

活血化瘀汤影响骨折愈合早期一氧化氮合酶活性的作用机制探讨

张俐¹, 周海兵¹, 刘烈刚²

(1. 福建中医学院骨伤系, 福建 福州 350003; 2. 华中科技大学同济医学院营养与食品系)

摘要 目的: 检测骨折愈合早期大鼠血清一氧化氮合酶(NOS)及其异构体的酶活性及活血化瘀汤对其的影响。方法: 选用雄性SD大鼠20只, 建立胫骨中段标准骨折模型, 随机分为两组, 每组10只, 分别以活血化瘀汤灌胃(中药组)或生理盐水灌胃(对照组); 采用化学比色法测定骨折后1、4、7、14、21 d NOS总量、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)及原生型一氧化氮合酶(cNOS)的活性。结果: 骨折愈合早期血清cNOS酶活性增强, 骨折后4 d达峰值。血清iNOS酶活性于骨折后14 d达峰值; 中药组NOS酶总量维持在较高水平, cNOS酶活性于骨折后14 d达到峰值。两组比较, 骨折后7、14、21 d血清NOS总量及骨折后14 d cNOS酶活性提高非常显著($P < 0.01$), 4 d NOS总量、7 d cNOS酶活性显著提高($P < 0.05$)。血清iNOS酶活性在骨折后4、7、21 d中药组高于对照组, 1、14 d低于对照组, 但无统计学意义。结论: 骨折愈合早期血清NOS酶活性随时间变化, 不同的异构体变化不同; 活血化瘀汤能激活大鼠骨折后血清NOS酶活性的作用, 对不同的NOS同工酶在不同的时间产生的作用不同。提示活血化瘀汤可通过不同方式激活NOS酶活性促进骨折愈合。

关键词 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 骨折愈合; 中草药

Enzymatic activities of nitric oxide synthase during fracture healing with Huoxue Huayu decoction(活血化瘀汤) ZHANG Li*, ZHOU Haibing, LIU Liegang.* Department of Orthopaedics & Traumatology, Fujian University of TCM, Fujian Fuzhou, 350003, China

Abstract Objective: The enzymatic activities of nitric oxide synthase(NOS) were examined for effects of the Huoxue Huayu decoction(活血化瘀汤) during rat fracture healing. **Methods:** Standardized closed fracture of the left tibia in isoflurane anesthetized Sprague Dawley rats was induced using a modified technique. All rats were filled with Huoxue Huayu decoction served as treatment or distilled water served as controls after fractures. Blood serum was determined by the enzymatic activity of NOS, inducible NOS(iNOS) and constitutive NOS(cNOS) on the 1st, 4th, 7th, 14th and 21st day after fracture. **Results:** It increased gradually on the enzymatic activity of cNOS on the 4st day and iNOS on the 14th h day but there was no significant difference during early fracture healing. After treatment of Huoxue Huayu decoction, the enzymatic activity of NOS kept higher level from the 4th day during fracture healing especially the 7th, 14th and 21st day($P < 0.01$). The enzymatic activity of cNOS increased significantly on the 7th($P < 0.05$) and 14th day after fracture($P < 0.01$). **Conclusion:** The enzymatic activity of NOS and its isomerase are different during early fracture healing. The enzymatic activity of NOS and its isomerase are more active after treatment of Huoxue Huayu decoction during observation time points. The study indicates the enzymatic activity of NOS has been improved after the treatment of Huoxue Huayu decoction during early fracture healing.

