

中华跌打丸对斑马鱼骨折愈合作用研究

杜正彩^{1a}, 俞航萍², 陈章美^{1a}, 夏中尚³, 赵芳惠^{1a}, 梁云飞⁴, 徐懿乔², 郝二伟^{1b}, 侯小涛^{1b}, 邓家刚^{1b*}
[1.广西中医药大学, a.科学实验中心, b.广西中药药效研究重点实验室, 南宁 530200; 2.杭州环特生物科技股份有限公司, 杭州 310051; 3.成都中医药大学, 成都 611137; 4.广西梧州制药(集团)股份有限公司, 广西 梧州 543000]

摘要: 目的 应用斑马鱼研究中华跌打丸促骨折愈合、抗炎、促血管形成及软骨损伤修复作用。方法 采用钝性棱刀挤压斑马鱼尾鳍建立骨折模型, 评价其骨折愈合及抗炎作用; 用转基因血管荧光斑马鱼评价其促血管形成作用; 地塞米松建立斑马鱼软骨损伤模型, 评价其软骨损伤修复作用; 通过 Q-PCR 检测中华跌打丸对 TNF- α 、IL-1 β 、BMP-2 和 BMP-7 基因表达的影响。结果 与模型对照组比较, 中华跌打丸在浓度为每尾 2 mg 时, 骨折愈合促进作用为 20.8%($P<0.05$); 浓度在 15.6, 31.3 和 62.5 mg·mL⁻¹ 时炎症消退作用分别为 44.6%, 50.6% 和 52.6%($P<0.05$), 且伴随 TNF- α 和 IL-1 β 基因的表达有不同程度下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 浓度为 1 000, 2 000 mg·L⁻¹ 时, 促血管形成作用分别为 19.7% 和 49.9%($P<0.01$ 或 $P<0.001$); 中华跌打丸通过上调 BMP-2 和 BMP-7 基因的表达起到软骨修复作用($P<0.01$ 或 $P<0.001$), 浓度为 500 mg·L⁻¹ 时, 软骨损伤修复作用为 42.0%($P<0.05$)。结论 中华跌打丸对斑马鱼有促进骨折愈合、抗炎、促血管及软骨损伤修复作用, 且通过下调 TNF- α 和 IL-1 β 的表达起到消炎作用, 上调 BMP-2 和 BMP-7 基因的表达起到软骨修复作用。

关键词: 中华跌打丸; 斑马鱼; 骨折愈合; 抗炎; 促血管形成; 软骨损伤修复

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)12-1454-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.12.008

引用本文: 杜正彩, 俞航萍, 陈章美, 等. 中华跌打丸对斑马鱼骨折愈合作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(12): 1454-1460.

Study on Effect of Zhonghua Deda Pill on Fracture Healing of Zebrafish

DU Zhengcai^{1a}, YU Hangping², CHEN Zhangmei^{1a}, XIA Zhongshang³, ZHAO Fanghui^{1a}, LIANG Yunfei⁴,
XU Yiqiao², HAO Erwei^{1b}, HOU Xiaotao^{1b}, DENG Jiagang^{1b*}[1.Guangxi University of Traditional Chinese Medicine,
a.Guangxi Scientific Experimental Center of Traditional Chinese Medicine, b.Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on
Chinese Materia Medica, Nanning, 530200, China; 2.Hunter Biotechnology, Co., Ltd, Hangzhou 310051, China; 3.Chengdu
University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 4.Guangxi Wuzhou Pharmaceutical (Group) Co., Ltd,
Wuzhou, 543000, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the antifracture healing, anti-inflammatory, angiogenesis and repair of cartilage damage effects of Zhonghua Deda pill by using zebrafish. **METHODS** The fracture model was established by squeezing the tail fin of zebrafish by a blunt edge knife, and the effect of Zhonghua Deda pill on fracture healing and anti-inflammatory was then evaluated; transgenic vascular fluorescence zebrafish was used to evaluate the angiogenic effect; cartilage damage model was established by treating zebrafish with dexamethasone, and then the effect of cartilage damage repairing was evaluated; the effects of Zhonghua Deda pill on the gene expressions of TNF- α , IL-1 β , BMP-2 and BMP-7 were measured by Q-PCR. **RESULTS** Compared with the model control group, the fracture healing effect of the Zhonghua Deda pill was 20.8%($P<0.05$) when concentration was 2 mg per tail. With down-regulating the expression of TNF- α and IL-1 β genes($P<0.05$ or $P<0.01$), the anti-inflammatory effect of Zhonghua Deda pill was 44.6%, 50.6% and 52.6% at the 15.6, 31.3 and 62.5 mg·mL⁻¹ concentration($P<0.05$); the angiogenesis effect of Zhonghua Deda pill was 19.7% and 49.9% at the 1 000, 2 000 mg·L⁻¹ concentration groups($P<0.01$ or $P<0.001$); Zhonghua Deda pill showed cartilage damage repairing effect by up-regulating the expression of BMP-2 and BMP-7 genes and result in 42.0% effect of cartilage damage repairing on zebrafish model at 500 mg·mL⁻¹ concentration($P<0.05$). **CONCLUSION** Zhonghua Deda pill can promote fracture healing, anti-inflammatory, angiogenesis and cartilage damage repairing in zebrafish, and play an anti-inflammatory role by down-regulating the expression of TNF- α and IL-1 β and play a cartilage repairing by up-regulating the expression of BMP-2 and BMP-7 genes.

