

中药胶剂修复半月板损伤的实验研究

张磊 高云 吴林生

(中国中医研究院骨伤科研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的 观察中药胶剂促进半月板损伤修复的效果, 并探讨其作用机理。方法 选用同样条件饲养, 体重 3kg 左右的健康成年日本大耳白兔 80 只, 雌雄不拘, 每组 40 只, 均采用左右侧自身对照, 侧别由掷币法随机决定。一组动物为空白对照, 即一侧半月板裂伤植入中药胶剂, 另一侧裂伤不做任何处理; 另一组动物为实验对照, 即一侧裂伤植入中药胶剂, 另一侧裂伤植入物理性状与该中药胶剂相似的明胶。在日本大耳白兔双侧下肢内侧半月板前 1/3 处横行切断造成半月板损伤模型, 一侧植入中药胶剂, 另一侧为对照组。术后 6 周、12 周、24 周分批处死动物取材。标本用于大体观察、光镜下组织学观察、扫描电镜观察和生物力学测试。结果 实验组裂伤部很快被肉芽样修复组织完全填充, 有血管长入, 创缘有软骨细胞增殖现象, 随后修复组织逐渐演变为正常半月板的纤维软骨组织。结论 实验证明该中药胶剂能够诱导血管和修复细胞进入半月板裂伤部, 包括原来并无血运的区域, 激发修复反应, 有效地促进半月板损伤的修复, 而且较之其它方法更为简便易行。其机理在于该中药胶剂能够有效地改善损伤局部的血液供应状态, 刺激半月板纤维软骨细胞增殖, 并为新生血管和修复细胞提供修复支架。

【关键词】 中草药 半月板损伤 组织学 生物力学

Meniscal repair using a Chinese herbal medicinal gel: an experimental study in rabbits ZHANG Lei, GAO Yun, WU Lin-sheng. Institute of Orthopedics and Traumatology, China Academy of TCM (Beijing, 100700)

【Abstract】 Objective To study the effect of a Chinese herbal gel on repair of meniscal injury, in order to find an easy and effective way to promote the repair of this injury, especially those in the avascular portion.

Methods Eight healthy adult white rabbits with big ears, 3kg weight or so without limitation in sex were fed in the same conditions. The animals were randomly divided into two groups: the control and gelatin control groups. In gelatin group, Chinese herbal medicinal gel was implanted into one side of meniscal lesion while no management was done in the contralateral side of the uninjured meniscus. In gelatin control group, Chinese herbal medicinal gel was implanted into one side of lesion and gelatin (Sigma Co. TAPE B) whose physical properties were similar with the Chinese medicinal gel was implanted into other side. The gelatin control was established so as to prove the repairing effect of the Chinese herbal gel depending not only on its physical action, but to a larger extent on its pharmacological action. The meniscus were cut transversely at the anterior 1/3 of medial meniscus. Models in both sides were established and Chinese herbal medicinal gel was implanted into one side of lesion. The other side served as the control group. The animals were sacrificed at 6th, 12th and 24th weeks respectively after operation. The specimens were removed for gross observation, histological and scanning microscope observations and biomechanical testing. **Results** The meniscal lesions of the experimental side were quickly filled with granular like repairing tissue. The newly developed vessels could be seen growing into the repairing tissue with the chondrocytes proliferating at the peripheral margin of the lesion. Then the repairing tissue gradually developed into the fibrocartilaginous components resembling normal meniscus. **Conclusion** The Chinese herbal gel can induce the growth of vessels and repairing cells into the meniscal lesion including the former avascular portion and stimulate the repairing response and thus promote the repair of meniscal lesions effectively. This method is easier to be carried out in comparison with other methods. The Chinese herbal gel's mechanism of promoting the repair of meniscal injuries lies in the fact that the Chinese herbal ingredients can improve the status of blood supply of the injured area effectively, stimulate the proliferation of meniscal chondrocytes and provide the scaffold for the newly developed vessels and the repairing cells.

