接骨膏促进新西兰兔骨折愈合的活性部位筛选Δ

郑国尧*，彭　磊，徐元翠，吴　飞，吴　波#（恩施土家族苗族自治州中心医院康复医学中心，湖北 恩施 445099）

中图分类号　R965.1　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）11-1349-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.11.12

摘　要　目的　筛选接骨膏促进新西兰兔骨折愈合的活性部位。**方法**　制备接骨膏醇提物以及乙酸乙酯部位、正丁醇部位，并与炼蜜调制成黏稠度适宜的膏药。以新西兰兔建立左前肢桡骨骨折模型，然后分为模型对照组、醇提物组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组，每组6只。除模型对照组外，其余各组兔外敷接骨膏相应极性部位膏药，干预4周。通过X线检测兔骨折愈合情况，采用酶联免疫吸附测定法检测兔血清中白细胞介素6（IL-6）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、骨钙素（OC）、血管内皮生长因子A（VEGFA）、碱性成纤维细胞生长因子2（bFGF2）、碱性磷酸酶（ALP）水平，采用苏木素-伊红染色观察兔骨折部位病理学形态变化，采用免疫组化法检测兔骨折部位bFGF2蛋白的表达水平。**结果**　正丁醇部位组兔骨折部位的愈合速度最快，醇提物组次之，乙酸乙酯部位组最慢；正丁醇部位组兔血清中TNF-α、IL-6水平下降最快，ALP、bFGF2、OC、VEGFA水平上升最快[且较醇提物组显著升高（$P<0.01$）]，骨折部位的软骨细胞完全消失，形成大量骨髓腔，且骨髓腔内骨小梁正式形成，bFGF2表达水平也较醇提物组升高。**结论**　接骨膏正丁醇部位促进兔骨折部位愈合的作用强于醇提物以及乙酸乙酯部位，是接骨膏促进骨折愈合的活性部位。

关键词　接骨膏；骨折；愈合；醇提物；正丁醇部位；活性部位

Screening of active fractions of Jiegu ointment for promoting fracture healing in New Zealand rabbits

ZHENG Guoyao, PENG Lei, XU Yuancui, WU Fei, WU Bo (Rehabilitation Medical Center, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Hubei Enshi 445099, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To screen the active site of Jiegu ointment in promoting fracture healing in New Zealand rabbits. **METHODS** The ethanol extract of Jiegu ointment, as well as the ethyl acetate and *n*-butanol parts, were prepared and mixed with honey to form a plaster with appropriate viscosity. The radial fracture model of left forelimb in New Zealand rabbit was established and divided into model control group, ethanol extract group, ethyl acetate fraction group and *n*-butanol fraction group, with 6 rabbits in each group. Except for model control group, rabbits of all other groups were treated with corresponding polar part of Jiegu ointment for external application, for 4 weeks. The radial fracture healing of rabbits was studied by X-ray examination. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the serum levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF-α), osteocalcin (OC), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), basic fibroblast growth factor 2 (bFGF2) and alkaline phosphatase (ALP). HE staining was adopted to observe the changes of pathological morphology of rabbit fracture site, and immunohistochemical method was used to detect the protein expression of bFGF2 in fracture site of rabbits. **RESULTS** The healing speed of the fracture site in the *n*-butanol fraction group was the fastest, followed by ethanol extract group, and the ethyl acetate fraction group was the slowest; the serum levels of TNF-α and IL-6 in *n*-butanol fraction group decreased the fastest, while the levels of ALP, bFGF2, OC and VEGFA increased the fastest [significant increase compared with ethanol extract group ($P<0.01$)]; the chondrocytes at the fracture fraction completely disappeared, forming a large number of bone marrow cavities, and the bone trabeculae in the bone marrow cavity were officially formed. The expression level of bFGF2 was also higher than ethanol extract group. **CONCLUSIONS** The effect of *n*-butanol fraction on promoting fracture healing is more significant than ethyl acetate fraction and ethanol extract, and *n*-butanol fraction is the active fraction of Jiegu ointment to promote fracture healing.

