

接骨方含药血清孵育体外培养骨痂中破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞生长的影响

尹拥军¹ 王炳南² 林 勇²

(1 南海经济开发区人民医院小塘分院,佛山,528222; 2 广州中医药大学,广东,510405)

摘要 目的:观察接骨方含药血清对体外培养的破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞生长的影响。方法:取新西兰家兔骨折造模骨痂进行体外培养,制备接骨方含药血清,用接骨方含药血清孵育新西兰家兔骨痂,进行破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞镜下形态学观察,观察骨痂中软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞的数目。结果:术后10 d的新西兰家兔骨痂镜下可见细胞开始从组织块周围爬出;染色后可见胞浆内出现黄褐色颗粒,胞核饱满,核仁清晰;术后17 d观察组骨痂可见成骨细胞和软骨细胞的增殖明显,破骨细胞增殖相对成骨细胞和软骨细胞较慢,术后24 d、31 d时可见骨痂中破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞均增殖速度变缓,与对照组相比,术后10 d、17 d、24 d、31 d观察组骨痂中成骨细胞和软骨细胞的增殖情况明显优于对照组;与对照组相比,术后10 d、17 d、24 d、31 d观察组骨痂中破骨细胞数量少于对照组,2组间差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组相比,术后10 d、17 d、24 d、31 d观察组骨痂中成骨细胞和软骨细胞数目均多于对照组,2组有统计学意义($P < 0.05$)。结论:接骨方含药血清可促进新西兰家兔成骨细胞和软骨细胞增殖,具有促进骨组织的再生的功效。

关键词 接骨方含药血清;新西兰家兔骨痂;破骨细胞;成骨细胞;软骨细胞;分化

The Effect of Jiegufang Drug Serum on Callus Osteoclasts, Osteoblasts and Chondrocytes in Vitro Growth

Yin Yongjun¹, Wang Bingnan², Lin Yong²

(1 Small Pond Branch of People's Hospital in the south China Sea Economic Development Zone, Foshan 528222, China;
2 Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Jiegufang drug serum on callus osteoclasts, osteoblasts and chondrocytes in vitro growth. **Methods:** To culture New Zealand rabbits fracture modeling callus in vitro and prepare Jiegufang drug serum to incubate New Zealand rabbits callus. The morphological shape and the number of callus osteoclasts, osteoblasts and chondrocyte were observed. **Results:** After 10 d of surgery, cells began to climb out of the surrounding tissue blocks. After staining, brown granules in the cytoplasm, nucleus full and clear nucleolus could be seen. After 17 d of surgery, it can be seen that the proliferation of osteoblasts and chondrocytes grew fast and osteoclasts grew slow in the observation group. After 24 d, 31 d of surgery, osteoclasts, osteoblasts and chondrocytes grew slower. To compare with the control group, the the proliferation of osteoblasts and chondrocyte were faster than the control group after 10 d, 17 d, 24 d, 31 d of surgery. After surgery of 10 d, 17 d, 24 d, 31 d, the number of osteoclasts in the observation group was lesser than the control group, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with the control group, the number of osteoblasts and the chondrocytes in the observation group were more than the control group after 10 d, 17 d, 24 d, 31 d of surgery, and the difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Jiegufang drug serum can promote New Zealand rabbits osteoblasts and chondrocytes proliferation, and thus to promote the regeneration of bone tissue.

Key Words Jiegufang drug serum; New Zealand rabbits callus; Osteoclasts; Osteoblasts; Chondrocytes; Differentiation

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.04.028

骨折的愈合过程是一个复杂而精细的器官修复过程,在某种程度上反应了骨骼的发育过程^[1]。因而对骨痂器官的研究可以更好地了解骨骼的发育的动态变化,更直接地了解骨折愈合过程中骨细胞的变化。传统中药具有加快骨折愈合的功效,接骨方以当归、赤芍、甘草调和营血,土鳖虫、自然铜、接骨木、骨碎补、续断活血补肾接骨,血竭被誉为伤

