

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002466

积雪草酸对小鼠骨折愈合的影响研究

吴新诱¹, 宗治贤¹, 张浪云¹, 黄健萍², 林思恩¹, 崔 燎³

(1. 广东医科大学附属骨科中心, 湛江 524023; 2. 广东医科大学第二临床医学院口腔教研室, 东莞 523808;

3. 广东医科大学天然药物研究与开发重点实验室, 湛江 524023)

【摘要】目的:探讨高低 2 种剂量积雪草酸对小鼠骨折愈合的影响。**方法:**对 36 只 12 周龄 C57 小鼠麻醉后行右侧股骨骨折术。骨折术后实验分为 3 组, 每组 12 只, 分别是: 空白对照组, 给予生理盐水(0.2 mL)每周 2 次皮下注射; 低剂量积雪草酸组, 给予低剂量积雪草酸水溶液(5 $\mu\text{g/g}$, 0.2 mL)每周 2 次皮下注射; 高剂量积雪草酸组, 给予高剂量积雪草酸水溶液(15 $\mu\text{g/g}$, 0.2 mL)每周 2 次皮下注射。术后给药前和给药后 8 周行右下肢 X 线摄像。给药后 8 周进行取材, 行微型计算机断层扫描分析、三点弯曲力学测试和脱钙骨组织形态学分析。**结果:**经过 8 周治疗后, 各组均呈现不同程度愈合。X 线影像结果提示, 空白对照组和低剂量积雪草酸治疗组骨痂生长不完全, 高剂量积雪草酸治疗组骨痂形成较完整, 骨小梁密度均匀; 微型计算机断层扫描分析定量结果显示, 与空白对照组相比, 低剂量积雪草酸治疗组骨组织体积百分数和骨密度分别升高 13.0%($P=0.264$)或 7.6%($P=0.215$), 而高剂量积雪草酸组骨组织体积百分数和骨密度分别升高 28.3%($P=0.020$)或 15.8%($P=0.009$)。股骨生物力学结果提示, 与空白对照组相比, 积雪草酸治疗有助于提高股骨生物力学性能, 低剂量组最大载荷和杨氏模量分别增加 26.37%($P=0.025$)和 10.00%($P=0.183$), 高剂量组最大载荷和杨氏模量分别增加 42.89%($P=0.007$)和 25.19%($P=0.035$)。形态学结果提示, 空白对照组骨折端未完全愈合且矿化不完全, 接受高低 2 种剂量积雪草酸治疗的骨折区矿化完全, 高剂量组骨组织修复效果较为理想。**结论:**高剂量积雪草酸有助于加速小鼠股骨骨折骨化和愈合, 并提高其生物力学性能。

【关键词】骨折; 骨痂愈合; 积雪草酸; 天然药物**【中图分类号】**R683.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-12-06

Effect of asiatic acid on fracture healing in mice

Wu Xinyou¹, Zong Zhixian¹, Zhang Langyun¹, Huang Jianping², Lin Sien¹, Cui Liao³

(1. Orthopaedic Center, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical University; 2. Teaching and Research Section of Stomatology, The Second College of Clinical Medicine, Guangdong Medical University; 3. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of two different dosages asiatic acid on the fracture healing in mice. **Methods:** Thirty-six C57 mice of 12 weeks were suffered right femoral fracture and were divided into three groups($n=12$): the blank control group which was treated with saline of 0.2 mL; the low-dose asiatic acid group which was treated with asiatic acid at a dose of 5 $\mu\text{g/g}$ and amount

作者介绍: 吴新诱, Email: 69994699@qq.com,

研究方向: 促骨折再生修复新药研究。

通信作者: 林思恩, Email: linsien2009@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81874000); 广东省医学科研基金面上资助项目(编号: A2018111); 广东省中医药局面上资助项目(编号: 20191184); 广东医科大学附属医院高层次人才科研启动基金资助项目(编号: 526Z20170001); 广东医科大学海洋医药研究院南海海洋生物医药资源研发公共服务平台开放基金课题资助项目(编号: 201806); 广东医科大学附属医院高水平医院建设“登峰计划”资助项目。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200428.0930.008.html>
(2020-04-28)

