

· 基础研究 ·

中药外敷超微粉体对大鼠骨折后骨痂形成和改建的影响

熊焱昊¹, 王普申¹, 齐进¹, 刘志安²

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海 200025;

2. 浙江省舟山广安骨伤医院, 浙江 舟山 316102)

摘 要 **目的:**观察中药外敷超微粉体对大鼠骨折后骨痂形成和改建的影响。**方法:**将 60 只 3 月龄 SD 雌性大鼠制成左侧胫骨骨折模型,并以克氏针固定。造模结束后将大鼠随机分为超微组、散剂组和对照组,每组 20 只。自术后第 1 天开始,超微组和散剂组大鼠分别采用中药外敷超微粉体和中药外敷散剂外敷骨折部位,每天 2 次,共 28 d,对照组不进行干预。分别于术后 7 d、14 d、21 d 和 28 d 每组各处死 5 只大鼠,取左侧胫骨分别进行 X 线、组织学及 Micro-CT 检查。**结果:**①X 线检查结果。超微组和散剂组术后 28 d 时骨折处外骨痂密度增加,骨折线模糊,均接近愈合,其中超微组大鼠骨折处外骨痂更致密;对照组术后 28 d 时仍可见到骨折线。②组织学观察结果。术后 7 d 骨折处主要为纤维骨痂,3 组无明显差别;术后 14 d 和 21 d 时,软骨骨痂开始取代纤维性骨痂;术后 28 d 时软骨骨痂周围不断有原始骨小梁出现,骨折断端表面出现破骨细胞,原始骨小梁不断改建成为成熟骨小梁,其中以超微组骨小梁最多。③Micro-CT 检查结果。术后 7 d 时 Micro-CT 检查,3 组均未见明显骨痂。术后 14 d 时 3 组大鼠骨折部位骨痂体积和骨痂密度组间比较,差异均有统计学意义[(20.2±2.3)mm³, (16.4±1.7)mm³, (14.4±1.3)mm³, $F=13.286$, $P=0.001$];(184.6±9.3)mg·m⁻³, (162.8±5.7)mg·m⁻³, (148.2±6.8)mg·m⁻³, $F=30.649$, $P=0.001$];超微组的骨痂体积和密度均高于散剂组和对照组($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$),散剂组骨痂体积和密度均高于对照组($P=0.001$, $P=0.001$)。术后 21 d 时 3 组大鼠骨折部位骨痂体积和骨痂密度组间比较,差异均有统计学意义[(25.6±3.6)mm³, (21.2±0.8)mm³, (17.6±1.8)mm³, $F=41.517$, $P=0.000$];(248.2±16.0)mg·m⁻³, (222.6±7.8)mg·m⁻³, (197.8±9.0)mg·m⁻³, $F=23.834$, $P=0.000$];超微组的骨痂体积和密度均高于散剂组和对照组($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$),散剂组骨痂体积和密度均高于对照组($P=0.000$, $P=0.000$)。术后 28 d 时 3 组大鼠骨折部位骨痂体积和骨痂密度组间比较,差异均有统计学意义[(30.2±0.8)mm³, (23.4±1.1)mm³, (21.4±1.1)mm³, $F=96.727$, $P=0.000$];(292.2±10.9)mg·m⁻³, (256.8±6.5)mg·m⁻³, (222.8±4.4)mg·m⁻³, $F=98.826$, $P=0.000$];超微组的骨痂体积和密度均高于散剂组和对照组($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$),散剂组骨痂体积和密度均高于对照组($P=0.000$, $P=0.000$)。**结论:**中药外敷超微粉体能够促进大鼠骨折后软骨骨痂向骨性骨痂转化,提高骨痂密度,促进骨折愈合,其效果优于中药外敷散剂。

关键词 骨痂 超微粉体 中药外敷 散剂 动物实验

Effect of traditional Chinese drug ultramicro-powder for external application on the formation and reconstruction of bony callus after fracture in rats Xiong Yanhao*, Wang Pushen, Qi Jin, Liu Zhian. * Rui Jin Hospital Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

