基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0141-04

接骨Ⅰ号治疗兔桡骨骨折中 BMP-7 表达的实验研究

邵高海,邱 宇,高仕长,倪卫东
(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨中药接骨Ⅰ号治疗对兔桡骨骨折中骨形态发生蛋白-7(Bone morphogenetic protein-7,BMP-7)表达的影响。方法:选取 56 只健康成年新西兰大白兔,制作双侧桡骨 3 mm 骨缺损模型,随机分为实验组和对照组,每组 28 只。实验组给予中药接骨Ⅰ号外敷治疗,对照组不给予治疗。分别于术后 5、7、9 d 及 2、3、4、6 周处死实验动物,其中 2、4、6 周行 X 片及组织切片 HE 染色检查以观察骨折愈合情况,第 5、7、9 天和 2、3 周行免疫组化及 RT-PCR 以了解 BMP-7 在治疗过程中的变化。结果:X 线片提示实验组骨痂出现较对照组早、数量多、出现骨性愈合时间较对照组早。HE 切片提示实验组纤维连接出现较对照组早、成骨细胞和破骨细胞及骨痂量较对照组多、骨性愈合时间较对照组早。实验组 RT-PCR 灰度值、免疫组化平均光密度值(Mean optical density,MOD)与对照组行两样本均数比较的 t 检验、差别有统计学意义($P<0.05$)。结论:接骨Ⅰ号通过促进BMP-7的表达而促进骨折的愈合。

【关键词】接骨Ⅰ号;骨形态发生蛋白-7;兔;桡骨;骨折
【中国图书分类法分类号】R264 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-07-27

BMP-7 expression at the treatment of radius fracture using "Jie Gu Yi Hao" in rabbit

SHAO Gao-hai, et al
(*Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the variation of bone morphogenetic protein-7(BMP-7)before and after "Jie Gu Yi Hao" treatment in the radius fracture of rabbit. *Methods*: 56 rabbits of New Zealand were randomly assigned into 2 groups, experimental group and control group.3 mm-long bone defect were taken in both radii of each rabbit. The experimental group were treated by "Jie Gu Yi Hao", while the control group was not treated. After 2,4,6 w, sacrifice the experimental animal. Then, assess the fracture healing through X-ray and HE. After 5,7,9 d and 2,3 w, observe the changes of BMP-7 through RT-PCP and immunohistochemistry. *Results*: X-ray shows: experimental group's bone callus appeared earlier and having more quantity bone callus. The experimental group's fibronectin and osteoblast occurs earlier than control group through HE, also have more callus than control group. Finally, do statistical analysis as the mean comparison of two samples' test into gray value of RT-PCR and MOD of immunohistochemistry. The results show that the difference is statistically significant. *Conclusion*: "Jie Gu Yi Hao" can promote fracture healing by improving the expression of BMP-7.

【Key words】jie gu yi hao; BMP-7; rabbit; radius; fracture

中医学认为骨折愈合的过程是一个"瘀去、新生、骨合"的过程。祖国传统医药在促进骨折愈合方面的疗效是肯定的,但其作用机理尚不完全确定。现代医学对骨折愈合的研究深入到细胞分子水平,为中药促进骨折愈合机理的研究提供了新的方法。本实验即利用 RT-PCR 及免疫组化技术从基因和蛋白水平探讨兔桡骨骨折经中药接骨Ⅰ号治疗前后骨形态发生蛋白-7(Bone morphogenetic protein-7,BMP-7)的表达变化、在基因和蛋白水平探讨中医药促进骨折愈合的作用机理。

作者介绍:邵高海(1972-),男,副教授,硕士,
研究方向:骨折愈合基础与临床。
通信作者:倪卫东,男,教授,Email:niweidong18@163.com。
基金项目:重庆市卫生局中医处资助项目(编号:2008-2-39)。