of 0.2 mL; high-dose asiatic acid group which was treated with asiatic acid at a dose of 15 $\mu\text{g/g}$ and amount of 0.2 mL. All treatments were performed twice a week via subcutaneously injections. X-ray images of the right lower limb were performed before and 8 weeks after drug administration. After 8 weeks of administration, micro-computer tomography(CT) analysis, three-point bending mechanical test and decalcified bone histological analysis were performed. **Results:** After 8 weeks of treatment, healing in three groups was in different degree. X-ray data showed that callus formation was incomplete in the blank control group and the low-dose asiatic acid group; callus formation was com-

plete and density of trabecular bone was uniformly in the high-dose treatment group. Results of micro-CT showed that the bone volume ratio(BV/TV) or bone mineral density(BMD) in the low-dose treatment group was increased by 13.0%($P=0.264$) or 7.6%($P=0.215$) than that in the blank control. In addition, BV/TV or BMD in the high-dose treatment group was also increased by 28.3%($P=0.020$) or 15.8%($P=0.009$) than that in the blank control. Data of the mechanical test showed that asiatic acid was able to enhance the femur's mechanical property; maximal load and Young's modulus were increased by 26.37%($P=0.025$) and 10.00%($P=0.183$) in the low-dose group or 42.89%($P=0.007$) and 25.19%($P=0.035$) in the high-dose group. And histological results showed that mineralization was incomplete and non-union at the fracture ends inside the callus in the control group, while mineralization was complete in two asiatic acid treatment groups, with a better bone healing effect in the high-dose group. **Conclusion:** The high dose of asiatic acid can promote the ossification and accelerate the healing process of fracture, and enhance the mechanical properties in mice.

[Key words] fracture; callus healing; asiatic acid; natural medicine

随着社会的迅速发展,高能量损伤引起的严重骨折发生率日益增高。骨组织具有独特的再生和自我修复能力。然而,由于受到患者局部或全身因素的影响,骨折的愈合往往无法达到满意的效果,临床上仍存在较大概率的骨折延迟愈合和不愈合。最新研究表明,骨折后骨不连发生率为 1.9%~20.0%^[1]。因骨不连而致残对个人和社会造成巨大的心理压力和经济损失。目前,临床上针对骨折延迟愈合和不愈合的治疗手段包括自体或异体骨移植、带血管蒂腓骨移植、Masquelet 技术和 Ilizarov 技术等^[2]。然而,目前这些技术也存在一些并发症。例如,自体骨移植作为治疗的“金标准”,可导致供体部位的骨缺损及疼痛不适。因此,提供适当的干预措施以加速骨再生、恢复骨的完整性及生物机械性能至关重要。

传统天然药物因其具有疗效确切、副作用少和患者认可度高等优势,应用天然药物促进骨组织修复和治疗骨折成为近年研究热点。积雪草(*Centella asiatica*)又称落得打、崩大碗、半边钱,为常用中草药,有清热利湿、解毒消肿的功效^[3]。本课题组前期研究发现,积雪草中的活性物质积雪草酸可抑制破骨细胞分化,从而发挥抗骨质疏松作用^[4]。本研究通过动物实验,进一步评价积雪草提取物对骨折的效果,为基于积雪草酸促骨折修复新药研发提供理论依据。本研究中积雪草酸剂量、给药方式的选择均依据前期研究而确定,即以前期研究中抗骨质疏松的积雪草酸剂量设定为本研究中的低剂量,高剂量则设定为低剂量的 3 倍^[4]。

1 材料和方法

1.1 小鼠骨折模型的建立

根据以往文献^[4-5]报道方法,选用 12 周龄 C57 小鼠 36 只,用 1%戊巴比妥钠(1 $\mu\text{L/g}$)腹腔注射。待小鼠完全麻醉后,于无菌环境中,右下肢外侧剃毛后用碘伏消毒备皮区域,在右侧膝关节至髌关节之间行 5 mm 纵行切口,于股外侧肌和腱膜之间钝性分离直至暴露小鼠右侧股骨干,用线锯在股骨干中部剪断小鼠股骨,然后使用直径 25G 注射器针头作为髓内固定装置逆行插入小鼠右侧股骨骨髓腔并复位骨折端,直至针头插入股骨近端,针头末端剪断、缝合切口。骨折术后 3 d 随机分成 3 组,每组 12 只动物,其中空白对照组(CON 组)给予生理盐水(0.2 mL),低剂量积雪草酸组(AAL 组)给予积雪草酸(5 $\mu\text{g/g}$, 0.2 mL),高剂量积雪草酸组(AAH 组)给予积雪草酸(15 $\mu\text{g/g}$, 0.2 mL)。每周皮下注射 2 次,共给药 8 周。

