

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.08.020

浓缩自体骨髓移植结合补肾活血中药对骨质疏松性骨折愈合的影响

王昌兴, 董黎强*, 刘琦, 何键能, 姜滔, 赵友

(浙江中医药大学附属第二医院, 浙江省杭州市潮王路 318 号, 310005)

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y2080991)

摘要 **目的** 探讨自体骨髓移植结合补肾活血中药治疗骨质疏松性骨折 (OPF) 的作用机制。 **方法** 100 只大耳白兔随机分为假手术组、模型组、移植组、中药组和联合组各 20 只。除假手术组外其余各组采用双侧卵巢切除 3 个月方法建立骨质疏松症模型, 各组再行左前肢锯断桡骨 3 mm 建立骨折模型。移植组给予自体浓缩骨髓 (2 ml/只) 经皮注射到骨折断端; 中药组给予补肾活血中药 10 ml/ (kg · d) 灌胃; 联合组给予骨髓移植和补肾活血中药灌胃, 剂量同上; 假手术组、模型组给予同量的生理盐水灌胃, 共 8 周。分别于治疗 2、4、6、8 周对骨折处骨组织进行大体观察、X 线摄片及 CT 平扫, 测定骨痂 CT 值, 并进行 HE 染色观察形态学变化。 **结果** 联合组、移植组及中药组从大体观察、X 线、HE 染色均明显好于模型组, 并且联合组均优于其他各组。与假手术组比较, 模型组白兔 2、4、6、8 周时骨折端骨痂 CT 值明显降低 ($P < 0.01$); 除移植组 8 周外, 移植组和联合组 2、4、6、8 周时骨折端骨痂 CT 值明显高于中药组 ($P < 0.01$); 联合组 4、6、8 周时骨折端骨痂 CT 值高于移植组 ($P < 0.01$)。 **结论** 浓缩自体骨髓移植结合补肾活血中药能够促进加快 OPF 的愈合, 并且优于单纯应用补肾活血中药或浓缩自体骨髓移植治疗。

关键词 骨质疏松性骨折; 自体骨髓移植; 补肾活血中药

骨质疏松性骨折 (osteoporotic fracture, OPF) 愈合同一般创伤骨折愈合一样, 也经历血肿机化期、原始骨痂形成期和骨痂塑形改造期。但 OPF 因其发生在骨质疏松症的基础上, 所以愈合更加困难, 愈合时间久, 甚至发生骨吸收, 骨折不愈合^[1]。中药具有促成骨作用, 既可治疗骨质疏松症, 也可促进骨折愈合, 骨髓移植的促成骨作用也得到证实^[2]。本研究从组织学和影像学角度观察浓缩自体骨髓移植结合补肾活血中药治疗 OPF 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 5 月龄雌性大耳白兔 100 只, 体重 2.5 ~ 3.0 kg, 实验动物许可证号: SCXK (浙) 2009-0042, 由浙江中医药大学实验动物中心提供并饲养, 单笼饲养, 自由活动, 标准固体饲料自由摄食饮水, 光照 12 h, 黑暗 12 h, 室温 (25 ±

2) °C, 适应性喂养 2 周。

1.2 试剂、药品及主要仪器

补肾活血中药汤剂制备: 骨碎补 9 g, 补骨脂 12 g, 枸杞子 15 g, 三七粉 3 g, 当归 12 g, 血竭 1.5 g, 生地黄 12 g, 赤芍 15 g, 续断 10 g, 土鳖虫 9 g, 枳壳 15 g, 川芎 15 g, 浙江中医药大学附属第二医院提供, 水煎成浓度为 100 mg/kg 药液; 3% 戊巴比妥钠 (上海新亚药业有限公司, 国药准字 H31021424); 9% 硫化钠 (上海化学试剂总厂); 硫酸庆大霉素 (广东三才石岐制药有限公司, 国药准字 H44023277); 肝素钠注射液 (河北常山生化药业有限公司, 国药准字 H20045512); X 线数码摄片机 CR 系统 (Solo、Compact plus); CT 机 (Siemens Emotion); Tissue Tek WIP 脱水机 (日本樱花检验仪器株式会社); EG 1160 石蜡包埋机 (德国徕卡仪器有限公司); 1516 切片机 (德国徕卡仪器有限公司); 数码照相机 (日本 Olympus 公司); 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 离心机 (Beckman AllegraX-15R Centrifuge); 计算机真彩图