1 材料和方法

1.1 实验动物

56 只新西兰大白兔,雌雄不拘,6 月龄,体重 2.0~2.5 kg,由重庆医科大学动物实验中心提供并饲养。随机将动物分为 2 组:实验组 28 只给予中药接骨Ⅰ号外敷包扎,对照组 28 只仅仅采用纱布和绷带包扎。术后 5、7、9 d 及 2、3、4、6 周分批处死动物,每批每组 4 只。

1.2 动物模型制作

实验动物双前肢脱毛,常规消毒铺巾,以 3%戊巴比妥钠按 30 mg/kg 行耳缘静脉注射麻醉。取双前肢外侧切口,逐

层切开显露桡骨，于桡骨中段剥离骨膜约 1.0 cm 长。用厚 3 mm 的自制手锯锯断造成双侧桡骨中段横形 3 mm 的骨质缺损。术毕以冲洗，逐层缝合包扎。不行固定，自由活动、自由饮食。术后肌注青霉素预防感染 3 d。

1.3 接骨Ⅰ号外敷制剂的制作

中药接骨Ⅰ号购于和平药房。将其研成粗粉状，加液体石蜡调匀，取该混合制品 10 g 置于灭菌纱布上制成外用膏药。实验动物造模成功后第 4 d，待切口干燥后取该混合制品敷于骨缺损部位、外用绷带包扎，每周换药 1 次。对照组仅仅采用纱布和绷带包扎。

2 检测方法

2.1 X 线摄片

分别于术后 2、4、6 周对实验组和对照组实验动物前肢行 X 线片检查，比较实验组和对照组骨痂出现的时间及数量的差异、骨折线的变化、骨性愈合及髓腔再通的情况。

2.2 组织学观察

到达检测时间后处死实验动物，以桡骨骨缺损处为中心两端各截取 1.0 cm 长原桡骨获取标本经 4%多聚甲醛溶液固定 48 h，5%硝酸脱钙 15 d，石蜡包埋后以 5 μm 厚连续切片行 HE 染色，普通光学显微镜观察。

2.3 RT-PCR 检测 BMP-7 基因表达

无菌条件下取骨折愈合处的骨痂快速冻于液氮中，24 h 后转存于 -80℃低温冰箱，提取总 RNA 后逆转录，将逆转录产物扩增后凝胶电泳，电泳结果利用凝胶图像分析软件 Band Scan 5.0 测出目的基因和内参基因 β-actin 的灰度值，结果以二者的比值表示，行统计学分析。

2.4 免疫组化检测 BMP-7 表达

石蜡切片常规脱蜡至水，采用 SABC 法行免疫组化染色，用对照组组织切片作为阳性对照，用 0.01 mol/L PBS 代替一抗染色的切片作阴性对照，DAB 显色。免疫组化染色片显微镜下拍照后用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析其平均光密度值、行统计学分析。

2.5 统计学分析

所有数据均采用平均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。所有数据均采用两个样本均数比较的 t 检验，设定 $\alpha=0.05$、$P<0.05$ 代表差异有统计学意义，SAS8.2 统计软件进行统计学处理。

3 结 果

3.1 X 线片观察结果分析

X 线片结果显示，实验组骨折愈合速度快于对照组。术后 2 周实验组和对照组均可见清晰骨折线，实验组骨痂形成明显；对照组仅见有骨膜反应。术后 4 周，实验组骨折线消失，外骨痂完全桥接断端，骨痂面积开始缩小；对照组骨折线模糊、可见少量骨痂生长。术后 6 周，实验组骨折端为骨性连接，髓腔再通；对照组骨折线消失，骨痂明显、面积缩小，髓腔未通。见图 1A、1B。

3.2 HE 染色组织学分析

骨折断端间从血肿机化、纤维连接到编织骨形成及板层骨生成，实验组早于对照组，从内外骨痂的形成到内外骨痂的增多，以及内外骨痂的吸收，最后骨髓腔的再通，实验组同样早于对照组。

