

桃红四物汤对早期闭合性骨折祛瘀生新作用的初步探讨

季兆洁¹, 韩岚¹, 彭代银¹, 陈卫东¹, 李珊珊¹, 周贞贞¹, 朱光宇^{2*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽省现代中药重点实验室, 合肥 230001;

2. 安徽省马鞍山市中心医院, 安徽 马鞍山 243000)

[摘要] **目的:**研究桃红四物汤对闭合性骨折早期的治疗作用。**方法:**SD大鼠60只,分为6组,分别为正常组、模型组、桃红四物汤高、中、低剂量组(18, 9, 4.5 g·kg⁻¹)、麝香接骨胶囊组(0.6 g·kg⁻¹),借由专用的骨折器造成胫骨闭合性骨折,建立大鼠胫骨闭合性骨折模型,给药后观察对骨折大鼠血液黏度的影响,采用放射免疫法测定血浆中血栓素B₂(TXB₂),6-酮前列腺素F_{1 α} (6-Keto-PGF_{1 α})的含量以及TXB₂/6-Keto-PGF_{1 α} ,采用酶联免疫法(ELISA)测定血清中血管内皮生长因子(VEGF)的含量,取骨组织病理切片观察骨痂微血管生成及骨折愈合情况。**结果:**与正常组比较,模型组明显骨折面缺损,大鼠血液黏度明显升高,血浆中TXB₂水平, TXB₂/6-Keto-PGF_{1 α} 明显升高,均具有统计学差异($P < 0.01$), VEGF浓度略微升高;与模型组比较,麝香接骨胶囊组、桃红四物汤高、中、低剂量组可明显的促进骨折区血管新生和骨折愈合,可明显降低骨折大鼠血液黏度,显著降低血浆中TXB₂水平, TXB₂/6-Keto-PGF_{1 α} , VEGF浓度明显增高,均具有统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$),尤其是桃红四物汤高剂量组与麝香接骨胶囊组效果一致($P < 0.01$)。**结论:**桃红四物汤对胫骨闭合性骨折具有很好的祛瘀生新作用,其作用机制可能与桃红四物汤改善血液黏度、减低TXB₂/6-Keto-PGE_{1 α} ,促进VEGF的表达有关。

[关键词] 桃红四物汤; 骨折愈合; 血管新生; 祛瘀生新

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0125-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030125

Stasis-removing and Regeneration-promoting Effect Study of Taohong Siwu Tang on Closed Fractures

Ji Zhao-jie¹, Han Lan¹, Peng Dai-yin¹, Chen Wei-dong¹, Li Shan-shan¹, Zhou Zhen-zhen¹, Zhu Guang-yu^{2*}

(1. Anhui Key Laboratory of Modernized Chinese Material, College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230001, China; 2. Department of Pharmacy, Maanshan Cenreal Hospital, Maanshan 243000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the treating effect on early closed fractures using Taohong Siwu Tang (TST). **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into six groups: normal group, model group, TST-treated group (18, 9, 4.5 g·kg⁻¹) and Shenxiang Jiegu group (0.6 g·kg⁻¹). The tibia closed fracture model rats were created using a dedicated fracture pusher. The influence on blood viscosity of TST was observed. The plasma thromboxane (TXB₂) and 6-ketone prostaglandin (6-keto-PGE_{1 α}) content were detected by RIA, the serum vascular endothelial growth factor (VEGF) content was assayed by ELISA. The situation of callus microvascular and fracture healing were observed using bone biopsy. **Result:** Compared with the normal group, model group showed severity of fracture defects and the blood viscosity increased significantly ($P < 0.01$). Additionally, both plasma TXB₂ and TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} elevated markedly ($P < 0.01$), and the content of VEGF increased slightly. Compared with the model group, all doses of TST groups could significantly stimulate the regeneration of blood vessel of callus in early phase and promote the healing of fracture. Meanwhile, it could reduce blood viscosity of fracture in rats, decrease the levels of plasm TXB₂ and TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} significantly and increase the level of serum VEGF obviously ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Especially, the effect of high dose group is close to the effect of

[收稿日期] 20140804(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473387);安徽省自然科学基金项目(1408085QH163);安徽省高等学校自然科学基金优秀青年基金课题(81073091)

[第一作者] 季兆洁,在读硕士生,从事新药研究与开发研究, Tel:0551-65136810, E-mail:13856966893@163.com

[通讯作者] *朱光宇,主任药师,从事临床药理学研究, Tel:0555-2891878, E-mail:zgy666zgy@163.com

positive drug group ($P < 0.01$). **Conclusion:** TST has good stasis-removing and regeneration-promoting effect on early closing fractures, the mechanism may be related to decreasing the levels of plasm TXB_2 and 6-keto- $PGE_{1\alpha}$, increasing the level of serum VEGF.

