

· 基础研究 ·

淫羊藿总黄酮对去势大鼠骨折原始骨痂发生的影响及其机制

史晓林¹, 梁博程^{1,2}, 吴鹏², 王博², 施振宇², 孔令成², 姚建亮², 黄俊俊¹, 李春雯³

(1. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310017; 2. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053; 3. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053)

【摘要】 目的:探讨淫羊藿总黄酮对去势大鼠骨质疏松性骨折愈合中骨痂形成的影响。方法:选取 40 只 6~8 周龄, 体重 209~246 g 的雌性 SD 大鼠, 采用钢锯截断加克氏针髓内固定法, 建立去势大鼠股骨中段骨质疏松性骨折模型。按随机数字表法随机分为淫羊藿总黄酮组和对照组, 每组 20 只。淫羊藿总黄酮组给予淫羊藿总黄酮 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 对照组给予等量生理盐水口服。在干预 6 周后, 使用双能 X 线骨密度仪检测股骨 BMD, 使用 Micro-CT 系统测量骨痂的骨体积、骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量及骨小梁分离度等参数。采用 HE 染色技术观察两组骨痂愈合进程中的骨痂组织形态学差异, 采用免疫组织化学染色技术检测骨痂处酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1(casein kinase 2-interacting protein 1, CKIP-1)的表达量。采用 RT-PCR 技术检测两组骨痂样本中骨特异性转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)表达量, 采用 3 点弯曲力学方法测量骨痂处最大载荷值。结果:干预 6 周后, 淫羊藿总黄酮组骨密度为 (129.4±3.1) mg/cm², 与对照组的 (117.3±3.3) mg/cm² 比较差异有统计学意义 ($t=-4.628 8, P<0.001$); Micro-CT 扫描结果显示, 淫羊藿总黄酮组和对照组在骨痂骨小梁数量、骨痂体积、骨痂体积/总体积、骨小梁分离度和骨小梁厚度方面比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。200 倍和 400 倍光镜下骨痂 HE 染色切片, 见骨小梁微结构参数与骨痂 Micro-CT 扫描结果趋势一致, 同时发现淫羊藿总黄酮组软骨细胞骨化水平明显高于对照组。骨痂中 Runx2 因子 RT-PCR 检测结果显示, 两组的 Runx2 mRNA 相对表达量差异有统计学意义 ($P<0.001$)。400 倍镜下观察骨痂中 CKIP-1 蛋白免疫组化检测结果显示, 淫羊藿总黄酮组和对照组 CKIP-1 蛋白阳性表达数分别为 9.30±1.16, 40.50±1.08, 差异有统计学意义 ($t=-62.26, P<0.001$)。骨痂生物力学结果显示, 淫羊藿总黄酮组和对照组最大载荷分别为 (98.37±9.64)、(68.45±6.07) N, 差异有统计学意义 ($t=6.433 4, P<0.001$)。结论:淫羊藿总黄酮可以促进去势大鼠骨质疏松性骨折愈合过程中成骨细胞骨形成能力和软骨骨化能力, 促进原始骨痂的形成, 增强骨折愈合强度, 而其促进骨愈合和增强骨折愈合强度可能是通过调节 CKIP-1 蛋白来实现的。

【关键词】 淫羊藿总黄酮; 原始骨痂; 骨形成; 软骨内成骨; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2017.08.013

Effect and mechanism of total flavone of epimedium on primary callus formation in ovariectomized rats with fractures SHI Xiao-lin, LIANG Bo-cheng, WU Peng, WANG Bo, SHI Zhen-yu, KONG Ling-cheng, YAO Jian-liang, HUANG Jun-jun, and LI Chun-wen*. * College of Basic Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the effects and related mechanisms of total flavone of epimedium treatment (TFE) on primary callus formation in ovariectomized rats. **Methods:** Forty male SD rats weighted from 209 to 246 g and aged 6 to 8 weeks were selected. Six weeks after ovariectomy a femur fracture model with middiaphyseal segment fracture was established, estimated and randomly divided into TFE group (150 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and control group (received saline). HE staining was used to evaluate the morphologic difference of primary callus during the bone callus healing between these two groups. The relative expression of Runt-related transcription factor 2 (Runx2) mRNA in the callus was identified by real-time polymerase chain reaction. Immunohistochemical technique was used to observe the Casein kinase 2-interacting protein 1 (CKIP-1) protein level in the callus of the two groups. Maximum fracture load was tested by three point bend test. **Results:** The BMD, primary callus volume, trabecular number (Tb.N) and trabecular thickness (Tb.Th) were higher in TFE group than that in control group ($P<$

