

：計畫編號：CCMP89-RD-036

行政院衛生署中醫藥委員會八十九年度委託研究發展
計畫成果報告

以骨科複合材料包覆中藥七釐散作為骨骼
大缺陷填充材料之可行性評估

執行機關：中國醫藥學院附設醫院

計畫主持人：曾永輝

研究人員：

執行期間：88年7月1日至89年6月30日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目錄

| | | |
|-----|-------|----|
| 零-1 | 中文摘要 | 2 |
| 零-2 | 英文摘要 | 5 |
| 壹 | 前言 | 7 |
| 貳 | 材料與方法 | 11 |
| 參 | 結果 | 22 |
| 肆 | 討論 | 26 |
| 伍 | 結論與建議 | 28 |
| 陸 | 參考文獻 | 29 |
| 柒 | 圖、表 | 31 |

編號：CCMP89-RD-036

以骨科複合材料包覆中藥七釐散作為骨 骼大缺陷填充材料之可行性評估

曾永輝

中國醫藥學院附設醫院

摘要

本研究目的乃結合中醫藥材及生醫骨科複合材料(GBG)，試圖發展出一種新的骨科修補材料，以解決臨床上治療大缺陷骨骼之不足。在複合材料的選取方面，以具可吸收性質的生醫玻璃粉末為主要基材，而以自然高分子材料明膠充當黏結劑。為了促進受傷骨組織癒合，本研究於骨科複合材料中包覆中藥七釐散，期盼材料植入骨骼大缺陷時能逐漸溶解，並釋出中藥作用於骨組織之修復，更希望藥效之產生速率完全符合自然骨的重建模式，使整個材料在植入一段時間後能夠完全被吸收、取代，而成為自然骨骼的一部分。

體外生物適應性評估方面，以老鼠的骨母細胞為評估細胞。每一個培養皿中加入 1ml 含細胞數目為 1×10^4 cells/ml 的培養液，然後再各加入 1ml 事先製備完成 100mg/dl, 75mg/dl, 50mg/dl, 25mg/dl,

5mg/dl, 以及 1mg/dl 不同濃度的藥劑, 控制組則將試料以 PBS 代替。經過於兩天 37°C 細胞培養箱的培養之後, 吸出培養液以劉氏染色法 (Liu stain) 染色觀察細胞型態的變化, 然後計算存活細胞數目, 以及酵素連結免疫分析法分析。

動物實驗方面, 將玻璃陶瓷粉末倒入明膠溶液中混合均勻時, 加入七厘散藥材, 充分混合後, 將膠狀的複合材料灌入自製的模具中, 以 γ -Ray 滅菌。植入紐西蘭兔頭顱骨中間直徑約 2 公分的圓形缺陷中。術後每週交替施打 Tetracycline 與 Calcine green, 作為新生骨組織標定劑。並且於手術後經 2、4、8、16、24 等週後, 分別將實驗動物犧牲, 進行組織切片、材料分析及 X-光檢視。

骨母細胞培養結果顯示, 100mg/dl, 75mg/dl, 50mg/dl 與 25mg/dl 四種濃度明顯的抑制骨母細胞之增殖, 5mg/dl, 以及 1mg/dl 兩種濃度之抑制效果降低, 而且有依濃度之降低, 使抑制效果更降低, 但仍低於控制組之細胞數。動物實驗結果發現七厘散有遲緩複合材料 (GBG) 降解速度之現象, 無論是複合材料 (GBG) 混合七厘散植入或複合材料 (GBG) 單獨植入加口服七厘散皆有不錯之效果, 且複合材料 (GBG) 混合七厘散植入效果較佳, 而複合材料 (GBG) 混合七厘散植入加口服七厘散並不會有更明顯之效果。

綜合以上結果, 雖然無法釐清七厘散於骨折癒合上之功效, 但

與複合材料(GBG)合用，可以遲緩降解速度，有助於骨頭缺陷之完全癒合。

關鍵詞：生醫骨科複合材料、七釐散、明膠、生醫玻璃

**The fabrication and Evaluation of a New Composite
Composed with DP-Bioglass, Gelatin, and Chin-Li-
Saan as a Bone Substitute**

Tsuang, Yang-Hwei

China Medical College Hospital

ABSTRACT

The purpose of this study was to prepare and evaluate the feasibility and biocompatibility of a new composite (GBGC) as bone substitute. The composite is composed of DP-bioglass ceramics, gelatin, and Chinese medicine chi-li-saan. In the previous studies, the biocompatibility and cytotoxicity of the GB composites were conducted by coculturing with rat osteoblasts in vitro. It was found that the gelatin and calcium were gradually releasing from the GBG composites, which were supposed to be nutritious for the growth of the osteoblast. Chin-li-saan, had been reported as a effective medicine that could accelerate the recovery of fractured bone, but it is not clear about the pathological effects of this medicine when acting on the bone cell or tissue directly. Thus, before this new composite was implanted into a rat calvarial defect, it is necessary to determine if chin-li-saan could facilitate the growth of bone cell.

