DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.004
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)09-0753-04

论著

不同时间给予转化生长因子β对兔骨折愈合作用的研究

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

提 要:目的 探讨不同时间给予外源性TGF-β对骨折愈合的促进作用。方法 采用兔右尺骨骨折模型,在不同作用时间于骨折区局部注射TGF-β,观察骨折愈合后生物力学、骨痂面积、皮质骨厚度和哈佛氏管直径的变化。结果 不同时间段给予TGF-β各组的骨痂面积和最大抗弯强度均有明显增加。不同给予时间的作用效果不同,在骨折后3~13 d局部注射TGF-β的作用最强,TGF-β对愈合骨的极限应力、刚度、极限负荷时能量吸收、皮质骨厚度和哈佛氏管直径则没有影响。结论 外源性TGF-β促进骨折愈合具有时效作用,在膜内成骨期局部应用时作用明显。

关键词:转化生长因子β;时相依赖;膜内成骨;骨折愈合
中图法分类号:R683;R977.4 文献标识码:A

Effects of different dosages of transforming growth factor-beta on the healing of rabbit ulnar fracture

LU Wei-zhong, TANG Kang-lai, YANG Liu, HE Xiao-bing, XU Jian-zhong, HE Jing, ZHU Qing-he (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of different dosages of exogenous transforming growth factor-beta (TGF-β) on fracture healing. Methods A total of 36 adult rabbits were inflicted with the model of right ulnar fracture and divided randomly into four groups according to the different injected dosages of TGF-β every day including control, 1 μg, 10 μg, and 20 μg groups. Fracture healing was evaluated by mechanical tests, bone morphometry and bone densitometry. Results Compared with control group, the maximal bending strength and callus area of the fracture healing in the treatment groups increased significantly with dosages of exogenous TGF-β increasing from 1 μg to 10 μg every day, which had no significant effects on 20 μg group. There were no significant differences between the treatment groups and control in the ultimate stress, bending stiffness, energy absorption at ultimate load, bone mineral content, cortical thickness or haversian canal diameter. Conclusion Local application of exogenous TGF-β can increase the callus formation and bending strength in a dose-dependent manner and hence accelerate fracture healing in rabbits.

Key words: transforming growth factor-beta; maximal bending strength; callus formation; dose-dependent; fracture healing

国内外大量研究表明[1,2],内源性转化生长因子β(Transforming growth factor-beta, TGF-β)有明显的促进骨折愈合的作用,在骨折愈合的不同时期发挥不同作用而呈动态变化。应用外源性TGF-β治疗骨折的研究报道较少,外源性TGF-β促进骨折愈合的时效关系尚不清楚。本实验采用在骨折愈合的不同时期局部注射一定浓度的TGF-β,探讨外源性TGF-β在不同作用时间对骨折愈合的影响,为其在组织工程和临床骨科中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 外源性TGF-β

参照文献[3]的方法,从人血小板中提纯鉴定。

1.2 实验动物

日本大耳白兔,雌雄各半,兔龄9个月,体质量3.5~4.5 kg,由第三军医大学实验动物中心提供。

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:2002-10-09

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

1.3 方法

1.3.1 实验模型 36只日本大耳白兔，随机分为A、B、C、D 4组，每组9只，各组间性别和体质量可比。3%戊巴比妥钠(0.5 ml/kg)静脉麻醉，无菌条件下手术显露右尺骨中段，用线锯切骨，造成长1.5 mm的缺损性骨折(参照文献[4]的方法)，生理盐水冲洗创口，骨折不作内固定，逐层缝合伤口，标记骨折处。术后肌注青霉素(4×10^5 U/d) 3 d，不加外固定，动物分笼饲养，常规饮食，允许其自由活动。

1.3.2 TGF-β用法 用0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline，PBS，pH 7.4)溶解TGF-β，各组分别在不同时间段局部注射TGF-β溶液，总量相同，均为100 μg，注射部位在右尺骨中段尺侧骨折区，每次注射的液体量为100 μl。A组于术后第2天一次性注射100 μg/100 μl TGF-β；B组于术后第3天开始连续注射TGF-β，每天10 μg/100 μl，共10 d；C组于手术当天开始每天连续注射TGF-β 2 μg/100 μl，共50 d；D组同C组一样，每天注射PBS 100 μl，连续50 d，作为空白对照。

