

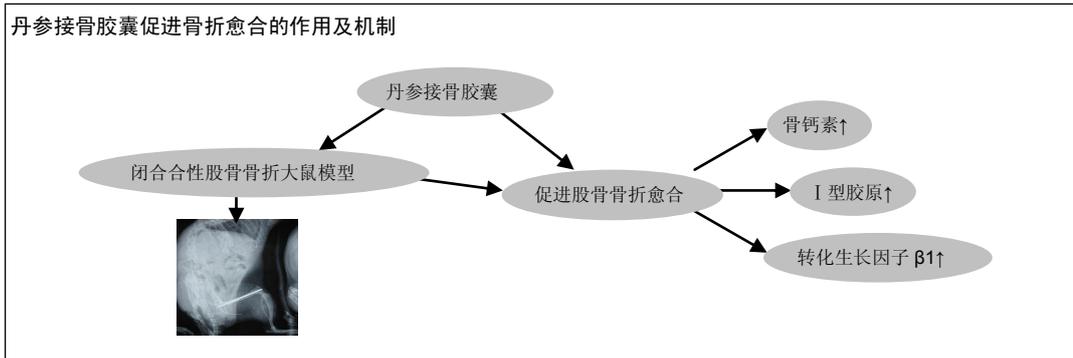
丹参接骨胶囊对闭合性股骨骨折模型大鼠骨折愈合的影响

王希强¹, 孙仁光¹, 孙仕润¹, 孙军¹, 王咏梅¹, 刘太建¹, 杜辉君¹, 潘峰²(¹青岛市即墨市中医医院骨科, 山东省青岛市 266200; ²中国医科大学第四医院骨科, 辽宁省沈阳市 110000)

引用本文: 王希强, 孙仁光, 孙仕润, 孙军, 王咏梅, 刘太建, 杜辉君, 潘峰. 丹参接骨胶囊对闭合性股骨骨折模型大鼠骨折愈合的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(5):622-627.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.05.003 ORCID: 0000-0003-0974-6397(王希强)

文章快速阅读:



王希强, 男, 1973年生, 山东省即墨市人, 1985年泰山医学院毕业, 副主任医师, 主要从事骨伤科方向。

通讯作者: 王希强, 青岛市即墨市中医医院骨科, 山东省青岛市 266200

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)05-0622-06

稿件接受: 2015-12-30

http://www.crter.org

文题释义:

骨折愈合: 是指骨折断端间的组织修复反应, 这种反应表现为愈合反应, 最终是恢复骨的正常结构与正常功能。骨折愈合是一个极其复杂的生物学过程, 受诸多因素的影响, 最新流行病学调查数据显示约有 10%的骨折因各种原因导致骨折愈合延缓甚至无法愈合。

闭合性骨折: 闭合性骨折常伴有软组织损伤。软组织对钝器伤的反应包括微血管反应和炎症性过程, 可分为炎症期, 增殖期和修复期。闭合性骨折的软组织损伤常采用 Tscherne 分类法, 该分类法可被分为 C0, C I, C II, CIII共 4 个等级。

摘要

背景: 丹参接骨胶囊是因有显著活血化瘀、消肿止痛的功效而成为治疗骨折的常用中药制剂之一。

目的: 观察丹参接骨胶囊对闭合性股骨模型大鼠骨折愈合的影响。

方法: 将大鼠随机分为丹参接骨胶囊组、生理盐水组及正常组, 丹参接骨胶囊组和生理盐水组制备闭合性股骨骨折模型大鼠, 骨折后分别给予生理盐水、丹参接骨胶囊 2 粒灌胃; 正常组正常饲养。观察骨折后 7, 14, 28 d 丹参接骨胶囊组及生理盐水组苏木精-伊红染色情况、血清骨钙素、I 型胶原的表达、骨痂转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白/mRNA 的表达。

结果与结论: ①苏木精-伊红染色显示, 骨折后 7 d, 丹参接骨胶囊组、生理盐水组骨折组织病理变化无显著差异, 骨折后 14, 28 d 丹参接骨胶囊组股骨骨折病理修复较生理盐水组明显。②骨折后 3, 7 d 丹参接骨胶囊组、生理盐水组大鼠血清骨钙素、I 型胶原的表达均明显升高($P < 0.05$), 两组表达趋势一致, 其中丹参接骨胶囊表达量始终较生理盐水组高, 且骨折后 14, 28 d 表达量差异有显著性意义($P < 0.01$)。③骨痂转化生长因子 $\beta 1$ 表达在丹参接骨胶囊组、生理盐水组骨折后第 3 天出现 1 个峰值, 随后浓度逐渐下降, 直至骨折后第 14 天丹参接骨胶囊组、生理盐水组转化生长因子 $\beta 1$ 表达又再度升高, 出现第 2 个峰值, 至骨折后第 28 天丹参接骨胶囊组、生理盐水组转化生长因子 $\beta 1$ 表达浓度再次出现下降。此过程丹参接骨胶囊组、生理盐水组转化生长因子 $\beta 1$ 表达趋势一致, 在 7, 14, 28 d 愈合时期, 丹参接骨胶囊组大鼠转化生长因子 $\beta 1$ 表达均高于生理盐水组。④结果证实, 丹参接骨胶囊能够促进骨折的愈合, 其机制可能与促进血清骨钙素、I 型胶原及转化生长因子 $\beta 1$ 的表达有关。

