

· 基础研究 ·

中医骨折分期治疗对骨折愈合作用的 X 线 与组织学研究

温建民¹, 徐颖鹏¹, 孙永生², 雷仲民³, 徐海斌⁴, 桑志成¹, 胡海威¹, 成永忠¹, 佟云¹, 孙卫东¹,
韩凤岳¹, 李莉¹

(1. 中国中医科学院望京医院骨科, 北京 100102; 2. 北京大学第三医院骨科; 3. 首都医科大学附属北京中医医院骨科; 4. 新乡医学院第一附属医院)

【摘要】 目的: 研究中医骨折分期治疗对骨折愈合的作用, 探讨中药治疗骨折的最佳分期方法。方法: 于 SD 大鼠双侧胫骨上 1/3 段前部的中点, 造成 2 mm × 1.5 mm 骨质缺损, 作为骨折愈合模型。222 只雄性 SD 大鼠, 首先随机取出 6 只作为正常对照组, 其他 216 只于造模后随机分为 4 组: 三期治疗组、二期治疗组、一期治疗组以及模型对照组, 每组 54 只。分别给予中药三期、二期、一期治疗以及等量生理盐水治疗。分别于术后 1、3、5、7、9、12、15、21、28 d 每组随机处死 6 只大鼠, 取右侧胫骨标本作为观察对象, 通过 X 线检查及组织学检查评价几种分期治疗方法对骨缺损愈合的作用。结果: X 线片肉眼观察示: 模型对照组自术后 7 d 起, 各时间点评分均低于或等于用药组, 部分时间点差异有显著性统计意义 ($P < 0.05$), 二期治疗组总平均评分最高, 但组间差异无显著性统计意义。X 线片图像分析显示: 术后 9~28 d 模型对照组在各个时间点的骨痂填充率均低于各用药组, 但差异无显著性统计意义, 各中药治疗组骨折愈合较模型对照组提前约 1 周。二期治疗组平均骨痂填充率最高, 但组间差异无显著性统计意义。组织学观察示: 模型对照组在术后大部分时间点组织学评分低于各用药组, 部分时间点差异有显著性统计意义 ($P < 0.05$), 二期治疗组在术后 5~15 d 大部分时间点组织学评分有高于一期治疗组和三期治疗组的趋势。二期治疗组平均评分最高, 但组间差异无显著性统计意义。结论: 对骨折分期辨证治疗是必要的, 二期治疗可能是骨折治疗的最佳分期方法。

【关键词】 骨折; 中医疗法; 放射学; 组织学

Radiblogical and histological study on treating fracture with different prescription of TCM in different healing stages WEN Jian-min*, XU Ying-peng, SUN Yong-sheng, LEI Zhong-min, XU Hai-bin, SANG Zhi-cheng, HU Hai-wei, CHENG Yong-zhong, TONG Yun, SUN Wei-dong, HAN Feng-yue, LI Li* Department of Orthopaedics Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medicine Sciences Beijing 100102 China

ABSTRACT Objective To observe the effects of treating fracture with different prescription of TCM in different healing stages and to explore the optimal phasing method in treating fracture. **Methods** A 2-mm-wide 1.5-mm-deep defect was bilaterally made as fracture healing model in the middle of the anterior part of the proximal one-third segment of tibia shaft of a SD rat. At first, 6 SD rats were taken randomly from 222 male SD rats into the normal control group. Postoperatively, the others were divided randomly into four groups: the model control group, the one-period treatment group, the two-period treatment group and the three-period treatment group on average. The rats in one-period treatment group underwent TCM in 1 period, those in two-period treatment group in 2 periods, those in three-period treatment group in 3 periods, and those in both the model control group and the normal control group were given saline at the same dose. On day 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 21 and 28 after operation, 6 rats in each group were selected randomly and sacrificed. Taking their right tibia as the object, the fracture healing was studied through observing and image analyzing of X-ray films and histology observation. **Results** The X-ray observation showed that the score of the model control group were less than or equal to that of all treatment groups since the 7th day after operation. The average score of two-period treatment group

基金项目: 国家中医药管理局资助项目 (编号: 04-05JP67)

通讯作者: 徐颖鹏 Tel: 010-64014411-2582 E-mail: xuyingpeng@etang.com

was the highest. The image analysis result showed that all treatment groups had a higher callus filling rate (CFR) than that of model control group, and the fracture healing of all treatment groups were promoted for about 1 week. The average CFR of two period treatment group was the highest. In histological examination, the result also showed that the histological scores of model control group were less than that of all treatment groups in the most time points after operation. From the 5th day to 15th day, the scores of two period treatment group had the tendency of being higher than that of the one period treatment and three period treatment groups. The average score of two period treatment group was higher than that of other three groups. But it had no significant difference. **Conclusion** Using different prescription of TCM in different stages of fracture healing is necessary. And the two period treatment may be the optimal way to treat bone fracture.