* 通讯作者: dlq58@126.com, 13867432797

像分析系统 IPP (Image-Pro Plus 6.0 media Cybernetics 公司)。

1.3 动物分组与模型建立

100 只大耳白兔采用随机数字表法分为假手术组、模型组、中药组、移植组、联合组各 20 只。模型组、中药组、移植组、联合组采用去势 (双侧卵巢切除) 方法建造大耳白兔骨质疏松动物模型^[9], 动物用 3% 戊巴比妥钠 (1 ml/kg) 耳缘静脉麻醉后, 行下腹部前正中切口约 6 cm, 分层进入腹腔后, 结扎输卵管, 切除卵巢, 缝合结扎子宫残端, 术前 30 min 及术后 3 日, 肌肉注射庆大霉素 (5 mg/kg) 预防感染, 3 个月后建立骨质疏松模型。假手术组切开腹腔找到卵巢后即缝合切口。各组 3 个月后再行左前肢后外侧中段纵行切口约 2 cm, 显露桡骨后用手锯横行锯断桡骨 3 mm, 不做内固定, 冲洗后分层闭合切口, 术前 30 min 及术后 3 日, 肌肉注射庆大霉素 (5 mg/kg) 预防感染, 建立骨折模型^[9]。

1.4 给药方法

移植组和联合组在骨折模型制作同时, 无菌条件下行髂骨穿刺, 抽取红骨髓 5 ml, 置于含有 1% 肝素钠的离心管中, 2000 r/min 离心 10 min, 将浓缩骨髓 (2 ml/只) 经皮注射到骨折断端, 5 天 1 次。中药组和联合组在骨折模型制作术后次日开始给药, 按 10 ml/(kg·d) 补肾活血中药汤剂灌胃, 假手术组、模型组和移植组给予同量的生理盐水灌胃, 各组均灌胃 8 周。

1.5 标本取材及处理

在骨折造模术后 2 周、4 周、6 周、8 周, 每组采用随机数字表法分别抽取 5 只动物颈动脉放血快速处死, 左侧桡骨骨折线上下各 8 mm 处截取标本, 小心去除周围软组织, 先用数码相机拍照, 并大体观察, 后立即置于生理盐水中浸泡, 随后进行 X 线摄片及 CT 平扫, 扫描线与骨折线平行, 由同一技师采用同一台 CT 机完成, 以骨折端为中心上下 0.5 cm 范围内扫描 5 层, 每层随机选取 5 个点测骨痂 CT 值, 并进行统计学分析。扫描完成后标本置于 4℃ 固定液中固定, 固定 24 h 后蒸馏水冲洗, 去除多余的固定液, 移入 20℃、10% EDTA, 脱钙 3 周, 隔 3 天更换脱钙液, 用针刺法检测脱钙满意后, 纵行正中剖开, 脱水机脱水, 二甲苯透明, 纵向石蜡包埋, 5 μm 厚度连续切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 光镜观察形态学变化。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件处理, 计量数据采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 各组数据间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 大体观察及 X 线结果

