

跌打七厘片对小鼠骨折愈合的影响

赵 焯[#], 严华美[#], 张禹杰, 刘考强, 柴永利, 詹红生, 沈知彼, 元唯安^{*}

上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203

摘要: 目的 研究跌打七厘片对小鼠骨折愈合的影响。方法 将100只C57BL/6小鼠随机分为空白对照组20只、假手术组20只、造模组60只。造模组制备股骨骨折模型, 造模后再随机分为模型组和跌打七厘片低、高剂量(405.5、1 621.8 mg·kg⁻¹)组, 每组20只。每天1次, 连续ig给药28 d。每周通过骨组织形态学和苏木精伊红(HE)染色观察骨痂形态改变、微计算机断层扫描分析(Micro-CT)检测愈合骨的骨体积分数(BV/TV), 生物力学三点弯曲实验检测愈合骨的最大负载, 全自动生化仪检测小鼠血清钙(Ca)、磷(P)、碱性磷酸酶(ALP)的水平。结果 HE染色、Micro-CT结果显示, 造模后第14天, 与模型组比较, 跌打七厘片组有较多的软骨细胞浸润, 钙化编织骨骨量多, 新生骨痂骨量明显较多; 造模后第28天, 模型组骨折断端仍有未连接, 而跌打七厘片组的骨折断端均已连接, 钙化编织骨转化为层状骨, 逐渐恢复骨的基本形态, 有更多的新生骨痂及钙化程度, 高剂量组骨折断端被钙化新生骨完全填充并与周围骨皮质相联合。造模后第14天, 跌打七厘片高剂量组的BV/TV、最大负载显著高于模型组($P<0.05$); 造模后第28天, 低、高剂量组的BV/TV、最大负载均显著高于模型组($P<0.05$)。造模后小鼠血清Ca水平各组之间没有明显差异。造模后小鼠血清P、ALP水平呈上升趋势, 并在21 d达到高峰, 与模型组比较, 第14、21天跌打七厘片低剂量组和第7、14、21、28天的高剂量组血清P水平显著升高($P<0.05$), 第14、21、28天的高剂量组血清ALP水平显著升高($P<0.05$)。结论 跌打七厘片可以提高成骨活性及钙盐沉积, 以增加骨痂水平增强骨强度, 有利于小鼠骨折愈合。

关键词: 跌打七厘片; 骨折; Micro-CT; 生物力学; 骨组织形态; 钙; 磷; 碱性磷酸酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)07-1512-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.07.015

Effect of Dieda Qili Tablets on fracture healing in mice

ZHAO Ye, YAN Huamei, ZHANG Yujie, LIU Kaoqiang, CHAI Yongli, ZHAN Hongsheng, SHEN Zhibi, YUAN Weian

Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: **Objective** To study the effect of Dieda Qili Tablet on fracture healing in mice. **Methods** A total of 100 C57BL/6 mice were randomly divided into blank control group ($n = 20$), sham operation group ($n = 20$) and model group ($n = 60$). After modeling, the model group was randomly divided into model group, Dieda Qili Tablets low and high-dose (405.5 and 1 621.8 mg·kg⁻¹) group, with 20 rats in each group. Once a day, continuous ig administration for 28 days. Micro-CT three-dimensional imaging analysis was used to detect the bone volume fraction of the healed bone. Biomechanical three-point bending test was used to detect the maximum load of the healed bone. Serum Ca, P, and alkaline phosphatase (ALP) contents were detected by fully automatic biochemical analyzer. **Results** HE staining and Micro-CT results showed that 14 days after modeling, compared with the model group, the Dieda Qili Tablets group had more chondrocyte infiltration, more calcified woven bone mass, and significantly more new callus bone mass. Totally 28 days after modeling, the fracture ends of the model group were still unconnected, while the fracture ends of the drop seven millimeter piece group were all connected. The calcified woven bone transformed into layered bone, gradually restoring the

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 上海市中医药“三年行动计划”[ZY(2021-2023)-0211]; 上海市“科技创新行动计划”生物医药科技支撑专项(20S21902100); 上海市教委协同创新中心: 中西医结合-中成药临床评价平台(A1-U21-205-0103); 上海市申康中心示范性研究型病房建设(SHDC2022CRW010); 上海市申康中心医企融合创新协同专项(SHDC2022CRT018); 上海市慢性筋骨病临床医学研究中心项目(20MC1920600)

