

# 植入型复方丹参缓释剂对骨折愈合影响的实验研究

王俊国<sup>1</sup>, 曹斌<sup>1</sup>, 唐胜建<sup>2</sup>, 刘永辉<sup>1</sup>, 张守平<sup>1</sup>

(1. 青岛市海慈医疗集团海慈医院骨科, 山东 青岛 266042; 2. 潍坊医学院整形外科医院)

**摘要** 目的: 观察丹参缓释剂植入骨折局部对骨折愈合的影响。方法: 42 只新西兰健康白兔随机分为两组, 均于右前肢桡骨中段制成 3 mm 骨缺损的骨折模型, 同时实验组放置丹参缓释剂 60 mg, 对照组放置等量赋形剂。分别于术后第 2、4、5、6 周取右桡骨行 X 线片及组织学检查; 第 2、4、6 周行电镜及骨密度检查; 第 5、6 周进行生物力学测试。结果: X 线片显示实验组较对照组骨折愈合提前。组织学观察实验组纤维性骨痂、软骨性骨痂、骨小梁之间过渡加快, 毛细血管增生明显。电镜检查实验组示骨折修复细胞形态学变化均有利于修复骨折。术后第 2、4、6 周时骨密度值实验组均较对照组高, 其中第 4 周时两者差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。术后第 5、6 周实验组抗折力均较对照组高 ( $P < 0.05$ )。结论: 在骨折局部使用丹参缓释剂对骨折愈合具有一定的促进作用。

**关键词** 丹参; 骨折愈合; 组织学; 骨密度

**Experimental research on the effect of implantation of controlled releasing Radix salvia miltiorrhiza on radial fracture healing** WANG Jun-guo\*, CAO Bin, TAN G Sheng-jian, LIU Yong-hui, ZHANG Shou-ping\*. Department of Orthopaedic, Haici Hospital of Qingdao, Shandong Qingdao, 266042, China

**Abstract Objective:** To evaluate the effects of implantation of controlled releasing Radix salvia miltiorrhiza on fracture healing. **Methods:** Standard fracture models were established in the middle of right radii of New Zealand healthy white rabbits. 42 rabbits were divided randomly into experiment group and control group, 60 mg controlled releasing Radix salvia miltiorrhiza were implanted into the fracture site in experiment group and 60 mg excipient in control group. Radiography, histological and electron microscopic examination were done respectively. BMD was detected at the 2, 4, 6 th week after the operation. Biomechanics test was employed at the 5, 6 th week after the operation. **Results:** X ray films showed fracture healing was earlier in the experiment group than that in the control group. Histological examination showed in the experiment group the transformation of fibrous callus, cartilaginous callus and trabecular bone were faster than that in the control group. The capillary hyperplasia was obvious. The electron microscopic examination showed all morphological changes facilitated to fracture healing. BMD at fracture site were higher in the experiment group than that in the control group; moreover, the difference of BMD at the 4 th week had statistical significance ( $P < 0.05$ ). The figures of anti fracture strength in the experiment group were greater at the 5, 6 th week, and the difference had statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Implantation of controlled releasing Radix salvia miltiorrhiza can accelerate fracture healing.

**Key words** Radix salvia miltiorrhiza; Fractures healing; Histology; Bone density

尽管医疗技术有了长足的进步, 但统计数字表明仍有约 5% ~ 10% 的骨折可发生骨折延迟愈合和不愈合<sup>[1]</sup>。而骨折愈合本身是一个缓慢过程, 常采用全身或局部给药来促进骨折愈合, 取得一定疗效。目前尚未见有局部植入药物促进骨折愈合的相关报

道。本研究是试图寻找一种一次性局部植入而有效促进骨折愈合的新方法。本试验通过制成动物桡骨骨折模型, 同时植入丹参缓释剂并观察其对骨折愈合的影响。

## 1 材料与方

**1.1 复方丹参缓释剂** 由青岛海慈医院骨科、天津天士力集团和中国医学科学院放射医学研究所共同

研制,主要成分为水溶性丹参素及少量川芎嗪<sup>[2]</sup>,固体剂型。赋形剂为明胶。

**1.2 动物造模及分组处理** 健康纯种成年新西兰大白兔 42 只,雌雄不拘,体重(2.76±0.21)kg,随机分为实验组和对照组。术前脱毛,固定,氯胺酮 40 mg/kg 静脉麻醉后,消毒铺巾。在右桡骨中段造成 3 mm 骨缺损的标准骨折,同时实验组骨折端左右两侧放置丹参缓释剂 60 mg,对照组放置等量赋形剂。