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81373878); 高校博士点基金联合项目(博导类)(编号:20133322110005); 浙江省自然科学基金一般项目(编号:LY14H270003)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No.81373878)

通讯作者: 李春雯 E-mail: xlshi-2002@163.com

Corresponding author: LI Chun-wen E-mail: xlshi-2002@163.com

0.001). The Tb.N and Tb.Th of primary callus were higher in TFE group than control group ($P=0.001$). The volume and bone volume/tissue volume of primary callus were in TFE group than control group ($P<0.01$). The trabecular separation (Tb.Sp) of primary callus were in control group higher than TFE group($P<0.01$). The HE staining of the 6 week slices showed that the degree of cartilage ossification in callus of the TFE group was significantly higher than that in control group under high magnification. Real-time PCR revealed that the comparative expression of Runx2 mRNA in control group was higher than that in TFE group ($P<0.001$); the positive number of CKIP-1 was less in TFE group than that in control group ($P<0.001$). TFE could increase the maximum load of the primary callus ($P<0.001$). **Conclusion:** TFE can promote the cartilage ossification of callus in ovariectomized rats, enhancing the bone strength and bone quality in the process of fracture healing via the CKIP-1/Runx2 pathway.

KEYWORDS Total flavone of epimedii; Primary callus; Bone formation; Endochondral ossification; Rats
Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2017, 30(8): 734-750 www.zggszz.com

目前,我国老年人口比率快速升上,骨质疏松症及其并发症给中国人,特别是老年人的健康带来了严重的威胁,并导致巨大的医疗经济负担和非常严重的家庭和社会负担^[1-5]。目前,二膦酸盐类药物仍为临床上抗骨质疏松的主要药物,然因需要长期应用可能导致患者依从性降低,且长期使用可诱发下颌骨坏死,易导致非典型性骨折,长期使用也受到一定限制^[6]。淫羊藿总黄酮是从中药淫羊藿提取出来的一种黄酮类化合物,大量临床及实验研究证明,淫羊藿总黄酮既可初进骨形成,又可抑制骨吸收,且未发现明显不良反应^[7-11]。本研究采用去势大鼠股骨中段骨质疏松性骨折模型,探讨淫羊藿总黄酮对去势大鼠骨折愈合中原始骨痂的影响,拟初步明确淫羊藿总黄酮在促进骨质疏松性骨折愈合中的机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

淫羊藿总黄酮胶囊(规格:0.35 g×24 粒,康缘阳光药业有限公司,国药准字:Z20140012,批号:151101)。兔抗大鼠酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1(casein kinase-2-interacting protein 1,CKIP-1,Biorbyt 公司,英国,货号:orb10417)。大鼠骨特异性转录因子 2(Runt-related transcription factor 2,Runx2)和 GAPDH 引物(上海吉凯基因化学技术有限公司设计并合成),HE 染色试剂盒(南京建成公司),免疫组化试剂盒(北京中杉生物科技有限公司)。

1.2 实验设备与仪器

SKYSCAN 1176 型 Micro-CT(Bruker 公司,比利时),Electro Force 3200 力学试验仪(Bose 公司,美国);OSTEOCORE2 型双能 X 线骨密度扫描仪(MEDLINK 公司,法国)。

1.3 实验动物及分组

清洁级健康雌性 SD 大鼠 40 只(浙江省医学科学院动物实验中心,实验动物合格证号:[SCXK(浙)2014-0001]),6~8 周龄,体重 209~246 g,按随机数字表法,随机分为淫羊藿总黄酮组及对照组,每组

20 只。本研究中动物饲养、造模、药物干预均在浙江省医学科学院动物实验中心完成。本研究经浙江省新华医院伦理委员会审批通过。

1.4 造模方法

经水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉,常规消毒后,切除双侧卵巢。术后 4 周,参照文献[12]开放截骨模型的方法,经水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉,取右下肢股外侧切口暴露股骨干,于股骨中段用钢锯将股骨横行锯断,以克氏针(直径 1 mm)固定骨折端,确认固定可靠后,逐层缝合切口,来建立大鼠右侧股骨中段骨质疏松性骨折模型。

