

三七总皂甙促进骨折愈合作用的实验研究

杨 军 任 婷 李学东 乔忠阁

摘 要 **目的** 探讨三七总皂甙(total saponins of panax notoginseng)在骨折愈合中的作用,为其临床应用提供实验依据。**方法** 在 36 只雄性 SD 大鼠左桡骨形成骨折模型,后随机分成对照组和 PNS 组,予以 PNS 100mg/(kg·d)腹腔内注射,对照组予以等量盐水。在骨折后 7 天、14 天、21 天 X 线观察骨折愈合及骨痂形成情况;HE 染色了解骨痂形成情况;评价全血黏度和血浆黏度水平。**结果** X 线显示 PNS 组骨痂形成明显加快;HE 染色显示 PNS 组骨折断端成骨细胞数目及骨痂增多;PNS 组全血黏度和血浆黏度降低。**结论** PNS 可低全血黏度及血浆黏度,改善血液流变性和骨折部位的血供,从而利于骨折愈合。

关键词 三七总皂甙 骨折 骨折愈合 鼠

The Experiment Study of Total Saponins of Panax Notoginseng on Promoting Fracture Healing. Yang Jun, Ren Ting, Li Xuedong, Qiao Zhongge. Department of Orthopaedic, Qitaihe City Hospital, Qitaihe Heilongjiang Province, Heilongjiang 154600, China

Abstract Objective To investigate the effects of total saponin of panax notoginseng on bone fracture healing. **Methods** 36 rats were divided into PNS group and control group. The left radius fracture model was used in this experiment. PNS 100mg/(kg·d) was intraperitoneal injections in rats of PNS groups and same dose isotonic saline was treated in control group. Rats in control group and PNS group were sacrificed and necropsied at 7, 14 and 21 day ($n=6$). The tissue or callus around fracture site were obtained for histological examination and callus measurement. The formation of callus was monitored by X-ray. The viscosity of whole blood and plasma was also studied. **Results** The formation and thickness of callus were enhanced by PNS. HE staining showed that the chondrocytes, osteoblasts and callus appeared earlier and more in PNS groups than control ($P<0.05$). The level of viscosity of whole blood and plasma was decreased by PNS. **Conclusion** PNS can increase callus content and promote the process of the bone fracture healing. Down-regulation of the viscosity of whole blood and plasma is the potential mechanism of PNS on accelerating the bone healing.

Key words Total saponins of panax notoginseng; PNS; Bone fracture; Fracture healing; Rats

骨折愈合是一个复杂而高度有序的生物学修复过程^[1],其自然过程需时较长,尽管大多数骨折都能愈合,但是仍有 10% 的患者发生延迟愈合,已证实 10%~15% 的骨折并发症来源于延迟愈合和骨不愈合,因此促进骨折的愈合能明显降低并发症,提高患者的生活质量,减轻社会和家庭的经济负担^[2,3]。中医药在促骨折愈合方面具有明显的优势,自古以来三七是临床治疗创伤及骨折的最常用药物,我们前期工作显示三七的主要成分三七总皂甙(panax notoginseng saponins, PNS)能促进成骨细胞的生成与活性,为此本实验以大鼠骨折模型为观察对象进行了放射学、组织学及血液流变学的观察和分析,探讨其

促骨折愈合的效应及机制,为临床应用提供实验依据^[4]。

材料与方法

1. 材料:实验动物:雄性 SD 大鼠,体质量 240~280g。PNS(商品名:注射用血栓通冻干,昆明制药集团股份有限公司生产和惠赠,批号:08FA08,规格:400 毫克/支);乙醚分析纯符合 HG3-1002-76(上海凌峰化学试剂有限公司)。

