

· 实验研究 ·

丹参注射液对鸡胚额骨分离细胞培养生长影响的组织化学观察

上海市伤骨科研究所(上海 200025) 徐荣辉 柴本甫 朱雅萍

内容提要 孵育 12 天的鸡胚额骨用胰酶制成分离细胞悬液。共获得 3×10^6 个细胞, 均分为 5 份, 分别加 Eagle 培养液或 0.1%、0.2%、0.4% 和 0.8% 丹参 Eagle 培养液, 在 CO_2 培养箱内进行培养。逐日进行活体观察。至培养 26 天收获。标本作 HE、AS、ARS 染色和 AIP-AcP 反应以进行比较。发现: 丹参能促进成骨细胞样细胞成熟, 分泌胶原性物质和 AIP, 并使钙盐在胶原基质上沉积, 形成骨小结节。但是过高浓度的丹参能导致对成骨细胞样细胞生长的抑制。丹参的合适实验浓度为 0.2%。

关键词 丹参 组织化学 细胞培养 骨分离细胞

实验已证实丹参注射液对创伤组织具有活血化瘀作用^[1~3]。在此基础上, 我们进一步对丹参在治疗创伤愈合尤其是骨折愈合过程中的机理进行核素标记^[4~7]、组织学和组织化学^[8,9]及超微结构实验研究^[10]。发现丹参在创伤愈合, 尤其是骨折愈合过程中, 由于活血化瘀作用改善了局部和全身血液循环, 从而增加了创伤局部营养, 提前出现创伤局部的清扫阶段。为创伤组织的修复创造良好的环境, 从而促创伤获得提前愈合。由于上述实验是在体内进行的, 影响因素较多。因此我们又用离体培养技术, 使实验条件更为单一, 以观察丹参对骨细胞和骨组织的直接影响。

材料与方法

鸡胚额骨分离细胞的制备^[11,12], 采用孵育 12 天的 Leghorn 鸡胚额骨 (除去骨外膜), 经剪碎清洗, 胰酶消化后过滤, 滤液即为鸡胚额骨分离细胞悬液。经细胞计数总共获得约 3×10^6 个细胞。用 Eagle MEM "Nissui" (1) 培养液, 简称 Eagle 培养液 (含 20% 小牛血清) 稀释至 10ml, 分装于 5 个培养瓶内 (瓶内预先各放 2 条载玻片条), 每瓶 2 ml。然后分别再加 Eagle、0.8% 丹参 Eagle、0.4% 丹参 Eagle、0.2% 丹参 Eagle 及 0.1% 丹参 Eagle 培养液各 2 ml。分别称为对照组和 0.8、0.4、0.2 及 0.1 丹参组 5 组 (丹参注射液系上海第一制药厂生产, 批号为 851015), 在 38°C 二氧化碳培养箱内培养。每周各换相应培养液 3 次, 逐日用倒置显微镜观察。培养至 26 天标本被收获, 取出培养瓶内载玻片条。玻条用玻璃刀划为等长

两段, 经冷丙酮固定后分别作 HE 染色、Alcian Blue、Sirius Red 染色 (简称 AS 染色)、Alizarin Red S (简称 ARS 染色) 和碱性磷酸酶-酸性磷酸酶反应 (简称 AIP-AcP 反应), 作各组间比较。

结 果

一、对照组

活体观察: 培养 24h 鳞片形细胞与长梭形细胞开始贴壁生长; 球形细胞绝大部分悬浮于培养液内, 少数可以贴壁生长。细胞的数量以鳞片形为最多; 球形次之; 长梭形较少。培养 48h, 三种细胞开始出现分裂。悬浮细胞随着换液而被清除。培养第 4 天起, 三种类型细胞的胞浆内均有小泡形成。培养液内亦可见到大量悬浮的小泡状分泌颗粒。随着时间的推移, 细胞密度逐日增加。组织学和组织化学染色观察: 细胞绝大多数为鳞片形细胞, 长梭形及球形细胞已很少见到。HE 染色可见片形云雾状红染物随处分布。此外还可见到直径为 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ 的少数红染小泡。AS 染色云雾状基质可呈红染或蓝染。此外可见少数红染的絮网状及团块状物和直径为 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ 圆形蓝染物。ARS 染色长梭形及球形细胞呈阳性。并可见到絮网状及团块状阳性染色物。AIP-AcP 反应, 部分鳞片形细胞胞浆内可见大量 AIP 反应阳性细小颗粒。基质中可见少数蓝染大颗粒 (直径为 $2 \sim 5 \mu\text{m}$)。少数白细胞胞浆内 AcP 反应阳性。未见破骨细胞。

