

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.07.006
文章编号: 1005-8982 (2024) 07-0034-08

实验研究·论著

银杏叶提取物促进大鼠激素性股骨头坏死中H亚型微血管形成的实验研究*

向炜¹, 邱成², 张小敏¹, 王念武¹, 陈孝均¹, 吴佳奇¹, 江锋¹

(1. 西南医科大学附属中医医院 骨科, 四川 泸州 646000; 2. 叙永县中医医院 骨科, 四川 泸州 646499)

摘要: **目的** 观察银杏叶提取物在大鼠激素性股骨头坏死(SONFH)模型中对H亚型微血管的影响。**方法** 采用脂多糖联合甲泼尼龙法复制SONFH模型。将50只大鼠分为空白组、模型组, 以及银杏叶提取物高、中、低剂量组, 每组10只。银杏叶提取物高、中、低剂量组分别予0.88、0.43、0.21 mL/kg银杏叶提取物溶液尾静脉注射, 空白组和模型组分别予等量生理盐水尾静脉注射。4周时Micro-CT断层扫描和HE染色观察股骨头外形、骨小梁结构及囊性变情况; 治疗8周后, 采用HE染色观察检测股骨头软骨表面光滑度和骨小梁密度, 免疫荧光染色观察检测股骨头血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)和内皮黏蛋白(Emcn)表达。**结果** 4周后Micro-CT断层扫描可见大鼠股骨头变形, 骨小梁稀疏; HE染色结果可见骨小梁稀疏、断裂、股骨头坏死, Micro-CT断层扫描与HE染色结果一致, 表明大鼠SONFH模型复制成功。8周后HE染色结果显示, 与空白组相比, 银杏叶提取物高、中、低剂量组及模型组均有不同程度股骨头坏死, 但银杏叶提取物高、中、低剂量组与模型组比较, 骨小梁相对密集, 股骨头坏死减少。各组大鼠CD31及Emcn阳性率比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 模型组CD31和Emcn阳性率较空白组及银杏叶提取物高、中、低剂量组均降低($P < 0.05$), 银杏叶提取物高剂量组CD31阳性率与空白组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 但Emcn阳性率高于空白组($P < 0.05$), 银杏叶提取物高剂量组CD31和Emcn阳性率与中、低剂量组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 但中剂量与低剂量比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 银杏叶提取物可促进大鼠SONFH模型中H亚型微血管形成, 改善股骨头周围血循, 促进血管成骨耦合, 延缓疾病进程。

关键词: 激素性股骨头坏死; 银杏叶提取物; H型血管; 血管形成

中图分类号: R681.8

文献标识码: A

Experimental study on the promotion of H-type microvessel formation in hormone-induced femoral head necrosis in rats by Ginkgo biloba leaf extract*

Xiang Wei¹, Qiu Cheng², Zhang Xiao-min¹, Wang Nian-wu¹,
Chen Xiao-jun¹, WU Jia-qi¹, Jiang Feng¹

(1. Department of Orthopedics, Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Orthopedics, Xuyong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Luzhou, Sichuan 646499, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Ginkgo biloba leaf extract on H-type microvessel formation in

收稿日期: 2023-10-20

* 基金项目: 西南医科大学校级科研基金-自然科学青年苗圃项目(No:2020XYLH-083); 四川省泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作重点项目(No:2019LZXNYDZ13)

[通信作者] 江锋, E-mail: 971726932@qq.com

a rat model of hormone-induced femoral head necrosis (SONFH). **Methods** SONFH model was established using lipopolysaccharide combined with methylprednisolone acetate in rats. Fifty rats were divided into blank group, model group, and high, medium, and low-dose Ginkgo biloba leaf extract groups, with 10 rats in each group. The high, medium, and low-dose Ginkgo biloba leaf extract groups were administered Ginkgo biloba leaf extract solution intravenously at doses of 0.88 mL/kg, 0.43 mL/kg, and 0.21 mL/kg, respectively, while the blank group and model group were given an equal volume of normal saline intravenously. After 4 weeks, micro-CT scanning and HE staining were used to observe the shape of the femoral head, trabecular structure, and cystic changes. After 8 weeks of treatment, HE staining was used to detect the smoothness of the cartilage surface of the femoral head and trabecular density, and immunofluorescence staining was used to detect the expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31) and endomucin (Emcn) in the femoral head. **Results** Micro-CT scanning showed deformation of the femoral head and sparse trabeculae in rats after 4 weeks, and HE staining showed sparse trabeculae, fractures, and femoral head necrosis. The results of micro-CT scanning were consistent with HE staining, indicating successful replication of the SONFH model in rats. After 8 weeks, HE staining showed varying degrees of femoral head necrosis in the high, medium, and low-dose Ginkgo biloba leaf extract groups and the model group compared with the blank group. However, compared with the model group, the trabeculae were relatively dense, and femoral head necrosis was reduced in the high, medium, and low-dose Ginkgo biloba leaf extract groups. The positive rates of CD31 and Emcn in each group of rats were statistically significant ($P < 0.05$). The positive rates of CD31 and Emcn in the model group were lower than those in the blank group and the high, medium, and low-dose Ginkgo biloba leaf extract groups ($P < 0.05$). The positive rate of CD31 in the high-dose Ginkgo biloba leaf extract group was not statistically different from that in the blank group ($P > 0.05$), but the positive rate of Emcn was higher than that in the blank group ($P < 0.05$). The positive rates of CD31 and Emcn in the high-dose Ginkgo biloba leaf extract group were statistically different from those in the medium and low-dose groups ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the medium and low-dose groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Ginkgo biloba leaf extract can promote H-type microvessel formation in the SONFH model in rats, improve blood circulation around the femoral head, promote vascular-bone coupling, and delay disease progression.

