

· 基础研究 ·

骨碎补总黄酮对颅骨缺损修复大鼠血清碱性磷酸酶、钙、磷的影响

金合¹, 李晋玉², 俞兴², 徐林²

(1. 延庆县中医医院骨科, 北京 102100; 2. 北京中医药大学东直门医院骨科, 北京 100700)

【摘要】目的:探讨中药骨碎补总黄酮(assemble flavone of rhizome drynaria, AFDR)在修复大鼠颅骨缺损过程中对血清碱性磷酸酶、钙、磷及肌酐、谷丙转氨酶水平的影响。**方法:**60只6周龄雄性SD大鼠,饲养1周后Excel表随机分为两组(对照组和AFDR组),每组30只。用电动磨钻在大鼠左右颅骨钻孔建立颅骨缺损模型,右侧缺损可注射骨修复材料(injectable bone regeneration vomposite, IBRC)。术后第1天AFDR组中药灌胃,对照组去离子水灌胃。分别于术后2、4、8周采血,检测血清中碱性磷酸酶、磷、钙、肌酐、谷丙转氨酶指标,并进行统计学处理。**结果:**2周时碱性磷酸酶AFDR组高于对照组,4周时血清钙、磷及钙磷乘积AFDR组高于对照组。血清谷丙转氨酶各时间点两组差异无统计学意义。8周时血清肌酐AFDR组低于对照组。**结论:**骨碎补总黄酮在大鼠颅骨缺损修复过程中,于2~4周可影响碱性磷酸酶及血清钙磷水平,对肝肾无毒性。

【关键词】 颅骨; 头部损伤, 穿透性; 骨碎补; 碱性磷酸酶; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2012.09.013

Influence of assemble flavone of rhizome drynaria on the value of the blood serum alkalinity phosphatase, calcium, phosphorus in rats model with skull defects repair JIN He, LI Jin-yu, YU Xing*, XU Lin. *Department of Orthopaedics, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

ABSTRACT Objective: To evaluate influence of assemble flavone of rhizome drynaria (AFDR) on the value of the blood serum alkalinity phosphatase (ALP), calcium (Ca), phosphorus (P), creatinine (Cr) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) in rats model with skull defects. **Methods:** Sixty SD male rats with age of 6-month were feeded for a week and then were randomly divided into control group and AFDR group, with 30 rats in each group. Left and right skull of rats were perforated with electromotive drill and the model of skull defects was made. Injectable bone regeneration vomposite (IBRC) was implanted right skull defects. The rats of control group and AFDR group were respectively lavaged with AFDR and deionized water at the first day after operation. The rats were respectively killed at the 2nd, 4th and 8th week and the blood serum ALP, Ca, P, Cr, GPT were detected and analyzed by statistics. **Results:** At the 2nd week after operation, blood serum ALP in AFDR group was higher than that of control group. At the 4th week after operation, blood serum Ca, P, and calcium-phosphorus product in AFDR group was higher than that of control group; there was no significant difference in GPT between two groups. At the 8th week after operation, blood serum Cr in AFDR group was lower than that of control group. **Conclusion:** When AFDR is used in the repairing of bone defect for 2~4 weeks, it may affect the level of ALP, Ca, P, and without toxicity to liver and kidney.

KEYWORDS Skull; Head injuries, penetrating; Drynaria fortunei; Alkaline phosphatase; Rats

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(9): 757-760 www.zggszz.com

较大骨缺损的修复,常用方法是采用自体骨移植。自体骨移植虽为目前骨缺损修复的金标准,但存在取骨区多种并发症、骨量有限等问题。随着骨组织工程的发展,采用具有骨传导作用的骨支架材料,同时配合有促进成骨作用的手段,也是目前探索治疗骨缺损的一种方法。中药在抗骨质疏松、促进骨折愈

合或骨缺损修复方面有积极作用,是常用的骨缺损修复的辅助手段之一。骨碎补总黄酮(assemble flavone of rhizome drynaria, AFDR)是骨碎补的提取物,具有促进骨愈合和抗骨质疏松作用^[1]。本研究观察在大鼠颅骨缺损采用可注射骨材料修复后,AFDR对血清中碱性磷酸酶(ALP)和钙(Ca)、磷(P)的影响,探索AFDR在骨缺损修复过程中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 60只雄性6周龄SD大鼠,SPF级[北京维通利华实验动物技术有限公司提供;合格证号:SCXK(京)2002-0003]。饲养1周后用于实验。