关键词:

实验动物: 骨软骨损伤与修复动物模型; **丹参接骨胶囊;** 骨折愈合; **骨钙素;** I 型胶原; **转化生长因子 $\beta 1$;** 苏木精-伊红染色; **SD 大鼠;** 闭合性股骨骨折; **ELISA;** RT-PCR; 辽宁省自然科学基金

主题词:

组织工程; 骨折; 愈合; 股骨; 模型, 动物

基金资助:

辽宁省自然科学基金(2013021023)

Wang Xi-qiang¹, Sun Ren-guang¹, Sun Shi-run¹, Sun Jun¹, Wang Yong-mei¹, Liu Tai-jian¹, Du Hui-jun¹, Pan Feng² (¹Department of Orthopedics, Chinese Medicine Hospital of Jimo City, Qingdao 266200, Shandong Province, China; ²Department of Orthopedics, Fourth Hospital of China Medical University, Shenyang 110000, Liaoning Province, China)

Wang Xi-qiang, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Chinese Medicine Hospital of Jimo City, Qingdao 266200, Shandong Province, China

Corresponding author: Wang Xi-qiang, Department of Orthopedics, Chinese Medicine Hospital of Jimo City, Qingdao 266200, Shandong Province, China

Subject headings: Tissue Engineering; Fractures, Bone; Healing; Femur; Models, Animal
Funding: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 2013021023

Effects of salvia miltiorrhiza bone-setting capsule on fracture healing in a rat model of closed femoral fractures

Abstract

BACKGROUND: Salvia miltiorrhiza bone-setting capsule is a traditional Chinese medicine for the treatment of fractures due to activating blood circulation to dissipate blood stasis, reducing swelling and pain.

OBJECTIVE: To observe the effects of Salvia miltiorrhiza bone-setting capsule on the fracture healing in a rat model of closed femoral fractures.

METHODS: Rats were randomly divided into salvia miltiorrhiza bone-setting capsule group, physiological saline group and normal group. In the salvia miltiorrhiza bone-setting capsule group and physiological saline group, rat models of closed femoral fractures were prepared, and then given physiological saline and salvia miltiorrhiza bone-setting capsule 2 pills by intragastric administration. In the normal group, rats were housed normally. At 7, 14 and 28 days after fractures, hematoxylin-eosin staining conditions, serum osteocalcin, the expression of collagen type I, and the expression of protein and mRNA callus transforming growth factor-beta 1 were observed in the salvia miltiorrhiza bone-setting capsule group and physiological saline group.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Hematoxylin-eosin staining demonstrated that at 7 days after fractures, no significant difference was found in pathological changes of femoral fracture in salvia miltiorrhiza bone-setting capsule group and physiological saline group. At 14 and 28 days after fractures, pathological repair was more obvious in the salvia miltiorrhiza bone-setting capsule group than in the physiological saline group. (2) At 3 and 7 days after fractures, serum osteocalcin and the expression of type I collagen were significantly increased in the salvia miltiorrhiza bone-setting capsule group and physiological saline group ($P < 0.05$), and the expression trend was consistent in both groups. The expression was always higher in the salvia miltiorrhiza bone-setting capsule group than in the physiological saline group, and significant differences were found at 14 and 28 days after fractures ($P < 0.01$). (3) Transforming growth factor beta 1 expression reached a peak at 3 days after fractures, gradually reduced, increased at 14 days (the second peak), and diminished at 28 days in the salvia miltiorrhiza bone-setting capsule group and physiological saline group. The expression trend of transforming growth factor beta 1 was consistent in the salvia miltiorrhiza bone-setting capsule group and physiological saline group. At 7, 14 and 28 days, the transforming growth factor beta 1 expression was higher in the salvia miltiorrhiza bone-setting capsule group than in the physiological saline group. (4) Results showed that salvia miltiorrhiza bone-setting capsule could promote fracture healing, and its mechanism was probably associated with serum osteocalcin, the expression of collagen type I and transforming growth factor- β 1.

Cite this article: Wang XQ, Sun RG, Sun SR, Sun J, Wang YM, Liu TJ, Du HJ, Pan F. Effects of salvia miltiorrhiza bone-setting capsule on fracture healing in a rat model of closed femoral fractures. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(5):622-627.