KEYWORDS: Zhonghua Deda pill; zebrafish; fracture healing; anti-inflammatory; angiogenesis

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA17202040-2); 广西中医药大学校级重点硕士研究生科研创新项目(YCSZ20190022); 广西中药药效研究重点实验室项目(19-050-39); 广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心建设项目

作者简介: 杜正彩, 男, 硕士, 研究员 Tel: 15907719818 E-mail: duzhengcai8@163.com *通信作者: 邓家刚, 男, 教授 Tel: 13877158896 E-mail: dengjg53@126.com

中华跌打丸于1961年由梧州市中药厂开始生产，至今近60年历史，连续收入中国药典2005、2010、2015及2020年版。据梧州市文史资料记载，其药方源于“急性子散”^[1]，具有清肿止痛、舒筋活络、止血生肌、活血祛瘀之作用，用于挫伤筋骨、新旧瘀患、创伤出血、风湿瘀痛等病症^[2]。已有文献报道中华跌打丸具有促进骨折愈合、抗炎、镇痛、抗疲劳、抗氧化、增强免疫力、活血祛瘀、软组织损伤后的修复等方面的药理作用^[3]。中华跌打丸虽有广泛的临床使用基础，药效显著，但其基础研究薄弱。

近年来随着研究的不断深入，斑马鱼在各种疾病模型中已有广泛的应用，如骨骼疾病、代谢类疾病、心血管系统疾病、神经系统疾病等^[4-8]。斑马鱼骨骼的微观结构与人类相似，其尾鳍挤压造成的骨折模型广泛用于骨折修复主要因其再生能力，能更好地模拟哺乳动物因外伤引起的骨折^[9-10]，斑马鱼骨折模型为哺乳动物骨折模型提供了强有力的辅助，并为研究成骨细胞活性及其机制提供了便利。

斑马鱼现已普遍应用于药效、毒理等方面的研究^[11-17]。本研究选用斑马鱼作为模式动物建立斑马鱼骨折模型^[18]及软骨损伤模型^[19]，可直接活体观察骨折部位骨密度水平、中性粒细胞的迁移、促血管形成及软骨损伤修复情况。

1 材料

1.1 动物

成年斑马鱼体质量为300~400 g，包括48尾受精后4月龄(4 month post-fertilization, 4 mpf)野生型AB系斑马鱼和10 mpf转基因中性粒细胞荧光斑马鱼，幼鱼包括300尾受精后2 d(2 day post-fertilization, 2 dpf)转基因血管荧光斑马鱼和390尾2 dpf转基因软骨荧光斑马鱼，均来源于杭州环特生物科技股份有限公司。

以上斑马鱼养殖水质：pH为6.5~8.5；硬度为50~100 mg·L⁻¹ CaCO₃；电导率为480~510 μS·cm⁻¹。实验动物使用许可证号：SYXK(浙)2012-0171。饲养管理符合国际AAALAC认证的要求。

1.2 仪器

SZX7体视显微镜(日本OLYMPUS)；CP214精密电子天平(美国OHAUS)；AZ100电动聚焦连续变倍荧光显微镜、与显微镜相连的K11543相机均购自日本Nikon；NanoDrop 2000超微量分光光

度计(美国Thermo)；T100普通PCR扩增仪、CFX Connect荧光定量PCR仪、HSP9665/HSP9601低位裙边96孔板、MSB1001光学黏性封膜B均购自美国Bio-rad；T10BS025均质仪(德国IKA)。

