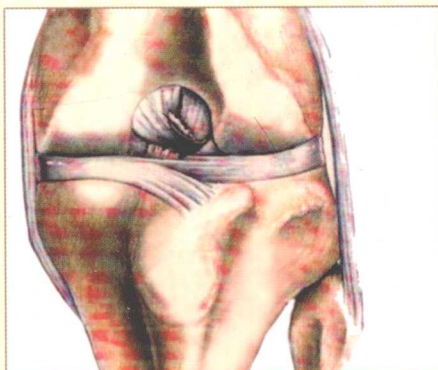


骨伤科 实验技术

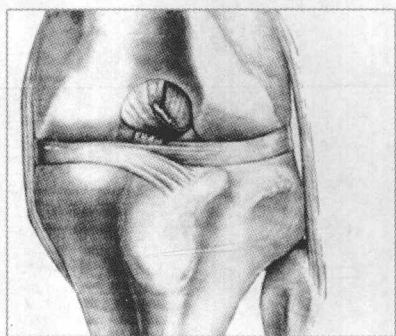
主编 沈霖 林燕萍 王拥军



北京科学技术出版社

骨伤科实验技术

主编 沈霖 林燕萍 王拥军



北京科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

骨伤科实验技术/沈霖等主编. —北京:北京科学技术出版社,2010.1

ISBN 978 - 7 - 5304 - 4315 - 6

I. 骨… II. 沈… III. 中医伤科学 - 实验 IV. R274 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 181258 号

骨伤科实验技术

主 编: 沈 霖等

策 划: 邬扬清

责任编辑: 邬扬清

责任校对: 黄立辉

封面设计: 耕者设计工作室

出 版 人: 张敬德

出版发行: 北京科学技术出版社

社 址: 北京西直门南大街 16 号

邮政编码: 100085

电话传真: 0086 - 10 - 66161951(总编室)

0086 - 10 - 66113227 0086 - 10 - 66161952(发行部)

电子信箱: bjkjpress@163.com

经 销: 新华书店

印 刷: 三河国新印装有限公司

开 本: 889mm × 1194mm 1/16

字 数: 872 千

印 张: 33.25

版 次: 2010 年 1 月第 1 版

印 次: 2010 年 1 月第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5304 - 4315 - 6/R · 1202

定 价: 65.00 元



京科版图书, 版权所有, 侵权必究。

京科版图书, 印装差错, 负责退换。

编 委 会

- 主 编 沈 霖(华中科技大学同济医学院)
林燕萍(福建中医学院)
王拥军(上海中医药大学)
- 副 主 编 李 蕾(华中科技大学同济医学院)
陈向华(安徽中医学院)
孙玉明(南京中医药大学)
陈 锋(广西中医学院)
陈悦邦(国际华佗中医学院)
- 编 委 沈 霖(华中科技大学同济医学院)
林燕萍(福建中医学院)
王拥军(上海中医药大学)
李 蕾(华中科技大学同济医学院)
陈向华(安徽中医学院)
孙玉明(南京中医药大学)
陈 锋(广西中医学院)
陈悦邦(国际华佗中医学院)
夏远军(华中科技大学同济医学院)
戴 兢(华中科技大学同济医学院)
杨胜兰(华中科技大学同济医学院)
卢芙蓉(华中科技大学同济医学院)
林春旭(华中科技大学同济医学院)
唐 海(北京友谊医院)
熊昌源(湖北中医学院)
韩 崑(湖北中医学院)
汤耿民(湖北省中医药研究院)
方苏亭(湖北省中医药研究院)
王海彬(广州中医药大学)
节晓光(贵阳中医学院)
涂 丰(香港中文大学中医学院)
李新建(长春中医学院)
高根德(浙江中医学院)

蔡 林(武汉大学中南医院)

刘世清(武汉大学人民医院)

吉海旺(陕西省人民医院)

冯 坤(洛阳正骨医院)

主编秘书 夏远军(华中科技大学同济医学院)

戴 燚(华中科技大学同济医学院)

卢芙蓉(华中科技大学同济医学院)

前 言

实验骨伤科学是以中医基本论为指导,用现代科学方法,研究中医骨伤科治疗方法和方药对机体的作用、作用机理,以阐明其防治疾病原理的科学,是现代中医骨伤科学的重要组成部分。

