

基于基因互作谱与动态表达谱解析伤科接骨片促进骨折愈合的止血活血双向调节机制

张楚^{1,2}, 张景媛¹, 陈凜¹, 刘毓东¹, 李晓洁¹, 胥明珠¹, 吴卓耘¹, 奚灏瀛³,
张宁³, 周宝强³, 林娜^{1*}, 张彦琼^{1,2*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 福建中医药大学 药学院, 福建 福州 350122;
3. 大连美罗中药厂有限公司, 辽宁 大连 116036)

[摘要] 采用骨折受累靶位血液微循环相关基因互作谱和动态表达谱整合分析加实验验证的研究策略,探索伤科接骨片通过止血活血双向调节发挥其促进骨折愈合的分子机制。收集源于 ETCM 2.0 和 HIT 2.0 数据库的伤科接骨片候选靶标谱,以及源于 HPO 数据库的止血与活血相关靶标;构建“方药候选靶标-活血/止血相关靶标”互作关联网络,筛选其关键网络靶标,并进行功能富集分析。从 GEO 数据库获取在骨折愈合过程中连续时间节点发生动态变化的基因集,并与伤科接骨片止血活血关键网络靶标做关联性分析。利用独立转录组学定量数据集与动物实验对关联靶标加以验证。关联性分析显示伤科接骨片在血肿形成期通过激活衰变加速因子(DAF,即 CD55)表达抑制骨折断端出血,在骨痂形成期和骨痂改造期通过降低白细胞介素-6(IL-6)、激活尿激酶型纤溶酶原激活物(PLAU)表达促进活血作用。动物实验验证结果表明,伤科接骨片显著增加骨折大鼠的骨体积分数、骨小梁厚度,并缩短骨折大鼠 CD55、IL-6、PLAU 异常表达的恢复周期,与骨折的模型组相比差异有统计学意义。伤科接骨片能在促进骨折愈合的不同阶段,有效调控 CD55 和 PLAU 共同参与的补体与凝血级联途径,以及 CD55 和 IL-6 共同参与的造血细胞功能通路,发挥止血活血双向调节骨折受累靶位血液微循环的作用。

[关键词] 骨折愈合; 伤科接骨片; 止血活血双向调节; 网络药理学; 靶标动态变化

Dual regulatory mechanisms of hemostasis and promotion of blood circulation of Shangke Jiegu Tablets in fracture healing based on gene interaction and dynamic expression profiles

ZHANG Chu^{1,2}, ZHANG Jing-yuan¹, CHEN Lin¹, LIU Yu-dong¹, LI Xiao-jie¹, XU Ming-zhu¹, WU Zhuo-yun¹,
XI Hao-ying³, ZHANG Ning³, ZHOU Bao-qiang³, LIN Na^{1*}, ZHANG Yan-qiong^{1,2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;
3. Merro Pharmaceutical Co., Ltd., Dalian 116036, China)

[Abstract] This study aimed to integrate the gene interaction profiles and dynamic expression profiles associated with blood microcirculation at fracture sites, in order to explore the molecular mechanism underlying the dual regulatory effects of Shangke Jiegu Tablets on hemostasis and activation of blood circulation in promoting fracture healing. The candidate target profiles of Shangke Jiegu Tablets were retrieved from the ETCM 2.0 and HIT 2.0 databases, while the targets related to hemostasis and promotion of blood

[收稿日期] 2025-02-12

[基金项目] 中国中医科学院中药研究所技术研发项目(20230831&20241118);深圳市“医疗卫生三名工程”项目(SZZYSM202311020);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2024E003)

[通信作者] *张彦琼,研究员,博士生导师,研究方向为临床中药学,E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn; *林娜,研究员,博士生导师,研究方向为中药药性和中药药理学,E-mail: nlin@icmm.ac.cn

[作者简介] 张楚,硕士研究生,研究方向为中药药理学,E-mail: zhangchu2323@163.com

circulation were obtained from the HPO database. An interaction network of "herbal medicine candidate targets-hemostasis/promotion of blood circulation-related targets" was constructed, and the key network targets were identified for functional enrichment analysis. Gene sets showing dynamic changes over time during the fracture-healing process were retrieved from the GEO database and correlated with the key targets related to hemostasis and the promotion of blood circulation of Shangke Jiegu Tablets. Independent transcriptomic quantitative datasets and animal experiments were employed to validate the associated targets. Correlation analysis reveals that during the hematoma formation stage, Shangke Jiegu Tablets effectively promoted hemostasis at the fracture site by upregulating the expression of decay-accelerating factor (DAF, also known as CD55). During the callus formation and remodeling stages, it promoted blood circulation by downregulating interleukin-6 (IL-6) and upregulating plasminogen activator urokinase (PLAU). Animal experiments demonstrated that Shangke Jiegu Tablets significantly increased the bone volume fraction (bone volume/total volume, BV/TV) and trabecular thickness (Tb.Th) in fractured rats and shortened the recovery period of abnormal CD55, IL-6, and PLAU expression, with statistically significant differences compared with the fracture model group. At different stages of fracture healing, Shangke Jiegu Tablets can effectively regulate the complement and coagulation cascade pathways involving CD55 and PLAU, as well as the hematopoietic cell function pathway involving CD55 and IL-6. This modulation enables the drug to exert its dual regulatory effects on blood microcirculation at the fracture site, providing a novel perspective on the therapeutic mechanism of Shangke Jiegu Tablets for fracture treatment.