Key words Fractures; TCM therapy; Radiology; Histology

骨折三期治则是中医骨折内治法的指导原则,是前人经验的总结,但缺乏现代研究成果的支持。为了研究骨折分期治疗对骨折愈合的作用,并探索最佳的骨折分期治疗方法,我们从放射学与组织学方面,研究了不同的分期治疗方法对SD大鼠骨折愈合的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD大鼠 222只,清洁级,雄性,健康,体重(270±20)g北京市实验动物中心提供。标准饲料喂养,动物室温度(25±2)℃。

1.2 动物实验室 中国中医科学院基础研究所动物实验室,二级。

1.3 实验中药 同仁堂医药公司崇文门分公司提供。

1.4 主要仪器设备 手术器械:上海医疗器械厂生产。钨靶X线机:贝尼 Coutour 2000钨靶X线机。扫描仪: M icotek 9600XL。图像分析软件: S igmascan Pro 5。

1.5 建立骨折模型 于造模前 48 h 双下肢常规脱毛。以 0.3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 体重腹腔注射麻醉。无菌施术,于胫骨上段前正中,沿胫骨前嵴切口,长约 1.5 cm。依次切开皮肤和皮下组织,显露胫骨,于髌腱止点下方 3 mm 处,横行切开骨膜,用特制骨锯造成宽 2 mm 深 1.5 mm 骨质缺损,生理盐水冲洗切口,逐层缝合。对骨折不作固定,自由活动,进食水。

1.6 随机分组 将 222 只 SD 大鼠应用 SPSS 软件产生随机数字的方法随机分组。先取 6 只作为正常对照组,其余造模后平均分为 4 组:三期治疗组、二期治疗组、一期治疗组与模型对照组,每组 54 只。动物分笼喂养,标准饲料。

1.7 干预方法

1.7.1 三期治疗组 根据中医骨折三期治则与 SD 大鼠骨折局部组织学变化,将骨折愈合过程分为三期:早期,即血肿机化演进期,骨折后 3 d 选用肢伤一方加减^[1,2];中期,即原始骨痂形成期,骨折后 4~14 d 选用肢伤二方加减^[1,2];晚期,即改造塑形期,骨折 15 d 以后,选用肢伤三方加减^[1,2]。

1.7.2 二期治疗组 将中医骨折三期治则的中期与晚期合并为一期,作为后期。早期:选用三期治疗组的早期方剂;后期:选用三期治疗组的中期与晚期所用方剂的综合方剂:当归、赤芍、枳壳、续断、骨碎补、煅自然铜(先煎)、生黄芪、熟地黄、山萸肉、淮山药、茯苓、泽泻、狗脊、炙甘草。

1.7.3 一期治疗组 将早期、中期与晚期合并为一期,选用三期治疗组早期、中期与晚期所用方剂的综合方剂^[1]。

1.7.4 模型对照组和正常对照组 给予和实验组等量的生理盐水。

1.7.5 药物制备和给药方法 按传统方法水煎并浓缩成含生药 1.5 g/ml 的水煎剂。根据动物体重和体表面积^[3]计算大鼠对人的等效剂量,经预实验观察最佳用药剂量为 2 倍等效剂量,以此为实验用药剂量。分早晚 2 次灌胃。

1.8 标本处理 分别于造模后 1、3、5、7、9、12、15、21 及 28 d 分 9 次以断髓法每组随机处死 6 只大鼠。取出双侧胫骨标本,以右侧胫骨为观察对象,用质量分数为 40 g/L 的多聚甲醛 4℃ 下固定 24 h,在标本进行 X 线检查后,经质量分数为 125 g/L EDTA-Na₂ 4℃ 下彻底脱钙,以骨折为中心取长 10 mm 的骨段,系列脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋。

