

伤科九味健骨片对家兔骨短缩延长后血清骨钙素及骨组织的影响

位春巍^{1,2} 陈嘉怡² 郑臣校^{2△}

[摘要] 目的:探讨伤科九味健骨片对家兔骨短缩延长牵拉成骨的作用和血清骨钙素浓度及骨组织 BMP2、FGF2 表达的影响。方法:选取 60 只新西兰清洁级家兔,建立单侧胫骨干缺损模型,随机分成 3 组,空白组采用外固定支架固定,对照组采用胫骨短缩延长术,实验组在短缩延长的基础上予以伤科九味健骨灌胃。分别于胫骨短缩延长术后 1 周、3 周及 5 周时比较各组家兔骨组织 HE 染色、Masson 染色、血清骨钙素浓度及骨组织 BMP2、FGF2 的表达水平。结果:胫骨短缩延长术后 1 周、3 周及 5 周时,组织形态学观察显示,3 组均可见新生血管,大量成骨细胞和成软骨细胞;实验组纤维性骨痂均比对照组更成熟,骨小梁排列更加规则,髓腔再通更快;与空白组、对照组比较,实验组在胫骨短缩延长术后 3 周及 5 周时,血清骨钙素浓度及骨组织 BMP2 的基因表达、蛋白表达水平显著提高,实验组在胫骨短缩延长术后 1 周、3 周及 5 周时,骨组织 FGF2 的基因表达、蛋白表达水平显著提高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:伤科九味健骨片可促进骨短缩延长牵拉成骨,其机制可能与促进血管、骨组织再生,提高血清骨钙素浓度及骨组织 BMP2、FGF2 表达水平有关。

[关键词] 骨短缩;牵拉成骨;机制;骨钙素;骨形态发生蛋白;成纤维细胞生长因子

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)02-0001-07

Efficacy of Jiuwei Jiangu Tablet on Serum Osteocalcin, Bone Tissue BMP2 and FGF2 after Bone Shortening and Elongation in Rabbits

WEI Chunwei^{1,2} CHEN Jiayi² ZHENG Chenxiao^{2△}

¹Graduate School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

²Hospital of Traditional Chinese Medicine of Zhongshan, Zhongshan 528400, Guangdong China.

Abstract Objective: To investigate the efficacy of Jiuwei Jiangu tablet on bone shortening, lengthening and distraction osteogenesis in rabbits, serum osteocalcin concentration and the expression of BMP2 and FGF2 in bone tissue. **Methods:** 60 male and female clean New Zealand rabbits were selected to establish a model of unilateral tibia shaft defect and randomly divided into three groups. The blank group was fixed with external fixation scaffold, the control group was treated with tibia shortening and lengthening, and the experimental group was given Jiuwei jiangu gavage on the basis of shortening and lengthening. HE staining, Masson staining, serum osteocalcin concentration and the expression levels of BMP2 and FGF2 in bone tissue of rabbits in each group were compared at 1, 3 and 5 weeks after tibia shortening and lengthening. **Results:** Histological observation showed that new blood vessels and a large number of osteoblasts and chondroblasts were observed in three groups at 1, 3 and 5 weeks after tibia shortening and lengthening. The fibrous callus in the experimental group was more mature than the negative control group, the arrangement of bone trabecula was more regular, and the medullary cavity recanalization was faster. Compared with the blank group and control group, the concentration of serum osteocalcin and bone tissue BMP2 gene expression and protein expression level in experimental group increased significantly at 3 and 5 weeks after tibia shortening and lengthening. The expression level of Bone tissue FGF2 gene and protein increased significantly in experimental group at 1, 3

and 5 weeks after tibia shortening and lengthening. The difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** Jiuwei Jiangu tablet can promote bone shortening and elongation, and the mechanism may be related to the promotion of blood vessel and bone tissue regeneration, increasing the concentration of serum osteocalcin and the expression levels of BMP2 and FGF2 in bone tissues.

基金项目:广东省中医药局科研项目(20191357)

中山市社会公益科技研究项目(2018B1084)

¹ 广州中医药大学研究生院(广州, 510006)

² 中山市中医院

[△]通信作者 E-mail: 944614470@qq.com

Keywords: shortening of the bone; traction osteogenesis; mechanism; osteocalcin; bone morphogenetic protein; fibroblast growth factor

