

· 基础研究 ·

# 接骨续筋丸促进大鼠骨折愈合的作用机制研究

刘震<sup>1</sup>, 于训意<sup>2</sup>, 曹长征<sup>2</sup>, 付伟<sup>1</sup>, 苏纪权<sup>1</sup>, 马贤德<sup>3</sup>, 侯德才<sup>2</sup>

(1. 辽宁省海城市正骨医院, 辽宁 海城 114200;

2. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032;

3. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032)

**摘要 目的:**探讨接骨续筋丸促进大鼠骨折愈合的作用机制。**方法:**将 72 只 3 月龄雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组, 每组 18 只。截断模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组大鼠股骨干中段, 制作股骨开放性骨折模型; 假手术组仅暴露股骨干, 不做截骨。造模后第 2 天开始灌胃, 接骨续筋丸组以  $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的接骨续筋丸混悬液灌胃, 接骨七厘胶囊组以  $0.52 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的接骨七厘胶囊混悬液灌胃, 模型对照组和假手术组给予蒸馏水灌胃; 每天灌胃 1 次, 各组连续灌胃 21 d。分别于药物干预 7 d、14 d、21 d 后取材, 各组随机选取 6 只大鼠从腹主动脉抽血, 经静置、离心后吸取上层血清, 保存待检; 抽血完成后, 取出大鼠左侧股骨干, 制备骨折端股骨石蜡标本。分别采用钙 (calcium, Ca)、磷 (phosphorus, P)、血清碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 试剂盒测定大鼠血清 Ca、P、ALP 含量, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察骨组织形态学变化, 采用免疫组化法检测骨折端骨组织中骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达。**结果:**①药物干预后血清 Ca 含量。药物干预 7 d、14 d、21 d 后, 4 组大鼠血清 Ca 含量比较, 组间差异均无统计学意义 [ $(1.80 \pm 1.03) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.88 \pm 0.80) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.91 \pm 0.68) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.83 \pm 0.62) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $F = 0.023$ ,  $P = 0.995$ ;  $(1.77 \pm 0.89) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.77 \pm 0.73) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.88 \pm 1.18) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.74 \pm 0.89) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $F = 0.025$ ,  $P = 0.095$ ;  $(1.72 \pm 0.98) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.74 \pm 0.61) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.80 \pm 0.90) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.69 \pm 0.79) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $F = 0.019$ ,  $P = 0.996$ ]。②药物干预后血清 P 含量。药物干预 7 d 后, 4 组大鼠血清 P 含量比较, 差异有统计学意义 [ $(1.89 \pm 0.56) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(1.97 \pm 0.53) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(3.23 \pm 0.90) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(4.24 \pm 0.68) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $F = 16.041$ ,  $P = 0.000$ ]; 组间两两比较, 假手术组与模型对照组的差异无统计学意义 ( $P = 0.846$ ), 假手术组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.003$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.005$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P = 0.018$ )。药物干预 14 d 后, 4 组大鼠血清 P 含量比较, 差异有统计学意义 [ $(1.81 \pm 0.48) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(2.65 \pm 0.36) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(3.73 \pm 0.77) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(4.37 \pm 0.93) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $F = 16.998$ ,  $P = 0.000$ ]; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.045$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.012$ ), 接骨七厘胶囊组与接骨续筋丸组的差异无统计学意义 ( $P = 0.116$ )。药物干预 21 d 后, 4 组大鼠血清 P 含量比较, 差异有统计学意义 [ $(1.82 \pm 0.40) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(2.15 \pm 0.50) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(3.35 \pm 0.62) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(4.21 \pm 0.70) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $F = 22.663$ ,  $P = 0.000$ ]; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.036$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.002$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P = 0.016$ )。③药物干预后血清 ALP 含量。药物干预 7 d 后, 4 组大鼠血清 ALP 含量比较, 差异有统计学意义 [ $(49.71 \pm 14.67) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(93.75 \pm 15.11) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(125.00 \pm 22.89) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(145.49 \pm 20.79) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $F = 29.797$ ,  $P = 0.000$ ]; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.001$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.001$ ,  $P = 0.000$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P = 0.009$ )。药物干预 14 d 后, 4 组大鼠血清 ALP 含量比较, 差异有统计学意义 [ $(41.57 \pm 10.69) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(91.13 \pm 10.76) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(111.77 \pm 19.66) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(149.42 \pm 12.71) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $F = 62.354$ ,  $P = 0.000$ ]; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P = 0.019$ )。药物干预 21 d 后, 4 组大鼠血清 ALP 含量比较, 差异有统计学意义 [ $(42.73 \pm 14.94) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(77.33 \pm 15.54) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(95.49 \pm 26.12) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(124.85 \pm 25.34) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $F = 15.847$ ,  $P = 0.000$ ]; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.010$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.026$ ,  $P = 0.001$ ); 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P = 0.015$ )。④药物干预后骨折端骨组织形态。药物干预 7 d 后, 模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组骨

折端骨组织中可见少量成骨细胞聚集;药物干预 14 d 后成骨细胞显著增多,且接骨续筋丸组及接骨七厘胶囊组的成骨细胞数量较模型对照组明显增多;药物干预 21 d 后成骨细胞开始减少;3 组破骨细胞在药物干预 21 d 后出现增长趋势。⑤药物干预后骨折端骨组织中 BMP-2 的表达量。药物干预 7 d 后,4 组大鼠骨折端骨组织中 BMP-2 表达量比较,差异有统计学意义( $0.10 \pm 0.01, 0.14 \pm 0.02, 0.23 \pm 0.03, 0.27 \pm 0.03, F=59.960, P=0.000$ );组间两两比较,假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.018, P=0.000, P=0.000$ ),模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.000, P=0.000$ ),接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组( $P=0.015$ )。药物干预 14 d 后,4 组大鼠骨折端骨组织中 BMP-2 表达量比较,差异有统计学意义( $0.12 \pm 0.02, 0.15 \pm 0.02, 0.24 \pm 0.03, 0.28 \pm 0.03, F=47.588, P=0.000$ );组间两两比较,假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.047, P=0.000, P=0.000$ ),模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.000, P=0.000$ ),接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组( $P=0.006$ )。药物干预 21 d 后,4 组大鼠骨折端骨组织中 BMP-2 表达量比较,差异有统计学意义( $0.11 \pm 0.02, 0.15 \pm 0.02, 0.24 \pm 0.03, 0.28 \pm 0.02, F=80.017, P=0.000$ );组间两两比较,假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.004, P=0.000, P=0.000$ ),模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.000, P=0.000$ ),接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组( $P=0.004$ )。⑥药物干预后骨折端骨组织中 VEGF 的表达量。药物干预 7 d 后,4 组大鼠骨折端骨组织中 VEGF 表达量比较,差异有统计学意义( $0.11 \pm 0.02, 0.14 \pm 0.02, 0.26 \pm 0.01, 0.27 \pm 0.04, F=69.567, P=0.000$ );组间两两比较,假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.015, P=0.000, P=0.000$ ),模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.000, P=0.000$ ),接骨七厘胶囊组与接骨续筋丸组的差异无统计学意义( $P=0.905$ )。药物干预 14 d 后,4 组大鼠骨折端骨组织中 VEGF 表达量比较,差异有统计学意义( $0.11 \pm 0.02, 0.15 \pm 0.02, 0.25 \pm 0.03, 0.28 \pm 0.02, F=72.334, P=0.000$ );组间两两比较,假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.026, P=0.000, P=0.000$ ),模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.000, P=0.000$ ),接骨七厘胶囊组与接骨续筋丸组的差异无统计学意义( $P=0.071$ )。药物干预 21 d 后,4 组大鼠骨折端骨组织中 VEGF 表达量比较,差异有统计学意义( $0.11 \pm 0.02, 0.15 \pm 0.02, 0.24 \pm 0.02, 0.27 \pm 0.05, F=39.739, P=0.000$ );组间两两比较,假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ),模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P=0.000, P=0.000$ ),接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组( $P=0.029$ )。结论:接骨续筋丸促进大鼠骨折愈合的作用机制可能是通过提高大鼠血清 P、ALP 的含量,促进其骨组织中 BMP-2 及 VEGF 的表达,从而促进成骨细胞增殖,但其具体作用机制有待进一步深入研究。