实验骨伤科学涉及生物化学、免疫学、细胞及分子生物学、组织工程学等多种新技术研究方法。尽管这些技术方法的在有关专著中有系统的介绍,但多偏重于理论,且少于骨伤疾病直接挂钩。往往使骨伤专业人员在设计课题时,于数部专著、数十种方法指标之间彷徨,难以甄别选用。为了补其疑阙,我们在医疗、教学、科研工作极度紧张之余,躬行未敢稍懈。荧灯独对,博采大量文献资料,葛裘屡更,总结多年来骨伤领域科研进展。将零星之拾,条贯成文,数易其稿,弃偏求全,编成《骨伤科实验技术》一书。目的是希冀开拓中医骨伤研究人员的设计课题思路。

鉴于实验骨伤科学是一门重视理论联系实际的学科,为了体现这一特点,本书编写上注重实用性、先进性,突出中医骨伤实验过程中的思维方法和实验技能,力求较系统地阐述现代生物学技术指标在骨伤相关实验中的运用。使读者选用时便于查阅,章法易循。至于这些技术方法的有关基础理论及原理等。则不在本书中详细讨论,庶几免与其他专著雷同之嫌。

本书的内容,以骨伤科实验的基本理论、基本知识、基本技能为基点,并结合现代中医骨伤科发展的需要编写。全书分十二章,前面四章主要介绍骨伤科实验研究的基本知识、骨伤科研究设计的基本知识、骨伤科实验常用动物的基本知识、常用动物模型的基本知识以及研究实例。后面八章主要介绍光镜结缔组织、肌组织、软骨和骨组织的实验研究、骨代谢的基本知识与实验研究、组织培养的基础知识与实验方法、骨与软骨分子生物学的实验技术、骨伤科免疫学检测基本实验技术以及骨组织细胞信号转导的机制。在编写工作中,遵循中医骨伤科研究生的培养目标,努力适应21世纪中医学教育。在编写方法上,突出基本知识和基本技能,争取做到便于教与学。在介绍各种实验仪器、方法和实验技术时,配上相应的插图,同时也收集了骨伤科实验学校较为前沿的科研成果。虽不敢言开一卷而识百家,但对于开拓中医骨伤研究者的设计课题思路,提供部分有益的实验学方法,颇有裕余。

由于实验骨伤科学涉及内容非常广泛,本书试图在实验学与骨伤临床医学之间精心设计一座相通的桥梁。然而书成之后,总感难如初愿,尽管主观上想取法于上,也许只得中下。加之笔者水平有限,刀铅无华,疏漏和笔到意未尽之处颇多,谬误之处亦复不免,恳请识者斧正。

本书在编写过程中得到了国家中医管理局大力支持。参加本书编写单位有华中科技大学同济医学院、福建中医学院、上海中医药大学、安徽中医学院、南京中医药大学

学、广西中医学院、湖北中医学院、湖北省中医药研究院、广州中医药大学、贵阳中医学院、香港中文大学中医学院、长春中医学院、北京友谊医院、武汉大学医学院、洛阳正骨医院。著名骨伤科专家李同生、刘伯龄等教授对本书提出了宝贵意见；邬扬清、黄立辉先生为本书做了大量审校和编辑工作，一并叩谢。

编者

2009 年 3 月

目 录

第一章 概论	(1)
第一节 骨伤科实验研究的发展概况	(1)
第二节 骨伤科实验研究的主要内容	(2)
第三节 骨伤科实验研究的方法特点	(3)
第二章 骨伤科实验研究设计的基本知识	(5)
第一节 骨伤科实验研究选题的方向和要点	(5)
一、骨伤科实验研究选题的基本方向	(5)
二、骨伤科实验研究设计的要点	(6)
三、骨伤科实验研究设计的基本原则	(6)
第二节 实验骨伤科研究选题的程序	(7)
一、形成初始意念	(7)
二、文献检索	(7)
三、建立工作假说	(7)
四、确定选题名称	(8)
五、研究课题的设计	(8)
第三章 骨伤科实验研究的常用技术和设备	(12)
第一节 软组织、软骨及骨组织形态学研究技术和常用设备	(12)
一、大体解剖学技术	(12)
二、软组织、软骨及骨组织切片技术和常用设备	(12)
第二节 软组织、软骨及骨超微结构研究常用设备	(17)
一、透射电镜	(17)
二、扫描电镜	(24)
三、高压电镜	(27)
四、分析电镜	(27)
第三节 软骨及骨细胞培养常用设备	(27)
一、基本设备和试剂	(27)
第四节 骨密度法及骨密度仪	(34)
一、X线骨密度估计法	(34)
二、光子诊断技术	(35)
三、双能X线骨密度测定法	(35)

