

骨愈宝促进家兔肾虚骨折愈合的实验研究*

郭建刚¹ 毛书歌¹ 赵 然¹ 侯桂英¹ 马青雯¹ 周英杰¹ 张朝辉²

内容提要 目的:研究骨愈宝对家兔肾虚骨折愈合的影响。方法:用 57 只家兔随机分为空白组(A)、对照组(B)和实验组(C),剥离骨膜后,锯除桡骨中段 0.73cm 造双侧桡骨中段缺损,术后 1 周开始药物干扰治疗:A 组常规喂养;B 组常规喂养加强的松片 6mg/(kg·d);C 组喂加有骨愈宝的饲料加强的松片 6mg/(kg·d),观察动物一般状态,体重变化,用药后 3、6 周分二批处死,取双前肢桡骨作 X 线及组织学检查。结果:A 组无肾虚表现,B 组逐渐产生肾虚,C 组出现肾虚表现轻并很快纠正;骨缺损愈合程度,C 组最好,A 组次之,B 组最差。结论:骨愈宝有纠正肾虚促进骨折愈合的作用。

关键词 骨愈宝 肾虚 骨折愈合

Experimental Study on Effect of Guyubao in Promoting the Fracture Healing in Kidney Deficiency Rabbits Guo Jian' gang, Mao Shuge, Zhao Ran, et al *Luoyang Institute of Orthopedics and Traumatology, Henan (471002)*

Objective: To study the effect of Guyubao (GYB) in promoting the fracture healing of Kidney deficiency (KD) rabbits. **Methods:** Fifty-seven rabbits were randomly divided into three groups: The blank group (A), the control group (B) and the experimental group (C). After the periosteum was peeled off, 0.73cm middle section defects on both radius were removed. One week after operation, the experiment was begun: Group A was fed normally; group B fed normally plus 6mg/(kg·d) prednisolone; group C fed with food mixed with GYB and 6 mg/(kg·d) prednisolone. The general state and body weight were observed. The rabbits were sacrificed at three and six weeks after the beginning of experiment. Both radius were observed with X-ray and histologic examination. **Results:** In group A, no KD appeared, group B gradually developed KD, and mild KD appeared in group C but adjusted rapidly. The healing of radial defect in order were C, A, B from higher to lower degree. **Conclusion:** The results revealed that the GYB could correct the KD and promote fracture healing.

Key words Guyubao, Kidney deficiency, fracture healing

骨愈宝是我院的一个经验方,主要用于肾虚所致骨延迟连接和骨不连接,经临床观察,治愈率不低于 90%^[1],为确切证实其对骨折合并肾虚的治疗作用,我们进行了动物实验研究,结果报告如下。

材料与方法

1 动物 健康日本大耳白家兔 57 只(第四军医大学动物中心提供),雌雄并用,体重 1800~2300g,随机分为空白组(A)、对照组(B)、实验组(C)3 组。

2 实验药物 骨愈宝:由本院制剂室提供,组成:续断 6 份、骨碎补 6 份、杜仲 4 份、鹿茸 1 份、自然铜 4 份、麝香 3 份、党参 4 份、白术 6 份、茯苓 6 份、山药 6

份、三七 3 份、黄芪 6 份、枸杞子 6 份,上药共为细末。强的松片:市售,河南省南阳生化制药厂生产,批号 971024。

3 造模及给药 用前臂桡骨中段骨缺损做骨折模型,皮质激素造成肾虚。方法:3%戊巴比妥 1ml/kg 静脉麻醉,无菌条件下取前臂中段内侧约 3cm 切口,分离软组织,剥离桡骨中段骨膜后双叶电锯片锯除桡骨中段 0.73cm,冲洗止血后缝合皮肤、皮下组织。每只兔均做双侧造模手术,术后庆大霉素抗感染 3 天,1 周后折线开始给药进入实验阶段。A 组:常规喂养;B 组:常规喂养并加服强的松 6mg/(kg·d);C 组:骨愈宝 [1.5g/(kg·d)] 加入饲料喂养,加服强的松 6mg/(kg·d);强的松片晨间 1 次给足全日量,2 周后开始减量,3 周后停止,骨愈宝全程给药。

