

跌创散促进兔实验性骨折愈合的作用★

刘国华¹, 王志义², 刘丹平³

Effect of Diechuang San on the experimental fracture healing in rabbits

Liu Guo-hua¹, Wang Zhi-yi², Liu Dan-ping³

¹Graduate College of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China;
²Jinzhou Shihua Hospital, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China;
³First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Liu Guo-hua★, Studying for master's degree, Physician, Graduate College of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China xinyv85@163.com

Correspondence to: Wang Zhi-yi, Professor, Jinzhou Shihua Hospital, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Received: 2010-03-15
Accepted: 2010-04-05

¹ 辽宁医学院研究生学院, 辽宁省锦州市 121001;
² 锦州石化(公安)医院, 辽宁省锦州市 121001;
³ 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁省锦州市 121001

刘国华★, 男, 1978年生, 山东省淄博市人, 辽宁医学院在读硕士, 医师, 主要从事中西医结合骨科学的研究。
xinyv85@163.com

通讯作者: 王志义, 教授, 锦州石化(公安)医院, 辽宁省锦州市 121001

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)24-04454-04

收稿日期: 2010-03-15
修回日期: 2010-04-05
(20100315017/YJ·Z)

Abstract

BACKGROUND: The Chinese medicine *Diechuang San* (DCS) has the property of activating blood circulation and removing stasis, as well as deswelling and alleviating pain, which obtain good outcomes in treating soft tissue injury. Bone fracture and soft tissue injury belong to "tendon trauma" in traditional Chinese medicine.

OBJECTIVE: To study the effect of DCS on experimental fracture healing.

METHODS: A total of 36 male New Zealand white rabbits were prepared for 3-mm fracture bone defects models at the middle of both radiuses. Then those rabbits were separated into model control group and DCS treatment group, which were treated by bandaging and external application of DCS, once two days. Afterwards, the changes of alkaline phosphatase (ALP), Ca and P concentrations, histopathology, as well as the X-ray films were observed at 2, 4 and 6 weeks after model preparation.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model group, the bone defects in the DCS group were filled quickly and the fracture healed earlier. The concentrations of serum ALP, Ca and P were greater in the first 4 weeks ($P < 0.05$, $P < 0.01$), which could promote the deposition of calcium in the fracture fragments, and promoted the fracture healing. The stimulated blood vessel was greater than the model group with larger inside diameter, and the ossification centers appeared earlier. Therefore, we presume that DCS may influence the serum ALP, Ca, P concentration changes and promote blood circulation to improve the fracture region such as the promotion of callus growth, and thus achieve the purpose of promoting fracture healing.

Liu GH, Wang ZY, Liu DP. Effect of diechuang san on the experimental fracture healing in rabbits. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(24): 4454-4457. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 跌创散有活血祛瘀, 消肿止痛之功, 对软组织损伤疗效显著。骨折与软组织损伤同属中医“筋伤”的范畴。

目的: 观察跌创散对实验性骨折愈合作用的影响。

方法: 取兔龄为6个月左右的雄性新西兰大白兔36只, 造成双侧桡骨中段约3mm骨缺损模型, 造模成功后随机分为模型组和跌创散组。模型组仅给予绷带包扎, 跌创散组给予跌创散外敷, 每2d更换1次包扎物, 分别于造模后2, 4, 6周观察新西兰大白兔桡骨骨折愈合过程中血清碱性磷酸酶、钙、磷浓度变化, 骨痂病理组织学改变及不同时期X射线的变化。

结果与结论: 跌创散组骨缺损填充快, 骨折愈合早, 前4周血清碱性磷酸酶、钙、磷浓度较高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 可以促进钙盐在骨折断端的沉积, 对骨折愈合有明显的促进作用, 血管较模型组数量多且内径大, 骨化中心出现早。因此, 推测跌创散可能通过影响血清碱性磷酸酶、钙、磷的浓度变化及促进骨折区域血液循环改善等方面而促进骨痂生长, 进而达到促进骨折愈合的目的。

