

恒古骨伤愈合剂对骨折树鼩血液生理和脏器系数的影响

吴超¹, 唐薇², 赵宏斌³, 李进涛¹, 角建林⁴, 袁鑫², 郑红^{1*}

(1. 昆明医科大学实验动物学部, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学第一附属医院科教部, 昆明 650032;
3. 昆明医科大学第一附属医院急诊科, 昆明 650032; 4. 昆明医科大学技术转移中心, 昆明 650031)

【摘要】 目的 评价恒古骨伤愈合剂对去势树鼩骨质疏松性骨折模型的血液生理指标和脏器系数的影响。
方法 30 只雌性树鼩分为对照组、模型组和治疗组。治疗组和模型组树鼩切除双侧卵巢 6 个月证实骨质疏松后再造成胫骨骨折。于骨折次日起, 治疗组用恒古骨伤愈合剂灌胃, 每两天 1 次; 模型组和对照组用等量生理盐水灌胃。灌胃 3 个月后, 检测各组树鼩血液生理指标和脏器系数。**结果** 在 16 项血液生理指标中, 模型组白细胞数、淋巴细胞绝对值和百分率显著低于对照组 ($P < 0.01$), 单核细胞百分比和绝对值也降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 治疗组单核细胞百分比和绝对值显著升高 ($P < 0.01$), 淋巴细胞绝对值和百分率以及白细胞数显著升高 ($P < 0.05$), 且治疗组脾脏系数明显高于模型组 ($P < 0.05$)。**结论** 恒古骨伤愈合剂提高骨质疏松性骨折树鼩的免疫力。

【关键词】 双侧去卵巢; 骨质疏松性骨折; 树鼩; 免疫力; 恒古骨伤愈合剂

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 11-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.11.001

Effect of Osteoking on blood physiological parameters and organ indexes in female tree shrews with osteoporotic fracture

WU Chao¹, TANG Wei², ZHAO Hong-bin³, LI Jin-tao¹, JIAO Jian-lin⁴, YUAN Xin², ZHENG Hong^{1*}

(1. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;
2. Department of Science and Education, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032;
3. Department of Emergency Medicine, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032;
4. Technology Transfer Center, Kunming Medical University, Kunming 650031)

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of Osteoking on blood physiological parameters and organ indexes in the ovariectomized tree shrew model of osteoporotic fracture (OPF). **Methods** A total of 30 4-month-old female tree shrews (*Tupaia belangeri*) were randomly divided into control group, model group and treatment group, with 10 in each group. Bilateral ovaries of the tree shrews in the treatment group and model group were removed and osteoporosis was confirmed 6 months later. Then tibial fractures were generated. From the next day of fracture, tree shrews in the treatment group were gavaged with Osteoking once every two days, and tree shrews in the model group and control group were gavaged with equal volume of sterile saline. After gavaging for 3 months, 16 blood physiological parameters and 6 organ indexes of the tree shrews in each group were measured. **Results** Among all of the 16 blood physiological parameters, the number of white blood cells, the absolute value and percentage of lymphocytes ($P < 0.01$) and monocytes ($P < 0.05$) in the

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号:81460647); 云南省应用基础研究计划项目[编号:2014FB033, 2017FE468(-014;016)]。

【作者简介】 吴超(1993-), 男, 硕士生, 研究方向: 药学与比较医学。E-mail: 120480903@qq.com

【通讯作者】 郑红(1969-), 女, 副教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向: 比较医学。E-mail: 847255170@qq.com

model group were significantly lower than those in the control group after 3 months. Compared with the model group, the absolute value and percentage of monocytes ($P < 0.01$) and lymphocytes, the number of white blood cells ($P < 0.05$) and the spleen coefficient were significantly increased ($P < 0.05$) in the treatment group. **Conclusions** Osteoking can improve the immunity of tree shrews with osteoporotic fracture.