In the animal implant experiments, the new composite was manually packed into 15x15x1.5 mm cylindrical Teflon molds and dried overnight in an oven to make preformed materials. The composites were sterilized by γ -ray exposure prior to use. Seventy-two mature New Zealand rabbits, weighting 3-3.5kg, underwent full-thickness excision of the parietal bone, which forms the majority of the cranial vault. Three experimental groups and one control group were examined in this study,

these groups include (1) fed with chin-li-saan + GBG composite, (2) fed with chin-li-saan + GBGC, (3) implant GBGC, and (4) unreconstructed rabbits as control. And three rabbits were examined for each groups in every time period. Animals were sacrificed by an overdose of sodium pentobarbital, at 2, 4, 6, 8, 16, and 24 weeks after operation. The assessment included a series of post-operative gross examination, radiographs, material analysis and histological evaluations.

In the osteoblast culture with chin-li-saan, There was obvious inhibition of the proliferation of the cell growth in the concentration over 25mg/dl. Although The inhibitory effect was reduced with low concentration. However, the cell counts were still lower than the control group. When the bone substitutes were implanted into the Skulls of the rabbits, The absorption of the GBG composite was slower with Incorporation of chin-li-saan. The additional feeding of chin-li-saan did not further reduce the rate of absorption.

Keywords : Biomedical composite, Chin-Li-Saan, Gelatin, DP-bioglass

壹、前言

人類最早的醫療活動之一是外治法，原始人類簡單的包紮法等療法，可謂骨傷科的起源。中華民族的自有文字記載伊始，也即甲骨文的年代(約公元前 21 世紀到至前 11 世紀)，記下了對骨傷疾病的簡樸知識，爾發展到西周時期(公元前 11 世紀至 8 世紀)隨著文化和醫學的進步，骨傷病的病名概念和治療方法逐步形成，從事醫療活動的醫生也開始分工，西周時四大醫之一“瘍醫”也就是外傷醫，已能應用藥物和簡單的外科器具，內治外治結合處理一般創傷、骨折、創傷感染以及癱瘓疾病。五十年代末，各地一些著名的中醫正骨醫師的經驗得到總結和繼承。六十年代，中西醫結合治療骨折的臨床科研工作取得成功，著名的骨科專家方先之、尚天裕等編著的<中西醫結合治療骨折>一書，結合中西醫治療骨折。不僅使中醫治療骨折的經驗得到繼承與發揚，而且對世界醫學科學也產生了影響。至此，中醫對骨折治療之方法多以(1)正骨手法以回復骨折處正確的對位，(2)固定架固定傷處，(3)藥物治療- 內治法、外治法，(4)針刺療法，拔火罐療法，水針療法，離子透入療法[1]。

然而在西醫方面，對於骨骼因意外傷害所造成的大部位的骨骼缺陷(bone defect)，給與適當的填充材料幫助骨骼的修復是最常見的處理方式[2,3,4]。陶瓷材料在生物體內與生物體的親和性非常良好，

而且植入後在生物體內會分解、吸收、與生物體形成緊密的化學結合，更甚地，能加速骨骼癒合或變成骨骼的一部份，就因這些卓越的特性，使得生醫陶瓷骨科材料能受到生醫材料界的青睞[5]。然而，生醫惰性陶瓷在機械性質方面，會有應力遮蔽(stress shielding)的效應發生，造成植入周圍骨組織疏鬆之現象；生醫活性陶瓷之機械強度，則普遍無法滿足臨床之需求。雖然，現在有許多從事生醫活性陶瓷強化的研究工作，可是效果仍不盡理想[6,7]。以生醫活性陶瓷而言，如氫氧基磷灰石(MAP)，三鈣磷酸鹽(TCP)經過燒結成型為塊狀或直接以粉末狀填入骨缺陷中(bone defect cavity)，來幫助骨骼修復，雖然其生物親合性良好，而且部份材料最後可被完全吸收進而為自然骨骼所取代，但是由於粉末狀填充材料在填補時，體液或血液常會將植入材料沖離患處，影響實際植入的效果；雖然將粉體製成多孔質，配合多種形狀大小的模具經過燒結成型可製成各式各樣的塊狀材料，然而在臨床應用上亦常會遭遇到一個重要的問題，即骨缺陷區域的大小或形狀不可能與預期的尺寸完全吻合，因此在臨床應用時常需挖大傷口或修剪植入材料，以求傷口與植入材料儘量密合，如此造成手術時間的延長及對病患傷口的二次傷害，而且患處與植入材料間所存留的一些間隙，更會使骨癒合因此受到阻礙[8,9,10]。

