

# 中药接骨丸促进肾虚骨折愈合的生物化学研究

冯坤 刘月桂 郭建刚 毛书歌 陈宝龙  
(洛阳正骨医院正骨研究所, 河南 洛阳 471002)

**【摘要】** 目的 研究中药接骨丸对肾虚骨折愈合的治疗作用。方法 24 只种兔造成桡骨中段 0.7cm 缺损并分成三组, 对照组和用药组用强的松造成家兔肾虚模型, 空白组不用激素。用药组口服中药接骨丸, 另两组自然饮食, 术后第 3、6 周取材, 观察中药接骨丸对肾虚模型动物骨折修复的影响。结果 对照组动物骨痂修复指标均低于空白组和用药组, 中药接骨丸有拮抗强的松、抑制骨折修复的作用, 表现在实验组动物的修复骨痂的骨矿含量、骨密度、骨痂钙、磷含量和碱性磷酸酶活性均高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 血液粘度低于对照组 ( $P < 0.05$ )。结论 中药接骨丸对肾虚性骨折的愈合修复有明显的促进作用。

**【关键词】** 骨折愈合 中草药 肾虚

**A biochemical study of the effect of "JIEGUWAN" on improving fracture healing of rabbits with SHENXU**  
FENG Kun, LIU Yuegui, GUO Jiangang, et al. Luoyang Orthopaedics and Traumatological Institute of Henan (Henan Luoyang, 471002)

**【Abstract】 Objective** To study the therapeutic effect of "JIEGU WAN" (JGW) (herb pills for enhancing fracture healing) on fracture healing in animal models with SHENXU (kidney deficiency). **Methods** The bilateral mid shaft defects of 7mm were made in the radii of 24 rabbits, which were then divided into three groups. 1. The JGW group and 2. The control group in both of them prednisone was used to produce SHENXU, and 3. The blank group was raised with routine feeding without receiving prednisone. JGW group were treated with JGW and other two groups (the control and the blank) had the same fracture and received no JGW. The animals were sacrificed at 3rd and 6th weeks for blood and callus analysis. **Results** The indices of callus repair in control group were lower than that of blank and JGW group, the plasm ALP and BMC, BMD, Ca and P of callus in JGW group were markly higher than that of control group ( $P < 0.05$ ). The blood viscosity of JGW group was significantly lower than that of control group. **Conclusion** Fracture healing was inhibited by prednisone. JGW antagonized this inhibition and improved the process of fracture healing.

**【Key Words】** Fracture healing Drugs, Chinese herbal Kidney deficiency

我院采用补肾活血中药制成中药接骨丸, 临床用于治疗骨折延迟愈合和不愈合取得良好的疗效。本文采用皮质激素致肾虚并造桡骨缺损的动物模型, 观察了实验性肾虚证对骨折修复的影响, 用生化方法对中药接骨丸治疗肾虚骨折的疗效进行研究及评价。

## 1 材料与方

**1.1 动物及造模** 实验用健康日本大耳白家兔 57 只(第四军医大学动物中心提供), 雌雄兼用, 体重 1.8~ 2.3kg, 随机分成空白组、对照组和实验组。3% 戊巴比妥钠 1ml/kg 静脉麻醉, 按无菌原则手术, 取前臂中段内侧约 3cm 切口, 剥离骨膜, 双锯片锯除桡骨中段 0.7cm, 造成双侧骨缺损, 冲洗止血, 缝合皮下组织和皮肤, 术后庆大霉素抗感染治疗三天。术后一周开始用药实验: 空白组动物常规喂养; 对照组动物常规喂养加强的松 ( $6\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ); 实验组动物用含中药接骨丸的饲料喂养 ( $1.5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 加强的松 ( $6\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。强的

