

## 续骨丹对胫骨骨不连大鼠 VEGF, TGF- $\beta$ 表达的影响

李月玮, 周围, 郭佳宝, 宋亚芳, 王旭东\*  
(南京中医药大学, 南京 210023)

**[摘要]** 目的: 研究续骨丹外敷疗法对大鼠胫骨不连模型血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 及转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 表达的影响。方法: 选取 10 只 SD 大鼠为空白组, 成模 50 只 SD 大鼠随机分为模型组, 续骨丹高、中、低剂量组(150, 75, 25 mg·kg<sup>-1</sup>), 经皮电刺激神经组(transcutaneous electrical nerve stimulation, TENS)。分别在干预后 4, 8 周对大鼠行 X 射线检测、测量骨间距; 苏木素-伊红(HE) 染色观察组织形态变化; 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 和酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 分别检测骨损伤区和血清中 VEGF, TGF- $\beta$  变化。结果: 与模型组比较, 续骨丹高、中、低剂量组, TENS 组骨间距和 VEGF, TGF- $\beta$  表达显著升高( $P < 0.01$ ); 与 TENS 组比较, 续骨丹高剂量组骨间距和 VEGF, TGF- $\beta$  表达显著升高( $P < 0.01$ ), 续骨丹中剂量组差异不显著, 续骨丹低剂量组显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结论: 续骨丹可以通过调节 VEGF, TGF- $\beta$  的表达, 改善局部血流供应, 诱导血管重建和骨重建, 促进骨不连愈合。

**[关键词]** 续骨丹; 骨不连; 血管内皮生长因子; 转化生长因子- $\beta$ ; 经皮电刺激神经疗法

**[中图分类号]** R22; R24; R285.5; R289.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0091-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180628

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1229.009.html>

**[网络出版时间]** 2017-12-27 10:39

## Effect of Xugudan on Expression of VEGF and TGF- $\beta$ in Rats with Nonunion of Tibia

LI Yue-wei, ZHOU Wei, GUO Jia-bao, SONG Ya-fang, WANG Xu-dong\*  
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of external application of Xugudan on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in rat model of tibial nonunion. **Method:** A total of 10 SD rats were selected as blank group, and 50 modeled SD rats were randomly divided into model group, high, middle and low dose Xugudan (150, 75, 25 mg·kg<sup>-1</sup>) groups, and transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) group. In 4 weeks, and 8 weeks after the intervention, X-ray detection and measurement of bone spacing were conducted; hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes. Real-time PCR and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect VEGF, and TGF- $\beta$  changes in bone injury and serum. **Result:** As compared with the model group, bone spacing, VEGF and TGF- $\beta$  expression levels were significantly increased in Xugudan high, middle and low dose groups as well as TENS group ( $P < 0.01$ ). As compared with TENS group, bone spacing, VEGF and TGF- $\beta$  expression levels were significantly increased in Xugudan high dose group ( $P < 0.01$ ), but the difference was not significant from Xugudan middle dose group, and the levels were significantly decreased in Xugudan low dose group ( $P < 0.01, P < 0.05$ ). **Conclusion:** Xugudan can improve the local blood supply by regulating the expression of VEGF and TGF- $\beta$ , induce vascular remodeling and bone remodeling, and promote the nonunion healing.

**[收稿日期]** 20171026(024)

**[基金项目]** 国家中医药管理局项目[ZYYs-2013-(0003)-2]; 国家社科基金重大项目(12ZD114)

**[第一作者]** 李月玮, 在读硕士, 从事中医康复理论的发掘与应用研究, E-mail: 1731042032@qq.com

**[通信作者]** \* 王旭东, 硕士, 博士生导师, 从事中医古籍文献及康复应用研究, Tel: 025-85811511, E-mail: wxdnjcm@163.com

[ **Key words** ] Xugudan; bone nonunion; vascular endothelial growth factor ( VEGF ); transforming growth factor- $\beta$  ( TGF- $\beta$  ); transcutaneous electrical nerve stimulation ( TENS )

