

骨碎补联合羟基磷灰石-壳聚糖支架修复兔大段骨缺损的实验研究

庞呈祥^{1,2} 姜红江^{1,2} 王亚楠^{1,2} 鞠昌军^{1,2} 余昕^{1,2} 侯燕^{1,2} 王一迪^{1△}

[摘要] 目的:探索中药骨碎补联合羟基磷灰石-壳聚糖支架修复兔大段骨缺损的可行性。方法:取 24 只新西兰大白兔,用电锯在双侧桡骨中段制造 1.5 cm 长的骨缺损区,选择左侧骨缺损旷置(作为空白对照),右侧植入羟基磷灰石-壳聚糖支架,无差别平分成两组。观察组(A组)给予骨碎补煎液(1 g/mL)灌胃(2次/d),每次灌胃剂量为 6.1 g/kg(约为 15 mL),对照组(B组)给予相应生理盐水灌胃(2次/d)。先后于术后第 4 周和第 12 周处死实验动物,分别记录 A 组、B 组右侧(植入支架侧)为 A1、B1, A 组、B 组左侧(空白对照侧)为 A2、B2,进行大体标本观察、X 线观察及组织学观察。结果:大体观察及 X 线片检查示术后第 4 周和第 12 周 A1 新生骨组织量明显多于 A2, B1 新生骨组织量明显多于 B2, A1 新生骨组织量多于 B1,且术后第 4 周和第 12 周 A1、B1 的 Lane-Sandhu-X 线片评分显著高于 A2、B2, A1 X 线片评分高于 B1,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。组织学观察显示术后第 4 周 A1 截骨处见较多新生骨组织,以软骨成骨方式向骨小梁过渡,支架降解明显; B1 截骨处见纤维性软骨,未见新生骨小梁,支架降解不明显;术后第 12 周 A1 截骨处见骨改造塑形及大量骨单位形成(以骨细胞为主), B1 截骨处见骨塑形较差,可见少量骨单位形成(以成骨细胞为主), A2 截骨断端处仅见较少的钙盐沉积, B2 截骨断端处未见新生骨组织及钙盐沉积,仅见少量胶原纤维。术后第 4 周和第 12 周 A1、B1 Lane-Sandhu 组织学评分显著高于 A2、B2,且 A1 明显高于 B1,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:羟基磷灰石-壳聚糖支架具有良好的生物相容性及骨传导能力,中药骨碎补(以灌胃方式给药)联合羟基磷灰石-壳聚糖支架能够促进骨缺损的新骨生成,缩短骨愈合时间,对兔大段骨缺损修复具有一定积极作用。

[关键词] 骨碎补;羟基磷灰石-壳聚糖;大段骨缺损;骨修复

[中图分类号] R318.08 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)09-0001-08

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.250901

Experimental Study on the Repair of Large Segmental Bone Defects in Rabbits by Drynaria Rhizome Combined with Hydroxyapatite-Chitosan Scaffolds

PANG Chengxiang^{1,2} JIANG Hongjiang^{1,2} WANG Yanan^{1,2}
JU Changjun^{1,2} YU Xin^{1,2} HOU Yan^{1,2} WANG Yidi^{1△}

¹ Shandong Wendeng Orthopedic Hospital, Weihai 264400, Shandong China;

² Shandong Institute of Orthopedics and Traumatology, Weihai 264400, Shandong China.

Abstract Objective: To explore the feasibility of repairing large segmental bone defects in rabbits by combining traditional Chinese medicine Drynaria Rhizome with hydroxyapatite-chitosan scaffolds. **Methods:** 24 New Zealand large white rabbits were taken, and a 1.5 cm bone defect area was created in the middle radius bilaterally with a chainsaw. The left side of the bone defect was chosen to be left open (as blank control), and the right side was implanted with hydroxyapatite-chitosan scaffolds, and the observation group (group A) was given the decoction of Drynaria Rhizome (1 g/mL) by gastric gavage

twice a day with the dosage of 6.1 g/kg (about 15 mL) per gavage, and the control group (group B) was given the corresponding saline by gastric gavage twice a day, successively after the operation). The control group (group B) was given the corresponding saline by gavage twice a day, and the experimental animals were executed at 4 and 12 weeks after

基金项目:威海市中医药科技项目(2022N-36)

¹ 山东省文登整骨医院(山东 威海, 264400)

² 山东省中医骨伤研究院

△通信作者 E-mail: 1370368678@qq.com

the operation, and the right sides of group A and group B (implanted stent side) were recorded as A1 and B1, and the left sides of group A and group B (blank control side) were recorded as A2 and B2, respectively, and the macroscopic specimens, X-ray observation, and histology were carried out. **Results:** Gross observation and X-ray examination showed that the amount of new bone tissue of A1 was significantly more than that of A2, and the amount of new bone tissue of B1 was significantly more than that of B2 at 4 and 12 weeks after surgery, and the Lane-Sandhu-X-ray scores of A1 and B1 were significantly higher than those of A2 and B2 at 4 and 12 weeks after surgery, and the A1 X-ray score was higher than that of B1, and the differences were all statistically significant ($P < 0.05$). Histological observation showed that more new bone tissue was seen at the A1 osteotomy at 4 weeks postoperatively, transitioning to trabeculae in a cartilaginous osteogenic manner, with obvious scaffold degradation; fibrous cartilage was seen at the B1 osteotomy, with no new trabeculae, and the scaffold degradation was not obvious. Bone remodeling was seen in A1 osteotomy at 12 weeks postoperatively, with a large number of bone units formed, dominated by osteoblasts, while poorer bone remodeling was seen in B1 osteotomy with a small amount of bone unit formation, dominated by osteoclasts, with A2 osteotomy dominated by osteoblasts. Osteoblasts were predominant, only a small amount of calcium salt deposition was seen at the A2 osteotomy, and no new bone tissue or calcium salt deposition was seen at the B2 osteotomy, only a small amount of collagen fibers were seen. The histologic scores of A1 and B1 Lane-Sandhu were significantly higher than those of A2 and B2 at 4 and 12 weeks after surgery, and A1 was significantly higher than B1, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Hydroxyapatite-chitosan scaffold has good biocompatibility and osteoconductivity, and the combination of traditional Chinese medicine *Drynaria Rhizome* with hydroxyapatite-chitosan scaffold in the form of gavage administration can promote the generation of new bone in the bone defect and shorten the time of bone healing, which has a certain positive effect on the repair of large segmental bone defects in rabbits.

