

盘龙七片抑制老年大鼠髋部骨折后炎症反应的机制研究

李金生¹ 席刚^{1△} 张志伟¹ 张福杰¹

[摘要] 目的:探讨中成药盘龙七片对髋部骨折后炎症损伤的保护作用及机理。方法:采用左侧髋部骨折法制备髋部骨折老年大鼠模型,灌胃给药盘龙七片后检测模型鼠血清及体外巨噬细胞、单核细胞中炎症因子 IL-6, TGF- β , IL-1 β , IL-10, BAFF 的表达变化及 Th17 细胞应答的变化。结果:盘龙七片组模型鼠血清中及体外巨噬细胞、单核细胞中炎症因子 IL-6, TGF- β , IL-1 β , IL-17, BAFF 水平均显著降低,而抑炎因子 IL-10 水平则明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);同时,盘龙七片对促 Th17 因子的抑制作用则可被 rBAFF 削弱,而被 BAFF 单抗处理加强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:盘龙七片可通过抑制 BAFF 激活的 Th17 炎症反应进而发挥对髋部骨折后的治疗作用。

[关键词] 盘龙七片;髋部骨折;大鼠模型;细胞因子;炎症反应

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)08-0017-04

Research on the Mechanism of Panlongqi Tablet Inhibiting Inflammation after Hip Fracture in Aged Rats

LI Jinsheng¹ XI Gang^{1△} ZHANG Zhiwei¹ ZHANG Fujie¹

¹Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.

Abstract Objective: To investigate the protective mechanism of Panlongqi tablet on aged rats with hip fracture. **Methods:** The rat model was established by left hip fracture method. After intragastric administration of Panlongqi tablet, the expression changes of inflammatory factors IL-6, TGF- β , IL-1 β , IL-10, BAFF as well as the Th17 cell response were tested from serum in vivo as well as macrophages and monocytes in vitro. **Results:** After administrated with Panlongqi tablet, the levels of inflammatory factors IL-6, TGF- β , IL-1 β , IL-10 and BAFF in serum as well as macrophages and monocytes were significantly reduced, while the levels of anti-inflammatory factor IL-10 were significantly increased ($P < 0.05$). Meanwhile, the inhibitory effect of Panlongqi tablet on pro-Th17 factor was weakened by rBAFF and strengthened by BAFF monoclonal antibody ($P < 0.05$). **Conclusion:** Panlongqi tablet play protective role in hip fracture by reducing the inflammatory response via inhibiting BAFF-activated Th17 response.

Keywords: Panlongqi tablet; hip fracture; rat model; cytokines; inflammation

髋部骨折是多发于股骨颈骨或股骨粗隆间的骨科常见病,以老年人群发病率最高^[1]。老年髋部骨折早期会出现全身应激及炎症反应,严重者可引起多器官并发症,影响患者预后甚至危及患者生命^[2-3]。因此,开展相关的药物机制研究对于髋部骨折临床治疗具有重要意义。以活血化瘀、消肿止痛等中药制剂辅助改善患者症状是老年髋部骨折术后恢复或保守治疗的有效方式^[4-5]。盘龙七片是由著名老中医王家成老先生所献祖传秘方经科学研制而成的中成药,临床应用表明其对骨折、骨关节炎等骨科疾病具有显著疗效^[6-8],

然而其具体作用机制尚不完全清楚。本研究拟以髋部骨折大鼠模型为对象,分析盘龙七片对于髋部骨折后炎症反应的抑制作用及机制,为解析中药盘龙七片治疗髋部骨折的药理机制提供佐证。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞

雄性 SD 大鼠(12 个月龄,体质量 500~600 g)来自山西医科大学实验动物中心,巨噬细胞由本实验室保存。

1.2 主要试剂

盘龙七片(陕西盘龙药业集团股份有限公司,国药准字 Z61020050);ELISA 试剂盒(Invitrogen 公司);重组鼠 BAFF(rBAFF)(Enzo Sciences);BAFF 抗体

¹ 山西医科大学第二医院(太原,030001)

[△]通信作者 E-mail:1003007294@qq.com

(Adipogen); MTT 细胞增殖-毒性检测试剂盒购买自碧云天生物技术研究; 流式细胞仪购买自 Becton-Dickinson 公司。

1.3 方法

1.3.1 大鼠模型制备与处理 大鼠模型制备参照赵小丹等^[9]方法。大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 采用仰卧位于骨折打击器底板, 左下肢置于砧板, 以钢板垫高下肢使髋关节伸直, 大鼠下肢外旋髋关节正位时固定, 使打击器尖端与大鼠粗隆间连线一致, 500 g 砝码从 17 cm 高处自由落下, 制造大鼠左侧髋部骨折。造模后常规饲养。

