

郑怀贤经验方对股骨骨不连大鼠骨折恢复的影响

魏林¹, 檀亚军², 孙玉³, 王金涛³, 叶锐彬¹

(成都体育学院附属体育医院, 1. 筋伤科; 2. 门诊骨科; 3. 成都体育学院, 四川 成都 610000)

【摘要】目的: 探讨郑怀贤经验方对股骨骨不连大鼠骨折恢复的影响。**方法:** 选取36只Wistar大鼠作为研究对象, 按照处理方式不同分为空白组、模型组及实验组。模型组和实验组大鼠手术离断股骨干构建股骨骨不连大鼠模型, 术后8周; 实验组给予郑怀贤经验方(2.7 g/kg)外敷患肢, 干预8周; 模型组和空白组不做任何处理。观察并比较各组大鼠活动、毛发色泽变化和股骨干缺损、病理改变、血清学指标变化。**结果:** 空白组大鼠活跃, 食欲正常、被毛致密紧披有光泽色泽, 股骨干骨质结构正常、软骨细胞排列有序; 模型组大鼠活动状态减少、食欲降低、毛发稍燥、色泽较暗, 且实验组大鼠上述情况有所改善; 实验组大鼠干预4周时股骨缺损部位有骨痂, 干预8周时骨缺损线消失、骨皮质连续, 且与模型组大鼠相比, 软骨细胞排列紊乱、结构缺少病理改变有改善, 血清骨特异性碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(OC)、I型原胶原N-端前肽(PINP)、转化生长因子- β (TGF- β)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白-2(BMP-2)水平均高于模型组($P < 0.05$)。**结论:** 郑怀贤经验方可提高成骨细胞活性、TGF- β 、VEGF、BMP水平, 促进股骨骨不连大鼠骨折恢复。

【关键词】 骨不连; 郑怀贤经验方; 成骨细胞活性; 转化生长因子 β ; 血管内皮细胞生长因子; 骨形态发生蛋白2

【中图分类号】 R687.3; R285.5 **【文献标志码】** A

Effects of Zheng Huaixian's empirical formula on the recovery of femoral bone nonunion in rats

WEI Lin¹, TAN Ya-jun¹, SUN Yu³, WANG Jin-tao³, YE Rui-bin¹

(1. Department of Fascial Injury; 2. Department of Orthopedics, Affiliated Sport Hospital of Chengdu Sport University; 3. Chengdu Sport University, Chengdu 610000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To explore the effects of Zheng Huaixian's empirical formula on the recovery of femoral bone nonunion in rats. **Methods:** The femoral shafts were surgically severed to construct models of rat with femoral bone nonunion, and they were divided into model group and experimental group according to different processing methods. The healthy rats were enrolled as blank group. At 8 weeks after surgery, experimental group was given Zheng Huaixian's empirical formula (2.7 g/kg) for external application on affected limbs for 8 weeks, while model group and blank group were not treated. The changes of rat activities, hair color, defects of femoral shaft, pathological situations and serological indexes were observed. **Results:** In blank group, rats were active, appetite was normal, clothing hair was compact and glossy, bone structure of femoral shaft was normal, and arrangement of chondrocytes was ordered. Compared with model group, reduced activity state, appetite, hair dryness and dark color were improved in experimental group. There was bone callus at femoral defect site after 4 weeks of intervention, bone defect line was disappeared, bone cortex was continuous, arrangement disorder and structure lack of chondrocytes were improved after 8 weeks of intervention in experimental group. The levels of serum bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OC), type I procollagen N-terminal propeptide (PINP), transforming growth factor- β (TGF- β), serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in experimental group were higher than those in model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Zheng Huaixian's empirical formula can improve osteoblasts activity, increase levels of TGF- β , VEGF and BMP, and promote fracture recovery in rats with femoral bone nonunion.

