

· 基础研究 ·

# 中医骨折三期治疗对家兔骨折骨膜组织中 VEGF 及 VEGF mRNA 表达的影响

徐颖鹏<sup>1</sup>, 温建民<sup>2</sup>, 董建文<sup>3</sup>, 潘贵超<sup>2</sup>, 孙永生<sup>2</sup>, 桑志成<sup>2</sup>, 胡海威<sup>2</sup>, 成永忠<sup>2</sup>

(1.中国中医科学院广安门医院骨科,北京 100053;2.中国中医科学院望京医院骨科;3.山东中医药大学附属医院骨科)

**【摘要】目的:** 研究中医骨折三期治则对家兔桡骨骨折愈合过程中内外骨膜及骨髓组织 VEGF 及 VEGF mRNA 表达的影响,探讨中药治疗骨折的分期治疗的合理性。**方法:** 140 只雄性新西兰白兔,无菌状态下手术,在家兔双侧桡骨下 1/3 段,造成 3 mm 完全骨质缺损的骨折愈合模型。采用计算机产生随机数字的方法,将家兔随机均分为 4 组:中药三期治疗组、中药一期治疗组、阳性药物对照组以及模型对照组,分别给予三期治疗、一期治疗、阳性药物治疗以及等量蒸馏水。于术后 3、6、9、14、28、42、56 d 每组随机处死 5 只家兔,取左侧桡骨标本作为观察对象,采用免疫组化和原位杂交方法检查外骨膜、内骨膜和骨髓组织中 VEGF 及 VEGF mRNA 表达,通过图像分析测量各种组织中 VEGF 及 VEGF mRNA 表达强度。**结果:** 各中药治疗组对于术后骨折端外骨膜、内骨膜和骨髓组织 VEGF 和 VEGF mRNA 表达均有促进作用,三期治疗组有高于其他三组的趋势( $P<0.05$ )。**结论:** 中药分期治疗对骨折愈合过程中外骨膜、内骨膜和骨髓组织 VEGF 及 VEGF mRNA 表达的促进作用更加明显,骨折分期治疗是必要的。

**【关键词】** 骨折; 血管内皮生长因子类; 原位杂交; 免疫组化; 兔

**DOI:** 10.3969/j.issn.1003-0034.2010.02.014

**Effects on VEGF and VEGF mRNA expression of the tissues of periosteum in three-period treatment of TCM for the fractures in rabbit** XU Ying-peng, WEN Jian-min\*, DONG Jian-wen, PAN Gui-chao, SUN Yong-sheng, SANG Zhi-cheng, HU Hai-wei, CHENG Yong-zhong. \*Orthopaedic Department of Wangjing Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine Science, Beijing 100102, China

**ABSTRACT Objective:** To observe the effects of the three-period treatment theory of bone fracture in TCM (Traditional Chinese Medicine) on VEGF and VEGF mRNA expression in the tissues of outer periosteum, endosteum and bone marrow of rabbits, and to explore the rationality of phasing method in TCM in treating fracture. **Methods:** 3 mm bone defect were made at lower one third part of both radius in 140 male healthy rabbits. The rabbits were randomly divided into four groups, including three-period treatment group (TTG), one-period treatment group (OTG), positive medicine treatment group (PTG) and model control group (MCG). The rabbits in TTG were treated with three-period treatment, rabbits in OTG were treated with one-period treatment, rabbits in PTG were fed by *Guzhe-Cuoshangsan* (a Chinese patent medicine which was used to treat bone fracture), rabbits in model control group were given no prescription or drug but distilled water as same dose as that of other groups. At day 3, 6, 9, 14, 28, 42 and 56, five rabbits from every group were randomly selected and were killed by aeroembolism. The left radiuses were taken out as the research object. Immunohistochemistry stain and in situ hybridization stain were performed to examine the VEGF and VEGF mRNA expression in the outer periosteum, endosteum and bone marrow. **Results:** The VEGF and VEGF mRNA expression of all TCM treatment groups were enhanced in the outer periosteum, endosteum and bone marrow at different time points in fracture healing. The VEGF and VEGF mRNA expression in the three tissues of TTG had the tendency of higher than that of the other groups at the most time points after operation. **Conclusion:** Treating fracture in stages has more predominant effect on the expression of VEGF and VEGF mRNA in the outer periosteum, endosteum and bone marrow than that of treating fracture with single prescription or drug.