ABSTRACT **Objective:** To observe the effect of traditional Chinese drug(TCD)ultramicro-powder for external application on the formation and reconstruction of bony callus after fracture in rats. **Methods:** Sixty 3-month-old female SD rats were made into the left tibia fracture models and the fractures were fixed with kirschner wires. Then the rats were randomly divided into ultramicro-powder group, pulvers group and control group, 20 cases in each group. The rats in ultramicro-powder group and pulvers group were treated with TCD ultramicro-powder for external application and pulvers for external application at fracture sites respectively on the first day after operation, twice a day for 28 consecutive days, while rats in the control group were not be treated. At 7, 14, 21 and 28 days after the operation, 5 rats were selected from each group and were executed, and their left tibiae were fetched out for X-ray examination, histology examination and micro-CT examination. **Results:** At the 28th day after operation, the density of external callus increased at fracture site of ultramicro-powder group and pulvers group, moreover, the fracture lines were fuzzy and the fracture approached clinic healing. The density of external callus of ultramicro-powder

group was more dense, while the fracture line can still be seen in control group at the 28th day after operation. At the 7th day after operation, the fiber calluses were found at fracture sites and there was no obvious difference between the 3 groups. At the 14th and 21th day after operation, the fiber calluses began to be replaced by cartilage callus. At the 28th day after operation, original bone trabeculas appeared constantly around the cartilage callus, and the osteoclasts were also found on fracture sites. The original bone trabeculas converted to mature bone trabeculas constantly, and the bone trabeculas were the most in ultramicro-powder group. The micro-CT examination showed that no visible bony callus were found in the 3 groups at the 7th day after operation. There were statistical difference in volume and density of bony callus at fracture sites between the 3 groups at the 14th day after operation ($20.2 \pm 2.3, 16.4 \pm 1.7, 14.4 \pm 1.3 \text{ mm}^3$), $F = 13.286, P = 0.001$; $184.6 \pm 9.3, 162.8 \pm 5.7, 148.2 \pm 6.8 \text{ mg/m}^3$), $F = 30.649, P = 0.001$). The volume and density of bony callus were higher in ultramicro-powder group compared with pulvers group and control group ($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$), and were higher in pulvers group compared with control group ($P = 0.001, P = 0.001$). There were statistical difference in volume and density of bony callus at fracture sites between the 3 groups at the 21th day after operation ($25.6 \pm 3.6, 21.2 \pm 0.8, 17.6 \pm 1.8 \text{ mm}^3$), $F = 41.517, P = 0.000$; $248.2 \pm 16.0, 222.6 \pm 7.8, 197.8 \pm 9.0 \text{ mg/m}^3$), $F = 23.834, P = 0.000$). The volume and density of bony callus were higher in ultramicro-powder group compared with pulvers group and control group ($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$), and were higher in pulvers group compared with control group ($P = 0.000, P = 0.000$). There were statistical difference in volume and density of bony callus at fracture sites between the 3 groups at the 28th day after operation ($30.2 \pm 0.8, 23.4 \pm 1.1, 21.4 \pm 1.1 \text{ mm}^3$), $F = 96.727, P = 0.000$; $292.2 \pm 10.9, 256.8 \pm 6.5, 222.8 \pm 4.4 \text{ mg/m}^3$), $F = 98.826, P = 0.000$). The volume and density of bony callus were higher in ultramicro-powder group compared with pulvers group and control group ($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$), and were higher in pulvers group compared with control group ($P = 0.000, P = 0.000$). **Conclusion:** The TCD ultramicro-powder for external application can promote the transformation of cartilage callus into osseous callus in rats after fracture and raise the bony callus density. Therefore, it can promote fracture healing. Moreover, its therapeutic effect is better than that of TCD pulvers for external application.

