

中药接骨方对骨折愈合过程中 骨粘连蛋白信使核糖核酸表达的调控

张媛¹, 何延辉², 王炳南³, 古展群³

(1. 河南省洛阳正骨医院, 河南 洛阳 471002; 2. 广东省深圳市横岗人民医院,
广东 深圳 503800; 3. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要 目的:研究中药接骨方在骨折愈合过程中对骨粘连蛋白信使核糖核酸表达的影响,探讨中药接骨方促进骨折愈合的作用机制。**方法:**将 40 只 2 月龄清洁级雌性 SD 大鼠制成右股骨中段骨折模型,并行髓内固定。造模成功后将 40 只大鼠分为治疗组和对照组,每组 20 只。自造模后第 1 天开始,治疗组以接骨方药液按 $10.4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量灌胃,对照组以等体积生理盐水灌胃。造模后第 14 天和第 28 天分别从 2 组各取 10 只大鼠处死,取出骨痂组织。将每个标本的骨痂组织按需要分成 2 份,1 份迅速冰冻切片进行原位杂交处理,测定骨粘连蛋白信使核糖核酸表达情况;另 1 份制成石蜡切片,染色后观察切片中成骨细胞、破骨细胞、成软骨细胞的情况。**结果:**①细胞学观察。造模后第 14 天,治疗组和对照组均可见较多骨痂形成。治疗组骨痂组织中有大量新生骨小梁和软骨组织,并连接成片,其间成骨细胞、成软骨细胞较为活跃,有少量破骨细胞;对照组纤维组织增生活跃,有大量成骨细胞形成,并见有一定的软骨组织。治疗组成骨细胞及破骨细胞数量多于对照组($t=6.520, P=0.000; t=3.670, P=0.002$),但成软骨细胞数量少于对照组($t=12.490, P=0.000$)。造模后第 28 天,治疗组骨痂组织中骨小梁数量较多,粗细均匀,排列方向一致,相互连接,折光性强。可见由成骨细胞转化而成并被钙化骨基质包埋的骨细胞,细胞形态正常,有骨小管与基质相连。大量排列较为整齐的成骨细胞和骨细胞出现,破骨细胞数量较少。对照组骨痂中骨小梁排列紊乱,折光强弱不一,并可见小吸收腔,骨折处可见较多纤维细胞、成软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞。治疗组成骨细胞、成软骨细胞及破骨细胞数量均少于对照组($t=6.640, P=0.000; t=9.940, P=0.000; t=8.330, P=0.000$)。②骨粘连蛋白信使核糖核酸表达情况。造模后第 14 天,治疗组大鼠骨痂骨粘连蛋白信使核糖核酸的表达水平高于对照组($t=6.700, P=0.000$);造模后第 28 天,2 组大鼠骨痂组织骨粘连蛋白信使核糖核酸表达水平比较,差异无统计学意义($t=1.830, P=0.084$)。治疗组造模后第 28 天骨粘连蛋白信使核糖核酸的表达水平低于造模后第 14 天($t=4.330, P=0.000$);对照组造模后第 28 天骨粘连蛋白信使核糖核酸的表达水平高于造模后第 14 天($t=4.770, P=0.000$)。**结论:**中药接骨方通过提高骨粘连蛋白信使核糖核酸的表达水平,使软骨修复提早进入骨化及塑形期,从而加速骨折愈合。

关键词 骨折愈合 骨结合素 接骨方 基因表达调控 RNA, 信使 动物实验

Regulation of mRNA expression by traditional Chinese medicine JIEGU DECOCTION during fracture healing

ZHANG Yuan*, HE Yan-hui, WANG Bing-nan, GU Zhan-qun. * Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital, Luoyang 471002, Henan, China

ABSTRACT Objective: To study on the effect of traditional Chinese medicine(TCM) JIEGU DECOCTION on the expression of osteonectin(ON)mRNA during fracture healing, and to explore the mechanism of action of TCM JIEGU DECOCTION in promoting fracture healing.