骨不连是运动系统康复医疗中的难题之一,目前对其定义尚不明确<sup>[1]</sup>,骨不连通常认为是在骨折后经过 8 个月的正常治疗,骨折愈合过程终止,且仍未达到骨性愈合的一种骨折后严重并发症<sup>[2]</sup>。由于骨不连易发部位与营养血管多寡有关,因此血管较少的胫骨发生骨不连的概率最高,虽然近年来,随着医疗技术的进步,骨折愈合率大大提高,但由于部分创伤较为复杂,临床报告表明骨不连的发生率仍在 5% ~ 10%<sup>[3]</sup>,其治疗也是一个漫长的过程,手术治疗作为临床治疗的金标准,但具有费用高、风险多、痛苦大,且有 5% 患者在经过二次甚至多次手术后,依然无法达到正常的骨性愈合的缺点<sup>[4]</sup>。经皮电刺激神经疗法 ( transcutaneous electrical nerve stimulation, TENS ) 是一种操作方便,无创伤痛苦,在近年来被广泛应用于临床骨不连康复的一种手段,研究表明<sup>[5]</sup> TENS 可以改变血流的特性,降低血液黏稠度,促进血液流动和骨生成,但由于应用于临床时间不长,其远期疗效安全性还需进一步确定。

传统医学在治疗骨伤方面历史悠久,近代以来,随着中药促进骨折愈合研究的首次报道,人们对中药促进骨折愈合的机制研究也愈发深入,大量研究证实中药促进骨愈合方面具有显著疗效<sup>[6]</sup>。代倩倩等<sup>[7]</sup>研究表明,接骨续筋口服液通过提高骨折家兔骨痂内骨形态发生蛋白-2 ( BMP-2 ), 转化生长因子- $\beta$  ( TGF- $\beta$  ) 的表达,促进骨折愈合。中药治疗骨折主要采用内服、外敷两种手段,其中中药外敷疗法可直接作用于骨损伤区,使药物快速布散,促进伤部肌肉收缩,进而促进骨折愈合,不良反应较少,本实验所用中药外敷方剂续骨丹来源于省级非物质文化遗产“章氏接骨膏”,经南京中医药大学王旭东教授加减而成。前期实验研究证明<sup>[8]</sup>,续骨丹可以调节 BMP-2 的表达,对骨缺损型骨折大鼠有明显的促进愈合作用,本研究是在前期动物实验的基础上,以骨不连模型 SD 大鼠为研究对象,采取中药外敷的康复手段,观察续骨丹对胫骨骨不连大鼠血管内皮生长因子 ( VEGF ), TGF- $\beta$  表达的影响,为进一步研究其作用机制提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁 Sparague Dawley 大鼠 60 只,均为雄性,鼠龄 12 周,体质量 ( 300  $\pm$  30 ) g,购自上海西

普尔必凯实验动物有限公司,合格证号 SCXK ( 沪 ) 2013-0016。饲养于南京中医药大学 SPF 级动物实验中心,饲喂普通饲料,每笼 5 只大鼠,自由饮食,定期更换垫料。本实验符合南京中医药大学实验动物伦理委员会 ( 2014-0003 ) 管理准则。

**1.2 药物及试剂** 续骨丹药物组成为穿山甲 60 g, 当归 20 g, 骨碎补 30 g, 冰片 6 g, 麝香 6 g, 枇杷叶 15 g, 皂角 30 g, 侧柏叶 30 g, 上 8 味药物购自北京同仁堂股份有限公司,经南京中医药大学文献研究所王旭东教授鉴定为正品,打粉,细目为 150 目; TGF- $\beta$ , VEGF 酶联免疫吸附 ( ELISA ) 试剂盒 ( 翼飞雪公司,批号分别为 YFXER00082, YFXER00092 ); trizol 提取试剂盒 ( 美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026 ); 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 ( GAPDH ) 抗体 ( 美国 Bioworld 公司,批号 MB001 )。

**1.3 仪器** SDZ-II 型低频脉冲治疗仪 ( 苏州医疗用品厂有限公司 ); JJ-12J 型脱水机, JB-P5 型包埋机 ( 武汉俊杰电子有限公司 ); DM1L 型莱卡倒置荧光显微镜 ( 德国莱卡公司 ); MSD97K49 型微量离心机, DU640 型核酸蛋白分析仪 ( 美国 Beckman 公司 ); DHG9123 型 A 台式电热鼓风干燥箱 ( 上海精密实验设备公司 ); KA1000 型离心机 ( 上海安亭科学仪器厂 ); IQ5TM 型实时荧光定量 PCR 仪, 525BR027843 型电泳槽及转膜仪 ( 美国 Bio-Rad 公司 ); Alpha 化学发光凝胶成像系统 ( 美国 Protein Simple 公司 )。