**关键词** 骨折愈合;接骨续筋丸;成骨细胞;破骨细胞;碱性磷酸酶;骨形态发生蛋白 2;血管内皮生长因子类;钙;磷;大鼠;动物实验

## Study on mechanism of action of Jiegu Xujin Wan(接骨续筋丸)in promoting fracture healing in rats

LIU Zhen<sup>1</sup>, YU Xunyi<sup>2</sup>, CAO Changzheng<sup>2</sup>, FU Wei<sup>1</sup>, SU Jiquan<sup>1</sup>, MA Xiande<sup>3</sup>, HOU Decai<sup>2</sup>

1. Haicheng Orthopedic - Traumatological Hospital, Haicheng 114200, Liaoning, China

2. The Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China

3. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the mechanism of action of Jiegu Xujin Wan(接骨续筋丸, JGXJW) in promoting fracture healing in rats. **Methods:** Seventy-two 3-month-old male SD rats were randomly divided into sham-operated group, model group, Jiegu Qili Jiaonang(接骨七厘胶囊, JGQLJN) group and JGXJW group, 18 cases in each group. The middle femoral shafts of rats in model group, JGQLJN group and JGXJW group were cut off to build open femoral fracture models, while the surgeries were performed on the rats in sham-operated group to expose their femoral shafts only. Since the 2nd day after the modeling operation, the rats in JGXJW group, JGQLJN group, model group and sham-operated group were intragastric administrated with JGXJW suspension (3 g/kg), JGQLJN suspension (0.52 g/kg) and distilled water respectively, once a day for 21 consecutive days. At 7, 14 and 21 days after the beginning of drug intervention, 6 rats were randomly selected from each group, and their blood were fetched out from aorta abdominalis. The upper serum was sucked from the blood samples after standing and centrifuging for further inspection. Then the rats were sacrificed and their left femoral shafts were fetched out for making femoral paraffin specimens. The serum contents of calcium (Ca), phosphorus (P) and alkaline phosphatase (ALP) were determined by using Ca, P and ALP assay kit. The morphological changes of bone tissues were observed after hematoxylin-eosin (HE) staining, and the expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in bone tissues of broken ends of fractured bone were detected by immunohistochemical method respectively. **Results:** There was no statistical difference in serum content of Ca

between the 4 groups at 7, 14 and 21 days after the beginning of drug intervention ( $1.80 \pm 1.03, 1.88 \pm 0.80, 1.91 \pm 0.68, 1.83 \pm 0.62$  mmol/L,  $F=0.023, P=0.995; 1.77 \pm 0.89, 1.77 \pm 0.73, 1.88 \pm 1.18, 1.74 \pm 0.89$  mmol/L,  $F=0.025, P=0.095; 1.72 \pm 0.98, 1.74 \pm 0.61, 1.80 \pm 0.90, 1.69 \pm 0.79$  mmol/L,  $F=0.019, P=0.996$ ). At 7 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in serum content of P between the 4 groups ( $1.89 \pm 0.56, 1.97 \pm 0.53, 3.23 \pm 0.90, 4.24 \pm 0.68$  mmol/L,  $F=16.041, P=0.000$ ). Further pairwise comparison showed that there was no statistical difference in the serum content of P between sham-operated group and model group ( $P=0.846$ ), and the serum content of P was lower in sham-operated group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.000, P=0.003$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.000, P=0.005$ ), and was lower in JGQLJN group compared to JGXJW group ( $P=0.018$ ). At 14 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in serum content of P between the 4 groups ( $1.81 \pm 0.48, 2.65 \pm 0.36, 3.73 \pm 0.77, 4.37 \pm 0.93$  mmol/L,  $F=16.998, P=0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the serum content of P was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.045, P=0.000, P=0.000$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.000, P=0.012$ ), and there was no statistical difference in serum content of P between JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.116$ ). At 21 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in serum content of P between the 4 groups ( $1.82 \pm 0.40, 2.15 \pm 0.50, 3.35 \pm 0.62, 4.21 \pm 0.70$  mmol/L,  $F=22.663, P=0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the serum content of P was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.036, P=0.000, P=0.000$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.000, P=0.002$ ), and was lower in JGQLJN group compared to JGXJW group ( $P=0.016$ ). At 7 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in serum content of ALP between the 4 groups ( $49.71 \pm 14.67, 93.75 \pm 15.11, 125.00 \pm 22.89, 145.49 \pm 20.79$  U/L,  $F=29.797, P=0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the serum content of ALP was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.001$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.001, P=0.000$ ), and was lower in JGQLJN group compared to JGXJW group ( $P=0.009$ ). At 14 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in serum content of ALP between the 4 groups ( $41.57 \pm 10.69, 91.13 \pm 10.76, 111.77 \pm 19.66, 149.42 \pm 12.71$  U/L,  $F=62.354, P=0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the serum content of ALP was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.000, P=0.000$ ), and was lower in JGQLJN group compared to JGXJW group ( $P=0.019$ ). At 21 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in serum content of ALP between the 4 groups ( $42.73 \pm 14.94, 77.33 \pm 15.54, 95.49 \pm 26.12, 124.85 \pm 25.34$  U/L,  $F=15.847, P=0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the serum content of ALP was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.010$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.026, P=0.001$ ), and was lower in JGQLJN group compared to JGXJW group ( $P=0.015$ ). At 7 days after the beginning of drug intervention, a small number of osteoblasts can be found in bone tissues of broken ends of fractured bone in model group, JGQLJN group and JGXJW group. At 14 days after the beginning of drug intervention, there was a notable increase in the number of osteoblasts, and the number of osteoblasts were greater in JGXJW group and JGQLJN group compared to model group. At 21 days after the beginning of drug intervention, the number of osteoblasts began to decrease while the number of osteoclasts began to increase. At 7 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in the expression of BMP-2 in bone tissues of broken ends of fractured bone between the 4 groups ( $0.10 \pm 0.01, 0.14 \pm 0.02, 0.23 \pm 0.03, 0.27 \pm 0.03$ ,  $F=59.960, P=0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the expression of BMP-2 in bone tissues was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.018, P=0.000, P=0.000$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.000, P=0.000$ ), and was lower in JGQLJN group compared to JGXJW group ( $P=0.015$ ). At 14 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in the expression of BMP-2 in bone tissues of broken ends of fractured bone between the 4 groups ( $0.12 \pm 0.02, 0.15 \pm 0.02, 0.24 \pm 0.03, 0.28 \pm 0.03$ ,  $F=47.588, P=0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the expression of BMP-2 in bone tissues was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.047, P=0.000, P=0.000$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P=0.000, P=0.000$ ), and was lower in JGQLJN group compared to JGXJW group ( $P=0.006$ ). At 21 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in the expression of BMP-2 in bone tissues of broken ends of fractured bone

