

实验研究

补骨素对实验性骨折愈合的影响 (成骨细胞 RNA 观察和血生化研究)

福建中医学院骨伤研究所 (350003) 林燕萍 王和鸣 周瑞祥*

摘要 30只家兔双侧桡骨骨折造模后, 分别喂以补骨素和生理盐水, 通过组织化学、血生化等检测手段, 观察补骨素对骨折愈合的作用。实验结果显示: 补骨素不但能促进骨细胞内RNA的合成, 增强成骨细胞活性, 使成骨细胞生长成熟加快, 而且还为骨折端钙盐沉积提供有利条件, 故补骨素确为一种促进骨折愈合之良药。

关键词 补骨素 骨折 实验, 动物

补骨素是在福建省骨伤科专家林如高经验用方基础上新开发的一种中药, 它具有活血和络、健脾生新、接骨续筋、强筋壮骨的功能。为了探讨该药对骨折愈合的作用, 我们采用家兔实验性骨折, 观察补骨素在骨折愈合过程中对成骨细胞核糖核酸 (RNA) 及血中钙、碱性磷酸酶的影响。

材料和方法

实验动物为健康雄性家兔30只, 体重1.5~2.0kg, 在无菌条件下, 按常规方法, 在每只家兔的两侧桡骨中、下1/3部位旋前圆肌止点远端, 用咬骨钳造成3mm宽缺损的标准骨折模型^[1], 逐层缝合, 不做固定。随机分成用药组和对照组, 每组各15只。用药组每天一次定时给予喂服补骨素20ml/只, 对照组则喂以生理盐水20ml/只/天。从骨折造模的当天即开始喂服, 直至被处死前一天。骨折后7、14、21、28、35天分五批用断颈法处死, 每批处死动物中用药组、对照组各3只。处死前先心脏抽取血液进行生化检查, 处死后每批动物作以下处理:

1. 取右侧尺桡骨标本, 用10%福尔马林液固定, 5%硝酸脱钙, 经5~7天彻底脱钙后, 将桡骨标本修截成以骨缺损处为中心, 兼上、下骨端约1.0~1.5cm长的组织块, 经冲洗、脱水、透明、石蜡包埋, 沿桡骨纵轴作7μm厚的连续切片, 苏木素—伊红 (HE) 染色。

2. 取左侧尺桡骨标本, 置冰醋酸—纯酒精 (1:3) 混合液中固定4~6小时, 再用福尔马林—生理盐水 (1:4) 固定24小时, 经Lorch's 脱灰剂在室温下脱钙7~15天。同样将桡骨标本修截成以骨缺损处为中心, 兼上、下骨端约1.0~1.5cm长的组织块, 常规石蜡包埋, 切片5μm, 行甲绿—吡洛宁染色, 显示核糖核酸 (RNA), 脱氧核糖核酸 (DNA)。

血液生化测定: 血清钙含量的测定用乙二醛双—2—羟苯胺试剂比色法^[2], 血清碱性磷酸酶浓度的测定采用磷酸苯二钠法^[3]。

结 果

初期 (骨折后7天): 用药组骨折端水肿大小不一, 有大量的纤维结缔组织侵入及成骨细胞出现。成骨细胞多为立方状, 胞质中含有较多的红色核糖核酸颗粒 (++)。骨外膜反应非常明显, 见到大量的立方状成骨细胞及新生骨小梁。在这些新生的骨小梁内, 骨细胞的胞质及粗短的胞突中含有较多粗大、深红的核糖核酸颗粒 (++~+++), 核仁大, 且着色深红。对照组骨折端仅见到大块的血肿坏死组织, 纤维侵入极少, 未发现明显的成骨细胞。骨外膜以结缔组织为主, 仅在靠密质骨处可见到扁平状的成骨细胞, 其胞质内只有少量分散、细小的浅红色核糖核酸颗粒 (+), 未见明显的红色核仁。