#共同第一作者: 赵 焯, 男, 硕士研究生, 研究方向为骨与关节疾病。E-mail: zhaoye1994zy@163.com

严华美, 女, 主管医师, 研究方向为骨与关节疾病。E-mail: yanhm2011@126.com

***通信作者:** 元唯安, 男, 主任医师, 研究方向为骨与关节疾病。E-mail: weian_1980@163.com

basic form of the bone, with more new callus and degree of calcification. The fracture ends of the high-dose group were completely filled with calcified new bone and combined with the surrounding bone cortex. On the 14th day after modeling, the BV/TV and maximum load of the high-dose group of Dieda Qili Tablets were significantly higher than those of the model group ($P < 0.05$). On the 28th day after modeling, the BV/TV and maximum load of the low and high dose groups were significantly higher than those of the model group ($P < 0.05$). After modeling, there was no significant difference in serum Ca levels among the groups. After modeling, the serum P and ALP levels of the model mice showed an upward trend and reached their peak on the 21st day. Compared with the model group, the serum P levels in the low-dose group of DiDa Qili Tablet on the 14th and 21st days and the high-dose group on the 7th, 14th, 21st, and 28th days were significantly increased ($P < 0.05$), and the serum ALP levels in the low and high-dose group significantly increased on days 14, 21, and 28 ($P < 0.05$). **Conclusion** Dieda Qili Tablet has therapeutic effect on fracture in mice by improving osteogenic activity and calcium salt deposition to increase the content of callus and enhance bone strength.

Key words: Dieda Qili Tablet; fracture; Micro-CT; biomechanics; bone tissue morphology; calcium; phosphorus; alkaline phosphatase

骨折是临床常见的损伤,泛指骨结构完整性和连续性发生破裂,同时伴随局部软组织与血管的损伤^[1]。随着社会的不断发展进步,骨折发病率也不断增长,骨折不愈合和骨折延迟愈合是骨折常见的并发症,多见于老年和儿童,部分发生于中青年。在美国每年估计发生790万例骨折,其中5%~10%的骨折愈合延迟或受损,需要额外的外科治疗,不仅给患者带来心理负担,还给社会和家庭带来沉重的经济负担^[2]。

跌打七厘片出自清代名医谢元庆编撰的《良方集腋》的七厘散,由酒当归、红花、醋乳香、血竭、三七、人工麝香、冰片、朱砂、儿茶等多味中药组成,具有活血化瘀、消肿止痛的功效,临床上多用于跌打损伤、外伤出血等疾患。以往药理研究认为跌打七厘片能够减轻疼痛、缓解肿胀和炎症反应,促进受伤部位的组织修复。同时,它也具有收敛止血、抗血栓、扩张微血管等多种作用,有助于改善局部血液循环及预防血栓形成^[3]。近期临床研究发现跌打七厘片对于骨折愈合具有促进作用,如改善局部肿痛症状、提前骨痂形成、缩短骨折愈合时间等^[4-7]。1项基础研究发现七厘散含药血清具有显著促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨性分化活性的作用,提示跌打七厘片可能具有促进骨折、骨不连愈合的作用^[8]。本研究通过组织形态学、生物力学、血清学、影像学等手段来观察跌打七厘片对骨折模型小鼠的骨折愈合情况的影响,为跌打七厘片治疗骨折提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

100只SPF级8周龄C57BL/6J雄性小鼠,体重(20±2)g,来源于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2021-

0011,实验动物合格证号20200903Abzz0619000641。实验动物饲养于上海中医药大学动物实验中心SPF级3楼,饲养条件为室内温度20~23℃,相对湿度40%~60%,噪声控制在60分贝以下,光照时间为12h光照、12h黑夜,饲养室每日消毒1次,高压灭菌垫料每周更换2次,饲料符合国家标准啮齿类动物干燥饲料标准,分笼饲养,每笼各5只。本研究对动物所进行的操作严格符合上海中医药大学实验动物福利与伦理相关规范(伦理编号PZSHUTCM191025012)。

