

接骨木根皮促进骨折愈合作用的研究

韩 华, 杨炳友, 杨 柳, 夏永刚, 王秋红, 匡海学*

黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究教育部重点实验室 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 观察接骨木根皮促进骨折愈合的作用。**方法** 制备桡骨骨折家兔模型。实验分对照组, 模型组, 跌打丸(0.28 g/kg)阳性对照组, 接骨木低、中、高(0.17、0.34、0.68 g/kg)组, 药物掺入饲料, 于造模后第2天连续给药36 d。观察接骨木根皮对骨折区骨组织形态和血清相关生化指标的影响。**结果** 与模型组比较, 给药12 d, 即骨折愈合初期, 接骨木高、中剂量组兔血清碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01); 给药24 d, 即骨折愈合中期, 接骨木高、中剂量组兔血清骨钙素(BGP)水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。X光片显示, 接骨木中剂量组兔骨膜反应密度较深, 骨痂增深、量增多, 且其密度与骨密度相似; 光镜观察显示骨膜下新生骨组织形成均质的骨小梁, 新生骨组织对原骨质两端成“工”字形包裹。**结论** 接骨木根皮通过促进成骨细胞合成、分泌ALP和BGP及破骨细胞分泌ACP, 提高成骨细胞的数量、加快局部坏死骨质的吸收及骨基质的成熟和钙化, 从而加快骨折愈合。

关键词: 接骨木; 骨折愈合; 碱性磷酸酶; 酸性磷酸酶; 骨钙素; 成骨细胞

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)14-1957-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.017

Promotion of *Sambucus williamsii* root barks on fracture healing

HAN Hua, YANG Bing-you, YANG Liu, XIA Yong-gang, WANG Qiu-hong, KUANG Hai-xue

Heilongjiang Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacodynamic Material Bases, Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To observe the promotion of *Sambucus williamsii* (SW) root barks for fracture healing. **Methods** Rabbit models with radius fracture were established. The rabbits were divided into control, model, Drieda Pill negative control, and low-, mid-, and high-dose (0.17, 0.34, and 0.68 g/kg) of SW groups. Drugs were added into forage and were given to rabbits 2 d after modeling for 36 d. The effect of SW root barks on serum biochemical indexes and histomorphology of fracture healing was observed. **Results** Compared with the model group, a significant increase of alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (ACP) was observed in high- and mid-dose SW groups in the initial stage of fracture healing of 12 d after administration ($P < 0.05$, 0.01). A significant increase of serum bone gla protein (BGP) was observed in the high- and mid-dose SW groups in the middle stage of fracture healing of 24 d after administration ($P < 0.05$, 0.01). X-ray revealed that deep periosteal reaction density was found, osteotylus was higher and more in the mid-dose SW group, and the density was similar to bone density; Light microscope revealed that trabecular bone appeared in new born bone tissue, and the substance of bone was encapsulated with I-section new born bone tissue. **Conclusion** SW root barks have the active fraction for fracture healing by promoting the synthesis and secretion of ALP and BGP of osteoblast, promoting the synthesis of ACP in osteoclast, increasing the quantity of osteoblasts, promoting the absorption of necrotic bone, and speeding up the maturation calcification of bone matrix.

Key words: *Sambucus williamsii* Hance; fracture healing; alkaline phosphatase; acid phosphatase; bone gla protein; osteoblast

接骨木 *Sambucus williamsii* Hance (SW) 为忍冬科植物, 又名续骨木、大接骨丹等, 其根皮作为民间用药历史较长, 具有治疗跌打肿痛、骨折、创

伤出血等功效。临床观察表明, 接骨木治疗骨折具有疗程短、恢复功能快、疗效高的特点^[1-2]。前期研究表明, 接骨木根皮促进骨折愈合的有效部位主要

收稿日期: 2012-12-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173501, 2011-2014); 黑龙江中医药大学博士创新基金(B201003); 黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划(B201201)

作者简介: 韩 华, 博士, 硕士研究生导师, 主要研究方向为中药及复方药效物质基础。E-mail: hh7551@163.com

*通信作者 匡海学 E-mail: haixuekuang@163.com

含环烯醚萜和木脂素类成分,其中环烯醚萜类成分占该有效部位的50%以上^[3-4]。为了深入探讨该有效部位促进骨折愈合的作用及其机制,本实验制备家兔桡骨骨折模型,观察接骨木根皮有效部位对骨折区骨组织形态和血清相关生化指标的影响,以期为接骨木更广泛地应用于临床提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

