

# 中药对小鼠骨折后血管重建与骨折愈合方式关系的影响

张建国 孙强 张兆祥 徐高四

(三峡大学医学院解剖学教研室,湖北 宜昌 443003)

**【摘要】** 目的 探讨中药对小鼠骨折后血管重建与骨折愈合方式关系的影响。方法 昆明种小鼠 50 只,制作闭合性胫腓骨骨折模型,随机分为两组,实验组口服中药,对照组口服生理盐水。分别于术后第 3、7、15、21、28 天处死动物。腹主动脉墨汁灌注,制成石蜡切片,HE 染色,光镜观察。结果 实验组骨折部位血管的增生、扩张程度高于对照组,软骨内成骨占整个骨痂的比例少于对照组。实验组较对照组约提前 1 周愈合。结论 中药通过促进骨折部位血管增生、扩张,加速软骨骨痂改建,减少软骨内成骨,增加膜内成骨的比例,促进骨折的愈合。

**【关键词】** 骨折愈合; 中草药

**Effect of Chinese medicinal herbs on relation between reconstruction of blood vessels and the types of fracture healing in mice** ZHANG Jianguo, SUN Qiang, ZHANG Zhaoxiang, et al. Department of Anatomy, Medical College of Three Gorges University ( Hubei Yichang, 443003, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of Chinese medicinal herbs (CMH) on relation between reconstruction of blood vessels and the type of fracture healing in mice **Methods** Experimental fracture models were made on 50 Kunming mice. Half of them given oral CMH were in the experiment group, and the rest without CMH belonged to the control group. The animals were sacrificed successively at 3th, 7th, 15th, 21th, 28th day after operation. After Chinese ink injection, and tissue slicing, HE staining were made to observe relation between reconstruction of blood vessels and the type of fracture healing. **Results** The dilation and regeneration of blood vessels in the experimental group was faster than that in the control group, the proportion of cartilaginous ossification was less than that in the control group. Fracture healing in experimental group occurred one week earlier than that observed in the control group. **Conclusion** The CMH could promote dilation and regeneration of blood vessels, decrease cartilaginous ossification, and promote the healing of fracture.

**【Key words】** Fracture healing; Drugs, Chinese herbal

骨折的修复依赖于骨痂的形成,通过膜内成骨和软骨内成骨两种方式形成骨组织。两种方式在发生部位、成因及机制上存在差异,但均始于骨祖细胞(osteogenic cell)的趋化、增殖、分化并合成细胞外基质,这个过程又受到全身与局部因子的调节<sup>[1]</sup>。已经证明中药对骨折愈合有促进作用,但以往对其机制的研究几乎没有涉及对骨折愈合方式的研究<sup>[2]</sup>。因此我们利用小鼠实验性胫腓骨双骨折,探讨中药对骨折愈合过程中血管重建与骨折愈合方式关系的影响,为临床骨科应用提供理论依据。

## 1 材料与与方法

**1.1 动物模型制作** 昆明种小鼠 50 只,雌雄不限,体重 18~23 g。在无菌条件下,以 0.4%戊巴比妥钠

溶液(0.1 mg/10 g)腹腔注射,全身麻醉。实验者右手持鼠,左手拇、食指固定其左踝关节,用左拇指在其胫腓骨近中段处由外向内骤然加压,造成局部闭合性骨折,局部皮肤保持完整。为确保骨折发生的一致性,指定专人按同一方法操作,一次性完成。

**1.2 分组** 将小鼠随机分成实验组和对照组。实验组于术后即开始每天早晚两次灌胃给药,每次约 0.2 ml 中药液,并于局部外擦中药液,持续用药。对照组用同样方法给以等量生理盐水。分别于骨折后第 3、7、15、21、28 d 断颈处死动物,两组每次各 5 只。

**1.3 切片制作** 动物处死后往腹主动脉灌注 2%墨汁明胶液,甲醛固定 7 d。然后取术侧后肢,5%盐酸脱钙 3 d,石蜡包埋,制作 8 μm 纵切片,HE 染色,显

显微镜观察。

**1.4 软骨内成骨区相对密度测量** 取骨折后第 7 天两组切片各 5 张,切片厚度均为  $8\ \mu\text{m}$ ,采用体视学的方法,测量每张切片软骨内成骨占整个骨痂的相对面积,规定此面积为相对密度,以评价软骨内成骨在整个骨痂中所占的比例。