0 引言 Introduction

骨愈合过程是一个高度复杂且有序的生物学修复过程, 血液循环状态、生物化学及生物物理因子的调控以及人体微量因子的水平均可影响骨折愈合过程^[1-2]。最新流行病学调查数据显示约有10%的骨折因各种原因导致骨折愈合延缓甚至无法愈合, 因此如何促进骨折愈合、缩短骨折愈合时间的研究愈加受到重视^[3-5]。研究骨折愈合的机制和促进骨折愈合的方法, 建立理想的骨折模型是必要的。通过模型观察更能了解骨折愈合的机制, 为临床上骨折愈合有更深入的了解, 为临床治疗提供更可靠的基础信息。

骨伤病首载于《黄帝内经》, 书中认为“血不活而骨不能接”、“活血化瘀”是治疗骨折的用药原则。丹参接骨胶囊是本院临床沿用多年的验方, 具有显著的活血化瘀、消肿止痛的功效而成为治疗骨折的常用中药制剂。本院尝试制备大鼠实验性骨折模型, 对SD大鼠进行造模, 通过内固定克氏针建立股骨骨折模型, 与大型动物相比, 大鼠有纯种和性好, 应用广泛等特点^[6], 建立SD大鼠骨折模型, 能更好的模拟人类骨折愈合情况, 同时可以用合理的时间、工作和成本得到更有价值的信息。且此大鼠模型稳定, 重复性好, 并通过苏木精-伊红染色、酶联免疫吸附实验

(ELISA)以及反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)探讨接骨丹胶囊促进骨折愈合的作用机制, 旨在为中西医治疗骨折提供新思路及理论实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 造模动物及材料 雄性SD大鼠70只, 由中国上海SLAC实验动物有限责任公司提供, 合格证号: SCXK(沪)2007-0005。于实验动物中心适应性喂养1周后, 体质量达(280±30) g进行实验。食物和水在整个实验过程中均由实验动物自由索取。实验经动物管理制度和使用委员会批准而进行, 实验过程中动物的处理均严格按照国际道德准则和国家健康指南关于维护和使用实验动物相关条例进行。

1.2 汤药的制备 丹参接骨胶囊组方^[7]: 主要成分为丹参30 g, 续断15 g, 骨碎补15 g, 土元9 g, 炒胡瓜子10 g, 自然铜10 g。由即墨市中医医院制剂室协作制备, 按照人与大鼠体表面积换算(人体表面积用许文生氏公式法: 体表面积(m²)=0.006 1×身高(cm)+0.012 8×体质量(kg)-0.152 9; 大鼠体表面积用Meeh-Rubner氏公式: A(体表面积m²)=9.1/10 000×W^{2/3}(体质量g))加工成1 mL汤药含生药1 g, 无菌封瓶, 4℃冰箱保存备用。

1.3 股骨骨折模型大鼠的构建 以30 g/L戊巴比妥钠按40 mg/kg腹腔注射麻醉。将大鼠局部脱毛, 碘伏消毒。在左股骨髁间窝处, 垂直穿入 ϕ 1.0 mm克氏针达髓腔, 稍扩大入针点, 改变方向插入髓腔, 拔出克氏针, 徒手折骨, 在股骨中段以一拇指为支点, 用较缓和的力量折骨, 当感觉到骨折时, 停止用力, 避免骨折移位, 克氏针从原穿针点进针, 穿针到骨折远端, 把克氏针体外部分用钢丝剪剪断, 针尾埋于皮下, 局部消毒后归笼。X射线显示骨折后大鼠左股骨骨折, 对位良好, 髓内针固定到位, 确认造模成功(图1)。

1.4 造模成功的检测标准 造模大鼠一般麻醉后10 min后清醒, 双下肢站立不受影响, 在饲料笼内活动、取食自如^[8]; 局部肿胀一两天即明显消退, 无红肿、渗出等现象发生, 无皮肤裂伤、克氏针松动等情况, 全身总体状况好。通过X射线观察, 骨折类型为横断或短斜型, 并且无明显移位^[9], 即为模型成功。

1.5 分组与干预 在70只大鼠中选6只设为正常对照组进行正常饲养。剩余64大鼠建模, 建模成功和最终纳入结果分析的大鼠共48只, 随机分为2组: ①丹参接骨胶囊组24只: 造模当天麻醉苏醒起灌服丹参接骨胶囊(即墨市中医医院配制, 国药准字鲁药制字Z02080234, 成分: 丹参100 g、川断150 g、骨碎补150 g、土元100 g、自然铜100 g和炒甜瓜子100 g), 日2次灌胃; 丹参接骨胶囊组灌胃药量依体质量以60 kg成人10倍剂量计算。②生理盐水组24只: 造模当天接受等量生理盐水灌胃。丹参接骨胶囊组和生理盐水组分别连续灌胃3, 7, 14, 28 d, 每个时间点6只。

1.6 苏木精-伊红染色 尖刀切取骨折端1.0-1.5 cm组织块, 置于40 g/L多聚甲醛溶液中, 4 °C固定48 h; 使用乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙剂, 经过1个月完成脱钙; 骨组织经过脱钙处理后, 梯度乙醇脱水, 流水蓝化, 脱水、分色、透明、树胶封固。随后置于倒置显微镜下观察。

1.7 ELISA检测血清骨钙素、I型胶原及骨痂转化生长因子 β 1蛋白的表达 将各组大鼠收集的腹主动脉血在4 °C条件下进行3 000 \times g离心5 min后, 使用高压枪头吸取离心后的上清液, 于-20 °C冰箱中保存备用。尖刀切取冷冻骨痂, 于精密天平上称取50 mg, 预冷Hanks液做裂解液, 于陶瓷研钵中滴加500 μ L Hanks液, 做均匀研磨, 制成质量浓度1 g/mL的混合液, 于-20 °C冰箱中保存备用。使用酶联免疫吸附实验(ELISA)进行检测, 利用抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合原理进行相关因子浓度的检测, 具体步骤如下: 用0.05 mol/L pH 9.6碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释至蛋白质含量为1-10 mg/L。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加0.1 mL, 4 °C过夜。次日, 弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗3次, 每次3 min。加一定稀释的待检样品0.1 mL于上述已包被之反应孔中, 置与37 °C孵育1 h。然后洗涤。同时做空白孔, 阴性对照孔及阳性对照孔。

