

伤科接骨片对兔下颌骨缺损骨组织 环氧合酶-2 表达的影响

翁春辉^{1*} 余穗华¹ 林 珊¹ 戴丽冰² 钟志勇³

(1. 暨南大学医学院第四附属医院/广州市红十字会医院, 广东省广州市同福中路 396 号, 510220;

2. 广州市创伤外科研究所; 3. 广东省医学实验动物中心)

* 通讯作者: chunhui_weng@126.com, 13602857030

[摘要] 目的 探讨伤科接骨片促兔下颌骨缺损骨组织修复的可能作用机制。方法 健康雄性新西兰兔 72 只, 随机分为正常对照组(24 只)、模型对照组(24 只)和伤科接骨片组(24 只), 除正常对照组外其余各组建立下颌骨缺损模型。正常对照组、模型对照组给予正常饲料 40 g/d, 伤科接骨片组给予伤科接骨片饲料 40 g/d(约含伤科接骨片 0.528 g)。分别于造模后第 7、14、28、56 天各处死 6 只兔, 行下颌骨侧位 X 线片检查后, 收集下颌骨缺损处骨组织块, 检测环氧合酶-2(COX-2)蛋白、COX-2 mRNA 表达。结果 与正常对照组比较, 模型对照组造模后第 14、28 天兔下颌骨组织 COX-2 蛋白及 COX-2 mRNA 表达明显升高($P < 0.05$); 与模型对照组比较, 伤科接骨片组造模后第 14、28、56 天兔下颌骨组织 COX-2 蛋白及 COX-2 mRNA 表达明显升高($P < 0.05$)。影像学显示, 伤科接骨片组较模型对照组兔下颌骨缺损区成骨速度更快, 新生骨密度更大。结论 伤科接骨片可能通过上调 COX-2 蛋白及 COX-2 mRNA 表达促进兔下颌骨缺损骨组织的修复。

[关键词] 下颌骨缺损; 伤科接骨片; 环氧合酶-2; 骨修复

Effect of Shangke Jiegu Tablets on the Expression of Cyclooxygenase-2 in Bone Tissue of Rabbit with Mandibular Defect

WENG Chunhui¹, YU Suihua¹, LIN Shan¹, DAI Libing², ZHONG Zhiyong³

(1. Guangzhou Red Cross Hospital, The Fourth Affiliated Hospital of Medical College of Jinan University, Guangdong Province 510220; 2. Guangzhou Institute of Traumatic Surgery; 3. Guangdong Medical Experimental Animal Center)

ABSTRACT Objective To study the possible repair mechanism of Shangke Jiegu Tablets (bone-setting tablets) for mandibular defect. **Methods** Totally 72 healthy male New Zealand rabbits were randomized into the normal control group, model control group and Shangke Jiegu Tablets group, with 24 in each. The mandibular defect models were established in all groups except the normal control group. The normal control group and model control group were given 40 g/d normal forage. The Shangke Jiegu Tablets group was given 40 g/d Shangke Jiegu Tablets forage (containing about 0.528 g Shangke Jiegu Tablets). Six rabbits in each group were sacrificed on the 7th, 14th, 28th and 56th day after modeling respectively. The bone tissue in mandibular defect area was collected after mandible X-ray examination. The protein and mRNA expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and the positive dyeing strength and area of bone tissue were detected. **Results** Comparing with the normal control group, the protein and mRNA expression of COX-2 increased significantly on the 14th and 28th day after modeling in the model control group ($P < 0.05$). Comparing with the model control group, the protein and mRNA expression of COX-2 increased significantly on the 14th, 28th and 56th day after modeling in the Shangke Jiegu Tablets group ($P < 0.05$). Imageology showed that the speed of bone-formation was faster and the density of new bone was greater in mandibular defect area in the Shangke Jiegu Tablets group. **Conclusion** Shangke Jiegu Tablets can repair the mandibular defect by up-regulating the protein and mRNA expression of COX-2.

