

· 药物研究 ·

麝香对颅骨骨缺损模型大鼠基质细胞衍生因子 1 和肝细胞生长因子的相关性研究

李应福¹ 李宁^{1*} 谢兴文² 宋敏¹ 徐世红² 李鼎鹏²

1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000

2. 甘肃省中医院, 兰州 730050

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 11-1477-04

摘要: 目的 探讨麝香对颅骨骨缺损模型大鼠基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) 和肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 水平变化的影响及其作用机制。方法 SD 大鼠雌、雄各 150 只, 利用牙科钻建立颅骨骨缺损模型, 模型动物完全随机分为给药组和模型组, 又将这两组分别分为 3 小组, 每组 50 只。给药组灌服麝香, 模型组灌服生理盐水, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 分别测定各组 7d、14d、28d 血清中 SDF-1、HGF 的变化, 将所得 OD 值处理计算后应用 SPSS17.0 统计分析。结果 与模型组比较, 给药组第 7 天 SDF-1 含量增加, 差异有统计学意义 ($P=0.0008$), 第 7 天和第 14 天 HGF 含量均增加 ($P=0.0158$, $P=0.0234$), 但第 7 天表达增加更加显著。结论 麝香可促进大鼠颅骨骨缺损区的愈合速度, 而这种愈合机制可能与增加血清中 SDF-1、HGF 水平有关。

关键词: 麝香; 骨髓间充质干细胞; 骨缺损; 基质细胞衍生因子 1; 肝细胞生长因子; 大鼠; 研究

Study of the effect of musk on the relationship between stromal cell-derived factor 1 and hepatocyte growth factor in the rat model of skull bone defect

LI Yingfu¹, LI Ning^{1*}, XIE Xingwen², SONG Min¹, XU Shihong², LI Dingpeng²

1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000

2. Gansu Provincial Hospital of TCM, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: LI Ning, Email: 535682960@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of musk on the levels of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and hepatocyte growth factor (HGF) in the rat calvarial bone defect model. **Methods** 150 male and female SD rats were used to establish the model of skull bone defect with dental drill. Model animals were randomly divided into the medicine group and model group. The two groups were further divided into 3 groups, with 50 rats in each group. Rats in the treatment group received musk, and rats in the model group were gavaged with normal saline. Serum SDF-1 and HGF were determined in each group at 7 d, 14 d, and 28 d with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The resulting OD value was analyzed using a SPSS 17.0 software. **Results** Comparing to the model group, SDF-1 in the treatment group increased on 7 d, and the difference was statistically significant ($P=0.0008$). HGF increased on 7 d and 14 d ($P=0.0234$, $P=0.0158$), and the increase was the highest on 7 d. **Conclusion** Musk promotes the healing of rat cranial bone defect area, and this healing mechanism may be associated with the increase of serum SDF-1 and HGF expression.

Key words: Musk; Bone marrow mesenchymal stem cells; Bone defect; Stromal cell-derived factor 1; Hepatocyte growth factor; Rat; Research

骨折后骨缺损是临床常见病与多发病, 因自身条件、缺损部位与大小、多种生长因子的调控及移植

材料的选择等因素的影响, 使加速缺损区修复及缩短愈合时间等问题一直成为骨科领域探索难点和研究热点^[1-5]。我们前期研究发现麝香可以使大鼠颅骨骨缺损处 SDF-1 的表达增加, 表明麝香除了引体外药物达到病所, 还可将体内有利于缺损区修复的

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81460735)

* 通讯作者: 李宁, Email: 535682960@qq.com

细胞或细胞因子引至病所^[6],但是血清中这些趋化因子是否会出现同样的表达?因此进一步研究骨缺损的修复作用机制,在此基础上寻找有效促进骨缺损修复速度,缩短愈合时间的药物具有现实意义和应用价值。鉴于此,本实验通过构建大鼠颅骨骨缺损模型,采用 ELISA 检测麝香对颅骨骨缺损大鼠 SDF-1、HGF 表达的影响,为研究麝香促进骨缺损愈合机制提供有力依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:6 周龄 SD 大鼠 300 只,雌雄各半,体质量(200 ± 20)g,均由甘肃中医药大学 SPF 实验动物中心提供,于甘肃中医药大学 SPF 动物实验中心实验室适应性饲养 5 天,实验室温度(20 ± 2)℃,自由饮水进食。动物设施使用证明 No: 00000230;动物质量合格证 No:6200100000201。

