
薪火相传 枝繁叶茂

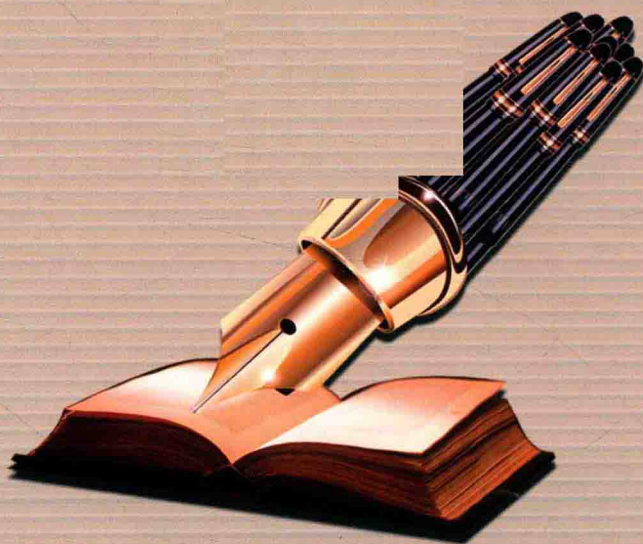
——李盛华教授研究生

论文集

(一)

XINHUOXIANGCHUAN ZHIFANYEMAO
LISHENGHUAJIAOSHOUYANJIUSHENG
LUNWENJI

主 编◎周明旺



薪火相传 枝繁叶茂

——李盛华教授研究生论文集

编委会

主 编：周明旺

副主编：叶丙霖 宋 渊

编 委：（按姓氏笔画排序）

叶丙霖 孙凤歧 朱换平 乔 斌 李亚军

宋 渊 吴锦秋 周明旺 梁雄勇 敬平福

序一

经过李盛华教授及其弟子的实践探索、辛勤笔耘,《李盛华教授研究生论文集》终于结集出版。适逢甘肃省中医院建院60周年之际,这部论文集的出版无疑具有重要意义。它不仅展示了李盛华教授近30年科研的成果,同时也是他学术思想的延伸和展现,更是贵院科研工作者为医院科研事业发展而努力奋斗的一个缩影,这也为院庆大典献上一道风味独特的文化大餐。

《李盛华教授研究生论文集》共收录论文37篇,内容涉及实验研究、临床研究、灾害医学研究等方面。翻阅文集,一种真实、生动、绚丽的感觉油然而生。鲜活的素材、生动的描述、鲜明的见解、真挚的情感,抒写着李盛华教授及其弟子们对科研工作的严谨、认真和客观的态度,抒写着他们对医学事业孜孜不倦的追求、探索和实践,也抒写着他们对患者的无私与大爱。在这里,我们既可以看到李盛华教授厚重的经验积累,又可以看到其弟子们上下求索的坚定信念。这一文集,承载着师生们共同发展的经历。一篇篇精美的文章,记录着心灵的对话,迸溅出师生思想碰撞的火花……忽而是凝重的思考,忽而是若有所思的顿悟,忽而是蓦然回首的释然。艰难困苦、喜悦感动无不融注于一篇篇心血凝成的力作中。

文字是生命的酒,文字是生命的歌。这样的歌让人心动,这样的酒让人心醉!

盖文章,经国之大业,不朽之盛事。古语有云:人生有“三不朽”——太上立德,其次立功,其次立言。其实人生在世,有“一立”便足以不朽。立言就是著书立说。而我们现在做的就是“立言”——以文章来阐释对医学的理解认识,对科研的真知灼见。虽然这些文章未必就能不朽,但能够和同道们互相交流心得,取长补短,学习借鉴,也不失为一大赏心乐事。

它山之石,可以攻玉。只要我们善于学习、思考,就能有所

发现;只要我们敢于实践、质疑,就能有所创新。愿李盛华教授及其弟子们用勤勉和智慧,共同创造出甘肃省中医院骨伤科辉煌的明天,谱写出医学事业的华美乐章。

什么是耕耘者的收获?倚锄望,到处是青青一片。“酒香不怕巷子深”,笔墨散发馨香,信其然,不是幻。受托作序,不胜荣幸,故欣然命笔,并致贺庆。

中国中西医结合学会骨科微创专业委员会名誉主任委员

于和 2013-7-9
于中国中医科学院

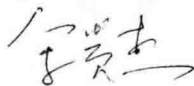
序二

李盛华教授致力于中西医结合骨伤学科之临床、教学、科研工作30余载,辛勤耕耘,锐意进取,不断创新,取得了累累硕果,为培养骨伤科人才、推动和促进甘肃中医药事业的发展做出了巨大贡献。

李盛华教授在长期临床、教学、科学研究工作中,坚持言传身教,注重提携后进,培养了一批又一批优秀的骨伤科临床、科研人才。他教导研究生不仅要掌握临床技能,提高自身的专业素养,以胜任临床工作,同时还应具有敏锐的科研意识、自主的科研思维以及优秀的科研能力,善于从临床实践中发现问题并进行研究,培养成为未来临床学科带头人和学术骨干。

此书虽刊载的是李盛华教授亲手指导过的硕、博士研究生学位论文,但其所反映的是他本人长期从事骨伤科临床、科研工作的总结和凝练。本书出版在即,欣然命笔为序,愿此书能使更多的学者和同道从中得到裨益。

