

新仙灵骨葆胶囊对大鼠骨折愈合的影响研究[△]

刘明^{1*}, 刘杨¹, 张永萍^{2#}, 徐剑², 孙宜春³, 白志文³ [1. 贵阳中医学院基础医学院, 贵阳 550025; 2. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550025; 3. 国药集团同济堂(贵州)制药有限公司, 贵阳 550009]

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1201-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.12

摘要 目的: 研究新仙灵骨葆胶囊对大鼠骨折愈合的影响, 为寻求“减量增效(减量等效)”新组方提供参考。方法: 将大鼠随机分为假手术组(蒸馏水)、模型组(蒸馏水)、仙灵骨葆胶囊组(350 mg/kg)和新仙灵骨葆胶囊低、中、高剂量组(53、105、210 mg/kg), 每组14只。除假手术组外, 其余各组大鼠均在麻醉状态下制作右侧股骨中段骨折模型。待大鼠术后清醒, 各组大鼠灌胃相应药物10 mL/kg, 每天给药1次, 连续4周。末次给药后, 测定大鼠体质量, 观察骨折处骨痂形成及组织病理学变化, 进行骨折侧生物力学(骨折应力、骨压碎力)测量, 并采用酶联免疫吸附法检测血清中炎症因子[肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)]水平。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠体质量和骨折侧骨折应力、骨压碎力明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 血清中TNF- α 、IL-1 β 水平明显升高($P < 0.01$); 模型组大鼠骨折周围可见明显骨痂形成, 骨小梁不成熟, 排列混乱。与模型组比较, 新仙灵骨葆胶囊高剂量组和仙灵骨葆胶囊组大鼠体质量明显增加($P < 0.05$), 新仙灵骨葆胶囊中、高剂量组和仙灵骨葆胶囊组大鼠骨折侧骨折应力明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 各给药组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 水平均明显降低($P < 0.01$); 且新仙灵骨葆胶囊各剂量组与仙灵骨葆胶囊组比较上述指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各给药组大鼠骨痂面积均变小, 骨折线变模糊, 骨折痕迹基本消失, 骨小梁数量增多; 骨折处皮质层增厚, 骨髓腔见大量毛细血管植入。结论: 新仙灵骨葆胶囊具有明显的促进骨折愈合作用, 可有效提高骨生物力学强度, 抑制炎症反应。

关键词 新仙灵骨葆胶囊; 大鼠; 骨折; 骨生物力学; 炎症因子

Study on the Effects of New Xianling Gubao Capsule on Fracture Healing in Rats

LIU Ming¹, LIU Yang¹, ZHANG Yongping², XU Jian², SUN Yichun³, BAI Zhiwen³ (1. Basic Medical School, Guiyang College of TCM, Guiyang 550025, China; 2. School of Pharmacy, Guiyang College of TCM, Guiyang 550025, China; 3. Sinopharm Group Tongjitang (Guizhou) Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550009, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of new Xianling gubao capsule on fracture healing in rats, and to provide reference for seeking new formula of “to reduce stockpiles and increase efficiency (to reduce stockpiles and constant efficiency)”. **METHODS:** Rats were randomly divided into sham operation group (distilled water), model group (distilled water), Xianling gubao capsule group (350 mg/kg), new Xianling gubao capsule low-dose, medium-dose and high-dose groups (53, 105, 210 mg/kg), with 14 rats in each group. Except for sham operation group, right middle femur fracture model was established under the anesthetic state. Rats were given relevant medicine 10 mL/kg intragastrically after woken, once a day, for consecutive 4 weeks. After last administration, body weights of rats were determined; the formation of callus and histopathological changes in fracture were observed; biomechanics of fracture side (fracture stress and bone crushing force) was measured. The levels of inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β) in serum were detected by ELISA. **RESULTS:** Compared with sham operation group, body weight, fracture stress and bone crushing force of fracture side were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the serum levels of TNF- α and IL-1 β were increased significantly ($P < 0.01$). In model group, the scab was visible around the fracture, and the trabecular bone was not mature and arranged in confusion. Compared with model group, body weights of rats were increased significantly in new Xianling gubao capsule high-dose group and Xianling gubao capsule group ($P < 0.05$); fracture stress of

