

低强度超声波对骨折愈合中胶原代谢影响的实验研究

汤荣光¹ 罗建中² 郑昱新¹ 顾坚毅¹ 王鹤岐¹

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021; 2. 太仓市中医院)

【摘要】目的 探讨低强度超声波对骨折愈合中 I、II 型胶原代谢的影响。方法 建立大鼠双侧胫骨近侧皮质骨缺损的动物模型, 随机分为 2 组, 实验组每日接受低强度超声波刺激, 而对照组给与假刺激。术后 10、20、30 天处死动物取标本(骨痂)进行组织学及免疫组化染色(SABC 法)观察。结果 组织学检查显示: 实验组的血肿机化、吸收, 软骨性骨痂和软骨内化骨明显早于对照组; 免疫组化检查显示: 实验组在 20 天时 I 型胶原的表达明显高于对照组, 在 30 天时 II 型胶原的表达也略高于对照组。结论 低强度超声波通过增加骨痂内 I、II 型胶原的合成来促进骨折的愈合, 其中以 I 型胶原的作用尤其明显。

【关键词】 超声疗法 骨折 胶原 免疫组织化学

Experimental study of low intensity ultrasound on collagen metabolism during fracture healing TANG Rong-guang, LUO Jianzhong, ZHENG Yu-xin, et al. Shuguang Hospital affiliated to Shanghai University of TCM (Shanghai, 200021)

【Abstract】 Objective To explore the effect of low-intensity ultrasound on I, II collagen metabolism during fracture healing **Methods** Animal model of cortical bone defect in bilateral proximal tibia in rats were established and randomly classified into 2 groups. The experimental group were given ultrasound exposure daily while the control group had sham exposure. The animals were sacrificed at 10, 20, 30 days respectively after operation and the callus were procured and observed with histological and immunohistochemical examinations. **Results** The histological examination showed that the absorption and organization of hematoma, the appearance of cartilage callus and endochondral ossification in experimental group were earlier than those in control group. Immunohistochemical examination showed that the expression of collagen I in experimental group were significantly higher than that in control group at 10th and 20th days, and the expression of collagen II in experimental group were higher than that in control group at 30th days. **Conclusion** Low-intensity ultrasound might accelerate fracture healing by increasing collagen I, II synthesis in callus, especially in I.

【Key Words】 Ultrasonic therapy Fractures Collagen Immunohistochemistry

低强度超声波能够加速骨折愈合, 国外已有很多报道, 而国内有关文献却不多。为了进一步观察超声波对骨折愈合的影响, 探讨其促进骨折愈合的机制, 我们采用免疫组织化学染色的方法, 观察超声波对骨折愈合中胶原代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 动物实验、分组及处理

选用健康 SD 雄性大鼠 24 只(上海必凯尔实验动物公司提供), 体重 250 ~ 300g, 20% 乌拉坦 1.0ml 行腹腔内麻醉。后肢脱毛, 在无菌条件下手术, 在胫骨前部、胫骨结节下 1cm 处, 用厚约 2mm 的钢锯条, 造成胫骨前横形的皮质缺损, 深度

达髓腔, 对侧胫骨亦作相同处理。术后分笼饲养, 自由活动。术后随机分为两组, 每组 12 只。术后第 2 天起, 实验组: 局部超声波刺激, 每次 15 分钟, 每日一次; 对照组: 局部假刺激, 每次 15 分钟, 每日一次。低频脉冲超声波由低频脉冲超声波发生器产生(上海大沪医疗设备厂制造), 实验时, 将大鼠麻醉后固定, 探头避开手术切口, 对准骨折缺损处, 涂抹耦合胶, 将探头紧贴骨折处皮肤, 超声波频率为 1.5MHz, 强度为 50mw/cm², 每次 15 分钟, 每日一次。

术后 10、20、30 天分批处死, 每批每组各 4 只。动物处死后, 无菌条件下截取含缺损区在内的胫骨段 1cm, 剔除软组织。

1.2 组织学及免疫组化观察

标准制备: 将标本置入 10% 的中性福尔马林液中固定 24

基金项目: 上海市卫生局科研基金资助课题(编号 98L005)