接骨木根皮有效部位(1 g相当于29.4 g生药,以下简称接骨木),以莫诺昔计,HPLC法测定环烯醚萜类质量分数>50%,黑龙江中医药大学药学院中药化学教研室自制^[4];跌打丸,哈药集团世一堂制药厂生产,批号0505129;戊巴比妥钠,上海化学试剂公司,批号F971104;碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(批号20060116)、酸性磷酸酶(ACP)试剂盒(批号20060126),南京建成生物工程研究所;血清骨钙素(BGP)试剂盒(批号20060106),解放军总医院科技开发中心放免所;HE染液,北京赛默生物科技有限公司。

1.2 动物

新西兰大白兔,雌雄各半,体质量2.0~2.5 kg,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,合格证号SYXK(黑)20020018号。

1.3 仪器

A—6型半自动生化分析测定仪,北京松上技术有限公司;TGL—16型离心机,上海医疗器械厂;S648型恒温水浴箱,国营创新医疗器械厂;光学显微镜,日本Nikon公司。

2 方法

2.1 模型制备

新西兰大白兔适应性喂养1周,戊巴比妥钠30 mg/kg耳缘静脉麻醉,左前肢硫化钠脱毛,常规消毒,无菌条件下切开皮肤、筋膜,沿肌间隙钝性分离肌肉达桡骨,剥离桡骨中下段,锯片锯成宽度约2 mm、深度为桡骨直径1/2的不完全性骨折,生理盐水冲洗后缝合皮下组织及皮肤,切口用无菌纱布包扎。

2.2 分组与给药

新西兰大白兔45只,雌23、雄22只,随机分为5组,每组9只,分别为模型组,跌打丸(0.28 g/kg)阳性对照组,接骨木低、中、高剂量(0.17、0.34、0.68 g/kg)组,另选8只作为对照组。所有大白兔单笼饲养,每日喂饲2次。跌打丸组和接骨木各剂量组每天先喂饲含药饲料,吃完后再给正常饲料;

对照组和模型组每天均喂饲2次正常饲料。跌打丸组和接骨木各剂量组于手术第2天开始给药,连续给药36 d。

2.3 指标观察

2.3.1 血清生化指标检测 分别于第1次给药后12、24、36 d,兔耳缘静脉取血,离心取血清,−20℃保存,测定血清中ALP、ACP、BGP水平。

2.3.2 X光检查 第1次给药后12、24 d,接骨木各剂量组和模型组各取3只兔,在清醒状态下摄左前肢X光片;末次给药后所有兔均摄左前肢X光片。

2.3.3 光镜观察 末次给药后,除对照组外,其他各组每组取7只兔,气栓处死,以骨折处为中心取桡骨段3 cm,剔除软组织,固定于10%甲醛中,HE染色,光镜(×10)观察组织形态。

3 结果

3.1 对血清ALP水平的影响

接骨木低剂量组1只兔死亡,未进行采样和数据统计。与对照组比较,模型组兔在造模后12 d,即骨折愈合初期,兔血清ALP水平升高($P<0.05$),表明造模成功。给药12 d后,与模型组比较,接骨木0.34、0.68 g/kg组和跌打丸组兔血清ALP水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01);给药24、36 d后,即骨折愈合中、末期,各给药组兔血清ALP水平处于较高水平,但无显著差异。结果见表1。

3.2 对血清ACP的影响

与对照组比较,模型组兔在造模后12 d,血清ACP水平显著升高($P<0.01$),表明造模成功。给药12 d后,与模型组比较,接骨木0.34、0.68 g/kg组和跌打丸组兔血清ACP水平虽有所下降($P<0.05$),但仍高于对照组;给药24、36 d后,各给药组兔血清ACP水平仍处于较高水平,但无显著差异。结果见表1。

3.3 对血清BGP的影响

与模型组比较,在给药12 d,跌打丸和接骨木组兔血清中BGP水平无显著差异;在给药24 d后,接骨木0.34、0.68 g/kg组和跌打丸组兔血清中BGP水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01);给药36 d后,各给药组血清BGP仍处于较高水平,但无显著差异。结果见表2。

3.4 X光检查

给药12 d后,模型组兔手术处血肿未完全吸收,骨折间隙明显;接骨木0.68、0.34 g/kg组兔血肿基本吸收,并以肉芽组织取代,骨折间隙不

明显;接骨木 0.17g/kg 组兔血肿基本吸收,骨折间隙较明显。

给药 24 d 后,模型组兔血肿完全消失,并以肉芽组织取代,有轻微骨膜反应;接骨木 0.68 g/kg 组兔骨折断端边缘趋于模糊,出现骨样组织和骨小梁;接骨木 0.34 g/kg 组兔骨折断端边缘趋于模糊,骨膜反应较明显;接骨木 0.17 g/kg 组兔骨折断端边缘趋