Keywords: *Drynaria Rhizome*; hydroxyapatite-chitosan; large segmental bone defects; bone repair

对于长骨的大段骨缺损^[1],目前临床上常见的处理方法主要有自体骨移植、同种异体骨移植与人工材料填充^[2],但这3种方法均存在一定的弊端。自体骨来源受限,对自身会产生新的创伤;同种异体骨存在免疫排斥与传播疾病的风险,深部血管化非常缓慢,常形成死骨或出现骨吸收,再骨折率会增高;人工材料则无法完全模拟人体骨的多层次构造与生物学特性。近年来,研究者目光聚焦于将中药与骨组织工程相结合的领域,以用于修复大段骨缺损^[3-4]。合成的羟基磷灰石生产成本较高且制作过程复杂,而天然羟基磷灰石可以使用加工处理后的猪骨头制作^[5],猪骨型羟基磷灰石(Porcine Bone Hydroxyapatite, PBHA)优点包括生产成本低,生产工艺相对简单,绿色环保,来源广泛,处理后具有良好的骨传导性和生物相容性。骨碎补作为传统“补肾壮骨”中药,是蕨类植物槲蕨的干燥根茎,有补肾强骨、活血续伤的功效^[6-7],其主要活性成分为骨碎补总黄酮(Total Flavonoids of Rhizome *Drynariae*, TFRD),具有抗骨质疏松、促进骨折愈合等功效^[8-12]。本实验通过结合中药骨碎补与羟基磷灰石在促进骨愈合方面的各自优势,为临床治疗人体四肢大段骨缺损提供可供参考的动物实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

于济南西岭角养殖繁育中心购得24只健康的3个月龄新西兰大白兔,雌雄不限,体重为2.0~2.5 kg,普

通级笼养。所用实验动物品种、规格、处死方法等均符合动物伦理学要求。实验通过山东省文登整骨医院伦理委员会批准,批准号为LL20220603。动物生产许可证号为SCXK(鲁)20200004。

1.2 药品及试剂

壳聚糖(Chiston, CS),平均相对分子质量为 3.5×10^6 ,脱乙酰度85%,购自济南海得贝海洋生物工程有限公司;猪骨型羟基磷灰石,猪骨经过脱脂、煅烧后制成猪骨型羟基磷灰石,将猪骨型羟基磷灰石用行星球磨机磨成粉;骨碎补饮片来自山东省文登整骨医院中药房;注射用青霉素钠(批号为210107,华北制药股份有限公司, 80×10^4 U/瓶);戊巴比妥(批号为2103071,天津金耀);0.9%氯化钠注射液(批号为2101010523,辰欣药业)。

1.3 实验仪器

医用数字化X线机(荷兰飞利浦公司),苏木精-伊红(HE)染色切片由山东省文登整骨医院病理科制作;病理切片机(Leica公司,德国);显微镜(Olympus公司,日本)。

1.4 方法

1.4.1 造模与分组 取24只3个月龄新西兰大白兔,体重为2.0~2.5 kg,随机分为A、B两组,每组12只;用自身对照法,右侧为实验侧,骨缺损处置入羟基磷灰石-壳聚糖支架;左侧为对照侧,骨缺损处旷置,作为空白对照。A组作为观察组,给予骨碎补总黄酮药

液约 15 mL 灌胃, 2 次/d; B 组为对照组, 给予相同剂量的生理盐水灌胃, 2 次/d; 对 24 只大白兔经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉, 消毒双侧前肢, 切开皮肤、皮下组织至骨面, 显露桡骨中段, 利用电锯形成双侧桡骨 1.5 cm 的骨缺损, 右侧桡骨中段截骨处植入制备好的羟基磷灰石-壳聚糖支架, 左侧桡骨中段截骨后旷置, 逐层缝合筋膜、皮下组织及皮肤 (见图 1)。术后给予 A、B 两组大白兔双前肢佩戴石膏保护性制动, 石膏开槽以便左右前肢截骨处换药及观察, 术后 3 d 肌注抗生素青霉素钠 4×10^4 U/只, 1 次/d, 术后不限制活动, 分笼饲养。