Methods: Forty clean femal SD rats of 2 months old were built models of right mid-femur fractures with intramedullary fixation. After successful molding, 40 rats were divided into treatment group and control group, 20 cases in each group. Since the first day from molding, rats in the treatment group were intragastric administrated with JIEGU DECOCTION($10.4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), while the others in the control group were intragastric administrated with equal volume of normal saline. On the 14th day and 28th day after molding, 10 rats selected from each group were executed, and their bony callus tissues were fetched out. Bony callus tissue of each specimen was divided into 2 parts. One part was made into frozen section and processed with in-situ hybridization, then ON mRNA expression was evaluated, while another part was made into paraffin section, and the morphology and amount of osteoblast, osteoclast and chondroblast in the paraffin sections were observed after staining. **Results:** On the 14th day after molding, massive bony callus tissues were found in treatment group and control group. In the bony callus tissue of treatment group, there were a large amount of new bone trabecula and cartilaginous tissue that connected into pieces, among which the osteoblast and chondroblast were active relatively while only a few number of osteoclasts were found. In the control group, the proliferation of fibrous tissue was active, and massive osteoblasts and a certain number of cartilaginous tissues were found. The amount of osteo-

blast and osteoclast in the treatment group was larger than that of control group ($t = 6.520, P = 0.000; t = 3.670, P = 0.002$), but the amount of chondroblast in the treatment group was smaller than that of control group ($t = 12.490, P = 0.000$). On the 28th day after molding, a large amount of bone trabeculas were found in the bony callus tissue in treatment group, and they were uniform in thickness and arranged in consistent direction and interconnected with strong light refraction. It was shown that osteocytes transformed from osteoblasts were embedded by calcified bone matrix, the shape of cells were normal, and there were connections between bone canalicules and matrix. Massive osteoblasts and osteocytes appeared and arranged in regular order, while a few amount of osteoclasts were shown. In the control group, bone trabeculas in the bony callus were in a disordered arrangement with uniform strength in refraction, and small absorption cavity was found. Massive fibroblasts, chondroblast, osteoblast and osteoclast were found in the broken ends of fractured bone. The amount of osteoblast, chondroblast and osteoclast in the treatment group were all smaller than those of control group ($t = 6.640, P = 0.000; t = 9.940, P = 0.000; t = 8.330, P = 0.000$). On the 14th day after molding, ON mRNA expression level in bony callus tissue of rats in the treatment group was higher than that of control group ($t = 6.700, P = 0.000$). On the 28th day after molding, there was no statistical difference in ON mRNA expression level in bony callus tissue of rats between the 2 groups ($t = 1.830, P = 0.084$). ON mRNA expression level of treatment group on the 28th day after molding was lower than that on the 14th day after molding ($t = 4.330, P = 0.000$). ON mRNA expression level in control group on the 28th day after molding was higher than that on the 14th day after molding ($t = 4.770, P = 0.000$). **Conclusion:** JIEGU DECOCTION can raise ON mRNA expression level. As a result, cartilage repair can enter into ossification and remodeling period earlier and the fracture healing is promoted.

Key words Fracture healing; Osteonectin; JIEGU DECOCTION; Gene expression regulation; RNA, messenger; Animal experimentation

骨粘连蛋白 (osteonectin, ON) 是骨基质中含量较多的非胶原性基质蛋白, 在启动矿化过程和促使矿物质在胶原成分上沉积中有重要作用^[1]。笔者通过动物实验对接骨方在骨愈合过程中对 ON 信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 表达的影响进行了观察, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 2 月龄清洁级雌性 SD 大鼠 40 只, 体质量 250 g 左右, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: 0009180。

1.2 实验药物 接骨方由当归 20 g、赤芍 20 g、甘草 10 g、土鳖虫 10 g、自然铜 20 g、接骨木 20 g、骨碎补 30 g、续断 20 g、血竭末 5 g 等 11 味中药组成。先将除血竭外的其他药物在 500 mL 冷水中浸泡 30 min, 以武火煮沸后再以文火煎煮 30 min。取汁后再加水 300 mL, 用武火煮沸后再以文火煎煮 30 min 后取汁。最后将 2 次所取药液混合后以文火煎煮至 100 mL, 冷却至室温后, 加入血竭末, 搅匀备用。

1.3 实验仪器 自制骨折产生器; 德国 Leica EM FC7UC7 冷冻超薄切片机; 德国 Sigma 小型台式冷冻离心机; 真空离心干燥器; 上海复日科技有限公司 FR-2000 型计算机图像分析系统。