[Key words] fracture healing; Shangke Jiegu Tablets; dual regulation of blood circulation and hemostasis; network pharmacology; target dynamic change

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20250507.701

骨折是骨科常见疾病,其致病因素包括暴力创伤、骨质疏松、应力损伤等^[1-3]。中国 50 岁及以上患者的椎体骨折发生率在 5 年内(2013—2017 年)增加了 1.79 倍,总体治疗费用急剧增加。因此,骨折不仅给患者带来痛苦,影响其日常生活和心理状态,还对社会公共医疗资源及经济产生不良影响^[3-6]。临床医生常采用手术对患者骨折部位进行固定或采取同种异体移植物等联合治疗方式,从而促进骨折愈合^[7-10]。多种因素可导致骨折愈合延迟,如骨折初期及手术时大量出血导致的伤口感染、个体因素导致的骨质疏松^[8-9]。可使用药物对骨折愈合延迟或骨不连、疼痛、肿胀等症状进行干预,目前用于促进骨折愈合、止痛及抑制炎症水平的药物多是从单一病理环节进行干预,例如氨甲环酸、阿司匹林与低分子肝素、阿片类药物、双膦酸盐、白细胞介素-1 受体 1 型(IL-1R1)抑制剂等^[10-12]。

中医药在治疗骨折时可从多个病理环节进行干预,如改善骨代谢、促进血液循环、抑制炎症水平等,并且治疗费用成本低^[13-14]。骨折的病理特征包括骨折区域发红和疼痛、肿胀、血液循环停滞和骨骼愈合缓慢^[14]。中医认为骨的形成需要血液提供营养,血对骨的生成起到关键作用,与现代医学研究中的血管与成骨耦合生成理论一致^[13,15]。伤科接骨片是治疗骨折的代表性中成药,被收载于 2020 年版《中国药典》。伤科接骨片由红花、三

七、朱砂、土鳖虫、马钱子粉、炙没药、海星、炙鸡骨、冰片、炙乳香、煅自然铜、甜瓜子组成,具有活血化瘀、消肿止痛、舒筋壮骨之功效,临床上主要用于减轻跌打损伤、腰岔气、伤筋动骨、瘀血肿痛、损伤红肿等症状,还可配合用于骨折患者复位术后^[16]。项目组前期的 Meta 分析结果表明,伤科接骨片在临床治骨折中发挥良好的化瘀、消肿、止痛等作用^[17]。

中医把骨折的愈合进程归纳为“脱瘀、生骨、合骨”。现代医学将这一过程分为 3 个阶段,即血肿形成期、骨痂形成期和骨痂改造期^[18-19]。局部的血液供应是影响骨折愈合的重要因素。血液对骨折愈合具有促进作用,但骨折发生及其围手术期,受累靶位短暂的出血现象又不利于其愈合,因此,骨折愈合存在止血、活血两方面需求,受累局部的止血过程和患者整体的活血过程均有助于骨折愈合和防止感染^[20]。伤科接骨片组方中的红花、土鳖虫、马钱子粉、炙没药、炙乳香、煅自然铜具有活血功效,且三七具有止血和活血功效。然而,该中成药品种在促进骨折愈合中发挥止血与活血双向调节微循环的作用方式及其潜在机制均不明确。因此,本研究拟通过整合骨折受累靶位血液微循环相关的基因互作谱和动态表达谱,研究伤科接骨片通过止血活血双向调节发挥其促进骨折愈合的分子机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只, 8~9 周龄, 体重质量 (280 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK(京) 2021-0011。实验期间采用昼夜各 12 h 间断照明, 恒温恒湿条件, 适应性喂养 1 周后用于实验。本研究中动物福利与实验过程遵循中国中医科学院实验动物福利伦理委员会的相关规定(伦理审查批准编号 IBTCMCACMS21-2402-02)。

1.2 药品与试剂

伤科接骨片(大连美罗中药厂有限公司, 货号 GP00002710); 接骨七厘胶囊(湖南金沙药业有限责任公司, 货号 SPH10008566); 异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司, 货号 R510-22-10); 0.9% 注射用生理盐水(石家庄四药有限公司, 货号 ZS5018); 注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司, 货号 H13020655); 大鼠白细胞介素-6(IL-6)、尿激酶型纤溶酶原激活物(PLAU)、衰变加速因子(DAF, 即 CD55)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物有限公司, 货号分别为 YJ102828、YJ2002935、YJ991904); 乙二胺四乙酸脱钙液、PBS 缓冲液、DAB 显色试剂盒、SV 超敏两步法试剂盒、抗原修复液、中性树胶(武汉博士德生物工程有限公司, 货号分别为 AR1071、AR0032、AR1027-1、SV0002、AR0026、AR0038); 组织固定液、Cole 苏木素染色液(常规染色)(北京索莱宝科技有限公司, 货号分别为 P1110、G1140); CD55 兔抗、IL-6 兔抗、PLAU 兔抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司, 货号分别为 A1228、A21264、A2181)。

1.3 仪器

全自动酶标仪(美国赛默飞公司, 型号 MK3); 烤片机(天津天利航空机电有限公司, 型号 KPJ-1A); 烘箱(天津泰斯特仪器有限公司, 型号 WGLL-65BE); 显微镜(日本 OLYMPUS 公司, 型号 BX51)。

2 方法

2.1 伤科接骨片靶标集的收集与处理

从 ETCM 2.0 (<http://www.tcmip.cn/ETCM2/front/#/>) 和 HIT 2.0 (<http://hit2.badd-caio.net/>) 数据库中检索并收集伤科接骨片组方中药材的候选靶标信息^[21-22], 合并去冗余, 作为伤科接骨片的候选靶标集。