2 周时大体观察联合组、移植组骨折端周围血肿机化组织多, 质地较硬; 中药组、假手术组、模型组骨折端周围少量血肿机化组织。X 线摄片显示 2 周时联合组、移植组骨折端出现较多的外骨痂, 骨折线较中药组、假手术组、模型组模糊; 中药组、假手术组、模型组骨折线模糊, 骨折线亮度较联合组、移植组高。4 周时大体观察联合组、移植组骨折端出现大量骨性外骨痂, 质地变硬; 中药组、假手术组骨折端也以骨性骨痂为主, 但外骨痂较联合组、移植组小; 模型组骨折端见少许外骨痂, 质地稍硬。X 线摄片显示 4 周时大体观察联合组、移植组骨折端骨痂增多, 外骨痂大, 骨折线模糊; 中药组、假手术组骨痂、骨折线开始模糊, 模型组骨折线仍较清晰。6 周时联合组、移植组有较大外骨痂基本呈梭形外观, X 线摄片显示 6 周时联合组骨折线隐约可见, 中药组、移植组骨折线亦隐约可见, 假手术组骨折线模糊, 模型组动物骨折线开始模糊。8 周时大体观察联合组、中药组、移植组软骨痂消失, 外骨痂梭形表现, 质地坚硬, 3 组骨痂外观无明显差异; 假手术组骨痂也呈梭形表现, 模型组骨折端周围可见少量外骨痂。X 线摄片显示 8 周时联合组、中药组、移植组、假手术组骨折线消失, 骨折端未见透亮带, 外骨痂梭形表现; 模型组可见不规则外骨痂, 量小, 仍隐约可见骨折端透亮线, 但亮度较 6 周时降低, 骨折线模糊。

2.2 骨组织 HE 染色结果

2 周时联合组、移植组可见原始小梁状骨表面大量的软骨细胞、成骨细胞, 骨外膜骨样组织明显, 骨内膜也可见成骨细胞, 断端间形成纤维连接, 已经出现新生的骨小梁, 排列规则; 中药组以纤维性连接为主, 其中可见软骨岛, 软骨痂周边有新生的骨小梁; 假手术组亦可见较多的软骨细胞及成骨细胞, 断端间主要为纤维连接, 可见少量新生骨小梁; 模型组断端仍为较多的纤维组织及软骨组织, 成骨细胞少, 原始骨小梁间为结缔组织, 排列紊乱。4 周时联合组、移植组骨膜外、骨折端周围成骨细胞数量较多, 较多原始小梁状骨, 外骨痂出现骨性骨痂, 骨小梁排列较整齐; 中药组、假手术

表 1 各组白兔不同时间骨折端骨痂 CT 值比较 (HU, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	2 周	4 周	6 周	8 周
假手术组	5	189 ± 34.57*	260 ± 39.26*	615 ± 36.79*	1014 ± 88.74*
模型组	5	136 ± 32.93	198 ± 32.42	440 ± 39.70	643 ± 60.12
移植组	5	228 ± 29.94* ^{△▲}	401 ± 29.63* ^{△▲}	795 ± 34.46* ^{△▲}	1240 ± 204.57* [△]
中药组	5	190 ± 38.65*	295 ± 45.48* [△]	770 ± 40.32* [△]	1217 ± 197.93* [△]
联合组	5	237 ± 30.12* ^{△▲}	498 ± 26.96* ^{△▲#}	931 ± 27.03* ^{△▲#}	1629 ± 246.38* ^{△▲#}

注: 与模型组比较, * $P < 0.01$; 与假手术组比较, $\Delta P < 0.01$; 与中药组比较, $\Delta P < 0.01$; 与移植组比较, # $P < 0.01$

组以软骨细胞和成骨细胞为主, 可见原始小梁状骨; 模型组为纤维组织及软骨组织, 以软骨组织为主, 纤维及小梁状骨排列紊乱, 间距宽。6 周时联合组、中药组、移植组、假手术组出现成熟骨小梁, 原始小梁状骨较少, 可见软骨骨化, 可见破骨细胞; 模型组主要为原始小梁状骨和软骨组织, 骨小梁粗细不等, 仍可见软骨细胞。8 周时联合组以成熟骨小梁为主, 骨塑形明显, 髓腔侧可见部分破骨细胞, 外骨痂破骨细胞少见或未见, 骨小梁排列较整齐; 中药组、移植组、假手术组也以骨性骨痂较多, 破骨细胞分布较均匀; 模型组以原始小梁状骨为主, 仍可见少量软骨成分, 可见破骨细胞, 骨小梁间距较宽。