1.3 药品与试剂

根据中国药典2020年版标准，中华跌打丸[广西梧州制药(集团)股份有限公司，批号：180213]由32味中草药组成，分别为牛白藤、假蒟、地耳草、牛尾菜、鹅不食草、牛膝、乌药、红杜仲、鬼画符、山桔叶、羊耳菊、刘寄奴、过岗龙、山香、穿破石、毛两面针、鸡血藤、丢了棒、岗梅、木鳖子、丁茄根、大半边莲、独活、苍术、急性子、建桅、川乌(制)、丁香、香附、黑老虎根、桂枝和樟脑，以上除樟脑研成细粉外，其余牛白藤等31味粉碎成细粉，过筛，混匀，包衣，干燥，即得。临用时用超纯水(灌胃)/养鱼用水(水溶)配制成200 mg·mL⁻¹母液，均质后按需稀释；接骨七厘片(湖南金沙药业有限责任公司，批号：180405)；吲哚美辛(上海晶纯实业有限公司，批号：1108939)；iTaq Universal SYBR Green Supermix(美国Bio-rad，批号：1725121)；2×Taq Master Mix(北京百泰克生物技术有限公司，货号：pr1701)；FastQuant RT Kit(With gDNase)试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司，货号：KR106]；TRI reagent(美国Invitrogen，货号：1382739)；氯仿(货号：T130144)、无水乙醇(货号：E111963)、硫酸软骨素(批号：6815)、地塞米松(批号：J1231035)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；异丙醇[生工生物工程(上海)股份有限公司，货号：A507048]。

2 方法

2.1 中华跌打丸对骨折斑马鱼骨折愈合促进作用评价

随机选取野生型AB系斑马鱼于烧杯中，每组8尾。用刀片挤压斑马鱼尾鳍下方的3根鳍条，建立斑马鱼骨折模型。给药方式采用灌胃给药，先用灌胃针吸取设定剂量的药液备用，再将斑马鱼麻醉。将灌胃针缓慢置于斑马鱼口腔内，推进灌胃针直至药液全部注入斑马鱼口腔，从斑马鱼口腔内退出灌胃针。用养鱼用水清洗斑马鱼至恢复自由游动。中华跌打丸在每尾3 mg剂量出现堵针无法灌胃，每尾2 mg剂量未出现呕吐现象，并未出现死亡和明显毒性反应，确定中华跌打丸灌胃最大剂量为每尾2 mg。分别灌胃给予中华跌打丸

每尾 0.22, 0.67 和 2 mg, 阳性对照药接骨七厘片每尾 2 mg, 同时设置正常对照组和模型对照组。给药 7 d 后, 将斑马鱼在 4% 多聚甲醛中常温固定 1 d, 换入 70% 乙醇中常温脱水 1 d, 用 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 茜素红溶液常温染色 1 d, 用 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH 洗去过染的部分, 每天换液, 连续 3 d。茜素红与骨钙离子形成螯合物, 用于矿化的骨基质的染色, 使钙化的骨骼染成红色^[20-21], 因此, 用显微镜采集骨折部位骨密度(不透明度平均值)来评价骨折部位愈合情况。

2.2 中华跌打丸对骨折斑马鱼抗炎作用评价

2.2.1 最大耐受浓度(maximum tolerated concentration, MTC)的确定 随机选取转基因中性粒细胞荧光斑马鱼于烧杯中, 每组 10 尾。用刀片挤压斑马鱼尾鳍下方的 3 根鳍条, 建立斑马鱼骨折模型。分别水溶给予中华跌打丸 31.3, 62.5, 125, 250 和 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度, 同时设置正常对照组和模型对照组。给药 24 h 后, 观察斑马鱼毒性及死亡情况。

2.2.2 抗炎作用评价 随机选取转基因中性粒细胞荧光斑马鱼于烧杯中, 每组 8 尾。用刀片挤压斑马鱼尾鳍下方的 3 根鳍条, 建立斑马鱼骨折模型。分别水溶给予中华跌打丸 15.6, 31.3 和 $62.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 阳性对照药吲哚美辛 $5\text{ }\mu\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时设置正常对照组和模型对照组。给药 24 h 后, 在荧光显微镜下观察、拍照并采集斑马鱼局部中性粒细胞荧光强度。

2.3 中华跌打丸对斑马鱼促血管作用评价

2.3.1 MTC 的确定 随机选取转基因血管荧光斑马鱼, 每组 30 尾。分别水溶给予中华跌打丸 125, 250, 500, 1 000 和 $2 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度, 同时设置正常对照组。给药 24 h 后, 观察斑马鱼毒性及死亡情况。