2.2 止血与活血作用相关基因集的收集与处理

从 HPO 数据库(<https://hpo.jax.org/>, version 2024) 中检索并获取与止血、活血作用相关的基因集^[23]。检索词包括“thrombocytopenia”“abnormal bleeding”“thrombocytosis”“thromboembolism”“subcutaneous hemorrhage”“persistent bleeding after trauma”“reduced antithrombin III activity”“reduced coagulation factor V activity”“abnormality of the coagulation cascade”“impaired platelet aggregation”“joint hemorrhage”“prolonged whole-blood clotting time”“prolonged prothrombin time”“impaired thrombin-induced platelet aggregation”“reduced prothrombin antigen”“reduced platelet dense granules”“reduced platelet alpha granules”“abnormality of thrombocytes”“abnormality of coagulation”“prolonged bleeding time”“reduced prothrombin consumption”“prolonged partial thromboplastin time”“disseminated intravascular coagulation”“high nonceruloplasmin-bound serum copper”“abnormality of the common coagulation pathway”“abnormality of blood circulation”“abnormal platelet function”“elevated coagulation factor V activity”“abnormality of prothrombin”“abnormal platelet aggregation”“abnormal coagulation factor V activity”“reduced isohemagglutinin level”“decreased prothrombin time”“abnormal prothrombin time”“decreased serum thromboxane B2”“reduced alpha-2-antiplasmin activity”“reduced antithrombin antigen”“decreased serum iron”“abnormal isohemagglutinin level”。从 HPO 数据库中收集止血、凝血功能降低或异常的相关基因, 合并去冗余后作为止血相关基因集; 活血、凝血功能增强的相关基因, 合并去冗余后作为活血相关基因集。

2.3 伤科接骨片候选靶标的功能挖掘

构建“伤科接骨片候选靶标-止血相关基因”相互作用网络、“伤科接骨片候选靶标-活血相关基因”相互作用网络。将上述网络靶标导入 DAVID 数据库(<https://davidbioinformatics.nih.gov/home.jsp>, version 2024) 进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 结合文献调研, 筛选与止血、活血相关的作用通路。

2.4 骨折愈合相关的动态转录组学数据挖掘

从 GEO 数据库获取骨折大鼠受累靶位的转录

组表达谱数据集 GSE262132 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE262132>)。该数据集来源于 15 只 3 月龄 SD 大鼠,随机分为 5 组,每组 3 只,共包含骨折后第 0(空白对照组)、3、7、14、28 天各组 3 只大鼠骨组织的转录组表达谱数据^[24-25]。采用 R 3.6.3 (<https://cran.r-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html#Citing-R>) 中的 Limma 软件包对上述转录组表达谱数据进行归一化处理,同时对数据进行对数转换。通过 Limma 包筛选每组数据集中 2 个分组之间的显著变化基因,选取校正后 $P < 0.05$ 作为动态表达基因。对第 3 天 vs 第 0 天,第 7 天 vs 第 3 天,第 14 天 vs 第 7 天,第 28 天 vs 第 14 天显著变化的基因进行汇总整理,获得骨折愈合过程中表达量呈现动态变化规律的基因集,并将其与方药候选靶标做关联性分析,绘制其表达量动态变化折线图。最后,结合文献研究,阐释伤科接骨片在促进骨折愈合过程中的止血、活血双向调节机制。

2.5 伤科接骨片发挥止血、活血作用潜在效应靶标转录组表达谱验证

从 GEO 数据库收集来源于骨折大鼠受累靶位的转录组表达谱数据集 GSE594 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE594>),该数据集共包含 54 个雄性 SD 大鼠样本,6 周龄、26 周龄、52 周龄 SD 大鼠转录组测序样本各 18 个,各分为 6 组,每组 3 只,共包含骨折后第 0(空白对照组)、3、7、14、28、42 天各组 3 只大鼠组织样品的转录组表达谱数据^[26]。提取伤科接骨片发挥止血、活血作用潜在效应靶标在骨折愈合不同时间点的 mRNA 表达量,并绘制其动态表达量折线图。

2.6 伤科接骨片发挥止血、活血作用潜在效应靶标动物实验验证

2.6.1 骨折模型建立

异氟烷气体诱导并维持大鼠麻醉,进行右下肢常规备皮、碘伏消毒,造成大鼠右下肢胫骨横断性骨折。将大鼠右下肢膝关节屈曲呈 90° 直角,于胫骨干中段内侧作 3 cm 纵向切口,逐层分离皮下组织、筋膜、肌肉等,充分暴露胫骨干中段,于胫骨弧度最明显处,用电锯切割致其完全断裂。用电钻夹持直径为 1.0 mm 的克氏针,从骨折断端逆行打入骨髓腔,针尖在胫骨内侧髁附近穿出,用克氏针折弯器将穿出部分的克氏针(长约 1 cm)折弯,固定在胫骨内侧髁附近,避免影响膝关节活

动。用尖嘴钳剪断多余部分,再将克氏针反向伸入骨髓腔以固定骨折断端。最后碘伏棉球擦拭伤口血液,用可吸收性外科缝线逐层缝合切口。为了避免大鼠之间啃咬损伤部位,可用无菌敷贴盖住伤口,2~3 d 后即可除去敷贴。造模后当天开始,连续 3 d 于大鼠健侧下肢肌注射 $8 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素钠溶液 0.1 mL(每只 $8 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{d}^{-1}$) 预防感染。造模后次日开始灌胃给药,连续给药 23 d。给药结束后,每只大鼠经 2% 戊巴比妥钠 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉,腹主动脉取血,取材结束后,每只大鼠经 2% 戊巴比妥钠 ($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 安乐死。

2.6.2 动物分组及给药

72 大鼠随机分为 6 组,每组 12 只,分别为空白对照组、模型组、伤科接骨片低剂量组 ($0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 临床等效剂量的 0.5 倍)、伤科接骨片中剂量组 ($0.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 临床等效剂量)、伤科接骨片高剂量组 ($0.72 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 临床等效剂量的 2 倍)、接骨七厘胶囊组 ($0.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 临床等效剂量)。造模成功后次日开始给药,空白对照组及模型组按体质量予蒸馏水灌胃,每日 1 次,持续给药 3 周。

