

· 实验研究 ·

丹参有效部位对骨折愈合过程中胶原
基因表达的影响*

史炜镔 符诗聪 杜 宁 张凤华 张 昊

内容提要 目的:观察丹参有效部位(RS9403)对骨折愈合过程中前胶原、转化生长因子 β_1 (TGF β_1)基因表达模式的影响,分析RS9403促进骨折愈合作用的分子机理。方法:健康成年Wistar大鼠24只,作双侧桡骨骨折模型,随机分成RS9403组、阳性对照药三花接骨散组(三花组)和空白对照组(空白组),分别以RS9403、三花接骨散和生理盐水灌胃给药,术后3天、1周、2周和4周后处死大鼠取材,采用不脱钙的大鼠骨痂组织冰冻切片进行原位杂交,观察骨痂组织中前胶原和TGF β_1 基因的表达。结果:骨折后第3天,RS9403组与三花组的骨折端TGF β_1 mRNA的表达明显高于空白组,并已出现Ⅲ型胶原基因的表达。骨折第1周末,成纤维细胞和软骨细胞样细胞的Ⅲ型前胶原基因表达占主导,RS9403组与三花组Ⅱ、Ⅰ型前胶原与TGF β_1 基因的表达较空白组呈同步增强趋势。骨折第2周末,Ⅰ型前胶原mRNA表达明显增加,RS9403组和三花组中肥大软骨细胞明显多于空白组,Ⅱ型前胶原mRNA的表达呈现显著的衰落趋势。同时证实共有表型表达现象的存在,尤以RS9403组与三花组更为明显。骨折第4周末,软骨骨痂基本被骨组织替代。RS9403组和三花组骨组织替代更趋完全,偶见Ⅰ型前胶原mRNA表达阳性的成骨细胞和肥大软骨细胞。结论:RS9403与阳性对照药三花接骨散均可调节骨折愈合过程中有关前胶原基因的表达,以促进骨折愈合,此作用可能与其对TGF β_1 基因表达的调控有关。

关键词 丹参 有效部位 骨折愈合 原位杂交 前胶原

Effect of Effective Fraction of Radix Salviae Miltiorrhizae on Procollagen Gene Expression in Fracture Healing
SHI Weibin, FU Shicong, DU Ning, et al *Department of Traumatology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai (200025)*

Objective: To investigate effect of effective fraction of Radix Salviae Miltiorrhizae (RS9403) on procollagens and transforming growth factor β_1 (TGF β_1) gene expression in fracture callus, and to explore the mechanism of RS9403 in enhancing fracture healing. **Methods:** Standardized radial fractures were performed in 24 Wistar rats, which were randomized into three groups: the RS9403 group, the Sanhua Jiegu powder (SHJGP) group and the blank control model group. They were fed orally with RS9403, SHJGP and normal saline respectively, and were sacrificed on the 3rd day, 1st week, 2nd week and 4th week after fracture in batches. In situ localization of procollagens and TGF β_1 gene expression were examined on the cryosection of rat fracture callus. **Results:** On the 3rd day after fracture, the TGF β_1 gene expression at the site of fracture in the RS9403 group and the SHJGP group was significantly higher than that in the blank control group, and type-Ⅲ procollagen gene expression was observed in the two groups. At the end of 1st week after fracture, the proc α_1 (Ⅲ) expression in fibroblast and chondrocyte-like cells was dominant. The local type Ⅱ and Ⅰ procollagen gene expressions in the RS9403 and the SHJGP group were enhanced simultaneously with TGF β_1 gene expression compared with those in the blank control group. At the end of 2nd week the RS9403 and the SHJGP group were characterized by a marked increase in the mRNA levels of type Ⅰ procollagen, the numbers of hypertrophic chondrocytes was larger than that in the control group, and the type Ⅱ procollagen expression declined markedly. The shared phenotype expression was confirmed at this stage, especially in the RS9403 and the SHJGP group. At the end of 4th week, the cartilaginous callus was almost all replaced by the bone tissue. In the RS9403 and the SHJGP

* 本课题受国家自然科学基金资助(No.39670894)

上海第二医科大学附属瑞金医院上海市伤骨科研究所(上海 200025)

group, the replacement was nearly complete, few type I procollagen mRNA positive osteoblasts and hypertrophic chondrocytes were found scattering in the woven bone and remnants of cartilaginous callus. **Conclusion:** RS9403 could affect the procollagens expression to enhance the healing of bone fracture as SHJGP do, maybe, by modulating the TGF β_1 expression.

