丹参对 SD 大鼠闭合骨折早期 VEGF 表达的影响^{*}

★ 吴春华¹ 彭太平^{2**} 邹来勇² 刘胜才² 张玮¹ (1 江西中医学院 南昌 330006; 2 江西中医学院附院 南昌 330006)

摘要:目的:了解丹参促进骨折愈合的作用机制。方法:采用 SD 大鼠右胫骨中段骨折、小夹板外固定模型,造模 168 只,分为丹参组和空白组,分别于给药后 1、2、3、5、7、14、21 天七个时相点处置动物,抽血用 RT-PCR 测定血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 的表达。结果:丹参组给药后 VEGF mRNA 表达较对照组高。结论:丹参促进骨折愈合的机制可能与其促进骨折区组织 VEGF mRNA 表达有关。

关键词:丹参;早期骨折;血管内皮细胞生长因子;mRNA

中图分类号:R 965 **文献标识码:**A

如何缩短骨折或骨缺损愈合时间,减少并发症发生,是骨科界近年研究的热点。丹参为唇形科植物丹参的干燥根及根茎。具祛瘀止痛,活血通经,清心除烦之功效,能促进成骨细胞(OB)的增殖与分化,抑制破骨细胞的形成。但对其是否能促进骨折愈合的研究甚少,本文旨在探讨该药对骨折愈合的影响及机理,为进一步研究及临床应用提供理论基础。骨折愈合是骨科研究一大难点,其机理尚不是很清楚。活血化瘀是骨折早期的治则。在骨折愈合过程中血管的生成与血液的供应起非常重要的作用,这一观点得到公认。血管内皮细胞生长因子(VEGF)是诸多血管生长因子中最有力的细胞因子^[1]。本实验研究丹参对 SD 大鼠闭合骨折同时小夹板外固定骨折模型的早期血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,并探讨活血化瘀中药促进骨折愈合的分子生物学机理。

1 材料和方法

1.1 药品 丹参药材购自江西省中医院中药房。生理盐水、90%的乙醇购自江西省中医院西药房。

1.2 试剂 TRIZOL 试剂(华美);Taq 酶(上海生工);反转录酶(上海生工)。

1.3 动物及分组 SD 大鼠 168 只,SPF 级(无特定病原动物)。雌雄兼用,6~8 周龄,体重(320±10)g,购自南昌大学医学院动物研究中心(合格证号 2006006)。随机分成 2 组,每组 84 只,丹参组灌胃丹参,空白对照组灌胃生理盐水。

1.4 动物模型的建立 (1)造模支架的制作:支架主要由以下几部分组成:①由底部、双侧立柱以及上、中两块长方形铁板组成基本的框形构架,保证可滑动中轴的平衡;②滑动中轴上部套有 500 g 的圆形重锤,可沿中轴自由下落;当中有与中轴相连的托盘,重锤落于托盘上,托盘下垫有弹簧以减少中轴向下移位;中轴的下端装有钝口刀片;③正对刀片底板上装有可调节间距的铁砧,本实验间距为 2 cm,铁砧下放置大鼠后肢小腿,刀片位于正中,与骨干垂直,形成类似力学测

试时的三点弯曲装置。(2)模型制作:在氯氨酮(0.1 g/kg)加地西洋 5 mg/mL 腹腔注射麻醉后把大鼠后肢小腿人工固定于造模支架的铁砧上,暴力撞击点位于胫骨中段前方最高点处,助手提起重锤至 30 cm 高处,让其沿中轴自由落体通过撞击托盘,力传导至刀片上,撞击胫骨中段造成骨折。避免骨折移位,小夹板外固定,自由活动。

1.6 半定量 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 1)总 RNA 的提取:将 0.1 g 组织块放入经-80℃预冷的研钵内,加 TRIZOL 1 mL,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。2)逆转录(RT):取 1 μg RNA,加入 oligo(dt)180.5 μg,DEPC 水补足至 11 μL,70℃反应 5 分钟;依次加入 5×RT buffer 4 μL,10 mmol/L dNTP mix 2 μL rRNasin 20 U,DEPC 水补足至 19 μL,37℃反应 5 分钟;随即加入反转录酶(MMLV)200 U,42℃反应 60 分钟;最后 70℃终止反应 10 分钟,80℃保存,cDNA 备用。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 m MdNTP mix 0.5 μL,25 p mol 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,DEPC 水补足至 25 μL。扩增条件如下:94℃预变性 4 分钟;94℃30 秒,62℃30 秒,72℃30 秒,共 35 个循环,72℃延伸 10 分钟。引物序列:VEGF sense 5'-TGC ACC CAC GAC AGA AGGGA-3',VEGF antisense 5'-TCA CCG CCT TGGCTT GTC ACA T-3';HIF-1α sense 5'-GTG GATATG 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 AT T-3',β-actin anti-sense 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 (引物序列用 Primer5.0 软件处理系统设计,由北京赛百盛生

实验研究

* 基金项目:江西省科技厅课题(No. 2005IC0600700)

** 通讯作者:彭太平,教授,博士生导师,长期从事中医骨伤研究。Email:nc-pengtaiping@126.com

物工程公司合成)。

取5 PI PCR产物在含有1.5%琼脂糖的0.5 x TBE缓冲液中电泳,电压控制在100 V,时间控制在30~40分钟。用Gel Doc 2000型凝胶图像分析系统拍照,Gelworks ID In-termediat软件定量分析VEGF120、VEGF164表达量这和与