1.9 X 线检查

1.9.1 X 线检查条件 采用贝尼 Coutour 2000 钨靶 X 线机,球管高度 20 cm,拍照条件为 0.3 s 30 mA, 25 KV。

1.9.2 X 线片肉眼观察评分 按照柴本甫等^[4]的骨折愈合评分标准,依据 X 线骨折断端边缘的变化、骨痂量、骨痂密度和骨痂边缘情况分为 1~4 级,分别给 1~4 分,然后计算总分。

1.9.3 X 线片图像分析 将骨折的 X 线片扫描成图像文件,用 S igmascan Pro 5 图像分析软件对骨痂形成量进行分析。首先,测定骨折后第 1 天和第 3 天骨折标本 X 线片所显示的骨缺损面积,以其平均值作为“标准的骨缺损面积”,再测定各时间点骨缺损区域未被骨痂填充的残余面积。将软件测量的结果输入计算机,并计算骨缺损的骨痂填充率(callus filling rate, CFR): CFR = (标准的骨缺损面积 - 骨缺损的残余面积) / 标准的骨缺损面积 × 100%。

1.10 组织学检查 标本行常规 HE 染色。根据文献方法^[5]从骨痂边缘、骨痂情况和骨膜反应情况分别对骨折愈合情况进行评分,分为 0~4 分,然后计算总分。

1.11 统计学方法 用 SPSS 12.0 软件对实验数据进行统计学分析,采用单因素 4 水平设计计量资料方差分析方法,对各时间点各组数据间进行横向比较:方差齐,采用 LSD 法;方差不齐,采用 Games-Howell 法。结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。检验水准: $\alpha = 0.05$

2 结果

2.1 X 线片肉眼观察评分结果 各时间点 X 线片肉眼评分总分结果(表 1)。模型对照组自术后 7 d 起,各时间点得分均低于或等于用药组,术后 7、12、28 d 得分与二期治疗组或

三期治疗组比较差异有显著性统计意义 ($P < 0.05$)。

各组平均评分比较显示 (表 1): 二期治疗组平均评分高于其他组, 一期治疗组次之, 模型对照组最差, 但组间的差异无显著性统计意义。

2.2 X线片图像分析结果 由于术后 1~7 d的 X线片骨缺损部位均未见明显骨痂生长, 故仅对术后 9~28 d的 X线片进行了图像分析 (表 2)。术后 9~28 d 模型对照组在各个时间点的骨痂填充率均低于各用药组, 但差异无显著性统计意义。二期治疗组骨痂填充率有高于其他两个治疗组的趋势。3个治疗组在术后 21 d时骨痂填充率已达到或接近 100%, 而模型对照组在术后 28 d才达到 100%, 3个治疗组骨折愈合速度较模型对照组快, 骨折愈合提前 1周, 缩短了 1/4的时间。

各组平均骨痂填充率 (表 2): 二期治疗组骨痂平均生长率最高, 三期治疗组次之, 模型对照组最低, 但差异无显著性统计意义。

2.3 组织学观察结果 各时间点组织学评分结果 (表 3): 模型对照组在术后大部分时间点组织学评分低于各治疗组。术后 5 d 3个治疗组得分均高于模型对照组 ($P < 0.05$), 二期治疗组得分高于其他两个治疗组 ($P < 0.05$), 术后 7、12 d二期治疗组得分均最高, 分别与模型对照组和三期治疗组间差异有显著性统计意义 ($P < 0.05$)。

各组组织学平均评分比较 (表 3): 二期治疗组总分平均分最高, 三期治疗组和一期治疗组次之, 模型对照组最低, 但组间差异无显著性统计意义。

表 1 术后不同时间点 X线片肉眼观察评分变化 (scores $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The change of X-ray films observed scores in different time points after operation (scores $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	术后不同时间点 Different time points after operation (days)								平均分 Average scores	
	1	3	5	7	9	12	15	21		28
模型组 Model control	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.50 ± 0.84	6.00 ± 1.90	6.50 ± 3.02	12.12 ± 1.60	14.67 ± 1.21	15.00 ± 0.89	7.87 ± 4.67
一期治疗组 One-period treatment	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.67 ± 0.81	8.17 ± 3.31	9.17 ± 2.64	12.50 ± 2.95	15.83 ± 0.41	15.33 ± 0.52	8.63 ± 4.94
二期治疗组 Two-period treatment	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	5.00 ± 2.00	7.67 ± 2.07	10.00 ± 1.90	14.17 ± 0.75	14.67 ± 1.03	15.67 ± 0.52	8.80 ± 4.85
三期治疗组 Three-period treatment	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	5.33 ± 0.52*	6.00 ± 1.67	9.17 ± 2.79	13.17 ± 1.72	15.67 ± 0.52	16.00 ± 0.00*	8.43 ± 4.96