Key words Radix Salviae Miltiorrhizae, effective fraction, fracture healing, in situ hybridization, procollagen

丹参作为活血化瘀的要药,其促进骨折愈合的机理已得到体内、体外的组织学、组织化学及超微结构实验研究的证实⁽¹⁾。自 1994 年,我们又对丹参作了促进骨折愈合有效部位的筛选,并确定了一个有效部位(RS9403),骨计量学检测(待发表资料)以及生物力学检测⁽²⁾显示:RS9403 可明显增加骨折处成骨细胞数量,促进类骨质的矿化,提高骨折端的力学强度。本研究采用不脱钙的大鼠骨痂组织冰冻切片进行原位杂交⁽³⁾,观察丹参有效部位(RS9403)对骨折愈合过程中前胶原以及转化生长因子(TGF β_1)基因表达的影响,以在分子水平上揭示上述作用机制。

材料与方法

1 动物模型与组织切片制作 健康成年 Wistar 大鼠 24 只,体重(200g $\pm$ 20)g,中国科学院上海实验动物中心提供,作双侧桡骨骨折模型⁽⁴⁾,随机分成丹参有效部位组(RS9403 组)、三花接骨散组(三花组)和空白对照组(空白组),每组 8 只,分别以 RS9403、三花接骨散和生理盐水灌胃给药。术后 3 天、1 周、2 周和 4 周后处死取材,每组 2 只,血肿和骨痂组织取下后,DEPC 水配制的磷酸缓冲液(PBS)冲去血迹,迅速置液氮内冻存,然后,在冰冻切片机上,作 6 μ m 的连续冰冻切片,置预先硅化的涂有多聚赖氨酸的载玻片上,质量分数为 4%的多聚甲醛(含 0.1mol/L 蔗糖的质量浓度 0.1mol/L 的 PBS, pH7.2)室温下固定 15min, PBS 洗 2 次,各 10min。质量浓度为 0.2mol/L 的 HCl 室温下作用 10min,质量分数为 0.1% Triton X-100 作用 15min,含质量分数为 0.2% 甘氨酸的 PBS 室温下孵育 10min,蛋白酶 K 消化 15min,含质量分数为 0.2% 甘氨酸的 PBS 室温下再孵育 10min, PBS - 5mmol/L Mg-Cl₂ 洗 2 次,各 15min,逐级酒精脱水,空气干燥。

2 探针的制备 有关前胶原基因 cDNA 探针的质粒[pHCAL1(I 型), pHCAR1 和 pHCAR3(II 型), pHFS3(III 型)],均由芬兰 Turku 大学惠赠,合成方法参照有关文献⁽⁵⁾。TGF β_1 寡核苷酸探针的探针序列:CTTGCTGTACTGTGTGTCCAA,由 DNA 合成仪合成。标记采用 Boehringer Mannheim 公司 Dig 标记试

剂盒,方法参照试剂盒所附说明。

3 原位杂交 采用非同位素 Dig 标记原位杂交,杂交及显色检测均采用 Boehringer Mannheim 公司 Dig 标记检测试剂盒,方法参照试剂盒所附说明及有关文献⁽⁶⁾。杂交阴性对照设立:(1)杂交液中不加标记探针;(2)杂交前以 RNase 处理切片。

结 果

骨折后第 3 天,RS9403 组与三花组的骨折端血肿中,TGF β_1 mRNA 的表达明显高于空白组,并出现 III 型胶原基因的表达。

在骨折第 1 周末,骨痂主要由未完全机化的肉芽组织、软骨骨痂以及部位沿骨折端骨膜下形成的编织骨组成,此时 III 型前胶原基因的表达占主导地位,杂交阳性颗粒广泛出现于肉芽组织的成纤维细胞样和软骨细胞样间充质细胞中。同时, I 型前胶原基因 mRNA 也开始在骨折端骨膜下编织骨中的成骨细胞中出现, II 型前胶原 mRNA 则在细小的软骨岛内的软骨细胞中有较高的表达。TGF β_1 表达在分化、增殖中的成骨细胞以及接近成熟的软骨细胞内较为明显,在 RS9403 组和三花组中尤为明显,与前胶原基因的表达较空白组呈同步增强趋势。

骨折第 2 周末,软骨骨痂占据骨折区的大部,并有部分软骨细胞趋向肥大,软骨特异性胶原——II 型前胶原 mRNA 与探针的杂交阳性颗粒在成熟的软骨细胞中密集出现,在肥大的软骨细胞中则较少出现,在 RS9403 组和三花组中肥大软骨细胞明显多于空白组, II 型前胶原 mRNA 的表达也呈显著的衰落趋势。软骨基质中,尤其在 RS9403 组和三花组的软骨基质中,一些肥大软骨细胞内出现 I 型前胶原基因的表达,即所谓的共有表型表达现象(shared phenotype expression)。而 I 型前胶原 mRNA 的表达则明显增加,在软骨内化骨和再塑建中的膜内化骨区中达高峰,尤其是在软骨内化骨前沿的成骨细胞中。TGF β_1 在进一步扩大的软骨小岛内的软骨细胞中持续高表达,尤其在 RS9403 组和三花组中。

骨折第 4 周末,在空白组中软骨骨痂基本被骨组

组织替代,可见散在的 I 型前胶原 mRNA 表达阳性的成骨细胞以及肥大软骨细胞。此时, $TGF\ \beta_1$ 在肥大软骨细胞内表达减弱,而在成骨细胞尤其在丰满的成骨细胞内尤为显著。RS9403 组和三花组骨组织替代更趋完全,偶见 I 型前胶原 mRNA 表达阳性的成骨细胞和肥大软骨细胞。杂交阴性对照组切片均未观察到明显杂交阳性细胞。

