

局部应用菟丝子总多糖对家兔骨折修复中 TGF- β 1 表达的实验研究*

★ 李绪松** 郑臣校 付光明 (广东省中山市中医院 中山 528400)

摘要:目的:研究局部运用菟丝子总多糖在促进家兔骨折修复中 TGF- β 1 的表达及其机理。方法:选用健康成年家兔 63 只,体重 2.5 kg 左右。随机分为 3 组(即菟丝子组、BMP 组和空白组),每组 21 只。在小腿中段前外侧逐层切开皮肤,分离组织,以线锯于胫骨中段截骨约 0.5 cm,手法复位并维持。菟丝子组、BMP 组分别在骨缺损断端间置入菟丝子总多糖凝胶、骨形成蛋白填充于缺损处;空白组断端间不作处理。三组均予缝合、夹板外固定。术后于 2、4、8 周分批处死实验动物 7 只,取标本行 TGF- β 1 免疫组化的方法进行评价。结果:中药组、BMP 组 TGF- β 1 免疫组化积分光密度值与空白组比较,都有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);中药组与 BMP 组比较无统计学意义($P > 0.05$)。结论:菟丝子总多糖可促进 TGF- β 1 参与调节骨折修复。一定程度证实了中药菟丝子对骨折损伤的修复作用。

关键词:菟丝子总多糖;骨折;转化生长因子- β 1;免疫组化

中图分类号:R 285.5 文献标识码:A

TGF- β 1 Expression of Local Application of Total Polysaccharide from Cuscuta on Rabbits Fracture Healing

LI Xu-song, ZHENG Chen-xiao, FU Guang-ming

Zhongshan hospital of traditional Chinese medicine in Guangdong province, Zhongshan 528400, China

Abstract: Objective: To study TGF- β 1 expression and the related mechanism about the effect of local application of the total polysaccharide from Cuscuta on accelerating fracture healing. Methods: 63 healthy adult rabbits, weight about 2.5 kg, were randomly divided into three groups: the Cuscuta chinensis group, the bone morphogenetic protein (BMP) group, the control group, 21 in every group. After skin incision layer by layer in anterolateral cross leg, separated tissue, osteotomy was performed in middle cross section of tibia with Fret saw, length is about 0.5 cm, then treated with manual reduction and maintenance. The Cuscuta chinensis group and BMP group were filled with The total polysaccharide from Cuscuta and BMP respectively, no treatment was given to the control group. Furthermore, three group were treated with suture and splint external fixation. At 2 weeks, 4 weeks, 8 weeks after respective treatments, 7 rabbits in each group were randomly selected and sacrificed. Tissue samples were collected and analyzed by TGF- β 1 immunohistochemistry. Results: Compared with the control group, the value of TGF- β 1 integral optical density in the Cuscuta chinensis group and BMP group showed significant difference, ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); while the difference was not statistically significant between the Cuscuta chinensis group and BMP group ($P > 0.05$). Conclusion: By up-regulating the levels of TGF- β 1, the total polysaccharide from Cuscuta have effectiveness on accelerating fracture healing. In some extent, this can be thought as the evidence of fracture repairing effect of Cuscuta chinensis.

Key words: The total polysaccharide from Cuscuta; Bone morphogenetic protein; Fracture; Transformation growth factor- β 1. Immunohistochemistry

* 基金项目:广东省中山市科技局 2012 年基金项目(20113A109)。

** 作者简介:李绪松(1976 -),男,主治医师,主要研究方向为:中西医结合治疗骨伤科疾病。E-mail: xusongli@163.com

中医骨伤科对骨折的治疗遵从于复位、固定、功能锻炼和三期辨证用药的一般原则。强调“肾藏精,主骨生髓”理论指导下的骨折用药方法。结合临床用药经验,以及现代药理对中药多糖类的研究进展,我们对菟丝子总多糖进行了创新性使用,观察菟丝子总多糖局部应用对家兔骨折的修复 TGF- β 1 表达情况。以说明补肾中药促进骨折修复的可行性和部分内涵。

1 实验材料

1.1 实验动物及分组

选用健康成年家兔 63 只,体重(2.3 \pm 0.3)kg,按性别随机分为三组:菟丝子总多糖组(A组)、BMP/明胶复合物组(B组)以及空白对照组(C组)。每组 21 只兔。

1.2 主要实验试剂与器材

菟丝子总多糖(广州中医药大学药学院中药制剂室提供);人骨形态发生蛋白(human bone morphogenetic protein, rhBMP)(天津中津生物发展有限公司提供);明胶(成都科龙化工试剂厂生产);TGF- β 1 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司生产);DAB(二氨基联苯胺)显色液(武汉博士德生物工程有限公司生产);戊巴比妥钠(上海化学试剂采购供应站分装厂进口分装);Leitz wetzlar 1512 型石蜡切片机(德国生产);CK-2 型普通光学显微镜(日本 Olympus 公司生产)。