[**Key words**] Taohong Siwu Tang; healing of fracture; blood vessel regeneration; stasis-removing and regeneration-promoting

骨折系指外力作用致使骨质部分或完全断裂,使得骨原本的完整性和连续性遭到破坏。若骨折处皮肤或黏膜完整,不与外界相通则称之为闭合性骨折。中医理论认为骨折愈合是“瘀去、新生、骨合”的过程。活血化瘀,改善血液循环,能够为加速骨折愈合创造条件。桃红四物汤由桃仁、红花、熟地黄、当归、白芍、川芎6味中药组成,是活血化瘀的代表方,具有活血化瘀、养血补血的双重功效^[1]。临床应用涉及骨科、妇科、内科、眼科、皮肤科、外科、五官科等临床各科,对血瘀而兼有血虚者尤为适宜^[2]。本课题遵循中医“祛瘀生新”理论,观察桃红四物汤是否对骨折早期有活血化瘀,促进骨折断端血管生成的作用,并对其机制进行了初步探讨,从而为桃红四物汤在骨折的治疗上提供了一定的实验研究基础和药理学依据。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,(280 ± 20)g,雌雄各半,由南京医科大学提供,动物合格证号SCXK(苏)2010-0004。

1.2 药物及试剂 药物桃仁、红花、熟地黄、白芍、当归、川芎购自北京同仁堂药业有限公司。桃红四物汤醇提物的制备:各药材按复方配伍比例^[3],加入10倍量体积分数为0.75的乙醇,回流提取2h后,浓缩配制成生药含量 $0.9 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的提取液备用。麝香接骨胶囊(安徽华佗国药股份有限公司,批号201109),血栓素 B_2 (thromboxane B_2 , TXB_2),6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$ ($F_{1\alpha}$ -6-Keto-PGF $_{1\alpha}$)测定试剂盒(解放军总医院科技开发中心放射所,批号131017),水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号20110724),生理盐水(安徽丰源药业股份有限公司,批号12091135),40%甲醛(扬州泸宝化学试剂有限公司,批号20111020),血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) ELISA试剂盒(上海西唐生物科技公司,批号20130401)。

1.3 仪器 肝素钠抗凝采血管(江西丰临医药用器械有限公司),LBY-N6COMPACT型全自动血流变仪(北京普利生仪器有限公司),GNP-9050型隔水式恒温培养箱(上海市三发科学仪器有限公司),

TB-718型生物组织自动包埋机(湖北孝感市泰维电子设备有限公司),TK-218型恒温摊片烤片机(湖北孝感市泰维电子设备有限公司),HH·BH·260-TBS型台式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),318MC型酶标仪(上海市三发科学仪器有限公司),GC-911型 γ 放射免疫计数器(中国科学技术大学科技实业总公司产品),DG-3022型酶联免疫检测仪(南京华东电子管厂),752型可见-紫外分光光度计(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 建立大鼠闭合性骨折模型 动物自由饮食,饮水,喂标准颗粒饲料,室温 $18 \sim 22 \text{ }^\circ\text{C}$,动物实验前均在实验室正常饲养1周。在 $10 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 体重3.5%水合氯醛ip麻醉下利用三点受力原理,模拟长骨干骨折时的受力情况,借由专用的骨折器造成胫骨闭合性骨折^[4]。骨折后的大鼠放置笼中自由活动 and 进食。

2.2 分组与给药 大鼠随机分成6组,即正常组、模型组、桃红四物汤高、中、低剂量组($18, 9, 4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),麝香接骨胶囊组 $0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,每组10只,桃红四物汤给药剂量依据文献,麝香接骨胶囊给药剂量依据60kg人每日用量体表面积折算法进行折算。先造模后给药,每天给药1次,连续ig给药10d。

大鼠用药量 $0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,在用药前将胶囊内容物用蒸馏水配成 $0.06 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液。