Key words Bony callus; Ultramicro-powder; External applications (TCD); Pulvers; Animal experimentation

中药外敷是中医药治疗骨折的特色疗法。目前临床常用的方法是將中药散剂調成糊剂、软膏或油膏外敷骨折局部,但这种方法存在药物剂量大、有效成分溶出率低、透皮吸收效果差、黏附力差及使用不便等缺陷。本研究采用浙江省舟山广安骨伤医院确有疗效的中药接骨外敷方,将相关药物制成超微粉体后外敷大鼠骨折部位,观察骨痂形成和改建情况,探讨中药外敷超微粉体对大鼠骨折愈合的影响及可能的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SPF 级 3 月龄 SD 雌性大鼠 60 只,体质量 (354 ± 27) g, 购自中国科学院上海动物实验中心,实验动物许可证号 SYXK(沪)2010-0025。

1.2 实验试剂 中药外敷散剂和超微粉体选用浙江省舟山广安骨伤医院中药接骨外敷方——新伤一号方,药物组成包括乳香 12 g、没药 12 g、红花 18 g、三七 15 g、木芙蓉叶 30 g、生大黄 18 g、马钱子 6 g、生川乌 9 g、川续断 9 g、骨碎补 12 g、自然铜 12 g 等。HE 染色试剂盒(碧云天公司)。

1.3 实验仪器 直径 1.2 mm 克氏针(上海医用缝

合针厂); UD-150B-10 X 线摄片机(岛津公司); Locus SP Micro-CT (GE 公司); AH-2 Olympus 显微镜(Olympus 公司)。

2 方法

2.1 建模及分组 参照文献[1]的方法建立大鼠骨折模型。采用 2% 戊巴比妥钠 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 进行腹腔注射麻醉后,在大鼠左胫骨前弓状缘上 0.3 cm 处截断胫骨,然后从胫骨平台前缘插入 1 根直径 1.2 mm 克氏针进行固定,常规透视了解内固定位置。术后将大鼠随机分为超微组、散剂组和对照组,每组 20 只。

2.2 药物干预及取材 自术后第 1 天开始,超微组和散剂组大鼠分别采用中药外敷超微粉体和中药外敷散剂外敷骨折部位,对照组不进行干预。药物干预每天 2 次,共 28 d。分别于术后 7 d、14 d、21 d 和 28 d 每组各处死 5 只大鼠,取左侧胫骨进行观察。

2.3 实验观察 将每次处死大鼠后取得的胫骨标本分别进行 X 线、组织学及 Micro-CT 检查。X 线检查以 UD-150B-10 X 线摄片机拍摄正位片,观察骨痂组织形成和骨折愈合进程。组织学观察时,将胫骨标本

骨折部位制成石蜡切片,切片方向与骨折线垂直,将切片进行 HE 染色后置于 AH-2 Olympus 显微镜下观察。Micro-CT 检查时,先将胫骨标本以 10% 中性甲醛固定 48 h,拔出用于内固定的克氏针,然后将其置于 Locus SP Micro-CT 系统的检测试管内,沿标本的长轴方向扫描,获取连续 Micro-CT 图像,分辨率 $2\,048 \times 1\,024$,层距 $20\,\mu\text{m}$ 。扫描完成后,在主机上手动圈出感兴趣区域,将 CT 值高于 1 000 定为骨组织,应用 MicroView 2.2 图像分析软件以 $2 \times 2 \times 2$ 方式重建,对骨痂作整体及分区的相关形态计量分析。

2.4 统计分析 采用 SPSS 13.5 软件对所得数据进

行统计处理,3 组大鼠术后不同时点骨痂体积和密度的组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 造模结果 在造模过程中,无大鼠发生麻醉意外死亡,2 只大鼠固定过程中发生骨质开裂,加用外固定后未影响后续实验,实验过程中无大鼠死亡。

3.2 X 线检查结果 超微组和散剂组术后 28 d 时骨折处外骨痂密度增加,骨折线模糊,均接近愈合,其中超微组大鼠骨折处外骨痂更致密;对照组术后 28 d 时仍可看到骨折线(图 1)。



图 1 3 组大鼠术后 28 d 骨折部位 X 线片

3.3 组织学观察结果 术后 7 d 骨折处主要为纤维骨痂,3 组无明显差别(图 2);术后 14 d 和 21 d 时,软骨骨痂开始取代纤维性骨痂(图 3、图 4);术后 28 d 时软骨骨痂周围不断有原始骨小梁出现,骨折断端表面出现破骨细胞,原始骨小梁不断改建成为成熟骨小梁,其中以超微组骨小梁最多(图 5)。