【Key words】 Bone nonunion; Zheng Huaixian's empirical formula; Osteoblast activity; TGF- β ; VEGF; BMP

骨不连是指骨折发生后超过正常骨折愈合时间仍未愈合的现象, 呈现出疼痛、骨断端局部压痛等症状, 使机体活动受限和负重降低, 影响运动系统康复^[1]。骨不连诱发因素众多, 如骨折后骨折端固定

不佳, 骨折端异常活动、血液供给不足以及成骨环境不佳等, 治疗前需循因辩证, 开展针对性治疗^[2]。骨不连在中医学中属于“骨痂”“骨痿”范畴, 病机为本虚标实, 外伤骨折淤血闭阻于内, 筋脉失养、骨髓

无以充填,中医治疗时需以消肿止痛、活血化瘀和续筋接骨为辨证以制定治疗方案。郑怀贤教授^[3-4]为我国著名骨伤科专家,郑氏骨科是四川省非物质文化遗产代表性项目,已有近百年历史,具有独特的思想和医疗体系,郑氏伤科方药为郑怀贤教授的经验方(下文统称“郑怀贤经验方”)具有消肿止痛、疏松肌肉、温通经络以及疏风散寒等作用,促进骨折恢复效果良好。郑怀贤经验方由苏木、自然铜、骨碎补、羌活、独活和白及等 15 味中药组成,有活血、化瘀、续筋接骨功效,但其对骨不连作用机理鲜有报道。本研究拟探讨郑怀贤经验方对骨不连大鼠的潜在作用机理。

1 材料与方

1.1 实验动物

清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 36 只,8~9 周龄,体质量(300±30)g,购于成都达硕实验动物有限公司,生产许可证号 SCXK(川)2020-0030,饲养房温度为 25~26℃,相对湿度为 55%~60%,人工光照 12 h/黑暗 12 h,饮食、饮水自由。

1.2 药物与试剂

郑怀贤经验方:苏木 50 g、自然铜 25 g、蟹粉 25 g、骨碎补 50 g、当归 25 g、赤芍 25 g、儿茶 25 g、血余炭 25 g、丁香 15 g、木香 25 g、没药 25 g、羌活 50 g、独活 50 g、白及 50 g、川芎 25 g,各味药物共研呈细末。骨特异性碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)、骨钙素(osteocalcin, OC)、I 型原胶原 N-端前肽(type I procollagen N-terminal propeptide, PINP)、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)测定试剂盒均购自上海烜雅生物科技有限公司。

1.3 动物建模、分组及干预

Wistar 大鼠购回后适应性饲养 1 周,随机选取 24 只大鼠用于股骨骨不连模型建立,麻醉成功后,大鼠左侧股骨手术区域常规备皮、消毒并固定于平台,离断大鼠左侧股骨干(股外膜)^[5],形成 5 mm 骨缺损,使用克氏针行骨髓腔固定,逐层缝合;术后每天肌肉注射 8 万单位青霉素防止感染,术后 1 次/d,连续 3 d,术后将大鼠放回饲养笼自由饲养;手术后 8 周,使用 X 射线检测股骨干缺损情况,若骨折端表现出萎缩硬化、无骨痂形成则表示股骨骨不连模型制备成功,本研究骨不连制模过程中无大鼠死亡,均制模成功。将制模成功大鼠随机分为模型组、实验

组两组,每组各 12 只;另选取 12 只大鼠为空白组,不做任何处理。术后 8 周,实验组大鼠患肢外敷郑怀贤经验方 2.7 g/kg(药物剂量为成人与大鼠表面积折算系数 6.25 换算的等效剂量),1 次/d,12 h/次,用无菌纱布包裹、胶带固定以防止药物脱落。空白组、模型组不做处理。

1.4 大鼠一般情况观察

干预前及干预 8 周后,观察大鼠食欲、活动状态、毛发色泽等生理活动。

1.5 X 射线检测大鼠股骨骨缺损情况

干预 4、8 周时,使用小动物超声系统观察大鼠左股骨干中部离断部位变化情况。

1.6 苏木精-伊红染色法(HE)观察大鼠股骨病理变化

干预 8 周时,取各组大鼠股骨干或骨折组织,分别使用多聚甲醛、乙二胺四乙酸对化骨组织进行固定、脱钙,常规石蜡包埋、切片、HE 染色、封片、显微镜下观察病理变化。

1.7 大鼠血清成骨细胞因子和 TGF-β、VEGF、BMP-2 水平检测

于干预前及干预 4、8 周,抽取大鼠腹主动脉血 3 mL,以 3 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,使用酶联免疫吸附法检测血清 BALP、OC、PINP、TGF-β、VEGF、BMP-2 水平。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 郑怀贤经验方对股骨骨不连大鼠外观和行为的影响