2.3 不同时间骨折端骨痂 CT 值比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组 2、4、6、8 周时骨折端骨痂 CT 值明显降低 ($P < 0.01$); 移植组、中药组、联合组白兔骨折端骨痂 CT 值 2、4、6、8 周时较模型组明显升高 ($P < 0.01$); 并且除中药组 2 周时, 移植组、中药组、联合组 2、4、6、8 周时骨折端骨痂 CT 值亦明显高于假手术组 ($P < 0.01$); 除移植组 8 周外, 移植组和联合组 2、4、6、8 周时骨折端骨痂 CT 值明显高于中药组 ($P < 0.01$); 联合组 4、6、8 周时骨折端骨痂 CT 值高于移植组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

骨质疏松症以骨量减少为特征, 骨密度 (BMP) 测量是早期诊断骨质疏松症预防 OPF 的可靠方法之一, 但随着对骨质疏松症研究的加深, 单纯的骨密度测量显露出很多局限性。定量 CT (QCT) 是 20 世纪 80 年代推出的一种利用常规计算机断层扫描成像 (CT) 设备测量骨密度的方法。QCT 的优点是它可以评价骨的大体结构, 分别测量小梁骨及皮质骨的密度, 并且可以直观的测量骨折端骨痂的密度, 可以将对骨痂的分析进行统计学量化, 科学性更高。Ebbesen 等^[4]应用 QCT 技术对腰椎压力强度进行评估, 显示这种方法对压力强度

均具有较高的预测能力。QCT 的使用使我们对骨愈合的早期表现有所观察, 将 QCT 应用于临床评价骨愈合程度, 是 X 线摄片非常有益的补充手段^[5]。并且测定骨折愈合不同时间段骨痂的 CT 值, 可以显示不同时间段骨痂的变化, 具有重要的实验及临床意义。

补肾活血中药方剂以益肾补虚、活血化瘀为原则, 方中补骨脂、当归、续断、生地黄、枸杞子补肾填精, 使骨生化有源; 血竭、三七、赤芍、川芎活血化瘀使骨折端局部血运增加, 营养物质及时送达, 以促进骨折愈合。本实验从 X 线摄片、组织学及 CT 值方面观察各组骨痂的变化情况, HE 染色结果显示, 2 周时中药组、移植组标本内软骨细胞较少见, 以成骨细胞为主, 这与骨折愈合过程中首先出现大量软骨细胞的理论不符^[6], 我们认为这可能是因为浓缩自体骨髓的移植把骨髓中大量有利于软骨化骨的因子带到骨折端, 加速了软骨内化骨的过程, 2 周时已经错过了观察软骨细胞的最佳时间, 这在以后的实验中有待改进。本实验 CT 值比较发现, 各组内不同时间段骨痂 CT 值的变化存在递增趋势, 模型组骨痂 CT 值递增幅度较小, 说明骨质疏松延迟了骨折的愈合, 愈合时间较其他组长; 联合组各时间段递增最明显, 8 周时骨痂 CT 值接近正常骨皮质 CT 值^[7] [兔桡骨正常骨皮质 CT 值 $\geq (1831 \pm 96.65)$ HU], 且在相同取材时间内骨痂 CT 值明显高于其他组 ($P < 0.01$), 这说明浓缩自体骨髓移植结合补肾活血中药能显著促进 OPF 的愈合, 且疗效明显好于单纯应用补肾活血中药治疗或单纯应用浓缩自体骨髓移植治疗; 移植组在 2、4、6 周时 CT 值高于中药组 ($P < 0.01$), 8 周时两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 可能是因为补肾活血中药主要抑制了骨质疏松症的加剧^[8], 而在促进骨折愈合作用方面没有浓缩自体骨髓局部注射作用快; 假手术组在 2 周时骨痂的 CT 值与中药组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 这可能与骨质疏松限制了骨折的早期愈合有关^[9];

到 4、6、8 周时中药组骨痂 CT 值都高于假手术组 ($P < 0.01$), 说明补肾活血中药具有促进 OPF 愈合的作用。同时 X 线及 HE 染色观察结果也可以辅助说明浓缩自体骨髓移植结合补肾活血中药促进 OPF 愈合的疗效明显优于单纯应用补肾活血中药或单纯应用浓缩自体骨髓移植治疗 OPF 的疗效, 使 OPF 愈合的时间进一步缩短。