Keywords mandibular defect; Shangke Jiegu Tablets; Cyclooxygenase-2; bone repair

颌骨缺损多由外伤、肿瘤切除等导致, 临床上较为常见。颌骨缺损的修复受多种生物因子调控, 各种生物因子与系统因素相互协调, 参与并调节骨组织再矿化和代谢过程^[1-2]。研究发现, 环氧合酶-2(COX-2)在骨骼吸收、重建过程中起重要作用^[3]。伤科接骨片是临床常用的纯中药制剂, 具有活血化瘀、消肿止痛、续筋接骨、补骨壮骨的功能^[4]。本研

究通过观察伤科接骨片干预前后兔下颌骨缺损修复过程中 COX-2 的表达变化, 探讨伤科接骨片促下颌骨缺损修复的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

健康雄性新西兰兔 72 只, 体重(2.5 ± 0.5) kg, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物合格证号:

0053678。

1.2 药物

伤科接骨片以海星为主,配以鸡骨、三七、血竭、红花、没药、土鳖虫、自然铜、乳香、马钱子。将 528 片伤科接骨片(大连美罗中药厂有限公司,批号:201008123,0.35 g/片)磨碎成粉状,加入 14 kg 全价颗粒饲料混匀,磨成粉状,制成 1.32% 伤科接骨片饲料。

1.3 主要试剂和仪器

COX-2 兔多抗(批号:sc-7951, Santa Cruz, 美国);DAB 显色试剂盒(批号:AR1022, 武汉博士德生物技术有限公司);RT-PCR 试剂盒(批号:DRR041A、DRR019A, TaKaRa, 日本);TRIzol Reagent (Life Technologies, 美国);逆转录试剂盒(批号:K1621, Fermentas, 美国);引物(北京奥科公司)序列如下:COX-2:上游 5'-TCCCTCATCTG-CAACAATGTG-3',下游 5'-GCAGGACTGTGG-GATTGATGT-3'; GAPDH:上游 5'-CAC-CCACTCCTCTACCTTCG-3',下游 5'-CGTCCTC-CTCTGGTGCTCT-3'。Light Cycler II 实时定量 PCR 扩增仪(Roche, 美国);FUSION FX7 凝胶成像分析仪(VitberTourmat, 法国);BX41 显微镜(Olympus, 日本);HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统(武汉千屏影像技术有限责任公司);悬吊式单板全数字化成像系统(Philips, 德国)。

2 方法

2.1 动物分组

72 只动物按抽签法随机分为正常对照组、模型对照组、伤科接骨片组,每组 24 只,各组按造模时间再分为 7、14、28 和 56 天 4 个时间点,每个时间点 6 只。实验期间,每周测量体重 1 次,每天观察动物外观体态,着重观察下颌部愈合情况并作相应记录。

2.2 兔下颌骨缺损模型的建立

取新西兰兔,3% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 耳缘静脉注射联合速眠新 II 0.25 ml/kg 肌肉注射麻醉。将模型对照组、伤科接骨片组兔固定于实验台,消毒,沿左下颌骨下缘作 3 cm 长切口,暴露下颌骨体中段,用直径 2 mm 钻头电钻,以 1000 r/min 速度,于下颌角前 0.5 cm 处打 3 个直达骨髓腔小孔,钻孔过程同时用 4℃ 生理盐水冷却;把小孔连接成 3 mm×8 mm×3 mm 沟槽,不折断下颌骨,撒青霉素粉,分层缝合伤口;正常对照组兔只暴露下颌骨,不损伤骨体。各组兔每天均以 40 万单位/只肌肉注射

青霉素 3 天。

2.3 给药方法

正常对照组、模型对照组每只动物给予正常饲料 40 g/d,伤科接骨片组每只动物给予伤科接骨片饲料 40 g/d(约含伤科接骨片 0.528 g),直至处死。

2.4 标本采集

分别在造模后第 7、14、28 和 56 天处死相应动物,行下颌骨侧位 X 线片检查后,取兔左下颌骨缺损处(以骨缺损为中心上下约 0.5 cm)的骨组织块进行检测。

2.5 检测指标与方法

2.5.1 免疫组化检测兔下颌骨组织 COX-2 染色强度和面积及蛋白表达 标本制片,形成石蜡包埋块后连续切片,按标准步骤行免疫组化染色,阴性对照片不加一抗,用 PBS 对照,胞浆棕黄色染色为阳性,显示结果进行定位并使用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统进行 COX-2 表达半定量分析。