关键词: 跌创散; 中药; 骨折愈合; 碱性磷酸酶; 骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.24.019

刘国华, 王志义, 刘丹平. 跌创散促进兔实验性骨折愈合的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24):4454-4457. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

中医药治疗骨折在长期的实践过程中取得了良好的疗效并积累了丰富的临床经验, 具有有效减轻患者痛苦、缩短疗程、功能恢复好等特点^[1-3]。现代中医药工作者在临床实践过程中不断创新, 设立了许多具有良好临床疗效的组方^[4]。跌创散即是在这种原则指导之下创立的一个方剂, 该方由大黄、黄柏佐以其他几味中药组成, 在前期临床使用过程中证明其有活血祛瘀, 消肿止痛之功, 其中取大黄凉血, 活血祛瘀; 黄柏祛湿消肿之效, 对软组织损伤等病症疗效较好。骨折与软组织损伤同属中医“筋伤”的范畴, 为明确该药作用机制, 同时也为临床

药物选择提供可靠的理论依据, 特设计本次实验, 以观察药物跌创散促进骨折愈合效果, 并对其可能的作用机制做出初步探讨。

1 材料和方法

设计: 随机对照, 动物实验。

时间及地点: 实验于2009-03/07在辽宁医学院动物实验中心及锦州石化医院病理科完成。

材料:

实验动物: 普通级成年雄性新西兰大白兔36只, 兔龄6个月, 体质量为2.5~3.0 kg, 由辽宁医学院动物饲养中心提供。动物饲养于光线良好, 温度为23℃, 相对湿度为45%的饲养室内。

实验过程中对动物处置符合科学技术部2006年《关于善待实验动物的指导性意见》的要求^[5]。

药物: 跌创散为锦州石化(公安)医院王志义教授经验组方, 主要由大黄、黄柏等药物组成, 由锦州石化(公安)医院制剂室提供, 每次换药前用黄酒将药物调成糊状。

方法:

骨折模型制备: 术前实验兔双前肢技术区8%硫化钠脱毛^[6], 速眠新注射液(0.2 mL/kg)肌肉注射麻醉^[7], 术时双前肢常规消毒, 术区用2%利多卡因局部浸润麻醉, 取前肢背外侧切口, 逐层切开, 显露桡骨。在桡骨中部用特制骨锯造成桡骨约3 mm的骨缺损, 彻底冲洗后逐层缝合包扎^[8]。由于兔前肢上下尺桡关节先天性骨性融合, 离断桡骨后尺骨可以起到内部支撑作用, 故不需内外固定。术后3 d内常规给予青霉素600 000 U/只, 预防感染^[9]。

分组: 术后按随机原则将实验兔分为模型组和跌创散组, 各18只。

干预: 术后待切口干燥后模型组兔仅予绷带包扎, 跌创散组兔给予跌创散外敷, 给药量以药物包绕前肢1周, 宽度约5 cm, 厚度约2 mm为度。2组均每2 d换药1次, 以防药物干燥, 影响疗效; 如有脱落则随时更换。

X射线观察: 分别于给药后2, 4, 6周分批(每组6只)用空气栓塞法处死^[10], 双前肢X射线摄片检查, 观察骨折愈合及骨痂生长情况^[11]。

血清碱性磷酸酶、钙、磷浓度检测: 动物处死前经耳缘静脉取血约3 mL, 送至锦州石化(公安)医院检验科, 由专业技术人员用日立7180多功能分析机检测血清碱性磷酸酶、钙、磷浓度^[12]。

