

接骨丸对 SD 骨折大鼠血清钙、ALP、CD3、CD44 表达的影响

金 朗¹ 王 雪² 王炳强³

(1 河北省沧州市人民医院药学部, 沧州, 061001; 2 河北省沧州医学高等专科学校基础医学部, 沧州, 061001;

3 河北省沧州市妇幼保健院药剂科, 沧州, 061001)

摘要 目的:探讨接骨丸对 SD 骨折大鼠血清钙、ALP、CD3、CD44 表达的影响。方法:SD 大鼠 40 只按照数字随机表法将其分为 4 个组(对照组、模型组、低剂量组、高剂量组),每组 10 只。模型组、低剂量组和高剂量组给予造模。对照组和模型组大鼠给予等量生理盐水灌胃;低剂量组灌胃浓度为 0.4 g/kg 浓度的接骨丸溶液、高剂量组灌胃浓度为 1.6 g/kg 的接骨丸溶液。结果:模型组、低剂量组、高剂量组治疗 1 周和 2 周血清钙、ALP、CD3、CD44 水平低于对照组,模型组、低剂量组治疗 3 周血清钙、ALP、CD3、CD44 水平低于对照组,而高剂量组治疗 3 周血清钙、ALP、CD3、CD44 水平高于对照组($P < 0.05$);低剂量组和高剂量组治疗 4 周血清钙、ALP、CD3、CD44 水平高于对照组和模型组,且高剂量组治疗 4 周血清钙、ALP、CD3、CD44 水平高于低剂量组($P < 0.05$)。结论:接骨丸可能通过增加血清钙、ALP、CD3、CD44 表达水平,促进骨折愈合。

关键词 接骨丸;SD 骨折大鼠;血清钙;ALP;CD3;CD44

Effect of Jiegu Pill on Expression of Serum Calcium, ALP, CD3, CD44 SD in Rats with Fracture

Jin Long¹, Wang Xue², Wang Bingqiang³

(1 Department of Pharmacy, Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061001, China; 2 Department of Basic Medicine, Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061001, China; 3 Department of Pharmacy, Cangzhou Maternal and Child Health Care Hospital, Cangzhou 061001, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of Jiegu Pill on the expression of serum calcium, ALP, fracture CD3, CD44 in SD rats with fracture. **Methods:** Forty SD rats were randomly divided into four groups (control group, model group, low dose group, high dose group) with 10 rats in each group. Model group, low dose group and high dose group were given. Rats in the control group and the model group were given equal volume of ordinary saline and the low dose group was intragastrically administrated with Jiegu Pill solution of 0.4 g/kg concentration, while rats in the high dose group was intragastrically administrated with Jiegu Pill of 1.6 g/kg solution. **Results:** The serum calcium, ALP, CD3, CD44 levels of the model group, low dose group, high dose group a week and 2 weeks later after the treatment were lower than those in the control group. serum calcium, ALP, CD3, CD44 levels of the model group and the low dose group 3 weeks after the treatment were lower than those in the control group and the high dose group, but the levels of serum were higher in the high dose group compared to those of the control group 3 weeks after the treatment ($P < 0.05$). The levels of serum calcium, ALP, CD3 and CD44 were higher in the high-dose group and low-dose group than those in the control group and the model group after 4 weeks treatment and the high-dose group was superior to the low-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Jiegu Pill may increase the expression of serum calcium, ALP, CD3, CD44 and promote fracture healing.