科之圣药,具有祛瘀生新之作用^[2]。在骨折早期,可增加生地凉血,猪苓、赤小豆等利水消肿^[3]。本实验观察接骨方含药血清对体外培养新西兰家兔骨痂中破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞生长的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 5~6月龄新西兰家兔4只,均为雄性,体重2.2~2.7 kg,由广州中医药大学基础医学

院科研实验中心提供(合格证号:scxk(广)字 2014~0006号)。

1.2 骨折造模分组 实验用新西兰家兔用 3% 戊巴比妥 1 mL/kg 经耳缘静脉注射麻醉后,剪去双前臂兔毛、碘伏消毒,铺无菌单,切开皮肤,小心分离出肌肉、血管、神经等组织,暴露新西兰家兔桡骨,用自制手锯在桡骨中部横向锯成 3.0 mm 的骨缺损骨折,不固定,立即缝合皮肤,并包扎伤口^[4]。术后庆大霉素 4 mg/kg 肌注 3 d 预防感染。术后 24 h 内,兔子均可自由活动,单笼喂养。4 只兔子随机标记为 A、B、C、D,分别对应于术后第 7 d、14 d、21 d、28 d 刮取左前臂骨折处骨痂组织,做好标记,作为观察组,所有操作过程均在无菌下进行,取出的骨痂均用无菌的无血清 BGJ 液冲洗后,种植至器官培养系统中^[5],均培养 3 d;同只兔子于其左前臂骨痂去除后 3 d,即分别为 10 d、17 d、24 d、31 d 刮取右前臂骨痂,做好标记,作为对照组,拟切片后光镜下观察。记录后第 7 d、14 d、21 d、28 d 新西兰家兔骨折及骨痂情况,包括骨痂的颜色、量的多少,骨折的位置、类型,兔子一般情况^[6]。

1.3 实验药物 中药接骨方包含接骨木、土鳖虫、自然铜、骨碎补、血竭等 11 味中药。取上述中药浸泡于 500 mL 冷水中约 30 min,之后用武火煎开,再用文火煎煮 30 min,取汁,药渣再加冷水 300 mL,武火煎开后,再以文火煎煮 30 min,取汁;将两次药汁合并再以文火煎煮至 100 mL,相当于生药量 1.55 g/mL^[7]。制备好后放 4 °C 冰箱保存,备用。

1.4 主要试剂和仪器 DMEM 培养基(GIBCO)、地塞米松(GIBCO)、胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物工程有限公司)、 β -甘油磷酸钠(SIGMA)、胰蛋白酶(GIBCO)、SW~CJ~LF 超净工作台(苏州安泰公司)、二氧化碳培养箱(SANYO)、离心机(湘仪)、相差倒置显微镜等。

2 方法

2.1 接骨方含药血清制备 再另选取兔子 2 只(标准同前),接骨方一次灌胃给药(相当于 15 次日给药量)。灌胃量按 10.4 mL/kg 体质量(生药量 15.5 g/mL)。新西兰家兔给药 1 次后 0.5 h 在清醒状态下在颈动脉采血,立即无菌分离出血清^[8]。在 56 °C 下,灭活补体,30 min 后在超净工作台使用 0.22 μ m 微孔滤膜滤器过滤除菌,分装, -20 °C 冻存备用。

2.2 骨痂体外培养 将骨痂剥离后,用 PBS + 抗生素(硫酸庆大霉素、链霉素)的溶液漂洗 2 次后,将每个骨痂样本均匀切成 1 mm 大小,放进 24 孔的一次

性组织培养板中的 3 个独立的细胞培养孔中,每个孔中含有 1 mm 的 BGJb 基质(由 25 mmol HEPES buffer, 5 μ g/mL 维生素 C, 1% 丙酮酸钠, 5% 胎牛血清和硫酸庆大霉素、链霉素组成)。培养在 37 °C、95% 的空气、5% CO₂ 的条件下进行。每 24 h 后更换一次培养基,72 h 后培养结束。每个组织样本的 3 个培养孔中,一个加单独的培养基^[9]。

