

· 基础研究 ·

中药超声透入对骨折愈合中 I、II 型胶原表达的影响*

徐琳峰¹ 樊振勇¹ 纵 亚¹ 胡坚勇¹ 陈丽娜¹ 傅华洲² 顾伟忠³

摘要 目的:研究中药超声透入对大鼠股骨骨折愈合中 I、II 型胶原表达的影响。**方法:**建立 27 只 SD 成年大白鼠的股骨骨折模型,随机分成 3 组,超声组每日予骨折部位行低强度超声治疗,实验组予以中药为耦合剂的低强度超声透入治疗,对照组给予假刺激,分别在术后 10d、20d、30d 每组各处死大鼠 3 只取标本(骨痂)行 I、II 型胶原的免疫组化染色观察。**结果:**10d 时 I 型胶原表达在三组比较差异无显著性意义,II 型胶原表达在实验组高于对照组($P < 0.05$),超声组与对照组比较差异无显著性意义;20d 时 I 型胶原表达在实验组高于对照组($P < 0.05$),超声组与对照组比较差异无显著性意义,II 型胶原表达在实验组明显高于对照组($P < 0.01$),超声组高于对照组($P < 0.05$);30d 时 I 型胶原表达在实验组明显高于对照组($P < 0.01$),超声组高于对照组($P < 0.05$),II 型胶原表达在三组比较差异无显著性意义。**结论:**中药超声透入有促进骨折愈合的作用,其机制有可能是:在早中期促进 II 型胶原表达,在中后期促进 I 型胶原表达。

关键词 超声药透;骨折愈合;胶原

中图分类号:R258, R683, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-11-0978-03

Effect of herbal ultrasound-phoresis on collagen I、II expressions during fracture healing/XU Linfeng,FAN Zhenyong,ZONG Ya,et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(11): 978—980

Abstract Objective: To explore the effect of herbal ultrasound-phoresis on collagen I、II expression during fracture healing in rats. **Method:** Animal models of femur fracture in rats were established. Then 27 SD rats were divided into 3 groups after operation. The experimental group were given herbal ultrasound-phoresis, the ultrasound group were given ultrasound exposure, the control group were given sham exposure. The rats were sacrificed at the 10th, 20th, 30th day respectively after operation and the callus were procured and observed with immunohistochemical examinations. **Result:** The expressions of collagen II in experimental group were higher than that in control group at the 10th d ($P < 0.05$) and 20th d ($P < 0.01$). The expressions of collagen I in experimental group were higher than that in control group at the 20th d ($P < 0.01$) and 30th d ($P < 0.05$). **Conclusion:** Herbal ultrasound-phoresis might accelerate fracture healing by increasing collagen II synthesis at earlier and middle stage, and increasing collagen I synthesis at middle and later stage.

Author's address Dept. of Physical Medicine and Rehabilitation, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou, 310006

Key words herbal ultrasound phoresis; fracture healing; collagen

骨折愈合是一个极其复杂的生物学过程,涉及病理、生理、生物、物理学的协调交叉作用,并且有多种细胞因子与介质参与其中。在骨折愈合的分子生物学研究中,测定胶原合成是检测骨形成和骨吸收的重要生物学指标之一^[1]。中药超声透入在临床及实验中都被证明有促进骨折愈合的作用^[2-3]。本研究通过观察骨折愈合过程中 I、II 型胶原的表达来进一步探讨中药超声透入促进骨折愈合的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

选用健康 SD 成年大白鼠 27 只(由浙江大学医学院动物实验中心提供),雌雄不限,体重 450 ± 105 g。随机分成实验组、超声组和对照组,每组各 9

只,3 组大鼠体重及一般情况经统计学分析,差异无显著性意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 实验动物模型制备

按 Wang 等^[4]介绍的实验研究方法制造股骨骨折髓内针固定模型:以氯氨酮(100mg/kg)加安定(5mg/kg)联合腹腔内麻醉,右后肢脱毛,在无菌条件下暴露右侧膝关节股骨关节面,用骨钻垂直于关节面钻洞,取 2mm 髓内针内固定,随后在右大腿外侧做一纵行切口,逐层分离,暴露股骨约 1—2cm,使用