4 观察方法

4.1 一般状况观察 动物精神、毛发及疾病发生

*河南省自然科学基金重点项目;获 1998 年河南省中医药科技进步一等奖

1. 河南省洛阳正骨医院正骨研究所(河南 471002);2. 洛阳医专病理研究室

情况。

4.2 每周开始晨间称重 1 次, 观察体重增减情况。

4.3 X 线检查 实验中每组分 3、6 周两批处死, 取双前肢照标本 X 线片, 然后同条件翻拍成黑白照片, 将缺损间骨痂描绘于坐标纸上, 计算骨痂所占缺损比例。

4.4 组织学与组织化学观察 3、6 周处死的动物, 每批右侧前肢标本 2~3 只离体后立即入冷丙酮固定, 后经石蜡包埋, 不脱钙切片, Gomori 碱性磷酸酶 (AKP) 组化染色, 光镜观察; 其余右侧标本 10% 中性福尔马林固定, 酸脱钙后, 做常规石蜡切片、HE 及 Masson 三色染色, 光镜观察。左侧标本进行生化分析 (另文报道)。

5 统计学方法 体重变化用 t 检验, X 线骨痂面积计算用 χ^2 检验。

结 果

手术中因麻醉药过量死亡 4 只, 余 53 只进入实验阶段。A 组 18 只, B 组 17 只, C 组 18 只。

1 一般状况 术后 1 周拆线时, 动物伤口愈合良好, 自给药进入实验阶段后, B 组动物逐渐毛发蓬乱, 干枯失光泽, 形体消瘦, 精神萎靡; A 组动物毛发顺、光滑, 性情活跃, 健壮生长; C 组动物表现介于 A、B 组之间。实验全程, A 组仅 1 只出现过疾病, 死亡 0; B 组出现疾病 4 只, 死亡 3 只; C 组出现疾病者 3 只, 死亡 0。疾病主要是腹泻, B 组死亡 3 只, 1 只系胃穿孔, 2 只系腹泻衰竭。动物死亡仅发生于前 3 周以内。

2 体重变化 A 组动物体重直线上升, 最后 1 周有少许下降; C 组动物先少许下降, 然后上升, 最后与 A 组接近; B 组动物一直处于负增长状态, 终未回到原有体重, 3、6 周取材时的结果 (采用 t 检验), 见表 1。

表 1 3 组家兔 3、6 周时体重增减值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	
	3 周	6 周
A	305.33 $\pm$ 168.89 * Δ (18)	350.00 $\pm$ 327.84 * (9)
B	-113.75 $\pm$ 114.57 (14)	-81.43 $\pm$ 192.48 (7)
C	46.54 $\pm$ 142.25 * (18)	317.78 $\pm$ 269.61 * (9)

注: 与 B 组同期比较, * $P < 0.01$; 与 C 组同期比较, $\Delta P < 0.01$; () 内为动物数

3 X 线观察结果 各组间、各组内部及同一只动物的两侧愈合不一致, 但均无外侧骨外膜骨痂, 只见到连接骨痂由断端向中心生长, 可供统计的缺损完全愈合者 (即不包括拍片失败和双折), 3 周时, A 组 18 个中有 4 个 (22.22%), B、C 组均为 0; 6 周时, A 组 13 个

中有 4 个 (30.77%), B 组 14 个中有 2 个 (14.29%), C 组 18 个中有 6 个 (33.33%)。骨痂所占缺损的面积, 以 C 组为最高, 3、6 周时均显著高于 B 组, 但和 A 组无差异; A 组 3 周时显著高于 B 组, B 组在 3 周停用强的松后上升幅度较大, 6 周时 A、B 两组已无差异 (见表 2)。

表 2 3 组 3、6 周时骨痂生长相对面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	骨痂生长相对面积 (%)	
	3 周	6 周
A	49.07 $\pm$ 23.83 * (9)	55.46 $\pm$ 37.43 (7)
B	22.50 $\pm$ 9.46 (6)	54.14 $\pm$ 18.53 (7)
C	56.20 $\pm$ 25.29 ** (8)	77.66 $\pm$ 14.48 * (9)

