

· 基础研究 ·

超声中药透入促进大鼠骨折愈合的实验研究

徐琳峰 樊振勇 胡坚勇 纵亚 陈丽娜 傅华洲 顾伟忠

【摘要】目的 初步探讨超声中药透入治疗促进大鼠股骨骨折愈合的疗效及其可能的作用机制。**方法** 选择 36 只 Sprague-Dawley 成年大白鼠,建立股骨骨折模型,术后随机分为超声组、中药组、超声中药透入组和造模组。超声组于骨折部位行低强度超声治疗,中药组给予中药外敷治疗,超声中药透入组行超声中药透入治疗,造模组不给予任何治疗,在笼内自由活动。治疗 30d 后处死各组大鼠,取材后行 HE 染色及 I 型胶原免疫组织化学染色。**结果** 组织学检查结果显示:超声中药透入组的骨折端软骨性骨痂和骨性骨痂填充较其他各组明显,细胞与胶原纤维排列较其他各组有规律;免疫组织化学分析结果显示:超声中药透入组骨折端 I 型胶原的表达较超声组和中药组强。**结论** 中药超声透入促进骨折愈合的作用显著,较单纯中药或单纯超声治疗效果良好;超声有促进中药透入的作用,其促进骨折愈合的机制有可能与促进 I 型胶原的合成有关。

【关键词】 中药; 超声; 骨折愈合

An experimental study of ultrasound-phoresis of Chinese herb in accelerating fracture healing XU Lin-feng*, FAN Zhen-yong, HU Jian-yong, ZONG Ya, CHEN Li-na, FU Hua-zhou, GU Wei-zhong. * Department of Rehabilitation Medicine, Hangzhou First People Hospital, Hangzhou 310006, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of ultrasound-phoresis of Chinese herb in the treatment of fracture healing on rats. **Methods** The animal model of femur fracture was established in 36 rats, who were divided into 4 groups after operation. The rats in the ultrasound group were given ultrasound treatment daily. The herbal group was given Chinese herb applied on the fracture site. The experimental group was given ultrasound-phoresis of Chinese herb on the site of fracture. The control group was housed without any treatment. All rats were sacrificed at 30 days and the bony callus were harvested and observed with histological and immunohistochemical examination. **Results** The histological examination showed that the appearance of cartilaginous and bony callus in the experimental group were earlier than those in other groups. Immunohistochemical examination showed that the expression of collagen I in the experimental group was significantly higher than that in ultrasound group and herbal group ($P < 0.05$), and as well as control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Ultrasound-phoresis of Chinese herb might be effective in accelerating fracture healing, which might be through increasing collagen I synthesis in callus.

【Key words】 Chinese herb; Ultrasound-phoresis; Fracture

多年来,许多学者从基础与临床方面提出了多种促进骨折愈合的方法,其中中药和超声对骨折愈合的促进作用已为医学界所肯定。本实验利用超声的药透作用,联合中药治疗骨折大鼠,观察超声中药透入的治疗作用并初步探讨其机制,现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及模型制备

选用健康 Sprague-Dawley 成年大白鼠 36 只,由浙江大学医学院动物实验中心提供,体重 250 ~ 300 g。按 Wang 等^[1]介绍的方法制作股骨骨折髓内

针固定模型:用 100 mg/kg 体重的氯氨酮加 5 mg/kg 体重的地西洋腹腔内注射麻醉动物;大鼠右后肢脱毛,在无菌条件下暴露右侧膝关节股骨关节面,用骨钻垂直于关节面钻洞,取 2 mm 髓内针内固定;在大鼠右大腿外侧纵行切口,逐层分离,暴露股骨约 1 ~ 2 cm,用骨钻造成横行骨折;用生理盐水冲洗骨碎片及凝血块,逐层缝合,覆盖包扎。术后大鼠使用青霉素抗炎 3 d,2 万 U/kg 体重,每日 2 次。术后能自由活动,局部创面没有感染即可认为模型制作成功。

二、实验动物分组及处理

将造模大鼠分笼饲养,自由活动,随机分成超声组、中药组、超声中药透入组和造模组,每组 9 只。超声组于术后第 2 天,待伤口干燥后,采用德国产 Somatom 4 型超声波治疗仪进行超声治疗。根据 Sun 等^[2]介绍的最佳处理参数,选择超声频率为 1.5 MHz、