1.2 标本采集与处理

造模小鼠于给药 8 周麻醉后常规颈椎脱臼处死,解剖分离出右侧股骨,小心剔除肌肉等软组织后,样本用生理盐水纱布包裹, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将样本恢复至室温后,当天依次进行显微 CT 扫描分析、三点弯曲力学检测,后置于 4%多聚甲醛固定 24 h,换 70%酒精保存。随后以 10%EDTA 脱钙,脱钙后行石蜡包埋切片,最后行形态学分析。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 X 线检查 各组动物在给药前和给药后 8 周在吸入麻醉(3%异氟烷)状态下行 X 线扫描,使用 Faxitron X-Ray 公司 805 型号机器,曝光电压 30 kV、曝光时间 10 s。记录 X 线影像学图片。

1.3.2 显微 CT 分析 给药 8 周后,根据以往报道方法^[4,7],应用显微 CT(Scanco Medical,瑞士)对股骨样本进行扫描和三维重建分析。扫描时,股骨样本与扫描轴呈垂直关系,设定等

距像素为 $10\ \mu\text{m}$, 电压为 $70\ \text{kV}$, 电流为 $114\ \mu\text{A}$ 。矿化组织的三维重建阈值设定为 $158\ \text{mg}/\text{cm}^3$, Gaussian 过滤 ($\sigma=0.8$, $\text{support}=2$) 以除噪。感兴趣区域 (region of interest, ROI) 的选择以骨折线为中心, 选择连续 400 张连续扫描影像, 进行三维重建。形态学参数包括骨量百分数 (骨组织体积/组织体积, V_B/V_T), 骨密度 (bone mineral density, BMD), 参数通过影像学软件进行分析 (Image Processing Language v4.29d, Scanco Medical)。

1.3.3 生物力学测试 用 Hounsfield 材料测试系统 (H25KS, Faxitron, 美国) 检测和分析左股骨的生物力学性能。简单来说, 将股骨固定于定制的夹具上, 下方跨距为 $8\ \text{mm}$, 上方压头接触股骨中段, 加载速度为 $0.01\ \text{mm}/\text{s}$, 使用 $0.5\ \text{kN}$ 测压元件在材料试验机进行压缩试验, 通过测力盘及计算机采集、输出的载荷-位移曲线读取, 记录最大载荷, 并计算杨氏模量和能量吸收。在生物力学测试中, 为了减少样本的组内差异, 剔除 1 个最大值和 1 个最小值, 因此纳入统计分析的一共是每组 10 只动物。

1.3.4 组织形态学分析 标本用 10% EDTA 缓冲液脱钙 20 d, 常规脱水, 石蜡包埋, $5\ \mu\text{m}$ 厚度连续切片, 切片标本用于 HE 染色和免疫组织化学染色检测成骨指标 I 型胶原蛋白 (type I collagen, Col I) 的表达。进行免疫组化时, 将抗 Col I 抗

体 (sc-293182, Santa Cruz, 美国) 孵育过夜, 充分洗涤后, 再以相应二抗孵育, 最后以 HRP 进行显色。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 正态分布数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 通过单因素方差分析法分析计量资料包括骨组织体积分数 (V_B/V_T)、BMD、最大载荷、杨氏模量和能量吸收的组间统计学差异, 以 Turkey's t 检验进行组间两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