Key Words Jiegu Pill; SD fracture rats; Serum calcium; ALP; CD3; CD44

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.12.058

骨折是常见的一种临床骨科疾病。流行病学调查发现随着车祸、高处坠落的不断上升,从而使得四肢骨折发病率呈上升趋势^[1-2]。骨折后容易发生不同程度的肿胀和疼痛等症状,且容易导致骨折不愈合等,严重影响患者日常生活和预后^[3-4]。骨折

愈合是极其复杂的一个生物学修复过程,受诸多因素的影响^[5]。现代医学认为骨折愈合以及治疗研究已逐渐进入生物学和细胞分子水平,为骨折的理论研究及应用研究奠定了良好的基础^[6]。本研究旨在分析接骨丸对 SD 骨折大鼠血清钙、ALP、CD3、CD44

表达的影响,为临床提供一定指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料 SD 大鼠 40 只,体重 100 ~ 120 g,雌雄各半。适应性饲养 1 周,自由饮食、饮水,维持室温为 23 ~ 25 ℃,相对湿度 70%。按照《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂中接骨丸质量标准于实验室接骨丸,接骨丸(河北万岁药业有限公司;生产批号:131201),粉碎至一定细度,备用。

1.2 实验分组 按照随机数字表法将 SD 大鼠分为 4 个组(对照组、模型组、低剂量组、高剂量组),每组 10 只。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备^[7] 各组大鼠均以 100 g/L 水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司生产;生产批号:37022673;300 mg/kg)腹腔注射麻醉动物,给大鼠以俯卧位进行固定,常规消毒,无菌操作,然后采用外侧切口,经股前、外侧肌间隔分离至股骨,除对照组外,其余各组大鼠采用低速牙科钻在股骨中断切断股骨,再利用克氏针髓腔逆行固定,逐层缝合,再给以无菌包扎,均手术成功。对照组不切断股骨,其余步骤同上。

1.3.2 给药方法 对照组和模型组大鼠给予等量生理盐水灌胃;低剂量组灌胃浓度为 0.4 g/kg 浓度的接骨丸溶液(相当于临床用药的 8 倍)、高剂量组灌胃浓度为 1.6 g/kg 的接骨丸溶液(相当于临床用药的 32 倍)。每组小鼠均按照 1 mL/100 g(小鼠体重)剂量给药。

1.4 观察指标 1)观察各组大鼠组织病理情况;2)观察各组大鼠于治疗 1 周、2 周、3 周、4 周血清钙水平变化,于大鼠眼底取血,制备血清,测定血清钙含量;3)观察各组大鼠于治疗 1 周、2 周、3 周、4 周血清 ALP 水平变化;于大鼠眼底取血,制备血清,测定 ALP 含量;4)观察各组大鼠 CD3 表达水平变化;5)观察各组大鼠 CD44 表达水平比较。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,采用独立样本 *t* 检验组间计量资料,多组采用双因素方差分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 X 线片观察大鼠骨折及病理组织 模型组和各剂量组大鼠术后骨折端断为血肿组织所填充,且于大鼠骨折后 1 周形成肉芽组织,于大鼠骨折后 2 周骨折端形成大量纤维性骨痂,于大鼠骨折后 3 周有散在骨小梁形成,于大鼠骨折后 4 周能够清晰