四、定量超声骨质测量技术	(36)
五、定量 CT 检查技术	(37)
第五节 放射性核素技术和设备	(37)
一、放射性核素骨显像技术和设备	(37)
二、其他放射性核素测定技术和设备	(39)
第六节 计算机显微图像分析及设备	(41)
一、图像分析技术	(41)
二、显微图像分析系统简介	(41)
三、图像分析仪工作程序	(42)
四、图像分析在生物医学中的应用	(43)
第七节 骨组织形态计量法研究方法	(43)
一、骨组织形态半自动测量技术	(44)
二、全自动图像分析	(47)
第八节 分子生物学实验室常规仪器设备	(50)
一、分子生物学实验室基础准备工作	(50)
二、分子生物学实验室常用基本器具	(51)
三、分子生物学实验室精密分析仪器及其使用方法	(52)
第四章 骨伤科实验研究常用实验动物	(60)
第一节 实验动物分级标准	(60)
一、按遗传学控制方法分类	(60)
二、按微生物学控制方法分类	(61)
第二节 常用实验动物的特点、品种、饲养管理	(61)
一、大鼠	(61)
二、家兔	(62)
三、犬	(62)
四、小鼠	(63)
五、豚鼠	(63)
六、猪	(63)
七、猫	(64)
第三节 动物实验基本技术操作方法	(64)
一、实验动物的抓取和固定方法	(64)
二、实验动物的编号标记方法	(68)
三、实验动物的麻醉方法	(69)
四、实验动物的脱毛方法	(70)
五、实验动物的给药途径和方法	(71)
六、实验动物的取血方法	(75)
七、实验动物的骨髓穿刺方法	(76)
八、实验动物的各种体液采集方法	(77)
九、实验动物的处死方法	(79)

第五章 光镜结缔组织、肌组织实验研究	(80)
第一节 结缔组织、骨骼肌的组织形态学	(80)
一、结缔组织	(80)
二、骨骼肌组织	(85)
第二节 光镜组织切片技术	(87)
一、石蜡切片的基本程序	(87)
二、火棉胶切片的基本程序	(99)
三、冷冻切片的基本程序	(101)
第三节 结缔组织常用的染色	(103)
一、苏木精-伊红(HE)染色	(103)
二、胶原纤维染色	(104)
三、弹性纤维染色	(108)
四、网状纤维染色	(111)
第四节 肌组织常用染色	(115)
一、Gomori 三色染色一步法	(115)
二、磷钨酸苏木精快染法	(115)
三、磷钨酸苏木精慢染法	(116)
四、Ralis 等(1977)肌纤维染色	(116)
五、Retterer 法显示横纹肌	(117)
六、Schaffler 肌原纤维、网状纤维及胶原纤维同时显示法	(117)
七、骨骼肌组织活检的酶组化法	(118)
八、其他染色	(120)
第五节 结缔组织、骨骼肌的常用光镜组织化学方法及原理	(120)
一、概述	(120)
二、组织的固定和制片	(121)
三、组织切片	(122)
四、核酸的显示法	(124)
五、糖类的显示法	(127)
六、弹性蛋白的显示法	(131)
七、脂类的显示法	(132)
八、酶类的显示法	(136)
第六章 光镜软骨和骨组织实验研究	(154)
第一节 软骨和骨组织的形态结构和功能	(154)
一、软骨	(154)
二、骨	(156)
三、骨的发生	(160)
第二节 软骨切片制作	(161)
一、透明软骨茜素红-美蓝染色法	(161)
二、透明软骨的临界电解质浓度法	(161)

