·基础研究·

# 活血化瘀汤对骨折早期缺氧诱导因子-1α及血管内皮生长因子影响的实验研究

张俐, 叶俊材, 陈伯仪, 王和鸣, 张安桢
(福建中医学院骨伤系, 福建　福州　350003)

摘要　目的: 探讨活血化瘀汤对骨折早期缺氧诱导因子-1α(HIF-1α) mRNA 和血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响及骨折早期缺氧反应的机制。方法: 选用雄性 SD 大鼠 72 只, 造成左胫骨中段闭合折骨标准的骨折模型, 术后采用髓内针固定。随机分成活血化瘀汤组(麻醉苏醒灌服活血化瘀汤, $n$ = 36)和生理盐水组(麻醉苏醒灌服等量生理盐水, $n$ = 36), 分别于灌胃后 1、2、3、5、7、14 d 处死大鼠, 取包括骨折端在内骨折上下各 0.5 cm 的骨质。应用 TR-PCR 技术, 动态观察 HIF-1α mRNA 及 VEGF 表达的变化。结果: 在骨折后 2 d, 骨折端 HIF-1α mRNA 表达达到高峰; 活血化瘀汤组用药后 1 d 及 2 d, 骨折端 HIF-1α mRNA 表达比生理盐水组显著性降低($P$ < 0.01); 用药后 3、5、7、14 d VEGF 的表达活血化瘀汤组比生理盐水组显著性升高($P$ < 0.01); 正常对照组对应组织则不能检测到两者的表达。结论: 左胫骨中段闭合骨折引起 HIF-1α mRNA 及 VEGF 基因转录和表达发生改变。活血化瘀汤能调控 HIF-1α 和 VEGF 的表达。

关键词　活血化瘀汤;　骨折愈合;　缺氧诱导因子-1α mRNA;　血管内皮生长因子

**Experimental research on the influence of Huoxue Huayu decoction(活血化瘀汤) to HIF-1α mRNA and VEGF expression during early fracture healing**

*ZHANG Li, YE Jun-cai, CHEN Bo-yi, WANG He-ming, ZHANG An-zhen. Department of Orthopaedics and Traumatology of Fujian University of TCM, Fujian Fuzhou, 350003, China*

**Abstract**　**Objective:** To explore the expression of hypoxic inductive factor-1α mRNA (HIF-1α mRNA) and vascular endothelial growth factor (VEGF) during early fracture healing of rats with Huoxue Huayu decoction(HXHYD, 活血化瘀汤). **Methods:** Sprague-Dawley rats($n$ = 72) were caused standardized closed left tibial fracture under isoflurane-anesthetize with a modified technique. 36 rats were treated with HXHYD after fracture. The other 36 rats without medicine served as controls. Fractured sides were determined with HIF-1α mRNA and VEGF expression on 1, 2, 3, 5, 7 and 14 d. Three normal rats without any medicine served as normal controls. **Results:** The expression of HIF-1α mRNA was increased significantly on the fracture sides 2 days after fracture but decreased significantly after treatment with HXHYD on 1, 2 d($P$ < 0.01). In the same time, the expression of VEGF was increased significantly after treatment by HXHYD on 3, 5, 7 and 14 d($P$ < 0.05). The expression of HIF-1α mRNA and VEGF were not detected in normal control group. **Conclusion:** This study has confirmed that fracture leads to microcirculation failure in both fracture sides and related skeletal muscle. HXHYD can improve blood nutrition on fractured sides during early fracture healing via the balance of HIF-1α mRNA and VEGF expression.