组织切片苏木精-伊红染色: 摄片结束后取双前肢桡骨, 以骨缺损处为中心取长度约1 cm的骨段, 将其置于40 g/L多聚甲醛溶液4 °C下固定24 h, 后再将其置于质量分数为10%的EDTA-2Na溶液脱钙^[13](每两到三天更换1次脱钙液)。待骨质松软, 针刺刀割无明显阻力后表示脱钙完成。以骨段纵轴为中心剖开骨段, 经系列乙醇脱水、透明、浸蜡、剖面向下, 低熔点石蜡包埋。用全自动切片机切成厚度约5 μm的蜡片, 将蜡片分别展于载玻片上, 做好标记, 置于干燥箱中, 42 °C烤片48 h。石蜡切片经2次二甲苯脱蜡, 梯度乙醇下行至水略洗, Harris苏木精溶液染色15 min后水洗, 蓝化, 入1%伊红水溶液1 min, 体积分数95%乙醇分色并上行至无水乙醇、二甲苯后, 中性树脂胶封固。切片制作完成后用200倍光学显微镜观察苏木精-伊红染色结果。

主要观察指标: 造模后2, 4, 6周骨折局部X射线观察骨痂生长情况, 血清碱性磷酸酶、钙、磷浓度变化, 骨痂组织苏木精-伊红染色观察成骨细胞、破骨细胞及血管数量的动态变化。

设计、实施、评估者: 设计、实施、评估者为全部作者, 未采取盲法评估, 参加者均接受过动物实验培训。

统计学分析: 所有数据统计均用SPSS 14.0(SPSS公司, 美国)进行统计学处理, 组间比较采用独立样本t检验的方法进行。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 新西兰大耳白兔36只在实验过程中无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 血清指标 正常机体血清碱性磷酸酶、钙、磷浓度维持在一定的范围之内, 有报道显示正常兔类碱性磷酸酶水平为(1 441.96±213.38) nkat/L, 正常血清钙浓度为(2.54±0.31) mmol/L, 血清磷浓度为(1.41±0.20) mmol/L^[12]。在本次实验中, 2组动物血清碱性磷酸酶浓度随时间变化均呈单峰样变化, 跌创散组在第2周达到峰值; 模型组在第4周达到峰值, 2组在达到峰值后均呈逐渐降低的趋势。血清钙则均表现为逐渐下降的趋势, 2组最高值均在第2周出现, 且跌创散组浓度明显高于模型组($P < 0.05$); 血清磷表现为逐渐增高, 前4周跌创散组浓度高于模型组($P < 0.01$), 见表1。

表1 各组骨折愈合过程中血清指标浓度变化
Table 1 Changes of serum indexes in each group during fracture healing

Group	n	ALP (nkat/L)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)
2 wk				
Model	18	1 764.24±133.88	3.07±0.17	1.22±0.35
DCS	18	2 203.22±232.63 ^a	3.23±0.30 ^a	1.67±0.26 ^b
4 wk				
Model	12	2 049.03±186.90	2.92±0.36	1.77±0.17
DCS	12	2 137.93±149.63	2.97±0.21	2.30±0.34 ^b
6 wk				
Model	6	1 936.50±202.09	2.84±0.25	2.35±0.13
DCS	6	1 719.80±184.25	2.78±0.31	2.26±0.11

ALP: alkaline phosphatase; DCS: Diechuang San; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. model group

