

强骨饮对骨质疏松性骨折愈合的影响及其作用机制

黄俊俊¹, 史晓林¹, 邓祖跃²

(1. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005;

2. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052)

摘要 目的:探讨强骨饮对骨质疏松性骨折愈合的影响及其作用机制。**方法:**将 30 只雌性 SD 大鼠随机分成假手术/骨折组、骨质疏松性骨折组、骨质疏松性骨折强骨饮治疗组, 每组 10 只。骨质疏松性骨折组、骨质疏松性骨折强骨饮治疗组大鼠摘除双侧卵巢建立骨质疏松模型, 假手术/骨折组大鼠未切除卵巢。骨质疏松造模术后 6 周, 双能 X 线骨密度扫描仪测定 3 组大鼠股骨中段骨密度, 并均于股骨中段截断右侧股骨后用克氏针内固定, 建立大鼠股骨中段骨折模型。骨折造模后, 骨质疏松性骨折强骨饮治疗组大鼠以强骨饮浓缩液灌胃, 假手术/骨折组、骨质疏松性骨折组大鼠以等量生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 6 周。灌胃 6 周后, 每只大鼠主动脉取血 5 mL, 分离血清, 酶联免疫法测定大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和转化生长因子- β 1 (transfer growth factor- β 1, TGF- β 1) 水平。然后处死大鼠, 完整取出右侧股骨制成股骨标本, 双能 X 线骨密度扫描仪测定大鼠股骨中段骨密度; Micro-CT 扫描仪观察大鼠股骨中段骨折处骨痂的结构, 分析、记录骨小梁数量、骨小梁厚度、骨小梁分离度、骨体积分数; 光学显微镜下观察大鼠股骨中段骨折处骨痂的组织形态。**结果:**①骨质疏松造模术后 6 周, 3 组大鼠股骨中段骨密度比较, 组间差异有统计学意义 [(0.348 \pm 0.048) g \cdot cm⁻², (0.218 \pm 0.047) g \cdot cm⁻², (0.221 \pm 0.052) g \cdot cm⁻²; $F=22.590$, $P=0.000$]; 骨质疏松性骨折组、骨质疏松性骨折强骨饮治疗组股骨中段骨密度均低于假手术/骨折组 ($P=0.000$, $P=0.000$); 骨质疏松性骨折组股骨中段骨密度与骨质疏松性骨折强骨饮治疗组比较, 差异无统计学意义 ($P=0.418$); 证实骨质疏松造模成功。灌胃 6 周后, 3 组大鼠股骨中段骨密度比较, 组间差异有统计学意义 [(0.258 \pm 0.039) g \cdot cm⁻², (0.202 \pm 0.021) g \cdot cm⁻², (0.227 \pm 0.038) g \cdot cm⁻²; $F=25.957$, $P=0.000$]; 假手术/骨折组股骨中段骨密度高于骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000$, $P=0.000$); 骨质疏松性骨折组股骨中段骨密度低于骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.003$)。②灌胃 6 周后, 3 组大鼠股骨中段 Micro-CT 扫描示, 假手术/骨折组骨折处骨膜反应明显, 骨痂膨大, 骨皮质厚实; 骨质疏松性骨折组骨皮质萎缩, 骨痂体积小; 骨质疏松性骨折强骨饮治疗组骨膜反应明显, 骨痂体积较大, 骨皮质无明显萎缩。3 组大鼠股骨中段骨折处三维重建图像显示, 假手术/骨折组骨折处骨痂生长明显, 骨小梁多, 骨小梁结构紧密; 骨质疏松性骨折组骨痂少, 骨小梁稀疏; 骨质疏松性骨折强骨饮治疗组比骨质疏松性骨折组骨痂生长明显, 骨小梁多, 排列有序。3 组大鼠股骨中段骨折处骨痂的骨小梁数量、骨小梁厚度、骨小梁分离度、骨体积分数比较, 组间差异均有统计学意义 [(0.309 \pm 0.052) 个 \cdot mm⁻¹, (0.152 \pm 0.041) 个 \cdot mm⁻¹, (0.233 \pm 0.047) 个 \cdot mm⁻¹, $F=11.583$, $P=0.000$; (0.375 \pm 0.055) mm, (0.206 \pm 0.036) mm, (0.296 \pm 0.043) mm, $F=18.590$, $P=0.000$; (3.489 \pm 0.367) mm, (4.427 \pm 0.191) mm, (3.768 \pm 0.269) mm, $F=28.559$, $P=0.000$; (55.52 \pm 7.24)%, (38.31 \pm 5.12)%, (50.96 \pm 6.15)%, $F=12.445$, $P=0.000$]; 假手术/骨折组骨痂骨小梁数量、骨小梁厚度及骨体积分数均高于骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.002$), 骨小梁分离度低于骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000$, $P=0.000$), 骨质疏松性骨折强骨饮治疗组骨痂骨小梁数量、骨小梁厚度、骨体积分数高于骨质疏松性骨折组 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), 骨小梁分离度低于骨质疏松性骨折组 ($P=0.000$)。③灌胃 6 周后, 3 组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1 水平比较, 组间差异均有统计学意义 [(94.52 \pm 10.13) ng \cdot L⁻¹, (144.02 \pm 17.71) ng \cdot L⁻¹, (112.82 \pm 12.16) ng \cdot L⁻¹, $F=14.494$, $P=0.000$; (112.05 \pm 24.59) ng \cdot L⁻¹, (176.83 \pm 35.92) ng \cdot L⁻¹, (129.93 \pm 29.04) ng \cdot L⁻¹, $F=9.494$, $P=0.000$; (35.49 \pm 4.02) ng \cdot L⁻¹, (29.03 \pm 3.19) ng \cdot L⁻¹, (32.82 \pm 3.54) ng \cdot L⁻¹, $F=18.957$, $P=0.000$]; 假手术/骨折组大鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平均低于骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$), TGF- β 1 水平高于骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000$, $P=0.000$); 骨质疏松性骨折组大鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平均高于骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000$, $P=0.000$), TGF- β 1 水平低于骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.032$)。④灌胃 6 周后, 光学显微镜下观察 3 组大鼠股骨中段骨折处骨痂组织可见, 假手术/骨折组骨小梁较粗、分布较规则、排列有序、间距小, 连接成拱桥状, 骨性骨痂取代软骨性骨痂, 小梁状骨经改建趋于成熟; 与假手术/骨折组相比, 骨质疏

