

无名异冲剂在骨折愈合中对 DNA 和 BMP 含量影响的实验研究

刘献祥 余希杰* 许书亮

福建中医学院骨伤系(福州 350003)

【摘要】 目的 探讨无名异冲剂治疗骨折的作用机理。方法 新西兰家兔 55 只造成双侧桡骨 3mm 缺损的骨折后随机分为用药组和对照组,于术后 1、2、3、4、5 周取骨痂制成石蜡切片,以 Feulgen 反应和免疫组化技术分别显示 DNA 和 BMP,进行图像定量分析。结果 在骨折愈合过程中,骨痂中骨折修复细胞 DNA 指数和骨痂局部 BMP 含量的总体变化趋势两组相同;用药组第 1、2 周骨痂 DNA 指数和 BMP 含量明显高于同期的对照组($P < 0.01$);用药组 BMP 高峰出现在第 2 周,对照组出现在第 3 周。结论 无名异冲剂能促进骨折修复细胞的增殖,增加成骨细胞的活性,诱导 BMP 合成,加速骨折愈合。

【关键词】 骨折愈合 脱氧核糖核酸 骨形态发生蛋白 无名异冲剂

Experimental study of the Effect of Wumingyi Chongji on the Content of DNA and BMP during Fracture Healing Liu Xianxiang, Yu Xijie, Xu Shuliang. Department of Orthopedics & Traumatology, Fujian College of TCM (Fuzhou 350003)

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of Wumingyi Chongji on the treatment of fracture. **Methods** 55 New Zealand rabbits were selected to make radial fractures bilaterally with 3mm defect, and divided randomly into two groups, the drug administration group and the control. The bone calluses were taken out 1, 2, 3, 4, 5 weeks after operation. The paraffin sections of them were stained with Feulgen reaction and immunohistochemical technique to manifest DNA and BMP, respectively, for quantitative image analysis. **Results** In the process of fracture healing, the tendency of the total changes in the DNA index of fracture repairing cells and in the local content of BMP in calluses was the same in both groups; 1 and 2 weeks after operation, DNA index and BMP content in the calluses of drug administration group was significantly higher than that of the control($P < 0.01$); the peak value of BMP in drug administration group was appeared at the second week, and that in the control at the third week. **Conclusion** Wumingyi Chongji can promote the proliferation of fracture repairing cells in callus, increase the activity of osteoblast, induce the BMP synthesis and accelerate the union.

【Key words】 Fracture union DNA BMP

无名异冲剂是长期使用于临床的秘方,具有活血化瘀、消肿止痛、续筋接骨之效。为了探讨其机理,作者采用组化和免疫组化技术,利用真彩色图像分析系统来研究无名异冲剂在骨折愈合过程中骨痂修复细胞 DNA 及骨痂局部 BMP(Bone Morphogenetic Protein,简称 BMP,即骨形态发生蛋白)含量动态变化规律,以期骨折治疗提供一种能增加内源性 BMP 的简便、经济的中医药治疗方法。

材料和方法

1. 药物加工 无名异冲剂由无名异、三七、丹参、莪术、川芎、当归、山药、黄芪、酒制大黄、续断、骨碎补

Wumingyi Chongji

等组成,经福州中药厂一次性加工而成。

2. 造模及分组 新西兰雄性大白兔 55 只,体重 2.0~2.5kg。50 只兔人工手术造成双桡骨 3mm 缺损的标准骨折模型^[1],不作任何外固定。手术后随机分为二组,各 25 只。用药组每日用无名异冲剂 4g/kg 调于 20ml 蒸馏水分早晚两次灌胃;空白对照组(对照组)则用 20ml 蒸馏水分早晚两次灌胃。两组动物于骨折后 7、14、21、28、35 天分批用断颈法处死。5 只非手术兔用作正常对照组(正常组),于 21 天集中用断颈法处死。

