

萬靈膏對骨折癒合療效的 組織形態學研究

中國醫藥學院 牙醫學系

王天美

中文摘要：

紐西蘭種雄性大白兔40隻(平均體重3公斤)將之分成四組,分別於術後一星期(第一組),二星期(第二組),三星期(第三組),四星期(第四組)犧牲之。每隻動物右側脛骨鑽一直徑3厘米的孔和右側腓骨鋸斷一長約3厘米的間隙,是為對照組。左側脛骨和腓骨做同樣處理,並以萬靈膏外敷於手術部位的皮膚外表,是為實驗組。動物犧牲後,以光源鏡學,螢光顯微鏡學和顯微放射攝影學來觀察外表與組織結構上的變化情形並加以分析。本實驗的目的旨在探討:1)萬靈膏對動物骨折癒合過程中的骨生成和骨吸收的影響情形,和2)萬靈膏在骨折癒合過程的不同時間裏,對骨組織和軟組織的修復作用所扮演的角色。

在脛骨鑽孔後一星期,顯微放射攝影學(X光片)的觀察,對照組與實驗組間沒有差異,但光源鏡鏡檢發現在鑽孔處附近,實驗組比對照組具有較多的肉芽組織和較少的血凝塊。另外實驗組在孔洞兩側皮質骨處,有破骨細胞和造骨細胞的出現,並且在封閉骨痂處有織狀骨的形成但此等顯微結構的變化,卻未見於對照組中。此種結果顯示,萬靈膏的使用,可加速動物骨折後癒合過程的進行,即縮短發炎時期而使進入修復時期的過程加快。脛骨鑽孔後二星期,X光片的觀察,實驗組動物鑽孔處,具有較多的聯合骨痂的形成。光源鏡鏡檢發現,對照組在鑽孔兩側皮質骨處,有新的

骨質生成，而實驗組在同一處也見骨質生成，並有顯著增加的趨勢。另外，螢光鏡檢發現，實驗組在鑽孔兩側皮質骨旁及骨髓腔近封閉骨痂處，有大量骨質正在生成，此現象在對照組並不明顯。此等結果顯示，萬靈膏可加速骨折癒合過程中修復期的進行。鑽孔後三及四星期，X光片上發現，實驗組的骨修復過程比對照組快速，並且進入了再造型時期。光源鏡學發現，對照組鑽孔處附近，繼續形成聯合骨痂，但並未連接兩側皮質骨。而實驗組的聯合骨痂的形成已近完成，並已完全聯接兩側皮質骨。有關腓骨鋸斷後修復的情形，在術後一星期無論對照組或實驗組均無變化。但術後二、三和四星期發現對照組和實驗組均已在進行骨修復，惟實驗組骨修復的進行速度和程度要比對照組來得快且好得多。

綜合以上實驗結果知，萬靈膏不但可以加速骨折後骨折處附近軟組織的復原，並可刺激各種骨痂的加速形成和骨生成的作用。簡言之，萬靈膏的使用，可促進骨折癒合的效果。

緒言：

骨折(fracture)是指骨受到外在或內在的某些因素，而使它的完整性和連續性發生了部份或完全的斷裂；大多數是由外傷的因素所造成[1]。骨折的治療在中國傳統醫學的傷科治療上佔著重要的地位。

中國傳統醫學對骨折的患者，常施以萬靈膏[1,2]來治療。該膏在中國傳統醫學的正骨心法要旨中[3]，曾詳載主治跌打損傷、消瘀散毒、舒筋活血、止痛接骨，兼去麻木風痰、寒濕疼痛等症，可促使骨折癒合快，治療時間短和功能恢復好，且併發症較少等顯著效果。

萬靈膏有上述好的治療骨折的臨床療效，然該膏對骨組織的促進生長作用，特別是骨折癒合的組織變化情形，則尚未有任何文獻報告。本研究即針對這方面作深入的探討。以紐西蘭種雄性大白兔為實驗動物，在各動物脛骨近側端的上腓骨切跡下端 2 公分處鑽一直徑 3 厘米的孔，另在腓骨頭下端 2 公分處，做一 3 厘米長的骨折，並施以萬靈膏治療後，用骨組織形態學、光學顯微鏡學、螢光顯微鏡學和顯微放射攝影學以及薄切片的技術，來探究該膏對骨折癒合過程中，細胞動力學及骨生成和骨吸收的影響及變化情形。

材料和方法：

一、實驗步驟：

本研究使用40隻體重約 3 公斤紐西蘭種雄性大白兔，以隨機抽樣法分成四組，每組10隻。四組動物分別於術後一星期是為第一組，二星期為第二組，三星期為第三組，四星期為第四組。每隻動物以麻醉藥 pentobarbital(30mg/kg) 麻醉後，採側臥姿勢固定於手術台上，右側脛骨在上腓骨切跡下方 2 公分處，鑽一直徑約 3 厘米大小的孔洞。另外，右側腓骨在上腓骨頭下方2 公分處，使用電鋸將腓骨橫向鋸斷，使該骨兩斷端相距 3 厘米是為對照組。於脛骨鑽洞或腓骨鋸斷過程中，均配合生理食鹽水沖洗以避免產生高熱。每隻動物的左側脛骨和腓骨於作上述相同手術處理後，以萬靈膏（萬靈膏，茂松傷骨科中醫診所，台南市，台灣省，中華民國）外敷於手術部位的皮膚外表並包紮之，是為實驗組。所有動物於處理後一、二、三、或四星期分別犧牲之。

為了測量骨的生物活性，所有動物均注射骨標示劑[4-6]注射情形如下表：

動物	骨 標 示 劑 (含 注 射 方 式 及 時 間)				
	Tetracycline (肌肉注射)	Calcein (靜脈注射)	Xylenol Orange (靜脈注射)	Calcein (靜脈注射)	Xylenol Orange (靜脈注射)
第一組	術後當天	術後第6天	————		
第二組	術後當天	術後第6天	術後第13天	————	
第三組	術後當天	術後第6天	術後第13天	術後第20天	————
第四組	術後當天	術後第6天	術後第13天	術後第20天	術後第27天

註：———— 表示動物已犧牲。Tetracycline, Calcein 及 Xylenol Orange 注射的劑量分別為 25mg/kg, 15mg/kg, 及 90mg/kg。

二、顯微放射攝影學

所有動物於犧牲當天，取下兩側脛骨和腓骨，分別於 Ohmic 顯微放射攝影儀 (OM-603 Ohmic 公司，東京，日本) 進行顯微放射攝影術。

三. 非脫鈣骨標本片的製作:

動物犧牲後取下兩側脛骨, 浸入10%磷酸緩衝甲醛液(10% phosphate-buffered formalin) 中, 固定48小時, 再用Villanueva 骨染色劑(Villanueva osteochrome bone stain, Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA) 染色10天。再用酒精脫水, 丙酮脫脂後, 復以異丁烯酸甲酯(methyl methacrylate, Eastman organic chemicals, Rochester, NY, USA)包埋劑包埋之。包埋好的脛骨標本, 以慢速鋸片機(Isomet, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA)鋸成150 μ m厚的鋸片, 以Maruto lapping machine (ML-521-D, Maruto 公司, 東京, 日本)磨薄至100 μ m厚, 作顯微放射攝影術, 而後用氰丙烯酸膠(Cyanoacrylate glue, Aronalpha, Toagosei Chemical, TOKYO, JAPAN)黏在顯微鏡用的塑膠載玻片上, 再繼續磨成20 μ m厚的薄片[7]。然後在光源及螢光顯微鏡下鏡檢、計量並分析之。

結果

壹. 顯微放射攝影學觀察脛骨鑽孔處的變化情形:

- 一. 術後一星期 X光片觀察: 在對照組(即右側脛骨在上腓骨切跡下方 2 公分處, 有直徑3厘米的鑽孔)鑽孔兩側的皮質骨間, 似乎隱約可見織狀骨(woven bone)的形成(Fig. 1)。在實驗組(即左側脛骨在上腓骨切跡下方2公分處, 有直徑3厘米的鑽孔, 並在左小腿皮外貼有萬靈膏)鑽孔兩側皮質骨間, 則可見有較多的織狀骨出現(Fig. 2)。
- 二. 術後二星期 X光片觀察: 在對照組鑽孔處, 可見有少量錨定骨痂(anchoring callus)和聯和骨痂(uniting callus)的形成(Fig. 3)。在實驗組則發現有大量的聯和骨痂和少量的錨定骨痂的形成(Fig. 4)。
- 三. 術後三星期 X光片觀察: 在對照組鑽孔處, 發現形成聯和骨痂的量有增加的趨勢(Fig. 5)。在實驗組鑽孔處, 則發現聯和骨痂繼續在形成, 另外尚有橋形骨痂(bridging callus)的形成, 而且錨定骨痂已在進行造型(modeling)和再造型(remodeling)(Fig. 6)。
- 四. 術後四星期 X光片觀察: 在對照組鑽孔處聯和骨痂繼續在形成(Fig. 7)。在實驗組

