·论著·

阿胶对骨愈合过程中相关基因表达影响

高云, 董福慧, 郑军
(中国中医研究院骨伤科研究所, 北京　100700)

摘要　目的: 揭示阿胶在骨愈合过程中对 6 种相关基因表达的干预作用, 了解阿胶的调节靶点, 探索建构中药基因组学的途径。方法: 通过在大鼠胫骨打孔的方法建立单因素干扰模型, 并将 150 只大鼠随机分为正常组、模型组和阿胶组, 每组 50 只, 分别在实验的第 4、7、14、21、28 天时, 采用原位杂交方法检测Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型前胶原 mRNA、转化生长因子(TGF-β_1mRNA)、骨形态发生蛋白(BMP-2mRNA)、血管内皮生长因子(VEGFmRNA)的变化。结果: 阿胶在骨愈合早、中期可促进Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型前胶原的 mRNA、TGF-β_1mRNA 的表达, 阿胶组的表达高于模型组和正常组; 而 BMP-2mRNA 及 VEGFmRNA 的表达量在骨愈合过程中无明显改变, 在骨愈合早、中期阿胶组和模型组的表达高于正常组。结论: 在骨愈合早期、中期, 阿胶可加强巨核细胞的聚集及增强其活性, 并可促进软骨细胞、成骨细胞的增殖及合成活性, 加快软骨内骨化, 促进骨愈合; 而对血管形成无明显作用。

关键词　骨折愈合;　基因表达;　中草药

Influence of *E jiao* on related genes expression during bone repair

GAO Yun, DONG Fu-hui, ZHENG Jun. Institute of Orthopedics and Traumatology, China Academy of Traditional Chinese Medicine (Beijing, 100700, China)

Abstract Objective: To express the influences of *E Jiao* on 6 kinds interrelated gene expression during bone repair, understand *E Jiao* regulation target, and create gene theory of Traditional Chinese Medicine. **Methods:** Single factor interfere model was set up in SD rat, and 150 SD rats were divided randomly into the normal group, model group and *E Jaio* group. Selecting 4, 7, 14, 21 and 28 days in the experiment, the in situ hybridization method was adopted to detect the change of procollagen mRNA, type Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, TGF-β_1mRNA, BMP-2mRNA and VEGFmRNA. **Results:** *E Jiao* promoted gene expression of procollagen mRNA type Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and TGF-β_1mRNA in the early and metaphase of bone repair. The expression in the *E Jiao* group was higher than that of normal group and model group. But there was no influence to BMP-2mRNA and VEGFmRNA gene expression, and the expression in the *E Jiao* group and model group were both higher than that of the normal group. **Conclusion:** In the early and metaphase of bone repair, *E Jiao* can increase aggregation and activity of megalocaryocytes. It can expedite proliferation and synthesizing activity of cartilage cell and osteoblast as well, quicken ossification in the cartilages and improving bone repair. But there is no influence to formation of blood vessel.

Key words　Fracture healing;　Gene expression;　Drugs, Chinese herbal

阿胶在骨愈合过程中是否对其相关基因表达存在调节作用, 调节的时空性及调节水平、强度、机制如何均属未知。通过阿胶对骨愈合过程中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型前胶原 mRNA、转化生长因子(TGF-β_1mRNA)、骨形态发生蛋白(BMP-2mRNA)和血管内皮生长因子(VEGFmRNA)表达的动态观察, 揭示阿胶在此过程中对骨愈合的干预作用, 了解阿胶的调节靶点, 为中药基因组学的建构提供理论与实验依据[1]。

1　材料与方法

1.1　动物模型的建立　13~ 14 周 SD 雌性大鼠, 体重 260~ 280 g, 共 150 只, 中国医学科学院实验动物中心提供。用浓度为 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉。将动物固定后, 左下肢脱毛, 皮肤消毒。无菌条件下, 自胫骨结节下端起, 沿胫骨走行, 做纵行切口, 长 1 cm。切开皮肤、皮下筋膜, 剥开胫前肌, 显露胫骨。在胫骨结节下端 2 mm 处, 自胫骨

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30171169)
通讯作者: 高云　Tel: 010-6401441-2539

外侧向胫骨内侧打第一个孔, 直径为 0.8 mm, 钻透皮质深达髓腔, 但不触及对侧皮质。在该孔下沿胫骨纵轴方向依次再打 2 个孔, 每两个孔的间距为 2 mm。用生理盐水冲洗, 逐层缝合切口[2]。动物分笼饲养, 自由活动及进食, 饲料(普通鼠Ⅱ号料) 由北京实验动物研究中心提供, 其含钙 0.8% ~ 1.8%, 磷 0.6% ~ 1.2%, 维生素 A 7 000 IU/kg, 维生素 D 1 000 IU/kg。