2.6.3 微计算机断层扫描技术(micro-CT)法检测骨计量参数指标

骨折胫骨固定 24 h,采用 micro-CT 仪 SkyScan1176 系统对样本进行扫描,扫描精度 $9.02 \mu\text{m}$,扫描电压 65 kV,电流 $385 \mu\text{A}$ 。采用 NRecon 软件对图片数据进行重构,Dataviewer 软件观察各层面结构,CTan 软件分析骨计量参数指标。

2.6.4 免疫组织化学(IHC)实验

将组织石蜡切片脱蜡复水,采用酶修复法修复抗原,孵育一抗 (CD55、IL-6、PLAU, 1 : 250), 4 °C 过夜、孵育二抗、DAB 显色,最后显微镜镜检。采用 CaseViewer 软件任意采集 3 个视野,ImageJ 软件统计至少 3 个视野阳性表达区域面积。

2.6.5 酶联免疫吸附测定(ELISA)实验

用普通不抗凝采血管腹主动脉取血 5 mL,以 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min 条件进行离心处理并收集上清液,用 ELISA 法检测大鼠血清中 CD55、IL-6、PLAU 水平。

2.7 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0.2 进行数据分析。根据正态分布检验结果,采用参数或非参数统计分析;进一步采用单因素方差分析,并进行 Tukey 事后检验(或 Kruskal-Wallis 检验的 Dunn 事后检验)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 伤科接骨片具有发挥止血、活血双向调节作用的潜能

通过数据库检索和收集,共获得 563 个伤科接骨片候选靶标基因,其与组方中药材的对应关联图见中国知网本文增强出版附加材料。其次,从 HPO 数据库共收集得到 95 个止血相关基因和 865 个活血相关基因,其相互作用网络见中国知网本文增强出版附加材料。值得关注的是,CD55、Janus 激酶 2 (JAK2)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGFB1) 等止血相关基因和 IL-6、环氧合酶-2 (PTGS2)、蛋白激酶 C α 型 (PRKCA) 等活血相关基因均为伤科接骨片组方中药材的高频共有基因。

进一步通过构建“伤科接骨片候选靶标-活血相关基因”互作网络和“伤科接骨片候选靶标-止血相关基因”互作网络,并对其网络靶标进行 KEGG 通路富集分析,见中国知网本文增强出版附加材料,结果表明,伤科接骨片候选网络靶标不仅显著参与磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B 通路 (Akt) 信号通路、丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 信号通路脂质与动脉粥样硬化、鼠肉瘤病毒基因 (RAS) 信号通路、补体和凝血级联、核因子 κB (NF- κB) 信号通路等 65 条与活血相关的作用通路,涉及纠正脂质代谢、促进血管生成、抑制炎症因子释放等药理作用环节,还参与辅助性 T 细胞 (Th17) 细胞分化、Janus 激酶 (JAK)-信号转导与转录激活因子 (SATA) 信号通路、补体和凝血级联、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、1 型辅助性 T 细胞 (Th1) 和 2 型辅助性 T 细胞 (Th2) 细胞分化、造血细胞谱系、抗原加工与提呈、钴胺素运输与代谢通路等 8 条与止血相关的作用通路。其中, Th17 细胞分化、JAK-STAT 信号通路、补体和凝血级联、HIF-1 信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化、造血细胞谱系、抗原加工与提呈、钴胺素运输和代谢途径是伤科接骨片发挥止血、活血作用的共同调控通路。

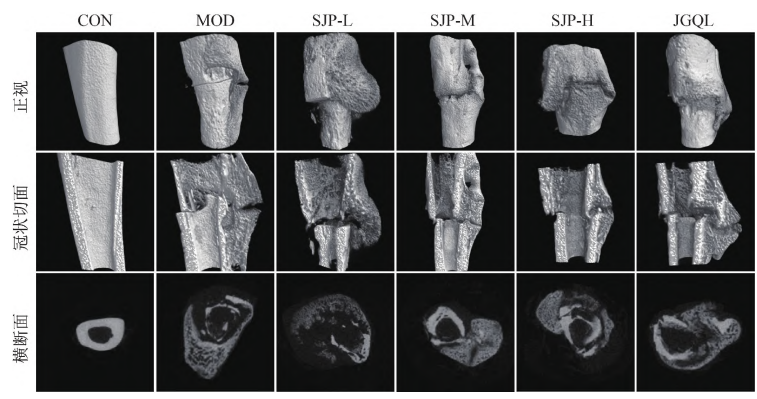
3.2 PLAU、CD55、IL-6 是伤科接骨片发挥止血活血双向调节血液循环的关键效应靶标

通过针对 GSE262132 数据集的动态差异表达数据分析,见中国知网本文增强出版附加材料,第 3 天 *vs* 第 0 天显著变化的基因集包括 9 105 个差异表达基因,其中,4 346 个上调表达基因,4 764

个下调表达基因。第 7 天 *vs* 第 3 天显著变化的基因集包括 4 899 个差异表达基因,其中,2 731 个上调表达基因,2 171 个下调表达基因。第 14 天 *vs* 第 7 天显著变化的基因集包括 6 361 个差异表达基因,其中 2 838 个上调表达基因,3 528 个下调表达基因,5 个基因同时存在于上调和下调表达基因中。第 28 天 *vs* 第 14 天显著变化的基因集包括 2 772 个差异表达基因,其中 1 548 个上调表达基因,1 224 个下调表达基因。通过筛选获得 383 个骨折愈合过程中发生表达量动态变化的基因,其中,CD55、IL-6、PTGS2、 β -连环蛋白 1 (CTNNB1)、尿嘧啶核苷酸转运蛋白 C1 (URCRC1)、基质金属蛋白酶组织抑制因子 2 (TIMP2)、鞘磷脂激酶 2 (SPHK2)、抑制细胞因子信号传导 1 (SOCS1)、蛋白激酶 C α 型 (PRKCA)、纤溶酶原激活物 (PLAU)、NAD(P)H:醌氧还原酶 1 (NQO1)、丝裂原激活蛋白激酶 2 激酶 2 (MAPK2K2)、高迁移率族蛋白 N5 (HMG N5)、高迁移率族蛋白 N3 (HMG N3)、氨基酸酰基肽水解酶 (DNEPEP)、细胞周期蛋白依赖性激酶 5 (CDK5) 等 16 个基因是伤科接骨片的候选靶标,其在骨折愈合不同时间点的表达量动态变化趋势见中国知网本文增强出版附加材料,显示 IL-6 与 PLAU 在骨折后第 3、7 天表达量显著上升,第 7 天表达量最高,可能与骨折后急性炎症相关,随后开始下降;CD55 在骨折后第 3、7 天表达量显著下降,第 7 天表达量最低,随后开始逐渐恢复正常;结合上述 3 个基因的生物学功能,推测伤科接骨片通过调节 CD55 和 PLAU 共同参与的补体与凝血级联途径,以及 CD55 和 IL-6 共同参与的造血细胞功能通路而发挥其止血活血双向调节骨折受累靶位的血液微循环作用。

