

# 盘龙七片调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路对大鼠胫骨骨折愈合的影响\*

黄晓文 左强 刘久翔 黄振飞 洪顾麒

(江苏省人民医院骨科, 江苏 南京 210029)

**【摘要】** 目的 探讨盘龙七片对大鼠胫骨骨折愈合的促进作用及可能作用机制。方法 选用 58 只 8 周龄、SPF 级 SD 雄性大鼠为实验大鼠,分为造模大鼠( $n=48$ )与 Sham 组大鼠( $n=10$ )。建立胫骨骨折模型大鼠,并将模型大鼠分为 Model 组、盘龙七片组(Treat 组)、 $\beta$ -catenin 抑制剂组(XAV-939)及盘龙七片+ $\beta$ -catenin 抑制剂组(Treat+XAV-939 组) 4 组,每组 10 只。X 光片观察大鼠胫骨骨折愈合状况;骨密度测定仪检测胫骨矿物质密度值(BMD);HE 染色观察大鼠骨折部位结构变化;酶联免疫吸附法检测血清中 ALP、bFGF、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ;免疫印迹法检测骨组织中 p-糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )、Wnt3、 $\beta$ -链蛋白( $\beta$ -Catenin)及淋巴增强因子 1(LEF1)蛋白表达。**结果** 与 Sham 组相比,Model 组骨组织影像学愈合评分、BMD、ALP、bFGF 水平、Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达降低,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平升高;与 Model 组相比,Treat 组骨组织影像学愈合评分、BMD、ALP、bFGF 水平、Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达升高,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平降低;Treat+XAV-939 组骨组织影像学愈合评分、BMD、ALP、bFGF 水平、Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达高于 XAV-939 组,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平低于 XAV-939 组,差异有统计学意义(均  $P<0.05$ )。**结论** 盘龙七片可促进大鼠胫骨骨折愈合,其机制与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路、缓解骨折大鼠机体炎症反应有关。

**【关键词】** 胫骨骨折;盘龙七片; $\beta$ -链蛋白通路;骨折愈合

**【中图分类号】** R681.8 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-3511.2020.08.003

## Effect of Panlongqi Tablet regulating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway on the healing of tibial fracture in rats

HUANG Xiaowen, ZUO Qiang, LIU Jiuxiang, HUANG Zhenfei, HONG Guqi

(Department of Orthopaedics, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the promoting effect of Panlongqi Tablet on the healing of tibial fracture in rats and its possible mechanism. **Methods** The tibial fracture model rats were established and divided into Model group, Panlongqi Tablet group (Treat group),  $\beta$ -catenin inhibitor group (XAV-939), treat + XAV-939 group, with 10 rats in each group. The healing of tibial fracture was observed by X-ray. Bone mineral density (BMD) of tibia was measured by dual energy x-ray absorptiometry. HE staining was used to observe the structural changes of fracture site. ALP, bFGF, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in serum were detected by ELISA. Western blotting was used to detect the protein expressions of p-glycogen synthetase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), Wnt3,  $\beta$ -catenin and lymphoid enhancer 1 (LEF1) in bone tissue. **Results** Compared with Sham group, the healing score of bone tissue imaging, BMD, the levels of ALP, bFGF, and the protein expressions of Wnt3,  $\beta$ -catenin and LEF1 in Model group were decreased, and the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  increased. Compared with the Model group, the healing score of bone tissue imaging, BMD, the levels of ALP, bFGF, and the protein expressions of Wnt3,  $\beta$ -catenin and LEF1 in Model group were increased, and the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  decreased. The healing score of bone tissue imaging, BMD, the levels of ALP, bFGF, and the protein expressions of Wnt3,  $\beta$ -catenin and LEF1 in Treat + XAV-939 group were higher than those in XAV-939 group, and the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were lower than those in XAV-939 group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Panlongqi Tablet can promote the healing of tibial fracture in rats. Its mechanism is related to the inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and the alleviation of

inflammatory response in rats.