## 2 方法

**2.1 造模** 参照徐晓峰等<sup>[9]</sup>造模方法将 60 只 SD 大鼠随机分笼,每笼 5 只,常规饲料适应性饲养 1 周。1 周后,随机选取 10 只大鼠为正常组,不作任何处理,将余下 50 只大鼠用体积分数 10% 水合氯醛,按 0.03 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 剂量对大鼠进行术前的腹腔注射麻醉。麻醉后,在腹侧胫骨中段作 2 cm 的切口,并剥离小腿肌肉,暴露右侧胫骨。用骨钳造成 4 mm 的骨缺损后,再用口腔充填器经酒精灯烧红后灼烧骨折两断端,然后用 0.8 mm 克氏针进行内固定,缝合创口,术后常规给予青霉素 8 万单位肌肉注射,每日 1 次,连续 3 d。

**2.2 分组及干预** 造模 8 周后随机选取 5 只大鼠,经大体观察, X 射线检查,显示骨折断端萎缩硬化,骨髓腔封闭,无明显骨痂生长,证实骨不连模型建立

成功。然后将剩余 50 只大鼠随机分为 5 组,分别为模型组,续骨丹高、中、低剂量组,TENS 组各 10 只。正常组与模型组,正常饲养,不作任何干预;续骨丹高、中、低剂量组分别取 150,75,25 mg·kg<sup>-1</sup>续骨丹(给药剂量根据人与动物体表面积折算比例表折算等效剂量),用 9℃白醋调如糊状,新鲜葱汤擦洗大鼠骨折处后,将中药敷于此处,并用油纸包裹、胶带固定以防止药物在大鼠活动时脱落,以及减少挥发性药物的挥发。每隔 1 d 敷药 1 次,每次敷药时间在 3 h 左右;TENS 组选用 SDZ-II 型低频脉冲治疗仪,用输出电流为 5 mA,强度为 2 mT,频率为 10 Hz 的低频脉冲治疗仪刺激大鼠骨折处,每隔 1 d 治疗 1 次,每次治疗时间在 3 h 左右。

**2.3 X 射线检测** 分别在干预后 4,8 周,各组随机选取 5 只大鼠,于省机关医院摄 X 射线正位片,观察治疗前后及各组间的骨不连愈合情况,并测量骨折间隙距离。

**2.4 组织形态学检测** 待大鼠麻醉处死后,截取骨不连区域骨骼,用 10% 多聚甲醛固定,然后脱钙、脱水透明、石蜡包埋。再将包埋好的蜡块切成 4 μm 厚的切片,行苏木精-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察骨不连区域的修复情况,图像采集分析。

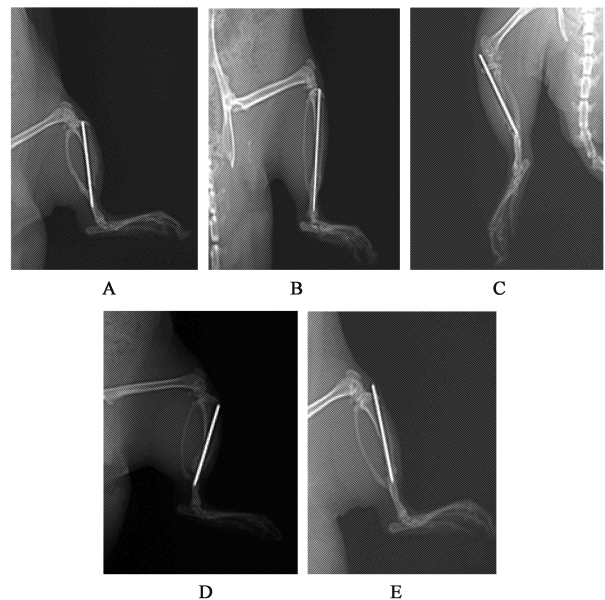
**2.5 ELISA 检测 VEGF 及 TGF-β 蛋白含量** 用 10% 的水合氯醛麻醉大鼠后,腹腔取血,分离血清。严格按照试剂盒说明,采用生物素双抗体夹心 ELISA 测定样品中大鼠血清中 VEGF 的含量。