2. 实验方法:SD 大鼠 36 只,随机分成对照组、PNS 组,每组各 18 只。大鼠持续乙醚吸入麻醉下,左前肢用硫化钠脱毛,于左前肢切开皮肤及深筋膜,从拇展长肌及桡侧腕长伸肌之间分离暴露桡骨,用手外科小锯在一侧桡骨中段横行锯断,术毕缝合伤口,不包扎,不固定。PNS 组予以 PNS [100mg/(kg·d)] 腹腔内注射,模型组注射同等量的生理盐水。

3. 观察指标:①实验大鼠的活动、饮食和伤口愈合等一般情况观察;②两组大鼠在术后 7 天、14 天、21 天麻醉后,拍摄 X 线片观察骨折修复情况;③两组大鼠在术后 7 天、14 天、21 天拍摄 X 线片后,随机取 6 只肝素抗凝取血,测定血液流变值(全血黏度);④大鼠取血后,以断颈法处死,以骨折断端为中心上、下 0.5cm 取材,取材后标本置入质量浓度为 40g/L 的多聚甲醛中固定 24h 后。再以质量浓度为 100g/L 的乙二胺四

基金项目:中国博士后课题基金项目(20090450913);广东省中医药局科研基金项目(2008163)

作者单位:154600 黑龙江省七台河市人民医院骨科(杨军、任婷);515041 汕头大学医学院第一附属医院骨科(李学东);154600 七台河精煤集团公司总医院骨科(乔忠阁)

通讯作者:李学东,电子信箱:xd1622@yahoo.com.cn

乙酸钠脱钙 2 周,每 3 天更换脱钙液。脱钙后,经梯度乙醇逐级脱水后,石蜡纵向包埋、石蜡切片厚 $5\mu\text{m}$ 进行常规 HE 染色,镜下观察,并用目镜测微尺测量其骨痂厚度,并按公式 $L = 0.1\alpha/\beta$ [L 为测量的外骨痂厚度值 (mm), α 为目镜测微尺测量格值, β 为放大倍数], 计算每个切片中 10 个视野的外骨痂厚度。

4. 统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

结 果

1. 一般情况:所有大鼠全部存活,大鼠于麻醉清醒后即能抬伤前肢(或伤前肢轻触地面)行走,手术 1 天后伤前肢可触地,活动自如。饮食正常,伤口无红肿、渗液等炎性反应,均一期愈合。

2. X 线观察:术后 7 天对照组与 PNS 组骨折断边缘稍模糊,出现少量骨痂;14 天两组骨痂量增多,对照组骨折端模糊,有骨痂生长。PNS 组骨折线模糊,骨痂形成明显,部分动物断端被骨痂充添;21 天对照组骨折端骨折线趋于消失,骨折端有连接性骨痂阴影,PNS 组约一半骨折边缘完全消失,大量连接性骨痂阴影,骨痂密度与骨皮质接近。

3. 骨痂组织学检查结果:手术后 7 天骨折处有成纤维细胞增多、大量的软骨细胞及成骨细胞,其中有丰富的新生血管及骨小梁,PNS 组明显增强;14 天对照组折端主要为软骨连接,并可见纤维细胞,少量新生编织骨生长,新生血管较少,而 PNS 组骨折断端间有大量的新生编织骨,少量软骨细胞,并见丰富的新生血管,不规则骨髓腔形成;21 天 PNS 组成骨细胞及破骨细胞较对照组多,形成新的骨小梁,骨小梁排列及成骨较对照组整齐、活跃。

4. PNS 对骨折大鼠外骨痂形成的影响:在各个时间点,PNS 组大鼠外骨痂形成明显高于对照组 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 PNS 对骨折大鼠外骨痂形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{mm}$)

组别	时间		
	7 天	14 天	21 天
对照组	0.82 ± 0.16	1.67 ± 0.26	2.03 ± 0.33
PNS 组	$1.10 \pm 0.18^*$	$2.28 \pm 0.33^*$	$2.65 \pm 0.35^*$