第 2 周：实验组骨折断端间形成纤维连接，有的区域出现了骨小梁和软骨，骨外膜增生明显，出现大量骨小梁，可见骨外膜软骨性骨痂与对侧骨外膜软骨性骨痂相连；对照组肉芽组织尚未完全被纤维组织取代，内外骨痂少，未见两端相连现象。

第 4 周：实验组骨折断端间出现板层骨，编织骨减少，破骨细胞增多，软骨成分少见；对照组断端间仍见大量软骨成分，编织骨开始增多。

第 6 周：实验组骨折端由板层骨连接，软骨成分消失，骨塑型明显，骨髓腔再通；对照组骨痂由编织骨和板状骨构成，以编织骨为主，软骨成分已经、少见，骨髓腔未通，内外骨痂开始塑型变薄。见图 2A、2B。

3.3 RT-PCR 结果分析

中药治疗组 BMP-7 基因表达水平高于空白对照组，



A. 术后 4 周实验组骨折线消失，外骨痂完全桥接骨折断端



B. 术后 4 周对照组断端可见外骨痂相连，但仍可见骨折线

图 1 X 线片观察骨折的愈合情况

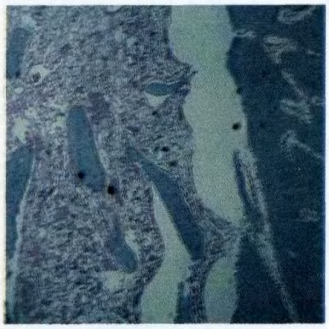
BMP-7 基因表达在实验组和对照组中的差别在术后 7、9 d 差别最为显著（$P<0.01$），在术后 3 周实验组 BMP-7 基因表达仍维持在较高的水平。见图 3、表 1。

3.4 免疫组化结果分析

中药治疗组 BMP-7 阳性表达率高于空白组，术后 9 d 差别尤为显著（$P<0.01$）；术后 5 d，BMP-7 在实验组和对照组的表达差异无统计学意义（$P>0.20$）；术后 7 d，2、3 周，实验组骨痂中 BMP-7 表达均高于对照组（$P<0.05$）。见图 4A、4B，表 2。

4 讨 论

在长期的临床实践中，中医学总结出许多应用于骨伤方面的药方，接骨Ⅰ号便是其中较有代表性的 1 种，其组成为：

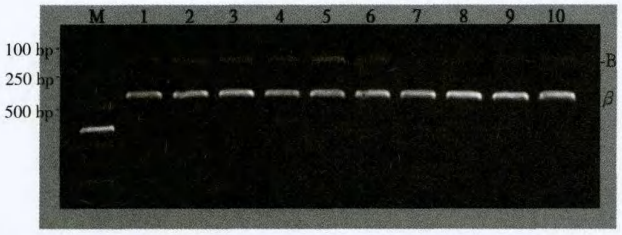


A. 术后 6 周实验组骨折端由板层骨连接，软骨成分消失，骨髓腔基本再通



B. 术后 6 周对照组骨痂由编织骨和板状骨构成，以编织骨为主；软骨成分已少见，骨髓腔未通

图 2 骨折愈合情况（HE 染色 光镜×100）



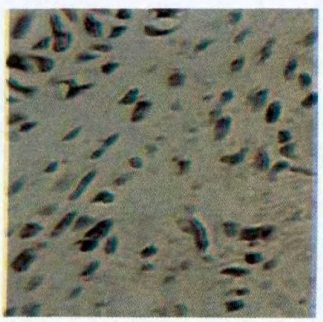
M.DNA Marker；B.BMP-7；β.β-actin；1.中药治疗 5 d；2.中药治疗 7 d；3.中药治疗 9 d；4.中药治疗 2 周；5.中药治疗 3周；6.对照组 5 d；7.对照组 7 d；8.对照组 9 d；9.对照组 2周；10.对照组 3周