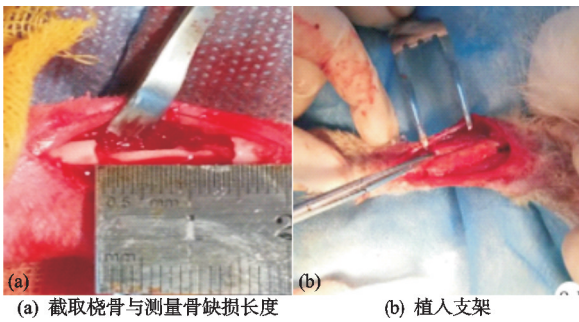


图 1 骨缺损造模过程与植入支架

1.4.2 支架及药物制备 支架的制备: 本实验用冷冻干燥法制备支架 (羟基磷灰石-壳聚糖支架), 具体方法为往壳聚糖中倒入 2% 醋酸溶解稀释, 配成 2% 壳聚糖溶液, 按质量比 1:50 将壳聚糖与猪骨型羟基磷灰石粉末混合, 不断搅拌混合均匀后得到黏稠性液体。将混合液倒入模具里, 用液氮冷却 5~6 min, 将模具中的产物取出后在真空状态下低温干燥 48 h (真空干燥 24 h 后对托盘加热), 即得到多孔支架 (羟基磷灰石-壳聚糖支架)^[13]。

骨碎补溶液的制备: 取 100 g 中药骨碎补饮片加三蒸水于煎锅中浸泡 60 min, 开始大火煮沸后转文火煎煮 30 min, 滤出药液备用; 于煎锅中再加水二煎 20 min, 再次滤出药液, 与一煎药液混合, 文火煎煮浓缩至 100 mL 的骨碎补溶液^[14], 含药量为 1 g/mL。假定成人标准体重约 60 kg, 大白兔平均体重约 2.5 kg, 剂量按人兔等效剂量换算方法计算^[15], 得到大白兔灌胃剂量 (6.1 g/kg) 约为 15 mL。

1.4.3 标本采集 A、B 两组分别于术后第 4 周和第 12 周对 6 只大白兔采用空气栓塞法处死, 完整截取大白兔双侧前肢, 分离出尺桡骨, 以便于各项指标的测定。

1.5 观察指标

1.5.1 大体观察 肉眼观察术后第 4 周和第 12 周大白兔截骨处植入的支架吸收情况, 颜色及体积变化, 截骨区边缘新骨生长情况, 骨痂生成情况, 周围软组织与材料的关系, 并观察截骨旷置处新骨生长情况及软组织愈合情况。

1.5.2 X 线片观察 A、B 两组术后第 4 周和第 12 周各处死 6 只大白兔后, 立即摄双侧前肢正位 X 线片 (以截骨区为中心), 观察骨缺损愈合情况。曝光条件: 电压 52 kV, 曝光量 5.18 mA·s, 距离 100 cm, 曝光时间 0.05 s。采用 Lane-Sandhu X 线评分标准进行 X 线评分 (见表 1), 由同一影像学专业医师在盲法下进行评分。X 线评分分值越高, 则说明骨缺损修复愈合越好。

表 1 Lane-Sandhu X 线评分标准

分类	标准	分值/分
	无骨形成	0
骨形成	骨形成占缺损 25%	1
	骨形成占缺损 50%	2
	骨形成占缺损 75%	3
	骨形成充满缺损	4
骨连接	骨折线清楚	0
	骨折线部分存在	2
	骨折线消失	4
骨塑形	未见骨塑形	0
	骨髓腔形成	2
	皮质骨塑形	4

1.5.3 组织学观察 A、B 两组术后第 4 周和第 12 周各处死 6 只大白兔, 然后截取双侧桡骨置于 10% 中性甲醛缓冲溶液固定, 20% EDTA 脱钙、浸蜡、透明、石蜡包埋, 沿标本纵向连续切片 (厚 5 μm), HE 染色后光镜下观察缺损修复情况。A、B 两组术后第 4 周和第 12 周各选取 6 只实验兔。依据 Lane-Sandhu 组织学评分标准 (见表 2), 由同一病理科医师在盲法下对各组结果进行评分。

表 2 Lane-Sandhu 组织学评分标准

分类	标准	分值/分
连接情况	无成骨	0
	纤维连接	1
	骨与类骨连接	2
	骨连接	3
	骨干重建	4
松质骨	无骨细胞活性	0
	新骨早期聚集	1
	有活性的新骨聚集	2
	松质骨正在改造	3
皮质骨	松质骨完全形成	4
	无骨皮质形成	0
	骨皮质形成的早期表现	1
	骨皮质正在形成	2
	大部分被改造	3
	皮质完全形成	4

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较

采用LSD检验,检验水准 $\alpha=0.05, P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

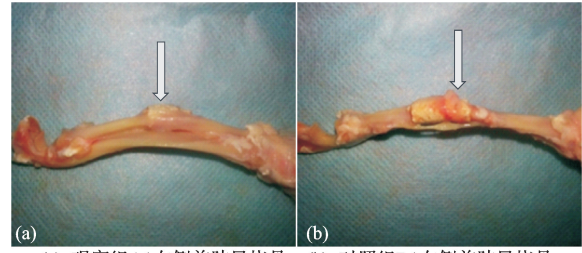
2.1 一般情况

术后各组大白兔均存活至相应实验结束时间,饲养过程中无自然死亡。术后 A、B 两组大白兔双前肢切口均愈合良好,无感染化脓及异常渗出,进食正常。

2.2 大体观察结果

A、B 两组大白兔术后第 4 周时,观察组 A1 植入的支架与宿主截骨断端结合紧密,表面由白色变为黄色,可见降解吸收;对照组 B1 植入的支架与宿主截骨断端结合不够紧密,表面仍为白色,与刚植入时支架的颜色相近,支架未见明显降解吸收(见图 2);术后第 12 周时,观察组 A1 植入的支架几乎全部降解吸收,大部分被新骨取代,与宿主骨之间连续性好,支架上爬行的新骨无论是外形、质地和颜色都与大白兔的正常桡骨相接近,而对对照组 B1 植入的支架表面由白色变为黄