3.3 伤科接骨片对胫骨骨折大鼠愈合组织影像学变化的影响

与空白对照组相比,骨折模型组大鼠的胫骨中段断裂,形成了骨痂,其骨痂连接处存在明显裂缝,骨体积分数 (BV/TV) 与骨小梁厚度 (Tb. Th) 显著降低 ($P < 0.01$),表明骨折会导致大鼠骨体积占比降低、骨小梁变细;与模型组相比,给药组 BV/TV 与 Tb. Th 显著增加 ($P < 0.05$),表明伤科接骨片可逆转骨折导致的骨体积占比降低与骨小梁变细,促进了骨折愈合,见图 1、表 1。



CON. 空白对照组; MOD. 模型组; SJP-L. 伤科接骨片低剂量组; SJP-M. 伤科接骨片中剂量组; SJP-H. 伤科接骨片高剂量组; JGQL. 接骨七厘胶囊组(表1、2,图2同)。

图1 各组大鼠的 micro-CT 扫描图像

Fig. 1 Micro-CT images of rats from each group

表1 伤科接骨片对胫骨骨折大鼠愈伤组织 micro-CT 变化的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of Shangke Jiegu Tablets on micro-CT changes of callus in tibial fracture rats($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	BV/TV/%	Tb. Th/ μm
CON	—	94.54 $\pm$ 1.49	2.05 $\pm$ 0.16
MOD	—	87.97 $\pm$ 1.24 ²⁾	1.13 $\pm$ 0.06 ³⁾
SJP-L	0.18	91.07 $\pm$ 0.90	1.39 $\pm$ 0.07
SJP-M	0.36	92.13 $\pm$ 1.45 ⁴⁾	1.50 $\pm$ 0.08 ⁴⁾
SJP-H	0.72	89.51 $\pm$ 0.68	1.14 $\pm$ 0.10
JGQL	0.10	91.76 $\pm$ 2.48	1.42 $\pm$ 0.22

注:与 CON 相比¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$;与 MOD 相比⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$, ⁶⁾ $P<0.001$ (表2同)。

3.4 伤科接骨片止血活血双向调节效应靶标 CD55、IL-6、PLAU 的实验验证

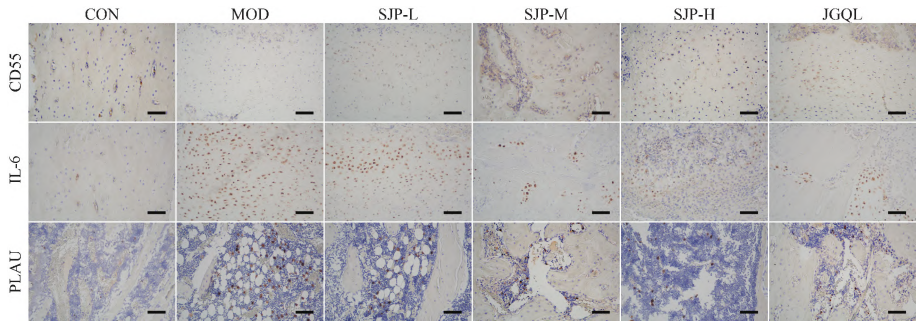
通过对 GSE594 表达谱数据集的分析可知, CD55 的 mRNA 表达量在 6、26 和 52 周龄大鼠骨折后的第 3、7 天显著下降,并于第 7 天下降至最低点,随后开始逐渐回升,且恢复水平随大鼠周龄的增长而降低;IL-6 的 mRNA 表达量在 6、26 和 52 周龄大鼠骨折后的第 3 天均上升至峰值,随后均呈现下降趋势;PLAU 的 mRNA 表达量在 6 周龄大鼠骨折后的第 3 天增加到最高,而在 26 周龄和 52 周龄大鼠骨折后的第 7 天,其表达量才达峰值,随后逐渐降低,但均高于正常水平,见中国知网本文增强出版附加材料。

利用伤科接骨片干预骨折大鼠 3 周的骨折愈合

组织切片、血清样本,开展 IHC 和 ELISA 实验。IHC 检测结果显示,与空白对照组相比,CD55 水平有降低趋势,但是差异无统计学意义;ELISA 实验检测结果显示,与空白对照组相比,模型组大鼠血清 CD55 水平显著降低($P<0.05$);与空白对照组相比,模型组大鼠的愈伤组织、血清 PLAU、IL-6 水平显著升高($P<0.05$);与模型组相比,伤科接骨片中、高剂量组大鼠的愈伤组织、血清 CD55 水平显著升高,而 IL-6、PLAU 水平显著降低($P<0.05$)。可见,伤科接骨片的干预显著改善了骨折所致 CD55、IL-6、PLAU 的异常表达,见图 2、表 2。

