

# 创面愈合中巨噬细胞功能与异质性动态研究

## ——“偎脓长肉”作用机制研究之二

天津骨科研究所(300211) 李秀兰 徐尔真\* 师宜健 赵凤义

**摘要** 本文以家兔制作感染创面动物模型。皮下埋入改良 schilling 不锈钢管,获取创面渗出液,收集创面细胞。采用 Wright—Giemsa 染色创面细胞,发现在创面愈合中外用中药组创面渗出液中巨噬细胞(M $\phi$ )数量多,且游走型 M $\phi$  多于常驻型 M $\phi$ ,与对照组比较呈显著性差异。组织化染色发现 M $\phi$  细胞内酸性磷酸酶(ACP)和糖代谢的限速酶琥珀酸脱氢酶(SDH),在创面愈合中与对照组均有极显著差异。提示外用中药可激活创面细胞提高细胞内酶活性,对促进创面愈合起重要作用。

**关键词** 创面愈合 巨噬细胞功能 酸性磷酸酶 琥珀酸脱氢酶

本文以荧光染色法研究创面 M $\phi$  亚群,进一步阐明外用中药对 M $\phi$  功能的影响。

本文研究创伤愈合中创面 M $\phi$  功能和胞内酶活性的动态规律,探讨 M $\phi$  在创伤愈合中的作用,进一步阐明外用中药对 M $\phi$  功能的影响,为探明偎脓长肉的作用机制提供依据。

### 材料与方法

**创伤动物模型:**选用健康大耳白兔(天津动物实验中心)同窝体重 1.50kg~1.75kg,于兔背侧脱毛后 2%普鲁卡因 1ml/kg 局麻,切开皮肤 2cm 长,分离疏松结缔组织,将改良 Schilling 不锈钢管(无菌,长 5cm,外径 1.6cm,内径 1.4cm,管壁上钻有直径 0.1cm 的小孔,孔距 0.5cm,管内置入 0.15g 脱脂棉)植入皮下,缝合伤口后,外敷凡士林油纱条,包扎伤口,建立创伤动物模型。手术后随机分为四组、外用药物水煎剂生肌膏组,玉红膏组、黄连膏组和对照生理盐水组。隔日于创面皮下分别注入各组药液 1.0ml<sup>[1]</sup>。(每 ml 含生药 200mg)。

**M $\phi$  的获取:**本实验采用改良 Schilling 的不锈钢网桶法,为自制具有小孔的不锈钢管,管内置入脱脂棉,能存留较大的创面渗出液。在手术后第 4、7、14 和 21 天,取出皮下的钢管和管内棉团,收集创面渗出液。用 1000rpm 离心 10 分钟获取创面细胞。台盼兰活细胞染色,计数活细胞。作细胞涂片,Wright-Giemsa 染色,

观察 M $\phi$  形态特征并计算创面愈合不同时期 M $\phi$  所占细胞总数的百分比以及游走型 M $\phi$  所占比例。(每组观察 6 张标本,计数 100 个细胞)。

1. 显色方法:将获取的创面细胞用小牛血清稀释为  $1 \times 10^6$ /ml 作细胞涂片。采用 Logda 偶氮偶联法,37℃ 孵育 2 小时显示 ACP;以硝基兰四唑盐法,37℃ 孵育 2 小时显示 SDH<sup>[2]</sup>。

2. 积分分析:镜检涂片,每组观察 6 张标本,每张统计 100 个 M $\phi$ ,计算 M $\phi$  酶化学反应阳性率。根据 M $\phi$  酶反应强弱和细胞形态,将阳性反应的 M $\phi$  分为四种类型,以半定量积分法分别评分。I 类:细胞一般较大,酶反应颗粒极大,染色深,颗粒充满整个细胞,评 4 分。II 类:细胞呈活化状态,有伪足伸长,体积较大,但酶反应颗粒较小,大小不等,染色较浅(可能为酶分泌阶段),评 3 分。III 类:细胞呈活化状态,体积较小,酶颗粒大小不等,染色深浅介于 I、II 类细胞之间,评 2 分。IV 类:细胞未活化或稍显示活化状态,体积小,酶反应颗粒较少,评 1 分。将积分作统计学处理。