图 3 实验组与对照组 BMP-7 基因表达情况（RT-PCR）

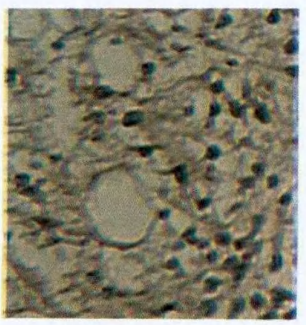
表 1 RT-PCR 灰度值统计学分析（$\bar{x}\pm s$）

检测时间	实验组	对照组	t 值	P 值
5 d	0.425 1 ± 0.105 5	0.236 1 ± 0.121 3	2.816	<0.05*
7 d	0.751 3 ± 0.198 4	0.251 9 ± 0.064 4	3.653	<0.01*
9 d	0.905 4 ± 0.216 9	0.549 5 ± 0.173 2	3.547	<0.01*
2 周	0.876 6 ± 0.243 1	0.636 7 ± 0.251 3	2.745	<0.05*
3 周	0.821 5 ± 0.375 3	0.587 4 ± 0.150 7	3.575	<0.01*

行两样本均数比较的 t 检验，*$P<0.05$ 为差异有统计学意义



A. 中药治疗术后 7 d



B. 空白处理术后 7 d

图 4 实验组与对照组 BMP-7 表达的差异（免疫组化 光镜×200）

表 2 免疫组化平均光密度值统计分析($\bar{x} \pm s$)

检测时间	实验组	对照组	t 值	P 值
5 d	0.334 2 ± 0.115 4	0.295 3 ± 0.054 1	1.031	>0.20
7 d	0.553 9 ± 0.051 4	0.310 0 ± 0.078 6	2.583	<0.05*
9 d	0.886 7 ± 0.136 5	0.510 8 ± 0.130 2	4.952	<0.01*
2 周	0.758 0 ± 0.253 1	0.643 8 ± 0.077 3	2.735	<0.05*
3 周	0.716 4 ± 0.166 2	0.611 2 ± 0.105 7	2.462	<0.05*

行两样本均数比较的 t 检验、*P<0.05 为差异有统计学意义

红花、桃仁、桂枝、川芎、乳香、没药、元胡、锻自然铜、续断、狗脊等。中医学认为,骨折愈合是一个"瘀去、新生、骨合"的过程,骨折愈合与肾脾肝及血瘀有密切关系,接骨Ⅰ号具有补肾健脾、益气活血、祛瘀生新的功效[1]。在血肿机化期,川芎、桃仁可提高毛细血管网的通透性,从而改善骨折断端局部血液循环[2];原始骨痂形成期、骨折断端由于局部缺氧、机体通过正常代偿反应诱导软骨细胞线粒体中钙离子释放于基质中,刺激成骨细胞分化繁殖,此时如果过量的使用活血化瘀药可能会破坏这种相对稳定的代偿机制,因此应该转向用续损接骨为主的药物,自然铜含有钙盐和锌、铜等多种微量元素、参与蛋白合成酶代谢[3],在该时期的应用就会增加机体的骨修复作用;在骨痂改造塑型期,应用改善蛋白及代谢、促进蛋白质多糖合成及钙化的药物可以有效的促进原始骨痂改造塑型时新骨的爬行和替代过程[4],从而缩短骨痂改建的时间,增强骨折愈合部位的强度。红花中铜、锌的含量明显高于其他药材,可通过补充金属离子增加家兔对锌铜元素的吸收,并通过其活血化瘀作用加强血清和邻近组织中锌铜元素参与修复反应,从而显著促进骨折的愈合[5]。乳香、没药可以扩散血管、改善微循环,清除坏死组织和代谢产物,增加局部供氧,促进营养物质的吸收[6]。自然铜含骨折愈合所需的钙、磷、铜、铁等矿物质,可诱导成纤维细胞转变为成骨细胞,促进骨痂生成[7],还能促进骨髓本身及周围血液中红细胞和血色素的增生,加快骨痂的胶原合成,促进钙磷沉积,而加速骨折愈合[8]。续断能增强成骨细胞的数量和活性,能促进骨折愈合后期骨痂的改建[9]。虽然众多的实验室和临床研究都证实中药能有效促进骨折的愈合,但是在其具体作用机理方面的研究仍然显得较为缺乏。