4 讨论

唐代孙思邈《千金方》中提出由于跌打坠堕,可伤及经络血脉导致出血;或血液不能循经留注,离经妄行,即可出现“伤血”的病理表现^[27]。《伤科补要》曰:“跌打损伤,专从血论。”孙氏运用止血、化瘀等方法,成为后世骨伤科的治疗常规^[28]。骨折发生后及围手术期会存在出血现象;此外在骨折愈合新生骨形成的过程中,需要血液提供营养物质。若血液出现黏稠或瘀滞,则不利于骨细胞从中汲取养分,进一步形成血栓出现肢体肿胀。针对增强血液循环、防止血液病理性流失和防止感染的临床需求,用治骨折的药物通常都应具有活血或止血功效。伤科接骨片是治疗骨折的上市中成药品种,方中红花、三七有活血止痛、消肿散瘀之功效,为君药;没药活血祛瘀,乳香止痛消肿,马钱子散结通络,甜瓜子消瘀散结,共为臣药;鸡骨、土鳖虫可强筋骨,海星消



标尺 100 μm 。

图 2 伤科接骨片止血活血双向调节效应靶标 CD55、IL-6、PLAU 在骨折愈合组织中含量的变化(免疫组化)

Fig. 2 Changes in levels of CD55, IL-6, and PLAU, targets of dual regulatory effect on hemostasis and promotion of blood circulation of Shangke Jiegu Tablets, in fracture callus tissue (immunohistochemistry)

表 2 免疫组化和 ELISA 检测各组大鼠骨折愈合组织和血清中 CD55、IL-6、PLAU 水平($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Detection of CD55, IL-6, and PLAU levels in fracture callus tissue and serum of rats across experimental groups by immunohistochemistry and ELISA ($\bar{x}\pm s$)

分组	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	组织($n=3$)			血清($n=5$)		
		CD55/%	IL-6/%	PLAU/%	CD55/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	PLAU/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$
CON	—	0.16 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.10	0.24 $\pm$ 0.22	299.42 $\pm$ 42.50	90.34 $\pm$ 13.80	528.76 $\pm$ 51.74
MOD	—	0.01 $\pm$ 0.01	2.52 $\pm$ 0.39 ³⁾	1.29 $\pm$ 0.46 ¹⁾	201.29 $\pm$ 32.76 ¹⁾	139.96 $\pm$ 15.77 ³⁾	931.90 $\pm$ 15.06 ³⁾
SJP-L	0.18	0.27 $\pm$ 0.24	1.23 $\pm$ 0.18 ⁵⁾	0.37 $\pm$ 0.15 ⁴⁾	252.06 $\pm$ 35.82 ⁴⁾	119.10 $\pm$ 12.97	782.88 $\pm$ 92.06 ⁴⁾
SJP-M	0.36	0.59 $\pm$ 0.12 ⁵⁾	1.14 $\pm$ 0.23 ⁵⁾	0.41 $\pm$ 0.12 ⁴⁾	291.67 $\pm$ 52.69 ⁴⁾	115.42 $\pm$ 14.18 ⁴⁾	522.54 $\pm$ 47.66 ⁶⁾
SJP-H	0.72	0.63 $\pm$ 0.15 ⁶⁾	0.97 $\pm$ 0.54 ⁵⁾	0.32 $\pm$ 0.08 ⁴⁾	323.17 $\pm$ 40.67 ⁶⁾	100.56 $\pm$ 7.47 ⁶⁾	681.00 $\pm$ 50.44 ⁶⁾
JGQL	0.10	0.46 $\pm$ 0.06 ⁴⁾	1.62 $\pm$ 0.37	0.79 $\pm$ 0.53	316.07 $\pm$ 23.34 ⁵⁾	98.28 $\pm$ 8.87 ⁶⁾	658.76 $\pm$ 116.60 ⁶⁾

肿化瘀,自然铜续筋接骨,共为佐药。本研究通过整合骨折受累靶位血液微循环相关的基因互作谱和动态表达谱,揭示了伤科接骨片发挥止血活血双向调节的作用特点及其相关分子机制。

项目组前期针对伤科接骨片的功效组划分与内涵解析研究表明,红花、三七、乳香、没药、土鳖虫、自然铜为活血化瘀组,其候选靶标谱主要参与促进骨损伤愈合(PI3K-Akt 信号通路、RAS 信号通路、破骨细胞分化等)、促血管新生、调节血液循环(血管平滑肌收缩、趋化因子信号通路、松弛素信号通路、爱帕琳肽信号通路)等^[17]。本研究的“方药候选靶标-止血/活血相关基因”互作网络挖掘提示,伤科接骨片在机体出血与凝血失衡时可能发挥着止血活血双向调节作用。有研究通过对《中华医方》中治骨折的方药进行数据挖掘,发现使用频次排名前 2 位的是乳香和没药,并认为乳香、没药和土鳖虫可作为活血化瘀的核心中药^[29]。此类中药不仅可以通过扩张微血管而改善局部组织的血液供应,减轻其缺氧和炎症反应^[30-31],也能够抑制凝血因子的激活,防

4894

止血栓形成,减轻由于血栓阻塞血管所引起的血流障碍^[31-33]。三七作为“伤科要药”,被广泛用于改善外伤出血等症,其主要通过促使血小板发生伸展伪足、变形、聚集等黏性变形运动,或促使血小板细胞膜和伪足破裂、脱落及部分溶解,产生脱颗粒等分泌反应,而诱导血小板释放腺苷二磷酸(ADP)、花生四烯酸(AA)、血小板因子Ⅲ和 Ca^{2+} 等凝血活性物质,即通过影响血小板聚集及活化、凝血因子释放等达到止血效果^[34-35]。