注: 与 B 组同期比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; () 内为动物数

4 组织学及组织化学结果 3 周: 外侧骨外膜均无成骨反应, 尺侧骨外膜及邻近的尺骨外膜有成骨反应, 缺损间有连接骨痂和纤维组织填充, 骨髓突出断端生长, 骨痂在骨髓前呈子弹头状向前延伸, 骨痂系骨性骨痂, 两端骨痂由来源于骨外膜和血肿机化形成的纤维组织连接, 缺损间的组织充满度, A 组、C 组基本相当, 均好于 B 组, 骨痂量及向前伸展度 A、C 组基本相当均好于 B 组, A、C 组均有骨缺损完全由骨痂填充的例子。Masson 三色, 骨痂内新生胶原蓝绿色, 成熟胶原鲜红色, 3 周时骨痂内红色胶原尚少, 从量上看 $C > A > B$ 。

6 周: 外侧骨外膜仍无成骨, 尺侧骨外膜及相邻尺骨外成骨活跃, 缺损端连接骨痂由两端向中心生长, A 组有 2 只完全由骨痂连接, 1 只无任何连接骨痂生长, 缺损由少许软组织和一些大的腔隙连接, 其余标本两端骨痂由纤维组织连接, 骨痂间的距离已较近; B 组有 1 只无任何骨痂生长, 缺损间有一些大的腔隙和少许肉芽组织, 其余标本连接骨痂生长, 中间纤维连接, 纤维连接的距离较大; C 组有 2 只完全由骨痂充填, 其余均有不同程度骨痂生长, 纤维组织将两端骨痂相连。Masson 三色, 6 周组, A、B、C 组动物所形成骨痂内, 红色胶原成分增多, 但 B 组仍有一只动物骨痂内红色胶原极少, 以新生蓝绿色胶原为主。

AKP 检查: AKP 呈棕黑色颗粒, 位于细胞浆及基质, 集中位于连接骨痂前部, 3 周时, C 组有一只缺损间满布, 虽染色较浅, 但面积广泛, B 组有 1 只仅极少, 按面积, 染色浓密程度排序评价 $C > A > B$ 。6 周组因标本处理不当失败。

讨 论

肾虚证的临床表现是机体的一派衰萎之象⁽²⁾, 实验研究多用药物诱导动物产生肾虚的表现⁽³⁾, 皮质激

素肾虚模型是较常用的一种。本实验用较大量的强的松口服给药, B 组家兔在给药 2 周后, 表现出体重下降, 毛发干枯、神态淡漠及疾病死亡率增加等一系列表现明显区别于 A 组家兔, 符合肾虚证的特征; C 组家兔在用强的松同时加服骨愈宝, 体重下降少, 而后上升明显, 其余虚证表现也较轻, 在后期完全无肾虚的表现, 说明实验用骨愈宝有纠正肾虚证的作用。

中医认为肾主骨生髓、髓养骨, 肾实则骨有生气, 肾与骨的生长、发育及骨折修复有重要关系, 明代薛己明确指出骨折不愈合是肾虚所致⁽⁴⁾, 所以在骨伤治疗中, 补肾方药的应用非常重要, 另外也认为瘀血影响骨折愈合, 即瘀不去, 新不生。骨愈宝正是基于此理论基础而组方, 在治疗骨延迟愈合、骨不连接的过程中, 通过应用补肾及活血化瘀的药物, 促进骨折愈合, 临床取得了良好效果。应用这一原则组方治疗骨不连及延迟愈合的其他一些报道⁽⁵⁾, 也证实了这一原则的正确性。