3.4 Micro-CT 检查结果 术后 7 d 时 Micro-CT 检查,3 组均未见明显骨痂。术后 14 d 时 3 组大鼠骨折部位骨痂体积和骨痂密度组间比较,差异均有统计学意义;超微组的骨痂体积和密度均高于散剂组和对照组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$),散

剂组骨痂体积和密度均高于对照组($P = 0.001, P = 0.001$)。术后 21 d 时 3 组大鼠骨折部位骨痂体积和骨痂密度组间比较,差异均有统计学意义;超微组的骨痂体积和密度均高于散剂组和对照组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$),散剂组骨痂体积和密度均高于对照组($P = 0.000, P = 0.000$)。术后 28 d 时 3 组大鼠骨折部位骨痂体积和骨痂密度组间比较,差异均有统计学意义;超微组的骨痂体积和密度均高于散剂组和对照组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$),散剂组骨痂体积和密度均高于对照组($P = 0.000, P = 0.000$)。见表 1。

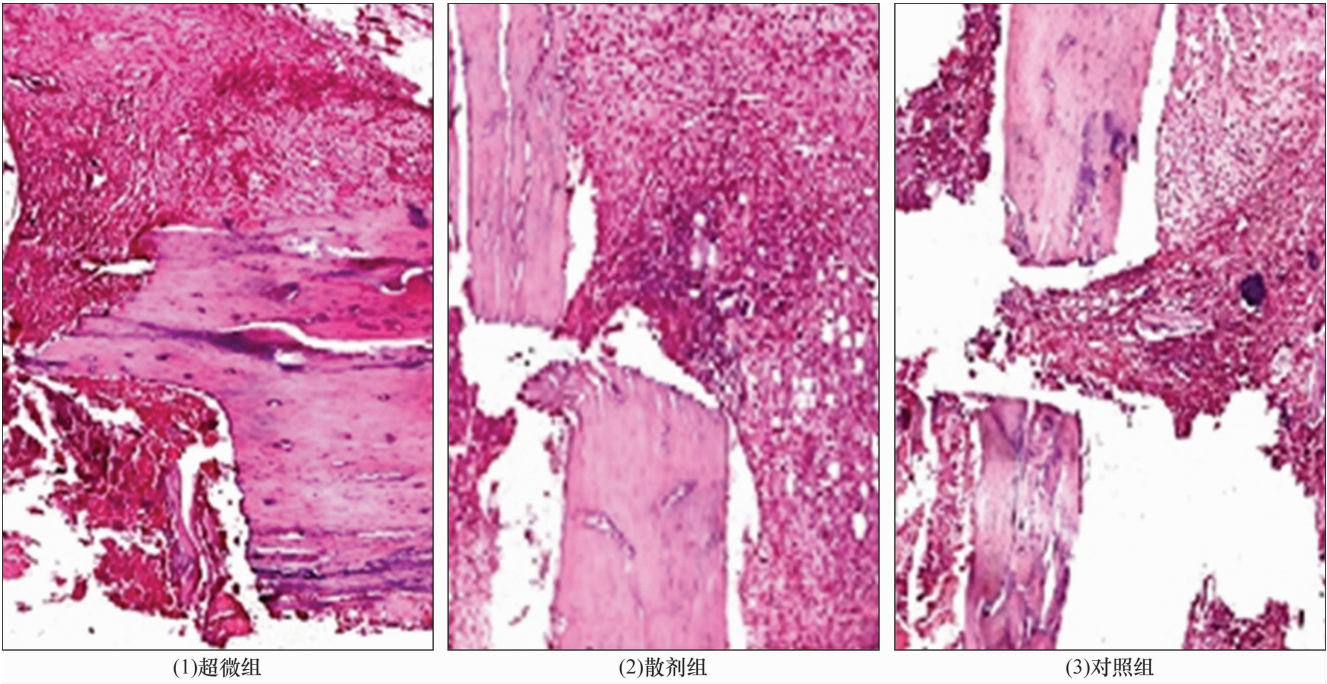


图 2 3 组大鼠术后 7 d 骨折部位骨组织切片 (HE 染色 ×20)