松性骨折组骨小梁较细,髓腔间隙较大,分布不规则、间距较宽,呈疏松化表现,软骨痂更明显,成熟小梁状骨较少,存在大量未钙化软骨细胞;与骨质疏松性骨折组相比,骨质疏松性骨折强骨饮治疗组骨小梁较粗、数量较多、间距较小,软骨细胞骨化占比较高,更接近于假手术/骨折组。结论:强骨饮可促进骨质疏松性骨折的愈合,其机制可能与提高血清中 TGF- β 1 水平和降低 TNF- α 、IL-1 β 水平,从而影响骨代谢、增加骨密度、改善骨微结构有关。

关键词 骨质疏松性骨折;骨密度;转化生长因子 β 1;白细胞介素 1 β ;肿瘤坏死因子 α ;强骨饮;大鼠;动物实验

Effects of Qianggu Yin(强骨饮) on the healing of osteoporotic fracture and its mechanism of action

HUANG Junjun¹, SHI Xiaolin¹, DENG Zuyue²

1. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310005, Zhejiang, China

2. Zhejiang institute for food and drug control, Hangzhou 310052, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the effects of Qianggu Yin(强骨饮, QGY) on the healing of osteoporotic fracture and its mechanism of action. **Methods:** Thirty female SD rats were randomly divided into sham-operated/fractured group, osteoporotic fracture group and QGY treatment group, 10 cases in each group. The bilateral ovariectomy were performed on rats in osteoporotic fracture group and QGY treatment group to build the osteoporosis rat models, while the rats in sham-operated/fractured group were not given ovariectomy. At 6 weeks after osteoporosis modeling operation, the bone densities of middle-segment femurs were detected by using dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) in rats of the 3 groups, and their right femurs were cut off at middle segment and fixed with Kirschner wires to built middle-segment femoral fracture models. After modeling, the rats in QGY treatment group were intragastric administrated with QGY concentrated solution, and the rats in sham-operated/fractured group and osteoporotic fracture group were intragastric administrated with isodose normal saline, once a day for consecutive 6 weeks. After 6-week intragastric administration, the blood (5 mL) were fetched out from aorta of each rat and the serum were isolated from the blood. The serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and transfer growth factor- β 1 (TGF- β 1) were measured by using enzyme linked immunosorbent assays. Then the rats were executed and their right femurs were fetched out for making specimens. The bone densities of middle-segment femurs were detected by using DEXA. The structure of bony callus at fractured site of middle-segment femurs were observed by using Micro-CT scanner, and trabecular number (Tb. N), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular separation (Tb. Sp) and bone volume fraction were analyzed and recorded. The histomorphological changes of bony callus at fractured site of middle-segment femurs were observed under the optical microscope. **Results:** At 6 weeks after osteoporosis modeling operation, there was statistical difference in the bone density of middle-segment femur between the 3 groups (0.348 ± 0.048 , 0.218 ± 0.047 , 0.221 ± 0.052 g/cm²; $F = 22.590$, $P = 0.000$). The bone densities of middle-segment femurs were lower in osteoporotic fracture group and QGY treatment group compared to sham-operated/fractured group ($P = 0.000$, $P = 0.000$), and there was no statistical difference in the bone density of middle-segment femur between osteoporotic fracture group and QGY treatment group ($P = 0.418$). After successful modeling and 6-week intragastric administration, there was statistical difference in the bone density of middle-segment femur between the 3 groups (0.258 ± 0.039 , 0.202 ± 0.021 , 0.227 ± 0.038 g/cm²; $F = 25.957$, $P = 0.000$). The bone density of middle-segment femur was higher in sham-operated/fractured group compared to osteoporotic fracture group and QGY treatment group, and was lower in osteoporotic fracture group compared to QGY treatment group ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.003$). After 6-week intragastric administration, the results of Micro-CT scanning on middle-segment femurs showed that (1) obvious periosteal reaction, dilate bony callus and thick cortical bone were found at fractured site in sham-operated/fractured group; (2) auantic cortical bone and small bony callus were found in osteoporotic fracture group; (3) obvious periosteal reaction, large bony callus and mild auantic cortical bone were found in QGY treatment group. The three-dimensional reconstruction images of fractured sites of middle-segment femurs showed that (1) well-grown bony callus and a great quantity of bone trabecula with compact structure were found at the fractured site in operated/fractured group; (2) sparse and less bone trabecula were found in osteoporotic fracture group; (3) compared to osteoporotic fracture group, more bony callus and regularly arranged bone trabecula were found in QGY treatment group. There was statistical difference in Tb. N, Tb. Th, Tb. Sp and bone volume fraction of bony callus at fractured site of middle-segment femur between the 3 groups (0.309 ± 0.052 , 0.152 ± 0.041 , 0.233 ± 0.047 piece/mm, $F = 11.583$, $P = 0.000$; 0.375 ± 0.055 , 0.206 ± 0.036 , 0.296 ± 0.043 mm, $F = 18.590$, $P = 0.000$; 3.489 ± 0.367 , 4.427 ± 0.191 , 3.768 ± 0.269 mm, $F = 28.559$, $P = 0.000$; 55.52 ± 7.24 , 38.31 ± 5.12 ,