色,可见降解吸收,未完全被新骨取代(见图 3)。

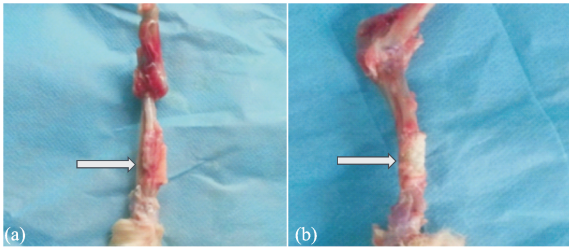


(a) 观察组A1右侧前肢尺桡骨; (b) 对照组B1右侧前肢尺桡骨 (白色箭头示植入支架与宿主截骨断端结合处)

图 3 术后第 12 周大体标本

2.3 X 线观察结果

术后第 4 周,观察组大白兔 A1 植入的支架与宿主截骨断端交界处可见早期骨再生,有骨痂形成,新生骨痂矿化密度相对较低,支架与宿主截骨断端交界处渐趋模糊;对照组 B1 植入的支架与宿主截骨断端交界处边缘清晰可辨,仅见散在钙化点,而观察组 A2 与对照组 B2 截骨区近端与远端未见形成骨连接,断端清晰,周围无骨痂及钙化点。术后第 12 周,观察组 A1 植入的支架与宿主截骨断端交界处完成了三维骨桥接,交界处缝隙消失,骨小梁结构呈定向排列特征;对照组 B1 植入的支架与宿主截骨断端的骨桥接较观察组 A1 差,交界处缝隙仍存在,宿主截骨断端硬化、萎缩,有明显骨吸收情况;而观察组 A2 与对照组 B2 骨缺损区近端与远端未见形成骨连接,仅观察组 A2 两断端可见少量的散在钙化点形成(见图 4)。



(a) 观察组A1右侧前肢尺桡骨; (b) 对照组B1右侧前肢尺桡骨 (白色箭头示植入支架与宿主截骨断端结合处)

图 2 术后第 4 周大体标本

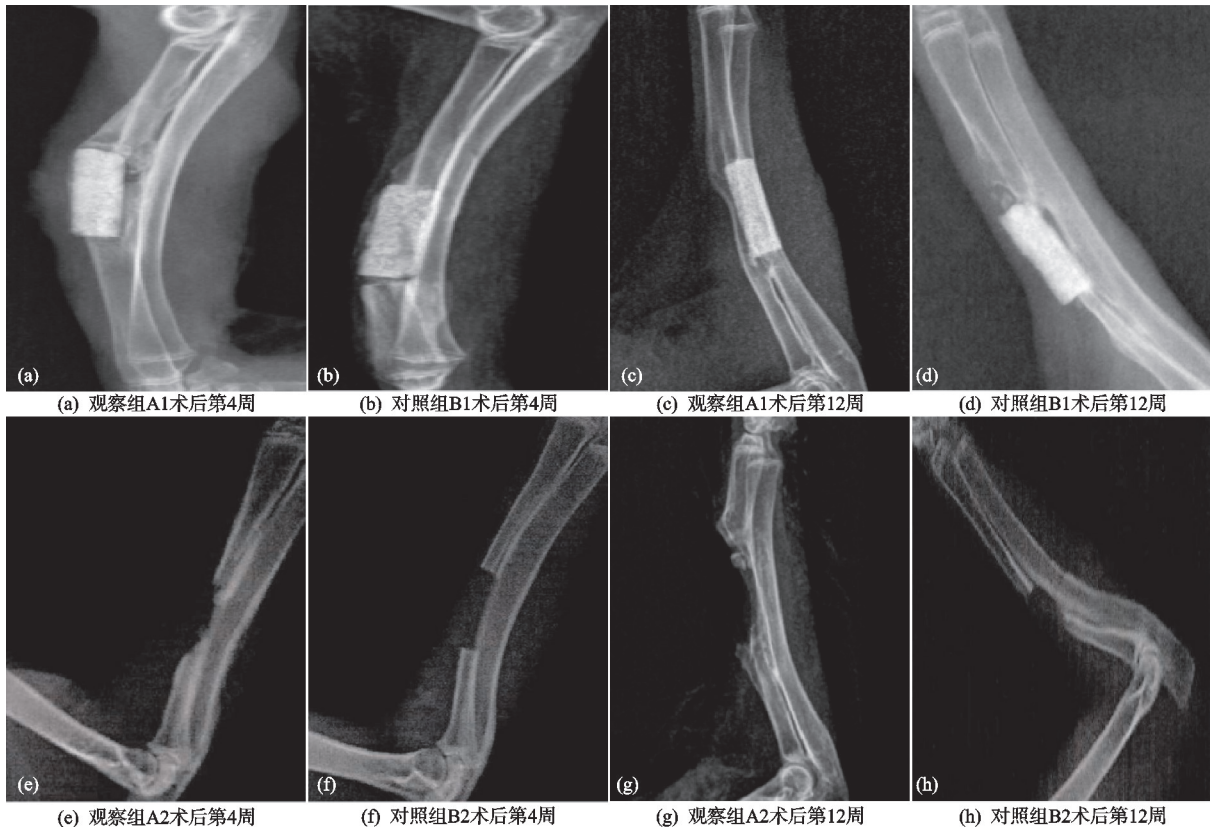


图 4 术后第 4 周和第 12 周观察组 A1、A2 及对照组 B1、B2 X 线片

观察组 A1 术后第 12 周 Lane-Sandhu X 线评分明显高于同组侧术后第 4 周,对照组 B1 术后第 12 周 Lane-Sandhu X 线评分明显高于同组侧术后第 4 周,且观察组 A1 在术后第 4 周和第 12 周 Lane-Sandhu X 线评分均高于同期对照组 B1,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);观察组 A1 及对照组 B1 术后第 12 周 Lane-Sandhu X 线评分均明显高于观察组 A2 及对照组 B2,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 术后 Lane-Sandhu X 线评分 ($n=6, \bar{x} \pm s$, 分)