[14] 朱晓璐, 林昀, 李霞. 蒸发光散射-HPLC法测定硫酸妥布

[△] 基金项目: 国家科技重大专项项目(No. 2011ZX09201-201-05); 贵州省协同创新中心建设项目(No. 黔教合协同创新字[2013]02号); 贵州省普通高等学校工程研究中心建设项目(No. 黔教合KY字[2014]22号)

* 副教授, 硕士生导师。研究方向: 中药、民族药防治心脑血管疾病药理研究。E-mail: 393617518@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 药物新制剂与新剂型的开发。E-mail: 642055255@qq.com

霉素注射液中的有关物质[J]. 中国药房, 2012, 23(16): 1527-1528.

[15] 马涵涛, 沈新伦, 杜雄军. HPLC-ELSD法测定补气口服液中黄芪甲苷的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(36): 3444-3445.

[16] 魏晓雨, 姜国栋, 陈泓, 等. 贞芪扶正颗粒的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2017, 28(33): 4691-4694.

(收稿日期: 2018-02-06 修回日期: 2018-03-15)
(编辑: 余庆华)

fracture side were increased significantly in new Xianling gubao capsule medium-dose and high-dose groups and Xianling gubao capsule group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The serum levels of TNF- α and IL-1 β were decreased significantly ($P<0.01$). There was no statistical significance in above indexes among new Xianling gubao capsule groups and Xianling gubao capsule group ($P>0.05$). The area of the callus in each group was smaller; the fracture line became blurred; the fracture trace disappeared and the number of bone trabeculae increased. The cortical layer was thickened, and a large number of capillary implants were found in the bone marrow cavity. CONCLUSIONS: New Xianling gubao capsule has a significant role in promoting fracture healing, and can effectively improve the strength of bone biomechanics and inhibit the inflammatory reaction.

KEYWORDS New Xianling gubao capsule; Rats; Fracture; Bone biomechanics; Inflammatory factors

仙灵骨葆胶囊为治疗骨质疏松症类非处方药品,2009年开始被收录在《国家基本药物目录》中,是防治骨质疏松症的首选药物。经多年的临床观察发现,其对骨质疏松症、骨折、骨关节炎和骨无菌性坏死等的疗效稳定可信^[1-3]。但因仙灵骨葆胶囊原方由多味中药组成,服用剂量较大,为进一步提高其市场竞争力和改善患者依从性,本课题组通过将仙灵骨葆胶囊溶解后过大孔吸附树脂HP-20色谱柱、乙醇洗脱,得到仙灵骨葆胶囊提取物,然后采用骨质疏松、骨折、骨关节炎等动物模型,结合活性成分的多指标模式的质量控制方法,确认预防骨质疏松、骨折、骨关节炎等的最佳剂量、关键馏分后进行重新组方,得到新仙灵骨葆胶囊。本研究将利用骨折大鼠模型,观察新仙灵骨葆胶囊促进大鼠骨折愈合的作用,为寻求“减量增效(减量等效)”仙灵骨葆胶囊新组方的开发利用提供药理实验依据。

1 材料

1.1 仪器

ALC-210.3 电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);TGL-12GB-C 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);ZS-3 酶标仪(北京新凤机电厂);YLS-16A 小动物骨骼强度测定仪(济南益延科技发展有限公司);BX-51 光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