**Key words** Fractures; Vascular endothelial growth factors; In situ hybridization; Immunohistochemistry; Rabbits

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(2): 120-124 www.zggszz.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30672704)

通讯作者:温建民 E-mail:wjm5734@263.net

骨折三期治则是中医骨折内治法的指导原则,既往研究发现,骨折端的血液供应对于骨折愈合具有重要意义。VEGF 是目前公认最强的促血管形成

因子,是促血管再生的最终通道。中药分期与不分期治疗均能促进骨折愈合,中药治疗能显著促进骨折愈合过程中 FGF-2 的表达,三期治疗明显强于一期治疗<sup>[1]</sup>。三期治疗组在骨折愈合的大部分时间点组织学评分及 X 线评分最高,骨折端血肿、纤维骨痂和软骨骨痂 3 种骨痂组织中 VEGF 及 VEGF mRNA 表达也有高于其他 3 组的趋势<sup>[2]</sup>。骨折三期治疗对外骨膜、内骨膜和骨髓组织 VEGF 及 VEGF mRNA 表达是否也有类似的影响?进一步的实验将说明这一问题。

## 1 材料与方法

**1.1 实验设计** 动物实验采用具有一个重复测量双因素析因设计方案。

**1.2 动物实验** 新西兰白兔 140 只,健康、雄性,体重(2.0±0.5) kg,由吉林大学基础医学院实验动物中心提供,实验动物生产许可证编号:SCXK(吉)2003-0001。动物实验在吉林大学基础医学院实验动物中心进行,许可证编号:SYXK(吉)2003-0001。原位杂交检查和免疫组化检查在吉林大学基础医学院病理生物学实验室完成。

**1.3 实验用药** 本实验所用中药均由长春市玉顺堂医药公司提供,中药方剂由长春中医学院附属医院制剂室制成含生药 5 g/ml 的浓缩口服液,灭菌后装瓶冷藏备用。阳性对照药采用哈尔滨华雨制药有限公司生产的骨折挫伤胶囊,批准文号:国药准字 Z23020323,规格:0.29 g×30 粒,批号:20050807。

**1.4 主要实验试剂** 戊巴比妥钠,北京市化学试剂公司提供;焦碳酸二乙酯(DEPC),美国 Promega 公司生产,天津市灏洋生物制品科技有限责任公司分装;VEGF(mRNA) ISH DIG KIT,探针合成序列:5'-CCAGA GGCAC GCAGG AAGGC TTGAA TATGT ACT,天津市灏洋生物制品科技有限责任公司提供;VEGF 免疫组化 S-P 试剂盒,福州迈新生物技术开发有限公司;DAB 显色试剂盒,福州迈新生物技术开发有限公司;复合消化液(T/P/E)Ph 6.4,天津灏洋生物技术有限公司。

**1.5 建立骨折模型** 所有家兔经适应性饲养 1 周后开始实验。于家兔双耳内侧用记号笔顺序编号,双上肢常规脱毛。用 0.3%戊巴比妥钠按 30 mg/kg 体重,耳缘静脉注射麻醉。无菌施术,于桡骨中下 1/3 处纵行切开皮肤及皮下组织,暴露桡骨中下 1/3 部位。在旋前圆肌肌止远端切开骨膜,用特制骨锯造成 3 mm 完全骨质缺损。不作任何固定,生理盐水冲洗切口,逐层缝合切口,对侧桡骨相同处理。术后分笼饲养,常规饲料及饮水。术后肌肉注射青霉素预防感

染,每次 40 万 U,每天 1 次,连续 3 d。

**1.6 随机分组** 用 SPSS 13.0 软件产生随机数字的方法将 140 只手术后的家兔随机分为 4 个实验组,每组 35 只。分别为中药三期治疗组(简称三期组)、中药一期治疗组(一期组)、模型对照组(模型组)和阳性药物对照组(阳性药组),每组随机分为 7 个小组,每小组 5 只家兔。

## 1.7 干预方法

**1.7.1 骨折愈合分期** 根据中医骨折三期治则及家兔桡骨中下段骨折愈合的组织学变化,将骨折愈合过程分为三期:早期为术后 1~7 d,相当于血肿机化演进期;中期为术后 8~28 d,相当于原始骨痂形成期;后期为术后 29 d 以后,相当于改造塑形期<sup>[2]</sup>。