2.3 X射线观察骨折愈合情况

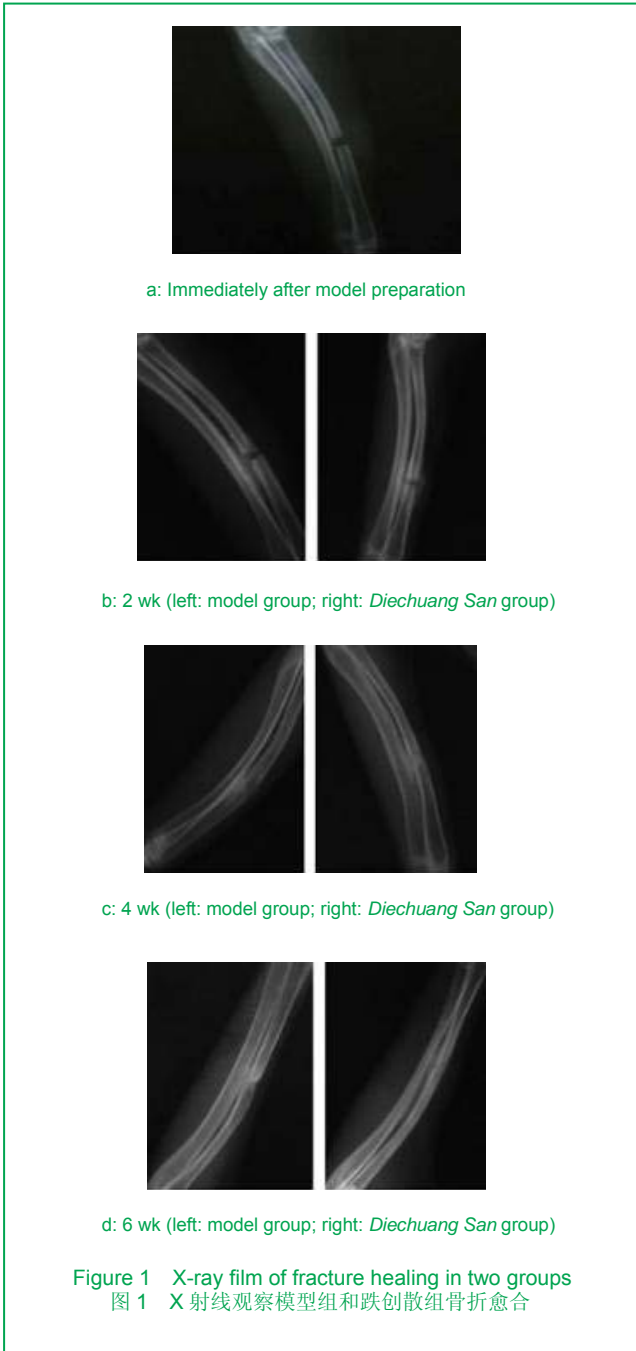
骨折愈合情况:

手术后即刻, 手术造成兔双前肢桡骨完全性骨折, 骨折断端间距约3 mm, 骨结构连续性完全中断, 见图1a。

给药后2周, 实验兔前肢断端清晰可见, 跌创散组骨膜反应明显, 骨痂生成量明显多于模型组, 边缘较模糊, 缺损处主要由疏松结缔组织填充, 见图1b。

给药后4周, 跌创散组兔前肢缺损处可见大量致密的骨痂生长, 外骨痂已部分会师桥接, 骨折断端未见有血肿; 而同期模型组兔前肢缺损处则骨痂稀少, 排列紊乱, 未见外骨痂会师桥接, 骨折处仍见机化血肿、纤维组织及软骨组织, 见图1c。

给药后6周, 跌创散组兔骨折断端髓腔已再通, 外骨痂基本改建成板层骨; 而模型组兔骨折断端髓腔未通, 外骨痂可见部分会师桥接, 骨折断端可见较多高密度骨组织影, 见图1d。



