

骨髓方治疗慢性骨髓炎的实验研究

刘献祥¹ 刘伯龄¹ 周琳瑛²

(11 福建中医学院骨伤系, 福建 福州 350003; 21 福建医科大学)

=摘要> 目的 观察骨髓方治疗大鼠慢性骨髓炎的疗效。**方法** 采用 SD 大鼠建立慢性骨髓炎模型, 随机分成四组: 骨髓方 Ñ 组、骨髓方 ò 组、对照组和空白组。治疗 1 个月, 观察 WBC、RBC、E-C3bRR、E-ICR、血清溶菌酶含量、骨 X 线、病理组织学指标。**结果** 骨髓方 Ñ、ò 组与空白组差异有非常显著性 ($P < 0.01$); RBC、E-C3bRR、E-ICR、血清溶菌酶含量指标骨髓方 Ñ、ò 组明显优于对照组 ($P < 0.01$)。光镜下病理组织学观察骨髓方 Ñ、ò 组明显优于对照组和空白组; 电镜下, 骨髓方 Ñ、ò 组细胞结构受损程度小于对照组和空白组。**结论** 骨髓方治疗慢性骨髓炎有较好疗效, 提示与其提高机体免疫力、促进微循环和促进成骨有关。

=关键词> 骨髓炎; 中草药; 动物, 实验

Experimental study on the treatment of chronic osteomyelitis with bone marrow decoction LIU Xianxiang, LIU Bding, ZHOU Linying. Department of Traumatology & Orthopaedics of Fujian TCM (Fujian Fuzhou, 350003, China)

=Abstract> Objective To observe the effects of bone marrow decoction on chronic osteomyelitis in rat model **Methods** SD rats animals with chronic osteomyelitis were randomly divided into four groups: bone marrow group Ñ, bone marrow group ò, control group and blank group. All animals were treated for 1 month and observed with WBC, RBC, Erythrocyte C3b receptor ratio (E-C3bRR), erythrocyte immune compound ratio (E-ICR), serum lysozyme activity, bone Xray and histopathological index. **Results** There were significant difference between the bone marrow group Ñ / ò and blank group ($P < 0.01$). Comparison between the bone marrow group Ñ / ò and blank group shown that RBC, E-C3bRR, E-ICR and serum lysozyme activity were significantly better ($P < 0.01$). In respects of roentgenography and histological manifestation, bone marrow group were better than the control group and the blank group; The injury degree to the cell structure of bone marrow group were less than the control group and the blank group. **Conclusion** Extractant from bone marrow decoction have good effects on chronic osteomyelitis in rat model, which suggest that bone marrow decoction can improve the immune function, the histological microenvironment and repairing of bone.

=Key words> Chronic osteomyelitis; Drugs, Chinese herbal; Animals, laboratory

长期的临床实践证明, 中医药治疗慢性骨髓炎具有良好疗效。骨髓方是著名中医骨伤专家许书亮教授的秘验方^[1], 长期运用于临床, 效果明显。为探讨其疗效机制, 以此方进行慢性骨髓炎的实验研究。

1 材料与方法

1.1 动物 健康 SD 大鼠 52 只, 雌雄各半, 体重雌性大鼠 130~150 g, 雄性大鼠 150~170 g, 上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 合格证书: 医动字第 0224921 号。昆明种封闭群小鼠 4 只, 福建中医学院动物实验中心提供。

1.1.2 骨髓方及其灌洗提取液 组方: 制马钱子 4 分, 皂角刺 9 分, 蒲公英 12 分, 紫花地丁 12 分, 连翘 10 分, 金银花 10 分, 生地黄 10 分, 炙全蝎 3 分, 穿山甲 10 分, 赤芍 9 分, 生黄芪 20 分, 当归 6 分, 甘草 3 分。由福建中医学院附属第二人民医院制剂室同批制成, 含生药量 0.105 g/ml。

