

· 基础研究 ·

异补骨脂素促进小鼠胫骨骨折愈合的研究

吴西^{1,2}, 王中琪^{1,2}, 魏娟娟², 柏鑫², 高玉海^{2,3}, 陈克明^{1,2,3}

(1. 甘肃中医药大学中医临床学院, 甘肃 兰州 730030; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院基础医学实验室, 甘肃 兰州 730050; 3. 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室, 甘肃 兰州 730050)

【摘要】 目的:探讨灌服不同剂量异补骨脂素(isopsoralen, ISO)对小鼠骨折及血管愈合的影响。方法:选取 2 月龄体质量为(20±2)g 的雄性 C57BL/6 小鼠 60 只,采用随机数字表法分为 4 组:模型组(Model)、低剂量组(isopsoralen-low dose, ISO-L)、中剂量组(isopsoralen-medium dose, ISO-M)和高剂量组(isopsoralen-high dose, ISO-H),每组 15 只。建立右侧胫骨骨折模型。术后采用灌胃给药,ISO-L 组、ISO-M 组和 ISO-H 组分别灌服 ISO 的浓度为 10、20 和 40 mg·kg⁻¹, Model 组灌服等体积生理盐水,每日 1 次,连续给药 28 d。每周称量体重 1 次。分别于第 7、14、21、28 天行 X 线检查,并采用改良后 I.R. Garrett 评分对骨痂生长情况进行评价。至 28 d 后取材,剥离主要脏器称重并计算脏器系数,进行脏器苏木素伊红染色(hematoxylin-eosin, HE)观察病理结构变化。采用微计算机断层扫描技术(Micro-CT)扫描骨折区域并进行三维重建得出效果图,量化骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)。将脱钙后的胫骨进行石蜡包埋并切片,通过 HE 染色和番红固绿染色观察骨折断端愈合及塑形情况。通过血管灌注 Microfil 造影剂后取出右侧胫骨并脱钙,使用 Micro-CT 扫描骨折区域骨痂微血管,比较血管体积分数及血管直径。结果:给药 28 d 后,各组小鼠体质量及器官系数比较,差异无统计学意义($P>0.05$),脏器 HE 染色未发现明显病理学改变。X 线片和改良后 I.R. Garrett 评分结果显示,ISO-M 组 28 d 评分高于 Model 组($P<0.05$);ISO-H 组第 14、21、28 天评分均高于其他 3 组($P<0.05$)。Micro-CT 结果显示,ISO-M 组腔内骨痂明显减少,低于 Model 组($P<0.05$);ISO-H 组骨痂大部分消退, BV/TV 均低于其他 3 组($P<0.05$)。HE 染色及番红固绿染色结果显示 ISO-H 组骨折区域断端闭合,已出现连续板层骨,骨折愈合进程超过其他组。血管造影结果显示,ISO-H 组和 ISO-M 组血管体积分数高于 Model 组和 ISO-L 组($P<0.05$), ISO-H 组和 ISO-M 组血管直径高于 Model 组和 ISO-L 组($P<0.05$)。结论:ISO 在 10~40 mg·kg⁻¹ 浓度范围内无明显毒副作用,可以改善骨微结构,促进骨痂微血管的生成,呈浓度依赖性加速小鼠骨折断端的愈合。

【关键词】 骨折; 骨痂; 异补骨脂素; 血管造影

中图分类号:R683.42

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2023.12.012

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Effects of isopsoralen on tibial fracture and vascular healing in mice**WU Xi^{1,2}, WANG Zhong-qi^{1,2}, WEI Juan-juan², BAI Xin², GAO Yu-hai^{2,3}, CHEN Ke-ming^{1,2,3} (1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, Gansu, China; 2. Basic Medical Laboratory, the 940 Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu, China; 3. Key Laboratory of Stem Cells and Gene Drug of Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu, China)

ABSTRACT Objective To explore effects of isopsoralen (ISO) with different doses on fracture and vascular healing in mice. **Methods** Sixty 2-month-old male C57BL/6 mice with body mass of (20±2) g were selected and divided into 4 groups by random number table method; model group (model), low dose group (isopsoralen-low dose, ISO-L), medium dose group (isopsoralen-medium dose, ISO-M) and high dose group (isopsoralen-high dose, ISO-H), with 15 animals in each group. The right tibial fracture model was established. After operation, ISO-L group, ISO-M group and ISO-H group were given ISO concentration of 10 mg·kg⁻¹, 20 mg·kg⁻¹ and 40 mg·kg⁻¹, respectively. Model group was given same volume of normal saline once a day for 28 days. Weighed once a week. X-ray was performed on 7, 14, 21 and 28 days, respectively, and modified I.R. Garrett scoring method was used to evaluate callus growth. After 28 days, the main organs were stripped and weighed, and organ coefficients were calculated. Hematoxylin eosin staining (HE staining) was performed on the organs to observe whether there were pathological structural changes. Micro-computed tomography (Micro-CT) was used to scan fracture area and conduct three-dimensional reconstruction to obtain the effect map, and quantify bone volume fraction (bone volume/total volume, BV/TV).