1.5 干预措施

淫羊藿总黄酮组予淫羊藿总黄酮 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌服,对照组给予等量生理盐水口服。实验大鼠均采用 16 号灌胃针灌胃给药,居住环境无差别,自由饮食。药物剂量计算方法均采用黄继汉等^[13]制定的动物剂量换算公式: $D_b=D_a \cdot R_{ab}$,已知 60 kg(标准体重)成人用药剂量 $D_a=23.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,成人标准体重到大鼠的 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 药物剂量换算系数 $R_{ab}=6.17$,因此得到标准体重大鼠用药剂量 $D_a=23.3 \times 6.17=144 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,最终研究给药量选取 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹。治疗 6 周后处死动物,取材及标本处理。

1.6 切片标本取材及处理方法

淫羊藿总黄酮组和对照组各取 3 只大鼠,注射水合氯醛麻醉,分离大鼠右股骨,剔除肌肉组织后将骨标本浸入体积分数 4%的多聚甲醛中固定 24 h(室温),然后转移标本到体积分数 10% EDTA 溶液中进行脱钙处理,4 周后脱水、包埋、切片,用于组织学观察和免疫组织化学染色。

1.7 观察项目与方法

1.7.1 双能 X 线扫描仪测定 BMD 淫羊藿总黄酮组和对照组各取 6 只大鼠处死,拔出克氏针,将标本放置于骨密度仪检查床上,使用双能 X 线扫描仪对股骨骨密度进行测定,采用扫描仪自带的小动物 BMD 分析软件进行分析,扫面信息区为骨折处骨痂

兴趣区,骨折线位于中央,扫描完成后进行骨痂感兴趣区 BMD 分析。然后进行 Micro-CT 扫描。

1.7.2 Micro-CT 扫描 Micro-CT 扫描参数:电压 65 kV,扫描电压 65 kV,电流 385 μ A,扫描分辨率 17.46 μ m,软件版本 1.1(build 6),图像旋转 0.750 0,几何校正为开启,曝光时间 270 ms,帧平均数 2,像素组合 2 \times 2,扫描旋转 180 $^\circ$,每旋转 0.5 $^\circ$ 拍摄 2 张图像。扫描范围:骨折线上下各 200 层。三维图像重建参数:重建软件 NRecon(版本 1.6.9.8),重建模式为标准。

采用 NRecon 软件对断层图像进行三维重建后,经 CT-Analyser 软件(Version 1.13)对骨痂的骨体积(bone volume, BV),骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV),骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th),骨小梁数量(trabecular number, Tb.N)及骨小梁分离度(trabecular separation, Tb.Sp)等进行分析。

1.7.3 HE 染色观察骨痂微结构 切片常规进行脱蜡后,使用苏木精-伊红染液进行染色,光镜下随机选取两组骨折线处骨痂组织高倍视野($\times 200$ 和 $\times 400$)拍照,并观察骨折骨痂切面单位视野内的骨小梁、软骨细胞、骨基质等,进行组织形态学比较。

1.7.4 免疫组织化学染色测定 CKIP-1 相对表达量 石蜡切片 50~60 $^\circ$ C 烤箱中融化 60 min 后,浸入二甲苯中 20 min,梯度乙醇水化,采用体积分数 3%的 H_2O_2 消除非特异性反应后,应用体积分数 5%的 BSA 进行封闭,按照抗体说明书对 CKIP-1 进行 1:200 稀释,滴加稀释的兔抗大鼠 CKIP-1 抗体 4 $^\circ$ C 过夜后 37 $^\circ$ C 复温 1 h,稀释的二抗 37 $^\circ$ C 孵育 30 min 后滴加 SABC,镜下 DAB 显色后蒸馏水洗涤,苏木素复染细胞核,棕黄色颗粒为阳性表达。使用 K-VIEWER 软件随机选取 10 个视野($\times 20$),对阳性细胞数进行统计。

1.7.5 RT-PCR 技术检测 Runx2 相对表达量 淫羊藿总黄酮组和对照组各取 3 只大鼠,处死后取材。骨痂组织经液氮研磨后,进行匀浆,按照 PCR 提取试剂盒说明书进行 RNA 提取,测 RNA 的浓度和纯度,按照试剂盒说明书进行逆转录反应以及荧光定量测定 Runx2 的相对表达量。Runx2 上游引物:5'-CCCAACTTCCTGTGCTCC-3',反向引物:下游引物:5'-AGTGAACTCTTGCCTCGTC-3',GAPDH: 上游引物:5'-CGTATCGGACGCCTGGTT-3',下游引物:5'-CGTGGGTAGAGTCATACTGGAAC-3',逆转录反应体系、PCR 扩增体系及反应条件按照试剂盒说明书设定。反应完成后进行扩增曲线和熔解曲线分析。