* 与对照组同时间比较, $P < 0.05$

5. PNS 对骨折大鼠血液流变学的影响:在 7 天、14 天、21 天各组大鼠全血黏度、血浆黏度呈下降趋势,PNS 组与对照组组比均各时点均有显著性差异 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 三七总皂甙对骨折大鼠的血液流变学影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别		全血黏度		血浆黏度
		低切	高切	
7 天	对照组	9.67 ± 1.15	4.11 ± 0.66	9.11 ± 0.93 *
	PNS 组	1.91 ± 0.21	3.07 ± 0.40 *	1.66 ± 0.20 *
14 天	对照组	9.37 ± 0.86	3.77 ± 0.51	1.84 ± 0.24
	PNS 组	8.33 ± 1.07 *	3.03 ± 0.46 *	1.41 ± 0.18 *
21 天	对照组	8.94 ± 0.99	3.12 ± 0.44	1.75 ± 0.17
	PNS 组	7.31 ± 0.85 *	2.57 ± 0.41 *	1.17 ± 0.19 *

* 与对照组同时间比较, $P < 0.05$

讨 论

骨折是骨科临床中的常见病及多发病,在骨折治疗的过程中,中药的作用无可替代,其在提高骨折愈合率、有效减少骨折并发症等方面具有独特的优势。三七是治疗骨折最常用的中药之一,PNS 是从三七中提取的有效成分,秉承了其“活血化瘀”的功效,对心脑血管疾病具有独特的疗效。但是 PNS 对骨折愈合的调节,目前研究尚少。骨折处出现骨痂是骨折愈合的重要标志,而 X 线和组织学检查是评价骨痂形成的重要手段。为了解 PNS 对骨痂形成是否有直接的促进作用,本实验采用 X 线及组织计量学观察 PNS 对骨痂形成的影响,结果显示:PNS 组的骨痂面积、外骨痂厚度均明显增加,这表明 PNS 加快骨折愈合是通过刺激骨痂增生实现的,PNS 可使矿化过程提前发生。

软骨细胞可以合成细胞外基质,刺激软骨细胞成熟与软骨增生,引起软骨内成骨,而成骨细胞是骨形成细胞,能合成、储存骨基质,其数量及活性是骨愈合的指标^[5]。我们先前体外研究表明,PNS 可以促进骨髓基质细胞的成骨分化及钙结节形成能力,本文组织学结果显示,PNS 组可骨痂内软骨细胞及成骨细胞数量明显增加,这表明软骨细胞及成骨细胞数量增加是 PNS 促骨痂生成的主要原因^[4]。调节体内循环,改善骨折局部血供是促骨折愈合的主要治疗手段。现代药理学研究表明 PNS 具有改善微循环、增加血流量、扩张血管、抑制血小板聚集等作用。本实验结果显示,PNS 可显著降低全血黏度及血浆黏度,改善血液流变性,通过增加新生血管从而使骨折部位的血供得到明显改善,加速血肿吸收、机化,促使纤维组织增生,纤维骨痂形成加快,成骨细胞再生活跃,缩短纤维骨痂转变为骨性骨痂的过程。

本研究通过研究 PNS 对骨折愈合的作用发现,PNS 可以缩短骨折愈合时间,提高骨痂质量,具有促

进骨折愈合作用,而降低全血黏度及血浆黏度,改善血液流变性可能是其潜在的效应机制。

参考文献

- 1 Rutten S, Nolte PA, Korstjens CM, Klein - Nulend J. Low - intensity pulsed ultrasound affects RUNX2 immunopositive osteogenic cells in delayed clinical fracture healing. *Bone*, 2009, 45(5): 862 - 869
- 2 Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, 1998, 355: S7 - S21
- 3 Goldhahn J, Scheele WH, Mitlak BH, *et al.* Clinical evaluation of me-

dicinal products for acceleration of fracture healing in patients with osteoporosis. *Bone*, 2008, 43(2): 343 - 347

