

伤科接骨片治疗大鼠骨折模型的影像学评价

沈明勤, 王颖钰, 荆梅, 石磊, 王志刚, 罗宇慧

(江苏省中医药研究院, 南京 210028)

【摘要】 目的 借助于X-射线、CT扫描成像、MRI等医学成像技术评价中成药伤科接骨片对大鼠骨折模型的治疗作用。方法 大鼠麻醉后手术分离右前肢桡骨,于中段形成横断的完全骨折,随后随机分为模型组、药物治疗组,另设伪手术组进行平行对照。治疗组按0.33g/kg的剂量灌胃给药,模型组和伪手术组等量灌胃生理盐水,连续给药4周,给药结束后以X射线、CT和MRI图像观察和记录骨折部位的愈合情况。最后麻醉处死动物,经解剖取骨折部位进行抗折力测定和HE染色的病理组织学检查。结果 X射线、CT和MRI检查结果清楚地表明,给药治疗后骨折部位可见有明显的致密性骨痂形成,骨折线模糊不清或消失,多数可见大量的钙盐沉积,趋于愈合,与骨折部位的病理组织学检查结果基本一致。结论 借助于医学影像技术可以更加客观地评价药物对大鼠骨折模型的治疗作用,尤以CT四维成像技术更加直观、清晰,值得进一步地推广应用。愈合后的前肢桡骨的抗折力也明显地增强。

【关键词】 伤科接骨片;骨折;大鼠模型;影像学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0091-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.017

Imaging evaluation of the therapeutic effect of a Chinese medicine, Shangke Jiegu Tablet, on the rat model of bone fracture

SHEN Ming-qin, WANG Yin-yu, JING Mei, SHI Lei, WANG Zhi-gang, LUO Yu-hui

(Jiangsu Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the therapeutic effect of a Chinese medicine, Shangke Jiegu Tablet, on the rat model of bone fracture. **Methods** After anesthesia, complete transverse fracture of the middle portion of the radius in the right forelimb was made in rats. The rats were randomly divided into three groups: model group, treatment group and sham operation group as control. Each group included 20 rats, half male and female. The rats in the treatment group were intra-gastrically administered the drug in a dose of 0.33 g/kg once daily for 4 weeks, while the model and sham operation groups were given normal saline. After the end of drug administration, images of X-ray, CT and MRI were taken to record the healing of the bone fracture. Finally the rats were sacrificed by anesthesia, and the bones were taken for anti-rupture strength test and routine histopathological examination. **Results** The imaging examinations clearly showed dense callus formation at the fracture site, and the fracture line was blur or disappeared. Calcium deposition was observed in most fracture sites. It was consistent with the results of histopathological observation. The anti-rupture strength of the healed bones was also obviously increased in the treatment group. **Conclusions** Medical imaging techniques can be used to more objectively evaluate the therapeutic effects of drug therapy for bone fracture. Especially, the 4-dimensional CT imaging can more clearly and directly reveal the healing process of bone fracture, and is worth of popularization and application.

【Key words】 Shangke Jiegu Tablet; Bone fracture; Rat model; Medical imaging; Histopathology; Therapy

[基金项目]江苏省科技公益专项基金资助(编号:BM2007506)。

[作者简介]沈明勤(1963-),男,研究员,研究方向:中药药理,E-mail:mqshen@163.com

大鼠骨折模型是常用的动物实验模型,目前常用 X-射线摄影的医学影像学方法记录和评价模型的形成和愈后等情况^[1,2]。但因为大鼠的骨骼偏小,X-射线摄像的清晰度、分辨率均不太理想,且为二维图像无法反映其三维特征,甚至影响了对实验结果的判断和评价。随着医学影像技术的不断发展,CT、MRI 等影像技术在医学诊断中得到了广泛的应用。笔者在实验工作中尝试运用 CT 扫描四维成像技术和核磁共振影像技术对大鼠骨折模型进行了影像学评价,与 X-射线摄像技术进行了比较,并用临床上广为应用的治疗药物伤科接骨片对大鼠模型进行治疗后,对骨折恢复的重要环节进行了多方面的综合评价,为先进科学技术在动物实验中的应用进行了探索性研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重(雌性 250~270 g,雄性 260~280 g),上海斯莱克实验动物有限公司提供[SCXK(沪)2012-0002];实验在本院 SPF 级屏障环境动物实验室进行[SYXK(苏)2011-0015],并遵循实验动物使用的“3R”原则,给予人道主义的关怀。