1.1.2 药物、试剂、设备:麝香购于兰州安泰堂天顺行药业,由甘肃中医药大学中药鉴定学教研室鉴定,为天然麝香。氯胺酮注射剂购自西安力邦制药有限公司。SDF-1 酶联免疫试剂盒(Rat SDF-1 ELISA KIT,上海酶联生物科技有限公司,货号:m1003227);HGF 酶联免疫试剂盒(Rat HGF ELISA KIT,上海酶联生物科技有限公司,货号:m1002925);酶联免疫检测仪(型号 RT-6100,深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 颅骨骨缺损模型的建立:于甘肃中医药大学 SPF 实验动物中心实验室适应性饲养第六天进行颅骨骨缺损模型的制备,参考文献^[7]以氯胺酮 0.1 g/kg 体重腹腔注射大鼠 2~4 min 后,取俯卧位,用固定板固定大鼠头部及四肢,在头部术野处剪毛、碘伏消毒,做一长约 1.5 cm 纵行切口,充分暴露颅骨并除去局部骨膜。用带直径 5 mm 钻头的牙科钻在头颅术野处造成直径约 5 mm 的圆形骨缺损,不损伤

硬脑膜及毛细血管,用无菌生理盐水冲洗骨缺损部位去除残存骨屑,缝合皮下层,消毒后缝合皮肤层,最后用碘伏消毒伤口。

1.2.2 分组与给药:将所有颅骨骨缺损模型大鼠按体重编号,采用完全随机法分为给药组、模型组各 150 只,然后将这两组通过完全随机法又分为 3 小组(给药组 1、2、3 组;模型组 4、5、6 组),每小组 50 只。给药组灌胃剂量按人与大鼠体重的折算公式计算,以低浓度 4.2 mg/100 g 为计算标准,通过研钵将其充分研磨后分别溶于 2.5 ml 的蒸馏水中进行吹打,至混悬液时向模型大鼠灌服,模型组灌服等体积的生理盐水,均每日一次,两组分别持续灌胃 7 d、14 d、28 d。

1.2.3 检测标本制备:连续灌胃 7 d 时,分别对第 1 组、第 4 组大鼠进行股动脉采血;持续灌胃 14 d 时,分别对第 2 组、第 5 组大鼠进行股动脉采血;持续灌胃 28 d 时,分别对第 3 组、第 6 组大鼠进行股动脉采血;将每次取出的血液 3000 r/min 离心 10~15 min,取上清,放置 -20℃ 冰箱备用。

1.2.4 SDF-1、HGF 表达测定:参照 LU Jianl 等^[8]方法,严格按照 SDF-1、HGF 试剂盒检测说明书操作,实验结果以酶标仪读数为准。稀释标准品加样品及标准品→加酶→显色液 A、B→加入终止液→15 min 内读 OD 值。根据 OD 和标准物浓度绘制标准曲线,将 OD 值代入相应公式计算浓度。

1.3 统计学处理

所有数据均输入计算机,采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,各数值均用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,均数间比较采用 *t* 检验,不同时间段比较采用重复测量双因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模完成后肉眼观察大鼠颅骨有一 5 mm 左右的圆形骨缺损,见图 1。



图 1 肉眼观察颅骨骨缺损模型

Fig. 1 Macroscopic observation of the skull bone defect model

2.2 麝香对两组颅骨骨缺损模型大鼠不同时间段内血清中基质细胞衍生因子 1、肝细胞生长因子表达的影响($\bar{x} \pm s$),见表 1。

统计结果显示:与模型组比较,给药组第 7 天 SDF-1 和 HGF 含量表达均增高($t = 4.073, t = 2.753, P < 0.01$);第 14 天给药组 HGF 含量表达增加($t = 2.477, P < 0.05$),SDF-1 含量表达无明显变