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划基金项目(编号:NCET-10-0249)

Fund programs: Supported by Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-10-0249)

通讯作者:俞兴 E-mail: yuxing34@sina.com

表 2 不同时期两组大鼠血清 Ca、P 及钙磷乘积的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of level Ca, P and calcium-phosphorus product in different times between two groups($\bar{x}\pm s$)

组别	术后 2 周				术后 4 周				术后 8 周			
	鼠数 (只)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	Ca×P	鼠数 (只)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	Ca×P	鼠数 (只)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	Ca×P
AFDR 组	8	2.30±0.17	2.50±1.23	71.60±34.87	10	2.40±0.14	2.49±0.74	74.26±22.61	9	2.57±0.36	2.32±0.62	8.56±1.66
对照组	9	2.30±0.09	2.09±0.76	59.19±20.74	9	2.25±0.13	1.82±0.47	51.01±15.55	8	2.41±0.37	2.31±0.62	7.99±0.54
F 值	-	0.00	0.68	0.82	-	5.73	5.28	5.52	-	0.90	0.00	0.63
P 值	-	>0.05	>0.05	>0.05	-	<0.05	<0.05	<0.05	-	>0.05	>0.05	>0.05

注: 在 AFDR 组不同时间点: Ca 比较, $F=2.70, P>0.05$; P 比较, $F=0.82, P>0.05$; 钙磷乘积比较, $F=0.36, P>0.05$ 。在对照组不同时间点: Ca 比较, $F=1.16, P>0.05$; P 比较, $F=1.14, P>0.05$; 钙磷乘积比较, $F=1.17, P>0.05$

Note: Comparison of blood serum Ca, P and calcium-phosphorus product in AFDR group in different times, $F=2.70, P>0.05$; $F=0.82, P>0.05$; $F=0.36, P>0.05$; respectively. Comparison of blood serum Ca, P and calcium-phosphorus product in control group in different times, $F=1.16, P>0.05$; $F=1.14, P>0.05$; $F=1.17, P>0.05$; respectively

表 3 不同时期两组血清 Cr、ALT 及 ALP 比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of Cr, ALT, ALP in different times between two groups($\bar{x}\pm s$)

组别	术后 2 周				术后 4 周				术后 8 周			
	鼠数 (只)	Cr ($\mu\text{mol/L}$)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	鼠数 (只)	Cr ($\mu\text{mol/L}$)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	鼠数 (只)	Cr ($\mu\text{mol/L}$)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)
AFDR 组	8	27.11± 8.85	36.29± 4.29	271.13± 70.58	10	34.87± 7.84	36.72± 6.40	207.86± 60.25	9	34.77± 6.52	39.23± 6.56	178.80± 60.10
对照组	9	21.94± 11.35	33.61± 3.99	209.06± 34.90	9	33.02± 4.41	37.26± 9.60	206.11± 53.78	8	45.11± 11.50	44.34± 10.79	185.78± 54.66
F 值	-	1.07	1.77	5.49	-	0.39	0.02	0.00	-	5.37	1.43	0.06
P 值	-	>0.05	>0.05	<0.05	-	>0.05	>0.05	>0.05	-	<0.05	>0.05	>0.05

注: 在 AFDR 组不同时间点: Cr 比较, $F=3.96, P<0.05$; ALT 比较, $F=2.34, P>0.05$; ALP 比较, $F=4.57, P<0.05$ 。在对照组不同时间点: Cr 比较, $F=9.60, P<0.01$; ALT 比较, $F=5.20, P<0.05$; ALP 比较, $F=0.26, P>0.05$

Note: Comparison of blood serum Cr, ALT, ALP in AFDR group in different times, $F=3.96, P<0.05$; $F=2.34, P>0.05$; $F=4.57, P<0.05$; respectively. Comparison of blood serum Cr, ALT, ALP in control group in different times, $F=9.60, P<0.01$; $F=5.20, P<0.05$; $F=0.26, P>0.05$; respectively