1.2 药物与主要试剂

跌打七厘片,每片相当于原生药0.3g,由重庆希尔安药业有限公司生产,生产批号201001。10%水合氯醛溶液、羧甲基纤维素钠、95%乙醇、无水乙醇、1%盐酸酒精、1%氨水(国药集团化学试剂有限公司);碘伏溶液(上海利康消毒高科技技术有限公司);0.9%氯化钠溶液(安徽丰原药业股份有限公司);庆大霉素注射液(山东正牧生物药业有限公司);苏木精染色液、伊红染色液、4%多聚甲醛[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.3 主要仪器

Leica RM2165切片机、Leica HI1210型摊片机、Leica HI1220型烘片机(德国Leica公司);Skyscan1172型Micro-CT机(比利时Bruker公司);Faxitron Xray Mx20型X线机(美国Faxitron公司);Instron 5543型材料力学测试仪(英斯特朗上海材料试验机公司);贝克曼库尔特AU5800全自动生化仪(美国贝克曼库尔特有限公司);Olympus BX43型显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 造模方法

造模前1晚小鼠禁食禁水,造模当天,使用10%

水合氯醛按照 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量对小鼠进行麻醉。麻醉成功后,剃毛备皮、碘伏消毒。小鼠侧卧位,暴露下肢股骨区域,从髌骨位置向股骨方向作约 1 cm 的纵行切口,顺肌肉纹理钝性分离筋膜肌肉组织,暴露髌骨及股骨外侧缘显露股骨髁间窝。施术者使用锯机将股骨中段锯断,再使用特制 0.5 mm 髓内针对准股骨髁间窝插入股骨髓腔进行髓内固定, 0.9% 氯化钠溶液冲洗伤口后逐层缝合肌肉、皮肤,缝合后再次使用碘伏消毒。术后小鼠连续注射庆大霉素 3 d ,密切关注小鼠情况。造模后立即行小动物X线成像,确认骨折线对位对线良好,说明造模成功,见图1。

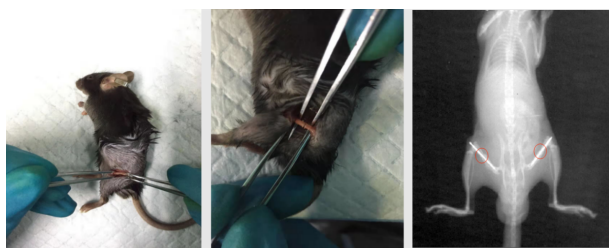


图1 小鼠骨折模型制作过程

Fig. 1 Modeling of femur fracture in mice

假手术组小鼠手术条件及麻醉方式同造模组,仅暴露股骨中段区域,最后用 $4-0$ 线逐层缝合肌肉筋膜皮肤, 0.9% 氯化钠溶液冲洗伤口,碘伏消毒。术后小鼠连续注射庆大霉素 3 d 。

2.2 分组与给药

随机将 100 只 C57BL/6 小鼠分为空白对照组 20 只、假手术组 20 只、造模组 60 只。造模组造模当天立即随机分为模型组和跌打七厘片低、高剂量 (405.5 、 $1\ 621.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组,每组各 20 只。造模后 1 d ,待小鼠麻醉恢复,开始 *ig* 给药,空白对照组、假手术组和模型组给予 0.9% 氯化钠溶液,给药体积均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 28 d 。其中因假手术组与空白对照组未制备骨折模型,与造模动物相比骨形态及生物力学是两种完全不同的状态,也无相应的骨痂区域,因此未进行骨形态及生物力学检测。设立假手术组与空白对照组比较,以排除手术过程对于血清钙(Ca)、磷(P)、碱性磷酸酶(ALP)的影响。

2.3 小鼠血清与股骨标本采集

小鼠血清的采集使用腹主动脉取血法,麻醉、备皮、剪开腹壁暴露腹主动脉,剪断腹主动脉收集小鼠动脉血,室温静置 30 min ,收集完成后置于离心机中 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min ,吸取上层淡黄色的血清后保存。取血后,剥离股骨部位皮肤、筋膜、肌