随后在各反应孔中加入新鲜稀释的酶标抗体(经滴定后的稀释度) 0.1 mL。37 °C孵育0.5-1.0 h, 洗涤。再于各反应孔中加入临时配制的TMB底物溶液0.1 mL, 37 °C 10-30 min。于各反应孔中加入2 mol/L硫酸0.05 mL。试剂盒由广州达安基因股份有限公司提供, 显色后采用紫外线492 nm波长, TMB反应产物检测需要450 nm波长。检测时一定要首先进行空白孔系统调零, 用测定标本孔的吸收值与一组阴性标本测定孔平均值的比值(P/N)表示。以空白对照孔调零后测各孔吸光度值, 若大于规定的阴性对照吸光度值的2.1倍, 即为阳性。操作过程全部按照试剂盒说明书进行检测。

1.8 RT-PCR检测各组骨痂转化生长因子 β 1 mRNA表达 按照RN Mast20说明书分别提大鼠取总RNA, 总RNA中的mRNA经反转录合成cDNA, 置于-80 °C冻存。反应在50 μ L体系中进行, 反应条件: 93 °C预变性2 min; 93 °C 45 s, 55 °C 1 min。

基因名称	序列
转化生长因子 β 1	上游: 5'- ATC ACC TAC CTT TCC TTG GGA GAC C -3' 下游: 5'-TAG TGG ATG GAA AGG AAC CCT CTG G-3'
β -actin	上游: 5'- CAT CCT GCG TCT GGA CCT GG -3' 下游: 5'- TGG AAG GTG GAC AGT GAG GC -3'

VEGF扩增循环数为40。每个样本取2 mL总RNA, 取固定量的PCR产物进行1.2%琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像仪进行扫描, 得出条带吸光度。用目的基因条带吸光度与标本条带吸光度的比值代表PRC扩增产物的相对含量, 比较各组转化生长因子 β 1 mRNA的表达情况。

1.9 主要观察指标 日常观察大鼠局部肿胀、皮肤裂伤、感染、畸形和克氏针松动等情况, 全身总体状况, 定期测量体质量; 并作相关记录。各组血清骨钙素、I型胶原的表达, 骨痂转化生长因子 β 1蛋白/mRNA的表达。

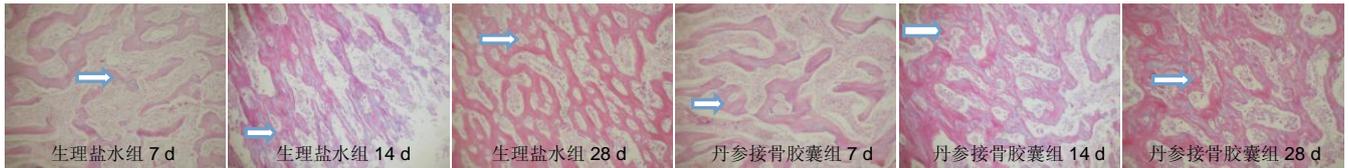
不良反应评估标准: 针尾处不适感^[10], 发生退针现象。出现感染, 局部及周围关节疼痛, 关节不正常, 活动剧烈时周围关节酸痛不适^[11]。

1.10 统计学分析 各组数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 17.0软件进行数据分析, 组间数据差异的比较采用单因素方差分析法, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 造模成功动物数量及过程 纳入70只SD大鼠。造模成功者60只。3只术后畸形愈合, 无死亡感染大鼠, 因实验分组设计需要, 3只大鼠予以剔除。最终计入结果分析数量为54只。

2.2 模型稳定性 构建SD大鼠闭合性的骨折模型, 此法具有手术简便, 对骨折周围软组织破坏小, 影响骨折愈合的夹杂因素少等优点^[12]。同时, SD大鼠建造的骨折模型, 骨折模型重复性好, 外在因素对骨折的影响小, 制作简便, 符合标准骨折模型的要求, 此方法简单、方便、快捷。

图2 各组大鼠股骨骨折处组织学变化(苏木精-伊红染色, $\times 100$)Figure 2 Histological changes at the site of femoral fractures in rats of each group (hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

图注: 图中可以看到同一时间苏木精-伊红染色发现丹参接骨胶囊组比生理盐水组成骨细胞数量多, 同时丹参接骨胶囊组 7, 14, 28 d 对比发现, 随着给药时间的延长, 成骨细胞数量增多, 骨折愈合情况较好。图中箭头所指为成骨细胞。

表1 各组大鼠体重变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, g)