骨缺损的治疗一直是骨科研究的热点难点^[1]。短缩延长方法治疗大段骨缺损的临床效果好,但治疗周期长,病人耐受性差,中药促进新骨形成历史悠久,广州中医药大学附属中山中医院院内制剂伤科九味健骨片可促进骨折愈合。将中药伤科九味健骨片与短缩延长方法创新性的联合应用于骨缺损的治疗中,通过中药伤科九味健骨片的活血止痛、接骨续损的功效与短缩延长方法牵张成骨作用的创新性的结合,将传统中医骨伤科的药物治法与现代医学技术治疗骨缺损的新方法有机结合,促进骨缺损修复,提高临床疗效。本研究的目的是通过动物实验研究伤科九味健骨片对家兔骨短缩延长牵拉成骨的作用及血清骨钙素浓度及骨组织 BMP2、FGF2 表达的影响,探讨伤科九味健骨片促进骨短缩延长牵拉成骨作用机制,为骨缺损的治疗提供一种新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验选用雌雄不限新西兰清洁级家兔 60 只,2~3 个月龄,体质量 1.5~2.0 kg,由广东省医学实验动物中心(SYXK(粤)2020-0004)提供。转笼饲养在中山市中医药药学部(SCXK(粤)2018-0002),恒温(22±3)℃、恒湿 60%±5%的清洁环境中,12 h 亮/暗循环,自由活动,标准家兔饲料及饮用纯净水,每隔 3 d 监测称重。按照中山市中医院伦理委员会批准的实验方案进行(审批号为 2018ZSZY-LLK-003)。

1.2 主要仪器设备及试剂

外固定支架(广州市华创医疗器械有限公司)、克氏针(1.2 mm)、电钻、医用线锯及摆锯、常规手术器械、备皮刀、医用青霉素钠、医用 75%乙醇、医用碘伏消毒剂、10%水合氯醛(3.5~4.0 mL/kg)、4%甲醛固定液(上海雷布斯仪器设备有限公司)、采血针、注射器、标本收集袋、EP 管(深圳市思琪生物科技有限公司)。一抗 BMP2、FGF2、 β -actin (Proteintech Group),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (Proteintech Group),RIPA 裂解液(碧云天),BCA 蛋白定量检测试剂盒(碧云天),转移、电泳、TBS 缓冲液(武汉谷歌生物科技);逆转录试剂盒、转染试剂盒(TRANS 公司),-80℃冰箱(中美科菱)。ABI7300 荧光定量 PCR 仪(life technology 公司),TGL-16M 低温冷冻离心机(湘仪),SW-CJ-1D 单人净化工作台(沪净净化),HR40-II A2 生物安全柜(Haier),SMA4000 超微量分光光度计(Merinton),Bestar™ qPCR RT Kit(德国

DBI),Bestar® SYBR Green qPCR Master Mix(德国 DBI 货号)。伤科九味健骨片成分有三七、续断、骨碎补、煅自然铜、川芎、当归、独活、桑枝、甘草;功能为接骨续损,活血止痛,可用于跌打损伤中期诸证;0.4 g/片,批号为粤药制字 Z20130005;配制单位为中山市中医院。

1.3 造模

按随机数字表法将 60 只家兔分为 3 组,每组 20 只。造模:于家兔右侧胫骨侧备皮,10%水合氯醛耳缘静脉麻醉后,右侧胫骨中点为中心,采用电锯截骨 12 mm 造成骨缺损。两端短缩后采用外固定支架固定,采用 1.2 mm 克氏针钻孔,两端各两颗固定针,术毕,逐层缝合伤口(见图 1)。术后分笼单只饲养。术口每天采用医用碘伏消毒,术后 7 d 内采用医用青霉素钠(8×10^5 IU/kg)预防感染。空白组(20 只):造模后,术后开始予以生理盐水灌胃,3 次/d,每次 6 mL。对照组(20 只):造模后,术后 3 d 病情稳定后开始行胫骨短缩延长术,0.6 mm/圈,0.6 mm/d,2 次/d(8:00 及 20:00),每次延长 0.3 mm,搬移时间共 1 个月。同时予以生理盐水灌胃,3 次/d,每次 6 mL。实验组(20 只):造模后,术后开始服用伤科九味健骨片,具体剂量如下(70 kg 成年人药物剂量与 1.5 kg 新西兰兔换算系数 0.07):伤科九味健骨片用量为 70 kg(人)0.4 g/片,3 片/次,3 次/d 即 3.6 g/d。新西兰兔 3.6 g/d,0.07/1.5 kg,即 168 mg/(kg·d),168 mg/(kg·d)×体质量=药量(mg)/d。分成 3 份,每次以温开水 6 mL 溶解后灌胃。于胫骨短缩延长术后 1 周、3 周及 5 周时分 3 批处死家兔,每批处死 12 只,每组各 4 只。

1.4 观察指标

1.4.1 组织形态学观察 动物心脏采血后采用空气栓塞法处死,每个动物的胫骨标本取材包括骨折断端及其周围骨痂等组织长约 1 cm。标本经多聚甲醛固定 48 h 后置入浓度为 125 g/L EDTA-Na 脱钙液,每 4 d 更换 1 次脱钙液。待针可刺入骨皮质时停止脱钙并用石蜡包埋,制备 6 μ m 厚度切片。进行 HE 染色及 Masson 染色,显微镜下观察。