肉,暴露股骨区域,从髌关节和膝关节处截取双侧的完整股骨组织。

2.4 小鼠股骨 Micro-CT 检测

将小鼠右侧股骨标本置于微计算机断层扫描分析(Micro-CT)机内扫描进行三维成像分析,经 Micro-view 软件三维重建后,在股骨横断面上选取感兴趣区(骨痂区域),计算并分析感兴趣区域内的骨体积分数(BV/TV)。

2.5 小鼠股骨组织苏木精-伊红(HE)染色

将获取的股骨组织先后脱钙、脱水、包埋及切片后进行 HE 染色。石蜡切片脱蜡至水,经过苏木素染细胞核、伊红染细胞质、梯度酒精脱水等过程,最后中性树胶封片。使用光镜观察股骨骨折端组织情况并拍照记录。

2.6 小鼠股骨的生物力学检测

将小鼠左侧股骨标本室温环境下复温后,使用材料力学测试仪进行生物力学三点弯曲检测,检测指标为最大负载。

2.7 小鼠血清 Ca、P、ALP 水平检测

将待测样本血清放置于全自动生化仪检测血清 Ca、P、ALP 浓度。

2.8 统计分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,空白对照组与假手术组仅进行血清 Ca、P、ALP 比较,比较采用独立样本 *t* 检验。其余各组之间采用完全随机单因素方差分析进行显著性检验。

3 结果

3.1 小鼠股骨 HE 染色结果

如图2所示,造模后第 14 d ,与模型组比较,跌打七厘片组有较多的软骨细胞浸润,并且钙化编织骨骨量多。造模后第 28 d ,可见模型组骨折断端仍有未连接,骨折断端周围出现大量的钙化编织骨组织。而跌打七厘片组的骨折断端均已连接,钙化编织骨转化为层状骨,逐渐恢复骨的基本形态,且高剂量的骨量明显高于低剂量。

3.2 小鼠股骨组织 Micro-CT 检测

如图3所示,三维图像成像结果显示,在造模后第 14 d ,与模型组比较,跌打七厘片低、高剂量组新生骨痂骨量明显较多,且高剂量组的骨痂水平多于低剂量组。造模后第 28 d ,与模型组比较,跌打七厘片组有更多的新生骨痂及钙化程度,高剂量组骨折断端被钙化新生骨完全填充并与周围骨皮质相联合。

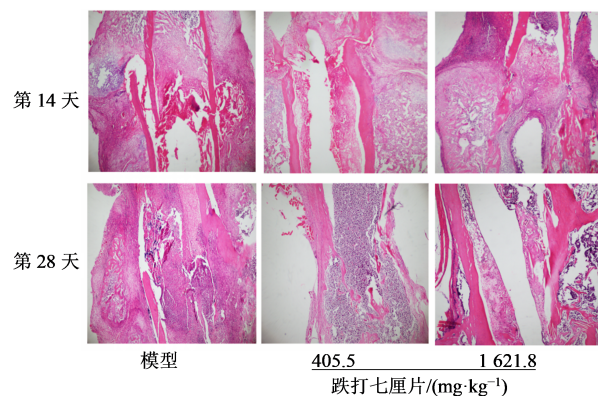


图2 小鼠股骨骨折后14、28 d HE染色(40×)

Fig. 2 HE staining at 14 and 28 d after femoral fracture in mice (40×)

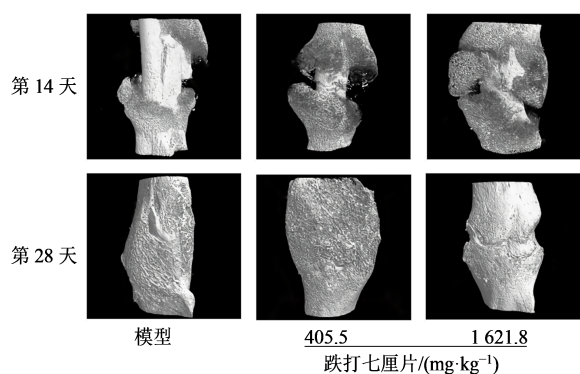


图3 小鼠股骨骨折后14、28 d Micro-CT三维成像

Fig. 3 Micro-CT three-dimensional imaging at 14 and 28 d after femoral fracture in mice