### M $\phi$ 异质性荧光染色

用上述方法获取对照组和生肌膏组创面渗出液。取  $2 \times 10^5$ /ml 细胞的创面渗出液滴在无菌载玻片上培养,37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养 2 小时。而后用无 Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup> 的 Hank's 液冲洗 3 次。显

显微镜下贴壁 Mφ > 95%，用 0.1% 硫代黄素染色 10 分钟。于荧光显微镜下观察。

### 结果

#### 1. 创面 Mφ 数量及活跃程度的观察

创面渗出液含大量细胞，包括 Mφ、中性粒细胞和淋巴细胞等。本实验重点观察 Mφ 数量，统计 Mφ 比率(见表 1)重复两次，结果一致。表一为其中的一次结果。结果显示，创伤后药物组 Mφ 均显著增多，特别是创伤后 14 天与对照组增长趋势虽相同，而增长程度有显著差异，t 检验比较  $P < 0.01$ ，说明外用中药可使创面 Mφ 迅速增殖和聚集。(见图 1)

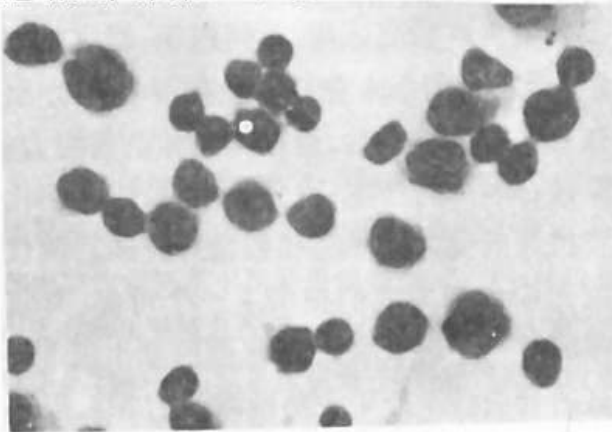


图 1 创面渗出液 Mφ

在创面愈合中，中药组游走型 Mφ 呈直线上升，而对照组稳定在一个较低水平。证明外用中药均可活化创面 Mφ。(见图 2)

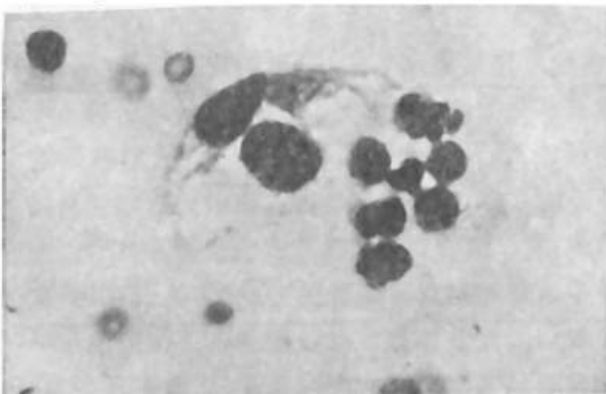


图 2 创面 Mφ 活跃

#### 2. 创面 Mφ 酶反应活性

(1) ACP 是上皮再生过程一类重要的胞浆水解酶，Mφ ACP 反应活性区呈棕红色，定位于细胞质，阴性反应细胞为淡黄色，外用中药生肌膏组与对照生理盐水组在创伤愈合中呈同步上升趋势。但两组比较有显著性差异  $P < 0.01$ ，

(见图 3)。外用中药组之间 ACP 动态变化规律一致。(见表 2)