2.3.2 促血管作用评价 随机选取转基因血管荧光斑马鱼, 每组 30 尾。分别水溶给予中华跌打丸 500, 1 000 和 $2 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度, 同时设置正常对照组。给药 24 h 后, 在荧光显微镜下观察、拍照并采集斑马鱼血管面积。

2.4 中华跌打丸对斑马鱼软骨损伤修复作用评价

2.4.1 MTC 的确定 随机选取转基因软骨荧光斑马鱼, 每组 30 尾。水溶给予 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松建立斑马鱼软骨损伤模型。分别水溶给予中华跌

打丸 125, 250, 500, 1 000 和 $2 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时设置正常对照组和模型对照组。给药 72 h 后, 观察斑马鱼毒性及死亡情况。

2.4.2 软骨损伤修复作用评价 随机选取转基因软骨荧光斑马鱼, 每组 30 尾。水溶给予 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松建立斑马鱼软骨损伤模型。分别水溶给予中华跌打丸 125, 250 和 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 阳性对照药硫酸软骨素 $1 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时设置正常对照组和模型对照组。给药 72 h 后, 在荧光显微镜下观察、拍照并采集斑马鱼颅面软骨荧光强度。

2.5 中华跌打丸对斑马鱼骨折愈合机制评价

收集斑马鱼样本, 采用 Triol 法提取 RNA, 使用紫外分光光度测定总 RNA 的纯度, 用超微量分光光度计测定 RNA 的浓度, A_{260}/A_{280} 比值均在 1.81~1.99, 逆转录合成 cDNA, 以 β -action 作为内参, 通过 Q-PCR 检测 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $BMP-2$ 和 $BMP-7$ 基因表达, 并用 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量。

2.6 统计学方法

用 GraphPad5.0 软件分析数据, 方差分析和 Dunnett's T-检验进行统计学分析, 统计结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 中华跌打丸对斑马鱼骨折愈合促进作用

与模型对照组比较, 阳性对照组每尾 2 mg 接骨七厘片对斑马鱼有骨折愈合作用($P<0.01$), 其骨折愈合促进作用为 20.8%。中华跌打丸在剂量分别为每尾 0.22, 0.67 和 2 mg 时, 对斑马鱼骨折有明显愈合作用, 其骨折愈合作用分别为 3.9%, 16.9% 和 20.8%, 表明中华跌打丸对斑马鱼骨折愈合有促进作用。结果见表 1, 图 1。

3.2 中华跌打丸对骨折斑马鱼抗炎作用评价

中华跌打丸在 $31.3, 62.5, 125, 250$ 和 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时, 死亡率分别为 0%, 0%, 20%, 60% 和 90%, 并在 $62.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 未发现明显毒性, 确定 MTC 为 $62.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

与模型对照组比较, 阳性对照组 $5\text{ }\mu\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吲哚美辛炎症消退作用为 63.7%($P<0.05$)。中华跌打丸在浓度分别为 $15.6, 31.3$ 和 $62.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 炎症消退作用分别为 44.6%, 50.6% 和 52.6% ($P<0.05$), 表明中华跌打丸对斑马鱼骨折后炎症有明显抗炎作用。结果见表 2, 图 2。

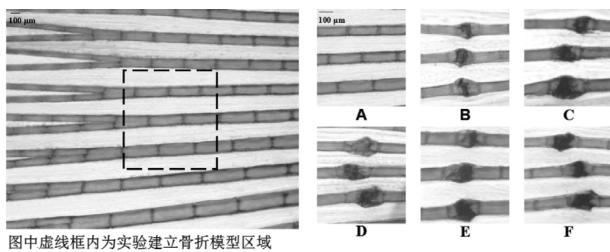


图 1 中华跌打丸对斑马鱼骨折愈合促进作用表型图
A—正常对照组; B—模型对照组; C—阳性对照组(每尾 2 mg 接骨七厘片); D—每尾 0.22 mg 中华跌打丸; E—每尾 0.67 mg 中华跌打丸; F—每尾 2 mg 中华跌打丸, 图中深色部分为骨折部位, 其颜色越深, 表明骨密度越高, 骨折愈合促进作用越强。

Fig. 1 Phenotypic diagram of promoting effect of Zhonghua Dieda pill on fracture healing of zebrafish
A—normal control group; B—model control group; C—positive control group(2 mg per tail Jiegu Qili pill); D—0.22 mg per tail Zhonghua Dieda pill; E—0.67 mg per tail Zhonghua Dieda pill; F—2 mg per tail Zhonghua Dieda pill. The dark part in the figure was the fracture site, the darker the color was, the higher the bone density was and the stronger the promoting effect of fracture healing was.