Key words Nitric oxide; Nitric oxide synthase; Fracture healing; Drugs, Chinese herbal

骨折愈合的过程就是“瘀去、新生、骨合”的过程, 活血化瘀是骨折早期的治疗原则。研究表明: 一

氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)有广泛的生物学功能, 参与了骨折愈合的调节^[1,2], 与骨折愈合局部的血管生成及血液供应、应力刺激、激素及局部各种细胞因子等许多因素密切相关^[3-6]。同时, NOS对成骨和破骨细胞的生成、增殖及功能都表现为双

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(NO. 03063)

福建省教育厅科学技术重点项目(NO. JA02228)

通讯作者: 张俐 Tel: 0591 83570823 E-mail: sj001@mailcity.com

向调节作用^[7,8]。本实验观察骨折愈合早期血清 NOS 及其异构体酶活性的变化,活血化瘀汤对其影响,从而阐明活血化瘀汤与血清 NOS 及其异构体酶活性的相关性以及促进骨折愈合的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用雄性 SD 大鼠 20 只,体质量 (320±10) g,清洁级,上海西普尔-必凯实验动物有限公司(批准证号:沪动合证字 152 号);普通饲料喂养,动物室温度(25±2)℃。

1.2 造模方法 采用氯氨酮(0.1 g/kg 体重)麻醉下,SD 大鼠胫骨中段闭合折骨髓内克氏针固定模型。在胫骨粗隆内上侧约 1~2 mm 以 φ 1 mm 克氏针垂直穿入达髓腔,稍扩大皮质入针点,改变方向插入髓腔,拔出克氏针,徒手折骨,克氏针从原穿针点进针,髓内牢靠固定骨折端。术毕分笼饲养。术后拍摄 X 线片确认造模成功。动物造模后双盲法随机分为两组,每组 10 只,分别以活血化瘀汤灌胃(中药组)或生理盐水灌胃(对照组)。

1.3 给药方法 活血化瘀汤:蒲黄 9 g、姜黄 4.5 g、当归 9 g、赤芍 9 g、紫苏 9 g、西红花 1.5 g、茜草 9 g、生地 9 g、三七 6 g、泽兰 6 g、莪术 6 g、甘草 3 g。按人剂量与大鼠剂量之间的换算方法^[7],加工制成汤药(每 1 ml 汤药含 1 g 生药),即 1 g/ml,骨折造模成功后予以服用。

1.4 主要仪器及相关试剂 酶标仪(美国 BioTek 公司);一氧化氮合酶及各异构体酶试剂盒(南京建

成生物工程研究所,批号 20030829)。

1.5 血清标本采集 未造模前 3 d 随机 10 只剪尾采血,作为该批次 SD 大鼠正常血清样本。骨折造模后 1、4、7、14、21 d 剪尾采血,所有大鼠采血前 12 h 禁食;冰上放置 1 h,4℃,3 000 r/min 离心 10 min,上层血清-20℃冰箱保存待测。

1.6 NOS 和 iNOS 酶活性的检测 所有样本均作平行对照,按试剂盒说明操作测得 NOS 和 iNOS 酶活性。eNOS 酶活性即 NOS 酶活性减去 iNOS 酶活性。酶活性以每毫升血清每分钟生成 1 nmol NO 为 1 酶活性单位(U/ml)。该批次 SD 大鼠未造模前正常血清样本检测结果即为酶活性的生理值。

1.7 统计方法 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 12.0 软件处理。相同时点 NOS 活性的比较应用组间 Independent Samples t Test 统计分析,多组样本均数比较的精确方差分析。

2 结果

2.1 骨折愈合过程血清 NOS 活性变化 骨折愈合中不同时间点酶活性变化:骨折后 7、14、21 d,血清 NOS 酶活性中药组与对照组差异非常显著($P < 0.01$);骨折后 4 d,中药组与对照组差异显著($* P < 0.05$)(表 1)。中药组和对照组血清 NOS 酶活性骨折后 1 d 开始增高,14 d 达到峰值,中药组较对照组增加 36%,之后两组血清 NOS 酶活性都下降,但中药组 21 d 依然在较高水平,较对照组增加 37%。

表 1 SD 大鼠骨折愈合过程中血清 NOS 活性($\bar{x} \pm s$, U/ml)

Tab. 1 Enzymatic activities of NOS during the period of fracture healing in SD rats($\bar{x} \pm s$, U/ml)

组别 Groups	n	生理值 Physiological value	1 d	4 d	7 d	14 d	21 d
中药组 Drugs group	10	6.77±4.41	6.99±2.56	8.95±1.37*	9.75±1.43**	11.03±1.25*	9.63±1.98**
对照组 Control group	10	6.77±4.41	7.52±3.51	7.62±0.97	7.14±0.79	8.13±1.75	7.01±1.05

