基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1463-04

骨活素胶囊对骨质疏松性骨折愈合影响的实验研究

林春阳[1],肖瑞法[1],徐希彦[1],陈大蓉[2],杨 敏[2],邓忠良[1]
(1.重庆医科大学附属第二医院骨科,重庆 400010;2.重庆市中医院骨科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨骨活素胶囊对骨质疏松性骨折愈合的影响。方法:8~12 月龄雌性新西兰大耳兔卵巢去势法 10 周得到Ⅰ型骨质疏松模型,再行桡骨骨折造模,从而建立骨质疏松性骨折模型。模型建立后随机分为 2 组,实验组和对照组分别给予含 1 g/(kg·d)骨活素胶囊的生理盐水和淀粉糊 5 ml 灌胃,在 2、4、8 周随机选取动物行影像学、血液生化指标、HE 染色、增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)免疫组化和生物力学检测。结果:骨活素干预的实验组动物较对照组骨痂、骨小梁形成增多增快,骨痂力学强度增强。结论:骨活素胶囊能使骨质疏松性骨折的愈合时间缩短,强度增强。

【关键词】骨质疏松性骨折;骨活素胶囊;骨折愈合;兔
【中国图书分类法分类号】R274.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-02-08

The effects of osteoactivin capsules on osteoporotic fracture healing

LIN Chun-yang, et al
(*Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of osteoactivin capsules on osteoporotic fracture healing. *Methods*: 8~12 month-old female New Zealand's rabbits were ovariectomized for 10 weeks to establish type Ⅰ osteoporosis model, then 3mm bone segments of radius were resected to establish osteoporotic fracture model. The animals were divided into two groups randomly, experimental group and control group were given 1 g/(kg·d) osteoactivin capsules and starch paste through intragastric administration separately. Shadow graph, blood biochemical parameters, HE staining, PCNA immunohistochemistry and biomechanical parameters were tested at 2, 4, 8 weeks. *Results*: The callus and bone trabeculae of the experimental group increased more rapidly, and its callus is stronger. *Conclusion*: osteoactivin capsules can reduce the time of osteoporotic fracture healing and increase the intensity of bone callus.

【Key words】Osteoporotic fracture; Osteoactivin capsules; Bone fracture healing; Rabbit

骨质疏松症是一种全身性疾病,主要表现为骨量减少及骨组织微结构退变,骨生物力学性能下降、脆性增加,容易发生骨折。骨质疏松症最严重的并发症是骨质疏松性骨折(Osteoporotic fracture,OPF),好发部位常为桡骨远端、髋部、椎体、肋骨等。OPF 较创伤性骨折难愈合,治疗困难,严重影响患者的生存质量,同时由于患病人群数量巨大,给社会和家庭带来极大的压力。传统的治疗骨质疏松症的药物包括钙剂、维生素 D 类、雌激素、双磷酸盐类、降钙素等,其在提高骨密度,降低骨折发生率方面有一定疗效,但长期应用副作用也会逐渐显露。尤其是在绝经后妇女应用广泛的雌激素类药物,长期应用可能会导致子宫内膜癌及乳腺肿瘤的发病率升高[1]。随着人口老龄化,OPF 发病率呈逐年升高的趋势,找到一种既能够有效治疗 OPF,副作用又小的药物成为了研究热点。

本课题研究的骨活素胶囊在护骨胶囊[2]基础上改良而成,长期用于临床,临床上主要用于骨质疏松、骨钙丢失所至腰膝酸软、骨痛等方面的治疗,疗效较好,没有发现明显的毒副作用,但对 OPF 的愈合有无促进作用缺乏足够的资料。本课题拟用西医的科研实验方法,探讨骨活素胶囊对 OPF 愈合的影响。

作者介绍:林春阳(1984-),男,博士,
研究方向:组织工程骨。
通讯作者:邓忠良,男,教授,E-mail:deng7586@gmail.com。
基金项目:重庆市卫生局中医药科技项目(编号:2006-B-30)。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 8~12 月龄雌性新西兰大白兔 40 只,重量 2.5~3.0 kg,由重庆医科大学动物中心提供。

1.1.2 主要仪器和药品

QDR-4500W 双能 X 线骨密度仪(Hologic 美国);X 线摄片机(BFG-400X 线机,南京医疗设备制造厂);病理切片机;全自动生化分析仪;电动牙科锯(Saeshin -204);戊巴比妥钠(上海化学试剂总厂);利多卡因(上海禾丰制药有限公司);青霉素钠(华北制药厂);骨活素浸润膏(由重庆市中医院提供)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验