50.96 ± 6.15%, $F = 12.445$, $P = 0.000$). The Tb. N, Tb. Th and bone volume fraction of bony callus were higher and the Tb. Sp was lower in sham-operated/fractured group compared to osteoporotic fracture group and QGY treatment group ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.002$; $P = 0.000$, $P = 0.000$). The Tb. N, Tb. Th and bone volume fraction of bony callus were higher and the Tb. Sp was lower in QGY treatment group compared to osteoporotic fracture group ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$). After 6-week intragastric administration, there was statistical difference in serum levels of TNF- α , IL-1 β and TGF- β 1 between the 3 groups (94.52 ± 10.13, 144.02 ± 17.71, 112.82 ± 12.16 ng/L, $F = 14.494$, $P = 0.000$; 112.05 ± 24.59, 176.83 ± 35.92, 129.93 ± 29.04 ng/L, $F = 9.494$, $P = 0.000$; 35.49 ± 4.02, 29.03 ± 3.19, 32.82 ± 3.54 ng/L, $F = 18.957$, $P = 0.000$). The serum levels of TNF- α and IL-1 β were lower and the serum level of TGF- β 1 was higher in sham-operated/fractured group compared to osteoporotic fracture group and QGY treatment group ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$). The serum levels of TNF- α and IL-1 β were higher and the serum level of TGF- β 1 was lower in osteoporotic fracture group compared to QGY treatment group ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.032$). After 6-week intragastric administration, the results of observation on bony callus at fractured site of middle-segment femurs under optical microscope showed that (1) thicker, regularly and compacted arranged and arch-bridge-shaped connected bone trabecula were found in the bony callus in sham-operated/fractured group, and the cartilaginous callus were replaced by bony callus and the trabecular bone became matured after remodeling; (2) thin, irregular and sparse bone trabecula and large intramedullary space were found in bony callus in osteoporotic fracture group, and more remarkable cartilaginous callus, less matured trabecular bone and large numbers of uncalcified chondrocytes were found in the bony callus; (3) compared to osteoporotic fracture group, thicker, more compacted and more numerous bone trabecula and higher proportion of ossified chondrocytes were found in the bony callus in QGY treatment group, which was more closer to sham-operated/fractured group. **Conclusion:** QGY can promote the healing of osteoporotic fractures, and it can promote bone metabolism, increase bone density and improve bone microstructure through up-regulating the serum level of TGF- β 1 and down-regulating the serum levels of TNF- α and IL-1 β , which may be the mechanism of action.

Keywords osteoporotic fractures; bone density; transforming growth factor beta1; interleukin-1beta; tumor necrosis factor- α ; Qiang-gu Yin; animal experimentation; rats

随着人口老龄化的加剧,骨质疏松症成为临床常见病,骨折是骨质疏松症严重的并发症之一。骨质疏松性骨折可严重影响老年人的生活质量,甚至给社会造成极大的负担。目前临床常用的抗骨质疏松药物,如二磷酸盐类药物,对骨质疏松性骨折的治疗作用尚存在争议。中药用于骨伤科疾病的治疗具有疗效明显、不良反应少等优点,中药治疗骨质疏松症已成为目前国内研究的热点^[1]。强骨饮具有益气补肾、活血温经、通络止痛等功效,用于骨质疏松症的治疗可增加骨密度、减轻疼痛症状,具有良好的抗骨质疏松作用,并可促进骨质疏松性骨折的愈合^[2-5]。但强骨饮促进骨质疏松性骨折愈合的作用机制尚不明确。为进一步探讨强骨饮对骨质疏松性骨折愈合的影响及其作用机制,本研究建立股骨中段骨质疏松性骨折大鼠模型,并对大鼠股骨中段骨密度、骨痂显微结构和组织形态及血清中细胞因子水平等进行测定、观察和分析,现报告如下。

1 材料和仪器

1.1 实验动物 体质量为 200~250 g 的清洁级雌性 SD 大鼠 30 只(浙江省医学科学院实验动物中心提

供,实验动物合格证号:SCXK 浙 2014-0001)。

1.2 实验药物及试剂 强骨饮浓缩液(药物组成:防风 15 g、黄芪 30 g、忍冬藤 25 g、露蜂房 20 g、杜仲 15 g、肉桂 10 g、川芎 20 g、川续断 30 g、骨碎补 20 g、鸡血藤 25 g、秦艽 15 g、鹿角霜 20 g 等。由浙江中医药大学附属第二医院制剂室制备,每毫升含生药 2.48 g)。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒(批号:20160623)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)试剂盒(批号:20160715)、转化生长因子- β 1(transfer growth factor- β 1, TGF- β 1)试剂盒(批号:20160722)、苏木精伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)试剂盒(批号:20160315)均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验仪器 SKYSCAN1176 型 Micro-CT 扫描仪(Bruker 公司,比利时),OSTEOCORE2 型双能 X 线骨密度扫描仪(MEDLINK 公司,法国)。

2 方法

2.1 动物分组和造模 30 只大鼠随机分为假手术/骨折组、骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮治疗组,每组 10 只。骨质疏松性骨折组和骨质疏松

性骨折强骨饮治疗组大鼠行双侧卵巢切除术,建立骨质疏松模型;假手术/骨折组大鼠不切除卵巢组织,仅切除腹部少许脂肪组织。骨质疏松造模术后 6 周,各组大鼠用 10% 水合氯醛麻醉,取右下肢股骨外侧切口显露股骨干,用线锯于股骨中段将股骨横行锯断,然后用直径 1 mm 的克氏针固定,依次缝合关闭切口,建立大鼠股骨中段骨折模型。