松片晨间一次给足全日量, 两周后开始减量, 三周后停药, 中药接骨丸全程给药。

**1.2 药物制备** 中药接骨丸由续断、骨碎补、杜仲、鹿茸、自然铜等 13 味中药组成, 上药共为细末, 炼为蜜丸, 每丸 9g。中药接骨丸由河南洛正制药厂加工制备, 强的松片为河南省南阳化学制药厂生产, 批号 971027。

## 1.3 分析方法

**1.3.1 血样分析** 用乙醚麻醉, 取颈静脉血, 一部分用肝素抗凝, 制成抗凝血, 另一部分制成血清。血清钙 (s-Ca) 测定采用 MTB 络合法, C.V < 4%, 反应温度 25℃, 波长 610nm; 血清磷 (s-Pi) 采用硫酸亚铁还原法, C.V < 2%, 反应温度 25℃, 波长 680nm。用抗凝血测全血高切粘度 (300/s)、低切粘度 (3/s)、全血还原粘度 (R.V.)、细胞压积 (%)、红细胞聚集指数 (TK) 和红细胞变形能力 (ARBC)。离心取血浆, 测定血浆粘度 (P)。用 G. P. O-T rinder 法测定血浆甘油三酯 (p

TG) 含量, C. V < 1. 5%; 用 Enzymatic Trinder 法测定血浆胆固醇( $\rho$  CH) 含量, C. V < 2. 3%。以上分析采用上海荣盛生物试剂厂生化试剂盒。采用 IFCC 推荐的方法测定血浆碱性磷酸酶( $\rho$  ALP), 北京中生生物工程公司试剂盒。

**1.3.2 骨痂分析** 处死动物, 离断腕肘关节, 取完整尺桡骨, 剔除附着的软组织, 在双能 X 线骨密度仪的 small animal 程序下, 用 Region High Precision 扫描模式测定骨痂之骨矿含量 (Bone mineral content, 简称 BMC, 批间 C. V < 1. 8%, 批内 C. V < 1. 1%) 及骨密度 (Bone mineral density, 简称 BMD, 批间 C. V < 1. 5%, 批内 C. V < 0. 9%)。准确取出缺损内的新生骨痂, 用丙酮震荡脱水, 真空干燥后称重。再用 10% 三氯醋酸抽提骨痂钙, 用 EDTA 滴定法测定骨痂总钙量 (Ca), 用钼酸铵法测定骨痂磷 (P)<sup>[1]</sup>。真空干燥脱钙骨, 准确称重。用 0. 1% 的木瓜酶 (0. 1M 磷酸缓冲液, pH6. 8, 含 2mM EDTA Na<sub>2</sub>, 5mM 半胱氨酸) 于 68℃ 条件下消化骨有机质 8h。取部分消化液用 Bitter 法<sup>[2]</sup>测定糖醛酸 (UA), 剩余消化液加等量浓盐酸, 在 108℃ 条件下继续消化 16h, 用 Newman 法<sup>[3]</sup>测

定羟脯氨酸 (Hop)。

**1.4 分析仪器** HP8452A 紫外可见分光光度计 (美国惠普公司), FASCO 94A 全自动血粘度快测仪 (重庆维多公司), RD 20IV 高速冷冻离心机 (日本岛津公司), QDR 4500A 双能 X 线骨密度仪 (美国 HOLOGIC 公司), Mettler H54AR 十万分之一分析天平 (瑞士)。羟脯氨酸标准试剂为中科院上海生化所产品。糖醛酸内酯标准试剂为西安医科大学赠送。其它试剂为分析纯。

**1.5 统计学处理** 用 SAS 统计软件对各组动物的检测指标进行统计得出平均值和标准差; 用 T 检验法评价各项指标组间差异的显著性。

**2 结果**

**2.1 血液生化学分析** 强的松致肾虚对照组、空白组及实验组动物的血清钙、磷、血浆甘油三酯和胆固醇含量没有明显的差异; 实验组动物血浆碱性磷酸酶活性明显高于对照组和空白组 (见表 1), 说明实验药物能够提高动物的成骨细胞的成骨活性。

表 1 血液生化分析结果 ( $\bar{x} \pm s$ ) (单位: mmol/L)