* 基金项目:浙江省中医药科技计划项目青年基金(2005B045)

1 杭州市第一人民医院康复医学科,310006

2 杭州市第一人民医院中医科

3 浙江大学附属儿童医院病理科

作者简介:徐琳峰,女,硕士,主治医师

收稿日期:2007-06-08

骨钻做横行骨折,用生理盐水冲洗骨碎片及凝血块,逐层缝合,覆盖包扎。术后各组大鼠青霉素抗感染治疗 3d。

1.3 实验动物处理

术后大鼠分笼饲养,自由活动。实验组:大鼠造模术后一天待伤口干燥后在骨折端行中药超声透入治疗。具体方法为:选用红花、桃红、桂枝、川芎、乳香、没药、元胡、锻自然铜、续断、狗脊各 10g(即为中药“愈骨 1 号”方剂),煎成汤剂,用淀粉勾芡成糊状作为超声治疗的耦合剂。采用 SOMOMED4 型超声波治疗仪(德国),根据文献 Sun 等^[9]介绍的最佳处理参数,选择超声强度为 30mW/cm²、频率为 1.5MHz,脉冲宽度为 200 μ s,每日 1 次,每次 10min。超声组:采用普通耦合剂行同实验组一样参数的超声治疗,每日 1 次,每次 10min。对照组:对造模术后大鼠骨折端行假刺激,予没有输出的超声辐射头加普通耦合剂,每日 1 次,每次 10min。

1.4 标本制备

于术后 10d、20d、30d 处死各组大鼠各 3 只,截取含骨折部分在内的股骨段 1—2cm,剔除软组织。标本置入 10%中性福尔马林液中固定 24h,然后置于 EDTA 脱钙液(由 EDTA、水、NaOH 按一定比例配制)中脱钙 30d,脱钙后标本经彻底冲洗,沿胫骨中轴矢状面剖开,经酒精逐级脱水、透明、浸蜡后石蜡包埋,4 μ m 厚作连续切片,然后进行免疫组织化学染色。

1.5 免疫组化染色

组织切片经脱蜡、脱水后,分别经 3%甲醇-双氧水灭活内源性酶,0.1%胰蛋白酶消化,正常羊血清封闭非特异性染色,滴加第一抗体(兔抗鼠

Collagen-I 多克隆抗体 1:150)置湿盒内 4℃冰箱过夜后,加生物素化二抗羊抗兔 IgG),SABC 复合物各处理 20min。各步骤间用 PBS 洗 2min $\times$ 3 次,DAB 显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤后苏木素轻度复染、脱水、透明、封片。用 PBS 代替一抗体作为空白对照,阳性结果为组织中出现棕黄色颗粒,着色深度与 Collagen-I 表达程度(及浓度)成正比。II 型胶原的免疫组化染色同上。400 倍显微镜下,取每张切片骨折端边缘区域相互不重叠的 5 个视野,用高清晰度彩色病理图文分析系统 HPIAS-1000 测得光密度和阳性面积值,取均值。以上一抗及 SABC 试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.6 统计学分析

各组数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS10.0 统计软件,数据处理采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

10d 时 I 型胶原表达的平均光密度和阳性面积值在三组比较差异无显著性意义,II 型胶原表达的平均光密度和阳性面积值在实验组高于对照组($P<0.05$),超声组与对照组差异无显著性;20d 时 I 型胶原表达的平均光密度和阳性面积值意义实验组高于对照组($P<0.05$)、超声组与对照组比较差异无显著性意义,II 型胶原表达的平均光密度和阳性面积值实验组高于超声组($P<0.01$),明显高于对照组($P<0.05$)(图 1—3);30d 时 I 型胶原表达的平均光密度和阳性面积值在实验组高于超声组($P<0.01$),明显高于对照组($P<0.05$)(图 4—6),II 型胶原表达在三组比较差异无显著性意义。见表 1。

