

• 基础研究 •

伤科接骨片对实验型骨折愈合过程中 TGF- β_1 的影响

石关桐¹ 吴宇峰² 沈培芝³ 曹月龙³

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021; 2. 中山市中医院; 3. 上海中医药大学骨伤科研究所)

【摘要】 目的 观察应用伤科接骨片后骨折愈合过程中 TGF- β_1 (转化生长因子- β_1) 的变化, 以进一步探讨其促进骨折愈合的机理。方法 72 只日本大耳白兔随机分为实验组和对照组, 每组各 36 只。在兔桡骨处用手术方法制备骨折模型, 术后即日起试验组给与伤科接骨片, 150mg/kg/d。于术后 3 天、1 周、2 周、3 周、4 周、6 周每组分别处死 6 只兔, 取标本, 采用免疫组化方法进行染色, 光镜下观察, 并利用图像分析的方法测定其 TGF- β_1 表达强度。结果 在骨折后的同一时间, 实验组和对照组的骨痂组织中 TGF- β_1 的染色有差异, 实验组的峰值比对照组约提前一周出现, 且比对照组的峰值高。结论 伤科接骨片可以调节骨折愈合过程中 TGF- β_1 的合成和分泌, 从而促进骨折的愈合。TGF- β_1 可能是伤科接骨片对骨折愈合过程影响的一个作用环节。

【关键词】 中成药 骨折 转化生长因子 β

The effect of Shangke jiegu tablet on TGF- β_1 in experimental fracture healing SHI Guan-tong, Wu Yu-feng, SHEN Pei-zhi, et al. Shuguang Hospital affiliated to Shanghai University of TCM (Shanghai, 200021)

【Abstract】 Objective To observe the effect of Shangke jiegu tablet on TGF- β_1 in experimental fracture healing and investigate the mechanism in the acceleration of fracture healing **Methods** 72 rabbits were divided into treatment group (36) and control group (36) randomly. The model were established on rabbits' radius and the experimental group were fed Shangke jiegu tablet with the dose of 150mg/kg/d. The specimens were taken from 6 rabbits of each group at 3 days, 1, 2, 3, 4, 6 weeks respectively after operation. The immunohistochemical staining and image analysis method were used to measure the expression intensity of TGF- β_1 . **Results** There were difference in callus immunohistochemical staining between the experimental and control groups simultaneously. The peak of expression intensity of TGF- β_1 of the treatment group appeared about 1 week ahead of the control group with a higher concentration. **Conclusion** Shangke jiegu tablet may be of help for the synthesis and secretion of TGF- β_1 in fracture healing and TGF- β_1 seemed to be a factor of the function of Shangke jiegu tablet.

【Key Words】 Chinese patent drugs Fractures Transforming growth factor β

伤科接骨片是目前广泛应用于骨伤科临床中的中成药, 取得了较好的疗效。临床及实验研究已从组织学、组织形态学、生物力学等不同角度证实该药能够促进骨折愈合^[1,2], 结合有关 TGF- β_1 的研究, 将有助于加深对其作用机制的认识。

1 材料与方

1.1 动物的选择及分组 日本大耳白兔 72 只, 5~7 月龄, 体重 2.5~3.0kg, 由上海中医药大学实验动物中心提供。应用随机数字表完全随机分为实验组和对照组, 每组 36 只。实验过程中, 实验组中一只意外死亡, 对照组中两只伤口感染, 排除实验观察。

1.2 模型制备 采用柴本甫氏^[3]造模方法, 氯氨酮 0.1g/kg

全身麻醉后, 在一侧桡骨旋前圆肌止点附近作约 3mm 缺损, 保留尺骨完整, 逐层缝合, 不置内外固定。

1.3 给药方法 造模后即日治疗组开始喂服伤科接骨片, 150mg/kg/d, 分 2 次给药, 约相当人的等效剂量。所用药物为大连中药厂生产, 辽卫药准字(1996)第 800233 号, 主要成份: 海星、鸡骨、土鳖虫、三七、红花、乳香、没药、自然铜等。两组均同时以普通饲料喂养。

1.4 标本取材及制备 于术后 3 天、1 周、2 周、3 周、4 周、6 周应用随机区组法每组分别抽取 6 只兔处死, 以骨折处为中心, 远近端各取约 1cm, 去除不必要的软组织, 置于 4% 多聚甲醛固定, 10% EDTA 脱钙 3~5 周, 每周换液一次。脱钙达