對於陶瓷粉末加上可吸收性高分子材料混合形成填充材料，應用在骨科植入的研究中，目前以氫氧基磷灰石混合 PLLA[11]和以生醫玻璃陶瓷(如 A·WG.C·)或鈣磷系列陶瓷粉末混合膠原纖維、纖維蛋白為最常見的組合[12]。由於現今最廣泛被使用的氫氧基磷灰石及生醫玻璃(陶瓷)，其在物體內無法被完全吸收、取代，故本研究於製備複合材料的材料選擇方面，取在生物體內具有可蛻化性(biodegradable)的陶瓷粉末。可吸收性高分子材料的選擇，乃由牛皮提煉出來的明膠(gelatin)做為與陶瓷粉末混合的黏結劑，此乃因為明膠的蛋白質結構為初級結構(Primary structure)，其物理特性、化學特性均符合本研究材料研製的要求，而且其所造成之排斥反應較膠原輕微，成本較低廉[13]。但因明膠在生物體內水解、酵素分解的速率太快，無法達到骨骼修復所需的時間，為了降低其分解的速率，利用化學方法或是物理處理方式，使明膠發生交聯反應，一方面可控制材料在生物體內的物理變化，另一方面方可降低明膠的排斥反應，可以利用交聯反應將明膠產生一架構，使陶瓷粉末充斥其中，隨著新生骨的形成，填充的複合材料亦逐漸被吸收，一直至骨缺陷修復完全[14-18]。

本研究目的乃試著結合中藥七釐散與骨科填充材料(GBG)的優點，以解決目前臨床應用上對於大部位的骨缺陷(bone defect)的許多

治療缺點。因此，材料不但必需具有良好的生物適應性、方便於外科手術操作外，更希望中藥七釐散的藥效與植入材料(GBG)在生物體內的溶解、析出速率完全符合自然骨骼之重建模式，並可迅速參與新生骨之形成，使整個材料在植入一段時間之後，完全被吸收、取代，而成為自然骨骼之一部份。同時希望該材料將來能應用於大缺陷的骨骼替代材料。而選擇七釐散做為中藥配方，主要乃應用其於骨折癒合之三大時期；血腫發炎期、原始骨痂期、骨痂重朔期長期優異且明顯之治療效果[19]。而七釐散之做用則有如施打於體內做用之水針注射液一般[20]，甚至其亦改善了水針為短效性作用，需天天注射的麻煩，並且藥劑直接於患處釋出，作用更直接、更有效。本研究以 3-3.5 公斤之紐西蘭兔做為實驗動物，在兔子頭顱骨創造出直徑約兩公分之缺陷(calvarial defect)，再將所發展之材料植入缺口，術後 2、4、8、16、32、64 等週後將之犧牲掉，進行組織切片、材料分析及觀察，作為評估之依據。

貳、 材料與方法

實驗材料

(1)七釐散的成份及功用：

| | |
|------|---|
| 方名 | 七里散 |
| 出典 | 良方集腋 |
| 組成 | 血竭兒茶，硃砂，沒藥，冰片，乳香，麝香 |
| 功能 | 活血，散瘀，止痛，止血 |
| 主治 | 跌打損傷，骨折筋斷之瘀血腫痛或刀傷，出血 |
| 臨床應用 | 外傷瘀血作痛，或刀傷出血，內傷血瘀，胸痛，吐血， 一切無名腫毒，燒傷，燙傷，中毒性心肌炎， 冠心病及肝炎脅痛，屬血瘀化熱者(孕婦禁用) |
| 藥名 | 血竭兒茶 |
| 異名 | 血竭麒，麟竭，麒麟竭孩兒茶，烏爹泥 |
| 性味 | 甘鹹平無毒苦澇平無毒 |
| 功能 | 收斂，止血，止痛，消瘀，活血，生肌收濕，瀉熱，生 肌，收斂，止血，定痛 |
| 主治 | 一切疼痛，跌打損傷，出血諸症，腸黏膜炎，消化不良， 清上膈熱，化痰生外治惡瘡，疥癬津，一切諸瘡 |
| 生藥用量 | 0.3~0.7 錢 1~2 錢 |

藥名 硃砂，沒藥
異名 辰砂.丹砂
性味 甘微寒有毒
功能 鎮莖.鎮靜.驅梅.益氣.明目.解毒
主治 精神不寧.神經性心悸亢進.眼球充血.驚恐少寐.小兒驚癇.
經閉
生藥用量 0.1~0.5 錢

藥名 沒藥
拉丁名 Myrrha
異名 末藥
性味 苦平無毒
功能 活血，散瘀，消腫，定痛，健胃，通經
主治 療金瘡，杖瘡，諸惡瘡，痔漏，下血，產後心腹氣痛，
消化不良，大便秘結
生藥用量 1~2 錢

藥名 紅花
拉丁名 Carthami Flos
異名 紅藍花，川紅花

性味 辛溫微苦無毒
功能 活血，散瘀，通經，解熱，發平，止痛
主治 婦女經閉，癥，奇難產，死胎，產後惡露不行，跌打損傷，瘀血止痛
生藥用量 1~3 錢

藥名 冰片
異名 梅片，龍腦，龍腦香
性味 辛溫無毒
功能 回蘇，清涼，鎮咳，鎮瘧，消炎，消腫
主治 因熱病而致之腦神經昏蒙，心力衰憊，失神，婦人難產，外用鼻粘膜
生藥用量 0.05~0.1 錢

