

植物性添加劑“Magacal”對骨折修護的效益

Effect of herbal Magacal on fracture healing.

資料來源:

By S.K. Maiti, Avijit Dutta, G.R. Singh, N.Kumar and M. Hoque
Division of surgery, Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar-243 122(UP)
Phytomedica Vol. 4, 2003

摘要

本試驗的進行，是為了評估植物性添加劑“MagaCal”，在實驗室及臨床上，對於骨折修護的效果。在實驗室中，使用的是兩根尺骨中段都有橫向骨折的兔子。其中一組，在骨骼後第5-20日，每日給予每隻兔子5ml的“MagaCal”，而另一組不作任何處理當作對照組。放射線檢查及組織病理學的結果顯示，“MagaCal”組的復原狀態較佳，明顯的骨膜反應包括，骨骼裂縫被新形成的骨組織完全填滿，骨痂體積明顯變小使骨膜表面整齊緻密。對照組的兔子，可發現其骨折的修復相對較慢。從脫鈣骨超薄切片，可看出“MagaCal”試驗組的骨折復原良好，其新骨有和舊骨相同的緻密度。在對照組的動物，新骨的形成，無法橫跨到另一端，造成癒合延遲。掃描式電子顯微鏡顯示，“MagaCal”試驗組的復原部位上，骨癒合較佳，骨折兩端都有完整的血管形成。血液生化分析也呼應以上發現。在臨床的研究中，共有22隻狗和8隻山羊有不同形式的長骨骨折，在骨折後連續給予15天的“MagaCal”。

“MagaCal”幫助加快新骨的形成，骨折可提早復原，承受體重和骨骼的完整性。這些研究明確指出，“MagaCal”對於骨折後的提早復原和骨重建有效。

骨折的復原是一型特殊的傷口修復反應，從骨骼新生到恢復骨骼的完整性。骨折復原的過程通常要考慮到生物體的狀態，5-10%的復原都會延遲或有障礙。要處理這類骨折，必須使用生物法來提高復原率。另外，骨折的復原幾乎都會因為任何內源或外源因子影響到細胞代謝功能而改變。這些因子包括轉化生長因子(TGF-β)、骨型態發生蛋白、荷爾蒙、維他命、前列腺素、飼料/藥品中含有的鈣。

有鑒於上述說明，本試驗研究目的在於評估印度IH公司所生產的植物性添加劑“MagaCal”，在實驗動物及臨床骨折修復病例中，促進骨生成作用的效果。

“MagaCal”可以調節食物中鈣、磷和鎂的吸收、生物利用率。它具有強化螯合因子，可與食物中的鈣磷鎂形成有機複合螯合物，並含有高生物利用率的天然維他命D代謝物、天然穩定的生物素、以及現代化輸送系統，將鈣磷鎂離子適當地傳送到所需位置。

材料與方法

將臨床上健康、成年的公母性別紐西蘭白兔，分為各5隻的試驗A & B組。試驗是採取標準化的飲食和管理。在thiopental(2.5%)麻醉狀況下，使所有實驗動物的兩根尺骨發生中段橫向骨折。試驗A組，骨折後第5-20日，每日每隻口服給予5ml的“MagaCal”，而試驗B組不給予任何藥物作為對照組。

使用碘藥水(povidone iodine)和IH的Himax軟膏，連續一週每日在皮膚傷口上作抗菌處理。所有實驗動物，手術後連續5日，每日以肌肉注射0.5gm的streptopenicillin。手術後第10天進行拆線。

研究數據及觀察計畫

(a)臨床觀察

術後每間隔一段時間，從臨床上觀察所有的動物在骨折部位有無發炎、疼痛、水腫，外科傷口的復原狀態、食慾、健康度，四肢肌肉有無萎縮。

(b)血液生化研究

所有動物從術前、術後第1、3、7、15、30及40天，從耳靜脈抽血5ml。其中3ml用於蒐集血清，2ml加入EDTA抗凝血劑。新採取的血液，分析其總白血球計數(TLC)、白血球分類計算(DLC)。血清樣品進行血鈣、血磷和血液鹼性磷酸酶的分析。

(c)放射線學

術後立即從橫向拍攝骨折部位的照片，接下來第10、20、30及40天也進行拍攝，評估骨裂縮小的狀態、骨折修復的進度及完整性。放射線條件是KVP=65、mAS=20、FED=70cm。