3.3 小鼠股骨BV/TV的比较

造模后第14天,跌打七厘片低剂量组的BV/TV高于模型组,但是没有显著性差异;高剂量组的BV/TV显著高于模型组($P<0.05$),高剂量组与低剂量组的差异无统计学意义。造模后第28天,跌打七厘片组的BV/TV均显著高于模型组($P<0.05$),且高剂量组的BV/TV显著高于低剂量组($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组小鼠骨折后各时间点BV/TV的比较($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 1 Comparison of BV/TV among each group at each point ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	BV/TV/%	
		第14天	第28天
模型	—	43.75±3.33	46.38±2.46
跌打七厘片	405.5	44.46±3.58	53.01±4.57*
	1 621.8	48.85±2.92*	66.46±2.34* [△]

与模型组比较: * $P<0.05$;与跌打七厘片低剂量组比较: $\triangle P<0.05$ * $P<0.05$ vs model group; $\triangle P<0.05$ vs low-dose group of Drieda Qili Tablets

3.4 小鼠股骨生物力学最大负载比较

如表2所示,造模后第14天,跌打七厘片低剂量组的股骨最大负载与模型组相比无显著差异,高剂量组的最大负载显著高于模型组($P<0.05$);高剂量组的最大负载高于低剂量组,但差异无统计学意义。造模后第28天,跌打七厘片组的股骨最大负载均显著高于模型组($P<0.05$),高剂量组高于低剂量组,但差异无统计学意义。

表2 各组小鼠股骨生物力学最大负载比较($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 2 Comparison of maximum load among each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	最大负载/N	
		第14天	第28天
模型	—	1.06±0.55	4.06±1.08
跌打七厘片	405.5	1.58±1.27	6.68±2.49*
	1 621.8	2.88±1.79*	7.82±1.63*

与模型组比较: * $P<0.05$ * $P<0.05$ vs model group

3.5 小鼠血清Ca、P、ALP水平比较

3.5.1 小鼠血清Ca水平 与空白对照组比较,假手术组血清Ca水平差异均无统计学意义;造模后第7天,模型组和跌打七厘片低、高剂量组的血清Ca升高,但均无明显差异。在第14、21、28天,模型组和跌打七厘片低、高剂量组的血清Ca均有降低的趋势,跌打七厘片组与模型组比较无明显差异。结果见表3。

3.5.2 小鼠血清P水平 在造模后第7天,跌打七厘片高剂量组的血清P水平与模型组相比显著升高($P<0.05$),其余各组之间的血清P水平比较均无统计学意义。

在造模后第14天,与假手术组比较,模型组血清P水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,跌打七厘片低、高剂量组的血清P水平均显著升高($P<0.05$);高剂量组的血清P水平较低剂量组升高,但其差异无统计学意义。

在造模后第21天,与假手术组比较,模型组血清P水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,跌打七厘片低、高剂量组的血清P水平均显著升高($P<0.05$);高剂量组的血清P水平与低剂量组相比显著升高($P<0.05$)。

在造模后第28天,与模型组和跌打七厘片低剂量组比较,高剂量组的血清P水平显著升高($P<0.05$)。结果见表4。

表3 各组小鼠血清Ca水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 3 Comparison of serum Ca content among each group at each point ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Ca/(mmol·L ⁻¹)			
		第7天	第14天	第21天	第28天
空白对照	—	2.13±0.03	2.13±0.04	2.13±0.04	2.11±0.06
假手术	—	2.18±0.02	2.13±0.02	2.10±0.04	2.13±0.06
模型	—	2.18±0.06	2.07±0.06	2.05±0.05	2.06±0.06
跌打七厘片	405.5	2.20±0.11	2.00±0.07	2.02±0.02	2.08±0.04
	1 621.8	2.24±0.11	2.03±0.05	1.99±0.13	2.09±0.02

表4 各组小鼠不同时间血清P水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 4 Comparison of serum P content among each group at each point ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	P/(mmol·L ⁻¹)			
		第7天	第14天	第21天	第28天
空白对照	—	2.90±0.29	2.23±0.18	2.81±0.31	2.62±0.35
假手术	—	3.10±0.30	3.09±0.36	2.70±0.09	2.76±0.26
模型	—	3.12±0.10	3.69±0.19 [#]	3.50±0.57 [#]	3.23±0.28
跌打七厘片	405.5	3.51±0.31	4.08±0.24 [*]	4.30±0.27 [*]	3.40±0.61
	1 621.8	3.83±0.43 [*]	4.13±0.32 [*]	4.82±0.42 ^{*△}	4.27±0.41 ^{*△}