三、PAS 法	(162)
四、弹性软骨染色法	(162)
五、纤维软骨染色法	(162)
第三节 脱钙骨切片制作	(162)
一、脱钙过程	(162)
二、脱钙法及脱钙液配制	(163)
三、脱钙兼固定方法	(164)
四、脱钙兼脱水方法	(164)
五、电解脱钙法	(164)
六、骨组织化学常用的脱钙法	(164)
第四节 脱钙骨切片常用的染色法	(165)
一、钙质染色法 - Kossa 法	(165)
二、Schmorl 硫堇 - 苦味酸法	(165)
三、Lillie 硝酸银沉淀法	(166)
四、Romeis 美蓝染色法	(166)
五、Von Kossa 法显示钙盐	(167)
六、不溶性钙盐显示法	(167)
七、电镜超微结构骨组织标本制备法	(168)
八、骨碱性磷酸酶与磷酸盐显示法 (Lorch)	(168)
九、骨组织采用铅法或钙钴法显示碱性磷酸酶	(169)
十、破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶的显示	(169)
十一、破骨细胞碳酸酐酶的显示	(169)
十二、成骨细胞葡萄糖 - 6 - 磷酸酶 (G6P) 的显示	(170)
第五节 不脱钙骨标本的制作	(170)
一、标本取材	(170)
二、固定、脱水与透明	(170)
三、渗透及包埋	(170)
四、制片	(171)
五、贴片	(172)
六、染色	(172)
七、骨标本保藏法	(174)
第七章 骨的代谢与重建	(176)
第一节 骨代谢	(176)
一、骨代谢生物化标志物	(176)
第二节 全身激素与骨代谢的关系	(182)
一、维生素 D 及其代谢产物	(182)
二、甲状腺激素	(184)
三、降钙素	(185)
第三节 影响骨形成和骨吸收的局部调节因子及其测定	(186)
一、骨形态发生蛋白	(187)

二、转化生长因子	(188)
三、胰岛素样生长因子	(189)
四、成纤维细胞生长因子	(189)
五、血小板衍生生长因子	(190)
六、骨保护素	(190)
七、软骨钙素	(191)
八、白细胞介素	(191)
九、肿瘤坏死因子	(191)
十、前列腺素	(192)
第四节 骨矿物质	(192)
一、钙	(192)
二、磷	(194)
三、镁	(196)
四、微量元素	(196)
第五节 骨重建	(199)
一、骨重建的生理意义	(199)
二、骨重建的生理过程	(199)
三、骨重建异常与骨丢失	(201)
第八章 组织培养	(202)
第一节 组织培养的概念	(202)
第二节 基本原理和方法	(202)
第三节 常用的培养方法	(204)
第四节 骨与软骨组织培养技术	(206)
一、成骨细胞的体外培养	(206)
二、破骨细胞体外分离培养	(210)
三、软骨细胞培养	(212)
四、骨髓基质细胞的培养	(214)
五、软骨器官培养	(216)
六、骨组织器官培养	(217)
第五节 骨细胞凋亡	(217)
一、细胞凋亡的概念	(217)
二、细胞凋亡的生物学意义	(218)
三、细胞凋亡调控蛋白	(218)
四、caspases 引起细胞凋亡的机制	(218)
五、细胞凋亡的形态学特征及检测方法	(219)
六、细胞凋亡在骨伤科实验研究中的应用	(223)
第九章 骨及软骨分子生物学基本实验技术	(227)
第一节 概述	(227)
第二节 重组 DNA 技术	(227)

一、质粒 DNA 的提取、纯化、酶切与鉴定	(228)
二、质粒 DNA 的限制性内切酶消化和琼脂糖凝胶电泳分离、鉴定	(229)
三、DNA 片段的回收与纯化	(231)
四、目的基因与载体的连接反应	(231)
五、大肠杆菌感受态的制备和重组质粒 DNA 的转化	(233)
六、含重组质粒的细菌菌落的鉴定	(234)
第三节 核酸分子杂交技术	(236)
一、DNA 探针的制备	(239)
二、Southern 印迹	(240)
三、Northern 印迹法	(242)
四、斑点杂交和狭线印迹	(244)
五、原位杂交	(246)
第四节 蛋白质检测方法	(249)
免疫印迹法——Western Blot	(249)
第五节 聚合酶链反应 (PCR) 技术	(252)
聚合酶链式反应 (PCR) 体外扩增 DNA	(254)
第六节 分子生物学技术在骨伤科研究中的应用	(255)
一、骨伤科致病的相关基因	(255)
二、骨伤科致病基因的连锁分析	(256)
三、骨伤科相关疾病的基因治疗	(257)
四、分子生物学在骨伤科相关领域的研究进展	(257)
第十章 骨伤科免疫学检测基本实验技术	(273)
第一节 免疫学概述	(273)
一、免疫功能	(273)
二、免疫器官和组织	(279)
三、免疫细胞	(283)
四、免疫分子	(296)
第二节 抗原的纯化和免疫血清制备方法	(311)
一、抗原的特性	(311)
二、蛋白质抗原的制备	(312)
三、免疫血清的制备	(315)
第三节 免疫组织化学方法	(319)
一、免疫组织化学主要染色方法基本原理	(320)
二、免疫组织化学实验方法概述	(324)
三、免疫荧光细胞组织化学技术	(333)
四、免疫酶细胞组织化学技术	(335)
五、亲和组织化学技术	(339)
六、光镜免疫金-银细胞组织化学技术	(341)
第四节 电泳方法	(342)
一、免疫电泳	(343)