3. 标本处理 大白兔处死后以骨痂处为中心,包括上下骨端各 2cm,取出标本,剔除筋膜、肌肉和肌腱,

* 华西医科大学博士研究生

保留外骨膜及骨痂。置 10% 中性福尔马林液中固定 48 小时,将同期标本用药组 and 对照组分两列摄入同一张 X 线片,之后标本再置 5% EDTA 液中脱钙 10~ 15 天,脱钙彻底后冲洗。沿桡骨纵剖面切开,取包括整个骨痂切面 2 块组织,按常规进行石蜡包埋,切 5 μ m 厚连续切片。每隔 5 张抽 3 张进行 Feulgen 染色^[2]和免疫组化 BMP 染色^[3]。免疫组化 BMP 染色过程: ①石蜡切片用二甲苯脱蜡 3 次,每次 5 分钟,浸入 100%、95% 和 75% 酒精各 5 分钟,水洗 2 分钟; ②浸入 7.5% 过氧化氢 5 分钟,水洗 5 分钟,2.4% 过碘酸 5 分钟,水洗 5 分钟,0.03% 硼氢化钠 3 分钟,PBS 洗 3 次,每次 2 分钟; ③滴加非免疫性动物血清,室温下孵育 10 分钟; ④滴加工作浓度 1/100BMP 第一抗体(抗 BMP 单克隆抗体由第四军医大学口腔医学院病理科提供,S-P 试剂盒由福州迈新公司提供,PBS 代替第一抗体,染色结果为阴性),室温孵育 60 分钟,PBS 洗 3 次,每次 2 分钟; ⑤滴加即用型生物素化第二抗体,室温 10 分钟,PBS 洗 3 次,每次 2 分钟; ⑥滴加新配制的 AEC 显色液,室温 5 分钟,水洗 2 分钟; ⑦滴加即用型苏木素溶液复染,水洗,风干后 AEC 封固剂封片。

4 图像定量分析方法 采用空军总医院生产的 CMIAS 型彩色图像分析仪进行分析。

(1) 骨痂修复细胞 DNA 含量图像分析: Feulgen 染色片经显微镜放大 400 倍,每例摄取外骨膜、骨折端、内骨膜图像各 3 幅存盘,每批及批间输入图像的入射光强度皆严格控制同一水平上,通过交互分割方法,

每例各部分割 80~ 100 个细胞,每批选择同批染色片的小淋巴细胞 30~ 50 个作为二倍体对照。计算骨痂修复细胞 DNA 指数及不同 DNA 倍体细胞所占百分率。

(2) 骨痂中 BMP 含量图像分析: 免疫组化 BMP 染色片,经显微镜放大 200 倍,每例随机摄入骨痂组织 4 幅图像,每批和批间输入的图像入射光强度皆严格控制在同一水平上,通过彩色分割方法,分割骨痂图像中 BMP 阳性产物区域,求出阳性产物平均光密度、阳性产物平均积分光密度。

结果

1. 骨痂中 DNA 含量 正常骨痂修复细胞多数为 2 倍体细胞,DNA 指数 < 1。用药组骨折后第 1、2 周以 3~ 4 倍体细胞为主,第 3 周时以 2 倍体细胞为主,第 4、5 周接近正常组织情况,DNA 指数逐渐降低,第 5 周时接近正常。对照组总体变化趋势同用药组,但 DNA 指数第 1、2 周明显小于后者 ($P < 0.01$),3 周时有“反弹”现象(表 1~ 2)。

2. 骨痂中 BMP 含量 正常骨组织 BMP-MCAB 染色基本阴性,骨痂染色为阳性,BMP 主要沉积在功能活跃的成骨细胞内及其周围和新生骨小梁边缘,纤维骨痂中含量较少,成熟骨组织及软骨组织中均为阴性。在骨折的 1、2、3 周骨痂局部 BMP 含量逐渐增多,在骨折 4、5 周,随着骨小梁的成熟,BMP 含量逐渐减少,第 1、2 周用药组明显高于对照组 ($P < 0.01$),用药组 BMP 高峰出现在第 2 周,而对照组出现在第 3 周(表 3~ 4)。