1.2 药物制备　药材购于北京同仁堂北城药材批发中心, 阿胶烊化后制成水溶液(每 100 ml 含生药 28 g)。

1.3 动物分组、给药及取材　将大鼠随机分为正常组、模型组和阿胶组 3 组, 每组 50 只鼠。模型组和阿胶组均按上述模型制作方法打孔, 打孔术后第 2 天, 阿胶组开始灌胃给药。用药量根据人体常用剂量(20 g/70 kg), 按人/鼠表面积比率换算等效计量法计算后, 每只每次 0.45 g/2 ml, 每天 2 次。模型及正常组灌服同等容量、频率的蒸馏水。

分别于术后 4、7、14、21、28 d 无菌条件下取胫骨, 处死。共 5 批, 每批 30 只。所取胫骨为整段, 以圆孔为中心约 10 mm 长。经生理盐水冲洗后立即置于液氮中暂存。

1.4 杂交切片的制备及原位杂交　见文献[3]。

1.5 统计学方法　采用 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 各组不同时间 TGF-β_1mRNA 的表达(见表 1)

4 d 时, 阿胶组 TGF-β_1mRNA 有较高表达, 且与正常组、模型组比较差异有显著性意义($P < 0.01$ 及 0.05), 表达存在于间充质细胞、成纤维细胞及肉芽基质中。7 d 时, 阿胶组 TGF-β_1mRNA 高表达, 且与正常组、模型组比较差异有显著性意义($P < 0.01$ 及 0.05), 并在软骨细胞中有表达。14 d 时, 阿胶组 TGF-β_1mRNA 表达达到峰值, 与正常组、模型组比较差异有显著性意义($P < 0.01$ 及 0.05), 在成熟的软骨细胞、成骨细胞中有高表达。21 d 时, 新生骨表面成骨细胞中 TGF-β_1mRNA 在阿胶组和模型组中呈高表达, 两组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 与正常组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。28 d 时, 表达量很低, 阿胶组与正常组、模型组间差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

表 1　TGF-β_1mRNA 表达水平的比较

Tab. 1　Comparison of TGF-β_1mRNA expression in three groups

组别	n	TGF-β_1mRNA				
		4 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	50	0.2±0.03	0.3±0.01	0.2±0.01	0.3±0.02	0.3±0.03
模型组	50	1.2±0.07**	1.6±0.13**	2.0±0.26**	1.0±0.31*	0.4±0.25
阿胶组	50	1.8±0.15**▲	2.1±0.24**▲	2.5±0.22**▲	1.1±0.28*	0.2±0.08

注: * 与正常组比较 $P < 0.05$, ** 与正常组比较 $P < 0.01$, ▲与模型组比较 $P < 0.05$, 以下同。

2.2 各组不同时间 BMP-2mRNA 的表达(见表 2)

4 d 时, 阿胶组和模型组的 BMP-2mRNA 达到较高水平, 两组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 而与正常组比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 且表达主要存在于间充质细胞。7 d 时, 阿胶组和模型组的表达达峰值, 两组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 与正常组相比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 主要存在于早期的软骨细胞。14 d 时, 阿胶组和模型组中 BMP-2mRNA 主要在早期的成骨细胞中有高表达, 两组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 与正常组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。21 d 时, BMP-2mRNA 在成骨细胞中有表达, 表达强度已呈下降趋势, 3 组间差异均无显著性意义($P > 0.05$)。28 d 时, 表达水平很低。

表 2　BMP-2mRNA 表达水平的比较

Tab. 2　Comparison of BMP-2mRNA expression in three groups

组别	n	BMP-2mRNA				
		4 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	50	0.1±0.04	0.2±0.05	0.1±0.03	0.1±0.04	0.1±0.05
模型组	50	1.6±0.25**	2.0±0.42**	0.8±0.15*	0.2±0.06	0.2±0.08
阿胶组	50	1.7±0.18**	1.9±0.39**	1.0±0.27*	0.2±0.05	0

2.3 各组不同时间 VEGFmRNA 的表达(见表 3)

4 d 时, 阿胶组和模型组的 VEGFmRNA 表达于间

充质细胞、成纤维细胞, 表达强度较弱, 两组间差异无显著性意义, 但与正常组比较差异均有显著性意义($P<0.05$)。7 d 时, 阿胶组和模型组的 VEGFmRNA 表达达到峰值, 且与正常组比较差异均有显著性意义($P<0.01$), 在软骨细胞中有高表达, 早期的成骨细胞中有表达。14 d 时, 阿胶组和模型组在血管内皮细胞、成熟及肥大的软骨细胞、成骨细胞均有较高表达, 两组比较差异无显著性意义, 与正常组比较差异均有显著性意义($P<0.05$)。21 d 时, 主要在成骨细胞、血管内皮细胞中有表达。28 d 时, VEGFmRNA 在成骨细胞中仍有表达, 但 3 组间比较差异均无显著性意义。