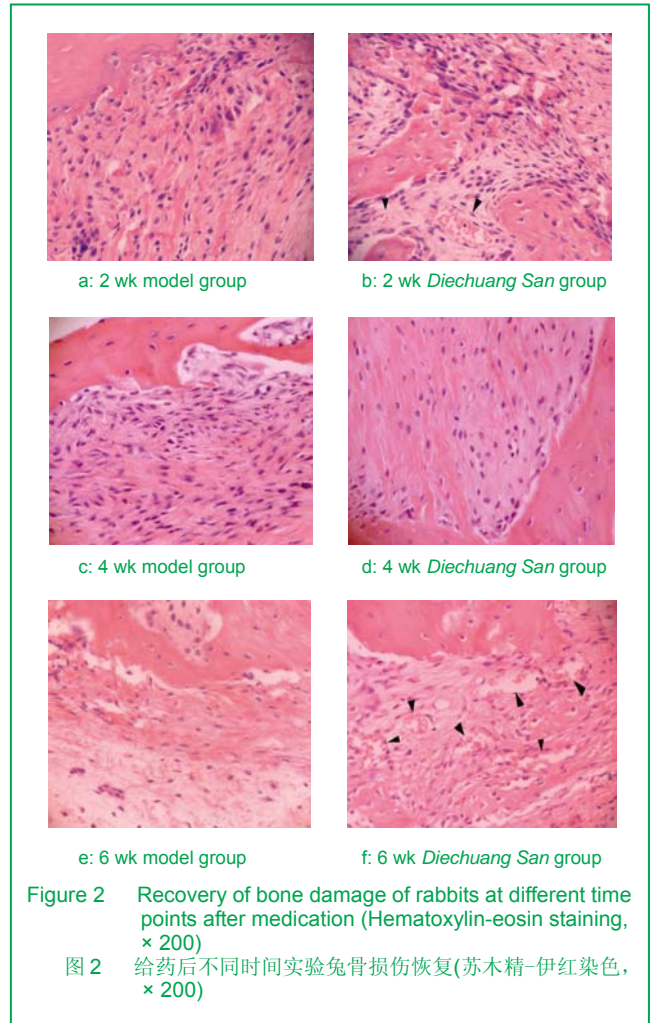
2.4 苏木精-伊红染色结果

不同时期骨损伤恢复情况:

给药后 2 周, 实验兔骨缺损出均由疏松结缔组织填充, 成骨细胞不规则分布于其中, 跌创散组中可见增生比较活跃的骨母细胞及较多毛细血管分布其中, 说明该组血供丰富, 恢复情况较模型组要好。

给药后 4 周, 实验兔骨折处均可见骨小梁形成, 跌创散组骨小梁数量较多且排列规整, 同时看到软骨化骨的演变, 显示出较好的治疗效果。

给药后 6 周, 两组均见深染的骨化区, 跌创散组骨小梁形成较多, 且含有多量毛细血管, 骨化区分布同向规律性排列, 提示处于骨痂改造塑形期, 而模型组骨小梁排列紊乱, 未见明显软骨化骨演变, 提示该处仍处于原始骨痂形成期, 见图 2。



3 讨论

任何骨折都有自然愈合的倾向, 但影响骨折愈合的因素众多^[14-15], 合适的药物干预能大大缩短骨折的愈合过程^[16]。中医药治疗骨折已有两千多年的历史, 在长期的实践过程中取得了良好的疗效并积累了丰富的治疗经验^[17]。

大黄用于瘀血证, 古籍中多有记载, 如复元活血汤即取大黄的活血祛瘀之效达到治疗外伤瘀血肿痛的目的^[18]。现代药理研究证明大黄是跌打损伤外用良药, 不仅能减低毛细血管通透性, 改善脆性, 并有增加血小板, 促进血液凝固的作用^[19], 通过改善损伤局部血液循环而达到促进损伤修复的治疗效果。黄柏主要功效为清热燥湿, 现代药理研究黄柏有祛湿消肿作用, 外用可以促进皮下渗血的吸收^[20], 其作用机理可能是通过对血小板的保护作用而达到治疗效果。两者合用则可改善骨折部位的血液供应, 促进局部血肿的吸收与机化, 促进骨折部位骨基质钙盐沉积, 而达到治疗骨折的目的。