2.5.2 RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 将骨组织块液氮中迅速研磨至粉末状,再加入 2 ml Trizol,氯仿分离,水相层经异丙醇沉淀,RNA 产物溶解于 DEPC 处理的双蒸水中。取总 RNA 1 μg,按 DRR019A 试剂盒说明书配制反转录反应液 10 μl,65℃ 水浴 1 min,30℃ 放置 5 min,65℃ 孵育 15 min,98℃ 灭活逆转录酶,低温保存。PCR 反应液:Ta q 10 μl,上、下游引物各 0.5 μl,RNase Free H₂O 8 μl。分别取 1 μl 反转录产物加入含 3 种基因引物的 PCR 反应液中,反应条件:95℃ 预变性 3 min,95℃ 2 s,56℃ 8 s,72℃ 11 s 扩增,循环 40 次;绘制熔解曲线。以 2^{-ΔΔCT} 法计算两组各时间点 COX-2 mRNA 与 GAPDH 比值。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用 One-Way ANOVA 分析,最小显著差异法进行两两比较。

3 结果

3.1 模型对照组与伤科接骨片组兔造模后不同时间下颌骨缺损骨组织 COX-2 染色比较

图 1 示,造模后第 7 天,相当于骨痂形成早期,伤科接骨片组(图 1A)与模型对照组(图 1E)阳性染色深浅和面积相当;造模后第 14、28、56 天,相当于骨痂形成后期及临床愈合期,伤科接骨片组阳性染色深、面积广(图 1F、G、H),而模型组阳性染色浅、

面积小(图 1B、C、D)。

3.2 各组兔造模后不同时间下颌骨缺损骨组织 COX-2 蛋白表达比较

表 1 示,与正常对照组比较,模型对照组第 14、28 天兔下颌骨组织 COX-2 蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型对照组比较,伤科接骨片组建模后第 14、28、56 天兔下颌骨组织 COX-2 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。

3.3 各组兔造模后不同时间下颌骨缺损骨组织 COX-2 mRNA 相对表达量比较

表 2 示,与正常对照组比较,模型对照组兔下颌骨组织 COX-2 mRNA 表达在造模后第 14、28 天明显升高($P<0.05$);与模型对照组比较,伤科接骨片组兔下颌骨组织 COX-2 mRNA 表达在造模后第 14、28、56 天明显升高($P<0.05$)。

3.4 模型对照组与伤科接骨片组兔造模后不同时间下颌骨影像学检测结果

造模后第 7 天,模型对照组兔下颌骨缺损区未见骨痂形成,呈透射影像,伤科接骨片组可见少量骨痂形成,缺损边缘出现絮状阻射影;造模后第 14 天,模型对照组兔下颌骨缺损区中央可见少量骨痂形成,周边出现絮状阻射影,伤科接骨片组可见大量骨痂,与缺损边缘新生骨组织出现断续连接、融合,但密度不均;造模后第 28 天,模型对照组兔下颌骨缺损区骨痂较多,与缺损边缘新生骨组织出现断续连接、融合,伤科接骨片组骨痂与缺损边缘新生骨组织出现完全连接、融合成片,密度增高,但较皮质骨低,边界模糊;造模后第 56 天,模型对照组兔下颌骨缺损区骨痂与缺损边缘新生骨组织出现连接、融合完全,可见边界,伤科接骨片组骨痂密度进一步增高,