【Key Words】 Drugs, Chinese herbal Meniscal injury Histology Biomechanics

半月板损伤是骨科常见疾病,而半月板的自身修复能力相当有限,尤其是半月板无血运区域损伤的修复一直是一个棘手的世界性难题。一些中药成分能够显著地改善组织的血液循环状态,促进组织的修复。将中药制成胶剂直接作用于半月板损伤局部,可能会诱导血管长入半月板无血运区,激发修复反应,并为修复细胞提供修复支架,而目前国内外还未见此报道。本研究利用自制的中药胶剂(主要成分为大黄、川芎、丹参、血竭、三七等),通过动物实验,结合形态学和生物力学手段,观察该中药胶剂修复半月板损伤的效果,以寻找一种促进半月板损伤修复,特别是半月板无血运区损伤修复的简便而有效的新方法。

1 材料与方 法

选用同样条件饲养,体重 3kg 左右的健康成年日本大耳白兔 80 只,雌雄不拘,每组 40 只,均采用左右侧自身对照,侧别由掷币法随机决定。一组动物为空白对照,即一侧半月板裂伤植入中药胶剂,另一侧裂伤不做任何处理;另一组动物为实验对照,即一侧裂伤植入中药胶剂,另一侧裂伤植入物理性状与该中药胶剂相似的明胶(Sigma. Co. TAPE B),设立实验对照组是为了证明促进修复的效果并非该中药胶剂的物理作用所致,而主要是由其药理作用所致。

用 3% 戊巴比妥钠耳静脉推注将兔麻醉后,无菌条件下用尖刀在内侧半月板前 1/3 处将半月板横形切断。双侧造模并确信半月板已被完全切断后,掷币随机决定在哪一侧的半月板裂伤处植入中药胶剂,另一侧不做处理或植入明胶。逐层缝合切口,无菌敷料包扎。术后笼中饲养,任其自由活动。

术后 6 周、12 周、24 周分批处死动物取材。术后 6 周处死空白对照动物和实验对照动物各 8 只,取得空白对照侧标本 8 个,实验对照侧标本 8 个,实验侧标本 16 个,均用于大体观察和光镜下组织学观察;术后 12 周处死空白对照动物和实验对照动物各 16 只,取得空白对照侧标本 16 个,实验对照侧标本 16 个,实验侧标本 32 个,每组标本各取 8 个用于生物力学测试,其余用于大体观察和光镜下组织学观察;术后 24 周取材数量及分配与术后 12 周基本相同,只是其中 2 个实验侧半月板标本用于扫描电镜观察。生物力学测试标本置于生理盐水中,并迅速修整为长 5mm、宽 2mm、厚 1mm 的标本块,上国产 WD- I 型万能电子试验机,进行纵向拉拽,直至将标本块完全拉断为止,测出其最大纵向抗张力值。

并另取 8 个正常的兔半月板标本,以同样的方法测出兔正常半月板标本的最大纵向抗张力值作为参照。将各组数据进行统计学处理(t 检验),以比较各组间修复组织的力学强度。

2 结果

2.1 大体观察 术后 6 周,所有的实验侧半月板裂隙已完全被一种红色的肉芽样组织填充,修复组织质地柔软,与周围正常半月板组织连接紧密。空白对照侧和明胶对照侧裂隙内无任何组织填充。

术后 12 周,实验侧半月板裂隙已完全消失,原裂隙内的红色肉芽样修复组织已演变为白色的、致密且较为坚韧的组织,外观上与正常的半月板组织十分接近,但在原裂伤区游离缘处仍可见粉红色的质地柔软的纤维结缔组织。空白对照侧裂隙内仍无修复组织填充,仅在裂伤部外缘半月板滑膜附着部有白色的纤维样组织连接。明胶对照侧断端间中部可见少许纤维样组织连接。

术后 24 周,实验侧半月板外观上已与正常的半月板组织无异,仅在游离缘的局部还残留有修复的痕迹。空白对照侧半月板裂伤区外 1/2 已得到修复,但内侧游离缘未能愈合。明胶对照侧连接组织仍集中于原裂伤区中部。