2 实验方法

2.1 实验动物的造模

以 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉麻醉成功。家兔取仰卧位,四肢固定于自制兔板上,搬运至手术台上。通过胫腓骨前外侧入路,切口约 5~6 cm,逐层切开皮肤、皮下组织及关节囊,显露家兔胫骨。尽量不损伤骨膜。使用线锯将胫骨截断,并形成一约 0.5 cm 的骨缺损区域。庆大霉素-生理盐水冲洗后,对 A、B、C 三组分别给予中药菟丝子总多糖、BMP/明胶复合物以及空白处理。然后逐层缝合骨膜及肌肉、筋膜层以及皮肤切口。术后伤口外涂红霉素眼膏,每只动物每天肌注青霉素钠 3 \times 10⁵ U,每天一次,共 7 天。常规进食,分笼饲养,自由活动,予以夹板外固定。术后 2、4、8 周,沿原手术切口取下骨折的胫骨,修剪周围的软组织,用 4% 多聚甲醛固定,4 $^{\circ}$ C 过夜,用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗,置入 20% 二乙胺四乙酸二钠(EDTA) pH 值 7.4 的磷酸缓冲液中,室温下脱钙 10 天,中间换液一次,用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡 4 h,软蜡包埋。切片厚度 5 μ m,37 $^{\circ}$ C

烤片过夜。行 TGF- β 1 免疫组化;并处死动物送标本。8 周处死所有实验动物。

2.2 观察指标及测定方法

应用 TGF- β 1 免疫组化的方法,切片经二甲苯脱蜡 4 h,梯度酒精水化,0.3% 过氧化氢甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶,5% 羊血清封闭后,加 1:100 稀释的兔抗鼠 TGF- β 1 抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,复温冲洗后加 1:300 稀释的羊抗兔抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,冲洗后再加 1:300 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉卵白素,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,冲洗后用二氨基联苯胺(DAB)显色,梯度酒精脱水二甲苯透明后封片。观察各组术后切片修复组织的积分光密度值(IOD)并进行统计学分析。

2.3 统计学处理

应用 SPSS11.5 统计软件处理:计量资料,以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA);经正态分布检验,方差齐性检验用 Homogeneity of variance test。

3 实验结果

3.1 一般情况

术后实验动物切口均于 5~7 天愈合,A 组 1 只共 1 个骨折端,B 组 2 只共 2 个骨折端,C 组 1 只共 1 个骨折端术后 2~3 天曾出现肿胀积液,给予消毒后穿刺积液抽吸为淡黄色稀液体。

3.2 TGF- β 1 免疫组化

免疫组织化学主要原理是用标记的抗体对细胞或组织内相应的抗原进行定性、定位和定量检测。其优点是具有高度的特异性、敏感性和精确性。阳性结果时采用了对切片修复组织的积分光密度值(IOD)进行统计。IOD 能反映出被测个体截面或投影轮廓内总的吸光度,由各像素点光密度值直接相加,表示组织细胞截面或投影轮廓内染色的深浅总量。

表 1 TGF- β 1 免疫组化 IOD 组间比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 标本数量 | 2 周 | 4 周 | 8 周 |
|-----|------|--------------------|--------------------|--------------------|
| A 组 | 7 | 59.25 \pm 12.47* | 84.86 \pm 22.57* | 76.96 \pm 19.57* |
| B 组 | 7 | 56.67 \pm 15.43 | 76.81 \pm 24.49* | 68.17 \pm 7.66* |
| C 组 | 7 | 37.48 \pm 13.54 | 31.83 \pm 9.26 | 27.62 \pm 8.32 |

与空白组比较: $\Delta P < 0.05$, $\star P < 0.01$ 。

由表 1 可以看出:2、4、8 周时,中药组、BMP 组 TGF- β 1 免疫组化积分光密度值与空白组比较,都有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);中药组与 BMP 组比较无统计学意义($P > 0.05$)。提示:菟丝子总多糖及 BMP/明胶复合物能够提高修复组织的 TGF- β 1 分泌表达,为骨折修复组织的生长、塑形提供基质材料。