**2.6 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 VEGF 及 TGF-β mRNA 相对表达量** 采用实时 Real-time PCR 技术进行检测。将骨样本进行研磨,加入 trizol 提取液 1 mL,冰水中匀浆,分离骨组织中的 RNA;按照 Real-time PCR 引物设计的要求选择反转录引物,分析目的基因表达量的情况,形成扩增曲线和熔解曲线。参照 GAPDH 引物序列为上游 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游 5'-GGTG AAGACGCCAGTGA-3',片段长度为 133 bp;VEGF 引物序列为上游 5'-TTGCTGCTCTACCT CCACCAT-3',下游 5'-TGTGCTCTCCTCCTGCC ATAG-3',片段长度为 274 bp;TGF-β 引物序列为上游 5'-TCAAGGAAGGCAGATCGTCAT-3',下游 5'-CGGCTT ATTGCTTCCCATCA-3',片段长度为 186 bp。PCR 反应条件为 95℃ 5 min,95℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 30 s,进行 40 个循环,收集荧光信号,结果用 C<sub>t</sub> 值表示,采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法对目的基因进行相对定量分析。

**2.7 统计学方法** 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 22.0 统计软件进行处理,数据分析前先检查的正态分布情况,然后筛选符合正态分布的数据,进行单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 续骨丹对大鼠骨不连愈合情况的影响** 干预后 4 周,模型组骨折断端萎缩硬化,骨髓腔封闭,其余各组骨痂开始生长;干预后 8 周,模型组大鼠骨折损伤区仍萎缩硬化,无明显骨痂生长,续骨丹中、低剂量组,TENS 组大鼠骨痂持续生长,续骨丹中剂量组有部分骨皮质连续,但续骨丹低剂量组,TENS 组骨皮质均未出现连续,续骨丹高剂量组大鼠胫骨损伤区域骨皮质连续,骨折线模糊。见图 1。



A: 模型组; B~D. 续骨丹高、中、低剂量组; E. TENS 组(图 2 同)

图 1 续骨丹对大鼠骨不连愈合情况的影响

Fig. 1 Effect of Xugudan on healing condition in rats of bone nonunion

**3.2 续骨丹对大鼠骨不连愈合骨折间隙的影响**

干预后 4 周,与模型组比较,各组大鼠骨间距均有显著减小( $P < 0.01$ ),与 TENS 组比较,续骨丹高剂量组骨间距有显著减小( $P < 0.01$ ),其余各组无明显差异;干预后 8 周,与模型组比较,各组大鼠骨间距持续减小( $P < 0.01$ ),与 TENS 组比较,续骨丹高剂量组骨间距依然显著减小( $P < 0.01$ ),续骨丹中剂量组骨间距无明显差异,续骨丹低剂量组骨间距显著增宽( $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.3 续骨丹对大鼠骨折损伤区组织形态的影响** 干预后 4 周,除模型组外,各组骨折损伤区的成骨细胞和骨痂增多,开始有骨小梁出现,但骨皮质不连续;

表 1 续骨丹对大鼠骨不连骨折愈合间隙的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 1 Effect of Xugudan on bone spacing in rats of bone nonunion( $\bar{x} \pm s, n=5$ ) mm

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	4 周	8 周
正常	-	-	-
模型	-	2.71 $\pm$ 0.14	2.74 $\pm$ 0.09
续骨丹	150	1.37 $\pm$ 0.13 <sup>1,3)</sup>	0.20 $\pm$ 0.04 <sup>1,3)</sup>
	75	1.92 $\pm$ 0.12 <sup>1)</sup>	0.47 $\pm$ 0.14 <sup>1)</sup>
	25	2.09 $\pm$ 0.13 <sup>1)</sup>	1.04 $\pm$ 0.20 <sup>1,3)</sup>
TENS	-	2.01 $\pm$ 0.22 <sup>1)</sup>	0.64 $\pm$ 0.16 <sup>1)</sup>

注:与模型组同期比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 TENS 组同期比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