基金项目:浙江省中医药科技计划项目青年基金(2005B045)

作者单位:310006 杭州,杭州市第一人民医院康复医学科(徐琳峰、樊振勇、胡坚勇、纵亚、陈丽娜),中医科(傅华洲);浙江大学医学院附属儿童医院病理科(顾伟忠)

脉冲宽度为 200 μs 、强度为 30 mW/cm^2 , 采用固定法, 声头面积为 5 cm^2 , 治疗部位为造模大鼠骨折端伤口处, 每日治疗 1 次, 每次 10 min, 30 d 为 1 个疗程。中药组于术后第 2 天, 待伤口干燥后, 选用红花、桃红、桂枝、川芎、乳香、没药、元胡、煅自然铜、续断、狗脊各 10 g, 煎成汤剂, 用淀粉勾芡成糊状敷于大鼠骨折处, 外用纱布覆盖固定, 每日换药 1 次, 每次 20 min, 30 d 为 1 个疗程。超声中药透入组于术后第 2 天, 待伤口干燥后, 先为大鼠敷用中药, 方法同中药组, 然后于骨折部位行超声治疗, 技术参数同超声组, 每日治疗 1 次, 每次 10 min, 30 d 为 1 个疗程。造模组大鼠造模后不给予任何处理, 在笼内自由活动。

三、标本的制备

按上述方法治疗 30 d 后处死各组大鼠, 截取含骨折部分在内的股骨段 1~2 cm, 剔除软组织。标本置入 10% 中性福尔马林液中固定 24 h, 然后置于乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 脱钙液 (由 EDTA、水、NaOH 按一定比例配制) 中脱钙 30 d, 脱钙后标本经彻底冲洗, 沿胫骨中轴矢状面剖开, 经酒精逐级脱水、透明、浸蜡后用石蜡包埋, 作 4 μm 厚连续切片, 然后行常规 HE 染色, 进行组织学观察。

四、免疫组织化学检测分析

应用链霉亲和素-生物素复合物 (strept avidin biotin complex, SABC) 技术进行分析。组织切片经脱蜡、脱水后, 分别用 3% 甲醇-双氧水灭活内源性酶, 0.1% 胰蛋白酶消化, 正常羊血清封闭非特异性染色, 滴加第一抗体 (兔抗鼠 Collagen-I 多克隆抗体 1:150) 置湿盒内于 4℃ 冰箱中过夜后, 加生物素化二抗体 (羊抗兔 IgG), SABC 复合物处理 20 min。用 PBS 洗 2 min $\times$ 3 次, DAB 显色, 光镜下控制反应时间, 蒸馏水洗涤后以苏木素轻度复染、脱水、透明、封片。用 PBS 代替一抗体作为空白对照。阳性结果为组织中出现棕黄色颗粒, 其着色深度与 Collagen-I 表达程度及浓度成正比。400 倍显微镜下, 用 HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文分析系统随机取每张切片骨折端边缘区域相互不重叠的 5 个视野, 检测光密度, 取均值。以上一抗及 SABC 试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供。

五、统计学分析

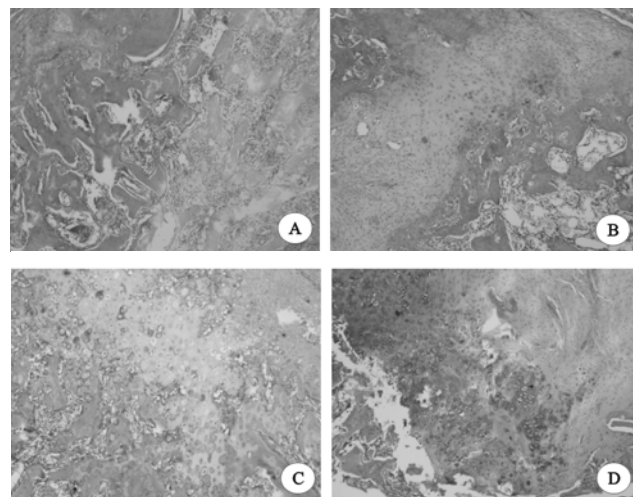
应用 SPSS 10.0 版统计软件, 各组平均光密度值用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