组别	术后第 4 周	术后第 12 周
观察组 A1	3.42 ± 0.51 ¹⁾	10.33 ± 0.98 ¹⁾²⁾
对照组 B1	1.75 ± 0.62	7.58 ± 1.24 ²⁾
观察组 A2		1.50 ± 0.52
对照组 B2		1.39 ± 0.63

注:1)与同期对照组 B1 比较, $P < 0.05$;2)与同期观察组 A2 及对照组 B2 比较, $P < 0.05$ 。

2.4 组织学观察

术后第 4 周,观察组 A1 植入支架与宿主截骨断端交界处切片内呈现典型的软骨内骨化进程,可见由纤维性软骨骨痂逐渐向骨性骨痂过渡,其内可见连续过渡的骨小梁,成骨细胞多,胶原纤维丰富,大量毛细血管形成;对照组 B1 植入支架与宿主截骨断端交界处切片可见仍以纤维性连接为主,未见典型骨小梁结构,成骨细胞、胶原纤维及毛细血管均较少(见图 5)。

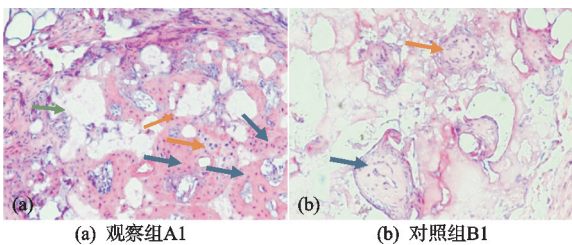


图 5 术后第 4 周组织切片 HE 染色观察(蓝色箭头示骨小梁,橙色箭头示成骨细胞,绿色箭头示胶原纤维,×100)

术后第 12 周,观察组 A1 植入支架与宿主截骨断端交界处切片内可见大量骨性骨痂连接形成网状骨小梁,局部钙盐沉积,可见成骨细胞及骨细胞,成骨细胞向骨细胞转化,以骨细胞形成为主;对照组 B1 植入支架与宿主截骨断端交界处切片内可见纤维性软骨骨痂逐渐向骨性骨痂过渡,其内可见过渡性骨小梁形成,并可见大量成骨细胞及极少骨细胞;A2 截骨断端处仅见较少的钙盐沉积,B2 截骨断端处未见新生骨组织及钙盐沉积,仅见少量胶原纤维(见图 6)。

观察组 A1 术后第 12 周 Lane-Sandhu 组织学评分明显高于同组侧术后第 4 周,对照组 B1 术后第 12 周 Lane-Sandhu 组织学评分明显高于同组侧术后第 4 周,且观察组 A1 在术后第 4 周和第 12 周 Lane-Sandhu 组织学评分均高于同期对照组 B1,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);观察组 A1 及对照组 B1 术后 12

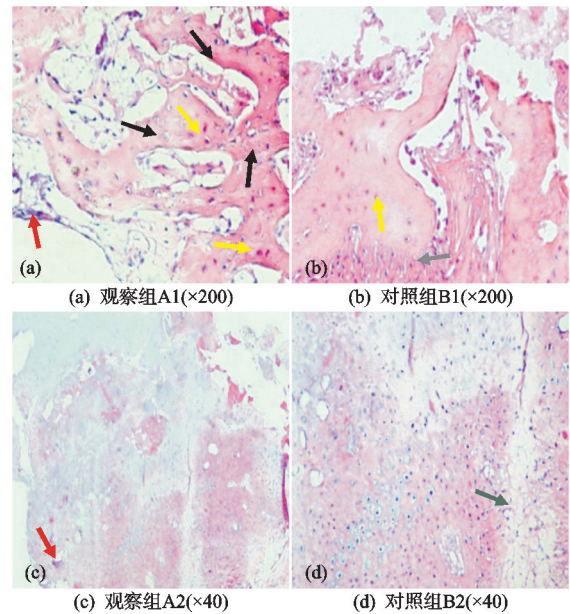


图 6 术后第 12 周组织切片 HE 染色观察(黑色箭头示网状骨小梁,灰色箭头示过渡性骨小梁,黄色箭头示骨状骨小梁,红色箭头示钙盐沉积,绿色箭头示胶原纤维)

周 Lane-Sandhu 组织学评分均明显高于观察组 A2 及对照组 B2,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 4。

表 4 术后 Lane-Sandhu 组织学评分 ($n=6, \bar{x} \pm s$, 分)

组别	术后第 4 周	术后第 12 周
观察组 A1	4.42 ± 0.71 ¹⁾	9.33 ± 0.78 ¹⁾²⁾
对照组 B1	2.25 ± 0.62	5.58 ± 1.14 ²⁾
观察组 A2		1.35 ± 0.42
对照组 B2		1.01 ± 0.12

注:1)与同期对照组 B1 比较, $P < 0.05$;2)与同期观察组 A2 及对照组 B2 比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