**1.7.2 给药方法** 三期组按照中医骨折三期治疗原则,早期给予肢伤一方,中期给予肢伤二方,后期给予肢伤三方<sup>[3-4]</sup>。肢伤一方:桃仁 10 g、红花 6g、当归 12 g、赤芍 12 g、川芎 12 g、防风 10 g、川萆薢 12 g、枳壳 10 g、乳香 5 g、生地黄 12 g、生甘草 6 g;肢伤二方:当归 12 g、赤芍 12 g、续断 12 g、威灵仙 12 g、生薏仁 30 g、桑寄生 30 g、骨碎补 12 g、五加皮 12 g;肢伤三方:当归 12 g、赤芍 12 g、续断 12 g、威灵仙 12 g、天花粉 12 g、骨碎补 12 g、川木瓜 12 g、黄芪 15 g、熟地黄 15 g、煅自然铜 10 g(先煎)、土鳖 10 g。一期组将骨折愈合过程不分期,给予肢伤一方、二方与三方的综合加减方(一期方)<sup>[1]</sup>:红花 10 g、当归 12 g、赤芍 12 g、枳壳 10 g、续断 12 g、骨碎补 12 g、煅自然铜(先煎)10 g、狗脊 10 g、生黄芪 15 g、熟地黄 15 g、淮山药 12 g、山萸肉 12 g、茯苓 12 g、泽泻 12 g、炙甘草 6 g。阳性药组将骨折愈合过程不分期,给予哈尔滨华雨制药有限公司生产的骨折挫伤胶囊水溶液。各组给药剂量为家兔对人等效剂量的 2 倍,每日 2 次灌胃。按等效量计算公式<sup>[5]</sup>计算(人体体重按照 60 kg 计算)。模型组给予等量蒸馏水灌胃。

**1.7.3 观察指标与方法** 术后第 3、6、9、14、28、42、56 天每个实验组随机抽取一小组家兔用空气栓塞法处死。取左侧桡骨标本为研究对象,经固定、脱钙、包埋等程序后制成 6 μm 的切片,按试剂说明书进行免疫组化和原位杂交染色。观察骨折愈合不同时间点外骨膜、内骨膜和骨髓组织中 VEGF 及 VEGF mRNA 表达情况。

**1.8 结果判断** 细胞浆被染成棕黄色为 VEGF 表达阳性,未显棕色为阴性。

**1.9 图像分析** 采用显微图像采集系统对免疫组化及原位杂交切片骨折断端附近的外骨膜、内骨膜和骨髓组织各取两个高倍镜视野,并用 ImagePro

plus 5.0 图像分析软件对这些组织中的阳性表达细胞的平均光密度值(MOD)进行测定。

**1.10 统计分析** 用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行统计分析。采用一般线性模型的重复测量过程对骨折愈合过程中每种组织 MOD 值组间差异进行比较,并对每个时间点组间差异进行比较。结果采用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,检验水准: $\alpha=0.05$ 。

**2 结果**

**2.1 骨折愈合不同时间点各组标本骨外膜 VEGF 表达及 VEGF mRNA 表达** 测定结果见表 1。

从骨折后 6 d 开始,骨外膜开始增厚,骨外膜内层的骨原细胞增生肥厚,逐渐形成骨样组织和软骨。骨外膜 VEGF 表达区域主要集中在骨膜间充质细胞、血管内皮细胞、成骨细胞和骨皮质表面的破骨细胞上。免疫组化染色结果显示 3 个中药治疗组术后大部分时间 VEGF 表达均高于模型组,三期组大部分时间点 VEGF 表达有高于其他 3 组的趋势。3 个中药治疗组平均 VEGF 表达强度均高于模型组,三期组最高。原位杂交结果显示 3 个中药治疗组在术后大部分时间点 VEGF mRNA 表达均有高于阳性药组的趋势。3 个中药治疗组平均 VEGF mRNA 表达强度均高于模型组,三期组最高。