基金项目:国家自然科学基金(编号:81770879);军队后勤科研计划项目(编号:CLB18J028)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 81770879)

通讯作者:陈克明 E-mail:chenkm@lut.edu.cn

Corresponding author: CHEN Ke-ming E-mail: chenkm@lut.edu.cn

After decalcification, the tibia was embedded in paraffin wax and sectioned. The healing and shape of fracture end were observed by HE staining and ferruxin solid green staining. The right tibia was removed and decalcified after intravascular infusion of Microfil contrast agent. Micro-CT was used to scan the callus microvessels in the fracture area, and the vascular volume fraction and vessel diameter were quantified. **Results** After 28 days of administration, there was no significant difference in body mass and organ coefficient among all groups ($P>0.05$), and no significant pathological changes were found in HE staining of organs. The results of X-ray and improved I.R. Garrett score showed that ISO-M group was higher than that of Model group at 28 days ($P<0.05$). Scores of ISO-H group at 14, 21 and 28 days were higher than those of the other 3 groups ($P<0.05$). Micro-CT results showed intracavitary callus in ISO-M group was significantly reduced, which was lower than that in Model group ($P<0.05$), most of the callus in ISO-H group were subsided, and BV/TV in ISO-H group was lower than that in the other 3 groups ($P<0.05$). The results of HE staining and ferrubens solid green staining showed fracture area of ISO-H group was closed, continuous laminar bone had appeared, and the fracture healing process was higher than that of other groups. Angiographic results showed vascular volume fraction in ISO-H and ISO-M groups was higher than that in Model and ISO-L groups ($P<0.05$), and the vascular diameter in ISO-H and ISO-M groups was higher than that in Model and ISO-L groups ($P<0.05$). **Conclusion** In the concentration range of 10–40 mg·kg⁻¹, ISO has no obvious toxic and side effects, and could improve bone microstructure, promote formation of callus microvessels, and accelerate healing of fracture ends in a concentration-dependent manner.

KEYWORDS Bone Fracture; Bony Callus; Isopsoralen; Angiography

骨折后常见的并发症有延迟愈合和骨不连等^[1], 给社会和患者带来了严重的负担^[2]。随着现代医学的发展, 仍有 5%~10% 的骨折会发生骨不连^[3-4]。随着人口老龄化加剧, 老年人骨骼强度较低^[3,5], 发生骨折的概率大幅增加, 医疗保健系统的负担将大幅增加^[6-7]。所以, 如何加速骨折愈合是骨科医生共同关注的问题。术后运用中医药加速骨折愈合被广泛应用于临床, 且具有良好的疗效^[8-9]。中医药具有缩短疗程和减少并发症等优势, 其中以“肾主骨”为理论依据^[10], “从肾论治”是治疗骨病的关键手段。补骨脂性苦、辛、温, 归脾、肾经, 是一种常用的补虚药, 具有补肾壮阳、补脾健胃的功效, 是治疗骨折和防治骨质疏松的常用中药单体^[11-12]。异补骨脂素 (isopsoralen, ISO) 是补骨脂的有效成分^[13], 对骨质疏松有一定的防治作用^[14], 但对于加速骨折愈合方面未见报道。因此, 本研究建立小鼠胫骨骨折模型, 旨在探讨不同剂量 ISO 在加速骨折愈合方面的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

实验仪器: 聚焦点 X 线成像系统 (VIVION 90, 丹东奥龙射线); Micro-CT (NMC-100, 平生医疗科技)。实验试剂: 异补骨脂素 (宝鸡辰光生物科技有限公司, 批号: HI018117, 纯度 98%); 注射用青霉素 (山东鲁抗医药); 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 脱钙液 (慢脱) (Servicebio G1105-500 ML); 通用型组织固定液 (Servicebio G1101-500 ML); 苏木素-伊红染色 (hematoxylin eosin, HE) 染液套装 (Servicebio G1003); 骨组织番红固绿染液 (Servicebio G1053-100 ML); Microfil 血管造影剂 (FlowTech, Inc. 美国); 肝素钠注射液 (上海医药) 等。

1.2 实验动物

选取 60 只 2 月龄雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量为 (20±2) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证编号为 SCXK (京) 2019-0010。饲养于中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院实验动物中心 [SYXK (军) 2017-0047], 适应性喂养 1 周, 每日自由摄食及饮水, 12 h 间隔照明, 每笼饲养密度 10 只。本实验经医院伦理委员会审查符合动物伦理 (批号: 2021KYLL183)。

1.3 造模与分组

小鼠胫骨骨折模型的造模方法根据以往文献^[15-16]报道有所改进。采用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg·kg⁻¹) 麻醉小鼠, 待小鼠完全麻醉后取右侧卧位, 剔除其右侧下肢毛发, 自右侧膝关节开始, 沿胫骨外侧前缘做 1 cm 大小切口。将无菌 4.5 号注射器针头从胫骨平台插入髓腔, 确认贯通髓腔后稍回退针头。止血钳钝性剥离肌肉和筋膜, 暴露胫骨中上段, 找到胫骨前外侧向前凸起最高点, 11 号手术刀片垂直下压造成横断骨折, 将针头重新插入胫骨以进行髓内固定, 确认对位对线良好后, 剪断针头外露, 生理盐水冲洗后逐层缝合伤口。术后连续注射青霉素 3 d 抗感染。

将造模成功的小鼠按随机数字表法分为模型组 (Model)、低剂量组 (isopsoralen-low dose, ISO-L)、中剂量组 (isopsoralen-medium dose, ISO-M) 和高剂量组 (isopsoralen-high dose, ISO-H), 每组 15 只。

1.4 干预措施

各组小鼠均采用灌胃给药, ISO-L 组、ISO-M 组和 ISO-H 组分别灌服 ISO 浓度为 10、20 和 40 mg·kg⁻¹, Model 组灌服等体积生理盐水。每日 1 次, 连续给药 28 d。

1.5 检测项目与方法

1.5.1 X 线检查及骨痂评分 术后每周进行 1 次 X 线检查。每组随机选取 6 只小鼠麻醉成功后取俯卧位,置于聚焦点 X 线成像仪内进行拍摄,观察骨折断端形态变化。拍摄条件为 45 kV,0.45 mA。根据 GARRETT 等^[17]改良制定的 I.R. Garrett 评分对 X 线片进行评价:断端未见骨痂为 0 分;断端边缘模糊,少见骨痂为 1 分;断端边缘进一步模糊,骨痂量增多但未达到将缺损填满为 2 分;断端边缘进一步模糊,缺损被骨痂填满为 3 分;断端边缘已完全消失,缺损处骨痂有一定程度消退为 4 分;断端边缘已完全消失,缺损处骨痂大部分消退为 5 分。