KEYWORDS　Jiegu ointment; fracture; healing; ethanol extract; *n*-butanol fraction; active fraction

现代医学认为，骨折愈合过程包含血肿炎症机化期、原始骨痂形成期、骨痂改造塑形期。在血肿炎症机化期内，骨折部位血管损伤形成血肿而分泌炎症因子[如肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）和白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）等]导致炎症反应，刺激受损部位，而具有消肿止痛功效的中药，可抑制炎症因子过度表达而改善软组织损伤，并缩短骨折愈合的血肿炎症机化期[1-3]。在原始骨痂形成期内，血管形成先于骨形成，为骨组织稳态维持提供坚实的物质基础，血管内皮生长因子A（vascular endothelial growth factor A，

Δ**基金项目**　湖北省知识创新专项（自然科学基金）资助项目（No. 2019CFB615）

＊**第一作者**　主治医师，硕士。研究方向：中药与康复医学。E-mail：41629986@qq.com

＃**通信作者**　主任医师，硕士生导师。研究方向：土家特色药材临床研究与应用。E-mail：723677231@qq.com

VEGFA）、碱性成纤维细胞生长因子2（basic fibroblast growth factor 2，bFGF2）等参与了骨血管的生成和骨再生，以促进骨修复。在这一阶段，应用具有活血祛瘀功效的中药，能够改善血液循环，促进骨折部位血管再生、骨痂形成，加速骨的形成[4－7]。在骨痂改造塑形期内，破骨细胞、成骨细胞和骨细胞三者之间相互协调，碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）、骨钙素（osteocalcin，OC）等的表达水平也发生了变化。在这一阶段，应用具有强筋健骨功效的中药，可以促进成骨细胞增殖，有效提高骨密度，促进骨痂改造与塑形[8－10]。

接骨膏由土家药材独正杆、刺老苞、刺五加组方而成，经粉碎、混匀、炼蜜调制成膏药，具有活血化瘀、祛瘀生新、接骨疗伤的功效，外敷可用于闭合性骨折，在恩施土家族苗族自治州中心医院临床应用30余年，疗效显著。其中，独正杆为葡萄科植物蛇葡萄 *Ampelopsis brevipedunculata*（Maxim）trautv 的干燥根，临床用于活血化瘀、消肿止痛；刺老苞为五加科植物楤木 *Aralia chinensis* L.的干燥根皮，临床用于散瘀消肿、活血止血；刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus*（Rupr.et Maxim.）Harms的干燥根和根茎或茎，临床用于祛风湿、强筋骨。接骨膏虽然疗效显著，但其以药材粉末直接入药使用的方式，限制了其活性成分快速、充分地释放，故存在给药剂量大、外敷接触面积大、患者依从性欠佳的缺陷。因此，为了提高接骨膏的临床疗效以及患者的依从性，本研究将接骨膏中的3味药材按临床应用比例组方后，分别制备其醇提物、乙酸乙酯部位和正丁醇部位，并对比这3个部位对新西兰兔骨折愈合的影响，从而筛选接骨膏促进骨折愈合的活性部位，以期为临床用药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

本研究所用动物为清洁级新西兰兔，共26只，雄性，体质量2.0～2.2 kg，购自湖北省逸挚诚生物科技有限公司，动物生产许可证号为SCXK（鄂）2016-0020。兔饲养于三峡大学动物实验中心，饲养条件为温度（20～25）℃、相对湿度（55±5）%，在此期间自由进食、饮水。本实验经三峡大学实验动物福利与伦理委员会批准（批准号为20200187）。

1.2 药品与试剂

独正杆、刺老苞、刺五加由湖北省建始县民族药材基地提供，经恩施土家族苗族自治州中心医院药学部主任张思波中药师鉴定为真品；苯巴比妥钠注射液（批号2012231）购自天津金耀药业有限公司；蜂蜜（批号2021032501）购自福建省神蜂科技开发有限公司；OC、VEGFA、TNF-α、IL-6、bFGF2、ALP酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒以及豚鼠抗兔bFGF2多克隆抗体（批号分别为L210511009、L210512940、L210507091、L210506259、L20603515、L210527105、PAA551Rb51）均购自武汉云克隆科技股份有限公司；苏木素-伊红（HE）染色试剂盒（批号RE1100）购自武汉百杰康生物科技有限公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号B210317234）购自武汉塞维尔生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