与假手术组比较:[#] $P<0.05$;与模型组比较:^{*} $P<0.05$;与跌打七厘片低剂量组比较:[△] $P<0.05$ ^{*} $P<0.05$ vs sham-operated group; ^{*} $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs low-dose group of Dieda Qili Tablets

3.5.3 小鼠血清ALP水平 在造模后28 d内模型组和跌打七厘片低、高剂量组的血清ALP水平均有升高的趋势,并在第21天达到高峰。造模后第14、

21、28天,跌打七厘片组的血清ALP水平均高于模型组,且第14天和第21天的高剂量组高于低剂量组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结果见表5。

表5 各组小鼠不同时间血清ALP水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 5 Comparison of serum ALP content among each group at each point ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)			
		第7天	第14天	第21天	第28天
空白对照	—	63.00±6.12	63.20±4.27	64.00±5.00	66.20±4.38
假手术	—	63.60±3.85	59.60±5.94	61.60±4.62	62.40±4.78
模型	—	66.60±5.60	66.20±4.38	72.00±10.65	69.60±8.39
跌打七厘片	405.5	68.60±3.36	76.00±8.03 [*]	97.00±8.09 [*]	80.80±9.34 [*]
	1 621.8	73.00±8.49	120.60±5.55 ^{*△}	128.60±26.13 ^{*△}	87.20±6.69 [*]

与模型组比较:^{*} $P<0.05$;与跌打七厘片低剂量组比较:[△] $P<0.05$ ^{*} $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs low-dose group of Dieda Qili Tablets

4 讨论

如何加速骨折愈合一直是骨科领域的重点问题^[9]。目前国内外对骨折的治疗还是多以手术为主,主要包括植骨术、内固定术与外固定术等^[10]。虽然手术治疗具有疗效好的优点,但手术操作不当可能会引起血供减少及术后感染等预后不良的可能,引起骨折愈合不良甚至不愈合,再加上手术费用较为昂贵,部分患者会对手术治疗的选择有所顾虑^[11]。中医药作为祖国传统医学,其治疗骨折具有

历史悠久、疗效优良、花费低廉的特点。跌打七厘片在临床上常用于治疗跌打损伤、外伤出血等,近年来已有临床研究报告跌打七厘片对骨折愈合有促进作用。然而跌打七厘片对于骨折愈合是否有影响的基础研究较少,为了客观地评价跌打七厘片对于骨折愈合影响的可能机制,本课题组开展了跌打七厘片对骨折愈合影响的研究。

骨折愈合是指骨折断端间的组织修复反应,是一个复杂的组织学、生物学、内分泌学及生物力学

的动态过程。骨折发生后立即进入炎症反应期,骨折周围血管增生、断端坏死骨重吸收、围绕骨折断端纤维软骨痂形成。软骨痂进行性扩大、变硬直至硬骨痂形成期纤维软骨骨化形成编织骨^[12-13]。通过HE病理染色和Micro-CT三维图像成像观察小鼠股骨骨折的愈合组织,研究发现跌打七厘片组的骨痂形成与钙化能力明显优于模型组。骨折端BV/TV是指感兴趣区域内的矿化骨痂体积与总骨痂体积的比值,反映骨折端中的骨痂组织水平,与骨痂的刚度和强度有关^[14]。结果显示造模后第14、28天,跌打七厘片低、高剂量组的BV/TV均高于模型组,说明了跌打七厘片可以通过提高骨痂水平从而提高骨强度,与影像学结果一致,而且低剂量组的骨痂水平明显不如高剂量组,说明跌打七厘片可能对骨痂形成程度影响有剂量相关性。