全国中医骨伤科学会委员、常务委员



前 言

李盛华教授自20世纪80年代从医以来,在为陇原数以万计的百姓解除骨伤病痛的同时,又不辞辛劳地投身于医学科研工作之中,作为项目负责人他主持完成了国家级、省部级科研项目30余项。作为硕士及博士研究生导师,他先后培养指导了数十名硕、博士研究生。

在李盛华教授从医30年之际,为了进一步总结和展示李盛华教授及其所带领的学术团队在科研及学术方面取得的成果,增强骨伤学科同仁学术意识和素养,推动甘肃省骨伤科事业的发展,我们特收集李盛华教授已毕业硕、博士研究生毕业论文,并编撰成集。

本论文集内容涵盖了中医基础理论、中医正骨手法、骨科微创技术、陇中药物研发、灾害医学、中医体质与骨关节疾病等相关性领域的研究。由于受实验条件、观察病例数量与质量、统计方法等诸多因素的影响,研究结果偏倚与疏漏在所难免,尚希各位学者及同仁们批评指正。

编 者

目 录

博士毕业生论文

- 非创伤性股骨头坏死中医体质类型及ApoB和MTHFR基因多态性研究 周明旺/003
- 神经根型颈椎病证候规范、疗效评价与方案优化 张文贤/054
- 1005例胸腰椎骨折住院患者的流行病学特征分析与临床治疗回顾性研究 张绍文/099
- 两种内镜治疗腰椎间盘突出症的比较研究及中医辨证规律探讨 李红专/146
- 丹参多酚酸盐联合封闭负压引流治疗四肢慢性创面的临床研究 宋 渊/175
- 中药外敷对前交叉韧带重建术后康复及相关细胞因子变化的影响研究 吴锦秋/202

硕士毕业生论文

- 损伤散含药血清对体外培养大鼠成骨细胞增殖、分化和矿化影响的实验研究 刘 坤/239
- 损伤散防治骨质疏松症的临床实验研究 刘中何/255
- 陇中损伤散治疗激素性股骨头坏死的实验研究 周明旺/275
- 陇中损伤散治疗激素性股骨头坏死模兔的实验研究 宋 渊/300
- 陇中损伤散对家兔骨折愈合影响的实验研究 王想福/323
- 陇中损伤散对家兔骨折愈合中骨密度、生物力学影响的实验研究 赵学寨/349
- 陇中损伤散含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化的影响 叶丙霖/372
- 山羊激素性股骨头坏死病理学及影像学实验研究 李小宏/391
- 陇中损伤散提取物对体外培养大鼠成骨细胞增殖、分化影响的实验研究 李 强/412
- 山羊激素性股骨头坏死血液流变学及血生化学实验研究 胡建锋/432
- “5·12”大地震甘肃灾区骨伤病调查与处置对策研究——脊柱与脊髓、骨盆损伤部分 王久夏/453
- “5·12”大地震甘肃灾区骨伤病调查与处置对策研究——四肢骨折部分 张彦军/480
- 地震伤情的影响因素分析与挤压综合征防治 张玉昌/500
- 陇中损伤散对高脂血症大鼠血脂、血流变、血凝系列指标的影响 杨文博/514
- 陇中损伤散的毒理学实验研究 I 宋江润/537
- 经皮激光汽化减压术治疗腰椎间盘突出症的临床研究 郭平德/561
- 陇中损伤散的毒理学实验研究 II 周 君/581
- 膝骨性关节炎患者中医体质因素的临床研究 柴喜平/603
- 膝骨性关节炎中医体质及相关因素调查分析 梁雄勇/619
- 神经根型颈椎病中医证型规范化研究 李亚军/643

酒精性股骨头坏死患者中医体质与CYP4501A2*1C基因多态性的研究	孙凤歧/680
损伤散对去卵巢大鼠骨组织形态计量学影响的研究	姚正凯/707
消肿止痛合剂对大鼠急性脊髓损伤影响的相关研究	邓 强/726
消肿止痛合剂预防人工关节置换术后下肢深静脉血栓形成的临床研究	汪俊红/744
川芎嗪对全髋关节置换术后深静脉血栓的预防效果及安全性探讨	李玉吉/760
血管内皮细胞VEGF在鼠尾再植术后的表达及消肿止痛合剂干预的实验研究	赵 萍/782
消肿止痛合剂联合曲马多对膝关节置换术后镇痛效应的相关性研究	尤从新/806
臭氧治疗不同体质类型腰椎间盘突出症的临床研究	柳 直/815
骨刺消巴布剂对大鼠急性软组织损伤模型的治疗作用及机理研究	魏国俊/832
血瘀质非创伤性股骨头坏死患者相关基因多态性研究	郭铁峰/847
痰湿体质型非创伤性股骨头坏死患者SREBPs基因多态性研究	穆欢喜/871
英汉缩略词对照表	903

中医体质与亚健康状态中医学体质学说的研究

ATTHK 基因多态性研究

作者



摘要：本研究旨在探讨中医体质学说的科学内涵，揭示其与现代医学的内在联系。通过运用现代分子生物学技术，对 ATTHK 基因多态性与中医体质类型进行了相关性分析。结果表明，ATTHK 基因多态性可作为中医体质分型的分子生物学标志。本研究为中医体质学说的现代化研究提供了新的思路和方法，具有重要的理论意义和临床应用价值。

博士 BIYESHENGLUNWEN BOSHI 毕业生论文

博士毕业生论文

摘要：本研究旨在探讨中医体质学说的科学内涵，揭示其与现代医学的内在联系。通过运用现代分子生物学技术，对 ATTHK 基因多态性与中医体质类型进行了相关性分析。结果表明，ATTHK 基因多态性可作为中医体质分型的分子生物学标志。本研究为中医体质学说的现代化研究提供了新的思路和方法，具有重要的理论意义和临床应用价值。

关键词：中医体质学说；ATTHK 基因；多态性；亚健康状态

参考文献

1. 王琦. 中医体质学说的科学内涵[J]. 中华中医药杂志, 2005, 25(1): 1-4.