**2.2 骨折愈合不同时间点各组标本骨内膜 VEGF 表达及 VEGF mRNA 表达** 测定结果见表 2。

术后 3 d 即可见到骨内膜增厚,最早在术后 6 d,骨内膜已有少量类骨组织形成,并且迅速增长,在术后 9 d 已有部分标本骨髓腔内充满新生骨小梁,说明骨内膜在骨折愈合中具有显著的作用。在骨内膜的成纤维细胞、间充质细胞、成骨细胞以及炎细胞中均可见到 VEGF 阳性表达。免疫组化结果显示 3 个中药治疗组在术后大部分时间点 VEGF 表达均高于模型组,三期组平均 VEGF 表达强度显著高于其他 3 组,模型组最低。原位杂交结果显示 3 个中药治疗组在术后大部分时间点 VEGF mRNA 表达均有高于模型组的趋势,3 个中药治疗组平均 VEGF mRNA 表达强度均高于模型组,三期组强度最高。

**2.3 骨折愈合不同时间点各组标本骨髓腔 VEGF 表达及 VEGF mRNA 表达** 测定结果见表 3。

骨髓具有诱导成骨的能力,1934 年 Megaw 和 Harbin 最先证实骨髓有成骨活性,骨髓是惟一含有丰富的决定性和诱导性骨先质细胞的组织<sup>[6]</sup>。骨髓组织中 VEGF 阳性表达主要在骨髓血管内皮、间充质细胞、网状纤维以及炎细胞等组织。免疫组化结果显示 3 个中药治疗组在术后大部分时间点 VEGF 表

表 1 骨折愈合不同时间点各组标本骨外膜 VEGF 及 VEGF mRNA 表达(MOD,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

Tab.1 The VEGF and VEGF mRNA expression in outer periosteum of every group at different time points during fracture healing (MOD,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

	模型组		一期组		三期组		阳性药组	
	VEGF	VEGFmRNA	VEGF	VEGFmRNA	VEGF	VEGFmRNA	VEGF	VEGFmRNA
3 d	0.071 5±	0.071 9±	0.075 4±	0.078 2±	0.066 6±	0.069 1±	0.072 8±	0.078 1±
	0.016 9	0.015 3	0.006 1*	0.012 5	0.011 3	0.007 3	0.009 5	0.017 1*
6 d	0.063 2±	0.064 5±	0.063 3±	0.063 1±	0.071 6±	0.065 6±	0.066 3±	0.067 9±
	0.009 8	0.007 4	0.006 6	0.010 8	0.005 9*△	0.008 5	0.004 8	0.002 8
9 d	0.068 2±	0.068 2±	0.061 8±	0.067 2±	0.066 8±	0.070 1±	0.068 8±	0.068 6±
	0.008 0	0.005 1	0.007 2	0.005 5	0.005 9	0.005 2	0.006 4△	0.004 7
14 d	0.056 4±	0.055 9±	0.061 0±	0.064 2±	0.067 7±	0.066 4±	0.065 4±	0.069 7±
	0.004 5	0.004 5	0.006 0	0.002 5*	0.007 5**	0.005 4*	0.009 2*	0.006 7**
28 d	0.057 6±	0.063 7±	0.063 2±	0.066 3±	0.067 6±	0.067 7±	0.062 9±	0.065 8±
	0.005 7	0.004 9	0.005 1	0.007 7	0.007 5**	0.006 6	0.003 7	0.006 3
42 d	0.059 2±	0.064 4±	0.065 3±	0.064 1±	0.067 0±	0.076 4±	0.061 9±	0.065 2±
	0.007 5	0.009 1	0.005 2	0.006 2	0.008 6*	0.008 4***△△◇◇	0.009 1	0.006 8
56 d	0.059 5±	0.063 8±	0.064 6±	0.067 3±	0.060 2±	0.068 3±	0.062 1±	0.055 5±
	0.005 4	0.009 6	0.005 3	0.005 4	0.003 6	0.010 2◇	0.006 6	0.005 8
均值	0.061 4±	0.064 1±	0.064 6±	0.066 7±	0.066 7±	0.069 1±	0.065 9±	0.068 7±
	0.009 4	0.009 0	0.006 9*	0.008 3	0.007 5**	0.007 9**	0.007 7	0.010 1

注:与模型组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与一期组相比,△ $P<0.05$ ,△△ $P<0.01$ ;与三期组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与阳性药组相比,◇ $P<0.05$ ,◇◇ $P<0.01$

Note:Compared with model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;Compared with one-period group, △ $P<0.05$ , △△ $P<0.01$ ;Compared with three-period group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; Compared with positive medicine group, ◇ $P<0.05$ , ◇◇ $P<0.01$