between the 4 groups ( $0.11 \pm 0.02, 0.15 \pm 0.02, 0.24 \pm 0.03, 0.28 \pm 0.02, F = 80.017, P = 0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the expression of BMP-2 in bone tissues was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P = 0.004, P = 0.000, P = 0.000$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P = 0.000, P = 0.000$ ), and was lower in JGQLJN group compared to JGXJW group ( $P = 0.004$ ). At 7 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in the expression of VEGF in bone tissues of broken ends of fractured bone between the 4 groups ( $0.11 \pm 0.02, 0.14 \pm 0.02, 0.26 \pm 0.01, 0.27 \pm 0.04, F = 69.567, P = 0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the expression of VEGF in bone tissues was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P = 0.015, P = 0.000, P = 0.000$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P = 0.000, P = 0.000$ ), and there was no statistical difference between JGQLJN group and JGXJW group ( $P = 0.905$ ). At 14 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in the expression of VEGF in bone tissues of broken ends of fractured bone between the 4 groups ( $0.11 \pm 0.02, 0.15 \pm 0.02, 0.25 \pm 0.03, 0.28 \pm 0.02, F = 72.334, P = 0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the expression of VEGF in bone tissues was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P = 0.026, P = 0.000, P = 0.000$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P = 0.000, P = 0.000$ ), and there was no statistical difference between JGQLJN group and JGXJW group ( $P = 0.071$ ). At 21 days after the beginning of drug intervention, there was statistical difference in the expression of VEGF in bone tissues of broken ends of fractured bone between the 4 groups ( $0.11 \pm 0.02, 0.15 \pm 0.02, 0.24 \pm 0.02, 0.27 \pm 0.05, F = 39.739, P = 0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the expression of VEGF in bone tissues was lower in sham-operated group compared to model group, JGQLJN group and JGXJW group ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ), and was lower in model group compared to JGQLJN group and JGXJW group ( $P = 0.000, P = 0.000$ ), and was lower in JGQLJN group compared to JGXJW group ( $P = 0.029$ ). **Conclusion:** JGXJW can increase the serum contents of P and ALP and promote the expression of BMP-2 and VEGF in bone tissues to promote the osteoblast proliferation, which may be the mechanisms of action for promoting fracture healing in rats. However, its specific mechanism of action needs to be further studied.

**Key words** fracture healing; Jiegu Xujin Wan; osteoblasts; osteoclasts; alkaline phosphatase; bone morphogenetic protein2; vascular endothelial growth factors; calcium; phosphorus; rats; animal experimentation

骨折的愈合是一个循序渐进、祛瘀生新的过程,此过程受患者年龄、力学环境、局部血液供应等诸多因素的影响。随着现代医学的发展,治疗骨折的方法更加多样化,但是骨折的畸形愈合、迟缓愈合、甚至不愈合亦屡见不鲜。如何更好地促进骨折的修复,依然是骨科界面临的重要课题之一。中医学认为创伤骨折的治疗过程可分为 3 个阶段,早期以活血化瘀、消肿止痛的方法减少各种伤科肿痛;中期靠调和营卫、接骨续筋药来促进周身和患处血液循环以及新生骨痂再生;晚期采用具有补肝益肾、强筋壮骨、接骨续筋等功效的中药加快骨折的愈合和机体正常活动的恢复。国内学者研究认为,中药在骨折愈合过程中的作用主要为止痛、散瘀、止血生肌、促进血液循环的修复<sup>[1]</sup>;还可提高血中钙、磷的沉积,促进成骨细胞表达,进而促进新骨生成<sup>[2]</sup>;同时还能促进骨折早期血管内皮生长因子表达和成骨细胞增殖<sup>[3]</sup>。骨折早期,采用具有活血化瘀、消肿止痛的中药可以改善骨折局部血液循环,消除肌肉痉挛,避免出现无菌性炎症<sup>[4]</sup>。接骨续筋丸为纯中药制剂,是由海城市正骨医院的名

老中医经临床经验总结出的经典方剂,具有活血散瘀、消肿止痛的功效,用于治疗跌打损伤,风寒湿痹,肢体疼痛。本实验拟建立大鼠股骨骨折模型,并采用接骨续筋丸含药血清干预后观察大鼠血清钙 (calcium, Ca)、磷 (phosphorus, P)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 变化情况及大鼠骨折愈合过程中骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达情况,探讨接骨续筋丸促进骨折愈合的作用机理,为临床应用接骨续筋丸治疗骨折提供理论依据。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 3 月龄健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 72 只,体重 ( $285 \pm 20$ ) g,购自辽宁长生生物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(辽)2010-0001,于辽宁中医药大学动物实验中心进行实验。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

**1.2 实验药物** 接骨续筋丸(海城市正骨医院院内制剂,批准文号:辽宁制字 Z05030078),规格:每丸

3 g, 每板 6 丸, 每盒 1 板; 用法用量: 口服, 每次 1 丸, 每日 2 次。接骨七厘胶囊(湖南金沙药业有限责任公司生产, 批准文号: 国药准字 Z200253999), 规格: 每粒 0.25 g, 每板 12 粒, 每盒 1 板; 用法用量: 口服, 每次 2 粒, 每日 2 次。

**1.3 实验试剂** 二甲苯溶液(沈阳鼎太达科技有限公司), C004-2 型钙测试盒(日本 OLYMPUS 公司), C006-3 型磷测试盒、A059-2 型 ALP 测试盒、bs-1012R 型 BMP-2 抗体(南京建成生物工程研究所), bs-1313R 型 VEGF 抗体、OAB-0031 型 ABC 试剂盒(北京博奥森生物有限公司), KIT-7710 型 DAB 显色试剂盒(福州亚新生物技术开发有限公司)。

**1.4 实验仪器** SHA-B 型恒温振荡器(常州国华仪器设备厂), PrimoR 型低温高速离心机(常州市万丰仪器制造有限公司), Multiskan MK3 型酶标仪(上海赛默生物科技发展有限公司), DM LS2 型数码显微镜(德国 Leica 公司), MDF-U32V 冰箱(日本 SANYO 公司), 微量移液器(上海赛默生物科技发展有限公司), JY5002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), BS223S 型电子天平、LEICA 300 型脱水机(北京赛多利斯仪器系统有限公司), EG1150 型石蜡包埋机、Leica RM2235 型切片机、HH B11 500-BS 型电热恒温培养箱(德国 Leica 公司), CHA 型生物显微镜(上海跃进医疗器械厂)。

## 2 方 法

**2.1 动物分组** 将 72 只 3 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法将其分为接骨续筋丸组、接骨七厘胶囊组、模型对照组、假手术组, 每组 18 只。

**2.2 动物造模** 造模前 8 h 对大鼠禁食, 不禁水。以 10% 水合氯醛( $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )行腹腔注射麻醉, 麻醉生效后, 将大鼠置于俯卧位。用剪刀剪去左下肢及左臀部的毛, 常规消毒。取大鼠左股外侧切口, 长约 3 cm, 依次切开皮肤、皮下组织, 钝性分离大鼠股外侧肌, 显露股骨干; 在大鼠股骨干中段以电钻打眼, 然后用止血钳和镊子折断股骨干(注意骨折断端的完整); 将直径 1 mm 的克氏针由骨折断端逆行插入股骨干近端, 于股骨大转子处穿出; 将两骨折断端复位, 并在复位后将克氏针顺行穿回; 活动大鼠术肢, 确认固定可靠后, 将克氏针紧贴股骨大转子根部折弯, 剪除多余部分; 以生理盐水冲洗大鼠切口, 逐层缝合。假手术

组仅暴露股骨干, 不做截骨。术后不用抗生素, 分笼饲养。

**2.3 药物干预** 大鼠给药剂量按人和动物药物等效剂量换算公式<sup>[1]</sup>, 将接骨续筋丸和接骨七厘胶囊成人(按体质量 60 kg 常人为标准)的临床用药剂量折算成大鼠的用药剂量。将接骨续筋丸和接骨七厘胶囊分别与蒸馏水溶解配成  $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  接骨续筋丸混悬液和  $0.052 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  接骨七厘胶囊混悬液。所有大鼠均于造模后第 2 天开始灌胃, 均按  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  标准大鼠灌胃法<sup>[2]</sup>给药。接骨续筋丸组以  $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的接骨续筋丸混悬液灌胃, 接骨七厘胶囊组以  $0.52 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的接骨七厘胶囊混悬液灌胃, 模型对照组和假手术组给予蒸馏水灌胃。每天灌胃 1 次, 各组连续灌胃 21 d。