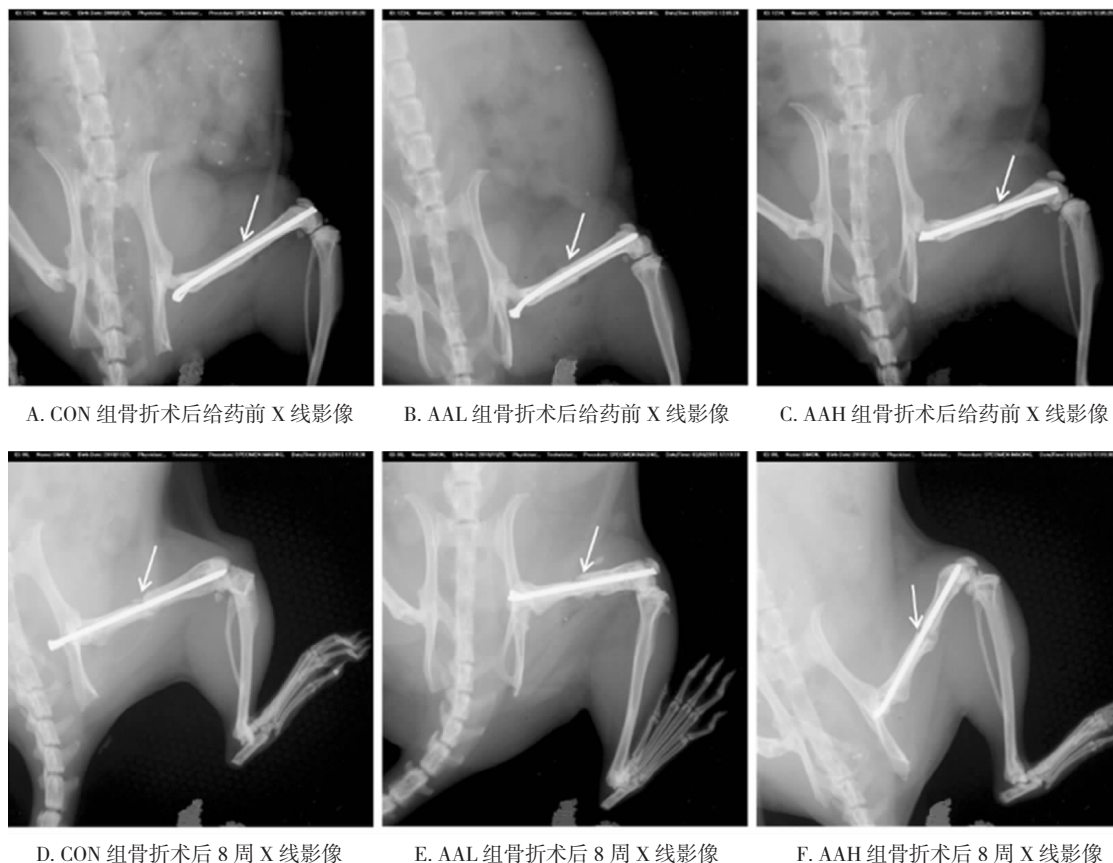
2 结果

2.1 骨折愈合过程中 X 线影像的变化

骨折造模术后第 3 天开始给药, 在首次给药前 (day 0) 和给药后 8 周 (day 56) 行 X 线影像观察骨折愈合情况, 结果如图 1 所示。骨折造模术后, 各组小鼠都呈现显著的骨折线显影; 给药后 8 周, 各组呈现不同的影像学改变。其中, CON 组和 AAL 组骨痂生长不完全, 而 AAH 组骨痂形成较多, 骨小梁更完整、密度均匀。这一结果提示 AAH 组比 AAL 组或者 CON 组骨折愈合更快速。