1.4.2 血清骨钙素浓度测定 各组实验动物在处死前禁食水 12 h,心脏取血 2 mL 送检,严格按照试剂盒说明书运用 ELISA 法测定血清骨钙素浓度,计算血清骨钙素含量。

1.4.3 用 Western Blot 检测 BMP2 和 FGF2 的蛋白表达 将骨组织用 PBS 冲洗干净,再用锡纸包裹骨组织,先将骨组织置于-80℃冰箱中放置 12 h,再放入液氮中保存,待骨组织达到一定数量后开始提取蛋白。

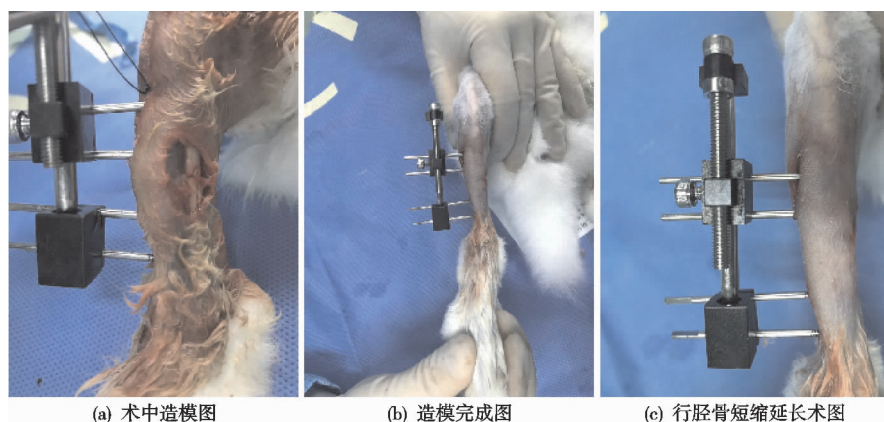


图 1 家兔胫骨骨缺损造模图

骨组织研磨：-80℃冰箱中取出骨组织，放进研钵中，加入液氮，用剪骨夹将骨组织尽可能夹细成小块组织，用研钵棒将骨组织尽量研磨成粉末状，期间液氮需要不断加入，以防止温度过高蛋白降解。将研磨所得粉末转移至 1.5 mL 离心管中，根据 100 mg:100 μ L 的比例加入 RIPA 裂解液（含 50 倍 Cocktail），在冰上裂解 30 min 以上。15 000 r/min 离心 5 min，收集上清，即为总蛋白溶液。用 BCA 法测定蛋白浓度并进行定量分装保存至液氮中待用。配置 12% 的分离胶和 5% 浓缩胶，加入 100 μ g 蛋白，80 mV 电泳一段时间后，120 mV 电泳至结束。300 mA 转模 30 min，用 5% 的脱脂奶粉（0.5% TBST 配）室温封闭 1 h，封闭结束后放入一抗 4℃ 孵育盒，室温孵育 3 h，用 TBST 洗膜液洗膜 3 次，每次 5 min。将二抗用 TBST 稀释 3 000 倍，室温下孵育 30 min 后，用 TBST 在室温下脱色床上摇 3 次，每次 5 min。吸干膜上液体加入 ECL 发光液，放入曝光仪检测结果保存数据。用 AlphaEase Fc 软件计算 Western Blot 电泳图灰度值。

1.4.4 用 RT-PCR 检测 BMP2 和 FGF2 的基因表达

将获取的骨组织研磨至粉末状后加入 Trizol，之后加入氯仿，混匀后室温放置 5 min。12 000 r/min 4℃ 离心 15 min，转移上层水相，加入异丙醇，混匀静置后 12 000 r/min 4℃ 离心 10 min，无水乙醇洗 3 次，干燥后加入焦碳酸二乙酯水，测其浓度后储存。引物序列：BMP2 上下游引物序列分别为 5'-AGGAAGCTTTGGGAGACGAC-3' 和 5'-AAGTGGGTCACCTTCCAC-3'；FGF2 上游引物为 5'-AGTAAGTCAGACGTTGGCCG-3'；下游引物为 5'-GCACGACTCGGCATCTGATA-3'；GAPDH（内参）上游引物为 5'-TTGCTGTCGCCCCGTTTCG-3'；下游引物为 5'-TGCCGTGGGTGGAATCATAC-3'；所以引物均由苏州泓讯公司合成提供。通过 RT-PCR 检测其 mRNA 表达水平，进行相对定量。

1.5 统计学方法

本研究取得的资料采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。计量资料符合正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 呈现，使用方差分析进行各组间的比较。计数资料以频数（%）呈现。一般资料以 95% 置信区间做描述性统计分析，用 χ^2 检验、Fisher 精确概率法处理各组间的比较。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 组织学观察