1.2.1.1 骨质疏松动物模型的建立 去势手术切除兔双侧

卵巢(Ovariectomy, OVX)造成Ⅰ型骨折疏松动物模型[3]。术前适应性喂养 2 周,术前 0.5 h 肌注青霉素钠 40 万 U,3%戊巴比妥钠(20~25 mg/kg)耳缘静脉麻醉,仰卧位,下腹正中切口长 5 cm 左右,分层进入腹腔,沿 V 字形输卵管寻找可见后腹膜肾脏下方粉红色、桑椹状的卵巢。结扎卵巢相连动脉,切除双侧卵巢,分层关闭切口。术后 3 d 青霉素钠 40 万 U 肌注。

1.2.1.2 骨质疏松性骨折动物模型的建立 骨质疏松模型成功后,手术造成兔双侧桡骨中段 3 mm 骨缺损建立 OPF 模型[4]。3%戊巴比妥钠(20~25 mg/kg)腹腔麻醉,局部 2%利多卡因 0.5~1 ml 肌肉浸润麻醉,俯卧位前臂后外侧纵行切口 2 cm,钝性分离肱桡肌和趾伸肌暴露桡骨中段,剥除中段骨膜 8 mm,牙科锯横行锯断桡骨,形成宽 3 mm 缺损性骨折,分层缝合,术后 3 d 青霉素钠 40 万 U 肌注。

1.2.1.3 动物分组 将 40 只兔子随机分为实验组和对照组各 20 只,3 g 骨活素浸润膏蒸馏水稀释至 5 ml,实验组给予骨活素浸润膏 1 g/(kg·d)灌胃,对照组给予淀粉糊 5 ml/d 灌胃。

1.2.2 动物取材及处理 各组到期后空气注射处死动物,截取骨折中心上下各 8 mm 骨段,4%多聚甲醛固定 24 h 后转入 70%乙醇固定 2 h,20%EDTA 中脱钙(4℃),脱钙完全(6 周)后转入乙醇中逐级脱水各 24 h,二甲苯透明 12 h,渗透液浸透、石蜡包埋、切片(6 μm 厚),将切片粘贴于 10%多聚赖氨酸包被的载玻片上,烘干后备用。

1.2.3 检测项目及方法

1.2.3.1 骨密度(Bone mineral density, BMD)和血生化测定 兔去势手术术前和术后 10 周,仰卧位四肢固定下,在骨密度仪上进行 BMD 测定。根据术前 BMD 计算平均值($\bar{x}$)及标准差(s)。术后 10 周时每个兔所测 BMD 值(P)与术前 BMD,计算值比较。参照公式计算术后 10 周时每只兔子的 T 值。测定 BMD 的同时,从兔耳缘静脉抽取凝固血 5 ml,离心分离血清,在自动生化分析仪上检查 Ca^{2+}、Mg^{2+}、P。

1.2.3.2 影像学 X 线检查 实验组和对照组分别于术后 2、4、8 周进行摄片检查,为消除尺桡骨重叠,均采用兔侧卧位。所有 X 线片均由同一技师采用一台 X 线摄片机完成,拍摄条件保持一致,即球管距离片盒 90 cm,45 kV、50 mA、0.4 ms。

读片由同一位高年资放射科医师完成,对骨痂及骨折线情况进行半定量分析和评价。

1.2.3.3 HE 染色和 PCNA 免疫组化染色 2、4、8 周时,HE 染色了解骨折部位细胞,细胞外基质以及成骨情况,PCNA 染色了解骨折愈合过程中成骨细胞的增殖活状态,均由重庆医科大学病理实验室完成。

1.2.3.4 生物力学测定 12 周时,解剖切取双侧桡骨,以骨折部位为中心,切取 4 cm 桡骨标本,用甲基丙烯酸甲酯制作矫正测试夹具,每端固定桡骨 1 cm。室温放置 12 h,生理盐水纱布包裹标本,放入塑料袋中,置于 -20℃冰箱中冷藏备用。常温下解冻 24 h 的标本放于 Instron-1011 试验机上进行 3 点弯曲试验。试验跨距为 30 mm,压头对准骨折处,加载速度 5 mm/min,计算机数据采集系统自动记录载荷—位移数据存盘,采样频率 10 Hz。兔桡骨以矩形截面横向弯曲梁模型处理,得出载荷—位移曲线,并自动计算出各个参数。

1.2.4 统计学分析 对定量、半定量数据采用 SPSS10.0 统计分析软件处理,比较采用两样本均数的 t 检验分析,设定 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 骨密度测定