1.3.3 标本采集 各组动物在术后50 d摄术肢X线片，观察骨折愈合情况。然后应用空气栓塞法处死，完整取下右尺骨，清除软组织和桡骨，作进一步分析。根据文献[5]采用的评价实验性骨折愈合的方法，对愈合骨的骨痂量和力学性能等进行测试。

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

1.3.5 骨形态测定 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管直径。

1.4 统计学处理

计量资料结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，先行方差分析，再行两两间的 q 检验。

2 结果

X线片观察结果显示，术后50 d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，以在骨折后3~13 d内给予TGF-β治疗的骨愈合情况最佳，见图1、2。

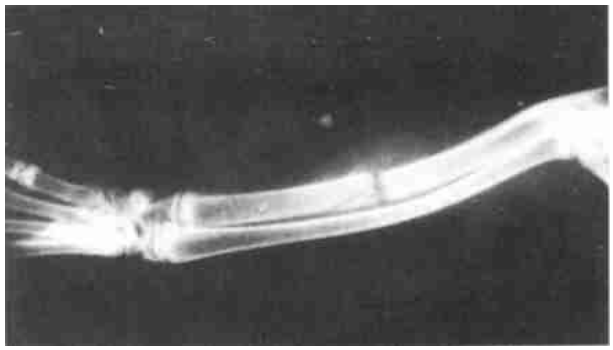


图1 兔尺骨骨折当天X线片(B组)

Fig 1 X-rays on day of ulnar fracture in the rabbit(group B)



图2 兔尺骨骨折后50 d X线片显示骨折愈合(B组)

Fig 2 Fracture healing by X-rays 50 d after ulnar fracture in the rabbit(group B)

力学测试结果显示：在骨折愈合不同时期给予TGF-β治疗各组在骨折愈合后的最大抗弯强度明显高于对照组(A、B、C组与D组比较，$P<0.01$)，其增加的程度具有明显的时效性。在骨折后3~13 d内给予TGF-β治疗的作用最强(B组与A、C组比较，$P<0.01$)，其次为在骨折愈合整个过程中给予TGF-β治疗的作用较强(C组与A组比较，$P<0.01$)。但在极限应力、极限刚度、极限负荷时能量吸收方面，各时间段给予TGF-β治疗的各组之间及其与对照组之间无明显差异($P>0.05$)，见表1。

表1 TGF-β不同作用时间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 local injection with TGF-β around the fractured area on the mechanical properties of healing right ulnar fracture in rabbit($n=9$，$\bar{x}\pm s$)

Group	Maximal bending strength(kg)	Ultimate stress(kg/mm^2)	Ultimate stiffness (kg/mm)	Energy absorption at ultimate load(kg× mm)
A	11.2±1.9 *	5.8±1.5	42.5±19.8	4.16±1.25
B	15.7±2.4 *#△	7.5±2.4	56.3±21.1	5.15±1.51
C	13.1±2.1 *#	6.5±2.1	48.6±18.5	4.85±1.36
D	8.2±1.3	4.5±0.9	31.6±8.2	3.10±0.61

*：$P<0.01$ *vs* D；#：$P<0.01$ *vs* A；△：$P<0.01$ *vs* C

骨形态定量显示，在骨折愈合不同时期给予TGF-β治疗的各组，其在骨折愈合后的骨痂面积明显高于对照组(A、B、C组与D组比较，$P<0.01$)，同最大抗弯强度一样，具有明显的时效性，在骨折后的3~13 d给予TGF-β，其骨折愈合后的骨痂面积

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

增加最多(B 组与 A、C 组比较, $P<0.01$), 其次为在整个骨折愈合过程注射 TGF-β 产生的骨痂面积较多(C 组与 A 组比较, $P<0.01$)。但各不同时间段 TGF-β 治疗的各组之间及其与对照组之间在骨皮质厚度和哈佛管直径方面则没有显著差异($P>0.05$), 见表 2。