空白组大鼠活跃、食欲正常、被毛致密紧披有光泽色泽;干预 8 周,相比空白组,模型组大鼠活动状态明显减少、食欲降低,毛发稍燥、色泽较暗,实验组大鼠在饲养笼中较模型大鼠活跃、食欲增加且毛发柔顺度、色泽均优于模型组。

2.2 郑怀贤经验方对股骨骨不连大鼠骨愈合情况的影响

干预 4 周,模型组大鼠左侧股骨干缺损明显,试验组大鼠左侧股骨干缺损部位有明显骨痂;干预 8 周,模型组大鼠股骨干缺损部位仍可见骨缺损缝线,实验组大鼠的骨缺损线消失、骨皮质也连续。见图 1。

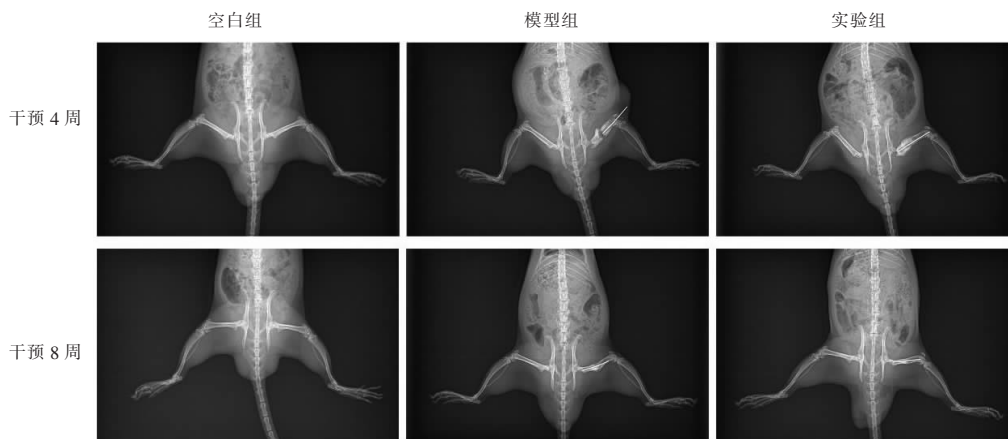


图 1 各组大鼠骨愈合情况

2.3 郑怀贤经验方对股骨骨不连大鼠病理变化的影响

干预 8 周时,空白组大鼠的股骨干骨质结构正常、软骨细胞排列有序,模型组大鼠软骨细胞出现核聚缩、软骨细胞坏死、骨小梁细胞减少,实验组大鼠软骨细胞排列紊乱和结构缺陷减缓。见图 2。

2.4 郑怀贤经验方对股骨骨不连大鼠成骨细胞的影响

干预前,模型组大鼠血清 BALP、OC、PINP 均低于空白组 ($P < 0.05$),实验组大鼠血清 BALP、OC、PINP 与模型组大鼠比较差异无统计意义 ($P > 0.05$);干预 4、8 周时,模型组大鼠血清 BALP、OC、

PINP 均低于空白组 ($P < 0.05$),但实验组大鼠血清 BALP、OC、PINP 均高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1-表 3。

2.5 郑怀贤经验方对股骨骨不连大鼠血清 TGF- β 、VEGF、BMP-2 水平的影响

干预前,模型组大鼠血清 TGF- β 、VEGF、BMP-2 水平均低于空白组 ($P < 0.05$),实验组大鼠血清 TGF- β 、VEGF、BMP-2 与模型组大鼠差异无统计意义 ($P > 0.05$);干预 4、8 周,模型组大鼠血清 TGF- β 、VEGF、BMP-2 均低于空白组 ($P < 0.05$),实验组大鼠血清 TGF- β 、VEGF、BMP-2 均高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 4-表 6。

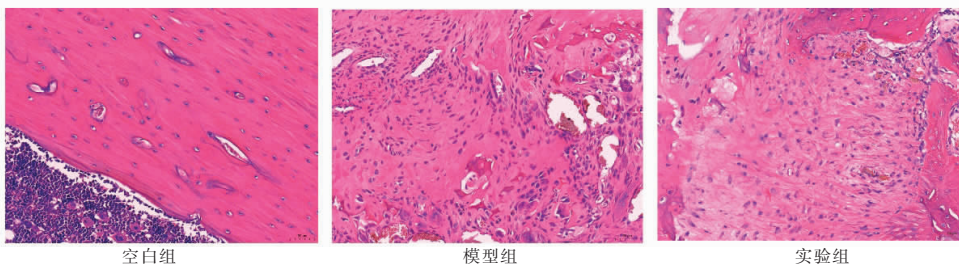


图 2 各组大鼠股骨病理变化 (HE $\times 200$)