2.2 组织学观察 术后 6 周,实验侧裂伤部已被肉芽样修复组织完全填充,内有成纤维细胞及一种均质无结构状物(中药胶剂中的胶剂成分),周围有许多吞噬细胞包绕,并逐渐被吞噬细胞分割、吞噬,演变为纤维结缔组织。创缘有软骨细胞增殖现象。修复组织内已有血管长入,即使在无血液供应的游离缘部分,亦能见到新生的血管。空白对照侧和明胶对照侧断端有坏死迹象,中间无任何修复组织产生,仅在外缘滑膜附着部有少量滑膜组织连接。

术后 12 周,实验侧裂伤区内胶原纤维含量大大增加,细胞增殖,成纤维细胞已分化为细长的纤维细胞,朝一个方向排列,均质无结构状物和吞噬细胞明显减少。空白对照侧修复组织只限于外侧滑膜缘附近,胶原纤维和其内的纤维细胞排列整齐。明胶对照侧的修复组织连接断端的中部,内含成纤维细胞和少量纤维细胞,未见血管。

术后 24 周,实验侧修复组织已经演变为纤维软骨组织,仅在裂伤区游离缘局部还残留了一小部分均质无结构状物处在机化、吸收过程中。空白对照侧游离缘部仍有一较大的裂口未能愈合。创缘下方可见部分细胞退变迹象。明胶对照侧半月板修复组

织仍未能填充整个裂伤区。

2.3 扫描电镜观察 术后 24 周, 实验侧半月板的修复组织与周围正常半月板组织愈合良好, 外观与周围正常的半月板组织十分相似, 而在原裂伤部游离缘处, 修复组织的局部区域在形态上与周围区域的修复组织及正常半月板仍有所区别, 但其内的胶原纤维排列及细胞分布已近似于正常的纤维软骨组织。

2.4 生物力学测试(见表 1)

表 1 术后半月板最大纵向抗张力平均值(kg, $\bar{x} \pm s$)

组 别	12 周	14 周
实 验 侧	6.09 ± 0.139	7.33 ± 0.475
空白对照侧	2.02 ± 0.225	4.03 ± 0.175
明胶对照侧	1.61 ± 0.39	3.93 ± 0.201
正常半月板	8.74 ± 0.125	8.74 ± 0.125

术后 12 周和术后 24 周空白对照侧与明胶对照侧比较 $P > 0.05$, 其余各组间比较 P 值 < 0.05 。结果表明, 实验侧半月板的生物力学强度明显优于空白对照侧和明胶对照侧, 但即使是术后 24 周, 与正常的半月板组织相比, 仍有显著性差异。各组自身相比, 术后 24 周时的力学强度均优于术后 12 周。在修复时间相同的条件下, 空白对照侧半月板和明胶对照侧半月板的力学强度无明显差别。

3 讨论

组织损伤的修复依赖于其自身的血管系统, 半月板也不例外, 但半月板只有外周 10% ~ 30% 的区域能够得到血液供应^[1], 位于该区域的损伤可产生与其它结缔组织类似的修复反应: 水肿、机化、增生和塑形, 而其它无血液供应区域的损伤则不能自行修复^[2]。建立血管通道^[3]和带蒂滑膜瓣植入^[4]的方法修复半月板损伤获得了成功, 证明只要使血液供应到达损伤局部, 即使是半月板无血运区的损伤也能得到修复, 而且修复组织最终能够化生为纤维软骨, 整个过程需要几个月的时间。

分析整个修复过程, 对比两个对照组的观察结果, 我们认为该中药胶剂能够诱导血管和修复细胞进入半月板裂伤部, 包括原来并无血运的区域, 激发修复反应, 使新生的修复组织迅速充满整个裂伤区域, 随后在生理应力的作用下^[5]逐渐化生为近似正常半月板的纤维软骨组织。其作用机理在于胶剂内

的中药成分有效地改善了损伤局部的血液供应状态, 保证了组织再生所需要的氧和营养物质的供应, 还能刺激邻近损伤区域的半月板纤维软骨细胞增殖。胶剂的物理特性使其能够粘附在裂隙间, 使药物直接、持续地作用于损伤局部。胶剂中的凝胶态物质还可能为新生血管和修复细胞提供修复支架, 并在修复过程中不断地被组织吞噬吸收。