表 2 骨折愈合不同时间点各组标本骨内膜 VEGF 及 VEGF mRNA 表达 (MOD,  $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab.2 The VEGF and VEGF mRNA expression in endosteum of bone of every group at different time points during fracture healing (MOD,  $\bar{x} \pm s, n=5$ )

	模型组		一期组		三期组		阳性药组	
	VEGF	VEGFmRNA	VEGF	VEGFmRNA	VEGF	VEGFmRNA	VEGF	VEGFmRNA
3 d	0.066 1±	0.077 5±	0.073 1±	0.069 5±	0.078 9±	0.081 3±	0.071 4±	0.078 8±
	0.006 9	0.006 6	0.010 6	0.005 9	0.025 9**	0.023 3 <sup>△</sup>	0.008 5	0.005 8 <sup>△</sup>
6 d	0.064 1±	0.067 5±	0.065 7±	0.065 4±	0.082 3±	0.073 8±	0.064 9±	0.063 4±
	0.010 5	0.011 3	0.003 5	0.004 1	0.007 6** <sup>△△◇◇</sup>	0.005 5 <sup>◇</sup>	0.004 8	0.003 4
9 d	0.070 3±	0.066 4±	0.066 0±	0.073 0±	0.075 3±	0.071 9±	0.069 4±	0.075 2±
	0.005 1	0.007 2	0.004 0	0.006 1	0.008 5 <sup>△</sup>	0.007 9	0.007 2	0.004 8*
14 d	0.055 0±	0.068 9±	0.066 9±	0.070 2±	0.074 9±	0.076 6±	0.070 2±	0.073 0±
	0.002 2	0.004 5	0.007 8**	0.007 4	0.006 4** <sup>△</sup>	0.007 7	0.005 6**	0.004 5
28 d	0.062 5±	0.072 6±	0.072 4±	0.077 8±	0.074 5±	0.071 1±	0.076 5±	0.078 1±
	0.005 2	0.009 6	0.009 2*	0.010 7	0.009 6**	0.007 4	0.011 1**	0.012 3
42 d	0.066 0±	0.070 4±	0.069 9±	0.072 5±	0.068 8±	0.074 4±	0.067 7±	0.074 4±
	0.004 8	0.005 9	0.004 7	0.005 1	0.008 1	0.008 6	0.007 2	0.004 3
56 d	0.066 0±	0.069 5±	0.074 2±	0.076 1±	0.066 9±	0.068 8±	0.069 2±	0.072 1±
	0.007 2	0.010 1	0.006 3*	0.006 0*	0.005 1	0.006 1	0.007 0	0.006 5
均值	0.064 1±	0.070 1±	0.069 6±	0.072 4±	0.074 4±	0.073 5±	0.070 1±	0.074 3±
	0.007 6	0.008 4	0.007 0**	0.007 3	0.011 5** <sup>△△◇◇</sup>	0.010 2*	0.008 1**	0.008 3*

注:与模型组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01;与一期组相比, <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01;与三期组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01;与阳性药组相比, <sup>◇</sup>P<0.05, <sup>◇◇</sup>P<0.01

Note: Compared with model group, \*P<0.05, \*\*P<0.01; Compared with one-period group, <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01; Compared with three-period group, \*P<0.05, \*\*P<0.01; Compared with positive medicine group, <sup>◇</sup>P<0.05, <sup>◇◇</sup>P<0.01

表 3 骨折愈合不同时间点各组标本骨髓腔 VEGF 及 VEGF mRNA 表达 (MOD,  $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab.3 The VEGF and VEGF mRNA expression in bone marrow of every group at different time points during fracture healing (MOD,  $\bar{x} \pm s, n=5$ )

