

点地梅提取物对大鼠股骨创伤愈合的影响*

黄景¹,何开家²,苏华^{2△},何飞²,唐毓凡¹,曾先彪²,邱宏聪²,韦宝伟²,韦桂宁²

(1. 广西省河池市都安瑶族自治县人民医院儿科 530700; 2. 广西中医药研究院药理所, 南宁 530022)

[摘要] 目的 研究点地梅提取物对大鼠股骨创伤愈合的影响。方法 选取 32 只雄性 Wistar 大鼠, 构建大鼠股骨骨创伤模型, 治疗组(包括点地梅高剂量组和点地梅低剂量组, 各 8 只)给予点地梅提取物, 假手术对照组(8 只)和骨创伤模型组(8 只)大鼠按体质量给予等容量的溶媒, 每天 1 次, 连续 10 d。记录大鼠的体质量增长、伤口愈合等情况, 检测血清钙、磷水平及碱性磷酸酶(ALP)活性、骨密度和骨生物力学, 通过 X 线片观察点地梅提取物对大鼠股骨创伤愈合的影响。结果 与骨创伤模型组比较, 治疗组血清中钙、磷水平, 钙磷乘积及 ALP 活性明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 与骨创伤模型组比较, 点地梅高剂量组创伤处骨密度明显降低($P < 0.05$), 点地梅低剂量组弯曲能量明显升高($P < 0.05$), 其余各项生物力学指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$); X 线片结果显示, 点地梅高、低剂量组均比骨创伤模型组愈合效果好。结论 点地梅提取物在所用剂量下具有一定的促进骨创伤愈合的作用。

[关键词] 点地梅; 大鼠; 股骨; 骨创伤

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)19-2608-04

Effects of Androsace umbellata extract on bone wound healing in rats*

Huang Jing¹, He Kaijia², Su Hua^{2△}, He Fei², Tang Yufan¹, Zeng Xianbiao², Qiu Hongcong², Wei Baowei², Wei Guining²

(1. Department of Maternity, the People's Hospital of Du'an Yao Autonomous County, Hechi, Guangxi 530700, China;

2. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi 530022, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of Androsace umbellata extract on bone wound healing in rats. **Methods** A total of 32 rats were selected, and the rat femur bone trauma model was established. The Androsace umbellata was administrated to rats in treatment groups (including high-dose Androsace umbellata group and low-dose Androsace umbellata group, 8 rats in each group) continuously for 10 days, while rats in the fake operation control group (8 rats) and bone trauma model group (8 rats) were treated with corresponding volume of solvent by body weight. The growth of body weight and wound healing of rats were recorded. The serum levels of calcium and phosphorus, activity of alkaline phosphatase (ALP), bone density and bone biomechanics were examined. The X-ray photograph was carried out to observe the effects of Androsace umbellata on bone wound healing. **Results** Compared with the bone trauma model group, serum levels of calcium and phosphorus, calcium-phosphorus product and activity of ALP were significantly increased in treatment groups, there were statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared with the bone trauma model group, bone density of trauma place in the high-dose Androsace umbellata group was significantly decreased ($P < 0.05$), bending energy in the low-dose Androsace umbellata group was increased ($P < 0.05$), while no statistically significant difference was found in the other skeletal biomechanical properties ($P > 0.05$). The results of X-ray films indicated that the treatment groups shown better effects on bone wound healing compared with the bone trauma model group. **Conclusion** Androsace umbellata extract could effectively promote bone wound healing in rats.

[Key words] Androsace umbellata; rats; femur; bone trauma

根据中医理论,骨创伤愈合过程中的瘀去新生、骨合具有动态平衡、辩证统一的特点^[1],具有补益肝肾、活血化瘀及接骨续筋功效的中药有利于患者的骨损伤处骨头修复,促进骨创伤愈合。点地梅属植物(Androsace L.)属于报春花科^[2],我国资源分布广泛,具有悠久的民间用药历史,主要以全草入药,性苦、寒,具有清热、解毒、消肿功效。用于治疗扁桃体炎、咽喉炎、口腔炎、急性结膜炎、热性水肿及咽喉肿痛等症,民间也有用作跌打损伤药的记载^[3-4]。临床上主要用于治疗慢性咽喉痛

等急、慢性咽喉肿痛,效果较好^[5]。目前尚缺乏有关点地梅对骨创伤愈合影响的研究报道。本研究通过手术复制大鼠股骨创伤模型,研究点地梅提取物对骨创伤愈合的促进作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Wistar 大鼠,雄性,3 月龄,无特殊病原体(SPF)级,由广西医科大学实验动物中心提供[动物许可证号:SCXK(桂)2009-0003]。动物观察室:相对湿度(50±70)%,温

