

本文引用:杨卓,邱振南,余晓愉,周文佳,闫春晓,齐新宇,徐无忌,熊辉.桃红四物汤组方药物主要有效单体成分伍对早期骨折愈合的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(12):1462-1467.

桃红四物汤组方药物主要有效单体成分伍 对早期骨折愈合的影响

杨卓¹,邱振南²,余晓愉¹,周文佳¹,闫春晓¹,齐新宇¹,徐无忌³,熊辉^{1*}
(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.浏阳市中医院,湖南浏阳 410301;
3.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005)

[摘要] **目的** 研究桃红四物汤中各药物主要有效单体成分伍对大鼠早期骨折愈合的影响及其机制。**方法** 采用骨锯截断股骨干中段建立骨折模型,将大鼠随机分为5组:空白组(不做处理灌胃等量生理盐水)、假手术组(只切开不截断,灌胃等量生理盐水)、模型组(造模,灌胃等量生理盐水)、原方水提组(造模,灌胃原方水煎剂)、单体成分组(造模,灌胃原方主要单体成分组方)。于造模后的第4、7、10天3个时间点:卡尺测量大鼠肢体肿胀度;ELISA检测大鼠血清中VEGF的浓度;Micro-CT扫描检测大鼠骨折断端BV和BV/TV%;HE染色观察大鼠骨折早期断端病理形态变化。**结果** 与空白组比较,模型组肢体肿胀度、VEGF浓度均明显增高,组织病理学结构存在明显差异。术后第4、7、10天与模型组比较,单体成分组与原方水提组肢体肿胀度明显下降($P<0.05$),VEGF浓度、BV、BV/TV%明显升高($P<0.05$)。**结论** (1)桃红四物汤各药物主要有效单体成分伍能有效缩短骨折愈合时间,促进大鼠早期骨折愈合。(2)桃红四物汤各药物有效单体成分伍与原方水煎剂对早期骨折的治疗效果基本相同。

[关键词] 桃红四物汤;单体成分伍;骨折;早期骨折愈合

[中图分类号]R289

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.12.005

Effects of Compatibility of the Main Effective Monomer Components of Medicinal Substances in Taohong Siwu Decoction on Early Fracture Healing

YANG Zhuo¹, QIU Zhennan², YU Xiaoyu¹, ZHOU Wenjia¹, YAN Chunxiao¹, QI Xinyu¹, XU Wuji³, XIONG Hui^{1*}
(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Liuyang Hospital of Traditional Chinese
Medicine, Liuyang, Hunan 410301, China; 3. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha,
Hunan 410005, China)

[Abstract] **Objective** To study effects and the mechanism of compatibility of the main effective monomer components of medicinal substances in Taohong Siwu Decoction on early fracture healing in rats. **Methods** Middle sections of femoral shafts were cut by a bone saw to establish fracture models, and the rats were randomly assigned into 5 groups: a blank group (without treatment and gavage with the same amount of normal saline), a sham operation group (incision only, without cutting off the femoral shafts; gavage with the same amount of normal saline), a model group (gavage with the same amount of normal saline after the modeling), an original prescription water extraction group (gavage with decoction of the original prescription) and a monomer component group (with a prescription of the main monomer components in the original prescription). On 3 time points of the 4th, 7th

[收稿日期]2019-10-30

[基金项目]国家自然科学基金项目(81574005);湖南省研究生科研创新项目(CX20190547)。

[作者简介]杨卓,男,在读硕士研究生,研究方向:中医药治疗骨伤科疾病。

[通讯作者]*熊辉,男,主任医师,教授,博士研究生导师,E-mail:xh_hn@hnu.cm.edu.cn。

and 10th days after the modeling; a caliper was used to measure degrees of rat limb swelling; ELISA was applied to detect concentrations of VEGF in rat serum; Micro-CT scanning was applied to detect BV and BV/TV% in rat fracture ends; and HE staining was used to observe pathological morphologic changes of the early fracture ends in rats. **Results** Compared with the blank group, the limb swelling degree and the VEGF concentration in the model group were significantly increased, and the histopathological structure was significantly different. Compared with the model group on the 4th, 7th and 10th days after the operation, the limb swelling degrees in the monomer component group and the original prescription water extraction group were significantly decreased ($P<0.05$), and the concentrations of VEGF, BV and BV/TV% were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** (1) The compatibility of the main effective monomer components of medicinal substances in Taohong Siwu Decoction can effectively shorten fracture healing time and promote early fracture healing in rats. (2) The treatment effects of compounds-compatibility of Taohong Siwu Decoction are equivalent to its original water extraction.