	模型组		一期组		三期组		阳性药组	
	VEGF	VEGFmRNA	VEGF	VEGFmRNA	VEGF	VEGFmRNA	VEGF	VEGFmRNA
3 d	0.071 6±	0.075 3±	0.080 0±	0.072 2±	0.074 2±	0.078 8±	0.074 9±	0.079 6±
	0.008 4	0.005 3	0.007 6*	0.006 2	0.012 7	0.008 9	0.009 5	0.011 3 <sup>△</sup>
6 d	0.072 7±	0.071 9±	0.075 6±	0.072 8±	0.080 9±	0.078 2±	0.068 4±	0.072 0±
	0.011 1	0.009 4	0.009 1 <sup>◇</sup>	0.003 5	0.007 4** <sup>◇◇</sup>	0.003 6	0.010 1	0.002 5
9 d	0.072 3±	0.068 3±	0.067 8±	0.071 4±	0.078 8±	0.075 1±	0.073 3±	0.075 5±
	0.006 7	0.005 5	0.006 2	0.007 4	0.007 2 <sup>△△</sup>	0.005 0*	0.009 0	0.002 0*
14 d	0.073 5±	0.076 8±	0.069 3±	0.069 9±	0.074 4±	0.075 2±	0.072 4±	0.072 4±
	0.008 8	0.005 9	0.005 7	0.006 0	0.006 8	0.003 2	0.005 9	0.006 8
28 d	0.060 1±	0.066 8±	0.068 6±	0.070 5±	0.071 5±	0.068 4±	0.075 7±	0.071 9±
	0.005 8	0.005 6	0.010 1*	0.004 9	0.004 6** <sup>△</sup>	0.004 3	0.006 4**	0.006 3
42 d	0.065 2±	0.065 6±	0.065 4±	0.070 4±	0.068 8±	0.075 4±	0.065 6±	0.070 4±
	0.002 4	0.007 9	0.008 7	0.006 3	0.008 0	0.005 0**	0.004 1	0.008 5
56 d	0.065 2±	0.068 3±	0.069 7±	0.078 1±	0.063 9±	0.070 8±	0.066 4±	0.072 7±
	0.005 1	0.005 0	0.003 2	0.007 3*** <sup>△</sup>	0.002 9	0.009 2	0.004 5	0.005 2
均值	0.065 1±	0.070 3±	0.070 3±	0.072 6±	0.073 1±	0.074 1±	0.071 2±	0.073 8±
	0.008 3	0.007 4	0.008 0	0.006 8*	0.008 7**	0.006 7**	0.008 2*	0.007 4**

注:与模型组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01;与一期组相比, <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01;与三期组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01;与阳性药组相比, <sup>◇</sup>P<0.05, <sup>◇◇</sup>P<0.01

Note: Compared with model group, \*P<0.05, \*\*P<0.01; Compared with one-period group, <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01; Compared with three-period group, \*P<0.05, \*\*P<0.01; Compared with positive medicine group, <sup>◇</sup>P<0.05, <sup>◇◇</sup>P<0.01

达均有高于模型组的趋势。3 个中药治疗组平均 VEGF 表达强度均高于模型组,三期组最高。原位杂交结果显示 3 个中药治疗组在术后大部分时间点 VEGF mRNA 表达均有高于模型组的趋势。3 个中药治疗组平均 VEGF mRNA 表达强度均高于模型组,三期组最高。

### 3 讨论

**3.1 三期治疗促进骨折愈合的机制** 从实验结果看,骨折愈合早期,外骨膜 VEGF 及 VEGF mRNA 表达在术后第 3 天迅速增高,术后第 6 天 VEGF 及 VEGF mRNA 表达下降,可能与骨折后外骨膜缺血缺氧环境有关。而三期治疗组术后 3 d VEGF mRNA 表达增高不显著,VEGF 表达呈现第 3 天低而第 6 天高的趋势,说明活血化瘀方剂改善了骨折端外骨膜区域缺血状况,从而减少了 VEGF mRNA 表达,并使 VEGF 表达第二高峰提前。而在内骨膜及骨髓腔组织中,情况有所不同,三期治疗组无论 VEGF 及 VEGF mRNA 表达均高于其他三组,可能与中医骨折三期治疗促进了血管形成、炎细胞浸润以及间充质细胞分化有关。骨折愈合中期,内外骨痂开始形成,三期治疗组的内外骨膜和骨髓腔组织 VEGF 及 VEGF mRNA 表达均较高,而此时是骨折端血管重建的重要时期,骨折三期治疗促进 VEGF 及 VEGF mRNA 表达,从而促进了骨折端血管的重建,加速骨折愈合。骨折愈合后期,骨痂开始塑形改建,模型组内外骨膜及骨髓腔 VEGF 及 VEGF mRNA 表达下降或变化不大,3 个中药治疗组 VEGF 及 VEGF mRNA 表达仍高于模型组,其中三期治疗组在骨外膜和骨髓腔 VEGF mRNA 表达出现高峰。