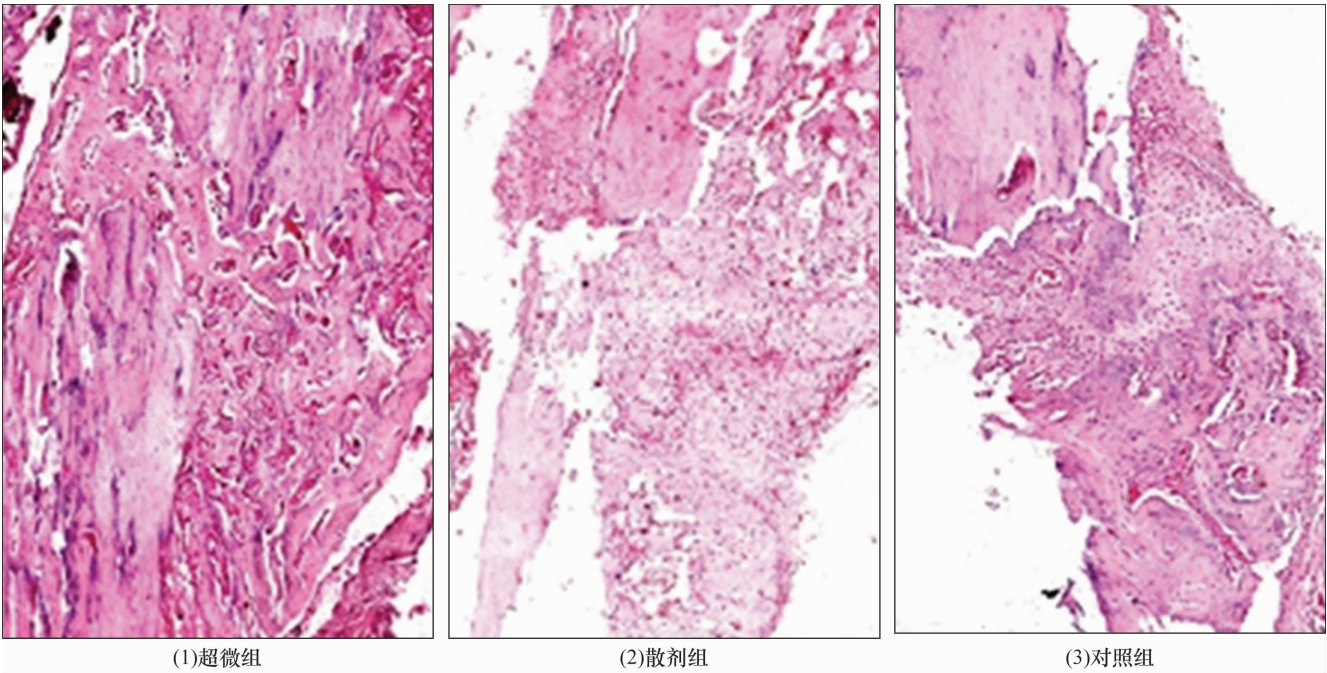


图 3 3 组大鼠术后 14 d 骨折部位骨组织切片 (HE 染色 ×20)

表 1 3 组大鼠术后不同时间骨痂体积和骨痂密度比较

组别	术后 14 d		术后 21 d		术后 28 d	
	骨痂体积 (mm ³)	骨痂密度 (mg · m ⁻³)	骨痂体积 (mm ³)	骨痂密度 (mg · m ⁻³)	骨痂体积 (mm ³)	骨痂密度 (mg · m ⁻³)
超微组	20.2 ± 2.3	184.6 ± 9.3	25.6 ± 3.6	248.2 ± 16.0	30.2 ± 0.8	292.2 ± 10.9
散剂组	16.4 ± 1.7	162.8 ± 5.7	21.2 ± 0.8	222.6 ± 7.8	23.4 ± 1.1	256.8 ± 6.5
对照组	14.4 ± 1.3	148.2 ± 6.8	17.6 ± 1.8	197.8 ± 9.0	21.4 ± 1.1	222.8 ± 4.4
F 值	13.286	30.649	41.517	23.834	96.727	98.826
P 值	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000