表 1 中华跌打丸对骨折斑马鱼愈合促进作用($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 1 Promoting effect of Zhonghua Dieda pill on fracture healing of zebrafish($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	浓度/ 每尾 mg	骨折处不透明度	骨折愈合促 进作用/%
正常对照组	—	0.62±0.025	—
模型对照组	—	0.77±0.042 ¹⁾	—
阳性对照组 (接骨七厘片)	2	0.93±0.025 ³⁾	20.8
中华跌打丸	0.22	0.80±0.038	3.9
	0.67	0.90±0.027	16.9
	2	0.93±0.039 ²⁾	20.8

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型对照组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model control group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表 2 中华跌打丸对骨折斑马鱼中性粒细胞的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 2 Effect of Zhonghua Dieda pill on neutrophils of fractured zebrafish($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	浓度	中性粒细胞荧光强度/像素	炎症消退 作用/%
正常对照组	—	287 341±22 170	—
模型对照组	—	1 017 123±228 328 ¹⁾	—
阳性对照组 (吲哚美辛)	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	368 757±41 904 ²⁾	63.7
中华跌打丸	15.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	563 946±52 420 ²⁾	44.6
	31.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	502 842±96 998 ²⁾	50.6
	62.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	482 251±34 896 ²⁾	52.6

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型对照组比较,²⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model control group, ²⁾ $P<0.05$.

3.3 中华跌打丸对斑马鱼促血管作用评价

中华跌打丸在 500, 1 000 和 2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度

时, 死亡率均为 0%, 且均无明显毒性反应, 确定 MTC 为 2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

与正常对照组比较, 中华跌打丸在 500, 1 000 和 2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 促血管作用分别为 5.1%, 19.7% 和 49.9%, 说明中华跌打丸对斑马鱼血管有促进作用。结果见表 3。

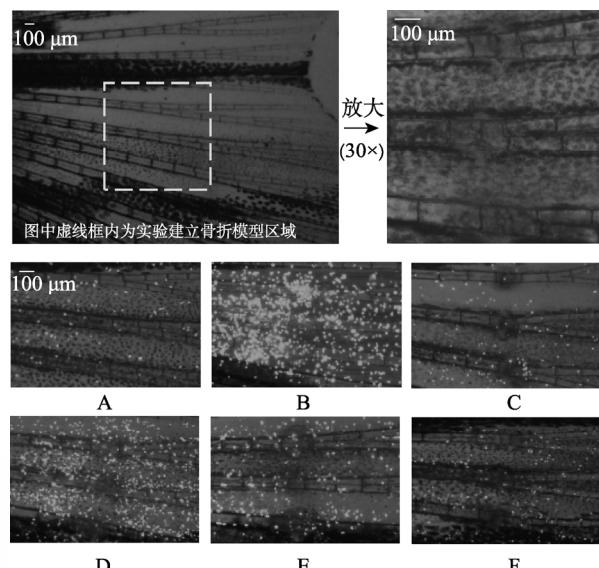


图 2 各实验组斑马鱼中性粒细胞聚集表型图

A—正常对照组; B—模型对照组; C—阳性对照组($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 呋噪美辛); D— $15.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 中华跌打丸; E— $31.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 中华跌打丸; F— $62.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 中华跌打丸; 图中浅色点为中性粒细胞, 其聚集越密集, 表明炎症反应越严重。

Fig. 2 Neutrophilic granulocyte aggregation phenotype of zebrafish in each experimental group
A—normal control group; B—model control group; C—positive control group($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ indomethacin); D— $15.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zhonghua Dieda pill; E— $31.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zhonghua Dieda pill; F— $62.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zhonghua Dieda pill. The green dots in the figure were neutrophils, and the denser their aggregation was, the more serious the inflammatory response was.

表 3 中华跌打丸对斑马鱼促血管作用评价($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 3 Evaluation of Zhonghua Dieda pill on angiogenesis of zebrafish($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	血管面积/像素	促血管作用/%
正常对照组	—	31 070±1 326	—
中华跌打丸	500	32 641±1 385	5.1
	1 000	37 185±1 606 ¹⁾	19.7
	2 000	46 569±1 147 ²⁾	49.9

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$.