白), 是反映骨形成和骨吸收的一个重要的生化指标, 而血清骨型 ALP 活性的定量有重要意义。成骨细胞分泌的骨型 ALP 增多, 可造成血清 ALP 升高。文献报道^[5]血清 ALP 与骨形成参数间为正相关关系, 可作为监测和初步判断成骨细胞活性的简易指标之一。ALP 对 Ca、P 代谢亦有重要影响, 因此其浓度在一定程度上反映骨重建和成骨细胞活性的情况。

骨基质无机物主要成分是羟磷灰石, 其中 Ca、P 所占比例最高, 骨骼与血液的 Ca、P 处于动态平衡, 新骨的形成需要 Ca、P 水平的提高^[6]。此外, 血中 Ca、P 含量可直接影响骨的钙化与溶解, Ca、P 相互作用, 钙磷乘积固定在一定水平, 其升高有利于钙盐的沉积^[7]。血 Ca、P 浓度的变化可反馈性调节相应激素的分泌, 进而影响骨的形成和溶解^[8]。血清 ALP、Ca、P 水平升高有利于骨折修复过程基质的钙化。

本实验结果表明 AFDR 对鼠颅骨缺损修复过程中 ALP 有干预作用, 2 周时达到高峰; AFDR 对鼠颅骨缺损修复过程中血清 Ca、P 浓度及钙磷乘积有调节作用, 4 周时作用明显。

3.2 AFDR 灌胃对大鼠血清 Cr、ALT 的水平的影响

Cr 是一种低分子量含氮化合物, 为肌肉组织代谢产生, 是肌酸代谢的最终产物, 在肌肉中通过磷酸肌酸自发的不可逆脱磷酸基作用, 闭合成环而形成^[9]。血清 Cr 水平相对恒定, 具有水溶性, 其浓度受 Cr 产生率、分布容积、肾外代谢和肾损伤程度等因素影响, 并且只由肾小球排泄, 不被肾小管重吸收, 因此主要反映肾小球滤过功能, 也是反映肾功能的重要指标之一^[10]。由于 Cr 来源于肌肉组织, 其浓度与肌肉量成正比, 肌肉萎缩性疾病时血清 Cr 浓度可降低。本实验观察对照组血清 Cr, 2、4、8 周间两两比较均有差异, 表明血清 Cr 可能随大鼠增龄水平递次增高。同时, AFDR 组血清 Cr 水平, 4、8 周与 2 周比较同样升高, 也支持大鼠增龄可能影响 Cr 水平; 对照组与 AFDR 组 Cr 水平随时间均升高, 说明 Cr 的升高与中药无关; AFDR 灌药 8 周, 血 Cr 浓度与对照组相比明显减低, 而大鼠体重无变化, 可以排除肌肉萎缩等因素。蒋文功等^[11]报道 AFDR 有保护肾脏的功能。本实验由于样本量少、观察时间短, 尚不能得出长时间服用该药具有改善肾小球滤过功能的结论, 但实验结果说明未发现 AFDR 有肾毒性。

ALT 是肝细胞受损最灵敏指标之一, 可用以评价药物的毒副作用, ALT 是存在于动物线粒体中的氨基酸转氨酶, 其在机体蛋白质代谢中发挥重要作用。如果肝细胞坏死, 细胞膜通透性增加, ALT 大量渗入血液, 使血中酶活性增高, 从而在一定程度上反映出肝细胞损害的程度。本实验表明大鼠增龄可能使 ALT 水平升高, 但 AFDR 组 ALT 水平各时间点差异无统计学意义, 未观察到大鼠增龄影响; AFDR 灌药 2、4、8 周大鼠的血清 ALT 水平, 与对照组比较差异无统计学意义, 说明 AFDR 无肝脏毒性。