同一處，則發現聯和骨痂繼續大量的形成。同時也在進行造型 (modeling) 和再造型 (remodeling) (Fig.8)。

貳. 光源鏡學觀察脛骨鑽孔處的組織形態變化情形：

- 一. 術後一星期：脛骨切片經H.E.染色後在光源鏡下觀察，發現對照組(即右側脛骨在上腓骨切跡下方 2 公分處，有直徑 3 厘米的鑽孔)在鑽孔兩側的皮質骨處有血凝塊存在及有少量肉芽組織增生(Fig.9)。在實驗組(即左側脛骨在上腓骨切跡下方2公分處有直徑 3 厘米的鑽孔，並在左小腿皮外貼有萬靈膏)同一處，則發現血凝塊漸被大量的肉芽組織取代。此種結果顯示，萬靈膏的使用可加速動物的骨頭在受損後的癒合過程(即縮短發炎時期，而使進入修復時期加速。(Fig.10)。在高倍率(400X)光源鏡下鏡檢，實驗組在鑽孔兩側皮質骨處有破骨細胞和造骨細胞出現(Figs.11,12)，但在對照組同處，則只發現血球細胞和肉芽組織。由於破骨細胞和造骨細胞出現(Fig.13)，說明了壞死的皮質骨正在進行骨吸收和骨生成，即進行聯合骨痂的形成。在實驗和對照組骨髓腔近鑽孔處，均有淋巴球增生的現象，此為慢性發炎的現象。另外在骨髓腔內近封閉骨痂(sealing callus)處有少量織狀骨的形成見於實驗組中(Fig.14)惟此種骨痂未在對照組中發現(Fig.15)。
- 二. 術後二星期：發現對照組在鑽孔兩側皮質骨處，有新的骨質生成(Fig.16)。在實驗組同一處亦可發現有新的骨質生成，並且骨量有增加的趨勢(Fig.17)。另外，在實驗組的封閉骨痂處，也有新的骨質生成(Fig.17)。在螢光顯微鏡下，可見實驗組鑽孔兩側皮質骨旁和骨髓腔近封閉骨痂處，有大量骨質生成(Fig.18)，惟此種現象在對照組中並不明顯(Fig.19)。
- 三. 術後三星期：對照組在鑽孔兩側皮質骨處，繼續有新的骨質向中央區域生成，即進行聯和骨痂的形成。此時期在封閉骨痂處，亦有骨質形成，並在骨髓腔中可有正常的骨髓組成和細胞的存在，而不再有任何發炎的組織和細胞存在(Fig.20)。在實驗組中，發現完整的聯合骨痂，已形成於鑽孔兩側皮質骨間，而且把兩側皮質骨聯接在一起。另外，與對照組一樣，可看到有骨質生成於封閉骨痂中(Fig.21)。

四. 術後四星期: 對照組方面, 鑽孔兩側皮質骨間繼續形成聯合骨痂, 但並未聯接兩側皮質骨 (Fig.22)。在實驗組方面, 兩側皮質骨間聯合骨痂的形成已幾近完成, 惟在聯合骨痂內, 仍可見極少量的纖維組織及血管存在 (Fig.23)。同時由於新生骨的造型 (modeling) 和再造型 (remodeling) 的進行, 橋形骨痂和錨定骨痂已消失, 使得鑽孔處皮質骨表面很光滑 (Fig.23)。

參. 顯微放射攝影學觀察腓骨鋸斷後的變化情形:

- 一. 術後一星期: 在腓骨頭下端2公分處鋸一寬約3厘米的間隔的術後一星期, 無論在對照組 ((Fig.24R) 和實驗組 (Fig.24L), 在X光片上均未發現有任何透和不透X射線 (radiolucent and radiopaque) 的變化。
- 二. 術後二星期: 發現對照組的腓骨鋸斷處, 在X光片上並無呈現任何X射線變化的情形 (Fig.25R)。惟在實驗組同一處, 則發現有聯合骨痂和錨定骨痂的形成 (Fig.25L)。
- 三. 術後三星期: 發現對照組的腓骨鋸斷處, 在X光片上, 呈現少量錨定骨痂和極少量聯合骨痂的形成 (Fig.26R)。然在實驗組同一處, 卻可發現大量錨定骨痂和橋形骨痂及較多的聯合骨痂的形成 (Fig.26L)。
- 四. 術後四星期: 發現對照組的腓骨鋸斷處, 有大量的聯合骨痂和錨定骨痂的形成, 並且聯合骨痂的形成未完全; 即未將鋸斷處兩端的皮質骨聯接的很好 (Fig.27R)。在實驗組的腓骨鋸斷處, 在X光片上則可見聯合骨痂已經聯接鋸斷處兩端的皮質骨, 另外尚可見錨定骨痂和橋形骨痂的形成 (Fig.27L)。此時期已進行骨修復的晚期, 即正在進行新生骨的造型 (modeling), 並準備進入再造型 (remodeling) 時期。

討論

萬靈膏在中國傳統醫藥學上, 被用來主治跌打損傷和止痛、接骨等症, 可促進骨折癒合, 使折骨恢復功能。本研究旨在探究: 1) 萬靈膏對動物骨折癒合過程中的骨生成和骨吸收作用的影響情形, 和 2) 萬靈膏在骨折癒合過程的不同時間裏, 對骨組織和軟組織的修復作用所扮演的角色。

骨折癒合的過程, 正常情況下可分為三個主要時期: 1) 發炎時期, 2) 修復時期,

3)再造型時期[8]。發炎時期，可見出血，血凝塊，淋巴球增生和肉芽組織的依序出現。修復時期，則可見大量肉芽組織，織狀骨 (woven bone) 和板狀骨 (lamellar bone) 依次出現[9-11]。在修復時期的骨組織形成過程中，又可依位置的不同而有下列四種骨痂的形成：1) 橋形骨痂 (bridging callus)，2) 錨定骨痂 (anchoring callus)，3) 聯合骨痂 (uniting callus)，和 4) 封閉骨痂 (sealing callus) [12]。再造型時期，為骨折癒合過程中最後的一個時期，此時期的作用主要是使經由修復時期在骨折處，所形成新的粗糙表面變的平滑，而恢復骨折前的同一外形 [8]。骨折癒合的發炎時期，可見於脛骨鑽孔後一星期的對照組和實驗組中，惟在實驗組中發現肉芽組織增生而血凝塊有減少或消失的趨勢，此種結果可能是由於萬靈膏的使用，刺激纖維芽母細胞的增殖或膠原纖維的產生，及加速血凝塊的分解。另外，在實驗組鑽孔兩側皮質骨表面有破骨細胞和造骨細胞的出現。此現象的解釋理由為，可能是 1) 萬靈膏刺激原始造骨細胞的增殖並進而使它分化成造骨細胞，2) 促進破骨細胞的形成，3) 上述兩種因素的總合。骨折癒合的修復時期，可見於脛骨鑽孔後第二，三和四星期，並且在術後第四星期時，修復時期和再造型時期同時並存於實驗組中。聯合骨痂和其他骨痂的形成於對照和實驗組中，有逐漸增加的趨勢。惟在實驗組中，骨痂形成的速度和量與對照組比較有顯著增加的趨勢。其原因可能是萬靈膏刺激大量的造骨細胞和破骨細胞形成並出現於孔洞附近，因而形成大量的骨組織(骨痂)。

腓骨鋸斷後的對照組，在 X 光片上觀察修復過程的進行，只見於術後第二，三和四星期，而實驗組進行的速度要比對照組來得快。此點也可認定為是因為使用萬靈膏所致。

結論

1. 萬靈膏的使用，可刺激纖維芽母細胞增生和膠原纖維的產生，亦即可縮短骨折癒合過程中的發炎時期，並促使修復期的加速進行。
2. 萬靈膏的使用，可促進原始造骨細胞的增殖和分化成造骨細胞，另外尚可加速破骨細胞的形成，而有利於折骨處新生骨的造型和再造型的進行。
3. 萬靈膏的使用，可刺激造骨細胞的活性，進而加速新骨質的生成。
4. 萬靈膏有促進骨折癒合的效果。

重要參考資料：(指國內外相關之重要文獻)

1. 戴新民：萬靈膏，中醫傷科學，p. 461-462；啟業書局，台北市，中華民國，1978
2. 戴新民：萬應靈膏，全國中藥成藥處方集，p. 1331-1332；啟業書局，台北市，中華民國，1983
3. 吳謙：萬靈膏，正骨心法要訣，p.37；醫宗金鑑，清，中國，1742
4. Olerud, S. and Lorenzi, G.L.: Triple fluorochrome labeling in bone formation and bone resorption. J. Bone Joint Surg. 52 (A):274-276, 1970
5. Ibsen, K.H.: Studies on the Association of the tetracyclines. Clin. Orthop. 200:85-86, 1985
6. Jaworski, Z.F.G.: Three dimensional aspects of lamellar bone formation and interpretation of the tetracycline labels in bone biopsy section. In Bone Histomorphometry, 3rd International Workshop, Sun Valley, May 28-June 2, p.189-200, 1980
7. Anderson, C.: Embedding, section and staining. In Anderson, C.(ed): Manual for the examination of bone. 1st ed., Boca Raton, Florida, USA, CRC Press Inc., p. 25-64, 1982
8. Cormack, D.H.: Ham's histology. p. 312-319, JB Lippincott Co., Philadelphia, USA, 1987.
9. Sevitt, S.: Healing of fractures in man. In Owen R, Goodfellow J, Bullough P(eds): Scientific Foundations of orthopaedics and Traumatology, p.258, William Heinemann Medical Book, London, England, 1980.
10. Sevitt, S.: Bone repair and fracture healing in man. Churchill Livingstone, Edinburgh, England, 1981.
11. Simmons, D.J.: Fracture healing. In Urist MR (ed): Fundamental and

Clinical Bone Physiology. p.283, JB Lippincott Co., Philadelphia, USA, 1980.