Keywords: hormone-induced femoral head necrosis; Ginkgo biloba leaf extract; H-type vessels; angiogenesis

激素性股骨头坏死 (steroid-induced necrosis of femoral head, SONFH) 是糖皮质激素 (Glucocorticoids, GCs) 的滥用或长期大剂量使用而引起的严重临床并发症。SONFH 常累及青壮年, 致残率高, 是严重髋关节炎的根源^[1]。我国人口基数大, SONFH 严重影响患者生存质量, 加重家庭和社会的经济负担^[2]。目前针对该疾病的治疗方法仍存在争议, 如何早期选择一种延缓疾病进展, 甚至扭转恶化局势的方法对临床医师而言显得尤为关键。

目前, 学者们提出了众多关于 SONFH 的学说, 但其发病机制仍存在争议。通过总结各个学说中的观点发现, 长期大剂量使用激素后, 股骨头局部的血供减少, 局部组织及细胞处于缺血、缺氧状态, 破坏了骨组织结构的功能, 最终导致股骨头缺血坏死, 因此, 改善坏死股骨头局部微循环变得尤为重要^[3]。

正因为如此, 近年来, 众多学者在大鼠和人的骨组织中, 尤其是在干骺端, 发现了一种高表达

CD31 和 Emcn 的特殊亚型微血管——H 亚型微血管^[4-5], 其具有血管成骨耦联作用^[6]。若 H 亚型微血管能够在 SONFH 中生成增加, 这将对促进股骨头坏死的修复具有重要意义^[3]。对此, 本课题组找到了一种从银杏树干叶中提取的活性物质, 即银杏叶提取物 (extract of leaves of the ginkgo biloba, EGb)^[7], 主要有效成分为银杏黄酮类化合物和银杏内酯类化合物。目前 EGb 已被用于临床治疗 SONFH^[8], 但银杏叶提取物能否通过促进 SONFH 大鼠 H 亚型微血管生成, 改善股骨头坏死骨的修复尚不清楚。本实验拟复制大鼠 SONFH 模型, 使用银杏叶提取物进行干预, 观察其对大鼠股骨头中 H 亚型微血管形成的影响, 探讨骨坏死修复机制, 为临床用药和推广提供依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

50 只 SPF 级 SD 雄性大鼠, 鼠龄 8 ~ 10 周, 体重

225 ~ 242 g, 来源于西南医科大学实验动物房[实验动物生产许可证号: SCXK(川)2023-017], 在西南医科大学实验动物科研部屏障动物实验设施中进行无菌手术[实验动物使用许可证号: SYXK(川)2023-065]。并按实验动物 3R 原则给予人道的关怀。大鼠给予标准大鼠颗粒饲料, 自由饮用纯净水, 每日换水, 隔日换垫料, 在相对湿度 30% ~ 35%、温度 (22.8 ± 1.5) °C, 光照 12 h/d 的环境中喂养。大鼠适应性饲养 1 周后开始实验。实验经西南医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号: 20220621-004)。

1.2 药物与试剂

银杏叶提取物注射液购自北京悦康药业集团股份有限公司, Lipopolysaccharides 脂多糖(L8880-10)购自北京 Solarbio/索莱宝, 甲基泼尼松龙 98% (M830013-200 mg) 购自上海 Macklin/麦克林公司, 戊巴比妥钠购自上海信裕生物科技有限公司, HE 染色试剂盒购自上海索莱宝公司, 荧光一抗重组 Anti-CD31 抗体[RM1006](ab281583) 购自上海艾博抗公司, Endomucin 抗体(V.7C7) 购自美国 Santa Cruz 公司, 荧光二抗 CY3 山羊抗兔(GB21303)、FITC 山羊抗大鼠(GB22302)、DAPI、自发荧光淬灭剂、抗荧光淬灭封片剂均购自武汉 Servicebio 公司。