增加样本量和检测的项目指标 (如肝肾功指标和无机盐的其他有关骨代谢的指标) 及对 AFDR 进行量效关系的观察研究, 将更能说明 AFDR 对肝肾功的影响。

总之, 通过本实验观察 AFDR 无肝肾毒性, 临床使用安全。在一定时间段能够调节大鼠血清 ALP 和血清 Ca、P 的水平, 促进骨缺损的修复。

参考文献

- [1] 张镡, 贾志杰, 田永利, 等. 骨碎补总黄酮与柚皮苷干预股骨干骨缺损模型大鼠骨愈合的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(37): 6947-6948.
Zhang D, Jia ZJ, Tian YL, et al. Effects of *drynaria fortunei* total flavonoid versus naringin on bone healing in rat femoral shaft bone defect models[J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2010, 14(37): 6947-6948. Chinese.
- [2] 赵晋宁, 谢雁鸣, 张文军, 等. 骨碎补总黄酮急性毒性实验[J]. 医药导报, 2005, 24(1): 12-15.
Zhao JN, Xie YM, Zhang WJ, et al. Acute toxicity test of total flavonoids from *Rhizome of Drynariae*[J]. *Yi Yao Dao Bao*, 2005, 24(1): 12-15. Chinese.
- [3] 王华松, 黄琼霞, 许申明. 骨碎补对骨折愈合中血生化指标及 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中医正骨, 2001, 13(5): 6-8.
Wang HS, Huang QX, Xu SM. The influence of *gusuibu* on serum biochemical indexes and expression of TGF- β 1 during fracture healing[J]. *Zhong Yi Zheng Gu*, 2001, 13(5): 6-8. Chinese.
- [4] 李红专, 张晓刚, 吴佳奇. 生骨再造散对家兔骨折愈合影响的实验研究[J]. 中国骨伤, 2005, 18(5): 272-274.
Li HZ, Zhang XG, Wu JQ. An experimental study of the effects of *Shenggu Zaizao powder* (on fracture-healing of rabbits)[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2005, 18(5): 272-274. Chinese with abstract in English.
- [5] Simank HG, Manggold J, Sebald W, et al. Bone morphogenetic protein-2 and growth and differentiation factor-5 enhance the healing of necrotic bone in a sheep model[J]. *Growth Factors*, 2001, 19(4): 247-257.
- [6] 卢敏, 戴致波, 谢进. 小针刀治疗对骨折愈合血管内皮细胞生长因子表达及血清无机盐和碱性磷酸酶影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤杂志, 2007, 15(6): 9-12.
Lu M, Dai ZB, Xie J. An experimental study of effect of small needle knife therapy on fracture healing about VEGF expression and the serum Ca, P, ALP influence[J]. *Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi*, 2007, 15(6): 9-12. Chinese.
- [7] 董华, 胡乃武, 董清平. 骨痛仙胶囊对家兔骨折血清碱性磷酸酶、钙、磷影响的实验研究[J]. 中医药学报, 2003, 31(2): 51-52.
Dong H, Hu NW, Dong QP. The influence of *Gutongxiao* capsule on the value of the blood serum alkalinity phosphatase, the calcium, the phosphorus in rabbit model with fracture[J]. *Zhong Yi Yao Dao Bao*, 2003, 31(2): 51-52. Chinese.
- [8] 王红梅, 阎鹏, 王平, 等. 藏族女性青少年血清钙磷及骨代谢生化标志物水平检测结果分析[J]. 中国学校卫生, 2008, 29(10): 884-886.
Wang HM, Yan P, Wang P, et al. The levels of serum total calcium, phosphate and biochemical markers of bone turnover in Tibetan female adolescents[J]. *Zhongguo Xue Xiao Wei Sheng*, 2008, 29(10): 884-886. Chinese.
- [9] Ward SM, Sanders KM, Himt GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2004, 16(Suppl 1): 112-117.
- [10] 罗敏琪, 吴帆, 黄建林, 等. 中国南方地区正常人群血清肌酐水平的变化其临床意义[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(9): 1843-1847.
Luo MQ, Wu F, Huang JL, et al. The difference of serum creatinine level between age and gender in southern Chinese and its clinical significance[J]. *Zhongguo Bing Li Sheng Li Za Zhi*, 2009, 25(9): 1843-1847. Chinese.
- [11] 蒋文功, 李幼姬. 骨碎补类黄酮对系膜增殖性肾小球肾炎大鼠模型的抑制作用[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2006, 7(8): 382-386.
Jiang WG, Li YJ. Suppressive effects of flavonoid of *drynaria fortunei* on mesangioproliferative glomerulonephritis in rats[J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Shen Bing Za Zhi*, 2006, 7(8): 382-386. Chinese.

(收稿日期: 2011-11-19 本文编辑: 连智华)