Table 1 Body weight changes in rats of each group

时间	丹参接骨胶囊组	生理盐水组	正常组
造模前	265.9 \pm 16.25	268.22 \pm 19.28	267.02 \pm 5.95
造模后 3 d	271.42 \pm 6.07	271.58 \pm 5.07	272.59 \pm 7.02
造模后 7 d	298.96 \pm 10.14	296.83 \pm 8.04	308.25 \pm 8.50
造模后 14 d	324.76 \pm 7.02	327.15 \pm 6.84	337.96 \pm 4.86
造模后 28 d	338.65 \pm 7.66	338.78 \pm 6.72	362.07 \pm 4.12

表注: 各组大鼠的体重变化差异无显著性意义($P > 0.05$)。表2 大鼠骨折区组织质量变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, g)

Table 2 Tissue weight changes in the fracture area in rats

时间	丹参接骨胶囊组	生理盐水组
骨折后 3 d	0.120 4 \pm 0.012 5	0.109 6 \pm 0.011 6
骨折后 7 d	0.221 6 \pm 0.007 3	0.205 1 \pm 0.008 4
骨折后 14 d	0.433 3 \pm 0.014 7	0.432 5 \pm 0.005 1
骨折后 28 d	0.277 6 \pm 0.011 0	0.264 4 \pm 0.014 8

表注: 同一时间点相比较, 丹参接骨胶囊组、生理盐水组对大鼠骨折区的组织质量变化差异无显著性意义($P > 0.05$)。表3 各组大鼠血清 I 型胶原及骨钙素表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Serum type I collagen and osteocalcin expression in rats of each group

时间	I 型胶原($\mu\text{g/L}$)		骨钙素(U/mL)	
	丹参接骨胶囊组	生理盐水组	丹参接骨胶囊组	生理盐水组
正常值	3.35 \pm 0.14	3.35 \pm 0.14	2.75 \pm 0.11	2.75 \pm 0.11
骨折后 3 d	8.02 \pm 0.61	5.26 \pm 0.48	6.12 \pm 0.48	5.59 \pm 0.47
骨折后 7 d	14.28 \pm 0.48 ^{ab}	8.16 \pm 0.43 ^b	13.57 \pm 0.58 ^{ab}	11.40 \pm 0.65 ^b
骨折后 14 d	12.81 \pm 1.21 ^{ab}	7.42 \pm 1.27 ^b	19.64 \pm 0.78 ^{ab}	15.83 \pm 0.84 ^b
骨折后 28 d	30.14 \pm 1.24 ^{ab}	19.62 \pm 1.10 ^b	24.47 \pm 1.60 ^{ab}	21.58 \pm 2.08 ^b

表注: 与生理盐水组比较, ^a $P < 0.05$; 与正常值比较, ^b $P < 0.05$ 。表4 骨痂中转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白及基因水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, ng/L)

Table 4 Transforming growth factor beta 1 protein and mRNA mass concentration in callus

时间	转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白		转化生长因子 $\beta 1$ mRNA	
	丹参接骨胶囊组	生理盐水组	丹参接骨胶囊组	生理盐水组
骨折后 3 d	35.99 \pm 1.20 ^a	31.07 \pm 0.80	0.48 \pm 0.16 ^a	0.29 \pm 0.88
骨折后 7 d	32.11 \pm 0.79 ^a	28.15 \pm 0.53	0.34 \pm 0.02 ^a	0.25 \pm 0.03
骨折后 14 d	43.45 \pm 0.85 ^a	37.52 \pm 0.65	0.85 \pm 0.06 ^a	0.52 \pm 0.02
骨折后 28 d	37.75 \pm 1.12 ^a	32.92 \pm 0.82	0.49 \pm 0.02 ^a	0.38 \pm 0.02

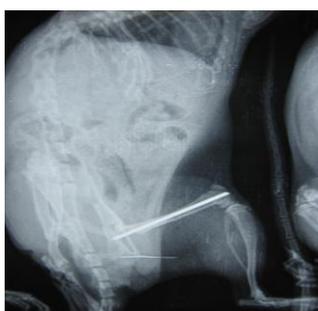
表注: 与生理盐水组比较, ^a $P < 0.05$ 。

图1 股骨骨折模型大鼠造模后 X 射线情况

Figure 1 X-ray film of a rat model of femoral fractures after modeling

图注: X 射线照射下, 明显可见克氏针已插入股骨处, 且出现骨折情况, 并无移位现象, 显示模型建造成功。

根据研究发现, 小型哺乳啮齿动物如大鼠的骨折愈合过程, 与人类骨折愈合过程相似, 建立SD大鼠骨折模型, 能更好的模拟人类骨折愈合情况^[6]。建立大鼠闭合性股骨骨折模型, 能降低实验对大鼠损伤机体干扰, 且外环境对骨折愈合影响因素少, 术后动物恢复快, 能排除开放性骨折建模中可能影响骨折愈合的因素, 模型稳定, 更加准确地反应实验中骨折愈合情况, 更有利于进行科学研究。