【Key words】 Bilateral ovariectomy; Osteoporotic fracture; Tree shrews; Immunity; Osteoking

恒古骨伤愈合剂(Osteoking, OK)源自云南南部彝族古方,是我国拥有自主知识产权、云南省重点支持开发的药品。该药物根据彝族医药关于哎哺、八宫、八极、六(八)色、天五行、地五行、人五行的理论,是治疗骨折、骨病等的内服方药,富含多种营养物质,例如微量元素和氨基酸等物质,可促进软组织损伤修复和水肿吸收,减少炎性渗出物对神经末梢的刺激,缓解疼痛^[1]。临床和动物实验研究表明恒古骨伤愈合剂对骨质疏松有一定的疗效,并且能促进骨质疏松性骨折(osteoporotic fracture, OPF)愈合^[2-4],但其作用机制有待进一步研究。本研究通过建立骨质疏松骨折树鼩模型,同时给予恒古骨伤愈合剂干预,对比观察树鼩血液中单核细胞(monocytes, MONO)、淋巴细胞(lymphocytes, LYMPH)、白细胞(white blood cells, WBC)、红细胞(red blood cells, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, HGB)、血小板(platelet, PLT)等 16 项血液生理指标和脾(spleen)等 6 项脏器系数及体重(body weight, BW)的变化,旨在观察恒古骨伤愈合剂对 OPF 树鼩的保护作用,初步探讨其作用机制,为恒古骨伤愈合剂治疗 OPF 提供参考数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级 4 月龄滇西亚种树鼩 40 只,雌性,体重为 100 ~ 140 g,由昆明医科大学实验动物学部提供[SCXK(滇)K2013-002]。树鼩饲养室温度:22℃ ~ 25℃,相对湿度 45% ~ 60%,每天人工光照 12 h[SYXK(滇)K2015-002]。动物饲喂颗粒饲料,自由饮水。实验操作过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

恒古骨伤愈合剂,25 mL/瓶,每毫升含生药 0.36 g,云南克雷斯天然药物制药厂生产,批号 20150406;贝克曼库尔特 Diff-2 型全自动血细胞分析仪,检测试剂为原装配试剂;梅特勒 me204e 万分之一天平;美国 GE 公司 Prodigy 型 DXA 骨密度仪。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立、分组和给药

10 只雌性树鼩切除双侧卵巢部分脂肪组织,作为对照组。30 只雌性树鼩切除双侧卵巢,术后 6 个月用 DXA 骨密度仪测定树鼩全身骨密度,选择骨密度降低 25% 的 20 只,右侧后肢行胫骨骨折术,建立去卵巢树鼩骨质疏松骨折模型;其中 10 只为模型组,10 只为治疗组。治疗组经灌胃方式,给予恒古骨伤愈合剂(0.45 mg/次),每两天 1 次,服用 3 个月。模型组和对照组给予同等剂量生理盐水灌胃。每周称重以调整给药剂量。

1.3.2 血样、脏器采集和检测

树鼩禁食 12 h,称量体重。非麻醉状态下心脏采血 0.5 mL,装入乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝管,混匀,设定好全自动血细胞分析仪精度,按照标准操作方法测定血液生理指标。麻醉处死动物,采集脏器,称量脏器重量,计算脏器系数。

1.4 统计学方法

试验数据采用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 20.0 进行统计分析,三组间比较采用单因素方差分析。设定 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

在检测的 16 项生理指标中,与模型组比较,治疗组单核细胞百分比与单核细胞绝对值的水平明显上升,差异有显著性($P < 0.01$);治疗组淋巴细胞绝对值、淋巴细胞百分率、白细胞数显著增加($P < 0.05$),其余各项指标差异无显著性($P > 0.05$)。与对照组比较,模型组树鼩白细胞数、单核细胞绝对值、单核细胞百分比显著减少($P < 0.01$);淋巴细胞绝对值,淋巴细胞百分率显著减少($P < 0.05$);其他指标,包括红细胞数、体积、比容和分布宽度,血红蛋白量、容量和浓度,血小板数、体积和压积,在三组间差异无显著性($P > 0.05$)(表 1)。