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

Tab 2　Histomorphometric evaluation of transverse section at the fractured area($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Callus area (area unit)	Cortical thickness (μm)	Haversian canal diameter(μm)
A	64.6±9.5 *	985±29	28.6±2.7
B	97.5±17.2 *#△	982±26	28.0±2.5
C	78.8±12.5 *#	978±29	27.8±2.3
D	41.3±4.6	988±28	28.2±2.6

*: $P<0.01$ *vs* D; #: $P<0.01$ *vs* A; △: $P<0.01$ *vs* C

3　讨论

骨折修复是一个非常复杂的再生过程, 它主要包括: 即刻损伤反应期、膜内化成骨期、软骨形成期和软骨内化骨四个时期[6]。国内外大量研究表明[1,2], 内源性 TGF-β 有明显的促进骨折愈合的作用, 在骨折愈合的不同时期发挥不同作用而呈动态变化。免疫组化和原位杂交研究表明[2,6,7], 在急性损伤反应期, 血肿延伸范围内的骨内层细胞仅有少量 TGF-β1 蛋白表达, TGF-β1 基因无表达, 细胞外的 TGF-β1 局限于骨折 24 h 内的骨折区和骨膜内的血肿中; 在膜内成骨期, 细胞外 TGF-β1 蛋白呈低表达, 而在成骨细胞内 TGF-β1 蛋白表达量较高, 骨膜细胞表达量少, TGF-β1 基因表达水平很低; 在软骨形成期, TGF-β1mRNA 表达水平较高, TGF-β1 蛋白表达位于间质细胞和未成熟的软骨细胞内, 而软骨性基质周围成熟的软骨细胞较少或无 TGF-β1 染色; 在软骨内成骨期, TGF-β1mRNA 表达水平较高, 肥大软骨细胞内和钙化的骨基质中无 TGF-β1 蛋白表达, 而在肥大软骨细胞周围和钙化骨基质处的成骨细胞内 TGF-β1 蛋白有阳性表达。我们根据骨折愈合过程中内源性 TGF-β 蛋白和基因表达的动态变化, 在即刻损伤反应期、膜内化成骨期和整个骨折愈合过程中局部注射外源性 TGF-β, 其结果发现, TGF-β 各时间段治疗组的骨痂形成量、最大抗弯强度明显高于对照组($P<0.01$), 并具有一定的时效性, 在膜内化成骨期(骨折后的 3~13 d 左右)给予 TGF-β 的作用最强, 其次为在整个骨折愈合过程中给予 TGF-β 的作用较强, 而在即刻损伤反应期作用相对较弱。这可能是在即刻损伤反应期(血肿期), 血肿内血小板聚集已释放出高浓度的内源性 TGF-β 到细胞外, 此时局部再给予高浓度的外源性 TGF-β, 但局部靶细胞的受体数目相对有限, 效应细胞已达饱和状态, 多余的 TGF-β 随时间延长逐渐被水解代谢, 到骨折愈合中期, 内源性 TGF-β 浓度下降, 局部微环境中缺乏有效浓度的 TGF-β, 因而成骨作用相对减弱。我们的结果也表明, 此期给予 TGF-β 作用不强。但此期是否为 TGF-β 不应期, 尚有待进一步研究。

在膜内化成骨期, 细胞外 TGF-β 浓度低, 并且 TGF-β mRNA 转录水平也很低, 此时局部给予较高浓度的外源性 TGF-β, 可能是刺激了间充质细胞大量增殖, 并作用于这些细胞的受体, 激活其中的软骨或骨基因, 从而使间充质细胞向软骨细胞或成骨细胞方向转化[6,8]。已分化的成软骨细胞和成骨细胞具有合成及释放 TGF-β 的功能, 外源性的 TGF-β 在其未完全吸收之前作用这部分细胞, 使局部微环境中不断有新的 TGF-β 合成与释放, 因而在软骨形成期和软骨内成骨期, 虽然外源性 TGF-β 已被完全吸收, 局部成骨过程仍然可以继续进行。所以在膜内化成骨期给予外源性 TGF-β 可使局部有持续有效的 TGF-β 存在, 从而保持有效的成骨活动, 因此在此期给予外源性 TGF-β 能最有效地促进骨折愈合, 而在软骨形成期和软骨内成骨期再给予外源性 TGF-β, 其意义不大, 我们的实验结果也证实了这一点。