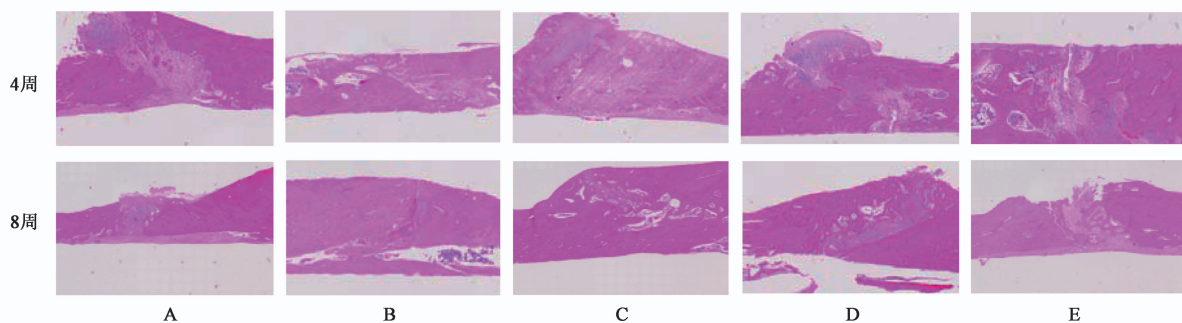


图 2 续骨丹对大鼠骨折损伤区组织形态的影响(HE,  $\times 100$ )

Fig.2 Effect of Xugudan on Tissue morphology of fracture area in rats of bone nonunion(HE,  $\times 100$ )

差异,续骨丹低剂量组 TGF- $\beta$  含量显著降低( $P < 0.01$ );干预后 8 周,与正常组比较,除正常组无明显差异外,其余各组 VEGF, TGF- $\beta$  含量持续显著升高( $P < 0.01$ );与 TENS 组比较,续骨丹高剂量组 VEGF, TGF- $\beta$  含量显著升高( $P < 0.01$ ),续骨丹中剂量组 VEGF, TGF- $\beta$  含量无明显差异,续骨丹低剂量组 VEGF, TGF- $\beta$  含量显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

**3.5 续骨丹对骨损伤区 VEGF, TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量的影响** 干预后 4 周,与模型组比较,除续骨丹低剂量组 TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量无显著差异外,其余各组 VEGF, TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量均显著升高( $P < 0.01$ ),与 TENS 组比较,续骨丹高剂量组 VEGF, TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量显著升高( $P < 0.01$ ),续骨丹中剂量组 VEGF mRNA 相对表达量显著降低( $P < 0.01$ ),续骨丹中剂量组 TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量无显著差异,续骨丹低剂量组 VEGF, TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量显著降低( $P < 0.01$ );干预后 8 周,与模型组比较,各组 VEGF, TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量持续显著升高( $P < 0.01$ );与 TENS 组比较,续骨丹高剂量组 VEGF, TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量显著升高( $P < 0.01$ ),续骨丹中剂量组 VEGF

干预后 8 周,续骨丹高剂量组骨折线逐渐清晰,部分骨皮质完全连续,续骨丹中剂量组骨折损伤区纤维组织明显减少,部分骨皮质开始连续,续骨丹低剂量组与 TENS 组形成软骨内成骨,部分骨小梁开始桥接。见图 2。

**3.4 续骨丹对大鼠血清中 VEGF, TGF- $\beta$  水平的影响** 干预后 4 周,与模型组比较,除正常组无明显差异外,其余各组 VEGF, TGF- $\beta$  含量均显著升高( $P < 0.01$ );与 TENS 组比较,续骨丹高、中剂量组 VEGF 含量均显著升高( $P < 0.01$ ),续骨丹低剂量组无明显差异,续骨丹高、中剂量组 TGF- $\beta$  含量无明显

表 2 续骨丹对大鼠血清中 VEGF, TGF- $\beta$  蛋白水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of Xugudan on protein levels VEGF, TGF- $\beta$ ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	时间/周	VEGF	TGF- $\beta$
正常	-	4	96.24 $\pm$ 9.48	135.24 $\pm$ 4.36
		8	99.07 $\pm$ 5.05	135.96 $\pm$ 4.00
模型	-	4	98.23 $\pm$ 8.65	137.53 $\pm$ 3.85
		8	102.38 $\pm$ 3.23	135.43 $\pm$ 4.71
续骨丹	150	4	259.01 $\pm$ 8.72 <sup>1,3)</sup>	160.69 $\pm$ 3.69 <sup>1)</sup>
		8	363.55 $\pm$ 6.23 <sup>1,3)</sup>	183.14 $\pm$ 4.79 <sup>1,3)</sup>
	75	4	240.78 $\pm$ 7.12 <sup>1,3)</sup>	154.19 $\pm$ 8.72 <sup>1)</sup>
		8	334.57 $\pm$ 12.08 <sup>1)</sup>	176.26 $\pm$ 2.70 <sup>1)</sup>
	25	4	210.60 $\pm$ 9.68 <sup>1)</sup>	144.05 $\pm$ 1.86 <sup>3)</sup>
		8	311.61 $\pm$ 12.99 <sup>1,3)</sup>	168.88 $\pm$ 3.08 <sup>1,2)</sup>
TENS	-	4	212.74 $\pm$ 11.19 <sup>1)</sup>	157.16 $\pm$ 4.58 <sup>1)</sup>
		8	338.63 $\pm$ 11.40 <sup>1)</sup>	174.97 $\pm$ 1.30 <sup>1)</sup>