(d)肉眼觀察

實驗動物在第40天的時候犧牲，觀察骨折部位的骨痂大小以及周圍軟組織的生長。

(e)組織病理學研究

實驗動物在第40天的時候犧牲，從骨折部位製作骨切片，並延伸到正常骨骼。在Goodling & Stewart溶液(80%蒸餾水、15%甲酸、5%福馬林)中進行脫鈣後，接著例行以H&E法染色，觀察兩組試驗動物的骨折修復狀況。

(f)掃描式電子顯微鏡(SEM)研究

這個研究的樣品是在試驗第40天，動物犧牲後，直接從修復的骨頭取樣。每個樣品都是包含骨折修復位置和鄰近區骨骼。以5%的戊二醛固定24-48小時。固定後，每個樣品再以磷酸緩衝液(pH 7.4)和蒸餾水各沖洗一次、30分鐘。接下來，樣品在30-100%不同濃度的乙醇中、各30分鐘進行脫水。HMDS 20分鐘乾燥。利用離子覆膜機(Model JFC 1100)以7-10 mA及1-2 KVP 5分鐘將樣品包覆上金屬離子。最後，樣品在掃描式電子顯微鏡(Jeol ISM 840 model)下進行觀察，研究其各個面體，確認新生骨組織在骨折部位的位置和分佈。

(g) 脫鈣骨超薄切片研究

分別在第27、28、35、36天時，以肌肉注射方式，每公斤體重給予25mg的Oxytetracycline，讓新骨加倍顯影。第40天犧牲試驗動物後，在骨折部位切下2-3mm厚度的切片，長度要包括周圍的正常骨。依據Frost(1958)描述的方法製備脫鈣超薄切片。在紫外光下觀察這些切片，評估新骨在骨折部位的生長和分佈。

(h) 統計分析

總白血球計數(TLC)、白血球分類計算(DLC)、血鈣、無機磷和鹼性磷酸酶的數值，使用“t”及ANOVA法進行統計分析。

結果與討論

將臨床上健康、成年的公母性別紐西蘭白兔，分為各5隻的試驗A & B組。試驗是採取標準化的飲食和管理。在thiopental(2.5%)麻醉狀況下，使所有實驗動物的兩根尺骨發生中段橫向骨折。試驗A組，骨折後第5-20日，每日每隻口服給予5ml的“MagaCal”，而試驗B組不給予任何藥物作為對照組。

使用碘藥水(povidone iodine)和IH的Himax軟膏，連續一週每日在皮膚傷口上作抗菌處理。所有實驗動物，手術後連續5日，每日以肌肉注射0.5gm的streptopenicillin。手術後第10天進行拆線。

在觀察期間，試驗A & B組的所有動物皆維持正常的食慾、排便與排尿。健康度良好，而骨折部位的發炎反應出現到術後第4天，四肢在第7天的外觀上也是正常的。外科傷口的復原呈現一般癒合。也沒有任何動物發生肌肉萎縮。試驗組的動物較早恢復體重支撐的能力，接下來才是對照組。

所有動物的總白血球計數(TLC)，在術後初期呈現明顯增加($P < 0.05$)。接下來幾日，兩組之間沒有再出現顯著差異。白血球分類計算(DLC)的結果可見，術後第7天，嗜中性球明顯增加($P < 0.01$)，伴隨著淋巴球的減少。但在試驗B組的動物(對照組)，嗜中性球到第15天、單核球到第30天，還可注意到絕對的增加。試驗A組的動物(“MagaCal”添加組)，在最初可注意到嗜中性球的增加，其持續到術後第7天，接下來就漸漸回到正常值。其他像是嗜鹼性球、嗜酸性球的計數，在各個時期都屬正常範圍內。術後初期由於嗜中性球增加造成的白血球增多症，被報告是因為當痛、緊迫、外傷、骨折、外科手術時，皮質類固醇會釋放出來。