[**Keywords**] Taohong Siwu Decoction; compatibility of compounds; fracture; early fracture healing

随着人们生活节奏的加快及交通水平的不断提高,骨折成了临床的常见病、多发病,各种并发症的概率也在逐渐增加^[1-2]。由于骨折的愈合是一个漫长的过程,所以国内外学者针对中医药促进骨折愈合进行了大量相关研究^[3]。桃红四物汤载于清代医家吴谦所著之《医宗金鉴》,是活血化瘀的代表方之一。本课题组前期研究表明,该方具有良好的促进早期骨折愈合的作用,主要表现在促进成骨细胞生长、加速骨小梁重建、促进骨痂微血管新生、提高骨痂血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白的表达^[4]。王慧卓等^[5]研究发现,大鼠灌胃桃红四物汤后,液相色谱-串联质谱法测得血液中有效单体成分主要有芍药苷、芍药内酯苷、梓醇、阿魏酸、藁本内酯和苦杏仁苷 6 种。本研究拟从桃红四物汤中药物主要有效单成分伍伍角度,探讨其对大鼠早期骨折愈合的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康 2 月龄 SD 雄性大鼠 60 只,体质量为(200±20) g,订购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号:SYXK<湘>2016-0002。各组大鼠均分笼饲养于湖南中医药大学实验动物中心,温度 20~25 ℃,相对湿度 55%~60%,自由摄食饮水。

1.2 主要药物及试剂

4%的乙二胺四乙酸(EDTA)(上海生工生物工程有限公司),鼠 VEGF 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司,G-W054),桃红四物汤单体成分组方:苦杏仁苷(MUST-18042810)、阿魏酸(MUST-18032928)、羟基红花黄色素 A(MUST-18101910)、梓醇(MUST-

18103011)、芍药苷(MUST-18032901)、毛蕊花糖苷(MUST-18032725)、川芎嗪(MUST-18051403),以上成分均由成都曼斯特生物科技有限公司提供,根据 2015 版《中药药典》的剂量将苦杏仁苷 35 mg、阿魏酸 2.5 mg、羟基红花黄色素 A 15 mg、梓醇 3 mg、芍药苷 31 mg、毛蕊花糖苷 1 mg、川芎嗪 1.5 mg 溶于水配成单体组方,和桃红四物汤水煎剂等体积灌胃。桃红四物汤:桃仁 20 g,红花 10 g,生地黄 20 g,当归 20 g,赤芍 20 g,川芎 10 g,由湖南省第二附属医院中药房提供,符合 2015 版《中华人民共和国药典》要求。药物制备:加 10 倍量水浸泡 0.5 h,用电热套加热回流提取 1 h,趁热滤过;第 2 次加 8 倍量水,同法再煮 1 h。合并两次煎液,药物浓缩至每 1 mL 中含复方中药 0.6 g。

1.3 主要仪器

ER-182 A 型电子天平(日本 AND 公司),显微镜(日本 Motic 公司),石蜡切片机(德国 LABSTAR 公司),旋转蒸发器 RE-2000B(上海亚荣生化仪器厂),显微 CT(美国 Perkin Elmer 公司)。

2 方法

2.1 动物造模及分组

将 60 只 SD 雄性大鼠饲养 1 周后,参照文献[6]造模,具体方法如下:腹腔注射 1%戊巴比妥麻醉大鼠后,取俯卧位将大鼠固定于无菌操作台上。备皮,常规消毒。于大鼠左股外侧作一长约 3 cm 的纵行切口,逐层钝性分离后充分暴露股骨干;定位至股骨干中段,先用骨锯锯断股骨,后改用止血钳折断股骨干,以保持断端完整。由断端进针,同侧股骨大转子出针,于股骨干近端逆行插入一根直径为 1 mm