骨折发生时, 机体通过血液循环和破骨细胞活动把骨中沉积的钙离子动员到血中, 以较高的血钙浓度加快

钙离子在骨折局部的沉积来满足骨折愈合的需要^[21]。通常血液供应越丰富、代谢越活跃这个过程越早发生；血浆和细胞外液保持一定浓度的无机磷是骨矿形成和吸收的决定因素，在血钙浓度下降的同时，血磷浓度增加，以动员更多的钙离子沉积到损伤局部，加速修复过程的进度。实验结果表明，跌创散能提高实验动物血清中碱性磷酸酶、磷的含量，血清钙含量先高后低，符合骨骼愈合过程的生化指标变化规律，实验动物的骨X射线影像检查显示跌创散组与模型组相比骨折愈合速度显著增快，提示跌创散对动物骨折愈合有促进作用，其机制可能与加快骨折局部血肿机化和吸收，改善局部血液循环，骨基质钙盐沉积有关^[22]。骨折发生时，机体通过血液循环和破骨细胞活动把骨中沉积的钙离子动员到血中，以较高的血钙浓度加快钙离子在骨折局部的沉积来满足骨折愈合的需要^[23]。通常血液供应越丰富、代谢越活跃这个过程越早发生；血浆和细胞外液保持一定浓度的无机磷是骨矿形成和吸收的决定因素，在血钙浓度下降的同时，血磷浓度增加，以动员更多的钙离子沉积到损伤局部，加速修复过程的进度。骨折的愈合是一个复杂的病理生理过程，是机体内外各种因素综合作用的结果，本实验仅从以上几个方面对药物作用机制做了初步探讨，其他可能的作用机制将会在以后的工作过程中不断完善。