Joyce 等[9]研究表明, TGF-β 对膜内和软骨内骨形成均有促进作用, 应用外源性 TGF-β, 可增强膜内骨形成, 他们在新生鼠股骨骨膜下每日注射 TGF-β1 或 TGF-β2, 发现骨膜内的间充质前体细胞同胚胎期骨形成和早期骨折愈合一样, 增殖和分化明显增强, 在停止注射后, 软骨内骨化也出现, 从而使软骨骨化(骨代替软骨)。他们还发现, 注射 TGF-β2 可促进软骨细胞和成骨细胞合成 TGF-β1, 这提示 TGF-β1 有明显的自身调节作用。因此, 在骨折愈合的后期(即软骨内成骨期), 没有必要局部再给予外源性 TGF-β, 我们的结果也表明, 在整个骨折愈合过程中全程注射外源性 TGF-β 的作用不是最强。其原因可能是内源性 TGF-β 在骨折愈合的不同时期呈动态变化, 全程给予外源性 TGF-β, 在局部内源性 TGF-β 高浓度时, 效应细胞已达饱和状态; 而当内源性 TGF-β 低浓度时, 由于分次给予的外源性 TGF-β 量相对较少, 局部缺乏有效浓度的 TGF-β, 因而在骨折愈合的内源性 TGF-β 低浓度期, 成骨作用较弱。Joyce 等[10]还研究发现, 在骨折后大约 14 d 内的软骨痂(主要为软骨)和第 15 天及 15 d 内的硬骨痂(主要为骨)中有 TGF-β mRNA 表达; 咱骨折后 4 d 清除骨痂, 用 TGF-β 治疗 3 d, 软骨基因(转录Ⅱ型胶原)表达被抑制, 但对骨基因(转录Ⅰ型胶原和骨连接素)表达则没有影响; 在骨折后 10 d 清除骨痂, 应用 TGF-β 刺激, 结果Ⅰ型胶原和骨连接素增加了几倍, 但对软骨基因和Ⅱ型胶原则没有作用。这些研究结果同我们的结果均

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

提示：TGF-β 在骨折愈合的不同时间内，对诱导组织分化、促进骨折愈合发挥着不同的作用而呈动态变化，在 TGF-β 蛋白和基因低表达期，局部给予外源性 TGF-β，使成骨作用增强。

TGF-β 各不同时间段治疗组在极限应力、极限刚度和极限荷时能量吸收方面同对照组相比，无明显差异（$P>0.05$），其原因可能是这三个指标的变异系数较大，不能显示出其差异[5]，另外还可能是骨痂成熟度不够，不能增强骨折处的应力和刚度。骨折区横切面形态学定量评估显示，与对照组相比，TGF-β 各不同时间段治疗组在骨皮质厚度和哈佛氏管直径方面无显著性差异（$P>0.05$），这可能是骨皮质的塑形不受 TGF-β 刺激作用的影响，具体原因尚有待进一步研究。

