

麝香乌龙丸对卵巢切除大鼠股骨骨折愈合的实验研究

张柳 刘锋 梁春雨 赵文国 王志文 张爱国

摘要:目的 研究麝香乌龙丸对卵巢切除大鼠股骨干骨折愈合的作用。方法 将30只雌性、12周龄Sprague-Dawley大鼠分成3组:假手术组(Sham + F + V)、卵巢切除 + 骨折 + 生理盐水对照组(OVX + F + V)、卵巢切除 + 骨折 + 麝香乌龙丸给药组(OVX + F + M),每组10只大鼠。所有需制造骨折的大鼠均采用右股骨中段横行骨折,髓内针固定,麝香乌龙丸给药组采用大鼠灌胃给药($1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),于术后4周杀死,取大鼠右侧股骨标本,分别进行CR摄片、组织形态学染色,并应用双能X线骨密度仪(DEXA)测量右股骨整体骨密度(tBMD)、远段骨密度(dBMD)和中段骨密度(mBMD)以及BMP-2免疫组化观察,并应用病理图像分析仪对BMP-2免疫组化进行光密度测定。结果 麝香乌龙丸给药组与OVX + F + V比较,前者骨痂mBMD和BMP-2的表达显著增高,骨小梁增宽、排列较整齐,板层骨形成,软组织可见。结论 麝香乌龙丸对OVX大鼠股骨骨折有明显促进骨折愈合的作用,并加快编织骨向板层骨的演变过程,这与BMP-2的表达有明显相关性。

关键词:骨质疏松症;卵巢切除术;骨折愈合;麝香乌龙丸;骨形态发生蛋白;免疫组织化学

The study of mask dark dragon pelle on femoral fracture healing in ovariectomized rats ZHANG Liu, LIU Feng, LIANG Chunyu, et al. Department of Otheapedics, Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China

Abstract: **Objective** To evaluate the effects of Mask Dark Dragon Pelle on femur fracture healing in bilateral ovariectomized rats. **Methods** Thirty 12-week-old female Sprague-Dawley rats were divided randomly into three groups of ten animals each. Group A was sham-operated and femur fracture and vehicle group (Sham + F + V), Group B was bilateral ovariectomized and femur fracture and vehicle group (OVX + F + V) and Group C was bilateral ovariectomized and femur fracture and administration of Mask Dark Dragon Pelle group (OVX + F + M). Mask Dark Dragon Pelle was administered once everyday (1.2 g/kg) for 4 weeks. Right femoral diaphysis was fractured transversely at the midshaft and fixed with intramedullary stainless wire. All rats were sacrificed 4 weeks after operation. Right femora were removed for the observation of radiology and histology, and for the monitoring of bone mineral density (BMD) by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA), immunohistochemistry assessment and Integral Optic Density (IOD). **Results** The mean mBMD and IOD of the OVX + F + M group was significantly higher than that of the OVX + F + V group. The woven bones have remodeled into lamellar bones and cartilage islands were observed. **Conclusions** Mask dark dragon pelle accelerates the fracture healing in ovariectomized rats and improves woven bones to remodel into lamellar bones. The fracture healing is in accordance with the expression of BMP-2.

Key words: Osteoporosis; Ovariectomized; Fracture healing; Mask dark dragon pelle; Bone morphogenetic proteins; Immunohistochemistry

骨质疏松症是由于骨量减少,骨的微观结构的退化,致使骨的脆性增加且易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。绝经期妇女尤为突出,在当前疾病

谱中位于前10位^[1]。同时,世界人口老龄化趋势的加剧,骨质疏松性骨折作为其最严重的并发症,对老年人健康的影响日益引起人们的重视。临床发现,麝香乌龙丸具有消肿镇痛,促进骨折愈合的作用。我们通过同时建立大鼠骨质疏松(OP)^[2]和骨折(F)^[3]模型,探讨该药对雌激素缺乏导致的骨质疏松

性骨折愈合的影响及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备与分组

健康 12 周龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只(购自北京大学医学部实验动物中心),普通级,体重 (258 ± 14) g。将其随机分成 3 组:假手术组(Sham + F + V)、卵巢切除 + 骨折 + 生理盐水对照组(OVX + F + V)、卵巢切除 + 骨折 + 麝香乌龙丸给药组(OVX + F + M),每组 10 只。