2.3 新西兰家兔骨痂的镜下形态学观察 将观察组及对照组骨痂样本用无 Ca~Mg 的 PBS 冲洗后,用 4% 多聚甲醛固定,用甲酸脱钙,石蜡包埋,5 μ m 切片,苏木素和伊红染色^[10],在显微镜下动态观察新西兰家兔破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞的生长情况及形态特征。

2.4 将观察组及对照组新西兰家兔右前臂骨痂和培养后的骨痂样本 用无 Ca~Mg 的 PBS 冲洗后,用 4% 多聚甲醛固定,用甲酸脱钙,石蜡包埋,5 μ m 切片,苏木素和曙红染色^[10]。在 400 倍显微镜下观察,每个标本随机选取 10 个视野,观察每个视野中软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞数,计算出单位面积(mm²)软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞数。

2.5 数据分析方法 应用 SPSS 16.0 版本统计软件进行分析,单因素方差分析,采用 *t* 检验和卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 2 组新西兰家兔破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞的形态学观察 新西兰家兔骨痂术后 10 d 的新西兰家兔骨痂镜下可见细胞开始从组织块周围爬出;染色后可见胞浆内出现黄褐色颗粒,胞核饱满,核仁清晰;术后 17 d 观察组骨痂可见成骨细胞和软骨细胞的增殖明显,破骨细胞增殖相对成骨细胞和软骨细胞较慢,术后 24 d、31 d 时可见骨痂中破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞均增殖速度变缓。见图 1。

3.2 2 组新西兰家兔软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞数量的检测 与对照组相比,术后 10 d、17 d、24 d、31 d 观察组骨痂中成骨细胞和软骨细胞的增殖情况明显优于对照组;与对照组相比,术后 10 d、17 d、24 d、31 d 观察组骨痂中破骨细胞数量少于对照组,2 组间差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组相比,术后 10 d、17 d、24 d、31 d 观察组骨痂中成骨细胞和软骨细胞数目均多于对照组,2 组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

4 讨论

骨折的愈合过程是一个复杂而精细的器官修复过程,在某种程度上反应了骨骼的发育过程。因而

对骨痂器官的研究可以更好地深入了解骨骼的发育的动态变化,更直接地了解骨折愈合过程中骨细胞的变化^[11]。多学科渗透性研究,特别是分子生物学的介入,使从微观研究骨折愈合过程的视野更广阔。骨折愈合的过程是一个高度复杂和有序的精微过程,众多的调节生长因子起着非常重要的作用^[12]。这些生长因刺激细胞的分化代谢,使因子与因子之间、细胞与因子之间的信息相互作用,从而完成骨折愈合修复这个复杂的过程。由于骨痂基质中含有大量的调节生长因子,基质又是骨痂细胞分泌的产物,因而基质与生长因子与细胞之间的信息联系在骨愈合中占有重要的地位^[13]。目前将成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞的变化作为一种观测指标,间接反映细胞的代谢、分化,研究生长因子等的成骨作用机理等等^[14]。在骨折的愈合过程中,骨痂的性质发生了变化其成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞的数量必然也发生变化,成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞的变化与骨折愈合过程中组织形态学上的分期具有对应关系。