2.2 积雪草酸治疗对骨折显微结构的影响

以高分辨显微 CT 对骨痂组织进行三维重建和分析骨组



注: 箭头示骨折线

图 1 小鼠股骨骨折术后积雪草酸治疗前及治疗后 8 周右侧股骨 X 线影像学结果

织结构。结果可见,CON 组绝大部分样本骨折断端仍可见显著的骨折线,AAL 组骨折断端基本愈合,AAH 组骨折断端已经完全愈合(图 2)。计量参数统计结果显示,CON 组、AAL 组和 AAH 组 V_B/V_T 分别为 $(36.00 \pm 6.99)\%$ 、 $(40.67 \pm 6.68)\%$ 和 $(46.17 \pm 5.71)\%$,BMD 分别为 $(108.80 \pm 8.31) \text{ g/cm}^2$ 、 $(117.20 \pm 12.97) \text{ g/cm}^2$ 和 $(126.00 \pm 10.04) \text{ g/cm}^2$,多组间比较具有统计学差异(V_B/V_T : $F=3.699$, $P=0.049$;BMD: $F=3.925$, $P=0.043$)。通过 Turkey's t 检验进行两两比较,结果显示,与 CON 相比,AAL 治疗组 V_B/V_T 和 BMD 分别升高 13.0%($P=0.264$)和 7.6%($P=0.215$),而 AAH 组 V_B/V_T 和 BMD 分别升高 28.3%($P=0.020$)和 15.8%($P=0.009$)。

2.3 积雪草酸对骨生物力学特性的影响

骨生物力学参数包括最大载荷、杨氏模量和能量吸收,它们反映了骨组织抵抗骨折的最大载荷和弹性。结果显示,

CON 组、AAL 组和 AAH 组最大载荷分别为 $(11.830 \pm 0.883) \text{ N}$ 、 $(14.950 \pm 0.564) \text{ N}$ 和 $(16.900 \pm 0.910) \text{ N}$,杨氏模量分别为 $(14\,200 \pm 881) \text{ kPa}$ 、 $(15\,620 \pm 401) \text{ kPa}$ 和 $(17\,780 \pm 984) \text{ kPa}$,能量吸收分别为 $(0.046\,9 \pm 0.004\,3) \text{ J}$ 、 $(0.063\,1 \pm 0.010\,9) \text{ J}$ 和 $(0.065\,7 \pm 0.011\,7) \text{ J}$ 。3 个参数多组间比较均具有统计学差异(最大载荷: $F=10.220$, $P=0.005$;杨氏模量: $F=5.110$, $P=0.033$;能量吸收: $F=4.538$, $P=0.043$)。依据上述结果可知,与 CON 组相比,实验组给予积雪草酸治疗有助于提高股骨生物力学性能。AAL 组最大载荷和杨氏模量分别增加 26.37%($P=0.025$)和 10.00%($P=0.183$),AAH 组最大载荷和杨氏模量分别增加 42.89%($P=0.007$)和 25.19%($P=0.035$)。具体如图 3 所示。