4 参考文献

- [1] Du TX, Li GL. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2005;9(34):122-124. 杜天信,李根林.接骨胶囊促进骨修复及抗炎镇痛作用的动物实验[J].中国临床康复,2005,9(34):122-124.
- [2] Liu YJ, Weng FQ, Li Q, et al. Zhongyi Yanjiu. 2005;18(1):35-36. 刘英杰,翁凤泉,李强,等.活血散瘀丸对骨折早期骨痂质量的影响[J].中医研究,2005,18(1):35-36.
- [3] Hu NP. Hebei Zhongyi Zazhi. 2007;29(9):56. 胡能平.肱骨骨折术后应用中成药治疗的临床疗效分析[J].湖北中医杂志,2007,29(9):56.
- [4] Yin CX, Liu AP, Cao RL. Zhongyiyao Linchuang Zazhi. 2007;19(6):640-642. 尹朝献,刘安平,曹日隆.中药促进骨折愈合机制的实验研究进展[J].中医药临床杂志,2007,19(6):640-642.
- [5] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals.2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见.2006-09-30.
- [6] Yu JQ, Yan L, Zheng P, et al. Ningxia Yixueyuan Xuebao. 2001;23(4):296-297. 余建强,闫琳,郑萍,等.实验动物脱毛剂的改良与应用[J].宁夏医学院学报,2001,23(4):296-297.
- [7] Wu SG, Qian N. Guiyang Zhongyi Xueyuan Xuebao. 2007;29(1):58-60. 吴曙光,钱宁.速眠新在实验动物麻醉中的应用[J].贵阳中医学院学报,2007,29(1):58-60.
- [8] Wang YX, Li ZM, Bi ZG. Zhongguo Difangbing Fangzhi Zazhi. 2008;23(1):60-61. 王玉学,李郑民,毕郑钢.建立兔桡骨缺损动物模型的实验研究[J].中国地方病防治杂志,2008,23(1):60-61.
- [9] Shen L, Lin YP, Wang YJ. Beijing: Beijing Science and Technology Press, 2005:384. 沈霖,林燕萍,王拥军.骨伤科实验研究[M].北京:北京科学技术出版社,2005:384.
- [10] Li C, Ren LQ. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008:76. 李才,任立群.人类疾病动物模型的复制[M].北京:人民卫生出版社,2008:76.
- [11] Zhang YB, Wang X, Guo XJ, et al. Dongwu Yixue Jinzhan. 2007;28(2):37-41. 张永斌,王萧,郭学军,等.壮筋补骨丸促进新西兰兔骨折愈合的X线影像学比较研究[J].动物医学进展,2007,28(2):37-41.
- [12] Dong H, Hu NW, Dong QP. Zhongyiyao Xuebao. 2003;31(2):51-52. 董华,胡乃武,董清平.骨痛仙胶囊对家兔骨折血清碱性磷酸酶、钙、磷影响的实验研究[J].中医药学报,2003,31(2):51-52.
- [13] Ma HH, Zhang RS, Zhou HB, et al. Zhenduan Binglixue Zazhi. 2005;12(5):391. 马恒辉,章如松,周航波,等.介绍一种改良的Neutral EDTA脱钙液[J].诊断病理学杂志,2005,12(5):391.
- [14] Huang CM, Su PJ, Li DG. Guangxi Zhongyi Xueyuan Xuebao. 2006;9(2):123-126. 黄春梅,苏培基,李大刚.中药促进骨折愈合的临床研究文献的评价[J].广西中医学院学报,2006,9(2):123-126.
- [15] Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury. 2005;36(12):1392-1404.
- [16] Wong M, Siegrist M, Goodwin K. Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes. Bone. 2003;33(4):685-693.
- [17] Liu QS, Zhuang H, Huang HX, et al. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006:331. 刘庆思,庄洪,黄宏兴,等.骨质疏松症中西医结合治疗[M].北京:人民卫生出版社,2006:331.
- [18] Lu Y. Taishan Yixueyuan Xuebao. 2001;22(3):258. 卢勇.复元活血汤在骨折初期的应用观察[J].泰山医学院学报,2001,22(3):258.
- [19] He Z, Xin YQ, Chen M. Zhongguo Zhongyi Jizheng. 2007;16(2):227-228. 何正显,信玉琼,陈明.大黄的化学成分、药理作用及其在临床急症中的应用[J].中国中医急症,2007,16(2):227-228.
- [20] Wu JR, Zhang B, Zhang GM. Yatai Chuantong Yiyao. 2009;5(11):160-162. 吴嘉瑞,张冰,张光敏.黄柏药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2009,5(11):160-162.
- [21] Xie Y, Zhu TY, Bi JH, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(19):3781-3783. 谢艳,朱太咏,毕军花,等.益气生骨颗粒对大鼠骨折愈合骨痂中无机质及钙含量的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(19):3781-3783.
- [22] Chen LT, Li HB. Shiyong Zhongxiyi Jiehe Zazhi. 2007;7(4):91-93. 陈立涛,李洪波.中医药对骨折愈合干预作用的研究近况[J].实用中西医结合临床,2007,7(4):91-93.
- [23] Chen L, Yang YZ, Chen JG. Hebei Zhongyi Zazhi. 2005;27(1):50-52. 陈玲,杨云洲,陈继革.接骨七厘片促进大鼠骨折愈合的实验研究[J].湖北中医杂志,2005,27(1):50-52.

来自本文课题的更多信息一

致谢:衷心感谢辽宁医学院动物实验中心、锦州石化医院放射科、检验科和病理科的各位老师及师张贵富等在实际期间给予的大力支持和无私帮助!

利益冲突:课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点:跌创散组方简单,不仅克服了单味中药治疗的局限性,也减少了复方制剂的诸多弊病,且为外敷使用,有效地避免了肝肠循环对药效的破坏,也能有效地减少药物的毒副作用等。

课题评估的“金标准”:骨钙素是反映骨折损伤后愈合的特异性指标,通过骨痂免疫组化染色的方法,可以更直接的反映骨折以后骨钙素含量的变化。

课题或设计的偏倚与不足:本课题因经费和实验条件限制,设计较为简单,观察指标较少,缺乏骨钙素等对骨折愈合有特征性意义的指标,可在以后的实验过程中予以逐步完善。