1.1.2 主要仪器和试剂

Mammomat-1000 NOVA 型摄影 X 射线机;Siemens 公司(德国);Lightspeed VCT XT 型 64 排螺旋 CT;GE 公司(美国);Echospeed 型 1.5T 超导核磁共振仪;GE 公司(MRI,美国);Axioskope 2 型显微图象分析系统;Zeiss 公司(德国);伤科接骨片:0.36 g/片,大连美罗中药厂有限公司(中国);钙、磷测定试剂盒:南京建成生物工程研究所(中国)。

1.2 方 法

1.2.1 实验动物分组

大鼠购进后适应性饲养 1 周,取 60 只称重后按性别、体重随机分为 3 组:假手术组、模型组,伤科接骨片治疗组,每组各 20 只,雌雄各半,做好标记,分笼饲养,每周复称体重。

1.2.2 动物模型的制备

将模型组,治疗组大鼠按文献^[1]方法制备前右肢桡骨中段骨折模型:水合氯醛腹腔注射麻醉,右前臂脱毛,于右前臂前侧作直切口,切开皮肤及深筋膜,从拇展长肌及桡侧腕长伸肌之间分离,骨膜外暴

露桡骨,在双侧桡骨中段以骨钳折断,滴入 3~4 滴的青霉素液(40 万 U/mL)预防感染,然后逐层缝合,后肢连续 3d 肌注青霉素(40 万 U/只)预防感染。手术 3 d 后开始按组分别灌胃给药,方法如下:治疗组将伤科接骨片用蒸馏水配制成浓度为 0.033 g/mL 的混悬液,按 0.33 g/kg 的剂量灌胃给药,假手术组和模型组灌胃给予等体积的蒸馏水。各组每日灌胃给药一次,共 4 周,在本院 SPF 动物实验室正常喂养。

1.2.3 放射影像学检查(X 射线、MRI 和 CT 成像检查)

给药第 28 天,各组取 10 只大鼠(雌雄各 5 只)分别以 3.5% 浓度的水合氯醛按 3 mL/kg 腹腔注射麻醉后,分别进行 X 射线、核磁共振(MRI)和计算机扫描 CT 四维成像等放射影像学检查,检查各大鼠骨折部位的愈合和恢复情况,并参考文献方法^[1]进行 4 级评分。评分标准:1 分,骨折断面可见或边缘趋向性模糊,未见骨膜和骨痂形成;2 分,断面边缘模糊、不整齐,可见骨膜形成,少量骨痂形成;3 分,断面边缘接近消失,骨膜明显,骨痂量增多但尚未填满;4 分,断面边缘消失,骨膜近似正常,骨痂填满,与骨皮质相互连接。

1.2.4 血液和骨折部位检测标本的获取

给药四周后,每组各取 10 只大鼠(雌雄各 5 只),分别以水合氯醛麻醉后,腹主动脉抽取血液,约 3 mL 以 15% EDTA 抗凝,测定血小板聚集率、全血粘度(高切、中切、低切的切变率分别为 8、40、120 1/s)及血浆粘度,其余置于未加抗凝剂试管中,室温放置 60 min,3000 r/min 离心 5 min,取血清按试剂盒说明书的方法测定血清 Ca、P 的水平。

第 28 天取血后,离断大鼠腕肘关节,剔除附着的软组织,取完整左侧桡骨,将骨痂组织标本置于装有 4% 甲醛(pH 7.4)的洁净玻璃瓶中封口,置于 4℃ 冰箱中,固定 48 h 再将骨痂标本置于含 5% EDTA(乙二胺四乙酸)液中脱钙 30 d 左右。石蜡包埋,常规切片(矢状面),行 HE 染色,光学显微镜下观察骨痂生长情况。

1.2.5 生物力学特征—抗折力测试

给药结束后,每组另取 10 只大鼠(雌雄各 5 只),按上法解剖取完整的桡骨标本,然后将获取的桡骨架在两根铁棒之间,以桡骨骨折处为中心挂一根线绳,在线绳下端悬挂一个小桶,然后逐渐向小桶内加水,当水加到一定的重量时,该愈合的骨头就会