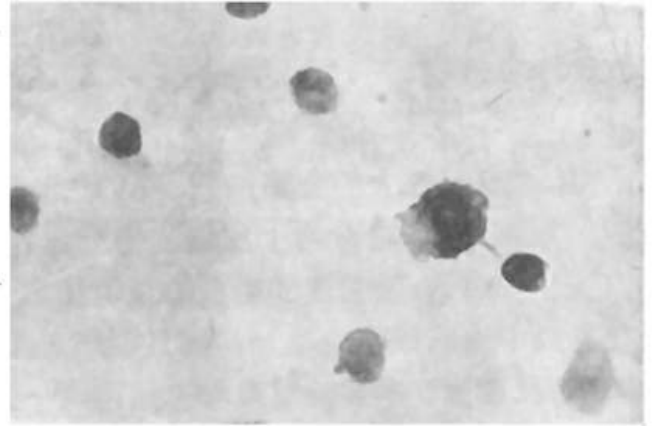


图 3 Mφ ACP

(2) SDH: SDH 定位于细胞质内，阳性反应呈紫蓝色颗粒。阳性为无色。镜检创面 Mφ，以半定量积分法分析 Mφ SDH 的相对含量。结果显示，生肌膏组 7 天出现上升峰而后继续维持在一个较高水平。对照组则无明显变化，t 检验 ( $P < 0.01$ )。其它各组外用中药与生肌膏组的动态规律一致。(见表 3, 图 4)

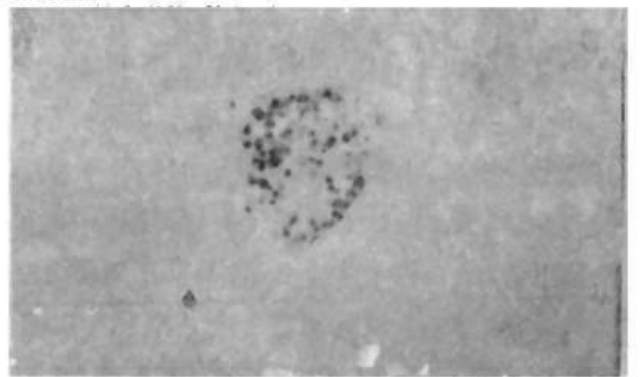


图 4 Mφ SDH

3. 创面 Mφ 的异质性: 创面 Mφ 经荧光染色后，亦显示 4 种不同颜色的荧光。I 型: 细胞质鲜兰，细胞核深兰。据已证明膜表面含有大量 Fc 和 C<sub>3</sub>b 受体并具有较强的吞噬和消化能力。II 型: 细胞质淡兰，细胞核兰色，功能仅略低于 I 型。III 型: 细胞质兰绿色，细胞核桔黄色，膜表面 Fc 和 C<sub>3</sub>b 受体的数目少，但具有良好的清除异物功能。IV 型: 细胞质黄色，细胞核桔红。认为是分化程度最高，趋于衰老的细胞。免疫活性最低，但具有一定的清除异物能力。

观察 Mφ 异质性的结果显示，在生肌长肉期创面 Mφ 无论是生肌膏组还是对照组均有明

显的异质性,且生肌膏组的 I、II 类 Mφ 明显高于对照组。经  $\sqrt{\text{six}^{-1}q}$  变换后,t 检验统计结果显示  $P < 0.001$ 。表明生肌膏组创面 Mφ 多为功能活跃型。

### 讨 论

Mφ 是机体最大的分泌细胞。ACP 是一种重要的溶酶体酶,它参与上皮细胞的分化和角化。Carranza FA,研究皮肤愈合的组织化学,发现在真皮中反应最强的是 Mφ,而且创伤 7 天后 MφACP 反应强。本实验结果与上述论点一致。创面 Mφ 含有大量 ACP,从创伤 7 天至愈合期 ACP 持续维持在较高水平,各组外用中药对创面 MφACP 有明显的激活作用,与对照组比较呈显著差异。提示外用中药加速创面愈合与 MφACP 促进上皮细胞分化和角化过程密切相关。

本实验结果表明,外用中药激活后的 Mφ,在创伤中期出现持续 SDH 分泌高峰,而对照组则出现在创伤 14 天以后,t 检验有极显著差异。这一结果与临床创面 Mφ 形态和功能研究一致,临床表现为创面此期脓液多而稠,创面趋向好转。Mφ 氧化吞噬功能强,Mφ 处于活跃状态的多。可见外用中药激活 LDH 和 SDH 为