表1 骨折后骨折区组织 VEGF mRNA 的表达

	n	术后第1天	术后第2天	术后第3天	术后第5天	术后第7天	术后第14天	术后第21天
空白组	12	0.52±0.132	0.76±0.191	1.112±0.218	1.284±0.014	1.357±0.072	1.121±0.062	1.034±0.053
治疗组	12	0.49±0.101	0.66±0.154	0.913±0.177	1.603±0.166*	1.723±0.125*	1.435±0.233*	1.217±0.134*

注:两组比较,* $P<0.05$ 。

从表1可见 VEGF mRNA 在骨折24小时表达开始增强,丹参组1,2,3天 VEGF 表达较空白组弱,但与生理盐水差异无显著性。5,7,14,21天丹参组表达较空白组强,第5天、第7天 VEGF 表达达到峰值,与生理盐水组比较有显著性意义($P<0.05$)。

3 讨论

丹参含有多种脂溶性非甾类成分、丹参素及维生素E等。有扩血管作用、抗血栓形成以及改善微循环的作用。丹参通过活血化瘀作用改善骨折愈合早期局部和全身的血液循环,清除氧自由基,增进一氧化氮活性,调节组织的修复与再生的作用,使骨折局部瘀血减轻,局部血循环改善,为骨折愈合创造了良好的内环境,缩短骨折愈合的时间^[3]。同时,体内研究显示丹参能促进成骨细胞样细胞成熟,分泌胶原性物质和碱性磷酸酶,并使钙盐在胶原基质上沉淀,形成骨小结节,而丹参的有效部位(RS9403)可能通过TGF-R这类生长因子的影响促进骨折的愈合^[4]。

VEGF是1989年初被Ferrara等^[5,6]证实存在的一类糖蛋白,其具有增加身血管通透性,特异性地与血管内皮细胞受体结合,促进血管内皮细胞分裂和增殖,进而导致新生血管生成的生物学特性。VEGF是最有力的血管生成因子,其他血管生成因子的血管生成作用则全部或部分通过增强VEGF的表达及生成作用来实现^[7]。

本实验结果显示:在骨折愈合的不同阶段,骨痂中VEGF的表达强弱不同,并且丹参对其表达与影响也不同。VEGF在骨折前24小时内表达开始增强,5~7天到达峰值。2周后表达开始减弱。骨折后前3天,生理盐水组VEGF表达强于丹参组,而5,7,14,21天丹参组VEGF表达明显强于生理盐水组。骨折后,由于血供的中断,氧分压降低,低氧强烈诱导VEGF的表达,局部的巨噬细胞、血小板、软骨细胞及间充质细胞通过旁分泌方式产生VEGF,使之与其他血管生长因子协同促进血管内皮细胞的增殖、分化和血管形成。骨折后前3天,由于丹参对骨折局部血液循环的改善,使局部血供好于生理盐水组,缺氧情况得到改善,从而暂时相对生理盐水组对VEGF表达的诱导较弱。故出现骨折后3天内VEGF的表达稍弱于生理盐水组。随着中药丹参应用,5,7,14,21天组丹参组VEGF表达明显强于生理盐水组,这可能是由于丹参直接作用于参与骨折修复功能旺盛的成骨细胞、纤维的母细胞、血管内皮细胞等,使其VEGF的表达增强;加上随着骨区血供的改善,损伤修复所需的营养物

β -actin表达量的比值。

1.7 统计学处理 所有计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均值比较采用独立样本 t 检验,由统计软件SPSS 11.5进行统计。检验标准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

质与生骨因子等输送到骨折部位,同时又把代谢产物带离骨折区,从而使VEGF mRNA的表达量达到高峰。另外,有文献报道VEGF在促进血管内皮细胞的增殖、分化和血管形成与其他生长因子有强烈的协同作用^[8],这样形成通过VEGF促进血管生成的良性循环。本实验结果提示2周后表达开始减弱,主要可能是由于骨折愈合的血管已生成,缺氧环境的改善,血管内皮细胞、纤维母细胞等促进血供的使命逐渐减弱,所以VEGF的表达也随之减弱。故此,在骨痂形成期应适时转向续损接骨为主,避免过多使用活血化瘀药,破坏其相对稳定的代偿机制。本实验VEGF表达的高峰在1周左右,此时正好符合病理学上组织愈合过程中的血管重建阶段,所以VEGF的血管诱导活性除对此期的血管重建具有十分重要的意义外,还对骨折愈合产生重要影响。本实验也证实,骨折早期丹参汤促进VEGF表达增强,说明丹参可能通过促进VEGF表达,促进血管再生与重建,参与了骨折愈合的修复过程。

参考文献

- [1]Pufe T, Wilde mann 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 ste in therat [J]. Cell Tissue Res, 2002, 309(3): 387~392
- [2]刘涛, 冉德洲. 活血化瘀、补肾益气中药对大鼠骨折愈合的TGF- α 的影响[J]. 成都体育学院学报, 2002, 28(1): 92~96
- [3]沈映君. 中药病理学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000, 128
- [4]史炜编, 符诗聪, 杜宁, 等. 丹参有效部位对骨折愈合过程中胶原基因表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(4): 269
- [5]张建鹏, 仲燕, 任绪义, 等. 镭诱导大鼠睾丸三种类型细胞和肝脏金属硫蛋白基因表达的研究[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(2): 184~187
- [6]Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 16(2): 851~858
- [7]Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, et al. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis [J]. J Surg Res, 1997, 67(2): 147~154
- [8]Sykaras N, Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? [J]. J Oral Sci, 2003, 45(2): 57~73

(收稿日期:2007-01-11)