三组树鼩中,模型组体重显著高于治疗组和对照组($P < 0.01$),治疗组与对照组差异无显著性($P > 0.05$)。模型组脾系数显著低于对照组($P < 0.01$);治疗组显著高于模型组($P < 0.05$)。三组树鼩其他脏器系数组间两两比较,差异均无显著性($P > 0.05$)(表 2)。

表 1 三组树鼩血液生理指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab.1 Comparison of blood physiological parameters of tree shrews in the three groups

指标 Parameters	对照组 Control group	模型组 Model group	治疗组 Treatment group
单核细胞百分比/% Percentage of MONO	28. 060 ± 2. 744	10. 300 ± 2. 943 **	18. 680 ± 2. 744 ^{ΔΔ}
单核细胞绝对值/10 ⁹ /L Absolute value of MONO	0. 720 ± 0. 187	0. 125 ± 0. 035 **	0. 285 ± 0. 053 ^{ΔΔ}
淋巴细胞百分率/% Percentage of LYMPH	71. 690 ± 7. 892	61. 920 ± 7. 694 *	70. 130 ± 5. 962 ^Δ
淋巴细胞绝对值/10 ⁹ /L Absolute value of LYMPH	1. 315 ± 0. 302	1. 155 ± 0. 347 *	1. 293 ± 0. 262 ^Δ
白细胞计数/10 ⁹ /L WBC count	2. 300 ± 0. 616	1. 300 ± 0. 413 **	1. 750 ± 0. 460 ^Δ
红细胞计数/10 ¹² /L RBC count	9. 179 ± 0. 506	9. 098 ± 0. 723	9. 385 ± 0. 448
红细胞比容/L/L Hematocrit (HCT)	0. 523 ± 0. 024	0. 530 ± 0. 034	0. 540 ± 0. 030
红细胞分布宽度变异系数/FL Red blood cell distribution width- coefficient of variation (RDW-CV)	0. 142 ± 0. 012	0. 140 ± 0. 007	0. 134 ± 0. 008
平均红细胞体积/FL Erythrocyte mean corpuscular volume (MCV)	56. 940 ± 1. 192	58. 250 ± 1. 923	57. 609 ± 2. 963
血红蛋白测定/g/L HGB	162. 200 ± 10. 097	165. 10 ± 10. 09	165. 000 ± 6. 116
平均血红蛋白容量/pg Mean corpuscular hemoglobin (MCH)	17. 690 ± 0. 578	18. 180 ± 0. 505	17. 600 ± 0. 752
平均血红蛋白浓度/g/L Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	310. 700 ± 9. 627	312. 500 ± 9. 958	305. 909 ± 212. 029
血小板平均体积/FL Mean platelet volume (MPV)	10. 437 ± 0. 958	11. 580 ± 1. 956	12. 227 ± 1. 824
血小板计数/10 ⁹ /L Platelet count	491. 500 ± 57. 914	472. 100 ± 80. 234	446. 600 ± 53. 402
血小板压积/FL Plateletcrit (PCT)	0. 544 ± 0. 102	0. 510 ± 0. 162	0. 576 ± 0. 144
血小板分布宽度/% Platelet distribution width (PDW)	16. 1 ± 1. 0	16. 3 ± 1. 0	16. 2 ± 0. 62

注:与对照组比较, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$; 与模型组比较, ^Δ $P < 0. 05$, ^{ΔΔ} $P < 0. 01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$; Compared with the model group, ^Δ $P < 0. 05$, ^{ΔΔ} $P < 0. 01$.