藥用部份位

藥名 乳香
拉丁名 Olibanaom Gummi
異名 馬尾香，天澤香
性味 苦辛溫無毒
功能 鎮痛，消痰，去痰，鎮咳，消炎

主治 心腹諸痛，跌打損傷瘀凝諸，乳房腫痛，胃潰瘍之吐血，

產後血積腹痛

生藥用量 0.5~2 錢

藥名 麝香

異名 麝臍

性味 辛溫

功能 興奮，強心，回蘇，鎮痛，消腫

主治 中風，痰厥，驚癇，跌打損傷，癥瘕，心腹暴痛

生藥用量 0.05~0.1 錢

(2)生醫骨科複合材料(GBG)

骨科複合材料方面所使用的原始材料包括兩大部份:生醫可吸收玻璃粉末(DP-bioglass)及黏結劑(gelatin)。

A. DP-生醫可吸收玻璃粉末

採用具生物降解性之鈉鈣矽磷生醫玻璃陶瓷粉末，其重量百分組成成份為 Na_2O 8.4%、 CaO 40%、 SiO_2 39.6%及 P_2O_5 12%。將擇定的氧化物， Na_2O 、 CaO 、 SiO_2 、 P_2O_5 ，依適當重量百分比混合， P_2O_5 粉末具強烈吸濕性及潮解性，不容易稱重配料，因此以三鈣磷酸粉末 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ，做為配製材料;三鈣磷酸中含有 CaO ，在稱取 CaO 時，若

含量不足，另加 CaCO_3 ，補充； Na_2O 則以 Na_2CO_3 ，做為配製原料。使用 Na_2CO_3 及 CaCO_3 做為原料，因為在高溫下，碳酸鹽類會分解成氧化物及二氧化碳，在二氧化碳送出過程中，會將熔融玻璃中的氣泡帶出，具有脫泡作用，減少玻璃中的氣泡殘留。將配製好的原料(raw materials)共 100 公克，置入球磨罐中，並放入直徑 0.5 公分的氧化鋁球，做為混合介質，八小時混合後，並經由電子微探分析(mapping)確定完全均勻混合。再將混合後的生料(batch materials)，放在白金坩堝中，直接放進 1400°C 的高溫爐中加熱數小時。將熔融的玻璃液體，迅速從高溫爐中取出，倒入不鏽鋼模型後再快速置於 $530 \sim 600^\circ\text{C}$ 的熱處理爐中退火(annealing)維持小時後緩慢降至室溫 ($5^\circ\text{C}/\text{min}$)，以消除因急速冷卻，殘留於玻璃內的內應力(Residual stress)。待冷卻至室溫而完成玻璃的熔製。

B.黏結劑

骨科植入物的研製過程中，常需利用一些有機高分子材料充當陶瓷粉末黏結劑，雖然黏結劑的種類有人工合成的高分子及取自於其它動物的自然材料兩種，然而現今對黏結劑的選擇大致上均以自然高分子材料為主要的來源，如纖維蛋白、膠原及明膠等，本研究選擇由牛皮所提煉而來的明膠為黏結劑。

實驗方法

(1) 中醫藥材體外生物適應性評估

前期研究對 GBG 的生物適應性的評估，在細胞培養測試方面，以骨母細胞做為實驗對象，已有相當完整的生物適應性結果，利用細胞培養方式評估亦間接證實材料對骨修復的正面效果，然而，就七釐散藥劑直接對骨細胞的作用效果，目前並無明確的證實，因此，本研究將以老鼠的骨母細胞(osteoblast)為評估細胞，針對七釐散對骨細胞的促進效益做進一步的探討，而骨母細胞培養評估法描述如下。

A. 骨母細胞培養方法

首先取出新生 1-4 天的大白鼠(Wistar white rat)的頭蓋骨(calvaria)，在顯微手術台上盡可能乾淨地去除頭蓋骨上的肌肉、纖維組織及骨膜，再將頭蓋骨浸入沒有小牛胚胎血清(fetal calf serum)的細胞培養液(Dulmecco's modified eagle's medium；DMEM)中，然後於細胞培養無菌操作檯(laminar flow)中將頭蓋骨取出，置入 15ml 的離心管中，加入 10ml 的磷酸緩衝生理食鹽水中(phosphate buffer saline；PBS)予以清洗，並重覆此步驟 2-3 次，清洗完成之頭蓋骨置於 10cm 的細胞培養皿中，以無菌的組織剪將頭蓋骨剪碎要求碎片大小在 1mm² 以下，再將此碎片收集置入 15ml 的離心管中，再倒入 PBS 約 10ml 加以沖洗，並重覆 2-3 次，之後吸除 PBS 並加入溶解蛋白酶(collagenase；

