

• 基础研究 •

四种中药对骨愈合过程中相关基因表达的影响

董福慧¹, 金宗谦², 郑军¹, 裴凌鹏¹, 高云¹, 杨淑芹¹, 蔡静怡¹

(1. 中国中医科学院骨伤科研究所, 北京 100700 2. 北京联合大学应用文理学院)

【摘要】 目的: 探索中药水蛭、海螵蛸、阿胶、骨碎补在骨折愈合过程中的干预作用, 了解它们各自的调节靶点, 探索建构其基因组学的途径。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 300 只大鼠随机分为正常组、模型组和给药组 (分别用 4 种中药给药), 每组 50 只, 分别在实验的第 4、7、14、21、28 天不同时间点采用原位杂交方法对各类 mRNA 的变化进行动态观察, 分析骨愈合过程中 I、II、III 型前胶原 mRNA、转化生长因子 TGF- β_1 mRNA、骨形态发生蛋白 BMP-2 mRNA 以及血管内皮生长因子 VEGF mRNA 的表达情况。结果: 不同中药对不同基因的作用不同, 作用的时间点不同, 作用强度也存在差异。其中海螵蛸在骨折早期对 I、III 型前胶原 mRNA、VEGF mRNA、BMP-2 mRNA 的表达升高, 后期 II、III 型前胶原 mRNA 表达水平下降, VEGF mRNA、TGF- β_1 mRNA 表达量维持于较高水平; 骨碎补组较模型组在 BMP-2 mRNA、TGF- β_1 mRNA、I 型前胶原 mRNA 的表达上差异有显著性统计意义; 阿胶对骨愈合早、中期 I、II、III 型前胶原 mRNA 和 TGF- β_1 mRNA 的表达与模型组比较差异存在显著性统计意义; 水蛭对 VEGF mRNA 的表达具有一定的促进作用。结论: 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。

【关键词】 骨愈合; 基因表达; 原位杂交; 中草药; 动物实验

Influence of Chinese medicine on related gene expression during bone healing DONG Fu-hui^{*}, JIN Zong-qian, ZHENG Jun, PEI Ling-peng, GAO Yun, YANG Shu-qin, CAI Jing-yi^{*} Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of Traditional Chinese Medicine Science, Beijing 100700, China

ABSTRACT Objective The purpose is to reveal the influence of Chinese medicine (Leech, Cuttlebone, Donkey-hide glue, Fortune's Drynaria Rhizome) on fracture healing to explore the Chinese medicine regulating target and to explore the way for creating the genomics of traditional Chinese medicine. **Methods** Single factor interfering model was set up in SD rat and 300 SD rats were divided randomly into the normal group, model group and treated group (4 species Chinese medicine) with 50 rats in each group. On 4, 7, 14, 21 and 28 days of the experiment, the *in situ* hybridization method was adopted to detect the change of procollagen mRNA, type I, II, III, TGF- β_1 mRNA, BMP-2 mRNA and VEGF mRNA. **Results** Four Chinese medicines had different functions action on different gene, different functional time and different functional strength. The results showed that in early stage of fracture, Cuttlebone could increase the expression of procollagens mRNA type I, III, VEGF mRNA and BMP-2 mRNA; at the later stage, the expression of procollagens mRNA type II, III descended, but the expression of VEGF mRNA, TGF- β_1 mRNA kept a high level. There were significant different in expression of BMP-2 mRNA, TGF- β_1 mRNA, procollagens mRNA type I between treated group by Fortune's Drynaria Rhizome and untreated model group. There were significant different in expression of procollagens mRNA type I, II, III and TGF- β_1 mRNA in early and middle stage between treated group by Donkey-hide glue and untreated model group. The Leech can promote for expression of VEGF mRNA. **Conclusion** Cuttlebone and Leech have promotion for angiogenesis. Donkey-hide glue, Fortune's Drynaria Rhizome and Cuttlebone have a

国家自然科学基金项目 (编号: 30171169)

生物活性物质与功能食品北京市重点实验室开放课题资助 (编号: LD-KZ-0302)

通讯作者: 董福慧 Tel: 010-64014411-2521

bone induction-promoting effect on early fracture of chondrification and have a great influence on osteoblastic proliferation and synthesis activity

Key words Bone healing Gene expression In situ hybridization Drugs Chinese herbal Animal experiment