注: * 与模型对照组比较, $P < 0.05$

Note: * Compared with the model control group $P < 0.05$

表 2 术后 9~28 d骨痂填充率变化 (% , $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The change of CFR from the 9th day to 28th day after operation (% , $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	术后不同时间点 Different time points after operation (days)					平均填充率 Average CFR
	9	12	15	21	28	
模型组 Model control	34.19 ± 23.18	68.77 ± 15.66	84.99 ± 7.36	95.01 ± 3.87	100.00 ± 0.00	80.50 ± 27.42
一期治疗组 One-period treatment	39.06 ± 26.33	75.21 ± 9.80	88.88 ± 13.97	100.00 ± 0.00	99.50 ± 1.22	83.77 ± 23.73
二期治疗组 Two-period treatment	51.95 ± 12.01	73.53 ± 16.07	95.19 ± 2.99	99.29 ± 1.59	100.00 ± 0.00	86.66 ± 20.60
三期治疗组 Three-period treatment	49.56 ± 35.54	70.17 ± 25.06	88.53 ± 11.66	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	84.71 ± 26.65

表 3 术后不同时间点组织学评分变化 (scores $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The change of histological scores in different time points after operation (scores $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	术后不同时间点 Different time points after operation (days)								平均分 Average scores	
	1	3	5	7	9	12	15	21		28
模型组 Model control	0.00 ± 0.00	0.67 ± 0.52	0.83 ± 0.98#	4.17 ± 1.17	4.33 ± 1.51#*	7.83 ± 2.23	8.33 ± 2.34	11.00 ± 0.63	11.33 ± 0.52	5.39 ± 4.38
一期治疗组 One-period treatment	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.89	2.00 ± 0.63*	4.00 ± 0.89*	6.00 ± 0.89*	8.17 ± 2.56	9.50 ± 1.64	11.50 ± 0.55	11.50 ± 0.55	5.96 ± 4.38
二期治疗组 Two-period treatment	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.00	3.17 ± 0.41#*	5.67 ± 1.75#	5.40 ± 1.14	9.50 ± 1.64*	10.67 ± 0.52	11.17 ± 0.98	11.33 ± 0.52	6.56 ± 4.33
三期治疗组 Three-period treatment	0.00 ± 0.00	0.83 ± 0.75	1.83 ± 1.17*	5.17 ± 1.17	6.50 ± 1.00*	6.33 ± 2.34*	10.83 ± 0.41	11.33 ± 0.82	11.17 ± 0.41	5.98 ± 4.45

注: * 与模型对照组比较, $P < 0.05$; # 与一期治疗组比较, $P < 0.05$; ^ 与二期治疗组比较, $P < 0.05$; * 与三期治疗组比较, $P < 0.05$

Note: * Compare with model control group $P < 0.05$; # compare with one-period treatment group, $P < 0.05$; ^ compare with two-period treatment group, $P < 0.05$; * compare with three-period treatment group $P < 0.05$

3 讨论

现代研究表明,骨折愈合过程是一个复杂而高度有序的生理病理过程。不同中药在骨折愈合的不同阶段有着不同的作用。从本实验结果来看,二期治疗组无论 X 线肉眼观察和图像分析,以及组织学观察均有优于一、三期治疗组的趋势。尤其是组织学观察中,二期治疗组在术后第 5 天即更换为以补益肝肾、接骨续筋中药为主的后期方之后的组织学评分高于一、三期治疗组,且在以后大部分时间点组织学评分都有高于一、三期治疗组的趋势,说明在骨折愈合的早期以活血化瘀为主,而中晚期以补益肝肾、接骨续筋为主的二期治疗促进骨折愈合的作用比采用单一方剂的一期治疗和传统的三期治疗更明显。

骨折愈合早期即炎症反应期的主要病理变化是骨折端血肿形成,炎性细胞的浸润,骨折端血肿大小将直接影响来自软组织新生血管形成及完成机化的时间。骨折愈合早期给予活血化瘀药物如桃仁、红花、当归、赤芍、川芎等均有明显的抗血小板凝聚、抗血栓形成的作用,可以改善骨折断端局部血液供应状态,加快软组织的损伤修复和水肿的吸收,从而促进了骨折的愈合。

骨痂形成期即骨折愈合中期,骨折断端由于局部缺氧,机体通过正常代偿反应诱导软骨细胞线粒体中的 Ca^{2+} 释放于基质中,刺激成骨细胞分化繁殖,此时过多使用活血化瘀药可破坏这种相对稳定的代偿机制,应适时转向续接骨药为