化,无统计学意义;第 28 天给药组 SDF-1 含量表达降低,HGF 含量表达增加, ($P > 0.05$)均无统计学意义;给药组各时间段比较差异无统计学意义。说明大鼠颅骨骨缺损时,通过麝香不同时间段的灌胃后,SDF-1 在第 7 天表达增加最显著,第 28 天缺损区已愈合,给药组反而降低,HGF 在第 7 天、第 14 天表达均增高,但第 7 天表达增加更显著。

表 1 大鼠骨缺损模型血清中 SDF-1、HGF 表达
Table 1 Expression of serum SDF-1 and HGF in the rat bone defect model

时间	n	SDF-1 (ng/ml)		P (SDF-1)	HGF (ng/ml)		P (HGF)
		模型组	给药组		模型组	给药组	
7d	100	63.33 ± 8.09	76.95 ± 6.82 *	0.0008	139.02 ± 15.11	166.88 ± 28.21 *	0.0158
14d	100	70.56 ± 11.91	71.80 ± 8.50	0.7912	150.17 ± 16.54	175.01 ± 27.06 **	0.0234
28d	100	80.12 ± 12.28	79.63 ± 9.26	0.9200	167.23 ± 9.55	180.42 ± 24.84	0.1439

注: * 与模型组比较表示 $P < 0.05$, ** 与模型组比较表示 $P < 0.01$
Note: * compared with the model group, $P < 0.05$, ** compared with the model group, $P < 0.01$

3 讨论

随着社会的不断发展,生活节奏的加快,因各种事故导致创伤、感染等多发,进而使骨折后骨缺损发生率呈逐年增加趋势。同时,由于我国老龄化趋势的加重,加之许多老年人缺少锻炼而形成弱体质现象,这使骨折后骨缺损患者的数量进一步增加。那么如何促进骨折后骨缺损的愈合,缩短愈合时间,是骨科研究的热点。目前治疗骨缺损的方法很多,包括、异体骨及人工骨修复材料等,但由于自体骨来源及可能造成新的损伤等、异体骨排斥反应及引入新的病原体等、工骨修复材料生物降解性及相容性等一系列问题对临床上应用于骨缺损的治疗造成一定的影响。通过前期研究发现^[9],低浓度麝香通过促进外源性干细胞迁移的途径从而促进大鼠颅骨骨缺损处骨痂形成,并加速骨折愈合、缩短愈合时间的效果最好。通过对大鼠颅骨骨缺损模型回植骨髓间充质干细胞的方法,发现低浓度麝香可以增加大鼠颅骨骨缺损处 SDF-1 的表达,那么通过低浓度麝香的干预后血清中某些趋化因子是否也参与促进大鼠颅骨骨缺损的修复及愈合的机制?

SDF-1 是一个强有力的趋化因子,主要通过其受体 CXCR4 发挥多种生物学功能,在肾脏、心脏、骨及牙齿等损伤或缺损中均有表达。Qiming Jin 等^[10]报道,SDF-1 能够单独促进颅骨临界骨缺损的形成,而对通过载体支架 BMP 诱导异位成骨促进骨缺损修复几乎没影响,这表明 SDF-1 可以通过加速局部血管生成的生物学功能提高骨缺损修复愈合的速