从国外的一些实验研究报告当中可以看出, 目前促进半月板损伤修复的方法多集中于两个方面, 一是促使血液供应进入半月板的无血运区域(如建立血管通道), 二是为修复细胞提供修复支架或刺激愈合(如外源性纤维蛋白凝块的植入^[6])。本实验证明该中药胶剂兼有这两方面的作用, 能够有效地促进半月板损伤的修复, 而且较之其它方法更为简便易行。但还存在着一些问题, 比如其中哪种或哪几种中药成分对半月板损伤的修复最为有效? 如果动物模型改为单纯的半月板游离缘损伤, 而不涉及滑膜缘, 是否也能取得相同的效果? 胶剂中的中药成分刺激纤维软骨细胞增殖的机理是什么? 此外, 由于半月板组织的生物力学特性极为复杂, 目前国际上还没有公认的能够较为全面地反映半月板组织力学特性的检测方法, 我们在实验中采用的测量半月板最大纵向抗张力值的方法, 在一定程度上能够反映修复组织的力学特性, 但还不全面, 远期结果也不太清楚。这些问题都还有待于进一步研究。

(本文图 1~ 6 见插页第 1 页)

参考文献

[1] Danzig L, Resnick D, Gonsalves M, et al. Blood supply to the normal and abnormal menisci of the human knee. Clin Orthop, 1983, 172: 271-276.

[2] Veth RPH, Den Heeten GJ, Jansen HWB, et al. Repair of the meniscus: An experimental investigation in rabbits. Clin Orthop, 1983, 175: 258-262.

[3] Gershuni DH, Skyhar MJ, Danzig LA, et al. Experimental models to promote healing of tears in the avascular segment of canine knee menisci. J Bone Joint Surg, 1989, 71A: 1363-1370.

[4] Meniscal repair using a flap of synovium. A experimental study in the dog. Am J Knee Surg, 1995 Spring, 8(2): 52-55.

[5] 王亦聰, 毕五蝉. 膝半月板损伤(二): 膝半月板损伤的修复及临床治疗. 中华骨科杂志, 1990, 10(5): 378-381.

[6] Arnoczky SP, Warren RF, Spivak J. Meniscal repair using an exogenous fibrin clot: An experimental study in dogs. J Bone Joint Surg, 1988, 70A: 1209-1217.

(收稿: 2000 03 10 编辑: 李为农)

转化生长因子 β_1 在骨折愈合过程中的表达

(正文见 453 页)

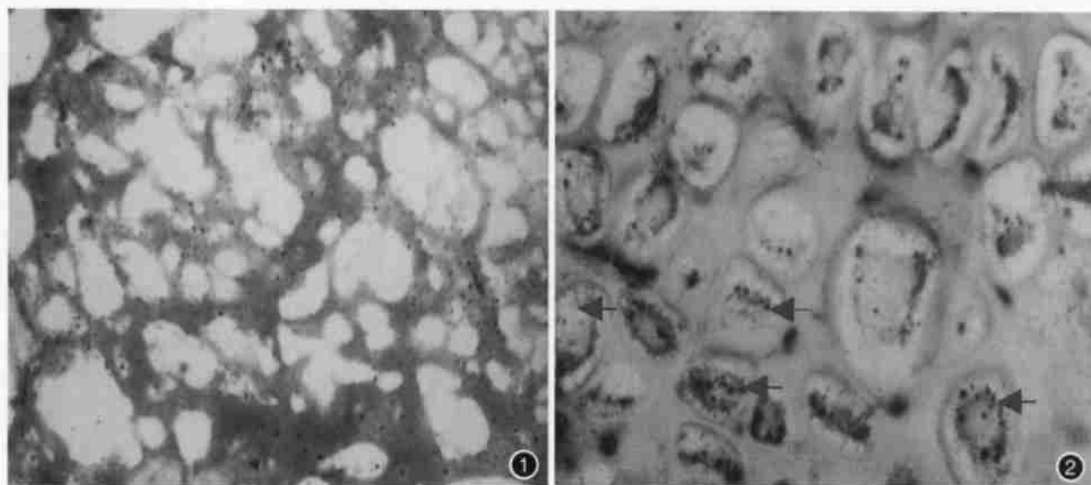


图 1 在骨折愈合早期(骨折后 3 天), 水肿内以无核的红细胞为主, 细胞之间可见杂交阳性颗粒。DIG 标记寡核苷酸原位杂交法 HE 复染 $\times 400$ 图 2 在软骨形成期(骨折后 10 天), TGF β_1 在进一步扩大的软骨小岛的软骨细胞内持续高表达(箭头所示)。DIG 标记寡核苷酸原位杂交法 HE 复染 $\times 400$

