

## • 实验研究 •

## 活血止痛汤联合脂肪填充对大鼠胫骨骨骺损伤的影响

郑志刚<sup>1</sup> 张伦广<sup>1△</sup> 潘三元<sup>1</sup> 刘小钰<sup>1</sup> 冯敏山<sup>2</sup> 付亚君<sup>1</sup> 张晓格<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨活血止痛汤联合脂肪填充对大鼠胫骨远端Ⅲ型和Ⅳ型骨骺损伤的作用。方法:36只大鼠随机分为对照组、模型组、脂肪组和脂肪中药组,采用阿利新蓝、免疫荧光染色观察损伤模型的建立及骨骺损伤愈合过程、骨桥形成过程及血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白2(BMP2)和白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的表达情况。结果:阿利新蓝染色结果显示:相较于对照组,模型组骨骺损伤明显并形成骨桥,然而加入脂肪和活血止痛汤干预后,骨骺损伤明显改善,骨桥消失,脂肪中药组效果更为明显。免疫荧光结果表明:对比对照组,模型组 VEGF、BMP2 和 IL-1 $\beta$  的表达均有明显增加;而相较于模型组,脂肪组和脂肪中药组的 VEGF、BMP2 和 IL-1 $\beta$  的表达均有所降低,并且脂肪中药组的 VEGF、BMP2 和 IL-1 $\beta$  的表达下降更为明显。结论:活血止痛汤联合脂肪填充治疗大鼠胫骨远端Ⅲ型和Ⅳ型骨骺损伤疗效明显好于单纯脂肪干预。

**[关键词]** 大鼠胫骨远端Ⅲ型和Ⅳ型骨骺损伤;活血止痛汤;脂肪填充;骨桥;软骨细胞

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)03-0012-05

**DOI:** 10. 20085/j. cnki. issn1005-0205. 240303

Effect of Huoxue Zhitong Decoction Combined with Fat Filling  
on the Injury of Fibial Epiphyseal in FatsZHENG Zhigang<sup>1</sup> ZHANG Lunguang<sup>1△</sup> PAN Sanyuan<sup>1</sup> LIU Xiaoyu<sup>1</sup>  
FENG Minshan<sup>2</sup> FU Yajun<sup>1</sup> ZHANG Xiaoge<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Luohu District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518001, Guangdong China;

<sup>2</sup> Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China.

**Abstract Objective:** To investigate the effect of Huoxue Zhitong decoction combined with fat filling on the type III and IV epiphyseal injury of distal tibia in rats. **Methods:** 36 rats were randomly divided into control group, model group, adipose group and adipose Chinese medicine group. The establishment of injury model, the healing process of epiphyseal injury, bone bridge formation and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), bone morphogenetic protein-2 (BMP2) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were observed by alcian blue staining and immunofluorescence staining. **Results:** Compared with the control group, alcian blue staining showed that the epiphyseal injury was obvious in the model group, and bone bridge was formed. However, after the intervention of adipose and Huoxue Zhitong decoction, the epiphyseal injury was obviously improved and bone bridge disappeared, and the effect of adipose Chinese medicine group was more obvious. Immunofluorescence results indicated that compared with the control group, the expressions of VEGF, BMP2 and IL-1 $\beta$  were significantly increased in the model group, while the expressions of VEGF, BMP2 and IL-1 $\beta$  were decreased in the fat group and the fat Chinese medicine group, and the expressions of VEGF, BMP2 and IL-1 $\beta$  were more significantly decreased in the fat Chinese medicine group. **Conclusion:** The therapeutic efficacy of Huoxue Zhitong decoction combined with fat filling on the type III and IV epiphyseal injury of distal tibia in rats is significantly better than simple fat intervention.

基金项目:广东省中医药局中医药科研项目(20221346)

深圳市“医疗卫生三名工程”项目(SZZYSM202101005)

<sup>1</sup> 深圳市罗湖区中医院(广东 深圳, 518001)

<sup>2</sup> 中国中医科学院望京医院

<sup>△</sup> 通信作者 E-mail: 5098290@qq. com

tion.