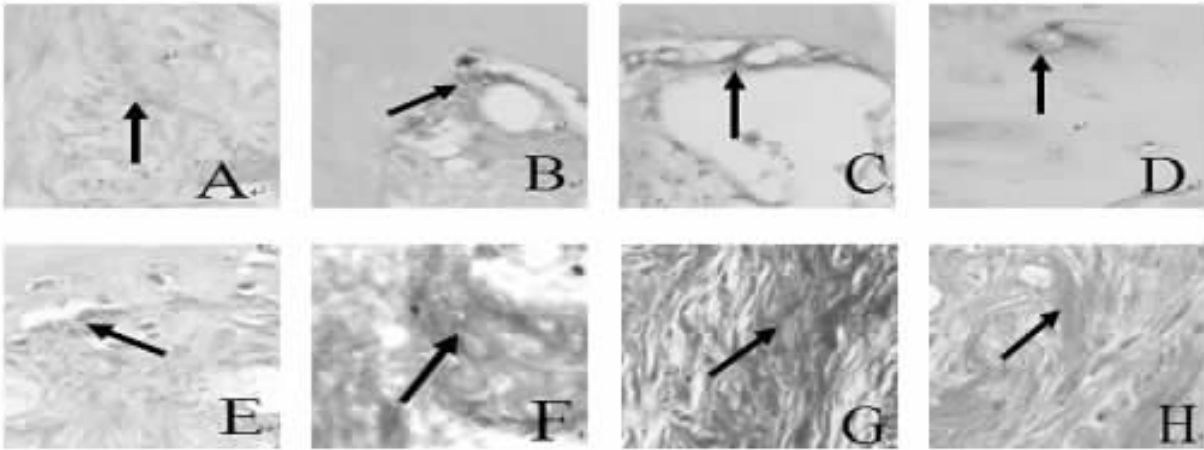


图 1 模型对照组和伤科接骨片组兔造模后不同时间下颌骨缺损骨组织 COX-2 染色比较(DAB 染色,×400)
注:A、B、C、D 分别为模型对照组造模后第 7、14、28、56 天;E、F、G、H 分别为伤科接骨片组造模后第 7、14、28、56 天。
黑色箭头示染色骨细胞

表 1 各组兔造模后不同时间下颌骨组织 COX-2 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	兔数	7 d	14 d	28 d	56 d
正常对照组	6	0.142±0.012	0.147±0.015	0.149±0.016	0.144±0.013
模型对照组	6	0.175±0.014	0.229±0.052*	0.203±0.036*	0.152±0.013
伤科接骨片组	6	0.208±0.018	0.319±0.035 [△]	0.278±0.033 [△]	0.202±0.014 [△]

注:与正常对照组同时间点比较,* $P<0.05$;与模型对照组同时间点比较, $\triangle P<0.05$

表 2 各组兔造模后不同时间下颌骨组织 COX-2 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	兔数	7 d	14 d	28 d	56 d
正常对照组	6	0.62±0.010	0.65±0.031	0.69±0.020	0.64±0.021
模型对照组	6	0.75±0.010	1.05±0.042*	0.92±0.031*	0.71±0.010
伤科接骨片组	6	0.92±0.018	1.58±0.041 [△]	1.31±0.033 [△]	0.90±0.014 [△]

注:与正常对照组同时间点比较,* $P<0.05$;与模型对照组同时间点比较, $\triangle P<0.05$

与皮质骨界限消失。

4 讨论

颌骨缺损在临床上较为常见,多由外伤、肿瘤切除后引起。环氧合酶(COX)是人体内合成一系列前列腺素的关键酶及限速酶^[5],包括环氧合酶-1(COX-1)和 COX-2 两种同工酶。COX-2 可将花生四烯酸代谢成前列腺素 E₂(PGE₂)等产物,PGE₂可启动与成骨相关的基因表达而刺激成骨细胞分化,增加骨量^[6]。

伤科接骨片是一种临床常用的纯中药制剂,研究表明,伤科接骨片可能通过促进骨缺损中期膜内成骨的骨矿化和骨形成,从而促进骨缺损修复^[7];且肾组织转化生长因子- β 1(TGF- β 1)亦参与其中^[8],TGF- β 1 对成骨细胞具有增殖调控作用^[9]。姚晖等^[10]认为,伤科接骨片可增加新生骨骨小梁的数量,促进骨小梁结构致密,从而促进骨缺损修复;翁春辉等^[11]研究显示,伤科接骨片可能通过调节骨保护素(OPG)、骨保护素配体(OPGL)的表达而促进骨缺损修复。本实验观察了伤科接骨片干预前后兔下颌骨缺损修复过程中 COX-2 表达的组织学和影像学变化。实验结果显示,在骨缺损修复过程中模型对照组 COX-2 蛋白及 COX-2 mRNA 表达均有不同程度升高($P<0.05$),提示 COX-2 参与了骨缺损修复。与模型对照组比较,伤科接骨片组建模后第 14、28、56 天兔下颌骨组织 COX-2 蛋白及 mRNA 表达明显升高($P<0.05$),骨组织阳性染色更深、面积更广,影像学结果显示,骨缺损区成骨速度更快,骨密度更高。提示伤科接骨片可促进 COX-2 表达,且主要表现在骨修复过程的中后期,其作用机制可能通过调节 COX-2 表达而促进骨缺损修复。