发生折断,然后称量小桶中所加的水的重量作为桡骨骨折造模抗折力的指标。

1.2.6 数据处理

各实验检测结果以 SPSS 13.0 软件进行方差分析和组间 *t*-检验统计学分析。

2 实验结果

2.1 大鼠骨折部位的 X 射线检查结果

X 射线检查结果表明:伪手术组大鼠的右前肢桡骨轮廓清晰、光滑,结构完整,未见明显创伤。模型组大鼠的右前肢桡骨可见明显的创伤性骨折,为横断的完全骨折,多数有明显的错位,可见纤维性骨

痂形成,但骨折线明显可见。治疗组给药后骨折部位可见有明显的致密性骨痂形成,骨折线模糊不清或消失,多数可见大量的钙盐沉积,趋于愈合(见图 1)。

2.2 大鼠骨折部位的 CT 成像、MRI 检查结果

骨折部位的 CT 成像、MRI 检查结果基本与 X 射线检查结果基本一致,但 CT 成像更直观地反应了骨折部位的外膜轮廓愈合和恢复情况,且图像直观、清晰,可以从不同的角度和侧面反映骨折部位的愈合情况(见图 2)。而 MRI 图谱则更加清晰地反应了骨折部位内部的恢复情况,但图像清晰度稍差(见图 3)。



注:A 图为伪手术组 1 号大鼠;B 图为模型组 3 号大鼠;C 图为治疗组 6 号大鼠。

图 1 骨折大鼠 X-射线图

Note. Picture A is the No. 1 rat of sham group. B is the No. 3 rat of model group. C is the No. 6 rat of therapy group.

Fig. 1 X-ray pictures of the fracture rats



图 2 骨折大鼠 CT 成像图(注:大鼠的编号同图 1)

Fig. 2 CT images of the fracture rats(The number of rat is the same in Fig. 1)

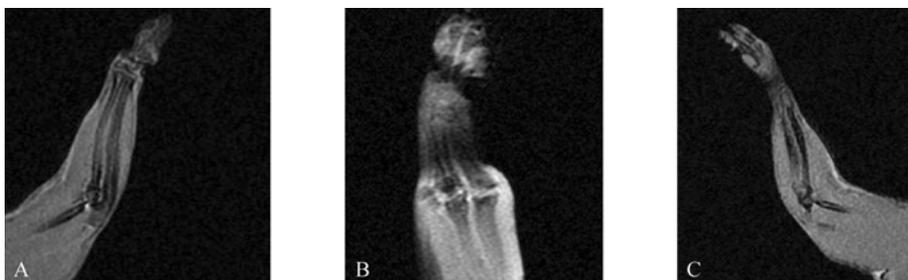


图 3 骨折大鼠 MRI 成像图(注:大鼠的编号同图 1)

Fig. 3 MRI images of the fracture rats(The number of rat is the same in Fig. 1)

2.3 对骨折部位的影像学评分结果

表 1 可见,治疗组的影像学评分明显高于模型

组,表明其愈合情况明显好于模型组。伪手术组因为没有骨折造模,全部分 4 分(见表 1)。

表 1 治疗后影像学评分结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Imaging scores after drug treatment

组别 Groups	平均积分 Average integral
伪手术组 Sham	4.0 ± 0.0 **
模型组 Model	2.1 ± 0.6
治疗组 Therapy	3.0 ± 0.7 **

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.表 2 对骨折模型大鼠全血粘度及血浆粘度的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Effect on whole blood and plasma viscosity in the fracture rats

组别 Groups	全血粘度 Whole blood viscosity (m Pa. s)			血浆粘度 (m Pa. s)
	低切 Low shear rate (8 1/s)	中切 Moderate shear rate (40 1/s)	高切 High shear rate (120 1/s)	
伪手术组 Sham	9.76 ± 1.66 **	5.46 ± 0.58 **	3.81 ± 0.38 **	0.85 ± 0.35 **
模型组 Model	16.67 ± 1.95	8.73 ± 0.67	5.78 ± 0.36	1.34 ± 0.26
治疗组 Therapy	12.63 ± 0.62 **	6.62 ± 0.35 **	4.11 ± 0.27 **	1.30 ± 0.15