2 方法

2.1 造模 用 10% 水合氯醛按 $3.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量

量腹腔注射对大鼠进行麻醉^[2]。麻醉起效后大鼠右后肢备皮, 消毒, 铺洞巾。沿着髌骨内侧切口进入关节囊, 缓慢弯曲膝关节, 用手术钳移动髌骨, 在膝关节伸直位将髌骨翻向外侧。用手钻将直径 0.8 mm 克氏针通过髌间插入髓腔, 直到大转子下, 剪断多余部分, 残端埋在膝关节软骨下, 缝合切口。然后将大鼠置于骨折产生器上, 通过调节器使大鼠仰卧, 右后股骨处于外展外旋位。根据大鼠体质量调整骨折产生器产生的冲击力, 在大鼠右后股骨干中段造成横断骨折。造模后肌注青霉素 8 万单位, 每天 1 次, 连续 3 d。

2.2 分组及药物干预 造模成功后将 40 只大鼠随机分为治疗组和对照组, 每组 20 只。按组别分笼饲养, 自由活动及进食。自造模后第 1 天开始, 治疗组以接骨方药液按 $10.4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量灌胃, 对照组以等体积生理盐水灌胃。

2.3 标本制作及效应指标观察 造模后第 14 天和第 28 天分别从 2 组各取 10 只大鼠, 断颈处死后置于 75% 酒精中浸泡消毒。浸泡 15 min 后取出置于无菌手术操作台上, 依次切开皮肤、皮下组织, 分离肌肉, 暴露股骨干 (上至转子下, 下至内外髁水平)。无菌操作下迅速取出骨痂组织并用生理盐水冲洗, 做好分组标记后迅速放入液氮中保存。然后将每个标本的骨痂组织按需要分成 2 份, 1 份迅速冰冻切片进行原位杂交处理, 测定 ON mRNA 表达情况; 另 1 份制成石蜡切片, 染色后观察切片中成骨细胞、破骨细胞、成软骨

细胞的情况。

2.3.1 细胞学观察 采用王炳南等^[3-4]的方法将部分骨痂组织制成石蜡切片,部分切片用 HE 染色后观察成骨细胞和成软骨细胞并计数,部分切片进行甲苯胺蓝染色后观察破骨细胞并计数。

2.3.2 ON mRNA 表达情况 将另一部分骨痂组织冰冻切片后进行原位杂交处理^[4-6]。再将原位杂交的每张切片分为 9 格区,选取每格区中心高倍视野,将光镜下的图像直接输入 IMS 细胞图像自动分析仪,定量测定阳性染色区的平均灰度值。

2.4 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件对所得数据进行统计分析,2 组大鼠骨痂组织中成骨细胞、破骨细胞、成软骨细胞数量及 ON mRNA 表达情况的比较均采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞学观察 造模后第 14 天,治疗组和对照组

均可见较多骨痂形成。治疗组骨痂组织中有大量新生骨小梁和软骨组织,并连接成片,其间成骨细胞、成软骨细胞较为活跃,有少量破骨细胞[图 1(1)];对照组纤维组织增生活跃,有大量成骨细胞形成,并见有一定的软骨组织[图 1(3)]。治疗组成骨细胞及破骨细胞数量多于对照组,但成软骨细胞数量少于对照组(表 1)。造模后第 28 天,治疗组骨痂组织中骨小梁数量较多,粗细均匀,排列方向一致,相互连接,折光性强;可见由成骨细胞转化而成并被钙化骨基质包埋的骨细胞,细胞形态正常,有骨小管与基质相连;大量排列较为整齐的成骨细胞和骨细胞出现,破骨细胞数量较少[图 1(2)]。对照组骨痂中骨小梁排列紊乱,折光强弱不一,并可见小吸收腔,骨折处可见较多纤维细胞、成软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞[图 1(4)]。治疗组成骨细胞、成软骨细胞及破骨细胞数量均少于对照组(表 2)。