1.3 主要仪器

正置白光拍照显微镜(型号: Eclipse Ci-L) 购自日本 Nikon 公司, 正置荧光显微镜(型号: Eclipse C1) 购自日本尼康 Nikon 公司, 成像系统(型号: DS-U3) 购自日本尼康 Nikon, Aipathwell(货号: BY-80113) 购自武汉 Servicebio 公司, Micro-CT(型号: 西门子 16 排 CT) 购自上海西门子医疗器械有限公司, 石蜡包埋机(型号: YD-6D) 购自浙江金华科迪仪器设备有限公司。

1.4 方法

1.4.1 模型复制及实验动物分组 参考李瑞琦等^[9]、董玉雷等^[10]研究脂多糖联合甲基泼尼松龙复制 SONFH 模型的方法, 并作出适当改动。将 50 只大鼠分为空白组、模型组, 以及银杏叶提取物高、中、低剂量组, 每组 10 只。其中银杏叶高、中、低剂量组是建立在模型组的基础上, 在对模型组大鼠连续 3 d 尾静脉注射青霉素 (4×10^5 u/只) 预防感染后, 间隔 24 h 尾静脉注射 20 μ g/kg 脂多糖, 1 次/d, 注射 2 d, 第 2 次注射完脂多糖后, 每间隔 24 h 尾静脉注射 40 mg/kg

甲基泼尼松龙^[11], 1 d/次, 注射 3 d。此后肌内注射青霉素 (4×10^5 u/只) 预防感染, 2 次/周, 注射期间大鼠死亡 3 只, 最终成功复制模型 37 只。模型复制 4 周后随机选取模型组 5 只大鼠行 Micro-CT 断层扫描和 HE 染色, 空白组 2 只行 HE 染色, 以股骨头软骨变薄, 软骨下骨坏死、塌陷、囊变形成, 骨小梁稀疏、断裂为特点, 表明 SONFH 模型复制成功^[10]。将剩余 32 只大鼠 SONFH 模型随机分为模型组、银杏叶提取物高、中、低剂量组, 每组 8 只。将银杏叶提取物与 0.9% 氯化钠注射液稀释, 制备成银杏叶提取物注射溶液。根据银杏叶提取物注射液说明书及人与动物的剂量进行转换。银杏叶提取物高、中、低剂量组分别予 0.88、0.43、0.21 mL/kg 银杏叶提取物溶液尾静脉注射, 空白组和模型组分别予等量生理盐水尾静脉注射。

1.4.2 Micro-CT 和 HE 染色评估模型复制结果 模型复制术后 4 周, 随机选取 5 只大鼠进行精准称重, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉处理。使用 Micro-CT 断层扫描双侧股骨头, 使用 CT Analyser 软件(上海岱嘉医学信息系统有限公司)观察股骨头外形变化, 软骨下骨是否塌陷, 骨小梁是否稀疏、断裂。并随机选取 2 只空白组和 5 只模型组大鼠进行处死, 消毒, 固定, 剪开双侧股骨近端处皮肤, 逐层剥离周围软组织, 经股骨近端剪开关节囊, 牵拉并旋转股骨, 剪断股骨头韧带和髌白横韧带, 取出完整股骨头。经 4% 多聚甲醛溶液固定, 10% EDTA 脱钙液脱钙, 石蜡包埋后切片, 用于 HE 染色, 用正置白光拍照显微镜观察股骨头形态、软骨厚薄及骨小梁微结构。

1.4.3 HE 染色观察各组股骨头形态、软骨厚薄及骨小梁微结构 术后治疗第 8 周精准称重, 根据各组大鼠体重腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 进行麻醉, 消毒, 固定, 取标本(方法同 1.4.2), 将标本完全浸泡在 4% 多聚甲醛溶液(体积 > 标本体积的 2/3) 中固定, 10% EDTA 脱钙液脱钙, 石蜡包埋后切片染色, 用正置白光拍照显微镜观察各组股骨头形态、软骨厚薄及骨小梁微结构。

1.4.4 免疫荧光观察 CD31 和 Emcn 的表达情况 取经 4% 多聚甲醛溶液固定, 10% EDTA 脱钙液脱钙后的股骨头样本切片(片厚 4 μ m), 随机选取切片经过脱蜡、抗原修复、血清封闭后, 在切片上滴加按一定比例配好的一抗大鼠 CD31、Emcn 抗体, 平放于湿

盒内4℃孵育过夜(湿盒内加少量水防止抗体蒸发);荧光偶联二抗避光室温孵育50 min;DAPI避光室温孵育10 min,复染细胞核;在切片内加入自发荧光淬灭剂5 min,流水冲洗10 min;最后用抗荧光淬灭封片剂封片。切片于荧光显微镜下观察并采集图像,DAPI染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,阳性表达为相应荧光素标记的红光或绿光。以Aipathwell对图像进行分析,分别计算CD31和Emcn阳性细胞率。阳性细胞率=阳性细胞数/细胞总数。