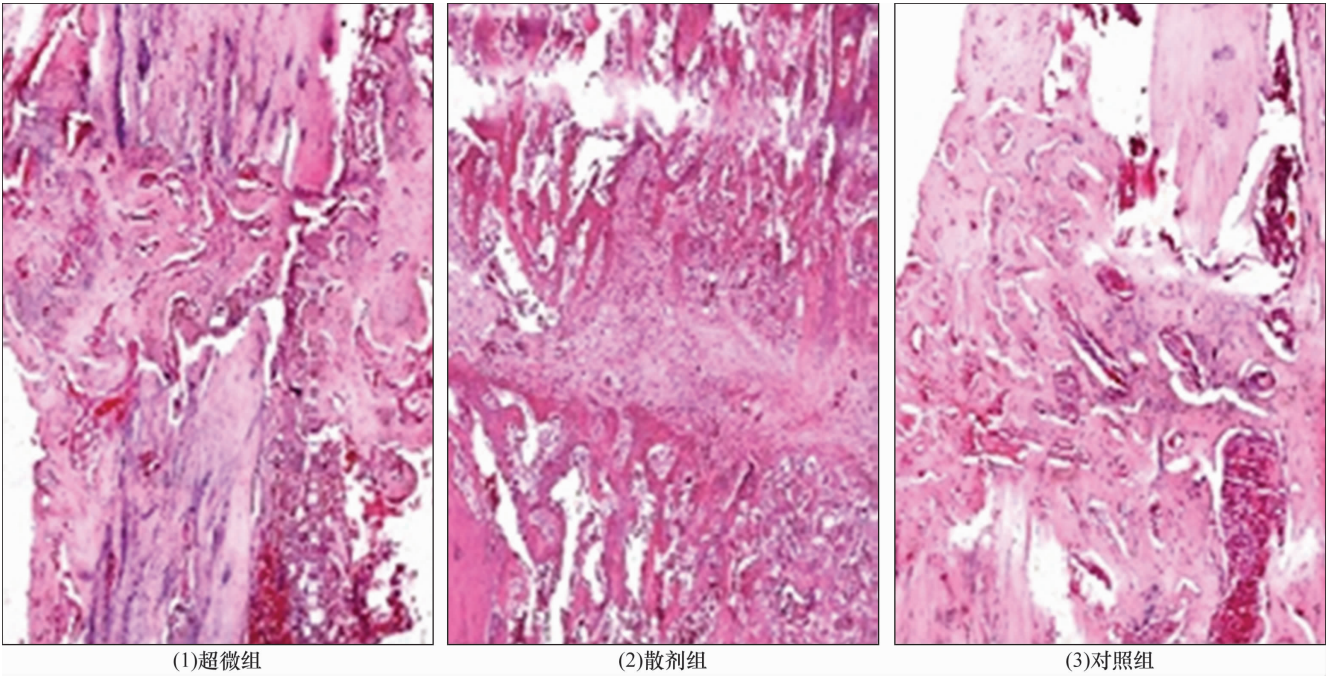


图 4 3 组大鼠术后 21 d 骨折部位骨组织切片 (HE 染色 $\times 20$)