骨愈合是一个复杂的过程,其在组织水平、细胞水平已得到了较好地研究与描述。但在分子生物学水平,所知还不多。中药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、水平、强度、机制如何等,均属未知。为此,通过对骨愈合过程中I、II、III型前胶原 mRNA、转化生长因子 TGF- β_1 mRNA、骨形态发生蛋白 BMP-2 mRNA、血管内皮生长因子 VEGF mRNA 表达的动态观察,揭示水蛭、海螵蛸、阿胶、骨碎补等 4 种中药在此过程中对骨愈合的干预作用,了解它们的调节靶点,探索建构其中药基因组学的途径^[1]。

1 材料与方

1.1 动物模型的建立 见文献[2]。

1.2 药物制备 所用药材均购于北京同仁堂北城药材批发中心,水蛭、海螵蛸、骨碎补粉碎后过 120 目筛,临用时加蒸馏水制成口服液(28 g·100 ml⁻¹生药),阿胶烱化后制成水溶液。配好的药剂低温保存备用,临用时摇匀。

1.3 动物分组、给药和取材 将大鼠随机分为正常组、模型组和给药组(分别用 4 种中药给药)6 组,每组 50 只。模型组和给药组均按上述模型制作方法打孔。打孔术后第 2 天,给药组开始灌胃给药,用药量根据人体常用剂量(15 g·70 kg⁻¹),按人/鼠表面积比率换算等效计量法计算后,每次 0.34 g·2 ml⁻¹,每天 2 次。模型组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 10 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 切片的制备及原位杂交 见文献[2]。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 11.0 统计软件分析,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组不同时间 I 型前胶原 mRNA 的表达 见文献[2-5]。正常组各时间点均无显著性统计意义上的阳性表达,各给药组、模型组与正常组在各时间点差异存在显著性统计意义($P < 0.05$)。给药组 4 d 时,低量表达。7 d 时,表达量上升,成骨细胞中均有高表达。14 d 时,达到峰值,在成骨细胞中有很高表达。21 d 时,几乎维持于峰值水平,表达于成骨细胞中。28 d 时,表达量下降,表达于骨小梁表面成骨细胞中。这个过程中给药组与模型组差异存在显著性统计意义($P < 0.05$)。

2.2 各组不同时间 II 型前胶原 mRNA 的表达 见文献[2-5]。正常组各时间点均无显著性统计意义上的阳性表达,各给药组、模型组与正常组在 4、7、14 d 时间点差异存在显著性统计意义($P < 0.05$)。给药组 4 d 时,中等强度,表达于软骨细胞中。7 d 时,达到峰值,表达于成熟软骨细胞中。14 d 时,表达强度下降,但在成骨细胞中有表达。21 d 时,表达量极低。28 d 时,几乎探测不到。这个过程中给药组与模型组第 1 周差异存在显著性统计意义($P < 0.05$)。

2.3 各组不同时间 III 型前胶原 mRNA 的表达 见文献[2-

5]。正常组各时间点均无显著性统计意义上的阳性表达,各给药组、模型组与正常组在 4、7、14 d 时间点差异存在显著性统计意义($P < 0.05$)。给药组 4 d 时,达到峰值,见于间充质细胞、成纤维细胞。7 d 时,表达量已明显下降。14、21 d 时表达量极低。28 d 时,未探测到。这个过程中给药组与模型组第 1 周差异存在显著性统计意义($P < 0.05$)。

2.4 各组不同时间 TGF- β_1 mRNA 的表达 见文献[2-5],正常组各时间点均无显著性统计意义上的阳性表达,各给药组、模型组与正常组在 4、7、14 d 时间点差异存在显著性统计意义($P < 0.05$)。给药组 4 d 时,有较高表达,见于间充质细胞、成纤维细胞及肉芽基质中。7 d 时,有较高表达,并见于软骨细胞中。14 d 时,达到峰值,在成熟的软骨细胞、成骨细胞中均有高表达。21 d 时,在新生骨表面成骨细胞中呈高表达,成熟骨质区表达量很低。28 d 时,表达量很低。这个过程中给药组与模型组第 2、3 周差异存在显著性统计意义($P < 0.05$)。