二、0.1 丹参组

活体观察: 类似对照组。组织学和组织化学观察: 细胞大部分为鳞片形细胞, 少数为长梭形细胞。

球形细胞已很少见到。HE 染色可见大量云雾状红染物及少数红染大颗粒(直径为 $2 \sim 5 \mu\text{m}$) 随处分布。AS 染色可见成片的蓝紫色云雾状物质和大颗粒。ARS 染色未见明显阳性染色物质出现。AIP-AcP 反应, AIP 阳性细胞成簇排列, AIP 呈细小颗粒状, 小部分已释放到细胞外基质中; 此外尚可在基质中见到直径为 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ AIP 反应阳性圆形颗粒。已有 AcP 反应阳性的多核细胞出现。

三、0.2 丹参组

活体观察: 类似对照组。组织学和组织化学染色观察: 大部分为鳞片形细胞, 长梭形及球形细胞均可见到。长梭形及球形细胞可见红染的分泌小泡在突起上或在胞浆边缘形成。一些脱落的突起上常见分泌小泡形成。基质中也可见到大小不同的小泡。细胞表面有大量云雾状、少量絮网状覆盖物。鳞片形细胞少数的突起也有红染小泡形成、脱落(甚至和突起一起脱落)至基质中。部分鳞片形细胞有大量大小不同的空泡形成。AS 染色可见红染的云雾状、小泡状、絮状、纤维状物。小泡状分泌物常在基质中聚集成团。ARS 染色长梭形及球形细胞胞浆呈阳性染色; 鳞片形细胞则大部呈弱阳性或阴性染色。AIP-AcP 反应: 呈阳性 AIP 反应的大部分为鳞片形细胞, 常呈集落样排列。偶可见到 AIP 反应阳性的长梭形或球形细胞。AIP 呈蓝黑染色, 细小颗粒状。大多数分布于胞浆内。部分已释放到基质中, 逐渐弥散, 使背景变为污浊。并可见到 AIP 反应呈强阳性的小泡(直径为 $2 \sim 5 \mu\text{m}$)。AcP 呈红色染色。AcP 常在多核细胞的胞浆内出现, 呈均质状或偶呈颗粒状。

四、0.4 丹参组

活体观察类似对照组, 但细胞密度有所降低。组织学和组织化学观察: 绝大部分为鳞片形细胞; 长梭形及球形细胞很少见。细胞密度比对照组有所降低。细胞分泌物有云雾状、絮网状和小泡状几种类型, 并可见脱落的细胞突起。AS 染色, 可见染色阳性的云雾状、絮网状及小泡状物。ARS 染色, 球形细胞及长梭形细胞呈阳性; 鳞片形细胞着色很淡, 但其脱落的突起可呈阳性染色; 小泡状及斑片状物呈阳性染色; 而云雾状及絮网状物未着色。AIP-AcP 反应: AIP 反应阳性细胞数量不多, 细胞中的 AIP 大部分已释放至基质中, 使背景呈蓝黑色具污浊感; 释放至基质中的 AIP 呈细小颗粒状或在基质中弥散或在小泡状分泌物(直径为 $2 \sim 5 \mu\text{m}$) 中凝集, AcP 反应阳性细胞未见。