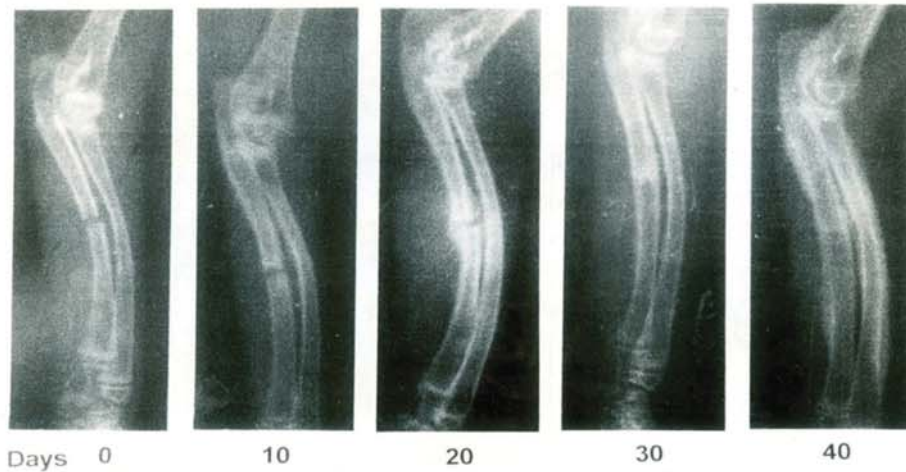
試驗A組動物的血鈣直到第7天非顯著地增加，在第15、30天有明顯降低($P < 0.05$)，最後在第40天時達到正常值。試驗B組動物的血鈣，非顯著的增加直到第15天，最後漸漸減少至實驗結束(第40天)。兩組動物的血鈣都在術後直接增加，這個結果和Soliman & Hassan(1964)對於骨折早期修復的發現相同。當兩組互相比較時，試驗組在第15、30天的血鈣明顯低於對照組，而試驗組動物在此階段有大量的支撐骨痂形成。也就是試驗組骨痂的鈣從血鈣得來，相對的，對照組的骨痂形成就延遲了。

兩組動物的血磷值在骨折固定之後直線上升，並在術後第3天達到最高。接下來各階段微幅增加，試驗結束時，兩組動物皆維持著些略高於基準值的量。骨折修復早期的血磷值增加，可能是由於骨折部位的細胞有壞死性崩裂。

"MagaCal"試驗組(A)的血液鹼性磷酸酶(AP)活性，從第3天開始顯著增加($P<0.05$)，在第15天時達到最高，最後在第40天下降到正常值。反之，對照組的AP活性在第40天最高。鹼性磷酸酶是一種大量出現在長骨骨化區的酵素，可以水解有機酯，提高無機磷的產生以利骨形成。"MagaCal"試驗組(A)，AP活性在骨折早期的增加，可能指出骨折修復時期中，骨細胞增生的增加。此酵素在軟骨內骨化過程的實際角色未知，有報告說其在骨折修護上，對於酵素活性和鈣化之間具有相關功能。

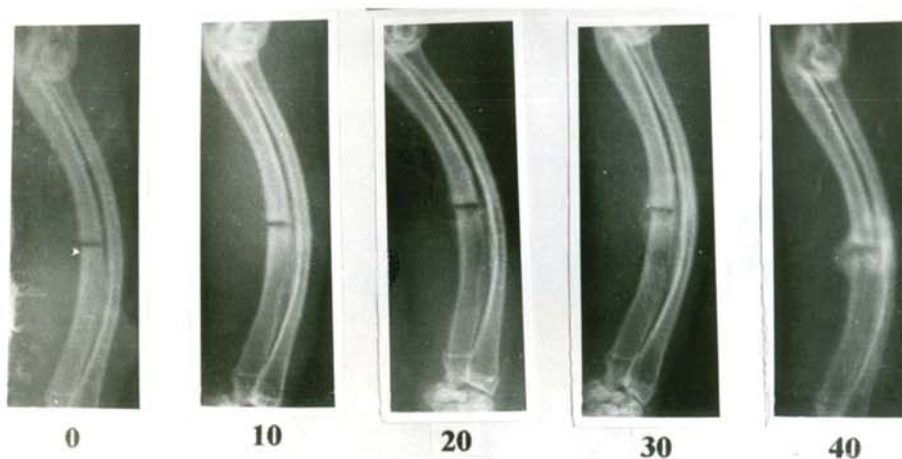
"MagaCal"試驗組(A)於術後直接拍攝的放射線照片顯示，尺骨有放射線穿透性的骨幹橫向缺損區，使得橈骨作為天然的支架。在第10天，骨膜反應幾乎延伸到整個尺骨的骨幹，以及骨折處的兩個斷端，變得不規則且模糊。此骨膜反應在第20天出現得更明顯。在此時期，骨折裂口幾乎被新形成的骨組織填滿，消除了骨頭的缺陷。第30天，骨膜反應明顯降低，骨痂組織化、骨單位完成。第40天，骨痂體積明顯縮小，平滑、不規則、緊密的骨膜表面明確指出，修復部位已重建。骨膜連貫性地橫跨骨折線完成。髓腔的連合跨過骨折線，但未完全(如圖一)。