假手术(Sham)的制备:仅进行大鼠背侧切开暴露腹腔内结构,但不进行卵巢切除,然后逐层关闭伤口。OVX 的制备:所有动物模型制备的麻醉方法均采用 1% 戊巴比妥钠以 40 mg/kg 体重的剂量腹腔注射麻醉;采用背侧入路,常规去毛,碘伏消毒后,以后方髂骨嵴上 2 cm、脊柱旁 1 cm 处取纵行切口,长约 1 cm,依次切开皮肤、皮下和肌层,暴露腹腔卵巢切除后,以丝线将残端结扎,逐层关闭伤口。骨折模型(F)制备:行右大腿中段外侧纵形皮肤切口,长约 2 cm,沿股外侧肌间隙钝性分离进入达股骨干,固定股骨,在股骨干中 1/3 段用线锯锯断成横行骨折,此过程注意保护坐骨神经和肌肉组织,再以直径约 1.5 mm 的克氏针逆行穿入骨折近端且从后侧股骨大粗隆穿出,复位骨折后再将其顺行穿入骨折远段髓腔,生理盐水冲洗,逐层关闭伤口。

将麝香乌龙丸(成药)置入研钵内研成粉末,再用双蒸水溶解成悬浊液,以灌胃针灌胃($1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),共 4 周。分别将受试大鼠采用 1% 戊巴比妥钠以 40 mg/kg 体重的剂量腹腔注射麻醉,于术后 4 周心脏取血处死大鼠,取其右侧完整的股骨标本,生理盐水冲洗置 10% 中性甲醛液 4℃ 冰箱保存。

1.2 观察指标

1.2.1 CR 摄片:将大鼠完整的右侧股骨干骨折标本经计算机 X 线摄影机(CR)摄片(距离 90 cm、电压 40 kVp、电流 3.2 mA·s),观察大鼠股骨骨折骨痂的连续性、骨折愈合情况。

1.2.2 骨密度测定:应用 Norland-XR 36 双能 X 线骨密度测量仪(DEXA,美国),采用小物体扫描模式(准确度 0.01%,扫描速度 60 mm/s,分辨率(resolution)1.0 mm × 1.0 mm,扫描宽度 5.0 cm)进行测量。测量时,拔除克氏针,将股骨全长三等分,分别测股骨全长、远 1/3 段、中 1/3 段(感性趣区)。精确度用变异系数(CV)表示,测得股骨不同部位变异系数为:全长(Total femur)0.47%,远段(Distal femur)

0.51%,中段(Midshaft femur)0.41%。

1.2.3 骨痂形态学染色(HE 染色):将大鼠股骨骨折标本,置入 10% 中性甲醛缓冲固定液中(pH = 7.2 ~ 7.4),在 4℃ 条件下固定 24 ~ 48 h,再经 10% EDTA-2 Na 缓冲液(pH = 7.4, 4℃)脱钙,隔 5 ~ 7 d 更换脱钙液,经过 3 ~ 5 周后,经鉴定脱钙完全后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,纵向石蜡包埋,5 μm 连续切片,HE 染色,透明后中性树脂封片,Olympus 显微镜下作普通光镜观察。

1.2.4 免疫组化染色(SABC 法)并图像分析:采用 SABC 法,BMP-2 免疫组化试剂盒(购自武汉博士德生物工程有限公司),具体操作严格按说明书进行,以该公司提供的阳性片作为阳性对照,用 PBS 液替代一抗作为阴性对照。采用 HPAIS-1000 高清晰度彩色病理图像分析系统,将免疫组化标本切片经显微镜输入计算机图像分析系统,并对图像进行二值分割,然后随机选取 4 个视野,在光镜 10 × 10 倍视野下,在同一阈值把所有样品全部测完,取骨痂组织阳性细胞平均积分光密度做为统计指标。

1.3 统计学处理

实验数据建立 EXCEL 数据库,应用 SPSS 12.0 软件包处理,两组间比较采用 Student's *t* 检验。数据均以均数加减标准差表示,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 CR 摄片的观察

大鼠离体右侧股骨干 CR 摄片,观察骨痂的连续性,发现各组大鼠骨折端均未发现不愈合现象。麝香乌龙丸给药组骨痂量相对较多,形成纤维包绕,骨折线模糊,内固定克氏针无松动和移位,无畸形愈合及成角。