1.5 统计学方法

数据分析采用GraphPad Prism统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用单因素方差分析,用单因素方差分析中的多重比较方法进行进一步的两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

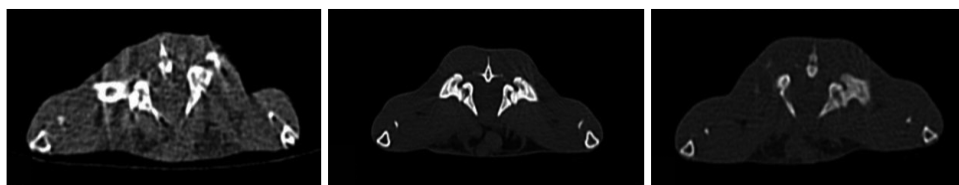
2.1 大鼠SONFH的鉴定

模型复制4周后,随机选取的模型组大鼠行Micro-CT断层扫描可见股骨头外形改变,轮廓不清,部分塌陷坏死,周围呈低密度信号。HE染色可见空白组股骨头表面光滑,软骨层较厚,软骨细胞丰富,骨小梁密集,未见明显坏死和炎症细胞浸润;模型组股骨头表面不光滑,软骨层变薄,大量软骨陷窝形成,骨小梁部分断裂、稀疏,轻度结缔组织增生,伴有中性粒细胞、淋巴细胞点状浸润。模型组

与空白组比较,股骨头坏死改变明显。综合Micro-CT断层扫描和HE染色结果发现,模型组复制4周后,与空白组比较,模型组大鼠股骨头发生变性,外形轮廓改变,软骨层变薄,骨小梁稀疏,与蒋玮等^[12]实验结果一致,表明SONFH模型复制成功。见图1、2。

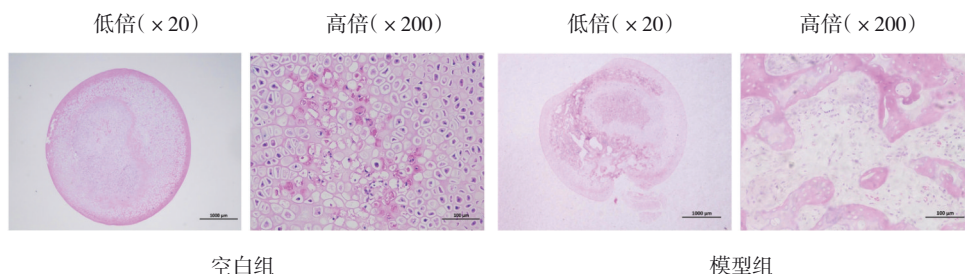
2.2 HE染色结果

用银杏叶提取物治疗8周后,行HE染色可见空白组股骨头软骨表面光滑,软骨细胞丰富,软骨层厚薄均匀,骨小梁密集,未见明显血管和淋巴细胞浸润;模型组股骨头软骨表面不光滑,软骨层薄弱不均,局部骨小梁排列稀疏,骨髓腔较大,可见较多细胞坏死,胞核碎裂或溶解,胞质崩解呈嗜碱性絮状物;银杏叶提取物低剂量组股骨头软骨表面不光滑,软骨层较薄,骨髓腔较大,多见细胞丢失,可见少量细胞坏死,胞核碎裂或溶解,胞质崩解呈嗜碱性絮状物;银杏叶提取物中剂量组股骨头软骨表面不光滑,软骨层薄弱,局部缺失,骨小梁分布密集,骨髓腔内细胞数量丰富;银杏叶提取物高剂量组股骨头软骨表面光滑,软骨层相对较厚,软骨细胞数量丰富,排列规则,骨小梁结构稍紊乱,骨小梁分布密集,骨髓腔偶见细胞坏死,胞核碎裂或溶解,胞质崩解呈嗜碱性絮状物。各组对比后发现,模型组与治疗组的骨坏死程度不同,银杏叶提取物高剂量组较中、低剂量组坏死减轻,骨小梁结构较密集,但较