mRNA 相对表达量无显著差异,续骨丹中剂量组 TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量显著升高( $P < 0.01$ ),续骨丹低剂量组 VEGF, TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量显著降低( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 续骨丹对大鼠骨损伤区 VEGF, TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of Xugudan on bone damage zone of VEGF, TGF- $\beta$  mRNA expression ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	时间 /周	VEGF	TGF- $\beta$
正常	-	-	-	-
模型	-	4	1.30 ± 0.23	2.27 ± 0.17
		8	1.18 ± 0.03	2.29 ± 0.09
续骨丹	150	4	3.11 ± 0.08 <sup>1,3)</sup>	3.37 ± 0.06 <sup>1,3)</sup>
		8	4.35 ± 0.18 <sup>1,3)</sup>	3.84 ± 0.11 <sup>1,3)</sup>
	75	4	3.03 ± 0.14 <sup>1,3)</sup>	2.91 ± 0.30 <sup>1)</sup>
		8	3.59 ± 0.15 <sup>1)</sup>	3.58 ± 0.12 <sup>1,3)</sup>
	25	4	2.00 ± 0.19 <sup>1,3)</sup>	2.47 ± 0.06 <sup>3)</sup>
		8	3.17 ± 0.06 <sup>1,3)</sup>	2.86 ± 0.07 <sup>1,3)</sup>
TENS	-	4	2.63 ± 0.08 <sup>1)</sup>	2.86 ± 0.35 <sup>1)</sup>
		8	3.78 ± 0.21 <sup>1)</sup>	3.23 ± 0.01 <sup>1)</sup>

#### 4 讨论

“瘀不去则新不生”，中医认为瘀血是影响骨折愈合的主要原因之一。《诸病源候论》中“此为被损伤，仍为风冷搏，故令血瘀结在内，久不瘥也”，风冷所致的离经之血阻滞经络，若瘀血不散，将影响延迟骨折愈合或致骨折不愈合，后世医家把骨折愈合分为三期，“瘀去”、“新生”、“骨合”，认为活血化瘀是骨折愈合的前提。续骨丹来源于省级非物质文化遗产“章氏接骨膏”，祖传两百余年，在民间有极高声誉，南京中医药大学王旭东教授于 2012 年起对其进行临床研究和文献研究，在确认其治疗骨折的疗效后，又从古籍中寻找与该方类似的古方（彭氏黑龙散（《永类钤方》卷二十二）·走马散（《医方大成》卷八引《经验方》），十宝散（《种福堂方》卷四），在精简的原则下加减而成。其中骨碎补续伤止痛，补肾强骨；枇杷叶通经活络，止痛；侧柏叶止血散肿；皂角散结消肿胀；当归活血养血，舒利关节，温通脉络；穿山甲走窜行散，活血通络祛瘀；麝香辛香走窜，活血祛瘀，通经止痛，具有极强的穿透性，可以携药效直达病灶；冰片清香宣散，生肌止痛，与麝香配伍作通透剂，使药力深达骨髓。

骨折的愈合关键是成骨细胞诱导骨重建和骨修复<sup>[10]</sup>，而在成骨效应中，血管的再修复是成骨修复的必要前提。血管在骨组织中，不仅负责营养的供应，还在骨折愈合的过程中充当着骨重建的主要感受器，参与骨骼的早期修复<sup>[11]</sup>。骨折时常伴有血管的严重破坏，若骨组织不能及时得到血液供养，就会直接影响骨折愈合，导致骨不连的发生。研究表明，中药可以改善局部血流，促进血管再修复、促进生长