* 基金项目:广西科学研究与技术开发计划重大项目重大专项(桂科重 14124002-4);广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(GZZJ13-15、GZZJ14-10);广西自然科学基金项目(2011 GXNSFA018258)。作者简介:黄景(1973-),主治医师,本科,主要从事儿科学急重症与疑难病诊治方面的研究。△ 通信作者,E-mail:weiguing2004@163.com。

度 20~25 ℃,所有动物均在同一条件下分笼饲养,每笼 4 只,自由饮水,标准颗粒饲料喂养,适应 2 周。实验过程中按照动物伦理学要求处置动物。

1.2 仪器与试剂 (1)主要仪器设备:13960 型 iMark 酶标仪(日本 Bio-rad 公司);TDL-5000B 型低速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);FA1004 电子天平(上海精科天平仪器厂);MTSmini-858 型材料实验机及材料测试系统及 Hologic Discovery 型骨密度仪[滂立生物医药技术(上海)有限公司]。(2)主要试剂:戊巴比妥钠[中国医药(集团)上海化学试剂公司,批号:F20090415];点地梅提取物由广西中医药研究院提供;钙测定试剂盒(长春汇力生技术有限公司,批号:2013029);磷测定试剂盒(长春汇力生技术有限公司,批号:2013001);碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(长春汇力生技术有限公司,批号:2013005)。

1.3 方法

1.3.1 药物提取方法 取 1 000 g 点地梅药材,95%乙醇提取 3 次,合并滤液,浓缩成膏状,4 ℃ 保存备用。

1.3.2 动物分组与处理 (1)分组与给药:32 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,分为假手术组、骨创伤模型组及治疗组(包括点地梅高剂量组和点地梅低剂量组),每组 8 只。治疗组灌服给药,假手术组和骨创伤模型组大鼠按体质量给予等容量的溶媒,每天 1 次,连续 10 d。实验过程中观察大鼠的一般状况包括形态、饮食等,以及伤口愈合和伤肢活动情况。观察末次给药大鼠体质量,计算体质量增长率=(末次给药大鼠体质量-给药前大鼠体质量)/给药前大鼠体质量×100%。大鼠骨创伤模型^[6]的复制:给各组大鼠用腹腔注射 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg),麻醉后,统一右后腿相同位置切口,手术暴露股骨干,假手术组除外,其余各组大鼠在股骨中段用小锯横行锯 1 mm 小口,约为股骨 1/3 截径的深度,股骨有骨损伤但不离断,复制骨创伤模型。骨创伤手术由同一工作人员操作,伤口缝合完毕用聚维酮碘消毒,注射青霉素抗感染 3 d。

1.3.3 血清钙、磷及 ALP 水平的测定 血清中钙、磷及 ALP 水平的测定参照文献^[7]。末次给药后 2 h,各组大鼠经戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血处死大鼠,3 000 r/min 离心 10 min,取血清,按照试剂盒说明书操作,检测血中钙、磷及 ALP 活性水平。

1.3.4 骨创伤处 X 线片 取股骨剔除表面肌肉及结缔组织,照骨创伤处 X 线片。

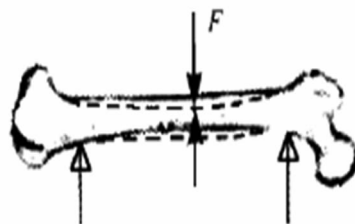
1.3.5 骨生物力学及骨密度研究 (1)骨生物力学研究^[8-9]:生理盐水湿纱布包裹大鼠创伤股骨,然后锡纸包裹,-70 ℃ 保存;测试时常温解冻,去除创伤股骨上的韧带、肌肉,用生理盐水复湿;通过 MTSmini-858 型材料实验机采用 3 点弯曲法^[10]检测和分析右股骨的生物力学性能,置大鼠右股骨于 MTS 实验机上,压头直径 1 mm,加载速度 0.01 mm/s,跨距(L)15 mm,受力见图 1;开始测试,记录弹性载荷、断裂载荷、最大载荷及位移,检测弯曲能量值。(2)骨密度研究^[8-9]:生理盐水湿纱布包裹大鼠创伤股骨,然后锡纸包裹,-70 ℃ 保存;测试时常温解冻,用生理盐水复湿,于骨密度仪上检测创伤处骨密度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分

析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 点地梅提取物对骨创伤愈合大鼠体质量的影响 实验期间,各组大鼠体质量增长正常,与假手术组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。手术创口愈合良好,术后手术部位未见感染,无动物死亡。