本研究结果表明,参与活血作用的伤科接骨片候选靶标最显著富集于脂质代谢途径,推测其具有抑制血液中脂质生成、矫正脂质代谢紊乱的作用,与该中成药品种的化瘀功效相关;此外,参与活血作用的伤科接骨片候选靶标还显著富集于血管新生通路。此外,参与止血作用的伤科接骨片候选靶标显著富集于 8 条与活血相关通路,提示其具有发挥止血活血双向调节作用的潜能。骨折后,由于出血和急性炎症反应,Th17 细胞、Th1 细胞和 Th2 细胞数量扩增,JAK2 表达升高,造血细胞谱系和凝血级联

反应等通路中的 CD55 表达降低,而血小板通过抗原呈递的蛋白质加工促进适应性免疫,引起免疫性血小板功能障碍^[36-37];有报道称血小板缺氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)通过纤溶酶原激活物抑制因子-1(PAI-1)合成和细胞外囊泡释放促进血栓形成^[38];可见,伤科接骨片参与止血活血双向调节微循环的8条通路,主要通过恢复骨折后血小板功能异常而增强其止血能力,通过抑制血栓、促进血细胞生成而增强其活血能力。相应地,转录组表达谱数据动态挖掘结果表明,参与止血活血双向调节作用的伤科接骨片候选靶标中,血细胞减少与造血细胞上 CD55 表达降低有关,可导致免疫性血小板数量减少,促进其表达,可增加血细胞、血小板数量,并增强止血能力^[39]。CD55 在骨折愈合过程中表达量的动态变化趋势相对稳定,不过随年龄增长,相较于 IL-6 与 PLAU,其在骨折后的动态恢复周期延长。IL-6 在骨折后表达升高,可导致造血细胞谱系通路受到影响,红细胞生成减少,抑制其表达可促进骨髓造血活动^[40]。PLAU(uPA 的编码基因)是纤溶酶,作为溶栓剂靶标,其具备明确的促进血管生成和溶解血栓作用。PLAU 与炎性相关因子表达水平表现出一致变化趋势;据文献报道,PLAU-纤溶酶原激活物受体(PLAUR)相互作用轴参与血管形成,PLAU 还参与了组织重塑,抑制炎症介导的破骨细胞生成^[41-43]。基于动物实验样本的 IHC、ELISA 检测结果证实,伤科接骨片显著抑制了骨折模型大鼠的愈伤组织、血清 CD55、IL-6、PLAU 异常表达,结合其动态转录组表达谱数据及其在骨折愈合过程中的潜在作用,提示伤科接骨片可能通过缩短骨折大鼠愈伤组织、血清中 CD55、IL-6、PLAU 水平的恢复周期而促进骨折愈合,伤科接骨片中剂量、高剂量给药组大鼠恢复水平最好;micro-CT 扫描分析表明,伤科接骨片显著促进了骨折愈合,伤科接骨片中剂量组大鼠骨折愈合效果最好。

综上所述,伤科接骨片在骨折愈合的不同阶段发挥着止血活血双向调节受累靶位血液微循环的作用,即在血肿形成期,其以止血作用为主,而在骨痂形成期和骨痂改造期,其以活血作用为主。在微观机制层面,伤科接骨片可能通过作用于其候选靶标 CD55,抑制骨折发生后免疫性血小板数量减少,逆转血细胞生成数量减少,促进骨折断端止血;通过调节其候选靶标 IL-6 在造血细胞谱系中的表达,发挥

其活血作用;通过调节 PLAU,促进血管生成,溶解血栓,促进血液循环。

[参考文献]

- [1] ALMEKINDERS L C, ENGLE C R. Common and uncommon injuries in ultra-endurance sports [J]. Sports Med Arthrosc Rev, 2019, 27(1): 25.
- [2] HERNLUND E, SVEDBOM A, IVERGARD M, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA) [J]. Arch Osteoporos, 2013, 8(1): 136.
- [3] LV H, CHEN W, YAO M, et al. Collecting data on fractures: a review of epidemiological studies on orthopaedic traumatology and the Chinese experience in large volume databases [J]. Int Orthop, 2022, 46(5): 945.
- [4] European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White book on physical and rehabilitation medicine in europe. Chapter 2. Why rehabilitation is needed by individual and society [J]. Eur J Phys Rehabil Med, 2018, 54(2): 166.
- [5] ENSRUD K E. Epidemiology of fracture risk with advancing age [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013, 68(10): 1236.
- [6] ZHENG X Q, XU L, HUANG J, et al. Incidence and cost of vertebral fracture in urban China: a 5-year population-based cohort study [J]. Int J Surg, 2023, 109(7): 1910.
- [7] COSTA M L, ACHTEN J, GRIFFIN J, et al. Effect of locking plate fixation vs intramedullary nail fixation on 6-month disability among adults with displaced fracture of the distal tibia: the UK FixDT randomized clinical trial [J]. J Am Med Assoc, 2017, 318(18): 1767.
- [8] METSEMAKERS W J, KORTRAM K, FERREIRA N, et al. Fracture-related outcome study for operatively treated tibia shaft fractures (F. R. O. S. T.): registry rationale and design [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2021, 22(1): 57.
- [9] TIAN R, ZHENG F, ZHAO W, et al. Prevalence and influencing factors of nonunion in patients with tibial fracture: systematic review and meta-analysis [J]. J Orthop Surg Res, 2020, 15(1): 377.
- [10] CHEN A T, PATTERSON B M. What's new in orthopaedic trauma [J]. J Bone Joint Surg Am, 2024, 106(13): 1148.
- [11] BARVENCIK F. Medication and bone metabolism: clinical importance for fracture treatment [J]. Unfallchirurg, 2015, 118(12): 1017.
- [12] MARTINO M M, MARUYAMA K, KUHN G A, et al. Inhibition of IL-1R1/MyD88 signalling promotes mesenchymal stem cell-driven tissue regeneration [J]. Nat Commun, 2016, 7:11051.
- [13] 郭雪峰, 于睿, 任艳玲, 等. 基于“成骨-成血管耦联”理论探讨中医药防治激素性股骨头坏死的科学内涵 [J]. 中华中医