的克氏针复位,然后顺行穿回,完成复位后,弯折其根部,剪去多余部分,随后缝合伤口。术中剔除粉碎性骨折大鼠,重新造模补充至所需样本量。观察大鼠情况,确认无术后死亡后回笼饲养,正常饮水摄食,予青霉素腹腔注射3 d,防止感染。将大鼠随机分为5组,每组12只:空白组(A组,不做处理,灌胃等量生理盐水)、假手术组(B组,只切开不截断,灌胃等量生理盐水)、模型组(C组,造模,灌胃等量生理盐水)、原方水提组(D组,造模,灌胃原方水煎剂)、单体成分组(E组,造模,灌胃原方主要单体成分组方)。

2.2 药物干预

大鼠每日灌胃量为3 mL/只,剂量为9 g/(kg·d)。原方水提组及单体成分组按等剂量灌胃相应药液;模型组、假手术组及空白组灌胃等量的生理盐水。各组连续灌胃10 d,每天灌胃2次,2次灌胃间隔8 h。

2.3 样本采集

在大鼠造模后第4、7、10天,每组随机选择4只大鼠,麻醉后经腹主动脉采血后用断颈处死大鼠,取出左侧股骨(造模处),多聚甲醛固定,固定后脱钙。

2.4 大鼠肢体肿胀度测定

分别于造模前和造模后第4、7、10天在左股骨中段同一位置剔除毛发,用红线缠上进行标记,并用不锈钢带表卡尺测量,每只大鼠均需要重复3次,得到平均值。

2.5 大鼠血清 VEGF 浓度的测定

造模后第4、7、10天使用ELISA检测各组大鼠血清VEGF的浓度,每组检测4只,取平均值,具体操作按说明书进行。

2.6 骨体积和骨性骨痂体积百分比测定

通过显微CT(Micro-CT)进行扫描,将造模后第4、7、10天大鼠股骨中段骨折位置和骨折处周围的骨进行三维重建分析,可测得骨体积(bone volume, BV)和骨性骨痂体积(total volume, TV)百分比(BV/TV%)。

2.7 HE染色观察骨折早期断端病理形态变化

用75%、85%、95%、100%的乙醇梯度依次脱水各30 min,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下分别观察造模后第4、7、10天骨折断端病理形态变化。

2.8 统计学分析

使用SPSS 19.0来进行统计分析,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”

表示。组间均数比较选择单因素方差分析,方差齐时选择LSD法,方差不齐时选择Dunnett's T3法,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 桃红四物汤对大鼠肢体肿胀度的影响

与空白组比较,假手术组肢体肿胀度差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组、原方水提组、单体成分组肢体肿胀度在造模后、灌胃第4、7天大鼠肢体肿胀度均显著增加($P < 0.05$),原方水提组、单体成分组在灌胃第10天差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组相比,单体成分组与原方水提组大鼠肢体肿胀度在造模后差异无统计学意义($P > 0.05$),在灌胃第4、7、10天明显降低($P < 0.05$)。与原方水提组比较,单体成分组肢体肿胀度在造模后、灌胃第4、7、10天差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 大鼠股骨中段肿胀度变化($n=4, \bar{x} \pm s, \text{cm}$)

组别	造模后	灌胃第4天	灌胃第7天	灌胃第10天
空白组	4.04±0.42	4.07±0.24	4.10±0.54	4.12±0.33
假手术组	4.51±0.56	4.42±0.47	4.29±0.23	4.10±0.41
模型组	5.52±0.38*	5.37±0.55*	5.01±0.40*	4.93±0.29*
原方水提组	5.45±0.25*	4.95±0.43*•	4.63±0.21*•	4.21±0.40•
单体成分组	5.46±0.33*	4.81±0.51*•	4.72±0.53*•	4.17±0.32•

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,• $P < 0.05$

3.2 桃红四物汤对大鼠血清 VEGF 浓度的影响

与空白组比较,假手术组大鼠血清VEGF浓度差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组、原方水提组、单体成分组大鼠血清VEGF浓度在灌胃第4、7、10天均显著增加($P < 0.05$)。与模型组比较,原方水提组、单体成分组大鼠血清VEGF浓度在灌胃第4、7、10天均显著增加($P < 0.05$)。与原方水提组比较,单体成分组大鼠血清VEGF浓度在灌胃第4、7、10天差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 不同时相点血清 VEGF 浓度含量统计分析($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	灌胃第4天	灌胃第7天	灌胃第10天
空白组	123.65±3.61	122.76±2.73	124.04±1.89
假手术组	130.17±1.67	125.30±2.54	123.15±3.01
模型组	162.32±5.34*	197.90±7.79*	225.68±2.54*
原方水提组	235.18±5.09*•	335.56±4.71*•	476.74±3.82*•
单体成分组	229.34±3.82*•	341.38±5.84*•	462.31±5.22*•

