

· 基础研究 ·

活血化瘀汤对大鼠骨折愈合过程中血清骨钙素和型胶原表达的影响

张俐, 杨宗宇

(福建中医学院骨伤系, 福建 福州 350003)

【摘要】 目的: 研究活血化瘀汤在骨折愈合过程中对骨钙素 (bone gamma carboxyglutamate protein, BGP) 和 型胶原 (Collagen) 表达的影响, 探讨该方在骨折愈合中对软骨内成骨的作用。方法: 选用雄性 SD 大鼠 60 只, 造成左胫骨中段闭合折骨标准的骨折模型, 术后采用髓内针固定。随机分成中药组 (麻醉苏醒后灌服活血化瘀汤, $n = 30$) 和对照组 (麻醉苏醒后灌服等量生理盐水, $n = 30$), 分别于灌胃后 3、5、7、14、21 d 腹主动脉取血, 然后取骨折端上下各 0.5 cm 长的一段骨质。应用 Elisa 技术, 动态观察骨钙素和 型胶原表达的变化。结果: 血清骨钙素、 型胶原在骨折愈合过程中表达持续增高, 且表达具有一致性; 活血化瘀汤组血清骨钙素、 型胶原的表达均较生理盐水组明显 ($P < 0.05$)。结论: 活血化瘀汤能调控骨钙素和 型胶原表达, 可能通过影响大鼠骨折愈合过程中软骨内成骨, 促进骨折愈合。

【关键词】 活血化瘀汤; 骨钙素; 胶原 型; 骨折愈合

Effect of Huoxue Huayu decoction (活血化瘀汤) on expression of bone gamma carboxyglutamate protein and Collagen in rat fracture healing ZHANG Li, YANG Zong-yu Department of Orthopaedics and Traumatology, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of *Huoxue Huayu* decoction on the expression of bone gamma carboxyglutamate protein (BGP) and Collagen in rat fracture healing **Methods:** Kirschner's wires were fixed in the bone marrow of the midshaft tibia with standardized closed fracture in 60 SD rats to establish the fracture models. The rats were randomly and equally divided into *Huoxue Huayu* decoction group served as *Huoxue Huayu* decoction and normal saline group served as saline after fracture. The specimens of serum and bony calluses were collected at 3, 5, 7, 14, 21 days to detect the level of serum BGP and Collagen after fracture. **Results:** All 60 rats were involved into the results of analysis. The expression of BGP and Collagen in all serum and the bony callus increased during fracture healing. It was significantly higher in *Huoxue Huayu* decoction group than that of normal saline group ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Huoxue Huayu* decoction may influence the proliferative ability of osteocytes via increasing the level of BGP and Collagen in serum and bony callus of rats with early fracture healing, and thus promote fracture healing.

Key words *Huoxue Huayu* decoction (活血化瘀汤); Bone gamma carboxyglutamate protein, BGP; Collagen type ; Fracture healing

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(8): 527-528 www.zggsz.com

活血化瘀法是骨折愈合早期临床主要治疗方法, 我们既往的研究从分子生物学角度证明了其在骨折愈合早期可通过不同方式激活 NOS 酶活性、调控 HIF-1 和 VEGF 的表达, 促进骨折愈合^[1-4]。骨钙素是合适的软骨内骨化标记物^[5]; 型胶原是骨基质中最主要的纤维胶原成分, 具有特异性, 是反映骨形成的重要指标。本实验拟通过活血化瘀汤对骨折愈合过程中骨钙素和 型胶原表达的影响, 探讨活血化瘀汤对骨

折愈合的影响, 对软骨内成骨的作用。

1 材料与方法

1.1 造模动物 3月龄雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 (280 ± 20) g, 由上海中科院提供 [批准证号: SCXK(沪) 2003-0003]。普通饲料喂养, 动物室温度 (25 ± 2) 。

1.2 骨折模型的建立与分组 全部动物均以 10% 水合氯醛按 0.3 g/kg 腹腔注射麻醉; 右下肢用脱毛膏脱毛, 在胫骨粗隆下位置闭合折骨, 消毒无菌操作, 用直径 1 mm 的克氏针从胫骨近端至远端髓内固定, 针尾埋于皮下。双盲随机分为中药组 (30 只)、对照组 (30 只)。造模后中药组在造模当天麻醉苏醒后灌服活血化瘀汤, 每日 2 次, 每次 1.5 ml。对照组用

基金项目: 1. 福建省引进高层次人才项目 (1401); 2. 教育部留学回国科研项目 (教外司留 (2004) 527 号)

通讯作者: 张俐 Tel: 0591-22861137 E-mail: zhangli626@yahoo.com

表 1 骨折后不同时间点血清骨钙素和 型胶原的表达 ($\bar{x} \pm s$)
 Tab 1 The expression of bone gamma carboxyglutamate protein (BGP) and Collagen after fracture at different time ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	骨钙素 (U/ml)					型胶原 (pg/ml)				
		3 d	5 d	7 d	14 d	21 d	3 d	5 d	7 d	14 d	21 d
中药组	6	5.922 ±	10.469 ±	13.026 ±	18.278 ±	27.953 ±	6.894 ±	10.580 ±	13.425 ±	27.780 ±	30.670 ±
		1.285*	1.425*	1.627*	6.264*	1.994**	2.619*	4.149*	4.253*	6.569**	6.588**
对照组	6	4.203 ±	8.564 ±	10.246 ±	14.440 ±	21.157 ±	7.415 ±	7.743 ±	7.322 ±	16.230 ±	20.232 ±
		1.176	1.410	2.123	5.764	3.346	3.389	3.869	2.603	4.737	7.061