注:中药组与对照组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

Note: Drugs group vs control group,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

2.2 大鼠骨折愈合过程血清 iNOS 活性变化 骨折后 4、7、21 d,中药组血清 iNOS 酶活性高于对照组,1、14 d 低于对照组,无统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。骨折后,中药组 NOS 和 eNOS 酶活性均增高,14 d 达到峰值;而 iNOS 则持续升高。对照组 4 d eNOS 达到峰值,14 d NOS 和 iNOS 升至峰值。骨折后中药组和对照组 iNOS 酶活性均增强,中药组持续升高。骨折后 4 d 较对照组增加了 80%,7 d 增加了 34%,

21 d 时增加了 128%;骨折后 4 d,对照组 iNOS 酶活性降至最低,14 d 迅速增至峰值后即开始下降至正常生理值。

2.3 大鼠骨折愈合过程中血清 eNOS 活性的变化 骨折后 7 d,eNOS 酶活性中药组与对照组差异显著($P < 0.05$)。骨折后 14 d,差异非常显著($P < 0.01$)(表 3)。骨折后,中药组和对照组 eNOS 酶活性增强,中药组骨折后 14 d 增至峰值,较对照组增加

63% 后, 迅速降至正常生理值附近; 对照组骨折后 4 d 迅速增至峰值即降至正常值附近。

表 2 SD 大鼠骨折愈合过程中血清 iNOS 活性($\bar{x} \pm s$, U/ml)

Tab. 2 Enzymatic activities of iNOS during the period of fracture healing in SD rats($\bar{x} \pm s$, U/ml)

组别 Groups	n	生理值 Physiological value	1 d	4 d	7 d	14 d	21 d
中药组 Drugs group	10	2.06 ± 2.52	2.45 ± 1.76	2.84 ± 1.85	2.70 ± 2.04	3.29 ± 1.36	4.43 ± 3.05
对照组 Control group	10	2.06 ± 2.52	2.79 ± 2.21	1.58 ± 0.94	2.02 ± 0.60	3.37 ± 1.32	1.94 ± 0.76

注: 中药组与对照组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Note: Drugs group vs control group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

表 3 SD 大鼠骨折愈合过程中血清 cNOS 活性($\bar{x} \pm s$, U/ml)

Tab. 3 Enzymatic activities of cNOS during the period of fracture healing in SD rats($\bar{x} \pm s$, U/ml)

组别 Groups	n	生理值 Physiological value	1 d	4 d	7 d	14 d	21 d
中药组 Drugs group	10	4.71 ± 2.99	4.53 ± 2.01	6.11 ± 1.63	6.91 ± 1.98*	7.74 ± 1.44**	5.20 ± 0.46
对照组 Control group	10	4.71 ± 2.99	4.73 ± 2.24	6.04 ± 1.38	5.12 ± 0.57	4.76 ± 1.30	5.07 ± 1.07

注: 中药组与对照组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Note: Drugs group vs control group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

3 讨论

骨折愈合的整个过程是持续和渐进的。临床上, 活血化瘀是骨折早期最主要的治疗原则。骨折后, 因骨折本身及邻近软组织的血管断裂出血, 形成血肿、凝成血块, 引起无菌性炎症反应。之后, 血肿机化, 骨折断端纤维连接, 约在骨折后 2~3 周内完成。此时, 内服活血化瘀药物, 加强骨折断端局部血液循环, 并清除血凝块及代谢中的分解产物^[3]。活血化瘀汤为福建名老中医骨伤专方, 也是全国多所医院骨伤科协作方, 具有明显地促进骨折愈合的临床疗效。故本文进一步探讨其对骨折愈合早期一氧化氮合酶活性影响的作用机制。