表 3　**VEGFmRNA** 表达水平的比较

Tab. 3　Comparison of VEGFmRNA expression in three groups

组别	n	VEGFmRNA				
		4 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	50	0	0	0	0	0.1±0.05
模型组	50	0.4±0.13*	2.0±0.45**	1.3±0.14**	1.0±0.23*	0.4±0.16
阿胶组	50	0.5±0.19*	2.1±0.38**	1.2±0.12**	0.9±0.11*	0.4±0.18

2.4　各组不同时间 Type Ⅲ Collagen mRNA 的表达(见表 4)　4 d 时, 阿胶组和模型组 Type Ⅲ Collagen mRNA 的表达达到峰值, 表达于间充质细胞、成纤维细胞, 两组比较差异有显著性意义($P<0.05$), 且较正常组的表达均明显升高($P<0.01$)。7 d 时, 两组的表达量均下降, 组间比较差异无显著性意义, 但与正常组比较差异有显著性意义($P<0.01$)。14、21 d 时表达量极低, 3 组间差异均无显著性意义。28 d 时, 未探测到。

表 4　**Type Ⅲ Collagen mRNA** 表达水平的比较

Tab. 4　Comparison of Type Ⅲ Collagen mRNA expression in three groups

组别	n	Type Ⅲ Collagen mRNA				
		4 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	50	0.1±0.02	0	0	0.10±0.02	0
模型组	50	2.0±0.44**	1.15±0.41**	0.10±0.03	0	0
阿胶组	50	2.6±0.32**▲	1.40±0.56**	0.08±0.01	0.08±0.02	0

2.5　各组不同时间 Type Ⅱ Collagen mRNA 的表达(见表 5)　4 d 时, 阿胶组和模型组的 Type Ⅱ Collagen mRNA 在软骨细胞中有较高表达, 两组间比较差异有显著性意义($P<0.05$), 且与正常组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。7 d 时, 达到峰值, 表达于成熟软骨细胞中, 阿胶组和模型组 Type Ⅱ Collagen mRNA 的表达差异有显著性意义($P<0.05$), 与正常组比较差异均有极显著性意义($P<0.01$)。14 d 时, 表达强度下降, 阿胶组和模型组的表达均明显高于正常组($P<0.05$), 而两组之间差异无显著性意义($P>0.05$), 表达主要在软骨细胞中, 但在成骨细胞及肥大的软骨细胞中亦有表达。21 d 时, 表达量极低, 3 组间差异无显著性意义。28 d 时, 探测不到。

表 5　**Type Ⅱ Collagen mRNA** 表达水平的比较

Tab. 5　Comparison of Type Ⅱ Collagen mRNA expression in three groups

组别	n	Type Ⅱ Collagen mRNA				
		4 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	50	0.2±0.03	0.1±0.03	0.1±0.02	0.2±0.02	0.1±0.02
模型组	50	0.8±0.06*	2.0±0.05**	1.0±0.22*	0.2±0.03	0.1±0.02
阿胶组	50	1.2±0.15*▲	2.4±0.23*▲	0.8±0.15*	0.2±0.03	0.1±0.03

2.6　各组不同时间 Type Ⅰ Collagen mRNA 的表达(见表 6)　4 d 时, 3 组的 Type Ⅰ Collagen mRNA 均为低量表达, 存在于成骨细胞中, 阿胶组较模型组、正常组的表达量显著升高($P<0.05$)。7 d 时, 表达量上升, 阿胶组和模型组明显高于正常组($P<0.01$ 及 0.05), 两组间差异亦有显著性意义($P<0.05$), 在成骨细胞中有表达。14 d 时, 达到峰值, 阿胶组和模型组均明显高于正常组($P<0.01$), 两组间差异亦有显著性意义($P<0.05$), 主要表达于成骨细胞中, 但在肥大的软骨细胞中有表达。21 d 时, 几乎维持

于峰值水平, 表达于成骨细胞中, 阿胶组与模型组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 但均高于正常组($P < 0.01$)。28 d 时, 表达量下降, 表达于骨小梁表面成骨细胞中, 阿胶组和模型组均高于正常组($P < 0.05$), 两组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表 6　Type Ⅰ Collagen mRNA 表达水平的比较

Tab. 6　Comparison of Type Ⅰ Collagen mRNA expression in three groups

组别	n	Type Ⅰ Collagen mRNA				
		4 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	50	0.3±0.01	0.2±0.01	0.3±0.02	0.4±0.03	0.3±0.02
模型组	50	0.2±0.02	0.8±0.06*	2.0±0.21**	1.8±0.28**	1.0±0.23*
阿胶组	50	0.5±0.01*▲	1.2±0.24**▲	2.6±0.26**▲	2.2±0.35**	1.0±0.16*