### 1.3 观察指标

**1.3.1 X 线检查** 术后第 2、4、5、6 周拍右前肢 X 线片。

**1.3.2 组织学检查** 术后第 2、4、5、6 周每组各杀 5 或 6 只取桡骨骨折两端各 0.5 cm,10% 甲醛固定,硝酸脱钙,取骨痂最大直径处纵切标本,常规石蜡包埋,组织切片,HE 染色。

**1.3.3 电镜检查** 术后第 2、4、6 周取桡骨骨折端 1 mm<sup>3</sup> 组织块,3% 戊二醛 4℃ 固定 2 h,5.5% EDTA 4℃ 脱钙 14 d,1% 锇酸后固定,Epon 812 包埋,超薄切片,枸橼酸铅醋酸双氧铀染色,H-7500 透射电镜观察。

**1.3.4 骨密度测定** 取第 2、4、6 周各组标本,剔除软组织,Challenger DEXA 骨密度测量仪测量断端骨密度(单位: g/cm<sup>2</sup>)。

**1.3.5 生物力学测定** 取第 5、6 周各组标本,剔除软组织,保持桡骨的完整性。GT-2000 机械拉压试验机进行生物力学测定。测试时以骨折处为中心,

跨距 5 cm,加载 100 g/min,至标本自骨折处折断,得抗折力(单位: g)。

**1.4 统计学处理** 所有计量资料均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用 SPSS 10.0 软件进行方差齐性检验后,采用配对资料的 *t* 检验,*P* < 0.05 表示两组间差异具有显著性。

## 2 结果

**2.1 X 线观察** 术后 2 周,两组骨折端均出现骨痂,呈线状或片状分布,骨折间隙明显。术后 4 周,实验组外骨痂形成明显,已形成桥接;对照组外骨痂未完全连接。术后 5 周,实验组骨折断端完全连接,外骨痂不明显;对照组骨折线仍可见。术后 6 周,实验组骨折线消失,髓腔再通;对照组骨折线模糊。

**2.2 光镜观察** 术后 2 周,骨断端处实验组成纤维细胞多,小血管增生;对照组成纤维细胞较多,小血管增生不明显。术后 4 周,实验组成纤维细胞较多,软骨细胞增殖活跃,软骨细胞向骨细胞过渡并形成骨小梁,成骨细胞多成群聚集,破骨细胞较多,血管增生明显;对照组骨小梁较幼稚,成骨细胞较多,血管增生。术后 5 周,实验组骨小梁较成熟,血管增生,仍可见到软骨细胞向骨细胞过渡,成骨细胞及破骨细胞多;对照组软骨细胞较多,向骨组织过渡,成骨细胞增生(图 1-2)。术后 6 周,实验组骨小梁及骨组织成熟,出现了正常的骨髓造血组织并示髓腔再通;对照组仍然可见少量软骨细胞向骨小梁过渡,已形成的骨小梁较成熟。