12. Weinmann, J.P. and Sicher, H.: Bone and Bones. CV Mosby Co., St. Louis, USA, p.285-312, 1950.

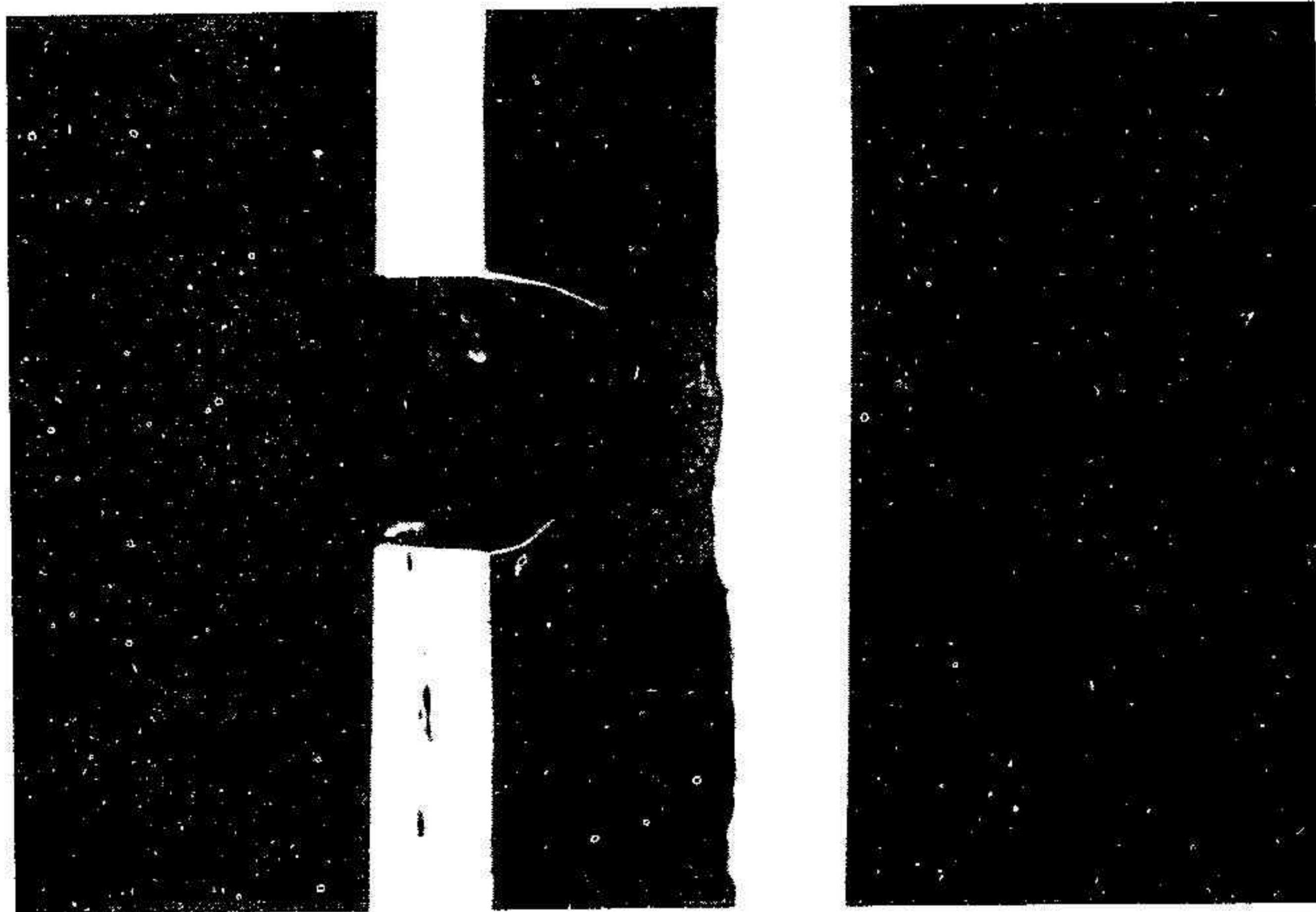


圖1. 術後一星期 X 光片觀察情形。對照組的骨鑽孔兩側皮質骨間，隱約可見織狀骨形成。(X 1)。

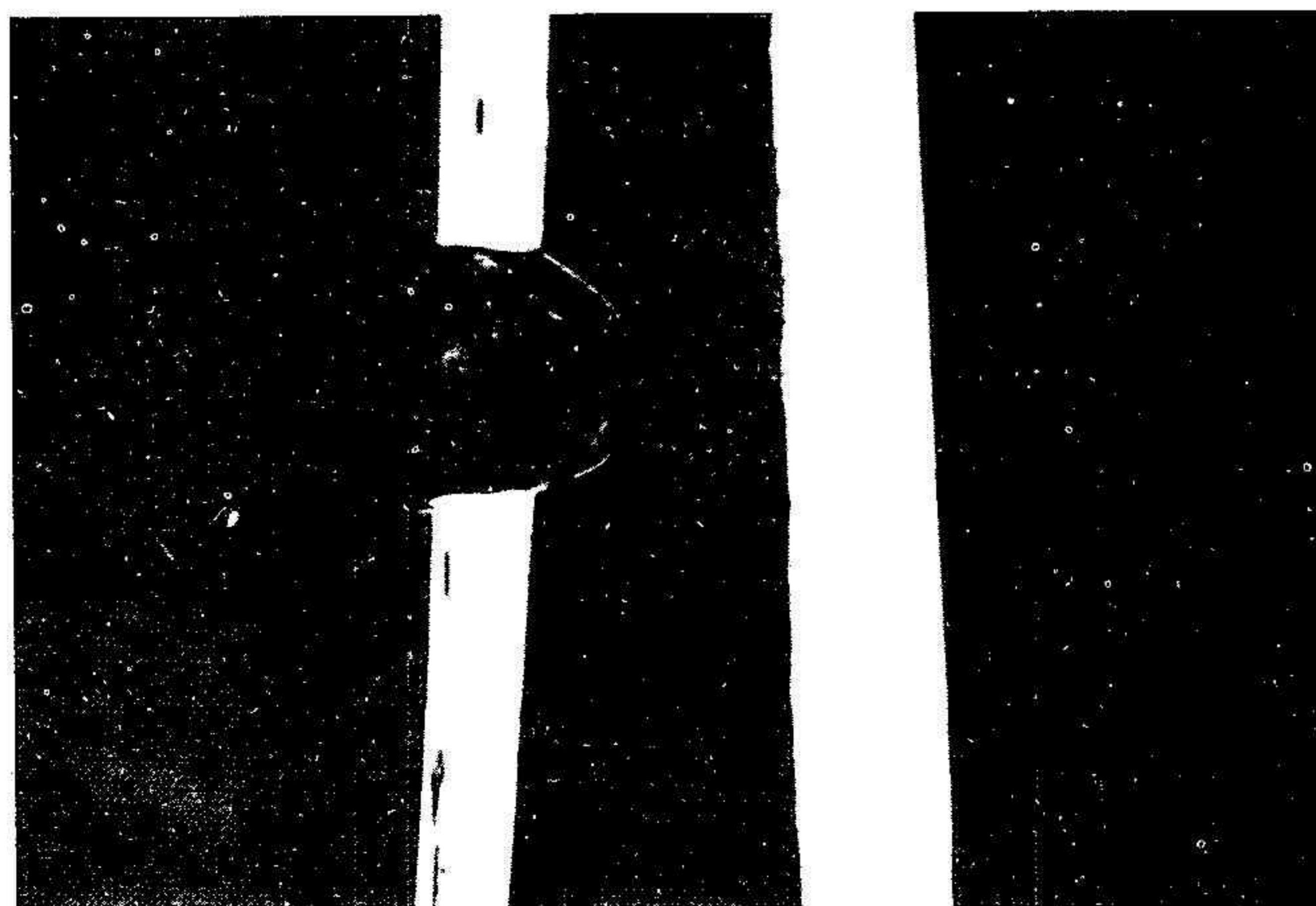


圖2. 術後一星期 X 光片觀察情形。實驗組的脛骨鑽孔兩側皮質骨間，可見有較多織狀骨形成。(X 1)。

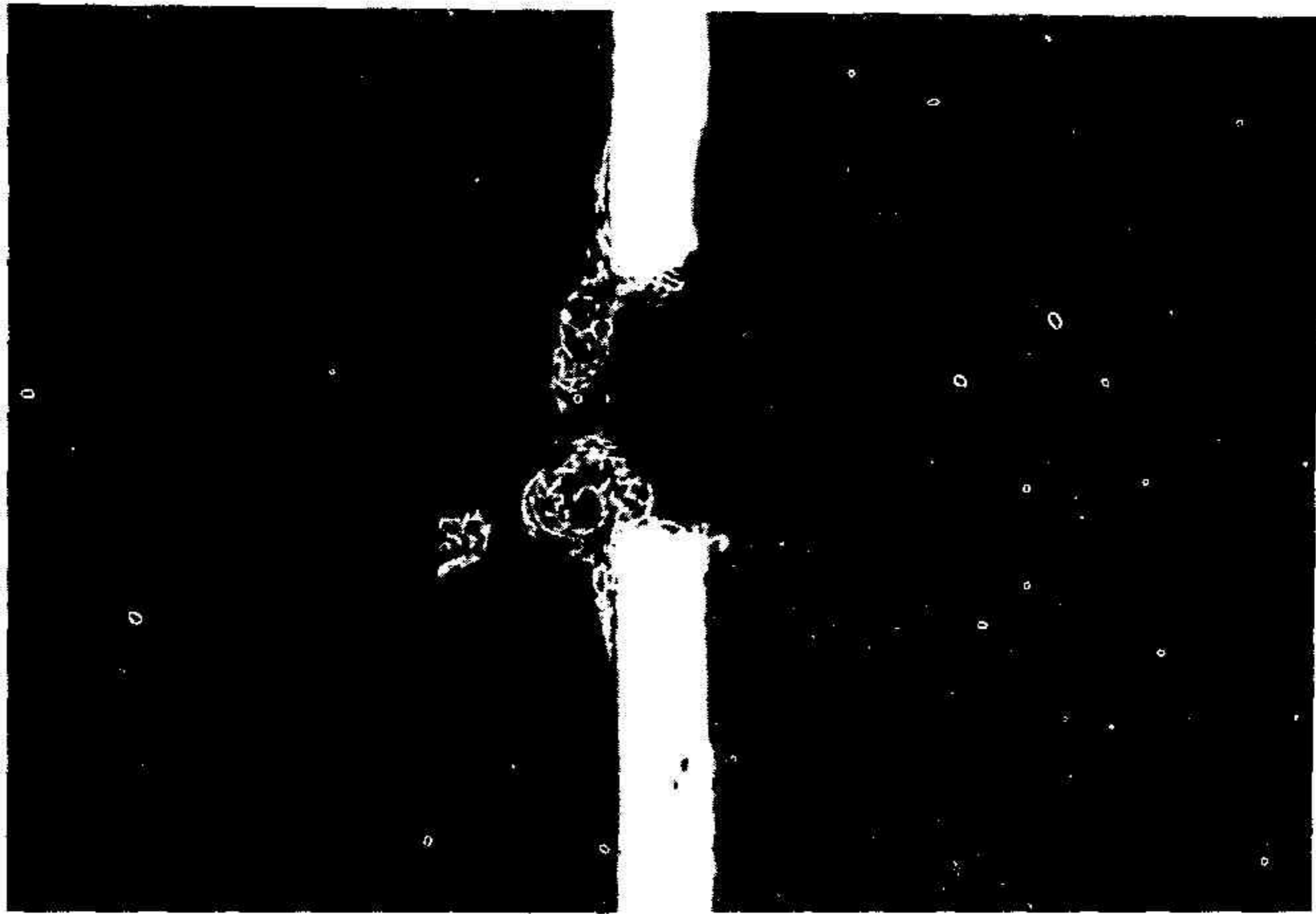


圖3. 術後二星期 X 光片觀察情形。對照組的脛骨鑽孔處，可見少量錨定骨痂和聯合骨痂的形成。(X 1)。

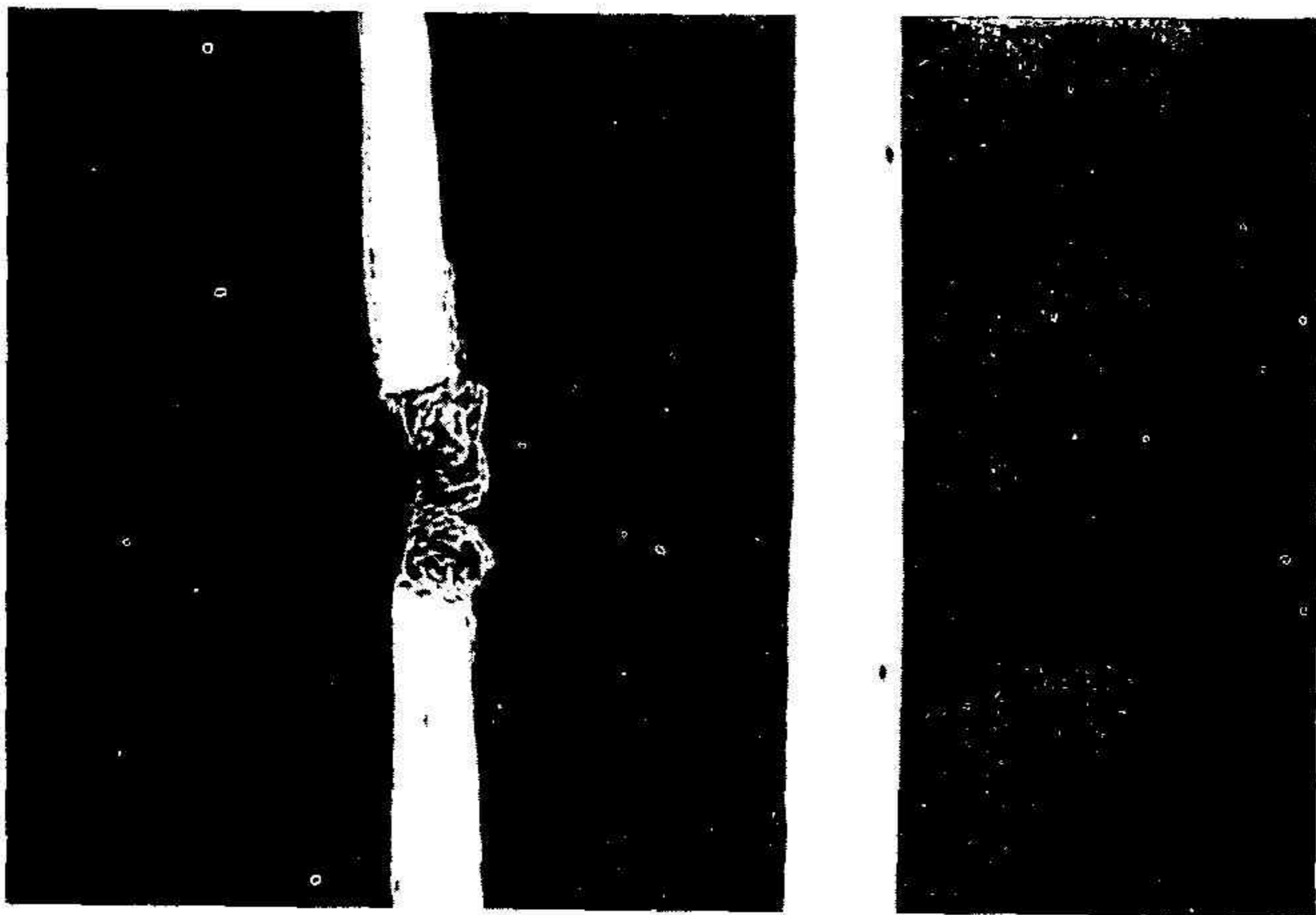