2. 李经纬. 中医体质学说的现代研究[J]. 中国中医药报, 2006, 12(1): 1-3.

3. 张其成. 中医体质学说的理论探讨[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(1): 1-4.

4. 李德军. 中医体质学说的现代研究[J]. 中国中医药报, 2008, 13(1): 1-3.

5. 王琦. 中医体质学说的科学内涵[J]. 中华中医药杂志, 2009, 29(1): 1-4.

6. 李经纬. 中医体质学说的现代研究[J]. 中国中医药报, 2010, 15(1): 1-3.

7. 张其成. 中医体质学说的理论探讨[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(1): 1-4.

8. 李德军. 中医体质学说的现代研究[J]. 中国中医药报, 2012, 17(1): 1-3.

9. 王琦. 中医体质学说的科学内涵[J]. 中华中医药杂志, 2013, 33(1): 1-4.

10. 李经纬. 中医体质学说的现代研究[J]. 中国中医药报, 2014, 19(1): 1-3.

非创伤性股骨头坏死中医体质类型及ApoB和MTHFR基因多态性研究

周明旺



个人简历:周明旺,男,汉族,生于1977年2月,博士研究生,主治医师,擅长中西医结合防治骨关节疾病,中国中西医结合学会骨科微创专业委员会秘书、甘肃省中医药学会骨伤科委员会副秘书长、甘肃省中西医结合骨科微创委员会委员,

甘肃省中医院“334”第三层次人才,主持省厅级科研项目2项;作为第二负责人参与在研国家自然科学基金面上项目2项,地区基金项目1项;参与完成科研项目7项,其中获省科技进步奖二等奖1项、三等奖2项;中华中医药学会科技进步三等奖2项;甘肃省皇甫谧中医药科技奖4项;省医学科技奖三等奖1项。作为第一作者发表学术论文20余篇,参编著作4部。

中文摘要

目的:通过调查非创伤性股骨头坏死(nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head, NONFH)患者中医体质类型、相关发病因素及ApoB和MTHFR基因多态性的研究,探讨NONFH与中医体质及ApoB和MTHFR基因多态性的相关性,为早期诊断、防治该病提供新的思路和方法。

方法:2011年1月至2013年1月,对甘肃省中医院NONFH患者179例进行问卷调查,调查前均知情同意,并随机选取309例非血缘关系健康志愿者为对照。所有病例调查、指标检测工作均按国家自然科学基金课题《非创伤性股骨头坏死中医体质类型及相关基因多态性研究》统一设计。主要观察指标:中医体质、性别、年龄、发病年龄、初潮年龄与绝经年龄(女性)、民族、饮酒、体重指数(发病时)、家族史等。采用Excel建立数据库,SPSS 17.0统计分析,并将具有统计学意义的变量通过Logistic回归模型进行多因素分析,计算比值比(OR),估计各危险因素与NONFH的关联强度。并依据统计结果分析确定中医高发体质类型,针对高发体质进行ApoB和MTHFR基因多态性的检测。

结果:

(1)一般情况:共调查NONFH患者179例(病例组)及非血缘关系健康志愿者309例(对照组),两组在居住地分

布上基本一致,具有可比性($\chi^2=24.343, P=0.05$)。

(2)发病因素的相关性:①两组在年龄、BMI、初潮年龄比较有统计学差异($P<0.05$);②两组酒类饮用情况比较有统计学差异($P<0.05$);③两组日照时间比较有统计学差异($P<0.05$);④两组文化程度与劳作方式比较有统计学差异($P=0.005$)。

(3)体质分布特点:体质发病率比较,病例组在气虚质、痰湿质、湿热质、血瘀质、气郁质等方面高于对照组且有统计学差异($P<0.05$),病例组在平和质方面低于对照组且有统计学差异($P<0.05$),两组在阳虚质、阴虚质、特禀质方面无统计学差异($P>0.05$)。Logistic回归分析表明男性性别、年龄、气虚质、痰湿质、血瘀质为NONFH的危险因素。

(4)ApoB基因多态性研究:ApoB基因2488C>T(XbaI)位点,病例组痰湿质X-/X+两种基因型频率高于对照组($P<0.05$),但X-/X+等位基因频率无统计学差异($P>0.05$),4154G>A(EcoRI)位点基因型分布和基因频率在两组间及病例组内不同体质间比较无统计学差异($P>0.05$)。

(5)MTHFR C677T位点多态性研究:①在MTHFR C677T位点多态性中,病例组T等位基因和TT基因型出现频率高于对照组且有统计学差异($P<0.05$);两组CC、CT基因型及C等位基因出现频率比较无统计学差异($P>0.05$)。②病例组血瘀质的MTHFR C677T T等位基因出现频率高于对照组,且有统计学差异($P<0.05$);病例组血瘀质的TT基因型出现频率高于对照组,且有统计学差异($P<0.05$);病例组痰湿质的三种基因型及C、T等位基因出现频率与对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。

结论:

(1)NONFH的发病高危因素:男性性别、年龄及中医体质中的气虚质、痰湿质、血瘀质。

(2)NONFH的发病与患者年龄、BMI、初潮年龄、酒类饮用情况、日照时间、文化程度与劳作方式等有相关性。

(3)气虚质、痰湿质、湿热质、血瘀质、气郁质与NONFH的发病具有相关性,其中前三位高发体质类型依次为气虚质、痰湿质、血瘀质。

(4)NONFH的3类高发体质之中,ApoB基因2488C>T

位点多态性与痰湿质有相关性, ApoB 基因 4154G>A 位点多态性与 NONFH 的 3 类高发体质无相关性。

(5) MTHFR C677T 位点多态性与 NONFH 的发病具有相关性。

(6) MTHFR C677T 位点 T 等位基因及 TT 基因型的高分布频率与血瘀质高发 NONFH 具有相关性; 痰湿质高发 NONFH 与 MTHFR C677T 位点多态性无相关性。

关键词: 非创伤性股骨头坏死; 中医体质; 基因多态性; ApoB 基因; MTHFR 基因

ABSTRACT

Objective: To explore the relationships among NONFH, TCM constitutional types and ApoB and MTHFR gene polymorphism with investigating NONFH patients of TCM constitutional types, pathogenesis risk factors and ApoB and MTHFR gene polymorphism, providing new ideas and methods for early diagnosis and preventive treatment.

Methods: After 179 patients with NONFH were provided the informed consents, they were investigated by questionnaires and surveys in Gansu Hospital of TCM from January 2011–January 2013, and 309 normal adult volunteers without kinship were randomly assigned as the control samples. Cases investigation and index testing work are completed by mentorship and National Nature Science Foundation Project of Study on NONFH of TCM Constitutional Types and Related Gene Polymorphism. Main outcome measures: TCM Constitutional Types, gender, age, age of onset, age of menarche and menopause (female), nationality, drinking, body mass index (illness episode), family history, etc. The database was established by Excel, statistical analysis was done by SPSS17.0, and the statistically significant variables were processed by Logistic regression model for calculating odds ratio (OR) and estimating the risk factors associated with NONFH's strength. The survey data was analysed to identify the high-risk types. The gene polymorphism of ApoB and MTHFR C677T was detected in some high-frequent types.

Results:

(1) General situation: 179 patients with NONFH (observation group) and 309 patients with volunteers were surveyed (control group). The two groups was consistent in the distribution of residence, and there were comparable ($\chi^2=24.343, P=0.05$).

(2) Risk factors of Correlation: In age, BMI, age of menarche, drinking, sunshine time, degree of education and way of working, there is statistically significant between the two groups ($P<0.05$).

(3) Distribution of TCM Constitution: The incidence of qi

deficiency type, phlegm-damp type, damp and hot type, blood stasis type and qi depression type in the observation group was higher than in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The incidence of normal type in the observation group was lower than in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). In the incidence of Yang-deficiency type, Yin-deficiency type and specific endowment type, the difference was not statistically significant between the two groups ($P>0.05$). Logistic regression analysis showed that the male gender, age, qi-insufficiency type, phlegm-damp type, blood stasis type and blood stasis type were risk factors.

(4) Study on the gene polymorphism of ApoB gene: In the XbaI genotypes of ApoB gene, the frequency of X-/X+ genotypes in the observation group with phlegm-damp type was higher than in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). In the frequency of X-/X+ alleles, there was not statistically significant between the two groups ($P>0.05$). In the geographic distribution and gene frequency of EcoRI, there was not statistically significant between the two groups and different TCM constitutions in the observation group ($P>0.05$).

(5) Study on the gene polymorphism of MTHFR C677T locus: ① The frequency of T allele and TT genotype in the observation group was higher than in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); there was not statistically significant between two groups in the frequency of C genotype and CC and CT allele ($P>0.05$). ② The frequency of MTHFR C677T allele in the observation group with phlegm-damp type was higher than the control group, and there was statistically significant ($P<0.05$). The frequency of TT genotype in the observation group with phlegm-damp type was higher than in the control group, and there was statistically significant ($P<0.05$). The frequency of C and T allele in the observation group with phlegm-damp type was higher than in the control group, and there was not statistically significant ($P<0.05$).

Conclusion:

(1) The risk factors of the incidence of NONFH are male gender, age and TCM constitutions of qi deficiency type, phlegm-damp type, and damp and hot type.

(2) The incidence of NONFH was associated with age, BMI, age of menarche, drinking, sunshine time, degree of education and way of working.

(3) Qi deficiency type, phlegm-damp type, damp and hot type, blood stasis type and qi depression type were associated

with the incidence of NONFH. The top three high-risk of TCM constitution type followed by blood stasis type, phlegm damp type and blood stasis type.

(4) There was a correlation between 2488C>T site of ApoB gene and phlegm-damp type in the three TCM constitutions generated NONFH.

(5) The polymorphism of the MTHFR C677T was associated with the incidence of NONFH.

(6) The high frequency of T allele and TT genotype in the MTHFR C677 site were associated with NONFH of blood stasis constitution. There was no close correlation between NONFH of phlegm damp constitution and the polymorphism of the MTHFR C677T.