4 结论

菟丝子总多糖与空白组比较在 2、4、8 周均有显著性差异;与 BMP 组比较没有统计学意义,但表现出一定的优势。提示在骨折愈合的不同阶段,产生 TGF- β 1 的细胞是不同的,表达量也不同,上述变化与组织学改变密切相关。而且与相应细胞的功能状态密切相关,这说明菟丝子总多糖可促进 TGF- β 1 参与调节骨折修复。一定程度证实了利用补肾中药菟丝子对骨折损伤的修复作用,也符合骨折治疗中强调补肝肾补气血的用药原则。

5 讨论

传统中医药在骨折治疗中发挥着重要作用,其治疗原则仍以骨折复位、固定、功能锻炼为一般原则,临床用药遵从三期辩证用药。目前大部分报道集中在复方制剂对促进骨折愈合的临床疗效观察和单味中药有效单体成分实验观察阶段。随着分子生物学、组织工程、基因工程的研究深入,中医对骨折损伤的理论应当有所针对性创新,并对有利于骨折修复的补肾活血类中药有效药用成分以及药理作用环节进行明确的研究。有学者研究表明^[1],TGF- β 1 表达量和组织学分布的变化与骨折愈合过程中相应的组织学变化密切相关,而且与相应细胞的功能状态相关,说明 TGF- β 1 是调节骨折愈合过程的重要因子以便在骨折修复领域发挥更重要的作用。

现代医学研究提示菟丝子能够促进造血功能,能促进骨髓造血干细胞的增殖,而髓腔内干细胞同时包括了骨髓间充质干细胞,为菟丝子补肾生髓养骨提供了依据。王建红等^[2]发现菟丝子黄酮能下调心理应激大鼠下丘脑神经递质 β -EP,上调腺垂体 LH 水平。现代药理学研究^[3]表明:菟丝子还能提高免疫功能,清除氧自由基、活性氧及抗脂质过氧化,增强体液免疫功能;具有一定的神经营养样作用和类似雌激素样作用,通过作用于不同的靶腺轴起到调节骨软骨代谢的作用。现代药理学研究提示多糖可能是补肾药药理作用的重要基础,目前研究较多的有枸杞多糖、菟丝子总多糖、地黄多糖、黄芪多糖、人参多糖以及六味地黄多糖等复方多糖。它们的共同功效包括^[4]:能提高免疫功能,清除氧自由基、活性氧及抗脂质过氧化等;菟丝子总多糖同时具有良好的成膜性和凝胶化能力,对温度和 PH 值稳定性

好,具有生物相容性和生物降解性,水溶性好。通过制成水凝胶具有定形和缓释作用,在既往试验中,有学者^[5]观察到菟丝子总多糖凝胶在骨质缺损内 2~4 周内完全吸收,与促进 II 型胶原 mRNA 表达四周达峰一致。并且与 BMP 凝胶组没有明显差异,而且略有优势,菟丝子总多糖凝胶发挥了促进骨折修复因素与临时基质结合体的作用。

本次实验,通过对菟丝子总多糖的创新性使用,提示可能在骨组织工程中种子细胞的体外培养以及辅助各种生长因子实现增效方面发挥积极的作用。在骨折愈合的不同阶段,TGF- β 1 是参与调节骨折修复的重要因子。但机体对骨折愈合过程的调控是复杂的,单一因子不能解释其全部内容^[6]。关于骨折愈合过程中应用菟丝子总多糖等类似的中药提取物对其它相关因子表达的影响,以及生长因子局部应用促进骨折愈合等问题,尚待进一步研究。本实验所选菟丝子的多糖成份有很强粘合作用,既有对骨折断端的固定粘接功效,又可促进骨折的修复,具双重作用,在目前骨折的修复治疗中具有极强的创新性。是对中药利用传统认识结合现代药理、病理进展提示做出的一次大胆尝试,对我们日后研究中医理论、开发新药提出了更广阔的道路。有利于拓展中药的使用范围,增加新的给药途径和提高临床疗效,从而提高中医药的竞争力,更好的为人类健康谋福利。

参考文献

- [1] 姬洪全,党耕町,马庆军,等.骨折愈合过程中转化生长因子 β 1 表达的实验研究[J].中华外科杂志,1998,36(2):72-73.
- [2] 王建红,王敏璋,欧阳栋,等.菟丝子黄酮对心理应激雌性大鼠下丘脑 β -EP 与腺垂体 FSH、LH 的影响[J].中药材,2002,12(25):886-888.
- [3] 何清义,李起鸿,杨柳,等.人关节软骨细胞的永生化及其表型的诱导[J].中华创伤杂志,2002,18:727-731.
- [4] 张振明,蔡曦光,葛斌.许爱霞女贞子多糖和菟丝子总多糖的协同抗衰老作用及其机制[J].中国药理学通报,2005,5(21):587-590.
- [5] 林慧彬,林建群,林建强.山东 4 种菟丝子生物学特性研究[J].中国野生植物资源,2008,1(28):34-35.
- [6] 李瑛,邹季,熊勇,等.小夹板固定对实验性骨折愈合的 VEGF 及 TGF- β 1 表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2007,15(9):32-35.