2.3 方法及指标的检测

2.3.1 对骨折大鼠血浆 TXB_2 、6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 的影响 末次给药1h后,将大鼠用3.5%水合氯醛($0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔麻醉后,由腹主动脉取血3mL加入到肝素钠抗凝采血管中,立即轻轻混匀,将抗凝血离心($4 \text{ }^\circ\text{C}$, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min)分离血浆,置 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。 TXB_2 、6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 严格按照放射免疫法试剂盒说明书进行操作。充分混匀,室温放置15min,然后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心20min,任取2管在 γ 免疫计数器上测cpm数为T管,弃去上清液,测各管沉淀cpm,按标准曲线计算各样本 TXB_2 、6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 浓度,并计算各样本 $TXB_2/6-$

Keto-PGF_{1α} 的值。

2.3.2 对骨折大鼠血液黏度的影响 末次给药 1 h 后,将大鼠用 3.5% 水合氯醛(0.1 mL·kg⁻¹)腹腔麻醉后,由腹主动脉取血 5 mL,放入肝素钠抗凝采血管中,立即轻轻混匀,送安徽中医药大学第一附属医院检测大鼠全血黏度和血浆黏度。

2.3.3 对骨折大鼠血清 VEGF 的影响 末次给药后 1 h,将大鼠用 3.5% 水合氯醛(10 μL·g⁻¹)腹腔注射麻醉,由腹主动脉取血 3 mL,放入一次性试管内,室温下血液自然凝固 10~20 min,离心(3 500 r·min⁻¹, 20 min),用移液枪吸取收集血清,置 -20 ℃ 冰箱保存。严格按照 (VEGF) ELISA 试剂盒说明书进行操作。

2.3.4 对骨折大鼠愈合程度及血管新生的影响 末次给药后 1 h,处死大鼠,截取胫骨骨折处上下各 0.5 cm 骨标本。经 10% 甲醛固定 7 d,再用 Jenkins 混合脱钙液脱钙,乙醇脱水后将标本置于已熔化的石蜡中,放入溶蜡箱保温。待石蜡完全浸入组织块后进行包埋,包埋好的骨组织块变硬后,在切片机上切成厚 5 μm 的切片,贴到载玻片上,放 45 ℃ 恒温箱中烘干,将烘干的切片进行脱蜡染色。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 10.0 统计应用软件进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间数据比

较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 对骨折大鼠血浆 TXB₂, 6-Keto-PGF_{1α} 的影响 与正常组比较,模型组 TXB₂ 含量明显降低,6-Keto-PGF_{1α} 含量明显升高, TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 明显升高,均具有统计学差异 ($P < 0.01$);与骨折模型组比较,麝香接骨胶囊组与桃红四物汤高剂量组的 TXB₂ 均有明显的减小 ($P < 0.01$),桃红四物汤中剂量组的 TXB₂ 也有明显的减小 ($P < 0.05$),桃红四物汤高剂量组的 6-Keto-PGF_{1α} 有明显的减小 ($P < 0.05$),麝香接骨胶囊组与桃红四物汤低、中剂量组的 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 的值均有明显的减小 ($P < 0.05$),桃红四物汤高剂量组的 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 的值均有明显的减小 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对骨折大鼠血液黏度的影响 与正常组比较,模型组全血黏度、血浆黏度均明显增高 ($P < 0.01$);与骨折模型组比较,麝香接骨胶囊组与桃红四物汤高、中剂量组的全血黏度、血浆黏度均明显的减小 ($P < 0.01$),低剂量组的全血黏度、血浆黏度也有显著的减少 ($P < 0.05$)。结果表明,桃红四物汤高、中、低 3 剂量组均对骨折造成的血瘀之黏、浓、凝改变明显减轻。见表 2。