为解决人体四肢大段骨缺损的修复重建难题,不能直接对临床患者盲目操作,首先需要建立理想的骨缺损实验动物模型,较为常用的实验动物有鼠类^[16]、兔^[17]、犬和羊等;其中最常用的实验动物为鼠类,其多被用于颅骨缺损模型中^[18-19],但很少被选作四肢大段骨缺损的实验模型,因为鼠类体型较小,在制造长管骨大段骨缺损模型时手术操作难度较大,需要克服一定困难^[20]。故在既往的研究中,研究者多用新西兰大白兔建立长管骨大段骨缺损模型,该实验动物相对于鼠类,具有手术操作简便、模型稳定性较好等优点,骨缺损处不需要进行内固定处理,且对兔日常活动没有过多不利影响^[21]。对于兔长管骨骨缺损多大才需要修复重建,Bigham-Sadegh 等^[22]研究认为兔的桡骨缺损尺寸超过 10 mm 即无法自行愈合,还有一些实验研究在建立兔桡骨大段骨缺损模型时形成了 15 mm 的骨缺损长度^[23-24]。综合以往研究,本实验选择 15 mm 作为兔桡骨大段骨缺损的长度,这完全符合长管骨大段骨缺损的实验要求。

长管骨大段骨缺损的主要治疗方法包括自体骨植骨、同种异体骨植骨和骨组织工程化修复,自体骨是治疗骨缺损的金标准^[9],但其来源只可从自身获取,且可取骨量有限,对自身也会造成二次损伤。而异体骨为了降低移植排斥风险,需经灭菌、辐照等处理,从而失去了细胞活性,属于无活性骨。作为自体骨的替代物,人工复合材料具有无免疫排斥反应、来源广泛等优点,其中东南大学生物材料实验室自行设计和研制的一种新型材料——天然羟基磷灰石-壳聚糖复合材料已经获得国家专利^[25]。实验证明该材料无细胞毒性且无特殊致热源存在,具有良好的细胞相容性等生物学特性,可以作为组织工程的良好生物支架。

壳聚糖(Chitosan, CHI)是由甲壳素经化学改性得到的有广泛应用价值的天然生物多糖高分子材料,在生物医用领域展现出显著优势,其具有三大核心特性:1)良好的生物相容性,能与人体组织形成适应性界面;2)广谱抗菌特性,可预防伤口感染;3)促进组织再生能力,通过调控细胞加速修复进程。这些特性使其成为创伤修复和骨再生领域的理想辅助材料,特别是在辅助构建三维复合支架时,其既实现可控降解又不产生代谢毒性,目前已在骨科植入物表面修饰、药物缓释等方面取得重要应用进展^[26]。

“补肾壮骨”中药在促进骨折愈合、提高骨愈合质量与缩短骨愈合周期等方面有着巨大的应用潜力^[27],《黄帝内经》中最早提出肾为“藏精之所,主骨生髓”,为中医学治疗骨折和骨病奠定了理论基础^[28-29]。骨碎补具有补肾壮骨之功效,是补肾法的代表性药物之一。经长期临床验证,传统中药骨碎补在骨科疾病治疗中展现出独特的价值。针对骨代谢失衡引发的骨质疏松及骨修复障碍等病症,该药材因其使用简便、成本低廉且疗效显著等特点,被广泛应用于治疗创伤性损伤等疾病中。现代药物学研究表明,从骨碎补中可提炼出有效成分骨碎补总黄酮(Osteopractic Total Flavone, OTF),骨碎补总黄酮可抑制炎症因子的表达^[30],既可促进骨髓间充质干细胞向成骨方向转化,又能降低破骨细胞活性,可有效抑制破骨细胞造成的骨吸收^[31],促进肠道对钙的吸收和钙在骨内的沉积。也有研究发现骨碎补总黄酮可通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进成骨基因 β -catenin 及低密度脂蛋白受体相关蛋白-5(LRP5)的表达,下调 Wnt/ β -catenin 信号通路负性调节因子糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)的表达,并联合纳米骨材料促进 MC3T3-E1 细胞成骨细胞的增殖分化,为临床上利用骨组织工程技术治疗骨缺损性疾病提供了理论支撑^[32]。

随着近年来传统中医药理论与现代生物医学的深度整合与协同发展,从传统中药骨碎补的功效出发探

讨其治疗骨质疏松症、骨性关节炎、促进骨愈合等现代药理学机制,成为传统中医药理论现代化的新契机。例如姜红江等^[14]认为口服骨碎补煎液可以改善肠道菌群结构、增加肠道菌群丰富度和多样性,从而调控 Wnt/ β -catenin 等经典信号通路促进骨髓间充质细胞成骨分化以发挥防治骨质疏松、促进骨愈合的作用,对骨碎补“接骨续筋”之功效进行了微观层面的阐述。

为了解中药骨碎补是否具有毒副作用,赵晋宁等^[33]以鼠类为实验对象,对其用骨碎补总黄酮溶液短期灌胃,实验发现骨碎补总黄酮不具有急性毒副作用。而且长期灌胃也未发现骨碎补总黄酮对鼠类有明显的毒副作用^[34],药理学实验证明骨碎补提取液灌胃安全性是肯定的,为口服骨碎补提取液联合人工材料支架修复骨缺损提供了保障。也有研究表明骨碎补总黄酮可充当外源性生物活性因子,与仿生支架复合应用于骨缺损修复中,相较于传统经消化道口服给药模式,中药有效成分联合仿生支架具有药物浓度高、定向给药及作用周期长等优点,理论上其骨缺损修复效果确切。但骨的愈合再生与修复是一个相对复杂的生理过程,中药有效成分通过支架局部释放与中药经消化道口服促进骨修复的机制是否一致,两者之间是否存在效果差异,以及孰优孰劣尚不明确,有待进一步证实。