**Key words**　Huoxue Huayu decoction;　Fracture healing;　Hypoxic inductive factor-1α mRNA;　Vascular endothelial growth factor

活血化瘀法是骨折早期的重要治法, 能改善血液流变学的性质, 减轻血液浓、粘、凝集的程度, 促进血管再生。实验表明, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是影响血管再生的重要生长因子, VEGF 的表达受缺氧诱导产生的缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)的调节[1]。然而活血化瘀是

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(编号: 03063)
福建省国际合作科技重点项目(编号: 20021025)
福建省教育厅科学技术重点项目(编号: JA02228)
通讯作者: 张俐　Tel: 13178119990　E-mail: sj001@mailcity.com

否通过改善血液流变学, 改善局部缺氧环境调节 VEGF 表达的机制尚不清楚, 本实验拟通过活血化瘀汤对骨折早期 HIF-1α mRNA 和 VEGF 表达的影响, 探讨活血化瘀汤改善骨折早期缺氧反应的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 造模动物** 3 月龄雄性 SD 大鼠 75 只, 体重(280±20) g, 由上海中科院提供(批准证号: 医动字第 02-492 号)。普通饲料喂养, 动物室温度(25±2) ℃。

**1.2 骨折模型的建立与分组** 全部动物用氯胺酮 0.1 g·kg$^{-1}$, 加地西泮 5 mg·kg$^{-1}$腹腔注射麻醉。右下肢用脱毛膏脱毛, 在胫骨粗隆下位置闭合折骨, 消毒无菌操作, 用 1 mm 直径的克氏针从胫骨近端至远端髓内固定, 针尾埋于皮下。双盲随机分为活血化瘀汤组(36 只)、生理盐水组(36 只)。活血化瘀汤组在麻醉苏醒开始灌服活血化瘀汤, 按人剂量与大鼠剂量之间的换算方法, 加工制成生药含量每克生药 1 ml汤药, 即 1 g/ml, 骨折造模成功后分 2 次予以服用; 生理盐水组灌服等体积生理盐水; 正常对照组 3 只。活血化瘀汤组和生理盐水组分别在 1、2、3、5、7、14 d 各处死 6 只, 在无菌操作下快速取下骨折区组织, 液氮保存。

**1.3 仪器与试剂** DU650 紫外分光光度计(美国 BECKMAN); 9600 基因扩增仪(美国 PE 生物系统公司); GEL DOC 2000 凝胶成像系统(美国 BIORAD); MILLI-Q Biocel 超纯水装置(美国 MILLIPORE); 64R 低温高速离心机(美国 BECKMAN); TRIZOL 试剂(华美); Taq 酶(上海生工); 反转录酶(上海生工); 引物根据文献[2,3]由上海生工合成。活血化瘀汤由屏山药厂协作制备。

**1.4 半定量 RT-PCR 检测 VEGF mRNA**

**1.4.1 总 RNA 的提取** 将 0.1 g 的组织块放入经 -80 ℃预冷的研钵内, 加 TRIZOL 1ml, 研磨, 按试剂说明书提取组织 RNA, 最后加 50 μl DEPC 水溶解, 60 倍稀释后, 紫外分光光度计测其 A260 和 A280 数值, 计算出所提取 RNA 的浓度及纯度。

**1.4.2 逆转录(RT)** 取 1 μg RNA, 加入 oligo(dT)$_{18}$ 0.5 μg, DEPC 水补足至 11 μl, 70 ℃反应 5 min; 依次加入 5× RT buffer 4 μl、10 mM dNTP mix 2 μl, rRNasin 20 U, DEPC 水补足至 19 μl, 37 ℃反应 5 min; 随即加入反转录酶(MMLV) 200 U, 42 ℃反应 60 min; 最后 70 ℃终止反应10 min, 80 ℃保存 cDNA 备用。

**1.4.3 聚合酶链式反应(PCR)** 上述反应得到的 cDNA 分别进行 VEGF、HIF-1α 和 β-actin 基因扩增, 扩增体系为 2.5 μl: 10× PCR buffer 2.5 μl, 10 mM dNTP mix 0.5 μl, 25 pmol β-actin 上下游引物各 0.2 μl, VEGF 上下游引物各 0.4 μl, 2.5 U/μl Taq 酶 0.5 μl, cDNA 2.0 μl, DEPC 水补足至 25 μl。扩增条件如下: 94 ℃预变性 4 min; 94 ℃ 30 秒, 62 ℃ 30 秒, 72 ℃ 30 秒, 共 35 个循环, 72 ℃延伸 10 min。引物序列: VEGF sense 5′-TGC ACC CAC GAC AGA AGG GGA-3′, VEGF antisense 5′-TCA CCG CCT TGG CTT GTC ACA T-3′; HIF-1α sense 5′-GTG GAT ATG TCT GGG TTG AG-3′, HIF-1α antisense 5′-ATT CTT CGC TTC TGT GTC TT-3′; β-actin sense 5′-CCC ATT GAA CAC GGC ATT-3′, β-actin antisense 5′-GGT ACG ACC AGA GGC ATA CA-3′。VEGF 产物包括 $VEGF_{120}$-360 bp, $VEGF_{164}$-492 bp; HIF-1α 产物为 706 bp。