模型大鼠随机分为模型组、处理组, 以正常喂养的大鼠为正常对照组。处理组按 1.288 5 g/kg 体质量 (临床成人剂量 10 倍) 灌胃给药盘龙七片, 2 次/d, 连续 4 周。正常对照组与模型组正常喂养。

1.3.2 细胞培养与处理 巨噬细胞 264.7 培养于含 10% (V/V) 胎牛血清、100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中, 37 °C 培养。

外周血单核细胞: 用密度梯度离心法分离自正常大鼠外周血。

CD4⁺ T 细胞: 采用磁性细胞分选试剂盒从单核细胞中分离纯化, 流式细胞仪检测其纯度达 93% 以上, 分离的 CD4⁺ T (1 × 10⁶ 个/mL) 培养于含 10% FCS 和青霉素/链霉素 (100 U/mL) 的 RPMI1640 培养基中。

DC 细胞: 单核细胞于含 IL-4 (50 ng/mL) 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (100 ng/mL) 的培养基中培养 6 d, 每 3 d 更换新鲜培养基, 收集 DC 细胞。

Th17 细胞: CD4⁺ T 细胞培养液中添加 0.1 μg /

mL anti-CD28, 0.5 μg / mL anti-CD3 抗体, 共培养 3 d 后收集细胞。

细胞处理: 上述培养良好的细胞传代, 以 2 ng/L IL-1β, 1 ng/L IL-6 模拟关节炎性环境刺激细胞 24 h, 加入盘龙七片再培养 24 h 后, 检测相关因子表达情况。

BAFF 功能评价: 细胞悬液中加入 rBAFF (50 ng/mL) 或 BAFF 抗体 (1 μg/mL) 培养 24 h, 收集上清液进行后续分析。

1.3.3 ELISA 检测 采用 ELISA 试剂盒法分别检测各组大鼠关节液或培养的细胞上清中 IL-6, TGF-β, IL-1β, IL-10, IL-17, BAFF 因子水平。

1.3.4 细胞活力检测 细胞处理 24 h 后, 采用 MTT 试剂盒法检测细胞活力水平, 于 450 nm 处测定吸光度。细胞存活率计算为细胞存活率 (%) = 100 × (OD 处理 / OD 对照)。

1.3.5 流式细胞仪检测 细胞处理 24 h 后, 调整细胞密度至 (1 × 10⁶ 个/mL), 加入 FITC-IL-17 抗体染色, 进行流式细胞分析。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 数据分析采用 SPSS12.0 软件进行, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 盘龙七片抑制髋部骨折后炎症因子的产生

与正常对照组相比, 模型大鼠血清中及体外巨噬细胞上清中促 Th17 炎症因子 IL-6, TGF-β, IL-1β 水平均显著升高, 而抑炎因子 IL-10 水平则明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1; 与模型组相比, 处理组中促炎因子 IL-6, TGF-β, IL-1β 水平则明显下降, 抑炎因子 IL-10 水平显著上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

