

局部植入接骨中药提取物促进骨愈合的实验研究

王银喜¹ 王金熙² 徐智敏¹ 吴士良³ 陆小燕¹ 李关兴¹

(1. 苏州市吴中人民医院,江苏 苏州 215128;2. 苏州大学附属第二医院;3. 苏州大学生命科学学院)

【摘要】 目的 评价局部植入接骨中药对颅骨缺损愈合的影响。方法 雄性 Wistar 大鼠 32 只,随机分两组,每组 16 只。应用接骨中药提取物与经盐酸胍处理的无骨诱导活性的不溶性骨质 (Insoluble bone matrix, IBM) 为植入材料,将中药提取物 IBM 复合植入直径 8 mm 的大鼠颅骨缺损和胸部皮下组织内。不含中药提取物的 IBM 植入上述部位 (不同动物) 作为对照。术后 10 d 和 30 d 取植入物行组织学、组织化学和生物化学分析。结果 术后 10 d,植入中药提取物 IBM 的颅骨缺损内见间充质细胞向成骨细胞分化的形态特征。术后 30 d,中药提取物 IBM 复合物在大鼠颅骨缺损内形成大量的新骨,且大多位于骨缺损中部,与宿主骨不相连接;单纯植入 IBM 的颅骨缺损中部未见新骨形成。中药提取物-IBM 和单纯 IBM 在胸部皮下组织内未能诱导异位成骨。结论 接骨中药提取物植入颅骨缺损部位后能促进间充质细胞向成骨细胞分化,从而加速骨缺损的愈合。

【关键词】 颅骨; 骨缺损; 中草药

An experimental study of extract of TCM for acceleration of bone healing WANG Yinxi, WANG Jinxi, XU Zhimin, et al. Department of Orthopaedics, the People's Hospital of Wuzhong (Jiangsu Suzhou, 215128, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of local implantation of bone-healing herb extract on the healing of cranial bone defects **Methods** 32 male Wistar rats were randomly divided into two groups, 16 rats in each group. Extract of TCM and no-inductive insoluble bone matrix (IBM) after guanidine-HCl extraction regard as implanted material, which were embed in skull defects and subcutaneous tissue of chest of rats. Alone IBM was embedded in the same site as control group (in different rats). Histology, histochemistry and biochemistry of the implants were analyzed at 10th and 30th days after implantation. **Results** After 10 days, mesenchymal cells to osteoblasts disorientation with herb extract-IBM complex preparation were observed. After 30 days, abundant new bone formation occurred in the skull defects with herb extract-IBM complex preparation. Above-condition was not found in control group. **Conclusion** Local implantation of bone-healing herb extract into skull defects can enhance differentiation of mesenchymal cells to osteoblasts and accelerates the healing process of bone defects.

【Key words】 Skull; Bone defect; Durges, Chinese herbal

为了观察接骨中药在骨缺损部位的局部疗效并探讨其作用机制,我们根据临床实践经验自拟中药接骨处方,经提取浓缩并与载体结合后植入大鼠颅骨缺损部位及胸部皮下组织囊袋内,观察中药提取物在骨缺损部位的成骨机能以及在软组织内的异位成骨活性,并分析其机制。

1 材料与方法

1.1 植入材料的制备

1.1.1 处方组成 骨碎补、淫羊藿、熟地、血竭、自然铜、乳香、没药等 10 味中药。

1.1.2 接骨中药提取物的制备 将上述药物等量比例共取生药材 1 000 g,经清洁处理后加适量水浸泡 24 h。将药材取出,另加水 5 000 ml,煎药 3 次,分别为 1 h、45 min、30 min,合并煎出液,沉淀 24 h,取上清液蒸发浓缩至 1 000 ml。加入 50%酒精 3 000 ml 沉淀 24 h 取上清液浓缩至原药 1/2,即 500 ml。每 1.0 ml 药液含 2.0 g 生药成分。将浓缩后的上清液离心 30 min (15 000 r/min),去除沉渣后获 400 ml 上清液,分装后 115 °C 高压 (0.7 kg/cm²) 消毒 30 min。将药液经冷冻干燥工艺处理后备

用。经上述制作过程每 0.8 g 生药获 1 mg 冷冻干燥提取物。

1.1.3 载体选择 本实验用盐酸胍提取后的大鼠不溶性骨基质 (Insoluble bone matrix, IBM) 作为中药提取物的载体。IBM 不含骨形态发生蛋白 (BMPs), 无成骨诱导活性^[1,2]。IBM 的制备方法参照参考文献[3]。