2.3 造模后一般形态观察和骨折模型的鉴定 造模大鼠一般麻醉后 10 min 后清醒, 双下肢站立不受影响, 在饲料

笼内活动、取食自如; 局部肿胀一两天即明显消退, 无红肿、渗出等现象发生, 无皮肤裂伤、克氏针松动等情况, 全身总体状况好; 畸形愈合 3 只。

2.4 大鼠体质量变化 同一时间点丹参接骨胶囊组、生理盐水组、正常组 SD 大鼠体质量比较, 组间差异无显著性意义, 见表 1。

2.5 大鼠骨折区组织质量的变化 取骨折端上下各 0.5 cm 及折端骨痂称质量, 观察骨痂生长情况。随着时间的推移, 骨痂质量逐渐增大, 到 14 d 时达到最大, 此时多为软骨痂。随后骨的生长逐渐进入改造和塑形期, 骨痂的质量变小, 趋于稳定。同一时间点比较, 各组间差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表 2。

2.6 大鼠骨折愈合情况及组织学变化 苏木精-伊红染色结果显示, 骨折后 7 d 时, 出现骨痂, 主要由未成熟和成熟的软骨细胞组成, 而骨折处皮质骨附近的软骨细胞明显肥大, 局部还出现少量新生骨小梁, 其周围可见成骨细胞。丹参接骨胶囊组较生理盐水组骨膜反应较明显。骨痂在 14 d 时达到最大, 内部肥大软骨细胞被成骨细胞取代, 镜下丹参

接骨胶囊组可见少量新生的编织骨, 生理盐水组主要为发育较成熟的软骨细胞。骨折后28 d时丹参接骨胶囊组新生编织骨明显增多, 骨小梁变粗大, 形成骨髓腔, 可见较成熟的骨组织, 内外骨痂开始变薄。生理盐水组骨小梁数目相对较少, 其间夹杂少量软骨细胞(图2)。

2.7 各组大鼠血清骨钙素和 I 型胶原的表达 大鼠血清 I 型胶原骨折后3, 7 d时表达逐渐增强($P < 0.05$), 14 d时表达减弱($P < 0.05$), 达到低谷(高于正常值), 然后表达又增强, 两组的表达趋势一致。而丹参接骨胶囊组表达量始终较生理盐水组高($P < 0.05$)。具体见表3。

大鼠血清骨钙素骨折后3, 7 d时表达逐渐增强, 骨折后28 d达到高峰($P < 0.05$), 两组的表达趋势一致。而丹参接骨胶囊组表达量始终较生理盐水组高, 14 d差异最显著($P < 0.05$)。具体见表3。

2.8 大鼠骨痂中转化生长因子 $\beta 1$ 的表达 转化生长因子 $\beta 1$ 在骨折愈合的不同阶段基因表达的水平不同, 其表达在骨折后第3天出现一个峰值, 随后逐渐下降, 直至骨折后第14天转化生长因子 $\beta 1$ 又再度升高, 出现第2个峰值, 至骨折后第28天转化生长因子 $\beta 1$ 水平再次出现下降。此过程两组大鼠两组转化生长因子 $\beta 1$ 的表达趋势一致, 在不同愈合时期, 丹参接骨胶囊组大鼠转化生长因子 $\beta 1$ 表达均高于生理盐水组($P < 0.05$), 具体见表4。

2.9 不良反应评估 实验中大鼠未出现退针现象, 也未出现术后感染, 局部及周围关节也无炎症反应, 无疼痛感, 大鼠不良反应状况良好。

3 讨论 Discussion

自春秋战国时期已有对骨折治疗的文献记载, 认为淤血阻滞是骨折的主要病机之一, 古代诸医家均从“血”论治, 因此便有了“折伤专主血论”、“瘀不去则骨不能接”及“瘀去新骨生”等^[13]说法。现代研究发现骨折后局部组织乃至全身血液均处于高凝状态, 并且骨组织损伤后机体产生的应激反应导致微循环障碍, 从而降低了血氧浓度, 影响了血液动力学, 上述这些病理变化均与血瘀有关, 所以实验认为如果改善骨折后机体“淤血”状态, 则可达到改善骨组织灌注, 从而实现愈合骨折的目的。整复、外固定、练功及内外用药这4种疗法被广泛运用于骨折的治疗, 它们的内容随着现代医学的不断进步而不断更新, 其中内外用药已然成为临床及科研的研究重点。丹参接骨胶囊主要成分是丹参、续断、土元、炒甜瓜子、自然铜和骨碎补。方中重用丹参^[14], 可活血化瘀、除旧生新、在方中行君药之职; 补碎骨^[15]、续断及杜仲均是补肝益肾之良药^[16-18], 共奏接骨续筋之功, 土元破血散瘀, 接筋续骨, 同时可以调血脉, 3者同为臣药; 自然铜可接骨续筋^[19], 炒甜瓜子化瘀止痛, 两者合用为佐药。整方共奏活血化瘀, 接骨续筋之功, 可促进骨折受损组织处淤血吸收, 从而为骨折的生长提供良好的环境。从中医角度认为肝肾与骨组织的生长