到终点后, PBS 液充分冲洗, 常规石蜡包埋。

1.5 免疫组化实验 ①主要试剂: TGFβ₁McAb(上海细胞生物研究所, 工作浓度 1:100), ABC 试剂盒(Vectec 公司); ②染色方法: 采用 ABC 染色方法。将石蜡包埋组织作 4μm 切片, 37℃过夜, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化。0.3% 过氧化氢甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶, 正常羊血清封闭非特异性染色, 加 TGFβ₁McAb 4℃过夜, 依次经生物素化第二抗体, ABC 复合物处理, DAB 显色。以上各步骤间需用 PBS 液充分振洗, 再经苏木素复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。PBS 代替第一抗体, 染色结果为阴性。

1.6 图像分析 采用 IMS 彩色图像分析综合系统, 华东理工大学免疫组化分析软件进行。每个标本取 5 张切片, 每张切片显微镜下放大 200 倍, 随机取 5 个视野, 测定其阳性强度均值, 结果进行统计学处理, 组间 t 检验。

2 结果

2.1 光镜观察 骨折后 3 天, 实验组血肿已向肉芽组织转化, 炎性细胞减少, TGFβ₁ 染色较对照组浅, 而在近骨折片的骨外膜下可见到幼稚的新生骨, 其表面衬附的成骨细胞内外均有 TGFβ₁ 染色, 胞内较强。对照组血肿中炎症反应明显, 细胞间质中见片状的 TGFβ₁ 强阳性染色。

骨折后 1 周, 实验组骨外膜深层间充质细胞增殖活跃, 有

向成纤维细胞、软骨细胞、成骨细胞分化的趋势, 胞浆内有 TGFβ₁ 的深染色。对照组也出现间充质细胞增殖和骨膜下新生骨, 但细胞数量少, 且 TGFβ₁ 染色较实验组浅, 肉芽组织类似于实验组骨折后 3 天的情况。

骨折后 2 周, 实验组可见活跃的膜内成骨和软骨成骨, 成熟的软骨细胞内 TGFβ₁ 强阳性染色。对照组可见软骨成骨早期的表现, 成熟软骨细胞不多。

骨折后 3~4 周, 实验组连接骨痂已形成, 软骨骨痂开始向硬骨痂转化, 可见到肥大的软骨细胞染色较浅或不着色。对照组第 4 周骨痂有初步连接, 但骨痂中夹有一些纤维骨痂, 可见中等强度的 TGFβ₁ 染色。

骨折后 6 周, 实验组断端完全连接, 软骨痂已很少, 骨小梁间隙减小, 弥合成片, 部分形成板层骨, 可见清晰的骨陷窝, 成骨活动明显减弱, 细胞或间质中 TGFβ₁ 染色很淡或消失。对照组连接骨痂中软骨痂较多。

2.2 图像分析 骨折早期, TGFβ₁ 染色强度均值低, 以后逐渐升高, 成骨活跃时最高, 随着修复的逐渐完成, TGFβ₁ 染色强度均值逐渐降低。骨折后 3 天, 相当于骨折损伤反应期, 对照组的 TGFβ₁ 染色度均值较实验组高(P < 0.05)。实验组在第 2 周, 出现染色高峰, 较对照组提前一周, 差异显著(P < 0.01)。见如下表 1。

表 1 TGFβ₁ 染色强度均值(̄x ± s)

| 时间 | N | 3 天 | 1 周 | 2 周 | 3 周 | 4 周 | 6 周 |
|-----|----|------------|------------|-------------|----------|------------|-----------|
| 对照组 | 36 | 11 ± 3.6* | 11.2 ± 4.0 | 15.8 ± 2.3* | 20 ± 2.5 | 15.2 ± 3.7 | 9.8 ± 2.1 |
| 实验组 | 36 | 10.8 ± 4.1 | 13 ± 5.1 | 23.2 ± 2.8 | 16 ± 3.1 | 15 ± 5.2 | 8.8 ± 1.9 |

与对照组比较, * P < 0.01, ** P < 0.05。

3 讨论

六十年代末, Urist 等^[4] 提出骨诱导学说, 使得骨生长因子在骨折愈合中的重要作用受到越来越多的关注。TGFβ (转化生长因子β) 被认为是激发骨折修复的诱导因子之一, 是目前研究的一个热点。TGFβ 是一种分子量为 25kd 的多肽, 有 5 种异构体 TGFβ₁₋₅, 各种异构体在许多生物反应中表现出相似的作用, 其中 TGFβ₁ 最为重要。骨和血小板中 TGFβ 的含量最为丰富, 在骨折修复过程中, 一方面血小板通过脱颗粒作用向骨折处释放高浓度的 TGFβ, 刺激相邻的骨细胞的增生和增加基质蛋白的合成, 另一方面, 骨折局部的修复细胞自身合成并分泌 TGFβ, 并刺激这些细胞的功能活跃。这样以自分泌和旁分泌的方式调节骨折愈合不同阶段的细胞的功能, 从而促进骨折的愈合^[5]。TGFβ 不仅调节骨、软骨细胞的生长分化, 还能协调诸多生长因子在骨、软骨组织中的表达和作用^[6,7]。