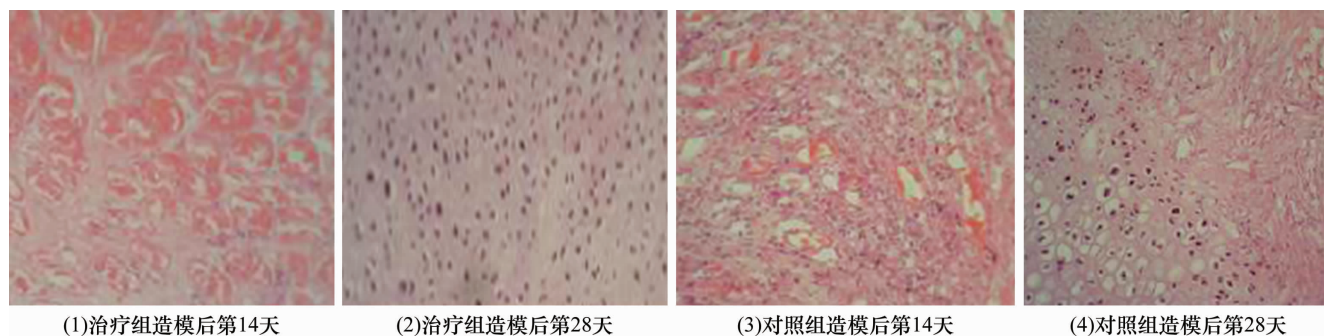


图 1 2 组大鼠骨痂组织细胞学观察(HE 染色 ×20)

表 1 造模后第 14 天 2 组大鼠骨痂组织中成骨细胞、破骨细胞及成软骨细胞数量的比较 个

组别	成骨细胞	破骨细胞	成软骨细胞
治疗组	18.50 ± 2.64	2.60 ± 1.26	8.60 ± 1.71
对照组	12.20 ± 1.55	0.90 ± 0.74	20.90 ± 2.60
<i>t</i> 值	6.520	3.670	12.490
<i>P</i> 值	0.000	0.002	0.000

表 2 造模后第 28 天 2 组大鼠骨痂组织中成骨细胞、破骨细胞及成软骨细胞数量的比较 个

组别	成骨细胞	破骨细胞	成软骨细胞
治疗组	16.50 ± 1.78	2.50 ± 0.71	5.60 ± 1.78
对照组	21.50 ± 1.58	5.40 ± 0.84	13.50 ± 1.78
<i>t</i> 值	6.640	8.330	9.940
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

3.2 ON mRNA 表达情况 造模后第 14 天,治疗组大鼠骨痂 ON mRNA 的表达水平高于对照组;造模后第 28 天,2 组大鼠骨痂组织 ON mRNA 表达水平比较,差异无统计学意义;治疗组造模后第 28 天 ON

mRNA 的表达水平低于造模后第 14 天;对照组造模后第 28 天 ON mRNA 的表达水平高于造模后第 14 天(表 3)。

表 3 2 组大鼠骨痂组织 ON mRNA 表达情况的比较

组别	造模后第 14 天	造模后第 28 天	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
治疗组	105.70 ± 7.53	88.64 ± 9.92	4.330	0.000
对照组	82.62 ± 7.22	94.73 ± 3.49	4.770	0.000
<i>t</i> 值	6.700	1.830		
<i>P</i> 值	0.000	0.084		

4 讨论

ON 是骨基质中含量较多的非胶原性基质蛋白,具有高亲和性和低亲和性钙结合位点^[7],通过它 ON 能将游离的 Ca^{2+} 沉积到 I 型胶原上,启动骨基质矿化过程,并能将矿化晶体吸附于胶原纤维上。骨折愈合要经历骨组织发生、生长、重建及构型等阶段。不同时期的骨痂组织形成都伴随着矿化过程,而 ON mRNA 的表达则贯穿于整个骨痂矿化过程中,在骨化

过程最活跃的时候,ON 的形成也达到高峰,随着骨化的完成,ON mRNA 的表达水平也逐渐降低^[7-9]。Romanowski 等^[10]研究发现,骨折后 4~7 d,骨膜下编织骨中的成骨样细胞内 ON 表达最强,此时 ON 阳性细胞中 I、V 型前胶原也为增强信号,骨钙素表达弱信号,且仅位于硬骨痂的深层;第 10 天,骨膜下 ON 信号消失,其信号再次被检测到是在软骨化骨的前沿处,I、V 型胶原也再次开始表达,但在肥大软骨细胞内没有 ON 表达,而增殖中的软骨细胞都有 ON 的弱表达。ON 在骨膜内和软骨化骨的前沿处表达,提示它可能对早期骨化有作用;ON 在一些软骨细胞中有表达,但是却在软骨基质中不被保留,故而推测其在骨愈合中发挥着细胞功能调节作用而非基质稳定作用。Hirakawa 等^[8]的原位杂交实验显示,术后第 1 天大鼠股骨骨折处增殖的骨膜就有 ON mRNA 的表达,第 3 天出现于编织骨中,第 5 天出现于软骨细胞中,第 7 天出现于成骨细胞中。王立平等^[1]发现新生成的编织骨中成骨细胞及骨细胞的 ON mRNA 表达为强阳性,推测 ON 可能与编织骨的形成有关,并且参与骨基质的钙化。这些研究结果表明,ON 在骨折愈合过程中除可调节骨与软骨形成及矿化外,可能对成骨细胞和软骨细胞的分化、增殖及成熟也有调节作用。