- 药学期刊, 2024, 42(7): 56.
- [14] MUKWAYA E, XU F, WONG M S, et al. Chinese herbal medicine for bone health [J]. *Pharm Biol*, 2014, 52(9): 12238.
- [15] QIN Q, LEE S, PATEL N, et al. Neurovascular coupling in bone regeneration [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(11): 1844.
- [16] 邵荣华, 祝小敏. 伤科接骨片治疗骨折 40 例[J]. *中国药业*, 2013, 22(8): 117.
- [17] 刘雪婷, 陈凛, 张苏雅, 等. 伤科接骨片治疗骨折临床效果的 Meta 分析及其“病-症-方”关联功效机制[J]. *医药导报*, 2024, 43(12): 1919.
- [18] 康金平, 刘安平. 中医药治疗骨折研究进展[J]. *中医临床杂志*, 2012, 24(5): 476.
- [19] 赵超, 张本政, 冯和林. 中医药干预骨折愈合过程的机制及实验研究进展[J]. *河北中医*, 2017, 39(12): 1904.
- [20] PANTELI M, POUNTOS I, GIANNOUDIS P V. Pharmacological adjuncts to stop bleeding: options and effectiveness [J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2016, 42(3): 303.
- [21] YAN D, ZHENG G, WANG C, et al. HIT 2.0: an enhanced platform for herbal ingredients' targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D1238.
- [22] ZHANG Y, LI X, SHI Y, et al. ETCM v2.0: an update with comprehensive resource and rich annotations for traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(6): 2559.
- [23] GARGANO M A, MATENTZOGLU N, COLEMAN B, et al. The human phenotype ontology in 2024: phenotypes around the world [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(D1): D1333.
- [24] CLOUGH E, BARRETT T, WILHITE S E, et al. NCBI GEO: archive for gene expression and epigenomics data sets; 23-year update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(D1): D138.
- [25] GU X, HUANG C, WANG S, et al. Transcriptomic analysis of the rat dorsal root ganglion after fracture [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(3): 1467.
- [26] MEYER M H, ETIENNE W, MEYER R A J R. Altered mRNA expression of genes related to nerve cell activity in the fracture callus of older rats: a randomized, controlled, microarray study [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2004, 5(1): 24.
- [27] 叶成明, 张建华. 四肢骨折肿胀的病因病机及用药特色[J]. *中医药临床杂志*, 2015, 27(7): 1036.
- [28] 马莎, 李玛琳. 中药促进骨折愈合及其机制的研究进展[J]. *西部医学*, 2011, 23(8): 1603.
- [29] 张磊, 梁诗韵, 刘芊含, 等. 基于《中华医方》的骨折药膏外治组方规律及敷药介质研究[J]. *江汉大学学报(自然科学版)*, 2024, 52(5): 521.
- [30] 张春晓, 王立刚, 王磊, 等. 丹参红花方联合 LMWH 对老年髌骨骨折快速康复患者凝血功能及下肢血栓预防的治疗价值[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2025, 27(1): 139.
- [31] 赵敏, 刁丽, 王淑梅, 等. 红花黄色素氯化钠注射液联合外敷冰黄散对四肢闭合骨折患者术后肿胀疼痛、炎症反应及凝血功能的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(10): 1083.
- [32] 苏倩榕, 桂雄斌, 韦旭日, 等. 中药土鳖虫药理活性成分及其临床应用的研究进展[J]. *基层中医药*, 2023, 2(2): 119.
- [33] 陈政国, 陈峦峦, 叶秋锦, 等. 注射用红花黄色素用于急性缺血性脑卒中有效性和安全性的 Meta 分析[J]. *中国药理学杂志*, 2024, 59(20): 1967.
- [34] 刘贺之, 庞健, 王增岭, 等. 菊三七与参三七对血小板超微结构影响的研究[J]. *药学期刊*, 1982, 17(11): 801.
- [35] 石礼平, 张国壮, 刘丛盛, 等. 三七化学成分和药理作用研究概况及质量标志物的预测[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(8): 2059.
- [36] MARCOUX G, LAROCHE A, HASSE S, et al. Platelet EVs contain an active proteasome involved in protein processing for antigen presentation via MHC-I molecules [J]. *Blood*, 2021, 138(25): 2607.
- [37] COLBERG L, CAMMANN C, GREINACHER A, et al. Structure and function of the ubiquitin-proteasome system in platelets [J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18(4): 771.
- [38] CHAURASIA S N, KUSHWAHA G, KULKARNI P P, et al. Platelet HIF-2 α promotes thrombogenicity through PAI-1 synthesis and extracellular vesicle release [J]. *Haematologica*, 2019, 104(12): 2482.
- [39] RUIZ-ARGÜELLES A, LLORENTE L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias [J]. *Autoimmun Rev*, 2007, 6(3): 155.
- [40] VALLETTA S, THOMAS A, MENG Y, et al. Micro-environmental sensing by bone marrow stroma identifies IL-6 and TGF β 1 as regulators of hematopoietic ageing [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4075.
- [41] KANNO Y. The uPA/uPAR system orchestrates the inflammatory response, vascular homeostasis, and immune system in fibrosis progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1796.
- [42] LUGANO R, PEÑA E, CASANI L, et al. UPA promotes lipid-loaded vascular smooth muscle cell migration through LRP-1 [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 100(2): 262.
- [43] KANNO Y, ISHISAKI A, KAWASHITA E, et al. uPA attenuated LPS-induced inflammatory osteoclastogenesis through the Plasmin/PAR-1/Ca²⁺/CaMKK/AMPK axis [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(1): 63.

[责任编辑 陈玲]