1mg/ml)5ml，放置於 37°C 的細胞培養箱中，靜置 1 小時後取出以 1500r.p.m. 離心 5min，將骨碎片與上清液分離並以吸管吸除上清液，並加入 PBS 沖洗稀釋剩餘的蛋白酶，洗淨的骨碎片及組織細胞混合已含有 10wt% 小牛胚胎血清的 DMEM 培養液中，再將之倒入 10cm 的培養皿中，於 37°C、5%CO₂ 的培養箱中靜置培養，如此完成骨母細胞的培養。

B. 七釐散生物體外適應性評估方法

由恆溫器(incubator)中取出骨母細胞的培養皿，以吸量管除去培養基，加入 2ml PBS 溶液重覆兩次將培養基清洗乾淨，並於清洗完畢後，再加入 1ml Trypsin/EDTA 輕搖幾下，放入恆溫器中保溫靜置 2-3 分鐘，待骨母細胞懸浮於 Trypsin/EDTA 溶液中，然後迅速加入 10ml 的 PBS 予以稀釋吸入離心管中，經過 1500rpm 的離心之後，將上清液抽出僅保留下層液大約 0.5ml，此時視所需分盤的數目，加入適當的培養基用吸量管來回抽吸幾次使其均一化，再分裝在每一個培養皿中，每一個培養皿中加入 1ml 含細胞數目為 1×10^4 cells/ml 的培養液，然後於每一個培養皿中再加入 1ml 事先製備完成不同濃度的藥劑，使培養基溶液的總量為 2ml，如此藥劑與培養液則以 1 比 1 比例混合於培養皿中，而在控制組方面則將試料以 PBS 代替，同樣地，經過於兩天 37°C 細胞培養箱的培養之後，吸出培養液以劉氏染色法

(Liu stain)染色再以位相差光學顯微鏡觀察細胞型態的變化情形，然後再將細胞打下計算存活細胞數目，而所吸出的培養液經過離心之後分裝於小試管中，放在-70°C的冰箱中保存以待做酵素連結免疫分析法(Enzyme Link Immunity Standard Assay，ELISA)分析。

(2)GBG+七釐散複合材料製作

市售的明膠為粉末狀並無黏結的效果，為了使玻璃粉末及明膠能充分均勻的混合，在材料的研製程序上首先必需使明膠調配成溶液，將明膠粉末稱取所需重量百分比(16.7%)的量;然後取 5 倍於明膠重量的蒸餾水置於燒杯中，水浴法加熱至 75°C 左右，將明膠粉末倒入燒杯中，維持溶液溫度為 75° C 左右，利用攪拌子於溶液中持續攪拌，約五分鐘後明膠完全溶解於熱水中而呈透明金黃色的明膠溶液，此時黏結劑的配製即告完成。

接著將玻璃陶瓷粉末，稱取重量百分比為 75wt%的量，均分成等量的三部份依序倒入明膠溶液中，主要乃是避免一次傾倒所有的粉末於黏結劑中時，無法使中醫藥材、黏結劑與粉末間充分混合的缺失，故採取兩段式添加粉末的方法，以提高混合的均勻度。首先將其中二部份的粉末緩緩倒入仍持續攪拌而且溫度維持 75°C 的黏結劑中，當混合均勻時，迅速將水浴溫度降低至 40°C，並加入已準備好的七釐散藥材，攪拌約 5-10 分鐘後再倒入剩餘的粉末。當充分混合後，

將膠狀的複合材料灌入自製的模具中，等到材料硬化後即可退去模具而完成試片的製作。材料在進行動物實驗前，須先進行 γ -Ray 消毒滅菌，以供動物實驗使用之。

(3)動物實驗

本研究以 3-3.5 公斤之紐西蘭兔做為實驗動物，術前進行手術部位之剃毛及消毒，再以 1:1 的 Combelen 及 ketamine 混合液，經肌肉注射 1.5c.c. 進行麻醉。實驗動物麻醉後，沿兔子顱頂部的中央線劃開，露出頭顱骨，以高速切割機(high speed cutting burr)從鼻背(nasal dorsum)至枕穴(inion)，穿過中央線拿掉顱頂部(parietal skull)中間的骨頭，創造出直徑約 2 公分的圓形缺陷，然後將材料植入缺陷部位，以生理食鹽水清理乾淨後，再做正常程序縫合傷口。手術後 48 小時內，每隔 12 小時施打一次 buprenorphine hydrochloride(IM 0.01mg/kg)止痛。術後每週交替施打 tetracycline 與 calcine green，作為新生骨組織標定劑。並且於手術後經 2、4、8、16、24 等週後，分別將實驗動物犧牲，進行組織切片、材料分析及觀察，作為評估之依據。

(4)試片處理與組織觀察

實驗動物犧牲後，以 Stryker Saw 將植入區域與周邊骨組織一起取下，沿植入區域中央線將取下的試片分成兩部份，分別作脫鈣與非脫鈣組織之觀察。將非脫鈣試片以逐級酒精、丙酮、與乙醚浸泡，