3　讨论

本实验表明, 阿胶在骨折早、中期可明显促进 TGF-β_1mRNA 的表达。由于骨折早期 TGF-β_1 主要源于血小板, 而骨折炎性期的血小板主要源于巨核细胞, 因此推测在骨折早期阿胶可加强巨核细胞的聚集及增强其活性。断端血肿体积的相对减小, 有利于外骨膜的成骨细胞"爬过"血肿, 加速外骨痂的形成, 促进骨愈合。另一方面, TGF-β_1 又可以在骨折早、中期促进软骨细胞、成骨细胞的增殖及合成活性, 加快软骨内骨化。本实验中Ⅰ及Ⅱ型前胶原的 mRNA 表达量的增加已证明了此点。Ⅲ型前胶原 mRNA 峰值的提高, 提示阿胶促进Ⅱ型胶原的合成, 而纤维支架的建构有利于修复细胞侵入血肿。BMP-2mRNA 表达量在骨折早期无明显变化(4, 7 d 时), 提示阿胶无促进间充质细胞分化的活性。VEGFmRNA 在骨愈合过程中无明显改变, 提示阿胶在骨愈合过程中, 对血管形成无明显作用。

参考文献

1　董福慧, 郑军. 在人类基因组学基础上建构骨折治疗的基因中药谱系的设想. 中医正骨, 2000, 12(2): 45-46.

2　郑军, 董福慧. 骨内膜成骨的动物模型. 中国骨伤, 2000, 13(9): 522-523.

3　郑军, 董福慧, 程伟. 水蛭对骨愈合过程中相关基因表达的影响. 中国骨伤, 2003, 16(9): 513-515.

(收稿日期: 2004-06-03　本文编辑: 李为农)

北京市京华行科贸有限责任公司

生产研制产品报价单

京药管械经营许 20000737 号　京医械广备(字)第 200312099 号

一、牵引康复设备　(D)代表全电脑控制

1. JKF 系列多功能脊柱牵引康复床: 电脑程控, 腰椎、颈椎、全身静止、间歇牵引, 侧扳, 腰部热疗按摩。

Ⅱ型 19 800 元/台　ⅢA 型: 26 500 元/台　ⅢA(D)型: 38 000 元/台

ⅠB 型: 8 800 元/台　ⅠB(D)型: 19 800 元/台　ⅠC 型: 13 000 元/台　ⅠC(D)型: 23 900 元/台

2. FYC 系列伏卧式多功能腰椎治疗床: 屈膝伏卧位牵引、捶击、热疗一体化, 颈牵、下肢摇摆。

Ⅱ型: 9 850 元/台　ⅢA 电动型: 13 900 元/台　ⅢA(D)型: 29 000 元/台

3. JQY 系列多功能颈椎牵引治疗仪: 颈牵、电针、热疗一体化。

Ⅰ型: 5 800 元/台　Ⅰ(B)型: 12 600 元/台　Ⅰ(A)型: 8 800 元/台　ⅠC 家用型: 520 元/台

二、RLY-A 系列 BH 型中频热场针灸按摩仪

该系列产品均为电脑程控, Ⅰ型产品具有人工针灸的各种针法及按摩手法, 手法逼真、柔和、深沉, 力度等同人工。中频波渗透性强, 可调至较深层次的穴位及病灶处。Ⅲ型和Ⅳ型增设远红外线热疗、药物离子导入, 配有与人体各部位相吻合的药物模具。主治: 风湿病、腰椎间盘突出症、颈椎病、骨质增生、关节炎、急慢性扭拉伤、偏瘫肢体恢复等。

Ⅰ型: 6 000 元/台　Ⅲ型: 9 000 元/台(双功能型)　Ⅵ型: 12 000 元/台(双功能智能型)

三、其它设备

1. XN 心脑检查治疗仪　ⅢA 型 2 960 元/台　2. GZ 骨质增生药物电泳治疗仪　ⅢA 型 3 260 元/台

3. FD 风湿治疗仪　ⅢA 型 2 880 元/台　4. DJS 胆结石治疗仪　ⅢA 型 3 380 元/台

邮购办法: (1)邮局, 银行汇款均可, 款到后立即发货。(2)厂家销售, 所售产品保修壹年, 长期维修。运费保险费由我方负责。(3)面向全国常年办理邮购, 欢迎来函来电索取资料。公司地址: 北京广安门外大街 305 号八区荣丰嘉园 8 号楼 2722 号　邮编: 100055　联系人: 徐照

电话: 010-63275185, 63275186　值班电话: 010-66031777　手机: 13901040602, 13910097637　银行汇款户名: 北京市京华行科贸有限责任公司开户行: 北京建行玉泉路支行　帐号: 65100060326300017010