作者简介: 汤荣光(1943-), 男, 主任医师, 硕士生导师; 研究方向: 创伤、脊柱、人工关节、足外科。

小时,然后置于脱钙液(由甲酸、甲醛及盐酸按一定比例配制)中脱钙 30 天,脱钙后的标本经彻底冲洗后,沿胫骨中轴矢状面剖开,经酒精逐级脱水、透明、浸蜡后石蜡包埋,5μm 厚作连续切片,然后分别进行常规 HE 染色和免疫组织化学染色。

主要试剂:抗 Collagen 抗体为兔抗大鼠型胶原抗体,工作浓度 1:150。抗 Collagen 抗体为小鼠抗大鼠型胶原抗体,工作浓度 1:100。抗体由武汉博士德生物工程公司提供,SABC 试剂盒由上海中达生物制品公司提供。

SABC 法免疫组化染色:组织切片经脱蜡脱水后,分别经甲醇-双氧水灭活内源性酶,0.1%胰蛋白酶消化,正常马血清封闭非特异性染色,滴加第一抗体(抗 Collagen 多克隆抗体,1:150)置湿盒内 4℃ 冰箱过夜后,加生物素化二抗(羊抗

兔 IgG)、SABC 复合物各处理 20 分钟,各步骤间用 PBS 洗 2 分钟 ×3 次。DAB 显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤后苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性结果为组织中出现棕黄色着色。着色深度与 Collagen 表达强度(即浓度)成正比。

Collagen 免疫组化染色方法与 Collagen 相同。

2 结果

2.1 组织学观察

实验组 10 天时仅有少量血肿残留,髓腔充血明显。20 天时缺损区血肿已吸收,软骨性骨痂出现,大量软骨细胞增生,并有部分软骨性骨痂开始骨化(图 1)。30 天时见新生骨小梁连接。对照组上述过程明显慢于实验组,两组的组织学观察结果比较见表 1。

表 1 术后不同时期两组大鼠骨标本组织学改变比较

时间(天)	对照组	实验组
10	缺损区较多血肿残留,髓腔有少量充血,缺损两端骨内外膜均可见少量软骨细胞。	缺损区少量残留血肿,髓腔可见到明显充血,缺损两端的骨外膜有较多的软骨细胞,并逐渐向缺损区延伸。
20	缺损区血肿基本消失,由增生纤维及软骨性骨痂修复填充,以软骨成分为主。	缺损区血肿已吸收,由增生的软骨性骨痂填充,部分软骨性骨痂开始骨化。
30	缺损区软骨性骨痂中,软骨成分逐渐减少,新生骨小梁向骨组织过渡,细胞及胶原纤维排列紊乱。	缺损区由软骨性骨痂填充,软骨成分逐渐消失,骨小梁已基本连接,细胞及胶原纤维排列有规律。

2.2 免疫组化染色观察

术后 10 天,型胶原的表达在此期两组无明显差异,均在近骨缺损处有少量阳性着色。实验组中型胶原在缺损两端的软骨细胞胞浆及其周围的基质中有较深的着色,而对照组仅偶见少量淡染着色。

术后 20 天,两组的型胶原表达均较前加深,主要位于软骨内化骨区及近骨缺损处的骨外膜之膜内化骨区。实验组中型胶原表达有进一步加深(图 2),此时对照组的表达较前加深,其着色深度仍弱于实验组。

术后 30 天,两组的型胶原表达较深,实验组的型胶原表达略强于对照组(图 3)。两组的型胶原表达均有下降,实验组仅偶见少量散在的型胶原表达。

3 讨论

超声是一种波动形式。又是一种能量形式,一定强度的超声波通过与人体组织相互作用,可以产生一定的生理效应。在医学上,50 年代超声主要用于诊断,70 年代后期超声波逐渐在药物渗透、雾化吸入、穴位注射、碎石等方面开展起来,形成了一门独立的学科——超声治疗学。超声波对骨折愈合影响的研究,直到 80 年代初才受到医学界的重视。