*福建医学院基础部

中期(骨折后14天): 用药组骨折端有较多的新生骨小梁, 血肿坏死组织较少, 可见到软骨组织钙化现象, 在碎骨片周围出现较多的以立方状为主的成骨细胞以及破骨细胞包绕, 在破骨细胞胞质内, 分布着非常稠密、颗粒粗大的红色核糖核酸(卅~卅卅)。骨外膜以大量新生骨小梁为主, 小梁内的骨细胞其胞质内的核糖核酸含量为(卅~卅卅)。小梁表面的成骨细胞多呈高柱状, 细胞胞质内的核糖核酸颗粒较为丰富(卅), 核仁大, 红色明显, 细胞核亦较大, 其内的绿色脱氧核糖核酸(DNA)较少。骨外膜接近骨折处有较大软骨组织, 可见软骨细胞肥大融合坏死现象。而此期的对照组骨折端血肿坏死被结缔组织分割, 有胞体较大的软骨细胞出现, 软骨组织增生明显。亦可见到一些扁平状成骨细胞, 在断端周围有少量新生骨小梁出现。骨小梁内骨细胞的核糖核酸含量有(卅~卅卅)。骨外膜以结缔组织及大量立

方状成骨细胞为主, 仍未见明显的新生骨小梁形成。

后期(骨折后28天): 此期用药组骨折端以新生骨小梁为主, 仅在局部见到少量的软骨组织骨化残迹, 到骨折后35天, 骨折端已完全呈新生骨结构。骨外膜的骨小梁结构与密质骨相近, 此时骨小梁中的骨细胞形状扁平, 胞质内未见明显的红色核糖核酸颗粒, 细胞核浓缩, 呈深兰绿色, 核仁也未显红色。而对照组骨折端有较多新生骨小梁, 可见软骨组织大片融合坏死现象。到35天, 断端以新生骨小梁为主, 小梁内的骨细胞胞质中仍充满了粗大、深红的核糖核酸颗粒(卅~卅卅), 小梁表面的成骨细胞多为高柱状。骨外膜以新生骨小梁为主, 局部仍可见软骨组织骨化现象。

血清钙含量、血清碱性磷酸酶浓度的测定结果如下图表:

30只家兔正常血清钙含量为 $10.027 \pm$

表1 血清钙含量 ($\bar{x} \pm SD$)

天数	7	14	21	28	35
用药组	14.833 ± 1.041	11.333 ± 3.802	11.933 ± 1.447	10.333 ± 3.557	10.275 ± 2.262
对照组	12.33 ± 0.642	16.376 ± 3.308	11.767 ± 0.896	13.2 ± 4.508	13.1 ± 2.623

表2 血中碱性磷酸酶浓度 ($\bar{x} \pm SD$)

天数	7	14	21	28	35
用药组	12.507 ± 1.155	13.163 ± 0.828	13.53 ± 6.712	12.323 ± 6.012	9.643 ± 4.021
对照组	8.267 ± 0.929	11.35 ± 1.625	10.99 ± 2.611	8.633 ± 0.432	12.38 ± 0.415

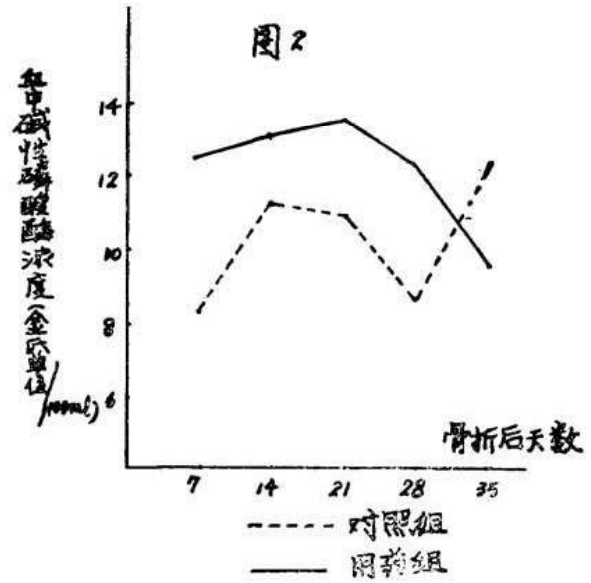
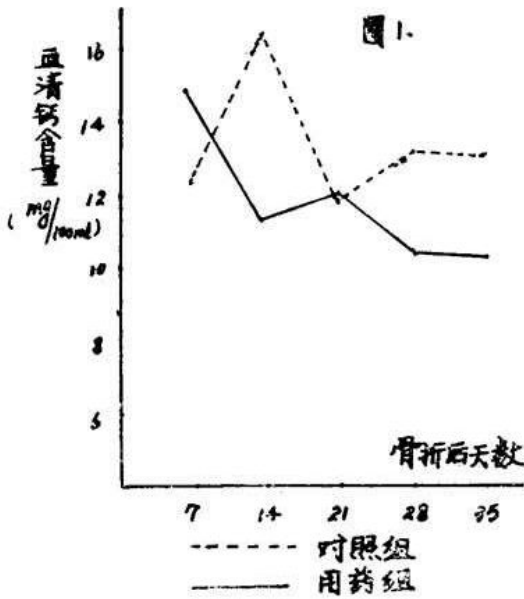
1.259mg/100ml, 说明动物个体差异较小, 血清钙含量较为稳定。从图1、表1中可以看出, 骨折后7天, 两组动物血清钙含量均有升高, 而用药组上升幅度大(达14.833mg/100ml)。一周以后用药组钙量开始下降, 而对照组仍持续上升, 直到14天才渐趋下落, 但从总的趋势来看, 用药组血清钙含量较对照组低。