圖一："MagaCal"試驗組(A)的放射線橫照顯示骨折後第1、10、20、30、40天的癒合過程。



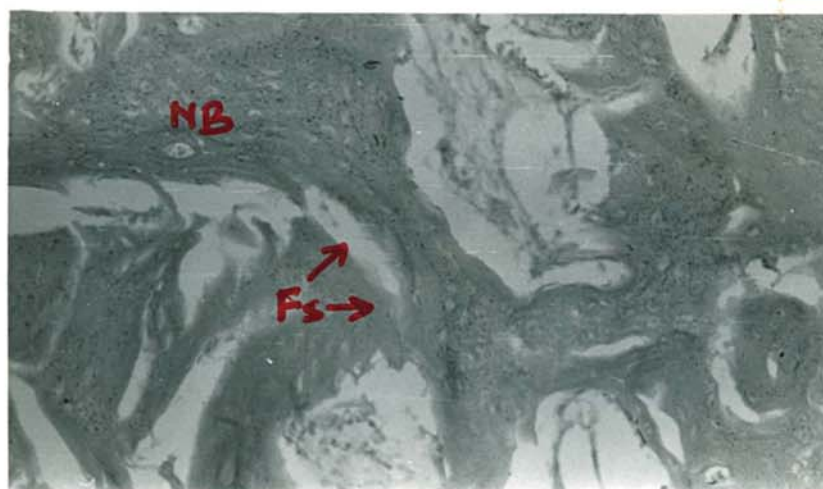
對照組(B)在第0、10、20天的放射線照片顯示，骨折斷端變得粗糙整齊，但是缺陷周圍的骨膜和骨內增生，比起試驗組(A)相對較慢。第30天的放射線照片顯露出兩邊斷端以及鄰近橈骨的骨膜表面，有新骨形成。在第40天，這些骨膜增生更緊密。雖然缺陷位置縮小，但在第40天仍可清楚目視，與試驗組相比，其修復是延遲的。在此時期，連結鄰近橈骨增生的骨膜，於本試驗中的功能如同天然支架(如圖二)。