1.5.2 小鼠一般情况和样本采集 每周称量体重 1 次,记录小鼠进食、进水量,观察精神状态、毛色等的变化。术后 28 d 处死所有小鼠,剪开皮肤迅速取出右侧胫骨,小心剥离软组织并取出内固定后放入 10 倍体积组织固定液中固定 24 h。每组随机选取 6 只小鼠,依次取出肝脏、心脏、脾脏、肺脏和双肾称重,计算脏器系数,脏器系数的计算方法为:脏器系数=(器官重量/小鼠体质量)×100%,将称重后的脏器加入组织固定液进行固定,将固定好的脏器进行石蜡包埋,切成 5 μm 切片,进行 HE 染色,切片常规脱蜡复水,进入苏木素染液染色 3 min,自来水洗;再经苏木素分化液 3 s,自来水洗;苏木素返蓝液返蓝 3 s,自来水冲洗。常规脱水、透明、封片,将制作好的切片置于显微镜下观察。

1.5.3 Micro-CT 分析 将术后 28 d 收集的骨折侧胫骨用组织固定液固定保存并取出内固定,每组随机选取 3 只小鼠的胫骨,使用 NMC-200 型 Micro-CT 扫描仪进行离体 Micro-CT 扫描分析。采集协议为管压 90 kV,管流 50 μA,扫描区域为胫骨平台为起点往下 4.5 mm。使用图像处理软件 Avatar v1.6 (PINGSENG Healthcare Inc.)进行三维重建,同时选取骨折线上下各 1.5 mm 部分为感兴趣区域(range of interest, ROI),使用 Avatar v1.6 (PINGSENG Healthcare Inc.)对 ROI 的骨体积分数 (bone volume/total volume, BV/TV)进行量化分析。

1.5.4 骨折断端形态学染色 骨组织固定 24 h 后转入 EDTA 脱钙液中脱钙,每周更换 1 次,3 周后彻底脱钙,石蜡包埋,切成 8 μm 切片。进行 HE 染色,染色方法同 1.5.2 中 HE 染色,镜下观察骨折愈合情况。进行番红固绿染色,切片常规复水,浸入骨组织固绿染液染色 3 min,自来水流水冲洗多余染液至软骨呈无色,经 1%盐酸快速处理 10 s,自来水清洗。浸入骨组织番红染液中染色 5 s,然后经四缸无水乙醇快速脱水,每次 3 s,常规透明、封片,观察骨折区

软骨发生和软骨内成骨情况。

1.5.5 骨折断端血管造影 于 28 d 后处死前每组随机取 3 只小鼠,麻醉完成后沿腹正中线将胸骨剪开,彻底暴露心脏后进行灌注。使注射器针头进入左心室,并灌注含低分子肝素钠的生理盐水,观察右心耳充盈情况,待到右心耳完全充盈时,剪破右心耳。持续灌注含低分子肝素钠的生理盐水,直至从右心耳流出的生理盐水为无色透明状。接着灌注 4%多聚甲醛,此时小鼠四肢出现颤动,持续灌注至肢体僵硬,固定完全。最后灌注 Microfil 造影剂,当肝脏可见明显黄色纹路时,提示造影剂充满肝内血管,此时灌注已成功。灌注成功后的小鼠 4 ℃过夜。次日将胫骨取出,纱布轻轻拭去表面的多余组织并取出内固定,置于组织固定液中固定 24 h 后放入 EDTA 溶液中脱钙 4 周,脱钙后进行 Micro-CT 扫描及重建观察骨折血管重建情况(扫描及重建方法同 1.5.3)。

1.6 统计学处理

采用 Graphpad Prism 9.3.1 软件进行统计学分析。符合正态分布的定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析或重复测量方差分析,两两比较采用 Turkey 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

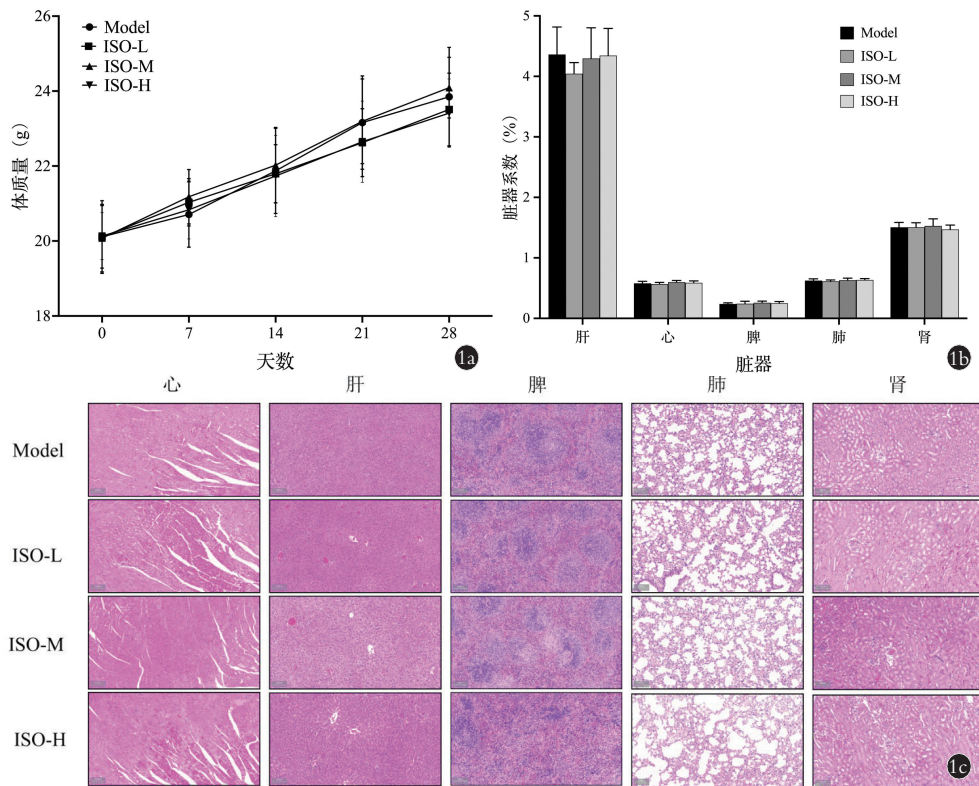
2 结果

2.1 一般情况

各组小鼠体质量比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 1a,表 1。灌药小鼠的精神状态、活跃程度、毛色等未见异常。28 d 后各组脏器系数比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 1b,表 2。各组主要器官的组织学观察未见明显的病理改变。见图 1c。