Keywords: Non-traumatic osteonecrosis of the femoral head; TCM Constitution; Gene polymorphism; ApoB and MTHFR genes

综 述

药物代谢酶类与激素性股骨头坏死基因多态性研究进展

摘要:流行病学调查证实糖皮质激素(Glucocorticoids, GCs)使用已成为引起我国非创伤性股骨头坏死(Nontraumatic Osteonecrosis of Femoral Head, NONFH)的主要危险因素。自1957年Pietuogrande^[1]首次报道使用皮质类固醇药物可引起(Osteonecrosis of Femoral Head, ONFH),国内外对ONFH进行了大量的研究,但其发病机制仍未阐明。大量研究表明,激素性股骨头坏死(Steroid-induced Osteonecrosis of the Femoral Head, SONFH)可能是多重遗传学因素与环境因素相互作用的结果,众多病理过程都参与ONFH的发生。本文通过对药物代谢酶类与SONFH基因多态性进行综述,为SONFH易感人群筛查、早期诊断和早期干预治疗提供理论依据,以期将来相关基因多态性应用于临床,提高用药的安全性。

关键词:糖皮质激素;股骨头坏死;药物代谢酶;基因多态性;综述

1 糖皮质激素作用机制

糖皮质激素^[2]是肾上腺皮质分泌的一类具有重要生理功能的甾体激素,具有调节细胞生长、发育、自身稳定和细胞死亡的作用,以维持机体组织细胞的平衡及其功能,是细胞凋亡的诱导因素^[3]。其作用机制可能为经典基因转录作用和快速的非基因转录作用。Asano等^[4]通过大量临床病例研究认为影响类固醇激素代谢的基因可能决定SONFH发生的易感性。

1.1 经典基因转录作用^[5]

GCs是脂溶性物质,可自由或经转运蛋白协助通过组织的细胞膜,与细胞内GCs受体(Glucocorticoid receptor, GR)结合形成配体受体复合物,致GR构象改变,与其分子伴侣蛋白(如HSP90、HSP70等)解离以暴露核定位序列,进行核转位和二聚体化,与靶基因启动子附近的特异序列GCs反应元件(glucocorticoid responsive element, GRE)或负性GCs反应元件(negative GRE, nGRE)相结合,以调节基因的转录,抑制或增强基因的表达,在核内调节转录而影响蛋白质的产生。由此推测,GCs基因转录调节作用介导引起SONFH可能与基因表观遗传学改变、基因突变、核苷酸

序列多态性、糖皮质激素反应元件的自身调节等有关。

1.2 非基因转录作用^[6-9]

GCs快速的非基因转录作用通过三种途径激活多种细胞信号转导通路发挥“非基因组效应”。即①非特异性非基因组作用,与细胞膜产生物理和/或化学的相互作用;②膜结合的GR介导的非基因组作用;③胞浆糖皮质激素受体介导的非基因组作用。其三种机制之间在某些水平上可能存在一定的交互调节作用。

2 GR及其基因多态性

GCs诱导细胞凋亡主要是通过GR实现,GR与GRE的特异性结合可能促使GCs诱导骨细胞凋亡,GR作为GCs致凋亡作用的介导者,其在体内发挥着各种作用。Van Rossum等^[10]发现,GR基因的ER22/23EK多态性与GR对糖皮质激素的抵抗有关。推测GR基因的多态性可能会影响GCs的敏感性,进而影响细胞的代谢。此外,GR是多个转录因子的共激活剂,在GCs的生物学效应中发挥重要的共因子的作用。Tamura K等^[11]对肾移植术后病人出现SONFH患者GR基因(JST006606、JST032069)研究,未发现二者具有明确的相关性。

3 药物代谢酶类相关基因多态性

3.1 细胞色素 P450

细胞色素 P450^[12](Cytochrome-P450, CYP450) 又称混合功能氧化酶和单加氧酶, 是微粒体混合功能氧化酶系中最重要的一族氧化酶, 主要存在于成人的肝脏中, 参与许多内源性和外源性物质的生物转化过程。在细胞中主要分布在内质网和线粒体内膜上, 作为一种末端加氧酶, 催化氧化生物体内内源物质如甾类化合物及外源物质如药物的代谢等作用, 其与脂溶性药物 GCs 的代谢过程密切相关。因其酶蛋白中所含血红素与一氧化碳 (CO) 的结合体 P450-CO 在 450nm 处有特征性强吸收峰而得名。其命名是通过以家族表示氨基酸的同源性、亚家族表示酶的同源性和同工酶划分, 依次以数字、字母、数字表示。其同源性超过 40% 的视为同一家族的基因成员; 同源性超过 55% 以上, 为同一亚族成员; 同源性大于 80%, 归为等位基因; 而大于 97% 的则认为是等位基因的变异体, 以末尾加 v 表示。涉及药物代谢的 CYP 主要为 CYP1、CYP2、CYP3、CYP4 四个家族的亚型。研究表明 CYP 的基因多态性可以导致个体差异明显的表型多态性, 即强代谢型 (extensive metabolisers, EM) 及弱代谢者型 (poor metabolisers, PM)。这种基因多态性可引起酶蛋白活性的变化, 并对物质的代谢产生不同影响, 进而可能对某些疾病的发生发展产生影响。

CYP450 基因多态性是药物代谢存在个体差异的主要原因。目前已证实 CYP3A4、CYP2D6、CYP2C19 等与 GCs 代谢过程密切相关。Asano 等^[13]对肾移植患者内发生 SONFH 患者的 CYP 亚型基因多态性进行研究, 发现其具有相关性, 但未发现与 SONFH 高度相关的单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 位点。CYP3 家族中亚型 CYP3A4 在合成类激素的代谢中起主要作用, GCs 可以作用于核受体 PXR, 进而诱导 CYP3A4 转录。Kaneshiro 等^[14, 15]研究指出, CYP3A 酶的低活性是 SANFH 的一个致病危险因素, 致使 SONFH 发生的危险性增加 9 倍以上。Tokuhara Y 等^[16]通过动物实验研究发现 CYP3A 活性与 SONFH 发生率呈负相关。CYP3A 的酶活性低时应用小剂量激素也可能引起 SANFH。Masada T 等^[17]通过实验动物对