血中碱性磷酸酶浓度正常时为 8.224 ± 1.025 金氏单位/100ml, 表明实验动物个体间差异小, 血中碱性磷酸酶浓度在正常状态下变

化不大。骨折后, 不论用药组, 还是对照组, 血中的碱性磷酸酶浓度都有不同程度的提高, 用药组到21天出现下降, 35天开始接近正常水平。对照组在整个实验观察期间(35天)出现两次波峰。28天以前用药组血中碱性磷酸酶浓度均比对照组高, 直到35天对照组才超过用药组。

讨 论

人体一旦遭受损伤, 则络脉受损, 气机凝滞, 营卫离经, 瘀滞于肌肤腠理, 出现肿、



痛、功能障碍等。根据骨折损伤的病理发展过程，可分为初、中、后三期，初期由于气滞血瘀，故需活血祛瘀；中期因瘀虽祛而未清，肿虽退而未消，应和营生新止痛，接骨续筋，以进一步调和气血；后期多因久病体虚，伤久必虚，此时骨虽合而未坚，宜培补肝肾脾胃，以强筋壮骨，使损伤骨骼恢复原有生理功能。前文提到，补骨素具有活血生新、接骨续筋、强筋壮骨的功能，从中医理论角度而言，它适用于骨折愈合的整个过程。从本实验结果看：用药组在第一周骨外膜、骨折端即可见到大量立方状的成骨细胞，到第二周，成骨细胞多呈高柱状，而对照组到第二周成骨细胞还多以扁平状为主，少数可见立方状，第四周方可见到高柱状成骨细胞的出现。实验中还发现，在骨折愈合过程中，当成骨细胞由扁平状逐渐分化形成立方状乃至高柱状时，细胞胞质中核糖核酸含量亦在逐渐增加（由+→++）⁽⁵⁾，而较为丰富的核糖核酸含量表明其产生蛋白的能力较强⁽⁴⁾。用药组骨折端及骨外膜的新生骨小梁出现均较早，且分化成熟得也快。新生骨小梁内骨细胞核糖核酸含量在第一周就有(++~+++)。到28天，新生骨小梁各成分的染色效果已与密质骨相近。而对照组新生骨小梁出现得迟，分化成熟得亦慢。到35天，骨断端新生骨痂内骨细胞胞质中仍布满了粗大、颜色深红的核糖核

酸颗粒(++~+++)。在新生骨小梁中当骨细胞由幼稚分化成熟时，其胞质中的核糖核酸的含量将逐渐降低。成骨细胞及骨细胞内蛋白质合成旺盛，速度加快，细胞生长迅速，分化成熟早，无疑有利于骨折的愈合。

血液生化检测结果显示：骨折后，血中的碱性磷酸酶浓度以用药组上升明显，且高峰比对照组提早一周出现。碱性磷酸酶的增加，峰值的提前出现，均表示成骨细胞活性增强⁽⁴⁾。结合前面组织形态学及组织化学观察结果，用药组成骨细胞是比对照组出现得早，且数量多，其胞质中的核糖核酸含量也较对照组多，我们推测，这可能是补骨素活血生新功能通过刺激成骨细胞活动的结果。众所周知，骨折愈合是一个相当复杂的过程，它必须依赖有关细胞的积极活动，而成骨细胞的活动又是各种生骨细胞中最为主要、最为直接的。成骨细胞活动增强，既有助于基质的形成，又有利于钙化的进行⁽⁶⁾，自然能促进骨折的愈合。