Mφ 提供了维系功能状态的重要能源。

近年来文献报道明确提出,Mφ 是重要的免疫调控细胞。许多研究者将 Mφ 分为两型,常驻型和游走型<sup>(3)</sup>。游走型是一类具有分泌活性和免疫调节功能的 Mφ。它来源于血单核细胞,在炎症等应激状态下可迅速迁移到病变部加强局部免疫功能。常驻型是固定于组织中的 Mφ。这类细胞个小,胞浆少呈不活跃状态。实验中发现,对照组创面 Mφ 在创伤愈合后期虽有所增加,而游走型 Mφ 却相对恒定。而外用中药组游走型 Mφ 呈直线上升。证明外用中药不仅是 Mφ 的激活因子还是 Mφ 的趋化和迁移因子。

大量资料研究证明,不同组织、器官或同一组织、器官中的 Mφ 在许多生物学特性方面均存在着明显的异质性。包括噬菌和杀菌能力,免疫原性;RNA 的产生;酶分泌活性;体外趋化性和膜抗原或受体的性质和数量等方面。硫代黄素荧光染色法为我们提供了一个可靠、有效和简便的鉴别手段。我们发现创面渗出液 Mφ 有明显的异质性。外用中药所激活的 Mφ,以免疫功能活跃的亚群占优势。表明外用中药促进创面愈合与这类亚群 Mφ 数量增多有关。

表 1:外用中药组在创伤愈合中 Mφ 比率  $\bar{x} \pm SD$

时间 组别	4 天	7 天	14 天	21 天
对 照 组	16.00±5.41	18.45±7.49	22.66±3.78	19.50±2.88
生 肌 膏	28.75±5.85	30.50±4.43	36.75±1.25	33.50±2.64
玉 红 膏	21.50±1.32	22.25±4.83	29.00±3.46	28.00±2.82
黄 连 膏	23.25±1.89	24.75±2.50	29.00±1.82	32.00±2.70

F 检验 Fa 和 Fb 均值  $P < 0.01$

表 2:创伤愈合中 Mφ 比率 ACP 酶积分相对含量的动态变化  $\bar{x} \pm SD$

时间 组别	4 天	7 天	14 天	21 天
对 照 组	55.25±4.42	59.50±5.85	80.66±6.50	77.00±8.12
生 肌 膏	68.25±1.89	77.50±5.25	96.50±9.71	92.50±3.51
玉 红 膏	63.00±8.28	70.25±8.80	102.25±12.84	100.25±13.81
黄 连 膏	67.00±3.26	76.00±8.83	89.50±10.27	87.50±4.35

表 3:外用中药在创面愈合中 Mφ · SDH 积分相对含量动态  $\bar{x} \pm SD$ 

时间 组别	4 天	7 天	14 天	21 天
对照组	86.66 ± 3.51	85.75 ± 4.34	89.00 ± 4.89	77.25 ± 2.62
生肌膏	104.00 ± 4.35	118.50 ± 12.87	113.00 ± 5.03	104.50 ± 9.11
玉红膏	106.33 ± 16.01	109.00 ± 4.96	101.25 ± 4.34	95.50 ± 9.94
黄连膏	90.00 ± 2.00	92.25 ± 6.70	96.00 ± 4.34	90.25 ± 5.43

## 参考文献

1. 李秀兰,等.外用中药作用机制的研究.中西医结合杂志 1987;7(4):229.
2. 陈啸梅,等.组织化学手册.人民卫生出版社.1982;

233.