参考文献

- [1] 黄公怡. 骨质疏松性骨折及其临床特点 [J]. 中华骨科杂志, 2008, 28(1): 74-77.
- [2] 姜东辉. 骨质疏松性骨折风险评估研究进展 [J]. 医学临床研究, 2013, 30(4): 785-787.
- [3] 尚德阳, 郑洪新, 宗志宏, 等. 补肾中药对肾虚骨质疏松症大鼠肾组织中 Smurf2 的 mRNA 和蛋白表达影响研究 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(8): 1684-1686.

- [4] Ebbesen EN, Thomsen JS, Beck-Nielsen H, et al. Lumbar vertebral body compressive strength evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry, quantitative computed tomography, and ashing [J]. Bone, 1999, 25(6): 713-724.
- [5] Markel MD, Wilkenheiser MA, Morin RL, et al. Quantification of bone healing. Comparison of QCT, SPA, MRI, and DEXA in dog osteotomies [J]. Acta Orthop Scand, 1990, 61(6): 487-498.
- [6] 许少文, 喻任, 赵光辉, 等. 去势对骨折早期愈合的影响 [J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(7): 439-443.
- [7] 赵明东, 潘志宏, 朱良豫, 等. 建立桡骨缺损模型: 骨缺损标准尺寸的确立 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(2): 213-218.
- [8] Namkung-Matthai H, Appleyard R, Janes J, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model [J]. Bone, 2001, 28(1): 80-86.

Effect of Concentrated Autologous Bone Marrow Aspirate Transplantation Combined With Kidney-Supplementing Blood-Quickening Herbs on Fracture Healing in Osteoporotic Fractures

WANG Changxing, DONG Liqiang, LIU Qi, HE Jianneng, JIANG Tao, ZHAO You

(The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Province 310005)

ABSTRACT Objective To study the effect of concentrated autologous bone marrow aspirate transplantation (CABMAT) combined with kidney-supplementing blood-quickening herbs on fracture healing in osteoporotic fractures (OPF). **Methods** Totally 100 white rabbits were randomized into the sham operation group, model group, transplantation group, Chinese medicinal group and combination group, with 20 in each. The osteoporotic models were established by ovariectomy for three months in all groups except the sham operation group. Then the fracture models were established by amputating 3mm radial bones of left forelegs in all groups. The concentrated autologous bone marrow (2ml/rabbit) was percutaneously injected into the fracture fragments in the transplantation group. The Chinese medicinal group was gavaged with 10ml/ (kg · d) kidney-supplementing blood-quickening herbs. The combination group was given bone marrow transplantation and intragastric administration of kidney-supplementing blood-quickening herbs. The sham operation group and model group were gavaged with the same amount of normal saline for 8 weeks. The general observation, X-ray and CT scanning were conducted in the bone tissue of fracture in the 2nd, 4th, 6th and 8th week of treatment. The CT values of bone callus were measured and the morphological changes were observed with HE staining. **Results** The combination group, transplantation group and Chinese medicinal group were superior to the model group in the general observation, X-ray and HE staining, especially the combination group. Comparing with the sham operation group, the CT values of bone callus were significantly decreased in the model group in the 2nd, 4th, 6th and 8th week of treatment ($P < 0.01$). Comparing with the Chinese medicinal group, the CT values of bone callus were significantly increased in the transplantation group and combination group in the 2nd, 4th, 6th and 8th week of treatment except in the transplantation group in the 8th week of treatment ($P < 0.01$). Comparing with the transplantation group, the CT values of bone callus were significantly increased in the combination group in the 4th, 6th and 8th week of treatment ($P < 0.01$). **Conclusion** The combo therapy of CABMAT and kidney-supplementing blood-quickening herbs can promote and accelerate the fracture healing in OPF.

Keywords osteoporotic fractures; autologous bone marrow transplantation; kidney-supplementing blood-quickening herbs

(收稿日期: 2013-09-17; 修回日期: 2013-11-12)

编辑: 邓 媛