

• 实验研究 •

丹参对大鼠胫骨骨折早期愈合过程中血清、骨痂及骨组织中钙、锌、铜的影响

解放军第323医院(西安 710054) 秦军志

第二军医大学长海医院 王贤傲

内容提要 本实验采用原子吸收光谱法,对大鼠胫骨闭合性骨折早期愈合过程中血清、骨痂及骨组织中钙、锌、铜含量的变化以及应用丹参治疗后的影响作了研究。发现丹参可明显增加血清和骨痂中钙、锌含量及锌/铜比值,抑制血清铜水平的升高和降低骨折断端邻近骨组织中锌的含量;且骨痂钙含量与骨痂中锌/铜比值呈明显的正相关。结果提示,丹参促进骨折愈合的作用,与其提高血清锌含量、加强骨折断端邻近骨组织中锌的动员,以及通过提高骨痂中锌含量、锌/铜比值来加速骨痂组织生长和钙化过程有关。

关键词 骨折 钙 锌 铜 丹参

近年来的研究表明,微量元素在机体中具有重要的生理功能。中医学认为,“肾主骨”,现代研究也发现肾气的盛衰规律与锌有明显的关系^[1]。骨折后引起机体神经体液应激反应,其中包括微量元素的变化。中药可以调节机体的病理性机能改变和修复组织。活血化瘀药(包括丹参)富含锌(Zn)、铜(Cu)、钙(Ca)等微量元素,故应用中药以调节机体微量元素的变化可能是促进骨折愈合的途径之一。本实验旨在了解丹参对大鼠胫骨骨折愈合早期血清中、骨痂及骨组织中钙、锌、铜元素变化的影响,以探讨丹参促进骨折早期愈合作用的机理。

材料与方法

一、实验分组及动物模型的制备

实验选用 Wistar 种大白鼠(由第二军医大学动物实验中心提供),雄性,体重250~300g,随机分成两组,实验组和对照组各10只,共20只。在术后第8天时,两组各有1只动物因采血时乙醚麻醉过量和肺部感染死亡。用定点手法折骨术造成大鼠左胫腓骨中段闭合性骨折。不用内外固定。两组动物在相同实验条件下喂养。实验组按人体用量的30倍,即0.06ml/10g体重,腹腔注射丹参注射液(3g/ml)1次/d,第1次用药在骨折后6h,此后每日上午10时注射1次,直到处死前为止(处死当天不注射)。对照组注射同等量的生理盐水。两组动物于术前、术后第4、8、12天

时自眼球采血1ml。术后第13天处死,取骨痂及骨标本。

二、血清的处理

自眼球采血1ml,静置数分钟,离心(3000rpm×15min),取上清,用去离子水适当稀释:Zn、Cu×5倍,Ca×80倍,然后直接测定。

三、骨痂及骨样品的制备和处理

1.骨痂及骨样品制备 处死大鼠后,立即取下左后肢和右后肢,置于10%中性福尔马林液内固定48h,取出后解剖左侧胫骨,保留骨膜,截取以骨痂中点为中心上下各5mm的一段骨痂组织,并在骨痂上方截取5mm的一段胫骨,同样在右后肢相应部位截取5mm的一段胫骨作为正常对照。

2.骨痂及骨样品的处理 将骨痂和骨样品用去离子水洗4遍,用滤纸吸干再放在烤箱中烤干(60℃,48h)至恒重,称重后放于硝酸:高氯酸(4:1)液中过夜,放电热板加热消化至白色液体,冷却后放刻度试管用去离子水适当稀释定容;Cu:100mg干组织加2ml去离子水,即为稀释20倍,同样Zn×1000倍,Ca×10万倍,然后直接测定。

四、原子吸收测定

经上述处理后的样品在原子吸收分光光度计(日立Z-8000型)上测定钙、锌、铜含量。

五、统计学处理

实验结果用student's t检验和直线回归与相关作

统计学处理。

结 果

一、血清中钙、锌、铜含量的变化

1. 血清钙含量的变化 两组血清钙含量术后均较术前明显下降, 但丹参组在术后第8天时, 血清钙水平明显升高, 与对照组比较有统计学意义($P < 0.01$), 基本恢复至正常水平($P > 0.05$), 见表1。

2. 血清锌含量的变化 对照组血清锌水平在术后一直呈低水平($P < 0.01, 0.05$); 而丹参组只是在术后第12天时才有明显下降($P < 0.05$), 但在术后第4、12天时明显高于对照组($P < 0.01, 0.05$), 见表1。