愈合关系密切, 肝主筋, 肾主骨生髓, 调节肝肾可以增加精血对骨折组织的濡养, 而丹参接骨胶囊整方正式具备了补益肝肾的功效, 从而使骨化生有源, 筋脉得以滋养, 促进断损筋骨修复。现代药理检测发现骨碎补具有促进蛋白多糖合成的效应, 而蛋白多糖是促进钙化的主要因子, 起通过加速钙磷沉积促进骨的生长发育^[20]; 二氧化硫是自然铜的主要成分可加速骨痂形成及增强骨的抗撕力; 有研究人员通过透射电镜发现土元提取物可以促进组织血管新生, 促进骨周围组织的血供, 促进肉芽组织的生长^[21]。实验利用苏木精-伊红染色对骨折组织的形态学进行观察后发现骨折7 d后两组大鼠的骨折组织均出现骨痂, 随着治疗的延长, 使用丹参接骨胶囊组的大鼠新生骨的数量及骨膜反应均较生理盐水组改善明显, 这就证实了丹参接骨胶囊的确具有接骨连筋通络的作用。近年来利用现代分子生物学技术探讨中医药治疗机制已成为热点话题^[22-27], 实验利用影像学、病理切片、ELISA以及RT-PCR技术检测丹参接骨胶囊对血清骨钙素、I型胶原以及骨痂中转化生长因子 $\beta 1$ 的影响, 结果实验发现丹参接骨胶囊可以促进骨折大鼠外周血清骨钙素、I型胶原的分泌, 血清骨钙素是一种由成骨细胞合成和分泌的非胶原蛋白, 其在调控软骨矿化发挥重要作用, 随着血清骨钙素浓度的上调, 说明大鼠体内成骨细胞矿化能力增强, 促进了胶原的钙化, 有利于骨折组织骨量的增加, 同时I型胶原表达的增加可发挥诱导成骨细胞增殖分化, 从而促进成骨细胞骨形成, 有利于骨折组织的修复。有关实验讨论如下:

3.1 实验结果 SD大鼠接受左股骨中段闭合骨折髓内克氏针固定模型后, 中药丹参接骨胶囊喂养后, 可以明显改变局部转化生长因子 $\beta 1$ mRNA、蛋白的表达水平。转化生长因子 $\beta 1$ 是一种在人类骨骼和血小板中含量丰富的多肽, 属于转化生长因子 β 家族重要的异构体之一, 拥有多种生理功能, 不但可以抑制破骨细胞的增殖, 还可以调节成骨细胞的生长周期, 通过对I型胶原的诱导作用, 促进骨折创伤组织的愈合^[28-31]。同时转化生长因子 $\beta 1$ 可以趋化多种炎症因子, 加速成纤维细胞的增殖, 为受损组织提供修复基础。在研究中实验发现两组骨折模型大鼠在骨折发生后体内转化生长因子 $\beta 1$ mRNA、蛋白的表达水平在骨折不同愈合阶段表达量不同, 在骨折后3 d大鼠体内转化生长因子 $\beta 1$ 的表达出现一个峰值, 实验认为这可能与骨折发生后机体应激反应导致血小板出现脱颗粒现象, 从而释放并激活了转化生长因子 $\beta 1$, 随后大量的转化生长因子 $\beta 1$ 各个促进骨折修复环节, 被大量消耗, 且此时处于膜内成骨阶段, 因此在骨折第7天转化生长因子 $\beta 1$ 浓度表达出现一个低谷, 直至骨折后第14天, 即到了软骨形成及软骨内成骨阶段时转化生长因子 $\beta 1$ 表达量逐渐增加, 再次达到峰值, 此时成骨细胞逐渐分化为软骨细胞, 活性成骨细胞反向调节转化生长因子 $\beta 1$ 的表达, 再协同其他因子促进骨基质的重建, 促进骨折修复。在骨折的修复的不同阶段, 接受丹

参接骨胶囊治疗的大鼠体内的转化生长因子 $\beta 1$ 表达量均高于生理盐水组, 其不但可以促进骨折形态学的修复而且可以促进转化生长因子 $\beta 1$ 的表达, 实验认为丹参接骨胶囊可通过上调内源性生物因子的表达, 增强其活性, 延长其半衰期而达到促进骨折愈合的目的。虽然实验结果显示与骨折愈合相关因子如骨钙素、I型胶原和转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白/mRNA表达有显示出对骨折愈合有积极作用的变化, 但是医学手段建立的动物模型可能因为各种因素始终不能完全代表人类的骨折疾病情况, 这就在对这类骨折疾病的认知上有一定的局限性, 因此需要更多的研究来探索骨折愈合的机制, 来加深临床对骨折的认识。

3.2 模型评价 实验的股骨骨折模型, 是根据国际上经典的骨折造模模型方法进行建立的, 得到比较经典常用的闭合性骨折模型, 对实验的成功开展有着深刻的影响。另外, 此模型利用SD大鼠进行建模, 能更很好的模拟临床人类骨折愈合症状, 更接近人类疾病模式, 有转化医学意义, 对医学治疗骨折类疾病的影响是很远的; 同时, 利用克氏针内固定的方式, 对大鼠股骨进行手术来得到闭合性股骨骨折模型, 在原来的复杂的造模方法基础上有了进一步的改善, 使造模方法更简便, 造模材料更易获得, 模型也表现得很稳定。