2.1.1 HE 染色 骨折愈合过程是从炎性细胞浸润，肉芽组织、新生毛细血管出现，纤维组织连接，再到透明软骨、编织骨、板层骨的转化，以及内外骨痂的形成与改建等。术后第 1 周，实验组骨折断端血肿机化已基本吸收完全并有大量新生肉芽组织和纤维组织生成，局部出现纤维连接；对照组骨折断端有骨坏死组织、新生肉芽组织及骨碎片包埋其中，血肿机化尚未完全吸收；空白组骨折端有大量骨坏死组织及骨碎片，血肿机化部分吸收。术后第 3 周，实验组骨膜增生明显，有大量外骨痂相连，骨小梁排列不整齐，软骨成分逐渐减少并有向骨性骨痂转化的趋势；对照组骨外膜增生，有少量外骨痂形成，新生骨小梁和编织骨数量少于实验组，软骨成分较实验组多；空白组少量骨膜增生，骨小梁稀疏，软骨成分较多。术后第 5 周，实验组软骨成分消失，断端板层骨相连，骨小梁数量和走行与正常骨板骨小梁基本一致，骨髓腔再通；对照组出现大量编织骨，可见少量板层骨，软骨成分基本消失，断端已基本连接，髓腔未通；空白组出现编织骨不如对照组，偶见少量板层骨，仍可见软骨成分（见图 2 和图 3）。

2.1.2 Masson 染色 Masson 染色结果显示家兔骨折愈合过程中各时间点实验组新生骨质成熟度均优于对照组和空白组，骨质中胶原成分明显多于对照组和空白组，实验组骨折愈合速度较对照组快（见图 4 和图 5）。

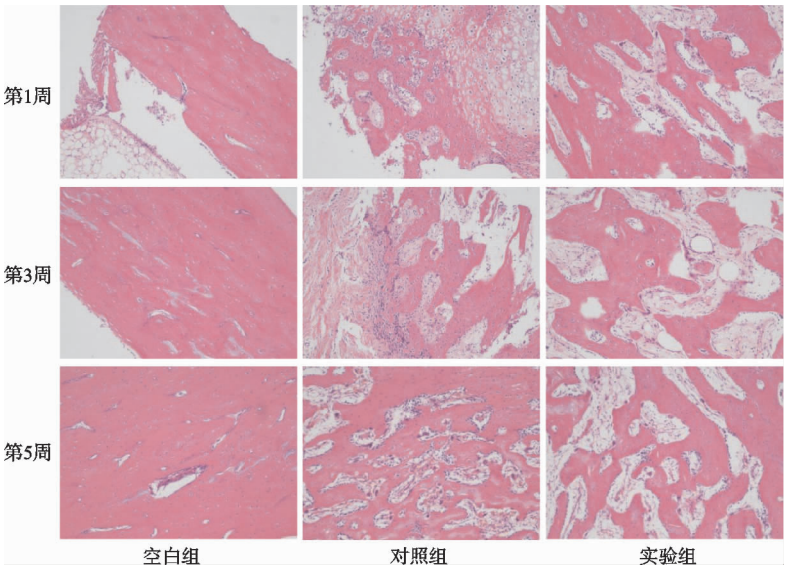


图 2 3 组家兔骨组织的组织形态学观察(HE 染色, ×100)

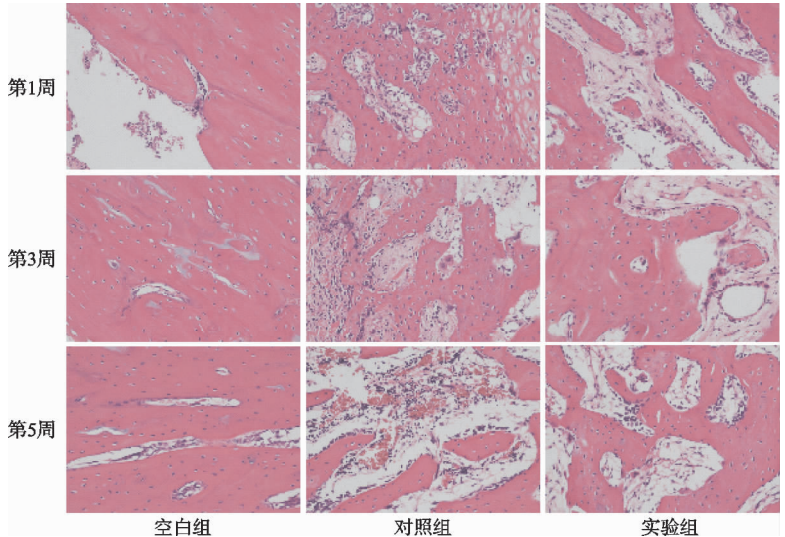


图 3 3 组家兔骨组织的组织形态学观察(HE 染色, ×200)