一氧化氮(NO)与骨折愈合中局部的血管生成及血液供应、应力刺激、激素及局部各种细胞因子等许多因素密切相关^[3-7]。同时, NO 对成骨和破骨细胞的生成、增殖及功能都表现为双向调节作用^[8,9]。成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收功能都依赖于少量 NO 的存在, 较低 NO 还可对骨细胞的增殖及活性具有促进作用; 而高浓度 NO 主要抑制骨细胞这些功能。NOS 抑制剂可抑制骨形成^[10], 这些都说明在骨折愈合的过程中 NO 发挥了重要作用。一般认为 NO 的生物学效应, 包括内皮细胞依赖性血管舒张、神经传递和细胞介导的免疫反应等。NO 的合成主要受 NOS 的调节。NOS 有三种异构体同工酶:

内皮型一氧化氮合酶(endothelial NOS, eNOS)、神经型一氧化氮合酶(neuronal NOS, nNOS)和 iNOS。eNOS 和 nNOS 为 cNOS。cNOS 的激活依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白(CaM), 激活后酶活性持续时间很短, 产生少量 NO。iNOS 的活性不依赖于 Ca^{2+} , 可被多种刺激激活, 产生大量 NO。

由于 NO 半衰期极短, 其活性和合成主要受 NOS 的调节, 因而对 NOS 的研究便成为目前研究 NO 生物学功能的重点。NOS 主要的异构体 cNOS(eNOS 和 nNOS)与 iNOS 的分布和功能是不同的。cNOS 正常生理下即具有生物活性, 主要存在于神经元和血管内皮细胞内, 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高时被激活后介导一系列生理功能, 如参与机体的防御免疫活动、调节血管的功能和组织的血流、参与神经的信息传递等。iNOS 几乎分布于所有组织中, 一般情况下不表达; 在受到外来抗原、细胞因子等各种刺激后可生成大量 NO, 其催化活性及活性持续时间均远超过 cNOS, 不需钙离子或钙调蛋白参与。在骨折愈合的不同阶段, 骨痂 NOS 表达和酶活性的种类、水平是不同的^[11,12]; 在正常骨组织中, NOS 低表达或不表达, 酶活性处于低水平。骨折后不同类型 NOS 的酶活性与时间密切相关, 因此检测血清 NOS 酶活性, 可以更好的了解骨折愈合过程, 为骨折后的治疗、预后提供一定的评价基础。

本实验结果显示, 对照组骨折后 NOS 酶活性增强了, 主要是早期 cNOS 酶活性增强(骨折后 4 d 达峰值)和中期 iNOS 酶活性增强(骨折后 14 d 达峰值); 而活血化瘀汤主要通过增强中期 cNOS 酶活性(14 d 达峰值)和持续的提高 iNOS 酶活性, 从而使总的 NOS 酶活性维持在较高水平。对照组血清骨折后 4 d cNOS 酶活性最高, iNOS 活性最低, 而总的 NOS 酶活性骨折后 1 d 升高后直到 21 d 才降到生理值。早期 cNOS 酶活性升高与 iNOS 的降低, 这可能与早期骨折局部血管舒张及生长、局部抑制 iNOS 活性的细胞因子增多有关。而后期 iNOS 酶活性的增加可能与骨细胞生长代谢旺盛、机械压力、激素的调节等有关。由于骨折愈合过程和 NO 和 NOS 的生物活性都很复杂, NOS 活性这种随时间变化具体机制尚不明了。与对照组比较, 中药组则持续增强 iNOS 酶活性, 同时在骨折 7、14 d 增强 cNOS 活性, 从而总的 NOS 活性较对照组处于更高的水平, 这提示活血化瘀汤对骨折后大鼠血清具有激活 NOS 酶活性的作用, 且对 NOS 同工酶在不同的时间产生不同的影响。这可能是活血化瘀汤促进骨折愈合的部分机制之一, 但活血化瘀汤影响 NOS 活性的有效成分、影响途径等有待进一步研究。

