和胃接骨胶囊对家兔骨折愈合中 转化生长因子- $\beta 1$ 表达的影响

郑悦亮¹, 周 辉², 赵万军², 张志敬³

(1. 浙江省人民医院, 浙江 杭州 310006; 2. 杭州市中医院; 3. 浙江中医学院)

【摘要】 目的: 观察和胃接骨胶囊对家兔骨折愈合过程中转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 表达变化的影响, 探讨其促进骨折愈合的机制。方法: 将 48 只家兔制成单侧桡骨中上 1/3 标准骨折模型, 随机分为 3 组: 实验用药组给予和胃接骨胶囊 1 粒; 阳性对照组给予麝香接骨丹 1 粒; 空白对照组给予安慰剂 1 粒; 均连用 14 d。分别于术后 7、14 和 28 d 行 X 线摄片、骨折处组织学观察, 免疫组化染色观察 TGF- $\beta 1$ 的表达。结果: 7、14 和 28 d 时实验用药组与空白对照组的 TGF- $\beta 1$ 表达差异均有显著性 (P 均 < 0.01)。7 d 和 14 d 时实验用药组与阳性对照组比较 TGF- $\beta 1$ 表达差异有显著性 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 28 d 时实验用药组与阳性对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。X 线骨骼片和组织学观察均显示实验用药组和阳性对照组效果优于空白对照组。结论: 和胃接骨胶囊能明显促进骨折愈合过程中 TGF- $\beta 1$ 的表达。

【关键词】 骨折愈合; 和胃接骨胶囊; 转化生长因子- $\beta 1$

中图分类号: R242; R274 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)04-0231-03

Effects of Hewei Jiegu capsule (和胃接骨胶囊) on transforming growth factor - $\beta 1$ expression during the process of healing in rabbits with bone fracture ZHENG Yue-liang¹, ZHOU Hui², ZHAO Wan-jun², ZHANG Zhi-jing³. 1. Zhejiang People's Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang, China; 2. Hangzhou Traditional Chinese Medical Hospital; 3. Zhejiang Traditional Chinese Medical College

【Abstract】 Objective: To observe the changes of transforming growth factor - $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) expression during the process of healing in rabbit with bone fracture and treated with Hewei Jiegu capsule (和胃接骨胶囊), and explore the mechanism of Hewei Jiegu capsule on healing bone fracture. **Methods:** The model of single radius fractures of forearm was established in 48 rabbits. The animals were randomly divided into three groups: the experimental treatment group was treated with Hewei Jiegu capsule of 1 pill, the positive group was treated with Shexiang Jiegu bill (麝香接骨丹) of 1 pill, and the control group was treated with placebo of 1 pill. All the groups were treated for 14 days. At the 7 th, 14 th and 28 th day, bone image of X-ray, histological changes of bone fracture tissue were observed and the expression of TGF- $\beta 1$ was detected by immunohistochemistry. **Results:** The difference was significant on TGF- $\beta 1$ expression between experimental treatment group and control group at 7 th, 14 th, 28 th day (both $P < 0.01$), as well as between experimental treatment group and positive group at 7 th the and 14 th day ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). The expression of TGF- $\beta 1$ was similar between experimental treatment group and positive group at the 28 th day. Bone image of X-ray and histological changes showed better effects of experimental treatment group and positive group than control group. **Conclusion:** Hewei Jiegu capsule has an obvious promoting effects on expression of TGF- $\beta 1$ during the process of healing on bone fracture

【Key words】 bone fracture heal; Hewei Jiegu capsule; transforming growth factor - $\beta 1$

和胃接骨胶囊是周辉教授根据骨损伤病机并结合多年临床经验研制而成的中药复方制剂, 临床及实验研究表明, 和胃接骨胶囊具有较好的提高骨折愈合质量作用。本实验中拟进一步探讨和胃接骨胶囊促进家兔骨折愈合的机制。

基金项目: 浙江省中医药管理局课题 (2005C200)

作者简介: 郑悦亮 (1974-), 男 (汉族), 浙江杭州人, 医学硕士, 主治医师。

1 材料与方

1.1 实验动物与药物: 48 只健康成年中国大耳白家兔, 雌雄不限, 平均体重 2.5 kg, 由浙江中医学院实验动物中心提供。和胃接骨胶囊由骨碎补、当归、佛手片、地鳖虫等 7 味药组成, 由杭州市中医院制剂室制备。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型: 在无菌条件下将家兔左侧桡骨中

