DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.019
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 11
980 2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)11-0980-04

# 不同剂量转化生长因子β对兔尺骨骨折愈合作用的研究

卢卫忠[1],唐康来[2],朱庆和[1],杨 柳[2],何 静[3],贺小兵[1],许建中[2] ([1]重庆市涪陵中心医院骨科,重庆 408000;[2]第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038;[3]重庆市药剂校,重庆 400032)

提 要:目的 探讨不同剂量的外源性转化生长因子β(Transporming growth facter-β, TGF-β)对骨折愈合的作用。方法 采用兔尺骨骨折模型,根据每天注射TGF-β剂量,36只成年兔随机分为对照组、1μg、10μg、20μg组;通过力学试验、骨形态测定和骨密度测量法对骨折愈合进行评估。结果 给予TGF-β各组的骨痂面积和最大抗弯强度比对照组均有明显增加,在TGF-β剂量1~10μg/d范围内,随TGF-β剂量增加而增大,而当剂量为20μg/d时,无明显增加。在极限应力、抗弯刚度、极限负荷时能量吸收、骨矿物含量、骨皮质厚度和哈佛氏管直径方面,TGF-β治疗各组与对照组之间无明显差别。结论 局部应用外源性TGF-β可促进骨痂形成,增加抗弯强度,并呈一定剂量依赖关系,从而促进兔骨折愈合。

关键词:转化生长因子β;最大抗弯强度;骨痂形成;剂量依赖;骨折愈合
中图法分类号:R329.2; R392.11; R683.41 文献标识码:A

## Effects of transforming growth factor-β on fracture healing

LU Wei-zhong, TANG Kang-lai, ZHU Qing-he, YANG Liu, HE Jing, HE Xiao-bing, XU Jian-zhong (Department of Orthopedics, Fuling Central Hospital, Chongqing 408000, China)

**Abstract**: **Objective** To investigate the effects of exogenous transforming growth factor-beta (TGF-β) administered at different phases on the improvement of fracture healing. **Methods** After the model of right ulnar fracture was established in rabbits, the changes of mechanical testing, callus area, cortical thickness and haversian canal diameter of fracture site were observed after local injection of TGF-β in the fracture region during the different phases of healing. **Results** Compared with those in the control group, the maximal bending strength and callus area of the fracture healing increased significantly in groups receiving TGF-β at different phases. Administration of TGF-β at different time resulted in different effects on the improvement of fracture healing. The effect was most significant in the group injected with TGF-β from three to thirteen days after fracture without affecting ultimate stress, stiffness, energy absorption at ultimate load, cortical thickness or haversian canal diameter. **Conclusion** The exogenous TGF-β has phase-dependent effects on the improvement of fracture healing at different phases after fracture, and can enhance significantly fracture healing when it is applied locally during intramembranous ossification.

**Key words**: transforming growth factor-beta (TGF-β); phase-dependent; intramembranous ossification; fracture healing

TGF-β是一个分子质量为25 000的一类多肽生长因子,该家族成员多达20余种,它们除了在个体发育、肿瘤生长中扮演着重要角色,还参与了骨折愈合的全过程。国内外大量研究表明,内源性TGF-β有明显促进骨愈合的作用[1,2],而应用外源性TGF-β治疗骨折愈合的实验研究尚处于初始阶段,关于外源性TGF-β促进骨愈合作用的量效关系也尚不清楚,本实验的目的在于进一步探讨外源性TGF-β对骨愈合的作用及量效关系。

基金项目:重庆市科委应用基础研究资助项目(2000177);重庆市科委重点科技攻关资助项目(2000-08-55);太极医学科技基金资助项目(2001-1)

作者简介:卢卫忠(1967-),男,重庆市垫江县人,副主任医师,主要从事生长因子对骨愈合作用方面的研究,发表论文15篇,电话:(023)72228367
通信作者:杨 柳,电话:(023)65317146,E-mail:jointsurgery@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2002-02-20;修回日期:2002-04-27