于模糊,骨膜密度淡浅。

给药 36 d 后,模型组兔骨折断端模糊,骨膜密度低,骨痂量少不超过缺损;接骨木 0.68 g/kg 组兔骨折断端接近消失,骨膜密度与骨密度相似;接骨木 0.34 g/kg 组兔骨折断端骨膜密度较深,骨痂量增多、增深;接骨木 0.17 g/kg 组兔骨折断端骨痂已填满缺损,但较淡且边缘不整齐。结果见图 1。

表 1 接骨木对骨折兔血清中 ALP、ACP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of SW on ALP and ACP levels in serum of rabbits with fracture ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物 / 只	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ALP / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)			ACP / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)		
			给药 12 d	给药 24 d	给药 36 d	给药 12 d	给药 24 d	给药 36 d
对照	8	—	247.3 ± 76.6	253.9 ± 103.8	257.8 ± 61.3	8.67 ± 1.36	11.01 ± 2.07	11.79 ± 2.11
模型	9	—	314.6 ± 33.4 ^Δ	290.0 ± 62.4	234.5 ± 106.9	21.31 ± 3.34 ^{ΔΔ}	17.71 ± 2.82	14.61 ± 2.97
接骨木	9	0.68	525.8 ± 52.4 ^{**}	382.2 ± 105.6	290.0 ± 61.3	15.11 ± 1.67 [*]	14.78 ± 2.34	11.76 ± 2.31
	9	0.34	463.9 ± 82.7 ^{**}	367.1 ± 128.9	253.4 ± 53.6	15.32 ± 2.04 [*]	14.45 ± 2.17	12.45 ± 2.75
	8	0.17	383.1 ± 144.7	243.0 ± 66.93	202.5 ± 67.2	18.56 ± 1.98	15.67 ± 2.11	13.42 ± 1.98
跌打丸	9	0.28	437.8 ± 133.8 [*]	304.6 ± 106.1	245.9 ± 67.8	15.33 ± 1.98 [*]	14.67 ± 2.15	12.11 ± 2.01

与对照组比较: ^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 2 接骨木对骨折兔血清中 BGP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of SW on BGP level in serum of rabbits with fracture ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物 / 只	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	BGP / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
			给药 12 d	给药 24 d	给药 36 d
对照	8	—	1.016 ± 0.321	1.300 ± 0.635	1.284 ± 0.420
模型	9	—	1.008 ± 0.577	1.317 ± 0.380	1.325 ± 0.466
接骨木	9	0.68	1.096 ± 0.278	2.442 ± 0.766 ^{**}	1.847 ± 0.854
	9	0.34	0.850 ± 0.075	2.393 ± 1.189 [*]	1.870 ± 0.665
	8	0.17	1.306 ± 0.501	2.150 ± 1.234	1.558 ± 0.771
跌打丸	9	0.28	0.907 ± 0.152	2.081 ± 0.703 [*]	1.718 ± 0.602

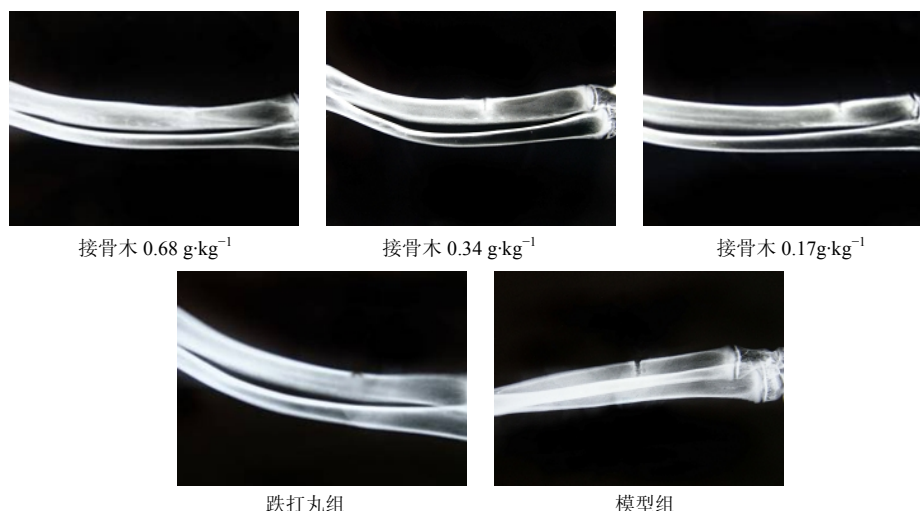


图 1 接骨木给药 36 d 后各组骨折兔左前肢 X 光片

Fig. 1 X-ray of left fore in rabbits with fracture in each group 36 d after SW administration