**2.4 取材** 各组分别于药物干预 7 d、14 d、21 d 后取材, 每组随机选取 6 只大鼠。用 10% 水合氯醛( $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉; 麻醉生效后, 将大鼠仰卧位于手术台上, 常规脱毛、消毒, 从实验大鼠的腹主动脉抽血, 每只抽取 8 mL。取出后的血静置 30 min 后, 用低温高速离心机离心 20 min(转速  $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心半径 250 mm); 用微量移液器吸取上层血清, 置入冰箱内保存待检。取血完成后, 经原切口依次切开皮肤、皮下组织, 显露并游离股骨干, 用剪刀将股骨完整取出, 置于滤纸上; 用手术刀片及剪刀彻底剔除股骨干上附着的肌肉、筋膜等软组织, 抽出克氏针, 将股骨干置于二甲苯溶液中固定, 做好标记; 脱钙完成后, 取出股骨干, 置于脱水机中脱水, 具体脱水步骤见表 1; 脱水后, 行二甲苯透明处理; 然后将其放入石蜡中, 使二甲苯与标本脱离; 脱离后将股骨干置于液体石蜡中, 待石蜡凝固成型, 股骨干被包埋; 用择轮式切片机沿股骨干长轴方向将骨折端周围股骨进行切片, 切片厚度为  $5 \mu\text{m}$ ; 切片完成后, 将其置于  $60^\circ\text{C}$  的烤片机上烤 30 min, 然后置入冰箱保存待用。

表 1 股骨干标本脱水步骤

酒精浓度	脱水时间
70% 乙醇	150 min
80% 乙醇	150 min
90% 乙醇	150 min
95% 乙醇	150 min
95% 乙醇	150 min
无水乙醇	60 min
无水乙醇	60 min

**2.5 血清 Ca、P、ALP 含量检测** 将血清标本用 Ca

测试盒、P 测试盒、ALP 测试盒分别测定大鼠血清中 Ca、P、ALP 含量。具体操作步骤如下:选择 610 nm、520 的酶标仪、试管、微量移液器、漩涡混运器气浴箱等设备;按照 Ca 试剂盒说明书将 10  $\mu$ L 大鼠血清置于测定孔中,取 610 nm 酶标仪比色,测试 OD 值;然后按测试盒说明书给出的公式计算出血清中 Ca 含量。按照 P 测试盒说明书,取 0.1 mL 血清标本与 0.4 mL 沉淀剂混匀,放入离心机内离心 10 min (转速 3500  $r \cdot \min^{-1}$ , 离心半径 60 mm), 离心结束后取上清液待检;按照测试盒要求将 10  $\mu$ L 上清液置于测定孔中,取 610 nm 酶标仪比色,测试 OD 值;然后按测试盒说明书给出的公式计算出血清中 P 含量。按照 ALP 测试盒说明书,取 5 mL 血清标本与 50 mL 缓冲液、50 mL 基质液混匀,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  气浴箱中 15 min, 取 520 nm 酶标仪比色,测试 OD 值;然后按测试盒说明书给出的公式计算出血清中 ALP 含量。

**2.6 骨折端骨组织形态观察** 将各组大鼠骨折端骨切片放入苏木素中染色 1 min 后,自来水冲洗 1 min, 1% 盐酸酒精分化 20 s, 自来水再冲洗 5 min; 冲洗完后用伊红染色 20 s, 放入梯度酒精中脱水, 脱水后用二甲苯透明 2 min; 染色后放入烤箱中烘干, 以树胶封片; 干燥后置于显微镜下观察骨折端骨组织形态学变化。

**2.7 骨折端骨组织中 BMP-2、VEGF 表达的免疫组化检测** 先将标本用二甲苯脱蜡 2 次, 第 1 次 5 min、第 2 次 10 min; 将其置于浓度分别为 100%、100%、95% 的梯度酒精中各 5 min, 并用吸水纸吸干; 用自来

水冲洗 3 min, 再以蒸馏水冲洗 3 min, PBS 浸泡 5 min; 用浓度为 3% 的过氧化氢去离子水孵育 10 ~ 15 min; 采用免疫组化 ABC 法依次滴加试剂 A、B、C 进行孵育 10 ~ 15 min 后, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; DAB 显色剂显色后, 用自来水充分冲洗; 以苏木素染色、盐酸酒精分化, 透明、封片。染色切片均在显微镜下观察, 细胞浆被染成棕黄色为 BMP-2 与 VEGF 表达阳性。选择染色较好的区域, 采用 Leica Q550CW 图像处理软件采集图片, 每只大鼠取 3 张切片, 每张选择 5 个视野, 拍照并保存。使用 Leica Q550CW 软件对图片进行图像分析, 测出图像中阳性表达累积光密度 (integrated optical density, IOD)、目标组织区域面积 (Area), 并计算出各图片的平均光密度 (ODmean), 计算公式如下:  $\text{ODmean} = \text{IOD} / \text{Area}$ 。再计算出每个样品 5 个视野的平均值作为该样品的平均光密度供统计使用。

**2.8 数据统计学分析** 采用 SPSS20.0 统计软件对所得数据进行统计学处理, 4 组大鼠药物干预不同时间后血清 Ca、P、ALP 含量及骨折端骨组织中 BMP-2、VEGF 表达量的组间比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

### 3 结果

#### 3.1 药物干预后血清 Ca、P、ALP 含量

**3.1.1 血清 Ca 含量** 药物干预 7 d、14 d、21 d 后, 4 组大鼠血清 Ca 含量比较, 组间差异均无统计学意义 (表 2)。

表 2 药物干预不同时间后 4 组大鼠血清钙含量比较  $\bar{x} \pm s, \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	样本量 (只)	干预 7 d 后	干预 14 d 后	干预 21 d 后
假手术组	6	1.80 $\pm$ 1.03	1.77 $\pm$ 0.89	1.72 $\pm$ 0.98
模型对照组	6	1.88 $\pm$ 0.80	1.77 $\pm$ 0.73	1.74 $\pm$ 0.61
接骨七厘胶囊组	6	1.91 $\pm$ 0.68	1.88 $\pm$ 1.18	1.80 $\pm$ 0.90
接骨续筋丸组	6	1.83 $\pm$ 0.62	1.74 $\pm$ 0.89	1.69 $\pm$ 0.79
$F$ 值		0.023	0.025	0.019
$P$ 值		0.995	0.095	0.996

**3.1.2 血清 P 含量** ①药物干预 7 d 后: 4 组大鼠血清 P 含量比较, 差异有统计学意义; 组间两两比较, 假手术组与模型对照组的差异无统计学意义 ( $P = 0.846$ ), 假手术组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000, P = 0.003$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000, P = 0.005$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P = 0.018$ )。②药物干预 14 d 后: 4 组大鼠血清 P 含量比较, 差异有统计

学意义; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.045, P = 0.000, P = 0.000$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.000, P = 0.012$ ), 接骨七厘胶囊组与接骨续筋丸组的差异无统计学意义 ( $P = 0.116$ )。③药物干预 21 d 后: 4 组大鼠血清 P 含量比较, 差异有统计学意义; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P = 0.036, P =$

0.000,  $P=0.000$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.000, P=0.002$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P=0.016$ )。见表 3。

**3.1.3 血清 ALP 含量** ①药物干预 7 d 后:4 组大鼠血清 ALP 含量比较, 差异有统计学意义; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.001$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.001, P=0.000$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P=0.009$ )。②药物干预 14 d 后:4 组大鼠血清 ALP 含量比较, 差异有统计学意义; 组间两两比较, 假手术组

低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.000, P=0.000$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P=0.019$ )。③药物干预 21 d 后:4 组大鼠血清 ALP 含量比较, 差异有统计学意义; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.010$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.026, P=0.001$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P=0.015$ )。见表 4。