2.2 骨密度测量结果

大鼠右侧股骨分别测量全长、远 1/3 段、中 1/3 段的骨密度(中段包括了骨折部位及全部骨痂),结果见表 1。

表 1 股骨不同部位的骨密度测量值比较

(g/cm^2 $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

参数	Sham + F + V	OVX + F + V	OVX + F + M
tBMD	0.1067 ± 0.0099	0.0941 ± 0.0135	0.0954 ± 0.0255
dBMD	0.1074 ± 0.0134	0.0994 ± 0.0370	0.0922 ± 0.0278
mBMD	0.1197 ± 0.0180	0.1137 ± 0.0277*	0.1179 ± 0.0167#

注:与 Sham + F + V 比较 * $P < 0.05$;与 OVX + F + V 比较 # $P < 0.05$ (Student's *t* Test)

2.3 骨痂组织形态学观察结果

OVX + F + V 与 Sham + F + V 组比较,后者大鼠骨折端大部分骨性愈合,有连续性骨痂包绕,但前者骨痂量较少,骨折线清晰,发现部分内固定克氏针松动和脱落现象。麝香乌龙丸给药组与 OVX + F + V 比较,骨痂中骨性骨痂较多,只有少量软骨细胞,但未见到“软骨岛”存在,骨小梁粗细均匀一致,间距无明显增宽,板层骨形成。周围结缔组织和骨髓腔可见较多毛细血管植入。表明骨折愈合过程中血运丰富,软骨性骨痂向骨性骨痂转化加速。

2.4 免疫组化染色观察结果

BMP 主要沉积在功能活跃的成骨细胞及其周围和产生骨小梁的边缘,纤维骨痂中较少,麝香乌龙丸给药组阳性细胞表达强于对照组,光密度(IOD)值差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 两组骨痂 BMP-2 表达的 IOD($\bar{x} \pm s, n = 10$)

参数	Sham + F + V	OVX + F + V	OVX + F + M
IOD	37.2 ± 12.2	27.52 ± 12.3	76.27 ± 24.2*

注:与 OVX + F + V 比较* $P < 0.05$ (Student's *t* Test)

3 讨论

卵巢切除大鼠是模拟绝经后骨质疏松症的公认模型。Wronski 等^[2]研究发现成年大鼠卵巢切除后,由于雌激素缺乏使骨改建呈高转换型,骨吸收和骨形成均增高,但骨吸收大于骨形成,骨形成相对减少,骨改建呈负平衡,这与人类绝经后骨质疏松症相似。

建立骨折实验模型的方法较多,可以采用闭合骨折的方法,亦可以采用开放骨折模型,两者各有优缺点。采用闭合方法,术后多不固定或外固定,易导致骨折的类型难以统一和骨折畸形愈合或不愈合,不利于控制条件进行统计分析和比较。而采用开放骨折方法,由于直视下截骨具有定位准确、切断方法方便、内固定方法牢固、可靠等优点,手术过程中只要严格无菌操作,就可有效控制感染机会,虽然手术创伤较大,但损伤程度相同,可以充分保证骨折类型的统一和所得实验数据的可比性^[3,4]。

本实验发现,OVX + F + V 与假手术组比较骨痂量减少,软骨骨痂比例高,骨痂 BMD 明显低。说明骨质疏松性骨折愈合过程中,软骨骨痂向骨性骨痂转化延迟,小梁骨吸收加快,骨形成降低,最终导致骨痂骨密度和骨量显著减少。BMP-2 的表达两者比较差异无统计学意义,有研究认为 BMP-2 等生长因子约释放 4 周^[5],在此期间 Sham 组骨折已基本完成

软骨内成骨,而 OVX 组仍处于软骨内成骨阶段,低浓度的 BMP-2 无法对软骨基质的钙化起诱导作用,从而进一步延缓了成骨过程。

通过对麝香乌龙丸给药组与对照组的比较,我们发现所观察和测量的各项指标,给药组要好于对照组,给药组在 CR 片上骨折端骨折线明显模糊,骨痂较多,显微镜下观察可见其板层骨形成,骨小梁发育较成熟,且明显增宽,排列整齐,软骨细胞少见,髓腔及外周组织可见较多微血管长入,表明骨折愈合过程中血运丰富,软骨性骨痂向骨性骨痂转化加速,测量骨痂 BMD 值显著增加($P < 0.05$);骨痂平均积分光密度明显高于对照组($P < 0.05$),表明骨痂 BMP-2 表达差异有统计学意义。