- 4 李学东,陈斌,郑创义,等. 三七总皂甙对骨髓基质细胞成骨分化及成骨作用的调节. *中国骨质疏松杂志*, 2009, 15(5): 371 - 373
- 5 Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am*, 1997, 79(11): 1699 - 1709

(收稿:2010-01-14)

(修回:2010-04-07)

检测甲型 H1N1 流感病毒富集方法的初步探索

李 华 柯华昕 龙润乡 杨 蓉 何春艳 白慧珠 崔萍芳 谢忠平

摘 要 **目的** 探索甲型 H1N1 流感病毒的富集方法,提高流感病毒核酸检测的灵敏度。**方法** 分别用 ProteinA/G 及 H1N1 特异性血清处理流感病毒样品,根据国家流感中心设计的 H1N1 亚型检测通用引物,采用反转录 - 聚合酶链反应(RT - PCR)方法,扩增产物为 527bp,来评价病毒的富集效果。**结果** 两种富集方法均能提高检测灵敏度,用 ProteinA/G 富集处理后检测灵敏度可达 10^{-6} ,用 H1N1 特异性血清沉淀富集处理后灵敏度为 10^{-5} 。**结论** 初步建立的富集甲型 H1N1 流感病毒方法,有效提高了流感病毒 RT - PCR 检测的灵敏度,可用于甲型 H1N1 流感病毒的检测。

关键词 流感病毒 甲型 H1N1 亚型 富集 检测

The Primary Exploration of Enrichment Methods for Influenza A (H1N1) Virus. Li Hua, Ke Huaxin, Long Runxiang, *et al.* Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Yunnan 650118, China

Abstract **Objective** To explore the enrichment methods for influenza A (H1N1) virus and improve the detection sensitivity of the virus nucleotide. **Methods** The influenza A (H1N1) virus samples were enriched by Protein A/G and the specific serum respectively. Universal primers of H1N1 subtype, which is designed by the National Influenza Center were applied in RT - PCR method to evaluate the effect of the virus enrichment. The RT - PCR product was 527bp. **Results** These two enrichment methods both could improve the detection sensitivity. The detection sensitivity of Protein A/G and H1N1 - specific serum enrichment methods could reach 10^{-6} and 10^{-5} respectively. **Conclusion** Such established enrichment methods for influenza A (H1N1) virus could effectively improve the detection sensitivity of influenza viruses through RT - PCR and could be used to detect Influenza A (H1N1) virus.

Key words Influenza virus; H1N1 subtype; Enrich; Detect

流感病毒属正粘病毒科,其基因组由分节段、单股负链 RNA 组成,其相对分子质量为 5000kDa。分为甲、乙、丙 3 个型别,均可引起人类急性呼吸道疾病^[1,2]。甲、乙型流感毒粒基因组有 8 个基因节段,而丙型仅有 7 个,缺 1 个编码神经氨酸酶蛋白的基因节段。基因组分节段是造成同型不同毒株间产生很高基因重配率的原因。甲、乙型流感病毒交替流行,涉及面广,对人群造成不同程度的危害,在婴

幼儿、老年人和免疫抑制患者中有更高的发病率和病死率。

2009 年 3 月,墨西哥暴发甲型 H1N1 流感,造成人员死亡,疫情很快蔓延到世界各地,我国内地也相继出现,因此,防治甲型 H1N1 流感成为当务之急。防治流感病毒首先要加强流感病毒变异的检测,尽量作出准确的预报,以便进行有针对性的措施如疫苗接种、治疗等。目前,实验室常规检测流感病毒的方法有 3 种;血清学诊断、病毒分离(通常取呼吸道标本包括鼻咽洗液和咽拭子,接种鸡胚或敏感细胞分离病毒,培养 16 ~ 72h)、快速诊断(使用 ELISA 和免疫荧光法^[3-6])。这些免疫测定方法需要相当完整的靶抗

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者:谢忠平,电子信箱:xzp218@126.com