固定組織並脫水脫脂後，再以聚丙烯酸樹脂(PMMA)包埋。包埋劑硬化之後，完成非脫鈣試片之包埋，將包埋好之試片，以鑽石切割機切下厚度約 100um 之薄片，把薄片黏貼於載玻片上，以 SiC 砂紙或研磨砂逐級研磨至 40um，再以 Paragon Stain 將試片染色，染劑中含 toluidine blue 及 basic fuchsin，可將礦化骨組織、類骨質(osteoid)、骨細胞分別染成膚色(flesh-tone color)、紫紅色(magenta)與藍色。

將另外一半試片，以 12%HCl 浸泡 12 小時進行脫鈣，然後以石臘包埋(Paraffin embeded)，最後 H.E. 染色之(hematoxylin and eosin stain)。

(5)X-光檢驗(radiographic examination)

實驗動物犧牲後，以 Stryker Saw 將植入區域與周邊骨組織一起取下，先將實體以 40keV，3mA 的 Faxitron X-光機(Hewlett-Packard Company，McMinneville, Ore)，在細顆粒底片下(fine-grained Kodak SRE film)，曝光 180 秒，曝光距離 9 公分。

(6)組織計量評估(histometric Evaluation)

為了定量新生骨組織侵入缺陷部位，或取代植入材料之情形。本研究以組織計量系統(histomorphometric computer program，Osteo Measure Version2.1, Osteo Metrics,Inc,Atlanta,Ga.)，將實驗相關部位

在光學顯微鏡下放大 10 倍，並將影像投影於電腦螢幕上，以影像處理軟體定量出新生骨、類骨質、植入材料、纖維組織等之面積。並觀察這些面積隨實驗時間之變化情形。

參、 結果

1. 體外生物適應性評估

於一系列的骨母細胞培養過程中，每一個培養皿中加入 1ml 含骨母細胞數目為 1×10^4 cells/ml 的培養液，再加入 1ml 之 100mg/dl, 75mg/dl, 50mg/dl, 5mg/dl, 以及 1mg/dl 不同濃度的七釐散，控制組方面則將試料以 PBS 代替。經過培養之後，分別於培養後第一天、第三天、以及第七天將細胞打下，計算存活細胞數目。同樣流程連續操作 6 次，取控制組中細胞數目最多的一次為標準值(100%)，其他培養皿之存活細胞數目以其為基準，成一定之比例，每種濃度 6 次培養結果比例之平均值顯示於圖- 1。各組資料經由 ANOVA 統計方法比較後，在以 t-Test 進一步各別比較。

於控制組中，可以見到骨母細胞培養過程中，骨母細胞數目逐日增加，第三天比第一天多，第七天增加更多。以 100mg/dl, 75mg/dl, 50mg/dl 與 25mg/dl 四種濃度加入骨母細胞培養皿中之存活細胞數目明顯少於控制組的骨母細胞培養皿。在培養後第三天與第七天之存活細胞數目亦無明顯之增加趨向，甚至在 100mg/dl 濃度下有點繼續減少之傾向，但是在統計上無意義。雖然在此四種濃度下骨母細胞之增殖受到明顯的抑制，但是尚不至於使培養皿中骨母細胞之存活細胞數目劇降，可見七釐散只有抑制骨母細胞培養之增殖，並不會

殺死培養中之骨母細胞。

骨母細胞培養皿中加入 5mg/dl 以及 1mg/dl 兩種濃度之抑制骨母細胞增殖效果降低。骨母細胞培養皿中加入 5mg/dl 後培養一天後之骨母細胞之存活細胞數目比例與控制組骨母細胞培養皿培養一天後之骨母細胞之存活細胞數目比例之差別在統計上無明顯的有意義，雖然在培養後第三天與第七天之存活細胞數目有增加趨向，但是在統計上無意義。骨母細胞培養皿中加入 1mg/dl 後培養一天後之骨母細胞之存活細胞數目比例與控制組骨母細胞培養皿培養一天後之骨母細胞之存活細胞數目比例之差別在統計上亦無明顯的有意義，在培養後第三天與第七天之存活細胞數目有增加趨向，與培養一天後之骨母細胞之存活細胞數目比例在統計上有明顯的意義。而且在培養後第三天之存活細胞數目與控制組骨母細胞培養皿培養第三天後之骨母細胞之存活細胞數目比例之差別在統計上無明顯的有意義。在培養後第七天之存活細胞數目與控制組骨母細胞培養皿培養第七天後之骨母細胞之存活細胞數目比例之差別在統計上無明顯的有意義。因此，骨母細胞培養皿中加入 5mg/dl 以下濃度之七釐散，抑制骨母細胞增殖效果降低。而且有依濃度之降低，使抑制效果更降低，但仍低於控制組之細胞數，雖然在統計上無明顯的有意義。