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,• $P < 0.05$

3.3 桃红四物汤对大鼠 BV、BV/TV%的影响

与模型组比较,原方水提组、单体成分组 BV、BV/TV%在灌胃第 4、7、10 天均显著增加($P<0.05$)。与原方水提组比较,单体成分组 BV、BV/TV%在灌胃第 4、7、10 天差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3-4、图 1。

表 3 大鼠术后 BV 变化($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	灌胃第 4 天	灌胃第 7 天	灌胃第 10 天
模型组	38.12±3.64	42.56±3.12	50.12±4.72
原方水提组	44.35±4.59 [▲]	53.23±3.24 [▲]	76.43±3.89 [▲]
单体成分组	46.23±3.34 [▲]	54.21±3.71 [▲]	78.52±4.76 [▲]

注:与模型组比较,▲ $P<0.05$

3.4 桃红四物汤对大鼠骨组织病理结构的影响

空白组和假手术组的骨皮质和骨干连续未断,可见充满骨髓的海绵状骨。灌胃第 4 天,模型组可见

表 4 大鼠术后 BV/TV%变化($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	灌胃第 4 天	灌胃第 7 天	灌胃第 10 天
模型组	0.21±0.04	0.24±0.05	0.35±0.06
原方水提组	0.33±0.06 [▲]	0.47±0.02 [▲]	0.58±0.09 [▲]
单体成分组	0.36±0.05 [▲]	0.42±0.07 [▲]	0.59±0.08 [▲]