**Keywords:** type III and IV epiphyseal injury of distal tibia in rats; Huoxue Zhitong decoction; fat filling; bone bridge; cartilage cells

胫骨远端骨骺损伤是儿童骨骺的常见损伤,骨骺损伤的 Salter-Harris(SH)分型中Ⅲ型和Ⅳ型骨骺损伤,即使经过正规的保守治疗或手术治疗,仍有可能发生生长功能紊乱和关节畸形<sup>[1-2]</sup>,甚至终身残疾<sup>[3]</sup>。活血止痛汤可促进胫骨骨折的恢复<sup>[4-6]</sup>,笔者对儿童胫骨远端骨骺损伤通过早期保守治疗、微创手术及活血止痛汤内服治疗后,极少会留下肢体短缩及关节畸形等并发症。本研究探讨活血止痛汤联合脂肪填充对大鼠胫骨远端骨骺损伤的调控作用,以明确活血止痛汤对骨骺损伤的作用机制,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和分组

SD 雄性大鼠 36 只,6~8 周龄,体重为 180~250 g,购自广东省实验动物中心,许可证号为 SYXK(鄂)2018-0101。随机分为 4 组:第一组(对照组)9 只大鼠正常饮食和饮水,不做任何处理。第二组(模型组)9 只大鼠用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后手术操作:取 5 mm 皮肤竖直切口,暴露胫骨远端前内侧,用高速牙科磨钻(钻头直径为 2 mm),在近生长板 5 mm 处骨干中间处开窗,再将钻头通过此窗插入干骺端生长板中间造成骨骺损伤<sup>[7-8]</sup>。第三组(脂肪组)9 只大鼠胫骨远端骨骺双侧损伤,右侧单纯损伤,左侧损伤后植入自体脂肪。第四组(脂肪中药组)9 只大鼠胫骨远端骨骺双侧损伤,右侧单纯损伤,左侧损伤后植入自体脂肪,同时给予活血止痛汤内服。取材时间:术后第 3 天和第 28 天。3 只一笼,所有大鼠在 21~25℃室温,湿度为 55%~65%,12 h/12 h 明暗交替的饲养房中喂养,常规饲养,正常饮食和饮水。本研究经本院伦理委员会批准。

### 1.2 实验药物及试剂

活血止痛汤成分:地鳖虫 9 g,乳香 3 g,当归 6 g,三七 3 g,落得打 6 g,川芎 2 g,陈皮 3 g,苏木 6 g,紫荆藤 9 g,红花 2 g,没药 3 g,赤芍 3 g,总计 55 g。活血止痛汤购于深圳市罗湖区中医院药剂科并由深圳市罗湖区中医院中药房煎药室煎制,熬制方法和相关程序严格按照《中国药典》相关规定执行;熬成 200 mL 药液,配制好所需浓度的活血止痛汤,放入 4℃冰箱备用。采用人与大鼠的体表面积公式进行相关换算,按照大鼠以 200 g 为标准体重计算,给予 2 mL 中药灌胃,2 次/d,给药量相当于含生药 5.5 g/(kg·d),共计 14 d。试剂为:阿利新蓝染液(Servicebio,批号为 G1027),组织固定液(Servicebio,批号为 G1101),脱蜡液(Servicebio,批号为 G1128),核固红染液(Servicebio,批号为 G1035),DAPI 染色试剂(Servicebio,批号为 G1012),柠檬酸抗原修复液(Servicebio,批号为 G1202),组织自发荧光淬灭剂(Servicebio,批号为

G1221),抗荧光淬灭封片剂(Servicebio,批号为 G1401),EDTA 抗原修复液(Servicebio,批号为 G1206),牛血清白蛋白(BSA,Servicebio,批号为 GC305010),血管内皮生长因子(VEGF)一抗(Servicebio,批号为 GB112339),骨形态发生蛋白 2(BMP2)一抗(Servicebio,批号为 GB12252),白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )一抗(Servicebio,批号为 GB11113)。