组别	动物数 (只)	s- 钙	s- 磷	P- 胆固醇	p- 甘油三酯	$\rho$ 碱性磷酸酶
对照组	6	2. 54 ± 0. 25	0. 86 ± 0. 13	1. 99 ± 1. 27	1. 59 ± 0. 92	43. 23 ± 17. 51
空白组	7	2. 86 ± 0. 48	0. 79 ± 0. 15	1. 52 ± 0. 82	0. 93 ± 0. 47	44. 08 ± 12. 34
实验组	7	2. 66 ± 0. 44	0. 76 ± 0. 14	1. 63 ± 0. 47	1. 33 ± 0. 71	62. 08 ± 13. 31* #

\* 与对照组相比, 统计学差异显著, P < 0. 05。# 与空白组相比, 统计学差异显著, P < 0. 05。

**2.2 血液流变学分析** 三组动物的高切血液粘度、血浆粘度、红细胞变形指数无明显差异, 实验组的红细胞聚集指数有所降低, 但无统计学差异; 实验组动物在低切变状态下的全血粘度低于对照组和空白组, 统计学差异显著 (见表 2、3), 结合 TG 和 CH 的分析结果, 我们认为实验药物有一定的活血化瘀的作用, 这种作用主要是纠正创伤后引起的血液高凝态形成, 促进血液循环。

表 2 血液粘度分析结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	血液粘度			
		高切粘度	低切粘度	还原粘度	血浆粘度
对照组	6	5. 21 ± 1. 03	13. 52 ± 1. 10	7. 66 ± 1. 14	1. 41 ± 0. 09
空白组	6	5. 33 ± 1. 03	13. 06 ± 2. 27	9. 02 ± 1. 11	1. 47 ± 0. 33
实验组	7	4. 80 ± 0. 44	11. 81 ± 1. 06*	7. 43 ± 0. 56#	1. 39 ± 0. 16

\* 与对照组相比, 统计学差异显著, P < 0. 05。# 与空白组相比, 统计学差异显著, P < 0. 05。

表 3 血液流变学分析结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	红细胞压积 %	聚积指数	红细胞变形能力
对照组	6	0. 47 ± 0. 06	0. 82 ± 0. 05	9. 00 ± 1. 12
空白组	6	0. 47 ± 0. 04	0. 86 ± 0. 06	9. 37 ± 0. 97
实验组	7	0. 45 ± 0. 04	0. 85 ± 0. 06	8. 67 ± 1. 15

\* 与对照组相比, 统计学差异显著, P < 0. 05。# 与空白组相比, 统计学差异显著, P < 0. 05。

**2.3 骨痂 DEXA 矿盐分析** 三周时, 对照组、空白组、实验

组三组动物的骨痂矿盐含量和骨密度没有明显的统计学差异; 六周时, 对照组、空白组、实验组三组动物的骨痂矿盐含量和矿盐密度依次增高, 空白组和实验组骨痂矿盐含量明显高于对照组, 骨密度指标仅实验组与对照组有统计学差异 (见表 4), 这表明强的松致肾虚后, 严重影响了动物骨折后新生骨痂的进一步骨化, 实验药物对骨折修复中、后期骨痂的钙化有明显的促进作用, 尤其对肾虚动物的作用更为明显。

表 4 骨痂矿盐分析结果表 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	三 周		六 周	
		骨矿含量 (g)	骨矿密度 (g/cm <sup>2</sup> )	骨矿含量 (g)	骨矿密度 (g/cm <sup>2</sup> )
对照组	7	0. 0275 ± 0. 0019	0. 1948 ± 0. 0248	0. 0390 ± 0. 0168	0. 2092 ± 0. 0265
空白组	7	0. 0271 ± 0. 0092	0. 1985 ± 0. 0302	0. 0492 ± 0. 0183	0. 2314 ± 0. 0560
实验组	8	0. 0306 ± 0. 0118	0. 2065 ± 0. 0522	0. 0569 ± 0. 0146*	0. 2525 ± 0. 0266*