度。赵永利等^[6]发现麝香可以使大鼠颅骨骨缺损处 SDF-1 表达增高,但这只是通过体外回植干细胞的方法进行免疫组化检测,那么是否同样影响血清中 SDF-1 表达,且国内外通过此类方法检测血清中 SDF-1 的报道鲜少。而通过本实验得知麝香确实可以增加血清中 SDF-1 的表达,这对研究中医引经理论将是一个新的突破口。HGF 是在上世纪 80 年代初作为肝细胞促分裂原被发现的,后来确定为一个由 α 和 β 链组成的异二聚体分子^[11-12]。HGF 主要与 c-Met 受体结合,通过一系列激活反应最终激活 FAK、PI3K/AKT、Ras/MEK 等多条信号传导通路,并调控特定趋化因子及细胞因子的表达来促进血管再生及细胞的分裂与迁移^[13]。已有大量报道 HGF 在细胞增殖、迁移、促进血管生成等中发挥重要作用^[14],另外对肾脏、肺、心脏和其他组织的内皮细胞有再生效应^[15-16],在皮肤损伤修复中 HGF 介导细胞自分泌信号传导同样出现高表达^[17]。研究报道^[18],当组织损伤后,通过一些炎症因子的刺激,机体组织的内分泌、旁分泌及体液调节发挥作用,使 HGF 在损伤区局部被激活,致 HGF 表达升高,达到促血管生成等作用,从而促进损伤区组织的再生与修复,这与本实验结果相符。

麝香出自《神农本草经》,是鹿科动物成熟雄体(马麝、原麝等)香囊中的干燥分泌物。其主要成分为麝香酮,约占麝香纯干品的 0.15% ~ 2%,化学成分主要含甾体化合物、大环化合物、脂肪酸、无机物、多肽蛋白质类化合物、酯类化合物等。本品辛、温,归心、脾经,具有开窍醒神、活血通络、解毒止痛等功

效,其性辛香走窜,内达脏腑筋骨,外走肌肤孔窍,其味浓郁芳馥、经久不散,麝香的用途十分广泛,主要作用于心血管系统、呼吸系统、循环系统、免疫系统、生殖系统等。《本草纲目》记载:它有“通诸窍,开经络,透肌骨”等功效。传统接骨方药中频繁的使用麝香,治疗跌打损伤、骨折等疾病,说明麝香具有引药物直达病所的作用,而其有效成分是否可促进体内相关因子的表达,从而促进机体自我修复能力。研究表明,麝香的确可以促进骨髓间充质干细胞迁移至骨缺损处,加速缺损区愈合。从前期及本实验结果我们可以得知,麝香除了引体外药物达到病所之外,还可将体内加速缺损区修复的细胞因子及血清中趋化因子引到病所,这对促使骨折后骨缺损愈合,缩短愈合时间提供了新的思路与方法,对进一步探索中药在中医引经理论的指导下参与疾病的修复及治疗方面有重要意义。当然本实验也存在不足之处,虽然麝香短时间内可通过促进血清中趋化因子高表达实现骨折后骨缺损的修复,SDF-1、HGF 可能刺激相关内源性机制的调控参与其愈合机制,但 SDF-1、HGF 出现高表达的最佳时间、麝香最佳浓度仍需要大样本、多层次的实验研究得以确定;从本实验发现 SDF-1 表达量与时间呈负相关,是否可以推断时间越长,其表达量越低甚至产生不利影响;寻求更多的中药单体来治疗临床骨科疾病,从而促进中医药事业的发展,这些仍需要我们不懈的努力与坚持。