新仙灵骨葆胶囊(批号:20130906,规格:0.3 g/粒,用法用量:口服,每日1次,每次3粒)和仙灵骨葆胶囊(批号:20130815,规格:0.5 g/粒,用法用量:口服,每日2次,每次3粒)均购自国药集团同济堂(贵州)制药有限公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(北京欣博盛生物科技有限公司,批号:20161105、20161107)。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,♀♂各半,体质量220~250 g,由中国人民解放军第三军医大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(渝)2014-0003。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将SD大鼠随机分为假手术组、模型组、仙灵骨葆胶囊组(350 mg/kg,根据成人临床用量换算而得)和新仙灵骨葆胶囊低、中、高剂量组(53、105、210 mg/kg,其中中剂

量为成人临床用量的等效剂量),每组14只,♀♂各半。参照文献方法造模^[4-6]:大鼠经10%水合氯醛麻醉,常规消毒右下肢股骨段,取股外侧切口,经股前、外侧肌间隔分离暴露股骨,在股骨中段(大转子下1 cm)用低速牙科钻切断股骨,逐层关闭伤口,常规消毒。假手术组大鼠只暴露股骨,不切断股骨。术后,待大鼠完全清醒后即开始灌胃给药,给药体积为10 mL/kg,每天给药1次,连续给药4周,假手术组和模型组大鼠给予等体积蒸馏水。

2.2 血清中炎症因子水平测定

末次给药后1 h,称大鼠体质量,麻醉,腹主动脉取血,以离心半径10 cm、3 000 r/min离心10 min,分离血清。采用ELISA法测定血清中TNF- α 、IL-1 β 水平,实验操作严格按照相应试剂盒说明书进行。

2.3 骨折处骨痂形成及组织病理学变化观察

处死大鼠,每组随机选取6只大鼠,迅速取材右侧股骨,光镜下观察大鼠股骨骨折愈合情况(骨折处骨痂形成情况),并采用显微镜的测微尺测量骨折处结痂面积大小。随后将取出的股骨放入10%甲醛中固定,进行切片制作,常规苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察骨折处组织病理变化。

2.4 骨折侧骨生物力学指标测定

分别将各组剩余的8只大鼠处死,取右侧股骨,剔除股骨上附着的肌肉和韧带后,用YLS-16A小动物骨骼强度测定仪对股骨进行最大荷载测试(骨折应力)和骨结构强度测试(骨压碎力)的骨生物力学测量。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用单因素方差分析进行显著性检验,方差齐时采用LSD法进行组间两两比较,方差不齐时采用Dunnnett's法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 体质量测定结果

造模后大鼠生长较缓慢,与假手术组比较,模型组大鼠体质量显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,新仙灵骨葆胶囊高剂量组和仙灵骨葆胶囊组大鼠在药后4周后体质量显著升高($P<0.05$)。与仙灵骨葆胶囊比较,新仙灵骨葆胶囊各剂量组大鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$),结果见表1。

3.2 骨折愈合情况及病理学观察结果

表1 各组大鼠体质量测定结果($\bar{x} \pm s, n=14$)

Tab 1 Determination of body weight of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=14$)

组别	给药前体质量,g	给药后4周体质量,g
假手术组	235.7±6.7	337.2±9.1
模型组	233.6±6.2	306.4±9.1**
新仙灵骨葆胶囊低剂量组	234.3±6.8	311.1±10.2
新仙灵骨葆胶囊中剂量组	232.9±6.4	310.1±10.3
新仙灵骨葆胶囊高剂量组	235.1±7.1	313.9±7.7 [#]
仙灵骨葆胶囊组	234.3±7.2	313.8±9.9 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$

0.05

3.2.1 骨折愈合情况 大体观察结果显示,假手术组大鼠骨皮质完整;各造模组大鼠均可见骨折线,骨折周围有明显骨痂形成;各给药组大鼠骨痂面积较模型组变小,骨折线变模糊,骨折痕迹基本消失,见图1。