### 1.3 主要仪器和设备

病理切片机(上海徕卡仪器有限公司),脱水机(意大利迪佩斯公司),包埋机(武汉俊杰电子有限公司),烤箱(天津市莱玻瑞仪器设备有限公司),组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司),冰冻切片机(赛默飞世尔科技有限公司),扫描仪(3DHISTECH 公司)。

### 1.4 阿利新蓝染色

按照前面所述方法干预后提取大鼠骨组织,进行阿利新蓝染色,首先将组织脱蜡至水,经冰冻切片和细胞爬片固定后用阿利新蓝染色;随后用核固红染液染核并进行脱水封片;最后在显微镜下观察形态学改变。

### 1.5 免疫荧光染色

将上述方法分离的各组大鼠的骨组织进行荧光染色,先制作石蜡切片,后将组织脱蜡至水,经抗原修复和血清封闭后,加一抗 4℃过夜,并加对应的二抗室温作用 1 h,用 DAPI 染核后封片,在荧光显微镜下观察小鼠组织中 VEGF、BMP2 和 IL-1 $\beta$  的表达情况。

### 1.6 统计学方法

对样本分析处理、采集数据,每一部位测量三次取平均值,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  形式表示。统计分析采用 SPSS22.0 软件,统计处理采用方差分析和  $t$  检验,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 阿利新蓝染色结果

相较于对照组,模型组出现创伤并伴有大量炎症细胞,形成血肿,出现骨桥;加入脂肪和活血止痛汤干预后,炎症细胞减少,血肿消退,骨桥明显改善、消失,并且脂肪中药组效果更为明显(见图 1),表明活血止痛汤可改善大鼠胫骨远端骨骺损伤。

### 2.2 免疫荧光染色结果

免疫荧光染色结果显示:对比对照组,模型组 VEGF、BMP2 和 IL-1 $\beta$  的表达均有明显增加;而相较于模型组,脂肪组和脂肪中药组的 VEGF、BMP2 和 IL-1 $\beta$  的表达均有所降低,并且脂肪中药组的 VEGF、BMP2 和 IL-1 $\beta$  的表达下降更为明显(见图 2),表明活血止痛汤联合脂肪填充对大鼠胫骨远端骨骺损伤具有改善作用,这种改善作用可能是通过调控 VEGF、BMP2 和 IL-1 $\beta$  的表达来实现的。

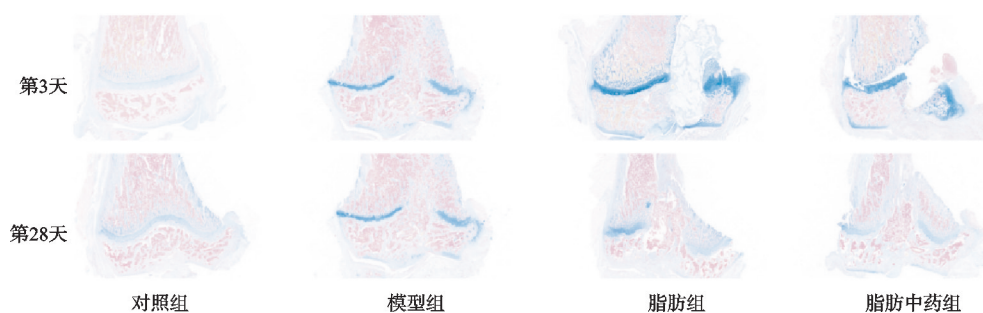


图1 阿利新蓝染色结果(×100)