2.2 药物干预和标本制备 骨折造模后,参照黄继汉等^[6]制定的药理试验中动物与人体间等效剂量换算公式,骨质疏松性骨折强骨饮治疗组大鼠以 $0.041 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 强骨饮浓缩液灌胃,假手术/骨折组、骨质疏松性骨折组大鼠以等量生理盐水灌胃,每日 1 次,连续 6 周。灌胃 6 周后,将 3 组大鼠采用 1% 戊巴比妥钠麻醉,每只大鼠主动脉取血 5 mL,离心 10 min (离心半径 207.8 mm, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 分离血清后, -20°C 保存备用。然后处死大鼠,拔出克氏针,完整取出右侧股骨,生理盐水冲洗后置于 10% 的甲醛溶液中, 4°C 冰箱保存。

2.3 实验指标观察检测

2.3.1 骨密度测定 ①骨质疏松造模术后 6 周,采用双能 X 线骨密度扫描仪对各组大鼠股骨中段骨密度进行测定。②将灌胃 6 周后处死大鼠取得的股骨标本置于双能 X 线骨密度扫描仪检查床上,以股骨骨痂处为中心进行骨密度扫描测定。

2.3.2 Micro-CT 扫描 将大鼠股骨标本固定在 Micro-CT 专用扫描垫上,以骨折线为中心上下各扫描 200 层,电压 6.5 kV、扫描电压 65 kV、扫描旋转 180° ,每旋转 0.5° 拍摄图像 2 张,采用 NRecon 软件进行三维图像重建。CT-Analyser 软件对大鼠股骨中段骨折处骨痂的骨小梁数量、骨小梁厚度、骨小梁分离度、骨体积分数进行分析。

2.3.3 组织形态学观察 将各组大鼠股骨中段骨折处骨痂标本切片后进行 HE 染色,光学显微镜下进行形态学观察。

2.3.4 血清 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1\beta$ 和 $\text{TGF}-\beta 1$ 水平检测 解冻各组大鼠血清,按照试剂盒说明书进行各项检测。

2.4 数据统计 采用 SPSS17.0 统计软件处理数据,3 组大鼠股骨中段骨密度及骨痂骨小梁数量、骨小梁厚度、骨体积分数、骨小梁分离度和血清中 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1\beta$ 、 $\text{TGF}-\beta 1$ 水平的组间总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结 果

3.1 一般结果 实验过程中各组大鼠进食、饮水正常,状况良好,无动物死亡。

3.2 骨密度测定结果 骨质疏松造模术后 6 周,3 组大鼠股骨中段骨密度比较,组间差异有统计学意义;骨质疏松性骨折组、骨质疏松性骨折强骨饮治疗组股骨中段骨密度均低于假手术/骨折组 ($P=0.000$, $P=0.000$);骨质疏松性骨折组股骨中段骨密度与骨质疏松性骨折强骨饮治疗组比较,差异无统计学意义 ($P=0.418$);证实骨质疏松造模成功。灌胃 6 周后,3 组大鼠股骨中段骨密度比较,组间差异有统计学意义;假手术/骨折组股骨中段骨密度高于骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000$, $P=0.000$);骨质疏松性骨折组股骨中段骨密度低于骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.003$)。见表 1。

3.3 Micro-CT 扫描结果 灌胃 6 周后,3 组大鼠股骨中段 Micro-CT 扫描示假手术/骨折组骨折处骨膜反应明显,骨痂膨大,骨皮质厚实;骨质疏松性骨折组骨皮质萎缩,骨痂体积小;骨质疏松性骨折强骨饮治疗组骨膜反应明显,骨痂体积大,骨皮质无明显萎缩 (图 1)。3 组大鼠股骨骨折处 Micro-CT 三维重建图像显示,假手术/骨折组骨折处骨痂生长明显,骨小梁多,骨小梁结构紧密;骨质疏松性骨折组骨痂少,骨小梁稀疏;骨质疏松性骨折强骨饮治疗组比骨质疏松性骨折组骨痂和骨小梁多,排列有序 (图 2)。3 组大鼠

表 1 3 组大鼠股骨中段骨密度测定结果 $\bar{x} \pm s, \text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$

组别	样本量 (只)	股骨中段骨密度	
		骨质疏松造模术后 6 周	药物灌胃 6 周后
假手术/骨折组	10	0.348 ± 0.048	0.258 ± 0.039
骨质疏松性骨折组	10	0.218 ± 0.047	0.202 ± 0.021
骨质疏松性骨折强骨饮治疗组	10	0.221 ± 0.052	0.227 ± 0.038
F 值		22.590	25.957
P 值		0.000	0.000