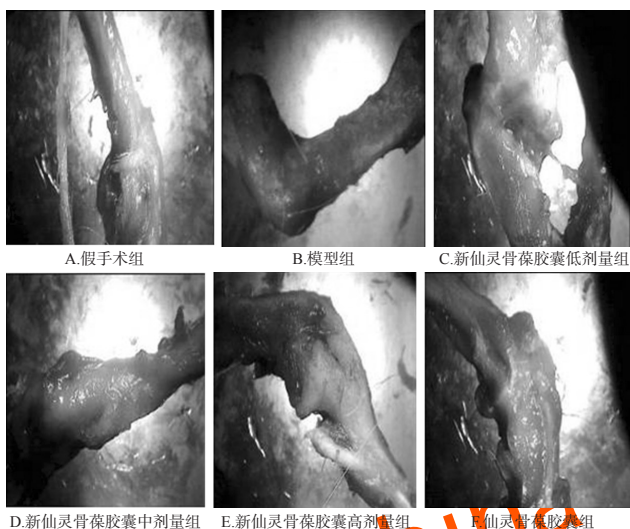


图1 各组大鼠骨折标本的大体观察结果

Fig 1 General observation of fracture specimens of rats in each group

经显微镜测微尺测量,模型组骨痂面积大约为0.2 cm²,新仙灵骨葆低剂量组骨痂面积大约为0.2 cm²,新仙灵骨葆中剂量组骨痂面积大约为0.16 cm²,新仙灵骨葆高剂量组骨痂面积大约为0.12 cm²,仙灵骨葆胶囊组骨痂面积大约为0.12 cm²。

3.2.2 病理学观察结果 假手术组大鼠骨质结构正常。模型组大鼠骨折端仍有透明软骨存在,局部有纤维性骨痂;骨小梁不成熟,排列紊乱、疏松,骨折线仍可见。新仙灵骨葆胶囊低剂量组大鼠大部分为骨性骨痂,少许软骨性骨痂,骨小梁排列稍紊乱、疏松。新仙灵骨葆中剂量组大鼠大部分为骨性骨痂,少许软骨性骨痂;骨小梁增多,已渐趋成熟,排列已稍有序,与主应力方向一致。新仙灵骨葆胶囊高剂量组大鼠基本为骨性骨痂,可见大量骨小梁,且已渐趋成熟,粗细均匀,排列较为一致,与主应力方向一致;骨髓腔可见毛细血管植入,骨折线已模糊。仙灵骨葆胶囊组大鼠均为骨性骨痂;骨小梁

已较成熟,粗细均匀,排列较为一致,与主应力方向一致;板层骨形成周围结缔组织和骨髓腔可见较多毛细血管植入且髓腔已通,骨折线较模糊。各组大鼠骨折处组织病理学观察结果见图2。

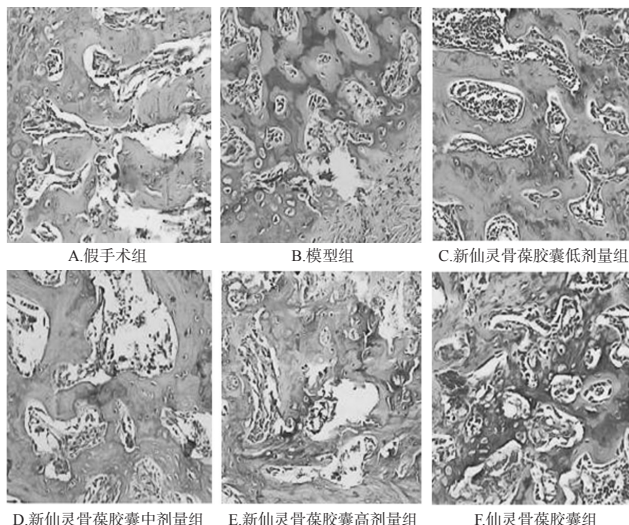


图2 各组大鼠骨折处组织病理学观察结果(HE染色,×100)

Fig 2 Histopathological observation of fracture site of rats in each group(HE staining, ×100)