表 1 中药超声透入不同时间对各组 I、II 型胶原表达的影响

($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	I 型胶原		II 型胶原	
		平均光密度值	阳性面积值	平均光密度值	阳性面积值
对照组	9				
10d	3	0.0184 $\pm$ 0.0018	57869 $\pm$ 463	0.0284 $\pm$ 0.0019	69988 $\pm$ 398
20d	3	0.0359 $\pm$ 0.0017	78943 $\pm$ 596	0.0378 $\pm$ 0.0015	79858 $\pm$ 472
30d	3	0.0509 $\pm$ 0.0015	98714 $\pm$ 926	0.0488 $\pm$ 0.0017	86891 $\pm$ 618
超声组	9				
10d	3	0.0196 $\pm$ 0.0020	60123 $\pm$ 503	0.0296 $\pm$ 0.0016	70358 $\pm$ 710
20d	3	0.0365 $\pm$ 0.0021	76149 $\pm$ 728	0.0458 $\pm$ 0.0020 ^{①③}	82891 $\pm$ 618 ^{①③}
30d	3	0.0567 $\pm$ 0.0016 ^①	99304 $\pm$ 698 ^①	0.0499 $\pm$ 0.0017	87098 $\pm$ 549
实验组	9				
10d	3	0.0204 $\pm$ 0.0016	60381 $\pm$ 670	0.0325 $\pm$ 0.0018 ^①	71243 $\pm$ 708 ^①
20d	3	0.0401 $\pm$ 0.0020 ^①	80304 $\pm$ 486 ^①	0.0507 $\pm$ 0.0019 ^②	85090 $\pm$ 909 ^②
30d	3	0.0645 $\pm$ 0.0019 ^{②③}	101846 $\pm$ 806 ^{②③}	0.0509 $\pm$ 0.0016	87380 $\pm$ 872

与对照组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 与超声组比较: ③ $P<0.05$

3 讨论

骨折延迟愈合和不愈合一直是医学界面临的一个挑战。多年来,许多学者从基础与临床方面提出了多种促进骨折愈合的方法。中药超声透入疗法,是利

用超声的药透作用,将中药导入体内的一种方法,它将传统中医药与现代物理治疗技术有机地结合起来,达到治疗和促进骨折愈合的目的。理气活血、接骨续筋中药能通过调节 I、II 型胶原 mRNA 的表达



图1 胶原Ⅱ 实验组 20d
(免疫组化染色, ×200)



图2 胶原Ⅱ 超声组 20d
(免疫组化染色, ×200)



图3 胶原Ⅱ 对照组 20d
(免疫组化染色, ×200)



图4 胶原Ⅰ 实验组 30d
(免疫组化染色, ×200)



图5 胶原Ⅰ 超声组 30d
(免疫组化染色, ×200)



图6 胶原Ⅰ 对照组 30d
(免疫组化染色, ×200)

水平,使软骨修复提早进入骨化及塑形期,从而促进骨折修复,加强骨折愈合^[6]。超声能促进成骨细胞和内皮细胞分泌血小板源性生长因子,后者可以通过促进不成熟成骨细胞分化成熟,诱导其生成Ⅰ型胶原,促进骨痂中软骨形成和骨膜内化骨^[7-8]。同时,超声波特有振动电位、声流作用及机械振动所致的细微按摩作用^[9],使细胞膜通透性增加,中草药更易从细胞间隙透入细胞内,在超声波自身治疗及中药协同作用下,对骨折进行有效的治疗,从而促进骨痂生长、骨折愈合。魏晓燕等^[12]的临床研究显示,中草药超声透入能明显缩短骨折愈合时间,促进骨痂生长和患肢功能恢复。本研究实验组Ⅰ型胶原在30d时表达强于单纯超声组,明显强于对照组;Ⅱ型胶原在20d时表达强于单纯超声组,明显强于对照组,从组织分子的角度证实了这一方法的有效性。