2. 動物實驗

紐西蘭白兔總共分成三組，每組分別有十隻。於紐西蘭白兔頭顱骨直徑 2 公分的圓形缺陷植入實驗材料，實驗材料分成：1. 複合材料(GBG)混合七厘散植入；2. 複合材料(GBG)混合七厘散植入，加口服七厘散；3. 複合材料(GBG)單獨植入，加口服七厘散。手術後經 2、4、8、12 與 24 週飼養後，分別將實驗動物犧牲，以 Stryker Saw 將植入區域與周邊骨組織一起取下，先以 X-光機檢視頭顱骨的圓形缺陷。手術後 2 週犧牲的實驗動物取下植骨區，經 X-光機檢視結果發現，三組動物之植入物周圍皆有明顯空隙，材料吸收不明顯。手術後 4 週犧牲者，複合材料(GBG)混合七厘散植入，無論是否加口服七厘散還是材料吸收不明顯。複合材料(GBG)單獨植入，加口服七厘散者之材料有明顯被吸收現象。手術後 6 週犧牲者，三組動物之植入物周圍皆有明顯新生骨長入現象。複合材料(GBG)混合七厘散植入，無論是否加口服七厘散者，依然還是材料吸收不明顯，雖然無口服七厘散者有些微被吸收現象。複合材料(GBG)單獨植入加口服七厘散者之材料仍舊有明顯地更進一步被吸收現象。即使至 12 週，複合材料(GBG)混合七厘散植入者，依然還是材料吸收不明顯。而複合材料(GBG)單獨植入者之材料更進一步被吸收至只剩二分之一左右。所有之實驗動物皆有新生骨繼續長入現象，綜括以上之觀

察，顯示七厘散有遲緩複合材料(GBG)降解速度之現象，無論是複合材料(GBG)混合七厘散植入或複合材料(GBG)單獨植入加口服七厘散皆有不錯之效果，且複合材料(GBG)混合七厘散植入效果較佳，而複合材料(GBG)混合七厘散植入加口服七厘散並不會有更明顯之效果(表-1)。

為了定量新生骨組織侵入缺陷部位，或取代植入材料之情形。原預定以組織計量系統(histomorphometric computer program, Osteo Measure Version2.1, Osteo Metrics, Inc, Atlanta, Ga.)，定量出新生骨、類骨質、植入材料、纖維組織等之面積。因 921 震災致使整個實驗延後，以至於尚未完成。脫鈣與非脫鈣組織之觀察亦因之延後。

肆、 討論

依資料顯示[19]，七厘散之主要作用於骨折癒合之三大時期；血腫發炎期、原始骨痂期、骨痂重朔期長期具有優異且明顯之治療效果，而七厘散之作用亦可有如施打於體內作用之水針注射液一般[20]。本實驗顯示七厘散直接加入骨母細胞培養中，高濃度時對骨母細胞之生長與增殖有抑制作用，但是無殺死骨母細胞之情況。濃度低於 5mg/dl 之抑制作用方有緩減，且濃度愈低，抑制作用愈小。本研究使用之七厘散係複方，成份之複雜性極高，對於骨母細胞之生長與增殖有抑制作用之結果，不難想像。倒是不具殺死骨母細胞之作用，使七厘散之直接植入生體骨骼內成為可接受之使用方法的理論根據。本實驗以骨母細胞培養為實驗對象，所以七厘散對骨母細胞之生長與增殖有抑制作用，無法瞭解是否對其他細胞也同樣具有抑制生長與增殖之作用，但是可能性應該存在，而且可能性相當高，尤其是與骨母細胞相接近的噬骨細胞，更有可能。

七厘散與複合材料直接植入動物頭骨中並無引起明顯之排斥現象，亦無傷口癒合問題，應證了骨母細胞培養中，對骨母細胞之生長與增殖有抑制作用，但是無殺死骨母細胞之情況，亦可見七厘散可直接植入生體中。動物實驗顯示，七厘散有遲緩複合材料降解速度之現象，但對骨新生並無明顯抑制作用，也進一步應證七厘散可

能於抑制骨母細胞之生長與增殖時，亦有可能具有抑制噬骨細胞之作用。複合材料之臨床應用係預期具有骨引導性(Osteoconduction)功能，要充分發揮骨引導性功能，植入物必須在新生骨長入骨缺陷中前，暫時填充此骨缺陷。因此，植入物之被吸收速度與降解速度不能太快，以至於新生骨尚未長入骨缺陷中前，植入物已消失，導致骨引導性功能無法發揮。動物實驗結果顯示，雖然無法釐清七釐散於骨折癒合上之功效，但與複合材料(GBG)合用，可以遲緩降解速度，有助於骨頭缺陷之完全癒合。

伍、 結論與建議

- 一、 直接加入骨母細胞培養中，高濃度七釐散對骨母細胞之生長與增殖有抑制作用，但不會殺死骨母細胞。濃度低於 5mg/dl 之抑制作用方有緩減，且濃度愈低，抑制作用愈小。
- 二、 七釐散與複合材料直接植入生體中，不會引起明顯之排斥現象。
- 三、 直接植入生體中時，無法證實七釐散於骨折癒合上之功效。
- 四、 七釐散與複合材料(GBG)合用，可以遲緩降解速度，有助於骨頭缺陷之完全癒合。