骨折后局部的成骨细胞有两个来源^(6,7), 一个是骨膜和骨髓内的骨祖细胞, 称为定向骨祖细胞 (determined osteoprogenitor cell 简称 DOPC), 所形成的成骨细胞以膜性成骨方式成骨, 并且其成骨不需生物因子诱导; 另一个来源是骨骼外组织的间叶细胞, 即所谓诱导性骨祖细胞 (induced osteoprogenitor cell 简称 IOPC), 其分化形成的成骨细胞需 BMP 的诱导, 所形成的成骨细胞以软骨内成骨方式成骨。骨膜剥离影响局部成骨细胞的增殖, 因而也削弱骨折愈合⁽⁸⁾, 在本次实验中, 我们剥离了外侧骨外膜, 并未对其缝合, 在实验中观察到外侧骨外膜无论在 A、B 和 C 组均无成骨, 充分证明了骨外膜剥离对骨愈合有重要影响。断端所形成的骨痂, 在骨髓前面呈子弹头状向前突出, 骨髓也随之向前, 骨痂系膜性成骨形成, 仅个别动物的骨缺损中见到软骨成骨, 这种现象提示, 该实验骨折愈合过程成骨细胞主要来源骨髓的骨祖细胞。缺损间软骨性骨痂的多少, 与缺损间的 BMP 的浓度有密切关系, BMP 在局部达到一定的有效浓度才能诱导成骨, 未缝合骨膜不利于缺损间 BMP 积聚⁽⁹⁾, 从而影响了 IOPC 分化为成骨细胞, 这可能是实验所见软骨骨痂少的原因。

骨折后 7 天左右的时间是骨愈合早期的生物学反应期⁽¹⁰⁾, 这一时期, 骨折局部受损伤组织及进入血肿内的大量单核细胞、吞噬细胞、淋巴细胞、血小板、多能分化细胞产生一些生长因子, 包括化学趋化因子, 血管形成因子和生长因子等, 损伤组织渗出液中的某些物质也能促进局部细胞的分裂分化⁽⁶⁾, 这一早期反应促

进局部成骨细胞的形成, 血肿吸收及血管网的重建, 以后随着组织修复进展, 局部释放这些因子的能力下降, 细胞增殖将放慢, 陈其昕等的实验证实⁽¹¹⁾, 骨愈合修复性细胞的增殖从骨折后第 2 天开始升高, 10 天左右趋于正常。骨折早期反应奠定了骨折愈合的基础。

本实验的用药干扰从术后 1 周开始, 主要是考虑到一旦加用强的松可能导致皮肤不愈合, 而继发感染, 影响实验整体。但 1 周后, 骨折早期反应已将过去, 修复性细胞的增殖及各种刺激因子释放已基本完成, 增殖细胞进入功能阶段, 此时用药影响的主要是已形成细胞的功能。3 周时单用强的松的 B 组出现肾虚, 愈合差于 A、C 组, 可见修复性细胞的功能受到抑制, C 组应用强的松与 B 组同量, 但又加用了骨愈宝, 愈合就较好, 说明骨愈宝有抗肾虚所致修复细胞功能降低的作用。6 周时 B 组已停用强的松 3 周, 愈合程度有较大幅度提高, 这与修复性细胞功能逐渐恢复有关, C 组愈合优于 A、B 组, 也提示骨愈宝有持续刺激修复细胞功能的作用。

参 考 文 献

1. 毛天东, 张 茂. 中药治疗创伤骨折延迟愈合和不愈合 42 例. 中医杂志 1989; 38(9): 39—40.
2. 邓铁涛主编. 中医诊断学. 上海: 上海科学技术出版社, 1984: 121—123.
3. 陈 奇主编. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 982—985.
4. 韦以宗, 施 杞主编. 中医骨伤科学(卷 1, 基础理论). 南宁: 广西人民出版社, 1988: 43—45.
5. 吴建华. 骨折迟缓愈合、不愈合治疗研究进展. 中医正骨 1998; 10(2): 47—48.
6. 朱建民, 金宗达. 骨折愈合的分子生物学进展. 中华骨科杂志 1993; 13(6): 456—459.
7. 张子军, 卢进壁. 骨髓成骨研究进展. 中华骨科杂志 1995; 15(7): 470—472.
8. 季 鸣, 顾云伍, 刘文杰. 骨外膜剥离对实验性骨折愈合的影响——超微结构研究. 中华骨科杂志 1994; 14(8): 498—501.
9. 张子军, 卢世壁. 内源性骨形态发生蛋白研究进展. 中华骨科杂志 1995; 15(8): 540—542.
10. 朱建民, 金宗达. 正常骨愈合的生物学基础. 中华骨科杂志 1992; 12(4): 293—295.
11. 陈其昕, 袁中兴, 刘 清, 等. 骨折愈合中修复性细胞增殖与骨形成的关系. 中华骨科杂志 1992; 12(4): 290—292.

(收稿: 1998-12-04 修回: 1999-06-05)