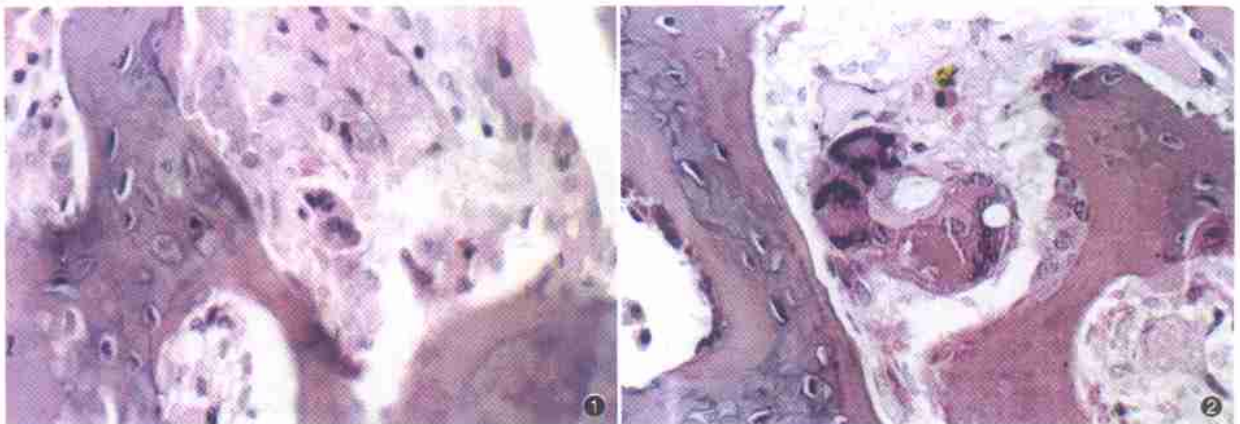


图 1 对照组骨折后 5 周,成骨细胞增生,破骨细胞可见,软骨细胞较多,向骨组织过渡(HE × 400) 图 2 实验组骨折后 5 周,骨小梁较成熟,血管增生,仍可见到软骨细胞向骨细胞过渡;成骨细胞多,破骨细胞多见(HE × 400)

**Fig.1** In the control group, osteoblast, osteoclast and cartilage cells were proliferated. Moreover the transformation of cartilage and trabecula were observed at the 5th week after fracture (HE × 400) **Fig.2** In the experimental group, trabecula was more mature, capillary was hyperplastic. The cartilage cell turn into bone cell could still be observed. And osteoblast and osteoclast increased (HE × 400)

**2.3 电镜观察** 骨折愈合过程中实验组各阶段出现的各种细胞与对照组基本一致,但亦出现了一些与对照组不同的变化,以第 4 周为例描述。  
 ①成纤维细胞:实验组胞质内高尔基复合体发达,粗面内质网发达,游离核糖体增多,线粒体发达;对照组成纤维细胞细胞器较发达,线粒体有肿胀及髓样变。  
 ②成骨细胞:实验组细胞胞质内线粒体及粗面内质网发达;对照组细胞内线粒体肿胀明显并有髓样变(图 3-4)。  
 ③软骨细胞:实验组软骨细胞内粗面内质网及高尔基复合体发达,游离核糖体增多,软骨细胞周围基质形成良好;对照组细胞内线粒体肿胀明显。  
 ④胶原原纤维:实验组骨断端处较对照组数量明显增

多,排列整齐(图 5-6)。  
 ⑤毛细血管:实验组新生毛细血管内皮细胞增生,基底膜完整,内皮细胞管腔面有大量微绒毛,内皮细胞有大量吞饮小泡及小凹;对照组内皮细胞有空泡样变及髓样变(图 7-8)。  
**2.4 骨密度检查** 骨折愈合过程中骨密度值逐渐增加,至第 4 周时达峰值,然后下降。在第 2、4、6 周三时段实验组骨密度值均比对照组高,其中第 4 周两者比较差异具有显著性( $P < 0.05$ , 表 1)。  
**2.5 生物力学测定** 术后第 5、6 周实验组抗折力递增,且均较对照组高,两者差异具有显著性( $P < 0.05$ , 表 1)。