结 果

一、组织学观察

超声中药透入组: 骨折端由软骨性骨痂与骨性骨痂填充, 软骨成分逐渐消失, 骨小梁已基本连接, 细胞

与胶原纤维的排列有规律 (图 1A)。中药组: 骨折端由软骨性骨痂填充, 部分软骨性骨痂开始骨化, 骨小梁部分连接, 细胞与胶原纤维的排列欠规则 (图 1B 和 C)。造模组: 骨折端以软骨性骨痂为主, 仍可见少量纤维性骨痂, 软骨成分逐渐减少, 新生骨小梁向骨组织过渡, 细胞与胶原纤维的排列紊乱 (图 1D)。



注: A. 超声中药透入组, 骨折端由软骨性骨痂与骨性骨痂填充, 细胞与胶原纤维排列有规律; B. 中药组, 骨折端由软骨性骨痂填充为主, 细胞与胶原纤维排列欠规则; C. 超声组, 骨折端由软骨性骨痂填充为主, 细胞与胶原纤维排列欠规则; D. 造模组, 骨折端可见少量纤维性骨痂, 细胞与胶原纤维排列紊乱

图 1 各组骨折端组织学观察 (HE 染色, $\times 200$)

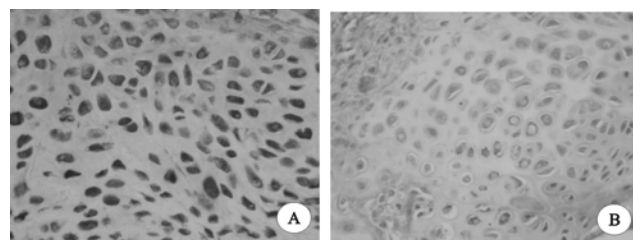
二、免疫组织化学分析结果

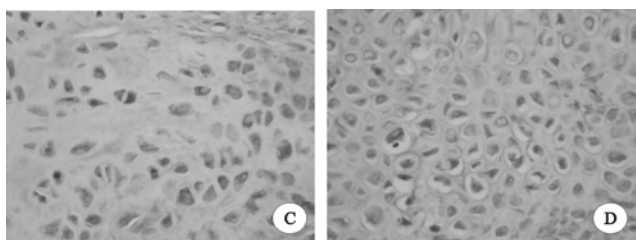
超声中药透入组 I 型胶原表达强于中药组和超声组, 明显强于造模组; 中药组和超声组 I 型胶原表达强度大致相仿, 略强于造模组 (图 2)。超声中药透入组的平均光密度值明显高于中药组、超声组以及造模组 ($P < 0.05$ 或 0.01); 中药组和超声组平均光密度值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠骨折端胶原表达的比较

组 别	<i>n</i>	I 型胶原平均光密度值
造模组	9	0.0323 $\pm$ 0.0073
中药组	9	0.0400 $\pm$ 0.0058 ^a
超声组	9	0.0434 $\pm$ 0.0049 ^a
超声中药透入组	9	0.0647 $\pm$ 0.0051 ^{bcd}

注: 与造模组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与中药组比较, ^c $P < 0.05$; 与超声组比较, ^d $P < 0.05$





注: A. 超声中药透入组, I 型胶原表达较强; B. 中药组, I 型胶原表达较超声中药透入组弱, 有部分着色; C. 超声组, I 型胶原表达较超声中药透入组弱, 有部分着色; D. 超声组, I 型胶原表达很弱, 无明显着色

图 2 各组骨折端胶原表达比较(免疫组织化学染色, $\times 400$)

讨 论

尽管大部分骨折能成功愈合, 仍有相当一部分骨折(约占骨折总数 5% ~ 10%) 会发生延迟愈合或不愈合。因此, 促进骨折愈合, 避免延迟愈合或不愈合一直是医学界的一个课题。多年来, 许多学者都在试图寻找一种更简单、有效的方法来促进骨折愈合。实验研究表明, 具有理气活血、接骨续筋功效的中药能促进骨折断端胶原蛋白的合成, 调节 I、II 型胶原基因的表达, 使软骨修复提前进入骨化及塑形期, 从而促进骨折的修复, 加强骨折愈合^[3]。超声能促进成骨细胞和内皮细胞分泌血小板源性生长因子, 后者可以促使不成熟的成骨细胞分化, 诱导 I 型胶原的生成, 促进骨痂中软骨形成和骨膜内化骨^[4-7]。我们根据临床的观察和研究, 考虑到可利用超声的药透作用将中药导入局部来促进骨折愈合。