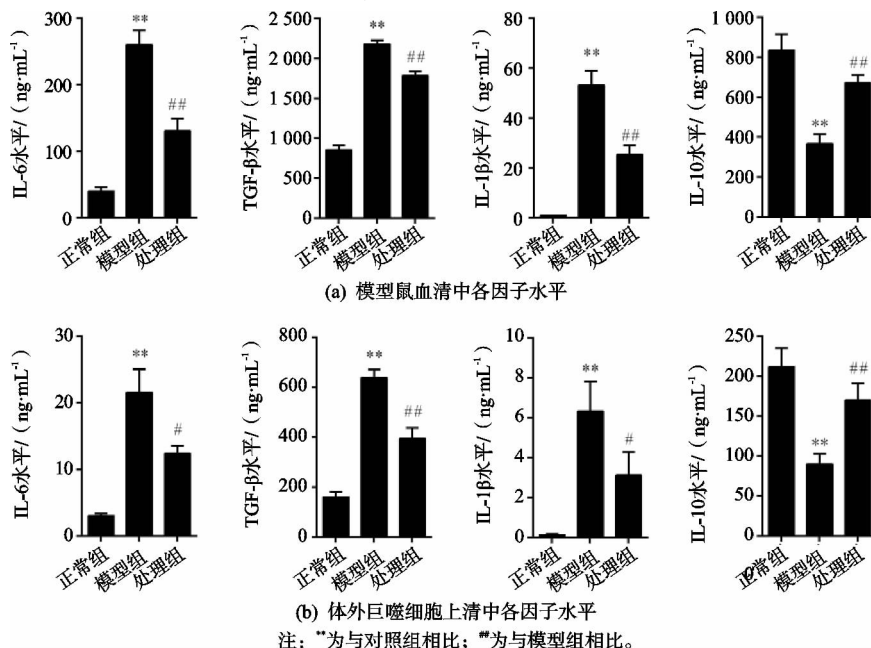
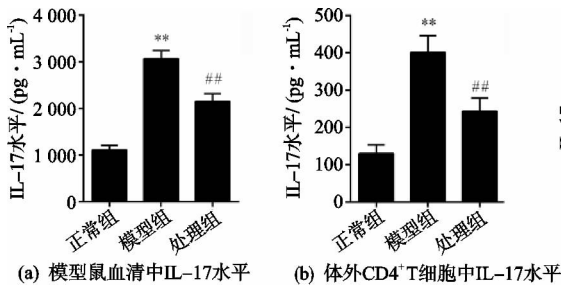


图 1 盘龙七片对髋部骨折后炎症因子的影响

2.2 盘龙七片抑制髌部骨折后 Th17 反应水平

与正常对照组相比,模型大鼠血清中及体外 CD4⁺ T 细胞上清中 IL-17 水平均显著增高,差异有统计学意



义($P<0.05$);与模型组相比,处理组中 IL-17 水平则明显降低;同时处理组中 IL-17⁺ 细胞占比也较模型组显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

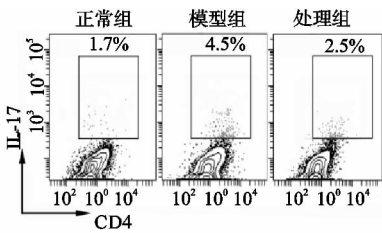


图 2 盘龙七片对髌部骨折后 Th17 反应的影响

2.3 盘龙七片抑制髌部骨折后 BAFF 因子的产生

与正常组对照相比,模型大鼠血清中及体外 DC 细胞、CD4⁺ T 细胞上清中 BAFF 因子水平均显著升高;与模型组相比,处理组中 BAFF 因子水平则明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

2.4 盘龙七片抑制 BAFF 诱导的促 Th17 因子的产生

体外巨噬细胞和单核细胞中,重组 rBAFF 处理可显著上调促 Th17 因子 IL-6、TGF- β 及 IL-1 β 水平,相反 BAFF 单抗处理则会下调其水平,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 4;同时盘龙七片对促 Th17 因