**【Key words】** Tibial fracture; Panlongqi Tablet;  $\beta$ -catenin pathway; Fracture healing

胫骨骨折属于临床常见创伤疾病,具有关节僵硬、活动受限等多种后遗症,致残率较高,影响患者生活质量,因此如何改善骨折愈合率,缩短愈合周期是目前研究的重要方向<sup>[1]</sup>。骨折愈合过程极为复杂,其中涉及较多信号通路,Wnt/ $\beta$ -链蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路在骨发育、分化中具有重要的调控作用。近期有研究发现,敲除  $\beta$ -catenin 后能引发大鼠骨分化障碍,造成软骨化<sup>[2]</sup>;阻断 Wnt 信号通路后则会造成骨痂延迟,影响骨愈合<sup>[3]</sup>。盘龙七片具有消肿镇痛,抗炎、活血化瘀的功能,在骨关节疾病中应用较多,然而具体机制尚不明确<sup>[4]</sup>。本研究通过建立大鼠胫骨骨折,并给予盘龙七片处理,旨在探讨其对骨折大鼠的保护作用及可能作用机制。

## 1 实验与方法

1.1 实验动物 选用 58 只 8 周龄、SPF 级 SD 雄性大鼠为实验大鼠,均由河南省实验动物中心提供,体质量 220~240 g,使用许可证号:SYXK(豫)2016-0008。饲养条件:温度 25℃,湿度 30%~50%,12 h 昼夜交替。本研究严格遵循实验动物管理条例进行饲养,一周后用于模型制备。

1.2 主要试剂与仪器 盘龙七片(批号:20181216,陕西盘龙药业集团股份有限公司); $\beta$ -catenin 抑制剂 XAV-939 (284028-89-3,美国 MCE 公司,纯度 98.71%);HE 染色试剂(G1120,美国索莱宝);碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)测定试剂盒(R2657s,德国 Roche);bFGF 测定试剂盒(CSB-E08002r-1,上海振誉生物科技有限公司);肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor - $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )测定试剂盒(JKSJ-1857,上海晶抗生物工程有限公司);白介素 1 $\beta$ (Interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )测定试剂盒(E-EL-R0012C,上海恒斐生物科技有限公司);RIPA 裂解液、蛋白浓度检测试剂盒(P0013B, P0010S,杭州碧云天生物技术有限公司);PVDF 膜(0.45  $\mu$ m, IPVH00010,美国 Millipore);兔抗鼠 p-糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )、Wnt3、山羊抗兔 HRP 标记二抗(AF2157, 5036-WN, HAF008,美国 R&D 公司);兔抗鼠  $\beta$ -Catenin、淋巴增强因子 1(Lymphokine 1, LEF1)、 $\beta$ -actin 一抗(C7738, AV32404, F3022,美国 Sigma 公司);切片机及烤片机(CM3050S,德国 Leica 公司);动物 X 线机(VX-PLUS,德国西门子);X 射线骨密度仪(Lunar iDXA,美国 GE);蛋白凝胶检测仪(Bright1500,美国 Invitrogen 公司)。

1.3 建立大鼠胫骨骨折模型 将 58 只实验大鼠分为造模大鼠( $n=48$ )与 Sham 组大鼠( $n=10$ )。参照文献<sup>[5]</sup>建立胫骨骨折大鼠,造模大鼠经麻醉后仰卧于手术台,固定左侧小腿,常规消毒,在胫骨结节上方 2 mm 处做一个 1.5 cm 纵向切口,随后依次切开皮下组织,暴露上半段胫骨,剥离肌肉与筋膜后,采取 0.1 mm 克氏针自平台处插向胫骨,用电锯锯断胫骨上方 1/3 处,用生理盐水对骨折处进行冲洗,随后用克氏针将两侧断端固定,缝合切口、消毒。Sham 组大鼠仅剥离胫骨肌肉后缝合,不进行其他处理。排除操作不当、伤口感染等,共 40 只大鼠模型建立成功。

1.4 大鼠分组与给药方法 模型建立成功后,将 40 只大鼠分为 Model 组、盘龙七片组(Treat 组)、 $\beta$ -catenin 抑制剂组(XAV-939 组)及盘龙七片+ $\beta$ -catenin 抑制剂组(Treat+XAV-939 组),每组 10 只。Treat 组:造模后,参考人与动物体表面积换算法,大鼠的给药剂量为人剂量的 6 倍,给予 600 mg/kg 盘龙七片<sup>[6]</sup>;XAV-939 组:造模后,给予 1 mg/mL XAV-939<sup>[7]</sup>;Treat+XAV-939 组:造模后,给予 1 mg/mL XAV-939 15 min 后,再给予 600 mg/kg 盘龙七片;Sham 组、Model 组给予等体积生理盐水,各组均处理 8 周。