可见骨小梁,且各剂量组于 4 周明显优于模型组。对照组大鼠骨质结构均正常。X 线片观察大鼠骨折情况见图 1,病理组织变化情况见图 2。

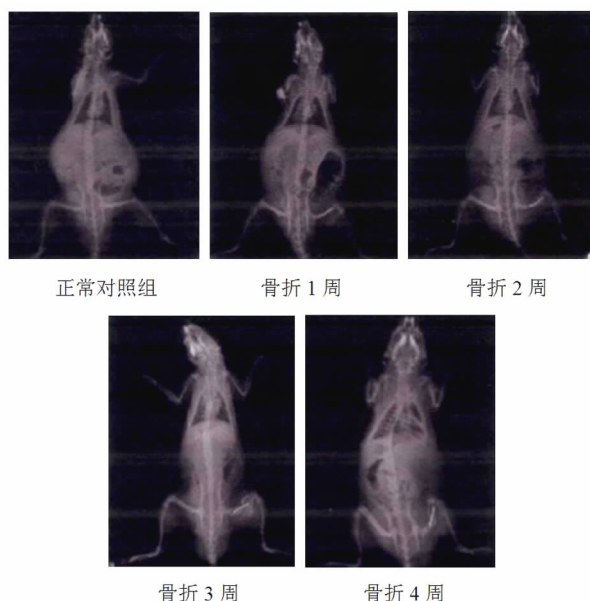


图 1 X 线片大鼠骨折愈合情况

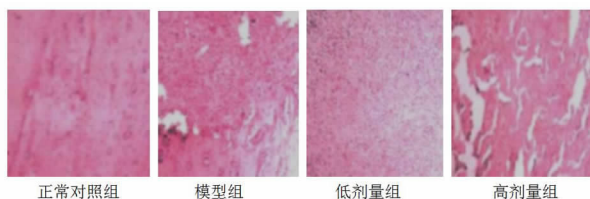


图 2 病理组织变化(×400)

2.2 各组大鼠血清钙水平比较 模型组、低剂量组、高剂量组治疗 1 周和 2 周血清钙水平低于对照组,模型组、低剂量组治疗 3 周血清钙水平低于对照组,而高剂量组治疗 3 周血清钙水平高于对照组($P < 0.05$);低剂量组和高剂量组治疗 4 周血清钙水平高于对照组和模型组,且高剂量组治疗 4 周血清钙水平高于低剂量组($P < 0.05$)。说明接骨丸可明显增加血清钙水平,且呈剂量依赖性。见表 1。

2.3 各组大鼠 ALP 水平比较 模型组、低剂量组、高剂量组治疗 1 周和 2 周血清 ALP 水平低于对照组,模型组、低剂量组治疗 3 周血清 ALP 水平低于对照组,而高剂量组治疗 3 周血清 ALP 水平高于对照组($P < 0.05$);低剂量组和高剂量组治疗 4 周血清 ALP 水平高于对照组和模型组,且高剂量组治疗 4 周血清 ALP 水平高于低剂量组($P < 0.05$)。说明接骨丸可明显增加血清 ALP 水平,且呈剂量依赖性。见表 2。

2.4 各组大鼠 CD3 表达水平比较 模型组、低剂量组、高剂量组治疗 1 周和 2 周 CD3 表达水平低于

对照组,模型组、低剂量组治疗 3 周 CD3 表达水平低于对照组,而高剂量组治疗 3 周 CD3 表达水平高于对照组($P<0.05$);低剂量组和高剂量组治疗 4 周 CD3 表达水平高于对照组和模型组,且高剂量组治疗 4 周 CD3 表达水平高于低剂量组($P<0.05$)。说明接骨丸可明显增加 CD3 表达水平,且呈剂量依赖性。见表 3。

2.5 各组大鼠 CD44 表达水平比较 模型组、低剂

量组、高剂量组治疗 1 周和 2 周 CD44 表达水平低于对照组,模型组、低剂量组治疗 3 周 CD44 表达水平低于对照组,而高剂量组治疗 3 周 CD44 表达水平高于对照组($P<0.05$);低剂量组和高剂量组治疗 4 周 CD44 表达水平高于对照组和模型组,且高剂量组治疗 4 周 CD44 表达水平高于低剂量组($P<0.05$)。说明接骨丸可明显增加 CD3 表达水平,且呈剂量依赖性。见表 4。

表 1 各组大鼠血清钙水平比较($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	鼠数	治疗 1 周	治疗 2 周	治疗 3 周	治疗 4 周
对照组	10	2.93±0.13	2.96±0.15	3.01±0.37	3.05±0.31
模型组	10	2.04±0.10 [*]	2.17±0.17 [*]	2.28±0.20 [*]	2.40±0.28 [*]
低剂量组	10	2.23±0.11 ^{*△}	2.56±0.21 ^{*△}	2.72±0.23 ^{*△}	3.24±0.34 ^{*△}
高剂量组	10	2.35±0.14 ^{*△▲}	2.78±0.29 ^{*△▲}	3.25±0.31 ^{*△▲}	3.59±0.39 ^{*△▲}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与低剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠 ALP 水平比较($\bar{x}\pm s$,IU/L)

