透明。石蜡包埋。石蜡切片,将蜡块切为 5 μ m 厚切片。石蜡切片脱蜡和水化,用柠檬酸钠热修复两次,PBS 洗,3%的过氧化氢封闭,PBS 洗;滴加 5%的 Triton X-100 室温 15 min,滴加正常山羊血清,室温孵育 15 min。用滤纸吸去组织上多余血清,直接滴加血清稀释的一抗至没过切片,抗体浓度为 Endomucin(山羊抗大鼠,1 : 200),CD31(小鼠抗大鼠,1 : 200),Osterix(兔抗大鼠,1 : 200),湿盒中 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。37 $^{\circ}$ C 复苏;滴加荧光素标记的与一抗来源相匹配的二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min(从此步骤后都需避光操作),PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,滴加 DAPI 室

温染核 5 min, PBS 洗 5 min × 3 次, 封片: 抗荧光催灭剂封片。于激光扫描共聚焦荧光显微镜 (FluoView™ FV1000) 下进行观察和照相。取 5 张切片, 免疫荧光强度使用 Image J 软件进行半定量分析。

1.2.5 RT-PCR 分析

取各组大鼠右侧股骨头, 放入做好标记的已装有 TRIzol 的 Ep 管内, 放入 -80℃ 冰箱存用。按照 TRIzol 试剂说明书提取股骨头总的 RNA。计算样品总 RNA 浓度, 完成总 RNA 的制备; 根据大鼠 Hif-1α、VEGF、Osterix、Runx2 序列, 使用 Premier 5.0 设计合成扩增 Hif-1α、VEGF、Osterix、Runx2 片段的特异性引物 (以 GAPDH 基因作为 PCR 的内参照), 进行引物序列设计 (见表 1); 根据反转录以及 PCR 反应体系及条件, 进行 RT-PCR 实验。为减少误差, 各

组 Hif-1α、VEGF、Osterix、Runx2 的表达水平均以相对表达量来表示。

1.3 统计学分析

采用统计软件 SPSS 21 进行统计分析, 坏死率比较采用 fisher 精确概率检验, 组间两两比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 以 *P* < 0.05 为有统计学意义。采用 Origin pro 8.5 绘图软件进行绘图。

2 结果

2.1 Micro-CT 分析结果

CG 组股骨头骨小梁排列整齐, 股骨头形态规则; MG 组见股骨头骨小梁稀疏、变薄, 部分骨小梁断裂, 软骨下囊性变形成; DFO 组骨小梁稀疏, 但无明显断裂情况, 未见囊性变形成 (见图 1)。

表 1 各检测基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of each detection gene

基因 Gene	上游 Forward	下游 Reverse
Hif-1α	5'-CCGCCACCACCACTGATGAATC-3'	5'-GTGAGTACCGTAGTCTGATGCC-3'
VEGF	5'-CGGTGTGGTCTTTTCGTCCTTCTTAG-3'	5'-AGGGATGGGTTTGTCTGTTTCTG-3'
Runx2	5'-CTTCGTCAGCGTCCTATVAGTTCC-3'	5'-TCCATCAGCGTCAACACCATCATTC-3'
Osterix	5'-GCCTACTTACCCGTCTGACTTTGC-3'	5'-CCCTCCAGTGGCCCACTATTGC-3'
GAPDH	5'-TGATGGGTGTGAACACGAG-3'	5'-AGTGATGGCATGGACTGTGG-3'