骨骼强度和刚度的恢复是定义骨折愈合的基本特点,通过生物力学检测可以对骨骼愈合的力学强度和刚度恢复进行评价^[15]。力学Stat理论认为,骨几何形状适合于确保来自普遍负载的最大组织应变保持在一定范围内,当超过该应变能力骨组织则会断裂^[15]。三点弯曲实验所检测的最大负载是指整个骨破坏前所承受的最大弯曲载荷,表明了愈合骨强度的大小,能够直接反映生物力学性能。本研究实验结果显示,在造模后第14、28天,使用高剂量跌打七厘片的小鼠股骨最大负载均明显优于模型组,而低剂量跌打七厘片在第14天的改善效果不佳,在造模后第28天与模型组的最大负载比较有明显差异。本研究的生物力学结果与形态学表现一致,说明使用跌打七厘片不仅可以明显改善小鼠股骨的骨形态结构,还能增强骨折愈合的股骨骨骼强度和刚度等生物力学性能。

骨强度不仅与骨组织的体积及其显微结构有关,还取决于骨基质中的矿化程度^[14]。钙盐沉积是骨折修复的关键步骤之一,骨组织的修复必须经骨基质的钙化才能趋于完成,而且新骨组织的强度与基质的钙化程度密切相关^[16]。骨的矿化和力学性能在很大程度上取决于钙磷沉积水平。血液中Ca、P是以Ca²⁺和HPO₄²⁻的离子形式存在的,是相互作用的系统,成骨作用和溶骨作用的正常进行是维持血液中钙、磷水平稳定的重要环节^[17]。ALP的活性和表达是成骨分化和骨组织再生的典型标志,ALP的释放会导致有机磷酸化合物分解并释放磷酸盐,磷酸盐与游离钙离子结合并沉积在骨组织中,因此ALP的高活性提示成骨作用的活跃^[18]。陈久智

等^[19]发现使用筋骨七厘散能显著提高骨折实验犬血清P水平与血清ALP活性,以及调节实验犬骨愈合过程中不同时期的血清Ca水平,从而促进实验犬骨折愈合。宋寒冰等^[20]发现七厘散含药血清组能促进骨髓间质干细胞增殖并提高ALP的活性从而促进成骨分化,其主要是通过激活Wnt/β-catenin通路促进Runx2、Osteocalcin、β-catenin、Wnt4a、Wnt7基因及其相应蛋白的表达。本研究实验结果显示,在造模后第7、14、21和28天,比较假手术组与空白对照组的血清Ca、P、ALP水平,两组差异均无统计学意义,提示假手术对于小鼠血清Ca水平的结果并无影响。在骨折造模后的第7天,小鼠血清Ca的水平有升高的趋势,可能是破骨细胞溶解骨碎片导致释放了大量Ca离子入血。在第14、21和28天,骨折造模后的血清Ca均呈明显下降的趋势,提示血清钙与磷酸盐结合沉积增加,处于诱导成骨的钙化状态,然而跌打七厘片低、高剂量对于骨折小鼠血清Ca的改变并不显著。而小鼠在骨折后血清P、ALP水平均呈上升趋势并在第21天达到高峰,且跌打七厘片组的血清P和ALP水平均高于模型组,说明跌打七厘片可以提高成骨活性,促进磷酸盐的释放,从而提高钙盐沉积促进小鼠股骨的骨折愈合。

本研究表明跌打七厘片对小鼠骨折有促进作用,提高成骨活性及钙盐沉积,以增加骨痂水平增强骨强度。跌打七厘片是临床上常用的中药复方,其药物成分繁多及机制复杂,本研究仅仅从动物水平研究跌打七厘片对骨折愈合的影响,未从机制角度进行研究探讨,后续研究将从细胞以及分子水平探究跌打七厘片促进骨折愈合的机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐志明. 补肾活血法对骨折愈合影响的临床及实验研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
Xu Z M. Effect of the treatment of bushenhuoxuefa for clinical and experimental research on fracture healing [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [2] Praemer A, Furner S, Rice D. Musculoskeletal conditions in the United States [EB/OL]. (1992-01) [2023-02-03] https://www.researchgate.net/publication/284627825_Medical_implants_and_major_joint_procedures_in_Musculoskeletal_Conditions_in_the_United_States.
- [3] 高莹, 鲁晶, 赵晶, 等. 跌打七厘片的药理作用机制及临床应用进展 [J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(23): 179-180.