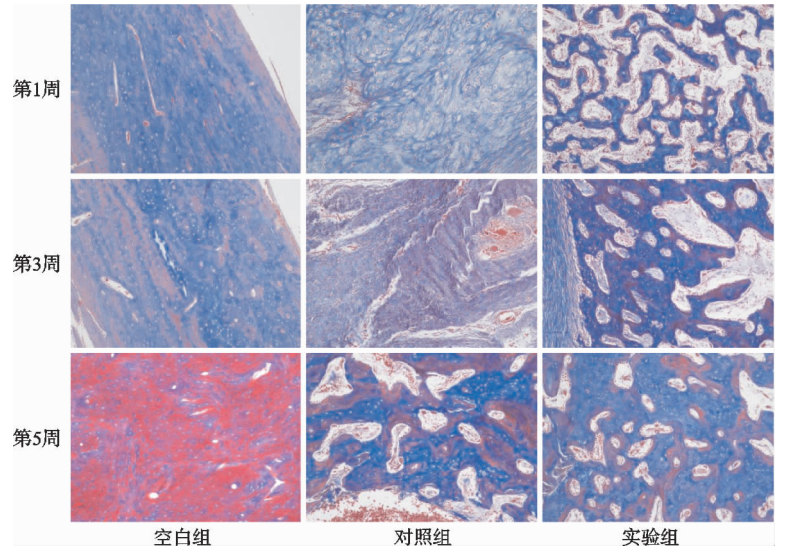


图 4 3 组家兔骨组织的组织形态学观察(Masson 染色, ×100)

2.2 血清骨钙素浓度测定结果

术后第 1 周,空白组、对照组、实验组的血清骨钙素浓度无明显差异;术后第 3 周及第 5 周,与空白组、

对照组比较,实验组血清骨钙素浓度显著提高,差异有统计学意义($P<0.05$)。3 组家兔的血清骨钙素浓度值见表 1。

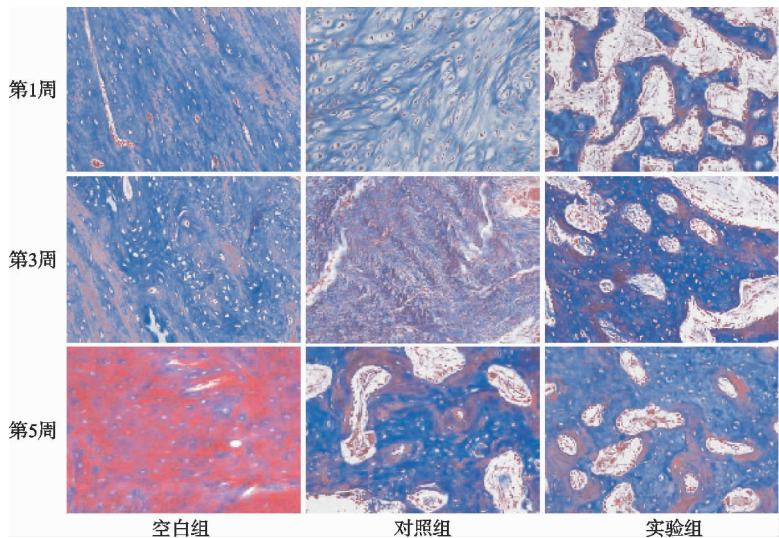


图 5 3 组家兔骨组织的组织形态学观察(Masson 染色,×200)

表 1 3 组家兔的血清骨钙素浓度值($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

时间	兔数/只	空白组	对照组	实验组	<i>F</i>	<i>P</i>
术后第 1 周	4	2.05±0.13	2.03±0.25	2.03±0.22	0.02	0.981
术后第 3 周	4	2.38±0.28	2.25±0.27	3.48±0.13	33.73	<0.001
术后第 5 周	4	2.48±0.21	2.53±0.19	3.83±0.10	80.34	<0.001

2.3 Western Blot 检测结果

2.3.1 3 组家兔骨组织 BMP2 蛋白表达的相对含量变化

术后第 1 周,空白组、对照组及实验组的 BMP2 蛋白表达的相对含量(目的基因灰度值/内参基因

GAPDH灰度值)差异无统计学意义;术后第 3 周及第 5 周,与空白组和对照组比较,实验组 BMP2 蛋白表达的相对含量显著提高,差异有统计学意义($P<0.05$)。3 组家兔骨组织在各时间点 BMP2 蛋白表达的相对含量见表 2。

表 2 3 组家兔骨组织 BMP2 蛋白表达的相对含量($\bar{x}\pm s$)

时间	兔数/只	空白组	对照组	实验组	<i>F</i>	<i>P</i>
术后第 1 周	4	0.63±0.10	0.63±0.09	0.67±0.09	0.36	0.705
术后第 3 周	4	0.62±0.09	0.73±0.10	1.30±0.17	30.95	<0.001
术后第 5 周	4	0.83±0.08	1.15±0.13	1.63±0.16	80.34	<0.001