**1.5 中药** 中药为自拟药方:煅自然铜、五加皮、骨碎补、栀子、乳香、煅狗骨、三七、当归、赤芍、白芷、鹿角胶、血竭、杜仲、没药、玄胡、红花、续断等十几味中药,经本院附属医院中药房鉴定。水煎两次,浓缩成  $100\ \text{g}/100\ \text{ml}$ ,4℃ 冷藏,备用。

## 2 结果

**2.1 骨折后第 3 d** 骨折后骨折断端之间一般大约有  $1\ \text{mm}$  左右间隙,并有错位情况。对照组断端骨皮质之间、骨髓腔之间及其周围组织有大量炎性细胞浸润,明显水肿,成纤维细胞增生,并可见少量成软骨细胞,无墨汁充盈的血管。骨外膜增厚,骨祖细胞增生,骨外膜下可见新生的微血管及较多的成骨细胞,并分泌骨基质(见图 1)。

实验组断端骨皮质之间、骨髓腔之间及其周围组织炎性细胞浸润明显少于对照组,水肿较轻,成纤维细胞增生,并可见片状的成软骨区,无墨汁充盈的血管。骨外膜明显增厚,膜下膜内成骨区较对照组多,血管增生及扩张、弯曲程度也较对照组明显(见图 2)。

**2.2 骨折后第 7 d** 对照组肉眼可见骨痂逐渐增大。镜下可见桥梁骨痂及骨外膜骨痂内有岛状的软骨形成。各软骨岛之间有墨汁充盈的血管,并且仍有少量炎症细胞浸润,成纤维细胞少,可见大量的成软骨细胞及少量的成骨细胞(见图 3)。在软骨边缘已有新生毛细血管网长入,在毛细血管周围可见肥大软骨细胞及成骨细胞。在骨外膜骨痂内偶尔也可见到成片的肥大软骨细胞,此区域也有大量的新生血管长入。骨外膜下已由膜内成骨形成骨小梁,骨小梁网孔内的血管进一步增生,并互相交织呈网状,但扩张、弯曲已不明显。软骨内成骨的相对密度为  $(70.9 \pm 5.2)\%$ 。

实验组肉眼可见骨痂逐渐增大。镜下可见桥梁骨痂及骨外膜骨痂内也有岛状的软骨形成,在各岛状软骨之间血管明显增生、扩张、弯曲,成纤维细胞较少,其间可见多少不等的成骨细胞,很少能见到成软骨细胞(见图 4)。在软骨边缘已有新生血管带长入,其密度较对照组高,增生、扩张、弯曲程度较对照

组更明显,在新生血管周围也可见肥大软骨细胞及成骨细胞。骨外膜下已由膜内成骨形成骨小梁,骨小梁网孔内增生血管密度及扩张、弯曲较对照组高。软骨内成骨的相对密度为  $(61.3 \pm 7.3)\%$ ,较对照组软骨骨痂所占比例小( $P < 0.05$ )。

**2.3 骨折后第 15 d** 对照组骨痂增大。镜下可见已形成软骨之间仍有新的软骨形成,未钙化,并有少量纤维骨痂,而无明显膜内成骨过程。纤维骨痂内血管密度较低,只是略微扩张、弯曲。已形成的软骨随着新生血管的长入和破骨细胞的活动,逐渐形成过渡性骨小梁,软骨周围的骨小梁几乎全为过渡性骨小梁。在骨小梁的网孔内有大量扩张、弯曲成窦状的血管网,血管一直延续到软骨边缘,逐渐变细。软骨内无墨汁充盈(见图 5)。

实验组骨痂较对照组少。镜下可见在桥梁骨痂内可见膜内成骨,并形成骨小梁,骨小梁之间有血管分布。在膜内成骨的前缘除大量的成骨细胞外,还可见少量的软骨细胞聚集在一起形成微小的软骨组织(见图 6)。此外,各软骨均已钙化,无墨汁充盈。骨痂内大量骨小梁形成,过渡性骨小梁网孔内的血管较对照组管径更粗,密度更高,约占软骨周围已形成骨小梁的  $1/3$ 。骨性骨小梁网孔内的血管开始变细但密度增加,有散在的髓窦,髓窦之间由丰富的毛细血管连接。外层骨小梁的网孔内有大量的造血干细胞及血细胞,这说明已有骨髓形成。