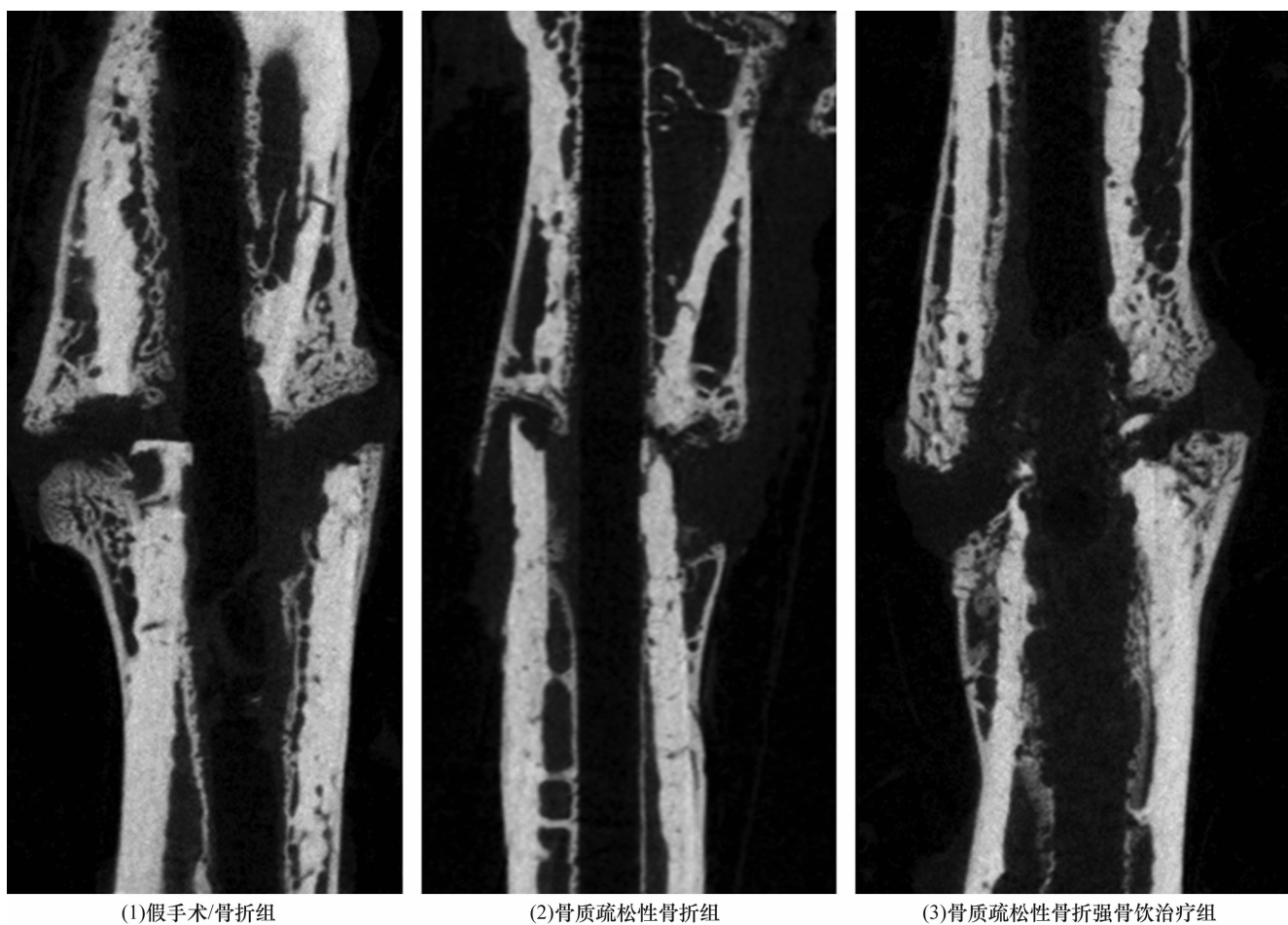


图1 药物灌胃6周后3组大鼠股骨中段 Micro-CT 片

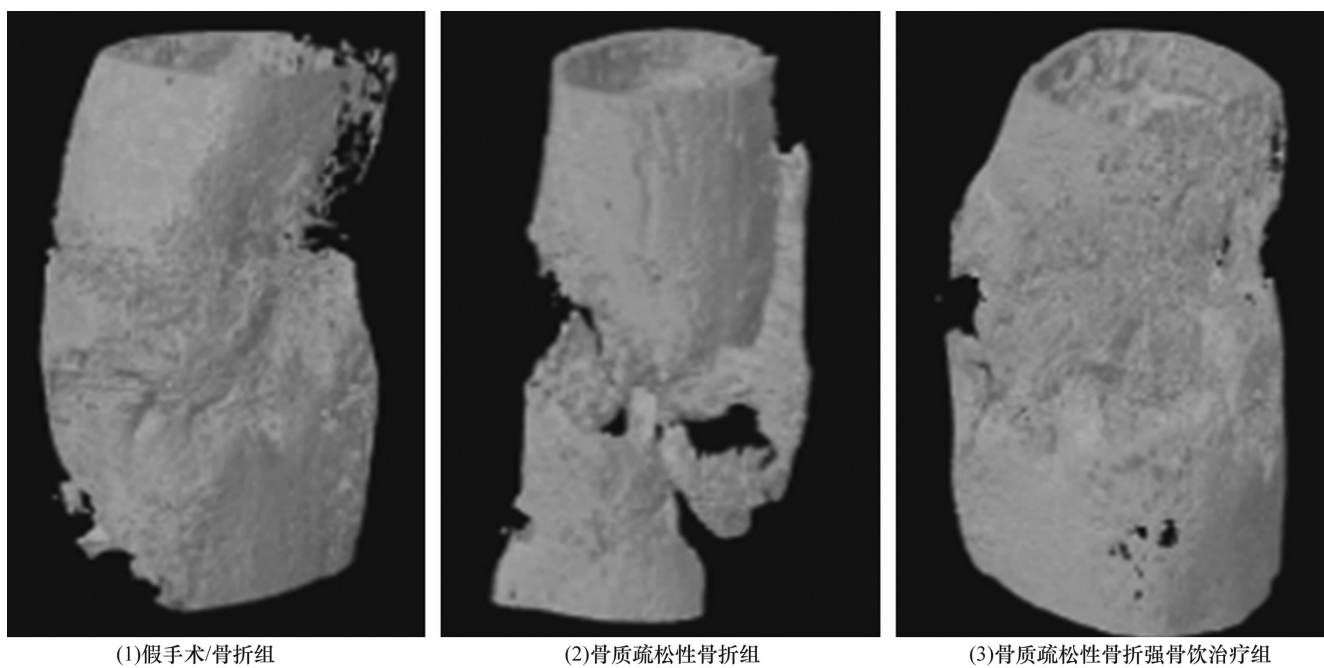


图2 药物灌胃6周后3组大鼠股骨中段 Micro-CT 三维重建图片

股骨中段骨折处骨痂的骨小梁数量、骨小梁厚度、骨小梁分离度、骨体积分数比较,组间差异均有统计学意义;假手术/骨折组骨痂骨小梁数量、骨小梁厚度及

骨体积分数均高于骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮食治疗组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.002$),骨小梁分离度低于

骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000, P=0.000$), 骨质疏松性骨折强骨饮治疗组骨小梁数量、骨小梁厚度、骨体积分数高于骨质疏松性骨折组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$), 骨小梁分离度低于骨质疏松性骨折组 ($P=0.000$)。见表 2。

3.4 血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和 $TGF-\beta1$ 水平检测结果 灌胃 6 周后, 3 组大鼠血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TGF-\beta1$ 水平比较, 组间差异均有统计学意义; 假手术/骨折组大鼠血清中 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 水平均低于骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$), $TGF-\beta1$ 水平高于骨质疏松性骨折组和骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000, P=0.000$); 骨质疏松性骨折组大鼠血清中 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 水平均高于骨质疏松性骨折强骨饮治疗组 ($P=0.000, P=0.000$), $TGF-\beta1$ 水平低于骨质疏松性骨折强骨饮治

疗组 ($P=0.032$)。见表 3。

3.5 组织学观察结果 灌胃 6 周后, 3 组大鼠股骨中段骨折处骨痂组织光学显微镜下观察可见, 假手术/骨折组骨小梁较粗、分布较规则、排列有序、间距小, 连接成拱桥状, 骨性骨痂取代软骨性骨痂, 小梁状骨经改建趋于成熟; 与假手术/骨折组相比, 骨质疏松性骨折组骨小梁较细, 髓腔间隙较大, 分布不规则、间距较宽, 呈疏松化表现, 软骨痂更明显, 成熟小梁状骨较少, 存在大量未钙化软骨细胞; 与骨质疏松性骨折组相比, 骨质疏松性骨折强骨饮治疗组骨小梁较粗、数量较多、间距较小, 软骨细胞骨化占比较高, 更接近于假手术/骨折组。见图 3。

4 讨论

骨代谢包括骨吸收和骨形成, 是一个动态平衡过程。当骨代谢紊乱, 骨吸收作用超过成骨作用时, 就会产生骨结构疏松和骨量减少。疏松的骨结构和减少的骨量使骨脆性增加、骨强度降低可增加骨折固定

表 2 药物灌胃 6 周后 3 组大鼠股骨中段骨痂 Micro-CT 扫描数据分析结果 $\bar{x} \pm s$

组别	样本量 (只)	骨小梁数量 (个 $\cdot mm^{-1}$)	骨小梁厚 (mm)	骨小梁分离度 (mm)	骨体积分数
假手术/骨折组	10	0.309 ± 0.052	0.375 ± 0.055	3.489 ± 0.367	$(55.52 \pm 7.24)\%$
骨质疏松性骨折组	10	0.152 ± 0.041	0.206 ± 0.036	4.427 ± 0.191	$(38.31 \pm 5.12)\%$
骨质疏松性骨折强骨饮治疗组	10	0.233 ± 0.047	0.296 ± 0.043	3.768 ± 0.269	$(50.96 \pm 6.15)\%$
F 值		11.583	18.590	28.559	12.445
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 药物灌胃 6 周后 3 组大鼠血清细胞因子水平检测结果 $\bar{x} \pm s, ng \cdot L^{-1}$

组别	样本量 (只)	肿瘤坏死因子 $-\alpha$	白介素 -1β	转化生长因子 $-\beta1$
假手术/骨折组	10	94.52 ± 10.13	112.05 ± 24.59	35.49 ± 4.02
骨质疏松性骨折组	10	144.02 ± 17.71	176.83 ± 35.92	29.03 ± 3.19
骨质疏松性骨折强骨饮治疗组	10	112.82 ± 12.16	129.93 ± 29.04	32.82 ± 3.54
F 值		14.494	9.494	18.957
P 值		0.000	0.000	0.000

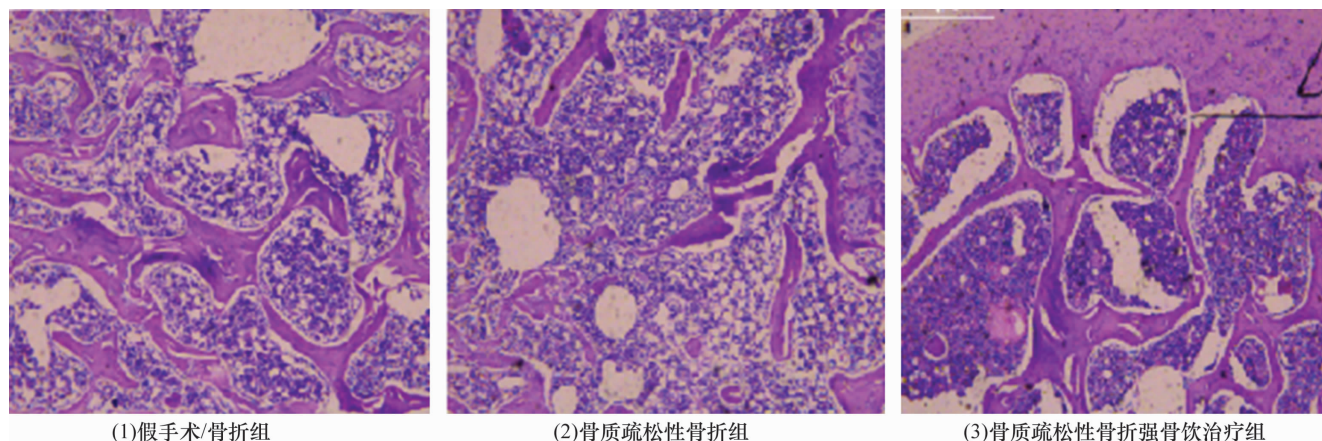


图 3 药物灌胃 6 周后 3 组大鼠股骨中段骨痂组织 HE 染色图片 ($\times 100$)