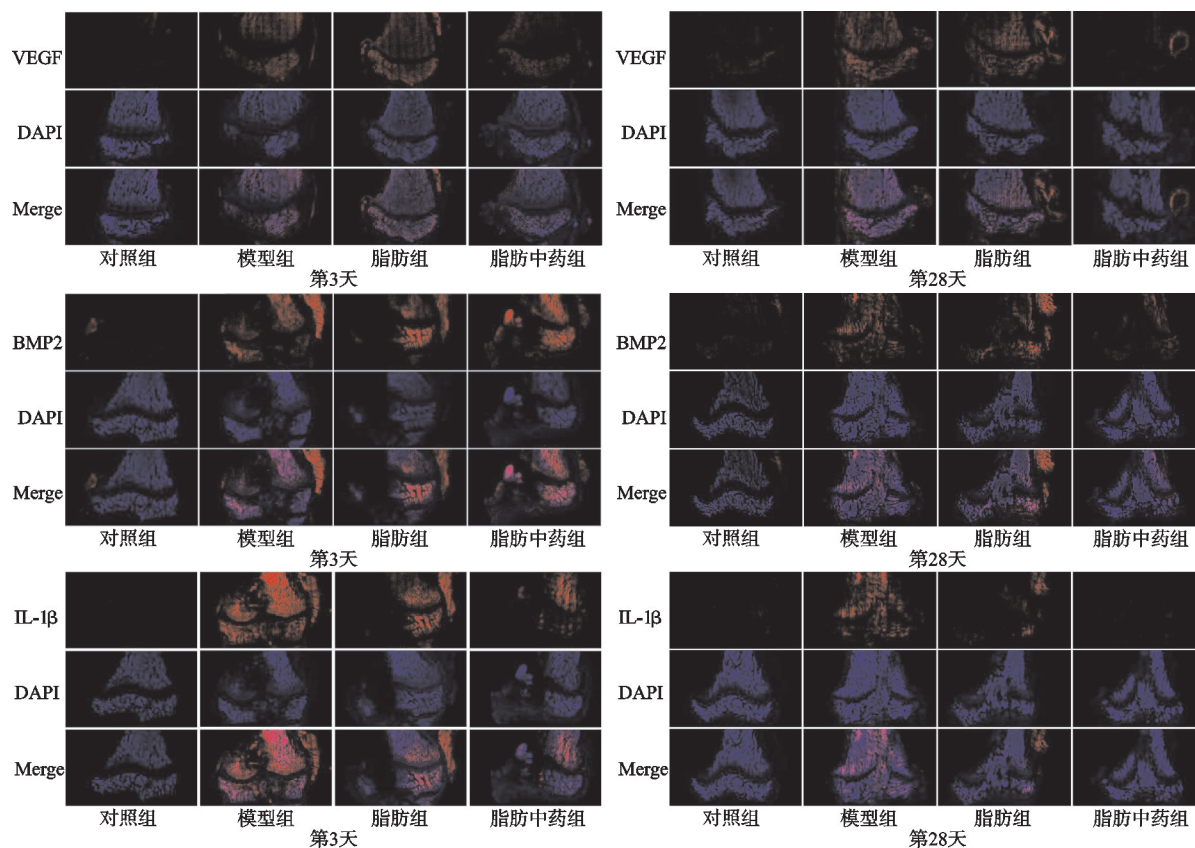


图2 免疫荧光染色结果(×100)

### 3 讨论

胫骨远端骨骺损伤防治历来是个难点,其导致的一系列后果目前仍缺乏较好的解决措施。目前,西医疗手段众多,临床上可用生物材料(如脂肪填充)预防骨桥形成,进而改善胫骨远端骨骺损伤,用脂肪填充兔骨桥切除后的空间,发现不会再次出现骨桥<sup>[9]</sup>;运用组织工程技术也可以预防骨桥形成,如将软骨细胞置于骨骺损伤区域,可减轻兔患足的畸形<sup>[10]</sup>;其他的手法治疗和手术治疗均有一定的效果,但多数都有操作难度高、移植物缺乏和移植排斥等问题,所以探寻防治胫骨远端骨骺损伤的有效措施具有实际价值。

在中医药领域文献中并没有提及骨骺损伤,但归属于骨折损伤的范畴,骨折早期中医辨证属气滞血瘀,治疗以活血化瘀、消肿止痛为主。清朝陈士铎在《辨证录》中云“血不活者瘀不去,瘀不去则骨不能接也”。中