BMP-7 属转化生长因子-β(Transforming growth factor-β,TGF-β)超家族成员,是一种多效性细胞因子。BMP-7 在成骨部位高表达,具有高效骨诱导活性,可诱导间充质细胞向成骨、成软骨细胞分化,进而产生新生骨;促进碱性磷酸酶的表达,修复和重建骨、软骨缺损[10]。den Boer 等[11]在应用 rhBMP-7 治疗骨缺损模型中发现,rhBMP-7 治疗组骨折部位愈合骨痂直径、骨痂体积、局部骨痂矿物质含量均显著高于对照组,可见 rhBMP-7 可以加速骨折愈合,并且可以生成正常的愈合骨。Haaijman 等[12]研究发现在长骨骨骺软骨膜应用 BMP-7 可促进细胞的增殖,使胶原的表达从Ⅰ型向Ⅱ型方向转化,诱导软骨膜转化成软骨,说明 BMP-7 在软骨内骨化的级联机制中起重要的作用。本实验研究结果显示中药接骨Ⅰ号治疗组骨痂组织中 BMP-7mRNA 和蛋白表达都较对照组增加、其差异具有统计学意义,X 线片和 HE 组织学、生物力学实验结果显示中药接骨Ⅰ号治疗组骨折愈合明显优于对照组。

综上所述,本实验结果提示中药接骨Ⅰ号促进骨折愈合与其能够促进 BMP-7 基因转录和表达有关,为中药接骨Ⅰ号促进骨折愈合的机理是其促进成骨因子的表达提供了佐证。

参 考 文 献

[1] 王 策,孙承继,王立朝.接骨Ⅰ号内服外敷治疗骨折迟延愈合 50 例报告[J].中医正骨,2002,14(12):23.

[2] 刘钟华,杨世荣,回 春.中药促进骨折愈合的实验研究概况[J].长春中医学院学报,2004,20(2):63-65.

[3] 李也白,温 宏,徐华梓,等.复合中药制剂促进骨折愈合的实验研究[J].骨与关节损伤杂志,1999,14(2):108-110.

[4] 周秋丽,王丽娟,郭颖杰,等.鹿茸多肽对实验性骨折的治疗作用及机理研究[J].白求恩医科大学学报,1999,25(5):586-588.

[5] 赵晓莲,翟饶生,李 晶,等.红花对家兔实验性骨折愈合中锌铜含量的影响[J].黑龙江医药科技,2004,27(2):43-44.

[6] 吴院学,孙承继,张 亮.接骨Ⅰ号与红药膏治疗骨折 168 例临床观察[J].中医正骨,2005,17(7):30-32.

[7] 王智兴,过帮辅,柴本甫,等.自然铜在骨折愈合过程中对总胶原、不溶性胶原、钙、磷和生物力学影响[J].中华骨科杂志,1986,6(4):305-307.

[8] 骆和生,王建华.中药方剂的药理与临床研究进展[M].广州:华南理工大学出版社,1991.235-238.

[9] 洪定钢,时光达.续断对实验性骨折愈合影响的骨组织形态计量学研究.中国中医骨伤科杂志,1999,7(3):4-7.

[10] 周 乐,崔 燎.骨形态发生蛋白-7 对肾、骨的作用[J].中国骨质疏松杂志,2006,2(5):538-542.

[11] Den Boer F C, Bramer J A, Blokhuis T J, et al. Effect of recombinant human estrogenic protein-7 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture[J]. Bone, 2002, 31:158-164.

[12] Haaijman A, D'Souza R N, Bronekers A L, et al. OP-1(BMP-7) affects mRNA expression of type Ⅰ, Ⅱ, X eonagen and matrix Glaprotein in ossifying long bones in vitro[J]. Bone Miner Res, 1997, 12:1815-1823.

(责任编辑:关蕴良)