圖二：對照組(B)的放射線橫照顯示骨折後第1、10、20、30、40天相對較慢的癒合過程。

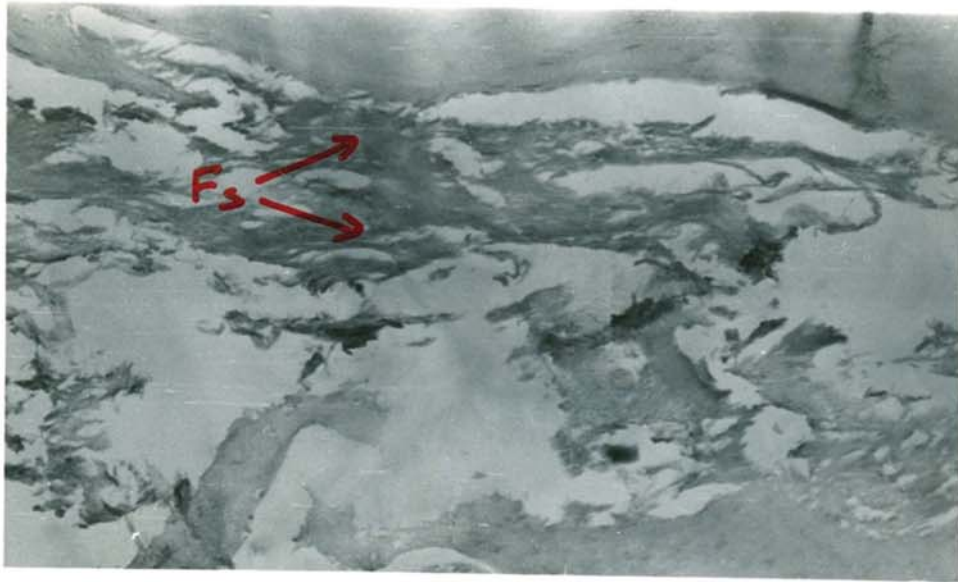


"MagaCal"試驗組(A)的組織病理學，可觀察到骨折線完全連合、並獲良好重建。骨折間隙被新發展的骨小樑填滿，顯示其天然的生長方向及交織。也可注意到一些新形成、厚的骨小樑，附著在骨折兩端(如圖三)。骨膜也變厚，且有單核細胞的浸潤。兩側斷端的重吸收和替換都在進度內。對照組(B)可見到，骨折部位的連合不完全，骨骼間隙及新形成的骨頭亦可清楚與正常骨頭做區別(如圖四)。新形成的骨組織，顯示出不適當的方向，無完整發展，也沒有橫跨骨折線。骨髓組織中也出現血管和單核細胞浸潤。

圖三："MagaCal"試驗組(A)的顯微照片顯示，骨折後40天，有大量新形成的骨小樑和骨單位osteon附著在骨折部位，將近完全癒合。



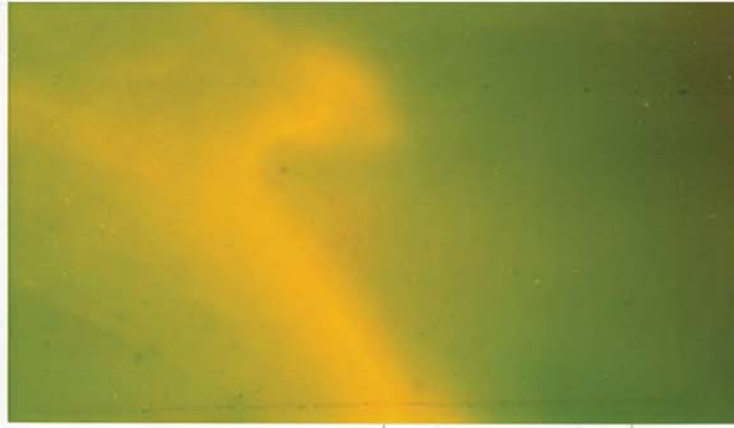
圖四：對照組(B)的顯微照片顯示，骨折後40天，骨折尚未完全癒合。



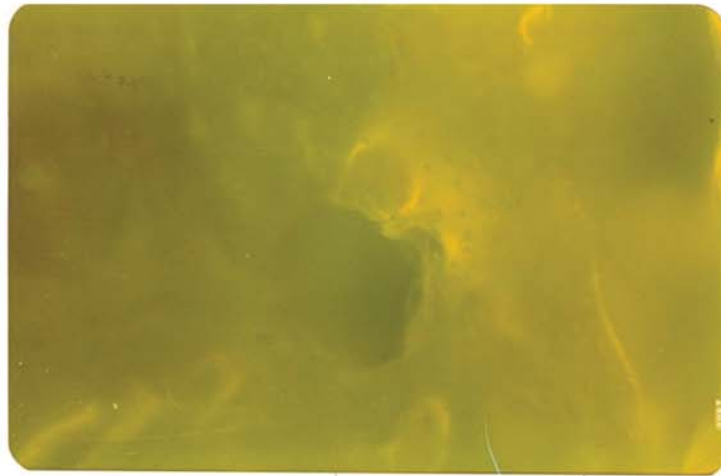
Oxytetracycline會跟隨離子化的鈣，藉由吸收的過程被固定，而這些是受限發生在那些礦質化組織活性沉積的區域。受標記的新骨和舊骨，在UV光下，會分別發出明亮的金黃色以及暗綠的螢光色，可用於評估新骨形成的數量以及骨折修復狀況。這些切面使用螢光骨標記，參照整理骨工程學並對照組織學，評估新骨的形成。實驗動物犧牲前的Tetracycline標記(2-6-2型)，有助於測量骨折部位新骨形成的範圍。幾乎所有的實驗動物，都可發現新形成骨和骨折修復的範圍，較接近內層網狀骨而非外層骨。這是由於骨骼接觸在網狀骨的許多點上，富含血液供應，因此復原快速。這證明了密度低的網狀骨之修復，快於較密實的外層骨。所有動物新生的骨頭，致密度總是低於舊骨，這是由於新骨的礦物質沉積和結晶體大小，和舊骨有差異。試驗組(A)的動物因為有“MagaCal”的輔助添加，從骨折斷端之完整骨頭連和、復原皮質的連續性，可觀察到良好的骨折修復。在螢光顯微鏡下，可目視斷端之間發出金黃螢光的骨折線，相反的，原本的骨頭是呈現暗藍綠色的顏色。在完全填滿骨折間隙的新骨組織之內，也出現無數新的骨小樑交叉橫跨(如圖五)。兩端都有重吸收的凹陷，指出骨頭的重吸收和取代都在良好進度下。重吸收的凹陷代表骨骼最初的重建。在“MagaCal”添加組，超薄切面顯示，良好的骨折復原下，新骨和舊骨的密度相似。這也說明這些動物的復原相對較快，骨頭恢復為新、正常的外觀。