3. Carr I. The Macrophage: A review of ultrastructure and function. New York 1973;5~10.

(收稿:1993-10-8 修回:1994-06-29)

## 透明质酸钠在骨科的临床应用

北京军区总医院(100700) 刘宇静

近年来透明质酸钠作为一种可吸收的高分子生物医用材料已被广泛应用于外科手术和骨关节病中,它可在生物性修复术中隔开组织表面,作为一种机械保护剂术后防止粘连及纤维性组织形成,抑制出血,减少形成永久性粘连骨块数量,抑制纤维细胞的运动和活性。

关节的主要结构是由关节软骨,滑膜和关节液及连接性细胞层的基质相隔而成,关节液中主要含有蛋白质和糖胺聚糖,糖胺聚糖几乎都是透明质酸 HA。关节腔内的 HA 具有保持关节液的粘稠性,保护关节软骨表面,润滑骨关节等许多重要生理机能。当骨关节患病时,(HA)会被水解酶水解,关节液炎症时也会增多,致使 HA 浓度降低,关节病日趋严重,若能及时补充高分子量且高度粘弹性的透明质酸钠制剂,就会对关节功能的恢复起积极作用。基于这一原理,将其用于骨关节病的治疗具有明显疗效。尤其是对骨关节炎、类风湿性关节炎、肩周炎、损伤性关节炎以及关节手术中软骨保护和术后预防关节粘连等均有显著疗效。以膝关节为例,具体方法如下:采用上海建华生物制品厂生产的透明质酸钠作膝关节注射,用 9~12 号针头抽取透明质酸钠 2.5ml,膝关节常规消毒,选取髌骨外上或外侧穿刺点,在髌骨关节间穿刺,依次穿透皮肤、深筋膜、关节囊、滑膜,进入关节腔,回抽关节液,若关节内积液,应先抽出关节液后再进行注射,确认注射于关节腔内(上述过程可在局麻下进行)。注射完成后,被动活动膝关节,使透明质酸钠均匀涂布于膝关节表面。但一定要

注射在关节腔内,否则会有鼓包凸起。不能注射在滑囊或关节腔外,也不能作静脉或组织内注射。每间隔一周重复注射,五次为一个疗程。上海海军医院曾作过 21 例 24 膝,主要是中老年患者,其中女 13 例,男 8 例年龄最小 41 岁,最大者 81 岁,6 膝注射 2 小时后有酸胀感,约 12 小时左右消失,再注射后未出现同样感觉,做完 5 次治疗后,疼痛消失及明显改善者 19 膝占 79.2%,稍有改善及无改善者 5 膝,占 20.8%。北京军区总医院骨科也作过几例,效果与上述情况基本吻合。迄今为止未发现因注入 HA 治疗而发生关节感染的,个别病人注射局部可能有瞬时性疼痛或发热感,偶尔有皮疹或搔痒症状,但未见全身过敏反应。有感染性关节炎的除外。不同部位的关节注入剂量不同,如膝关节为 2.5ml,肩周炎则用 1ml,这要根据具体部位而定。注入关节腔内的 HA 约在 3 天内自关节液中逐步消失分布于关节组织内。外源性 HA 并不参与关节液代谢,只是进入滑膜组织,一部分低分子化后进入血液流至肝脏内代谢,经过大量的动物实验和临床应用发现 HA 具有如下几种主要作用:1. 覆盖关节软骨表面,保护软骨,对关节软骨的变性有抑制作用,抑制蛋白多糖从软骨基质中析出。2. 保护关节组织,抑制疼痛,增加关节活动度,改善关节挛缩即对关节功能有改善作用。3. 促进滑膜组织分泌透明质酸,对病态关节液有作用,对自身高分子 HA 生物合成有促进作用。

(收稿:1994-08-19 修回:1994-11-21)

## Abstract of Original Articles

### Observation of the rabbit tibial interfragmental gap in vivo by light guide fiber method

Zou Bing-zeng(邹炳曾) Shang Tian-yu(尚天裕) Song Yue(宋跃) Zhao Hong-pu(赵洪普)

*Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of TCM(100700)*

In this article, changes of the healing process of rabbit tibial interfragmental gap treated with small splints and intramedullary nail fixation were observed. Through light guide fiber method, image pattern analysis measurements and radiographic analysis of the callus, the results showed that the mean value of fracture interfragmental gap decreased along with increasing of the time. There are also correlation between the tendency of changes of fracture and post-fracture time and burden of the limb ( $p < 0.01$ ). Roentgenogram showed that the fractures were healed by the external bridge callus across the fracture site at sixth week. The results suggested that longitudinal displacement within  $0.33 \pm 0.17 - 0.95 \pm 0.43$  mm of the experimental rabbit tibial fracture ends can facilitate bone healing.