图中箭头所指为 3 点弯曲实验测定受力点

图 1 3 点弯曲实验示意图

表 1 点地梅提取物对骨创伤愈合大鼠体质量的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	体质量(g)		增长率 (%)
	实验前	实验末	
假手术组	267.13±22.27	320.63±23.06	20.03
骨创伤模型组	264.25±22.78	328.62±27.88	24.36
点地梅高剂量组	263.38±20.51	329.13±26.86	24.96
点地梅低剂量组	267.75±19.88	334.38±32.77	24.88

2.2 点地梅提取物对骨创伤愈合大鼠血清钙、磷及 ALP 水平的影响 与假手术组比较,骨创伤模型组大鼠血清钙、磷水平,钙磷乘积(Ca×P)及 ALP 活性均降低;点地梅高剂量与低剂量组血清钙、磷水平,Ca×P 及碱性磷酸酶活性均高于骨创伤模型组,见表 2。

2.3 点地梅提取物对骨创伤愈合大鼠创伤处骨密度的影响 假手术组、骨创伤模型组、点地梅高剂量组、点地梅低剂量组大鼠股骨创伤处测得的骨密度分别为(0.251±0.013)、(0.312±0.048)、(0.271±0.03)、(0.315±0.055)g/cm²。与假手术组比较,骨创伤模型组骨密度明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与骨创伤模型组比较,点地梅高剂量组骨密度明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 点地梅提取物对骨创伤愈合大鼠股骨生物力学的影响 与假手术组比较,骨创伤模型组大鼠股骨的最大载荷、断裂载荷、弹性载荷、弯曲能量均明显降低($P < 0.05$),弹性挠度较假手术组虽有减小,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。点地梅高剂量组各项指标较骨创伤模型组均增长,但差异无统计学意义($P > 0.05$);点地梅低剂量组与骨创伤模型组比较弯曲能量明显增大,差异有统计学意义($P < 0.05$),最大载荷、断裂载荷、弹性载荷及弹性挠度虽有增长,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

2.5 骨创伤愈合大鼠股骨创伤处 X 线片 如图 2 所示,假手术组股骨密度均匀,表面光滑无骨痂;骨创伤模型组大鼠股骨创伤处有大量骨痂填充,但尚未充满缺损处;点地梅高剂量组

表 2 点地梅提取物对骨创伤愈合大鼠血清钙、磷及 ALP 水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	血清钙(mmol/L)	血清磷(mmol/L)	Ca×P	ALP(U/L)
假手术组	2.74±0.52	2.29±0.21	6.23±1.02	132.88±12.75
骨创伤模型组	2.12±0.52 [#]	1.29±0.40 [#]	2.80±1.10 [#]	114.15±42.76
点地梅高剂量组	2.56±0.28 [△]	1.78±0.54 [△]	4.65±1.81 [△]	147.63±84.46
点地梅低剂量组	2.70±0.46 [△]	1.70±0.44 [△]	4.70±1.91 [△]	202.59±123.33 [△]

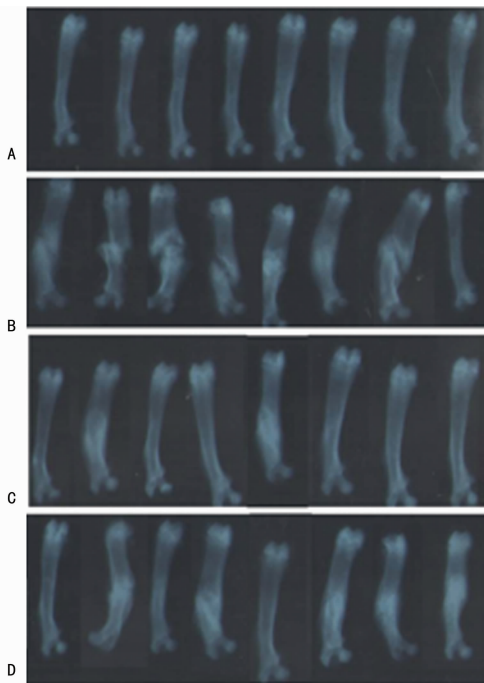
[#]: $P < 0.01$, 与假手术组比较; [△]: $P < 0.05$, 与骨创伤模型组比较