1.1.4 接骨中药提取物 IBM 复合物的制备 将 5 mg 冷冻干燥的中药提取物溶解于 1 ml 磷酸缓冲液 (PBS) 中, 将 15 mg IBM 颗粒置于中药 PBS 溶液中并充分搅匀, 将此混合液冷冻干燥后供大鼠体内植入。每一植入物含 5 mg 冷冻干燥中药提取物 (相当于 4.0 g 生药成分) 和 15 mg IBM 颗粒。

1.2 接骨中药体内成骨活性的观察

1.2.1 植入方法 雌性 Wistar 大鼠 32 只 (由苏州大学动物实验中心提供), 10 周龄, 随机分成两组, 每组 16 只。麻醉后手术部位脱毛消毒, 在颅顶做一纵形切口暴露颅盖骨并切除局部骨膜。用圆头锉造成直径 8 mm 的圆形全层顶骨缺损, 用生理盐水冲洗骨缺损部位以去除残存骨屑。在胸部作 1 cm 长横切口, 用钝性分离法造成皮下组织囊袋。第一组于同一动物的颅骨缺损部位和胸部皮下组织囊袋内植入中药 IBM 复合物; 第二组于同一动物的颅骨缺损部位和胸部皮下组织囊袋内单纯植入 IBM 作为对照。伤口用 5-0 丝线间断缝合。术后 10 d 和 30 d 每组分别处死 8 只动物, 取出颅骨部及胸部皮下组织植入物做有关检查。

1.2.2 观察内容 大体观察: 植入物周围的组织反应, 血管和新生骨形成等。组织学和组织化学检查: 取每个植入物的一半及其周围组织于 4% 多聚甲醛溶液固定后, 行脱钙石蜡包埋或不脱钙塑料包埋。石蜡切片用 HE 或藏红 (Safranin-O) 染色, 不脱钙塑料切片用组织化学方法标记碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性或 Goldner 染色法识别新骨基质, 光镜下观察。组织形态测量: 将带摄像系统的显微镜连接计算机, 使用软件 Optimas 5.2, 作组织形态测量。在连续性组织切片中每 5 张组织切片中取一张切片进行组织形态测量, 测定组织切片中新骨形成的数量。新骨形成量的指标为: 颅骨缺损部位以平均新骨形成的面积/平均原始骨缺损切面面积等于新骨面积%; 皮下植入物以平均新骨形成的面积/平均植入物切面面积等于新骨面积%。每个标本至少观察 8 张组织切片, 计算出每个标本的

新骨面积%的平均值, 每组观察 8 个标本。生物化学分析: 植入物的另一半经剔除周围组织 (颅骨标本去除原宿主骨) 后定量, 匀浆, 4℃ 下离心 30 min (12 000 r/min)。取上清液测 ALP 活性, 作为成骨活性的指标, 测定方法见参考文献[4]。离心后的沉淀物经冷冻干燥石灰化 (700℃, 16 h)。灰化的样本溶于 6 当量浓度的盐酸溶液, 用 0.1% 氧化镧稀释成 0.5% (v/v) 稀盐酸溶液后用原子吸收分光光度计的顶钙含量作为新生基质钙化程度的指标。

1.2.3 统计学处理 组织形态测量和生物化学分析结果均为计量资料, 采用不配对 *t* 检验分析中药 IBM 和单纯 IBM 植入物之间的组间差异。

2 结果

2.1 大体观察 术后 10 d 取标本时, 各组植入物周围均未见明显炎症反应。植入中药 IBM 的颅骨缺损部位有少量钙化组织形成; 单纯植入 IBM 的颅骨缺损部位未见明显钙化组织; 胸部皮下的中药 IBM 和 IBM 植入物表面有少量纤维组织包裹。术后 30 d, 植入中药 IBM 的颅骨缺损均有大量骨化组织形成, 且大多位于缺损中部; 而植入 IBM 的颅骨缺损中部未见明显骨化组织; 胸部皮下的中药 IBM 和 IBM 植入物表面被纤维组织包裹, 未触及明显钙化组织。

2.2 组织学和组织化学观察 术后 10 d, 植入中药 IBM 的颅骨缺损内见大量细胞增生, 部分细胞已分化为典型的成骨细胞, ALP 染色阳性 (图 1), 并见少量新合成的骨基质 (图 2)。这种成骨反应可见于宿主骨边缘, 但大多位于缺损中部。植入 IBM 的颅骨缺损边缘见少量成骨反应, 但缺损中部未见成骨细胞分化现象 (图 3); 胸部皮下的中药 IBM 和 IBM 植入物内见成纤维细胞增生, 未见骨或软骨形成。