五、0.8 丹参组

活体观察: 培养 48h 细胞贴壁生长。培养至第 4

天胞浆内及基质中可见许多分泌小泡。培养至第 14 天部分细胞开始出现固缩、密度降低。培养至 26 天, 细胞密度急剧减少。组织学及组织化学观察: HE 染色, 偶见一些已经固缩且结构模糊的细胞轮廓和云雾状、絮网状、颗粒状(直径为 $2 \sim 5 \mu\text{m}$) 红染物。AS 染色, 可见一些红染的固缩变性长梭形和鳞片形细胞以及云雾状、絮网状和颗粒状物。其中絮网状和颗粒状物可凝集成圆形小结节。ARS 染色, 固缩变性细胞及颗粒状物均呈强阳性染色。AIP-AcP 反应, 可见成堆聚集的圆形大颗粒(直径 $2 \sim 5 \mu\text{m}$) AIP 反应呈强阳性; 未见 AcP 反应阳性细胞。

讨 论

在细胞发育过程中, 其分化程度越幼稚, 所表现的功能就越原始; 随着细胞分化成熟, 将出现相应发育阶段的功能。鸡胚额骨分离细胞是由不同发育阶段的成骨细胞样细胞组成。因此, 鸡胚额骨分离细胞亦将表现出不同发育阶段成骨细胞样细胞的功能, 这可以通过组织化学反应清楚地表现出来。成骨细胞样细胞最早出现的功能为酸性粘多糖的合成与分泌。随着细胞的发育成熟, 成骨细胞样细胞将出现合成和分泌胶原性基质的能力^(11,12)以及 AIP 的能力。在骨组织形成过程中细胞外 AIP 与成骨纤维的产生以及钙化相关联⁽¹³⁾。骨小结节^(14~16)出现以前, 先有未钙化的骨小结节雏形, 而且成骨细胞样细胞也将一定量的 AIP 释放至基质中。因此可推理成骨细胞样细胞早期 AIP 的释放与胶原纤维的形成有一定的关系。随着成骨细胞样细胞的进一步发育成熟, AIP 将参与钙盐在骨小结节中的沉积。上述过程是成骨细胞样细胞生长、发育和形成骨组织的生理过程。丹参在体外成骨细胞样细胞发育过程中具有促进细胞分裂、成熟和形成骨组织的作用。成骨细胞样细胞一旦发育演变为骨细胞, 细胞功能趋于静止。因此, 过高浓度的丹参虽然可以使较多的骨小结节出现, 但是细胞功能的过早静止以及退变将不利于骨组织的继续形成。只有应用适当浓度的丹参, 才能使成骨细胞样细胞在数量上有明显地增加, 又能使更多的骨组织形成。因而本研究为丹参在骨折治疗中的作用提供有说服力的依据。

参 考 文 献

1. 胡美珠, 等。丹参注射液对家兔桡骨骨折后肢体血容量的影响。中华外科杂志 1979; 17:33。
2. 张菊英, 等。丹参注射液对家兔前臂软组织挫伤以后肢体血容量的影响。天津医药骨科附刊 1980; 13:

- 133.
3. 刘季兰, 等. 丹参注射液对家兔前臂软组织挫伤以后血肿吸收的影响. 中华骨科杂志 1983; 3:385.
4. 胡美珠, 等. 丹参对骨折后骨髓蛋白聚糖含量的影响. 中西医结合杂志(基础理论诗集) 1988; 8:93.
5. 张菊英, 等. 丹参注射液对骨折愈合中钙沉积的影响. 中西医结合杂志 1984; 4:536.
6. 刘季兰. 丹参注射液对骨折愈合中钙再吸收的影响. 中西医结合杂志 1985; 5:418.
7. 刘季兰, 等. 丹参注射液对骨折愈合中注射⁴⁵Ca后早期⁴⁵Ca动力学变化的影响. 骨伤科通讯 1988; 3:8.
8. 徐荣辉. 丹参对家兔皮肤切口愈合影响的组织化学观察. 中草药 1982; 12:15.
9. 徐荣辉, 等. 丹参对家兔桡骨骨折愈合的影响. 上海第二医科大学学报 1988; 8:309.
10. 柴本甫, 等. 活血化瘀药丹参治疗骨折的超微结构研究. 中西医结合杂志 1987; 7:417.
11. 徐荣辉, 等. 胚胎大鼠颅盖骨分离细胞早期体外培养的组织化学观察. 解剖学报 1988; 19:53.
12. 徐荣辉, 等. 胚胎大鼠颅盖骨分离细胞原代早期体外培养的组织化学观察. 中华骨科杂志 1990; 10:45.
13. Bourne GH. The biochemistry and physiology of bone. Second Ed. Academic Press New York, 1976; Vol IV:191.
14. Tenenbaum HC, et al. An ultrastructural study of osteogenesis in chick periosteum in vitro. Bone 1986; 7:259.
15. Ecarot-Charrier B, et al. Mineralization in osteoblast cultures: A light and electron microscopic study. Bone 1988; 9:147.
16. Bhargava U, et al. Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells. Bone 1988; 9:155.