## 1.5 观察指标与测定方法

1.5.1 X 光片观察大鼠胫骨骨折愈合状况 末次给药结束后,采用 X 线机对各组大鼠左下肢胫骨骨折处检测;参数设置:光源距离:75 cm,胶片距离:2 cm,曝光时间:1.25 s。拍摄结束后,采用 Garrett 等<sup>[8]</sup>评分法对各组大鼠胫骨骨折愈合情况进行评定。

1.5.2 样本收集 X 光片拍摄结束后,各组大鼠均麻醉后处理,收集血液 1 mL,3000 r/min 离心后,保存血清置-20℃保存;切开患侧皮肤,暴露胫骨,去除踝关节保留胫骨,同时拔除固定针使胫骨离体,待测骨密度、骨痂直径;检测结束后,将一部分骨组织放置在-80℃保存,另一部分在 4%多聚甲醛中过夜固定。

1.5.3 胫骨骨矿物质密度值(Bone Mineral Density, BMD)测定 采用骨密度测定仪扫描离体胫骨,记录扫描值,扫描 3 次,获取平均值;采用游标卡尺测定骨痂最长直径。

1.5.4 HE 染色观察大鼠骨折部位结构变化情况 将固定后骨组织去除,用脱钙液进行脱钙处理,6 周后,再次在固定液中固定 48 h,经脱水、透明、浸腊等包埋后制备骨组织石蜡切片,采用 HE 染色试剂盒对骨组织切片进行染色,在倒置显微镜下观察大鼠骨折

结构变化情况。

1.5.5 血清碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP)、碱性成纤维生长因子 (Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)、TNF-α、IL-1β 水平检测 采用酶联免疫吸附法检测血清中 ALP、bFGF、TNF-α、IL-1β 水平,具体依据制造商说明书操作。

1.5.6 免疫印迹法检测骨组织中 p-GSK-3、Wnt3、β-Catenin、LEF1 蛋白表达 骨组织经脱钙处理后,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,测定浓度后,统一定量 30 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,将分离后的目的蛋白转移到 PVDF 膜上,封闭后用兔抗鼠 p-GSK-3、Wnt3、β-Catenin、LEF1、β-actin 一抗抗体孵育膜,4 ℃ 环境中过夜孵育;次日用 HRP 标记的二抗抗体孵育膜,37 ℃ 温育 2 h,ECL 发光液处理后,用 Image-J 软件分析各蛋白表达水平,以目的蛋白灰度值/β-actin 灰度值表示蛋白相对表达量。

1.6 统计学分析 数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,大体评分采用秩和检验,多组比较行单因素方差分析,进一步两两分析行 SNK-q 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 X 射线检测结果 Sham 组大鼠胫骨正常;Model 组骨折线清晰,出现少量骨痂;Treat 组骨折伴有骨痂,骨折线模糊;XAV-939 组骨折线清晰,无骨痂;Treat+XAV-939 组骨折线清晰,出现微量骨痂,见图 1。与 Sham 组相比,Model 组骨组织影像学愈合评分降低;与 Model 组相比,Treat 组骨组织影像学愈合评分升高,XAV-939 组骨组织影像学愈合评分降低;Treat+XAV-939 组骨组织影像学愈合评分高于 XAV-939 组,差异有统计学意义(均 P<0.05)。见表 1。

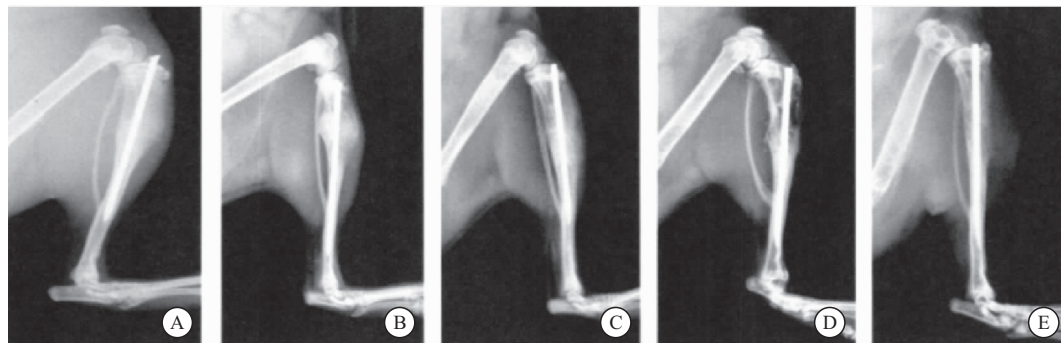


图 1 各组大鼠 X 射线检测结果

Figure 1 X-ray examination results of rats in each group

注:A. Sham 组;B. Model 组;C. Treat 组;D. XAV-939 组;E. Treat+XAV-939 组

表 1 各组大鼠骨组织影像学愈合评分比较( $\bar{x} \pm s$ ,分)