表 1 骨痂修复细胞 DNA 倍体所占百分率(%)

时间(周)	正常组				用药组				对照组			
	2倍	3倍~4倍	5倍	>5倍	2倍	3倍~4倍	5倍	>5倍	2倍	3倍~4倍	5倍	>5倍
1					18.7	76.2	4.8	0.3	33.5	62.3	4.2	0
2					26.5	72.4	1.1	0	68.2	31.6	0.2	0
3	87.9	12.1	0	0	79.5	20.5	0	0	50.1	48.7	1.2	0
4					85.6	14.4	0	0	79.8	20.2	0	0
5					86.3	13.7	0	0	86.5	13.5	0	0

表 2 骨痂修复细胞 DNA 指数动态变化($\bar{x} \pm s$)

	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
用药组	1.5084 \pm 0.1304 ^{$\Delta\Delta$}	1.4356 \pm 0.1339 ^{$^* \Delta\Delta$}	1.0583 \pm 0.1032	0.9854 \pm 0.2135	0.9431 \pm 0.2531
对照组	1.3015 \pm 0.1092 ^{$\Delta\Delta$}	1.0219 \pm 0.1535	1.2147 \pm 0.1062 ^{Δ}	0.9848 \pm 0.1542	0.9694 \pm 0.1542

注: ①正常组 DNA 指数: 0.9646 \pm 0.1157。② Δ 为正常组比用药组或对照组,* 为用药组比对照组。③3 个 Δ 或* 表示 $P < 0.001$,2 个表示 $P < 0.01$,1 个表示 $P < 0.05$ 。④下同。

表 3 骨痂中 BMP 平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
用药组	0.27 ± 0.06* ^{△△}	0.46 ± 0.15* ^{△△}	0.37 ± 0.16 ^{△△△}	0.31 ± 0.09 ^{△△△}	0.24 ± 0.16 ^{△△}
对照组	0.13 ± 0.08 [△]	0.20 ± 0.12 [△]	0.39 ± 0.14 ^{△△△}	0.28 ± 0.07 ^{△△△}	0.22 ± 0.13 ^{△△}

注: 正常骨组织 BMP 平均光密度值: 0.05 ± 0.02

表 4 骨痂中 BMP 平均积分光度值($\bar{x} \pm s$)

	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
用药组	0.03545 ± 0.00747* [*]	0.07615 ± 0.00549* ^{**}	0.05284 ± 0.00960	0.03850 ± 0.00828	0.02830 ± 0.00268
对照组	0.02081 ± 0.00581	0.03785 ± 0.00883	0.05310 ± 0.01360	0.03920 ± 0.01776	0.02650 ± 0.00255

注: 正常组织 BMP 平均积分光度值: 0.0013 ± 0.00084; 正常组与用药组或对照组比较 $P < 0.001$

讨论

无名异冲剂以无名异、三七、丹参、莪术、川芎等药行气活血、消肿止痛, 以无名异为诸药之君, 李时珍曾倍赞无名异:“打伤肿痛, 无名异为末, 酒服, 赶上四肢之末, 血皆散矣。”山药、黄芪补气行血, 当归补血活血以和营生新; 续断、骨碎补补益肝肾, 强筋健骨; 大黄利水消肿活血。诸药配伍, 兼顾骨折早、中、晚三期病理证候, 能达瘀去、新生、骨合之目的。本实验结果显示无名异冲剂具有以下作用:

1. 促进骨痂修复细胞的分裂增殖 骨折后髓腔内, 骨折端被掀起骨膜下以及邻近的软组织内形成血肿, 其间周围的毛细血管和幼稚结缔组织很快长入血肿, 毛细血管内皮细胞和结缔组织中的间充质细胞大量增殖分化为成纤维细胞; 同时骨内外膜生发层之骨生成细胞大量增殖, 分化为成骨细胞或成软骨细胞。此期(骨折后第 1~2 周)骨折修复细胞增殖活跃, 染色体倍增, 因而 DNA 指数高, 但用药组明显大于对照组 ($P < 0.01$), 说明细胞增殖更加活跃。成纤维细胞产生大量胶原纤维, 血肿机化形成肉芽组织, 骨折端初步连接起来, 成纤维细胞功能完成, 逐步转化为成骨细胞或成软骨细胞, 间充质细胞大量分裂增殖活动停止, DNA 指数下降, 用药组下降明显; 在软骨成骨阶段, 软骨细胞肥大、变性、坏死, 软骨周围毛细血管长入, 带来的内皮细胞和间充质细胞增殖分化为成骨细胞, 因而在骨折后第 3 周对照组出现 DNA 指数“反弹”现象, 用药组软骨骨痂少, 就无此现象。骨折后第 4、5 周进入骨小梁改建阶段, 此时大量细胞分裂增殖活动已完成, 因而 DNA 指数接近正常。

2. 增加成骨细胞活性, 促成 BMP 合成 国内外学者对 BMP 近 30 年的深入研究, 目前已明白 BMP 为一酸性多肽, 分子量为 20000 左右, 主要存在于兔、牛、猴等动物及人的骨基质、牙本质基质中, 主要作用于血管周围游走的、未分化的间充质细胞, 诱导其增殖分化为成骨细胞或成软骨细胞, 从而加速骨折愈合。

本实验中, 骨痂 BMP MCAB 染色结果为阳性, 而正常骨组织阴性, 说明骨痂局部 BMP 浓度增高。BMP 主要集中在成骨细胞周围及新生骨小梁边缘, 成骨细胞内也有着色, 在骨折修复的 2、3 周着色最深, 成熟骨组织和软骨组织均不着色, 推测 BMP 由成骨细胞产生分泌。

定量分析表明: BMP 高峰期出现在骨折的 2、3 周, 这是因为骨折第 1 周连接骨痂主要由成纤维细胞组成, 只有骨内外膜成骨细胞合成 BMP, 且骨内膜血运不丰富, 成骨细胞功能相对不活跃, 因而骨痂局部 BMP 浓度低; 在骨折后的 2、3 周, 连接骨痂进入软骨成骨阶段, 随着毛细血管进入软骨基质的内皮细胞和间充质细胞增殖分化为成骨细胞, 形成骨小梁, 最终所有的软骨被细嫩的海绵骨替代, 沟通了骨膜血运系统与骨髓营养动脉系统, 内外骨痂及连接骨痂血供良好, 成骨细胞功能最活跃, 因而合成 BMP 多; 在骨折修复的 4、5 周, 大量新生骨小梁活动结束, 成骨细胞趋于静止, 合成 BMP 减少。

无名异冲剂中, 山药富含多种的自由氨基酸^[4], 提供成骨细胞合成 BMP 的原料; 当归、黄芪等和营生新药能加速体内物质代谢, 合成更多 ATP^[5]; 无名异富含 Mn、Fe 等无机离子^[4], 这些无机离子作为酶活性激动剂, 能加速机体内的物质代谢和蛋白质合成反应。BMP 反过来又诱导间充质细胞增殖分化为成骨细胞, 三者形成良性循环, 结果用药组骨痂出现大量成骨细胞, 合成丰富的骨基质, 带来骨折的提前愈合。

参考文献

- 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
- 孙庆雷. 组织病理学与组织化学技术手册. 北京: 科学出版社, 1982, 242
- 施作榕. 链霉菌亲合物素蛋白-生物素酶标免疫组化染色法的初步研究. 中华免疫学杂志, 1986, 2(3): 169
- 江苏新医学院. 中药大辞典. 上海: 上海科学技术出版社, 1996, 160
- 王筠默. 中药药理学. 上海: 上海科学技术出版社, 1985, 101 (收稿: 1997-08-21; 修回: 1997-10-26)