

补肾活血汤对SD大鼠骨折愈合过程中结缔组织生长因子表达的影响

程英雄¹, 罗毅文¹, 王斌¹, 吴志方¹, 庄洪²

1. 广州中医药大学附属骨伤科医院, 广东 广州 510240; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 探讨补肾活血汤对SD大鼠骨折愈合过程中结缔组织生长因子表达的影响。方法: 清洁级SD大鼠40只, 6月龄, 随机分为对照组(A组)及补肾活血汤组(B组), 建立骨折模型。A组大鼠灌胃蒸馏水, B组大鼠灌胃补肾活血汤溶液, 灌胃给药容积为10 mL/kg。造模后第3、7、14、21天, 每组随机选取5只大鼠, 切取骨痂标本, 采用RT-PCR法和Western-blot法分别检测结缔组织生长因子(CTGF)的mRNA和蛋白质的表达。结果: 结果显示, A组术后3天、7天及14天的CTGF mRNA和蛋白的表达逐渐增强, 至21天表达下降, 与术后14天比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后3天, B组CTGF mRNA和蛋白无表达, 术后7天、14天及21天, B组的CTGF mRNA和蛋白的表达逐渐增强, 术后21天与术后14天比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后21天, B组较A组的CTGF mRNA和蛋白的表达均显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 补肾活血汤能够促进骨折愈合过程中结缔组织生长因子蛋白和mRNA表达, 从而促进骨折愈合。

[关键词] 补肾活血汤; 骨折愈合; 结缔组织生长因子(CTGF); 蛋白质; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2016)09-0233-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.09.101

立足于骨折的三期辨证, 早期气滞血瘀、中期营血不和及晚期的肝肾亏虚, 多采用中药补肾活血汤治疗, 临床经典方补肾活血汤具有此功效。结缔组织生长因子(CTGF)在骨折愈合方面发挥着重要作用, 有研究显示, CTGF促进软骨细胞和成骨细胞的增殖、分化, 从而对骨折愈合产生直接影响^[1]。因此, 本研究采用补肾活血汤, 探讨补肾活血汤对SD大鼠骨折愈合过程中结缔组织生长因子表达的影响, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组 清洁级雄性SD大鼠40只, 6月龄, 体重260~300g, 由广州中医药大学动物实验室中心提供, 实验动物合格证号: 6020911, 随机分为2组: 对照组(A组)、补肾活血组(B组), 每组20只。

1.2 主要试剂与仪器 蛋白裂解液、30%丙烯酰胺、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、SDS(十二烷基硫酸钠)、甲醇、过硫酸铵、TEMED(四甲基乙二胺)、PVDF膜(聚偏二氟乙烯膜)、脱脂奶粉、预染marker购自碧云天; 内参蛋白GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、CTGF兔多克隆抗体、山羊抗兔IgG二抗购自武汉博士德; ECL荧光试剂盒购自Pierce; RT-PCR试剂盒购自上海罗氏公司; 紫外/核酸蛋白检测仪(Nano-Drop); 垂直电泳仪(Baygene)。

1.3 药物的制备 中药补肾活血汤, 处方: 熟地黄、菟丝子、

补骨脂各18g, 杜仲、肉苁蓉、枸杞子、山萸肉、独活、当归、没药各6g, 红花3g, 所有中药材由广州中医药大学附属骨伤科医院药房提供。将中药材990g(共10剂)放入铝锅中, 加入5000 mL蒸馏水常温下浸泡24h后, 加热沸腾, 文火煎煮3h, 用一层纱布过滤得到3820 mL药液, 分装后, 4℃保存。

1.4 造模方法与标本的采集 以10%水合氯醛按0.133 mL/100g腹腔注射麻醉, 2组均行闭合性股骨干骨折术^[1]: 麻醉后, 取俯卧式, 碘酒、酒精消毒右下肢膝关节皮肤, 作膝关节内侧纵行切口, 约1cm, 切开皮肤、皮下, 暴露关节腔, 将髌骨向外侧推开, 极度屈曲膝关节, 暴露髌间窝, 摇钻将0.8 mm无菌克氏针打入股骨髓腔内, 近段至粗隆下, 远端不超过关节面, 避免阻碍关节的自由活动。关节腔内滴入少量青霉素水溶液, 缝合切口, 将右股骨置于骨折发生装置下, 股骨的中点与骨折发生装置的打击器对应, 并且所有垂直打击力量通过弹簧长度保持一致。手术均在严格无菌条件下进行, 术后根据分组放至笼中自由活动与进食。术后连续3天, 青霉素肌肉注射预防感染。术后第1天开始, A组大鼠灌胃蒸馏水, B组大鼠灌胃补肾活血汤溶液, 灌胃给药容积为10 mL/kg, 每毫升相当于0.259g原药材, 相当于临床给药剂量的5倍, 每天1次, 直到实验结束。术后第3、7、14、21天, 每组随

[收稿日期] 2016-05-08

[基金项目] 广州中医药大学创新基金(K0070077)