2.2 X 线检查及骨痂评分比较

X 线片结果如图 2 所示,灌服 ISO 7 d 后,Model 组、ISO-L 组和 ISO-M 组小鼠胫骨的骨折断端清晰,但 ISO-H 组断端开始模糊。14 d 后,Model 组和 ISO-L 组骨折断端边缘模糊,骨折断端呈低密度影,初步形成纤维连接;ISO-M 组骨痂已出现一定程度的矿化,ISO-H 组矿化程度更高。21 d 后,Model 组和 ISO-L 组形成骨桥连结,骨痂面积增大,ISO-M 组断端外周骨痂已被吸收而减小,ISO-H 组已形成皮质骨桥,骨痂吸收减少,髓腔部分已贯通。28 d 后,ISO-H 组皮质骨连续性已基本建立,髓腔已贯通,恢复骨正常结构。骨痂评分结果发现,术后 7 d 各组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);术后 14 d,ISO-H 组评分高于其余 3 组 ($P < 0.05$);术后 21 d,ISO-H 组评分高于 Model 组和 ISO-L 组 ($P < 0.05$);术后 28 d,ISO-M 组评分高于 Model 组 ($P < 0.05$),ISO-H 组评分高于其余 3 组 ($P < 0.05$)。见表 3。



注: Model: 模型组; ISO-L: 低剂量组; ISO-M: 中剂量组; ISO-H: 高剂量组。下同

图 1 各组小鼠一般情况 1a. 灌服第 0、7、14、21、28 天各组小鼠体质量 ($\bar{x}\pm s, n=15$) 1b. 灌服第 28 天各组小鼠心、肝、脾、肺、肾脏器系数 ($\bar{x}\pm s, n=6$) 1c. 各组小鼠心、肝、脾、肺、肾脏器 HE 染色 ($\times 200$)

Fig.1 General condition 1a. Body mass of mice on 0, 7, 14, 21 and 28 days after oral administration ($\bar{x}\pm s, n=15$) 1b. Organ coefficients of heart, liver, spleen, lung and kidney of mice on the 28th day of administration ($\bar{x}\pm s, n=6$) 1c. Hematoxylin eosin staining of heart, liver, spleen, lung and kidney of mice in each group ($\times 200$)

表 1 各组小鼠不同灌服时间体质量变化情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Changes of body mass of mice in each group at different perfusion times ($\bar{x}\pm s$)

单位: g

组别	鼠数	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Model 组	6	20.107±0.865	20.694±0.903	21.896±1.173	23.139±1.287	23.839±1.367
ISO-L 组	6	20.109±1.003	21.033±0.654	21.794±0.803	22.639±0.936	23.501±1.002
ISO-M 组	6	20.097±0.930	21.249±0.695	22.011±1.043	23.197±1.171	24.084±0.838
ISO-H 组	6	20.129±0.649	20.833±0.805	21.738±1.122	22.716±1.086	23.407±0.945
F 值		0.011	1.225	0.244	1.296	1.495
P 值		0.998	0.308	0.865	0.280	0.225

注: Model 为模型组; ISO-L 为低剂量组; ISO-M 为中剂量组; ISO-H 为高剂量组。下同

表 2 灌服 28 d 后各组小鼠心、肝、脾、肺、肾脏器系数 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Organ coefficient of heart, liver, spleen, lung and kidney in each group after 28 days of administration ($\bar{x}\pm s$)

单位: %

组别	鼠数	心	肝	脾	肺	肾
Model 组	6	0.579±0.034	4.363±0.453	0.237±0.020	0.624±0.030	1.506±0.080
ISO-L 组	6	0.568±0.027	4.045±0.183	0.243±0.040	0.613±0.021	1.507±0.075
ISO-M 组	6	0.600±0.026	4.297±0.505	0.257±0.027	0.632±0.033	1.528±0.117
ISO-H 组	6	0.587±0.032	4.344±0.449	0.249±0.028	0.635±0.023	1.469±0.073
F 值		1.216	0.750	0.496	0.769	0.463
P 值		0.330	0.535	0.690	0.525	0.711

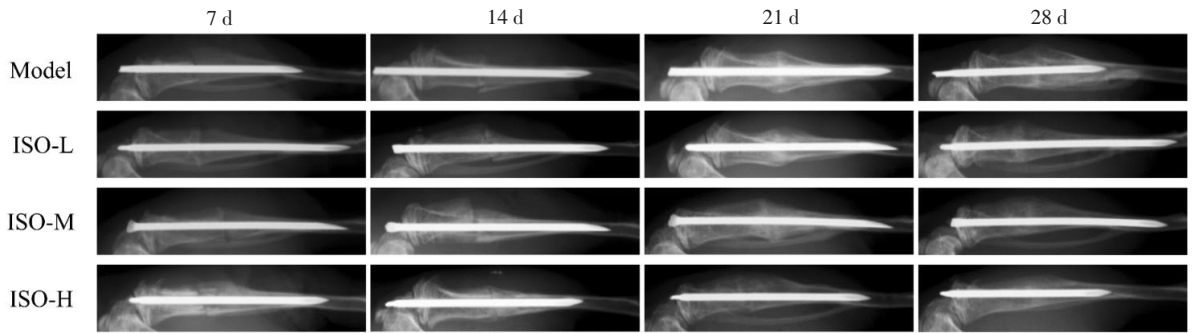


图 2 各组小鼠灌服第 7、14、21、28 天骨折 X 线

Fig.2 X-ray results of fracture on 7, 14, 21 and 28 days after oral administration among different groups