2.4 积雪草酸对骨痂组织形态学的影响

形态学 HE 染色结果提示,积雪草酸治疗 8 周后,CON

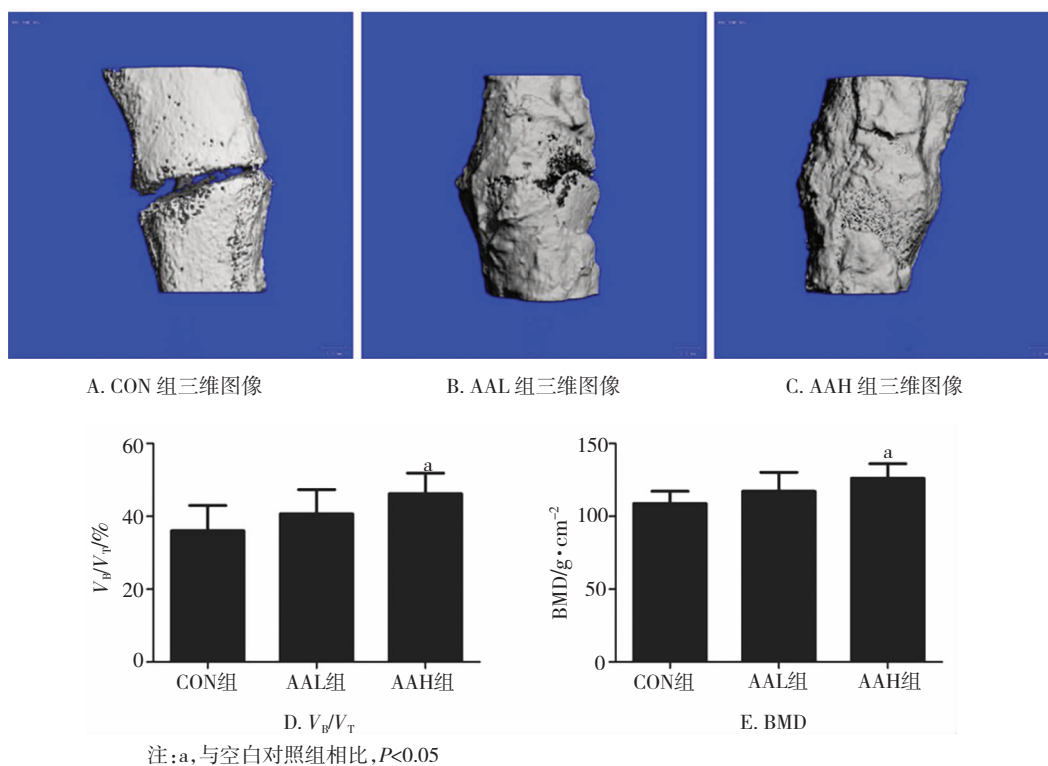


图 2 积雪草酸治疗 8 周后股骨骨痂三维重建结果

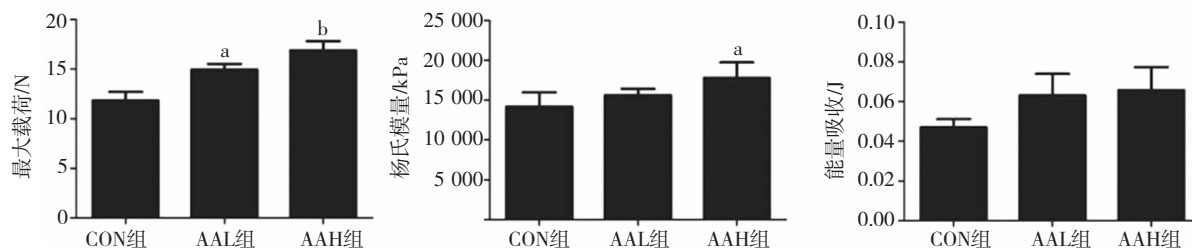


图 3 各组治疗 8 周后股骨三点弯曲力学测试结果

注:与空白对照组相比,a, $P < 0.05$;b, $P < 0.01$

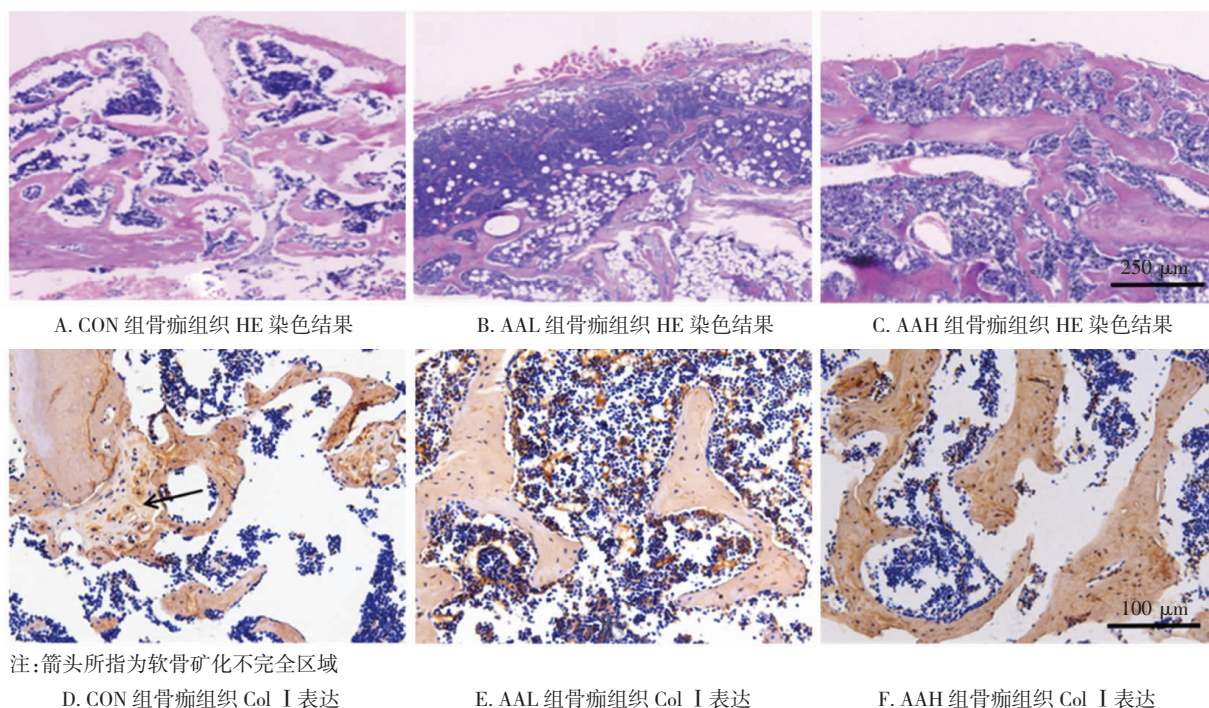


图 4 各组治疗 8 周后骨痂的形态学染色结果

组骨折断端仍然可见清晰的骨不连区域,骨痂内骨组织较为稀疏。AAL 组骨折断端已经愈合,骨痂内骨小梁较薄而且相对稀疏;AAH 组骨折断端已经愈合,骨折区骨小梁较粗而且数目较多。免疫组化结果显示,各组均有不同程度的 Col I 阳性表达。CON 组骨折部位仍可见一定数量的软骨组织。软骨细胞周边有 Col I 呈环状表达,软骨基质 Col I 表达较少,提示该部位矿化不完全。高剂量治疗组 Col I 表达较多。以上结果提示,接受高剂量积雪草酸治疗 8 周后骨折端骨折区矿化完全,骨组织修复效果较为理想(图 4)。

3 讨论

本研究建立了小鼠股骨骨折模型,通过系统给药(皮下注射)分别给予高、低 2 种剂量的积雪草酸进行治疗,并以生理盐水作为空白对照。研究结果表明,CON 组经治疗 8 周后,绝大部分动物的骨折断端未愈合,仍有明显的骨折线,骨痂骨量相对较少。积雪草酸具有加速骨折愈合过程中骨矿化的作用,AAH 组促进骨折修复效果最佳。