1.1.3 MRSA 悬液 MRSA 由南京军区福州总医院检验科提供。将菌种在肉汤培养基中传代一次, 配成 1×10^8 cfu/ml 细菌悬液, 取适量菌液注入小鼠腹腔以恢复菌种毒力, 24 h 后将小鼠处死, 取腹腔液接种于普通培养基上, 37 °C 培养 24 h, 纯分菌种, 在肉汤培养基中再传代一次。造模前配成 5×10^8 cfu/ml

MRSA 悬液。

114 药品与试剂 5% 鱼肝油酸钠注射液(上海东海制药厂生产,批号:卫药准字 010225);丁胺卡那注射液(齐鲁制药厂,鲁卫药准字(1995)第 062020 号);血清溶菌酶试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供;盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司,苏卫药准字(1991)第 301302 号)。

115 造模方法 参照沈霖等^[2]法,取 46 只 SD 大鼠,雌雄各半,适应性喂养 1 周,禁食 12 h 后,盐酸氯胺酮按 10 mg/100 g 体重进行大鼠腹腔腹膜下注射麻醉,右后肢膝前区剪毛、消毒,屈曲膝关节,用 8 号针头由胫骨平台前中 1/3 交界处平行胫骨干纵轴略偏后朝胫骨髓腔方向钻孔刺入,有突破感,放出少量骨髓;另取 8 号针头经前孔刺入胫骨髓腔内,注入耐甲氧西林金黄色葡萄球菌混悬液(按 0101 ml/20 g 体重计算注入量)与 5% 鱼肝油酸钠 0103 ml 的混合液。退出针头,对针孔稍加压迫,造模后观察局部反应情况。4 周后,局部红肿、窦道形成、流脓, X 线显示骨膜增生,皮质增厚,密度增加或为包壳,其内有死骨及死腔形成。

116 体外抑菌实验 将传代后的菌种在平皿培养基上密集划线,采用纸片法^[3]进行提取液抑菌实验,同时,用丁胺卡那药敏试纸片(上海华东临床医学科技公司生产,沪 G/95 卫药生证字第 08 号,30 Lg/片)做抑菌实验,操作及结果判定严格按照 NCCLS 制定的最新规则及标准进行。

117 处理及分组方法 造模成功的 SD 大鼠 40 只行局部病灶清除术及闭式灌注术^[4],术后将动物随机分成四组,每组动物 10 只:骨髓方 Ñ 组,以 5% 骨髓方提取液灌注加骨髓方内服;骨髓方 Ò 组,以 5% 骨髓方提取液灌注;对照组,以丁胺卡那 24 @10⁴ U

加入 500 ml 生理盐水中灌注;空白组,以生理盐水灌注。以上各组手术后 3 d 内,每日灌注 4 次,3 d 后每日灌注 2 次,每次 5 ml/只,每分钟灌注 10 ml 药液。骨髓方 Ñ 组内服 2 ml/次,每天 2 次。

118 统计学数据 计数资料采用 Ridit 检验,计量资料采用 t 检验。

2 结果

211 体外抑菌实验 5% 骨髓方提取液药敏纸片周围无明显抑菌圈,丁胺卡那药敏纸片抑菌圈为 20 mm,为高敏。

212 治疗后病变肢体 X 线检查 治疗后取患骨摄片,依刘宗义等^[5]对慢性化脓骨髓炎 X 线诊断分型为标准,将大鼠患骨 X 线表现分为轻度、中度、重度三级,轻度为治愈恢复型,中度为增殖型和 X 线稳定型,重度为破坏进展型和死骨形成型,采用对比评定 X 线片表现,用 Ridit 检验进行统计处理(见表 1)。

表 1 X 线摄片对比

组别	动物数(只)	轻度	中度	重度
骨髓方 Ñ 组 * * #	10	8	1	1
骨髓方 Ò 组 * *	10	7	2	1
对照组*	10	5	3	2
空白组	10	1	3	6