3.5 光镜观察

模型组图骨膜在断端形成阶梯样突起，断端内骨基质没有与新生骨组织形成对“工”字形包裹，新生骨组织以大量小梁样结构和浅在骨间隙为主（即纤维骨痂为主），骨基质偏嗜碱性，骨髓腔内可见毛细血管充血，同时可见散在骨碎片。

接骨木 0.68 g/kg 组兔骨膜在断端封盖，在新生骨组织表面走行与长骨一致，厚薄均匀，新生骨组织对原骨质两端成“工”字形包裹，骨膜下新生骨组织形成均质的骨小梁；接骨木 0.34 g/kg 组兔骨膜

在断端覆盖，薄厚均匀，原骨质与新生骨组织断端清楚，看不到间隙，新生骨质处有较多不同方向的血管即哈费氏管，骨髓腔断端未见炎性细胞；接骨木 0.17 g/kg 组兔骨膜在断端覆盖，薄厚不等，骨膜下新生骨组织可见骨小梁，骨髓腔断端偶见少量炎性细胞。

跌打丸组图骨膜在断端覆盖，薄厚不等，骨膜下新生骨组织可见粗细不等的骨小梁，在骨小梁腔隙表面可见成骨细胞，骨髓腔可见毛细血管扩张、炎细胞渗出。结果见图 2。

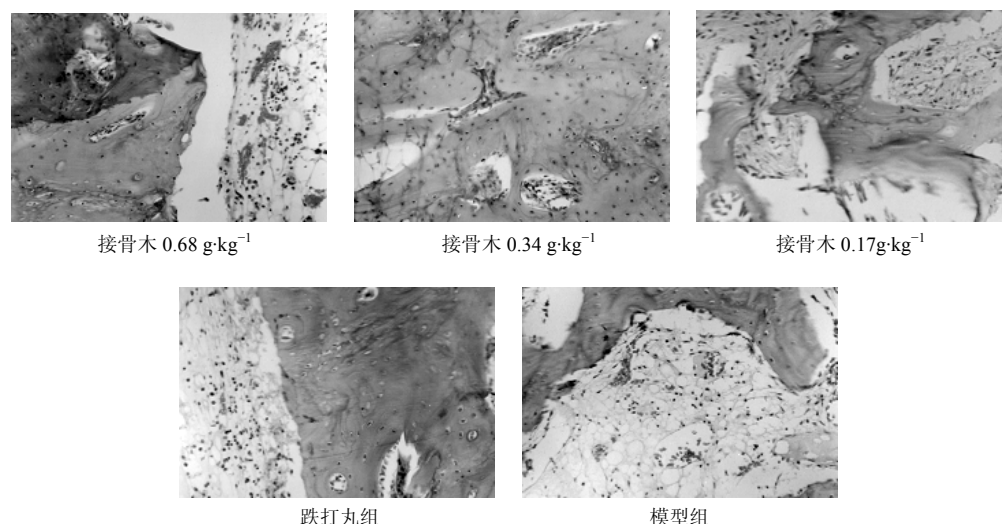


图 2 接骨木给药 36 d 后各组骨折兔左前肢光镜观察

Fig. 2 Light microscopy of left fore of rabbits with fracture in each group 36 d after SW administration

4 讨论

骨折愈合是指骨折断端间的组织修复反应，一般可分为血肿机化期（即炎症反应期）、原始骨痂形成期、骨痂改造塑形期（即骨折愈合早、中、晚期）。这些分期并不是截然分开的，在炎症反应期就开始修复过程，在修复的时候也存在塑形的过程^[5-6]。

本实验中观察到，在骨折愈合初期，接骨木 0.34、0.68 g/kg 组血肿已基本吸收，并以肉芽组织取代之；骨折愈合中期，接骨木各剂量组肉芽组织中出现骨样组织和骨小梁，骨折断端边缘均趋于模糊，多数有骨膜反应较明显；骨折愈合末期，接骨木 0.34、0.68 g/kg 组骨膜下新生骨组织形成均质的骨小梁，骨折断端接近消失，骨膜反应密度较深（即骨密度较大），骨痂量增多、增深，密度与骨密度相似。提示接骨木能促进骨痂生长、胶原合成和无机盐的沉积，加速骨痂的改建，具有促进骨折愈合的作用。