术后 30 d, 植入中药 IBM 的颅骨缺损内见大量新骨形成, 部分新骨已由编织骨改建为板层骨结构 (图 4); 而植入 IBM 的颅骨缺损部位仅在宿主骨附近形成少量新骨, 缺损中部见血管及纤维组织增生, 但未见新骨 (图 5); 胸部皮下的中药 IBM 和 IBM 植入物部分吸收, 未见新生骨或软骨形成 (图 6)。

2.3 组织形态测量 中药 IBM 组和 IBM 组在术后 10 d 和 30 d 在颅骨缺损部位的新骨面积%见表 1, 新骨面积为编织骨和板层骨的总和。

统计学分析表明中药 IBM 在术后 10 d 和 30 d 的新骨面积%均显著高于 IBM 组, 10 d 组: $t = 12.41, P < 0.01$; 30 d 组: $t = 22.32, P < 0.01$ 。

2.4 生物化学分析 术后 10 d 和 30 d 各种植入物

的 ALP 活性见表 2, 钙含量见表 3。

表 1 中药 IBM 组和 IBM 组在颅骨缺损部位的新骨面积 % 比较 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

植入物	10 d	30 d
中药 IBM	15.21 \pm 3.20	32.81 \pm 4.87
IBM	1.23 \pm 0.45	3.53 \pm 1.14

表 2 中药 IBM 组和 IBM 组的 ALP 活性 (Units/ mg 蛋白质 n = 8, $\bar{x} \pm s$)

植入物	10 d	30 d
中药 IBM(颅部)	14.88 \pm 4.02	11.02 \pm 2.34
IBM(颅部)	1.89 \pm 0.51	3.76 \pm 0.81
中药 IBM(皮下)	0.83 \pm 0.31	0.91 \pm 0.35
IBM(皮下)	0.62 \pm 0.28	0.81 \pm 0.37

统计学分析表明植入颅骨缺损内的中药 IBM 组在术后 10 d 和 30 d ALP 活性均显著高于 IBM 组。10 d: $t = 8.85, P < 0.01$; 30 d: $t = 8.37, P < 0.01$ 。植于皮下组织的中药 IBM 组在术后 10 d 和 30 d 的 ALP 活性略高于 IBM 组, 但组间差别无显著性, 10 d: $t = 1.46, P > 0.05$; 30 d: $t = 0.35, P > 0.05$ 。

表 3 中药 IBM 和 IBM 组的钙含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}, n = 8, \bar{x} \pm s$)

植入物	10 d	30 d
中药 IBM(颅部)	10.79 \pm 1.98	26.31 \pm 4.78
IBM(颅部)	1.09 \pm 0.45	4.29 \pm 1.22
中药 IBM(皮下)	0.87 \pm 0.41	1.43 \pm 0.58
IBM(皮下)	0.74 \pm 0.32	1.09 \pm 0.51

统计学分析表明植入颅骨缺损内的中药 IBM 组在术后 10 d 和 30 d 钙含量显著高于 IBM 组, 10 d: $t = 13.51, P < 0.01$; 30 d: $t = 12.63, P < 0.01$ 。植于皮下组织的中药 IBM 组和 IBM 组的组间差别无显著性, 10 d: $t = 0.70, P > 0.05$; 30 d: $t = 1.25, P > 0.05$ 。

3 讨论

3.1 接骨中药提取物具有促进成骨的作用 本实验证明接骨中药提取物确有刺激成骨细胞分化的功能。其根据为: 颅骨的再生能力很差。文献报道直径 8 mm 的大鼠颅骨缺损如无有效处理, 术后 13 个月仍未愈合, 骨缺损部位被致密纤维组织所充填^[2,4]。因此颅骨缺损部位的新骨形成基本上归因于植入物的作用。在颅骨缺损内植入 IBM 后 30 d, 缺损边缘形成少量新骨, 而缺损中部无新骨形成, 提示这种边缘成骨现象为宿主骨和骨膜的修复

反应向植入物内的延伸。而同期植入中药 IBM 复合物的颅骨缺损中部可见大量的新骨形成, 这些岛状新骨大多与宿主骨不连接。证明实验期间缺损中部的的新骨形成归因于中药提取物的生物活性。