表 3 药物干预不同时间后各组大鼠血清磷含量比较  $\bar{x} \pm s, \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	样本量(只)	干预 7 d 后	干预 14 d 后	干预 21 d 后
假手术组	6	1.89 ± 0.56	1.81 ± 0.48	1.82 ± 0.40
模型对照组	6	1.97 ± 0.53	2.65 ± 0.36	2.15 ± 0.50
接骨七厘胶囊组	6	3.23 ± 0.90	3.73 ± 0.77	3.35 ± 0.62
接骨续筋丸组	6	4.24 ± 0.68	4.37 ± 0.93	4.21 ± 0.70
<i>F</i> 值		16.041	16.998	22.663
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

表 4 药物干预不同时间后各组大鼠血清碱性磷酸酶含量比较  $\bar{x} \pm s, \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	样本量(只)	干预 7 d 后	干预 14 d 后	干预 21 d 后
假手术组	6	49.71 ± 14.67	41.57 ± 10.69	42.73 ± 14.94
模型对照组	6	93.75 ± 15.11	91.13 ± 10.76	77.33 ± 15.54
接骨七厘胶囊组	6	125.00 ± 22.89	111.77 ± 19.66	95.49 ± 26.12
接骨续筋丸组	6	145.49 ± 20.79	149.42 ± 12.71	124.85 ± 25.34
<i>F</i> 值		29.797	62.354	15.847
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

**3.2 药物干预后骨折端骨组织形态** 假手术组染色清晰, 骨组织结构清晰, 可见骨板。模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组, 在药物干预 7 d 后骨折端骨组织中可见少量成骨细胞聚集; 药物干预 14 d 后成骨细胞显著增多, 且接骨续筋丸组及接骨七厘胶囊组的成骨细胞数量较模型对照组明显增多; 药物干预 21 d 后成骨细胞开始减少; 3 组破骨细胞在药物干预 21 d 后出现增长趋势(图 1)。

**3.3 药物干预后骨折端骨组织中 BMP-2、VEGF 的表达量**

**3.3.1 骨折端骨组织中 BMP-2 的表达量** ①药物干预 7 d 后:4 组大鼠骨折端骨组织中 BMP-2 表达量比较, 差异有统计学意义; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.018, P=0.000, P=0.000$ ), 模型对照组低于

接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.000, P=0.000$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P=0.015$ )。②药物干预 14 d 后:4 组大鼠骨折端骨组织中 BMP-2 表达量比较, 差异有统计学意义; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.047, P=0.000, P=0.000$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.000, P=0.000$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P=0.006$ )。③药物干预 21 d 后:4 组大鼠骨折端骨组织中 BMP-2 表达量比较, 差异有统计学意义; 组间两两比较, 假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.004, P=0.000, P=0.000$ ), 模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组 ( $P=0.000, P=0.000$ ), 接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组 ( $P=0.004$ )。见表 5、图 2。



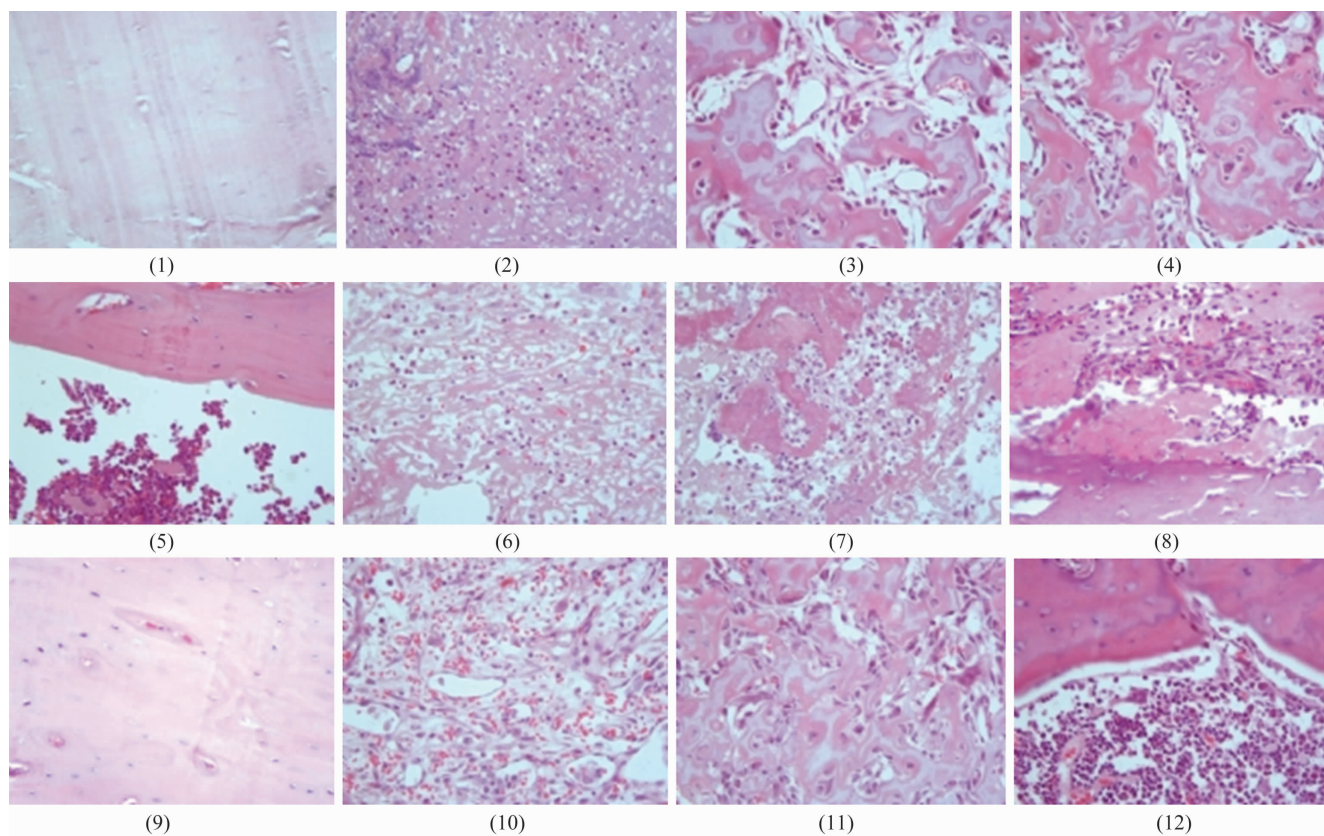


图 1 药物干预不同时间各组大鼠骨折端骨组织 HE 染色结果(×200)

(1)至(4)为药物干预 7 d 后图片,(5)至(8)为药物干预 14 d 后图片,(9)至(12)为药物干预 21 d 后图片。每行图片从左至右依次为假手术组、模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组

表 5 药物干预不同时间后 4 组大鼠骨折端骨组织中骨形态发生蛋白 2 表达量比较  $\bar{x} \pm s$ 

组别	样本量(只)	干预 7 d 后	干预 14 d 后	干预 21 d 后
假手术组	6	$0.10 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.02$	$0.11 \pm 0.02$
模型对照组	6	$0.14 \pm 0.02$	$0.15 \pm 0.02$	$0.15 \pm 0.02$
接骨七厘胶囊组	6	$0.23 \pm 0.03$	$0.24 \pm 0.03$	$0.24 \pm 0.03$
接骨续筋丸组	6	$0.27 \pm 0.03$	$0.28 \pm 0.03$	$0.28 \pm 0.02$
<i>F</i> 值		59.960	47.588	80.017
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

**3.3.2 骨折端骨组织中 VEGF 的表达量** ①药物干预 7 d 后:4 组大鼠骨折端骨组织中 VEGF 表达量比较,差异有统计学意义;组间两两比较,假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P = 0.015, P = 0.000, P = 0.000$ ),模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P = 0.000, P = 0.000$ ),接骨七厘胶囊组与接骨续筋丸组的差异无统计学意义( $P = 0.905$ )。②药物干预 14 d 后:4 组大鼠骨折端骨组织中 VEGF 表达量比较,差异有统计学意义;组间两两比较,假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P = 0.026, P = 0.000, P =$