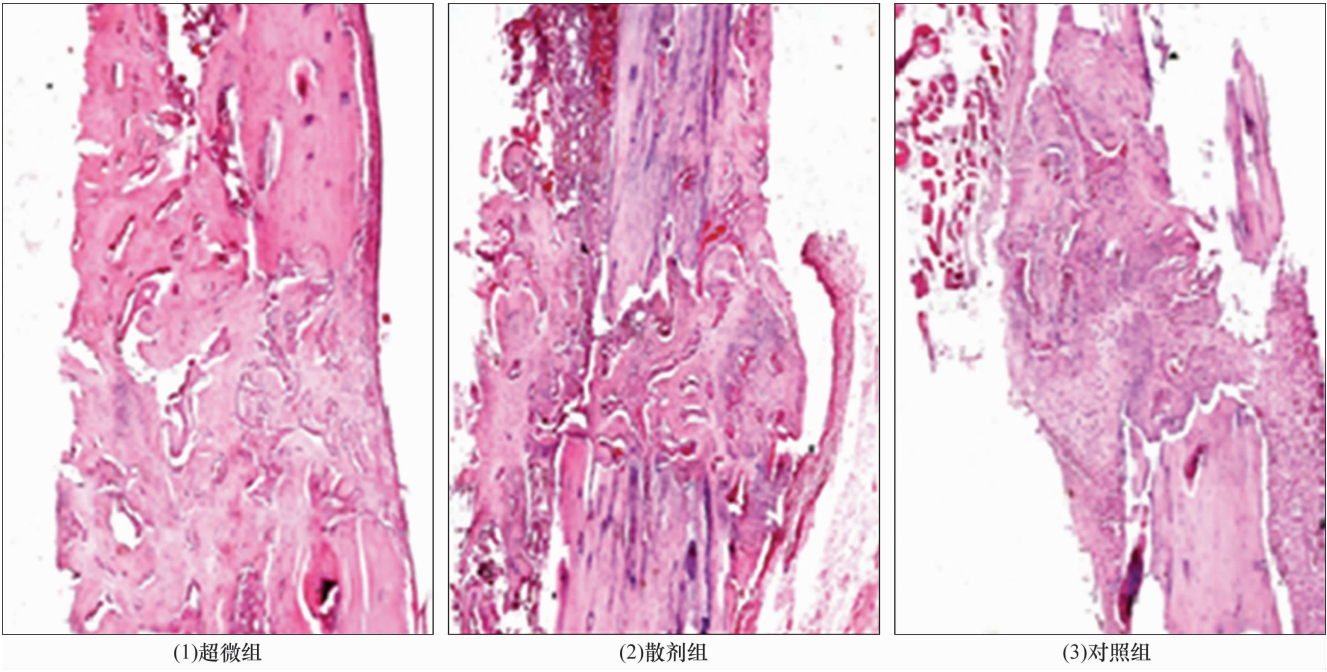


图 5 3 组大鼠术后 28 d 骨折部位骨组织切片 (HE 染色 $\times 20$)

4 讨论

中药外敷是中医药治疗骨折的特色疗法,疗效独特。新伤一号方是浙江省舟山广安骨伤医院治疗骨折的外敷方剂,经多年临床使用和观察,该方在促进骨折愈合方面疗效确切。方中乳香、没药、红花、三七活血化瘀,木芙蓉叶、生大黄清热消肿,马钱子、生川乌通络止痛,川续断、骨碎补、自然铜接骨续筋,诸药合用具有促进瘀血吸收、加快肿胀消退、推动气血运行、加速骨痂生长的作用。现代药理实验研究证实,

乳香、没药和马钱子具有很好的抗炎、抗菌作用^[2-4]。骨碎补可提高血液中钙、磷的浓度,促进钙、磷沉积,增强机体内成骨细胞增殖活性,提高血清碱性磷酸酶的活性以及促进转化生长因子在骨痂组织中的表达,促进骨折愈合^[5]。这些抗炎、抗菌及促进骨折愈合的药物可有效避免由于炎症反应而在骨折处形成不成熟骨痂,避免骨折延迟愈合^[6-8]。

传统的外敷方法是中药散剂调成糊剂、软膏或油膏外敷骨折局部,存在药物剂量大、有效成分溶出

率低、透皮吸收效果差、黏附力差及使用不便等缺点。采用超微粉碎技术处理中药散剂,可使中药变为超微颗粒,增大了药物的总体表面积,增加了药物有效成分与骨折断端皮肤接触的面积,提高了其生物利用度,增加了药物透皮吸收的效果^[9-11]。在本研究中,X 线、Micro-CT 及组织学检查结果均证实了超微粉体技术在提高药物疗效方面的作用。