表 2 三组树鼩体重和脏器系数比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab.2 Comparision of body weight and organ coefficients of tree shrews in the three groups

指标 Indicators	对照组 Control group	模型组 Model group	治疗组 Treatment group
体重/g Body weight	114. 440 ± 9. 798	132. 181 ± 7. 051 **	115. 620 ± 7. 770 ^{ΔΔ}
脾/% Spleen	0. 1625 ± 0. 0405	0. 0748 ± 0. 0171 **	0. 1140 ± 0. 0190 *
心/% Heart	0. 6663 ± 0. 0991	0. 6238 ± 0. 0671	0. 6074 ± 0. 0583
肺/% Lung	0. 8497 ± 0. 0574	0. 9146 ± 0. 1247	0. 9346 ± 0. 2011
肝/% Liver	4. 9333 ± 0. 8163	4. 4827 ± 0. 6073	4. 4314 ± 0. 7939
左肾/% Left kidney	0. 4909 ± 0. 0515	0. 5158 ± 0. 0856	0. 4658 ± 0. 0778
右肾/% Right kidney	0. 4917 ± 0. 0521	0. 5225 ± 0. 0991	0. 4628 ± 0. 0784

注:与对照组比较, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$; 与模型组比较, ^Δ $P < 0. 05$, ^{ΔΔ} $P < 0. 01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$; Compared with the model group, ^Δ $P < 0. 05$, ^{ΔΔ} $P < 0. 01$.

3 讨论

骨质疏松症是一种代谢性骨骼系统疾病。随着人口老龄化问题的日趋严重,已使得骨质疏松性骨折(OPF)成为常见多发病。OPF 致残率高,对老年人健康造成了极大威胁。目前用于 OPF 研究的动物有大鼠、小鼠、犬、兔、猪、羊、狒狒、猴等,其中大鼠的应用最多,但这些动物模型各有缺陷^[5]。树鼩与灵长类动物亲缘关系最为接近^[6],并且繁殖能力强,饲养难度低,体型与大鼠类似,可方便地完成雌性树鼩去卵巢及造成骨折,操作可控,重复性好,这些都为树鼩成为 OPF 研究的新型实验动物模型创造了条件。因此,本实验室在参考王运林等^[7]方法的基础上,成功建立 OPF 树鼩模型并开展恒古骨伤愈合剂治疗研究。

血细胞具有固有免疫活性,可在体外用免疫原激活系统血液固有免疫反应。白细胞免疫系统是血液固有免疫系统的主要成分^[8]。脾脏是哺乳动物最大的外周免疫器官,是免疫应答的重要部位。脾脏中含有丰富的 T 细胞、B 细胞、树突细胞(dendritic cells, DC)及巨噬细胞、自然杀伤细胞(natural killer cells, NK)等细胞亚群,它们的组成比例和数量的维持对于机体免疫应答功能的发挥至关重要,且与多种临床疾病的发生密切相关^[9]。中医理论认为原发性骨质疏松症病机以肾脾虚为本,于中气不升,土气不纳,亦即阴阳两虚导致^[10]。恒古骨伤愈合剂功能主治为活血益气、补肝肾、接骨续筋、消肿止痛,符合中医治疗骨质疏松症和 OPF 的原则。但该药治疗 OPF 的机制还有待研究^[11]。

有研究报道雌激素下降,血液循环中淋巴细胞产生的白介素-1(IL-1)和骨髓基质产生的白介素-6(IL-6)增多,白介素-2(IL-2)等免疫调节物质的产生减少,体内脱氢表雄酮(DHEA)浓度显著下降,引起免疫系统失调^[12]。本研究显示,雌性树鼩经去势建立 OPF 模型后,外周血单核细胞、白细胞($P < 0.01$)和淋巴细胞($P < 0.05$)均明显下降,同时模型树鼩脾脏系数显著低于对照组($P < 0.01$),提示 OPF 树鼩机体免疫力下降,推测可能因树鼩切除卵巢后,雌激素分泌减少,破坏神经-内分泌-免疫网络平衡所致。此外,雌激素可降低蛋白脂肪酶活性,抑制脂肪生成;雌激素可作用于下丘脑,减少摄食^[13];雌激素也能增加肾上腺素的解脂作用,通过以上途径,雌激素具有降低脂肪堆积的作用^[14]。本