3. 血清铜含量的变化 两组血清铜含量术后一直处于较高水平, 但在术后第4天时, 丹参组血清铜含量明显低于对照组($P < 0.05$), 见表2。

4. 血清锌/铜比值变化 两组血清锌/铜比值(Zn/Cu)术后明显低于术前值, 但丹参组在术后第4天, 血清 Zn/Cu 比值明显高于对照组 ($P < 0.001$), 见表2。

二、骨痂中钙、锌、铜含量的变化

丹参组骨痂中钙、锌含量及锌/铜比值较对照组均有明显的升高 ($P < 0.001, 0.05$); 而两组骨痂中铜的含量则无明显差异($P > 0.05$)。丹参组骨痂中钙含量的升高与骨痂中锌/铜比值的升高呈正相关($r = 0.7089$,

表1 两组血清中钙、锌含量比较 ($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm S$)

组 别	Ca				Zn			
	术 前 (n=10)	术		后	术前 (n=10)	术		后
		4天 (n=10)	8天 (n=9)	12天 (n=9)		4天 (n=10)	8天 (n=9)	12天 (n=9)
丹 参	118.503 ± 22.911	83.120 $\pm 10.280\Delta\Delta\Delta$	106.820 $\pm 9.470^{**}$	92.044 $\pm 6.145\Delta\Delta$	1.439 ± 0.262	1.405 $\pm 0.137^{**}$	1.238 ± 0.177	1.191 $\pm 0.087^{*}\Delta$
生 理 盐 水	108.315 ± 16.340	89.080 $\pm 6.210\Delta\Delta$	90.270 $\pm 5.870\Delta\Delta$	94.410 $\pm 10.750\Delta$	1.530 ± 0.284	1.168 $\pm 0.208\Delta\Delta$	1.152 ± 0.161	1.056 $\pm 0.119\Delta$

注: 与生理盐水组比较 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与术前比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; n = 鼠数; 下同

表2 两组血清中铜及锌/铜比值含量比较 ($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm S$)

组别	Cu				Zn/Cu			
	术 前 (n=10)	术		后	术 前 (n=10)	术		后
		4天 (n=10)	8天 (n=9)	12天 (n=9)		4天 (n=10)	8天 (n=9)	12天 (n=9)
丹 参	0.853 ± 0.180	1.150 $\pm 0.200^{*}\Delta\Delta\Delta$	1.096 $\pm 0.320\Delta$	1.266 $\pm 0.365\Delta$	1.725 ± 0.353	1.248 $\pm 0.200^{*}\Delta\Delta\Delta$	1.249 $\pm 0.513\Delta$	1.008 $\pm 0.266\Delta\Delta$
生 理 盐 水	0.807 ± 0.069	1.500 $\pm 0.460\Delta\Delta\Delta$	1.384 $\pm 0.376\Delta\Delta\Delta$	1.367 $\pm 0.420\Delta\Delta\Delta$	1.917 ± 0.439	0.835 $\pm 0.255\Delta\Delta\Delta$	0.875 $\pm 0.228\Delta\Delta\Delta$	0.841 $\pm 0.274\Delta\Delta\Delta$

表3 各组骨痂、骨断端骨组织、健侧骨组织中钙、锌、铜含量比较 ($\mu\text{g/gdt}$, $\bar{x} \pm S$)

组	别	鼠数	Ca	Zn	Cu	Zn/Cu
骨 痂	丹 参	9	170.00 $\pm 13.73\Delta\Delta^{*}$	142.78 $\pm 17.30\Delta$	1.84 ± 0.23	78.46 $\pm 11.06\Delta$
	生理盐水	9	144.89 ± 12.11	127.89 ± 11.93	2.08 ± 0.34	63.12 ± 12.94
骨 断 端	丹 参	9	194.94 $\pm 20.11\Delta\Delta$	155.78 $\pm 14.22\Delta\Delta$	1.63 $\pm 0.41\Delta$	102.89 $\pm 34.99\Delta\Delta$
	生理盐水	9	179.23 $\pm 30.94\Delta\Delta$	163.89 ± 24.51	1.84 $\pm 0.33\Delta\Delta$	92.23 $\pm 22.55\Delta\Delta$
健 侧	丹 参	9	227.51 ± 12.47	174.00 ± 14.12	0.70 ± 0.21	243.82 ± 40.50
	生理盐水	9	228.38 ± 14.27	169.33 ± 12.65	0.59 ± 0.21	277.40 ± 61.02

注: 钙含量单位为 mg/gdt ; 与生理盐水组比 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.001$; 与健侧比 $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.001$; 骨痂钙与骨痂 Zn/Cu 呈正相关, $*P < 0.05$ ($r = 0.7089$)