**Key words** Fracture healing Fracture end gap Light guide fiber method Rabbit

### Phagocytic function and heterogenicitic motive studies of surface wound healing

—Studies on the mechanism of Wei Nong Zhang Rou(2)

Li Xiu-lan(李秀兰) Xu Er-zhen(徐尔真) Shi Yi-jian(师宜健) Zhao Feng-yi(赵凤仪)

*Tianjin Institute of Orthopaedics(300211)*

Rabbit infected surface wound models were prepared. Wound exudation and surface wound cells were collected with modified Schilling stainless steel tube embedded in the hypoderm. The surface wound cells were stained with Wright-Giemsa stains. It was found that number of macrocytes(M) increased during process of the surface wound healing in external application of Chinese drug group, besides the wandering macrocytes were more than permanent ones. The differences were significant statistically. Through histochemical staining, there were very significant difference of the acid-phosphatase (AcP) and sugar metabolic rate-limiting succinate dehydrogenase (SDH) between surface wound healing and control group. It is suggested that external application of Chinese medicine can activate surface wound cells and elevate intracellular enzymic activity. It plays an important role in promoting surface wound healing.

**Key words** Surface wound healing Macrocytes Acid phosphatase Succinate dehydrogenase

### A comparison between two kinds of internal fixation in treating fracture of patella

Cai Hua(蔡桦) Zhan Jie-hui(詹杰辉)

*Affiliated Hospital of Orthopaedics, Guangzhou College of TCM(510240)*

Fifty-three cases of fracture of patella were treated with coarse silk thread cerclage internal fixation in 39 cases, and tension steel wire internal fixation in 14 cases. Three months postoperatively showed that the former was superior than the later. It is because in later group tail of the Kirschner pin brought a touching pain postoperatively, so recovery of the function was generally slower than the

former group. It is suggested that in the treatment of fracture of patellar the former method was first choice.

**Key words** Fracture of patellar Internal fixation of fracture Clinical study

**Eighty-two cases of open tibio-fibular fracture treated with integration of traditional Chinese and modern medicine**

Lu Ding-quan(陆鼎铨)

*Fu Yang City People's Hospital, Zhejiang Province(311400)*

Better results were obtained in the treatment of **82** cases of open tibio-fibular fracture treated with integration of traditional Chinese and modern medicine. It is advised to let the open fracture becoming closed fracture after through debridement. During external fixation the patient kept in sitting position, let the affected limb hanging naturally in order to reduce the fracture ends in position correctly by means of gravity, then correct external fixation was applied instead of internal fixation. Application of drugs according to differentiation of symptom-complex in different stages and early functional exercises were emphasized.

**Key words** Fracture of tibia and fibula Integration of traditional Chinese and modern medicine

**Compressive fracture of thoracic and lumbar vertebrae treated with buttock-shoulder style of training**

Ye Jin(叶劲) Bai Shu-chen(白书臣)

*Affiliated Hospital of Hubei College of TCM(430061)*

In this article, a kind of new functional exercise was introduced in the treatment of compressive fracture of thoracic and lumbar vertebrae. Twenty eight cases were treated. After a follow-up study of **3-41** months, satisfactory results were found in **24** cases. The characteristics of the exercise are small amplitude of movement, easy to be carried on, they were well accepted by middle and senile patients. The difference between the method and traditional therapy was introduced.

**An analysis of reoperated cases following replacement of the femoral head in senile**

Zhou Zhang-wu(周章武)

*Affiliated Hospital of Anhui College of TCM(230031)*

Twenty-nine reoperated cases following failure of replacement of the femoral head have been performed from March of **1979** to Feb. of **1992**. Regarding the main causes of **reoperation**, inappropriate between the head and acetabulum and loosening of the prosthesis; secondly **breaking** of prosthesis, infection and dislocation etc. were also mentioned. Prophylactic measures were suggested.

**Key words** Artificial femoral head Neck-shaft angle of the femur Anterior incline angle of the femur