医学认为骨折后出现的肿胀是由于离经之血溢出,瘀积阻滞,引起局部脉络运行不畅,继而发生局部肿胀;而血液瘀积则导致脉络不通,患者自觉局部疼痛加剧;同时引起局部气血失调,筋脉不能获得良好的濡养,加之患肢疼痛及水肿等症状,对骨折的愈合及骨折部位的功能恢复产生严重影响。因此,中医治疗应以活血化瘀为基本原则,实现止痛、消肿、消散瘀血以促进患者康复的目的。宋代杨仁斋在《直指附遗方论》中指出:“盖气为血帅也,气行则血行,气止则血止,气温则血滑,气寒则血凝,气有一息之不运,则血亦有一息之不行。”传统中医利用先活血化瘀,同时需与理气兼顾,因为伤血必及气,因此认为在治血的同时要治气,治疗宜以活血化瘀、行气、利水消肿、改善血液循环为主。通过改善血液循环,代谢产物的清除和渗出水肿的吸收,减少对神经末梢的刺激,缓解疼痛。活血止痛汤用



于骨折后早期的治疗,功效为活血化瘀,通络、止痛、行气,可改善骨折的局部微循环,消肿利水,促进骨痂形成,大大缩短骨折的愈合时间。活血止痛汤加减方中:当归、红花、川芎、赤芍、苏木活血通经,乳香、没药、三七活血止痛,地鳖虫、紫荆皮、落得打破瘀通经、消肿止痛,陈皮理气化滞。诸药合用,共奏活血化瘀、通经止痛之功效,兼治标本,药效持久,药力温和。这可能与活血止痛汤早期及时的祛除瘀血,促进生长板损伤的修复有关。活血止痛汤用于早期骨折的治疗,可促进血液循环和骨痂形成,最终促使骨折愈合。有研究表明,活血止痛汤加脱水剂治疗胫骨骨折,其疗效明显好过单纯脱水干预<sup>[11]</sup>。本研究中阿利新蓝染色结果表明:与对照组相比,模型组创伤形成,出现大量炎症细胞,血肿形成并机化,出现骨桥并形成成熟骨小梁,然而脂肪填充处理后,炎症减退,血肿减少,骨桥明显改善,并且加入活血止痛汤联合干预后效果更好,表明活血止痛汤可改善胫骨远端骨骺损伤。

血管内皮生长因子是重要的信号分子,在骨组织中发挥着重要作用。研究发现血管内皮生长因子是介导骨组织与血管生成过程中重要的调节因子<sup>[12-14]</sup>,有报道称血管内皮生长因子是骨骺损伤后血管生成的重要原因,而血管生成是诱发骨骺损伤后骨桥形成的关键因素<sup>[15]</sup>。骨骺损伤后血管内皮生长因子表达显著升高,经抗血管内皮生长因子处理后,可影响骨骺损伤后血管的生成和骨组织含量,并抑制骨桥的形成<sup>[16-17]</sup>,抗血管内皮生长因子可能在抑制骨桥形成进而改善骨骺损伤中发挥重要作用。本研究中免疫荧光结果显示,经活血止痛汤联合脂肪处理的大鼠,血管内皮生长因子表达较模型组明显下调,提示活血止痛汤联合脂肪填充可能通过调控血管内皮生长因子表达来改善胫骨远端骨骺损伤。

骨形态发生蛋白 2 具备较强的骨诱导能力,能够促进骨的发育和再生,并可诱导骨胶原的生成<sup>[18-19]</sup>。有研究发现骨形态发生蛋白 2 基因敲除的大鼠骺板内软骨细胞排列紊乱,形态异常,因此骨形态发生蛋白 2 是研究软骨生长发育情况的重要标志物<sup>[20-23]</sup>。有研究表明骨形态发生蛋白 2 在骨骺损伤的纤维形成阶段及骨桥形成阶段高度表达<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,相较于对照组,模型组骨形态发生蛋白 2 表达明显升高,而经活血止痛汤联合脂肪填充处理后,骨形态发生蛋白 2 表达显著下降,提示活血止痛汤联合脂肪填充可能通过调控骨形态发生蛋白 2 表达进而改善胫骨远端骨骺损伤。