的失败率,且对骨折自身的愈合也会产生不利影响。骨质疏松性骨折发生骨折愈合延迟,多表现为骨痂矿化减少、骨骨密度降低、机械强度下降、骨小梁变细和骨小梁的结构性变差^[7]。骨折愈合也是骨吸收和骨形成相互作用的过程。长期对骨吸收的强烈抑制可能会打破骨折愈合的平衡。理想的促进骨质疏松性骨折愈合的药物应该是具有抑制骨吸收和促进骨形成双向调节功能。双磷酸盐类药物是临床上常用的一类抗骨质疏松药物,具有明显的抑制骨吸收作用。对于骨质疏松性骨折,双磷酸盐类药物虽不延迟骨痂形成但可抑制原始骨痂向板层骨痂重塑的过程^[8]。且对于长期使用双磷酸盐类药物的患者,骨折愈合可能会发生延迟^[9]。甲状旁腺激素类药物作为一种促骨形成药物,用于骨质疏松性骨折的治疗,有缩短骨折愈合时间、减轻疼痛和改善功能的作用^[10]。但甲状旁腺激素类药物价格昂贵,临床应用较少,其疗效和安全性还有待验证。

中医学认为肾主骨、藏精,骨质疏松症的主要病机为肾精亏虚、肾阳不足、骨失所养、髓冷骨弱^[11]。强骨饮功效以益气补肾、活血温经、通络止痛为主;组方中黄芪与鹿角霜补肾助阳、益气补肾治其本,川芎、肉桂、忍冬藤、露蜂房、鸡血藤等温经通络活血止痛治其标,川断、骨碎补、杜仲等又助益补肾壮骨;诸药相和,标本兼治。本实验结果也表明强骨饮能增加骨质疏松性骨折大鼠股骨骨密度和骨痂中骨小梁数量、骨小梁厚度及骨体积分数,降低骨小梁分离度,说明强骨饮能有效促进骨质疏松性骨折的愈合。

骨折愈合是一个复杂的过程,可分为血肿形成和炎症反应期、软骨痂形成期、骨性骨痂形成期及重塑期。骨折愈合过程中可释放各种细胞因子如 TGF- β 家族、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17F、IL-23 等,这些细胞因子可调节间充质干细胞、成骨细胞等细胞的活性,在骨折愈合过程中发挥重要作用^[12]。TGF- β 1 作为 TGF- β 家族的一员,可促进间充质干细胞的增殖、分化和细胞外基质的合成,促进软骨和骨痂形成,在骨重塑和骨折愈合中发挥重要作用^[13]。骨折延迟愈合患者血清中 TGF- β 1 的水平可明显低于骨折正常愈合的患者^[14]。TNF- α 、IL-1 可通过增强破骨细胞的分化和活性,促进骨吸收,抑制成骨细胞增殖、分化及胶原和骨的形成。IL-6、IL-1 和 TNF- α 的水平增高反映的是机体老化过程中亚临床的系统性

慢性炎症反应状态,这种状态可称之为炎症老化,与绝经后骨丢失密切相关^[15]。TNF- α 对于骨折愈合的影响比较复杂。抑制 TNF- α 水平可逆转骨吸收的进程^[16]。但骨折后 1~3 d, TNF- α 的分泌增加可促进间充质干细胞的募集增生和向成软骨、成骨细胞表型分化,启动骨折愈合的成骨过程,甚至在软骨痂向硬骨痂转化和骨塑形过程中 TNF- α 都是必不可少的。但在骨质疏松性骨折、感染性骨折及老年骨折患者和糖尿病骨折患者的骨折愈合过程中, TNF- α 持续性的高表达会抑制软骨细胞增殖,影响软骨痂的形成,也会抑制成骨细胞的生成、促进破骨细胞的生成,打破骨形成和骨吸收的平衡,损害软骨痂矿化过程^[16]。IL-1 β 也具有较强的刺激骨吸收的作用,能激活一氧化氮诱导软骨细胞凋亡,协同 IL-17 降解软骨细胞基质,抑制成骨细胞活性,破坏骨微结构^[17]。本实验结果表明,强骨饮可提高骨质疏松性骨折大鼠骨折愈合过程中血清 TGF- β 1 的水平,抑制 TNF- α 、IL-1 β 的水平。

本实验结果表明,强骨饮可促进骨质疏松性骨折的愈合,其机制可能与提高血清中 TGF- β 1 水平、降低 TNF- α 、IL-1 β 水平,从而影响骨代谢、增加骨密度、改善骨微结构有关。

5 参考文献

- [1] 吕慧,李秀芳,李玛琳. 中药促进骨质疏松性骨折愈合的作用及机制研究进展[J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(3): 66-70.
- [2] 吴鹏,王博,孔令成,等. 强骨饮颗粒联合阿仑膦酸钠维 D3 片口服在原发性骨质疏松性髋部骨折术后抗骨质疏松治疗中的应用[J]. 中医正骨, 2016, 28(5): 16-19.
- [3] 徐伟锋,叶健,吴连国. 强骨饮对骨质疏松性股骨颈骨折患者全髋关节置换术后血清骨代谢生化指标和骨密度的影响[J]. 中医正骨, 2015, 27(2): 12-16.
- [4] 孔令成,施振宇,姚建亮,等. 强骨饮治疗骨质疏松性椎体压缩性骨折的临床研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(9): 1159-1163.
- [5] 潘定权,李静伟,何康宏,等. 强骨饮治疗原发 I 型骨质疏松性髋部骨折的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(9): 11-13.
- [6] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [7] FÉRON JM, MAUPRIVEZ R. Fracture repair: general aspects and influence of osteoporosis and anti-osteoporosis