取 5 μl PCR 产物在含有 1.5% 琼脂糖的 0.5× TBE 缓冲液中电泳, 电压控制在 100 V, 时间控制在 30~40 min。用 Gel Doc 2000 型凝胶图像分析系统拍照, Gelworks ID Intermidiate 软件定量分析 $VEGF_{120}$、$VEGF_{164}$表达量之和与 β-actin 表达量的比值及 HIF-1α 与 β-actin 表达量的比值。

**1.5 统计分析** 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 使用 SPSS 12.0 Independent-Samples T Test 统计分析, 显著性标准为 $P<0.05$。

## 2 结果

**2.1 活血化瘀汤对骨折早期 HIF-1α mRNA 表达的影响** 见表 1, 骨折后 2 d HIF-1α mRNA 表达量达到峰值, 14 d 后及正常组 HIF-1α mRNA 表达量均低于检测水平(表 1 未列出); 给药 1、2 d 后活血化瘀汤组 HIF-1α mRNA 的表达量显著低于生理盐水组, 3 d 后 HIF-1α mRNA 表达水平明显下降, 并且活血化瘀汤组与生理盐水组之间差异无显著性。

表 1 骨折后骨折区组织 **HIF-1α mRNA** 的表达($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

**Tab.1 HIF-1α mRNA expression in the fracture area after fracture**($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

| 时间(d) Times(d) | 活血化瘀组 Huoxue Huayu group | 生理盐水组 Saline group |
|---|---|---|
| 1 | 1.325±0.177* | 1.569±0.090 |
| 2 | 1.488±0.216* | 1.804±0.233 |
| 3 | 1.085±0.120 | 1.231±0.219 |
| 5 | 0.774±0.144 | 0.671±0.101 |
| 7 | 0.336±0.133 | 0.459±0.115 |

注: 两组比较, * $P<0.05$

Note: Comparison between two groups, * $P<0.05$

**2.2** 活血化瘀汤对骨折早期 VEGF mRNA 表达的影响　见表 2, VEGF mRNA 表达在骨折 24 h 表达开始增强; 活血化瘀汤组 1、2 d VEGF 表达与生理盐水组差异无显著性, 3、5、7、14 d 活血化瘀汤组表达较生理盐水组强; 5、7 d VEGF 表达到峰值。

表 **2**　骨折后骨折区组织 **VEGF mRNA** 的表达( $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

**Tab. 2　VEGF mRNA expression in the fracture area after fracture**( $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

| 时间(d) Times(d) | 活血化瘀组 HuoXueHuaYu group | 生理盐水组 Saline group |
|---|---|---|
| 1 | 0.494±0.101 | 0.523±0.132 |
| 2 | 0.669±0.154 | 0.765±0.191 |
| 3 | 0.913±0.177* | 1.112±0.218 |
| 5 | 1.603±0.166* | 1.284±0.014 |
| 7 | 1.723±0.125* | 1.357±0.072 |
| 14 | 1.435±0.233* | 1.121±0.062 |