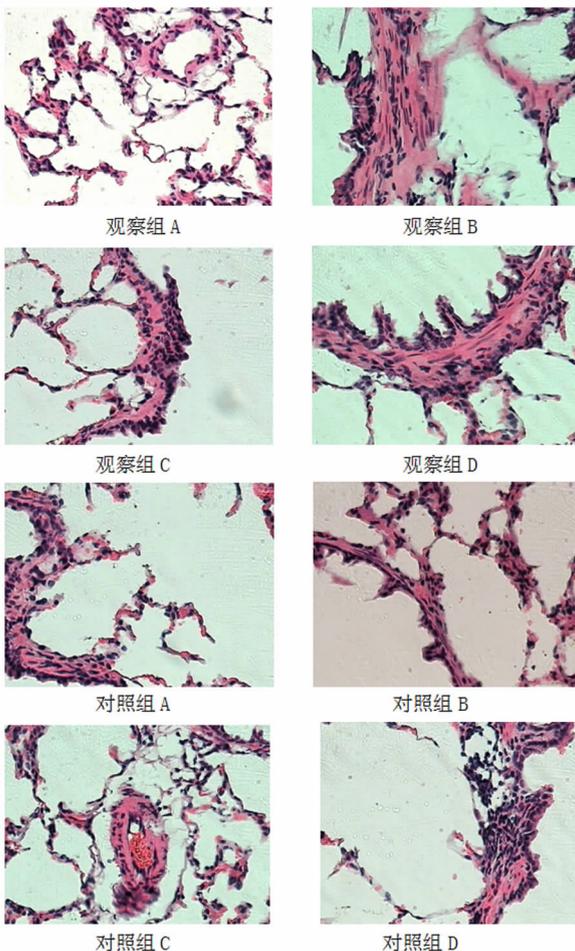


图1 2组新西兰家兔破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞的形态学观察(×100)

表1 各组单位面积(mm²)软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞数量的检测结果

分组	破骨细胞数(个)	软骨细胞数(个)	成骨细胞数(个)	
观察组	A	2.12 [△]	8.4*	11.5*
	B	4.9 [△]	25.7*	39.4*
	C	6.2 [△]	28.9*	52.1*
	D	7.1 [△]	29.7*	61.4*
对照组	A	1.3	4.1	9.1
	B	5.7	9.8	28.3
	C	6.2	13.5	31.4
	D	7.9	14.1	33.1

注:与对照组相比,* $P < 0.05$ 。与对照组相比, $^{\Delta}P > 0.05$ 。

成骨细胞作为骨更新活动中的重要功能细胞,是骨发生和骨形成的物质基础^[15-17]。正常生理状态下,成骨细胞的骨形成与破骨细胞的骨吸收之间保持动态平衡,破骨细胞的活动亦受到成骨细胞的调控^[18-21]。术后10 d的新西兰家兔骨痂镜下可见细胞开始从组织块周围爬出;染色后可见胞浆内出现黄褐色颗粒,胞核饱满,核仁清晰;术后17 d观察组骨痂可见成骨细胞和软骨细胞的增殖明显,破骨细胞增殖相对成骨细胞和软骨细胞较慢,术后24 d、31 d时可见骨痂中破骨细胞、成骨细胞和软骨细胞均增殖速度变缓,与对照组相比,术后10 d、17 d、24 d、31 d观察组骨痂中成骨细胞和软骨细胞的增殖情况明显优于对照组;与对照组相比,术后10 d、17 d、24 d、31 d观察组骨痂中破骨细胞数量少于对照组,2组间差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组相比,术后10 d、17 d、24 d、31 d观察组骨痂中成骨细胞和软骨细胞数目均多于对照组,2组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

本实验用接骨方含药血清孵育骨痂,观察新西兰家兔骨痂中软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞的形态与数量,结果表明接骨方含药血清能明显促进新西兰家兔骨痂中软骨细胞、成骨细胞形成和生长,说明接骨方其能促进骨组织再生。但其具体机制尚不明确,还需要进一步研究来证实。

参考文献

[1] García-Hernández A, Arzate H, Gil-Chavarría I, et al. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells[J]. Bone, 2012, 50(1): 276-288.
 [2] 陆继梅. 自拟接骨方治疗四肢长骨骨折内固定术后延迟愈合32例[J]. 中国药业, 2015, 24(2): 77-79.
 [3] 张媛, 何延辉, 王炳南, 等. 中药接骨方对骨折愈合过程中骨粘连蛋白信使核糖核酸表达的调控[J]. 中医正骨, 2012, 24(9): 11-14.
 [4] Skaliczki G, Schandl K, Weszl M, et al. Serum albumin enhances bone