對照組(B)的動物，從新形成、緻密度較低的骨組織，以及橫跨骨折線的皮質連續性也未恢復，可看出骨折部位無完全聯合。在紫外光下，某些地方出現相對密度低的螢光，代表骨折間隙沒有被新的骨組織完全填滿。間隙的前端邊緣被螢光色新骨填滿，指出新骨形成不良，無法橫跨到另一端，使得聯合延遲(如圖六)。

圖五：“MagaCal”試驗組(A)的螢光標記顯微照片顯示，大量良好新形成胞/骨單位(金黃色)附著在骨折線。

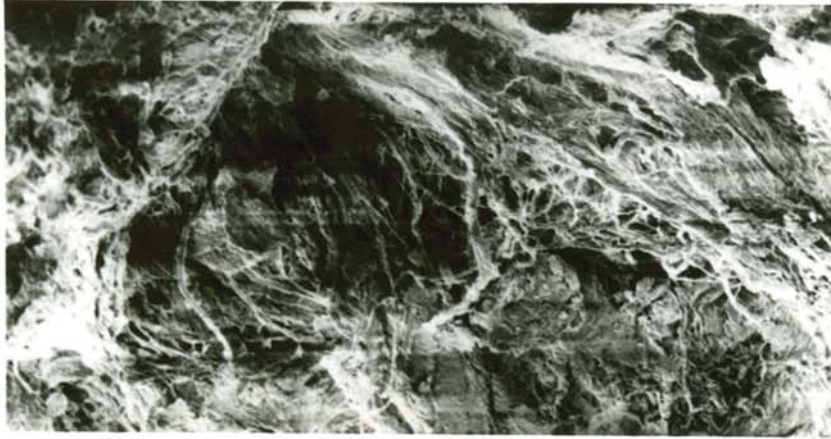


圖六：對照組(B)的螢光標記顯微照片顯示，骨折部位相對較緩慢的造骨活性。

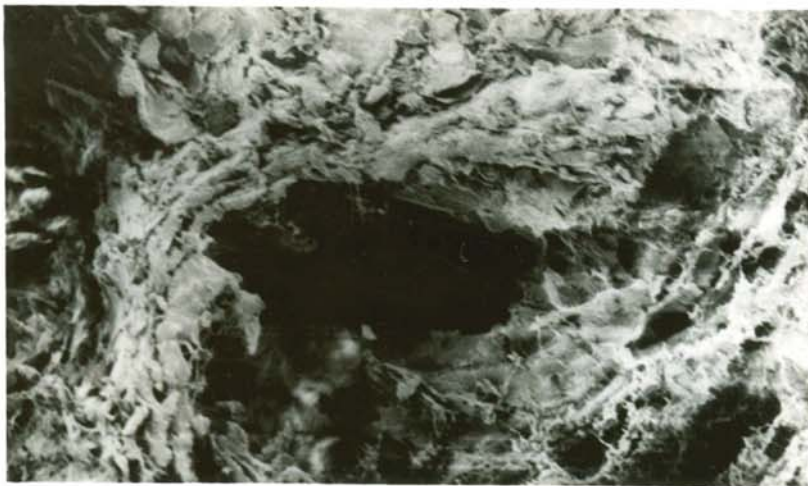


掃描式電子顯微鏡(SEM)可用來觀察兩組動物的骨折復原狀況。也可以看到參與修復過程中的組織之型態圖，以及骨折部位血管的生成狀況。在“MagaCal”試驗組(A)的動物，SEM可清楚的看到兩邊斷端的骨聯合，但是，重建的過程還在進行中。這證明了受傷部位有骨細胞(成骨細胞及軟骨細胞)，以及未礦化膠原蛋白網狀系統的存在。更進一步放大倍數來看，修復部位出現血管增生現象，新血管附著在修復部位上(如圖七)。這些血管大部分來自於骨膜和周圍的軟組織。對照組(B)的動物，SEM照片顯示骨頭的損傷並未完全修復，且部分被纖維軟骨組織填滿(如圖八)。骨組織很明顯的分部在骨折斷端，纖維軟骨則出現在損傷部位的中心。對照組動物的骨基質建設和血管生成也相對較少。

圖七：“MagaCal”試驗組(A)的骨切面的掃描電子顯微照片顯示，骨基質與新形成的骨細胞融合的排列過程，以及附著於癒合部位的新血管。



圖八：對照組(B)的掃描電子顯微照片顯示，新骨只在骨折末端形成，且骨頭中心被纖維軟骨組織填滿。



"MagaCal"用於試驗組動物，可能會催活/刺激體內的骨先質細胞，促使骨生成細胞早期增殖(成骨細胞及軟骨細胞)以及有機基質的形成。放射線學、組織學、掃描及脫鈣超薄切片等研究證實，"MagaCal"試驗組的動物，骨生成的開始速度，遠快於對照組動物。成骨作用是指髓腔(骨內膜)、以及骨外層(骨膜)形成層中存在的活化骨生成細胞，直接形成新骨。