Duarte^[1](1983)首先报道了家兔实验性腓骨切除和股骨钻孔的动物模型,用低强度超声波治疗后,骨的生长和新鲜骨折的愈合与对照组比较明显加快。此后 Wang^[2]和 Pilla^[3]等通过动物实验证实了这一发现。而 Heckman^[4]和 Kristiansen^[5]等将超声波应用于胫骨干骨折和桡骨远端骨折的病人,结果这些病人的临床愈合和完全愈合(临床和 X 线)时间分别明显缩短。这些文献报道肯定了超声波促进骨折愈合的作用。

骨组织包括细胞和细胞外基质,胶原是骨基质中的重要组成部分,它构成了骨组织的蛋白框架,是钙盐沉积的场所,

对维持骨的生物力学性能具有重要意义。在骨折愈合的过程中,胶原纤维的合成与修复占有重要的地位。分子生物学研究中,测定胶原合成是检测骨形成或骨吸收的重要生物学指标之一,刺激或抑制骨痂内胶原的合成能较好地反映对骨生成或骨吸收作用的机制。

目前一般认为,在骨折愈合的成骨阶段,型胶原是主要胶原,由成骨细胞分泌。在新骨替代软骨痂之后,新形成的骨基质主要由型胶原构成。在骨折愈合的软骨形成期,型胶原是主要胶原,由成软骨细胞分泌,型胶原的表达仅局限在有软骨细胞表型的细胞^[6]。

我们的实验研究表明:骨折愈合的过程中,低强度超声波能促进软骨细胞增生,加速血肿的机化,并可促进软骨内化骨。免疫组化染色观察的结果显示:低强度超声波对骨折愈合的早、中期型胶原的表达具有明显的促进作用,对中后期型胶原的表达也有一定的促进作用。这些观察的结果提示,超声波是通过影响软骨细胞的形成和活化、软骨内化骨的过程,促进了软骨细胞基质蛋白(主要是胶原)的合成,从而促进了骨折的愈合。这与 Yang 等^[7,8]的研究结果相吻合。

骨折愈合是一个复杂的生物学过程,超声波促进骨折愈合的具体机制有待进一步深入地研究。(本文图见插页 3)

参考文献

- [1] Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. Arch Orthop Trauma Surg, 1983, 101: 153-159.
- [2] Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, et al. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. J Orthop Res, 1994, 12: 40-47.
- [3] Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, et al. Non invasive low intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. J Orthop Trauma, 1990, 4: 246-253.
- [4] Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, et al. Acceleration of tibial frac-

ture healing by noninvasive low intensity pulsed ultrasound. J Bone Joint Surg (Am), 1994, 76(1): 26-34.

[5] Kristiansen TK. The effect of low power specifically programmed on the healing time of fresh fracture using a Colles' model. J Orthop Trauma, 1990, 4: 227-228.

[6] 丁真奇, 郭延杰. 胶原与骨折愈合. 骨与关节损伤杂志, 1997, 12(2): 125-127.

[7] Yang KH, Wang SF, Lewallen DG, et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. J Orthop Res, 1996, 14: 802-809.

[8] Yang KH, Wang SF, Lewallen DG, et al. Low intensity ultrasound stimulates fracture healing in rat model: Bio-mechanical and gene expression analysis. Tran Orthop Res Soc, 1994, 19: 519-525.

(收稿: 2000-09-10 编辑: 李为农)

手法介绍

屈髋屈膝法治疗腰椎滑脱症

朱干 龙翔宇

(佛山市中医院, 广东 佛山 528000)

从 1993 年 7 月以来, 在临床上应用了屈髋屈膝法为主对 163 例腰椎滑脱症病人进行系统的治疗, 收到满意疗效, 现总结如下:

1 临床资料

本组 163 例中男 76 例, 女 87 例; 年龄 25 岁 ~ 68 岁, 平均年龄 53.8 岁; 病程最短小于 1.5 月, 最长大于 10 年; 真性滑脱 122 例, 假性滑脱 41 例; L₄ 滑脱 51 例, L₅ 滑脱 112 例; 按 Meyerding 法分度^[1], 真性滑脱 122 例中, Ⅰ度滑脱 53 例, Ⅱ度滑脱 58 例, Ⅲ度滑脱 11 例。

2 治疗方法

2.1 预备手法 揉法, 患者俯卧在治疗床上, 术者站在患者左侧, 手呈半握拳状, 用手背的尺侧及第 4 ~ 5 手指近端紧贴腰部皮肤上, 前臂带动腕关节做内外旋转, 均匀的来回摆动; 完成滚动的动作, 用力要均匀柔和, 不要跳跃。揉法, 用大拇指点压肾俞、大肠俞、命门、环跳、委中及阿是穴。

2.2 治疗手法 这是治疗的关键所在, 通过上述手法放松后, 让患者仰卧在治疗床上, 呈屈膝屈髋体位, 术者站在患者右侧左手掌放在患者膝关节上, 右手托住骶部, 左手向下用力压, 右手向后上用力托, 两手同时用力一紧一松做 20 ~ 30 次。然后让患者休息 5 分钟; 在上述体位用一高约 30 ~ 40cm 的枕头垫在骶部, 患者屈膝屈髋双手手指交叉抱紧膝关节。术者站在患者足处(床尾), 双手掌放在患者双膝用力往头及腰方向用力按压, 一紧一松约 20 次。然后让患者休息 5 ~ 10 分钟, 起床时戴腰围, 隔天一次, 15 次为一疗程。配合药物外敷, 中频、薰腰等理疗。

3 治疗结果

3.1 疗效评定标准 治愈: 原有各种症状、体征消失, 腰和下肢功能恢复正常, 能参加轻工作; 显效: 原有各种症状、体征消失, 腰和下肢功能基本正常, 不影响轻工作; 好转: 原有症状减轻, 体征有所改善; 未愈: 症状、体征无改善。

3.2 治疗结果 治愈 28 例, 显效 62 例, 好转 54 例, 无效 19 例。治疗次数最多的为 46 次, 最少的 4 次, 平均为 16.7 次。

52 例得到完整的随访, 时间为 0.5 ~ 7 年, 3 例因复发再次住院治疗。6 例因滑脱大于 Ⅲ度, 复发行手术治疗。余 43 例情况良好。

4 讨论

在腰椎滑脱症的治疗中, 放松手法起缓解肌肉痉挛, 松懈神经根粘连的作用; 准备手法要和缓舒适, 以患者感觉轻微的酸痛可以忍受为度, 在腰部行手法时切忌用按压法, 以免滑椎从后向前受力, 加重滑脱。屈髋屈膝法其目的在于调整腰部局部的关系, 纠正不正常的解剖关系, 使神经或韧带的压迫缓解。屈髋屈膝法使腹肌收缩, 从而增加腹内压, 压力作用于前凸的腰曲上, 前滑的腰椎在前面首当其冲的受到力的作用, 从而有可能改善其不正常的解剖结构关系, 来缓解症状。我们知道: 腰肌、棘上韧带及棘间韧带有限制腰部过度前屈的作用^[2]。当屈髋屈膝时腰部处于过度弯曲, 从而使腰肌、棘上韧带及棘间韧带等紧张起来产生反方向的对抗作用, 前滑的腰椎受到相邻椎的作用, 根据力学原理, 其合力方向向后。从而使前滑椎得到一个向后拉力作用。理论上能起到复位、纠正其不正常解剖关系的作用, 使周围的神经及韧带受到的牵拉及压迫得到缓解, 从而使症状消失, 体征改善。我们在临床实践中观察到: 患者虽其症状缓解甚至消失, 但 X 线检查发现滑椎只有少部份轻度复位, 而大部份滑椎其滑脱程度治疗前后不会变化。这正如我们对腰椎间盘突出症患者进行牵引、手法推拿等保守治疗时, 治疗前后虽不能使突出髓核在大小上发生变化^[3], 但神经根受到的机械压迫得到缓解, 而同样得到很好疗效一样。总之, 腰椎滑脱症经保守治疗后, 其疗效是肯定的, 但其作用机理仍有待进一步研究总结。