**2.4 骨折后第 21 d** 对照组骨痂开始缩小,类似实验组第 15 d 情况。镜下可见软骨内成骨区仍存在少量的钙化软骨组织。外周骨小梁多被吸收,骨髓腔扩大。骨髓腔内可见少量的脂肪细胞及大量的造血干细胞及血细胞。骨痂边缘有间断的骨板围绕,并与断端骨皮质相连。血管分布特点与对照组第 15 d 血管分布特点类似,但分布面积更大(见图 7)。

实验组骨痂明显减少。镜下可见软骨均已改建成骨。骨髓腔普遍扩大并与断端骨髓腔相通。骨髓腔内可见大量脂肪细胞、造血干细胞和血细胞。骨痂边缘有较连续的薄层骨板围绕,并与断端骨皮质相连。在骨痂内可见少量的粗大血管,其周围血管逐渐变细,髓窦之间由丰富的毛细血管连接(见图 8)。

**2.5 骨折后第 28 d** 对照组骨痂明显减小。镜下可见骨髓腔进一步扩大并与断端骨髓腔相通,但仍有少量骨小梁互相连接。骨髓腔内可见大量的脂肪细胞、造血干细胞和血细胞。骨痂边缘有较连续的

薄层骨板围绕,并与断端骨皮质相连。骨痂内可见少量的粗大血管,其周围血管逐渐变细,髓窦之间由丰富的毛细血管连接。

实验组骨折已基本愈合,大部分骨小梁已被吸收,只见少量散在的骨片。骨髓腔内造血干细胞和血细胞减少,脂肪细胞增多。骨痂边缘的骨板连续,与断端骨皮质相连,且较对照组增厚。血管变细,变稀疏。

### 3 讨论

3.1 中药促进骨折后血管重建 我们发现:在骨折早期,实验组骨外膜下膜内成骨、纤维骨痂形成、软骨内成骨时血管的增生、扩张均较对照组明显,以后,随着骨痂的改建,实验组较对照组提前出现骨髓腔,内有造血干细胞及脂肪细胞,并且与原骨髓腔相通。这与我们以前的研究结果一致:中药可以促进血管增生、扩张,保证骨折愈合过程中的血液供应,以促进骨折的愈合<sup>[3]</sup>。

3.2 中药减少软骨内成骨同时增加膜内成骨比例

现已证实,成骨细胞前体-骨祖细胞有两种类型:一是定向性骨祖细胞(determined osteogenic precursor cell, DOPC),具有干细胞的特性,不需要外源性诱导物的作用能自动分化成骨,它仅在骨髓及骨膜中发现;二是诱导性骨祖细胞(inducible osteogenic precursor cell, IOPC),是一种未分化的间充质细胞(mesenchymal cell),存在于所有的结缔组织中,也存在于骨髓中,这些细胞并不能自发的形成骨组织,必须在骨形态发生蛋白(BMP)等诱导物的作用下才能转化为成骨细胞和成软骨细胞<sup>[4,5]</sup>。

我们发现,对照组除了骨膜下可见膜内成骨外,骨折断端之间未见膜内成骨,而实验组还可见明显的膜内成骨,实验组软骨骨痂所占的比例明显小于对照组。同时实验组纤维骨痂内血供的密度及扩张、弯曲程度均较对照组高。在肉芽组织向软骨骨痂的转变过程中,血管可能由于软骨组织中高的液体静水压的作用而闭塞<sup>[6]</sup>,使对照组骨折愈合过程优先选择软骨内成骨<sup>[7]</sup>。因此我们认为由于中药可

以促进血管增生、扩张,使间充质细胞更多的向成骨细胞转化,增加膜内成骨。

实验观察到,膜内成骨发生于血管增生之后,血液供应较丰富,骨小梁形成时间较短,而软骨内成骨有赖于软骨骨痂改建时血管的重新长入,由软骨边缘开始逐渐形成骨小梁,骨小梁形成时间较长,因此,中药对膜内成骨的影响要比对软骨内成骨的影响更明显。