2.5 各组不同时间 BMP-2 mRNA 的表达 见文献[2-5],正常组各时间点均无显著性统计意义上的阳性表达,各给药组、模型组与正常组在 4、7、14、21 d 时间点差异存在显著性统计意义($P < 0.05$)。给药组 4 d 时,达到较高水平,主要存在于间充质细胞。7 d 时,达到峰值,主要存在于早期的软骨细胞。14 d 时,主要在早期的成骨细胞中有高表达。21 d 时,在成骨细胞中有表达,表达强度已呈下降趋势。28 d 时,水平很低。这个过程中给药组与模型组在 4 d 时差异存在显著性统计意义($P < 0.05$),其余时间点差异均无显著性统计意义($P > 0.05$)。

2.6 各组不同时间 VEGF mRNA 的表达 见文献[2-5]。正常组各时间点均无显著性统计意义上的阳性表达,各给药组、模型组与正常组在各时间点差异存在显著性统计意义。给药组 4 d 时,表达见于间充质细胞、成纤维细胞,表达强度较弱。7 d 时,达到峰值,软骨细胞、早期的成骨细胞中有高表达。14 d 时,在血管内皮细胞、成熟及肥大的软骨细胞、成骨细胞均有较高程度表达。21 d 时,主要在成骨细胞、血管内皮细胞中有表达。28 d 时,在成骨细胞中仍有表达。给药组与模型组在 4 d 时差异存在显著性统计意义($P < 0.05$),其余时间点均无显著性差异($P > 0.05$)。

3 讨论

通过上述实验我们得到如下结论:①海螵蛸在骨折早期 III 型前胶原 mRNA 的表达显著升高,但达到峰值后,其表达水平迅速下降。推测其在骨折早期可能与骨折炎症期的间充质细胞、成纤维细胞的增值及功能活跃有关,通过增加其数量、促进其合成功能而缩短炎症反应期,加速骨愈合。海螵蛸对 II 型前胶原 mRNA 的表达量峰值无明显影响,但在骨折中后期表达量下降明显,这可能是由于血管数量的增加,导致软骨性基质吸收的加快。而 BMP-2 mRNA 早期的表达较高,表明海螵蛸在骨折软骨形成早期具有促进骨诱导作用。在本实验中, TGF- β_1 mRNA 表达量早期变化不明显,中后期维持于较

高水平。推测海螵蛸对成骨细胞的增殖及合成活性有较大影响,而对软骨细胞影响不大。海螵蛸有促进骨折愈合作用,缩短愈合时间,促进纤维细胞和成骨细胞增生与骨化。②骨碎补在骨修复早期,促进了 BMP-2mRNA 的表达,说明其与间充质细胞分化有关。但 III型前胶原 mRNA 表达水平并无明显改变。而之后 II、I 型前胶原 mRNA 表达水平显著上升。TGF- β_1 mRNA 表达水平在软骨形成期及软骨内骨化期亦明显上升。据此推测,骨碎补在细胞表型分化过程中有调节作用,促进了间充质细胞向成骨细胞系及成软骨细胞系分化,并增进了其合成活性,而对成纤维细胞无影响。从这一点上看,成软骨细胞、成骨细胞并非源于成纤维细胞的演化,或者是骨碎补对细胞表型分化的调节作用主要发生于炎症期后,同时我们还注意到,VEGF-mRNA 表达量无明显变化,说明骨碎补促进骨化的机制与血管生成量无关。此外,II型前胶原 mRNA 在达到峰值之后,迅速下降,表明软骨性基质吸收加快,结合 VEGF-mRNA、I 型前胶原 mRNA、TGF- β_1 mRNA 表达量变化特征,有理由怀疑骨碎补对破骨细胞的功能有促进作用,并且这种作用不是单向的,而是与成骨细胞功能相耦合的。③阿胶在骨折早、中期可明显促进 TGF- β_1 mRNA 的表达。由于骨折早期 TGF- β_1 mRNA 主要源于血小板,而骨折炎症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富集及增强其活性。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 mRNA 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、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 III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 的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。VEGF-mRNA 在骨愈合过程中无明显改变,表明阿胶在骨愈合过程中,对血管形成无明显作用。④水蛭在骨折 4 d时,TGF- β_1 mRNA 的表达量低于模型组,由于骨折早期 TGF- β_1 mRNA 主要源于血小板,因而水蛭在骨折早期减小了血小板的凝集;而 III型前胶原 mRNA 表达量亦相应下降,这些从一个侧面说明炎症反应程度降低,血肿量下降。在骨折 14 d时 TGF- β_1 mRNA 的表达量开始高于模型组,而 VEGF-mRNA 始终高于模型组,说明水蛭在骨折中、后期促进了血管生成,加速了爬行替代过程,促进骨愈合。实验中 II 型前胶原 mRNA 在达到峰值之后,迅速下降;I 型前胶原 mRNA 表达水平显著上升。I、II型前胶原的 mRNA 表达量的变化特征支持此点推论。BMP-2mRNA 的表达量在骨修复期与模型组相比无明显变化,表明水蛭无促进间充质细胞分化的作用。水蛭通过在骨折早期降低炎症反应程度,在骨折中、后期促进了血管生成而加速骨愈合,而骨损伤后的血肿量减小并不影响骨愈合的速度。