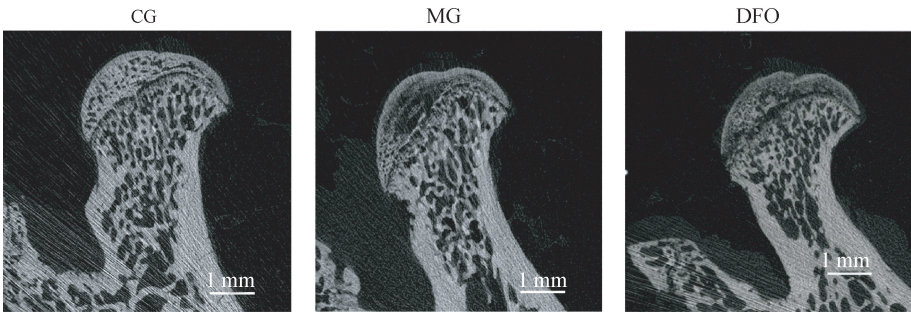
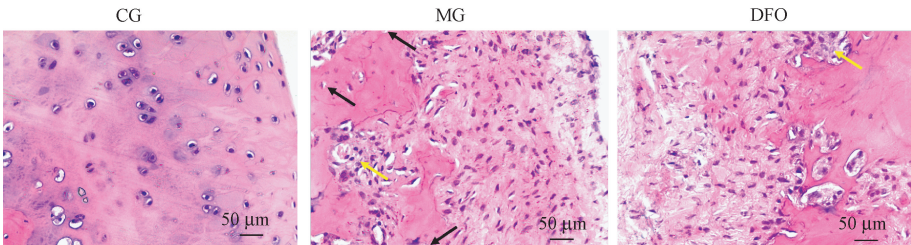


图 1 各组大鼠股骨头 Micro-CT 扫描

Figure 1 Results of Micro-CT scanning of the femoral head of rats in each group



注: 黑色箭头所指空骨陷窝; 黄色箭头为变性坏死的骨组织。

图 2 各组大鼠股骨头 HE 染色

Note. The black arrow refers to the empty bone lacunae. The yellow arrow refers to denatured and necrotic bone tissue.

Figure 2 HE staining of the femoral head of rats in each group

2.2 组织形态计量学和免疫荧光染色分析

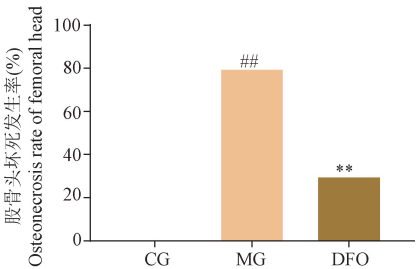
2.2.1 HE 染色

HE 染色知 CG 组骨细胞及细胞核染色均匀,未见空骨陷窝形成;MG 组股骨头有空骨陷窝形成,见点状骨髓坏死出血,并出现纤维结构增生,炎性细胞浸润;DFO 组仅少量标本出现空骨陷窝形成,有点状骨髓坏死出血,且程度较模型组轻(图 2)。

参照股骨头坏死诊断标准^[16],CG 组 0/10 只, MG 组 8/10 只, DFO 组 3/10 只出现股骨头坏死,采用 fisher 精确概率检验结果如下(图 3)。

2.2.2 免疫荧光染色结果

股骨头切片免疫荧光染色可见 CG 组大鼠股骨头中微血管 CD31、Emcn 染色强阳性(H 型血管), Osterix⁺成骨(祖)细胞大量分布,主要分布于骨膜及骨髓周围 H 型血管大量分布的区域;而在 MG 组股骨头中 CD31、Emcn 染色弱阳性,伴随见 Osterix⁺成



注:与 CG 组相比, ^{##} $P < 0.01$;与 MG 组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

图 3 股骨头坏死 fisher 精确概率检验结果

Note. Compared with CG group, ^{##} $P < 0.01$. Compared with MG group, ^{**} $P < 0.01$.

Figure 3 Fisher test for osteonecrosis of the femoral head

骨(祖)细胞分布减少。DFO 组可见 CD31、Emcn 染色强阳性微血管,同时可见 Osterix⁺成骨(祖)细胞相较与 MG 组分布数量增多,主要分布于骨膜及骨髓周围 H 型血管大量分布的区域(图 4)。