注:与空白组比较:* P < 0105, * * P < 0101;与骨髓方 Ò 组比较:# P > 0105

213 免疫指标 正常大鼠 6 只(正常组),造模后大鼠 6 只(模型组),以及 4 组治疗后大鼠 40 只腔静脉取血,作白细胞(WBC)计数、红细胞(RBC)数量检测,参照郭峰^[6]作法 C3b 受体花环率(E- C3bRR)、红细胞免疫复合物花环率(E- ICR)检测,血清溶菌酶含量同批按比浊法进行检测(见表 2)。

214 患骨病理组织学 慢性骨髓炎的病理改变为

表 2 6 组动物免疫指标变化(x ? s)

组别	n	WBC(n/mm ³)	RBC(10 ⁷ /ml)	E- C3bRR(%)	E- ICR(%)	血清溶菌酶(Lg/ml)
正常组	6	8 463.33 ? 580.16	8.06 ? 0.81	11.16 ? 2.01	5.25 ? 0.77	30.88 ? 4.25
模型组	6	9 031.67 ? 333.43 ^v	4.65 ? 0.43 ^{v v}	4.54 ? 1.24 ^{v v}	2.65 ? 0.90 ^{v v}	23.39 ? 3.95 ^{v v}
骨髓方 Ñ 组	10	8 574.00 ? 495.65 ^{* * *}	7.78 ? 0.40 ^{# # #}	10.79 ? 1.95 ^{# # #}	5.06 ? 0.67 ^{# # #}	31.06 ? 4.35 ^{# # #}
骨髓方 Ò 组	10	8 552.00 ? 521.30 ^{* * *}	7.52 ? 0.39 ^{# # #}	10.36 ? 2.14 ^{# # #}	4.87 ? 0.85 ^{# # #}	30.11 ? 4.06 ^{# # #}
对照组	10	7 922.00 ? 580.23 [*]	6.29 ? 0.62 ^{* *}	6.83 ? 1.89 ^{* *}	3.70 ? 0.53 ^{* *}	26.82 ? 3.43 ^{* *}
空白组	10	7 256.00 ? 656.95	4.16 ? 0.41	3.01 ? 1.47	2.20 ? 0.51	21.08 ? 3.46

注:与对照组比较:# P < 0105, # # P < 0101;与空白组比较:* P < 0105, * * P < 0101;与正常组比较:^v P < 0105, ^{v v} P < 0101

骨质破坏、坏死、窦道、感染性死腔及肉芽组织增生。光镜下:骨髓方 Ñ、Ò 组可见纤维组织、毛细血管增生显著,血管周围见炎性细胞的附壁和游出,髓腔再

通,骨组织修复,病灶内有大量排列的新骨组织,新骨之间有破骨细胞存在,并有骨髓形成;对照组以肉芽组织增生为主,可见少量毛细血管,髓腔部分再

通;空白组可见感染性死腔,边缘破坏如虫蚀状,见许多坏死中性粒细胞,散在岛屿状死骨、碎片,视野中可见含铁血黄素沉着。电镜下:骨髓方 \tilde{N} 、 \tilde{O} 组骨组织表层见前成骨细胞和成骨细胞,前成骨细胞呈梭形,细胞器较少,平行于骨表面成串排列,成骨细胞呈立方形,胞浆内粗面内质网丰富,高尔基体发达,核椭圆形,常染色质较丰富,核仁可见,成骨细胞排列紧密,骨组织可见血管。骨髓组织未见明显水肿,造血细胞增生活跃,比例大致正常,巨噬细胞明显增多,内含大量溶酶体,胞浆量较多,成纤维细胞体积较大,功能活跃;骨髓方 \tilde{O} 组骨组织及骨髓结构类似骨髓方 \tilde{N} 组,二者未见明显异常;对照组骨组织中骨小管排列稀疏,数量减少,骨细胞陷窝腔较大,细胞结构无明显异常,骨组织表层可见稀疏排列的成骨细胞,其胞浆内粗面内质网、核糖体丰富,少数线粒体水肿,内质网轻度扩张。骨髓组织明显水肿,结构较松散,间质可见低电子密度区或透明带,纤维组织较少,网状细胞体积较大,胞浆丰富,粗面内质网多半有扩张;空白组骨组织中骨小梁排列稀疏,数量减少,骨细胞陷窝腔较大,线粒体水肿,线粒体内的嵴改变、扩张,可见嗜铁板层骨陷窝,骨髓中纤维增生活跃,中性粒细胞增生活跃。