二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(348)
第五节 固相酶免疫测定方法	(351)
一、ELISA 的基本原理	(352)
二、方法类型	(352)
第六节 放射性免疫测定	(359)
一、放射性核素标记	(359)
二、免疫放射测定	(363)
三、放射受体分析(RRA)	(365)
第七节 免疫组织化学技术在骨伤科实验中的应用	(366)
一、软骨组织、骨组织的免疫酶标法染色	(367)
二、骨组织免疫组织化学技术的注意事项	(368)
三、应用实例	(369)
第十一章 常见骨伤科动物模型的复制及研究方法实例	(379)
第一节 急性软组织损伤模型	(379)
第二节 长骨干骨折动物模型	(384)
一、开放性桡骨骨折模型	(384)
二、开放性股骨骨折模型	(385)
三、闭合性骨折模型	(386)
第三节 慢性化脓性骨髓炎实验模型	(387)
一、创伤性感染法	(387)
二、血源性感染法	(389)
第四节 膝关节骨关节炎模型	(391)
一、关节手术复制法	(391)
二、关节固定法	(392)
三、静脉结扎加固定法	(393)
四、干骺端髓内血运阻断法	(393)
第五节 骨质疏松症模型	(394)
一、内分泌代谢类	(394)
二、药物类	(399)
三、机械固定法	(402)
四、营养干预法	(402)
第六节 脊髓损伤模型	(405)
一、复制脊髓损伤模型的要求	(405)
二、复制脊髓损伤模型的方法	(406)
三、复制脊髓损伤造模术后处理方法	(418)
四、复制脊髓损伤模型的评定标准	(418)
五、研究方法实例	(422)
第七节 股骨头坏死	(427)
一、激素诱导法	(427)
二、激素加马血清法	(431)

三、局部化学灭活法	(433)
四、液氮即刻冷冻法	(434)
第八节 肩关节周围炎模型	(434)
一、复制机制	(435)
二、复制方法	(435)
三、研究方法实例	(435)
第九节 颈椎病动物模型	(436)
一、颈椎解剖及生理特点	(437)
二、颈椎病的分型	(438)
三、颈椎病的发病机制	(439)
四、颈椎病动物模型复制方法	(440)
五、研究方法实例	(440)
第十节 腰椎间盘突出症动物模型	(442)
一、复制机制	(443)
二、复制方法	(443)
三、研究方法实例	(443)
第十一节 腰椎管狭窄动物模型	(444)
一、复制机制	(445)
二、复制方法	(445)
三、研究方法实例	(445)
第十二节 类风湿性关节炎动物模型	(446)
一、发病诱因	(446)
二、病理变化	(447)
三、致炎因子	(448)
四、类风湿性关节炎的发病方式	(449)
五、血清及细胞学检查	(449)
第十三节 痛风性关节炎动物模型	(454)
一、概述	(454)
二、痛风模型	(457)
三、研究方法实例	(458)
第十四节 骨恶性肿瘤动物模型	(458)
一、复制机制	(459)
二、复制方法	(459)
三、研究方法实例	(460)
第十二章 骨组织代谢的细胞信号转导机制	(463)
第一节 信号以及细胞传递信号	(463)
一、作用于细胞的信号	(463)
二、信号的归宿	(464)
三、构成信号转导系统的要素	(464)
第二节 信号转导系统的特征	(471)