- healing in a nonunion femoral defect model in rats: a computer tomography micromorphometry study[J]. *International orthopaedics*, 2013, 37(4):741-745.
- [5] Hussein K A, Zakhary I E, Hailat D, et al. Delayed versus immediate reconstruction of mandibular segmental defects using recombinant human bone morphogenetic protein 2/absorbable collagen sponge[J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2013, 71(6):1107-1118.
- [6] Pountos I, Georgouli T, Henshaw K, et al. Release of growth factors and the effect of age, sex, and severity of injury after long bone fracture: A preliminary report[J]. *Acta orthopaedica*, 2013, 84(1):65-70.
- [7] Ming L G, Chen K M, Xian C J. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling[J]. *Journal of cellular physiology*, 2013, 228(3):513-521.
- [8] Nadeem D, Kiamehr M, Yang X, et al. Fabrication and in vitro evaluation of a sponge-like bioactive-glass/gelatin composite scaffold for bone tissue engineering[J]. *Materials Science and Engineering*, 2013, 33(5):2669-2678.
- [9] Gasiorowska J, Teisseyre A, Uryga A, et al. The influence of 8-prenyl-naringenin on the activity of voltage-gated kv1.3 potassium channels in human jurkat t cells[J]. *Cellular & molecular biology letters*, 2012, 17(4):559-570.
- [10] 黄伟忠, 张莉, 唐景云, 等. 尼古丁对大鼠骨折愈合和骨痂血管内皮生长因子表达的影响[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(23):3112-3113.
- [11] Swarnkar G, Sharan K, Siddiqui J A, et al. A naturally occurring naringenin derivative exerts potent bone anabolic effects by mimicking oestrogen action on osteoblasts[J]. *British journal of pharmacology*, 2012, 165(5):1526-1542.
- [12] Mizuno M, Kobayashi S, Takebe T, et al. Brief report: Reconstruction of joint hyaline cartilage by autologous progenitor cells derived from ear elastic cartilage[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(3):816-821.
- [13] Hoenic E, Leicht U, Winkler T, et al. Mechanical properties of native and tissue-engineered cartilage depend on carrier permeability: a bioreactor study[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2013, 19(13-14):1534-1542.
- [14] Pountos I, Georgouli T, Henshaw K, et al. Release of growth factors and the effect of age, sex, and severity of injury after long bone fracture: A preliminary report[J]. *Acta orthopaedica*, 2013, 84(1):65-70.
- [15] 程婉, 许兵, 应航, 等. 抗骨质疏松中药对成骨细胞作用的研究进展[J]. *中医正骨*, 2012, 24(2):65-68.
- [16] 吕玉明, 程立明, 裴国献, 等. 骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化的实验研究[J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(9):1401-1404.
- [17] 王昌, 汤旭磊, 陈克明, 等. 葛根素在体外对成骨细胞增殖和分化的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(33):6102-6106.
- [18] 马小妮, 葛宝丰, 陈克明, 等. 淫羊藿苷调节成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收的机制[J]. *中国医学科学院学报*, 2013, 35(4):432-438.
- [19] 曾展鹏, 王海彬, 黄枫, 等. 桃红四物汤对骨痂“成骨-破骨细胞共育系”中蛋白的影响[J]. *中药材*, 2012, 35(3):456-461.
- [20] 陈熙, 吴伟, 孙忠广, 等. 应力调节经典 Wnt 信号通路影响成骨分化研究进展[J]. *中国运动医学杂志*, 2014, 33(6):616-622.
- [21] 严启新, 赵文娟, 殷明, 等. 骨新康对大鼠成骨细胞及破骨细胞活性的研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(10):772-775.
- (2015-03-11 收稿 责任编辑: 张文婷)
- (上接第 670 页)
- [10] 叶新源. 心元胶囊联合辛伐他汀对冠心病二级预防临床研究[J]. *中国当代医药*, 2009, 16(24):40-41.
- [11] 王传锋, 贾明兰. 他汀类药物防治动脉粥样硬化的应用[J]. *中国现代医生*, 2008, 46(10):29-31.
- [12] 明阳, 李红心, 丰世慧. 心元胶囊治疗冠心病心绞痛临床观察[J]. *中国中医急症*, 2013, 15(1):16-17.
- (2015-11-05 收稿 责任编辑: 张文婷)