大鼠股骨头部分塌陷,外形轮廓畸形变。

图1 模型复制4周后模型组大鼠股骨头Micro-CT断层扫描影像



空白组

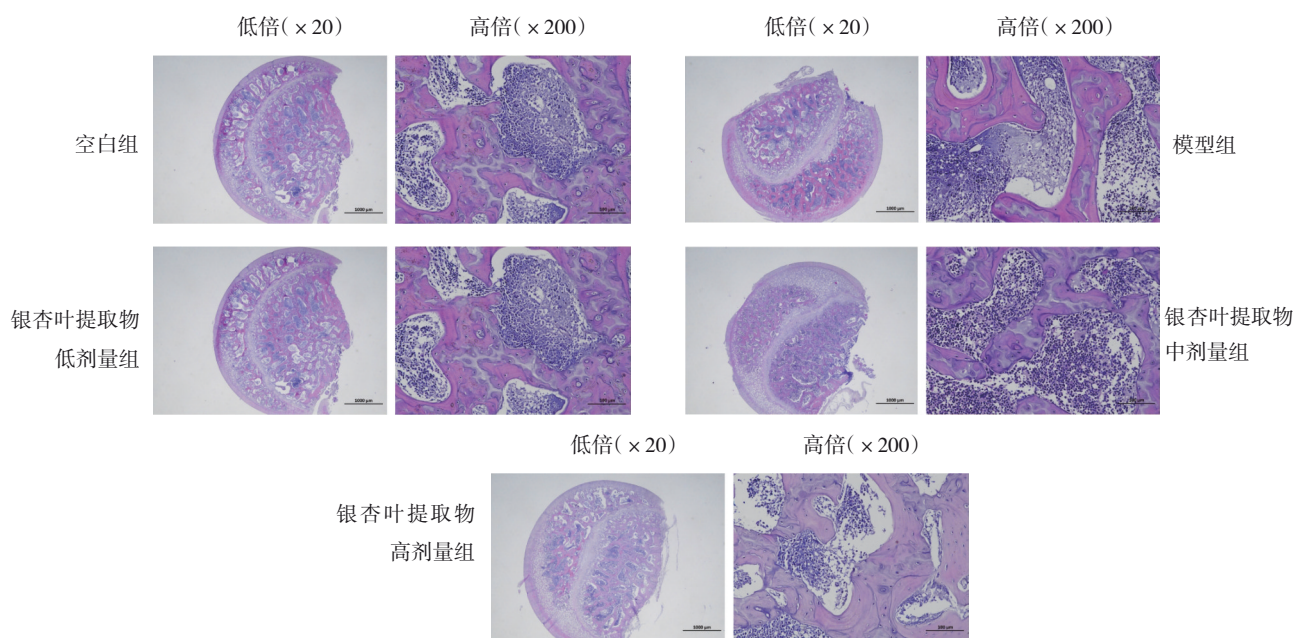
模型组

空白组与模型组比较,空白组的股骨头表面更加光滑,软骨层较厚,骨小梁密集,未见炎症细胞浸润。

图2 模型复制4周后空白组与模型组大鼠股骨头的HE染色

空白组较差。银杏叶提取物中、低剂量组较模型组的坏死程度较轻,但骨小梁稀疏,结构混乱,周围有

部分炎症细胞浸润。见图 3。



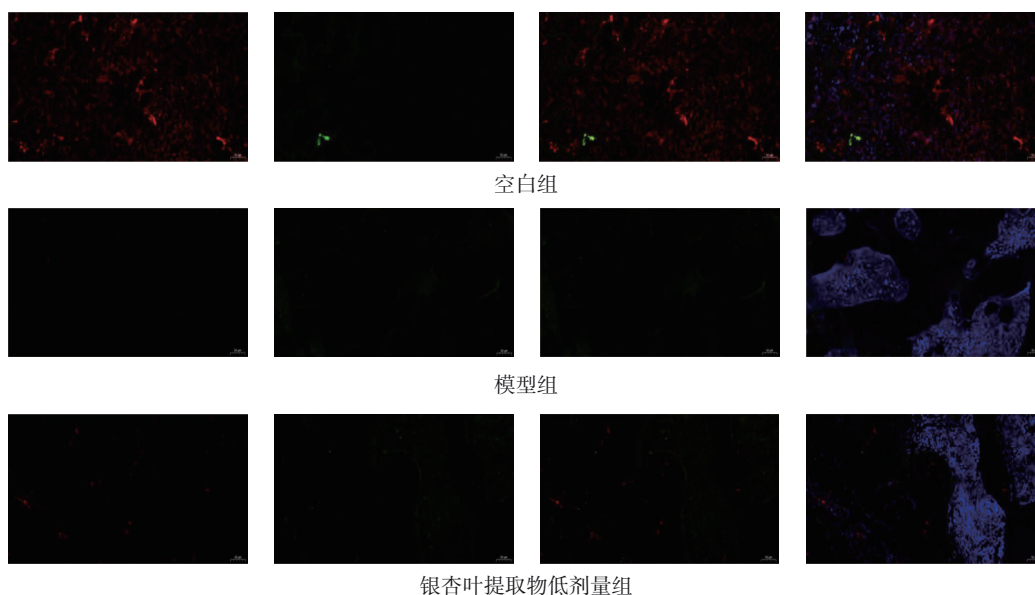
空白组股骨头软骨表面光滑,软骨层厚薄均匀,骨小梁密集;模型组软骨层薄弱不均,骨小梁稀疏;银杏叶提取物高、中、低剂量组中,骨小梁结构较模型组多,其中高剂量组骨小梁结构致密,生成更多,较中、低剂量组明显,但与空白组相比仍具有一定差距。