3.3 血清中炎症因子水平测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,新仙灵骨葆胶囊各剂量组和仙灵骨葆胶囊组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 水平均显著降低($P<0.01$)。与仙灵骨葆胶囊比较,新仙灵骨葆胶囊各剂量组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠血清中TNF- α 和IL-1 β 水平测定结果见表2。

表2 各组大鼠血清中TNF- α 和IL-1 β 水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Serum levels of TNF- α and IL-1 β of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	TNF- α , pg/mL	IL-1 β , pg/mL
假手术组	35.39±8.85	42.77±9.06
模型组	78.49±8.54**	83.64±6.11**
新仙灵骨葆胶囊低剂量组	56.22±11.58 [#]	65.83±10.49 [#]
新仙灵骨葆胶囊中剂量组	51.19±13.42 [#]	56.74±11.53 [#]
新仙灵骨葆胶囊高剂量组	57.34±13.78 [#]	59.26±12.39 [#]
仙灵骨葆胶囊组	55.19±9.74 [#]	58.59±8.06 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.01$

0.01

3.4 骨折侧骨生物力学指标测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠的骨折应力、骨压碎力均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,新仙灵骨葆胶囊中、高剂量组和仙灵骨葆胶囊组大鼠的高骨折应力均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),各给药组大鼠的骨压碎力差异均无统计学意义($P>0.05$)。与仙灵

骨葆胶囊比较,新仙灵骨葆胶囊各剂量组大鼠的骨折应力和骨压碎力差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠骨折侧骨折应力和骨压碎力测定结果见表3。

表3 各组大鼠骨折侧骨折应力和骨压碎力测定结果($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab 3 Determination results of fracture stress of fracture side and bone crushing force of rats in each group($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	骨折应力,kg	骨压碎力,kg
假手术组	11.891±1.857	10.525±1.787
模型组	4.654±1.284**	8.561±1.633*
新仙灵骨葆胶囊低剂量组	5.539±1.178	9.021±1.882
新仙灵骨葆胶囊中剂量组	6.581±1.713*	9.298±1.311
新仙灵骨葆胶囊高剂量组	7.286±1.466**	9.766±1.903
仙灵骨葆胶囊组	7.111±1.479**	9.811±1.881

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. sham operation group,* $P<0.05$,** $P<0.01$;vs. model group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

4 讨论

仙灵骨葆胶囊由淫羊藿、续断、丹参、地黄等药材组成,具有滋补肝肾、活血通络、强筋健骨的功能,是防治骨质疏松症的首选药物。该药在临床治疗骨折方面也取得突破性进展,其促进骨折愈合的作用也逐渐得到认可^[7-9]。相关研究认为,仙灵骨葆胶囊治疗骨折的机制可能是通过性激素样作用、增强成骨细胞活性、平衡肌体内环境和微量元素、促进矿物质在骨中的沉积,从而促进骨痂的生长。田发明等^[10]证实,仙灵骨葆胶囊可提高骨折大鼠骨痂组织的血管数量,提示其可促进骨质疏松大鼠骨折愈合早期血管的形成。任光友等^[11]研究发现,仙灵骨葆胶囊可增加骨折大鼠血清生长激素,提示其参与了促进骨折愈合。穆树林等^[12]研究发现,仙灵骨葆胶囊可加快骨折大鼠编织骨向板层骨的转化,促进骨折愈合。

骨折是骨的完整性和连续性中断。依据组织、细胞学的变化,将骨折愈合分为炎症反应血肿机化期、原始骨痂形成期和骨痂改建塑形期几个阶段。本研究制作大鼠股骨中段骨折模型,大鼠骨折术后4周大致模拟了血肿机化末期与原始骨痂形成初期阶段,新生血管的形成是这一阶段的重要特征,局部血液供应将促进骨折愈合,但该阶段持续高表达的炎症反应对骨折修复过程是一个不利因素^[13-14]。实验中观察到新仙灵骨葆胶囊可增加骨折处组织骨小梁,形成骨性骨痂,骨髓腔植入大量毛细血管,这提示新仙灵骨葆胶囊可促进骨折大鼠骨折处新生血管形成,促进骨折处局部血液供应,可加快骨折愈合;且新仙灵骨葆胶囊可显著降低血清炎症因子TNF- α 、IL-1 β 水平,抑制炎症反应,有利于骨折修复。本研究结果还表明,新仙灵骨葆胶囊可显著增加骨折大鼠体质量,明显提高骨折侧骨折应力,增强骨生物力学强度;且病理学观察结果显示,新仙灵骨葆胶囊组大鼠的