新骨成形或成骨作用也會直接發生在誘導骨質生成的過程中。誘導骨質生成作用，是在與骨基質接觸之後，未分化的間葉細胞，分化為成骨細胞。此過程中主要的階段分為趨化、有絲分裂、分化。間葉細胞受刺激後，變成軟骨細胞，接著增殖並產生礦物質骨基質。分化是受許多不同的因子(骨誘發因子)調節，包括骨形成蛋白(BMP)、轉化生長因子 β (TGF- β)、類胰島素生長因子(IGF)、細胞動素、血小板衍生性生長因子(PDGF)、腫瘤壞死因子(TNF)及前列腺素E2。"MagaCal"可能會創造某些上述骨誘發因子的細胞環境，使試驗組動物的骨生成提早。各項評估數據也指出，"MagaCal"試驗組的動物，除了骨生成作用較早，血管增生和重建復位也比對照組動物快速。早期的研究者也有報告，和對照組相比，植"MagaCal"可提高骨折修復率，並縮短大約30%的復原時間。

Choudhary 在1991年，發現了"MagaCal"使用於家禽飼料添加時，具有蛋殼中鈣的動員能力。這個事實和在試驗組動物的骨折部位可看到相對較緻密、組織化的骨痂，以及血鈣也明顯低(血鈣動員進入骨痂)具相關性。Philipov等人於1994年也報告，"MagaCal"的添加，幫助達到妊娠後期鈣的高需求量，也促進乳牛骨骼組織的鈣化，因此"MagaCal"添加後，對於骨骼重建活性具有正面效應，並提高骨骼中無機礦物質的佔比。

臨床病例

臨床上總共有30個骨折的病例(22隻狗和8隻山羊)，在骨折之後，"MagaCal"在犬隻給予15ml、山羊給予30gm的劑量，一天兩次、連續15天。這些骨折包括了股骨骨幹骨折、脛骨髁端骨折、尺/橈骨遠端骨折及掌/蹠骨骨折。這些病例經過適當還原(股骨和脛骨骨折主要屬開放式、尺橈骨和掌蹠骨則是閉鎖式)及固定(內/外)，配合廣效抗生素和止痛劑，"MagaCal"作為輔助添加。各時期的放射線照片以及臨床症狀，包括四肢的體重支撐狀況，指出"MagaCal"有助於加快新骨形成，使骨折早日修復、恢復體重支撐和骨骼緻密度。但是，少數臨床病例在接下來幾天回到綜合性醫院，而某些病例無回診。所以無法得到最後的完整資料。