注: 两组比较, * $P<0.05$

Note: Comparison between two groups, * $P<0.05$

## 3　讨论

骨折的愈合是一个非常复杂的病理过程。骨折局部的微环境, 如氧饱和度、酸碱度、细胞因子等非常重要, 直接影响血管的形成, 骨系细胞的增殖分化, 矿物质的沉积。

骨折必定复合血管的断裂、栓塞, 并且引起局部和全身血液流变学的改变, 血粘度增高[4], 局部微循环血流减缓, 组织氧饱和度下降。这一病理过程对骨折愈合的意义具有双重性, 它对组织细胞的代谢、增殖、分化不利, 但一定程度的缺氧却可以启动机体对缺氧的代偿性反应, 细胞内许多基因的转录和表达发生改变, 如编码血管内皮生长因子(VEGF)、红细胞生成素(EPO)、酪氨酸羟化酶及参与糖酵解的许多酶的基因等, 这些基因被称为缺氧反应基因(hypoxia responsive genes, HRG)。目前研究表明[5]这一反应和 HIF-1 有关, HIF-1 是细胞在缺氧条件产生的核蛋白, 它与靶基因结合, 促进其转录, 使机体产生一系列缺氧适应反应。HIF-1 有两个亚基, HIF-1α 和 HIF-1β, 只有两者形成二聚体后才具备活性, HIF-1α 蛋白表达是其活性的主要决定因素[6]。

活血化瘀中药可改善骨折愈合早期局部和全身的血液循环, 改善局部血氧状况, 为骨折的愈合创造良好的内环境早已有认识。但机体是否因此影响其局部的良性的调节机制, 尚未被关注。

本实验结果显示, 在骨折愈合的不同时间, 骨痂中 HIF-1α 和 VEGF 的表达强弱不同, 并且活血化瘀汤对其表达的影响也不同。骨折后血管的损伤, 血供骤然中断, 组织细胞缺氧诱导多种细胞 HIF-1α 的表达[7], 同时在 HIF 的调节下, VEGF 的表达增高。由于活血化瘀汤改善微循环, 改善局部血氧, 因此, 研究显示仅骨折后第 2、3 天活血化瘀汤组 HIF-1α 和 VEGF 的表达均较生理盐水组量低, 这符合在缺氧环境下 HIF-1α 对 VEGF 的调节。第 4 天后, 随着组织水肿的消退, 炎性介质的清除、部分受损血管的再通、血流变的改善, 血氧得到提高, HIF-1α 表达下降, 2 周后 HIF-1α 达到正常组织极低表达水平。在这期间活血化瘀汤组和生理盐水组之间 HIF-1α 无明显差异。

骨折后 2 d HIF-1α 表达量达到峰值, 2 周后及正常组 HIF-1α 表达量低于检测水平; 第 2、3、4 天活血化瘀汤组 HIF-1α 的表达量显著低于生理盐水组, 第 6 天、第 8 天 HIF-1α 表达水平明显下降, 并且活血化瘀汤组与生理盐水组之间差异无显著性。VEGF 的表达在 HIF-1α 表达到峰值后继续增高, 到第 6、8 天达到峰值, 并且 5、7、14 d 活血化瘀汤组比生理盐水组表达量显著增高, 说明 VEGF 表达并非仅仅受 HIF-1α mRNA 表达的影响, 可能与其他内环境的改善密切相关。有报道缺氧对 HIF-1α 的调节是在转录后水平[8], 我们仅在转录水平进行研究, 其在转录后或翻译后的相关机制还有待于进一步研究。

参考文献


1 Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, et al. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. Plast Reconstr Surg, 1999, 104(3): 738-747.

2 Pufe T, Wildemann B, Petersen W. Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: A study in the rat. Cell Tissue Res, 2002, 309(3): 387-392.

3 Marfella R, D′Amico M, Filippo CD, et al. Myocardial infarction in diabetic rats: Role of hyperglycaemia on infarct size and early expression of hypoxia-inducible factor 1. Diabetologia, 2002, 45(8): 1172-1181.

4 张俐. 针灸对骨折家兔血液流变学的影响. 中国中医骨伤科, 1997, 5(6): 1.

5 Damert A, Ikeda E, Risau W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in $C_6$ glioma cells. Biochem J, 1997, 327: 419-423.

6 Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. J Lab Clia Med, 1998, 131(3): 207-214.

7 Wiener CM, Booth G, Semenza GL. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor-1. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 225: 485-488.

8 Huang LE, Aramy I, Livingston DM, et al. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. J Biol Chem, 1996, 271: 32253-32259.


(收稿日期: 2004-08-26　本文编辑: 李为农)