五、 參考文獻

- (1) 武春發.張安禎., "中醫骨傷科學" 知音出版社 P140-149,1992.
- (2) M. R. Urist : " Bone grafts , derivatives and substitutes" .3-102,(1994)
- (3) R. W. Bucholz , A. Carlton ,and R .E. Holmes : "Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes " Orthopedic Clinics of North america,18:323,(1987)
- (4) S. L. Turek : " Orthopedics Principles and their Application" 4th edition,31-100,(1984)
- (5) 林峰輝, " 鈉鈣矽磷生醫骨科玻璃陶瓷之研究," 成功大學礦冶及材料科學 研究所博士論文 .
- (6) F. H. Lin, C. C. Liu , Y. Y. Huang , C. Y. Wang ,and C. M. Lu : "Sintered porous DP- bioactive glass and hydroxyapatite as bone substitute" J. Biomater 15:1087-1097,(1994)
- (7) J. W. Harrison : "Osteosarcoma associated with metallic implant". Clin. Orthop, Relate. Res. 116:253-260,(1976)
- (8) R. Holmes, R. Bucholz, and V. Mooney : "Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects, a histometric study, J.Bone and Joint Surgery, 68A: 904 (1986).
- (9) F.H. Lin, Y.Y. Huang, M.H. Hon, and S.C. Wu :Fabrication and biocompatibility of a porous bioglass ceramic in a Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ system". J.Biomed.Eng, 13:328-334,(1991)
- (10) J. F. Piecuch, A. J. Goldberg,C.V.Shastry and R. B. Chrzanowsk: "Compressive strength of implanted porous replamine form hydroxyapatite J. Bionied. Mate.Res, 18:39-45,(1984)
- (11) C.C.P.M.Ve, heyen, J. R. de Eijn and C. A. Van Blitterswilk: "Mechanical
- (12) behaviour of hydroxyl apatite/poly Lactide composite" Ceramics in Substitutive and Reconstructive Surgery. Elsevier Science Publishers B. V., (1991)
- (13) K. Ono, T. Yam Amuro ,T. Nakamu, a, Y. Kakutani and T. Kokubo:" Apatite-wollastonite containing glass Ceramic-fibrin mixtures a bone defect " filer " J. Biomed. Mater. Res. 22:869-885, (1988)
- (14) H. Iwrata, H. Hanamur, M. Kaneko, N. Yasuhara, Y. Terashima, G. Kajino. K. Ida, Y. Mabuchi and M. Nakagawa: "Chemosterilized

- Autolyzed Antigen-Extracted Allogeneic(AAA) Bone Matrix Gelatin for Repair of Defects from Excision of Benign Bone Tumors: A preliminary report", *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 154:150-155, (1981)
- (15) D.F. Williams: Biocompatibility of Clinical Implant Materials, V.2, 9:209-234, (1981)
- (16) H. E. Koehlein and G. Lemperle : "Studies of gelatin-resorcin-formaldehyde glue. *Surgery*, 66:377-383, (1969)
- (17) D.P. Speer, M. Chvapil, C.D. Eskelson, and J. Ulreich: "Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials," *J. Biomed. Mater. Res.*, 14:753-764, (1980)
- (18) W. C. Mc Maste, J. Kouzelos, S. Liddls, and T. R. Waugh: "Tendon grafting with glutaraldehyde fixed material ", *J. Biomed. Mater. Res.*, 10:259-271, (1976)
- (19) C. Y. Yao, J. s. Sun, F.H. Lin, C. J. Liao, and C. W. Huang : "Biological effects and cytotoxicity of TCP and formaldehyde cross-linked gelatin composite " , *Mate. Chem. Phys.*, 45:6-14, (1996)
- (20) 黃惠茶, "如意金黃散與接骨散在骨折癒合過程中的生化與病理研究", 中國醫藥學院中國醫學研究所博士論文, 1997 年
- (21) 武春發.張安楨., "中醫骨傷科學" 知音出版社 P145-147, 1992.

六、圖、表

表-1

| | GBG+七釐散 | GBG+七釐散+口服 | GBG+口服 |
|--------|----------------------|--------------------|----------------------|
| 第 2 週 | 圓周有明顯空隙 材料吸收不明顯 | 圓周有明顯空隙 材料吸收不明顯 | 圓周有明顯空隙 材料吸收不明顯 |
| 第 4 週 | 新生骨長入佳 材料吸收不明顯 | 材料吸收不明顯 | 新生骨長入 材料吸收佳 |
| 第 8 週 | 新生骨長入 1/3 材料有少許吸收 | 新生骨長入 材料吸收不明顯 | 新生骨長入 材料吸收明顯 |
| 第 12 週 | | 新生骨長入佳 材料吸收不明顯 | 新生骨長入佳 材料已有吸收 1/2 |

圖-1