CYP3A 的酶活性进行造模, 予以相同剂量的 GCs 处理因素, 通过 3 周实验, 依据 SANFH 发病率, 可得出 CYP3A 高酶活性是 SANFH 的保护性因素, 不仅降低 SANFH 的发生率, 而且减小了骨坏死的范围。CYP 是一个超家族, 其众多亚族基因多态性可能与药物代谢关系密切, 因此 CYP 与 SANFH 的相关性还有待进一步的研究。

3.2 多重耐药基因 ABCB1

多重耐药基因 ABCB1^[18] (multidrugresistance gene, MDR ABCB1) 是编码药物转运蛋白 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的编码基因。P-gp 是一种依赖 ATP 酶的跨膜转运蛋白, 将药物外排作用的泵功能, 将进入细胞内的碳水化合物、药物和色素等泵出细胞外, 从而阻止其在细胞内聚积发挥细胞毒作用, 而 GCs 在体内也通过 P-gp 进行转运。Hoffmeyer 首次报道了 ABCB1 基因多态性和 P-gp 表达相关^[19]。MDR ABCB1 基因多态性可能会导致 GCs 在细胞内外分布、药物代谢动力学以及代谢产物的改变^[20]。Fujioka M 等发现 ABCB1 3435C/T 多态性与 SONFH 患者有关^[21]。Asano 等^[4]对肾移植后无 ONFH 和 ONFH 病例在应用他克莫司抑制机体免疫系统时研究 ABCB1 基因多态性, 发现 ABCB1 T3435T 基因型和 T2677A 基因型患者 SONFH 发病率较低, 这两种基因型对 SONFH 有保护性作用, 并且两种多态性处于连锁不平衡状态; 推测 3435TT 基因型通过增强 P-gp 泵活性增强, 阻止类固醇激素在骨细胞中的聚集, 从而降低 SONFH 发病率。

3.3 环磷腺苷反应元件结合蛋白

环磷腺苷反应元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CBP) 是真核细胞内重要的转录辅激活因子, 具有高度保守的序列, 能够与 300 多种转录因子相结合, 被认为是哺乳动物基因转录调控中的关键位点, 通过与 GR 结合在 GCs 的生物学效应中发挥重要的共因子的作用^[22]。Tamura K 等^[11]对肾移植术后病人的 CBP 基因 (JST103922) 单核苷酸多态性研究, 发现 ONFH 患者 CBP 基因 A/G 等位基因出现率比未发生 ONFH 患者 CBP 基因 A/G 等位基因出现率明显高, 有统计学相关性。但是 JST103922 并不在编码区, 其多态性不会引起核苷酸序列的改变。因此, 对 CBP 基因多态性与 SONFH 的发生机理需要进一步的研究。

4 讨论

通过对GCs的作用机制及药物代谢酶类(CYP、MDR ABCB1、CBP)与SONFH基因多态性进行相关阐述总结,SONFH患者与药物代谢相关酶基因多态性具有相关性,SONFH发病机制可能与GCs的毒性作用及遗传易感性相关。根据SONFH患者在使用GCs治疗剂量、时间窗(0.5-2年)、用法、用药途径等,GCs基因转录调节作用介导引

起SONFH可能与基因表观遗传学改变、基因突变、核苷酸序列多态性、糖皮质激素反应元件的自身调节等有关;通过GCs非基因转录作用,推测SONFH的发病可能由于GCs对骨内各细胞具有直接或者间接的损害作用。而药物代谢酶类与GCs代谢密切相关,科研中需进一步发现与SONFH患者高度相关的SNP位点,为临床使用GCs治疗基础疾病提供用药依据和安全保障。