$P < 0.05$), 见表 3。

三、骨组织中钙、锌、铜含量的变化

两组骨折断端骨组织中钙及锌/铜比值与健侧比较均有非常明显地降低($P < 0.001$), 且两组比较无明显差异($P > 0.05$); 而两组与健侧比较铜的含量则明显升高($P < 0.01, 0.001$), 两组比较无明显差异。丹参组骨折断端骨组织锌含量较健侧明显下降($P < 0.001$), 而对照组则无明显变化($P > 0.05$), 见表 3。

讨 论

一、钙的变化及其意义

骨折后钙代谢发生变化, 血浆钙在损伤后有其时相变化⁽²⁾。谈志龙等⁽³⁾发现家兔骨折整个愈合期间血清钙出现两个低峰, 术后 4~8 天为第一低峰, 术后第 30 天为第二个低峰。本实验亦发现, 在骨折早期血清钙下降明显。这是由于骨折后局部出血、缺氧、瘀血, 以及钙排泄增加, 引起钙丢失所致^(4, 5)。而应用丹参治疗后, 在骨折后第 8 天时明显升高血清钙水平。这说明丹参通过活血化瘀作用, 改善骨折局部血液循环和缺氧状态, 从而提高骨折早期血钙水平, 促进成纤维细胞蛋白质合成与分泌, 使细胞线粒体内钙颗粒增加⁽⁶⁾, 加快骨折愈合过程。正常情况下, 骨钙与血钙不断进行着交换。有报道丹参可增强骨折邻近部位的钙动员⁽⁷⁾。本实验结果与之不符, 两组骨折断端邻近骨组织中钙含量无明显区别。设想这可能与丹参作用于骨折愈合期的时间有关, 丹参加强骨折断端邻近骨组织钙动员作用发生于骨折愈合的最初时期, 而在骨折后第 13 天时, 其作用已不明显。

二、锌、铜的变化及其意义

锌是机体创伤组织愈合的必需物质。骨折后可引起机体内锌的代谢和含量再分配的变化⁽⁸⁾。本实验结果显示, 骨折早期血清锌和血清锌/铜比值明显降低。这说明骨折后体内缺锌。血清锌降低与创伤后机体应激反应释放促肾上腺皮质激素(ACTH)和白细胞内源性物质(LEM)有关。在这些激素和类激素的作用下, 血清锌很快被摄入肝脏和被动员转运到创伤组织处, 参与创伤的修复, 另外尿排锌增加, 从而使血清锌浓度降低。骨折后应用丹参治疗, 可减慢血清锌浓度的下降, 保持其相对稳定, 达到补锌的目的, 但又胜似补锌, 补锌寓于活血化瘀之中。本实验观察到, 丹参可明显提高骨折愈合早期骨髓中锌含量和锌/铜比值, 但降低骨折断端邻近骨组织锌含量; 并且, 骨髓钙含量与其锌/铜比值有明显的正相关。这说明骨髓钙的增加

与其中锌的作用是分不开的。锌可促进骨组织生长和矿化过程^(9, 10)。在骨折愈合早期应用丹参治疗, 可将骨折断端邻近骨组织中的锌动员至骨断端, 促进骨痂生长和钙化, 促进了骨折的愈合。

本实验还发现, 骨折早期, 血清铜和骨髓、骨折断端邻近骨组织中铜含量均有明显升高。这说明骨折后机体内铜含量的升高是一个普遍现象。骨折后发生应激反应, 白细胞及巨噬细胞被激活, 分泌 LEM, LEM刺激肝脏细胞粗面内质网加速血浆铜蓝蛋白的合成和释放, 白蛋白结合铜增多, 血清铜含量增多, 血中部分铜也可进入骨折部位, 使骨髓和骨折断端邻近骨组织中铜含量增高, 这有利于提高赖氨酰氧化酶的活性, 使胶原纤维合成加快, DNA、RNA聚合酶活性升高, 促进核酸和蛋白质合成, 骨痂生长加快。丹参在术后第 4 天时明显地抑制血清铜的升高。其原因还不清楚, 估计可能与丹参提高血清锌水平有关, 因锌与铜具有互相拮抗作用。