本实验是以骨碎补煎液灌胃联合羟基磷灰石-壳聚糖支架局部应用于兔大段骨缺损的修复,实验选用与人体骨骼的无机成分相似的猪骨型羟基磷灰石,其与壳聚糖作为材料制备支架,既可在体内降解又具备良好生物相容性及骨传导特性,于兔双侧桡骨中段形成 1.5 cm 的骨缺损构建大段骨缺损模型,有利于后期评价复合材料支架对骨缺损区的修复效果。

设置观察组及对照组中的空白对照侧 A2、B2 观察桡骨截骨后无支架植入缺损处愈合情况,既可以与本组内植入支架侧(A1 或 B1)进行对比观察,又可以与不同组的空白对照侧(A2、B2)进行对比观察,能够充分、客观地反映实验数据的准确性。观察组及对照组中的空白对照侧 A2、B2 术后第 4 周和第 12 周进行大体标本及 X 线观察,均见骨缺损区未形成骨连接,术后第 4 周观察组 A2 与对照组 B2 骨缺损区断端处清晰,周围无骨痂及钙化点形成,仅观察组 A2 术后第 12 周缺损区断端处附近可见少量的散在钙化点形成,无明显骨痂形成,说明本实验建立的兔大段骨缺损动物实验模型是可靠、可行的。

实验中 X 线片显示,术后第 4 周和第 12 周时观察组植入支架侧 A1 及对照组植入支架侧 B1 的骨修复重建情况明显优于观察组空白对照侧 A2 及对照组空白对照侧 B2,相应的影像学(Lane-Sandhu X 线)评分也更高,这说明相较于两组的空白对照侧,羟基磷灰

石-壳聚糖支架对修复骨缺损有促进作用,这与负霄等^[35]将纳米羟基磷灰石-壳聚糖支架植入兔桡骨缺损中得到良好骨愈合效果的实验结果相似。同时,观察组植入支架侧 A1 的修复重建骨缺损的效果明显优于对照组植入支架侧 B1,术后第 4 周及术后第 12 周,观察组植入支架侧 A1 的 Lane-Sandhu X 线评分明显高于对照组植入支架侧 B1,这说明骨碎补对骨缺损愈合亦有积极作用,能明显促进成骨,缩短骨修复重建时间,且术后第 12 周观察组空白对照侧 A2 断端 X 线观察可见少量散在钙化点形成,而对照组空白对照侧则无,也说明即使两组空白对照侧在没有植入支架的情况下,经灌胃给药骨碎补煎液也可以对骨缺损的修复产生一定的促进作用。HE 染色结果进一步证实了影像学检测结果,从组织形态学层面进一步证明观察组植入支架侧 A1 骨缺损间隙内新生骨质更多且矿化现象更明显,而对照组植入支架侧 B1 内新生骨质相对较少且成熟度不高。最后是观察组空白侧 A2 及对照组空白对照侧 B2 内可见大量结缔组织填充,未形成骨连接,观察组 A2 仅断端形成少量新生骨组织。

综上所述,1.5 cm 兔桡骨骨缺损长度达到建立大段骨缺损的动物实验模型的要求,羟基磷灰石-壳聚糖支架具有良好的生物相容性及骨传导能力,中药骨碎补以灌胃给药方式联合羟基磷灰石-壳聚糖支架能够促进骨缺损的新骨生成,缩短成骨时间,对大段骨缺损修复产生积极作用,其作用机制可能与激活转化生长因子 β /骨形态发生蛋白通路有关^[12]。本实验的不足之处:本实验中药骨碎补的给药方式为灌胃,经消化道灌胃给药的方式首先需要在胃肠被吸收进入血液,然后通过体循环到达骨缺损区域,并且需要一定时间才能达到最佳药效浓度,随后局部药物浓度及药效存在一定程度降低,峰谷效应较为明显,故能够维持药物峰值的时间相对较短,没有将中药骨碎补提取物联合生物支架以局部载药释放方式直接作用于骨缺损部位促进骨修复的疗效进行实验观察与比较,未来笔者将采用中药骨碎补提取物联合生物支架直接局部载药释放方式与灌胃给药方式对兔大段骨缺损的疗效进行对比研究,进而为后期的临床研究提供实验依据。

参考文献

[1] 关德强,于波.大段骨缺损修复的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(52):70-71.
 [2] 赵轶男,刘建,刘昌盛,等.不同孔径多孔 CPC 材料修复兔大段骨缺损的实验研究[J].中国矫形外科杂志,2012,20(10):924-927.
 [3] 许建中.骨组织工程相关研究新进展[J].中国修复重建外科杂志,2010,24(7):769-773.
 [4] 李琰,姜红江,孙鹏,等.骨碎补研究热点与趋势的文献挖掘及可视化[J].中国中医药现代远程教育,2023,21