2.3.2 3 组家兔骨组织 FGF2 蛋白表达的相对含量变化

术后第 1 周、第 3 周及第 5 周,与空白组和对照组比较,实验组 FGF2 蛋白表达的相对含量(目的基因灰度值/内参基因 GAPDH 灰度值)显著提高,差异有统

计学意义($P<0.05$)。3 组家兔骨组织在各时间点 FGF2 蛋白表达的相对含量见表 3。

2.3.3 3 组家兔骨组织 BMP2 和 FGF2 蛋白条带图
3 组家兔骨组织在各时间点 BMP2 和 FGF2 蛋白条带图见图 6。

表 3 3 组家兔骨组织 FGF2 蛋白表达的相对含量($\bar{x}\pm s$)

时间	兔数/只	空白组	对照组	实验组	<i>F</i>	<i>P</i>
术后第 1 周	4	0.43±0.09	0.43±0.10	0.68±0.09	9.10	0.007
术后第 3 周	4	0.60±0.08	0.65±0.12	0.95±0.13	10.75	0.004
术后第 5 周	4	0.78±0.05	0.80±0.08	1.18±0.20	11.66	0.003

2.4 RT-PCR 检测结果

2.4.1 3 组家兔骨组织 BMP2 mRNA 基因表达的相对含量变化

术后第 1 周,空白组、对照组及实验组的 BMP2 mRNA 表达的相对含量(ΔCt =目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值)差异无统计学意义;术后第 3 周及第 5 周,与空白组和对照组比较,实验组 BMP2 mRNA 表达的

相对含量显著提高,差异有统计学意义($P<0.05$)。3 组家兔骨组织 BMP2 mRNA 基因表达的相对含量见表 4。

2.4.2 3 组家兔骨组织 FGF2 mRNA 基因表达的相对含量变化

术后第 1 周、第 3 周及第 5 周,与空白组和对照组比较,实验组 FGF2 mRNA 表达的相对含量(ΔCt =目

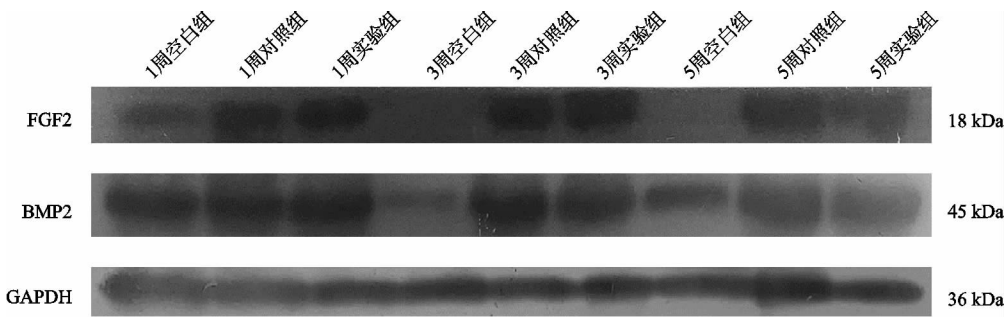


图 6 3 组家兔骨组织 BMP2 及 FGF2 蛋白条带图

表 4 3 组家兔骨组织 BMP2 mRNA 表达的相对含量(ΔCt, $\bar{x} \pm s$)

时间	兔数/只	空白组	对照组	实验组	F	P
术后第 1 周	4	5.18±0.28	5.22±0.33	5.05±0.17	0.601	0.565 9
术后第 3 周	4	5.30±0.24	5.55±0.17	5.93±0.09	11.97	0.002 9
术后第 5 周	4	5.65±0.12	6.00±0.21	6.47±0.20	19.44	0.000 5

的基因 Ct 值一内参基因 Ct 值)显著提高,差异有统计
学意义($P<0.05$)。3 组家兔骨组织 FGF2 mRNA 表

达的相对含量见表 5。

3 讨论

表 5 3 组家兔骨组织 FGF2 mRNA 表达的相对含量(ΔCt, $\bar{x} \pm s$)

时间	兔数/只	空白组	对照组	实验组	F	P
术后第 1 周	4	0.14±0.00	0.40±0.02	0.43±0.03	142.60	<0.000 1
术后第 3 周	4	0.37±0.04	0.38±0.07	1.26±0.07	228.40	<0.000 1
术后第 5 周	4	0.78±0.03	0.88±0.03	1.24±0.09	52.37	0.000 2