## 1 材料与方法

### 1.1 外源性TGF-β的获取

参照我们既往的方法[3],从人血小板中提纯鉴定。

### 1.2 动物

日本大耳白兔,雌雄各半,兔龄9月,骨成熟,体质量(3.5~4.0)kg,由第三军医大学实验动物中心提供。

### 1.3 方法

1.3.1 实验分组 36只日本大耳白兔,按TGF-β治疗剂量

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0、1.0、10、20 μg/d 随机分为 4 组, 每组 9 只, 各组的性别和体质量可比。0 μg/d 组给予 TGF-β 溶剂作空白对照。

1.3.2　动物实验模型　　参照文献[4]的方法 3%戊巴比妥钠静脉麻醉, 无菌手术显露右尺骨中段, 用线锯切骨, 造成尺骨中段 1.5 mm 缺损性骨折模型, 生理盐水冲洗创口, 不作内固定, 逐层缝合伤口, 标记骨折区。术后肌注青霉素 40×$10^4$ U/d, 共 3 d, 不加外固定, 动物分笼饲养, 常规饮食, 允许其自由活动。

1.3.3　TGF-β 用法　　用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)溶解 TGF-β, 使其浓度分别为 10、100、200 μg/ml。在 TGF-β 各治疗组右侧尺骨中段尺侧骨折区注射 TGF-β 溶液 100 μl(分别含 TGF-β 1, 10, 20 μg); 在对照组相应部位注射 PBS 液 100 μl。术后第 3 天开始, 每日注射 1 次, 共 10 次。

1.3.4　骨标本采集　　各组动物在术后 8 周摄术肢 X 线片, 观察骨折愈合情况。然后应用心内注射过量戊巴比妥钠(250 mg/kg)方法处死, 完整取下右尺骨, 清除各种软组织和桡骨, 作进一步分析。根据文献[5, 6]采用的评价实验性骨折愈合的方法, 对愈合骨的骨痂量、骨矿物含量和力学性能等进行测试。

1.3.5　骨密度测定　　根据光子吸收法检测骨矿物质含量(Bone mineral content, BMC)。其测量的标准范围为骨折近远段 8 mm 区域, 以每 4 mm 节段进行扫描, 根据 4 张扫描图平均数计算 BMC。

1.3.6　力学测试　　用于力学测试的尺骨在 4 h 内完成取材, 贮存在林格溶液中(4 ℃, pH 7.4)。愈合骨折力学特性分析采用三点弯曲试验方法。将尺骨置于三点弯曲材料测试机(岛津 AG—20K1VA 型)上, 恒定变形率为 5 mm/min, 跨距为 4 cm, 测定最大抗弯强度(极限负荷)、极限应力、极限刚度和极限负荷时的能量吸收。

1.3.7　骨形态测定法　　参照文献[5]的方法, 在骨折愈合处切取 100 μm 厚度的横断面切片。用计算机辅助的光镜进行切片形态学评价。根据计算机扫描法所检查的骨皮质上的骨痂组织来测量骨痂面积。用与显微镜连接的数字转换器, 随机选择每张切片的 10 个区域, 测量出骨皮质厚度和哈佛氏管直径。

### 1.4　统计学处理

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用方差分析, TGF-β 各治疗组之间比较用 LSD 法检验, 与对照组之间比较用 Dunnett 检验。

## 2　结果

X 线片观察结果显示, 术后 8 周各 TGF-β 治疗组骨折均已愈合, 其骨愈合情况明显好于对照组, 以 TGF-β 10 μg/d 组骨愈合情况最佳, 见图 1、2。

骨密度测定显示 TGF-β 各治疗组间以及与对照组之间的 BMC 均无明显差别, 对照组、1、10、20 μg/d 组的 BMC 分别是(0.513±0.021) g/cm、(0.508±0.024) g/cm、(0.556±0.027) g/cm、(0.545±0.025) g/cm ($P>0.05$)。