参 考 文 献

1. 王祝举, 等. 中草药与微量元素. 中医药信息 1989; 6 (1): 2.
2. 陈拱治摘译. 钙代谢障碍及其在几种创伤中的作用(俄文). 国外医学·创伤外科基本问题分册 1982; 3(3): 169.
3. 谈志龙, 等. 家兔骨折愈合过程中血清钙、磷、碱性磷酸酶、羟脯氨酸的变化. 骨伤科通讯 1988; (2): 29.
4. Simmon DJ. Fracture healing perspective. Clin Orthop 1985; 200: 100.
5. Seivitt S. 5 Metabolic and biochemical aspects of injury and fracture healing. in: bone repair and fracture healing in man. Edinburgh. Churchill Livingstone 1981: 52.
6. 柴本甫, 等. 活血化瘀治疗骨折的超显微结构研究. 中华外科杂志 1982; 20: 369.
7. 刘季兰, 等. 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(7): 418.
8. Van Ri M, et al. Zinc as an integral component of the metabolic response to trauma. Surg Gynecol Obstet 1981; 153(5): 677.
9. Yamaguchi M, et al. Zinc stimulation of bone protein synthesis in tissue culture. Activation of aminoacyl tRNA synthetase. Biochem Pharmacol 1988; 37(21): 4075.
10. Yamaguchi M, et al. Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture. Biochem Pharmacol 1987; 36: 4007.

results revealed that before treatment the levels of plasma LPO and EMMV in both groups increased significantly compared with those of normal controls ($n=30$, $P<0.01$) respectively. There was a close correlation between LPO and EMMV ($r=0.6774$, $P<0.01$) and a close correlation between LPO and LDH ($r=0.5703$, $P<0.01$). After one course, the levels of plasma LPO and EMMV in both groups decreased significantly (compared with those before treatment, $P<0.01$, respectively). But the LPO level and EMMV in group I were much higher than those in normal controls yet ($P<0.05$, respectively). And LDH, GOT and ECG in nearly half of the patients in group I did not recover after one course while most patients in group II recovered. The results suggested that free radical plays an important role in the pathogenesis of AVM. SM as a good antioxidant, could protect myocardium from repairing membrane damage and clearing away free radical. This provided a new approach to treatment of viral myocarditis.

Key Words viral myocarditis, *Salvia miltiorrhizae*, lipid peroxide, erythrocyte membrane microviscosity

(Original article on page 345)

Reduction of Genotoxic Damage in Oral Mucosa with Myasthenia Gravis by TCM

Li Shun-min (李顺民), Cai Ya-na (蔡亚娜)*, Jiang Yong-xiong (江永雄)*

Shenzhen Hospital of TCM, Shenzhen (518033), *Guangzhou Teachers' College, Guangzhou

Micronucleated exfoliated cell (MEC) of oral mucosa of 40 patients with myasthenia gravis (MG) and 54 normal controls were observed by means of micronucleus test. The frequency of MEC of two groups were 9.56‰ and 2.55‰ respectively, and their difference was remarkably significant ($P<0.001$). 22 cases were treated by TCM Qiang Ji Jian Li Capsule (强肌健力胶囊). The frequency of MEC after treatment fell from 14.38‰ to 6.00‰. The difference was significant ($P<0.002$). The frequency of Spleen-asthenia (脾虚) group higher than that of non-Spleen-asthenia ($P<0.05$). The results revealed that: (1) The patients with MG had genotoxic damage. (2) The constitution with the Spleen-asthenia and the genotoxic damage was related. (3) Qiang Ji Jian Li Capsule of invigorating the Spleen and benefiting Qi (气) could reduce the genotoxic damage.

Key Words myasthenia gravis, Qiang Ji Jian Li Capsule, oral mucosa, micronucleus

(Original article on page 348)

Couching-Netting Operating for Dislocation of Adult Lens

Jiang Bo-ling (蒋伯龄), Tang You-zhi (唐由之), et al

Dept. of Ophthalmology, Guan An Men Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100053)

Clinical data of 12 adult cases of dislocation of lens treated with couching-netting operating were analysed, including cases of traumatic cataracts with complications of glaucoma and cataract couching surgical complication of phacolysis. The result was rather satisfactory. Eyesight was corrected, most of the corrective vision was over 0.5 level, intraocular pressure was controlled and no serious complication was found. According to the author's experience, couching-netting was recommended as a simple and effective method for treating dislocation of adult lens.

Key Words Couching-netting, dislocation of adults lens, glaucoma, cataract

(Original article on page 351)

Effect of Radix Salviae Miltiorrhizae on Calcium, Zinc, Copper Content in Serum, Callus and Bony Tissue in Early Stage of Healing Process in Rat Closed Tibial Fracture

Qin Jun-zhi (秦军志), Wang Xian-chu (王贤春)*

Dept. of Stomatology, 323 Hospital of PLA, Xi'an (710054)

*Dept. of Stomatology, Chang Hai Hospital, The Second Military Medical College, Shanghai

Changes of calcium, zinc, copper contents in serum, callus and bony tissue in the early stage of the healing process of rat closed tibial fracture, also the changes of them with radix salviae miltiorrhizae (RSM) treatment were studied. It was found that calcium, zinc contents and Zn/Cu