一般认为,小鼠骨折后 3 d 代表炎症期,10 d 代表软骨形成高峰期,21 d 代表骨形成和重建过程开始^[9]。观察小鼠骨折愈合效果的时间点是 6~12 周^[9],因此本研究选择术后 8 周作为观察时间点。X 线平

片是临床上评估骨折愈合的常用方法,此方法简单有效、低成本,避免不必要的创伤性检查。动态 X 线影像结果提示,CON 组小鼠骨折愈合延缓;而积雪草酸治疗后,骨性愈合时间明显缩短。然而,X 线影像所获得的结果是二维图片,不利于定量分析。显微 CT 分析是对体积较小的骨组织进行定量的标准方法。其优势在于拥有更小的体积和更高的空间分辨率,在不破坏样本的前提下,可以获得样本的二维和三维图片,并进行定量的分析^[10]。由于骨折修复过程具有特殊性,即骨组织在骨痂内部并不能严格区分皮质骨和松质骨。因此,在研究骨折过程骨量变化的时候,以显微 CT 扫描分析只能得出骨痂部位总体 V_B/V_T 和 BMD。骨痂组织的生物力学测试是评价骨折愈合程度的主要指标之一,也称为判断骨质量的“金标准”。常用的评价骨折愈合的生物力学方法包括三点或四点弯曲实验、扭转实验等^[10]。由于个体差异,动物在骨折后形成的骨痂并非均一的结构,如果采用四点弯曲,难以确保 4 个点所受的力的一致性,固定样本具有较大的困难;扭转实验也必须对长骨的两端进行预先包埋,耗时较长,不利于组织活性的保持。三点弯曲实验只需相对固定 3 个点,简单易于操作。因此本研究采用三点弯曲测

