

伤科健骨汤对大鼠四肢开放性骨折模型中 VEGF 表达及局部组织学表现的影响

林小永¹, 陈亮²

中山市中医院骨二科, 广东 中山 528400

[摘要] 目的: 观察在大鼠四肢开放性骨折模型早期愈合过程中, 伤科健骨汤对血清中血管内皮生长因子 (VEGF) 表达及骨折端局部组织学改变的影响。方法: 将 SPF 级 SD 大鼠造成开放性股骨骨折模型, 术后将造模成功的大鼠随机分为实验组和对照组各 18 只。实验组造模后第 2 天即开始以伤科健骨汤浓缩液灌服, 对照组仅给予正常饲养。术后第 1 周、2 周、4 周, 分批处死动物取材行免疫组化染色及图像分析测定, 酶联免疫吸附双抗体夹心法 (ELISA) 测定血清 VEGF 表达的强度。结果: 实验组术后第 2 周、4 周的 VEGF 浓度与对照组相比, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。局部组织免疫组化染色及图像分析测定显示, 实验组 VEGF 的表达在 1、2、4 周时均强于对照组, 其中在第 2 周时染色阳性强度最高, 第 4 周阳性强度降低, 但仍强于对照组。结论: 伤科健骨汤在大鼠四肢骨折愈合早期可正向调高 VEGF 水平, 从而促进骨折断端微血管新生增殖, 加快骨折端骨性连接形成, 起到促进骨折愈合的作用。

[关键词] 开放性骨折; 伤科健骨汤; 血管内皮生长因子 (VEGF); 大鼠; 动物实验

[中图分类号] R683 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 02-0218-02

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.02.102

血管内皮生长因子 (VEGF) 在骨创伤的正常血管生成、骨痂结构和矿化以及软骨改建中发挥着极其重要的作用, 但目前该类研究多停留在分子生物学领域内, 中医药治疗骨创伤有着悠久的历史 and 突出的临床效果, 但对其具体作用机理的研究尚不深入, 本研究将二者通过实验设计进行结合, 建立大鼠四肢开放性骨折模型进行对照试验, 观察在四肢开放性骨折早期愈合过程中, 伤科健骨汤对体内血清中 VEGF 表达及骨折端局部组织学表现的影响, 探讨其治疗四肢开放性骨折的作用机制, 以进一步明确其促进骨折愈合的机理。

1 材料

1.1 实验动物 健康 SPF 级 SD 大鼠, 58 只, 雌雄各 29 只, 体重 180~200 g, 4~6 周龄。由广东省医学实验动物中心提供, 遵循中国科学技术委员会颁发的《实验动物管理条例》进行实验。

1.2 主要试剂及仪器 伤科健骨汤是本院骨科经验方, 组成: 怀牛膝、续断、透骨草、独活各 15 g, 补骨脂、三七、川芎、当归、鸡血藤各 10 g, 甘草 5 g, 水浸泡 30 min, 煎 3 次, 每次煎开 10 min 后过滤取汁, 将 3 次汁液混合, 并统一浓缩为质量浓度 2 g/mL 的药液, 由本院中药房煎制; 抗鼠 VEGF 的酶联免疫吸附双抗体夹心法 (ELISA) 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司提供); 即用型 SABC 免疫组化试剂盒 (武汉博士德

生物工程有限公司); 超净工作台 (苏州净化设备有限公司, Sw-CJ); GENIOS 多功能酶标仪 (奥地利 TECAN 公司)。

2 实验方法

2.1 造模与分组 58 只 SD 大鼠饲养于本院药学部实验动物中心, 室温 20℃, 相对湿度 60%, 自由摄食、饮水, 每周监测体重。用计算机随机数字生成法将大鼠随机分为造模组 40 只和正常对照组 18 只。2 组均给予全价营养颗粒饲料 (含 12% 脂肪、60% 碳水化合物、28% 蛋白质)。

2.1.1 开放性骨折模型的建立 采用腹腔注射麻醉的方法, 于大鼠右下腹部注射 3% 戊巴比妥钠, 按每 1 kg 体重 1 mg 的剂量, 计算药物浓度, 左后肢股骨部术区常规备皮、消毒, 取前外侧切口, 沿肌间隙尽量钝性分离骨面, 显露股骨干, 于股骨干中 1/3 处呈短斜形截断, 取 1.2~1.5 mm 的克氏针做髓内固定以固定折端, 检查对位对线良好, 固定稳固后, 冲洗缝合伤口, 安尔碘每天消毒伤口预防感染。

2.1.2 分组方法 在造模成功的大鼠中选取健康状况良好的 36 只, 用计算机随机数字生成法随机分为实验组和对照组各 18 只。

2.2 给药方法 实验组造模后第 2 天即开始以伤科健骨汤浓缩液灌服, 按 10 倍成人剂量换算为 15 mL/(kg·d), 分 2 次给药。对照组仅给予正常饲养。

[收稿日期] 2014-10-09

[基金项目] 广东省中山市科技攻关计划项目 (20132A176)

[作者简介] 林小永 (1978-), 男, 副主任医师, 主要从事中西医结合创伤骨科的临床及研究工作。

[通讯作者] 陈亮, E-mail: chenliang211@163.com。

2.3 血清中 VEGF 的测定 术后第 1 周、2 周、4 周应用随机数字生成法, 每组分别抽取 6 只大鼠拍 X 线片后处死, 取骨折端局部组织标本固定保存后待测。心脏取血, 离心 15 min 分离血清, -70°C 低温保存待测。VEGF 含量的测定采用 ELISA。