参考文献

- 1 Diwan AD, Wang MX, Jang D, et al. Nitric oxide modulates fracture healing. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(2): 342-351.
- 2 Corbett SA, Hukkanen M, Batten J, et al. Nitric oxide in fracture repair. Differential localisation, expression and activity of nitric oxide synthases. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1999, 81(3): 531-537.
- 3 王和鸣. 中医伤科学. 北京: 中国中医药出版社, 2002. 122.
- 4 Corbett SA, McCarthy ID, Batten J, et al. Nitric oxide mediated vasoactivity during fracture repair. *Clin Orthop*, 1999, 365: 247-253.
- 5 Nomura S, Takano Yamamoto T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol*, 2000, 19(2): 91-96.
- 6 Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 2001, 142(2): 760-766.
- 7 孙靖. 实验动物学讲义. 北京市实验动物管理办公室, 1999. 126.
- 8 van't Hof RJ, Ralston SH. Cytokine induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(11): 1797-1804.
- 9 Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH, et al. Nitric oxide: A cytokine induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(7): 1040-1049.
- 10 Ralston SH, Todd D, Helfrich M, et al. Human osteoblast like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 1994, 135(1): 330-336.
- 11 Turner CH, Owan I, Jacob DS. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone*, 1997, 21(6): 487-490.
- 12 Zhu W, Diwan AD, Lin JH, et al. Nitric oxide synthase isoforms during fracture healing. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(3): 535-540.

(收稿日期: 2004-08-20 本文编辑: 李为农)

北京市京华行科贸有限责任公司

生产研制产品报价单

京药管械经营许 20000737 号 京医械广备(字)第 200312099 号

一、牵引康复设备 (D)代表全电脑控制

1. JKF 系列多功能脊柱牵引康复床: 电脑程控, 腰椎、颈椎、全身静止、间歇牵引, 侧扳, 腰部热疗按摩。

II型: 19 800 元/台	IIIA 型: 26 500 元/台	IIIA(D) 型: 38 000 元/台
IB 型: 8 800 元/台	IB(D) 型: 19 800 元/台	IC 型: 13 000 元/台
		IC(D) 型: 23 900 元/台

2. FYC 系列俯卧式多功能腰椎治疗床: 屈膝俯卧位牵引、捶击、热疗一体化, 颈牵、下肢摇摆。

II型: 9 850 元/台 IIIA 电动型: 13 900 元/台 IIIA(D) 型: 29 000 元/台

3. JQY 系列多功能颈椎牵引治疗仪: 颈牵、电针、热疗一体化。

I 型: 5 800 元/台 I(B) 型: 12 600 元/台 I(A) 型: 8 800 元/台 IC 家用型: 520 元/台

二、RLY-A 系列 BH 型中频热场针灸按摩仪

该系列产品均为电脑程控, I 型产品具有人工针灸的各种针法及按摩手法, 手法逼真、柔和、深沉, 力度等同人工。中频波渗透性强, 可调至较深层次的穴位及病灶处。III型和IV型增设远红外线热疗、药物离子导入, 配有与人体各部位相吻合的药物模具。主治: 风湿痹、腰椎间盘突出症、颈椎病、骨质增生、关节炎、急慢性扭拉伤、偏瘫肢体恢复等。

I 型: 6 000 元/台 III型: 9 000 元/台(双功能型) VI型: 12 000 元/台(双功能智能型)

三、其他设备

1. XN 心脑检查治疗仪 IIIA 型 2 960 元/台 2. GZ 骨质增生药物电泳治疗仪 IIIA 型 3 260 元/台

3. FD 风湿治疗仪 IIIA 型 2 880 元/台 4. DJS 胆结石治疗仪 IIIA 型 3 380 元/台

邮购办法: (1) 邮局, 银行汇款均可, 款到后立即发货。(2) 厂家销售, 所售产品保修壹年, 长期维修。运费保险费由我方负责。(3) 面向全国常年办理邮购, 欢迎来函来电索取资料。公司地址: 北京广安门外大街 305 号八区荣丰嘉园 8 号楼 2722 号 邮编: 100055 联系人: 徐照 电话: 010-63275185, 63275186 值班电话: 010-66031777 手机: 13901040602, 13910097637 银行汇款户名: 北京市京华行科贸有限责任公司 开户行: 北京建行玉泉路支行 帐号: 6510006032630017010