表 1 显示:参照 WHO 骨质疏松诊断标准中 T<-2.5[5]。OVX 兔术后 10 周 BMD 满足骨质疏松诊断标准。

2.2 血液生化指标

表 2 显示:术后 10 周时血 Ca^{2+}、Mg^{2+}、P 与术前比较无明显变化($P>0.05$)。代表破骨细胞活性的抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)活性在 OVX 术后 10 周显著高于 OVX 术前($P<0.05$),表示成骨细胞活性的碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)在 OVX 术后 10 周时明显低于术前($P<0.05$)。

2.3 影响学检查

2.3.1 X 片结果 图 1 显示:2 周时,实验组骨折部位出现较多的外骨痂,骨折线开始模糊;对照侧无明显外骨痂,骨折线清晰,骨膜反应轻。4 周时,骨活素治疗组骨折部位骨痂增多,骨折线模糊,有内骨痂生长,对照侧显示少许外骨痂,骨折线开始模糊。骨折后 8 周,实验组外骨痂大部分吸收,骨折处皮质管密度接近正常皮质骨,骨髓腔再通,接近于正常骨。对照侧骨折线消失,外骨痂减少,但是骨皮质较薄,髓腔仍未完全再通。

2.3.2 骨折 X 片评分 表 3 显示:X 线片骨痂评分结果显示实验侧(骨活素胶囊治疗组)与对照侧比较有显著性差异($P<0.05$)。表示骨活素治疗组较对照侧骨痂出现早、形成快,量多,骨折线模糊和消失所需时间短,髓腔再通时间提前。

2.4 HE 染色

图 2 显示:骨折 2 周:骨活素实验组骨折断端之间有大量的纤维组织连接,骨外膜出现骨样组织;对照组断端之间仍然可见较多的肉芽组织,未完全被纤维组织取代,骨外膜可见少量的软骨骨痂。骨折 4 周,实验组骨折断端之间可见大量的纤维骨痂,并有向板层骨过度的趋势,外骨膜外有骨性骨痂包裹,有少量软骨;对照组骨折端为纤维组织及大量软骨组织,有少量的新生骨小梁。骨折 8 周:实验侧骨折端由骨性骨痂、板层骨连接为主,骨塑形明显,髓腔再通,可见破骨细胞在髓腔侧聚集;对照侧骨折端以编织骨为主,有向板层骨过度趋势,髓腔未再通。

表 1 随机抽取 6 只兔子进行术前和术后 10 周的 BMD 测定数据

	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s
术前	0.231 4	0.253 5	0.264 2	0.243 7	0.259 9	0.228 4	0.246 9	0.014 9
术后 10 周	0.199 8	0.185 3	0.186 3	0.201 0	0.192 7	0.187 5	0.191 2	0.007 0
t	-3.16	-4.13	-4.06	-3.08	-3.63	-3.98	-3.67	

2.5 PCNA 免疫组化

PCNA 染色只存在于正常增殖细胞及肿瘤细胞内而得名，PCNA 在细胞增殖的启动上起重要作用，是反映细胞增殖状态的良好指标，PCNA 染色定位于细胞核，染色为棕褐色。图 3 显示：在骨折愈合过程中，PCNA 染色定位于成骨细胞核成纤维细胞之中，而且实验组和对照组相比，实验组 PCNA 染色的细胞阳性率比对照组的更多，提示实验组的成骨细胞核成纤维细胞增殖更加活跃。

2.6 生物力学测定

表 4 显示：骨活素实验组与对照组相比，峰值应力、峰值载荷、峰值吸收能量值、弹性模量均升高，表示骨活素胶囊能够使骨质疏松性骨折后形成的新生骨硬度和强度得到增强。

3 讨 论

骨质疏松性骨折动物模型过去多采用小鼠或者大鼠股骨中段骨折模型，需要髓内针内固定，制动以及外固定等，有一定的固定失败率。而且髓内针占位可能会影响骨折的自然愈合过程，骨折部位间隙小，不利于后面的影像学以及各项指标的观察。本实验采用去势新西兰大耳白兔双侧桡骨中段 3 mm 骨缺损作为骨质疏松骨折模型的优势在于桡骨有尺骨支持，桡骨缺损性骨折后骨折断端因为骨间膜的作用不致移

表 2 术前和术后 10 周兔血液生化数据统计

	Ca^{2+}(mmol/L)	Mg^{2+}(mmol/L)	P(mmol/L)	ALP(IU/L)	TRAP(IU/L)
术前	3.55 ± 0.51	1.23 ± 0.17	1.43 ± 0.14	70.50 ± 12.94	3.92 ± 0.78
术后 10 周	3.64 ± 0.55	1.19 ± 0.15	1.39 ± 0.11	52.14 ± 9.32	5.31 ± 0.96
t	0.26	0.39	0.50	2.57	2.51
P	0.80	0.70	0.63	0.032	0.036