麝香乌龙丸的主要成分为麝香、制川乌、地龙等。临床发现其具有促进骨折愈合的功能,但作用机制有待进行实验研究和探讨。中药促进骨折愈合的实验研究自刘润田^[6]首次报道以来,国内学者运用现代科技手段多方位多角度对中药促进骨折愈合进行了深入地研究并取得了重大进展。

在骨折愈合过程中,中药具有改善骨折后局部微循环的作用,促进血肿的机化和吸收。Wallace 等^[7]研究证实,局部血液循环是影响骨折愈合的重要因素。骨折愈合需要新生血管参与,成骨细胞的生长机能也依赖血供状态。周重建等^[8]发现,中药黄芪、当归等能促进骨折端组织毛细血管的开放。李也白等^[9]发现李氏接骨丹具有改善骨折后外周循环的作用,进而促进血肿的吸收和机化。本研究中骨痂组织镜下观察发现,麝香乌龙丸给药组骨痂周围及髓腔毛细血管明显增殖,有利于改善微循环,促进静脉回流,消除肿胀改善血供状态,以利骨折修复。

在骨折愈合过程中,钙盐沉积是一个突出关键步骤,骨组织的修复须经过基质的钙化过程,才能趋于完成。有实验证明,应用中药组能够加速骨痂的钙化,增加骨痂的钙盐沉积,骨痂骨密度增高,从而提高骨折愈合的数量和质量^[10-12]。本研究发现,麝香乌龙丸给药组骨痂量增加,骨痂 BMD 明显升高;软骨细胞少见,编织骨已部分转化为板层骨,骨小梁成熟度高,排列规整,表明麝香乌龙丸不仅可以加速软骨痂向骨性骨痂的转化,而且显著增加骨折愈合的数量和质量,从而加速骨折愈合的速度,缩短骨折愈合时间。麝香乌龙丸给药组中 BMP-2 的表达明显强于对照组,表明麝香乌龙丸具有促进 BMP-2 生长因子的合成和分泌的作用,其对骨折的作用与刺激 BMP-2 生长因子表达有关。这与刘献祥等^[12]的

研究结果相一致,具有诱导 BMP-2 的合成,加速骨折愈合之作用。

综上所述,麝香乌龙丸对 OVX 大鼠股骨骨折有明显促进骨折愈合的作用,并加快编织骨向板层骨的演变过程,这与 BMP-2 的表达有明显相关性。

【参 考 文 献】

- [1] 薛延,主编.骨质疏松症诊断及治疗指南.北京:科学出版社,1999.
- [2] Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*, 1989, 10:295-301.
- [3] Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, et al. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop*, 1997, 342:218-227.
- [4] 郝永强,戴赳戎.骨质疏松性骨折实验模型的设计与建立.中国矫形外科杂志,2002,9:569-572.
- [5] Mundy CR, Boyce B, Hughes D, et al. The effects of cytokines and

growth factors on osteoblastic cells. *Bone*, 1995, 17:71-75.

- [6] 刘润田.中药接骨丹对骨折愈合作用研究.天津医药,1962,4:457-458.
- [7] Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, et al. The vascular response to fracture micromovement. *Clin Orthop Relat Res*, 1994, 301:281-290.
- [8] 周重建,王绪辉,朱显华,等.益气化瘀剂在骨折愈合过程中的生化和病理观察.中国中医骨伤杂志,1989,5:7-10.
- [9] 李也白,温红,徐华梓,等.复合中药制剂促进骨折愈合的实验研究.骨与关节损伤杂志,1999,14:108-109.
- [10] 洪定钢,时光达.淫羊藿影响骨折愈合的组织学及骨组织形态计量学研究.中医正骨,1999,11:3-6.
- [11] 吴宇峰,石关桐,张戈,等.伤科接骨片对兔骨折骨痂骨矿和生物力学性能的影响.中国中医骨伤杂志,2001,9:26-29.
- [12] 刘献祥,余希杰,许书亮.无名异冲剂在骨折愈合中对 DNA 和 BMP 含量影响的实验研究.中国骨伤,1999,12:21-23.

(收稿日期:2006-03-09)