胶原是骨基质中的重要组成部分,它构成了骨组织的蛋白框架,是钙盐沉积的场所,对维持骨的生物力学性能具有重要意义。胶原在骨折愈合过程中的作用目前不是很清楚。一般认为,在骨折愈合的软骨形成期,Ⅱ型胶原是主要胶原,由成软骨细胞分泌,在骨折后第2周,Ⅱ型胶原的mRNA迅速增加^[10],在骨膜表面形成的基质成分可作为成骨细胞移行,毛细血管长入的基质结构,为软骨钙化、软骨移除及骨形成奠定基础。在骨折愈合的成骨阶段,Ⅰ型胶原是主要胶原,由成骨细胞分泌,在新骨替代软骨痂之后,新形成的骨基质主要由Ⅰ型胶原构成^[11];Ⅰ型胶原是成骨细胞表型成熟和钙结节形成的基本保障,在促进成骨细胞分化和增强成骨细胞黏附能力方面发挥着重要作用^[12]。

在本实验中,与对照组相比,中药超声透入明显促进了Ⅰ、Ⅱ型胶原的表达。免疫组化染色提示:Ⅱ型胶原在10d时开始合成增多,到20d时达高峰;Ⅰ

型胶原在20d时开始合成增多,到30d时达高峰。提示Ⅰ型胶原表达在骨化及塑形期最明显,Ⅱ型胶原表达在软骨修复期最明显,这一结果与Scandberg^[13]和Hiltunen^[14]研究的结果及董清平等^[15]研究结果相吻合。

综上所述,中药超声透入有促进骨折愈合的作用,其机制有可能是:在早中期促进Ⅱ型胶原表达,在中后期促进Ⅰ型胶原表达。

参考文献

- [1] 汤荣光,罗建中,郑昱新,等.低强度超声波对骨折愈合中胶原代谢影响的实验研究[J].中国骨伤,2001,14(12):733—735.
- [2] 魏晓燕,韩洪舜,韩靖,等.中草药超声透入促进骨折愈合的临床研究[J].现代中西医结合杂志,2003,12(2):139—140.
- [3] Yang KH, Wang SJ, Lewallen DG, et al. Exposure to low-intensity ultrasound increase aggrecan gene expression in a rat femur fracture model[J]. J Orthop Res, 1996, 14:802—809.
- [4] Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, et al. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model[J]. J Orthop Res, 1994, 12:40—47.
- [5] Sun JS, Hong RC, Chang WH, et al. In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells [J]. J Biomed Mater Res, 2001, 57:449—456.
- [6] Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing [J]. Clin Orthop, 1998, 355(suppl 17—21).
- [7] Shimazaki A, Lunl K, Azuma Y, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits [J]. J Bone Joint Surg (Br), 2000, 82: 1077—1082.
- [8] 张超,梁国穗,张颖恺,等.低强度超声波刺激对人骨髓基质细胞和骨膜细胞生物学效应的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27:657—660.
- [9] 张小斌,王坤正.低强度超声在骨折愈合中的作用[J].中华物理医学与康复杂志, 2003, 25(11): 701—702.
- [10] Scandberg M, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair[J]. Clin Orthop, 1993, 289—292.
- [11] Ashhurst DE. Collagens synthesized by healing fractures[J]. Clin Orthop, 1990, 255—273.
- [12] 杨志明,余希杰,黄富国,等.外源性Ⅰ型胶原对人胚骨膜成骨细胞生物学特性的影响[J].华西医科大学学报,2001,32(1):1—4.
- [13] Scandberg M, Aro HT, Multimaki P, et al. In situ localization of collagen production by chondrocytes and osteoblasts in fracture callus[J]. J Bone Joint Surg (Am), 1989, 71(1):69—77.
- [14] Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice[J]. Clin Orthop, 1993, 297: 23—27.
- [15] 董清平,关智宇.骨痛仙胶囊对兔Ⅰ、Ⅱ型胶原蛋白mRNA影响的研究[J].中医药信息[J], 2005, 22:50—52.