3.2 接骨中药提取物的成骨作用具有组织特异性

本实验观察到接骨中药 IBM 复合物能刺激颅骨缺损部位的间充质细胞向成骨细胞分化, 进而形成新骨; 而相同剂量相同成分的植入物在胸部皮下未能诱导间充质细胞分化成骨。这种组织部位的特异性可能与以下因素有关: 颅骨缺损部的硬脑膜和头皮下结缔组织(手术时缺损部的骨膜已切除)内的间充质反应细胞与胸部皮下的反应细胞的分化程度和细胞受体等特性可能有所不同。由于硬脑膜与颅骨内板骨膜在解剖上有联系, 硬脑膜浅层细胞的分化程度可能较接近成骨潜能细胞, 在接骨中药提取物的刺激下具有向成骨细胞分化的潜能。接骨中药可能直接刺激有成骨潜能的局部细胞内源性生长因子的表达。这些内源性因子的表达和分泌可进一步改变局部生物化学环境的影响, 并调节接骨中药的生物活性。临床观察到口服接骨中药可促进骨愈合但未见软组织内异位成骨, 也说明接骨中药的成骨作用具有组织特异性。

本实验证实接骨中药提取物植入大鼠颅骨缺损后具有促进成骨细胞分化的功能, 这一发现在接骨中药的理论研究和临床应用方面均有重要意义。如能分离和纯化接骨中药的主要有效成分, 测定其局部植入促进骨折及骨缺损愈合的最佳浓度, 将对接骨中药的研究和临床应用产生更为深远的指导意义。

(本文图 1 - 6 见后插页 1)

参考文献

- 1 Wang J, Glimcher MJ. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: I. Differences in the cellular response to demineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. *Calcif Tissue Int*, 1999, 65:156-165.
- 2 Wang J, Glimcher MJ. Characterization of matrix-induced osteogenesis in calvarial bone defect. .Origins of bone-forming cells. *Calcif Tissue Int* 1999, 65:486-493.
- 3 王金熙, 吴士良, 周海斌, 等. 纯化天然骨唾液蛋白的体内成骨活性. *中华骨科杂志*, 2000, 20(4):234-238.
- 4 Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniof Surg*, 1990, 1:60-68.

(收稿:2002 - 07 - 10 修回:2002 - 11 - 26 编辑:李为农)

局部植入接骨中药提取物促进骨愈合的实验研究

(正文见 346 页)

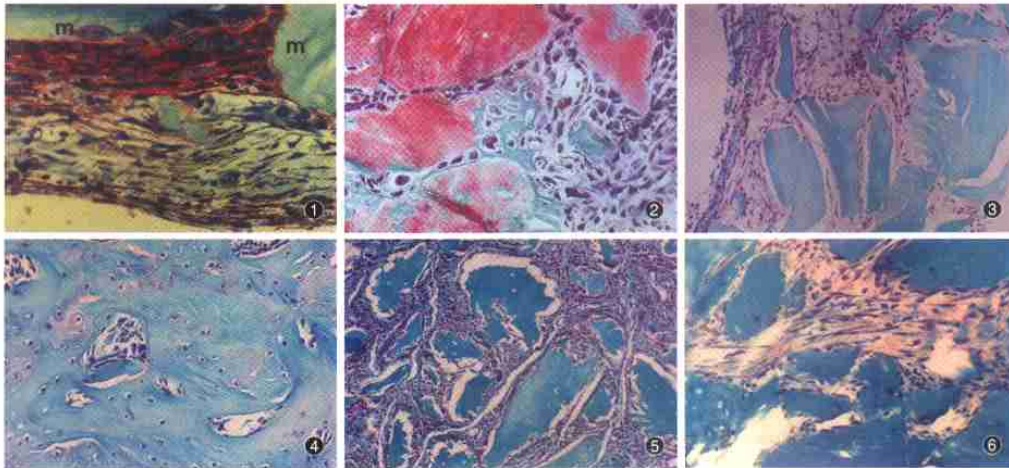


图1 术后10d, 颅骨缺损处的中药提取物-IBM植入物内见间充质细胞向前成骨细胞和成骨细胞分化的形态特征, IBM颗粒(m)之间有大量具有ALP活性(红色)的前成骨细胞和成骨细胞(ALP染色 $\times 280$)。图2 术后10d, 植入中药提取物-IBM的颅骨缺损内见新骨形成。绿色为新骨基质, 红色为植入之IBM颗粒, 其表面有大量典型的成骨细胞(Goldner染色 $\times 260$)。图3 术后10d, 单纯植入IBM绿色颗粒的颅骨缺损中部见成纤维细胞增生, 未见成骨反应(Safranin-O染色 $\times 125$)。图4 术后30d, 植入中药提取物-IBM的颅骨缺损中部见较成熟的新骨和新生骨髓组织(Safranin-O染色 $\times 200$)。图5 术后30d, 植入IBM的颅骨缺损内见IBM颗粒(绿色)部分吸收, 颗粒之间由纤维组织所充填, 未见骨或软骨形成(Safranin-O染色 $\times 125$)。图6 术后30d, 胸部皮下的中药提取物-IBM植入物内未见新骨或软骨形成(Safranin-O染色 $\times 160$)。