本研究所用主要仪器有EYELA N-1100型旋转蒸发仪（日本东京理化器械株式会社），TC-15型套式恒温器（山东新华医疗器械股份有限公司），FD-1A-50型真空冷冻干燥机（江苏天翎仪器有限公司），JE303GE型电子天平（梅特勒-托利多仪器有限公司），H1650R型台式高速冷冻离心机（湘仪离心机仪器有限公司），KD-BM&BL型生物组织包埋一体机、KD-2258型石蜡切片机、KD-P型生物组织摊片机（金华市科迪仪器设备有限公司），CKX41型显微镜（日本Olympus公司）。

2 方法

2.1 接骨膏不同极性部位的制备

按接骨膏处方比例，取独正杆800 g、刺老苞800 g、刺五加400 g，混匀，粉碎，过100目筛；以8倍体积的75%乙醇溶液回流提取2次，滤过，合并滤液，回收溶剂，冷冻干燥，即得醇提物（得率为14.37%）。取180 g醇提物进行粉碎，过200目筛，悬浮于适量水中，依次使用等体积的乙酸乙酯、正丁醇萃取2次，回收溶剂，冷冻干燥，即得乙酸乙酯部位、正丁醇部位（得率分别为3.31%、4.90%）。

取醇提物、乙酸乙酯部位、正丁醇部位样品适量，粉碎，过200目筛，与蜂蜜按质量比1∶3调制成黏稠度适宜的膏药，常温密封保存1周后，在纱布上将药膏涂布制成5 cm（长）×3 cm（宽）×0.2 cm（厚）的载药纱布块，备用[11]。

2.2 造模、分组及干预

将兔固定后，以苯巴比妥钠（1 mL/kg）经耳缘静脉麻醉，在兔左前肢桡骨侧备皮、消毒；沿桡骨前内侧，以桡骨中、下1/3段交界处为中心，依次切开皮肤、浅筋膜、深筋膜，钝性分离肌肉、暴露桡骨；在桡骨中段，用咬骨钳造成桡骨中段5 mm的骨缺损，保证尺骨完整性。经X线检测后，若兔桡骨中段骨组织完全缺损无连接、尺骨无损伤则表明造模成功[12]。术后3 d内肌内注射青霉素预防感染，每天2次。

本研究共有25只兔造模成功。随机挑选24只造模成功的兔分为模型对照组、醇提物组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组，每组6只。造模成功1 d后，在兔造模伤口背面上下5 cm区域备皮，将各组载药纱布采用夹板固定在备皮部位的中央区域，每3 d换药1次，持续4周。模型对照组不外敷药物，仅以同样大小的夹板包扎固定，夹板更换时间同3个给药组。

2.3 兔骨折部位愈合进程检测

各组兔在造模当天和给药第7、14、21、28天时，采用X线观察骨痂阴影情况，骨折线模糊、消失的时间以及骨髓腔贯通时间。

2.4 兔血清中IL-6、TNF-α、OC、VEGFA、bFGF2、ALP水平的检测

各组兔于造模当天及给药第7、14、21、28天时，经静脉采血2～2.5 mL，以1 500 r/min离心5 min，取上清液，采用ELISA试剂盒检测兔血清中IL-6、TNF-α、OC、VEGFA、bFGF2、ALP的水平。

2.5 兔骨折部位病理形态学的观察

各组兔在末次给药后，经静脉采血后处死，以骨折处为中心取桡骨段1 cm，剔除软组织，放入含10%多聚甲醛的EDTA脱钙液中缓慢脱钙2～3月；脱钙完成后，将桡骨骨折愈合部位修平整，置于对应标签的小组织脱水盒内，然后进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋，经切片、脱蜡后，进行HE染色，然后以树胶封片，采用显微镜观察病理形态学并拍照。

2.6 兔骨折部位bFGF2蛋白表达水平的检测

取桡骨骨折愈合部位标本，按“2.5”项下方法制备切片，以二甲苯、乙醇梯度脱蜡至水，然后进行抗原修复、内源性过氧化物酶灭活、特异性位点封闭；加入bFGF2一抗（稀释度1∶300）于4 ℃孵育过夜，以磷酸盐缓冲液（PBS）清洗；加入二抗（稀释度1∶200）于37 ℃孵育1 h，以PBS清洗；经DAB显色、苏木精复染后，再以梯度乙醇脱水、树胶封片，采用显微镜进行观察并拍照。