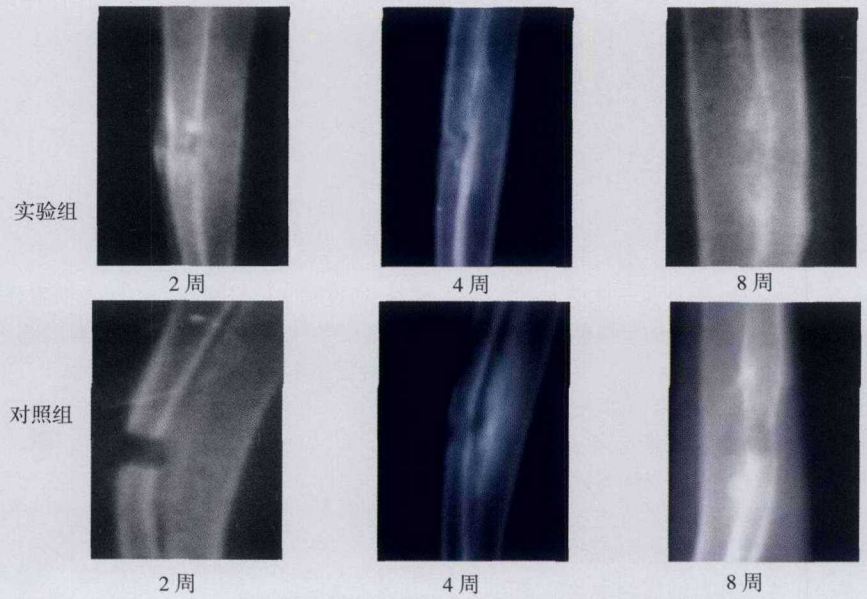


图 1 2、4、8 周时实验组和对照组的 X 片检查图片

表 3 2、4、8 周骨痂 X 片评分数据统计

时间(周)	2	4	8
n	5	5	5
骨活素实验组	5.2 ± 0.84	9.4 ± 1.52	17.8 ± 1.3
对照组	2.6 ± 1.14	5.8 ± 0.84	12.4 ± 1.82
t	4.11	4.64	5.40
P	0.003 4	0.001 7	0.006

表 4 12 周时实验组和对照组的生物力学测定数据统计

指标	峰值应力(MPa)	峰值载荷(MPa)	峰值吸收能量值(J)	弹性模量(MPa)
例数	5	5	5	5
骨活素	50.6 ± 5.68	71.5 ± 6.24	0.041 2 ± 0.005 9	1 360.0 ± 154.2
对照组	35.2 ± 4.26	51.3 ± 6.89	0.027 1 ± 0.003 5	769.0 ± 98.4
t	4.85	4.86	4.60	7.22
P	0.001 3	0.001 3	0.001 8	0.000 1