子的抑制作用则可被 rBAFF 削弱,而被 BAFF 单抗处理加强,差异有统计学意义($P<0.05$)。

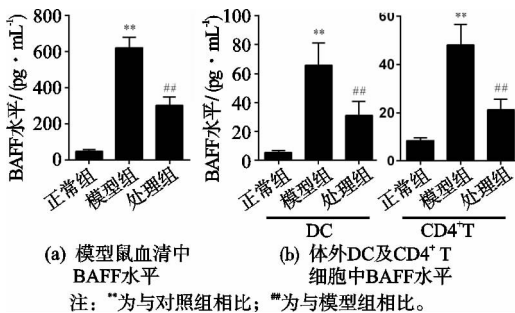


图 3 盘龙七片对髌部骨折后 BAFF 因子的影响

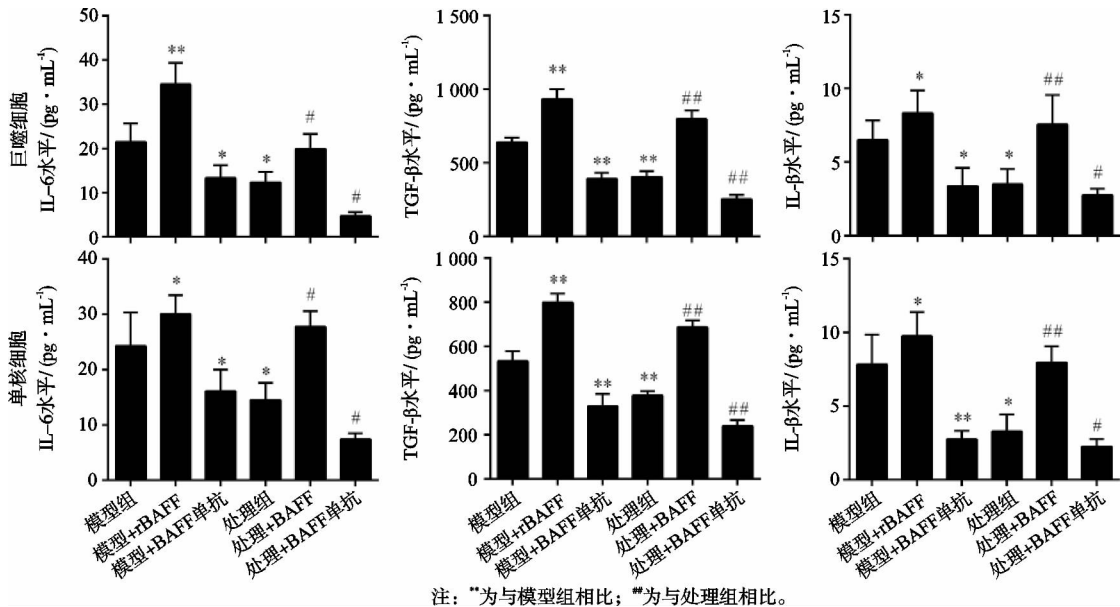


图 4 盘龙七片对 BAFF 诱导的促 Th17 因子的影响

3 讨论

异常的炎症反应是髌部骨折后必然经历的病理过程,同时也是老年髌部骨折患者术后并发症发生的重要原因之一,这其中 T 细胞及其辅助细胞应答的异常扮演着重要角色,也使得如何缓解髌部骨折患者术后炎症反应的紊乱等成为治疗该病症的关键^[10-11]。一直以来,利用中医药的方法保守治疗或手术后恢复治疗髌部骨折等疾病便是医药领域研究的热点内容^[12]。

中成药盘龙七片是由著名老中医、中国《中医辞典》编写顾问王家成老先生所献祖传秘方经科学研制而成,主要成分包括盘龙七、当归、壮筋丹、丹参、五加皮等 29 味中草药^[13]。临床应用表明,盘龙七片对于包括骨折在内的不同类型的骨科疾病均具有明显的临床疗效^[14-16]。本研究通过构建老年髌部骨折大鼠模型,证实了盘龙七片能有效改善髌部骨折大鼠血清中炎症因子的水平,减轻炎症反应,发挥治疗作用。

已知辅助性 T 细胞应答是参与髋部骨折后免疫反应的主要免疫细胞类型,其中 Th1 型反应一直被认为在此类疾病中占据优势^[2]。然而近年来研究发现,不同于 Th1, Th2 型 CD4⁺ T 细胞亚群, Th17 细胞亚群也在髋部骨折后病理过程中扮演着重要角色,其异常应答与活化是引起组织损伤的主要原因^[2,17]。Th17 是能分泌 IL-17 炎症因子的辅助性 T 细胞,由 CD4⁺ T 细胞分化而来。已有临床报道表明,老年髋部骨折患者骨折后第 1 天外周血中 Th17 细胞比例即开始升高,手术后第 1 天达最高峰,第 3 天开始降低,同样骨折后患者血清中 IL-17 含量也随之升高,术后第 1 天升至最高峰。证实了 Th17 细胞参与了老年髋部骨折患者的炎症反应,其与 Treg 细胞的失衡,是髋部骨折之后老年患者产生并发症和感染的重要病理机制^[18-19]。本研究中,笔者发现模型大鼠血清中 IL-17 分泌量增加,体外 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化频率也显著增加,而盘龙七片能显著抑制 Th17 细胞的活化和 IL-17 的产生,对髋部骨折之后 Th17 反应具有抑制作用。