2.3 Micro-CT 扫描结果

骨折 28 d 右侧胫骨骨折部位三维重建及量化结果如图 3 所示,从胫骨外侧面、内侧面及背侧面均可观察到各组断端已形成骨性连接,内外骨痂均有不同程度吸收。Model 组和 ISO-L 组可从骨皮质外侧观察到处于塑形阶段的骨痂;ISO-M 组及 ISO-H 组骨痂塑形基本完成,可观察到致密线状的骨皮质,且表面光滑、连续。矢状面可见 Model 组和 ISO-L 组断端存在不规则的块状腔内骨痂;ISO-M 组腔内骨痂明显减少;ISO-H 组骨痂已被清除,骨小梁呈细密网状结构,髓腔已完全贯通。术后 28 d,ISO-H 组 BV/TV 低于其余 3 组($P<0.05$)。ISO-M 组 BV/TV 低于 Model 组($P<0.05$),而与 ISO-L 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。ISO-L 组 BV/TV 与 Model 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

2.4 骨痂形态学染色结果

HE 染色结果发现,Model 和 ISO-L 组骨折区域组织形态松散且不规则,胶原纤维粗大,形态与编织骨特点相符;ISO-M 组可见编织骨的形态从不规则转变为平行束状排列;ISO-H 组断端闭合,编织骨向板层骨转化,出现连续板层骨,连续性较好,骨折区域骨痂较少。

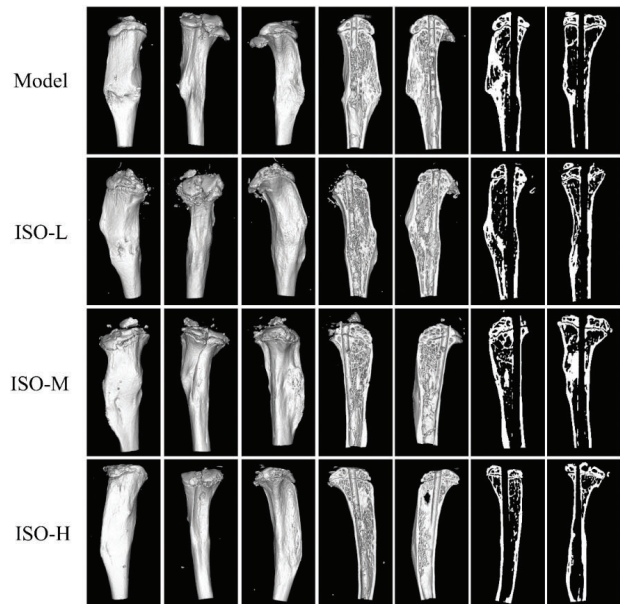


图 3 灌服 28 d 后各组小鼠胫骨三维重建结果

Fig.3 Results of tibia 3D reconstruction in each group after 28 days of administration

番红固绿染色结果发现,纤维和软骨组织呈红色,成骨呈蓝绿色。Model 组和 ISO-L 组断端可见结构疏松的红色软骨与绿色编织骨交替存在;ISO-M

表 3 各组小鼠灌服不同时间骨痂评分($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Callus scores of after administration at different time in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	7 d	14 d	21 d	28 d
Model 组	6	0.222±0.427	1.611±0.697	2.889±0.582	3.389±0.502
ISO-L 组	6	0.222±0.427	1.611±0.607 ^{a1}	2.944±0.539 ^{a4}	3.556±0.511 ^{a7}
ISO-M 组	6	0.333±0.485	1.889±0.676 ^{a2b1}	3.278±0.461 ^{a5b3}	3.944±0.426 ^{a8b5}
ISO-H 组	6	0.333±0.485	2.778±0.427 ^{a3b2c1}	3.667±0.485 ^{a6b4c2}	4.444±0.511 ^{a9b6c3}
F 值		0.352	14.700	8.586	16.730
P 值		0.790	0.000	0.000	0.000

单位:分

注:与 Model 组比较,^{a1} $q=0.000, P>0.05$;^{a2} $q=1.927, P>0.05$;^{a3} $q=8.092, P<0.05$;^{a4} $q=0.454, P>0.05$;^{a5} $q=3.178, P>0.05$;^{a6} $q=6.355, P<0.05$;^{a7} $q=1.453, P>0.05$;^{a8} $q=4.842, P<0.05$;^{a9} $q=9.200, P<0.05$ 。与 ISO-L 组比较,^{b1} $q=1.927, P>0.05$;^{b2} $q=8.092, P<0.05$;^{b3} $q=2.724, P>0.05$;^{b4} $q=5.901, P<0.05$;^{b5} $q=3.390, P>0.05$;^{b6} $q=7.748, P<0.05$ 。与 ISO-M 组比较,^{c1} $q=6.165, P<0.05$;^{c2} $q=3.178, P>0.05$;^{c3} $q=4.358, P<0.05$

表 4 灌服 28 d 后各组小鼠胫骨骨体积分数比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Comparison of BV/TV in tibia of mice after 28 days of administration($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	骨体积分数
Model 组	3	0.121±0.010
ISO-L 组	3	0.112±0.015 ^{d1}
ISO-M 组	3	0.087±0.010 ^{d2a1}
ISO-H 组	3	0.046±0.003 ^{d3a1d1}

注：与 Model 组比较，^{d1} $q=1.643, P>0.05$ ；^{d2} $q=5.720, P<0.05$ ；^{d3} $q=12.52, P<0.05$ 。与 ISO-L 组比较，^{a1} $q=4.077, P>0.05$ ；^{a2} $q=10.88, P<0.05$ 。与 ISO-M 组比较，^a $q=6.801, P<0.05$

组可见绿色编织骨向致密的板层骨转变，软骨骨痂已有较大程度的吸收，骨折区域依旧有少量纤维和软骨组织交替存在；ISO-H 组红色纤维和软骨组织较少，多见绿色板层骨。见图 4。