- treatment[J]. Injury, 2016, 47(Suppl 1): 10-14.
- [8] KATES SL, ACKERT - BICKNELL CL. How do bisphosphonates affect fracture healing? [J]. Injury, 2016, 47(Suppl 1): 65-68.
- [9] NG AJ, YUE B, JOSEPH S, et al. Delayed/non-union of upper limb fractures with bisphosphonates: systematic review and recommendations[J]. ANZ J Surg, 2014, 84(4): 218-224.
- [10] PEICHL P, HOLZER LA, MAIER R, et al. Parathyroid hormone 1-84 accelerates fracture-healing in pubic bones of elderly osteoporotic women [J]. J Bone Joint Surg Am, 2011, 93(17): 1583-1587.
- [11] 葛继荣, 郑洪新, 万小明, 等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2015) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(9): 1023-1028.
- [12] GHIASI MS, CHEN J, VAZIRI A, et al. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods[J]. Bone Rep, 2017, 6: 87-100.
- [13] SARAH RUDI K, THOMAS A, MOUSAVI M, et al. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) levels in human fracture healing[J]. Injury, 2011, 42(8): 833-837.
- [14] POUNTOS I, GEORGOULI T, PNEUMATICOS S, et al. Fracture non-union: Can biomarkers predict outcome? [J]. Injury, 2013, 44(12): 1725-1732.
- [15] LOI F, CORDOVA LA, PAJARINEN J, et al. Inflammation, fracture and bone repair[J]. Bone, 2016, 86: 119-130.
- [16] KARNES JM, DAFFNER SD, WATKINS CM. Multiple roles of tumor necrosis factor-alpha in fracture healing [J]. Bone, 2015, 78: 87-93.
- [17] 黄明, 胡熙耀, 彭敏, 等. 青藤碱对家兔骨质疏松压缩性骨折模型骨生长分化因子 2 和血清白介素-1β 及白介素-17 的影响[J]. 实用药物与临床, 2017, 20(11): 1253-1256.

(收稿日期: 2018-05-30 本文编辑: 杨雅)

· 通 知 ·

全国水针刀微创技术及中医筋骨三针法学习班通知

水针刀微创技术、中医筋骨三针疗法是由北京世针联中医微创针法研究院院长吴汉卿教授经过 30 余年潜心研究, 在传统九针、刀针、水针疗法、针挑疗法、运动针法及太极针法基础上, 根据中医经筋学说及软组织解剖学所总结的融中西医针法于一体的中医微创技术。该技术已被纳入国家中医药管理局“中医医疗适宜技术”, 写入全国高等中医药院校创新教材, 确定为中医药 I 类继续教育推广项目。该技术问世以来, 全国性培训班已成功举办 200 余期, 培训学员数万名, 学员来自国内包括台湾、香港等地区及国外, 如: 马来西亚、新加坡、韩国、俄罗斯、澳大利亚、美国等, 其“短、平、快”的治疗特点受到了国内外专家及广大学员的好评。为满足广大医师要求, 继续举办学习班, 培训内容如下。

水针刀微创技术、三氧融盘技术 ①水针刀微创技术结合三氧融盘技术治疗软组织损伤病, 如: 颈椎病、肩关节周围炎、肘关节病变、腕管综合征、腰椎间盘突出症、膝关节病变、坐骨神经痛、臀上皮神经痛、风湿类风湿关节炎、腱鞘炎、跟痛症等骨伤疼痛疾病。②水针刀尸体解剖微创入路内容: 该班在医学院解剖馆进行, 结合新鲜尸体全面讲解人体全身三维解剖以及三针法定位、进针方向、针下层次、危险区的划分、常用针法及操作技巧等内容, 学员能自己动手练习。

中医筋骨三针疗法 中医筋骨三针疗法分为微型筋骨三针疗法与巨型筋骨三针疗法 2 种, 微型筋骨三针疗法的优点: 该针具针体细如银针, 创伤微、痛苦小, 融合了中医针法和西医刀法, 定位独特, 针法灵活多变, 既有微创针刀的松解分离功能, 又有针灸的补泻候气、疏通经络功能; 该疗法主治: 中风偏瘫、失语症、三叉神经痛、面瘫、肋间神经痛、坐骨神经痛、皮神经卡压症、四肢末端病等。巨型筋骨三针疗法的优点: 该针法有钝性松解、安全可靠、通透力强、松解力度大等特点。其主要针法有: 筋膜扇形撬拨法、筋骨减压术、椎间孔针旋转术等 10 大针法; 该疗法主治: 颈腰椎术后综合征、腰椎管狭窄症、强直性脊柱炎驼背、颈 1 横突综合征、颈 7 棘突综合征等临床疑难病。同时培训水针刀松解埋线技术内容: 脊背九大诊疗区, 应用水针刀松解、注射、磁线留置并配合整脊手法快速治愈颈性心脏病、颈性咽炎、面瘫、癫痫、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等; 并教授三氧自血疗法治疗心脑血管疾病, 乙肝、丙肝、脂肪肝等肝病, 妇科疾病及皮肤病性病等。

培训时间: 每月 1 日正式上课, 学期 12 天, 请提前 1 天报到。

培训方式及待遇: 学习班由吴汉卿教授主讲, 采用小班授课, 理论结合临床实习和尸体解剖操作, 学期结束后颁发培训证书及 I 类继续教育学分证书。

培训地址: ①北京班地址: 北京市东城区广渠门内夕照寺街东玖大厦 B 座 703 室, 北京世针联中医微创针法研究院。②河南南阳班地址: 河南省南阳市仲景路与天山路口, 水针刀研究院。

联系电话: 400 8377 618 **联系人:** 黄建老师 13721820657, 0377-63282507

网址: www.shuizhendao.com (中华水针刀微创网)