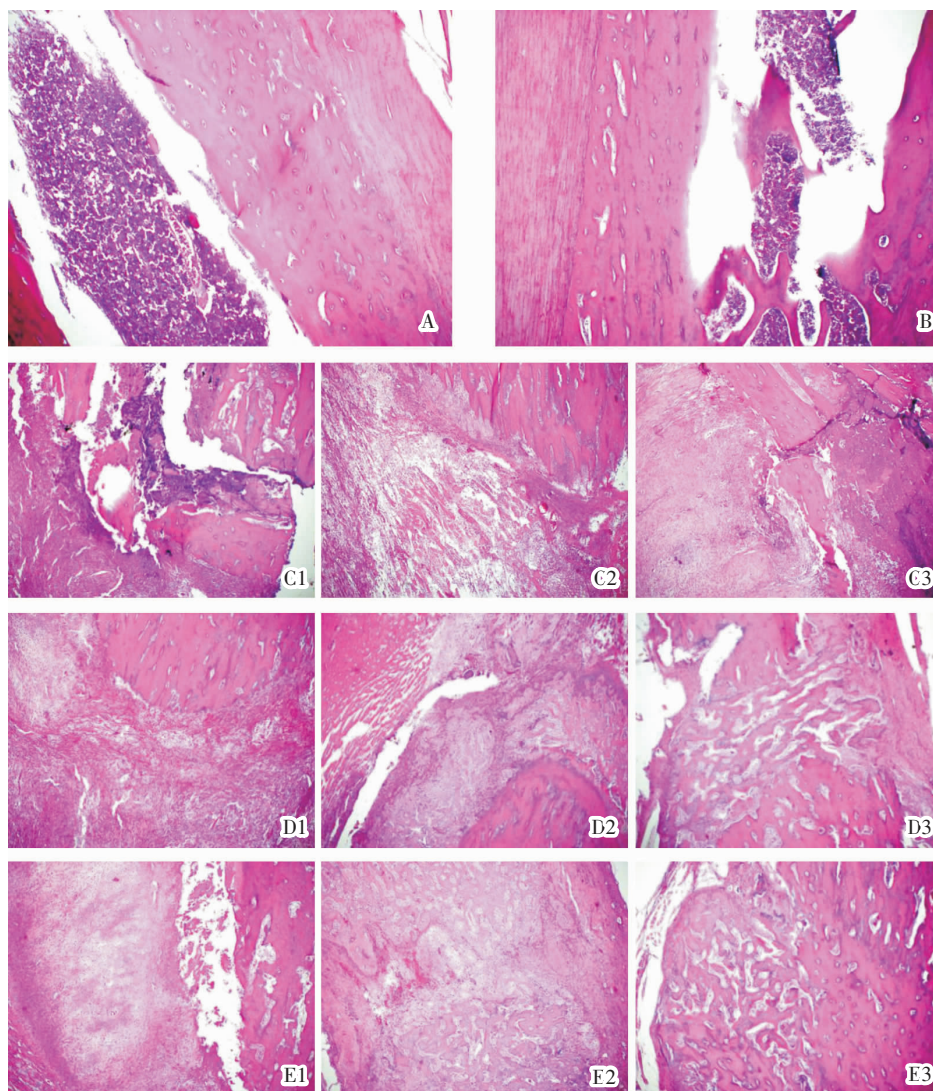
注:与模型组组比较,▲ $P<0.05$

不连续的骨皮质和骨干以及局部坏死的骨组织;原方水提组和单体成分组中均可以见到少量的软骨细胞和肉芽组织。灌胃第 7 天,模型组、原方水提组、单体成分组中均可见大量软骨细胞和肉芽组织,此外,原方水提组还可见少许骨小梁,单体成分组还可见少许的骨小梁和骨髓腔。灌胃第 10 天,模型组可见大量的软骨细胞和肉芽组织,未见骨痂;原方水提组和单体成分组均可见少许骨痂,骨痂内有新生骨小梁且排列致密。见图 2。



注:C.模型组;D.原方水提组;E.单体成分组。1,2,3 对应造模后第 4,7,10 天 3 个时相点

图 1 术后第 4、7、10 天大鼠股骨显微 Micro-CT 图像



注:A.空白组;B.假手术组;C.模型组;D.原方水提组;E.单体成分组。1,2,3 分别对应第4、7、10天3个时相点

图2 术后第4、7、10天大鼠股骨切片(HE,×40)

4 讨论

骨折愈合是一个复杂的过程,是通过细胞、生长因子和生物途径之间的相互作用来协调的^[7],通过骨折部位处募集祖细胞,促进形成初始软骨痂,然后被血管再吸收、骨形成和骨化最终达到骨折愈合^[8]。骨折修复失败一直是困扰骨科医生的重要难题^[9],中医药治疗骨伤科疾病有着独特优势,尤其在治疗骨损修复方面,一直是临床骨科研究的重要领域^[10]。现代药理研究表明^[11],桃仁中的有效成分苦杏仁苷能发挥抗炎作用,其机制可能与通过脂蛋白刺激小鼠小胶质细胞 BV-2 中环氧化酶 2,并促进一氧化氮合酶 mRNA 的表达有关。红花中的有效成分羟基红花黄色素 A,能拮抗二磷酸腺苷的促血小板聚集作用^[12],通过竞争性抑制血小板激活因子,正向调控

VEGF 的表达,进一步促进血管的新生。桃红四物汤含有大量多糖成分,有助于增加造血微循环中的白细胞、红细胞和血小板的含量,还能刺激肌组织中的造血调控因子,提高外周血中白细胞含量^[13-14]。研究表明^[15],阿魏酸具有抗炎、抗血栓、抗氧化、抑制血小板聚集等药理作用。芍药苷能够抗炎止痛、扩张血管、增加血流量、抑制血小板聚集。川芎嗪具有明显的抗氧化损伤的作用,能增加组织中的毛细血管数,改善微血管内血液流变性,改善损伤组织血运状态,加速骨折愈合。梓醇溶液能显著促进成骨细胞增殖。通过实验也证实了桃红四物汤单体成分配伍加速了骨折愈合^[16]。

VEGF 在内皮细胞活化、增殖、迁移、改善血管通透性等过程中均起重要作用。血管生成是成骨过程中的关键环节,VEGF 又是调控血管发育和血管

生成的重要生长因子之一。因此,调控 VEGF 表达是修复骨损伤和促进骨再生的重要靶点之一。本实验研究发现,与模型组相比,原方水提组与单成分组 VEGF 浓度在灌胃第 4、7、10 天均显著升高;与原方水提组相比,单成分组 VEGF 浓度在灌胃第 4、7、10 天未见明显差别。证实了桃红四物汤有效单成分组方可以促进 VEGF 的表达。