圖4. 術後二星期 X 光片觀察情形。實驗組的脛骨鑽孔處，可見大量聯合骨痂和少量錨定骨痂的形成。(X 1)。



圖 5. 術後三星期 X 光片觀察情形。對照組的脛骨鑽孔處，可見聯合骨痂的形成有增加的趨勢。(X 1)。



圖 6. 術後三星期 X 光片觀察情形。實驗組的脛骨鑽孔處，發現聯合骨痂繼續形成，另外尚有橋形骨痂(bridging callus)的形成。(X 1)。

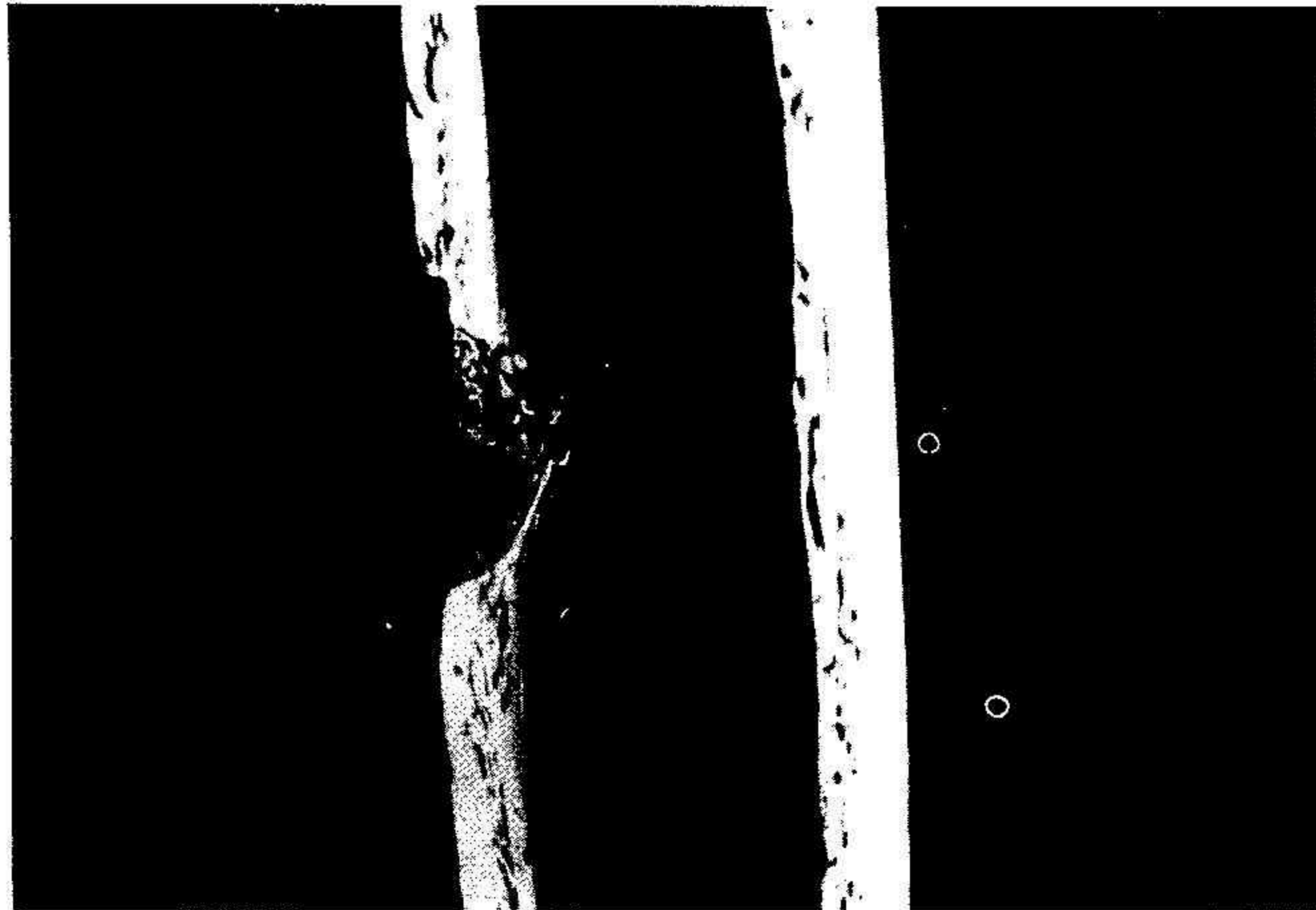


圖7. 術後四星期 X 光片觀察情形。對照組的脛骨鑽孔處,可見聯合骨痂繼續在形成。(X 1)。

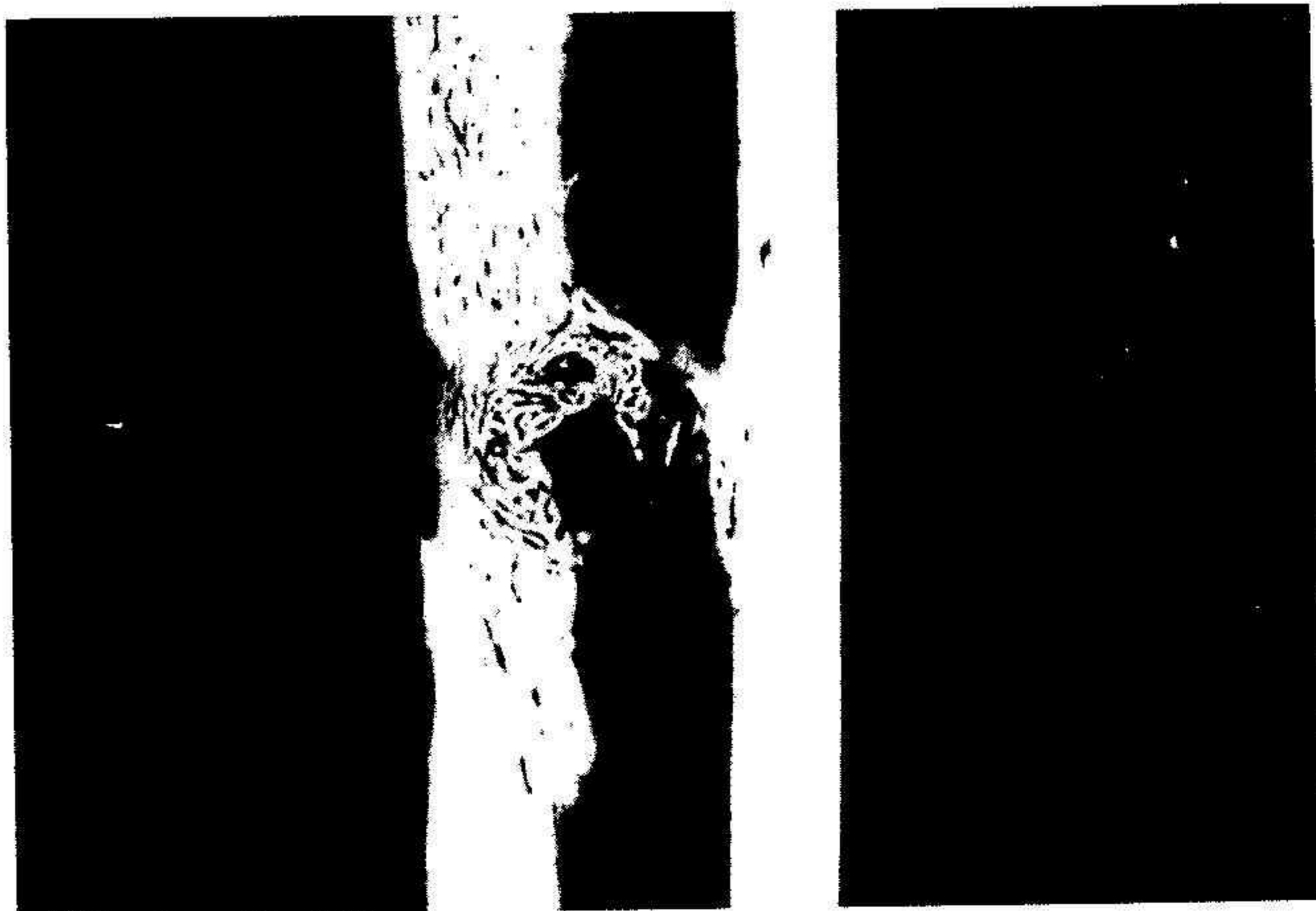


圖8. 術後四星期 X 光片觀察情形。實驗組的脛骨鑽孔處發現聯合骨痂大量形成有漸漸完全連接鑽孔兩處皮質骨的趨勢。(X 1)。