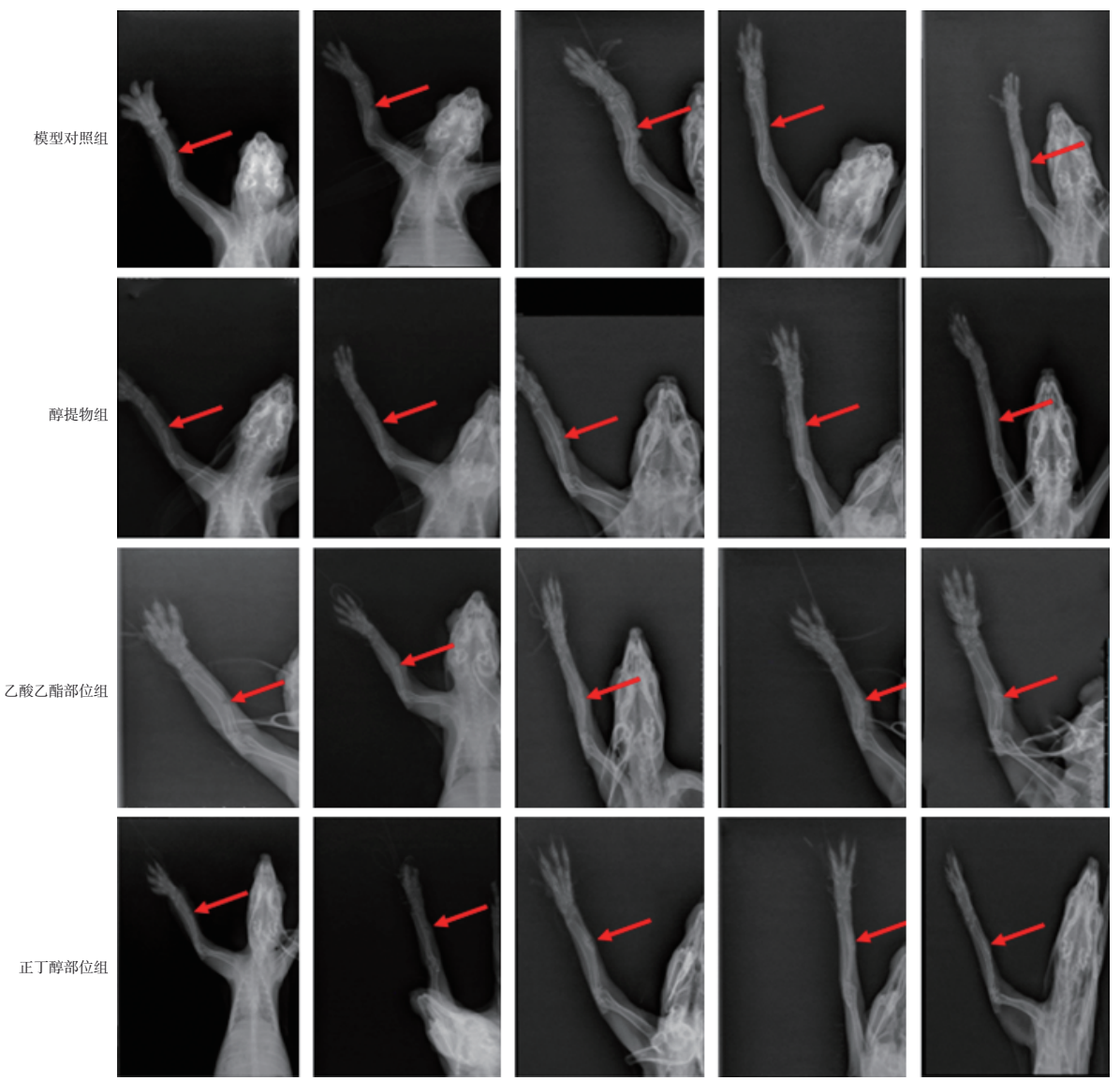
2.7 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计学分析，符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐时采用Bonferroni法进行组间两两比较，方差不齐时采用Tamhane’s *T*2法。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 接骨膏不同极性部位对兔骨折部位愈合的影响