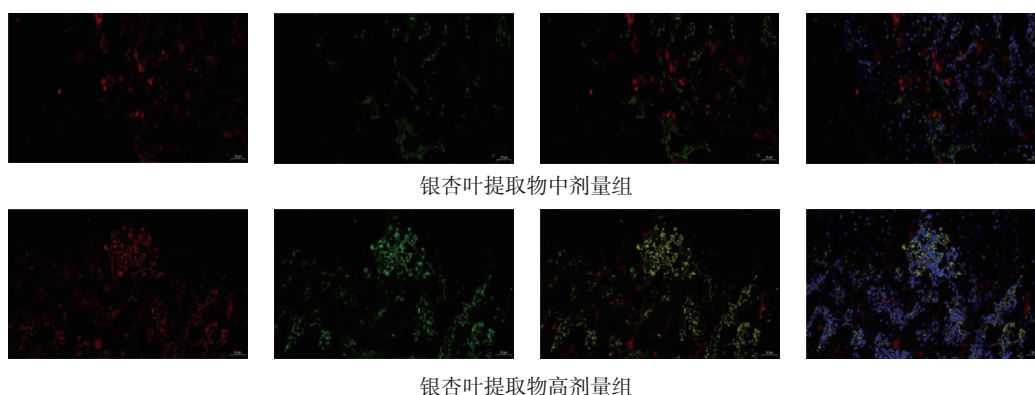
图 3 银杏叶提取物治疗 8 周后各组的 HE 染色

2.3 免疫荧光染色结果

银杏叶提取物治疗 8 周后,采用免疫荧光检测大鼠 SONFH 模型中 CD31 和 Emcn 阳性率的表达,结果显示,各组 CD31 及 Emcn 阳性率比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),进一步行多重比较分析结果显示,模型组 CD31 和 Emcn 阳性率较空白组及银杏叶提取物高、中、低剂量组均降低 ($P < 0.05$)。银杏叶

提取物高剂量组 CD31 阳性率与空白组比较无差异 ($P > 0.05$),但 Emcn 阳性率高于空白组 ($P < 0.05$);银杏叶提取物高剂量组 CD31 和 Emcn 阳性率与银杏叶提取物中、低剂量组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),但银杏叶提取物中剂量组与银杏叶提取物低剂量组 CD31 和 Emcn 阳性率比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4 和表 1。





CD31 表达为红色, Emcn 表达为绿色; 空白组红光表达明显, 但绿光表达较少; 模型组红光和绿光表达均较少; 低剂量组红光和绿光表达也较低; 中剂量组红光和绿光表达增多; 高剂量组红光和绿光明显增多。

图 4 各组免疫荧光染色典型图片 (×200)

表 1 各组小鼠 CD31 和 Emcn 阳性率比较

(n=8, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	CD31	Emcn
空白组	23.239 ± 7.542 ^①	0.179 ± 0.153 ^①
模型组	3.925 ± 1.984 ^②	1.066 ± 1.537 ^②
银杏叶提取物低剂量组	8.255 ± 2.409 ^{①②③}	5.031 ± 2.226 ^{①②③}
银杏叶提取物中剂量组	4.750 ± 2.047 ^{①②③}	3.801 ± 2.647 ^{①②③}
银杏叶提取物高剂量组	28.841 ± 13.716 ^①	25.151 ± 6.728 ^{①②}
F 值	20.294	71.344
P 值	0.000	0.000

注: ①与模型组比较, $P < 0.05$; ②与空白组比较, $P < 0.05$; ③与银杏叶提取物高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

股骨头坏死是临床常见的严重疾病^[13], 具体机制仍有待深入研究。近年来, 有研究表明, 激素类药物使用与非创伤性股骨头坏死密切相关^[14]; 低剂量或短期使用激素可抑制血小板聚集和血栓形成, 但高剂量或长期使用可使血小板聚集, 增加血栓形成^[15]。近年来, 受新型冠状病毒感染疫情影响, 激素类药物使用频率增加对股骨头坏死的威胁进一步加大^[16]。

为了更好地防治 SONFH, 从众多股骨头坏死机制学说中发现, 血管功能障碍、血供循环丧失是股骨头缺血坏死的直接原因, 因此血管的最终作用逐渐被越来越多的人认可^[17]。也正因为如此, 人们将近年来在老鼠和人体上发现的血管内皮细胞蛋白 (CD31 和 EMCN) 抗体强烈阳性染色的 H 亚型微血管引入到 SONFH 防治的眼界^[3]。KUSUMBE 等^[4]、