3 讨论

311 提高红细胞免疫机能 本实验中,慢性骨髓炎数量减少及红细胞免疫机能低下是由于慢性骨髓炎的病理变化,干扰了骨髓的正常造血功能所致,而红细胞来源于骨髓造血干细胞,骨髓造血功能受到破坏必然使红细胞膜上受体活性减退,从而不能有效地粘附和清除体内致病菌,这可能是导致慢性骨髓炎经久不愈的一个很重要的原因,这也与中医对此病治则采用扶正托毒之法相一致。

312 加强巨噬细胞吞噬功能以促进微循环和病灶区组织修复 本实验中,骨髓方 \tilde{N} 、 \tilde{O} 组血清溶菌酶含量与空白组有非常显著性差异($P < 0.01$),说明经

骨髓方治疗后,大鼠体内巨噬细胞的吞噬功能加强。骨髓方 \tilde{N} 、 \tilde{O} 组白细胞计数与正常组(造模前)无显著性差异,而空白组白细胞计数明显下降,且与骨髓方组有非常显著性差异,说明经骨髓方治疗后,机体细菌含量减少,免疫机能加强,这对于减少局部组织破坏,促进局部组织的修复提供了良好的内环境,而具有吞噬活性的细胞可产生各种氧化活性物质均有强烈的杀菌作用^[7]。上述细胞在完成吞噬、清除坏死组织后大多可转化为纤维母细胞,最后形成纤维结缔组织修复创面。而病灶区内微血管的侵入为修复创造有利条件。

313 促进成骨 本实验病理组织学观察发现:骨髓方组病灶区内纤维组织、毛细血管增生显著,髓腔再通。超微结构发现:骨组织表层有大量前成骨及成骨细胞,成骨细胞细胞器丰富并可见血管侵入,表明经骨髓方 \tilde{N} 、 \tilde{O} 组治疗后纤维组织及骨组织增生活跃,而骨增生的纤维组织自身就有旺盛的膜内成骨和形成透明软骨的潜能,当透明软骨伴有血管侵入时,又可进行软骨内成骨,而成骨细胞在骨髓炎中能积极地参与对金黄色葡萄球菌的防御作用,总体上有利于机体对骨组织中金黄色葡萄球菌的清除^[8]。

参考文献

- 1 施杞. 百家方技精华. 北京: 中国中医药出版社, 1990. 132-136.
- 2 沈霖, 杜靖远, 杨家玉, 等. 慢性化脓性骨髓炎的造模方法及相关指标测定. 中国中医骨伤科杂志, 1989, 5(5): 326.
- 3 李仪奎. 中药药理实验方法学. 上海: 上海科技出版社, 1992. 286-289.
- 4 蓝文正, 郭臣灵. 实用骨科手术学. 天津: 天津科技出版社, 1992. 912.
- 5 刘宗义, 谢景龙, 谢正平. 慢性化脓性骨髓炎 X 线诊断分型的探讨. 医师进修杂志, 1993, 16(11): 4243.
- 6 郭峰. 红细胞在免疫反应中的应用. 血液免疫学研究. 上海: 第二军医大学出版社, 1998. 3.
- 7 李秀兰. 外用中药作用机理的研究. 21. 化学发光测定中性粒细胞的氧化代谢功能. 中国骨伤, 1989, 3(6): 6.
- 8 郭传斌. 成骨细胞在金黄色葡萄球菌感染后的细胞因子表达. 现代口腔医学杂志, 2000, 14(3): 152-156.

(收稿: 2002-09-26 编辑: 李为农)

欢迎投稿

欢迎订阅