钙是骨折愈合过程中基质钙化及骨化不可缺少的成分，所以当发生骨折损伤时，机体必须提供足够的钙和氨基酸，才能让骨痂转化为钙化骨痂⁽⁷⁾。我们曾对补骨素进行药物成分分析，结果发现它至少含有人体必需的16种氨基酸，以及大量的钙，当家兔骨折造模后，定时给予喂服补骨素，这样既为合成胶原所需的

氨基酸提供原料,更为骨折端钙盐沉积准备了条件。本实验结果显示:骨折后一周用药组与对照组的血钙含量均比骨折前高,而前者上升明显,这可能与用药组在此时成骨效应还不是最强,同时机体又不断补充含钙量丰富的补骨素有关。到一周以后,用药组血钙含量下降,且总趋势比对照组低。对照组血钙含量高,一方面可能是因为成骨速度慢,断端钙的需求量在整个观察期间尚处于较低水平,另一方面则因破骨细胞对骨折处碎骨的吸收,又释放一部分钙入血。而用药组血钙含量从一周以后一直处于对照组之下,可能与其成骨速度快有关。由于成骨速度快,骨折处需要较多的钙盐沉积而使全身代偿性血钙降低,从而进一步佐证了补骨素能加速骨折愈合过程。

小 结

30只家兔双侧桡骨骨折造模后,通过组织学、组织化学及血液生化检测,观察内服补骨素对骨折愈合的影响。实验结果表明:补骨素能使成骨细胞内的核糖核酸合成速度加快,细

胞生长迅速,分化成熟提早,增强了成骨细胞的活性,并为骨折断端的钙盐沉积提供了有利条件。

参 考 文 献

1. 柴本甫等. 骨折模型. 中华外科杂志 1962; 5: 299.
2. 上海市医学化验所. 临床生化检验. 上海: 上海科学技术出版社, 1979; 222~223.
3. 上海市医学化验所. 临床生化检验. 上海: 上海科学技术出版社, 1979, 354~356.
4. Casperson, T. O. Relations between nucleic acid and protein synthesis. Symp. Soc-Exp. Biol., 1947; 1:127.
5. 葛子, 房世源. 家兔实验性骨折愈合过程中组织学和组织化学研究. 解剖学报, 1966; 9(1):1
6. 张克勤等. 七厘散对骨折愈合作用的初步探讨. 中华外科杂志, 1962; 5:305.
7. 柴本甫, 过邦辅. 理气药品对骨折愈合的初步研究. 中华外科杂志, 1962; 10(5):209.
8. 王和鸣. 中草药影响骨折愈合过程的实验研究. 中医骨伤科杂志, 1986; 2 (4):44.

腰痛 I 号方治疗实验性神经根炎的病理学观察

中国中医研究院骨伤科研究所 (100700) 苗燕玲 刘恩

摘要 腰痛 I 号治疗实验性大白鼠神经根炎的病理组织学改变的结果表明: 腰痛 I 号可使炎症减轻, 促进变性神经纤维的恢复, 减少胶质细胞和胶质纤维的增多, 减轻瘢痕化及瘢痕对周围神经组织的挤压。

关键词 腰痛 I 号 神经根炎 病理学

我所医师根据中医理论, 拟定腰痛 I 号方(腰痛 I), 临床治疗 143 例血瘀型椎间盘源性腰腿痛病人, 总有效率 93%^[1], 并建立了大白鼠神经根炎模型^[2]。本文主要介绍腰痛 I 治疗实验性大白鼠神经根炎的病理组织学改变。为腰痛 I 号方的实验研究提供部分依据。

药品与实验动物模型: 腰痛 I 号方分为成人剂量的 10 倍、20 倍、30 倍三种剂量; 腰痛宁、消炎痛各为成人剂量的 20 倍; 致炎物: 将直径 0.5cm 的圆形定量滤纸片浸于 0.5% 福尔马林水溶液 24 小时备用。以无菌手术的方法, 将致

炎物放于大白鼠第 5 腰神经根的腋侧^[2]