骨痂面积较模型组变小,骨折线变模糊,骨折痕迹基本消失,具有明显的促进骨折愈合作用。并且,新仙灵骨葆胶囊的上述作用与仙灵骨葆胶囊无显著差异,作用相当。

综上所述,本研究从组织学、生物力学、生物化学等方面对新仙灵骨葆胶囊促进骨折愈合作用进行了研究。研究结果证实新仙灵骨葆胶囊对大鼠骨折愈合有促进作用,且该作用与仙灵骨葆胶囊作用相当,表明新仙灵骨葆胶囊在促进骨折愈合方面达到了“减量等效”的目的,但其促进骨折愈合的作用机制仍不是十分明确,需要进一步从细胞、分子水平去探讨。

参考文献

- [1] 张振忠.仙灵骨葆治疗骨关节疾病的研究进展[J].天津药学,2015,27(3):61-65.
- [2] 章铁立,廖星,刘福梅,等.仙灵骨葆胶囊上市后用安全性系统评价[J].中国中药杂志,2017,42(15):2845-2856.
- [3] 闰乾,陈锋,孙海林,等.仙灵骨葆胶囊治疗膝骨性关节炎的有效性和安全性系统评价[J].中国药房,2014,25(35):3333-3338.
- [4] 寇玉辉,王天兵,邓磊,等.人工虎骨粉对大鼠骨折愈合的影响[J].中国骨质疏松杂志,2011,17(7):605-609.
- [5] 周镇,燕青,李洪波,等.壮筋续骨汤对骨折大鼠血清内源性生长因子水平的影响及意义[J].中国中西医结合外科杂志,2015,21(5):479-484.
- [6] 汪雷,刘林娟,肖黎,等.骨髓损伤合并肢骨骨折大鼠模型中leptin的表达[J].实用医学杂志,2015,31(22):3688-3690.
- [7] 李秋琼.仙灵骨葆胶囊在促进骨折愈合中的疗效观察[J].中医中药,2010,17(24):96-97.
- [8] 李炜鹏.仙灵骨葆胶囊在骨折治疗中的临床应用[J].海峡药学,2015,27(9):149-150.
- [9] 赵建根,马超.PVP结合仙灵骨葆胶囊治疗老年性骨质疏松症伴骨折临床疗效评价[J].中华中医药学刊,2016,34(11):2805-2807.
- [10] 田发明,张柳,骆阳,等.仙灵骨葆对骨质疏松性骨折骨痂血管形成的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(28):5161-5164.
- [11] 任光友,卢玲,周宁,等.仙灵骨葆胶囊对骨折愈合中生长激素浓度及转化生长因子 β_1 表达的影响[J].贵州医药,2003,27(7):595-596.
- [12] 穆树林,张柳,李震,等.仙灵骨葆对卵巢切除大鼠股骨骨折愈合影响的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2009,23(6):690-693.
- [13] 严斌.茶多酚对大鼠骨折早期愈合及TNF- α 表达影响的实验研究[J].中国医药指南,2015,13(17):5-6.
- [14] 刘雄,廖前德,曹焕新,等.马栗树籽提取物(迈之灵)对肢体创伤患者血清细胞因子IL-6、IL-1 β 和TNF影响的研究[J].中南药学,2009,7(10):777-780.

(收稿日期:2017-11-11 修回日期:2018-02-05)

(编辑:林 静)