圖9. 術後一星期光源鏡學觀察情形。對照組在脛骨鑽孔兩側皮質骨間,有血凝塊存在和少量肉芽組織增生的現象。(H&E, X 16)。



圖10. 術後一星期光源鏡學觀察情形。實驗組在脛骨鑽孔處的血凝塊,已漸被大量肉芽組織取代。(H&E, X 16)。



圖 11. 術後一星期光源鏡學觀察情形。實驗組在脛骨鑽孔兩側皮質骨處，可見破骨細胞存於豪希普氏陷窩(Howship's lacunae)內。(X 330)。



圖 12. 術後一星期光源鏡學觀察情形。實驗組在脛骨鑽孔兩側皮質骨處，有造骨細胞的出現。(X 330)。



圖 13. 術後一星期光源鏡學觀察情形。對照組的脛骨鑽孔處附近，只見血球細胞和肉芽組織，而不見有破骨細胞或造骨細胞。(X 330)。

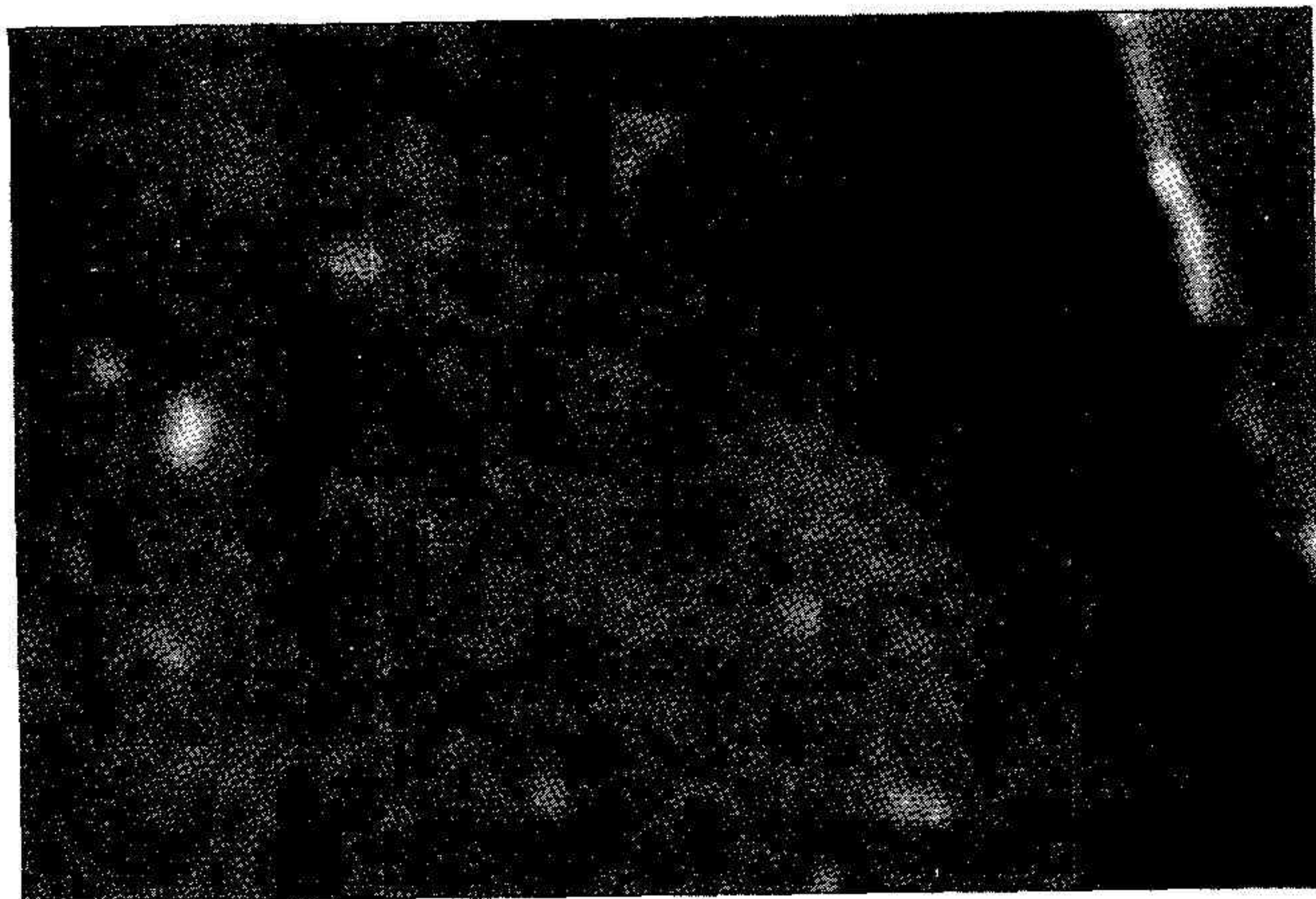


圖 14. 術後一星期螢光鏡學觀察情形。實驗組在脛骨骨髓腔近封閉骨痂處，有少量織狀骨的形成。(X 160)。