由图1可见，模型对照组兔的桡骨骨折线在造模后第28天时变得模糊，但未消失；乙酸乙酯部位组兔的骨



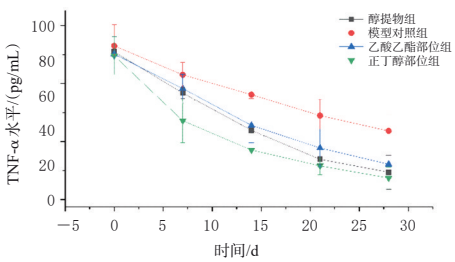
注：箭头所指为桡骨骨折部位

图1 各组兔桡骨骨折愈合的情况

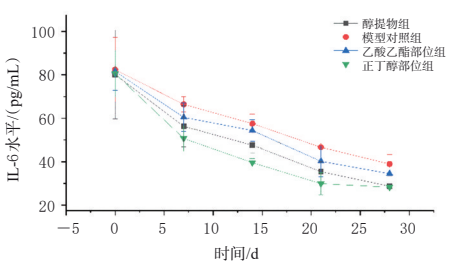
折线在造模后第21天时变得模糊，在第28天时消失；醇提物组兔的桡骨骨折线在造模后第21天时未消失，骨折愈合处的骨组织在第28天时开始增厚；正丁醇部位组兔的桡骨骨折线在造模后第21天时完全消失，骨折处的骨髓腔在第28天时开始贯通。由此可知，正丁醇部位组兔骨折部位的愈合速度最快，醇提物组愈合速度次之，乙酸乙酯部位组愈合速度较醇提物组慢，模型对照组愈合速度最慢。

3.2 接骨膏不同极性部位对兔血清中IL-6、TNF-α、OC、VEGFA、bFGF2、ALP水平的影响

由图2可见，正丁醇部位组兔血清中TNF-α、IL-6水平下降最快，其次为醇提物组。实验结束时，正丁醇部位组兔血清中TNF-α、IL-6水平低于醇提物组，但差异无统计学意义。



A. TNF-α



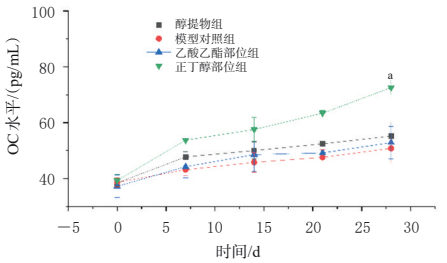
B. IL-6

图2 各组兔血清中TNF-α、IL-6水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

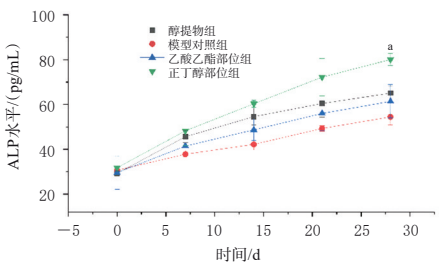
由图3可见，各组兔血清中OC、ALP、bFGF2、VEGFA水平从造模当天至第28天均呈逐渐上升趋势，其中正丁醇部位组上升最快，其次为醇提物组。实验结束时，与醇提物组比较，正丁醇部位组兔血清中OC、ALP、bFGF2、VEGFA水平均显著升高（$P<0.01$）。

3.3 接骨膏不同极性部位对兔骨折部位病理形态学的影响

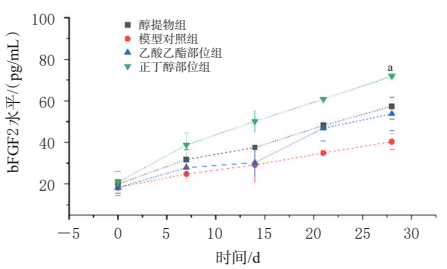
由图4可见，模型对照组兔骨折部位的软骨细胞向骨痂转化，并产生少量孔径较小的骨髓腔，另外有小部分骨开始钙化；乙酸乙酯部位组兔骨折部位的病理形态学特征与模型对照组几乎一致；醇提物组兔骨折部位大部分软骨细胞消失，少数软骨细胞刚好完成向骨髓腔的转化，多数骨髓腔内骨小梁未正式形成，有小部分骨开始钙化；正丁醇部位组兔骨折部位的软骨细胞完全消失，形成大量骨髓腔，且骨髓腔内骨小梁正式形成。