本研究的结果提示,中药外敷超微粉体能够促进大鼠骨折后软骨骨痂向骨性骨痂转化,提高骨痂密度,促进骨折愈合,其效果优于中药外敷散剂。

5 参考文献

- [1] 费琴明,陈统一,陈中伟. 大鼠胫骨标准骨折模型的制作[J]. 上海实验动物学,2001,22(1):10-12.
- [2] Fan AY, Lao L, Zhang RX, et al. Effects of an acetone extract of *Boswellia carterii* Birdw. (Burseraceae) gum resin on adjuvant-induced arthritis in lewis rats[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 101(1-3):104-109.
- [3] 叶建红. 对药乳香没药的药理作用与临床应用体会[J]. 安徽中医临床杂志, 2003, 15(3):264-265.
- [4] 殷武. 马钱子生物碱类成分镇痛作用研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2000.

- [5] 王华松,黄琼霞,许申明. 骨碎补对骨折愈合中血生化指标及 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中医正骨, 2001, 13(5):6-8.
- [6] Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, et al. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture[J]. Semin Cell Dev Biol, 2008, 19(5):459-466.
- [7] Pettit AR, Chang MK, Hume DA, et al. Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics[J]. Bone, 2008, 43(6):976-982.
- [8] Reikerås O, Shegarfi H, Wang JE, et al. Lipopolysaccharide impairs fracture healing: an experimental study in rats[J]. Acta Orthop, 2005, 76(6):749-753.
- [9] 陈旭. 三七超微粉碎对生物体内吸收影响的初步试验[J]. 西北药学杂志, 2002, 17(5):203-204.
- [10] Shimazaki A, Inui K, Azuma Y, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits[J]. J Bone Joint Surg Br, 2000, 82(7):1077-1082.
- [11] 魏晓艳,韩洪舜,韩靖,等. 中草药超声透入促进骨折愈合的临床研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(2):139-140.

(2014-08-13 收稿 2014-09-10 修回)

(上接第 19 页)

4.4 其他因素 其他影响肱骨干骨折发生延迟愈合或不愈合的因素主要包括感染、骨折复位不良、骨折端软组织损伤严重等。感染一般通过破坏骨折端血供,增加骨折端的坏死和吸收机会,而影响内固定物的稳定性等间接途径导致骨折延迟愈合及不愈合。手法复位若不能纠正分离、成角及旋转畸形,易造成骨折延迟愈合或畸形愈合。严重的软组织损伤易影响骨折端周围血供,从而造成骨折延迟愈合或不愈合。刘建等^[7]认为,高能量损伤不但常造成严重粉碎骨折,而且常导致周围软组织严重损伤及神经血管合并伤,使骨折局部血供及神经营养障碍,而影响骨折愈合,最终发生骨不连。

本研究结果显示,肱骨干骨折后发生延迟愈合或不愈合主要与不合理的功能活动、固定不稳及严重粉碎性骨折有关联。但骨折延迟愈合及不愈合的发生绝不是单一因素作用的结果,而是混杂了多种因素的交叉作用结果。对于各因素间有无交互效应及其相关性,我们将继续收集资料做进一步分析研究。

5 参考文献

- [1] 曾炳芳,康庆林. 四肢骨不连外科学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010:77.
- [2] 胥少汀,葛宝丰,徐印坎. 实用骨科学[M]. 4 版. 北京: 人民军医出版社, 2012:1155.
- [3] 马国栋,张立臣,李纪元,等. 一期自体植骨加压钢板内固定治疗肱骨干骨折[J]. 实用骨科杂志, 2008, 14(7):413-414.
- [4] 李冀,赵伟超,关鹏飞,等. 长骨医源性骨不连的临床流行病学调查[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2012, 27(1):34-36.
- [5] Ekholm R, Adami J, Tidermark J, et al. Fractures of the shaft of the humerus. An epidemiological study of 401 fractures[J]. J Bone Joint Surg Br, 2006, 88(11):1469-1473.
- [6] 邱南海,郝根旺. 骨不连常见病因分析与治疗进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(10):762-765.
- [7] 刘建,王志刚,孟国林,等. 肱骨骨不连的原因分析及治疗[J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(4):395-399.

(2013-05-25 收稿 2013-12-04 修回)