1.7.6 生物力学测试骨折骨痂载荷 淫羊藿总黄

酮组和对照组各取 6 只大鼠,处死后取材。力学测试前将标本置于室温条件下 30 min,取出两组待测试标本,固定标本两端,防止测试时发生旋转移位。将股骨骨折标本放置于 Electro-Force 3200 生物力学试验仪上进行 3 点弯曲试验。以股骨中点为加载点,承载点跨距为 30 mm,并以 2 mm/min 的加载速度进行加载,记录各组最大载荷。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件包进行统计分析,所得定量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,骨密度、骨痂骨小梁数量、骨痂体积、阳性细胞数等两独立样本比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨痂观察检测感兴趣区域示意图

双能 X 线骨密度和 Micro-CT 扫描骨痂微结构检测的感兴趣区域为以骨折线为中心的梭形骨痂部分(图 1a, 1b, 1c, 1d)。淫羊藿总黄酮组中梭形骨痂较大,骨折线周围骨痂中矿化骨含量较多(图 1a, 1b),对照组中梭形骨痂较小,骨折线周围骨痂中矿化骨含量较少(图 1c, 1d)。

2.2 骨密度检测结果

淫羊藿总黄酮可以增加去势大鼠骨痂感兴趣区域骨密度,淫羊藿总黄酮治疗后 6 周大鼠骨密度为(129.4 ± 3.1) mg/cm^2 ,对照组(117.3 ± 3.3) mg/cm^2 ,差异有统计学意义($t=-4.6288, P<0.001$)。

2.3 Micro-CT 扫描结果

从 Micro-CT 扫描感兴趣区骨痂三维结构及切面图像可见,淫羊藿总黄酮组(图 2a, 2b, 3a, 3b, 3c)在骨折造模成功,治疗 6 周后,与对照组(图 2c, 2d, 3d, 3e, 3f)相比,表现为维持较多的骨小梁,骨痂处形成的板层骨更厚,维持的骨小梁更多,骨小梁更稠密,骨小梁更粗、间距更小。Micro-CT 扫描骨小梁详细参数结果显示(表 1),淫羊藿总黄酮组的骨痂骨小梁数量明显多于对照组,骨痂体积、骨痂体积/总体积大于对照组,骨小梁分离度小于对照组,骨小梁厚度大于对照组。

2.4 HE 染色结果形态观察

如图 4 所示,200 倍和 400 倍光镜下,观察 6 周骨痂中软骨细胞、骨小梁分布情况,淫羊藿总黄酮组骨小梁数量更粗,淫羊藿总黄酮组骨小梁间距明显小于对照组,淫羊藿总黄酮组软骨细胞骨化占比明显高于对照组,淫羊藿总黄酮组未骨化软骨细胞占比明显低于对照组。