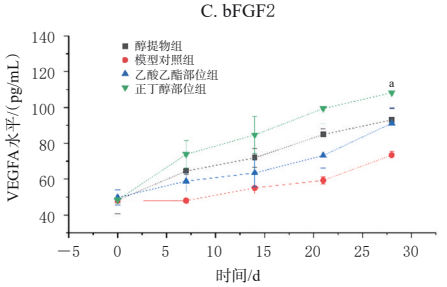
A. OC



B. ALP



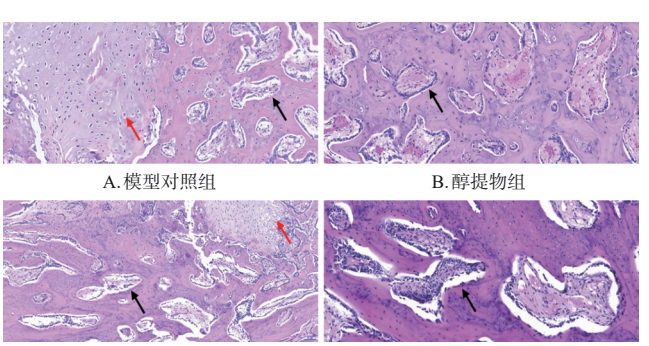
C. bFGF2



D. VEGFA

a：与醇提物组比较，$P<0.01$

图3 各组兔血清中OC、ALP、bFGF2、VEGFA水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）


A. 模型对照组　B. 醇提物组

C. 乙酸乙酯部位组　D. 正丁醇部位组

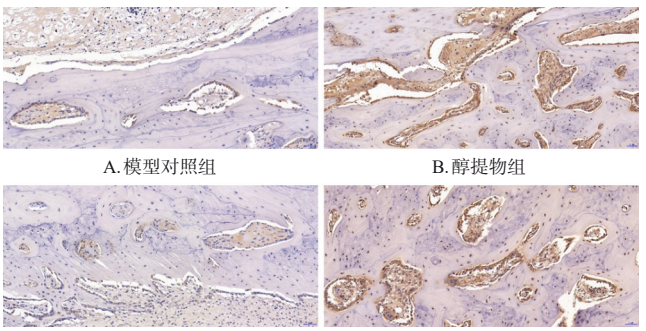
注：红色箭头为软骨细胞，黑色箭头为骨髓腔

图4 各组兔骨折部位病理形态学的显微图（×200）

3.4 接骨膏不同极性部位对兔骨折部位bFGF2蛋白表达的影响

由图5可见，与模型对照组比较，正丁醇部位组和醇

提物组兔骨折部位bFGF2蛋白表达水平均升高，且正丁醇部位组表达更高。



A.模型对照组　B.醇提物组

C.乙酸乙酯部位组　D.正丁醇部位组

注：图中黄褐色细胞为高表达bFGF2蛋白的成骨细胞

图5　各组兔骨折部位bFGF2蛋白表达的免疫组化图（×200）

4　讨论

本研究X线检测结果显示，正丁醇部位组与醇提物组兔骨折线消失时间与骨髓腔贯通时间较模型对照组提前，这提示，接骨膏醇提物和正丁醇部位均可促进兔骨折部位的愈合，表明对接骨膏75%醇提物进行正丁醇萃取可有效富集其活性成分，进而增强其促进骨折愈合的药理作用。

在骨折血肿炎症机化期内，过度的炎症反应，如M1型巨噬细胞过度分泌TNF-α、IL-6，会刺激T细胞抑制成纤维细胞、软骨细胞、成骨细胞以及参与骨痂构建功能的间充质干细胞向血肿内趋化与转移，进而延长骨折愈合进程[13—14]。本研究结果显示，接骨膏正丁醇部位降低兔血清中TNF-α、IL-6水平的速度最快，其次为醇提物，这说明接骨膏正丁醇部位的抗炎作用较醇提物更好。