参考文献

- [1]Carnes DL,De La Fontaine J ,Cochran DL,et al. Evaluation of 2 novel approaches for assessing the ability of demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation [J]. J Periodontol,1999,70(4):353-363.
- [2]Chaudhari A, Ron E,Rethman MP. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates differentiation in primary cultures of fetal rat calvarial osteoblasts[J]. Mol Cell Biochem,1997,167(1-2):31-39.
- [3]Schwartz Z,Denison A,Bannister SR,et al. Osteoblast response to fluid induced shear depends on substrate micro-architecture and varies with time[J]. J Biomed Mater Res A,2007,83(1):20-32.
- [4]宫丽,张继平. 伤科接骨片促进骨折愈合的研究进展[J].

中国中医药信息杂志,2006,13(5):92-94.

- [5]Einhorn TA. Cox-2; Where are we in 2003? -The role of cyclooxygenase-2 in bone repair[J]. Arthritis Res Ther, 2003,5 (1):5-7.
- [6]Fracon N,Teófilo JM,Satin RB,et al. Prostaglandins and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry [J]. J Oral Sci,2008,50(3):247-252.
- [7]张继平,宫丽,邱建文,等. 伤科接骨片对家兔骨折模型骨形态计量学动态参数的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志,2008,14(1):47-50.
- [8]张继平,张奋耿,宫丽,等. 伤科接骨片对家兔骨折模型肾组织转化生长因子- β 1 表达的影响[J]. 广州中医药大学学报,2008,25(4):316-318.
- [9]Ryoo HM, Van Wijnen AJ, Stein JL, et al. Detection of a proliferation specific gene during development of the osteoblast phenotype by mRNA differential display[J]. J Cell Biochem,1997,64(1):106-116.
- [10]姚晖,宫丽,张继平,等. 伤科接骨片对家兔骨折模型骨形态计量学静态学参数的影响[J]. 中医正骨,2008,20(3):3-5.
- [11]翁春辉,赖晓宇,詹春华,等. 伤科接骨片对兔下颌骨缺损修复中骨保护素及配体表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2012,30(7):1551-1553.

(收稿日期:2013-05-09;修回日期:2013-08-05)

[编辑:洪 涛]

欢迎邮购医学光盘

四大经典 VCD《黄帝内经》《伤寒论》《金匱要略》《温病学》全套 2500 元,其中《金匱要略》单套 800 元,其余每套 600 元。四大基础 VCD《中医基础理论》、《中医诊断学》、《中药学》、《方剂学》全套 2700 元,单套 700 元。

“全国名老中医专家临床经验高级讲习班”自 1999 年以来举办多期,得到了 60 多位全国名老中医和专家的积极响应和大力支持。授课内容为全国名老中医和专家个人几十年临床经验的宝贵结晶。现已制作成光盘,可作为中医医疗、教育和研究机构收藏以及开展继续教育的培训教材,也可供中医医务工作者临床自学。第一期 1500 元(22DVD),第二期 1500 元(20 DVD),第三期 1130 元(16 DVD),第四期 980 元(16 DVD),第五期 1330 元(23 DVD),第六期 1050 元(16 DVD),第七期 710 元(13 DVD),第八期 700 元(11 DVD),第九期 850 元(10 DVD),第十期 680 元(10 DVD),第十一期 540 元(10 DVD)。总价 10970 元。

汇款地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社;收款人:北京医海林音像书店收,邮编:100700,联系人:张伟平,(010)64014411-3036;叶晨,(010)64013162。