中药胶剂修复半月板损伤的实验研究

(正文见 456 页)

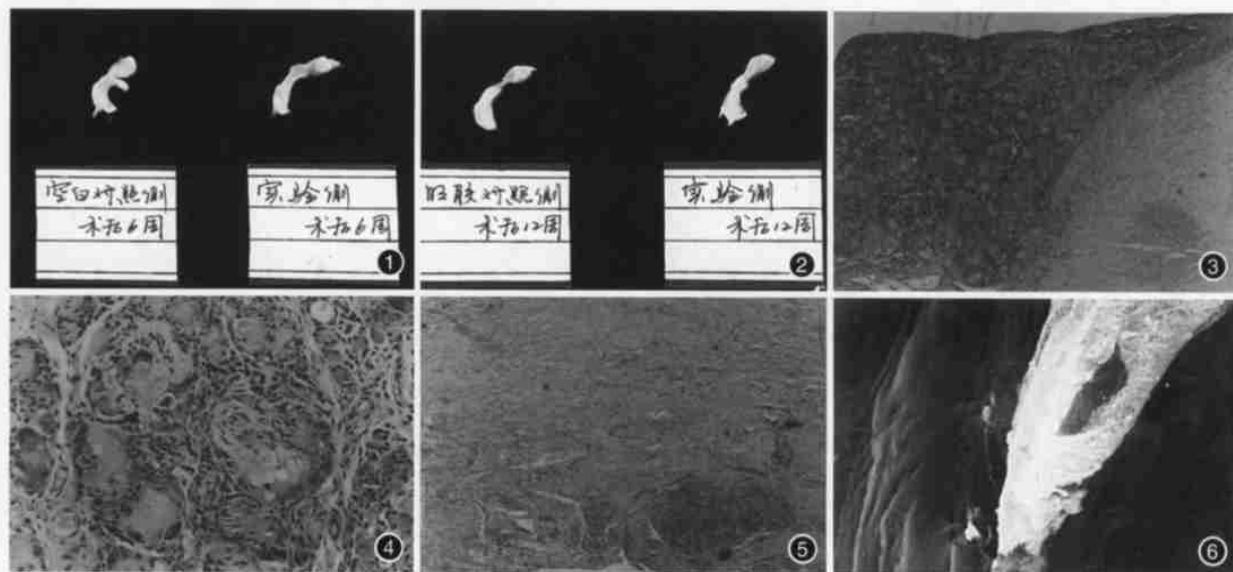


图 1 术后 6 周, 大体观察见实验组半月板裂隙已被肉芽样修复组织完全填充。图 2 术后 12 周, 大体观察见实验组半月板已基本修复。图 3 术后 6 周, 实验组, 见半月板裂隙已被肉芽样修复组织完全填充, 创缘附近的正常半月板组织有纤维软骨细胞增殖现象。HE 染色 $\times 4$ 。图 4 术后 6 周, 实验组, 修复组织内已有血管长入, 有成纤维细胞及一种均质无结构状物, 周围有许多吞噬细胞包绕, 并逐渐被吞噬细胞分割、吞噬, 演变为纤维结缔组织。HE 染色 $\times 20$ 。图 5 术后 24 周, 实验组, 修复组织已经演变为纤维软骨组织, 仅在裂伤区游离缘局部还残留了一小部分均质无结构状物处在机化、吸收过程中。HE 染色 $\times 4$ 。图 6 术后 24 周, 实验侧半月板的修复组织与周围正常半月板组织愈合良好, 外观与周围正常的半月板组织十分相似, 呈平行的波浪形丘状峰。而在原裂伤部游离缘处, 修复组织的局部区域在形态上与周围区域的修复组织及正常半月板仍有所区别。扫描电镜观察, 15KV, $\times 300, 1000\mu\text{m}$ 。