OC是骨基质中最丰富的标志物之一，其缺失会导致骨质疏松；VEGFA具有促进血管生成、提高血管通透性等作用，可以促进骨折愈合；bFGF2是骨折愈合过程中发挥关键作用的细胞因子之一，对骨祖细胞、原始干细胞、成骨细胞、软骨细胞以及血管形成均具有显著的促进作用；血清中ALP表达水平越高，表明成骨细胞越活跃，骨折愈合能力越强[15—16]。本研究结果显示，接骨膏正丁醇部位在骨折愈合进程中，可持续升高兔血清中ALP、bFGF2、OC、VEGFA水平，且作用较醇提物更显著。成骨细胞分泌的bFGF2，对骨折愈合产生促进作用，主要存在于新产生的骨髓腔内，在骨小梁周围呈有序致密排列[14]。HE染色结果和免疫组化结果显示，与醇提物组比较，正丁醇部位组兔骨折部位的软骨细胞完全消失，形成大量骨髓腔，且骨髓腔内骨小梁正式形成；骨折部位bFGF2蛋白表达水平升高。这说明接骨膏正丁醇部位对兔骨折部位的愈合作用较醇提物更好。

综上所述，接骨膏正丁醇部位促进兔骨折部位愈合的作用强于醇提物以及乙酸乙酯部位，是接骨膏促进骨折愈合的活性部位。

参考文献

[1] HUANG H Q，LUO L，LIU Z T，et al. Role of TNF-α and FGF-2 in the fracture healing disorder of type 2 diabetes model induced by high fat diet followed by streptozotocin [J]. Diabetes Metab Syndr Obes，2020，13：2279-2288.

[2] CHEN T H，WEBER F E，MALINA-ALTZINGER J，et al. Epigenetic drugs as new therapy for tumor necrosis factor-α-compromised bone healing[J]. Bone，2019，127：49-58.

[3] 胡灏，王任先，万奔，等. 骨发育及损伤修复过程中骨形成与血管形成的偶联作用[J]. 中国骨与关节杂志，2021，10(11)：871-876.

[4] 黄幸儒，陈旭，罗天，等. 筋骨疗伤膏外敷对大鼠急性软组织损伤的消肿止痛作用研究[J]. 按摩与康复医学，2021，12(15)：42-46.

[5] YANG S，CHENG J，MAN C，et al. Effects of exogenous nerve growth factor on the expression of BMP-9 and VEGF in the healing of rabbit mandible fracture with local nerve injury[J]. J Orthop Surg Res，2021，16(1)：74.

[6] 郭松. 解毒活血化瘀汤对股骨颈骨折术后炎症反应及骨折愈合影响[J]. 中国现代医生，2020，58(1)：73-75.

[7] 赵灏，易智. 活血化瘀汤对股骨骨折大鼠骨痂组织胶原表达水平及促进愈合机制分析[J]. 四川中医，2019，37(2)：37-40.

[8] WANG Y J，CHEN W T，ZHAO L，et al. Obesity regulates miR-467/HoxA10 axis on osteogenic differentiation and fracture healing by BMSC-derived exosome LncRNA H19[J]. J Cell Mol Med，2021，25(3)：1712-1724.

[9] ZHANG X Y，CHEN Y P，ZHANG C，et al. Icariin accelerates fracture healing via activation of the Wnt1/β-catenin osteogenic signaling pathway[J]. Curr Pharm Biotechnol，2020，21(15)：1645-1653.

[10] 黄明艳，刘超，王阶. 活血化瘀中药促内皮祖细胞血管修复和新生研究进展[J]. 中国中医药信息杂志，2019，26(7)：141-144.

[11] 苗明三，尹俊涛，缪君娴，等. 中药外用药理实验存在问题及解决思路[J]. 时珍国医国药，2008，19(12)：2945-2946.

[12] 徐元翠，万仲贤，黄华斌，等. 独正杆不同极性部位促进SD大鼠骨折愈合活性研究[J]. 环球中医药，2018，11(2)：177-181.

[13] 魏海峰. 染氟成纤维细胞和成骨细胞IGF-1及bFGF的表达及其意义[D]. 长春：吉林大学，2007.

[14] PAOLI F D，STAELS B，CHINETTI-GBAGUIDI G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis[J]. Circ J，2014，78(8)：1775-1781.

[15] 钱洲曜，王勇平. 血管内皮生长因子有望成为加速骨折愈合的全新治疗手段[J]. 中国组织工程研究，2020，24(17)：2759-2769.

[16] 段硕，邓丹华，陈磊，等. 活血补肾壮骨方对GIOP型大鼠骨折愈合的作用及对骨密度、血清碱性磷酸酶和骨钙素水平的影响[J]. 中国中医急症，2020，29(10)：1728-1731，1758.

（收稿日期：2022-11-15　修回日期：2023-04-23）

（编辑：唐晓莲）