RAMASAMY 等^[5]首先在小鼠胫骨中发现了 H 亚型微血管, 在后续众多小鼠或大鼠实验中均已得到验证。GAO 等^[18]发现, 人的股骨头中也存在 H 亚型微血管。H 亚型微血管已经被证实具有血管成骨耦合作用^[6], 主要分布在骨内膜和干骺端, 呈弓柱状, 周围聚集着丰富的 Osterix+骨祖细胞、成骨细胞, 可增加骨量, 加速骨形成^[19]。目前, H 亚型微血管通过改善血液循环、促进血管成骨耦合在骨质疏松、骨折愈合、骨坏死等众多骨科疾病当中起着不可替代的作用。

激素的使用对 H 亚型微血管的影响较大, 且多偏向于抑制。LANE 等^[20]在实验研究中发现, 激素类药物可使股骨干骺端 H 亚型微血管显著减少, 引起骨密度降低, 骨微结构破坏。PENG 等^[21]在糖皮质激素和骨脉管系统关系的实验中发现, GCs 可通过转抑制 GR/NF- κ B 抑制 PDGF-BB 在破骨前体细胞 (POCs) 中的合成, 从而抑制 H 亚型微血管的形成。LIU 等^[22]使用糖皮质激素治疗幼龄小鼠后也发现激素类药物可抑制 H 亚型微血管周围破骨细胞分泌的血管生成素介导的内皮细胞核糖体 RNA 转录, 抑制血管成骨耦合, 引起干骺端骨量丢失。激素的大剂量或长期使用不可避免地引起对 H 亚型微血管的抑制, 导致大鼠股骨头周围血供减弱, 细胞信号及营养物质交换减弱, 骨密度下降, 骨小梁塌陷, 软骨细胞变性坏死, 最终引发并加剧大鼠 SONFH 可能。

因此, 如果能找到一种可以改善股骨头周围血液循环, 促进血管生成和重塑的药物, 可能对延缓和治疗 SONFH 具有重要意义。本研究发现, 银杏叶提取物不仅具有抗炎、抗氧化、清除自由基的作用,

还具有改善凝血功能、血流动力学及缺血再灌注损伤的作用,而且毒副作用低,临床运用广泛,疗效确切。因此,本实验将银杏叶提取物用来干预大鼠 SONFH 模型,观察其对大鼠 SONFH 模型的影响。

所以,笔者提出银杏叶提取物是否能促进血管成骨耦合的 H 亚型微血管生成,改善股骨头局部血循环,从而治疗 SONFH 的大胆猜想。结合本次实验结果,证实了这一猜想。随着激素使用时间的延长,股骨头周围大量细胞坏死,软骨塌陷,骨髓腔增大,骨密度降低,骨小梁微结构被破坏,符合 MINNECI 等^[15]关于对激素使用剂量和使用时间对血管的影响的报道。本研究通过对比空白组、模型组,以及银杏叶提取物高、中、低剂量组的 HE 染色结果发现,银杏叶提取物高、中、低剂量组均有不同程度的股骨头坏死,较空白组软骨层变薄,骨小梁稀疏,但较模型组坏死程度较轻,骨小梁稍微粗大密集,银杏叶提取物高剂量组比银杏叶提取物中、低剂量组在同样的治疗时间下效果更加明显。说明银杏叶提取物对大鼠 SONFH 的防治具有较好作用,且疗效存在一定的剂量依赖性。通过免疫荧光检测 H 亚型微血管强表达的阳性内皮细胞(CD31 和 Endom)后进一步验证了大鼠股骨头中确实存在 H 亚型微血管。空白组大鼠的 CD31 呈高表达,Emcn 呈低表达。模型复制成功后予以银杏叶提取物高、中、低剂量治疗后,银杏叶提取物高剂量组的 CD31 和 Emcn 阳性率明显高于中、低剂量组,且较模型组也升高,表明银杏叶提取物能够促进大鼠 SONFH 中 CD31 和 Emcn 的高表达,且银杏叶提取物高剂量组效果更好,以上结果表明,在大鼠 SONFH 模型中,银杏叶提取物能够促进 H 亚型微血管形成,高剂量组疗效更加明显,对改善股骨头坏死周围血供,增强血管成骨耦合,恢复骨小梁微结构,防治 SONFH 具有很大意义。

本实验在“血管学说”^[23]指导下,在大鼠 SONFH 模型中对近年来新发现的 H 亚型微血管进行检测,发现 H 亚型微血管与激素性股骨头坏死具有紧密联系,但银杏叶提取物是如何促进 H 亚型微血管形成的具体机制有待进一步研究。本次实验虽然证明了银杏叶提取物可以通过促进 H 亚型微血管形成对大鼠 SONFH 进行治疗,但仍有很多局限性:①免疫荧光切片为随机选取股骨头标本进行,染色也是随

机选取,结果具有一定差异,从实验数据上看也具有不同程度波动,可能与样本量有关,后期需对样本同一层次以及加大样本量进行检测;②本实验未对大鼠 SONFH 进行分期,分期治疗效果有待进一步研究;③从实验结果上看银杏叶提取物可能对所有坏死期均有积极作用,但最终具体疗效不确定,后期研究可能需延长治疗时间。