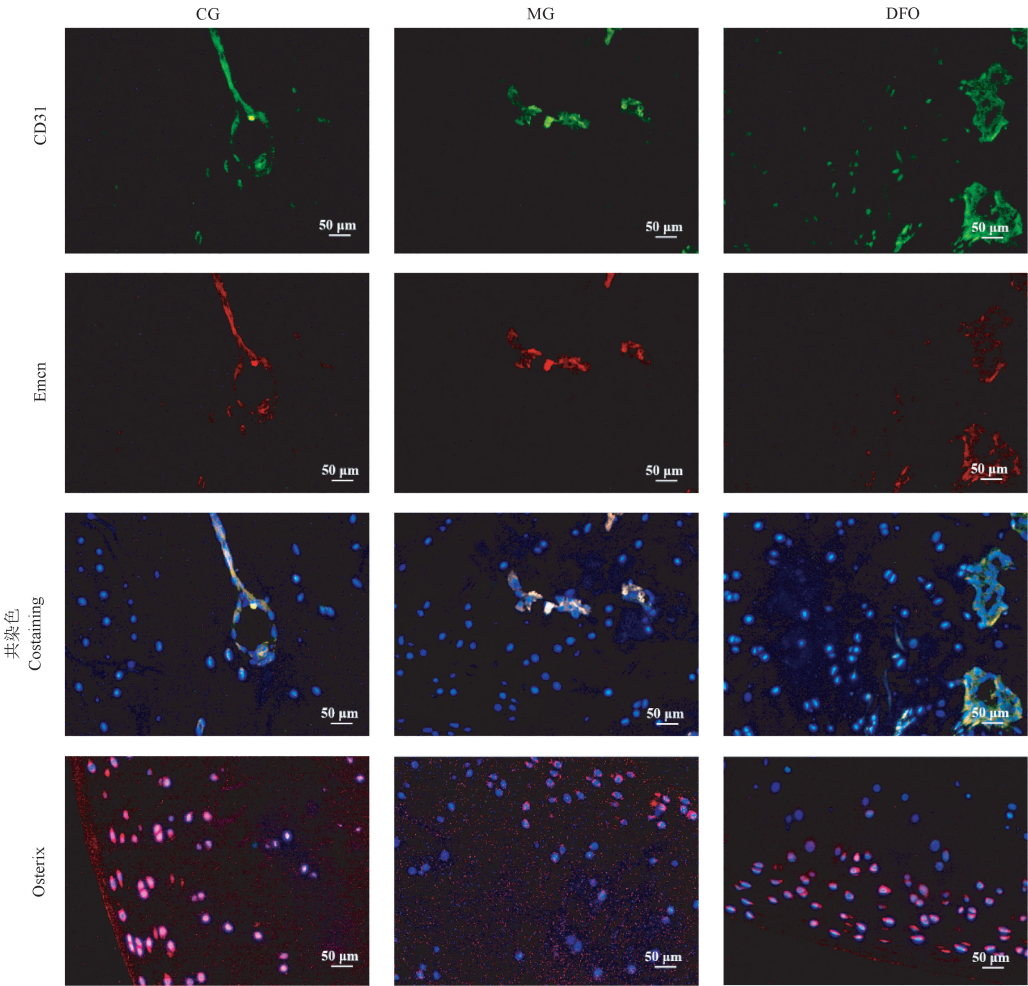


图 4 各组大鼠股骨头免疫荧光染色

Figure 4 Immunofluorescence staining of the femoral head of rats in each group

免疫荧光染色相对面积分析,与 CG 组比较, MG 组大鼠股骨头中 H 型血管的量下降,具有统计学意义($P < 0.01$);与 MG 组比较,DFO 组大鼠股骨头中 H 型血管的量增多,具有统计学意义($P < 0.05$);与 CG 组比较, MG 组 Osterix⁺成骨(祖)细胞量下降,具有统计学意义($P < 0.01$);与 MG 组比较,DFO 组 Osterix⁺成骨(祖)细胞量增多,具有统计学意义($P < 0.01$)(见图 5)。

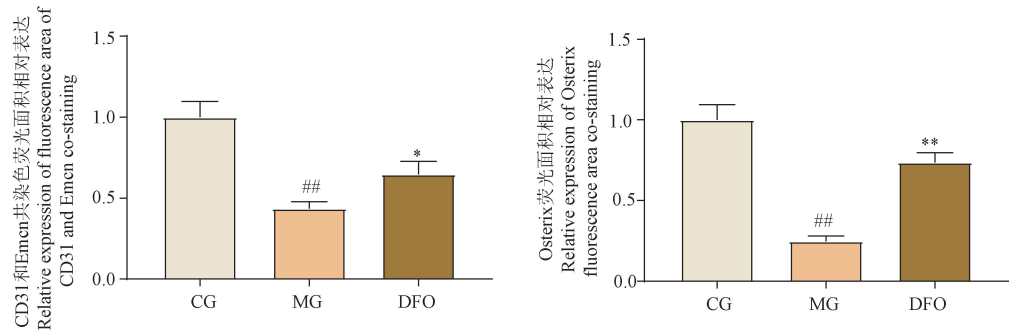
2.3 RT-PCR 分析

Hif-1 α mRNA 检测结果:与 CG 组比较, MG 组大鼠股骨头中 Hif-1 α 表达下降,具有统计学意义($P < 0.01$);与 MG 组比较,DFO 组 Hif-1 α 表达升高,具有统计学意义($P < 0.01$)。