长时间异常应力负荷下兔颈椎间盘的组织病理学观察

(正文见 374 页)

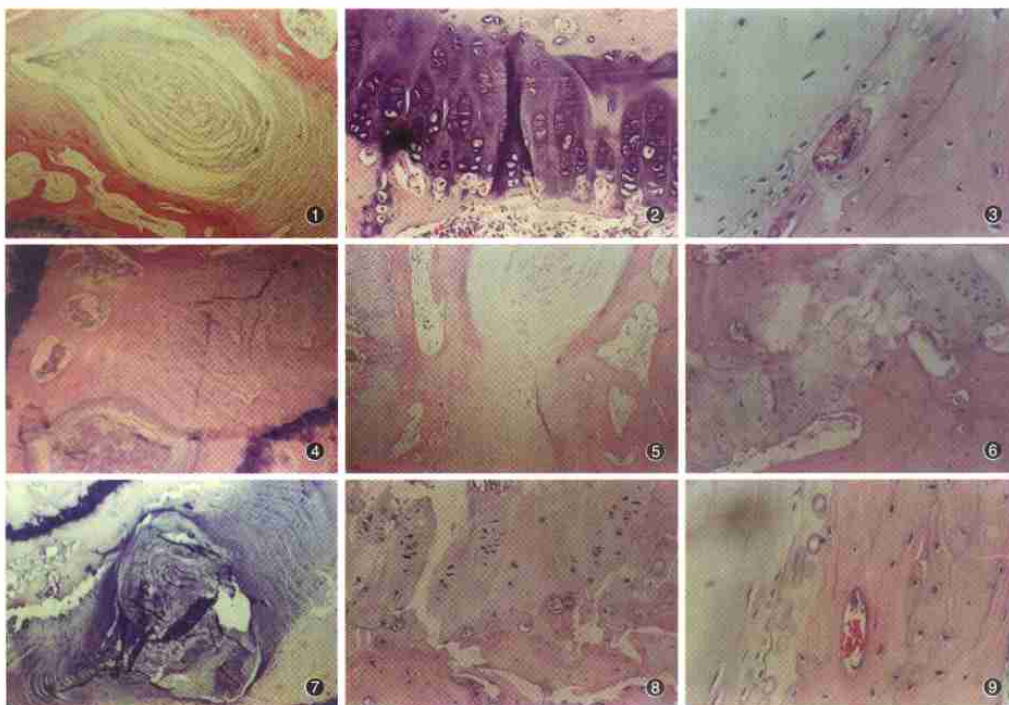


图1 处理前对照正常颈椎间盘, 髓核居中, 纤维环完整, 上下缘由软骨终板封闭(HE $\times 40$)。图2 处理前对照正常颈椎间盘终板关节软骨与髓核交界处, 软骨下方直接与骨髓腔毗邻, 骨髓腔血管中有粗大血管分布, 潮线分布明显(HE $\times 400$)。图3 处理前对照正常颈椎间盘终板生长软骨, 软骨细胞呈柱状有序排列(HE $\times 200$)。图4 1月模型组颈椎间盘, 髓核皱缩, 纤维环肿胀变性(HE $\times 40$)。图5 2月模型组颈椎间盘, 纤维环变性, 髓核皱缩, 轻微向后突出(HE $\times 40$)。图6 2月模型组颈椎间盘终板生长软骨, 软骨细胞变性坏死, 数目明显减少, 排列紊乱, 软骨下骨板增厚(HE $\times 200$)。图7 3月模型组颈椎间盘, 髓核皱缩, 纤维环变性, 与终板连接处断裂(HE $\times 40$)。图8 3月模型组颈椎间盘终板生长软骨, 出现明显裂隙(HE $\times 200$)。图9 3月模型组颈椎间盘终板关节软骨与髓核交界处, 潮线向前推进, 钙化关节软骨层明显增厚, 软骨细胞坏死(HE $\times 400$)。