[作者简介] 程英雄(1976-), 男, 副主任中医师, 研究方向: 骨质疏松性骨折的防治。

机选取5只大鼠，切取骨痂标本，液氮保存。

1.5 RT-PCR法检测CTGF mRNA 液氮研磨，组织块直接放入研钵中，加入少量液氮，迅速研磨，待组织变软，再加少量液氮，再研磨，如此三次，应用Trizol试剂盒提取总RNA。CTGF的引物序列为：上游引物：5'-GAGTGGGTGTGTGACGAGCCCAAGG-3'，下游引物：5'-ATGTCTCCGTACATCTTCCTGTAGT-3'，PCR产物为499bp。PCR反应体系为20μL，PCR循环参数为：94℃预变性3min，94℃变性30s，54℃退火30s，72℃复性30s，共35个循环，最后72℃延伸7min。每次PCR反应均以无菌双蒸水代替cDNA模板作为阴性对照。实时荧光定量，计算机分析各组CT值。

1.6 Western blot印迹法检测CTGF蛋白的表达 取各组的组织块研磨，提取总蛋白。将各组蛋白样品加loading buffer煮沸变性，并进行SDS-PAGE凝胶电泳，电转移至PVDF膜上进行转膜，用5%BSA封闭液封闭1h，分别用GAPDH、CTGF一抗抗体试剂盒稀释浓度的适当量4℃孵育过夜。后加入羊抗兔二抗，室温反应1h，洗膜后，在曝光房内，将PVDF膜用超敏发光液孵育1min，用X-ray曝光显影条带。Image J分析条带灰度值，以CTGF/GAPDH表示蛋白表达量。

1.7 统计学方法 所有数据采用SPSS19.0统计软件进行分析，计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，2组间比较用t检验。多组间比较用单因素方差分析，方差齐，则用LSD；方差不齐用Dunnett T3比较。

2 结果

2.1 2组大鼠四个时相CTGF mRNA表达情况比较 见表1，图1。RT-PCR结果显示，A组术后3天、7天及14天的CTGF mRNA表达逐渐增强，至21天表达下降，与术后14天比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后3天，B组CTGF mRNA无表达，术后7天、14天及21天，B组的CTGF mRNA表达逐渐增强，在21天时，与术后14天比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)。在术后21天时，B组与A组CTGF mRNA表达含量比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 2组大鼠四个时相CTGF mRNA表达情况比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	3d	7d	14d	21d
A组	0.3051±0.05445	0.5088±0.0224	0.8128±0.03051	0.4309±0.3206 ^①
B组	0.002693±0.000553	0.3268±0.04388	0.5152±0.3306	0.8282±0.3598 ^②

与同组前一个时间点比较，^① $P < 0.05$ ；21d时，与A组比较，^② $P < 0.05$

2.2 2组大鼠四个时相CTGF蛋白表达情况比较 见表2，图2。Western Blot法结果显示，A组术后3天、7天及14天的CTGF蛋白表达逐渐增强，至21天表达下降，与术后14天比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后3天，B组无表达，术后7天、14天及21天，B组的CTGF蛋白表达逐渐增强，在21天时，与术后14天比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)。在

术后21天时，B组与A组CTGF蛋白表达含量比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)。

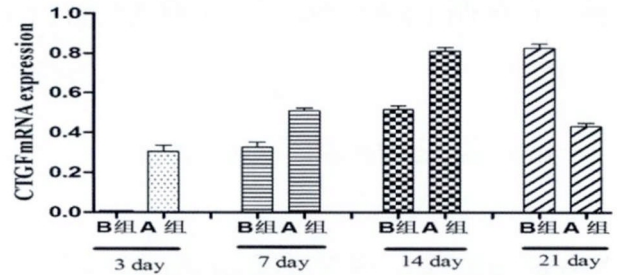


图1 2组大鼠四个时相CTGF mRNA表达情况

表2 2组大鼠四个时相CTGF蛋白表达情况比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	3d	7d	14d	21d
A组	0.2651±0.02211	0.3988±0.01241	1.3934±0.06191	0.2759±0.02081 ^①
B组	0.003693±0.000553	0.2402±0.02449	0.3219±0.02286	1.3561±0.03132 ^②

与同组前一个时间点比较，^① $P < 0.05$ ；21d时，与A组比较，^② $P < 0.05$

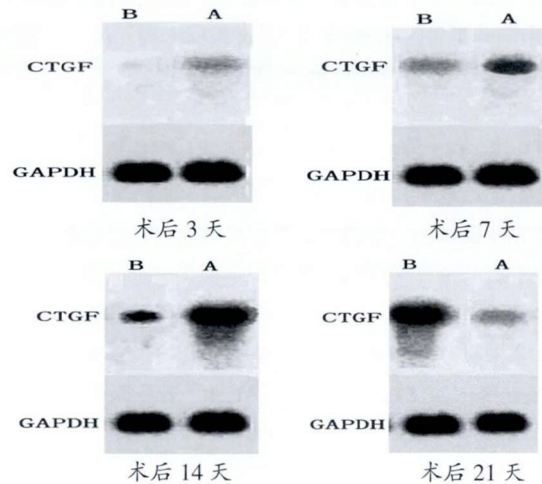


图2 2组大鼠四个时相CTGF蛋白表达情况

3 讨论

结缔组织生长因子是一种多功能的生长因子，参与体内多种病理生理过程，在胚胎发育、肿瘤形成、动脉粥样硬化、纤维化疾病以及骨折愈合中发挥重要作用。CTGF作为一种重要的效应分子，在软骨细胞和成骨细胞的增殖、分化方面发挥重要作用，对骨折愈合产生直接而重要的影响^[1]。