综上所述,未来深入研究 H 亚型微血管在 SONFH 中的影响机制,靶向 H 亚型微血管治疗^[24],将可能会对 SONFH 的防治具有重大意义。

参 考 文 献 :

- [1] MONT M A, CHERIAN J J, SIERRA R J, 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.
- [2] MANKIN H J. Nontraumatic necrosis of bone (osteonecrosis)[J]. *N Engl J Med*, 1992, 326(22): 1473-1479.
- [3] XU H X, WANG C Q, LIU C, et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells for treating steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10(5): 781-796.
- [4] 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): 323-328.
- [5] RAMASAMY S K, KUSUMBE A P, WANG L, et al. Endothelial notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone[J]. *Nature*, 2014, 507(7492): 376-380.
- [6] GROSSO A, BURGER M G, LUNGER A, et al. It takes two to tango: coupling of angiogenesis and osteogenesis for bone regeneration[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2017, 5: 68.
- [7] 北京脑血管病防治协会银杏叶注射液临床应用专家共识写作组. 银杏叶提取物注射液临床应用中国专家共识(2019)[J]. *中华老年医学杂志*, 2019, 38(11): 1198-1204.
- [8] 林俊东, 徐建成, 郑亚明, 等. 银杏叶提取物治疗早期股骨头缺血性坏死的疗效观察[J]. *中国医药*, 2012, 07(11): 1409-1411.
- [9] 李瑞琦, 张国平, 李宜炯, 等. 提高激素性股骨头坏死模型成活率的方法[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(50): 8729-8734.
- [10] 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.
- [11] 汪轩, 张琳, 邢婧, 等. 激素剂量对激素性股骨头坏死模型建立的影响及系统评价[J]. *浙江中医药大学学报*, 2016, 40(1): 19-25.
- [12] 蒋玮, 曹林忠, 郭明峻, 等. 激素性股骨头坏死动物模型的建立及评价[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6): 799-804.
- [13] COHEN-ROSENBLUM A, CUI Q J. Osteonecrosis of the femoral head[J]. *Orthop Clin North Am*, 2019, 50(2): 139-149.

- [14] TAN B, LI W L, ZENG P, et al. Epidemiological study based on China osteonecrosis of the femoral head database[J]. *Orthop Surg*, 2021, 13(1): 153-160.
- [15] MINNECI P C, DEANS K J, BANKS S M, et al. Meta-analysis: the effect of steroids on survival and shock during sepsis depends on the dose[J]. *Ann Intern Med*, 2004, 141(1): 47-56.
- [16] TANG C, WANG Y C, LV H S, et al. Caution against corticosteroid-based COVID-19 treatment[J]. *Lancet*, 2020, 395(10239): 1759-1760.
- [17] 邵文凯, 冯勇. 血管在激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(11): 2307-2313.
- [18] GAO F Q, MAO T L, ZHANG Q Y, et al. H subtype vascular endothelial cells in human femoral head: an experimental verification[J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(4): 1497-1505.
- [19] ZHANG J K, PAN J, JING W. Motivating role of type H vessels in bone regeneration[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(9): e12874.
- [20] LANE N E, MOHAN G, YAO W, et al. Prevalence of glucocorticoid induced osteonecrosis in the mouse is not affected by treatments that maintain bone vascularity[J]. *Bone Rep*, 2018, 9: 181-187.
- [21] PENG Y, LV S, LI Y S, et al. Glucocorticoids disrupt skeletal angiogenesis through transrepression of NF- κ B-mediated preosteoclast *Pdgfb* transcription in young mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(6): 1188-1202.
- [22] LIU X N, CHAI Y, LIU G Q, et al. Osteoclasts protect bone blood vessels against senescence through the angiogenin/plexin-B2 axis[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1832.
- [23] CHEN C Y, DU W, RAO S S, et al. Extracellular vesicles from human urine-derived stem cells inhibit glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head by transporting and releasing pro-angiogenic *DMBT1* and anti-apoptotic *TIMP1*[J]. *Acta Biomater*, 2020, 111: 208-220.
- [24] 向炜, 黄山峻, 曹家全, 等. 骨折愈合中诱导H型血管形成因素的研究进展[J]. *中国医学创新*, 2022, 19(22): 179-184.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 向炜, 邱成, 张小敏, 等. 银杏叶提取物促进大鼠激素性股骨头坏死中H亚型微血管形成的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(7): 34-41.

Cite this article as: XIANG W, QIU C, ZHANG X M, et al. Experimental study on the promotion of H-type microvessel formation in hormone-induced femoral head necrosis in rats by *Ginkgo biloba* leaf extract[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(7): 34-41.