试方法对骨痂力学性能进行评价。

传统中草药对骨再生或骨折修复具有重要的促进作用。积雪草是一种应用广泛的中草药,具有清热利湿、消肿解毒的功效。其有效成分为三萜类化合物,包括积雪草酸、积雪草苷、羟基积雪草苷、玻热模苷、破热米苷和破热米酸^[11]。现代药理学研究认为,积雪草酸具有抗炎、促进伤口愈合、预防肝纤维化、减轻抑郁症状等作用^[12-13]。课题组最新研究表明,积雪草酸可通过调控转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)中抑制性因子 Smad7 表达增高,进而抑制 TGF- β 下游信号;另外,积雪草酸还能抑制核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)信号通路,降低破骨细胞分化关键转录因子的表达,进而抑制破骨细胞分化,从而防治去卵巢后小鼠骨质疏松^[4]。最近研究发现,积雪草酸还以浓度依赖的方式促进成骨细胞分化,并抑制成骨细胞凋亡。随着积雪草酸浓度的增加,成骨细胞 MC3T3 中的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和茜素红的染色强度随之增加。经积雪草酸刺激早期,Col I 基因的表达水平出现明显变化;而刺激后期 ALP、骨形态发生蛋白、核心转录因子- α 1 和骨钙素的表达水平明显增加。进一步研究表明,MC3T3-E1 细胞在积雪草酸刺激后,可能通过 MAK-AKT 信号通路介导抗凋亡蛋白的表达上调,促凋亡蛋白表达下降,进而抑制成骨细胞凋亡^[14]。本研究虽然未直接探讨积雪草酸体外促成骨作用,但是动物实验结果显示积雪草酸可加速小鼠股骨骨折的矿化和愈合,并提高其生物力学性能,成骨分化指标 Col I 表达明显增高,提示积雪草酸可能有促进骨折愈合过程中的成骨过程。然而,积雪草酸如何平衡调控成骨和破骨细胞分化,进而影响骨折愈合过程值得进一步探讨。

综上所述,积雪草酸能增大骨折骨痂体积,加速矿化过程,增强骨折后力学强度,改善骨组织结构,促进骨折愈合。本研究首次报道了传统天然药物积

雪草的活性成分积雪草酸对骨折愈合的促进作用,为进一步深入研究和开发促进骨再生的新药奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 雷明星,张里程,林 峰,等. 骨不连风险因素的最新研究进展[J]. 中国骨与关节杂志,2018,7(7):514-518.
- [2] 吴作培,孙贵新. 骨不连治疗的研究与技术应用进展[J]. 中国组织工程研究,2013,17(35):6333-6338.
- [3] 冯 旭,郭飞飞,赵 龙,等. 积雪草酸药理作用及其结构修饰的研究进展[J]. 中草药,2014,45(7):1037-1042.
- [4] Huang J, Wang H, Huang M, et al. asiatic acid attenuates bone loss by regulating osteoclastic differentiation[J]. Calcif Tissue Int, 2019, 105(5):531-545.
- [5] Haffner-Luntzer M, Kovtun A, Rapp AE, et al. Mouse models in bone fracture healing research[J]. Curr Mol Biol Rep, 2016, 2(2):101.
- [6] Skoglund B, Aspenberg P. Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2007, 8:98.
- [7] Lin S, Lee WY, Huang M, et al. Aspirin prevents bone loss with little mechanical improvement in high-fat-fed ovariectomized rats[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791:331-338.
- [8] Bradaschia-Correa V, Josephson AM, Mehta D, et al. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine directly inhibits osteoblast differentiation and mineralization during fracture healing in mice[J]. J Bone Miner Res, 2017, 32(4):821-833.
- [9] Manigrasso MB, O'Connor JP. Characterization of a closed femur fracture model in mice[J]. J Orthop Trauma, 2004, 18(10):687-695.
- [10] 王洪复. 骨质疏松症药效研究方法与技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:60-66.
- [11] 李亚楠,李志辉,霍丽妮,等. 积雪草化学成分的研究[J]. 广西中医药,2015,38(2):78-80.
- [12] 冯 旭,郭飞飞,赵 龙,等. 积雪草酸药理作用及其结构修饰的研究进展[J]. 中草药,2014,45(7):1037-1042.
- [13] Joshi K, Chaturvedi P. Therapeutic efficiency of *Centella asiatica* (L.) Urb. An underutilized green leafy vegetable; an overview[J]. Int J Pharm Bio Sci, 2013, 4:135-149.
- [14] 许 燕,肖 明,李 涛,等. 积雪草酸促进成骨细胞分化的机制[J]. 华西药学杂志,2019,34(4):347-351.

(责任编辑:冉明会)