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.5 对大鼠血小板聚集率的影响

表 3 可见,与模型组和伪手术组比较,治疗组血小板聚集率明显降低,有极显著意义 ($P < 0.01$),表明伤科接骨片可抑制血小板聚集,有明显的活血作用。在实验过程中,模型组有 2 只血液标本有凝集血丝,不能正常测定,故 $n = 8$ (见表 3)。

表 3 对骨折模型大鼠血小板聚集率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effect on platelet aggregation in the fracture rats

组别 Groups	标本数/只 Samples	血小板聚集率/% Platelet aggregation rate
伪手术组 Sham	10	50.14 ± 32.77
模型组 Model	8	59.54 ± 13.45
治疗组 Therapy	10	24.76 ± 7.54 **

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.6 对骨折模型大鼠血清 Ca, P 水平的影响

与模型组比较,治疗组大鼠的血清 Ca、P 水平均有明显升高 ($P < 0.05 \sim 0.01$);甚至略高于伪手术(正常对照)组的水平,表明服用伤科接骨片后可以促进 Ca、P 的吸收,有益于骨折创伤的恢复(见表 4)。

表 4 对骨折模型大鼠血清 Ca, P 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 4 Effect on the serum Ca and P levels in the rats

组别 Groups	Ca /mmol/L	P /mmol/L
伪手术组 Sham	2.45 ± 0.07	2.32 ± 0.47
模型组 Model	1.93 ± 0.41	2.28 ± 0.35
治疗组 Therapy	2.68 ± 0.11 *	2.77 ± 0.43 **

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.7 骨折部位生物力学检测——抗折力测试结果

实验结果表明,模型组大鼠骨折部位的抗折力

2.4 对大鼠全血及血浆粘度的影响

表 2 可见,与模型组比较,治疗量组全血粘度(高切,中切,低切)有明显的降低,差异有显著性 ($P < 0.01$),表明伤科片对骨折模型大鼠全血粘度的升高有一定的降低作用,对血浆粘度的升高其抑制作用不明显 ($P > 0.05$, 见表 2)。

显著下降,给药各组的抗折力比模型组均明显提高 ($P < 0.05 \sim 0.01$),高、中剂量组的愈合情况尤佳,但仍未恢复到正常动物的水平(见表 5)。

表 5 大鼠骨折部位抗折力测试结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 5 Anti-rupture strength of the fracture site of rats

组别 Groups	折断骨折部位的重量/g Weight used to the fracture site
伪手术组 Sham	1480.0 ± 45.0 **
模型组 Model	496.0 ± 247.1
治疗组 Therapy	874.1 ± 150.8 **

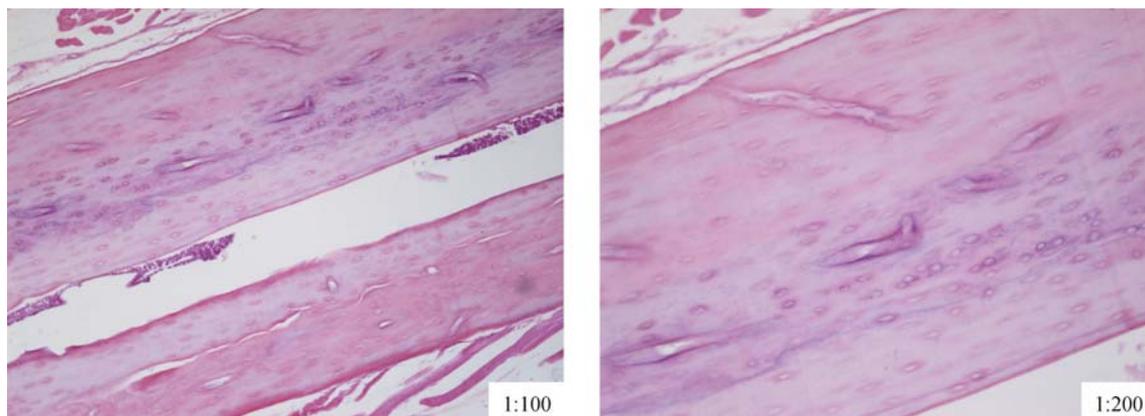
注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.8 对骨折部位的病理组织学检查结果