2.5 骨折断端血管造影结果

术后 28 d 骨痂微血管灌注结果发现,Model 组和 ISO-L 组骨折断端血管较为稀疏,血管直径较小,未能完全贯通骨折断端;ISO-M 组和 ISO-H 组血管已基本恢复正常状态,贯通程度较高,血管较粗,且密集程度高。见图 5。术后 28 d,ISO-H 组血管体积分数高于 Model 组和 ISO-L 组($P<0.05$),与 ISO-M 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。ISO-M 组血管体积分数显著高于 Model 组和 ISO-L 组 ($P<0.05$)。ISO-L 组与 Model 组血管体积分数比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。ISO-H 组血管直径显著高于 Model 组和 ISO-L 组($P<0.05$),与 ISO-M 组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。ISO-M 组血管直径高于 Model 组和 ISO-L 组($P<0.05$)。ISO-L 组血管直径与 Model 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

3 讨论

3.1 ISO 对小鼠主要脏器的影响

ISO 是从豆科植物补骨脂的干燥成熟果实中提

表 5 灌服 28 d 后各组小鼠胫骨血管体积分数和直径比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.5 Comparison of blood vessel volume fraction and diameter of tibia in mice after 28 days of administration($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	血管体积分数	血管直径/mm
Model 组	3	0.016±0.001	0.071±0.001
ISO-L 组	3	0.020±0.003 ^{a1}	0.074±0.002 ^{a4}
ISO-M 组	3	0.036±0.002 ^{a2a1}	0.086±0.004 ^{a3a3}
ISO-H 组	3	0.039±0.001 ^{a3a2a1}	0.094±0.001 ^{a4a4a2}

注：与 Model 组比较，^{a1} $q=3.721, P>0.05$ ；^{a2} $q=18.13, P<0.05$ ；^{a3} $q=21.20, P<0.05$ ；^{a4} $q=1.747, P>0.05$ ；^{a5} $q=8.748, P<0.05$ ；^{a6} $q=12.96, P<0.05$ 。与 ISO-L 组比较，^{b1} $q=14.41, P<0.05$ ；^{b2} $q=17.48, P<0.05$ ；^{b3} $q=7.001, P<0.05$ ；^{b4} $q=11.21, P<0.05$ 。与 ISO-M 组比较，^b $q=3.068, P>0.05$ ；^c $q=4.210, P>0.05$

取得到的香豆素成分，现代药理研究表明补骨脂具有抗骨质疏松、抗肿瘤和抗氧化等作用^[18]。本实验采用灌胃的给药方式,观察各组小鼠的进食进水、精神状态、毛发光泽程度、活跃程度等,结果发现各组间未见明显差异。同时分析给药 28 d 后主要脏器系数及脏器 HE 切片,结果提示各组小鼠主要脏器未因给药受损,表明 ISO 在 10~40 mg·kg⁻¹ 浓度范围内未对主要脏器产生明显毒副作用。

3.2 ISO 对骨折断端修复的影响

本实验采用小鼠胫骨骨折模型,该模型对肌肉和血管造成的破坏较小,有助于骨折愈合过程中的血液供应。通过髓内固定的方式,减少了断端的移位^[19-20]。因其固定较为稳定,形成的骨痂较小,骨折愈合进程较快^[21]。因此,本实验周期短,可重复性高,操作简便,适合用来评价骨折愈合的快慢。X 线及 CT 是评价骨折愈合的疗效最常见的手段^[22-23]。X 线通过密度与厚度差异所形成的对比度反映断端连接情况;Micro-CT 相比于 X 线是一项三维空间的评判指标,通过断层扫描及三维重建克服了 X 线检查影

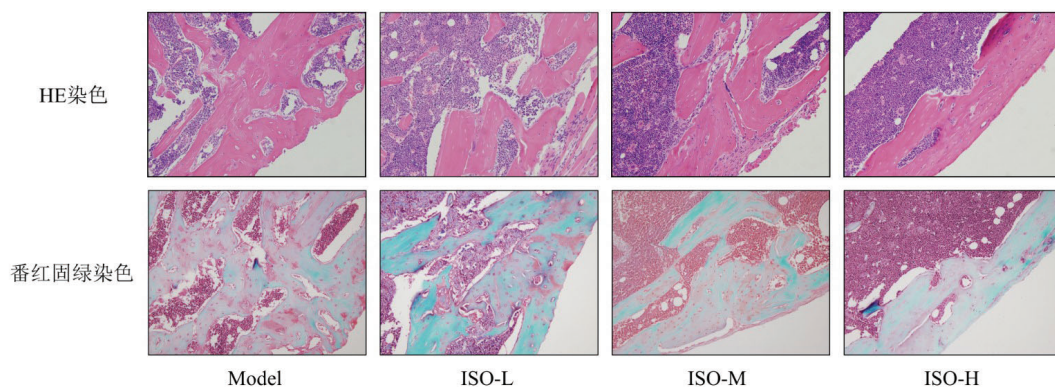
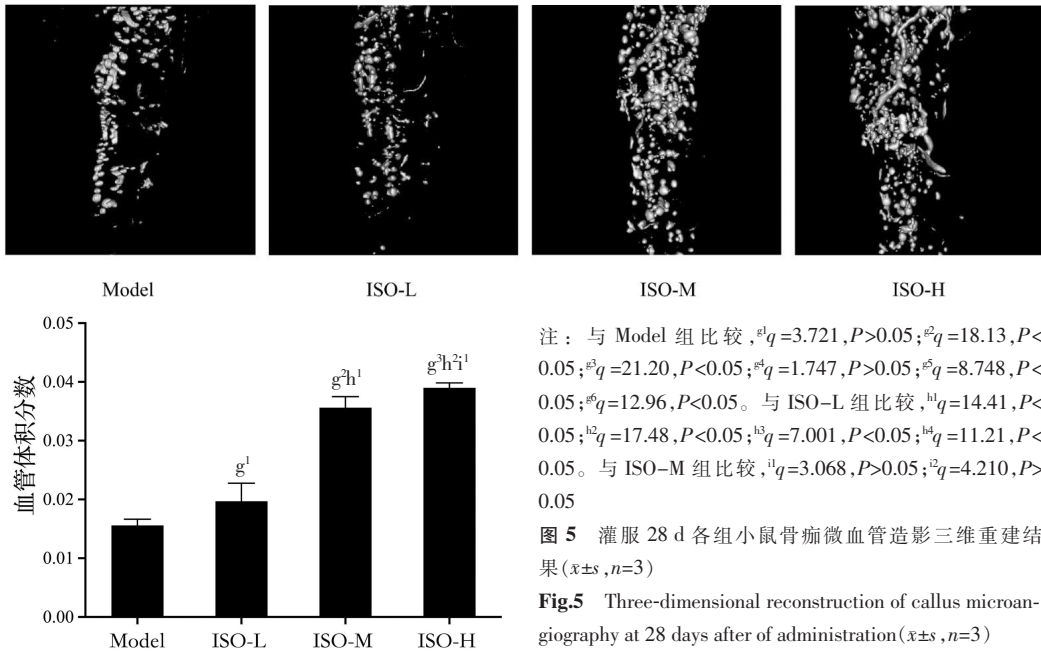