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: as compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

等量生理盐水灌胃。分别在 3、5、7、14、21 d 各处死 6 只,在无菌操作下快速腹主动脉取血,同时取下骨折区组织, - 80 超低温冰箱保存。

1.3 仪器与试剂 DU650紫外分光光度计(美国 Beckman); BT半自动生化分析仪酶标仪(意大利 Biotechnica Instruments); MLLIQ Bioce超纯水装置(美国 Millipore); 骨钙素、型胶原 Elisa 试剂盒(天津津盛); 活血化瘀汤组方: 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, 购自福建同春药业股份有限公司中药材分公司。由福建中医学院屏山制药厂协作制备,按照人与大鼠体表面积换算加工成 1 ml 汤药含生药 1 g,即 1 g/1 ml,无菌封瓶, - 20 冰箱保存备用。

1.4 观察指标与方法 Elisa 检测骨钙素、型胶原的表达按照试剂盒说明书操作,各组在造模后 3、5、7、14、21 d 腹主动脉采血 1 次。采血前 12 h 禁食,玻璃管收集腹主动脉血 4 ml,冰上放置 1 h, 4 000 r/min,离心 10 min,上层血清移至新 1.5 ml EP 管中(2 个) - 20 冰箱保存。取出酶标板,依照次序对应分别加入 100 μl 的标准品和质控品于空白微孔中,分别标记样品编号,加入 100 μl 样品于空白微孔中,每孔加入 50 μl 的酶标记溶液,20 孵育反应 90 min,洗板机清洗 5 次,每次静立 15 s,每孔加入底物 A、B 液各 50 μl,20 孵育反应 15 min,每孔加入 50 μl 的终止液,终止反应。于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值。结果于波长 450 nm BT 半自动生化分析仪上读取各孔的 OD 值。

1.5 统计分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 进行统计分析,组间比较用 t 检验, Independent-Samples t test, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

活血化瘀汤对骨折愈合过程中骨钙素和 型胶原表达的影响:血清骨钙素和 型胶原在骨折愈合过程中表达持续增高,在软骨痂向骨痂转化时间内其表达突然提高至很高水平,且表达具有一致性(见表 1)。

3 讨论

骨折的愈合是一个非常复杂的病理过程,骨折局部的微环境,如氧饱和度、酸碱度、细胞因子等非常重要,直接影响血管的形成、骨细胞的增殖分化、矿物质的沉积^[4]。目前认为血清的骨钙素是反映成骨细胞功能的生化标志物^[6]。成骨细胞合成骨钙素后,大部分沉积于骨基质,小部分释放入血。

血液循环中的骨钙素与合成的骨钙素总量有高度的相关性,它反映骨代谢的瞬间变化^[7]。血清骨钙素不是骨基质释放出来的,而是成骨细胞新合成的。成骨细胞合成的骨钙素大约有 20% 释放入血,血清骨钙素和骨组织骨钙素呈正相关,因此血中的骨钙素测定可反映成骨细胞的功能状况^[8],而且骨钙素是合适的软骨内骨化标记物^[5]。型胶原是骨基质中最主要的纤维胶原成分,具有特异性,是反映成骨的重要指标。本实验结果显示,血清骨钙素、型胶原在骨折愈合过程中表达持续增高,在软骨痂向骨痂转化时间内其表达突然提高至很高水平,且二者表达具有一致性,表达高峰期出现在软骨痂向骨痂转化期。活血化瘀汤组血清骨钙素、型胶原的表达均较生理盐水组明显($P < 0.05$)。活血化瘀汤能调控其表达,可能通过影响大鼠骨折愈合过程中软骨内成骨,促进骨折愈合。至于其通过何种方式调控其表达,有待于进一步研究。

活血化瘀汤是林如高老先生的经验方,福建省人民医院采用此协定方广泛应用于治疗骨折疾患,取得了良好的临床效果。本实验结果显示,活血化瘀汤从数量和时间上影响了血清骨钙素、型胶原的表达,这也可能是其影响软骨内成骨促进骨折愈合的机制。

参考文献

- 张刚,叶俊材. 活血化瘀汤对大鼠骨折愈合早期血管内皮生长因子活性的影响. 中国临床康复, 2004, 8(23): 4798-4799.
- 张刚,周海兵,刘烈刚. 活血化瘀汤对大鼠骨折愈合过程中诱导型一氧化氮酶基因表达的影响. 中国临床康复, 2005, 9(22): 160-162.
- 张刚,周海兵,刘烈刚. 活血化瘀汤影响大鼠骨折愈合早期一氧化氮酶活性的作用机制探讨. 中国骨伤, 2005, 18(2): 93-96.
- 张刚,叶俊材,陈伯仪,等. 活血化瘀汤对大鼠骨折愈合早期缺氧诱导因子-1 及血管内皮生长因子影响的实验研究. 中国骨伤, 2005, 18(4): 216-218.
- Claes L, Wolf S, Augat P. Mechanical modification of callus healing. Chirur, 2000, 71(9): 989-994.
- 马维,张爱民,周学智,等. 骨钙蛋白在骨折初期愈合过程中的血清学分析. 河北医科大学学报, 2001, 22(2): 119.
- 黄建敏,刘晓梅,潘丽萍,等. 骨折患者血清骨钙素 RIA 的临床意义. 放射免疫学杂志, 2001, 14(5): 290.
- Szulk P, Chapuy MC, Meunier PJ, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. J Clin Invest, 1993, 91(4): 1769-1774.

(收稿日期: 2006 - 09 - 10 本文编辑: 李为农)