Table 1 Comparison of healing scores of bone tissue imaging in each group

组别	n	骨组织影像学愈合评分
Sham 组	10	8.06±0.74
Model 组	10	3.67±0.48 <sup>①</sup>
Treat 组	10	5.61±0.44 <sup>②</sup>
XAV-939 组	10	3.16±0.37 <sup>②</sup>
Treat+XAV-939 组	10	3.75±0.62 <sup>③</sup>

注:与 Sham 组相比,①P<0.05;与 Model 组相比,②P<0.05;与 XAV-939 组相比,③P<0.05

2.2 各组大鼠胫骨矿物质密度检测结果 与 Sham 组相比,Model 组 BMD 降低;与 Model 组相比,Treat 组 BMD、骨痂直径升高,XAV-939 组 BMD、骨痂直径降低;Treat+XAV-939 组 BMD、骨痂直径高于 XAV-939 组,差异有统计学意义(均 P<0.05)。见表 2。

表 2 各组大鼠 BMD、骨痂直径比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of BMD and callus diameter in each group

组别	n	BMD(mg/cm <sup>2</sup> )	骨痂直径(mm)
Sham 组	10	0.26±0.03	—
Model 组	10	0.12±0.02 <sup>①</sup>	0.63±0.06
Treat 组	10	0.18±0.02 <sup>②</sup>	0.76±0.07 <sup>②</sup>
XAV-939 组	10	0.07±0.03 <sup>②</sup>	0.54±0.05 <sup>②</sup>
Treat+XAV-939 组	10	0.13±0.04 <sup>③</sup>	0.63±0.06 <sup>③</sup>

注:与 Sham 组相比,①P<0.05;与 Model 组相比,②P<0.05;与 XAV-939 组相比,③P<0.05

2.3 各组大鼠骨折处 HE 染色情况 Sham 组大鼠组织形态大体完整;Model 组骨折处出现少量纤维组织,排列不整齐,部分出现坏死区域;Treat 组骨折处纤维组织密度增大,排列有序且部分已被正常组织替代;XAV-939 组骨折处出现大量骨痂、纤维组织,排列紊乱;与 XAV-939 组相比,Treat+XAV-939 组纤维组织排列稍整齐,但仍有部分坏死区域。见图 2。

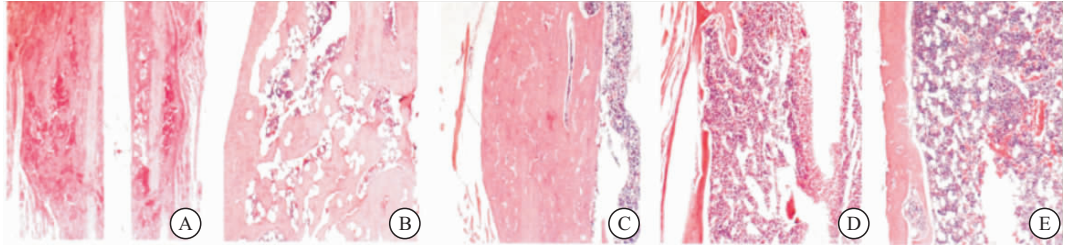


图 2 HE 染色观察大鼠骨折处病理形态变化情况(100×)

Figure 2 The pathological changes of fracture site in rats

注: A. Sham 组; B. Model 组; C. Treat 组; D. XAV-939 组; E. Treat+XAV-939 组

2.4 各组大鼠血清 ALP、bFGF 水平比较 与 Sham 组相比, Model 组 ALP、bFGF 水平降低; 与 Model 组相比, Treat 组 ALP、bFGF 水平升高, XAV-939 组 ALP、bFGF 水平降低; Treat + XAV-939 组 ALP、bFGF 水平高于 XAV-939 组, 差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组血清中 ALP、bFGF 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of ALP and bFGF levels in serum of each group