表 1 各组大鼠血清 BALP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	干预前	干预 4 周	干预 8 周
空白组 ($n=12$)	15.82 \pm 1.69	15.57 \pm 1.73	15.72 \pm 1.98
模型组 ($n=12$)	8.52 \pm 1.87*	7.14 \pm 1.59*	6.26 \pm 1.66*
实验组 ($n=12$)	8.69 \pm 1.92	10.76 \pm 1.35#	13.51 \pm 1.85#
F 值	62.248	87.674	87.303
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$,与空白组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较。

表 2 各组大鼠血清 OC 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	干预前	干预 4 周	干预 8 周
空白组 ($n=12$)	14.22 \pm 1.63	14.54 \pm 1.69	14.37 \pm 1.81
模型组 ($n=12$)	8.33 \pm 1.38*	7.03 \pm 1.08*	5.98 \pm 1.22*
实验组 ($n=12$)	8.46 \pm 1.25	12.84 \pm 1.42#	15.84 \pm 1.34#
F 值	66.514	92.447	155.277
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$,与空白组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较。

表 3 各组大鼠血清 PINP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	干预前	干预 4 周	干预 8 周
空白组 ($n=12$)	2.89 \pm 0.24	2.94 \pm 0.19	2.88 \pm 0.21
模型组 ($n=12$)	2.08 \pm 0.16*	1.86 \pm 0.13*	1.81 \pm 0.17*
实验组 ($n=12$)	2.13 \pm 0.13	2.56 \pm 0.15#	3.16 \pm 0.19#
F 值	74.098	143.110	167.505
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$,与空白组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较。

表 4 各组大鼠血清 TGF- β 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	干预前	干预 4 周	干预 8 周
空白组 ($n=12$)	2.98 \pm 0.12	2.95 \pm 0.13	2.99 \pm 0.15
模型组 ($n=12$)	1.79 \pm 0.17*	1.61 \pm 0.15*	1.54 \pm 0.13*
实验组 ($n=12$)	1.80 \pm 0.16	2.34 \pm 0.18#	2.81 \pm 0.11#
F 值	244.581	225.677	436.637
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$,与空白组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较。

表5 各组大鼠血清 BMP-2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	干预前	干预4周	干预8周
空白组(n=12)	1.59 ± 0.12	1.62 ± 0.11	1.63 ± 0.09
模型组(n=12)	1.02 ± 0.08*	0.81 ± 0.09*	0.76 ± 0.10*
实验组(n=12)	1.04 ± 0.10	1.39 ± 0.12 [#]	1.69 ± 0.11 [#]
F 值	122.299	181.283	322.927
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

*P < 0.05, 与空白组比较; #P < 0.05, 与模型组比较。

表6 各组大鼠血清 VEGF 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	干预前	干预4周	干预8周
空白组(n=12)	94.56 ± 4.87	95.71 ± 5.33	95.18 ± 5.49
模型组(n=12)	67.56 ± 5.04*	60.42 ± 4.89*	55.17 ± 4.43*
实验组(n=12)	66.38 ± 4.73	87.71 ± 5.32 [#]	78.34 ± 5.27 [#]
F 值	127.946	152.868	187.359
P 值	0.002	<0.001	<0.001