表 3 点地梅提取物对骨创伤愈合大鼠股骨生物力学的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	最大载荷(n)	断裂载荷(n)	弹性载荷(n)	弹性梯度(mm)	弯曲能量($n \times mm$)
假手术组	177.81±13.23	175.14±16.10	119.14±8.55	0.241±0.053	14.51±4.32
骨创伤模型组	127.00±31.33 [#]	121.88±29.91 [#]	90.09±18.78 [*]	0.199±0.054	9.20±3.70 [*]
点地梅高剂量组	149.25±28.00	131.20±30.19	103.77±25.72	0.237±0.068	12.32±4.83
点地梅低剂量组	145.21±40.04	128.05±36.41	108.03±25.58	0.262±0.092	14.25±5.76 [△]

^{*}: $P < 0.05$, [#]: $P < 0.01$, 与假手术组比较; [△]: $P < 0.05$, 与骨创伤模型组比较

股骨创伤处基本愈合,骨痂均匀完整;点地梅低剂量组除 1 例尚有轻微裂痕外,其余也基本愈合。



A:假手术组;B:骨创伤模型组;C:点地梅高剂量组;D:点地梅低剂量组

图 2 骨创伤愈合大鼠股骨创伤处 X 线片

3 讨论

骨创伤的愈合是机体一个自然修复过程,机体调动自身积极因素参与骨受伤部位的组织修复。主要与以下两方面密切相关:(1)骨创伤修复的各种细胞的增殖活动;(2)有机基质的形成和无机盐的沉积。一般情况下,只要骨创伤处无错位,对接固定良好,体质正常,营养充足,经过 1~2 个骨周期大多数骨创伤都能自行修复愈合^[11]。然而创伤愈合处骨质的加强还依赖于其周围组织钙、磷等无机盐溶出和沉积重新平衡的建立,骨痂组织基质钙化,骨痂强度的提高等^[12]。如何早期促进骨创伤愈合并加强创伤愈合处的骨质是骨伤科研究的重点

课题。

人体正常的生命活动中,血和骨中的钙磷水平维持动态平衡。当成骨作用时,血中的钙磷在骨组织中沉积;当溶骨作用时,原来沉积在骨组织中的钙磷被动员,释放进入血液^[13]。血液中的 Ca×P 维持动态平衡,当超过一定的浓度积时,在骨的有机质中钙和磷先形成胶体态,最终以无机盐的形式沉淀于骨内。因此血清中的 Ca×P 也反映了钙磷在骨中沉积的快慢。本实验中,骨创伤模型大鼠血清钙、磷水平及 Ca×P 均降低,而不同剂量的点地梅提取物能增加血清钙、磷水平和 Ca×P。提示点地梅提取物可能通过促进骨创伤周围骨组织的溶骨作用,使钙、磷动员出来,血清 Ca×P 升高,骨创伤处 Ca×P 增加,促进了骨痂的形成与钙化。

骨创伤修复时,骨母细胞、软骨母细胞、血管骨内皮和外皮细胞、血管周围细胞均合成丰富的 ALP^[14]。成骨细胞分泌的 ALP 可以渗入血液,使血液 ALP 水平增加,因此血清 ALP 可作为骨重建活跃情况的标志^[15]。本实验中点地梅提取物给药组大鼠血清 ALP 活性均升高,可见点地梅提取物给药后创伤骨重建更为活跃。

骨创伤发生后,外骨膜深层的成骨细胞增殖较快。一般大鼠骨创伤第 3 天开始形成骨膜骨痂。本实验中,大鼠骨创伤 10 d 后,创伤部位均有骨痂形成。与骨创伤模型组比较,点地梅提取物给药大鼠骨痂更为均匀完整。创伤部位的骨密度分析发现,骨创伤模型组的大鼠骨密度明显比假手术组高;而与骨创伤模型组比较,点地梅提取物高剂量组大鼠骨密度明显降低。这可能是由于点地梅提取物给药后,加速了骨痂的成熟,大量的坏死骨组织通过溶骨作用动员出来,增加了血液中的钙磷水平,有利于创伤骨组织的钙化。骨生物力学的结果也显示,点地梅提取物给药后,骨生物力学各个指标均比骨创伤模型组有所提高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。可以推测点地梅提取物具有强化骨质,增加抗折力的作用,但这可能需要更长的时间才能显示出明显的效果。