主^[6]。在骨折愈合中晚期即骨痂形成期和改造塑形期给予接骨续筋、补益肝肾方剂能促进软骨骨痂形成、基质钙化、骨化及骨痂改建,从而促进了骨折的愈合。彭汉士等^[7]采用家兔桡骨中段 3 mm 骨折缺损的骨折模型,观察 7 d 开始给予肢伤三方灌胃,取术后 14、28 d 标本进行组织学、组织化学、组织形态计量学检测。结果用药组新生血管、骨小梁形成均优于对照组,4 种骨痂记分、外骨痂厚度均高于对照组。说明骨折愈合中晚期给予补益肝肾、接骨续筋方剂可以明显促进骨折愈合。

参考资料

- 1 孙永生,温建民,吴林生,等.骨折三期治疗对骨生长因子 FGF-2 表达影响的实验研究.中国骨伤,2004,17(4):222-226.
- 2 董福慧,朱云龙.中医正骨学.北京:人民卫生出版社,1999:35-41.
- 3 苗明三.实验动物和动物实验技术.北京:中国中医药出版社,1997:145.
- 4 柴本甫,过邦辅.理气药物对骨折愈合的影响的初步研究.中华外科杂志,1962,10(5):299.
- 5 张俐,陈在得,张安祯.磁场对家兔实验性骨折愈合的组织学研究.中国中医骨伤科杂志,1997,5(3):4-7.
- 6 张俐,叶俊材.活血化瘀汤对骨折早期血管内皮细胞因子活性的影响.中国临床康复,2004,8(23):4798-4799.
- 7 彭汉士,贝美莲,吴清和,等.中药肢伤三方促进骨折愈合的实验研究.广州中医药大学学报,2001,18(2):163-166.

(收稿日期:2006-02-28 本文编辑:李为农)

河南省洛阳正骨医院获准设立博士后科研工作站

日前,河南省洛阳正骨医院经国家人事部、国家博士后管理委员会评审批准,获得设立博士后科研工作站资格。

该院是在具有 200 余年历史的洛阳平乐郭氏正骨基础上建立、并通过自主创新的方式发展起来的拥有数字化网络办公系统、现代企业经营管理理念和先进装备的一所集医疗、教学、科研、产业于一体的省级医疗机构,建立 50 年来,经过几代洛阳正骨人的不懈努力,学术水平不断提高,学科队伍不断壮大,社会影响与日俱增,医教研和谐发展,专科特色日趋明显。开放床位 1 100 张,在职职工近 900 人,高级职称者 110 人,河南省省管专家 5 人,全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师 6 人,享受国务院颁发的政府特殊津贴待遇者 7 人,业务骨干中被外聘为研究生导师或兼职教授者 13 人。

该院是国家卫生部首批认定的、专门为境外人士提供医疗紧急救援服务的“卫生部国际紧急救援中心网络医院”,国家中医药管理局确定的全国中医骨伤专科医疗中心、全国骨伤科医师培训基地、三级甲等医院、全国骨代谢与骨质量分析三级实验室,国家食品药品监督管理局确定的国家药品临床研究基地,也是河南省卫生厅、省中医药管理局确定的河南省创伤骨科急救中心、省脊柱外科研究治疗中心、省颈腰痛疾病研治中心、省骨病研治中心、省手外显微外科研治中心、省骨伤康复中心、省中医骨伤工程技术研究中心等。设有急诊科、ICU、髋部损伤科、膝部损伤科、足踝损伤科、手外科、上肢损伤科、矫形科、介入治疗科、骨肿瘤科、骨髓炎科、骨坏死和骨不连科、小儿正骨科、风湿病科、整形美容科、特色手法研究治疗室等 20 多个骨科病区 and 病理、生化、中药、核医学、生物医学工程、组织培养、血液流变及 SPF 级动物等 10 余个实验(研究)室。

博士后科研工作站是为那些新近获得博士学位、品学兼优、身体健康、年龄在 40 岁以下、志愿从事博士后科研工作的优秀青年人才搭建的旨在进行具有探索、开拓、创新性质科学研究的科研互动平台,该站的批准设立并运行,标志着该院在培养和造就高层次专业人才、提高自主创新能力、遴选骨伤学科带头人、加快科研成果产业化、打造“洛阳正骨”品牌等方面跨入崭新阶段。

地址:洛阳市启明南路 1 号 邮政编码:471002 单位名称:河南省洛阳正骨医院