3.4 中华跌打丸对斑马鱼软骨损伤修复作用评价

中华跌打丸在 125, 250, 500, 1 000 和 2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时, 死亡率分别为 0%, 0%, 0%, 96.7% 和 100%, 并在 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 未发现明显毒性, 确定 MTC 为 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

与模型对照组比较, $1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸软骨素促软骨再生作用为 39.5% ($P<0.05$)。中华跌打丸在浓度为 125, 250, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 促软骨再生作用分别为 23.6%, 24.1% 和 42.0%, 说明中华跌打丸对斑马鱼有促进软骨损伤修复作用。结果见表 4。

表 4 中华跌打丸对斑马鱼软骨损伤修复作用评价 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab. 4 Evaluation of Zhonghua Deda pill on zebrafish cartilage damage repairing ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	荧光强度/像素	软骨再生促进作用/%
正常对照组	-	411 238±22 045	-
模型对照组	-	302 784±34 023 ¹⁾	-
阳性对照组 (硫酸软骨素)	1 000	422 505±37 287 ²⁾	39.5
中华跌打丸	125	374 362±37 563	23.6
	250	375 698±33 557	24.1
	500	429 855±28 243 ²⁾	42.0

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型对照组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model control group, ²⁾ $P<0.05$.

3.5 中华跌打丸对斑马鱼骨折愈合机制评价

与模型对照组比较, 中华跌打丸处理后 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 相对表达量均有降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 说明中华跌打丸能通过下调 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 表达而发挥抗炎作用。

与模型对照组比较, 中华跌打丸在浓度为 125, 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时组 $BMP-2$ 和 $BMP-7$ 相对表达量均有显著升高 ($P<0.01$ 或 $P<0.001$), 表明中华跌打丸能明显上调 $BMP-2$ 和 $BMP-7$ 表达促进斑马鱼软骨损伤修复。结果见表 5~7。

表 5 引物序列信息

Tab. 5 Primer sequence information

基因			引物序列(5'→3')
β -actin	Forward	TCGAGCAGGAGATGGGAAC	
	Reverse	CTCGTGGATACCGCAAGATT	
$TNF-\alpha$	Forward	ATCTTCAAAGTCGGGTATG	
	Reverse	TGTGCCAGTCTGTCTCC	
$IL-1\beta$	Forward	GTCACACTGAGAGCCGGAAG	
	Reverse	GCAGGCCAGGTACAGGTTAC	
$BMP-2$	Forward	CAGGTTAGCAGACCCAGAGC	
	Reverse	AACTCCTCGTCTGGATGGA	
$BMP-7$	Forward	CCGTTTCAACCCTCAGGGA	
	Reverse	GCTTCGCCCTCTGGAATCTT	

表 6 中华跌打丸对 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 6 Effect of Zhonghua Deda pill on $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ expression ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	浓度	$TNF-\alpha$	$IL-1\beta$
正常对照组	-	0.69±0.14	0.08±0.017
模型对照组	-	1.21±0.26	1.12±0.19 ¹⁾
阳性对照组 (吲哚美辛)	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.81±0.25	0.61±0.098 ²⁾
中华跌打丸	15.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.09±0.23	0.64±0.11 ²⁾
	31.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.54±0.11 ²⁾	0.62±0.11 ²⁾
	62.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.51±0.10 ²⁾	0.54±0.076 ³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与模型对照组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with the model control group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表 7 中华跌打丸对 $BMP-2$ 和 $BMP-7$ 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$BMP-2$	$BMP-7$
正常对照组	-	0.82±0.012	0.63±0.027
模型对照组	-	1.00±0.047 ¹⁾	1.00±0.059 ¹⁾
阳性对照组 (硫酸软骨素)	1 000	1.04±0.077	1.20±0.072
中华跌打丸	125	1.39±0.049 ³⁾	1.59±0.047 ³⁾
	250	1.35±0.031 ²⁾	1.39±0.022 ²⁾
	500	0.88±0.054	0.88±0.060

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型对照组比较, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model control group, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

4 讨论

骨折是人类最常见的大器官创伤性损伤, 哺乳动物的骨折修复不是简单地纯再生过程, 骨折愈合过程漫长, 服用促进骨折愈合的药物对患者恢复至关重要。

中华跌打丸从研发至今将近 60 年历史, 对骨折愈合的药理作用贯穿了整个过程包括活血化瘀、促血管形成以及骨再生, 在治疗骨折愈合、抗炎、增强骨密度方面有显著临床疗效^[3]。高华等^[22]发现了中华跌打丸对小鼠具有一定的缓解疲劳、抗氧化及增强免疫功能的作用。李茂等^[23]评价了中华跌打丸对大鼠骨折愈合、软骨损伤修复及祛瘀作用, 结果表明中华跌打丸能增加大鼠骨痂面积、密度, 减少急性软组织损伤的水肿, 促进软骨修复。李茂等^[24]通过小鼠骨关节炎模型发现了