因子分泌、提高成骨细胞的活性等<sup>[12-13]</sup>，常用药物为解表类、活血化瘀类、益肝肾补药类，如陈文<sup>[14]</sup>用复骨健步片治疗骨折，提高骨痂中 VEGF 的表达水平，加速骨折断端的血管修复，进而促进骨折愈合；贺宪等<sup>[15]</sup>发现补肾药物可以缩短骨折愈合的时间，并且对于骨折不愈合或延迟愈合等情况也有明显疗效。

近些年来，国内外学者对骨不连的治疗做了大量研究，其中充足的血供仍被认为是骨不连愈合的前提。血管修复受多种细胞、生长因子的影响，如成纤维细胞生长因子（FGF），集落刺激因子（CSFs），TGF- $\beta$ ，内皮素（ET-1）等，但尤以 VEGF 的诱导作用最强，它在诱导血管修复的同时，还参与了骨的重建与修复<sup>[16]</sup>。研究证明，在骨折愈合过程中，若血管内皮因子缺乏会导致骨折不愈合或延迟愈合，并在给予外源性血管内皮因子后，愈合情况得到改善<sup>[17]</sup>。VEGF 作为做主要的血管调节因子，可以直接促进血管的重建和修复，为骨痂提供充足的血液供应和良好的营养环境<sup>[18]</sup>；此外 VEGF 在骨重建中亦发挥着一定的调节作用，它可以促进软骨内成骨，以及调节破骨细胞和成骨细胞的形成、分化<sup>[19]</sup>。续骨丹中含有大量活血化瘀药，使得局部微循环血流速度加快，毛细血管通透性增加，进而促使受损血管再生。

TGF- $\beta$  属于“TGF- $\beta$  超家族”的成员，由免疫细胞及非免疫细胞以自分泌或旁分泌方式产生的一种多功能生长因子<sup>[20]</sup>。TGF- $\beta$  广泛存在于肌肉骨骼和免疫系统，在骨组织再生与修复中扮演着重要角色，骨组织中的 TGF- $\beta$  主要由成骨细胞产生，参与诱导成骨细胞的骨形成效应，以及破骨细胞的骨吸收效应<sup>[21]</sup>。研究表明，局部注射外源性 TGF- $\beta$ ，可增加骨痂量，促进骨折愈合<sup>[22]</sup>。TGF- $\beta$  分为 2 种形式：潜在型 TGF- $\beta$ （latent TGF- $\beta$ ）和激活型 TGF- $\beta$ （active TGF- $\beta$ ），它们先以无活性形式储存于骨基质中，在发挥作用前被破骨细胞激活，然后通过经典的 Smad 依赖性通路，促进成骨细胞的增殖和活性，诱导骨折愈合，TGF- $\beta$  还能诱导成纤维细胞合成 I，II，III，IV，V 和 VI 胶原，骨连接素（osteonectin, ON），并刺激 I 型胶原与骨连接蛋白的合成，此外 TGF- $\beta$  还可以诱导 VEGF 的表达，但其机制目前尚不清楚<sup>[23]</sup>。

本实验研究结果显示，续骨丹对胫骨骨不连大鼠 VEGF 及 TGF- $\beta$  的表达有调节作用，且与续骨丹浓度大小呈正相关，即效果随浓度的增加而增加。从骨间距测量和骨损伤区组织形态结果看，续骨丹

高剂量组效果明显优于其他各组,骨皮质连续,骨折线模糊,说明续骨丹可以促进骨不连愈合;在上调 VEGF 及 TGF- $\beta$  方面, TENS 组,续骨丹大、中剂量组效果均优于续骨丹低剂量组,而 TENS 组与续骨丹中剂量组效果差异不显著。马信龙等<sup>[24]</sup>发现骨缺损处 VEGF 浓度的减少,会导致 TGF- $\beta$  浓度的降低,并进而形成恶性循环,阻碍骨缺损的愈合,本实验研究表明,随着 VEGF 表达的增强, TGF- $\beta$  的表达亦呈现增强的趋势,笔者推测 VEGF 与 TGF- $\beta$  之间可能存在尚不清楚相互作用机制。此外,在骨折愈合过程中,模型组 VEGF, TGF- $\beta$  表达与空白组无显著差异,而通过不同疗法干预后, VEGF, TGF- $\beta$  表达均有显著升高,可能 VEGF, TGF- $\beta$  在骨折愈合过程中的表达受阻是导致骨不连发生的原因之一。