白细胞介素 1(IL-1)对骺板软骨细胞具有明确的作用,可抑制软骨细胞增殖,减少胶原合成<sup>[25]</sup>。有研究表明,IL-1 $\beta$  等细胞因子也被视作诱发软骨细胞代

谢功能异常的重要因素<sup>[26]</sup>。IL-1 $\beta$  可诱导软骨细胞释放蛋白水解酶和产生其他炎性细胞因子<sup>[27]</sup>。IL-1 $\beta$  可刺激机体产生 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  等一系列细胞因子,这些细胞因子广泛参与软骨细胞的炎症损伤、变性和坏死<sup>[28]</sup>。本研究结果显示,经活血止痛汤联合脂肪填充处理后,大鼠的 IL-1 $\beta$  表达对比模型组明显下调,提示活血止痛汤联合脂肪填充可能通过调控 IL-1 $\beta$  表达从而改善胫骨远端骨骺损伤。

本研究具有一定的局限性,仅探讨了活血止痛汤联合脂肪填充干预后对大鼠胫骨远端骨骺损伤的有效性,初步探讨了活血止痛汤可能通过调控血管内皮生长因子、骨形态发生蛋白 2 和 IL-1 $\beta$  的表达进而促进胫骨远端骨骺损伤恢复,是否还会调控其他关键蛋白进而发挥作用仍有待进一步研究,并且没有深入分析其作用机理,活血止痛汤是通过何种信号通路参与调控胫骨远端骨骺损伤也有待分析。

综上所述,本研究以胫骨远端骨骺损伤大鼠为研究对象,初步证明活血止痛汤联合脂肪填充可减轻血肿和炎症,改善骨桥,促使血管内皮生长因子、骨形态发生蛋白 2 和 IL-1 $\beta$  的表达降低,进而促进胫骨远端骨骺损伤恢复,并且中药联合使用效果显著优于单纯脂肪填充,因此活血止痛汤具有很好的推广应用价值。下一步将结合体内外实验,对实验结果进一步佐证,并进一步深入探究活血止痛汤改善胫骨远端骨骺损伤相关信号通路,为活血止痛汤的临床应用提供科学证据。

## 参考文献

- [1] 李欢,沈忆新. 胫骨远端骨折的治疗进展[J]. 生物骨科材料与临床研究,2007,4(4):30-32.
- [2] 马长生,李郑林,王明千,等. 小儿胫骨远端不稳定性骨折的治疗体会[J]. 中医正骨,2007,19(5):30.
- [3] NGUYEN J C, MARKHARDT B K, MERROW A C, et al. Imaging of pediatric growth plate disturbances[J]. Radiographics,2017,37(6):1791-1812.
- [4] 韩乐乐. 活血止痛汤加减在胫骨远端骨折术后肢体肿胀患者中的应用观察[J]. 实用中西医结合临床,2021,21(24):74-75.
- [5] 时坤,孟凡军,冯哲. 活血止痛汤对胫骨平台骨折患者术后 DVT 形成、凝血指标及关节功能的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志,2023,15(6):990-993.
- [6] 吴笛,戴丽冰,杨健生,等. 活血止痛汤对胫骨平台骨折术后患者疼痛程度及膝关节功能的影响[J]. 中国民间疗法,2022,30(10):56-59.
- [7] WATTENBARGER J M, GRUBER H E, PHIEFFER L S. Physeal fractures, part I: histologic features of bone, cartilage, and bar formation in a small animal model[J]. J Pediatr Orthop,2002,22(6):703-709.
- [8] LEE M A, NISSEN T P, OTSUKA N Y. Utilization of a murine model to investigate the molecular process of