组别	n	ALP(U/L)	bFGF(pg/L)
Sham 组	10	230.44 ± 13.89	84.25 ± 9.16
Model 组	10	141.86 ± 11.47 <sup>①</sup>	56.58 ± 6.45 <sup>①</sup>
Treat 组	10	174.31 ± 10.72 <sup>②</sup>	71.95 ± 8.39 <sup>②</sup>
XAV-939 组	10	127.05 ± 11.73 <sup>②</sup>	45.38 ± 6.45 <sup>②</sup>
Treat+XAV-939 组	10	148.27 ± 12.56 <sup>③</sup>	58.84 ± 6.59 <sup>③</sup>

注: 与 Sham 组相比, ①  $P < 0.05$ ; 与 Model 组相比, ②  $P < 0.05$ ; 与 XAV-939 组相比, ③  $P < 0.05$

2.5 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平比较 与 Sham 组相比, Model 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平升高; 与 Model 组相比, Treat 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平降低, XAV-939 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平升高; Treat + XAV-939 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平低于 XAV-939 组, 差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见表 4。

2.6 盘龙七片对胫骨骨折大鼠 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路蛋白表达的影响 与 Sham 组相比, Model 组 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达升高, Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达降低; 与 Model 组相比, Treat 组 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达降低, Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达升高, XAV-939

表 4 各组血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of serum TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in each group

组别	n	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (ng/mL)
Sham 组	10	34.59 ± 3.46	12.34 ± 2.69
Model 组	10	112.34 ± 9.27 <sup>①</sup>	34.92 ± 4.11 <sup>①</sup>
Treat 组	10	75.84 ± 8.65 <sup>②</sup>	22.80 ± 4.52 <sup>②</sup>
XAV-939 组	10	135.02 ± 11.70 <sup>②</sup>	47.35 ± 6.27 <sup>②</sup>
Treat+XAV-939 组	10	118.46 ± 8.19 <sup>③</sup>	32.27 ± 3.87 <sup>③</sup>

注: 与 Sham 相比, ①  $P < 0.05$ ; 与 Model 组相比, ②  $P < 0.05$ ; 与 XAV-939 组, ③  $P < 0.05$

组 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达升高, Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达降低; Treat + XAV-939 组 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达低于 XAV-939 组, Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达高于 XAV-939 组, 差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见图 3、表 5。

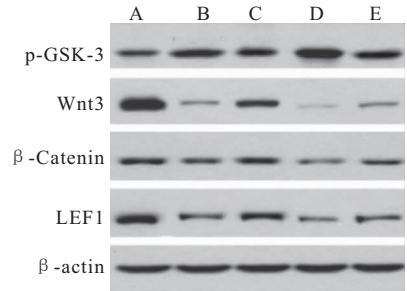


图 3 免疫印迹法检测骨组织中 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路蛋白表达

Figure 3 Western blot detection of Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway protein expression in bone tissue

注: A. Sham 组; B. Model 组; C. Treat 组; D. XAV-939 组; E. Treat + XAV-939 组

表 5 各组大鼠骨组织 p-GSK-3 $\beta$ 、Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Comparison of p-gsk-3 $\beta$ , Wnt3,  $\beta$ -Catenin and LEF1 protein expression in bone tissue of rats in each group

组别	n	p-GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -actin	Wnt3/ $\beta$ -actin	$\beta$ -Catenin/ $\beta$ -actin	LEF1/ $\beta$ -actin
Sham 组	10	0.72 ± 0.08	1.37 ± 0.13	0.91 ± 0.07	0.95 ± 0.08
Model 组	10	1.06 ± 0.09 <sup>①</sup>	0.26 ± 0.04 <sup>①</sup>	0.51 ± 0.06 <sup>①</sup>	0.42 ± 0.05 <sup>①</sup>
Treat 组	10	0.61 ± 0.07 <sup>②</sup>	0.78 ± 0.09 <sup>②</sup>	0.69 ± 0.08 <sup>②</sup>	0.65 ± 0.13 <sup>②</sup>
XAV-939 组	10	1.22 ± 0.13 <sup>②</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>②</sup>	0.38 ± 0.05 <sup>②</sup>	0.32 ± 0.06 <sup>②</sup>
Treat+XAV-939 组	10	1.03 ± 0.11 <sup>③</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>③</sup>	0.54 ± 0.05 <sup>③</sup>	0.45 ± 0.07 <sup>③</sup>