VEGF mRNA 检测结果:与 CG 组比较, MG 组大鼠股骨头中 VEGF 表达下降,具有统计学意义($P < 0.01$);与 MG 组比较,DFO 组 VEGF 表达升高,具有统计学意义($P < 0.01$)。

Osterix mRNA 检测结果:与 CG 组比较, MG 组大鼠股骨头中 Osterix 表达下降,具有统计学意义($P < 0.01$);与 MG 组比较,DFO 组 Osterix 表达升高,具有统计学意义($P < 0.01$)。

Runx2 mRNA 检测结果:与 CG 组比较, MG 组大鼠股骨头中 Runx2 表达下降,具有统计学意义($P < 0.01$);与 MG 组比较,DFO 组 Run2 表达升高,具有统计学意义($P < 0.01$)(见图 6)。



注:与 CG 组相比, ## $P < 0.01$;与 MG 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图同)
Figure 5 各组大鼠股骨头免疫荧光相对面积
Note. Compared with CG group, ## $P < 0.01$. Compared with MG group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

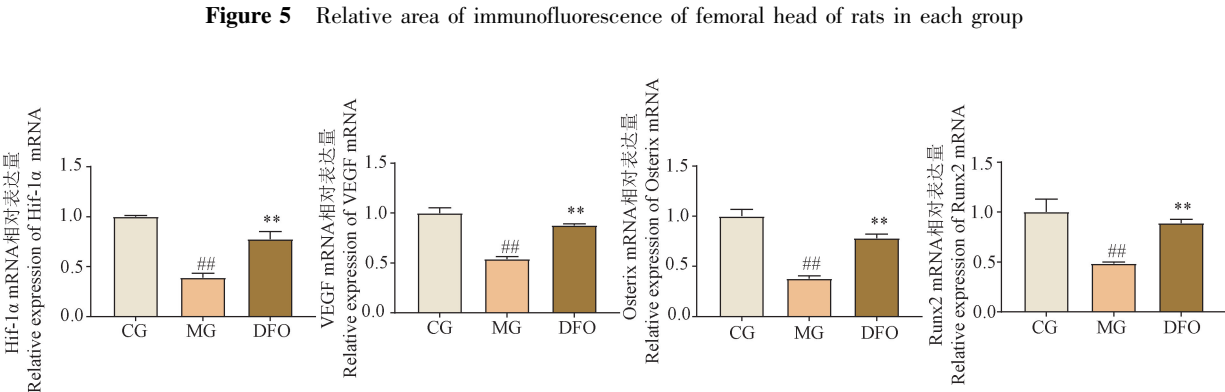


图 6 各组大鼠股骨头 RT-PCR 表达情况
Figure 6 RT-PCR examination of the femoral head of rats in each group

3 讨论

股骨头坏死是一种发生于髋关节的灾难性骨关节疾病,通常会导致髋关节的破坏^[17]。该病高发于 30 ~ 50 岁,影响患者后 30 ~ 50 年的工作和生活,自然进程常进展为股骨头塌陷和严重的髋关节炎,全髋关节置换术通常为其终末治疗手段^[18]。尽

管髋关节置换手术日趋成熟,但是年轻髋关节置换患者仍然需面对如假体松动、再次或多次翻修、活动受限等诸多问题,放任病程进展消极等待关节置换也不是应有的科学态度。目前尚无公认有效的保髋治疗方法。有效地促进坏死骨修复,及早恢复股骨头软骨下骨机械强度,避免关节塌陷是保髋治疗成败的关键,多数专家认为血供恢复是股骨坏