应用加味龙胆泻肝汤治疗带状疱疹 11 例

北京铁路总医院中医科(北京 100038) 李健贤

带状疱疹是临床上常见的一种疾病,是由病毒引起的急性皮肤炎症。中医学名为“缠腰火丹”、“缠腰龙”。本病是由肝火妄动、湿热内蕴而成。近年来,笔者在门诊工作中,应用加味龙胆泻肝汤治疗 11 例带状疱疹患者,疗效满意。现介绍如下。

临床资料 本组病例 11 例,男 5 例,女 6 例,年龄最大 62 岁,最小者 24 岁。病程 4~5 日 6 例,5~10 日 3 例,10~15 日 2 例。部位:腰部 4 例,胸部 3 例,颈部 2 例,眼部 2 例。诱因:病前感冒 2 例,情志不遂 9 例。舌苔黄 7 例,苔白 4 例。脉象:弦细 9 例,细数 2 例。

治疗方法 口服加味龙胆泻肝汤:药用龙胆草 10g,栀子 10g,黄芩 10g,柴胡 10g,板蓝根 10g,生地 10g,丹皮 10g,蒲公英 15g,野菊花 10g,地丁 10g,赤芍 10g,生甘草 10g,元胡面 2 包。用法:每日一剂,水煎 2 次,早晚各服 1 次(每次 100ml)。眼部出现疱疹者加青箱子 10g,谷精草 10g;大便秘结加大黄 6g。

结果 疗效标准:痊愈:疼痛终止,疱疹消退,皮损消失恢复正常。11 例患者中 10 例痊愈,1 例因累及角膜病情严重收住院,门诊无法观察。症状消失所需天数:10 例患者中,疼痛终止时间:6 例为 3 天,3 例 6 天,1 例为 12 天。疱疹消退时间:5 例为 6 天,3 例 9 天,2 例为 12 天。

体会 本文 11 例患者除 1 例眼部受损严重,带状疱疹性角膜炎合并虹膜炎,疼痛剧烈的老年患者收住院外,其余均在门诊治疗。除其中 1 例并用地塞米松静脉滴注配合治疗外,余 10 例均单纯应用中药治疗而获痊愈。中医学治疗本病的原则为清热利湿治其因,化瘀通络理气治其果。临床上可分火热盛和湿热盛两型。本组所见到的 11 例多为火热甚者。因此,采用苦寒类药以清热解毒为主,服用后即可收到较满意的疗效。“通则不痛”,“痛则不通”,特别对于老年患者疼痛比较剧烈者,皮损消退后,仍需继续服药,巩固疗效。瘀血未去,脉络不通,因此,必须强调使用活血化瘀药,这样才能达到去瘀止痛之效果。

书讯 《陕西中医函授》是陕西中医学院主办的中医成人专业教育辅导专刊,系统辅导中医院校设置的各基础临床主要课程,开展理论探讨,交流临证经验,开设专题讲座,介绍名老中医经验精华,开展学术争鸣,介绍自学方法,解答函询疑难,开辟自考专栏,辅导自学成材,为患者会诊治病,反映读者心声。该刊系统性强、简明实用、形式新颖、便于自学。《陕西中医函授》为双月刊,公开发行,国内统一刊号:CN61-1106,邮发代号:52-23,定价 1.20 元。欢迎读者向全国各地邮电局(所)订阅,我部可为读者办理邮购。刊社地址:咸阳市渭阳中路陕西中医学院内。邮编:712083。