表 1 桃红四物汤对骨折大鼠血浆 TXB₂, 6-Keto-PGF_{1α} 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of TST on TXB₂ and 6-Keto-PGF_{1α} content of serum in fracture rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	6-Keto-PGF _{1α} /ng·L ⁻¹	TXB ₂ /ng·L ⁻¹	TXB ₂ /6-Keto-PGF _{1α}
正常	-	312.98 ± 31.11	125.61 ± 24.31	0.41 ± 0.13
模型	-	246.61 ± 40.21 ³⁾	175.66 ± 24.47 ³⁾	0.74 ± 0.09 ³⁾
TST	18	282.69 ± 22.34 ¹⁾	144.15 ± 15.81 ²⁾	0.53 ± 0.15 ²⁾
	9	251.66 ± 44.69	151.76 ± 19.46 ¹⁾	0.59 ± 0.17 ¹⁾
	4.5	253.57 ± 57.51	167.52 ± 15.87	0.65 ± 0.08 ¹⁾
麝香接骨胶囊	0.6	250.19 ± 37.27	125.05 ± 12.03 ²⁾	0.55 ± 0.16 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 桃红四物汤对骨折大鼠全血黏度及血浆黏度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of TST on viscosity of whole blood and serum in fracture rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	全血黏度/mPa·s			血浆黏度/mPa·s
		低切	中切	高切	
正常	-	13.01 ± 0.42	6.63 ± 0.91	4.59 ± 0.12	1.32 ± 0.03
模型	-	14.57 ± 0.45 ³⁾	7.06 ± 0.56 ³⁾	5.72 ± 0.73 ³⁾	1.53 ± 0.01 ³⁾
TST	18	13.58 ± 0.71 ²⁾	6.40 ± 0.41 ²⁾	4.61 ± 0.91 ²⁾	1.38 ± 0.18 ²⁾
	9	12.79 ± 1.61 ²⁾	5.69 ± 1.30 ²⁾	3.98 ± 1.25 ²⁾	1.34 ± 0.21 ²⁾
	4.5	14.06 ± 0.45 ¹⁾	6.60 ± 0.03 ¹⁾	4.84 ± 0.84 ¹⁾	1.42 ± 0.14 ¹⁾
麝香接骨胶囊	0.6	12.84 ± 1.24 ²⁾	5.95 ± 1.09 ²⁾	4.37 ± 0.99 ²⁾	1.36 ± 0.16 ²⁾

3.3 对骨折大鼠血清 VEGF 的影响 桃红四物汤高、中剂量组 VEGF 浓度明显增高 ($P < 0.01$), 桃红四物汤低剂量组也有明显增高 ($P < 0.05$)。麝香接骨胶囊组显著增高 VEGF 浓度 ($P < 0.01$)。结果表明桃红四物汤具有显著提高大鼠体内 VEGF 浓度的作用。见表 3。

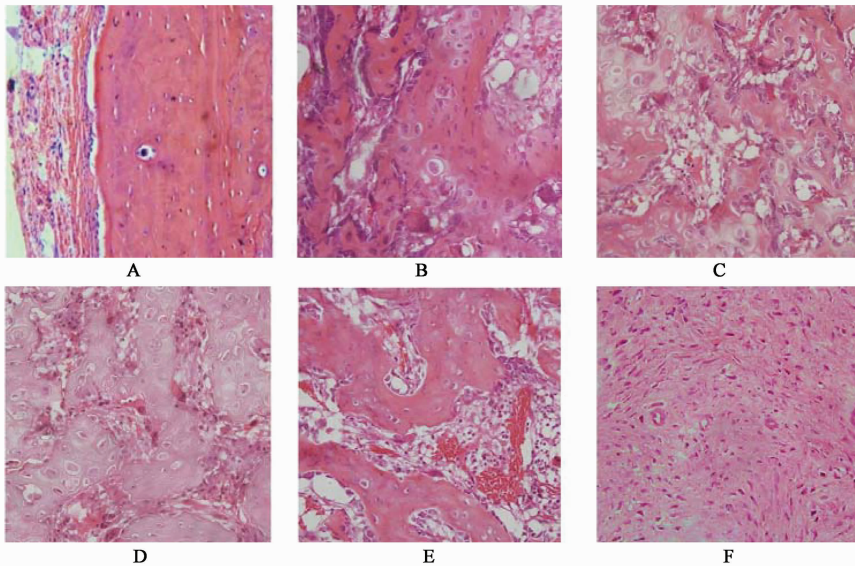
3.4 对骨折大鼠骨折愈合程度及血管新生的影响 与正常组比较,造模各组有明显骨折面缺损,说明造模成功。桃红四物汤高、中、低剂量组和麝香接骨胶囊组与模型组比较,均有毛细血管以及由毛细血管转化的静脉新生并且已经到肉芽组织后期有大量成骨细胞的形成;在高剂量组和麝香接骨胶囊组图中,可见明显骨小梁和骨性骨痂的形成。结果表明,桃红四物汤可以促进肉芽组织的分化,从而促进断端

表 3 桃红四物汤对骨折大鼠血清内皮生长因子 VEGF 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of TST on VEGF content of serum in fracture rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	VEGF/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	112.51 ± 6.73
模型	-	122.25 ± 5.79
TST	18	184.35 ± 8.71 ⁽²⁾
	9	219.42 ± 6.51 ⁽²⁾
	4.5	129.60 ± 9.42 ⁽¹⁾
麝香接骨胶囊	0.6	181.26 ± 9.86 ⁽²⁾