- 参考文献
- [1] Pietrogrande V. and Mastromarino R. Osteopatia daprolongato trattamento cortisone[J]. Ortop. Traumatol, 1997, 25: 791.
 - [2] Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, etc. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists[J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 275(1): 71-78.
 - [3] Canalis E, Delany AM. Mechanisms of glucocorticoid action in bone[J]. Ann NY Acad Sci, 2002, 966(1): 73-81.
 - [4] Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, etc. ABCB1 C3435 TandG2677T/A polymorphism decreased the risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after kidney transplantation[J]. Pharmacogenetics, 2003, 13(11): 675-682.
 - [5] Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, etc. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists[J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 275: 71-78.
 - [6] Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(1): 46-56.
 - [7] Koukouritaki SB, theodoropoulos PA, Margiours AN, et al. Dexamethasone alters rapidly action polymerization dynamics inhuman endometrial cells: evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover [J]. J Cell Biochem, 1996, 62(2): 251-261.
 - [8] Lowenberg M, tuyenman J, bilderbeek J, etc. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through I κ B and fyn [J]. Blood, 2005, 106(5): 1703-1710.
 - [9] Kotitschke A, Sadie-Van Gijzen H, Avenant C, etc. Genomic and nongenomic cross talk between the gonadotropin-releasing hormone receptor and glucocorticoid receptor signaling pathways [J]. Mol Endocrinol, 2009, 23(11): 1726-1745.
 - [10] Van Rossum EF, Roks PH, De Jong FH, etc. Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms [J]. Clin Endocrinol(Oxf), 2004, 61(5): 573-581.
 - [11] Tamura K, Nakajima S, Hirota Y. Genetic association of a polymorphism of the cAMP-Responsive element binding Protein-binding protein with steroid-induced osteonecrosis after kidney transplantation[J]. Bone Miner Metab, 2007, 25(5): 320-325.
 - [12] J. A. Hasler, R. Estabrook, M. Murray, etc. Human cytochromes P450[J]. Molecular Aspects of Medicine, 1999(20): 1-137.
 - [13] Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, etc. Genetic analysis of steroid induced osteonecrosis of the femoral head[J]. J Orthop Sci, 2003, 8(3): 329-333.
 - [14] Kaneshiro Y, Oda Y, Iwakiri K, etc. Low hepatic cytochrome P450 3A activity is a risk for corticosteroid-induced osteonecrosis[J]. Clin Pharmacol Ther, 2006, 80(4): 396-402.
 - [15] Kaneshiro Y, Takaoka K. Hepatic CYP3A activity in association with development of osteonecrosis of the femoral head [J]. Clin Calcium, 2007, 17(6): 902-909.
 - [16] Tokuhara Y, Wakitani S, Oda Y, etc. Low levels of steroid-metabolizing hepatic enzyme (cytochrome P450 3A) activity elevate responsiveness to steroids and may increase risk of steroid-induced osteonecrosis even with low glucocorticoid dose [J]. J Orthop SCI, 2009, 14(6): 794-800.
 - [17] Masada T, Iwakiri K, Oda Y, etc. Increased hepatic cytochrome P4503A activity decreases the risk of developing steroid-induced osteonecrosis in a rabbit model [J]. J Orthop Res, 2008, 26(1): 91-95.
 - [18] Song PF, Shen L, Meibohm B, etc. Detection of MDR1 single nucleotide polymorphisms C3435T and G2677T using real-time polymerase chain reaction: MDR1 single nucleotide polymorphism genotyping assay [J]. AAPS Pharm Sci, 2002, 4(4): article 29.
 - [19] Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, etc. Functional Polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97: 3473-3478.
 - [20] Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. MDR1 genotype related pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(11): 1391-1400.
 - [21] Fujioka M, Arai Y, Kuribayashi M. Genetic analysis for Prevention of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Clin Calcium, 2007, 17(6): 894-900.
 - [22] Bosscher K, Berghe WV, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappa B or activator protein: molecular mechanisms for gene repression [J]. Endocrine Rev, 2003, 24: 488-522.

前 言

股骨头坏死属中医“骨蚀”、“骨痹”、“血瘀”等范畴,是世界范围内难治性常见骨关节疾病。对其病因发病机制的研究及防治对策,一直是骨科的研究热点之一。近年来关于 NONFH 的研究进展显示,影响骨坏死因素较多,其产生的分子机制尚不清楚,对其治疗至今仍然有一定的盲目性和经验性,尚无一种理想方法能治愈塌陷前期不同分期分型的 ONFH。故寻求安全、有效、无创的 ONFH 预防和治疗方法一直是骨科研究的重要课题,药物治疗成为当前防治 ONFH 的研究热点。目前,中医药通过整体法则防治股骨头坏死显示出了一定的优势^[1]。但是,由于各医家对 NONFH 病因病机的认识侧重不同,且尚未见对 ONFH 中医体质临床流行病学的系统研究文献报道,从而一定程度上阻碍了该病的中医药防治进展,进一步影响了中医药结合中医体质“治未病”理论优势的发挥和学术交流^[2]。今后利用祖国传统医学优势“因人制宜”的原则,利用现代科学的各种手段,对该病的病因病理进行更加深入的探索,确立较为统一及客观的防治标准,有可能在 ONFH 的防治上取得更大进展^[3-5]。

中医体质学是以中医理论为指导,研究人类各种体质的生理、病理特点,并分析疾病的反应状态指导预防、治疗和养生康复的一门学科^[6],其主导对个体体质状态的辨析,是辨体预防疾病学术思想的优势所在。中医体质是机体自身强弱及其与疾病斗争过程中所表现的稳定的个体特征,其不仅关系着疾病的发生、发展和转归,而且影响着临床疗效,因而中医体质学说在生理病理与临床诊治及预防各环节方面值得深入探讨^[6]。对此王琦^[7]教授提出“体质可分”、“体病相关”和“体质可调”中医体质三论。中华中医药学会发布了我国第一部指导和规范中医体质研究及应用的技术性文件《中医体质分类与判定》标准^[8]。本标准适用于中医体质的分类、判定及体质辨识治未病的临床研究。

中医体质学重视遗传与环境等影响体质的相关因素在疾病过程中的作用,对揭示中医病因有

独特的优势。

随着中医现代化的发展,从分子水平阐释中医体质与股骨头坏死的相关性,应用中医“治未病”理论探讨预防、治疗的方法,为走出防治 NONFH 的困境提供了新思路、新方法。

目前现代医学对 NONFH 相关基因多态性的研究主要有以下三方面:

在凝血异常相关基因方面,研究发现^[9]高凝血状态是 ONFH 的一个致病因素,对此我们前期相关实验研究也表明血管内凝血可能诱发骨内纤维蛋白血栓形成和骨髓内出血而导致骨坏死,血管内凝血可能是骨坏死发生的一个共同机理^[10]。目前,该方面研究主要集中在与血栓形成密切相关的基因亚甲基四氢叶酸还原酶基因(methylene tetrahydrofolate reductase gene, MTHFR gene)、因子 V 基因和凝血酶原基因等^[11]。MTHFR gene 的编码产物是同型半胱氨酸,高同型半胱氨酸血症是血栓形成的独立危险因素。相关研究^[12,13]表明 ONFH 患者容易发生 MTHFR 基因突变,且在自发性和继发性 ONFH 中无明显差异,因此,在 ONFH 发病机制中 MTHFR 基因多态性值得深入研究。使用多重 PCR 限制性片段长度为每个多态性基因分型,叶酸还原酶 A1298C 基因型不与坏死有关,但 C677T 比 677CC 基因变异基因型叶酸还原酶增加了坏死的风险^[14,15]。此外,数据表明,亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性在朝鲜人民骨坏死的发病中有重要作用,它还意味着不同种族的人口坏死的遗传风险状况可能有所不同^[16]。

在脂类代谢异常相关基因方面,脂代谢紊乱学说是股骨头坏死的重要学说之一,长期大剂量使用 GCs 引起体内高脂血症,脂肪分解,血中游离脂肪酸增多,从而使血管内皮损伤,胶原暴露,激活内源性凝血途径,使纤维蛋白血小板血栓形成^[10]。载脂蛋白 A(Apolipoprotein-A, Apo A)和载脂蛋白 B(Apolipoprotein-B, Apo B)作为脂类代谢的重要蛋白,其基因多态性和 ONFH 的相关性成为目前研究的热点^[17]。ApoA₁ 是 HDL 的主要组成蛋白,ApoA₁ 基因结构的改变影响着其分子结构、

生成和向血液中释放的速率,进而影响血中ApoA₁与HDL的水平。ApoA₁启动了75bp位点可能不直接影响ApoA₁基因的转录,而和邻近的某个基因存在连锁不平衡,后者才是引起ApoA₁转录速度变化的直接原因^[20,21]。ApoB主要是与胆固醇结合组成LDL和识别LDL受体,在脂类转运和代谢过程中起着重要作用,ApoB基因具有明显的多态性,目前研究较多的是XbaI、EcoRI酶切位点多态性和3'端可变数目串联重复序列(3'-VNTR)^[18,19]。

在肝酶相关基因方面,对于NONFH,在同样的致病因素作用下,即相同用量的激素或酒精,有些人会诱发坏死,有些人则不,说明个体对于激素等致病因素的敏感性是不同的。细胞色素P450(cytochromeP450,CYP450)是人体内主要的药物代谢酶,存在于肝脏中,几乎参与所有的脂溶性药物代谢过程。CYP450的基因多态性是药物代谢速率存在明显个体差异的主要原因^[22]。CYP450有50多个亚型,其中亚型CYP3A4在合成类激素的代谢中起主要作用,CYP3A4由激素转录诱导,通过位于细胞核上的孕烷X受体(pregnanex receptor,PXR)中介激素的作用^[23-25]。Kaneshiro等^[26]研究发现P450 3A的低活性是NONFH的一个致病因素,并报道药物代谢酶P450的其他亚型如CYP2D6和CYP2C19也与激素代谢有关。目前,中国人群中CYP450的基因多态性与NONFH的相关性有待进一步研究。

综上所述,MTHFR、ApoA₁、ApoB和CYP450

基因多态性与股骨头坏死的发生和发展密切相关,但是目前,中国人群中尚未开展从上述基因多态性方面进行NONFH与中医体质的相关性研究,故从该方面进一步探索中医体质与NONFH的关系,必将有利于揭示NONFH的发病原因,深刻认识NONFH的本质,实施个体化辨体诊疗、贯彻“因人制宜”思想的具体实践。

本研究是国家自然科学基金面上项目“非创伤性股骨头坏死中医体质类型及其相关基因多态性研究”(批准号:81072821)的子课题。通过随机抽样观察股骨头坏死患者有关资料,运用循证和流行病学的理论方法,进行中医体质分型,测定患者关节功能,分析9种体质在NONFH中的分布,引入现代数理统计方法进行相关性研究,以探求9种体质与NONFH发病的相关性,进而探讨体质差异与NONFH患者功能的关系,从分子水平基因多态性方面揭示体质特点对病情发生发展产生的影响,为NONFH的临床中医药调体预防和治疗提供理论基础。本研究有助于医疗工作者重视体质因素在疾病发生与发展中的重要作用,以NONFH的中医体质相关性,分析及认识不同体质人群在NONFH中的发病特点,为中医辨体诊疗模式寻找客观依据,为中医防治NONFH提供新的理论依据、思路和治疗靶点,进一步加大中医药结合中医体质“治未病”理论优势的发挥,并将为中医骨伤事业的发展带来一定的社会效益和经济效益,促进中医药在国际社会的普遍理解与接受。

第一部分 临床研究

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 病例的收集

病例来源:2011年1月至2013年1月甘肃省中医院门诊、住院部确诊为NONFH的179例患者。

1.1.2 对照组资料收集

随机选取非血缘关系健康志愿者309例(样本含量根据多元统计分析样本含量估计原则估算)。

1.2 诊断及纳入标准

1.2.1 西医诊断标准

参考2006年中华医学会骨科学分会关节外科学组提出的股骨头坏死诊断与治疗专家建议^[27]。

1.2.1.1 主要诊断标准:

(1)症状、体征和病史:髋关节疼痛,以腹股沟、臀部、大腿为主,髋关节旋转活动受限,有明确的酗酒史。

(2)X线改变:股骨头塌陷并伴关节间隙变窄;股骨头内有分界的硬化带;软骨下骨有透X线