图 4 灌服 28 d 后各组小鼠骨痂形态学染色结果($\times 200$)

Fig.4 Morphological staining results of callus after 28 days of administration($\times 200$)



注：与 Model 组比较，¹ $q=3.721, P>0.05$ ；² $q=18.13, P<0.05$ ；³ $q=21.20, P<0.05$ ；⁴ $q=1.747, P>0.05$ ；⁵ $q=8.748, P<0.05$ ；⁶ $q=12.96, P<0.05$ 。与 ISO-L 组比较，¹ $q=14.41, P<0.05$ ；² $q=17.48, P<0.05$ ；³ $q=7.001, P<0.05$ ；⁴ $q=11.21, P<0.05$ 。与 ISO-M 组比较，¹ $q=3.068, P>0.05$ ；² $q=4.210, P>0.05$ 。

图 5 灌服 28 d 各组小鼠骨痂微血管造影三维重建结果 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.5 Three-dimensional reconstruction of callus microangiography at 28 days after of administration ($\bar{x}\pm s, n=3$)

像重叠的缺点,使骨折断端得以清楚显示^[24]。本研究通过 X 线发现 ISO-H 组断端最先出现了肉芽组织,表明 ISO 可加速骨折愈合进程,术后 14 d 发现 Model 组和 ISO-L 组初步形成纤维连接,而 ISO-M 组与 ISO-H 组的纤维连接已开始矿化,ISO-H 组的矿化程度更高。术后 28 d 进一步通过 Micro-CT 观察到 Model 组和 ISO-L 组的骨折断端仍存在数量繁多的网织骨结构,随着 ISO 给药浓度的升高网织骨结构逐渐减少,网织骨结构变为坚实的密质骨,形成坚固的骨性连接,表明本实验中 ISO 加速编织骨形成及骨折区域重建的程度与 ISO 的给药浓度呈正相关。

骨痂形态学染色可进一步观察骨折断端不同组织的分布情况,比较各组间的断端塑形形态可以衡量其愈合进程的快慢。术后 28 d 时各组均进入骨痂重塑阶段,此时断端的编织骨应向板层骨逐渐转变,使骨折两端形成稳定的连接。板层骨在骨折断端分布状态反映骨折愈合进程,ISO-H 组已出现连续板层骨,骨折愈合进程超过其他组,表明本实验中 ISO 浓度的增加使骨折断端的愈合进程加快。

3.3 ISO 对骨痂微血管生成的影响

血液供应是否充足是影响骨折愈合速率的关键因素之一。骨折的发生导致血管断裂,血液供应不足,血供不足是骨折延迟愈合或不愈合的主要原因^[25]。新生血管可以持续为骨折区域带去氧气、营养物质和细胞因子,促进骨折愈合,为骨痂的生成及重建提供物质基础^[26]。本实验血管造影结果显示,由于 Model 组愈合进程较慢,仍处于新生血管的时期,已形成的血管较少,血管直径较小。ISO-L 组也处于血

管新生阶段,ISO-H 组愈合速度快,已形成丰富的血管,并且贯通骨折部位,血管已基本恢复正常状态,表明在 ISO 给药浓度升高,可加快新血管生成,新生的丰富血管为骨折处提供更多的氧气及营养物质等,进而加速骨折愈合进程。

3.4 本研究的局限性

本研究仍存在一定的局限性:(1)未探讨 ISO 治疗过程中不同时段骨折愈合情况的变化。(2)仅研究了 ISO 在 10~40 mg·kg⁻¹ 浓度范围内的治疗效果,未研究其他浓度的治疗效果。(3)ISO 促进骨折愈合及血管形成的具体作用机制仍未明确,可进一步研究骨折断端及血液中的骨代谢指标的表达情况。以上不足之处有待后续实验进一步探究。

综上所述,本研究结果表明 ISO 可以改善骨微结构,加速编织骨形成及骨折区域重建,加快新生血管生成速率,增粗骨痂微血管并增加密度,具有加速骨折愈合的效果,且在 10~40 mg·kg⁻¹ 浓度范围内呈浓度依赖性促进小鼠骨折及血管愈合。

参考文献

- [1] ZHOU L M, WU H J, GAO X, et al. Bone-targeting liposome-encapsulated salvianic acid A improves nonunion healing through the regulation of HDAC3-mediated endochondral ossification[J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14:3519-3533.
- [2] 谭亮, 张子韬, 邱旭升, 等. 四肢多发骨折并发胸腔积液的危险因素分析[J]. 中国骨伤, 2022, 35(7):692-697.
TAN L, ZHANG Z T, QIU X S, et al. Analysis of risk factors of multiple fractures of limbs complicated with pleural effusion[J]. China J Orthop Traumatol, 2022, 35(7):692-697. Chinese.
- [3] MARUYAMA M, RHEE C, UTSUNOMIYA T, et al. Modulation of the inflammatory response and bone healing[J]. Front Endocrinol, 2020, 11:386.