ALP 在骨骼、肝、脾、肾上腺等处合成，其中

在骨骼和肝脏中合成最多（各占总量近 50%）。骨骼中 ALP 主要由成骨细胞合成和分泌，能分解有机磷酸化合物，产生大量无机磷酸盐离子，促进后者与钙离子结合成磷酸钙而沉淀于骨组织内。成骨细胞分泌的 ALP 可以渗入血液中，故血清 ALP 水平与成骨细胞数量和成骨细胞活性呈正相关，因此常将 ALP 作为成骨细胞活动的标志。在本实验中观察到，接骨木 0.34、0.68 g/kg 组在给药 12 d 后，血清 ALP 水平的升高非常显著；在给药 24 d 后，血清 ALP 也具有较高水平，提示接骨木可以促进成骨细胞合成、分泌 ALP，提高骨折愈合初、中期成骨细胞的数量和活性，从而加快骨折愈合^[7-9]。

ACP 常存在于前列腺、骨骼、血细胞等中。在骨骼中 ACP 分布于破骨细胞的吞噬区、皱褶缘及破骨细胞与骨间隙中，参与骨质吸收活动，是破骨细胞的标记酶。在骨折愈合早期，破骨细胞需要吸收坏死骨质及清除残渣；在骨折愈合后期，破骨细胞

主要改造骨痂,使软骨组织向骨组织转化,并参与骨改建。因此,破骨细胞活性的增强亦是骨折快速愈合的必要条件^[10]。本实验结果显示,接骨木 0.34、0.68 g/kg 组兔血清 ACP 水平在给药 12 d 显著升高,在给药后 24、36 d 亦处于较高水平,提示接骨木增强破骨细胞活性,加快局部坏死骨质的吸收,促进新骨生成和改造,促使骨痂早期向正常骨质转变。

BGP 是含有 49 个氨基酸残基、由成骨细胞合成及分泌的一种骨特异蛋白,又称骨钙蛋白,是骨骼中量最大的非胶原蛋白,能准确反映成骨细胞的活动,是钙的强力结合物,参与体内钙的调节,促进骨生成过程中基质的钙化,加速骨基质的成熟。本实验结果显示,接骨木 0.34、0.68 g/kg 组在给药 24 d 后,兔血清 BGP 水平均显著升高,0.17、0.34、0.68 g/kg 组在给药 36 d 后血清 BGP 水平也具有较高水平,提示接骨木可以促进骨折后期骨基质的成熟和钙化。

综上所述,接骨木根皮有效部位通过促进成骨细胞合成、分泌 ALP 和 BGP 及破骨细胞分泌 ACP,提高成骨细胞的数量、加快局部坏死骨质的吸收及骨基质的成熟和钙化,从而加快骨折愈合。接骨木根皮有效部位中促进骨折愈合的确切物质基础还需

进一步深入研究。

参考文献

- [1] 严永清,余传隆,黄泰康,等. 中药辞海 [M]. 北京:中国医药科技出版社,1997.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1985.
- [3] 吕芳. 接骨木根皮化学成分的研究 [D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2002.
- [4] 韩美华. 接骨木根皮化学成分及其复方制剂成型工艺的研究 [D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2003.
- [5] 党耕町. 骨组织形态测量学 [J]. 中华外科杂志, 2009, 27(1): 57-59.
- [6] Jee W S S, Ma Y F, Chow S Y. Maintenance therapy for added bone mass or how to keep the profit after withdrawal of therapy of osteopenia [J]. *Bone*, 1995, 17(4): 309-319.
- [7] 姚清华. 碱性磷酸酶与骨代谢 [J]. 国外医学:临床生物化学及检验分册, 2007, 2(3): 7-10.
- [8] 狄勋元. 骨折愈合研究的新进展 [J]. 骨与关节损伤杂志, 2007, 11(6): 375-376.
- [9] 黎海芪. 生长和骨代谢的生化标志 [J]. 国外医学:儿科学分册, 2008, 32(2): 85-89.
- [10] 饶寒敏. 降钙素对骨性质和成骨细胞功能的影响 [J]. 国外医学:创伤与外科基本问题分册, 2004, 15(3): 159.