参考文献

- [1] 邵宣, 许克斌. 实用颈腰背痛学. 北京: 人民军医出版社, 1992. 338.
- [2] 杨双喜, 薛晋玉. 脊椎病和软组织损伤的诊断与治疗. 北京: 中国医药科技出版社, 1999. 52.
- [3] 张显崧, 章莹, 汪青春, 等. 腰椎旋转手法治疗椎间盘突出症的机理. 中医正骨, 1993, 5(3): 5-6.

(收稿: 2001-03-23 编辑: 李为农)

低强度超声波对骨折愈合中胶原代谢影响的实验研究

(正文见 733 页)

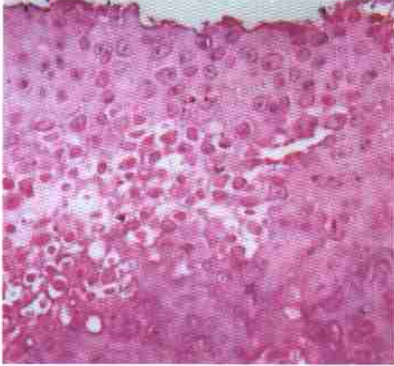


图1 实验组 20 天 HE 10×10 骨缺损处可见大量软骨细胞增生, 大部分区域出现软骨内化骨



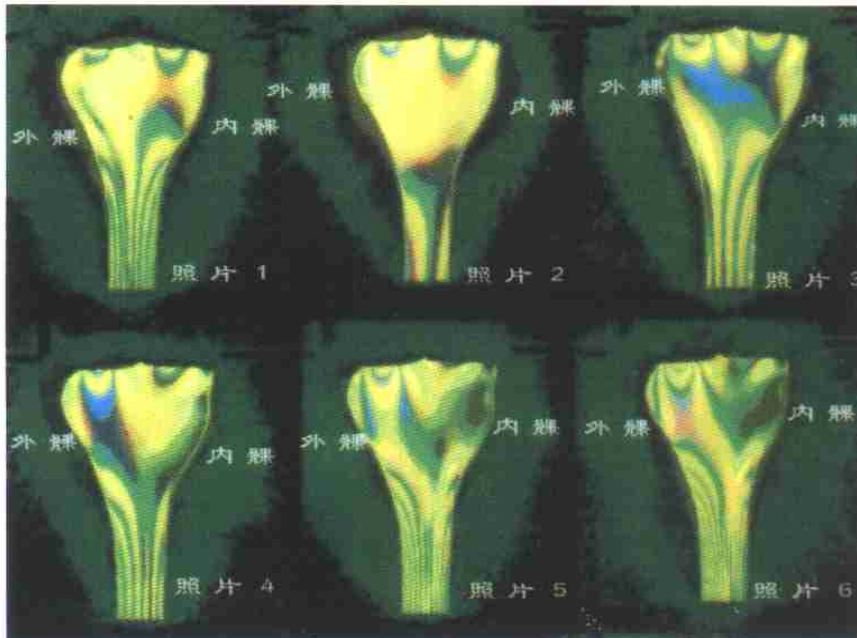
图2 实验组 20 天 II 型胶原免疫组化染色 10×40 软骨细胞胞浆及周围基质中有阳性染色 (黄色)



图3 实验组 30 天 I 型胶原免疫组化染色 10×40 骨基质中有呈条纹状排列的 I 型胶原阳性染色 (深黄)

肱骨外髁的光弹性实验研究

(正文见 739 页)



照片 1 内翻位加载, 有伸肌肌力作用。
照片 3 中立位加载, 有伸肌肌力作用。
照片 5 外翻位加载, 有伸肌肌力作用。

照片 2 内翻位加载, 无伸肌肌力作用。
照片 4 中立位加载, 无伸肌肌力作用。
照片 6 外翻位加载, 无伸肌肌力作用。