上 1/3 用手术方法造成骨缺损 2~3 mm, 术后任兔自由行走, 无外固定, 即为模型。骨折术后肌肉注射(肌注)青霉素 200 kU, 每日 1 次, 共 3 d。

1.2.2 分组及给药:将实验家兔按随机数字表法分为实验用药组、阳性对照组和空白对照组, 每组 16 只。制模后 1 d, 实验用药组家兔每只给予胃接骨胶囊 1 粒, 阳性对照组给予麝香接骨丹 1 粒, 空白对照组给予安慰剂 1 粒, 连续服用 14 d。

1.2.3 动物处死及标本处理:每组动物分别于术后 7 d 和 14 d 以空气栓塞法各处死 4 只, 28 d 以空气栓塞法各处死 8 只, 剪下两侧上臂下端, 放入 -20 ℃ 冰箱保存。对断肢分别进行 X 线摄片、骨折处组织病理观察及转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor - $\beta 1$, TGF - $\beta 1$) 免疫组化检测。

1.3 观察指标

1.3.1 一般情况:连续观察 3 组动物毛发光泽度、食量、活动度、反应度和切口情况。

1.3.2 X 线骨骼片:观察术后 7、14 和 28 d 兔左侧桡骨中上 1/3 骨折处的缺损情况、骨膜反应、骨痂量和骨小梁。

1.3.3 组织学观察:取包括骨折断端及其周围软骨痂约 1 cm。标本置入体积分数为 4% 的多聚甲醛中浸泡 48 h 后, 置入体积分数为 10% 的乙二胺四乙酸 (EDTA) 液 (pH 7.2) 脱钙 (4 ℃), 每周换脱钙液 1 次。待针可刺入骨皮质时停止脱钙, 随后用石蜡包埋 (60 ℃), 制备 4 μ m 厚度切片。切片经脱蜡至水、苏木素-伊红 (HE) 染色后进行组织学观察。

1.3.4 免疫组化染色:切片经脱蜡至水后, 分别经体积分数为 0.3% 的双氧水封闭内源酶。常规 ABC 法进行免疫组化染色, 即切片经一抗 (TGF - $\beta 1$ 多克隆抗体) 处理过夜后, 依次经生物素化第二抗体、ABC 复合物处理, 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木精复染; 脱水、透明、封片; 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为阴性对照, 用试剂盒内阳性切片作阳性对照。阳性细胞浆和 (或) 膜着色呈棕黄色。用 PAS - 9000 病理图像分析仪行 TGF - $\beta 1$ 染色面积及灰度的测定。

2 结果

2.1 一般情况:3 组动物术后均无感染。实验用药组动物术后 2 d 行动及饮食恢复如前; 空白对照组及阳性对照组倦卧少动, 术后 3~4 d 方才恢复。术后 3 d 可见实验用药组及阳性对照组动物肢体肿胀基本消失; 而空白对照组局部瘀斑明显, 7 d 后才消失。

2.2 X 线骨骼片:实验用药组及阳性对照组 7 d 时

已有 3 只动物骨折断端边缘模糊, 而空白对照组 14 d 才出现浅淡骨膜反应。实验用药组及阳性对照组 14 d 时骨折端均趋向模糊, 有轻度骨膜反应, 个别标本甚至有少量骨痂形成; 而空白对照组的标本仅表现为骨折端模糊, 轻度骨膜反映, 无骨痂反映, 无骨痂可见。28 d 时实验用药组及阳性对照组骨痂填满缺损, 而空白对照组骨痂尚未填满缺损, 透光缝隙明显。实验用药组和阳性对照组在 7 d 和 14 d 时 X 线骨骼片检查结果无明显差别。28 d 时, 实验用药组骨缺损内骨小梁明显比阳性对照组密实。总的结果表明: 实验用药组及阳性对照组骨折修复快于空白对照组, 实验用药组骨折修复快于阳性对照组。