组别	鼠数	治疗 1 周	治疗 2 周	治疗 3 周	治疗 4 周
对照组	10	48.29±5.24	50.38±5.49	51.47±6.32	50.28±4.17
模型组	10	27.34±5.87 [*]	24.92±6.12 [*]	34.19±5.29 [*]	22.67±6.27 [*]
低剂量组	10	32.19±4.69 ^{*△}	37.28±4.57 ^{*△}	45.29±5.13 ^{*△}	53.74±4.28 ^{*△}
高剂量组	10	36.45±5.13 ^{*△▲}	41.68±4.82 ^{*△▲}	54.98±4.83 ^{*△▲}	58.91±4.35 ^{*△▲}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与低剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠 CD3 表达水平比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	鼠数	治疗 1 周	治疗 2 周	治疗 3 周	治疗 4 周
对照组	10	43.49±4.29	43.12±4.30	45.02±4.37	44.10±4.72
模型组	10	23.18±6.24 [*]	21.81±5.02 [*]	20.89±4.29 [*]	18.18±3.98 [*]
低剂量组	10	27.18±5.92 ^{*△}	31.28±5.46 ^{*△}	38.27±4.87 ^{*△}	49.28±5.13 ^{*△}
高剂量组	10	31.82±5.21 ^{*△▲}	36.78±5.71 ^{*△▲}	49.82±4.56 ^{*△▲}	54.28±5.38 ^{*△▲}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与低剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

表 4 各组大鼠 CD44 表达水平比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	鼠数	治疗 1 周	治疗 2 周	治疗 3 周	治疗 4 周
对照组	10	47.38±5.42	45.89±4.59	46.52±5.14	47.82±4.29
模型组	10	23.32±3.28 [*]	24.35±3.79 [*]	20.13±4.31 [*]	15.38±3.52 [*]
低剂量组	10	26.39±3.59 ^{*△}	30.18±3.24 ^{*△}	37.84±4.17 ^{*△}	52.47±5.12 ^{*△}
高剂量组	10	29.38±2.98 ^{*△▲}	2.78±0.29 ^{*△▲}	51.21±3.98 ^{*△▲}	58.13±4.78 ^{*△▲}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与低剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

3 讨论

骨折主要是指骨的完整性及连续性失去,且包括局部软组织和血管的损伤。中医学认为肢体损于外,则气血伤于内,致血脉离经忘行,恶血留滞,形成血瘀,从而造成气血运行失常,瘀积不散,为肿为痛,故而应以活血化瘀、消肿止痛、续筋接骨为主^[8-10]。接骨丸主要成分为甜瓜子、土鳖虫、地龙、桂枝(炒)、郁金、骨碎补、续断、自然铜(煅醋淬)、马钱子粉。其中甜瓜子具有消瘀散结功效,土鳖虫具有破

血逐瘀、续筋接骨功效,地龙具有清热平肝、熄风止痉、通络除痹功效,桂枝具有温通经脉、散寒止痛功效,郁金具有活血行气、疏肝利胆功效,骨碎补具有补肾强骨、续伤止痛功效,续断具有补肝肾、续筋骨功效,自然铜具有散瘀止痛、截骨续筋功效,马钱子粉具有温络止痛、散结消肿功效。纵观全方,可奏活血化瘀、消肿止痛、续筋接骨。故本研究应用接骨丸治疗 SD 骨折大鼠,取得了满意的结果。