BV/TV% 及 BV 是评价骨折断端生长情况的标志^[17]。分析 Micro-CT 结果发现,桃红四物汤单成分组方能有效促进大鼠早期骨折愈合。骨组织病理学检测也进一步证实了这一结果,通过观察灌胃第 4、7、10 天病理切片我们发现,原方水提组和单成分组大鼠软骨细胞的生长、骨小梁与骨髓腔的形成、骨折愈合的速度均快于模型组。

综上所述,通过对大鼠一般情况、肢体肿胀度、血清 VEGF 浓度、Micro-CT 和组织病理切片的观察、检测和分析,本次实验有效证实了桃红四物汤单成分伍有助于促进大鼠骨折早期愈合,但具体机制尚需进一步研究。此外,本实验仅对 3 个时间点的结果进行分析,样本量较小,桃红四物汤单成分组方是否可以完全替代原方水煎剂还需进一步实验研究。

参考文献

- [1] GUREN E, FIGVED W, FRIHAGEN F, et al. Prosthetic joint infection—a devastating complication of hemiarthroplasty for hip fracture[J]. *Acta Orthopaedica*, 2017, 88(4): 383–389.
- [2] AFSHA R, AHMADREZ A. Intrapelvic Protrusion of a Broken Guide Wire Fragment during Fixation of a Femoral Neck Fracture[J]. *Archives of Bone & Joint Surgery*, 2017, 5(1): 63–65.
- [3] 程 琦,闫腾龙,丰 哲.中医药促进骨折愈合机理的研究进展[J]. *广西中医药大学学报*,2014,17(2):85–87.
- [4] 熊 辉,李 前,谈立明,等.桃红四物汤有效成分的交互作用及其对血清 VEGF 浓度的影响[J]. *中医正骨*,2011,23(2):3–6.
- [5] 王慧卓,彭代银,陈卫东,等.LC-MS/MS 鉴定大鼠血浆中桃红四物汤有效成分[J]. *安徽中医药大学学报*,2017,36(3):69–73.
- [6] 刘 震,于训意,曹长征,等.接骨续筋丸促进大鼠骨折愈合的作用机制研究[J]. *中医正骨*,2017,29(10):1–12.
- [7] GERSTENFELD L C, ALKHIARY Y M, KRALL E A, et al. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis[J]. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2006, 54(11): 1215–1228.
- [8] ROBERTS J L, PAGLIA D N, DRISSI H. Transcriptional mechanisms of secondary fracture healing [J]. *Current Osteoporosis Reports*, 2018, 16(2): 146–154.
- [9] LOI F, CORDOVA LA, PAJARINEN J, et al. Inflammation, fracture and bone repair[J]. *Bone*, 2016, 86: 119–130.
- [10] 张 坤,牛良晨,袁福杰,等.中药促进骨折愈合在细胞分子水平的研究进展[J]. *中国骨伤*,2017,30(8):777–782.
- [11] 许筱凰,李 婷,王一涛,等.桃仁的研究进展[J]. *中草药*,2015,46(17):2649–2655.
- [12] 王保磊,万 叶,张德进,等.桃红四物颗粒制备及其抗血小板聚集作用的研究[J]. *时珍国医国药*,2019,30(4):881–885.
- [13] 马清林,吴国泰,孙 敏,等.当归补血作用研究进展[J]. *甘肃中医药大学学报*,2019,36(3):93–97.
- [14] 谭旭仪,陈献韬,高书图,等.补肾、活血、祛痰法对激素性股骨头坏死模型血液流变学的影响[J]. *湖南中医药大学学报*,2017,37(6): 594–598.
- [15] 曾柳庭,刘慧萍,杨凯麟,等.四物汤有效成分的关联性分析[J]. *中成药*,2017,39(3):576–582.
- [16] 贾英民,李瑞玉,武密山,等.地黄梓醇对原代培养 SD 乳大鼠成骨细胞成骨活性的影响研究[J]. *现代中西医结合杂志*,2015,24(23): 2524–2526.
- [17] MORGAN E F, MASON Z D, CHIEN K B, et al. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: Relationships among callus structure, composition, and mechanical function[J]. *Bone*, 2009, 44(2): 335–344.

(本文编辑 匡静之)