2.3 组织学观察:实验用药组及阳性对照组 7 d 时骨折断端间血肿消失, 代之以较多的肉芽组织, 大量成纤维细胞、成软骨细胞和成骨细胞生成, 骨膜深层的细胞出现增生和骨膜内成骨现象, 成骨细胞活跃; 14 d 时成纤维细胞由梭形变为圆形, 细胞外基质生成增多, 以成骨细胞增生为主; 28 d 时外骨痂、桥梁骨痂中的软骨细胞明显减少, 代之以骨小梁为主的结构, 骨小梁排列整齐, 部分骨髓腔已贯通, 其中阳性对照组比实验用药组软骨细胞多。在上述各个时期的组织内均可见到丰富的新生血管; 而空白对照组 7 d 时有软骨细胞出现, 但较实验用药组及阳性对照组同一时间少且形态幼稚, 有膜内成骨现象, 14 d 形成软骨巢, 28 d 骨小梁排列紊乱, 髓腔未贯通; 与实验用药组及阳性对照组相比骨折愈合进程明显减慢。

2.4 免疫组化染色:7 d 实验用药组与阳性对照组骨外膜下及周围软组织形成的血肿中中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞及红细胞间质中 TGF - $\beta 1$ 呈强阳性染色; 在单核炎性细胞周围, TGF - $\beta 1$ 的染色更为明显, 增生的骨膜细胞内有 TGF - $\beta 1$ 阳性染色。空白对照组对应处均显色较浅或不显色。14 d 实验用药组与阳性对照组在软骨形成区可见幼稚软骨细胞及成熟软骨细胞都呈强阳性染色, 且成熟软骨细胞着色最深, 肥大软骨细胞不显色。空白对照组也可见到软骨细胞有较深着色, 但明显浅于两个用药组。28 d 时 3 组新生骨小梁表面衬附的成骨细胞内可见 TGF - $\beta 1$ 阳性染色, 同时也有细胞外染色, 而埋入骨基质的成骨细胞内、外 TGF - $\beta 1$ 染色均为阴性。软骨细胞内仍有 TGF - $\beta 1$ 的强阳性染色; 在膜内成骨以上继续分化的间充质细胞内仍然有 TGF - $\beta 1$ 阳性染色; 在软骨内成骨区域, 钙化前沿的软骨细胞浆内未见 TGF - $\beta 1$ 阳性染色, 而周围

基质则为强阳性染色;桥梁骨痂骨膜增厚的部位,依旧可见间充质细胞分化,并有细胞内染色阳性,但表 1、2 结果显示,实验用药组的 TGF- β 1 染色强度与面积明显强于其他两组。

表 1 各组 TGF- β 1 染色面积比较($\bar{x}\pm s, n=16$)

组别	7 d	14 d	28 d
实验用药组	38 434.0 $\pm$ 2 511.8*	48 197.0 $\pm$ 2 583.6* $\Delta\Delta$	24 142.0 $\pm$ 3 523.7*
阳性对照组	36 664.0 $\pm$ 1 549.4	43 354.0 $\pm$ 4 192.2*	21 421.0 $\pm$ 2 599.3*
空白对照组	33 970.0 $\pm$ 2 569.9	37 452.0 $\pm$ 3 034.9	15 943.0 $\pm$ 1 463.4

注:与空白对照组比较:* $P<0.01$;与阳性对照组比较:

$\Delta\Delta P<0.01$

表 2 各组 TGF- β 1 染色灰度比较($\bar{x}\pm s, n=16$)

组别	7 d	14 d	28 d
实验用药组	126.50 $\pm$ 2.07*	117.50 $\pm$ 1.60* Δ	125.10 $\pm$ 1.46* $\Delta\Delta$
阳性对照组	124.90 $\pm$ 2.10*	115.60 $\pm$ 1.41*	123.10 $\pm$ 1.46*
空白对照组	121.50 $\pm$ 2.45	113.10 $\pm$ 1.46	122.60 $\pm$ 1.28

注:与空白对照组比较:* $P<0.01$;与阳性对照组比较:

$\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$

3 讨论

目前对骨折治疗早、中期临床上常用的中药虽有活血化瘀、消肿止痛、接骨续筋等促进骨折愈合的作用,但这些药大多存在胃肠道反应较重的缺点。和胃接骨胶囊具有健运脾胃、消肿止痛、和营续骨的作用,基本无胃肠不适,消肿止痛迅速、骨折愈合快。临床及实验研究表明和胃接骨胶囊具有较好的提高骨折愈合质量作用^[1]。骨碎补能通过增加骨胶原分泌及钙盐沉积促进骨折的愈合,增加骨痂厚度,提高骨折愈合质量,增加 TGF- β 1 在骨痂组织中的表达^[2]。当归能活血补血、疏通经络、祛瘀生新、舒筋活络、接骨续筋,促使骨外膜内层细胞增多,产生骨样组织,并形成新生骨^[3];并可使创伤大鼠巨噬细胞的非特异性免疫功能得到保护^[4]。佛手一味,《本草纲目》载其“治心下气痛”;《滇南本草》载其“补肝暖胃,止呕吐,消胃寒痰,治胃气疼痛”。药理研究证实佛手醇提物对动物体外肠管功能有明显的抑制作用,对乙酰胆碱引起的兔十二指肠痉挛有显著的解痉作用,能迅速缓解氨甲基胆碱所致胃和胆囊的张力增加,实乃治胃良药。地鳖虫,其功效逐瘀破积,通络,理伤止痛。

TGF- β 是一个多功能的多肽家族,是组织受伤后细胞外基质积聚过程中的主导介质,它调节细胞的生长发育及组织受伤后的修复重塑。TGF- β 可刺激骨膜间充质细胞增殖、分化,促进成骨细胞和

成软骨细胞增生,刺激 I 型胶原合成,诱导膜内成骨和软骨内的成骨过程。细胞内信使蛋白 Smads 是 TGF- β 1 的直接底物,活化的受体 I 磷酸化不同的 Smads 蛋白后,将信号传递到细胞核内,介导特异的基因表达^[5]。目前已鉴定出 5 种不同分子类型的 TGF- β ,即 TGF- β 1~5,其氨基酸有 64%~82% 同序。在整个进化过程中,TGF- β 1 被高度保留,人、猪、牛、猴、鸡的 TGF- β 1 中氨基酸序列完全相同,与小鼠之间仅相差 1 个氨基酸,且其前体分子均含有 Arg-Gly-Leu 序列。Tanaka 等^[6]用酶组织化学染色技术、电镜观察等手段发现,将 TGF- β 1 作用于鼠的颅骨骨膜后,增殖的主要成分是前成骨细胞,诱导发生膜内化骨,加速了骨的生长。本实验中的 X 线结果表明,实验用药组及阳性对照组骨折修复快于空白对照组,实验用药组骨折修复快于阳性对照组;组织学观察结果也证实实验用药组及阳性对照组比空白对照组骨折愈合进程明显加快。免疫组化结果显示,实验用药组在骨折愈合不同时期骨痂组织内 TGF- β 1 表达量及定位均与文献报告相符^[7],且阳性程度明显优于阳性对照组与空白对照组,特别是在骨折愈合早、中期。提示和胃接骨胶囊可能促进和加快 TGF- β 1 的合成与分泌,导致成骨活动的活跃,缩短骨折的愈合过程。

综上所述,我们认为和胃接骨胶囊提高骨折愈合质量的作用与促进 TGF- β 在骨折各个阶段表达,并促进成骨细胞增殖和基质合成有关。本研究结果为和胃接骨胶囊促进骨折愈合提供了生物因子水平的理论基础,有关该药在促进骨折愈合时是否还影响其他相关生物因子还有待进一步研究。

参考文献:

- [1]郑悦亮,周辉,赵万军,等.和胃接骨胶囊对家兔骨折愈合质量影响的实验研究[J].中国中医骨伤科杂志,2006,14:28-30.
- [2]王华松,许申明.骨碎补对骨折愈合中 TGF- β 1 表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2001,9:10-13.
- [3]刘宇,马献军.当归在外伤性骨折治疗中的作用[J].中医正骨,2004,16:5.
- [4]郝江,雷鸣,潘兴华,等.3 种不同中药组方对创伤大鼠应激细胞因子及腹腔吞噬细胞功能的影响比较[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11:281-283.
- [5]陈伟,付小兵,孙国柱,等.溃疡组织中转化生长因子- β 异构体与其受体含量的变化及其对创面修复的影响[J].中国危重病急救医学,2002,14:93-95.
- [6]Tanaka T, Taniguchi Y, Gotoh K, et al. Morphological study of recombinant human transforming growth beta-induced intramembranous ossification in neonatal rat parietal bone[J]. Bone, 1993, 14:117-123.
- [7]姬洪全,党耕町,马庆军,等.骨折愈合过程中转化生长因子 β 1 表达的实验研究[J].中华外科杂志,1998,36:72.

(收稿日期:2006-03-08 修回日期:2006-07-05)

(本文编辑:李银平)