作者贡献: 王希强负责实验设计和资料收集。其他作者共同参与实验的实施。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 张志平, 白晓春, 张忠民, 等. 髓内针固定小鼠闭合性股骨骨折模型的建立[J]. 解剖学报, 2012, 4(1): 135-138.
- [2] 陈昱, 陈宗雄, 徐皓, 等. 骨折愈合机制的现代研究[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(5): 9951-9956.
- [3] 李稻主编. 医学功能学科实验原理与方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008, 3: 34.
- [4] 谢幸财, 王和鸣. 中医药促进骨折愈合的实验研究进展[J]. 中医正骨, 2010, 22(12): 38-40.
- [5] 周正新, 刘安平, 王峰, 等. 接骨续筋胶囊促进骨折愈合作用的实验研究[J]. 中医药临床杂志, 2008, 20(2): 124-126.
- [6] 赵震宇, 邵林, 刘建宇, 等. 外固定方法制作的大鼠股骨骨折模型[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(24): 4387-4389.
- [7] 王希强, 孙仁光, 孙仕润, 等. 丹参接骨胶囊对骨折SD大鼠TGF $\beta 1$ mRNA及蛋白表达的影响[J]. 中医临床研究, 2014, 6(9): 95-97.
- [8] 张连方, 齐进, 王晋申. 小鼠闭合性股骨骨折模型的建立与评估[J]. 中国矫形外科杂志, 2010, 18(2): 143-146.
- [9] 周晓中, 董启榕, 张健东. 大鼠股骨闭合骨折模型的制作[J]. 东南大学学报(医学版), 2007, 26(1): 60-62.
- [10] 李万庆. 不同内固定方式治疗锁骨骨折的临床疗效分析[J]. 吉林医学, 2013, 34(8): 1451-1452.
- [11] 陆廷永, 罗时友, 周元爱. 克氏针内固定治疗锁骨骨折疗效观察[J]. 临床骨科杂志, 2008, 11(4): 328.
- [12] 余昶, 董启榕, 周晓中. 两种大鼠股骨骨折模型愈合的比较[J]. 苏州大学学报(医学版), 2008, 28(1): 4-6.
- [13] 祁晓华, 沈梅红, 黄晔. 针刺促进家兔骨折愈合与折伤专主血论关系初探[J]. 南京中医药大学学报, 1999, 15(3): 162-163.
- [14] 方芳, 王平珍. 丹参促进骨折愈合的研究进展[J]. 河南中医, 2015, 35(2): 311-312.
- [15] 钱茜. 骨碎补化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(5): 186-188.
- [16] 卿茂盛, 陈小砖, 邹志鹏. 续断对大鼠骨质疏松性骨折愈合影响的生物力学实验研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2002, 19(3): 159-160.
- [17] 程志安, 吴燕峰, 黄智清等. 续断对成骨细胞增殖、分化、凋亡和细胞周期的影响[J]. 中医正骨, 2004, 16(12): 1-3.
- [18] 葛文杰, 张贤, 蔡建平. 杜仲对去势雌性骨质疏松大鼠骨代谢、骨生物力学的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2009, 33(5): 417-419.
- [19] 赵根华, 翁泽斌, 高倩倩, 等. 自然铜炮制前后促进骨折愈合作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(4): 481-485.
- [20] 宋渊, 李盛华, 何志军. 骨碎补含药血清对成骨细胞增殖、成骨的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 3(2): 45-47.
- [21] 许小志, 徐志强, 方耀忠, 等. 骨九方促进骨折愈合临床研究[J]. 新中医, 2010, 42(11): 52-54.
- [22] 徐建平, 郭文荣. 骨折愈合影响因素及中医药治疗的研究进展[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2010, 7(6): 35-37.
- [23] 王力, 郑甦, 杨风云, 等. 壮筋续骨汤对大鼠成骨细胞ALP比活性、BGP含量和Cbf I基因表达影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2008, 16(12): 24-26.
- [24] 王力, 郑甦, 杨风云, 等. 壮筋续骨汤促进大鼠胫骨骨折愈合: RT-PCR法检测核心结合子 $\alpha 1$ 基因表达的验证[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(20): 3678-3681.
- [25] Kwong FN, Hoyland JA, Fremont AJ, et al. Altered relative expression of BMPs and BMP inhibitors in cartilaginous areas of human fractures progressing towards nonunion. Orthop Res. 2009; 27(6): 752-757.
- [26] 王祥杰, 潘月兴, 杜志仙, 等. 壮筋续骨汤对大鼠骨折骨痂中骨形态发生蛋白7和神经肽Y表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(8): 2420-2422.
- [27] 李红专. 生骨再造散对家兔骨折愈合影响的实验研究[J]. 中国骨伤, 2005(5): 272-274.
- [28] 徐攀峰, 邵金祥, 张维康. 成纤维细胞生长因子2和转化生长因子 $\beta 1$ 在四肢骨折愈合过程中表达调控的研究[J]. 中国基层医药, 2013, 20(23): 3555.
- [29] 宋昭君, 倪卫东, 高仕长. 丹参注射液对骨折愈合过程中BMP-7、TGF- $\beta 1$ 及bFGF表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(3): 223.
- [30] 熊辉, 桃红四物汤干预骨痂血管新生及VEGF表达的实验研究[J]. 中国医师杂志, 2014, 6(2): 195-197.
- [31] Yu PB, Beppu H, Kawai N, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. J Biol Chem. 2005; 280: 24443-24450.