$0.000$ ),模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P = 0.000, P = 0.000$ ),接骨七厘胶囊组与接骨续筋丸组的差异无统计学意义( $P = 0.071$ )。③药物干预 21 d 后:4 组大鼠骨折端骨组织中 VEGF 表达量比较,差异有统计学意义;组间两两比较,假手术组低于模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ),模型对照组低于接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组( $P = 0.000, P = 0.000$ ),接骨七厘胶囊组低于接骨续筋丸组( $P = 0.029$ )。见表 6、图 3。



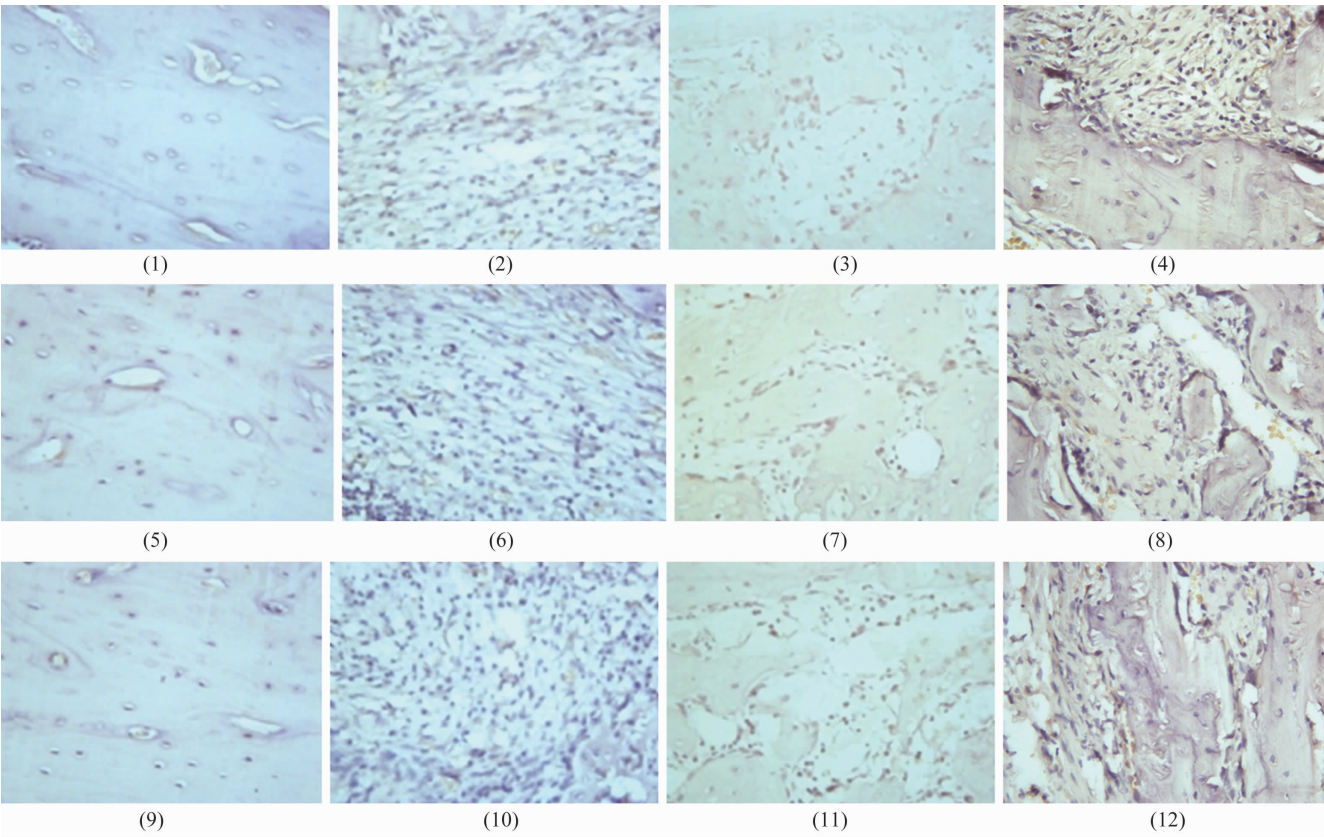
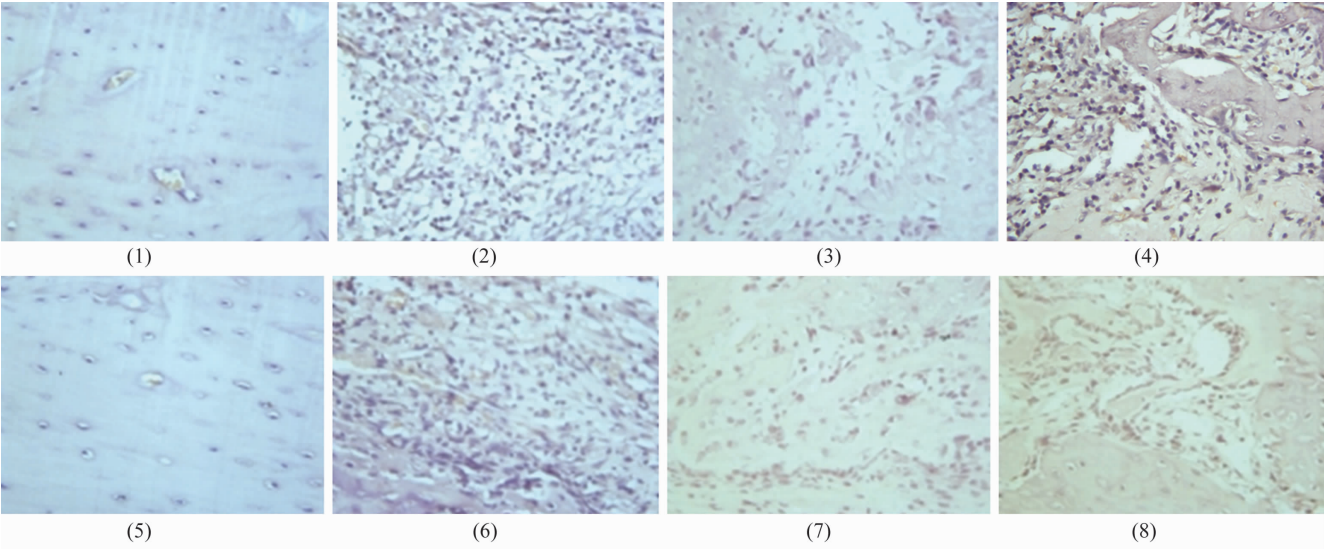


图 2 药物干预不同时间各组大鼠骨折端骨组织骨形态发生蛋白 2 的表达(免疫组化染色 ×400)

(1)至(4)为药物干预 7 d 后图片,(5)至(8)为药物干预 14 d 后图片,(9)至(12)为药物干预 21 d 后图片。每行图片从左至右依次为假手术组、模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组

表 6 药物干预不同时间后 4 组大鼠骨折端骨组织中血管内皮生长因子表达量比较  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(只)	干预 7 d 后	干预 14 d 后	干预 21 d 后
假手术组	6	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02
模型对照组	6	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02
接骨七厘胶囊组	6	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.02
接骨续筋丸组	6	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.05
F 值		69.567	72.334	39.739
P 值		0.000	0.000	0.000