讨 论

以往丹参促进骨折愈合的研究主要集中在组织、细胞水平的研究。这些研究已显示丹参的活血化瘀作用改善了骨折愈合早期局部和全身的血液循环,为骨折的愈合创造了良好的内环境;同时,体内研究还显示丹参能促进成骨细胞样细胞成熟,分泌胶原性物质和碱性磷酸酶,并使钙盐在胶原基质上沉积,形成骨小结节。而这方面的研究均未作有效部位的筛选提取。RS9403 经过严格的生物力学测试筛选,并得到骨计量学检测的印证,但作用机理尚属未知。

从本结果显示,RS9403 和三花接骨散不仅促进了骨折愈合过程不同阶段主要胶原的表达,而且在骨折中后期,肥大软骨细胞 I 型胶原的表达也得到增强,还促使早期软骨细胞样细胞内 III 型胶原的表达。

软骨细胞和成骨细胞起源于类似的间充质细胞,一般认为它们分别进入各自的、不可逆的分化途径,而产生各自成熟、稳定的表型⁽⁶⁾,而一些研究显示软骨细胞成熟的最后阶段,不论在骨痂,还是在发育骨的生长板,出现 I 型胶原的合成和类骨质形成,显示所谓“成骨细胞样表型”,在体外细胞培养和胚胎器官培养中,分化或肥大的软骨细胞形成骨组织^(7~9)。这种所谓的共有表型表达只见于修复或发育组织,并随骨痂的成熟而减弱,而几乎不出现在分化较完全的组织。

如果这种表型改变,是细胞转分化的一个中间相,那也为骨折后期软骨基质中成骨细胞的第二种来源,即除外随新生血管进入的未分化细胞之外的肥大的软骨细胞,提供了佐证。同时,这也是丹参促进骨折愈合的一个重要调节机制,即丹参很可能增进了骨折愈合后期软骨骨痂中编织骨内成骨细胞表型(I 型胶原)表达细胞的数量,而愈合早期软骨细胞内 III 型胶原的表达,可能是纤维细胞向软骨细胞转化的一个中间相。这也说明在生长发育和创伤修复的特殊或应激情况下,某些细胞的特异性表型可发生改变,而且这种变化可由外界干预调控。

RS9403、三花接骨散这类活血化瘀类方药,在促

进骨折愈合方面,除了先前研究所揭示的作用机制外,其对某些细胞表型表达改变或转分化的影响,更增加了骨折愈合不同阶段特异性胶原的表达,是不可忽视的作用机制。因此,以往研究所显示的 RS9403 增加骨折愈合处成骨细胞数量⁽²⁾,可能与此种作用机制有关,即它不仅促进了间充质细胞向成骨细胞的分化,而且能促进软骨细胞向成骨细胞转化。

从实验结果看,RS9403 这种类似细胞分化刺激诱导作用,可能与促进 $TGF\ \beta_1$ 的表达有关。 $TGF\ \beta_1$ 对骨折愈合过程具有重要的启动作用⁽¹⁰⁾,它加速了间充质细胞的定向分化和增殖。RS9403 很可能通过对 $TGF\ \beta_1$ 这类生长因子的影响促进骨折的愈合。

参 考 文 献

1. 徐荣辉,柴本甫,朱雅萍. 丹参注射液对鸡胚额骨分离细胞培养生长影响的组织化学观察. 中西医结合杂志 1991;11(11):668—670.
2. 符诗聪,杜 宁,史炜镔,等. 丹参有效部位(丹参-9403)对骨折愈合影响的生物力学实验研究. 中国中西医结合杂志 1999;19(2):106—107.
3. 史炜镔,杜 宁,符诗聪,等. 骨痂组织冰冻切片前胶原及转化生长因子 β_1 基因表达的原位定位. 中华骨科杂志 1999;19(4):239—242.
4. 柴本甫,过邦辅. 理气药物对骨折愈合影响的初步研究. 中华外科杂志 1962;10(5):299—304.
5. Sandberg M, Vuorio E. Localization of types I, II, III collagen mRNAs in developing human skeletal tissues by in situ hybridization. J Cell Biol 1987; 104:1077—1089.
6. Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, et al. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. Exp Cell Res 1991;195:492—503.
7. Kahn AJ, Simmons DJ. Chondrocyte-to-osteocyte transformation in grafts of perichondrium-free epiphyseal cartilage. Clin orthop Rel Res 1977;129:299—304.
8. Cancedda FD, Gentili C, Manduca P, et al. Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. J Cell Biol 1992; 117:427—435.
9. Gentili C, Bianco P, Neri M, et al. Cell proliferation, extracellular matrix mineralization, and ovotransferrin transient expression during in vitro differentiation of chick hypertrophic chondrocytes into osteoblast-like cells. J Cell Biol 1993;122:703—712.
10. Joyce ME, Jingushi S, Bolande ME, et al. Transforming growth factor- β in the regulation of fracture repair. Orthop Clin North Am 1990;21:199—207.

(收稿:1999-05-06 修回:2000-01-10)