病理组织学检查结果提示:伪手术组大鼠的右前肢桡骨的病理切片可见骨密质呈板层状,骨结构完整,骨髓腔清晰,骨皮质连续,骨小梁排列整齐,骨组织无缺损,结构正常。造模各组大鼠骨折部位的骨髓腔均消失,其中模型组以纤维骨痂为多,可见大片的纤维性骨痂和少量的骨小梁残留;治疗组大鼠可见骨性和软骨骨痂形成,多数骨小梁长成且排列较齐,仅有 2 只大鼠的骨小梁排列稍乱,骨折的愈合情况明显好于模型组(见图 4)。

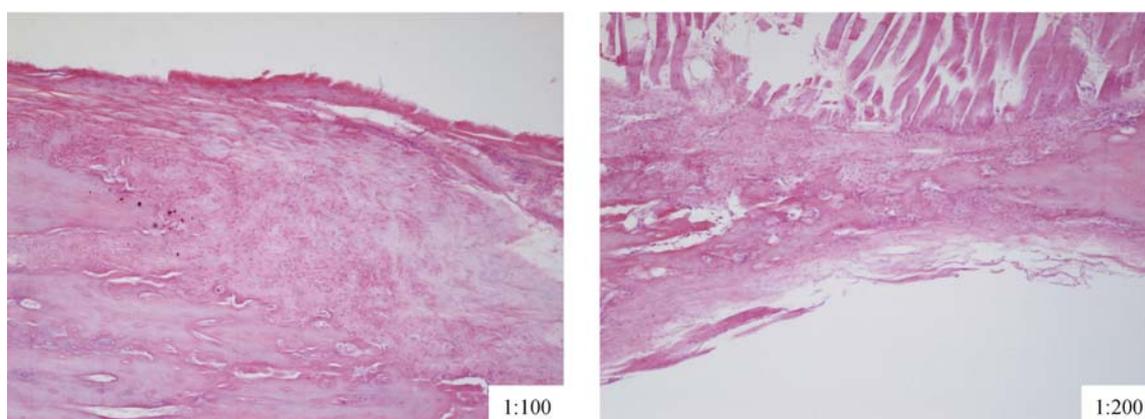
3 小结与讨论

骨折是临床上多见的创伤性疾病,其愈合过程是复杂的骨组织结构和生物力学不断恢复的过程^[3]。在骨折初时,因骨骼及周围组织血管断裂、出血而在局部形成瘀肿,并逐渐形成含有网状纤维素的凝块,约 24 h 后新生毛细血管、成纤维细胞和吞噬细胞开始侵入,使血肿块机化,被机化的血肿块



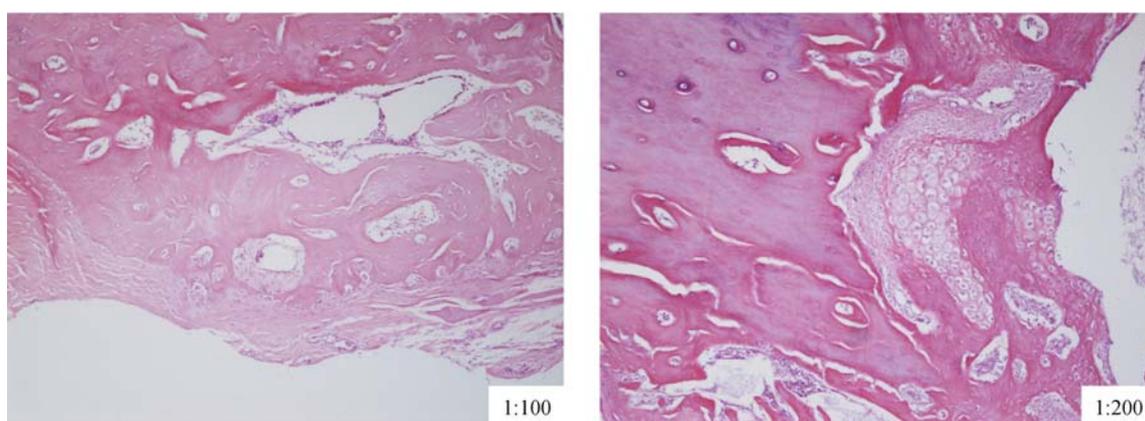
注:伪手术对照组:骨髓腔清晰,骨皮质连续,骨小梁排列整齐。

Note. Sham group: Clear bone, medullary cavity continuous, cortical bone and regularly arranged bone trabeculae.