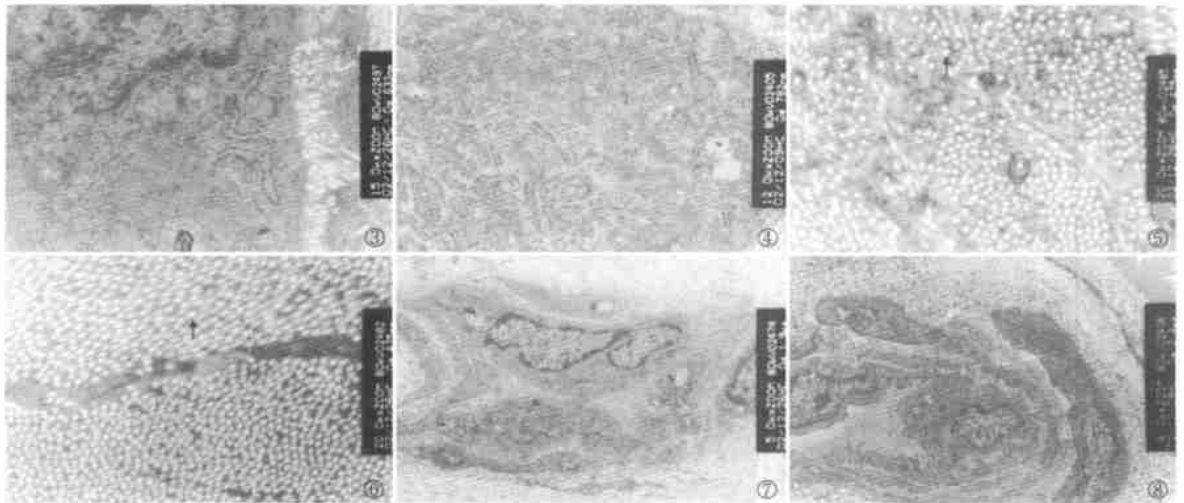


图 3 对照组成骨细胞线粒体肿胀,有髓样变(TEM×15 000) 图 4 实验组成骨细胞胞质内线粒体及粗面内质网发达(TEM×12 000)  
 图 5 对照组胶原原纤维(箭头所示,TEM×20 000) 图 6 实验组胶原原纤维(箭头所示)较对照明显增多,且排列更为整齐(TEM×20 000)  
 图 7 对照组毛细血管内皮细胞有空泡样变及髓样变(TEM×5 000) 图 8 实验组毛细血管内皮细胞增生,基底膜完整,内皮细胞管腔面有大量微绒毛,吞饮小泡及小凹(TEM×4 000)

Fig. 3 Mitochondria of osteoblasts were swelling and had pulpy form degeneration in the control group(TEM×15 000) Fig. 4 Mitochondria and RER of osteoblast thrived in the experiment group(TEM×12 000) Fig. 5 Collagen fibrils in the control group(Arrow point instruction, TEM×20 000) Fig. 6 Collagen fibrils in the experimental group increased and arranged more regularly than in the control group(Arrow point instruction, TEM×20 000) Fig. 7 In the control group, endothelial cells of blood capillary with vacuolation and pulpy form(TEM×5 000) Fig. 8 Endothelial cells of blood capillary were hyperplastic and all morphological changes showed that the function of endothelial cells were active in the experimental group(TEM×4 000)

表 1 骨折后不同时间兔桡骨断端的骨密度值及抗折力值( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 BMD and anti fracture strength of rabbits radius at different healing time after fracture( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	骨密度值( $g/cm^2$ ) BMD( $g/cm^2$ )			抗折力值(g) Anti fracture strength(g)	
	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 5 周	第 6 周
	The 2 rd week	The 4 th week	The 6 th week	The 5 th week	The 6 th week
实验组 Experimental group	0.227±0.012	0.312±0.012*	0.250±0.009	1382.000±117.164*	2130.600±169.793*
对照组 Control group	0.217±0.011	0.261±0.015	0.236±0.011	1163.800±91.873	1819.200±63.456

注:实验组与同期对照组比较: \*  $t = 6.083, P < 0.05$ ; \*  $t = 4.404, P < 0.05$ ; \*  $t = 3.243, P < 0.05$

Note: Experimental group compared with control group of synchronization: \*  $t = 6.083, P < 0.05$ ; \*  $t = 4.404, P < 0.05$ ; \*  $t = 3.243, P < 0.05$

### 3 讨论

**3.1 研究背景及本研究优点** 既往诸多促进骨折愈合的研究多为全身性给予中西药物<sup>[3,4]</sup>或局部外敷药物<sup>[5]</sup>。前者药物大部分分布到其他组织、器官,进入骨折处药量较少;后者则因皮肤的屏障作用,进入骨折处的药量甚微。鉴于此,作者采用传统中药丹参制成缓释剂型,植入骨折局部以达到促进骨折愈合的目的。本研究证明该方法具有以下优点:①骨折局部保持了较高的药物浓度;②具有缓释作用,能在骨折局部持续释放有效药物浓度达 35 d<sup>[2]</sup>,发挥药理作用;③避免了全身或局部多次给药的药物不良反应。

#### 3.2 丹参对骨折愈合影响的作用机制

**3.2.1 改善局部微循环** 丹参可通过对创伤局部组织血管容量的调节而促进创伤组织的修复,减少以充血为主的早期血容量增加,使新血管增生而引起的血容量高峰延续时间向后延长<sup>[6]</sup>。丹参能抑制血小板合成和释放血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)等前列腺素类缩血管物质<sup>[7]</sup>;丹参还有提高机体抗凝和抗纤溶活性<sup>[8]</sup>;另外还有抗凝血及抑制血栓形成等作用<sup>[9]</sup>,从而通过改善局部微循环而改善细胞缺血缺氧所致的代谢障碍。本实验观察到实验组毛细血管增生较对照组明显,同时新生毛细血管内皮细胞形态上的变化显示其功能明显活跃,证明丹参确有促进血管增生、改善微循环的作用。