- [4] TIAN R F, ZHENG F, ZHAO W, et al. Prevalence and influencing factors of nonunion in patients with tibial fracture: systematic review and meta-analysis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1):377.
- [5] SALHOTRA A, SHAH H N, LEVI B, et al. Mechanisms of bone development and repair[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(11):696-711.
- [6] GLEASON L J, BENTON E A, ALVAREZ-NEBRED A M L, et al. FRAIL questionnaire screening tool and short-term outcomes in geriatric fracture patients[J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2017, 18(12):1082-1086.
- [7] 周武, 米博斌, 刘国辉. 胫骨骨折治疗的若干问题及思考[J]. *中国骨伤*, 2022, 35(6):503-505.
ZHOU W, MI B B, LIU G H. Issues and thoughts on treatment of tibial fracture[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2022, 35(6):503-505. Chinese.
- [8] HE J B, LI X J, WANG Z Y, et al. Therapeutic anabolic and anti-catabolic benefits of natural Chinese medicines for the treatment of osteoporosis[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:1344.
- [9] 向兴彤, 豆贾, 韩世峰, 等. 补阳还五汤对老年 Colles 骨折手法复位小夹板外固定后患者早期骨痂 X 线评分及血清碱性磷酸酶水平的影响[J]. *中国骨伤*, 2020, 33(3):241-246.
XIANG X T, DOU B, HAN S F, et al. Effect of Buyang Heanwu decoction (补阳还五汤, BYHWT) on X-ray evaluation of early callus and level of serum alkaline phosphatase in elderly patients with Colles fracture after manual reduction and joint external fixation[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2020, 33(3):241-246. Chinese.
- [10] 薛纯纯, 刘爽, 陈林, 等. 从肾脏调控骨的物质基础阐释“肾主骨”的科学内涵[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(3):1574-1578.
XUE C C, LIU S, CHEN L, et al. Exploration on the scientific connotation of "kidney governing bones" from the perspective of the kidney regulating the material basis of bone[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(3):1574-1578. Chinese.
- [11] 李想. 基于网络药理学探讨异补骨脂素治疗骨质疏松的作用机制[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021.
LI X. Discussion on the mechanism of isopsoralen in the treatment of osteoporosis based on network pharmacology[D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2021. Chinese.
- [12] REN Y L, SONG X, TAN L, et al. A review of the pharmacological properties of psoralen[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:571535.
- [13] 李想, 王剑, 岑利民, 等. 异补骨脂素影响骨代谢研究进展及其药物安全性[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(11):1637-1640.
LI X, WANG J, CEN L M, et al. Research progress of the effect of isopsoralen on bone metabolism and the drug safety[J]. *Chin J Osteop*, 2021, 27(11):1637-1640. Chinese.
- [14] 尚延春, 张海英, 柴巍巍. 异补骨脂素改善骨质疏松大鼠骨代谢的作用探讨[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(2):220-224.
SHANG Y C, ZHANG H Y, CHAI W W. Exploration of the effect of the effect of isopsoralen on bone metabolism in osteoporotic rats[J]. *Chin J Osteop*, 2021, 27(2):220-224. Chinese.
- [15] 温轩, 谢杨丽, 苏楠, 等. 小鼠胫骨稳定性骨折模型制作及评价[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(5):404-407.
WEN X, XIE Y L, SU N, et al. Preparation and evaluation of mouse model of stable tibial fracture[J]. *J Third Mil Med Univ*, 2013, 35(5):404-407. Chinese.
- [16] XIONG C, ZHANG Z Q, BAHT G S, et al. A mouse model of orthopedic surgery to study postoperative cognitive dysfunction and tissue regeneration[J]. *J Vis Exp*, 2018(132):56701.
- [17] GARRETT I R, GUTIERREZ G E, ROSSINI G, et al. Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats[J]. *J Orthop Res*, 2007, 25(10):1351-1357.
- [18] REN Y, SONG X, TAN L, et al. A review of the pharmacological properties of psoralen[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:571535.
- [19] PANAGIOTOPOULOU V C, DAVDA K, HOTH I H S, et al. A retrieval analysis of the Precice intramedullary limb lengthening system[J]. *Bone Joint Res*, 2018, 7(7):476-484.
- [20] CHEN F C, HUANG X W, YA Y S, et al. Finite element analysis of intramedullary nailing and double locking plate for treating extra-articular proximal tibial fractures[J]. *J Orthop Surg Res*, 2018, 13(1):12.
- [21] HO-SHUI-LING A, BOLANDER J, RUSTOM L E, et al. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives[J]. *Biomaterials*, 2018, 180:143-162.
- [22] 赵昊昱, 孔令驰, 杨凯, 等. 临床骨愈合评估方法研究进展[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2021, 23(11):1003-1007.
ZHAO H Y, KONG L C, YANG K, et al. Advances in clinical assessment of bone healing[J]. *Chin J Orthop Trauma*, 2021, 23(11):1003-1007. Chinese.
- [23] 施勤, 张文. 骨科常用实验技术方法[M]. 苏州大学出版社: 206.
SHI Q, ZHANG W. Common Experimental Techniques and Methods in Orthopaedics[M]. Soochow University Press: 206. Chinese.
- [24] XIONG Y, CHEN L, YAN C C, et al. The lncRNA Rhno1/miR-6979-5p/BMP2 axis modulates osteoblast differentiation[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(9):1604-1615.
- [25] LI L W, TANG P Y, ZHOU Z, et al. GIT1 regulates angiogenic factor secretion in bone marrow mesenchymal stem cells via NF- κ B/Notch signalling to promote angiogenesis[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(6):e12689.
- [26] RAMASAMY S K, KUSUMBE A P, SCHILLER M, et al. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:13601.

(收稿日期:2023-01-03 本文编辑:李宜)