注:模型组:大面积纤维性骨痂,偶见少量的骨小梁残留。

Note. Model group: a large area of fibrous callus, and scarcely seen residual bone trabeculae.



注:治疗组:骨性骨痂形成,部分为软骨骨痂,骨小梁生成,排列整齐

图 4 骨折大鼠的病理组织切片图

Note. Treatment group: bone callus formation, some are cartilage callus, and bone trabecular formation regularly arranged.

Fig. 4 Histopathological changes in the bones of fracture rats

和肉芽组织再演变为纤维结缔组织,形成骨折端的纤维化愈合^[4]。其后骨折部位的骨内膜及骨外膜的成骨和成软骨细胞开始发生,产生骨化组织,填充

在骨折端的空隙,形成内、外骨痂,并沿着骨皮质的髓腔侧和骨膜侧向骨折线生长,逐步会合并不断钙化。骨折间隙早期形成的纤维组织也逐步转化成软

骨组织,进而钙化成骨痂,同时新生的骨小梁不断增加,骨痂也逐步骨化形成骨连接,终至骨折愈合^[5,6]。实验中选择的“伤科接骨片”由红花、炙没药、三七、煅自然铜、马钱子粉、炙乳香、土鳖虫、冰片等中药精制成,有“活血化瘀,消肿止痛,舒筋接骨”的功效,是临床上常用的治疗骨折的中成药。其中的红花、没药、三七、冰片等活血化瘀中药在骨折早期可发挥化瘀、消肿、止痛的作用,而煅自然铜、乳香、土鳖虫等中药则对其后的骨痂形成及骨化、骨小梁生成等有一定的促进作用。实验研究结果进一步确证了其功效,表明伤科接骨片口服给药后可促进骨折模型大鼠的创口形成骨性和软骨性骨痂,促进骨小梁的生成和钙盐沉积,使愈合后的骨折部位的生物力学特征——抗折力明显增强,进而加速其愈合。这些药效作用可能与全方的活血通络、促进骨折断端钙磷的沉积和纤维骨痂组织的钙化等有关,其作用的机理有待进一步地研究和分析。

通过对大鼠骨折模型的 X-射线、CT 四维成像和 MRI 图像的比较,发现 X-射线图为二维图像,远不及 CT 成像对大鼠骨折及愈合情况表达的清晰、直观和全方位。而 MRI 图像需要用特殊的动物专用小线圈,价格昂贵,目前难以推广,且其图像的清晰度、分辨率和直观表达也需要进一步地提升。CT 四维成像是先将 X 线束对物体扫描后,由探测器接收透过该层面的 X 线,转变为可见光,由光电转换器转变为电信号,再经模拟/数字转换器转为数字信

号,输入计算机进行处理,最终形成清晰的全方位四维动画图像,从而更加清晰、直观地反映骨折的愈合情况,值得进一步地推广应用。当然,CT 四维成像可能对愈合期骨痂和成骨的区分不够清晰,有文献报道^[4]正常的骨痂 CT 阈值约在 225 ~ 330 之间,而成熟骨组织的 CT 值则在 331 ~ 700 之间,因此可以运用多阈值分析法分别对骨痂和成熟骨组织进行表达。另外,也需结合生物力学、病理组织学等检查综合评价骨折的修复情况。

参 考 文 献

- [1] 王羿. 补肾活血法对大鼠骨折愈合影响的 X 线影像学研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 34(4): 18-21
- [2] 王羿, 何先游, 苏军. 布依药鹿角壮骨煎液对大鼠骨折模型愈合的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(2): 260-263.
- [3] Li C, Ominsky MS, Tan H L, et al. Increased callus mass and enhanced strength during fracture healing in mice lacking the sclerostin gene [J]. Bone, 2011, 49(6): 1178-1185.
- [4] 毕龙, 王军, 钦逸仙. 显微 CT 多阈值分析评价骨折愈合效果 [J]. 中国体视学与图像分析, 2012, 17(3): 200-206
- [5] Chao EY, Inoue N. Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodeling [J]. Eur Cells Materials, 2003, 31(6): 72-84.
- [6] 陆永江, 刘华. 唑来膦酸对去势大鼠骨折后骨痂和骨微结构的影响 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(6): 11-14.

[收稿日期] 2014-09-09