#### 3.2.2 丹参对各种骨折修复细胞的影响

**3.2.2.1 促进成骨细胞增生及功能活跃** 丹参治疗骨折过程中除随新生血管进入的未分化细胞可向成骨细胞转化外,肥大的软骨细胞也可向成骨细胞转化<sup>[10]</sup>。本实验中丹参治疗后用药组成骨细胞出现时间早,数量明显增多,多成群分布,证明丹参不仅可以促进间充质细胞向成骨细胞转化,还能促进软骨细胞向成骨细胞转化。另外从微观角度亦可观察到丹参治疗后成骨细胞表现出旺盛的合成能力。

**3.2.2.2 促进成纤维细胞增生及功能活跃** 应用丹参后成纤维细胞数量明显增多,细胞器功能明显活跃等现象,证明丹参使成纤维细胞的蛋白质合成旺盛,进而使胶原原纤维及胶原纤维增多。另外,实验观察到成纤维细胞的出现及转化均较对照组快,这是一个积极的过程,能使成纤维细胞更快地被骨组织所代替,从而促进骨折的愈合<sup>[11]</sup>。

**3.2.2.3 调节破骨细胞功能** 骨的塑形改建是成骨细胞与破骨细胞共同活动的结果。微观观察可以

发现丹参使实验组骨小梁周围出现成团的破骨细胞,细胞数量增多、体积增大,不规则。作者认为丹参通过对破骨细胞的调节作用也促进了骨的塑形改建。

**3.2.2.4 促进基质钙化** 胶原纤维是骨组织重要的组成部分。作者观察到丹参的应用使胶原原纤维在数量上明显增多,排列整齐。反映在抗折力的生物力学测试中,实验组第 5、6 周的抗折力显著高于对照组( $P < 0.05$ ),也证明了丹参的使用促进胶原纤维的合成,进而促进了骨基质的钙化过程。

**3.3 川芎嗪的药理作用及对骨折愈合的影响** 川芎嗪是从川芎根茎中分离出的生物碱单体,化学结构为四甲基吡嗪。川芎嗪主要的药理作用<sup>[12,13]</sup>:改善局部微循环;拮抗血小板聚集;抗血栓形成;促进纤维蛋白溶解;拮抗氧自由基损伤。可见川芎嗪的药理作用与丹参在很多方面具有共性,川芎嗪在复方丹参中的辅助使用,对骨折愈合的促进作用应具有协同效果。

本研究结果表明丹参缓释剂植入骨折局部有促进骨折愈合的作用,但其作用机制有待于进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 Einhorn T A. Enhancement of fracture healing. J Bone Joint Surg (Am), 1995, 77(9): 940-956.
- 2 曹斌,刘永辉,王开友,等.植入型丹参缓释剂的研制与药代动力学研究.中国骨伤,2002,15(7):411-412.
- 3 费琴明,陈统一,崔大敷,等.人工合成成骨生长肽促进兔胫骨骨折愈合的实验研究.中华骨科杂志,2002,22(3):165-170.
- 4 孙之镐,刘向前,祁开泽,等.接骨紫金丹对家兔骨折愈合期间几种金属元素的影响.中国骨伤,1999,12(6):16-18.
- 5 张建国,陈良金,蒋文跃.外敷中药对骨折愈合微血管重建的影响.中国骨伤,2000,13(2):86-87.
- 6 胡美珠,张菊英,刘季兰,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(1):33.
- 7 李承珠,林嘉宝,杨诗春,等.丹参对血小板释放血管收缩物质的影响.中国中西医结合杂志,1984,4(9):565-532.
- 8 顾杨洪,张彩英,黄桂秋,等.丹参和丹参素对牛内皮细胞抗凝和纤溶功能的影响.上海第二医科大学学报,1990,10(3):208-211.
- 9 李承珠,杨诗春,赵凤娣,等.丹参素抗凝血作用的研究.中国中西医结合杂志,1983,3(5):297-299.
- 10 史炜镔,符诗聪,杜宁,等.丹参有效部位对骨折愈合过程中胶原基因表达的影响.中国中西医结合杂志,2000,20(4):269-271.
- 11 柴本甫,汤雪明.活血化瘀药丹参治疗骨折的超微结构研究.中国中西医结合杂志,1987,7(7):417-419.
- 12 黄力强.川芎对心脑血管疾病活血化瘀药理作用的探讨.辽宁中医杂志,2000,27(10):469.
- 13 庄洪.川芎嗪对肢体缺血再灌注损伤影响的临床实验研究.中国骨伤,2001,14(6):343-344.

(收稿日期:2004-04-05 本文编辑:房世源)