【参 考 文 献】

- [1] 刘阳,曹延林,朱立新,等.新型可注射性 nHA/CS 骨修复材料修复兔股骨髁骨缺损的 X 线评估.中国矫形外科杂志,2011,19(17):1472-1475.
Liu Yang, Cao Yanlin, Zhu Lixin. et al. X ray evaluation of a new injectable nHA/CS bone repair material for repairing the defect of the femoral condyle in rabbits. Chinese Journal of Orthopaedic Surgery, 2011, 19(17): 1472-1475.
- [2] 阳懿,赵承初,孙勇,等.两种骨修复材料修复兔颅骨骨缺损: X 射线评估效果.中国组织工程研究与临床康复,2010,14(34):6283-6286.
Yang Yi, Zhao Chengchu, Sun Yong. et al. Two kinds of bone repair materials for repairing skull defects in rabbits; the effect of X - ray evaluation. Tissue Engineering Research and Clinical Rehabilitation in China 2010, 14(34): 6283-6286.
- [3] 胡金龙,王静成,颜连启.组织工程学技术治疗骨缺损的最新研究进展.中国矫形外科杂志,2013,21(2):150-153.
Hu Jinlong, Wang Jingcheng, Yan Lianqi. Recent advances in tissue engineering in the treatment of bone defects. Chinese Journal of Orthopaedic Surgery, 2013, 21(2): 150-153.
- [4] Long T, Zhu Z, Awad HA, et al. The effect of mesenchymal stem cell sheets on structural allograft healing of critical sized femoral defects in mice. Biomaterials. 2014;35(9):2752-2759.
- [5] Mao L, Tamura Y, Kawao N, et al. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. Bone. 2013;61C:102-108.
- [6] 赵永利,谢兴文,李宁.等.麝香对颅骨骨缺损模型大鼠 SDF-1 表达的影响.中国骨质疏松杂志,2013,19(4):386-390.
Zhao Yongli, Xie Xingwen, Li Ning. et al. Effect of Musk on the expression of SDF-1 in rat model of skull bone defect. Chinese Journal of Osteoporosis, 2013, 19(4): 386-390.
- [7] 谢兴文,赵永利,李宁.等.麝香对颅骨骨缺损模型大鼠单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响.中国中医药信息杂志,2013,20(5):48-51.
Xie Xingwen, Zhao Yongli, Li Ning. et al. Effect of Musk on the expression of monocyte chemotaxis protein 1 in rat model of skull bone defect. Chinese Journal of traditional Chinese Medicine, 2013, 20(5): 48-51.
- [8] LU Jianl, MA Jil, WANG Li-nal, LIN Shu-rui, YU Cai-nal. Study on Influence of Sini Powders on IL-1 β in Rats with Experimental Ulcerative Colitis. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(1): 103-105.
- [9] 谢兴文,侯费祎,李宁.等.不同浓度麝香酮对外源性骨髓间充质干细胞在体内迁移的影响.中国中西医结合杂志,2012,32(7):980-985.
Xie Xingwen, Hou Feiyi, Li Ning. et al. Effects of different concentrations of musk ketone on the migration of exogenous bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. Chinese Journal of integrated traditional Chinese and Western Medicine, 2012, 32(7): 980-985.
- [10] Qiming Jin, William V. Giannobile. SDF-1 Enhances Wound Healing of Critical-Sized Calvarial Defects beyond Self-Repair Capacity. PLoS One. 2014; 9(5): e97035.
- [11] Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. Biochemical and biophysical research communications, 1984, 122: 1450-1459.
- [12] Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2003, 327: 1-23.
- [13] Chen HT, Tsou HK, Chang CH, et al. Hepatocyte growth factor increases osteopontin expression in human osteoblasts through PI3K, Akt, c-Src, and AP-1 signaling pathway. PLoS One, 2012, 7(6): e38378.
- [14] Honghui Su, Hongjun Fan, Huiling Su. Research progress of the role of HGF/c-Met in the proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of cancer. Oncology and Translational Medicine, 2015, 1(4): 190-193.
- [15] Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. HGF as a renoprotective and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. Front Biosci, 2008, 13(1): 7072-7086.
- [16] Mizuno S, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: a regenerative drug for acute hepatitis and liver cirrhosis. Regen Med, 2007, 2(2): 161-170.
- [17] 苏会玲,汤桂梅,范洪君.等. HGF/SF-MET 通路的基本原理.河北医药,2013,35(21):3297-3299.
Su Huiling, Tang Guimei, Fan Hongjun. et al. The basic principle of HGF/SF-MET access. Hebei Pharmaceutical, 2013, 35(21): 3297-3299.
- [18] Hua ZY, Song J, Cheng F, et al. The effect of hepatocyte growth factor on the initiation phase of liver regeneration after cold ischemia in a rat model of small-for-size liver transplantation. Hepatogastroenterology, 2012, 59(117): 1548-1552.

(收稿日期:2016-04-19;修回日期:2016-05-30)