综上所述,点地梅提取物可显著提高骨骼创伤大鼠血清中钙、磷水平、Ca×P 及 ALP 活性,降低创伤处骨密度,显著提高

弯曲能量,具有良好的促进骨创伤愈合的作用。其详实的物质基础和作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 阎彦江,范金鹏,扈文海,等. 中药在促进骨折愈合中的进展[J]. 河北医科大学学报,2009,30(4):421-423.
- [2] 雷军,肖云川,刘森,等. 点地梅中的两个化学成分[J]. 中成药,2013,35(8):1708-1710.
- [3] 肖培根,杨世林. 实用中草药原色图谱: 草药类[M]. 北京: 中国农业出版社,2002:258.
- [4] 向彬,杨杰,周春花,等. 点地梅的抗炎镇痛作用研究[J]. 中国医药科学,2014,4(3):31-33.
- [5] 何希瑞,魏桂芳,姚宏,等. 点地梅属植物化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):296-299.
- [6] 陈玲,杨云洲,陈继革. 接骨七厘片促进大鼠骨折愈合的实验研究[J]. 湖北中医杂志,2005,27(1):50-52.
- [7] 谢艳,朱太咏,毕军花,等. 益气生骨颗粒对大鼠骨折愈合骨痂中无机质及钙含量的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(19):3781-3783.
- [8] 苏华,赵华,吴铁. 醋酸泼尼松对大鼠骨质量及生物力学的影响[J]. 中国热带医学,2009,9(7):1232-1234.

- [9] 苏华,吴铁,赵华. 双参口服液对醋酸泼尼松致骨质疏松症大鼠骨质和骨量的影响[J]. 中国组织工程研究,2009,13(41):8118-8122.
- [10] Hao Y, Wang X, Wang L, et al. Zoledronic acid suppresses callus remodeling but enhances callus strength in an osteoporotic rat model of fracture healing[J]. Bone, 2015, 81:702-711.
- [11] 阮朝阳. 中药促进骨折愈合作用机制的实验研究进展[J]. 中医药导报,2003,9(2):48-49.
- [12] 付小兵. 骨创伤修复基础研究的若干新进展[J]. 中华创伤外科杂志,2004,6(1):46-50.
- [13] Bonjour JP. Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health[J]. J Am Coll Nutr, 2011, 30(5 Suppl 1): S438-448.
- [14] 凌昆,赵诣,郭素华. 巴戟天药物血清对成骨细胞生物学特性的影响[J]. 中华中医药杂志,2010,25(6):846-849.
- [15] 丁香,曹文丽,张应辉. 南蛇藤乙醇提取物对大鼠骨创伤愈合的影响[J]. 中国现代应用药学,2014,31(3):283-287.

(收稿日期:2017-02-05 修回日期:2017-04-10)

(上接第 2607 页)

- [10] Sun Q, Liu L, Mandal J, et al. PDGF-BB induces PRMT1 expression through ERK1/2 dependent STAT1 activation and regulates remodeling in primary human lung fibroblasts[J]. Cell Signal, 2016, 28(4):307-315.
- [11] Takahashi J, Orcholski M, Yuan K, et al. PDGF-dependent β -catenin activation is associated with abnormal pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension[J]. FEBS Lett, 2016, 590(1):101-109.
- [12] Jiang Z, Zhong G, Wen L, et al. The role of platelet-derived growth factor-B/platelet-derived growth factor receptor- β signaling in chronic atrial fibrillation[J]. Cardiology, 2016, 133(4):242-256.
- [13] 陈勇,韩小勇. 核苷类似物治疗乙型肝炎患者发生慢加急性肝衰竭短期预后的生存状况研究[J]. 重庆医学,2015,44(7):955-957.
- [14] Xin J, Ding W, Hao S, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes Express tissue inhibitor of metalloproteinases 4 and follistatin[J]. Liver Int, 2015, 35(10):2301-2310.
- [15] Shi D, Zhang J, Zhou Q, et al. Quantitative evaluation of human bone mesenchymal stem cells rescuing fulminant hepatic failure in pigs[J]. Gut, 2017, 66(5):955-964.

- [16] Huang B, Cheng X, Wang H, et al. Mesenchymal stem cells and their secreted molecules predominantly ameliorate fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis in mice respectively[J]. J Transl Med, 2016, 14:45.
- [17] Li J, Tao R, Wu W, et al. 3D PLGA scaffolds improve differentiation and function of bone marrow mesenchymal stem Cell-Derived hepatocytes[J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(9):1427-1436.
- [18] Geiger A, Walker A, Nissen E, et al. Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 467(2):303-309.
- [19] Lee CH, Liu KS, Chang SH, et al. Promoting diabetic wound therapy using biodegradable rhPDGF-loaded nanofibrous membranes: CONSORT-compliant article [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(47):e1873.
- [20] Wang Q, Huo L, He J, et al. Soluble epoxide hydrolase is involved in the development of atherosclerosis and arterial neointima formation by regulating smooth muscle cell migration[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(11):H1894-1903.

(收稿日期:2017-02-07 修回日期:2017-04-12)