(21):40-43.
 [5] 樊晓霞,任浩浩,陈抒天,等.不同来源天然骨磷灰石的材料学性能比较研究[J].生物医学工程学杂志,2014,31(2):352-356.
 [6] 邓志军,杨文龙,杨智军,等.骨碎补活性成分促进骨缺损后骨重建的机制及其组织工程学应用[J].中国药房,2024,35(8):1023-1028.
 [7] 谌顺清,梁伟,张雪妹,等.骨碎补化学成分和药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2021,46(11):2737-2745.
 [8] 曾志奎,熊伟,梁卫东,等.骨碎补总黄酮调控 H 型血管影响大鼠股骨 Masquelet 诱导膜模型的骨重建[J].中国组织工程研究,2024,28(32):5130-5135.
 [9] 陈家敏,朱洁英,庞祖才,等.骨碎补总黄酮及其成分柚皮苷促进牵张成骨新骨愈合作用比较[J].中华中医药学刊,2024,42(5):94-97.
 [10] 王杰,邹德宝,李琰,等.基于网络药理学结合实验验证探究骨碎补防治绝经后骨质疏松症的作用机制[J].湖南中医药大学学报,2022,42(9):1476-1484.
 [11] 申震,陈泽华,郭英,等.骨碎补总黄酮对牵张成骨模型大鼠中 H 血管及成血管-成骨耦联的作用[J].中华中医药杂志,2022,37(3):1352-1356.
 [12] 黄敏玲,卢赵琦,申震,等.骨碎补总黄酮干预 Notch 信号通路影响骨重建过程中成血管-成骨耦联[J].中国组织工程研究,2021,25(32):5116-5122.
 [13] 赵峰,尹玉姬,宋雪峰,等.壳聚糖-明胶网络/羟基磷灰石复合材料支架的研究——制备及形貌[J].中国修复重建外科杂志,2001,15(5):276-279.
 [14] 王杰,李琰,石威,等.基于肠道菌群的骨碎补抗绝经后骨质疏松症的机制研究[J].中国中医骨伤科杂志,2022,30(12):7-14.
 [15] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
 [16] 申震,郭英,姜自伟,等.基于骨组织工程技术比较骨碎补总黄酮两种给药方式修复大鼠大段骨缺损模型的效果[J].中国组织工程研究,2022,26(27):4346-4352.
 [17] 任广铁,周海宇,张苍宇,等.组织工程骨膜及脱蛋白骨修复兔桡骨大段骨缺损的早期观察[J].中国矫形外科杂志,2014,22(8):730-736.
 [18] KUROBANE T,SHIWAKU Y,ANADA T,et al. Angiogenesis involvement by octacalcium phosphate-gelatin composite-driven bone regeneration in rat calvaria critical-sized defect[J]. Acta Biomaterialia,2019,88:514-526.
 [19] HUI P L,LAI T Y,LIN Y L,et al. Parathyroid hormone gene-activated matrix with DFDBA/collagen composite matrix enhances bone regeneration in rat calvarial bone defects[J]. Journal of the Chinese Medical Association, 2017,81(8):699-707.
 [20] MATHIEU M,VÉRONIQUE V,ROMANO M,et al. A novel murine femoral segmental critical-sized defect model stabilized by plate osteosynthesis for bone tissue engineer-

- ing purposes[J]. *Tissue Engineering: Part C, Methods*, 2013, 19(4):271-280.
- [21] SHAFIEI-SARVESTANI Z, ORYAN A, BIGHAM S A, et al. The effect of hydroxyapatite-hPRP, and coral-hPRP on bone healing in rabbits; radiological, biomechanical, macroscopic and histopathologic evaluation[J]. *International Journal of Surgery*, 2012, 10(2):96-101.
- [22] BIGHAM-SADEGH A, KARIMI I, SHADKHAHAST M, et al. Hydroxyapatite and demineralized calf fetal growth plate effects on bone healing in rabbit model[J]. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 2015, 16(2):141-149.
- [23] YANG F, WANG J, HOU J, et al. Bone regeneration using cell-mediated responsive degradable PEG-based scaffolds incorporating with rhBMP-2[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(5):1514-1528.
- [24] NIEMEYER P, SZALAY K, LUGINBÜHL R, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model[J]. *Acta Biomaterialia*, 2009, 6(3):900-908.
- [25] 孙庆顺, 李慕勤, 刘正. 骨碎补复合材料对牙槽骨缺损修复的实验研究[J]. *黑龙江医药科学*, 2009, 32(4):11-12.
- [26] BIAO H, YUCHUN G, HOUBIN L, et al. Recent advances in chitosan-based layer-by-layer biomaterials and their biomedical applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 271:118427.
- [27] 熊伟, 袁灵梅, 钱国文, 等. “补肾壮骨”中药应用于骨组织工程支架修复节段性骨缺损[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(21):3438-3444.
- [28] 陈桂锋, 尚奇, 沈耿杨, 等. 从“肾主骨生髓”揭示骨质疏松症炎症微环境的中医理论基础[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(12):6906-6909.
- [29] 李建国, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 从 BMSCs 探讨“肾主骨生髓”理论指导下中医药治疗骨质疏松症的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(8):1205-1207.
- [30] 李定, 李悦, 黄枫, 等. 骨碎补总黄酮在诱导膜技术中对骨缺损区域血管形成和成骨质量的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(11):5086-5089.
- [31] 高文鑫, 陈云刚, 姚康, 等. 骨碎补治疗骨质疏松症的实验研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(11):1683-1689.
- [32] 李晋玉, 俞兴, 姜俊杰, 等. 骨碎补总黄酮联合纳米骨材料促进 MC3T3-E1 细胞的增殖分化[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(7):1030-1036.
- [33] 赵晋宁, 谢雁鸣, 张文军, 等. 骨碎补总黄酮急性毒性实验[J]. *医药导报*, 2005, 24(1):12-14.
- [34] 赵晋宁, 谢雁鸣, 邓文龙, 等. 骨碎补总黄酮的大鼠长期毒性试验[J]. *毒理学杂志*, 2004, 18(S1):301-302.
- [35] 贡霄, 丁童, 杨卫强, 等. 负载木通皂苷 D 的纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架修复骨缺损[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(27):4293-4299.

(收稿日期:2025-04-02)