我们的结果表明，在骨折愈合过程中，局部应用外源性 TGF-β 对骨折愈合有一定促进作用，并呈一定的时效性，在膜内化成骨期给予外源性 TGF-β 的作用最强。

参考文献：

[1] Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies and implants fixation[J]. Acta Orthop Scand Supple, 1998, 283: 2—37.
[2] Gao J, Symons A L, Bartold P M. Expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) in the developing periodontium of rat[J]. J Dent Res, 1998, 77(9): 1708—1716.
[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(1)：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, Iedet T, *et al*. Local injection of TGF-β increases the strength of tibial fractures in the rats[J]. Acta Orthop Scand, 1994, 65: 34—41.
[6] Hill P A. Bone remodeling[J]. Br J Orthod, 1998, 25(2): 101—107.
[7] Andraw J G, Hoyland J, Andraw S M, *et al*. Demonstration of TGF-β1mRNA by *situ* hybridization in normal fracture healing[J]. Calcif Tissue Int, 1993, 52: 74—78.
[8] 卢卫忠，唐康来，杨 柳，等. TGF-β 对成骨细胞的作用[J]. 第三军医大学学报，2000，22(1)：99—102.
[9] Joyce M E, Roberts A B, Sporn M B, *et al*. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogensis and osteogenesis in the rat femur[J]. J Cell Biol, 1990, 110: 2195—2207.
[10] Joyce M E, Jingushi S, Bolander M E. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair[J]. Orthop Clin North Am, 1990, 21(1): 199—209.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)09-0756-01

中药保留灌肠治疗慢性盆腔炎及盆腔淤血综合征

Chinese-medical retention enema on management of the chronic pelvic inflammation and the pelvic congestion syndrome

邓晓杨，慕宇舸 （第三军医大学成都军医学院第 47 医院妇产科，成都 610500）

慢性盆腔炎及盆腔淤血综合征是妇科门诊颇为常见的妇科病。两者发病原因、临床表现及体征多有相似之处，有时甚至二者互为因果，故临床上常常一律诊断为慢性盆腔炎。

这类患者多见于 30～50 岁的经产妇，其临床特点是：慢性下腹痛，低位腰痛，极度疲劳感，性感不快以及植物神经功能紊乱引起的失眠、多梦，头痛、烦躁，腹胀、大便秘结等症状[1]。慢性盆腔炎患者妇科检查可有宫旁组织增厚、附件增粗或有包块形成并有压痛；盆腔淤血综合征则往往无炎症体征，但盆腔局部极为敏感，触诊下腹深压痛明显[2]。两者均见宫颈肥大，其色淤紫，这是由于两者均有不同程度的盆腔静脉淤血现象。因淤血而引起组织缺氧和营养不良，进一步使盆腔结缔组织内平滑肌纤维和血管壁的平滑肌产生痉挛性收缩和疼痛。痉挛性疼痛又可以反射性引起盆腔淤血的加重[3]。因此我们选用逍遥散进行治疗。

1 方药与方法

方药：柴胡 9 g，当归 6 g，白芍 6 g，红花 3 g，香附 9 g，刘寄奴 9 g，毛冬青 30 g。

治疗方法：将药加水煎成 100 ml，待药液温度适宜时（约 30～35 ℃），患者排便后取侧卧位，以消毒的中粗尿管徐徐插入患者肛门，深约 15 cm，取上清药液缓缓注入尿管，注完后拔出尿管，并嘱患者静卧 15～20 min 后才起床活动，每日保留灌肠 1 次，10～15 d 为一疗程。

灌肠后患者普遍反映肠蠕动迅速增加，随之有便意，此时嘱患者静卧，极力控制勿将药液排出，并在短时间内避免参加一切增加腹压的劳动和活动。多数患者经 3～5 次灌肠后逐步能适应，一直保留至次日灌肠前才解大便。这就保证了药液在肠内的充分吸收，治疗效果更好。

2 结果

我们用此方法治疗 600 多例，并对 100 例患者进行了追踪观察，其有效率达 94%，特别是对盆腔淤血综合征效果更显著，显效率 70.6%。不少患者曾经采用多种治疗方法，但最终自觉这种中药保留灌肠疗法较其他方法效果好，一般经 10～15 次治疗后症状明显好转甚至消失，少数患者经约 3～6 个月后再发病，但亦较治疗前为轻。

（下转 759 页）

作者简介：邓晓杨（1972—），女，四川省广汉市人，医师，主要从事妇产科临床方面的研究。电话：(028)83016670
收稿日期：2002-11-27；修回日期：2003-01-30

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