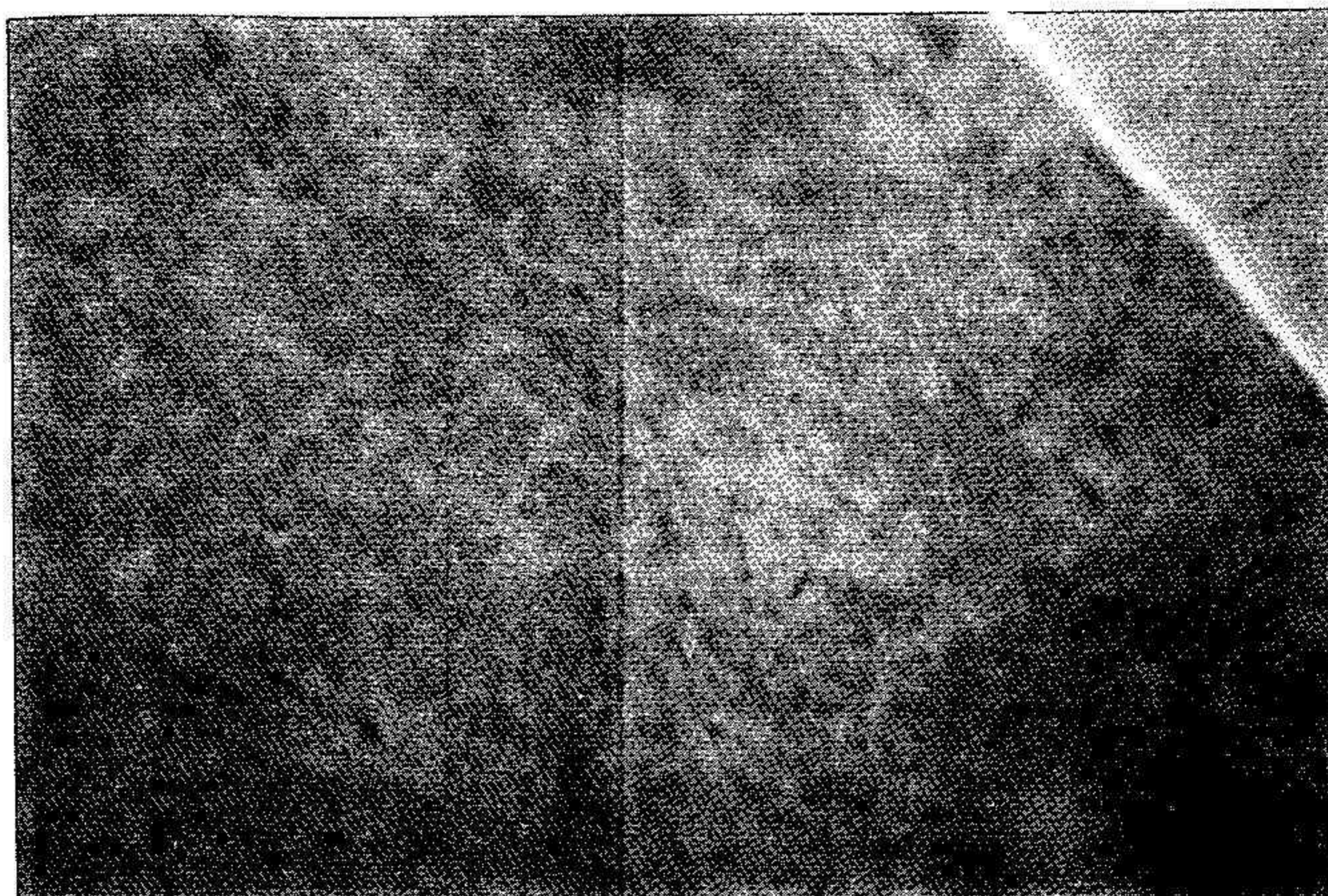


圖 15. 術後一星期螢光鏡學觀察情形。對照組在脛骨骨髓腔近封閉骨痂處，未見有織狀骨的形成。(X 160)。



圖 16. 術後二星期光源鏡學觀察情形。對照組在脛骨鑽孔兩側皮質骨處，有新的骨質形成。(X 40)。



圖 17. 術後二星期光源鏡學觀察情形。實驗組在脛骨鑽孔兩側皮質骨處，有大量新的骨質形成。另在封閉骨痂處，也有新的骨質形成。(X 40)。



圖 18. 術後二星期螢光鏡學觀察情形。實驗組脛骨鑽孔兩側皮質骨旁和骨髓腔近封閉骨痂處，有大量的骨質形成。(X 40)。

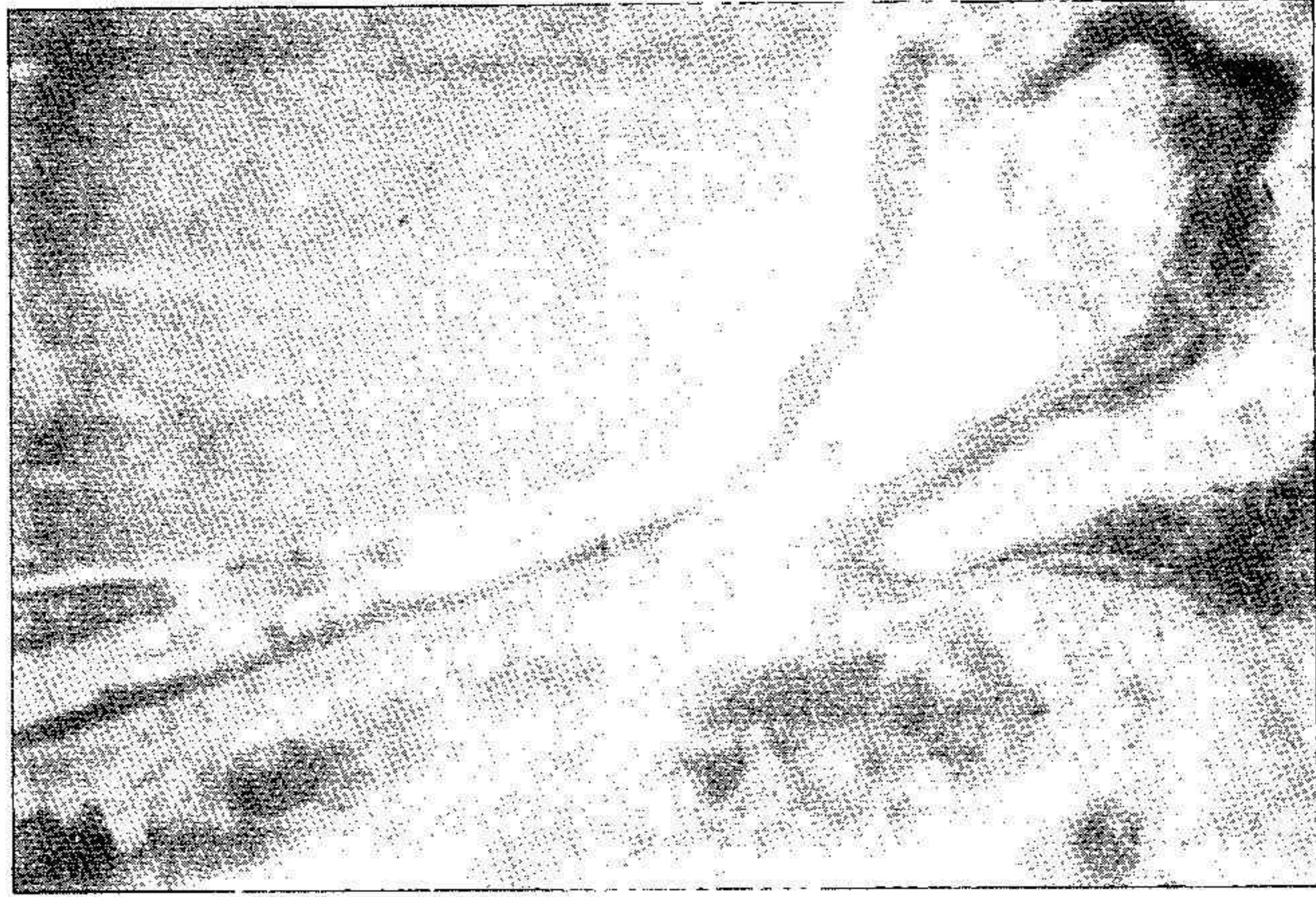


圖 19. 術後二星期螢光鏡學觀察情形。對照組只在脛骨鑽孔處皮質骨旁，有少量骨質形成。(X 40)。



圖 20. 術後三星期光源鏡學觀察情形。對照組在脛骨鑽孔兩側皮質骨間，有新的骨質向中央區域形成。(X 40)。