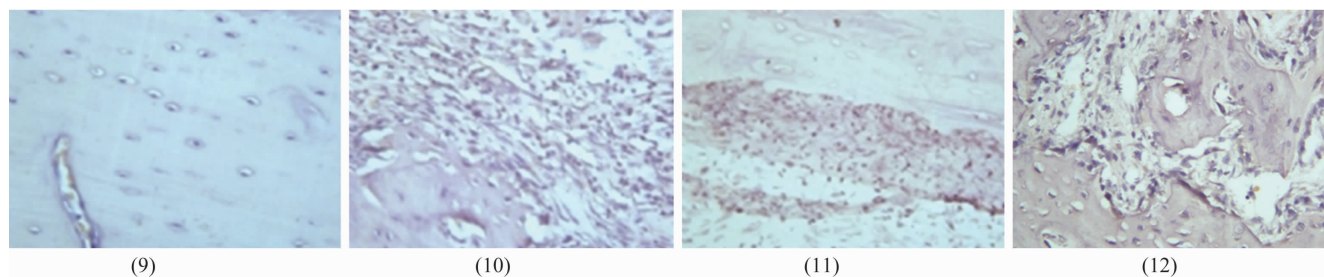


图 3 药物干预不同时间各组大鼠骨折端骨组织中血管内皮生长因子的表达(免疫组化染色  $\times 400$ )

(1)至(4)为药物干预 7 d 后图片,(5)至(8)为药物干预 14 d 后图片,(9)至(12)为药物干预 21 d 后图片。每行图片从左至右依次为假手术组、模型对照组、接骨七厘胶囊组、接骨续筋丸组

#### 4 讨 论

选择合适的骨折模型在研究骨折愈合过程中至关重要。一个好的骨折模型具有操作简单、成功率高等基本特点。在对长管状骨骨折研究中通常采用 2 种骨折模型,一种是开放骨折模型,另一种是闭合骨折模型,这 2 种骨折模型各有其优缺点。国际上通常采用闭合骨折模型,该模型对局部软组织损伤小,骨折稳定性高,不易移位,且在实验中受外来因素干预少,可以比较真实地反应骨折的愈合过程<sup>[5]</sup>。但是,闭合骨折模型有一严重的缺点是造模成功率低。本实验选择了开放骨折模型,其优点为可在直视下进行,造模成功率高,且骨折断端整齐。

在骨的无机成分中,Ca 和 P 是最主要的部分。骨是人体内 Ca、P 的储存库,人体中约有 99% 的 Ca 和 85% 的 P 存在于骨中。Ca 和 P 作为人体骨骼中最基本的矿物质元素,在骨骼代谢中至关重要。其含量的升高与降低将直接影响骨的代谢过程,且与骨的钙化、溶解以及成骨、破骨有着密切的联系。在人体中 Ca 和 P 的沉积始终维持在一定的水平,既相互影响又维持着相互平衡。当 Ca 和 P 的沉积升高时有利于钙盐在骨中的沉积。赵亮等<sup>[6]</sup>通过研究续断骨伤合剂在骨骼愈合中的作用发现,续断骨伤合剂可以使血清中的 P 升高、Ca 降低,但 Ca 和 P 的沉积显著增高;认为续断骨伤合剂是通过促进钙盐的沉积而影响骨折愈合的过程。血清中的 ALP 具有调节血中 Ca 和 P 的作用。ALP 可以分解有机磷酸化合物,产生磷酸盐离子,这些磷酸盐离子可以和钙离子结合从而促进钙盐沉积。ALP 在骨折愈合中的作用有以下几点:①可以显示骨折部位细胞增殖及骨折愈合的程度,因为很多与骨折关系密切的细胞如骨母细胞、血管骨内皮细胞在骨折愈合过程中均会合成、分泌丰富的 ALP<sup>[7]</sup>;②具有诱导成骨的作用,因为与新骨形成关系密切的

血管外皮细胞、骨母细胞等形成的细胞外基质中有大量含有 ALP 的小泡;③其含量的高低可作为监测骨折愈合的指标之一,因为血液中的 ALP 来源于成骨细胞。本实验结果说明,接骨续筋丸并非通过调节血钙而促进骨折愈合,而是通过提高血清 P、ALP 含量而促进骨折愈合,而且其对血清 P、ALP 的调节能力强于接骨七厘胶囊。

骨组织是一种复杂的动态组织,在其不断的新陈代谢过程中,成骨细胞与破骨细胞是最关键的 2 种细胞,它们通过共同作用来调节骨组织代谢<sup>[8]</sup>。成骨细胞多聚集在生长期的骨组织、新生骨的表面,位于骨外膜的内层及骨小梁,是骨形成、骨骼发育与生长的主要功能细胞,其在骨生成过程中经历增殖、成熟、矿化、凋亡 4 个阶段<sup>[9]</sup>。破骨细胞可对形成的编织骨进行重吸收和改建,在骨折愈合过程中十分重要。在骨折早期,骨折断端的血管受损,哈佛氏系统封闭,骨折断端被血肿填充,此时破骨细胞不能到达死骨区域,由巨噬细胞及其演变的多核巨细胞清除死骨及坏死组织。伴随着坏死组织的清除,软骨钙化及新生骨小梁的形成,来自新生血管的破骨细胞开始在矿化骨痂的吸收改建过程中发挥重要作用。成骨细胞和破骨细胞在正常骨形成与重建过程中,各自维持一定的数量,互相制约,对生物刺激产生相应的反应,不断更新以维持体内骨代谢的平衡<sup>[10]</sup>。此外,骨折愈合是一个多种细胞因子共同参与、相互协调的过程<sup>[11]</sup>。骨愈合的本质是哈佛氏系统的重建,即破骨细胞对坏死骨的吸收和成骨细胞直接成骨。本实验骨折端骨组织形态学观察结果说明,接骨续筋丸可能是通过促进成骨细胞增殖而加速骨折愈合过程的。

BMP 是 1965 年由 Urist 在植骨过程中发现并提取出来的一种小分子量糖蛋白,是目前唯一能单独诱导间充质细胞向成骨细胞分化,从而促进骨组织生长



的细胞生长因子,也是骨组织形成过程中最关键的调节因子<sup>[12]</sup>。BMP-2 是目前 BMP 家族中受关注程度最高的成员之一。BMP-2 具有 2 种能力,一是促进成骨细胞分化,二是诱导体外成骨<sup>[13]</sup>。近年来,积极探索利用基因工程生产重组人 BMP 获得成功<sup>[14]</sup>。利用基因技术重组的 BMP-2、BMP-7 开始应用于开放性骨折及脊柱骨折当中,其安全性和有效性已经得到了验证<sup>[15]</sup>。应用 BMP 治疗骨折在促进骨折愈合的同时,可更好地减轻患者的经济负担,因此为其广泛应用于临床成为可能<sup>[16]</sup>。姚明智<sup>[17]</sup>研究发现,采用接骨七厘片治疗四肢骨折后,BMP-2 含量明显高于治疗前;认为接骨七厘片在整个疗程中能上调 BMP-2 表达,通过 BMP-2 的相关信号通路促进成骨细胞分化,加速骨折愈合。张佩等<sup>[18]</sup>研究结果显示,新伤续断汤在治疗骨折的过程中是通过提高 ALP 的活性及 BMP-2 表达来影响成骨细胞的成骨功能,从而达到治疗骨折和骨质疏松的效果。李科伦等<sup>[19]</sup>研究发现,骨折延迟愈合患者血清中 BMP-2 等多项因子较正常人下降,这使得成骨细胞等骨形成细胞因缺乏细胞因子的刺激难以正常分化,硬骨痂难以形成,从而影响骨折愈合的效果。VEGF 是一种特殊的骨生长因子,具有肝素活性,可特异性地诱导血管形成<sup>[20]</sup>。VEGF 来源于间充质细胞、成骨细胞,在发挥作用的过程中与碱性成纤维细胞生长因子相互配合,刺激软骨钙化及加速骨骼重建,对骨折愈合起重要作用<sup>[21]</sup>。纪经涛等<sup>[22]</sup>认为,VEGF 在血管生成的启动过程中起至关重要的作用,可以激活内皮细胞并使之以一定浓度聚集,促进细胞整合、成熟。成骨因子与成血管因子相互配合,在骨愈合过程中按一定量释放,会增强骨愈合的速度及质量,且作用强于单独一种因子的作用。VEGF 可以促进血管内皮细胞的增殖、分化和血管形成,并与其他生长因子有强烈的协同作用<sup>[23]</sup>。王琴等<sup>[24]</sup>通过动物实验发现,愈骨胶囊可明显增加骨痂中 VEGF 及转化生长因子- $\beta$  的表达,致使软骨细胞增多,骨痂出现、钙化提前,骨髓腔再通时间缩短。VEGF 是一种与血管密切相关的骨生长因子,目前尚不清楚其在骨折愈合中的具体作用机制。杨震等<sup>[25]</sup>通过研究认为,VEGF 促进血管生成的作用可以高效地在骨折处建立起营养物质输送通道,并且促进局部骨折端的代谢循环,为减轻骨折端水肿和促进骨折愈合发挥了不可或缺的作用。周正