力学测试验结果显示, TGF-β 各治疗组的最大抗弯强度(极限负荷)明显高于对照组($P<0.01$), 在 1~10 μg/d 内随 TGF-β 治疗剂量增加而增大($P<0.01$), 在 10 μg/d 时最大, 以后随剂量增加而增大已不明显(20 μg/d 组与 10 μg/d 组比较, $P>0.05$)。在极限应力、极限刚度、极限负荷时能量吸收方面, TGF-β 各治疗组间及其与对照组之间无明显差异($P>0.05$), 见表 1。



图 1　兔尺骨骨折当天 X 线片(TGF-β 10 μg/d 组)

**Fig 1　X-ray image on the day of ulnar fracture in the rabbit (TGF-β 10 μg/d group)**

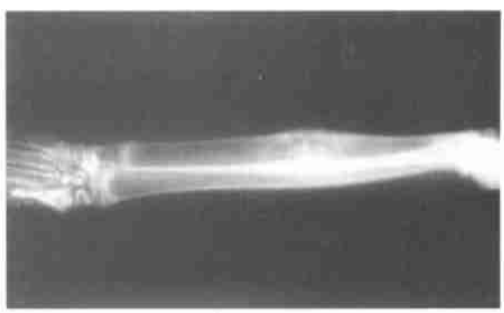


图 2　兔尺骨骨折后 8 周 X 线片显示骨折愈合(TGF-β 10 μg/d 组)

**Fig 2　Fracture healing by X-ray 8 weeks after ulnar fracture in the rabbit (TGF-β 10 μg/d group)**

表 1　骨折区局部注射 TGF-β 对兔右尺骨骨折愈合力学特性的影响($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

**Tab 1　Effects of TGF-β on the mechanical properties of healing right ulnar fracture in the rabbits at different phases ($n=9$, $\bar{x}\pm s$)**

| Group | Maximal bending strength(kg) | Ultimate stress (kg/mm$^2$) | Ultimate stiffness (kg/mm) | Energy absorption at ultimate load (kg×mm) |
|---|---|---|---|---|
| Control | 8.5±1.5 | 4.2±0.82 | 33.0±8.0 | 2.90±0.55 |
| 1 μg/d | 10.8±1.7 * | 5.3±0.89 | 40.2±11.5 | 3.87±0.89 |
| 10 μg/d | 15.5±2.5 *# | 7.8±2.5 | 58.5±20.3 | 5.21±1.55 |
| 20 μg/d | 15.8±2.4 *# | 7.6±2.2 | 59.1±18.9 | 5.81±1.48 |

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* 1 μg/d

表 2　骨折区横切面组织形态学评估($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

**Tab2　Histomorphometric evaluation of transverse section at fracture site at different phases ($n=9$, $\bar{x}\pm s$)**

| Group | Callus area(area unit) | Cortical thickness(μm) | Haversian canal diameter(μm) |
|---|---|---|---|
| Control | 40.5±4.8 | 986±29 | 28.5±2.7 |
| 1 μg/d | 62.3±9.6 * | 978±27 | 28.3±2.2 |
| 10 μg/d | 98.7±18.2 *# | 989±30 | 27.9±2.3 |
| 20 μg/d | 96.6±18.5 *# | 979±29 | 29.2±2.4 |

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* 1 μg/d

骨形态定量显示, TGF-β 各治疗组的骨痂面积明显高于对照组($P<0.01$), 并随 TGF-β 剂量增加而增多($P<0.01$), 至 10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

μg/d 时最大，以后随剂量增加无明显增多(20 μg/d 组与 10 μg/d 组比较，$P>0.05$)，在骨皮质厚度和哈佛管直径方面，TGF-β 各治疗组间及其与对照组之间无明显判别($P>0.05$)，详细情况见表 2。