骨痂微血管的新生和骨痂的愈合。表明桃红四物汤有明显的促进骨折区血管新生和骨折愈合的作用。见图 1。



A. 正常组; B. 桃红四物汤 4.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; C. 桃红四物汤 9 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 桃红四物汤 18 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 麝香接骨胶囊 0.6 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 模型组
图 1 桃红四物汤对骨折大鼠骨折愈合程度及骨痂微血管新生情况的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effects of TSD on degree of fracture healing and callus micrangium regeneration in fracture rats (HE, $\times 400$)

4 讨论

桃红四物汤出自清·吴谦所著的《医宗金鉴》，由四物汤加桃仁、红花组成，为血瘀证尤其是血瘀症治疗常用方。四物汤补血和血，由当归、白芍、川芎、熟地黄组成，以补血而不滞血，和血而不伤血为特点，为治疗血病通用之方，多用于血虚而又血行不畅的疾病。桃红四物汤在四物汤基础上复用桃仁、红花 2 味，加重其活血化瘀生新之效，是祛瘀生新的代表方。而中医治疗损伤骨折，祛瘀生新则是其重要的治疗原则，通过祛瘀作用使骨折局部瘀血减轻，促进局部血循环，改善缺氧环境为骨折愈合创造了良好的内环境，通过生新，尤其是血管新生，促进血供，

促进骨折愈合。

VEGF 是一种特异性作用于血管内皮细胞的生长因子，参与了骨折修复过程，骨折早期具有促进血管内皮增殖与迁移，诱导毛细血管管腔形成并具有增加血管通透性的作用^[5-7]。本实验采取检测大鼠血清中的 VEGF 含量的方法来间接反映桃红四物汤是否具有刺激骨折早期骨痂血管增生的作用，结果显示桃红四物汤各剂量组均可以显著提高大鼠血清中 VEGF 的含量，从而达到促进骨折愈合的目的。

在血小板聚集中有一对精巧的分子调节机制是 TXA₂ 和 PGI₂，TXA₂ 通过抑制腺苷酸环化酶 (AC) 使血小板和血管壁平滑肌内环磷酸腺苷 (cAMP) 减

少,或者作为 Ca^{2+} 载体直接促进 Ca^{2+} 内流,从而促进血小板聚集和局部血管收缩,加速血栓形成。 PGI_2 是目前已知最强的血小板抑制剂和血管扩张剂,其通过兴奋 AC,增加 cAMP 浓度,刺激 NO 的释放,协同扩张血管与抑制血小板的聚集,从而可降低血液黏稠度进而促进瘀血的消除。 TXB_2 为 TXA_2 的代谢产物,6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 为 PGI_2 的代谢产物。因此,通过检测 TXB_2 和 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 的水平可以间接反映出 TXA_2 和 PGI_2 的水平。实验结果显示,桃红四物汤各剂量组血浆 TXB_2 水平均有显著性降低,且随剂量增加,降低程度也有所增加,而血浆 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 水平也有轻微的下降,但作用不明显。表明桃红四物汤通过影响 TXA_2 - PGI_2 而发挥其去瘀生新的作用靶点可能在 TXA_2 。

综上所述,桃红四物汤具有显著的促进骨折愈合作用,其作用途径与降低 TXB_2 含量、改善血液流变学、提高大鼠 VEGF 的含量、促进骨痂微血管的新生相关,显示出良好的去瘀生新作用。

[参考文献]

[1] 丁艳杰,张前德. 桃红四物汤临床与实验研究进展[J]. 江苏中医药,2010,42(1):77-79.

[2] 李翊,彭代银. 桃红四物汤的药理学研究进展[J]. 安徽医药,2011,15(5):529-531.

[3] 刘竹青,尹登科,韩岚,等. 桃红四物汤含药血清对过氧化氢损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志,2013,38(3):402-406.

[4] 张连方,齐进,王晋申,等. 小鼠闭合性股骨骨折模型的建立与评估[J]. 中国矫形外科杂志,2010,18(2):143-146.

[5] Dong L Q, Yin H, Wang C X, et al. Effect of the timing of surgery on the fracture healing process and the expression levels of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2[J]. Exp Ther Med,2014,8(2):595-599.

[6] Kempen D H, Lu L, Heijink A, et al. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration[J]. Biomaterials, 2009,30(14):2816-2825.

[7] Li R, Li C H, Nauth A, et al. Effect of human vascular endothelial growth factor gene transfer on endogenous vascular endothelial growth factor mRNA expression in a rat fibroblast and osteoblast culture model[J]. J Orthop Trauma,2010,24(9):547-551.

[责任编辑 周冰冰]