注: 与 Sham 组相比, ①  $P < 0.05$ ; 与 Model 组相比, ②  $P < 0.05$ ; 与 XAV-939 组, ③  $P < 0.05$

### 3 讨论

近年来骨折发生率逐渐升高,膝关节作为人体中结构最为复杂的关节之一,容易发生骨折,其中胫骨骨折较常见,胫骨平台连接胫骨上端与下端,在支撑运动及稳定性方面发挥重要作用,因此胫骨骨折发生后,严重影响患者日常生活。少部分骨折患者会出现骨折延迟愈合,因此如何改善骨折愈合环境是目前研究的重要内容。本研究通过建立胫骨骨折大鼠, X 射线检查显示 Model 组大鼠骨折部位清晰、骨折线清晰、骨密度值降低, HE 染色发现骨折处出现少量纤维组织、排列不整齐、小部分出现坏死区域。这说明大鼠胫骨骨折,且存在胫骨骨折延迟愈合,提示胫骨骨折模型大鼠建立成功。

盘龙七片主要由草乌、盘龙七、当归、单身、川乌等中药组成,现代药理学研究表明盘龙七片具有祛风除寒、消肿止痛、疗伤止痛的功效,在脊椎炎及外伤骨折等骨科疾病中应用较多<sup>[9-10]</sup>。本研究发现经盘龙七片治疗后, HE 染色发现骨折处出现大量骨痂,骨纤维组织增多,排列整齐,一部分已被正常组织替代,骨密度值及骨痂直径升高,表明盘龙七片组骨折愈合较好,提示盘龙七片对胫骨骨折大鼠的愈合具有促进作用。

炎症反应在骨折延迟愈合中发挥重要作用, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子高表达会破坏软骨细胞胞外基质完整性,进而影响软骨细胞分化,造成骨折愈合缓慢<sup>[11-12]</sup>。本研究发现,与 Sham 组相比, Model 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平明显升高,表明胫骨骨折大鼠机体中炎症反应水平较高,经盘龙七片治疗后血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平降低,提示盘龙七片可能通过减低胫骨骨折大鼠机体炎症反应,促进骨折愈合。ALP 是成骨细胞分化早期骨形成的标志性蛋白, ALP 可反应骨形成程度, ALP 活性越强,代表成骨细胞分化程度越高<sup>[13]</sup>。bFGF 属于软骨细胞的有丝分裂原及形态发生因子,可促进软骨细胞分裂、再生、修复<sup>[14]</sup>。本研究发现,与 Sham 组相比, Model 组 ALP、bFGF 水平明显降低,表明胫骨软骨活性较弱,骨愈合缓慢,经盘龙七片治疗后血清 ALP、bFGF 水平升高,提示盘龙七片可能通过减软骨活性,加速骨愈合。

Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路在器官发育、组织稳定、炎症反应中占据重要地位,该通路核心蛋白为  $\beta$ -catenin, 当通路激活后, Wnt 蛋白可与膜特异受体结合进而抑制 GSK-3 $\beta$  磷酸化,使降解复合体无法形成,进而导致细胞质中  $\beta$ -catenin 增多,逐渐移至细胞核,与转录因子 TCF/LEF 结合激活靶基因的转录<sup>[15-16]</sup>。近期有研究发现, Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路与骨分化及骨折愈

合相关<sup>[17]</sup>。Choi 等<sup>[18]</sup>研究发现,激活 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路后,可加速软骨细胞成熟和纵向骨生长。Snowball 等<sup>[19]</sup>研究显示,胚胎时期缺乏  $\beta$ -Catenin,可造成小鼠软骨发育不全及死亡。沈蓝等<sup>[20]</sup>研究发现,可通过激活 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路促进骨折愈合。本研究发现,与 Sham 组相比, Model 组大鼠骨组织中 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达升高, Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达降低,经盘龙七片治疗后 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达降低, Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达升高,推测盘龙七片对胫骨骨折大鼠的愈合作用可能与 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路激活有关。为进一步验证这一推测,本研究采用  $\beta$ -Catenin 抑制剂处理模型大鼠,结果发现与 Model 相比,骨组织愈合不佳,骨密度及骨痂直径明显降低,骨组织中 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达升高, Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达降低,表明抑制 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路后能够使胫骨骨折大鼠骨折愈合缓慢。在  $\beta$ -Catenin 抑制剂基础上联合盘龙七片治疗后,大鼠骨折处有所愈合,骨密度及骨痂直径升高,骨组织中 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达降低, Wnt3、 $\beta$ -Catenin、LEF1 蛋白表达升高,进一步提示盘龙七片可通过激活 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路,促进软骨细胞分化,促进骨折大鼠愈合。