综上所述,续骨丹外敷能够影响 VEGF 及 TGF- $\beta$  的表达,改善骨不连损伤区血流供应,促进骨不连的愈合,其中以续骨丹高剂量组效果最突出,但是否存在其他作用机制仍需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 王俊,陈一心. 骨不连动物模型的研究进展[J]. 江苏医药, 2008, 34(5):509-510.
- [2] 房国军,曲志国,崔正宏,等. 大鼠胫骨标准实验性骨不连模型的制作[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(18):2795-2800.
- [3] 袁志,刘建. 骨不连的防治[J]. 创伤外科杂志, 2011, 13(2):189-192.
- [4] 唐佩福,王满宜. 骨不连的治疗——理念与临床应用[M]. 济南:山东科学技术出版社,2014:31-35.
- [5] Cook J J, Summers N J, Cook E A. Healing in the new millennium: bone stimulators: an overview of where we've been and where we may be heading[J]. J Clin Med Res, 2015, 32(1):45-59.
- [6] 蔡瑞霖,陈长青. 中药促进骨缺损修复机理的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012(8):85-88.
- [7] 代倩倩,胡谷丰. 接骨续筋口服液对家兔骨折愈合过程 BMP-2, TGF- $\beta_1$  表达的影响[J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(4):488-491.
- [8] 周围,李月玮,蒋秋冬,等. 续骨丹外敷疗法对大鼠胫骨缺损模型血清 BMP-2 的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(4):1336-1342.
- [9] 徐晓峰,李阳,钱栋,等. 骨形态发生蛋白 2 和血管内皮生长因子 mRNA 在股骨骨不连大鼠损伤区域的动态表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(37):6857-6860.
- [10] CHAI B F, ZHU X L, YANG L F. Effect of cast immobilization on bone turnover. A tetracycline double labelling investigation[J]. Chin Med J (Engl), 1980, 93(5):316-330.
- [11] 刘振东. 骨折愈合原理[M]. 北京:人民军医出版社, 2012:29-30.
- [12] 李凯,史明,李文恒. 中医药促进术后骨折愈合的实验研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(10):69-71.
- [13] 何科,祁开泽. 中医药治疗骨不连及延迟连接研究近况[J]. 中医药导报, 2003, 9(10):50-51.
- [14] 陈文. 复骨健步片对大鼠模型骨折愈合早期成骨细胞增殖和 VEGF 表达的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2010.
- [15] 贺宪,魏春山,陈孝银. “肾主骨”在骨伤临床中运用[J]. 安徽中医药大学学报, 2004, 23(1):4-6.
- [16] Aubin J E, Heersche J N, Merrilees M J, et al. Isolation of bone cell clones with differences in growth, hormone responses, and extracellular matrix production [J]. J Cell Biol, 1982, 92(2):452-461.
- [17] 初同伟,王正国,朱佩芳. 血管内皮生长因子对骨折愈合相关因子表达的调控[J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(4):235-238.
- [18] Steinbrech D S, Mehrara B J, Saadeh P B, et al. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts *in vitro* [J]. Plast Reconstr Surg, 1999, 104(3):738-747.
- [19] 苏佳灿,曹烈虎. 骨生长因子[M]. 上海:第二军医大学出版社,2015:145-150.
- [20] CHEN G, DENG C, LI Y P. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(2):272-288.
- [21] Nasser F, Gholami G A, Kadkhodazadeh M. Effect of bioactive ceramic and recombinant human transforming growth factor-beta (rhTGF-beta) on regeneration of parietal bone defects in rat [J]. J Long Term Eff Med Implants, 2011, 21(1):71-78.
- [22] Sakimura K, Matsumoto T, Miyamoto C, et al. Effects of insulin-like growth factor I on transforming growth factor beta1 induced chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells cultured in a polyglycolic acid scaffold [J]. Cells Tissues Organs, 2006, 183(2):55-61.
- [23] Chua C C, Hamdy R C, Chua B H. Mechanism of transforming growth factor-beta1-induced expression of vascular endothelial growth factor in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1497(1):69-76.
- [24] 马信龙,谢军,王沛,等. VEGF、TGF- $\beta_1$  在骨缺损不愈合中表达的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 2002, 22(9):561-566.

[责任编辑 邹晓翠]