骨折愈合过程中,骨组织矿化是必须经历过的

程,其中 ALP 参与细胞外基质矿化过程,ALP 切割有机磷酸酶,局部 PO4³⁻浓度增加,进而结合钙离子而启动钙化过程,同时还可抑制 ALP 酶活性,在体内和体外均会致使肢体骨骼矿化不良^[11]。ALP 主要分布在细胞的质膜,并且在人体内 ALP 存在于骨组织、肾和小肠黏膜,在骨组织中主要集中在骨化部位。血清钙与蛋白结合,血中钙、磷甲状腺激素的调控下以及与骨组织中钙、磷保持动态平衡,骨折后骨折断端的钙盐沉积,从而使血钙浓度下降^[12-13]。笔者本研究结果显示,低剂量组和高剂量组治疗 4 周血清钙、ALP 水平高于对照组和模型组,且高剂量组治疗 4 周血清钙、ALP 水平高于低剂量组。CD3 和 CD44 作为细胞表面多功能黏附分子主要于各种类型的细胞中广泛表达,同时参与多种生理病理过程,其中包括肿瘤细胞的生长和转移、创伤愈合等。在骨组织中,CD3 和 CD44 主要于破骨细胞和骨细胞中表达,介导细胞与细胞外基质间的相互作用。有学者研究报道显示,CD3 和 CD44 在骨折骨痂软骨细胞表达显著减少^[14]。笔者本研究结果显示,低剂量组和高剂量组治疗 4 周 CD3、CD44 水平高于对照组和模型组,且高剂量组治疗 4 周 CD3、CD44 水平高于低剂量组。提示接骨丸可明显增加 CD3 和 CD44 表达水平,从而促进骨折愈合。

综上所述,接骨丸可能通过增加血清钙、ALP、CD3、CD44 表达水平,促进骨折愈合。但本研究还存在一些不足之处,研究大鼠相对较少,研究作用机制方面相对较少,还需在后续研究工作中做深入实验研究,提供可靠的临床参考价值。

参考文献

[1] Khoshbin A, Leroux T, Wasserstein D, et al. The epidemiology of paediatric supracondylar fracture fixation: a population-based study[J].

Injury-international Journal of the Care of the Injured, 2014, 45(4): 701-708.

[2] 孙永生, 徐颖鹏, 温建民, 等. 中药不同分期对实验性 SD 大鼠骨折愈合过程中成纤维细胞生长因子-2 表达的作用[J]. 中华中医药杂志, 2010, 17(9): 1472-1476.

[3] Lin ZZ, Wang JJ, Chung CR, et al. Epidemiology and mortality of hip fracture among patients on dialysis: Taiwan National Cohort Study [J]. Bone, 2014, 64(7): 235-239.

[4] 于波, 张恒, 谢进. 复元活血汤对骨折大鼠转化生长因子 $\beta 1$ 表达的作用研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 861-863.

[5] 汤群珍, 邹来勇. 杜仲对 SD 大鼠闭合骨折早期血生化指标的影响[J]. 河南中医, 2011, 31(4): 349-351.

[6] Cong E, Walker M D. The Chinese skeleton: insights into microstructure that help to explain the epidemiology of fracture [J]. Bone Research, 2014, 2(2): 80-92.

[7] 王羿, 党兴. 补肾活血法对 SD 大鼠骨折模型愈合影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12): 3150-3151.

[8] 黎圣田. 中医治疗骨折早期肢体肿胀的疗效[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(17): 14-15.

[9] 薛胜文. 中医治疗骨折迟缓愈合临床对比分析[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 19(6): 90-91.

[10] 刘新焕, 蔡建平, 张贤, 等. 中西医结合治疗桡骨远端骨折研究述评[J]. 中医学报, 2013, 28(2): 184-187.

[11] 牛莉莉, 熊亚林, 陈思彤. 血清碱性磷酸酶与骨折愈合的相关性分析[J]. 世界最新医学信息文摘: 电子版, 2013, 44(8): 38-39.

[12] 丛晓荣, 潘维亮. 疏血通注射液预防胫骨骨折术后下肢深静脉血栓形成的疗效[J]. 中国医药, 2012, 7(12): 1568-1569.

[13] Wang L, Che Y J, Wang X. Relationship between serum MMP-1 level and ALP, NTX in patients with primary osteoporotic vertebral and femoral neck fracture [J]. Clinical Journal of Medical Officers, 2011, 18(5): 29-32.

[14] Wang L, Liu F, Bartula L, et al. The Experiment Research on the Expression of CD44, FN of Callus Cartilage Cell in Fracture of Osteoporosis [J]. Shock, 2006, 25(6): 23.

(2016-03-14 收稿 责任编辑: 张文婷)