楠等<sup>[26]</sup>认为,VEGF 在骨折愈合过程中有重要的作用,但其安全有效性及其具体的作用机制目前仍然不清楚,需要大量的临床与动物实验来验证。本实验结果显示:在大鼠骨折愈合过程中,接骨续筋丸及接骨七厘胶囊均能促进 BMP-2 表达、VEGF 的表达而促进骨折愈合,且接骨续筋丸的作用要强于接骨七厘胶囊。

本研究结果显示,接骨续筋丸含药血清能促进大鼠骨折愈合,其作用机制可能是通过提高血清中 P、ALP 的含量,促进骨组织中 BMP-2 及 VEGF 的表达,从而促进成骨细胞增殖,加速骨折愈合过程,但其具体作用机制有待进一步深入研究。

## 5 参考文献

- [1] 潘元珍,刘超群,周国林. 闭合性骨折早期应用中药熏洗、外敷的疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 333-335.
- [2] 朱建富,郑海荣,曾焕友. 骨折术后患者应用活血化瘀类药物促进骨折愈合的近期与远期疗效[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(3): 509-511.
- [3] 林越,张宁,刘世巍,等. 补肾活血方对 hPTH(1-34)干预下小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖及分化的影响[J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(11): 3065-3068.
- [4] 章晓云,陈跃平,龙飞攀,等. 手法复位小夹板固定结合中医三期辨证用药治疗伸直型桡骨远端骨折 367 例[J]. 中医正骨, 2014, 26(12): 37-39.
- [5] 梁春雨,张柳,赵文国,等. 前交叉韧带切断对卵巢切除大鼠股骨骨折愈合的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(2): 146-155.
- [6] 赵亮,张晨. 续断骨伤合剂在促进骨折愈合中对血生化指标的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(1): 11-13.
- [7] BOYAN BD, SWAIN LD, SCHWARTZ Z, et al. Epithelial cell lines that induce bone formation in vivo produce alkaline phosphatase-enriched matrix vesicles in culture[J]. Clin Orthop Relat Res, 1992, (277): 266-276.
- [8] 梁伟,吕天成,李理,等. 降钙素基因相关肽对骨质疏松性骨折愈合影响的体外研究[J]. 中华骨科杂志, 2017, 37(6): 353-358.
- [9] 童安莉,陈璐璐,丁桂芝. 成骨细胞骨形成机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5(3): 60-64.
- [10] COUGHLIN SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors[J]. Nature, 2000, 407(681): 258-264.
- [11] LOI F, CORDOVA LA, PAJARINEN J, et al. Inflammation, fracture and bone repair[J]. Bone, 2016, 86: 119-130.

- [12] 周勇,任菲菲,丰凡翔,等. 血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白 2 在非创伤性股骨头坏死不同区域的表达[J]. 中医正骨, 2015, 27(8): 7-10.
- [13] CHEN D, HARRIS MA, ROSSINI G, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts[J]. Calcif Tissue Int, 1997, 60(3): 283-290.
- [14] 赵明,王信会,周延伸. rhBMP-2 成熟肽在大肠杆菌中的表达及其诱导成骨活性[J]. 生物化学杂志, 1994, 10(3): 319.
- [15] 吴志明,王东,罗华云,等. 骨科基础研究的奠基者 Marshall R. Urist[J]. 实用骨科杂志, 2007, 13(4): 246-247.
- [16] GARRISON KR, SHEMILT I, DONELL S, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2010, 65(6): 6950.
- [17] 姚明智. 接骨七厘片对四肢骨折愈合过程中血清骨形态发生蛋白-2 的影响[J]. 中国当代医药, 2015, 22(9): 94-96.
- [18] 张佩,董路珏,李义凯. 新伤续断汤对成骨细胞增殖及骨形态发生蛋白的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(1): 92-97.
- [19] 李科伦,赵政,陈学文,等. 骨折延迟愈合患者血清多项因子及微循环指标的变化研究[J]. 中华全科医学, 2014, 12(11): 1778-1779.
- [20] CARMELIET P, CHERH D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease[J]. Am J Physiol, 1997, 273(5 Pt2): 2091-2104.
- [21] 康献刚,王志强. 骨折愈合过程中细胞因子的作用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(7): 877-879.
- [22] 纪经涛,胡永成,夏群,等. 血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白在骨组织工程中的作用[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(33): 5356-5363.
- [23] EINHORN TA, GERSTENFELD LC. Fracture healing: mechanisms and interventions[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(1): 45-54.
- [24] 王琴,易美彤,曾敏. 愈骨胶囊促进兔骨折愈合的分子机制初探[J]. 中成药, 2013, 35(11): 2337-2341.
- [25] 杨震,吴兴林,李建扬,等. BMP-2 和 VEGF 基因活化纳米骨浆对去势雌性山羊椎骨骨质影响[J]. 中华显微外科杂志, 2016, 19(39): 469-473.
- [26] 周正楠,张岩,邱旭升,等. 骨折愈合过程中 VEGF 的表达与调控及其作用的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(24): 2248-2251.

(2016-12-04 收稿 2017-07-21 修回)

## · 通 知 ·

### 国际数字医学会数字中医药分会 2017 年会征文通知

为适应全球数字医学的前沿发展趋势,促进中医药学的标准化、规范化和客观化的研究,推动现代中医学和中药学与信息科学的交叉融合,由国际数字医学会与 DCM 杂志主办的“2017 国际数字医学会数字中医药分会年会暨第二届数字中医药学术交流会”拟定于 2017 年 11 月 16—19 日在广州市举办。会议将以“数字中医诊疗创新研究与应用”为主题开展学术交流,同时邀请院士、国医大师、杰青等国内外著名专家和教授作专题学术讲座,热烈欢迎从事中医药数字化、客观化、标准化或中医药信息学等相关学科的科教工作者及医疗、护理人员参与。

**征文内容** 中医药的标准化、规范化和客观化研究、中医药信息化研究、数字中医药产学研结合研究,与数字化研究相关的其他临床医学、护理研究等。论文可以用中文或英文书写,字数在 5 000 字以内(全文或摘要)。

**截稿日期** 2017 年 10 月 31 日,论文和参会回执均请发送至邮箱 dcm@hncm.edu.cn。

**主、协办单位** 国际数字医学会,DCM 杂志,广西中医药大学、贵阳中医学院、广州中医药大学、湖北中医药大学、江西中医药大学、湖南中医药大学等期刊社;《湖南中医杂志》《中医正骨》《中国中医骨伤科杂志》《中医药导报》等杂志社。

国际数字医学会数字中医药分会

2017 年 10 月 8 日

## · 作者须知 ·

### 提交论文著作权转让书的提示

凡经本刊通知采用的稿件,请通讯作者于接到通知后 1 周内,将由全体作者签名并加盖第一作者单位公章的论文著作权转让书邮寄至本刊编辑部,并注明稿件编号及第一作者姓名。

论文著作权转让书请寄:河南省洛阳市瀍河区启明南路 82 号《中医正骨》编辑部,邮政编码:471002。