*P < 0.05, 与空白组比较; #P < 0.05, 与模型组比较。

3 讨论

中医学对骨不连病因、病机认知发现骨不连与肝肾不足、血瘀、气血亏虚等关系密切,骨不连的标在筋骨、本在肝肾^[6]。清代医学名家陈士铎提出血瘀不去、骨不生的观点,认为骨折愈合过程为瘀去、新生、骨合,肢体损伤在外,气血损伤在内,骨折久致正气耗伤,易出现气血两虚,筋骨失濡养,最终导致骨不连。本研究显示,经郑怀贤经验方治疗后,股骨骨不连大鼠的活动状态增加、食欲增加且毛发、色泽均得到明显改善,外敷治疗4周大鼠股骨干缺损部位有明显骨痂,持续治疗至第8周,大鼠股骨缺损部位消失,骨皮质连续,股骨干软骨细胞排列紊乱及结构缺损情况得到明显改善,说明郑怀贤经验方能促进股骨骨不连大鼠骨折处愈合。郑怀贤经验方中的苏木可行血祛瘀、消肿止痛,骨碎补活血续伤,自然铜散瘀、接骨止痛,蟹粉补骨添髓、养筋活血,当归、赤芍、血余炭活血祛瘀,儿茶收湿敛疮、生肌止血、活血止痛,丁香、木香、没药和川芎活血、行气、止痛,羌活、独活散寒、祛风、除湿,白及消肿、生肌;诸药合用有活血、祛瘀、止痛和续接筋骨功效,促进骨不连骨折恢复。

正常骨折愈合需经过肿胀、血肿机化、原始骨痂、骨痂改造和塑形阶段,受到多种因子共同调节,成骨细胞在该过程中发挥重要作用,可促进骨痂形成,骨折损伤可引起骨折端骨组织血供减少,恶化骨折愈合环境^[7-8]。BALP、OC 和 PINP 均由成骨细胞合成分泌, BALP 通过水解磷酸酶供给磷酸促进羟

基磷灰石沉积、成骨形成^[9];血 OC 含量增加可增强成骨细胞活性,是骨基质矿化的必需物质^[10],可抑制破骨细胞活性^[11];PINP 是骨组织有机质的主要成分,血液系统中 PINP 含量升高反映成骨细胞合成骨胶原能力增强^[12]。本研究显示郑怀贤经验方干预后,实验组股骨骨不连大鼠血清 BALP、OC、PINP 水平高于模型组,与王军威等^[13]研究结果相似,说明郑怀贤经验方可促进股骨骨不连大鼠骨愈合,这可能与成骨细胞活性增加有关。

骨折愈合过程中,VEGF 作为主要血管调节因子,可促进血管重建、修复,为骨痂提供充足血液供给和良好的营养环境^[14-15]。TGF- β 参与创伤愈合、组织纤维化和成骨生成过程,促进刺激 I 型胶原合成、膜内成骨及软骨细胞合成、骨痂形成^[16-17]。BMP-2 是骨形态发生蛋白家族成员,可调节骨祖细胞增殖、分化,诱导未分化间充质细胞分化为成骨细胞,促使新骨形成^[18-19]。本研究中,郑怀贤经验方干预后,实验组股骨骨不连大鼠血清 TGF- β 、VEGF、BMP-2 水平均高于模型组,与既往研究^[20-21]结果相似,说明郑怀贤经验方能通过提高 TGF- β 、VEGF、BMP-2 水平促进成骨形成、股骨骨不连骨愈合。

综上,郑怀贤经验方可促进股骨骨不连大鼠骨折恢复,其作用机制可能与促进成骨细胞活性以及提高 TGF- β 、VEGF、BMP 水平有关。

参考文献

- [1] Wildemann B, Ignatius A, Leung F, et al. Non-union bone fractures [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2021, 7(1): 57.
- [2] Hofman M, Andruszkow H, Heyer FL, et al. Risk factors of non-union in intramedullary stabilized diaphyseal long bone fractures: identifying the role of fracture stabilization strategies and concomitant injuries [J]. European Journal of Trauma and Emergency Surgery: Official Publication of the European Trauma Society, 2021, 47(6): 1903 - 1910.
- [3] 叶家军, 巫宗德, 周春阳, 等. 运用郑氏伤科治法治疗胫腓骨骨干骨折临床疗效观察 [J]. 四川中医, 2010, 28(3): 104 - 106.
- [4] 秦雪飞, 徐永平. 功能锻炼配合郑氏伤科药物手法预防桡远骨折后关节功能障碍 [J]. 四川中医, 2018, 36(8): 148 - 149.
- [5] 徐晓峰, 李阳, 钱栋, 等. 骨形态发生蛋白 2 和血管内皮生长因子 mRNA 在股骨骨不连大鼠损伤区域的动态表达 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010(37): 6857 - 6860.
- [6] 中医出版中心. 黄帝内经素问 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [7] ElHawary H, Baradaran A, Abi-Rafeh J, et al. Bone healing and inflammation: principles of fracture and repair [J]. Seminars in Plastic Surgery, 2021, 35(3): 198 - 203.

(下转第 1035 页)