注：实验组与对照组各个参数相比，$P<0.05$

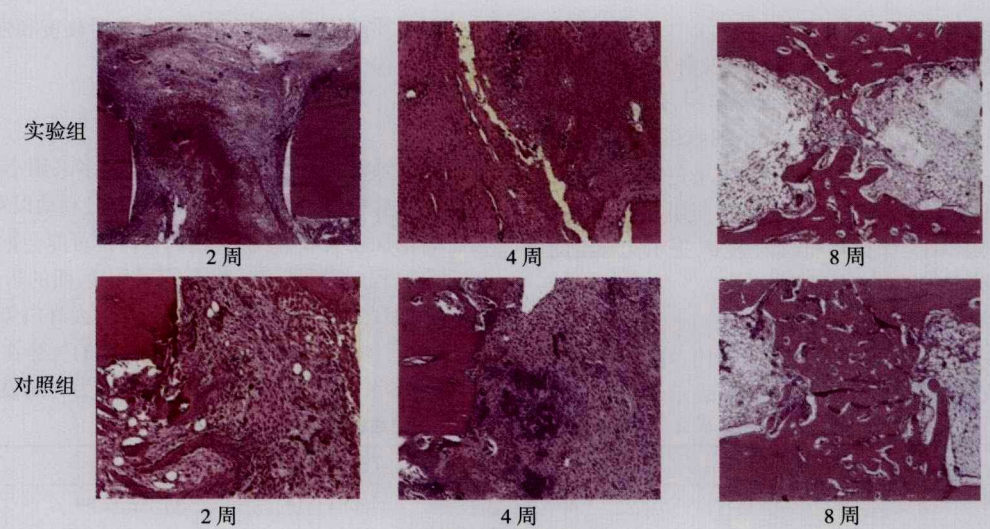


图 2 HE 染色图片

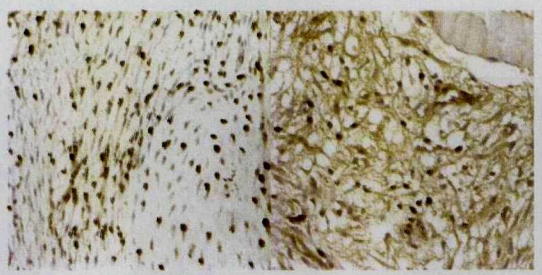


图 3 PCNA 染色图片

位，不需内外固定，不需限制动物运动。另外兔子体型大小合适，便于治疗和观察以及各种检测的进行，而且双侧造模可自身比较，减少干扰因素，增强了可比性。

骨活素胶囊系在护骨胶囊的基础上改良而得，是纯中药提取的促进成骨的活性成分提取物，已经长期运用于临床治疗当中，取得了明显的疗效，而且未发现明显的毒副作用[6]。本实验进一步证实了骨活素胶囊能够有效地促进了骨质疏松性骨折的愈合，缩短骨折愈合的时间，增强骨痂的强度，为骨活素胶囊在由于骨质疏松症并发骨折的病例中的临床运用提供了科研证据。

骨活素胶囊的主要成分之一淫羊藿的有效药理成分为淫羊藿苷，淫羊藿苷可通过促进成骨细胞分泌骨保护素，增强细胞核因子 κB 受体活化因子配基（Receptor or activator of NF-κB ligand，RankL）的表达[7]，而且能够通过诱导碱性磷酸酶和钙化结节形成促进大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化，可视为一种良好的骨诱导活性因子[8]。骨活素胶囊的另一组成成分为补骨脂，补骨脂具有植物雌激素样作用，可以促进成骨细胞增殖，增加 ALP 的分泌，刺激骨形成，从而发挥治疗骨质疏松的作用，本研究也发现骨活素胶囊实验组成骨细胞增殖状态更加活跃。另外有研究发现在成骨细胞的细胞膜上发现了补骨脂素的作用靶点[10]。

骨活素胶囊通过对含有成骨活性成分的纯中药的合理提取和搭配，其治疗骨质疏松的疗效已经在临床上得到肯定，而且其促进成骨的机制已经在细胞水平上得到了进一步研究并取得一些成果，但是骨活素胶囊在基因水平如何影响成骨，通过哪些信号通路影响成骨细胞分化和增殖，如果更好地搭配各种有效成分以达到最好的临床治疗效果和避免副作用是有待于进一步研究的课题。

参 考 文 献

[1] 黎 蘅，金卫东.女性更年期滥用雌激素易引发癌症[J].健康文摘，2008，6：16-17.

[2] 陈大蓉，刘其芬.中药护骨合剂防治绝经后骨质疏松症的临床研究[J].中医杂志，1994，35(6)：359.

[3] 张 堃.去势加地塞米松肌肉注射法兔骨质疏松模型建立的实验研究[J].中国骨质疏松杂志，2008，14(2)：69-72.

[4] 张立强，张松林.内皮细胞生长因子及碱性成纤维细胞生长因子对兔桡骨骨折愈合影响的比较[J].中国组织工程研究和临床康复，2008，12(33)：202-205.

[5] Kanis J A，Melton L J，Christiansen C，et al. The diagnosis of osteoporosis[J]. J Bone Miner Res，1996，9(8)：1137-1141.

[6] 杨 敏，樊小明，操良玉，等.骨活素胶囊的研制及临床应用[J].中成药，2006，28(9)：10005-10006.

[7] 蒋绍艳.淫羊藿苷对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响[J].海南医学院学报，2009，15(10)：1198-2000.

[8] 张秀珍，杨黎娟.淫羊藿甙对大鼠成骨细胞护骨素、RANKL 表达的影响[J].中华内分泌代谢杂志，2006，22(3)：222-225.

[9] 安亚兰，王建舫，许水明，等.补骨脂水提液及补骨脂素对体外培养成骨细胞的影响[J].畜牧兽医学报，2009，40(2)：266-271.

[10] Hornicek F J，Malinin G I，Banovac K，et al. Morphologic and metabolic changes in rat osteoblast cultures during the dark reaction with 8-methoxypsoralen[J].Chemical Biology Interact，1994，90(2)：185-193.

（责任编辑：冉明会）