实验中模型组体重显著高于对照组($P < 0.01$),推测是由于树鼩雌激素水平下降导致脂肪代谢异常所致。

恒古骨伤愈合剂已用于 OPF 的临床治疗和兔 OPF 研究^[4]。该药含有人参、黄芪、三七、红花、陈皮等成分。人参^[15]、黄芪^[16]等是良好的补气益身药物,两者的药理作用广泛,能刺激淋巴细胞增殖使淋巴细胞增加,激活环磷酸腺苷增强非特异性免疫功能,促进多种细胞因子的分泌等。王庭欣等^[17]将黄芪多糖溶液通过灌胃方式饲喂小鼠,结果显示,黄芪多糖能促进小鼠细胞免疫、体液免疫和巨噬细胞功能。有文献报道在鹌鹑的饲料中添加人参茎叶,改善了鹌鹑部分血液生理指标,加快免疫器官的生长,从而提高免疫力^[18]。三七中的三七多糖与杜仲可增强淋巴细胞的转化能力,并提高自然杀伤细胞的活性,从而加快免疫细胞形成^[19]。有研究者采用皮下注射环磷酸腺苷的方式,导致小鼠脾指数、胸腺指数、淋巴细胞百分率下降,经皮下注射三七皂苷 R_g 治疗后,以上各项指标均有所恢复,认为三七皂苷 R_g 有促进免疫力恢复的作用^[20]。红花中的红花苷^[21]和陈皮^[22]也可促进淋巴细胞增殖,提高淋巴细胞的转化率。此外,我们的前期研究发现恒古骨伤愈合剂对骨折树鼩心脏和肝脏功能具有保护作用^[23]。本实验结果表明,恒古骨伤愈合剂能显著提高 OPF 树鼩单核细胞百分比和绝对值($P < 0.01$),提高淋巴细胞绝对值和百分率、白细胞数和脾系数($P < 0.05$),提示恒古骨伤愈合剂能较有效地改善 OPF 树鼩免疫功能。同时,治疗组体重比模型组显著降低($P < 0.01$),表明恒古骨伤愈合剂改善了雌激素减少所致的肥胖。

免疫细胞和骨细胞源于相同的祖细胞,其分化由相同的支持细胞驱动。机体骨重建和免疫系统存在着相互调节的作用,免疫系统的异常激活可以改变成骨细胞、破骨细胞之间的耦联平衡,从而影响骨重建的失衡而导致骨质疏松^[24]。从本实验所获得的数据,推测恒古骨伤愈合剂通过改善 OPF 树鼩免疫功能,进而调节骨重建的平衡。这为恒古骨伤愈合剂治疗 OPF 的机理研究提供了新的思路。

参考文献:

- [1] 胡敏,赵宏斌,王兵,等.恒古骨伤愈合剂促进胫骨下段骨折术后愈合临床观察[J].中国中西医结合杂志,2005,25(2):160-161.
- [2] Zhao HB, Hu M, Zheng HY, et al. Clinical study on effect of