B 细胞活化因子 BAFF 是来源于 TNF 家族的关键细胞因子,多由单核细胞、树突状细胞分泌合成,在 B 细胞的生存和发育中起着至关重要的作用。BAFF 可由多种骨性炎症反应而诱导表达,参与炎症反应的调控^[20]。既往证据表明,高表达的 BAFF 也是 Th17 细胞产生和分化的关键促进因子。BAFF 能激活单核细胞、树突状细胞中 TGF- β , IL-1 β 炎症因子的产生,而后者对于 Th17 细胞的诱导分化具有显著促进作用^[21]。本研究发现,在老年髋部骨折模型大鼠血清和体外 DC 细胞、CD4⁺ T 细胞上清中 BAFF 因子均呈高水平表达态势,而盘龙七片则能明显降低 BAFF 水平,并可减少 BAFF 诱导的促 Th17 因子 IL-6, TGF- β 及 IL-1 β 的产生,从而发挥抑制 Th17 细胞反应的作用。

综上所述,本研究以老年髋部骨折模型大鼠及体外 Th17 细胞模型为对象,证实了盘龙七片对髋部骨折后 Th17 细胞反应具有抑制作用,这一过程与盘龙七片对 BAFF 炎症因子的产生及其激活的促 Th17 因子的抑制作用有关。该结果为理解中成药盘龙七片对骨折的作用机理提供了证据。

参考文献

- [1] ANAGNOSTIS P, PASCHOU S A, GOULIS D G. Management of acute hip fracture[J]. *New England Journal of Medicine*, 2018, 378(10): 971-972.
- [2] COUTO C, ALMEIDA D, LEITE F X, et al. Early mortality after hip fracture is type of surgery important? [J]. *Journal of Anesthesia & Clinical Research*, 2018, 9(5):

823-825.

- [3] YOO J-IL, HA Y C, CHOI H, et al. Malnutrition and chronic inflammation as risk factors for sarcopenia in elderly patients with hip fracture[J]. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 2018, 27(3): 527-532.
- [4] 陈智能, 徐杰, 叶俊材, 等. 三期辨证中药复方对老年性骨质疏松髋部骨折患者骨代谢标志物的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(7): 3196-3199.
- [5] 朱广奇, 卢建华, 沈淑劲, 等. 老年髋部骨折术后并发症的中医药防治研究进展[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2019, 27(5): 91-93.
- [6] 李凌汉, 何虹, 林勇, 等. 盘龙七片对膝骨性关节炎患者疗效与外周血 Th17 细胞及相关细胞因子的关系[J]. *中国医药科学*, 2017, 7(13): 9-12.
- [7] 王明杰, 任世定, 张运佳, 等. 瑶药千斤拔油针联合盘龙七片治疗类风湿性关节炎的临床疗效[J]. *广西医学*, 2018, 40(15): 1737-1738.
- [8] 陈瑞, 董博, 姚洁, 等. 肌骨超声引导下针刀配合盘龙七片治疗慢性梨状肌损伤 50 例[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2019, 27(6): 43-45.
- [9] 赵小丹, 刘浩, 李涛, 等. 乌司他丁减轻老年大鼠髋部骨折后肺损伤程度的实验研究[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2017, 48(6): 66-69.
- [10] SLOR C J, WITLOX J, ADAMIS D, et al. The trajectory of C-reactive protein serum levels in older hip fracture patients with postoperative delirium[J]. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 2019, 34(10): 1438-1446.
- [11] KARRES J, KIEVIET N, EERENBERG J P, et al. Predicting early mortality after hip fracture surgery: the hip fracture estimator of mortality Amsterdam[J]. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 2018, 32(1): 27-33.
- [12] 吴洁, 马艳辉, 姚东旭, 等. 乌司他丁联合右美托咪定对高龄髋部骨折患者炎症反应和术后肺部并发症的影响[J]. *医学综述*, 2019, 25(11): 2275-2278.
- [13] 王婷. 盘龙七片联合洛芬待因治疗寒湿型腰椎间盘突出症的临床疗效[J]. *临床合理用药杂志*, 2019, 12(3): 27-28.
- [14] 王婷, 戴冀斌. 盘龙七片联合通督活血汤治疗风湿痹阻型腰椎管狭窄症临床观察[J]. *中国药业*, 2019, 28(2): 64-66.
- [15] 周晓莉, 乔平平. 盘龙七片治疗寒湿痹阻型膝关节炎 32 例[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2018, 26(12): 72-73.
- [16] 巨振兴, 徐永军. 盘龙七片联合塞来昔布治疗类风湿性关节炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(11): 256-260.
- [17] DIXIT M, SINGH K B, PRAKASH R, et al. Functional block of IL-17 cytokine promotes bone healing by augmenting FOXO1 and ATF4 activity in cortical bone defect model[J]. *Osteoporosis International*, 2017, 28(7): 2207-2220.