然而骨折修复是一个极其复杂的过程,既有多细胞的参与,又有全身与局部多种因子调节。骨折发生后,从血肿、炎症细胞及骨折端释放骨形态发生蛋白(BMP)、转化生长因子(TGF- $\beta$ )、胰岛素样生长因子(IGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血管内皮生长因子(EGF)等具有骨诱导作用的生长因子,诱导不同来源的骨原细胞募集、分化进而不断产生新骨<sup>[8,9]</sup>。中药促进骨折愈合的原因可能是由于中药影响了这些骨诱导因子的表达和释放的结果。

(本文图 1~8 见插页)

#### 参考文献

- 1 Mundy GR. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. Clin Orthop, 1996, 324:24-32.
- 2 汤耿民,沈霖,方肇年,等. 中药促进骨折愈合疗效机理研究新进展. 中国中医骨伤科杂志, 2000, 8(4):56-58.
- 3 张建国,陈良金,蒋文跃,等. 外敷中药对骨折微血管重建的影响. 中国骨伤, 2000, 13(2):86-87.
- 4 Falla N, Van Vlasselaer P, Bierkens J, et al. Characterization of a 5-fluorouracil-enriched osteoprogenitor population of the murine bone marrow. Blood, 1993, 82(12):3580-3591.
- 5 Reddi AH. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. Clin Orthop, 1995, 313:115-119.
- 6 Hulth A, Johnell O, Lindberg L, et al. Demonstration of blood-vessel like structures in cartilaginous callus by antilaminin and antiheparin sulfate proteoglycan antibodies. Clin Orthop, 1990, 250:289-293.
- 7 Conell CN, Lane JM. Newest factors in fracture healing. Clin Orthop, 1992, 277:297-305.
- 8 Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factor. Clin Orthop, 1991, 263:30-37.
- 9 Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EL. Gene expression during bone repair. Clin Orthop, 1993, 289:298-306.

(收稿 2002 - 04 - 02 编辑:房世源)

欢迎投稿

欢迎订阅

## 中药对小鼠骨折后血管重建与骨折愈合方式关系的影响

(正文见 84 页)