中药和超声对骨折愈合的促进作用已得到证实。超声治疗骨折是现代物理技术在骨伤科应用的一个大突破, 而中草药治疗骨折则是祖国医学行之有效的办法。但是, 外用中药究竟有多少透入到组织内, 一直是人们所关注的问题, 因为这直接关系到疗效的好坏。由于超声具有促进药物透入的作用, 于是我们设想将二者相结合, 疗效可能更佳。从理论上讲, 超声的机械振动及声流作用所致的细微按摩作用, 可使细胞膜通透性增加, 中草药更易通过细胞间隙透入细胞内^[8-10]。超声与中药协同作用, 可进一步促进骨痂生长、骨折愈合, 发挥更好的效果。魏晓燕等^[11]的临床研究显示中草药超声透入可促进骨折愈合, 证明中草药超声透入能明显缩短骨折愈合时间, 促进骨痂生长和患肢功能恢复。但国内外有关中草药超声透入治疗骨折的实验研究还鲜见报道。本实验从组织分子学的角度来阐述和证明这一方法的有效性。超声中药透入组的组织学观察和免疫组织化学分析结果均显示, 其促进骨折愈合的效果比单纯中药或单纯超声治疗好。

胶原纤维是结缔组织的主要成分, 在骨基质的有机成分中, 90% 为 I、II 型胶原, 是骨修复中重要的物质基础^[12]。在骨折愈合的分子生物学研究中, 测定胶原合成是检测骨形成和骨吸收的重要生物学方法。本实验显示, 超声中药透入组 I 型胶原表达的平均光密度值明显高于造模组、中药组和超声组, 提示超声药物透入促进骨折愈合可能是通过促使 I 型胶原合成来实现的。

综上所述, 超声药物透入可促进骨折愈合, 治疗作用较单纯中药或单纯超声好, 其机制可能与促进 I 型胶原的合成有关。但是, 超声药物透入治疗骨折愈合还有很多尚待解决的问题, 如: 中药超声透入的具体机制、中药的透入量、中药超声透入剂的开发与应用价值、超声剂量的选择等, 均有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Sun JS, Hong RC, Chang WH, et al. In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells. *J Biomed Mater Res*, 2001, 57:449-456.
- [3] 魏玉玲, 何承建, 染克玉. 骨仙片对小鼠骨折愈合的 I、II 型胶原基因表达影响的实验研究. *中国中医骨伤科杂志*, 2003, 11:22-24.
- [4] Shimazaki A, Lunl K, Azuma Y, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits. *J Bone Joint Surg*, 2000, 82:1077-1082.
- [5] Rosier RN, Okeefe RJ, Hicks DG. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop*, 1998, 355 (Suppl):294-300.
- [6] 赵学琴, 周智勇, 王永江, 等. 促进骨折愈合的物理治疗方法的进展. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26:314-316.
- [7] 张超, 梁国穗, 张颖恺, 等. 低强度超声波刺激对人骨髓基质细胞和骨膜细胞生物学效应的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:657-660.
- [8] 张小斌, 王坤正. 低强度超声在骨折愈合中的作用. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:701-702.
- [9] 赵健乐, 李新平, 刘春华. 超声波药物透入治疗慢性软组织损伤的疗效观察. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26:510-511.
- [10] 杨丽梅. 应用超声电导经皮局部中药透入治疗流行性腮腺炎. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:259.
- [11] 魏晓燕, 韩洪舜, 韩清, 等. 中草药超声透入促进骨折愈合的临床研究. *现代中西医结合杂志*, 2003, 12:139-140.
- [12] 胡学武, 游长征, 熊辉. 中医药促进骨折愈合分子机理研究进展. *中医药导报*, 2006, 12:79-81.

(修回日期:2007-03-25)

(本文编辑:吴 倩)