- Gao Y, Lu J, Zhao J, et al. Pharmacological mechanism and clinical application progress of Dieda Qili Tablets [J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2013, 6(23): 179-180.
- [4] 陈崇文. 跌打七厘片促进骨折愈合的效果观察 [J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(20): 63-64.
- Chen C W. Observation on the effect of Dieda Qili Tablet in promoting fracture healing [J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2013, 6(20): 63-64.
- [5] 王江萍. 跌打七厘片治疗创伤骨折疗效观察 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(8): 1343.
- Wang J P. Observation on therapeutic effect of Dieda Qili Tablet on traumatic fracture [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2012, 21(8): 1343.
- [6] 张德辉, 徐恒雁, 朱民. 跌打七厘片治疗 Colles 骨折 60 例疗效分析 [J]. 中国中医急症, 2009, 18(4): 543-544.
- Zhang D H, Xu H Y, Zhu M. Clinical analysis of 60 cases of Colles fracture treated with Dieda Qili Tablet [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2009, 18(4): 543-544.
- [7] 韩高超. 跌打七厘片联合改良克氏针张力带内固定术治疗髌骨骨折的效果 [J]. 河南外科学杂志, 2020, 26(3): 142-143.
- Han G C. Effect of Dieda Qili Tablet combined with improved Kirschner wire tension band internal fixation on patella fracture [J]. Henan J Surg, 2020, 26(3): 142-143.
- [8] 谢兴文, 徐世红, 李宁, 等. 七厘散含药血清对骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(10): 895-899.
- Xie X W, Xu S H, Li N, et al. Effect of Qilisan containing serum on the proliferation and osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells [J]. Chin J Osteoporos, 2012, 18(10): 895-899.
- [9] Çevik H B, Eceviz E, Kaya Ö T Ç, et al. The effect of topical and systemic tranexamic acid on fracture healing in rats [J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2020, 54(2): 207-212.
- [10] Chun Y S, Lee D H, Won T G, et al. Current modalities for fracture healing enhancement [J]. Tissue Eng Regen Med, 2022, 19(1): 11-17.
- [11] Einhorn T A, Gerstenfeld L C. Fracture healing: Mechanisms and interventions [J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(1): 45-54.
- [12] Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadeh A. Bone injury and fracture healing biology [J]. Biomed Environ Sci, 2015, 28(1): 57-71.
- [13] 刘炜, 罗会盛, 邹恺平, 等. 健骨丸对去势大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5615-5619.
- Liu W, Luo H s, Zou K p, et al. Effect of Jiangu Pill on osteoporotic fracture healing in ovariectomized rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(18): 5615-5619.
- [14] Zhang G D, Boyle D L, Zhang Y T, et al. Development and mineralization of embryonic avian scleral ossicles [J]. Mol Vis, 2012, 18: 348-361.
- [15] Skic A, Puzio I, Tymicki G, et al. Effect of nesfatin-1 on rat humerus mechanical properties under quasi-static and impact loading conditions [J]. Materials, 2022, 15(1): 333.
- [16] di Giacomo V, Cataldi A, Sancilio S. Biological factors, metals, and biomaterials regulating osteogenesis through autophagy [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2789.
- [17] Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions [J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(3): 133-143.
- [18] Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: An overview [J]. Indian J Clin Biochem, 2014, 29(3): 269-278.
- [19] 陈久智, 李少川, 刘亚驹, 等. 筋骨七厘散对骨折犬血清 Ca、P 与 ALP 的影响 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2020, 45(3): 48-52.
- Chen J Z, Li S C, Liu Y J, et al. Effect on serum Ca, P and ALP in dogs with fracture by Chinese herb medicine Jinguqili Powder [J]. Guangdong J Animal Vet Sci, 2020, 45(3): 48-52.
- [20] 宋寒冰, 刘家兴, 王革强, 等. 七厘散含药血清对大鼠骨膜间质干细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路表达的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37(1): 76-79.
- Song H B, Liu J X, Wang G Q, et al. Effect of Qili San medicated serum on rats' bone marrow stromal cells and signaling pathway expression of Wnt/ β -catenin [J]. J Chang Univ Chin Med, 2021, 37(1): 76-79.

【责任编辑 兰新新】