一、信号转导通路的一般特性	(471)
二、细胞内信号转导通路网络的分子基础	(472)
三、信号转导通路网络的形成机制	(473)
四、信号转导专一性的调节	(474)
第三节 二聚作用是调节信号转导的一个重要机制	(474)
一、二聚作用的一般功能	(474)
二、信号转导中的二聚作用	(475)
三、模拟二聚作用	(480)
第四节 信号转导的生物学效应	(481)
一、信号转导的转录响应	(481)
二、信号转导与细胞增殖	(485)
三、信号转导的细胞分化响应	(486)
四、信号转导和细胞凋亡	(487)
第五节 骨形成与代谢过程中的信号传递机制	(488)
一、骨形成过程中的信号传递机制	(488)
二、骨吸收过程中的信号传导机制	(495)
第六节 成纤维细胞中的信号转导机制	(497)
一、PTK 在 RA 成纤维样滑膜细胞 MAPKs 活化中的作用	(497)
二、染料木黄酮对 RA 成纤维样滑膜细胞中 PTK 的影响	(498)
第七节 脊髓、神经修复过程的信号转导机制	(500)
一、慢突触传递是通过蛋白质的磷酸化和去磷酸化	(500)
二、BMP 在神经发育和修复中的作用	(500)
三、G-蛋白偶联受体介导的神经轴突生长信号转导机制	(501)
四、蛋白激酶 C 抑制剂对脑缺血大鼠突触体游离钙的影响	(501)
五、神经营养因子治疗脊髓损伤的研究进展	(502)
六、胶质细胞源性神经营养因子家族研究进展	(503)
第八节 信号转导未来研究的发展	(504)
一、信号转导的机制	(505)
二、病理状态下的信号转导通路	(505)
三、转录因子之间的相互作用	(507)
四、信号转导分子基因剔除带来的新消息	(508)

第一章 概 论

第一节 骨伤科实验研究的发展概况

中国医药学是一个伟大的宝库,而骨伤科是其中一个重要组成部分,其历史悠久,源远流长。据文献记载,中医骨伤科理论奠基于西周、春秋时期,成书于唐代。但是运用现代科学方法研究中医骨伤科的理、法、方、药,却是伴随着近代自然科学的发展才开始的。尤其是近几十年来,国内骨伤科界日益重视积极结合中医药理论,运用现代科学方法,研究了整骨手法,小夹板固定及治疗骨伤疾病的中药复方,单味中药及其有效成分的功效、药性、归经、配伍、炮制、毒性、体内过程;并建立了多种骨伤“病”、“证”的动物模型研究中医骨伤科治疗方法的作用机制,使骨伤科实验研究的内容更加广泛,思路更为开阔,研究的方法和手段也愈趋先进。现代骨伤科研究除采用经典的实验学研究方法外,还运用了生物化学、生物力学、免疫学、细胞及分子生物学、组织工程学等多种新技术研究方法,取得了可喜的成果。大量实验研究已经并将继续表明,应用现代医药学技术和方法,研究中医骨伤科传统理、法、方、药,有助于阐明中医治疗的基本理论和提高临床疗效。

数十年来,由于许多学者、专家的努力,骨伤科学发展迅速。就骨伤科学书籍出版来说,数十年来出版了一大批有较大影响的书籍,如1964年上海中医学院主编《中医伤科学》(第2版教材)。1980年由广州中医学院主编全国高等医药院校试用教材《中医伤科学》(第4版教材)。1985年由卫生部主持编写了高等医药院校本科教材《中医伤科学》(第5版教材)。1991年前后,由北京针灸骨伤学院主编的高等中医药院校骨伤专业(本科)系列教材(共14本),作为全国中医学院骨伤专业大专生、本科生的统一教材。其中时光达、陈宝兴主编的《实验骨伤科学》作为第一本骨科实验学专著,以组织形态学为基础,对当时新近发展的检验技术作了部分介绍。该书2001年由人民卫生出版社再版,对原版内容进行了调整,增加了骨免疫细胞化学研究、骨的PCR基因扩增技术两章,删除了骨负载试验有关章节,调整了骨伤实验研究方法学、骨密度测量方法等有关内容,使其更符合教学和科研。1996年由国家中医药管理局组织编写的规划教材《中医骨伤科学基础》、《中医骨伤学》、《中医筋伤学》、《中医骨病学》(第6版教材)相继出版。2001年施杞、王和鸣主编的《骨伤科学》专设“骨伤实验学”一章,介绍了部分骨伤科动物模型的复制和骨与软骨细胞培养技术。此外,《中国骨伤》、《中国中医骨伤科》、《中医正骨》等专业杂志发表了大量的骨伤科实验学研究论文,促进了中医骨伤科从经验医学向实验医学迈进的过程。

本书较系统反映骨伤科学研究方法,以适应和促进骨伤科学的发展,逐步建立起我国所特有的骨伤科学研究方法学。