(收稿日期:2011-11-21)

本事琥珀散对子宫内膜异位症大鼠 Th1/Th2 漂移的影响*

★ 刘彤彤¹ 张小勇 马小娜 王冬 赵伟鹏 孙良明 赵妍 王庆国** (北京中医药大学 2009 级博士研究生 北京 100029; 2. 北京中医药大学 北京 100029)

摘要:目的:通过比较本事琥珀散治疗前后子宫内膜异位症(EMs)大鼠模型血清辅助性 T 淋巴细胞(Th 细胞)分泌干扰素- γ (IFN- γ)和白细胞介素-4(IL-4)及其比值的变化,探讨本事琥珀散对 EMs Th1/Th2 漂移的影响。方法:采用自体内膜移植法建立 EMs 大鼠模型,随机分为正常组、伪手术组、疾病模型组、本事琥珀散组和达那唑组,给药 4 周后 ELISA 法检测血清 IFN- γ 和 IL-4 水平,并计算 IFN- γ /IL-4 比值。结果:与疾病模型组比较,本事琥珀散组 IFN- γ /IL-4 比值明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:EMs 大鼠模型血清 Th 细胞存在 Th2 向 Th1 漂移的现象,对异位内膜的生长具有促进作用。本事琥珀散能够纠正 Th1/Th2 的漂移,对 EMs 一定的具有治疗作用。

关键词:本事琥珀散;子宫内膜异位症;大鼠;Th1/Th2 漂移;干扰素- γ ;白细胞介素-4

中图分类号:R 711.71 **文献标识码:**A

Effects of BenShiHuPoSan on Th1/Th2 Drift in Endometriosis Model Rats

LIU Dan-tong, ZHANG Xiao-yong, MA Xiao-na, WANG Dong, ZHAO Wei-peng, SUN Liang-ming, ZHAO yan, WANG Qing-guo

Beijing University Of Chinese Medicine, Beijing 100029

Abstract: Objective: By comparing the changes of IFN- γ and IL-4 in endometriosis model rats in before and after using BenShiHu-

(上接第 14 页)疫的治疗水平和流行情况,留下了宝贵的研究资料;从 1901 年《鼠疫约编》成书到 1935 年《鼠疫治疗全书》出版,前后 34 年,这段时间不但是鼠疫横行的时期,也是中西医交汇撞击的时期,李健颐衷中参西,结合西医医理来认识鼠疫病症,治疗中也大胆创制运用新剂型解毒注射液,反映了当时闽医在中西医汇通中的实践精神,比之《鼠疫约编》的治疗水平有了新的发展。综上所述,两部鼠疫专著反映了近代福建地区中医防治鼠疫的临床经验,对于当今的疫病防治,具有一定的临床价值,对于研究近代福建鼠疫流行病史,也有重要的文献参考价值。

参考文献

- [1] 中国医学科学院流行病学微生物学研究编.《中国鼠疫流行史》[M]. 北京:内部修订本,1973:2.
- [2] 俞慎初. 闽台医林人物志[M]. 福州:福建科学技术出版社,1988:118.
- [3] 李健颐. 鼠疫治疗全书[M]. 福州:福建余庆堂药局铅印本,1935:1.
- [4] 周易,刘德荣. 清代福建医家编撰的部分医籍述[J]. 福建中医学院学报 2008,18(1):88.
- [5-6] 陈杰士.《鼠疫治法》[M], 福建省政府秘书处印,1941 年铅印本,1.
- [7-9] 李健颐. 鼠疫治疗全书[M]. 福州:福建余庆堂药局铅印本,1935,题词.
- [10] 吴文清. 李健颐《鼠疫治疗全书》学术特点与成就[J]. 中华医史杂志,2005,34(2):88.

(收稿日期:2011-11-22)

* 基金资助:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2011CB505100)

** 通讯作者:王庆国(1952-),男,教授,主任医师,博士生导师。国家级重点学科——中医临床基础学科带头人,北京市教学名师,国家级精品课程——《伤寒论》主讲教师。现任北京中医药大学副校长,国家重大基础研究(973)计划(证候规范及其与疾病方剂相关性研究)及(基于“肝藏血主疏泄”的脏象理论研究)首席科学家。研究方向:经方作用机理及配伍规律研究;基于经方的中药新药开发研究;中医证候规范及其生物学基础研究。Tel:010-64286871, E-mail:Wangqg8558@sina.com