分析骨折接骨片的组成, 主要包括: 活血化瘀药(三七、红花、乳香、没药)、动物骨类药(鸡骨、土鳖虫、海星)、铜类药(自然铜)。活血化瘀类药物能降低骨折局部毛细血管的通透性, 减少炎性渗出, 促进血管重建使局部血运障碍很快恢复; 同时, 还能降低全血粘度及红细胞聚集程度, 改善局部的血液循环^[8]。铜是骨折愈合过程中最活跃的元素^[9], 在骨折修复中作用显著, 进入体内的铜可能通过某种形式激发成骨细胞活性, 有利于基质蛋白的合成。王智兴等^[10] 的研究证实, 自然铜有利于骨痂的胶原合成和钙、磷沉积的增加。动物骨类药

中所含的钙、磷等矿物质含量和比例与人体骨骼近似, 易于被吸收利用, 能促进骨质矿化; 同时还含有胶原合成的必需氨基酸。这些是骨折接骨片能够促进骨折愈合的物质基础。

TGFβ 能诱导 bFGF(碱性成纤维细胞生长因子) 和 PDGF(血小板衍生生长因子) 的 mRNA 的表达^[11]。bFGF 是毛细血管增殖刺激剂, 能促进毛细血管向骨折端生长^[12](这对于骨折局部血供的重建有重要意义), 并能对成骨细胞基因进行调节; TGFβ 能够通过改变成骨细胞的 PDGFR(血小板衍生生长因子受体) 来调节 PDGF 对成骨细胞的促增殖作用^[13]; 并且 TGFβ 可诱导 I 型胶原的合成。这些恰恰与活血化瘀药、铜类药和动物骨类药在骨折愈合过程中所表现的作用密切相关。

在本实验中, 实验组与对照组的骨折愈合过程中 TGFβ₁ 的表达趋势与上述是一致的。光镜下观察发现, 骨折后 3 天, 对照组骨折断端周围大量炎性细胞浸润, 间质中可见 TGFβ₁ 的较强染色, 而实验组的炎症反应已开始减弱, TGFβ₁ 的染色较浅, 在骨外膜下已有幼稚的编织骨出现。这可以解释骨折后 3 天实验组的染色强度均值低于对照组的图像分析结果, 说明骨折接骨片能够缩短炎症反应期, 较早地启动修复过程。在第 2 周, 实验组的膜内化骨和软骨化骨都很活跃, 此时, TGFβ₁ 的染色阳性强度均值达到峰值。对照组则在第 3 周达到峰值, 比实验组迟后了一周左右, 同时其峰值也较实验组的峰值为低。提示骨折接骨片可能促进 TGFβ₁ 的合成与分泌, 导致实验组的成骨活动比对照组活跃。到骨折的后期,

两组 TGF- β_1 的表达强度均呈下降趋势, 图像分析结果无统计学差异。从 TGF- β_1 的角度讲, 药物的作用较明显地表现在骨折的早、中期。

实验的结果表明, 在骨折修复进程中, 伤科接骨片可能作用在 TGF- β_1 这一环节上, 调节 TGF- β_1 的合成和分泌, 从而促进骨折的愈合。值得注意的是, 任何时候骨细胞的微环境中都不只出现某一种因子, 骨折愈合是一个多种骨生长因子共同参与、相互协调的复杂的生物学过程, 不是单以 TGF- β 所能够解释的。TGF- β 可能也只是其作用的一个环节、一个方面。伤科接骨片对 TGF- β 与其它骨生长因子的整体协调作用有何影响, 有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 徐栋梁, 李佛保, 黄芝胜, 等. 伤科接骨片对骨质疏松性骨折疗效和机制的研究. 中华创伤杂志, 1998, 14(1): 25-27.
- [2] 魏玉玲, 晏雪生, 梁克玉. 伤科接骨片促进骨折愈合作用的实验研究. 中医正骨, 1996, 8(4): 3-5.
- [3] 柴本甫, 过邦辅. 理气药物对骨折愈合影响的初步研究. 中华外科杂志, 1962, 10(5): 298-299.
- [4] Urist MR, Dowell TA, Hay PH, et al. Inductive substrates for bone formation. Clin Orthop, 1968, 59: 59-63.