死骨修复的先决条件^[19]。

近期随着对其分布、形态、功能认识的加深, H 型血管备受关注。大量激素应用诱发股骨头血运障碍,进而导致股骨头内细胞凋亡,诱发股骨头坏死发生^[9],可见血运与骨骼细胞在股骨头发生、发展中的同样重要,而具有成血管成骨偶联作用的 H 型血管可能在股骨头坏死中发挥了重要作用。骨内特殊的微血管——H 型血管具有正向骨形成作用,除了具有营养和氧气分配的优先权,而且分泌活性物质为成骨系提供微环境, Osterix 阳性的成骨祖细胞、胶原蛋白 1 α 阳性的成骨细胞和 Runx2 阳性的前成骨祖细胞选择性的分布在 H 型血管周围^[10]。前文提及,人类股骨头同样存在 H 型血管,并且与骨量呈正相关,在干骺端及股骨头等骨高转换的部位 H 型血管对骨量、骨强度具有明显相关性^[7-8]。在本研究中发现,激素诱导的股骨头坏死中,股骨头中的 H 型血管受到明显损害,提示 SINFH 中 H 型血管损害可能是该病发生发展的一个重要因素。去铁胺可有效降低细胞内的铁离子,稳定 Hif-1 α ,调控缺氧反应。研究发现应用 Hif-1 α 稳定剂—去铁胺可以减轻甲强龙对大鼠股骨头 CD31^{hi}Emcn^{hi} 亚型血管的损害作用^[20]。进一步观察到重要的缺氧反应调控因子 Hif-1 α 及其下游因子 VEGF 在 SINFH 中表达下降,而运用去铁胺可以改善这种情况,提示缺氧反应调控与 H 型血管两者之间必然存在着密切的联系。

研究发现 SINFH 中存在缺氧反应调控异常,表现为 Hif-1 α 、VEGF 下降^[14]。Weinstein 等^[9]通过对 Hif-1 α 和 VEGF 的基因表达检测,证明 Hif-1 α 、VEGF 表达在 SINFH 早期就开始降低,且 Hif-1 α 、VEGF 的表达异常、骨血管和骨强度的降低发生于骨量的丢失和微结构的恶化之前。胡亮等^[21]通过动物实验,提示提高 Hif-1 α 可以促进激素性股骨头缺血性坏死的骨修复。Hif-1 α 激活可增加细胞耐缺氧能力应对短暂的缺氧以避免细胞凋亡,以 Hif-1 α 可以促进下游靶基因 VEGF 表达进而促进血管生成和血供改善是机体应对慢性缺氧的机制之一。VEGF 是调节血管发育的最重要的生长因子之一,目前研究将其视为骨修复的关键调节因子^[22-24]。这与我们研究中观察到的结果相似,在本研究中, SINFH 大鼠出现缺氧反应调控障碍表现为 Hif-1 α 、VEGF 降低,进一步可能抑制 H 型血管生成而出现 H 型血管损害,提示 Hif-1 α /VEGF 信号调控障碍导致 H 型血管异常

在 SINFH 发生发展过程中起到了关键作用。

骨骼是一种高度血管化的组织,骨血管系统在骨骼的维持骨量和骨骼修复中发挥着重要的作用^[25]。血管系统不仅负责运输循环细胞、氧气、营养物质和代谢废物,而且还提供钙和磷酸盐(它们是基质矿化的基础),也提供血管分泌素信号因子,调控骨骼生长和骨稳态^[26]。H 型血管是在成血管成骨偶联中具有重要的地位^[10]。我们研究提示骨特异的 H 型血管损害可能是激素性股骨头坏死的关键发病机制之一,促生 H 型血管可能是激素性股骨头坏死防治的关键靶点。但本实验仅为动物实验,在人体激素性骨头坏死中的具体情况,需要进一步探索研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Zheng LZ, Wang JL, Kong L, et al. Steroid-associated osteonecrosis animal model in rats [J]. J Orthop Translat, 2018, 13: 13-24.
- [2] Zhao DW, Yu M, Hu K, et al. Prevalence of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head and its associated risk factors in the Chinese population: results from a nationally representative survey [J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128 (21): 2843-2850.
- [3] 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.
- [4] Zhang Q, Jin L, Jin L. Role of coagulopathy in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. J Int Med Res, 2018, 46(6): 2141-2148.
- [5] Zhao X, Wei Z, Li D, et al. Glucocorticoid enhanced the expression of ski in osteonecrosis of femoral head: the effect on adipogenesis of rabbit BMSCs [J]. Calcif Tissue Int, 2019, 105 (5): 506-517.
- [6] Yuan L, Li W, Wang X, et al. The relationship between genetic polymorphisms in apolipoprotein E (ApoE) gene and osteonecrosis of the femoral head induced by steroid in Chinese Han population [J]. Genes Genom, 2018, 40(2): 225-231.
- [7] 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.
- [8] 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): 1497-1505.
- [9] Weinstein RS, Hogan EA, Borrelli MJ, et al. The pathophysiological sequence of glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in male mice [J]. Endocrinology, 2017, 158(11): 3817-3831.
- [10] Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone [J]. Nature, 2014, 507(7492): 323-328.