**3.2 中医骨折分期治疗的必要性** 现代研究表明,中药在骨折愈合的不同阶段有着不同的作用及机制。洪定钢等<sup>[7]</sup>发现续断在骨折愈合的早期是提高成骨细胞的数量,而后期则通过提高成骨细胞的活性来促进骨痂的生长;董福慧等<sup>[8]</sup>发现海螵蛸、水蛭对血管形成有促进作用,阿胶、骨碎补和海螵蛸对骨折软骨形成早期具有促进骨诱导的作用,并对成骨细胞的增殖及合成活性有较大影响。骨折愈合过程中不同中药可能相互影响、相互作用,对骨折愈合产生协同或拮抗作用。肖洪彬等<sup>[9]</sup>发现桃仁、红花通过对全血黏度、纤维蛋白原、红细胞压积的百分比及红细胞聚集指数的显著降低而起到改善血液流变性,抑制血栓形成,而达到活血化瘀之目的;而单独应用桃仁或红花的效果不显著,仅红花可降低纤维蛋白

原的含量。针对骨折愈合不同时期的生理病理变化施以相应中药,使不同作用的中药产生协同作用或相加作用,共同促进骨折愈合。张俐等<sup>[10-11]</sup>研究了活血化瘀汤对骨折愈合早期缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) mRNA 和 VEGF 的表达,发现能够显著降低骨折愈合早期 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达,并能促进 3~14 d VEGF 的表达,说明活血化瘀中药可以促进骨折愈合早期的血管生成,改善缺氧状态。并且认为在骨痂形成期应适时转向续损接骨药为主,避免过多使用活血化瘀药,破坏其相对稳定的代偿机制。彭汉士等<sup>[12]</sup>采用组织学、组织化学、组织形态计量学检测研究了肢伤三方对骨折愈合中后期的作用。发现骨折愈合中晚期给予补益肝肾、接骨续筋方剂可以明显促进骨折愈合。

综上所述,中药分期与不分期治疗对骨折愈合均有一定的促进作用,其机制与促进骨折愈合过程中内外骨膜及骨髓腔 VEGF 及 VEGF mRNA 表达有关。针对骨折愈合阶段施以不同方剂的三期组较不分期的一期组和阳性药组对于 VEGF 及 VEGF mRNA 表达的促进作用更加明显,分期治疗是必要的。

#### 参考文献

- [1] 孙永生,温建民,吴林生,等.骨折三期治疗对骨生长因子 FGF-2 表达影响的实验研究.中国骨伤,2004,17(4):222-226.
- [2] 温建民,徐颖鹏,董建文,等.中医骨折 3 期治疗对家兔骨折各种骨痂组织 VEGF 及 VEGF mRNA 表达的影响.中国中药杂志,2007(24):2640-2645.
- [3] 施杞,王和鸣.骨伤科学.北京:人民卫生出版社,2001.159-171.
- [4] 董福慧,朱云龙.中医正骨学.北京:人民卫生出版社,1999.35-41.
- [5] 苗明三.实验动物和动物实验技术.北京:中国中医药出版社,1997.145.
- [6] 陆裕朴.实用骨科学.北京:人民军医出版社,1991.56.
- [7] 洪定钢,时光达.续断对实验性骨折愈合影响的骨组织形态计量学研究.中国中医骨伤科杂志,1999,7(3):4-7.
- [8] 董福慧,金宗谦,郑军,等.四种中药对骨愈合过程中相关基因表达的影响.中国骨伤,2006,19(10):595-597.
- [9] 肖洪彬,赵艳明,王海,等.桃仁、红花配伍对慢性血瘀模型大鼠血液流变学的影响.中医药信息,2005,22(4):75-76.
- [10] 张俐,叶俊材.活血化瘀汤对骨折早期血管内皮细胞因子活性的影响.中国临床康复,2004,8(23):4798-4799.
- [11] 张俐,叶俊材,陈伯仪,等.活血化瘀汤对骨折早期缺氧诱导因子-1 $\alpha$  及血管内皮生长因子影响的实验研究.中国骨伤,2005,18(4):216-218.
- [12] 彭汉士,贝美莲,吴清和,等.中药肢伤三方促进骨折愈合的实验研究.广州中医药大学学报,2001,18(2):163-166.

(收稿日期:2009-09-08 本文编辑:桑志成)