## 3 讨论

近年来，关于 TGF-β 在骨折愈合中作用的研究报道较多[1,2,7]。研究表明，内源性 TGF-β 在骨折愈合不同时期发挥不同作用而呈动态变化，TGF-β 对骨折愈合具有诱导、促进和调节作用，而将外源性 TGF-β 用于骨折治疗的研究报道相对较少。我们通过局部连续注射法，将 TGF-β 注射在兔尺骨骨折处，结果表明，在骨折区注射 TGF-β 使骨痂量增多。这提示 TGF-β 对骨折愈合的促进作用可能表现在使骨折周围骨痂形成增多方面，是通过促进骨痂生长来促进骨折愈合的。这与其他的研究结果相似，Joyce 等[6] 研究发现，给胎鼠颅骨骨膜下局部注射 TGF-β 20～100 ng/d，有诱导和增强骨形成的作用，从而使颅骨厚度增加 6 倍。Joyce 等[8] 还发现，在新生鼠股骨干骨膜下注射 $TGF-\beta_1$ 120 ng/d 或 $TGF-\beta_2$ 200 ng/d，对局部新骨和软骨形成有较大的增强作用。大量实验表明，TGF-β 能够促进骨痂组织中细胞的生长[2,6]。

我们用骨皮质厚度和哈佛管直径研究骨折区皮质骨的塑型，结果表明，TGF-β 各治疗组与对照组之间的骨皮质厚度和哈佛氏管直径无明显差异。这提示外源性 TGF-β 对早期骨折愈合过程中的骨皮质塑型可能无显著作用，而内源性 TGF-β 对骨折愈合后期骨皮质塑型却具有调节作用[7]，这种作用的不一致性，可能与骨折愈合后期内源性 TGF-β 持续存在有关，具体原因尚有待进一步研究。骨矿物质含量结果显示，TGF-β 各治疗组与对照组之间无明显差异。这可能是骨皮质的矿物质含量已占骨组织的大部分[7]，骨皮质的塑型并不受外源性 TGF-β 刺激作用的影响。具体原因尚不清楚，有待进一步研究。

骨折愈合后的三点弯曲实验表明，TGF-β 可增加愈合骨的抗弯强度，但对愈合骨的极限应力、极限刚度和极限负荷时的能量吸收则无明显作用。然而，在 10 μg/d 组，与对照组的绝对值相比，极限应力增加了 85.7%，极限刚度增加了 77.3%，能量吸收增加了 79.7%。同最大抗弯强度相比，这 3 个参数的变异程度均较大，在 10 ng/d 组，最大抗弯强度的变异系数是 16.12%，而极限应力的变异系数 32.05%，极限刚度的变异系数是 34.7%，能量吸收的变异系数是 29.75%，这可能是此 3 个参数显示无统计学差异的原因所在。另外一个可能的原因是，骨痂形成的成熟度仍然不够，以至不能增强骨折处的应力和刚度。骨痂的成熟度可能与体内有多种生长因子网络调节有关，免疫组织化学和分子物学研究表明[1,7]，在骨痂组织中存在有其他生长因子，可能影响骨痂的成熟。

研究结果还表明，TGF-β 对兔尺骨骨折愈合的促进作用具有明显的剂量依赖性，随着外源性 TGF-β 剂量增加，骨痂形成量增多，愈合骨的抗弯强度增加，以 TGF-β 10 μg/d 剂量时作用最强，到 20 μg/d 时这种增强作用已不明显。这与以往的研究报道具有一定相似性。Joyce 等[6] 研究发现，给予低剂量 TGF-β1，软骨/骨形成比例随 TGF-β1 剂量增加而增加，局部注射 TGF-β1 最大剂量(100 ng/d)后，软骨/骨形成比例是 3.5，而当给予 20 ng/d 剂量(低剂量)时，比例明显下降。Beck 等[9] 在成年兔颅骨骨缺损研究中发现，当每个骨缺损使用 TGF-β 剂量在 0.1～2 μg 时，单用 TGF-β1 诱导骨形成具有剂量依赖性，随剂量增加而增强。我们的使用剂量是参照以往用局部注射法进行体内实验的结果[5,6,8]，以往研究 TGF-β 的使用剂量从 0.2～5.0 μg/d，发现均能促进幼鼠新骨形成，并且都是用啮齿类动物作为研究对象，我们选择兔，TGF-β 的使用剂量较大，从 1～20 μg/d。