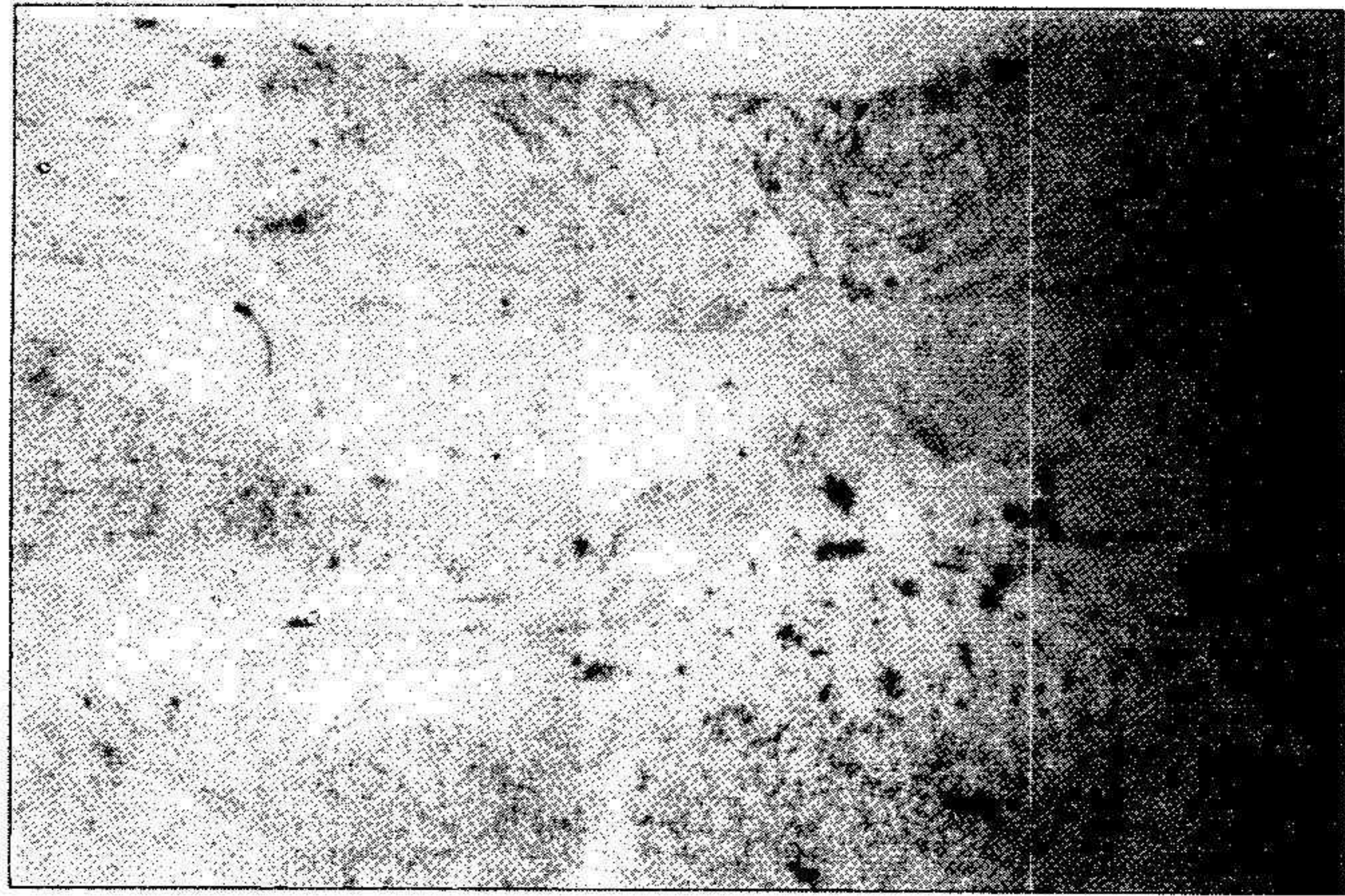


圖 21. 術後三星期光源鏡學觀察情形。實驗在脛骨組鑽孔兩側皮質骨間，有完整的聯合骨痂把兩側皮質骨聯接在一起。(X 40)。

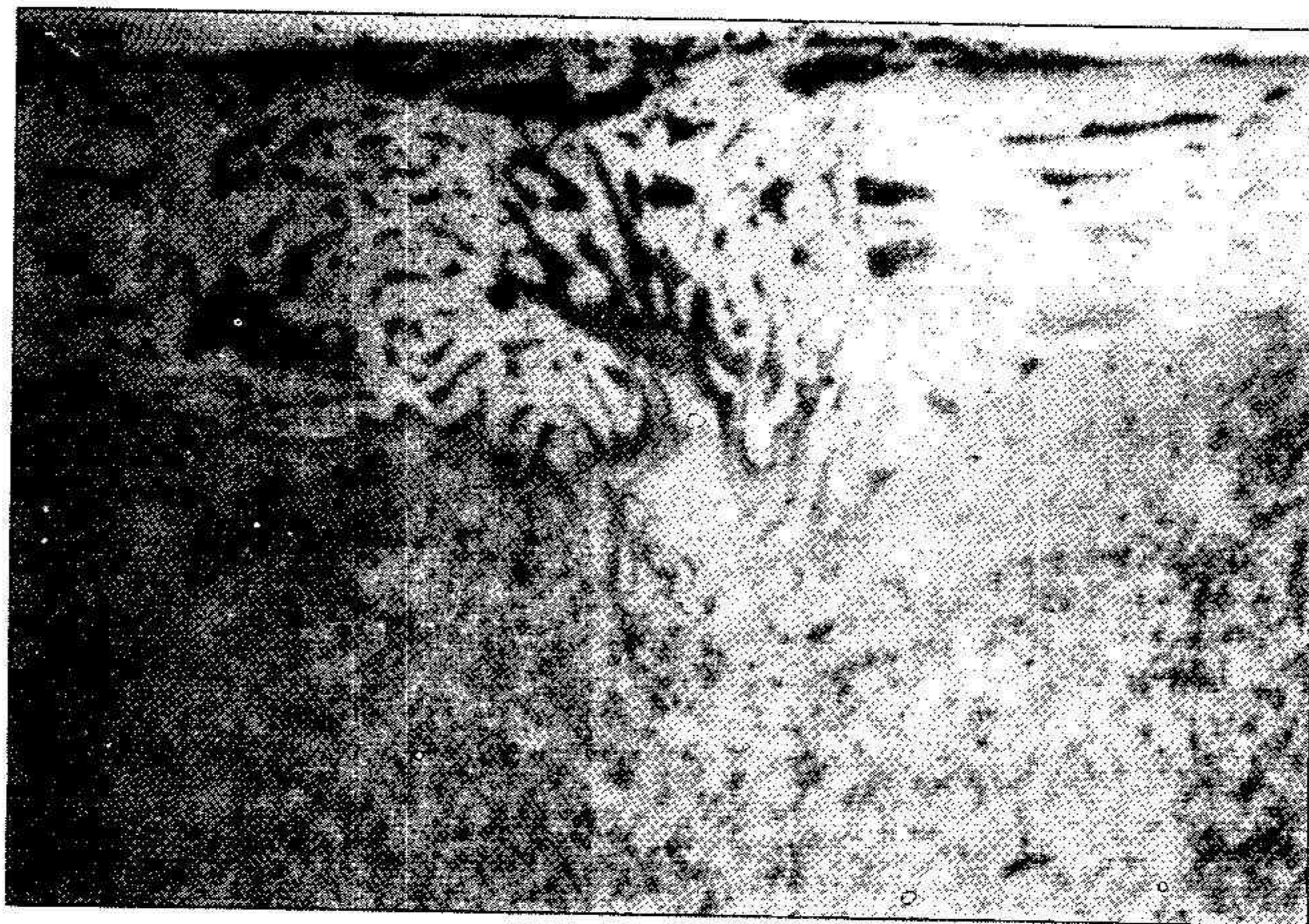


圖 22. 術後四星期光源鏡學觀察情形。對照組在脛骨鑽孔兩側皮質骨間，有聯合骨痂的繼續形成，但並未聯接兩側皮質骨。(X 16)。



圖 23. 術後四星期光源鏡學觀察情形。實驗組在脛骨鑽孔兩側皮質骨間聯合骨痂的形成,已幾近完成。(X 16)。

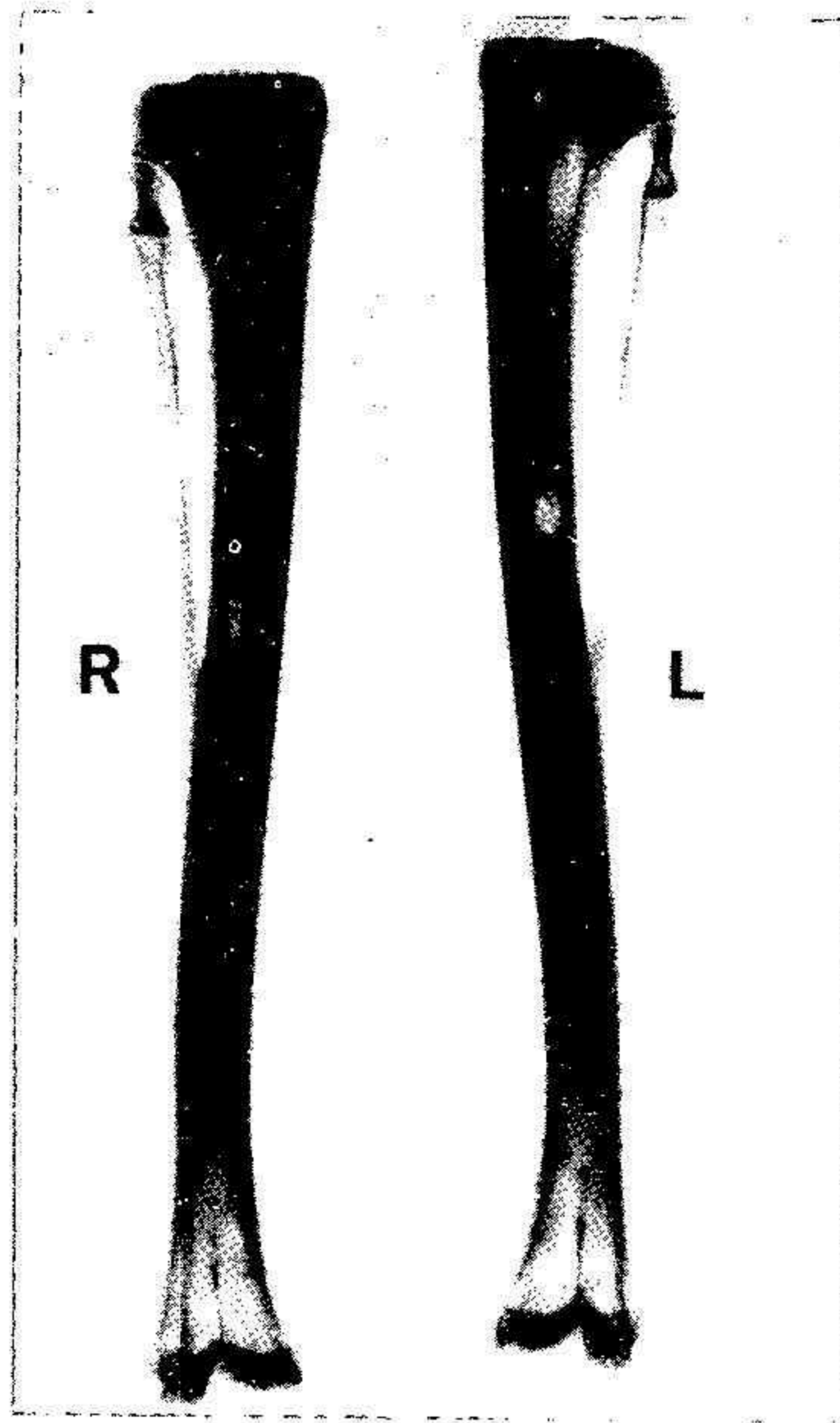


圖 24. 術後一星期顯微放射攝影學觀察情形。無論對照組 (R) 或實驗組 (L) 的腓骨鋸斷處, 在 X 光片上均未有任何變化。(X 1)。