2.4 VEGF 免疫组织化学检测 术后第 1 周、2 周、4 周, 取大鼠的局部组织标本经 4% 多聚甲醛溶液固定、硝酸脱钙, 石蜡切片。采用即用型 SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 二氨基联苯胺(DAB)显色。免疫组化染色片电子显微镜下计算免疫组化染色的平均光密度值和积分光密度值进行半定量分析。

2.5 统计学方法 所得的数据采用 SPSS15.0 软件进行统计分析, 计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两样本均数比较采用 t 检验, 多样本均数比较采用单因素方差分析。

3 实验结果

3.1 2 组各时间点血清 VEGF 浓度比较 见表 1。实验组术后第 2 周、4 周的 VEGF 浓度与前 1 周比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 2 组间第 2 周、4 周的 VEGF 浓度分别比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。

表1 2组各时间点血清 VEGF 浓度比较 $(\bar{x} \pm s)$ mg/L

组别	n	第1周	第2周	第4周
实验组	18	158.30 ± 11.06	178.50 ± 9.97 ^{①③}	170.45 ± 12.55 ^{②③}
对照组	18	147.65 ± 4.55	151.28 ± 8.30	160.37 ± 3.15

与本组第 1 周比较, ① $P < 0.05$; 与本组第 2 周比较, ② $P < 0.05$; 与对照组同期比较, ③ $P < 0.05$

3.2 局部组织学观察结果 见图 1、2、3。实验组 VEGF 的表达在 1、2、4 周时均强于对照组, 其中在第 2 周时染色阳性强度最高, 第 4 周阳性强度降低但仍优于对照组。其中术后第 1 周, 2 组均出现较强阳性染色, 实验组程度稍强于对照组, 但优势不明显; 术后第 2 周, 实验组局部组织染色阳性强度高于对照组, 二者差异明显, 且实验组局部软骨痂、成骨细胞、新生血管内皮细胞密度明显高于对照组, 端断组织增生活跃。术后第 4 周, 2 组 VEGF 仍呈持续阳性表达, 但差异程度稍有下降。

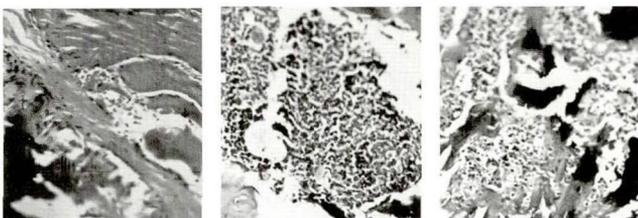


图1 术后第1周 图2 术后第2周 图3 术后第4周

4 讨论

随着人们对骨折愈合机制研究的深入, 逐渐认识到人类骨

骼在骨折发生后的愈合过程中, 受到诸多因素的影响, 这之中骨折断端的血供是最基本的因素, 也是最重要的因素, 而创伤后血管的生成可通过很多诱导因子诱导, 有研究显示, 唯有 VEGF 对内皮细胞有特异性, 能促使其增殖及血管的生成, 同时又能增加血管的通透性^[1-2]。类似的研究也证实, VEGF 在骨骼生成及其代谢过程中均起到极为关键的作用, 如初同伟等^[3]通过动物实验发现, 使用 VEGF 组骨折端局部血流量明显高于对照组, 而使用 VEGF 抗体组则出现骨不连及不愈合。文献[4]报道显示, 在骨折的愈合过程中, VEGF 能通过促进骨折端及其周围软组织血管的生成, 特异性增加局部的血流量, 促进内皮细胞增殖, 调节软骨的生成与成熟, 增进成骨细胞与软骨内骨化之间的相互作用, 诱导成骨, 进而加快骨折愈合过程。国外有研究也发现, 在骨折部位应用 VEGF 腺病毒转染的方法可促进骨折愈合^[5]。

伤科健骨汤为本院骨科应用多年的经验方, 临床效果明显, 但其具体作用机理尚不明确, 极大地制约了对外学术交流及进一步现代化开发, 本次实验结果显示: 伤科健骨汤在大鼠四肢骨折愈合早期可正向调高 VEGF 水平, 从而促进骨折断端微血管新生增殖, 加快骨折端骨性连接形成, 起到促进骨折愈合的作用。尤其是术后第 2 周, 实验组骨折断端局部组织中 VEGF 表达明显高于对照组, 提示伤科健骨汤能促进 VEGF 的合成分泌, 从而有效地促进了骨修复过程中血管的形成和骨生成, 这可能是其促进骨折愈合的重要机制。但必须指出的是, 骨折愈合是多种因素共同参与、相互协同的复杂过程, VEGF 只是其中的一个方面, 关于伤科健骨汤是如何干预其他骨生长因子的, 还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 161(2): 851-858.
- [2] Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen regulated to PDGF[J]. Science, 1989, 246(4935): 1309-1312.
- [3] 初同伟, 王正国, 朱佩芳, 等. 血管内皮细胞生长因子在骨折愈合过程中的作用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16(2): 75-78.
- [4] 钟刚, 裴福兴, 樊瑜波. 血管内皮生长因子基因转染促进骨折愈合的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(8): 604-606.
- [5] Lattermann C, Baltzer AW, Zelle BA, et al. Feasibility of percutaneous gene transfer to an atrophic nonunion in a rabbit [J]. Clin Orthop Relat Res, 2004 (425): 237-243.

(责任编辑: 刘淑婷, 吴凌)