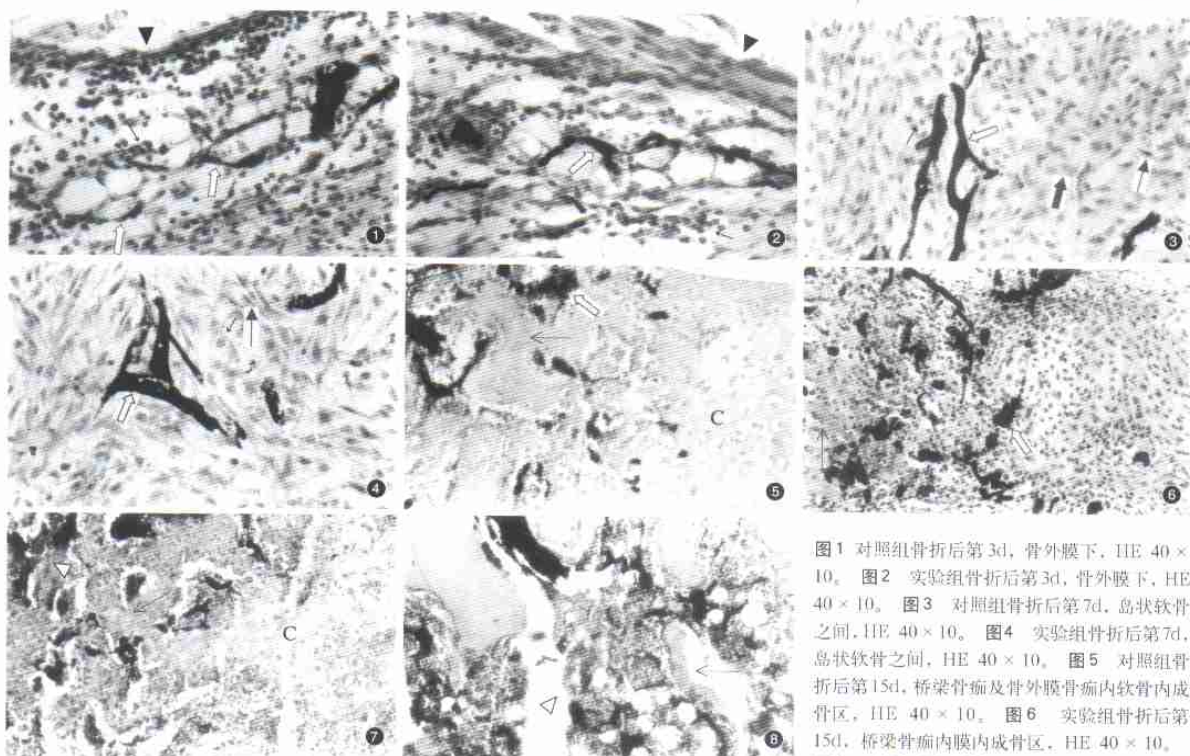


图1 对照组骨折后第3d, 骨外膜下, HE 40 × 10。图2 实验组骨折后第3d, 骨外膜下, HE 40 × 10。图3 对照组骨折后第7d, 岛状软骨之间, HE 40 × 10。图4 实验组骨折后第7d, 岛状软骨之间, HE 40 × 10。图5 对照组骨折后第15d, 桥梁骨痂及骨外膜骨痂内软骨内成骨区, HE 40 × 10。图6 实验组骨折后第15d, 桥梁骨痂内膜内成骨区, HE 40 × 10。图7 对照组骨折后第21d, 桥梁骨痂及骨外膜

骨痂内软骨内成骨区, HE 20 × 10。图8 实验组骨折后第21d, 骨髓腔再通, HE 20 × 10。  
图中: 一示成骨细胞; ⇨示增生、扩张的微血管; 一示成软骨细胞; →示成纤维细胞; ▲示骨外膜; —→示骨小梁; △示骨髓腔; C示软骨组织。

## 应用神经延长架延长兔坐骨神经的实验研究

(正文见 87 页)

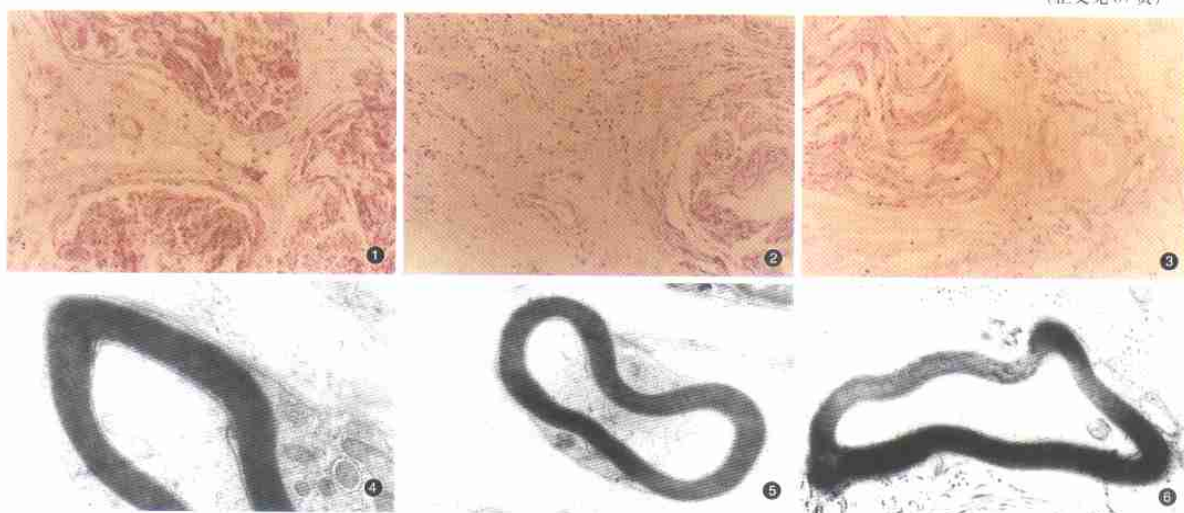


图1 神经延长组, 术后第2周时, 距缝合口15 mm处, 神经纤维再生良好, 外膜及束间血管再通良好 (HE × 200)。图2 神经切断后直接端-端缝合组, 取材部位及镜下表现与神经延长组基本相同 (HE × 200)。图3 神经移植组, 取材部位和时间同上, 神经纤维再生不良, 空泡变性, 血管壁增厚 (HE × 200)。图4 神经延长组, 取材部位同上, 有髓和无髓神经纤维丰富, 髓鞘同心环结构清晰 (TEM × 80K)。图5 神经切断后直接缝合组, 基本同神经延长组 (TEM × 80K)。图6 神经移植组, 无髓神经纤维丰富, 髓鞘同心环不清, 有凝固变形 (TEM × 80K)。