Hirakawa 等^[8]通过对小鼠骨折的研究发现,在骨折 14 d 时骨折处 ON mRNA 的表达水平最高,而在 28 d 时表达水平下降到最低点,反映了骨折愈合过程中骨痂组织 ON mRNA 的动态表达过程,即在骨折愈合的骨化阶段 ON mRNA 的表达水平最高,而在塑形期表达水平下降到最低点。但是本研究中 28 d 时对对照组骨痂中 ON mRNA 的表达水平比 14 d 时高,可能是因为对照组骨痂组织中成骨细胞在 28 d 时大量生成,骨折还没有进入塑形期。本研究的细胞学观察表明,在 2 个不同时间点上治疗组骨痂组织中成骨细胞大量生成出现较早,表明治疗组骨痂组织骨化进程早于对照组。在骨折的愈合过程中,骨痂组织从软骨痂向骨痂转化过程中软骨细胞逐渐减少、成骨细胞逐渐增多,到塑形期时成骨细胞逐渐减少向骨细胞转化。

本研究中治疗组在造模后 28 d 时成骨细胞的数量少,与 ON mRNA 的表达体现了一致性,表明中药接骨方通过提高 ON mRNA 的表达水平,使软骨修复提早进入骨化及塑形期,从而促进骨折修复,加速骨折愈合。

5 参考文献

- [1] 王立平,党耕町. 骨连接素在骨愈合中作用的探讨[J]. 中华骨科杂志,1998,18(8):497-499.
- [2] 吕音,杨玉彬. 绝经后骨质疏松大鼠模型文献回顾及实验初探[J]. 现代医院杂志,2010,10(5):21-22.
- [3] 王炳南,魏玉玲,梁克玉. 接骨方对骨折愈合过程中 I 型胶原 mRNA 表达的影响的实验研究[J]. 湖北中医学院学报,1999,1(2):60-61.
- [4] 刘玮,吕荣,胡蕴玉,等. 皮质骨不脱钙切片法及在免疫组化中的作用[J]. 临床与实验病理学杂志,1988,4(2):112-113.
- [5] 姜泊,张亚历,周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,1996:128-132.
- [6] Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing[J]. J Orthop Res, 1995,13(3):357-367.
- [7] Li R, Li CH, Nauth A, et al. Effect of human vascular endothelial growth factor gene transfer on endogenous vascular endothelial growth factor mRNA expression in a rat fibroblast and osteoblast culture model[J]. J Orthop Trauma, 2010,24(9):547-551.
- [8] Hirakawa K, Hirota S, Ikeda T, et al. Localization of the mRNA for bone matrix proteins during fracture healing as determined by in situ hybridization[J]. J Bone Miner Res, 1994,9(10):1551-1557.
- [9] Caetano-Lopes J, Lopes A, Rodrigues A, et al. Upregulation of inflammatory genes and downregulation of sclerostin gene expression are key elements in the early phase of fragility fracture healing[J]. PLoS One, 2011,6(2):e16947.
- [10] Romanowski R, Jundt G, Termine JD, et al. Immunoelectron microscopy of osteonectin and type I collagen in osteoblasts and bone matrix[J]. Calcif Tissue Int, 1990,46(6):353-360.

(2012-02-22 收稿 2012-06-14 修回)

· 作者须知 ·

论文中“平均年龄”要用“中位数”表示

中位数是指将数据按大小顺序排列起来,形成一个数列,居于数列中间位置的那个数据(或最中间两个数据的平均数)。中位数是样本数据所占频率的等分线,它不受少数几个极端值的影响,用它代表全体数据的一般水平更合适。因此,论文中使用中位数表示年龄的平均水平比使用算术平均数更为合适,计算起来也更为简便。