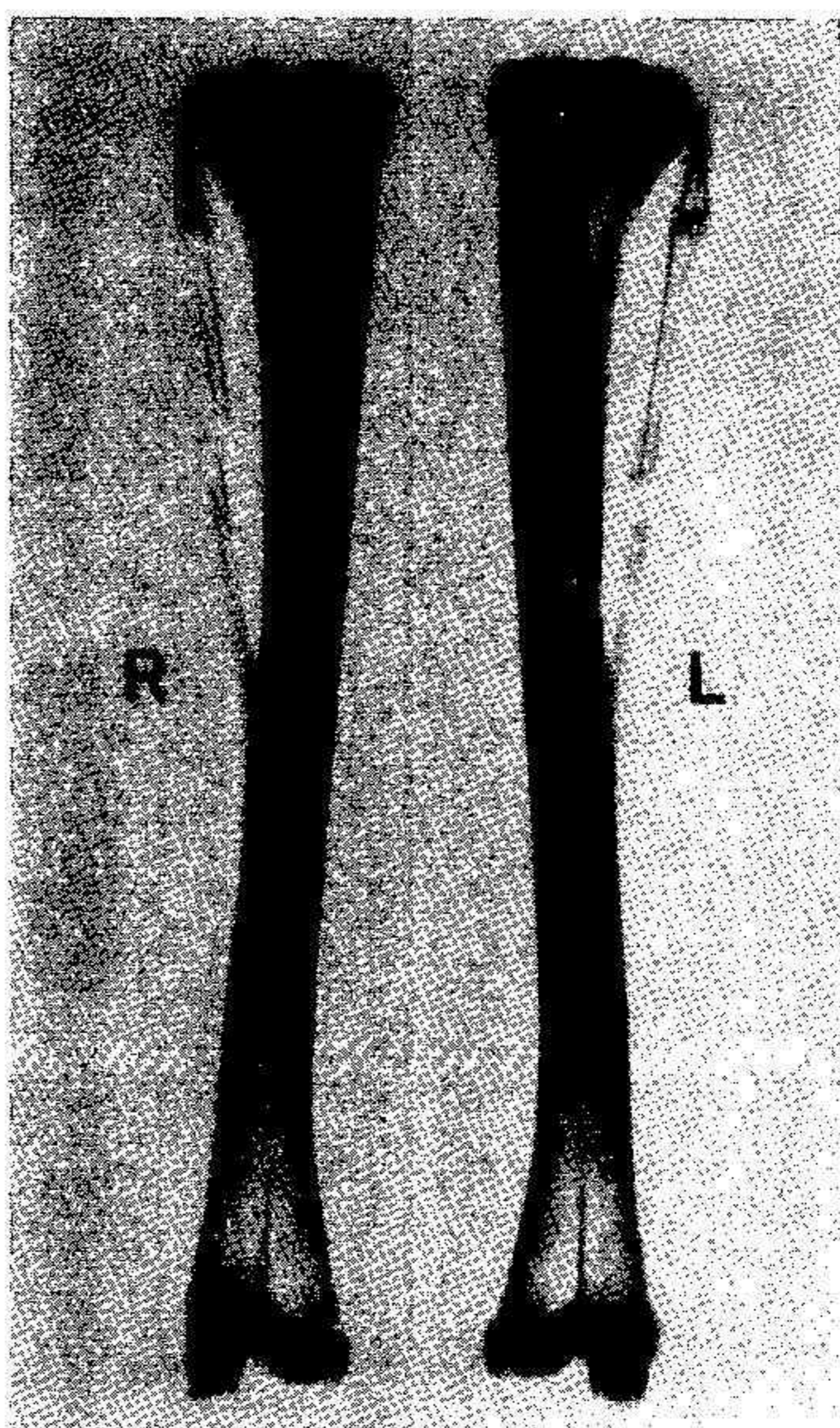


圖 25. 術後二星期顯微放射攝影學觀察情形。對照組 (R) 的腓骨鋸斷處，在 X 光片上仍未有任何變化，惟在實驗組 (L) 同一處，則有聯合骨痂和錨定骨痂的形成。(X 1)。

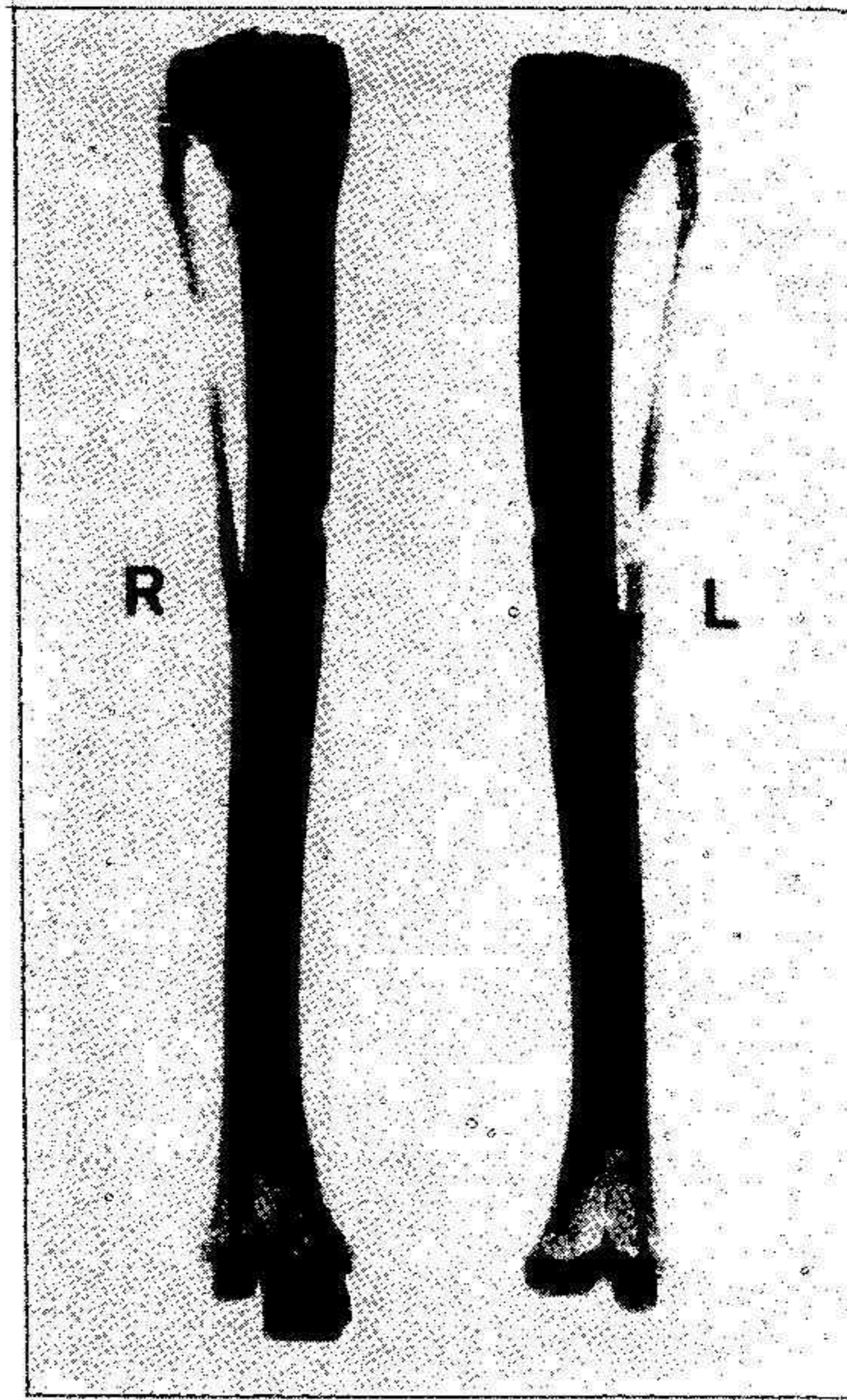


圖 26. 術後三星期顯微放射攝影學觀察情形。對照組(R)的腓骨鋸斷處,在X光片上,有少量錨定骨痂和聯合骨痂的形成。在實驗組(L)同一處,則有大量錨定骨痂和橋形骨痂及較多聯合骨痂的形成。(X 1)。

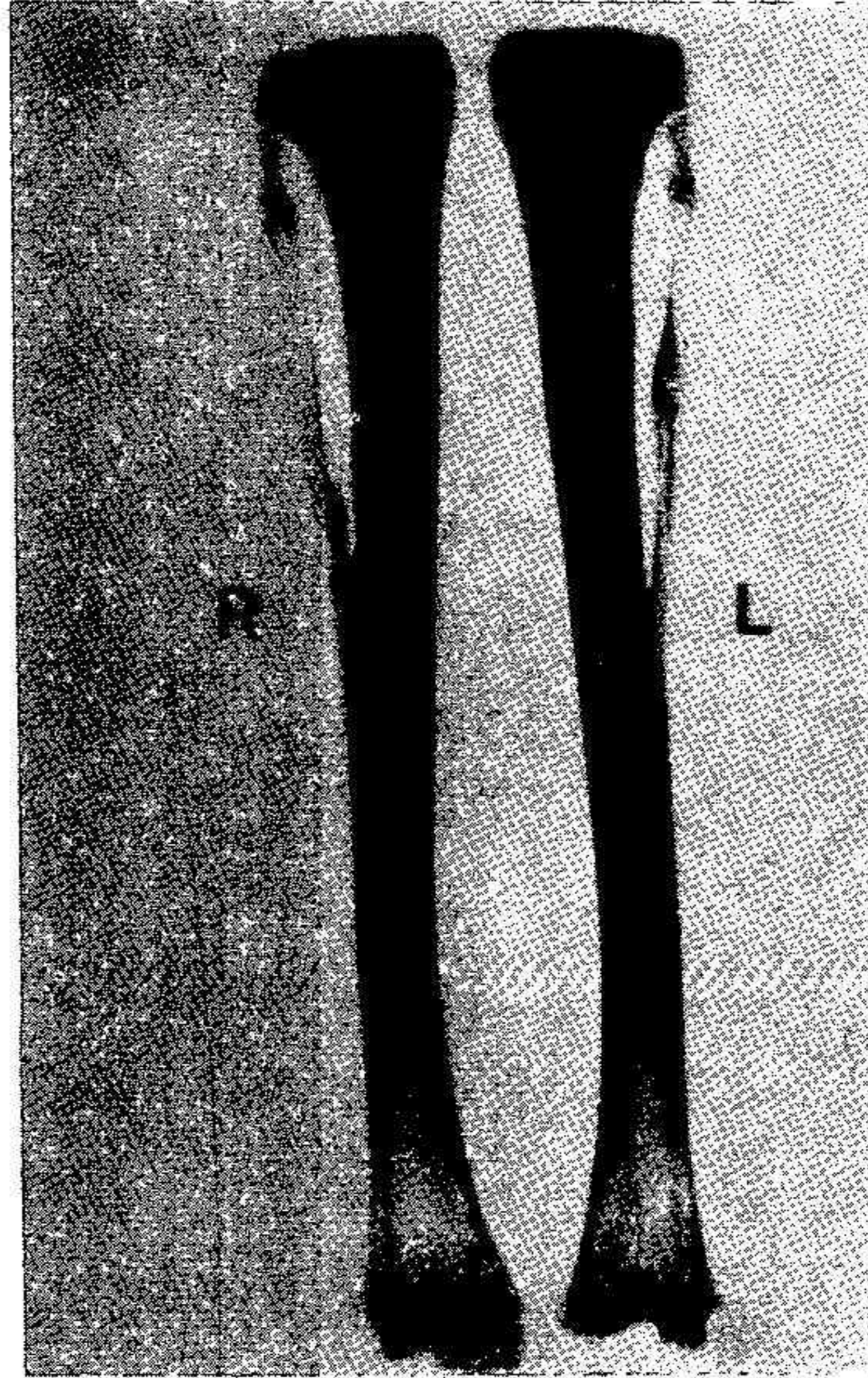


圖 27. 術後四星期顯微放射攝影學觀察情形。對照組 (R) 的腓骨鋸斷處, 在 X 光片上, 已有大量的錨定骨痂和聯合骨痂的形成。實驗組 (L) 同一處, 除有聯合骨痂的形成外, 它們尚將兩側皮質骨聯接在一起。(X 1)。