- Osteoking in preventing postoperative deep venous thrombosis in patients with intertrochanteric fracture [J]. Chin J Integr Med, 2005, 11(4): 297-299.
- [3] 罗德军, 赵宏斌, 周旭, 等. 鲑鱼降钙素联合恒古骨伤愈合剂治疗腰椎 OPF 疗效分析 [J]. 中华内分泌外科杂志, 2011, 5(3): 158-160.
- [4] 王素彬, 赵宏斌, 胡敏, 等. 恒古骨伤愈合剂对骨质疏松性骨折兔骨密度及 DKK-1 蛋白的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(8): 1000-1003.
- [5] Atmaca H, Aydın A, Musaoğlu R. Experimental model of osteoporosis: comparison between ovariectomy and Botulinum toxin A [J]. Acta Ortop Bras, 2013, 21(6): 340-343.
- [6] 郑红, 李树德, 王振宇, 等. $\text{A}\beta_{1-40}$ 侧脑室注射模拟阿尔茨海默病树突模型的核磁共振成像特征 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(4): 1-6.
- [7] 王运林, 匡德宣, 马朝霞, 等. 去卵巢法骨质疏松树突模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 562-566.
- [8] 郭峰, 钱宝华, 花美仙. 体外免疫原快速激活全血细胞固有免疫反应系统模式的应用 [J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(1): 64-67.
- [9] Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity [J]. Immunity, 2013, 39(5): 806-818.
- [10] 周龙云, 郭杨, 黄桂成, 等. 骨质疏松症“病本在脾, 以阴阳两虚为要”之见探讨 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(4): 487-491.
- [11] 陈振南, 周忠, 王万明, 等. 恒古骨伤愈合剂促进腰椎板开窗术后微小骨粒回植骨重建的实验研究 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(35): 12-15, 34.
- [12] 黄辉, 司秋生, 王新力, 等. X 线照射卵巢研究雌激素与免疫功能相关性的动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 1993, 1(2): 70-74.
- [13] Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006, 361(1471): 1251-1263.
- [14] 郭姣红, 李旭炯, 岳嘉, 等. 怀牛膝对去卵巢肥胖大鼠体重和肿瘤坏死因子- α 的影响 [J]. 成都医学院学报, 2008, 3(2): 100-102, 106.
- [15] 孙秀萍, 李腾飞, 石哲, 等. 人参总皂苷和远志总苷配伍对小鼠抗抑郁作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(6): 30-36.
- [16] 林浩炜, 谭行华. 黄芪及其提取物在肝病中的应用 [J]. 国际中医中药杂志, 2016, 38(12): 1142-1145.
- [17] 王庭欣, 王庭祥, 吴广臣, 等. 黄芪多糖增强小鼠免疫功能的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1763-1764.
- [18] 李俊峰, 刘千辉, 苏凤艳, 等. 人参茎叶对鹌鹑生长、免疫器官指数和血液生化指标的影响 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2017, 45(3): 31-36, 42.
- [19] 殷捷鸿. 中药三七抗衰老作用研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(12): 3060-3061.
- [20] 江源, 刘翠, 陈清彬, 等. 三七皂苷 R_{g1} 对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国现代中药, 2006, 8(3): 9-11.
- [21] 刘娟, 李建伟, 乔玉峰, 等. 红花临床应用研究进展 [J]. 医学研究与教育, 2015, 32(3): 91-94.
- [22] 周金星, 靳二辉, 李升和, 等. 自拟中药免疫促进剂对 SD 大鼠白细胞及血清生化指标的影响 [J]. 安徽科技学院学报, 2016, 30(1): 1-6.
- [23] 袁鑫, 郑红, 角建林, 等. 口服恒古骨伤愈合药对骨质疏松性骨折树突部分血液生化指标的影响 [J]. 昆明医科大学学报, 2017, 18(7): 12-15.
- [24] Takayanagi H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone [J]. Nat Rev Rheumatol, 2009, 5(12): 667-676.

[收稿日期]2017-04-17

·专家问答·

问:常见的小鼠颈部非特异荧光显影如何消除?

答:说到小鼠颈部的非特异荧光,可能早期的设备会有这种现象,但对活体光学成像来说,目前较新设备的软件已经针对这一部分进行了处理,都能有效消除掉。

(感谢第四军医大学实验动物中心 师长宏 教授、
冷泉港生物科技股份有限公司分子影像部门副总经理 王志宇先生 的解答)