Nakanishi等的研究结果显示，CTGF mRNA的过表达可促进软骨细胞株HCS-2/8细胞增殖，并促进软骨聚集蛋白多糖分泌和X型胶原表达^[2]。欧阳冰等人采用MTT及SABC法观察CTGF生长因子对体外培养的兔关节软骨细胞增殖和表型的影响，结果显示100μg/L的CTGF生长因子作用软骨细胞7天的增殖效果最好，而SABC检测到经CTGF刺激组的细胞型胶原表达较空白对照组有显著差异^[3]。Nishida等研究表

明 rCTGF 可轻度促进人骨肉瘤 SaOS-2 细胞和小鼠前成骨细胞—MC3T3-E1 细胞的增殖,同时 rCTGF 可上调骨基质蛋白如 I 型胶原、骨桥素和骨钙素 mRNA 的表达,而且 rCTGF 可上调 ALP 的基因表达并增强其活性,而 ALP 是成骨细胞分化的一种标志物^[4]。Amott JA 等^[5]人研究显示,CTGF 通过激活 avb5 整合素转导,调控成骨细胞样细胞系的胞内激酶活性,从而促进局部黏附蛋白的形成和肌动蛋白细胞骨架的重构。Safadi FF 等^[6]发现,抗 CTGF 治疗可抑制骨基质的矿化和结节形成,其抑制钙盐沉积的作用呈剂量依赖性。另外 CTGF 在骨质樱花大鼠中呈过表达,同时该大鼠表现为破骨细胞功能缺陷,骨密度明显增高,骨基质和骨矿化相关基因高表达。上述研究结果提示,CTGF 可能在正常骨建和骨重建中发挥某些作用。

本次实验研究采用 RT-PCR 方法检测 CTGF 基因的 mRNA 表达,从核酸角度来分析基因的表达情况,并结合 CTGF 核酸的产物蛋白质,从蛋白水平来分析基因的表达情况。通常从核酸和蛋白两个层次来分析,可以得到更为确定的基因表达结果,更详细、更直观地说明基因表达的情况。实验结果显示:术后 3 天、7 天和 14 天,补肾活血汤组的 CTGF mRNA 和蛋白表达较对照组低,在前三个时相中,2 组大鼠 CTGF 的 mRNA 和蛋白表达均依次提高;在术后 21 天,补肾活血汤组较对照组的 mRNA 和蛋白表达显著性增加,而对照组则在第四个时相中 CTGF 表达较第三个时相降低。根据实验结果,我们分析认为补肾活血汤能促进 CTGF 的表达主要在 7 天、14 天和 21 天,而在 21 天时最明显,从而促进骨折愈合,与 Nakata E 等^[7]研究结果相近。

CTGF mRNA 及其蛋白产物的表达在骨骼发育以及骨量维持方面发挥重要作用。因此,进一步研究 CTGF 对骨骼发育和骨重建的作用,以及开发促进和(或抑制)CTGF 的药物,有助于进一步的了解骨质疏松性骨折的愈合机制,并为其防治提供新的策略。综上所述,在骨折愈合过程中,辨证使用补肾活血化痰中药,能够促进骨折愈合过程中软骨骨痂向骨性骨痂转化的步骤,从而促进骨折愈合,这一结果对临床骨折愈合治疗及研究有一定的指导意义。

[参考文献]

- [1] Aoyama E, Kubota S, Khattab HM, et al. CCN2 enhances RANKL-induced osteoclast differentiation via direct binding to RANK and OPG[J]. *Bone*, 2015 (73): 242-248.
- [2] Nakanishi T, Nishida T, Shimo T, et al. Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture[J]. *Endocrinology*, 2000, 141 (1): 264-273.
- [3] 欧阳冰,林绵辉,左文建,等. 结缔组织生长因子对体外培养的兔关节软骨细胞增殖和表型的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(20): 3816-3820.
- [4] Nishida T, Kubota S, Nakanishi T, et al. CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, stimulates proliferation and differentiation, but not hypertrophy of cultured articular chondrocytes[J]. *J Cell Physiol*, 2002, 192(1): 55-63.
- [5] Amott JA, Zhang X, Sanjay A, et al. Molecular requirements for induction of CTGF expression by TGF-beta1 in primary osteoblasts[J]. *Bone*, 2008, 42 (5): 871-885.
- [6] Safadi FF, Xu J, Smock SL, et al. Expression of connective tissue growth factor in bone: its role in osteoblast proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 196(1): 51-62.
- [7] Nakata E, Nakanishi T, Kawai A, et al. Expression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24(CTGF/Hcs24) during fracture healing[J]. *Bone*, 2002, 31(4): 441-447.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)