不同年龄、种属的动物对 TGF-β 的反应存在着差别。Roberts 等[10] 研究发现，不同年龄的动物，对 TGF-β 的反应敏感程度不同。6 周龄鼠对 TGF-β 反应程度最大，而年老鼠反应程度最小。由于物种的差别，也可能表现出对 TGF-β 刺激作用产生不同的反应。以往用 TGF-β 作体内研究实验[5,6,8] 多数选择的是不成熟的啮齿动物(如胎鼠、新生鼠等)，这些研究对象比我们研究所选择的成熟兔具有较大的生长潜力。因此，不同种属、年龄的实验动物所使用的TGF-β 剂量不同。从我们的结果看，在兔尺骨骨折局部应用 TGF-β 的最佳剂量为 10 μg/d。

结果表明，在兔骨折周围局部注射 TGF-β，可以促进骨痂生长，增强骨折愈合后骨组织的最大抗弯强度，并且有剂量依赖性，TGF-β 的最适剂量为 10 μg/d。

参考文献：

[1] Gao J, Synons A L, Bartold P M. Expression of transforming growth factor-beta(TGF-β1) in the developing periodontium of rats[J]. J Dent Res, 1998, 77(9): 1708－1716.

[2] Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies and implants fixation[J]. Acta Orthop Scand Supple, 1998, 283(S): 2－37.

[3] 唐康来，杨 柳，卢卫忠，等. 人血小板中 TGF-β 的提取纯化及鉴定[J]. 第三军医大学学报，1999，21(11)：800－804.

[4] 郑淑芳，郑纪宁，耿建华，等. He-Ne 激光照射促进骨折愈合的量效关系的实验研究[J]. 中华骨科杂志，2001，21(11)：700－702.

[5] Nielsen H M, Andreassen T T, Ledet T, *et al*. Local injection of TGF-β

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

increases the strength of tibial fractures in the rat. [J] Acta Orthop Scand, 1994, 65(1): 34—41.
[6] Joyce M E, Jingushi S, Scully S P, *et al*. Role of growth factors in fracture healing[J]. Prog Clin Biol Res, 1991, 365: 391—416.
[7] Hill P A. Bone remodeling[J]. Br J Orthod, 1998, 25(2): 101—107.
[8] Joyce M E, Roberts A B, Sporn M B, *et al*. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur [J]. J Cell Biol, 1990, 110(6): 2195—2207.
[9] Beck L S, Deguzman L, Lee W P, *et al*. TGF-beta induces bone closure of skull defects[J]. J Bone Miner Res, 1991, 6(11): 1257—1265.
[11] Roberts A B, Sporn M B. Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues[J]. Mol Reprod Dev, 1992, 32(2): 91—98.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2003)11-0983-01

# 个案与短篇

# 马应龙麝香痔疮膏致月经不调 20 例分析

# An analysis of 20 cases of menoxenia due to using muskhaemorrhoids electuary

周 均[1], 甘 露[2] (第三军医大学附属西南医院: [1] 药学部; [2] 普通外科, 重庆 400038)

为了解马应龙痔疮膏在治疗痔疮时对妇女月经的影响。以洁阴洁痔栓为对照, 对用药前后月经的变化进行对比研究发现使用马应龙痔疮膏后妇女月经量增多, 周期紊乱, 但行经天数无明显变化。因此, 经期妇女和月经不调者应慎用马应龙痔疮膏。

## 1 材料与方法

连续门诊治疗的 20 名月经正常痔疮女患者, 年龄 19～45 岁。使用武汉马应龙药业集团股份有限公司生产的批号为 20010123 药膏, 每日 2 次, 每次 1 g, 连续使用 7 d, 纪录用药前后当月月经量、周期和行经天数的变化。同时对另 20 例连续门诊诊治的女痔疮患者用四川省内江神州药业公司生产的洁阴洁痔疮膏(批号 020211)作为对照用药, 用药方法同马应龙痔疮膏。结果采用 $\chi^2$ 检验, 由于两者治疗痔疮的效果均已肯定, 故不再对其疗效另作统计。