Histochemical Study on Effect of Radix Salviae Miltiorrhizae on Growth of Isolated Cells from Embryonic Chicken Frontal Bone Cultured in Vitro

Xu Rong-hui(徐荣辉), Chai Ben-fu(柴本甫), Zhu Ya-ping(朱雅萍)

Shanghai Institute of Traumatology and Orthopedics, Shanghai (200025)

12-day embryonic chicken frontal bone digested with trypsin to prepare the suspension of isolated bone cells. 3×10^6 cells were harvested altogether. The cells were divided equally into five parts. Then the Eagle medium and 0.1%, 0.2%, 0.4% and 0.8% Radix Salviae Miltiorrhizae in Eagle medium were added respectively and cultured in 5% CO₂ incubator. It was observed under the inverted microscope every day. At the 26th day of culture, the cells were studied. The specimens were stained with H. E., Alcian Blue-Sirius Red, Alizarin Red S staining and alkaline phosphatase-acid phosphatase reaction for comparison. It was found that the maturation of the osteoblast-like cells could be accelerated by Radix Salviae Miltiorrhizae. Secretion of the collagenous substance, positive alkaline phosphatase reaction and deposition of mineral on the collagenous substance, forming bone nodules were found to be enhanced. But unduly high concentration of Radix Salviae Miltiorrhizae could lead to inhibition of osteoblast-like cell growth. The optimal concentration of Radix Salviae Miltiorrhizae was 0.2% in culture medium.

Key Words Radix Salviae Miltiorrhizae, histochemistry, cell culture, bone isolated cell.

(Original article on page 668)

Effect of Kang Shuai Shen Fang(抗衰神方) on Immune Functions of ⁶⁰Co γ-Ray Irradiated Mice

Gong Ping(巩平), et al

Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing (100083)

In this paper we reported that Kang Shuai Shen Fang (KSSF) could recover the immune functions of irradiated mice. The results indicated that KSSF is able to enhance the proliferation response of spleen cells of irradiated mice to Con A and LPS. At the dosage of 400 mg/kg · d, KSSF can stimulate the production of plaque forming cells, the DTH response induced by allogeneic splenocytes. The mixed lymphocyte reaction was much stronger in the drug-receiving irradiated group than that in the control group. Further study indicated that KSSF is able to enhance the production of interleukin 2 in irradiated mice.

Key Words Kang Shuai Shen Fang, immunodeficiency, interleukin 2, recover immune functions

(Original article on page 671)

Research on the Effect of Shen Xian Sheng Mai Ye(参仙升脉液) on Experimental Sick Sinus Syndrome

Xu Shu-qiang(许树强), Wu Ze-min(武泽民), Shi Zai-xiang(史载祥), et al

China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029)

The effects of Shen Xian Sheng Mai Ye (SXSMY) on experimental sick sinus syndrome (SSS) were observed. By applying 20% formaldehyde to the rabbits' sino-atrial node area, we got the acute animal model of SSS. By observing the rabbits' heart rate (HR), arrhythmia and cardioelectric physiologic index in different periods, the results were as follows: (1) Increasing heart rate: SXSMY could increase rabbits' HR 10~30 times per minute by observing electrocardiogram within 2 hours ($P < 0.05 \sim 0.001$). (2) Correcting arrhythmia: SXSMY could reduce arrhythmia of sinus nodal arrest and nodal rhythm remarkably. (3) Improving sinus atrial node function: SXSMY could improve sinus node recovery time (SNRT) and sinus atrial conducting time (SACT) with the method of atrial pacing (AP) ($P < 0.01 \sim 0.001$). But the above results did not appear in atropine and glucose groups.

Key Words Shen Xian Sheng Mai Ye, experimental sick sinus syndrome, electrocardiogram, cardioelectric physiologic index

(Original article on page 674)