外伤、感染、肿瘤等因素均可造成骨缺损,其治疗一直是棘手的问题^[2]。美国每年大约有 650 万骨折患者,骨肿瘤和创伤造成的骨缺损占 10%~15%^[3]。随着交通事故的增多,中国的骨缺损患者也日益增加,已成为影响生活质量的主要疾病之一,给社会带来沉重的负担^[4]。骨不连、骨缺损常用的治疗方法以自体骨移植及 Masquete 技术为主。但是自体骨来源有限,并且会对供区造成新的骨缺损^[5]。国内外尽管开始使用异体骨,然而异体骨有免疫原性、潜在病原体的缺点,而且价格昂贵。金属类、合成塑料类及硅胶等人工材料由于缺乏骨诱导性而难以推广。Masquete 技术适用于感染性骨缺损,但是存在长期卧床、长时间外固定和需大量自体松质骨等缺点,因此探索新的方法提高骨愈合和促进骨形成是治疗骨缺损的最佳途径^[6]。牵张成骨技术由 Gavril Abramovich Illizarov 提出并推广,是一种利用生物内在的再生潜力来延长骨骼,治疗大段骨缺损的技术。该技术是治疗大段骨缺损尤其合并感染时的金标准,其机制是利用自体组织,通过外固定支架施加牵张应力,刺激骨痂再生,实现骨骼再生的同时,使软组织得以再生。据 Wen 等报道,采用该技术实现了 24.5 cm 胫骨大段缺损的治疗^[7]。骨搬移可分为以下四个阶段:潜伏期、牵张期、巩固期和拆架期。潜伏期指术后 5~10 d,为炎症反应期,如同新鲜骨折早期血肿期。牵张期指在断端受到牵拉应力刺激,促进新生纤维骨痂再生,直至搬

移骨段与残余的目标骨段对合。巩固期是指骨搬移结束后固定外固定支架,进行功能康复,使断端纤维骨痂矿化、实现骨性愈合的过程,时间通常为牵张期的 2 倍。达到骨性愈合后拆除外固定支架,佩戴支具,逐步恢复正常活动,通常为 1~3 个月,此期为拆架期。上述即为完整的骨搬移治疗周期。虽然短缩延长法能避免植骨材料的限制,对局部情况的要求较低,然而骨短缩延长后骨痂牵拉区成骨较为缓慢、治疗周期时间过长,研究观察显示骨短缩延长中持续存在的缓慢的牵拉应力,能够使骨再生及修复过程表现为骨愈合进程中各个阶段的重叠及交叉,类似于骨折端愈合。因此,如何促进骨短缩延长牵拉成骨、促进骨缺损修复、缩短治疗周期、提高临床疗效,是当下需要解决的问题之一。

明代薛己《正体类要》曾说“肢体损于外,则气血伤于内,营卫有所不贯,脏腑由之不和”,这说明局部筋骨皮肉的损伤会引起机体内在的功能失调,进而引发脏腑、营卫、津液、气血及经络等功能紊乱,表明了外伤与内损、局部与整体的相互作用及影响关系^[8]。因此,在损伤的辨证施治过程中要有整体观念,应从整体出发,对筋骨皮肉、营卫气血、脏腑津液及经络之间的病理生理关系多方面综合考虑,综合分析,辨证施治,这种局部与整体的统一观,更是中医伤科辨证施治的基本原则^[9]。伤科九味健骨片为院内制剂,成分有三七、续断、骨碎补、煅自然铜、川芎、当归、独活、桑枝、甘草,功能为接骨续损,活血止痛,可用于跌打损伤中期诸证。

在应用伤科九味健骨片结合骨短缩延长方法的临床实践中发现中期用药续筋接骨、和营生新,明显促进骨质愈合。毕锴等^[10]通过实验研究,观察发现具有化瘀活血、续筋接骨功效的中药能提高骨折断端胶原蛋白的合成,刺激调节 I 型、II 型胶原蛋白基因的表达,促使骨折断端修复提前进入骨化期及塑形期,从而促进骨折的再生修复,有利于骨折愈合。陈冠儒等^[11]研究发现,补肾活血方可促进大鼠骨折模型的愈合,其机制可能与改善血液流变学指标,减轻炎症反应,提高 BMP2、VEGF 和 TGF- β 1 水平表达有关。

骨缺损的治疗需要多种细胞生长因子及蛋白质的参与^[12]。血清骨钙素是一种非胶原蛋白,由成骨细胞合成并分泌,可反映成骨细胞分化和成熟的程度,促进羟基磷灰石的沉积,富集成骨细胞和破骨细胞,促进骨形成和骨钙化^[13]。在众多的生长因子中,以 BMP2 和 FGF2 的研究较为广泛,目前国内外关于 BMP2 基因治疗的研究正成为热点^[14]。骨形态发生蛋白(BMP)具有成骨活性,可通过不同的信号通路诱导未分化间充质细胞向软骨细胞和成骨细胞方向分化进而形成新骨,在骨折和骨缺损的修复过程中发挥着重要作用^[15]。随着基因工程技术的发展,多种动物 BMP 基因被克隆和测序,现已发现 20 多个亚型,其中 BMP2 具有较强的成骨能力^[16]。FGF2 是纤维细胞生长因子家族成员之一,其可诱导骨髓干细胞增殖,加速骨形成过程;还可以通过促进成骨细胞合成胶原纤维及促进早期血管化,改善局部血运,加速钙盐沉积及骨矿化^[17]。