- [11] Zalavras C, Shah S, Birnbaum MJ, et al. Role of apoptosis in glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2003, 13(2-4): 221-235.
- [12] FernándezTorres J, ZamudioCuevas Y, MartínezNava GA, et al. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) in the articular cartilage: a systematic review[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(12): 2800-2810.
- [13] David V, Martin A, Isakova T, et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production [J]. *Kidney Int*, 2016, 89(1): 135-146.
- [14] Zhao D, Qiu X, Wang B, et al. Epiphyseal arterial network and inferior retinacular artery seem critical to femoral head perfusion in adults with femoral neck fractures [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2017, 475(8): 2011-2023.
- [15] Yin BH, Chen HC, Zhang W, et al. Effects of hypoxia environment on osteonecrosis of the femoral head in Sprague-Dawley rats [J]. *J Bone Miner Metab*, 2020, 38(6): 780-793.
- [16] 董玉雷, 周磊, 李玉龙, 等. 大鼠激素性股骨头坏死模型的建立和评价 [J]. *中国医学科学院学报*, 2015, 37(2): 152-156.
- Dong YL, Zhou L, Li YL, et al. Establishment and assessment of rat models of glucocorticoid-induced osteonecrosis [J]. *Acta Acad Med Sin*, 2015, 37(2): 152-156.
- [17] 谢程欣, 王维, 余城墙, 等. 酒精性股骨头坏死动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(7): 139-144.
- Xie CX, Wang W, Yu CQ, et al. Research progress in animal models of alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(7): 139-144.
- [18] Mont MA, Cherian JJ, Sierra RJ, et al. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: where do we stand today? A ten-year update [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2015, 97(19): 1604-1627.
- [19] 沈莹姗, 乌日莎娜, 庄至坤, 等. 基于病理表型辨析激素性与酒精性股骨头坏死的血瘀证特点 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(8): 4868-4872.
- Shen YS, Wu RSN, Zhuang ZK, et al. Study on characteristics of differentiation of blood stasis syndrome between steroid and alcohol induced osteonecrosis of the femoral head based on pathological phenotype [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(8): 4868-4872.
- [20] Jing X, Du T, Yang X, et al. Desferoxamine protects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head via activating HIF-1 α expression [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(12): 9864-9875.
- [21] 胡亮, 王军海, 王志烈, 等. 骨形态发生蛋白 2 联合突变型低氧诱导因子 1 α 修复激素性股骨头缺血性坏死 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(28): 4440-4446.
- Hu L, Wang JH, Wang ZL, et al. Combination of bone morphogenetic protein 2 and mutant hypoxia-inducible factor 1 α repairs steroid-induced avascular necrosis of the femoral head [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(28): 4440-4446.
- [22] Zha Y, Li Y, Lin T, et al. Progenitor cell-derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects [J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 397-409.
- [23] Kim ME, Seon JK, Kang JY, et al. Bone-forming peptide-4 induces osteogenic differentiation and VEGF expression on multipotent bone marrow stromal cells [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 734483.
- [24] Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 937-945.
- [25] 单宇, 王亮, 张敏, 等. 铁蓄积、骨内血管与骨质疏松关系的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(7): 954-957, 962.
- Shan Y, Wang L, Zhang M, et al. Research advance in the relationship among iron accumulation, blood vessel in bone, and osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2017, 23(7): 954-957, 962.
- [26] Zhao Y, Xie L. Unique bone marrow blood vessels couple angiogenesis and osteogenesis in bone homeostasis and diseases [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, 1474(1): 5-14.

[收稿日期] 2022-03-06