中华跌打丸能增加小鼠血清中 SOD 的含量，并降低 MDA 含量，并能减轻肿胀度，对小鼠骨关节炎具有抗炎镇痛作用。

斑马鱼与人类存在相似基因调控路径，在骨骼疾病研究方面可以获得新的研究思路和方法^[25-29]。斑马鱼的鳍被广泛地用作骨骼研究主要由于其超强再生能力，尾鳍鳍条与骨分化有关的信号在再生过程中重新激活。斑马鱼尾鳍鳍条骨折处理后，可导致了一系列的反应包括伤口愈合，芽基形成、血管微循环形成、再生生长等^[30]。

中华跌打丸骨折愈合中的抗炎作用可通过下调 *TNF-α* 和 *IL-1β* 的表达，*TNF-α* 主要源自巨噬细胞和单核细胞，*IL-1β* 能与 *TNF-α* 产生协同作用，可引起中性粒细胞脱颗粒、黏附分子的表达从而诱发炎症反应。

BMPs 是诱发干细胞分化成成骨细胞最有效的因子^[31]，除了成骨细胞，*BMPs* 也参与骨折愈合中的软骨生长及软骨成骨^[32]。*Hankenson* 等^[33]报道了骨折愈合过程中 *BMP-2* 和 *BMP-7* 高表达。2017 年 *Wang* 等^[34]发现软骨细胞中的 BMP 信号通路可以增强骨形成和改善骨折愈合。*Zhang* 等^[35]研究了 *BMP-3* 通过诱导细胞外基质降解、干扰兔关节软骨部分厚度缺损的修复作用。*顾羊林*^[36]在 2009 年发现在软骨损伤初期 *BMP-7* 出现高表达，随着时间推移其表达变弱，这一结果与本研究结果一致，中华跌打丸在低、中浓度对软骨损伤修复的作用表现在上调 *BMP-7*，而高浓度加速了成骨细胞分化，*BMP-7* 表达下降。*陈冠儒*等^[37]发现骨折愈合治疗中，*BMP-2* 在初期达到高峰，后期含量下降，本研究中 *BMP-2* 含量变化与 *BMP-7* 相似，低、中浓度含量上调，高浓度含量下降，缩短了骨折斑马鱼骨重建的时间。

本实验采用斑马鱼模式生物研究发现中华跌打丸可通过增强骨密度，促血管形成抗炎及促软骨修复，并影响相关基因的表达，从而达到骨折愈合形成的效果，进而缩短骨折恢复时间，为临床用药提供参考。

REFERENCES

- [1] 梧州市政协学习文史委员会. 梧州名产溯源[Z]. 梧州市文史资料选辑, 2007(22): 14-16.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2015.
- [3] 钟海森, 陈章美, 赵芳惠, 等. 中华跌打丸研究概况[J]. 广西中医药大学学报, 2018(21): 68-71.
- [4] SUN Z H, JIA S J, MENG A M. Zebrafish: Swimming in life sciences[J]. Chin Bull Life Sci(生命科学), 2006, 18(5): 431-436.
- [5] CAPIOTTI K M, ANTONIOLI R, KIST L W et al. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model[J]. Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol, 2014(171): 58-65.
- [6] TANG C, XIE D, FENG B. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of positive inotropic agents[J]. Chem Biol Drug Des, 2015, 85(3): 253-258.
- [7] BARABAN S C, TAYLOR M R, CASTRO P A, et al. Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression[J]. Neuroscience, 2005, 131(3): 759-768.
- [8] FLEMING A, SATO M, GOLDSMITH P. High-throughput *in vivo* screening for bone anabolic compounds with zebrafish[J]. J Biomol Screen, 2005, 10(8): 823-831.
- [9] SOUSA S, VALERIO F, JACINTO A. A new zebrafish bone crush injury model[J]. Biol Open, 2012, 1(9): 915-921.
- [10] SICCARDI A J, PADGETT-VASQUEZ S, GARRIS H W, et al. Dietary strontium increases bone mineral density in intact zebrafish(*Danio rerio*): A potential model system for bone research[J]. Zebrafish, 2010, 7(3): 267-273.
- [11] CHEN J, ZHAO L, WANG Y, et al. Application of zebrafish model in multimodal identification of active constituents of traditional Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(14): 3387-3394.
- [12] XIA Q, HAN L W, ZHANG Y, et al. Study on liver protection and hepatotoxicity of saikogenin a based on zebrafish model[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(13): 2662-2666.
- [13] WANG C Q, XIA T, CHEN H, et al. Metabolism of militarine component of the effective fractions of *Bletilla striata* in zebrafish[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(4): 467-472.
- [14] GRAWITZ P B. Inflammation and Cancer[J]. Nature, 2015, 420(6917): 860-867.
- [15] LI S, LOU S, LEI B U, et al. Transcriptional profiling of angiogenesis activities of calycoxin in zebrafish[J]. Mol Biosyst, 2011, 7(11): 3112-3121.
- [16] TANG J Y, LI S, LI Z H, et al. Calycoxin promotes angiogenesis involving estrogen receptor and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in zebrafish and HUVEC[J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11822. Doi: 10.1371/journal.pone.0011822
- [17] MUKHI S, PATIÑO R. Effects of prolonged exposure to perchlorate on thyroid and reproductive function in zebrafish [J]. Toxicol Sci, 2007, 96(2): 246-254.
- [18] KNOPF F, HAMMOND C, CHEKURU A, et al. Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin[J]. Dev Cell, 2011, 20(5): 713-724.
- [19] LI M. Craniofacial dysplasia in zebrafish induced by dexamethasone sodium phosphate[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2009.
- [20] WANG J, XU Y, CHEN W, et al. Tissue structure and ultramicro structure characters of zebrafish tooth[J]. J Oral Sci Res(口腔医学研究), 2009, 25(6): 703-705.
- [21] XU R C, DUAN X H, ZHANG Y L. Characteristics of bone