- transphyseal bone formation[J]. *J Pediatr Orthop*, 2000, 20(6):802-806.
- [9] 张克勇,余国荣,余黎,等. 切除骨桥并填塞带血供脂肪筋膜瓣治疗中心型骨桥形成的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(11):2364-2366.
- [10] LEE S U, LEE J Y, JOO S Y, et al. Transplantation of a scaffold-free cartilage tissue analogue for the treatment of physeal cartilage injury of the proximal tibia in rabbits[J]. *Yonsei Med J*, 2016, 57(2):441-448.
- [11] 邹永华,邱敏. 活血止痛汤联合脱水剂治疗胫骨平台骨折术后患肢肿胀的临床疗效分析[J]. *中国医药指南*, 2023, 21(15):49-52.
- [12] FERRARA N, DAVIS-SMYTH T. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. *Endocr Rev*, 1997, 18(1):4-25.
- [13] GERBER H P, VU T H, RYAN A M, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation[J]. *Nature Medicine*, 1999, 5(6):623-628.
- [14] ZELZER E, MAMLUK R, FERRARA N, et al. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development[J]. *Development*, 2004, 131(9):2161-2171.
- [15] CHUNG R, XIAN C J. Recent research on the growth plate; mechanisms for growth plate injury repair and potential cell-based therapies for regeneration[J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 53(1):T45-T61.
- [16] FISCHERAUER E, HEIDARI N, NEUMAYER B, et al. The spatial and temporal expression of VEGF and its receptors 1 and 2 in post-traumatic bone bridge formation of the growth plate[J]. *J Mol Histol*, 2011, 42(6):513-522.
- [17] SU Y W, CHUNG R, RUAN C S, et al. Neurotrophin-3 induces BMP-2 and VEGF activities and promotes the bony repair of injured growth plate cartilage and bone in rats[J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31(6):1258-1274.
- [18] SUN J, LI J, LI C, et al. Role of bone morphogenetic protein-2 in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3):4230-4237.
- [19] FASSBENDER M, MINKWITZ S, THIELE M, et al. Efficacy of two different demineralised bone matrix grafts to promote bone healing in a critical-size-defect: a radiological, histological and histomorphometric study in rat femurs[J]. *Int Orthop*, 2014, 38(9):1963-1969.
- [20] SHU B, ZHANG M, XIE R, et al. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 20):3428-3440.
- [21] MOGHADDAM A, BREIER L, HAUBRUCK P, et al. Non-unions treated with bone morphogenic protein 7: introducing the quantitative measurement of human serum cytokine levels as promising tool in evaluation of adjunct non-union therapy[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2016, 13(13):3.
- [22] GERAGHTY S, KUANG JQ, YOO D, et al. A novel, cryopreserved, viable osteochondral allograft designed to augment marrow stimulation for articular cartilage repair[J]. *J Orthop Surg Res*, 2015, 10:66.
- [23] LIN D, ZUO S, LI L, et al. Treatment of neglected femoral neck fractures using the modified dynamic hip screw with autogenous bone and bone morphogenetic protein-2 composite materials grafting[J]. *Indian J Orthop*, 2015, 49(3):342-346.
- [24] MACSAI C E, GEORGIU K R, FOSTER B K, et al. Microarray expression analysis of genes and pathways involved in growth plate cartilage injury responses and bony repair[J]. *Bone*, 2012, 50(5):1081-1091.
- [25] DE CROMBRUGGHE B, LEFEBVRE V, NAKASHIMA K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(6):721-727.
- [26] YI H, ZHANG W, CUI Z M, et al. Resveratrol alleviates the interleukin-1 $\beta$ -induced chondrocytes injury through the NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1):424.
- [27] JIANG J, CAI M. Cardamonin inhibited IL-1 $\beta$  induced injury by inhibition of NLRP3 inflammasome via activating Nrf2/NQO-1 signaling pathway in chondrocytes[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31(6):794-802.
- [28] LU X, YU Y, YIN F, et al. Knockdown of PVT1 inhibits IL-1 $\beta$ -induced injury in chondrocytes by regulating miR-27b-3p/TRAF3 axis[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 79:106052.

(收稿日期:2023-09-06)