实验动物分组: 75 只 Waster 大白鼠, 雌雄各半, 体重 120—150g。随机分为六个实验组: (1) 对照组 15 只, 术前术后均不给药。(2) “腰痛 I” 10 倍组 (I₍₁₎) 10 只; (3) “腰痛 I” 20 倍组 (I₍₂₎) 14 只; (4) “腰痛 I” 30 倍组 (I₍₃₎) 12 只; (5) 消炎痛组 13 只; (6) 腰痛宁组 11 只。第 (2) 至 (6) 组分别在术前 3 小时开始灌胃给药, 对照组灌蒸馏水每日二次。各组分别在术后第 1、2、3、6 周处死, 取 L₄—S₁ 段脊髓及神经做病理切片, HE 染色。

Abstracts of Original Articles

Advance in studying of fracture treated with integration of traditional Chinese and western medicine

Gu Yun-wu(顾云伍), Han Hui(韩慧), Shang Tian-yu(尚天裕)

Tianjin Institute of Fracture treated by integration of Traditional Chinese and Western Medicine(300021)

The author discussed a new advance in treating fracture with integration of traditional Chinese and western medicine, including fracture reduction and external fixator instruments, Chinese herbs in treating fracture, basic theoretical studies and researches in future etc

Key Words Fracture, integration of traditional Chinese and western medicine
(Original article on page 5)

The effect of experimental fracture healing treated by Bu Gu Su

(Observations on osteoblast RNA and studies on blood biochemistry)

Lin Yan-ping(林燕萍), Wang He-ming(王和鸣) et al

Fujian Institute of Orthopaedics and Traumatology, College of TCM(350003)

Thirty rabbits which had standard fracture between mid and lower 1/3 of the radius doubly, were fed with Bu Gu Su(BGS) and physiological saline respectively. The histochemical and blood biochemical methods were used to detect the effect of BGS on the experimental fracture healing. The results show that BGS can not only promote the RNA synthesis of the osteoblast, strengthen the activity of the osteoblast, stimulate the growth and mature of osteoblast but also provide a favourable environment for calcification. So we consider that the BGS is an effective drug for fracture healing

Key Words Bu Gu Su, fracture, experiment, animal

(Original article on page 8)

Pathological observations on experimental radiculoneuritis treated by Lumbago No.1

Miao Yan-ling(苗燕玲), et al

Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of Traditional Chinese Medicine(100700)

The results of pathologico-histological changes of Lumbago No.1 in treating experimental rat radiculoneuritis indicate that it can alleviate the inflammation,

promote restoration of the degenerative nerve fibres, decrease proliferation of glia cells and collagenous fibres, alleviate cicatriciation and compression of the peripheral nerve tissue from the scar.

Key Words Lumbago No. 1, radiculoneuritis, pathology

(Original article on page 11)

Eexperiences of Prof. Zhu Fang-shou in treating cervical spondylosis

Li Ning (李宁)

Jiangsu Province Traditional Chinese Medical Hospital(210029)

In this article, elevation of neck rotation method, Lei Gong Teng prescription orally administering, medical pillow supporting the neck method, cervical supportor method, functional exercises five therapeutic methods in treating cervical spondylosis were introduced.

Key Words Cervical spondylosis, traditional Chinese medicine therapy

(Original article on page 13)

Clinical study on osteoporosis caused by senile rheumatoid arthritis treated with traditional Chinese medicine

Liu Chuan-zhen (刘传珍), et al

Jiangbei Central. Hospita, Ningbo City, Zhejiang Province (315020)

Senile osteoporotic patients caused by rheumatoid arthritis were divided into three types. They are deficiency of Spleen and Kidney Yang type treated with a prescription which bears the action of tonifying the Kidney and warming Yan, invigorate the Spleen and removes dampnes by diuresis; deficiency of the Kidney essence with blood stasis type treated by the prescription of nourishing the Kidney and removing stasis, recovering paralysis and activating collaterals; Yindeficiency in both the Liver and Kidney, treated by prescription of nourishing the liver, fulfilling the marrow, promoting collaterals and clearing away the fire. The total effective rate was 93.1% and that of the control group being 80.0%. There are significant difference ($P < 0.05$) statistically.

The statistical data indicates that Chinesemedicine treatment has improved bony tissue's density, ESR, RF, protein electrophoresis, Ig, C3, CIC, morning rigidity, griping strength, 20m walking time, pain, arthroncus, tiredness of the joints and function of them.

Key Words Osteoporosis, senile, rheumatoid arthritis, traditional Chinese medicine therapy

(Original article on page 17)