- [5] 司晓辉, 金岩, 杨连甲. 颌骨骨折愈合过程中转化生长因子 β 的表达及意义. 现代口腔医学杂志, 1998, 12(2): 94.
- [6] Bourque WT, Hall BK, Gross M. The presence of several growth factors during the stages of fracture repair. J Bone Joint Surg (Br), 1993, 75: 282-287.
- [7] McDonald BR, Gonen M. Cytokines and bone. Br J Rheumat, 1992, 31: 149-160.
- [8] 翁维良. 20 种活血化瘀药对实验性微循环障碍的影响. 中西医结合杂志, 1984, 4(9): 555-557.
- [9] 蓝文正, 刘国栋, 沙因, 等. 骨折愈合过程中微量元素含量的研究. 中华骨科杂志, 1989, 9(3): 200-202.
- [10] 王智兴, 过邦辅, 柴本甫, 等. 自然铜在骨折愈合过程中对总胶原、不溶性胶原、钙、磷和生物力学的影响. 中华骨科杂志, 1986, 6(4): 305-307.
- [11] 刘勇, 郑启新. 转化生长因子与骨、软骨代谢及修复. 国外医学·创伤与外科基本问题分册, 1999, 20(2): 67-69.
- [12] 胡蕴玉. 骨生长因子促进骨愈合的研究及展望. 解放军医学杂志, 1997, 22(1): 4-6.
- [13] 陈建庭, 杨德鸿, 景宗森, 等. 转化生长因子调节人成骨细胞 PDGFR 的表达. 中华医学杂志, 2000, 80(2): 147-149.

(收稿: 2000-10-31 修回: 2001-01-10 编辑: 李为农)

• 短篇报道 •

鼻骨骨折 4 例报告

周长庚

(国家体育总局训练局医院, 北京 100061)

鼻骨骨折在运动创伤中, 多见于篮球、水球、足球、手球和拳击等对抗项目。笔者曾临场处置 4 例鼻骨骨折, 均收到较好的疗效。现报告如下。

1 临床资料

4 例均为国家男子篮球队主力运动员, 年龄 25~27 岁。其中 3 例在比赛中被对方运动员肘部直接暴力撞击鼻部致伤, 1 例在对抗训练中被队友手掌直接打在鼻部致伤, 伤后鼻部畸形, 触摸有骨擦音, 双鼻孔出血。3 例临场治疗处置, 1 例 20 分钟后转送同仁医院五官科治疗。

2 治疗方法

2.1 复位 临场确诊后, 利用局部组织暂时休克麻木状态, 争取即刻进行现场处置。令患者做在椅子上, 助手在后面固定头部或靠在墙上, 医者采用长镊子包裹纱布, 顺上鼻道伸入到顶部, 左手轻按住鼻部, 右手握镊子均力向外上方挑起, 使鼻骨恢复正常位置。左手可触到骨回纳感, 或听到响声。

2.2 止血 骨折后因骨折的轻重不同, 可有少量或多量出血。本文其中 2 例采用 1:1000 肾上腺素的纱布条、塞入鼻道止血, 效果很好, 如果没有上述药液, 也可直接塞入纱布条、棉花条、冰袋冷敷临时处置, 也能收到较好的止血效果。

2.3 固定 鼻骨骨折复位后, 因双侧鼻骨有一个互相支撑的

作用, 一般比较稳定, 不须特殊固定。本文 4 例经填塞纱布条 10~25 cm 后, 均能起到固定的作用。但必须在 2~3 天复查时取出纱布。

2.4 预防感染 4 例均服用先锋 VI 号 4 天。无一例感染。

3 治疗结果

本文 4 例, 其中 1 例因两次骨折, 鼻外型稍有些左偏, 其他 3 例均在临场及时处置, 一周后鼻道通畅, 鼻骨外形恢复正常。患者比较满意。

4 讨论

由于对抗项目竞争激烈, 被对方直接暴力击中鼻部是致伤的主要原因, 因方向和力量不同, 可导致一侧或两侧鼻骨骨折、畸形。也可导致鼻中隔软骨损伤, 鼻粘膜破裂而出血不止。本文 4 例因项目特点鼻外型均有畸形改变(如马鞍型、斜鼻型、凹陷型等)。一侧或双侧鼻孔出血, 触摸均有骨擦音。一般不难做出鼻骨骨折的正确诊断。对于受伤时间长后局部血肿、出血多、疼痛、不易复位的患者, 应立即转院五官科鼻粘膜麻醉后再行手法复位。如果骨折比较复杂, 并有灰色液体从鼻道流出, 应立即转院拍 X 线片或 MRI 影像是否有颅底骨折, 确诊后再治疗处置。鼻骨骨折经治疗处置后, 一般应停训 1 周, 2 周内鼻部避免碰撞, 20 天后恢复正常训练。

(收稿: 2000-09-11 编辑: 李为农)