### 4 结论

盘龙七片能缓解胫骨骨折大鼠炎症反应,促进骨折愈合,其机制可能与激活 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路、促进成骨细胞分化有关,然而盘龙七片药理机制较复杂。盘龙七片对胫骨骨折 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路的影响具体通过下游哪些蛋白发挥作用,还有待后续深入研究。

### 【参考文献】

- [1] 刘勃, 李佳, 李石伦, 等. 2010 年至 2011 年中国东部和西部地区 Colles 骨折的流行病学对比分析[J]. 中华创伤骨科杂志, 2017, 19(10):892-896.
- [2] HOUBEN A, KOSTANOVA-POLIAKOVA D, WEISSENBOCK M, *et al.*  $\beta$ -catenin activity in late hypertrophic chondrocytes locally orchestrates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis [J]. *Development*, 2016, 143(20):3826-3838.
- [3] WANG Y, NEWMAN MR, ACKUN-FARMMER M, *et al.* Fracture-Targeted Delivery of  $\beta$ -Catenin Agonists via Peptide-Functionalized Nanoparticles Augments Fracture Healing [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(9):9445-9458.
- [4] 王盛. 盘龙七片联合牵引治疗腰椎间盘突出症致腰痛的临床疗效[J]. 临床合理用药, 2017, 10(12):150-151.
- [5] LUGER E J, ROCHKIND S, WOLLMAN Y, *et al.* Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 1998, 22(2):97-102.

- [6] 张旭,李文雄,李小群,等. 盘龙七片配合中药外敷治疗腰椎间盘突出症的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(7): 54-57.
- [7] BAI J, LIU Z, XU Z, *et al.* Epigenetic downregulation of SFRP4 contributes to epidermal hyperplasia in psoriasis [J]. *J Immunol*, 2015, 194(9): 4185-4198.
- [8] GARRETT I R, GUTIERREZ G E, ROSSINI G, *et al.* Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats [J]. *J Orthop Res*, 2007, 25 (10): 1351-1357.
- [9] 李赞, 刘丹, 黄芸芸, 等. 盘龙七片配合火疗治疗强直性脊柱炎 60 例[J]. 陕西中医, 2016, 37(10): 1365-1366.
- [10] 王盛. 盘龙七片联合牵引治疗腰椎间盘突出症致腰痛的临床疗效[J]. 临床合理用药, 2017, 10(12): 150-151.
- [11] CHISARI E, YAGHMOUR KM, KHAN WS. The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of pre-clinical studies [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 1063 (19) 31229-31334.
- [12] MATSUMURA E, TSUJI K, KOMORI K, *et al.* Pretreatment with IL-1 $\beta$  enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells [J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(2): 181-193.
- [13] JO S, HAN J, LEE YL, *et al.* Regulation of osteoblasts by alkaline phosphatase in ankylosing spondylitis [J]. *Int J Rheum Dis*, 2018, 11(4): 534-538.
- [14] GALLEGO-MUÑOZ P, IBARES-FRÍAS L, VALSERO-BLANCO MC, *et al.* Effects of TGF $\beta$ 1, PDGF-BB, and bFGF, on human corneal fibroblasts proliferation and differentiation during stromal repair [J]. *Cytokine*, 2017, 96(8): 94-101.
- [15] MIYAMOTO K, OHKAWARA B, ITO M, *et al.* Fluoxetine ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (9): 184388-184395.
- [16] HUANG T, ZHOU Y, WANG J, *et al.* MiR-26b regulates cartilage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12): 5084-5092.
- [17] SUN Z, JIN H, ZHOU H, *et al.* Gubong Injection promotes fracture healing by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in vivo and in vitro [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120 (9): 109436-109440.
- [18] CHOI S, CHA PH, KIM HY, *et al.* Indirubin-3'-oxime stimulates chondrocyte maturation and longitudinal bone growth via activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(9): 104-110.
- [19] SNOWBALL J, AMBALAVANAN M, WHITSETT J, *et al.* Endodermal Wnt signaling is required for tracheal cartilage formation [J]. *Dev Biol*, 2015, 405(1): 56-70.
- [20] 沈蓝, 韩雨杉, 赵宏斌, 等. 中药治疗骨质疏松性骨折中 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(7): 192-194.