本研究通过组织形态学观察,发现在胫骨短缩延长术后 1 周、3 周及 5 周时,实验组的成骨细胞数量显著增多,骨小梁交织成网状,伴有骨髓组织、血管再生,骨组织更加成熟,纤维性骨痂均比对照组更成熟,骨小梁排列更加规则,髓腔再通更快,这在一定程度上表明口服伤科九味健骨片可促进骨短缩延长牵拉成骨新西兰家兔对合端血管、骨组织再生,提高骨愈合速度和促进骨形成,缩短治疗周期。与空白组、对照组比较,实验组在胫骨短缩延长术后 3 周及 5 周时,血清骨钙素浓度及骨组织 BMP2 的基因表达、蛋白表达水平显著提高,实验组在胫骨短缩延长术后 1 周、3 周及 5 周时,骨组织 FGF2 的基因表达、蛋白表达水平显著提高,差异有统计学意义,这在一定程度上表明口服伤科九味健骨片可提高骨短缩延长牵拉成骨新西兰家兔体内血清骨钙素浓度及骨组织 BMP2、FGF2 的含量,提高骨愈合速度和促进骨形成,缩短治疗周期。

综上所述,伤科九味健骨片可促进骨短缩延长牵拉成骨,其机制可能与促进血管、骨组织再生,提高血清骨钙素浓度及骨组织 BMP2、FGF2 水平表达有关。

参考文献

- [1] 秦泗河. Ilizarov 技术推动外固定肢体重建发展[J]. 骨科, 2021,12(3):193-194.
- [2] ZHOU N,LI Q,LIN X,et al. BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells[J]. Cell and Tissue Research,2016,366(1):101-111.
- [3] ZHANG C,MENG C,GUAN D,et al. BMP2 and VEGF165 transfection to bone marrow stromal stem cells regulate osteogenic potential in vitro[J]. Medicine,2018,97(5):e9787.
- [4] ROGERS M B,SHAH T A,SHAIKH N N. Turning bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on and off in mesenchymal cells[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2015, 116 (10): 2127-2138.
- [5] 殷海阳,张永红. 骨搬运后对合端延迟愈合、不愈合的机制研究与规范化临床应用技术[J]. 中国组织工程研究, 2020,24(36):5858-5863.
- [6] 杨洋,许长鹏,欧栓机,等. 膜诱导技术治疗胫骨感染性骨缺损的临床研究[J]. 实用骨科杂志,2020,26(8):750-752.
- [7] 黄希,王文波. 长骨骨缺损的组织工程治疗现状[J]. 临床与病理杂志,2021,41(2):456-461.
- [8] 毕军花,郭宝生,张国梁,等. 益气生骨颗粒促进大鼠骨折愈合的实验研究[J]. 中医药导报,2019,25(6):37-40.
- [9] 高国卫,赵立来,童培建,等. 右归饮联合富血小板血浆对去卵巢骨质疏松大鼠影像学、骨密度和生物力学的影响[J]. 浙江中西医结合杂志,2019,29(4):268-272.
- [10] 毕锴,温建民,孙永生,等. 中医骨折三期治疗对家兔骨折愈合中 VEGF 与 BMP-2 表达影响的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2012,18(12):1344-1347.
- [11] 陈冠儒,张翔,许兵. 补肾活血方对大鼠骨折模型的愈合作用及对 BMP-2、VEGF 及 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中国中医急症,2019,28(12):2111-2114.
- [12] IKPEGBU E,BASTA L,CLEMENTS D N,et al. FGF-2 promotes osteocyte differentiation through increased E11/podoplanin expression[J]. J Cell Physiol,2018,233(7):5334-5347.
- [13] LIU T,ZHENG Y,WU G,et al. BMP2-coprecipitated calcium phosphate granules enhance osteoinductivity of deproteinized bovine bone, and bone formation during critical-sized bone defect healing[J]. Scientific Reports,2017,7(1):41800.
- [14] 杨楠,陈跃平,章晓云. 分子信号通路及细胞层面的骨折愈合机制[J]. 中国组织工程研究,2019,23(20):3188-3194.
- [15] 邓桢翰,黄勇,肖璐璐,等. 骨形态发生蛋白在关节软骨再生过程中的作用与应用[J]. 中国组织工程研究,2021,25(5):798-806.
- [16] 王腾,孙康,刘峰,等. 重组人骨形态发生蛋白 2 与兔间充质细胞的软骨内骨化过程相关性研究[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(24):3201-3203.
- [17] 周琦琪,韩祥祯,张文静,等. 碱性成纤维细胞生长因子诱导大鼠骨髓间充质干细胞膜片成骨及成血管分化[J]. 中国组织工程研究,2021,25(1):1-5.

(收稿日期:2021-06-05)