\* 与对照组相比, 统计学差异显著, P < 0. 05。# 与空白组相比, 统计学差异显著, P < 0. 05。

**2.4 骨痂生化分析** 对照组、空白组和实验组动物的骨痂量依次增高, 其中实验组和对照组的骨痂量有显著统计学差异; 三组动物的骨痂脱钙基质的量有相似的递升规律, 但统计学差异不明显。对骨痂中总钙、磷量进行分析, 实验组明显高于对照组, 统计学差异显著 (见表 5)。说明实验组有促进缺损区的骨痂生长和钙化的能力。

表 5 骨痂钙磷含量分析结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	骨痂重量 (mg)	脱矿基质 (mg)	骨痂钙 (mg)	骨痂磷 (mg)
对照组	7	38.70±11.94	14.72±7.20	9.21±0.29	1.55±0.73
空白组	7	45.83±18.83	13.58±6.65	9.69±0.73	2.61±1.67
实验组	8	55.35±10.96*	15.82±3.40	10.85±0.97*	2.79±0.66*

\* 与对照组相比, 统计学差异显著,  $P < 0.05$ 。# 与空白组相比, 统计学差异显著,  $P < 0.05$ 。

对脱钙骨痂进行骨痂成份分析, 实验组动物骨痂中羟脯氨酸总量略高于其它两组, 但无统计学差异, 表明肾虚及药物对骨折后早期成骨时的胶原合成影响较小, 而糖醛酸的总量变化以非肾虚组为高, 实验组最低, 两组有统计学差异。进一步计算各组动物骨痂的总 Ca/Hop、Ca/UA 的值, 结果实验组的 Ca/Hop 明显高于对照组, 统计学差异明显, 表明实验药物可以提高骨痂的钙化率, 对骨痂的早期骨化有明显的促进作用。同时, 考虑到动物骨折的修复时间, 我们认为实验组的 Ca/UA 值显著地高于对照组和空白组, 推测实验组动物可能处于骨折修复过程中的钙化活动期(见表 6)。

表 6 骨痂羟脯氨酸、糖醛酸含量分析结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	羟脯氨酸 (mg)	糖醛酸 (mg)	羟/羟脯氨酸	钙/糖醛酸 × 10
对照组	7	0.92±0.58	0.07±0.06	7.36±1.25	8.49±4.98
空白组	7	0.87±0.43	0.11±0.05	8.77±2.58	6.98±2.94
实验组	8	1.10±0.33	0.05±0.03#	10.40±2.25*	17.58±6.95*#

\* 与对照组相比, 统计学差异显著,  $P < 0.05$ 。# 与空白组相比, 统计学差异显著,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

中医治疗骨折延迟愈合及不愈合多从肾虚入手, 通过补肾、活血达到促进骨折愈合的目的。中药接骨丸以续断、骨碎补、杜仲等药物补肾壮骨, 以党参、三七等药物补气活血, 符合上述治疗原则。

活血化瘀法促进骨折愈合的机制见文献[4]。本实验结果也表明, 通过药物改善及非药物干预, 创伤后动物血液高凝态的形成与骨痂生长的质和量呈现明显的异向性。

应用皮质激素造成动物的类似人类肾虚临床症状的动物模型已有较多的应用, 皮质激素对骨折愈合的影响存在多方面的干扰因素<sup>[5-7]</sup>: ①皮质类固醇能抑制成骨细胞及前体成骨细胞的分化, 减少成骨细胞活性及其有效寿命, 减少骨细胞 mRNA 编码产物, 减少胶原合成, 导致骨基质形成减少, 抑制纤维及纤维组织形成, 进而影响肉芽组织生长; 对糖蛋白合成的抑制, 直接影响骨的沉积和组织的钙化。②减少肠钙的吸收, 影响钙平衡而干扰骨痂的骨化, 这可能与皮质激素抑制钙结合蛋白合成及 ATP 减少, 从而抑制线粒体释放钙, 增加细胞旁路钙回流等因素有关。③皮质类固醇有拮抗维生素 D 的作用, 并减少维生素 D 受体蛋白的数目, 抑制  $1, 25-(OH)_2D$  刺激成骨细胞分泌骨钙素, 从而影响骨痂的钙化。本实验结果也表明, 强的松对骨折愈合时成骨的质和量均有严重的影响, 尤其是对骨痂骨化过程的影响更为严重。本实