- development of zebrafish and its applications in the studies of bone diseases[J]. Chin J Conserv Dent(牙体牙髓牙周病学杂志), 2017, 27(4): 235-238.
- [22] GAO H, YU T, CAI T, et al. Study on part pharmacological effect of Chinese Didea pills[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2008, 28(6): 428-431.
- [23] LI M, WEI B W, QIN L, et al. Experimental study on accelerating fracture healing and soft tissue injury renovation effects of Chinese Didea pill[J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技), 2008, 15(4): 257-258, 240.
- [24] LI M, WEI B W, QIN L, et al. Studies on the anti-osteoarthritis and analgesia of Zhonghua Diedawan in rats and rabbits[J]. China Trop Med(中国热带医学), 2007, 7(12): 2316-2318.
- [25] HUITEMA L F, APSCHNER A, LOGISTER I, et al. Entpd5 is essential for skeletal mineralization and regulates phosphate homeostasis in zebrafish[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(52): 21372-21377.
- [26] FISHER S, JAGADEESWARAN P, HALPERN M E. Radiographic analysis of zebrafish skeletal defects[J]. Dev Biol, 2003, 264(1): 64-76.
- [27] ASHARANI P V, KEUPP K, SEMLER O, et al. Attenuated BMP1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish[J]. Am J Hum Genet, 2012, 90(4): 661-674.
- [28] SUN C, ZHANG S, GAO L S, et al. Brief introduction of zebrafish disease model research[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2016, 25(20): 2340-2343.
- [29] AKIMENKO M A, MARÍ-BECCA M, BECERRA J, et al. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration[J]. Dev Dyn, 2003, 226(2): 190-201.
- [30] EINHORN T A, GERSTENFELD L C. Fracture healing: Mechanisms and interventions[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(1): 45-54.
- [31] CHENG H W, JIANG W, PHILLIPS F M, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins(BMPs)[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85(8): 1544-1552.
- [32] KAYGUSUZ M A, TURAN C C, AYDIN N E, et al. The effects of G-CSF and naproxen sodium on the serum TGF-beta1 level and fracture healing in rat tibias[J]. Life Sci, 2006, 80(1): 67-73.
- [33] HANKENSON K D, GAGNE K, SHAUGHNESSY M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015(94): 3-12.
- [34] WANG P E, YING J, LUO C, et al. Osthole promotes bone fracture healing through activation of BMP signaling in chondrocytes[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(8): 996-1007.
- [35] ZHANG Z, YANG W, CAO Y, et al. The functions of BMP3 in rabbit articular cartilage repair[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 25934-25946.
- [36] 顾羊林. 兔髌白软骨损伤后髌臼发育及软骨中 BMP-7 的变化[D]. 大理: 大理学院, 2009
- [37] CHEN G R, ZHANG X, XU B. Effect of bushen Huoxue decoction on healing function of rat fracture model and its influence on expression of BMP-2, VEGF and TGF- β 1[J]. J Emerg Tradit Chin Med(中国中医急症), 2019, 28(12): 2111-2114, 2129.

收稿日期: 2020-08-20
(本文责编: 陈怡心)