参考文献

- 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):245-246
- 董福慧,郑军,程伟.骨碎补对骨愈合过程中相关基因表达的影响.中国中西医结合杂志,2003,23(7):518-520
- 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
- 高云,董福慧,郑军.海螵蛸对骨愈合过程中相关基因表达的影响.中医正骨,2004,16(7):386-387
- 高云,董福慧,郑军.阿胶对骨愈合过程中相关基因表达的影响.中国骨伤,2004,17(9):510-522

(收稿日期:2006-03-07 本文编辑:李为农)

2007年征订启事

《深圳中西医结合杂志》为双月刊,每期定价 8.00元,全年 48.00元。邮发代号:46-167 订阅者可到全国各地邮局(所)办理。广告许可证:深工商广字 0058号。地址:深圳市笋岗西路 深圳市第二人民医院内 《深圳中西医结合杂志》编辑部 邮编:518035 Tel (0755) 83228956 E-mail szxyjhzz@yahoo.com.cn

《中国中西医结合影像学杂志》为双月刊,国内外公开发行,中国标准连续出版物号:CN 11-4894/R;国际连续出版物号:ISSN 1672-0512 国外代号:BM1760;邮发代号:24-200,大 16开,80页,全部 105 g铜版纸印刷,定价 10元,全年 60元。本刊可通过邮局征订,也可直接汇款至杂志编辑部。地址:山东省济南市文化西路 42号,《中国中西医结合影像学杂志》编辑部;邮编:250013 Tel (0531) 82950414-6689; Fax (0531) 82666651 E-mail ljl@sdzydfy.com; yxbj@163.com

《中国全科医学》为半月刊,可在网上投稿或用 E-mail 方式投稿。每期每册 5.8元,全年 139.2元。可到当地邮局订阅(邮发代号:80-258),欢迎向我刊发行部邮购。地址:北京市南区右安门外西头条 10号,首都医科大学 128信箱,中国全科医学杂志社;邮编:100069; Tel 010-63052088 010-83525550-16; Fax 010-63052088 E-mail zgqkxy@126.com

《中国民间疗法》为月刊,正文 64页,每册 6.80元,全年 81.60元,国内外公开发行。邮发代号:82-695,各地邮电局(所)均办理订阅。也可直接从本刊邮购,地址:北京市朝阳区北三环东路 28号 易亨大厦 1602室 《中国民间疗法》编辑部,邮编:100013 Tel (010) 64405732

《中国中医急症》为月刊,每月 15日出版,国际大 16开本,112页,定价 8元,全年 96元,邮局订阅代号:78-98 也可直接汇款至编辑部订阅。联系人:安浚;地址:重庆市渝中区北区路 1号;邮编:400013 Tel 023-63521390 63534375 Fax 023-63521390

《中国针灸》杂志(月刊),《针刺研究》杂志(双月刊),《世界针灸杂志》(全英文版,季刊)属国家级针灸学术期刊,《中国针灸》杂志每册 8元,订阅代号:2-53;《针刺研究》杂志每册 10元,订阅代号:82-171;在内地各地邮局均能订阅。《世界针灸杂志》每册 15元,请直接与《世界针灸杂志》有限公司发行部联系。海外读者可与《世界针灸杂志》有限公司发行部联系邮购。地址:北京东直门内南小街 16号,邮编:100700 Tel/Fax 010-84046331; E-mail zgzyjz@sina.com

《中国中西医结合消化杂志》为双月刊,国内统一刊号:CN 42-1612/R;国际标准刊号:ISSN 1671-038X。邮发代号:38-212(国内),NTE1065(国际),72页,每期定价 7.80元,全年 46.80元。广告经营许可证:武工商广字 02-16号。地址:武汉市解放大道 1277号,华中科技大学同济医学院附属协和医院内 邮政编码:430022 Tel 027-85726835 E-mail zyxh@whuh.com