验中使用的中药可以降低皮质激素对骨折愈合的影响, 促进骨折的愈合, 但其作用机制尚不清楚。

从骨痂钙化成骨的过程来看, 尽管骨折修复机制复杂, 但目前认为碱性磷酸酶、胶原、糖蛋白和磷脂作为局部的组织因素对骨痂钙化有着重要的影响。碱性磷酸酶是由成骨细胞分泌, 其通过在钙化区对磷酸脂的水解作用, 释放出磷酸阴离子, 在胶原骨架上启动钙化过程, 表现在血清化学上为碱性磷酸酶活性升高, 它反映了成骨细胞的成骨活性。骨基质中的蛋白多糖在骨痂钙化过程中有重要的作用, 蛋白多糖分子由于含有大量的酸性基团, 可以结合大量钙, 为钙化储存钙源。当钙化发生时, 在蛋白水解酶的作用下, 蛋白多糖解离, 使结合的钙释放出来, 参与钙化, 同时, 蛋白多糖的排除又为矿化沉积提供必要的空间。所以, 在不同的钙化阶段, 蛋白多糖的含量有一个双相变化过程, 这种变化可能对无机盐的形成和沉积有重要的控制作用。胶原作为一种骨架成份是钙化的基础, 当基质中的蛋白多糖等保护物质被清除之后, 胶原的矿化作用部位便暴露在纤维多聚体基质中, 局部游离的钙化离子及碱性磷酸酶水解出的磷酸根离子在有限的胶原纤维的自然表面上相互作用, 发生矿化反应。同时, 新生胶原的结构直接影响沉积磷灰石晶体的大小、形态和方向性。所以提高成骨细胞的活性, 促进胶原蛋白的合成, 调节相关糖蛋白的代谢, 对骨折修复时的骨痂生长和骨化有重要的意义。从本实验的结果看, 实验中药可以提高成骨细胞的活性, 尽管在促进胶原合成方面的作用并不明显, 但从对整体骨痂质量的影响情况看, 实验中药的主要作用点, 可能更多地集中在骨痂的钙化阶段, 即对调节肾虚骨折后修复骨痂的骨化有更明确的促进作用。

补肾中药对骨代谢影响的详细机制目前尚不明了, 但补肾中药对骨代谢的调节作用已有很多报道, 有报道补肾中药能增加皮质激素造模后动物的新骨形成, 增加骨小梁的面积, 认为补肾中药可以对抗皮质激素的抗合成作用, 促进骨基质的合成。补肾方药对去势致肾虚动物的骨力学性能改变也有较好的对抗作用。本实验也证明了补肾方药对肾虚所致的骨折延迟愈合有明显的防治作用。

### 参考文献

- [1] 上海市医学化验所. 临床生化检验(上). 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 109- 222.
- [2] Bitter T, Muir L. Modified uronic acid Carbazole reaction. Analytical Biochemistry, 1992, 204(4): 330.
- [3] Newman RF, Logan MA. The determination of hydroxyproline. J Biol Chem, 1950, 225(184): 299.
- [4] 吴霄昭. 活血化瘀药加速骨折愈合的理论基础. 新中医, 1984, (3): 55.
- [5] 柴本甫. 几个影响骨及骨折愈合的药物. 国外医学·创伤与外科基本问题分册, 1982, (1): 21.
- [6] Godschak M, Lexy J, Downs RW. Glucorticoids decrease Vitamin D receptor number and gene expression in human osteosarcoma cells. J B Mineral Res, 1992, 7(1): 21.
- [7] Peretz A, Preat JP, Bosson D, et al. Serum osteocalcin in the assessment of corticosteroid induced osteoporosis. Effect of long and short term corticosteroid treatment. J Rheumatol, 1989, 16(3): 363.

(收稿: 1998 11-06 修回: 1999 03-08 编辑: 李为农)