## 2 结果

使用马应龙痔疮膏的患者月经周期紊乱、经期延长、月经量增多($P<0.05$)、但对行经天数的影响无显著意义($P>0.05$)。对照组的患者月经无明显改变($P>0.05$)。各 20 例使用马应龙痔疮膏和洁阴洁痔疮膏对女患者月经的影响见表 1。

表 1 使用马应龙痔疮膏及洁阴洁痔疮膏对妇女月经的影响

| | 马应龙痔疮膏(20 例) | | | 洁阴洁痔疮膏(20 例) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 周期(d) | 经量(ml) | 行经天数 | 周期(d) | 经量(ml) | 行经天数 |
| 用药前 | 29.33 | 65 | 3.93 | 28.92 | 62 | 4.01 |
| 用药后 | 33.82 | 93 | 4.16 | 29.47 | 68 | 3.98 |
| *P* 值 | <0.05 | <0.05 | >0.05 | >0.05 | >0.05 | >0.05 |

作者简介: 周 均(1963—), 女, 湖南省蔚县人, 主管药师, 主要从事中西药结合治疗妇科慢性炎症方面的研究, 发表论文 13 篇。电话: (023) 68754441

收稿日期: 2002-04-27; 修回日期: 2002-08-28

## 3 讨论

痔疮为肛肠科常见多发病, 居肛门五大疾病之首, 人群发病率为 46.26%[1]。痔疮非大病, 但长期出血、瘙痒, 给患者带来痛苦。在临床治疗中, 马应龙痔疮膏和洁阴洁痔疮膏均具有活血化淤、收敛固脱、解痉止涌、润肠通便、止血生肌、消炎、消除水肿的功效, 但同时马应龙痔疮膏也带来一些负反应, 对孕妇及妇女月经的影响较大, 尤其是对月经量及周期的影响(虽然对行经天数影响不大), 应慎重使用。

马应龙痔疮膏内含麝香、牛黄、珍珠和琥珀等药物, 具有清热解毒、去腐生肌及收敛血的功效, 对痔疮有较好的疗效。但主药中的麝香为鹿科动物林麝、马麝或原麝成熟雄体香囊内的干燥分泌物, 具有活血散结, 止疼和催生下胎的作用[2], 其抗炎作用直接依赖肾上腺, 对子宫有明显的兴奋作用[3]。而洁阴洁痔疮膏同样具有清热解毒, 消炎镇痛的功能, 其主要成份为槐角、蛇床子、地榆、苦参等, 作用较为温和, 对子宫没有影响。

此外, 从解剖上看肛门为消化道末端, 内含大量痔静脉丛[4], 血液供应相当丰富, 直肠前方为阴道、子宫。当药物涂在肛门直肠时, 药物吸收快, 直肠本生也具有吸收功能, 加速了药物吸收后进入血液循环及对子宫的作用, 从而对妇女月经产生影响。因此, 建议医生在选择同类药物治疗痔疮时, 应考虑妇女的特殊性, 杜绝孕妇及经期妇女使用马应龙痔疮膏, 对月经不调患者, 应慎用该药。在无医生指导的情况下, 最好少用或不用含麝香类的痔疮膏, 选用不含麝香类的其它痔疮膏。

关键词: 麝香; 月经不调
中图法分类号: R283.6 文献标识码: B

## 参考文献:

[1] 喻德洪. 肛肠外科疾病问答[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 83—87.
[2] 编辑委员会编. 中国药物大全[M]. 第 2 版, 中药卷. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 3335.
[3] 宋立人, 洪恂主. 现代中药大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 2489—2490.
[4] 李省吾. 肛肠诊治[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2000. 45.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net