(收稿日期: 2019-11-25; 修回日期: 2020-03-31; 编辑: 郭翠)

#### (上接第 1103 页)

- [24] 郭强, 张宏其. 单纯经后路病灶清除椎体间植骨术治疗脊柱结核的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2018, 26(2): 150-155.
- [25] PU X, ZHOU Q, HE Q, *et al.* A posterior versus anterior surgical approach in combination with debridement, interbody autografting and instrumentation for thoracic and lumbar tuberculosis [J]. *Int Orthop*, 2012, 36(2): 307-313.
- [26] HE Q, XU J. Comparison between the antero-posterior and anterior approaches for treating L5-S1 vertebral tuberculosis [J]. *Int Orthop*, 2012, 36(2): 345-351.
- [27] 王颖博, 范伟力, 朱军, 等. 椎间孔入路穿刺引流联合椎旁肌间隙入路内固定治疗腰骶椎结核的临床研究[J]. 局解手术学杂志, 2017, 26(12): 868-872.
- [28] 石仕元, 赖震, 费骏, 等. 经皮椎弓根螺钉内固定联合腹部小切口病灶清除治疗老年腰椎结核的效果分析[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(6): 650-656.
- [29] 施建党, 何进文, 牛宁奎, 等. 小切口技术在胸腰椎结核前路手术中的应用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2019, 33(6): 698-706.
- [30] HU D, FEI J, CHEN G, *et al.* Mini-open anterior approach focal cleaning combined with posterior internal fixation for thoracolumbar tuberculosis: Follow-up of 149 cases [J]. *Asian J Surg*, 2020, 43(1): 78-86.
- [31] 彭兴剑, 柯珍勇, 汪洋, 等. 脊柱结核微创治疗进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2017, 25(5): 448-451.
- [32] 况尚如, 蒋电明. 脊柱结核的外科治疗进展[J]. 重庆医学, 2009, 38(18): 2367-2369.
- [33] 朱何涛, 朱博, 高天阳, 等. 经皮微创手术治疗腰椎结核的中远期疗效观察[J]. 天津医药, 2017, 45(06): 614-619.
- [34] 江晓航, 卢峰. 椎间孔镜技术在脊柱结核脓肿诊疗中的应用[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2017, 22(1): 14-17.
- [35] 张正平, 王凯军, 王小明, 等. 经皮椎间孔入路内镜下病灶清除、植骨联合后路经皮内固定治疗胸、腰椎结核[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(8): 468-476.
- [36] 张佳林, 乔永东, 袁海峰, 等. OLIF 技术联合后路 Wiltse 入路内固定治疗单节段腰椎结核[J]. 中国矫形外科杂志, 2019, 27 (21): 1954-1959.
- [37] DAVIS TT, HYNES RA, FUNG DA, *et al.* Retroperitoneal oblique corridor to the L2-S1 intervertebral discs in the lateral position: an anatomic study [J]. *J Neurosurg Spine*, 2014, 21 (5): 785-793.
- [38] LIU L, LIANG Y, ZHANG H, *et al.* Imaging anatomical research on the operative windows of oblique lumbar interbody fusion [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163452.
- [39] WANG QY, HUANG MG, OU DQ, *et al.* One-stage extreme lateral interbody fusion and percutaneous pedicle screw fixation in lumbar spine tuberculosis [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2017, 17(1): 450-455.
- [40] GAN F, JIANG J, XIE Z, *et al.* Minimally invasive direct lateral interbody fusion in the treatment of the thoracic and lumbar spinal tuberculosis Mini-DLIF for the thoracic and lumbar spinal tuberculosis [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2018, 19 (1): 283.
- [41] 许建中. 规范脊柱结核治疗, 为我国结核病防治做出更大贡献[J]. 中华骨科杂志, 2014, 34(2): 97-101.

(收稿日期: 2020-05-21; 修回日期: 2020-06-01; 编辑: 郭翠)