2.5 CKIP-1 蛋白免疫组织化学结果

如图 5 所示,400 倍镜下观察显示,淫羊藿总黄

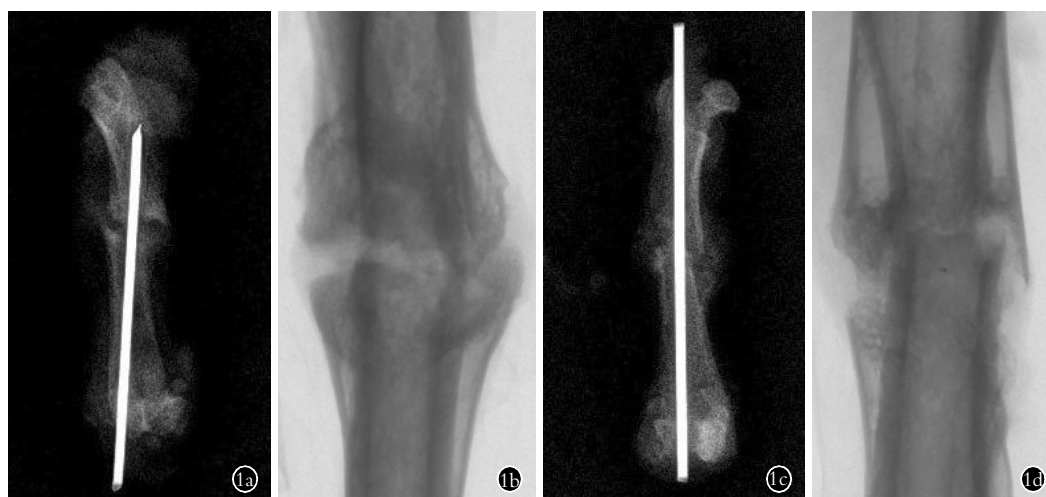


图 1 骨痂检测观察感兴趣区域示意图 1a. 淫羊藿总黄酮组药物干预后 X 线图像, 红色矩形框为骨痂检测观察的感兴趣区域 1b. 显示 1a 中骨痂检测观察感兴趣区放大后的图像, 从图中可见淫羊藿总黄酮治疗组骨折线周围骨痂体积较大, 骨痂密度较高 1c. 显示了对照组 X 线图像, 红色矩形框为骨痂检测观察的感兴趣区域 1d. 显示了 1c 中骨痂检测观察感兴趣区放大后的图像, 可见对照组骨折线周围骨痂体积较小, 骨痂密度较低

Fig.1 Image of the region of interest 1a. The X-ray images of TFE group were observed, and the red rectangle box was the region of interest 1b. It showed that the callus volume of TFE group was bigger, the callus density was higher 1c. The X-ray images of control group were observed, and the red rectangle box was the region of interest 1d. It showed that the callus volume of TFE group was smaller, the callus density was lower

表 1 两组骨折骨痂体积及骨小梁显微结构参数比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Parameters of bone microstructure of callus between two groups($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	骨体积(mm ³)	骨体积分数(%)	骨小梁厚度(mm)	骨痂骨小梁数量(mm ⁻¹)	骨小梁分离度(mm)
淫羊藿总黄酮组	6	36.70±2.87	48.71±3.04	0.230±0.005	0.210±0.052	3.720±0.209
对照组	6	26.29±2.79	42.23±3.28	0.190±0.009	0.110±0.016	4.900±0.134
t 值	-	-6.367	-3.549	-8.699	-4.492	11.661
P 值	-	<0.000	0.0053	<0.000	0.001	<0.001

酮可以明显抑制 CKIP-1 的表达, 其表现为阳性细胞数量明显少于对照组, 图 5a, 5b 中的棕褐色染色细胞为阳性表达细胞。随机选取 10 个视野阳性颗粒数统计分析结果显示, 淫羊藿总黄酮组阳性表达数为 9.30±1.16, 对照组阳性表达数为 40.50±1.08, 差异有统计学意义($t=-62.26, P<0.001$)。

2.6 Runx2 mRNA 表达水平

与对照组相比, 淫羊藿总黄酮组可以明显促进骨痂中 Runx2 mRNA 表达水平, 淫羊藿总黄酮组中 Runx2 mRNA 的相对表达量为 2.38±0.17, 对照组 Runx2 mRNA 的相对表达量为 0.21±0.16, 差异有统计学意义($t=-16.0999, P<0.001$)。

2.7 骨折骨痂处最大载荷

淫羊藿总黄酮组的骨痂力学强度大于对照组, 对照组最大载荷为(68.45±6.07) N, 淫羊藿总黄酮组最大载荷为(98.37±9.64) N, 差异有统计学意义($t=6.4334, P<0.001$)。淫羊藿总黄酮可以增强骨痂处的最大载荷。

3 讨论

骨质疏松是一种多因素诱发的骨强度降低、骨微结构破坏的综合性代谢性疾病, 骨质疏松性骨折是其常见且为最严重并发症^[14]。目前认为骨形成和骨吸收耦联失衡是其主要病理机制, 临床治疗骨质疏松及骨质疏松性骨折主要以抑制骨吸收的二磷酸盐为主^[15-16], 取得了一定的临床疗效。但是也产生了很多更加棘手的问题, 比如下颌骨坏死, 长期应用二磷酸盐导致的非典型性骨折等^[9]。因此, 研究具有促成骨能力的淫羊藿总黄酮对骨折骨痂的影响及其促进骨折愈合的机制有着十分重要的意义。

3.1 淫羊藿总黄酮对骨质疏松性骨折愈合中原始骨痂的影响

本研究发现淫羊藿总黄酮可以通过维持骨痂骨小梁生成增加去势大鼠骨折愈合强度, 且其机制可能是通过调控骨形成关键蛋白 Runx2 来实现^[17-18]。笔者使用 Micro-CT 扫描技术, 定量分析骨折处骨小梁生成情况。淫羊藿总黄酮组骨小梁数量、骨痂体积

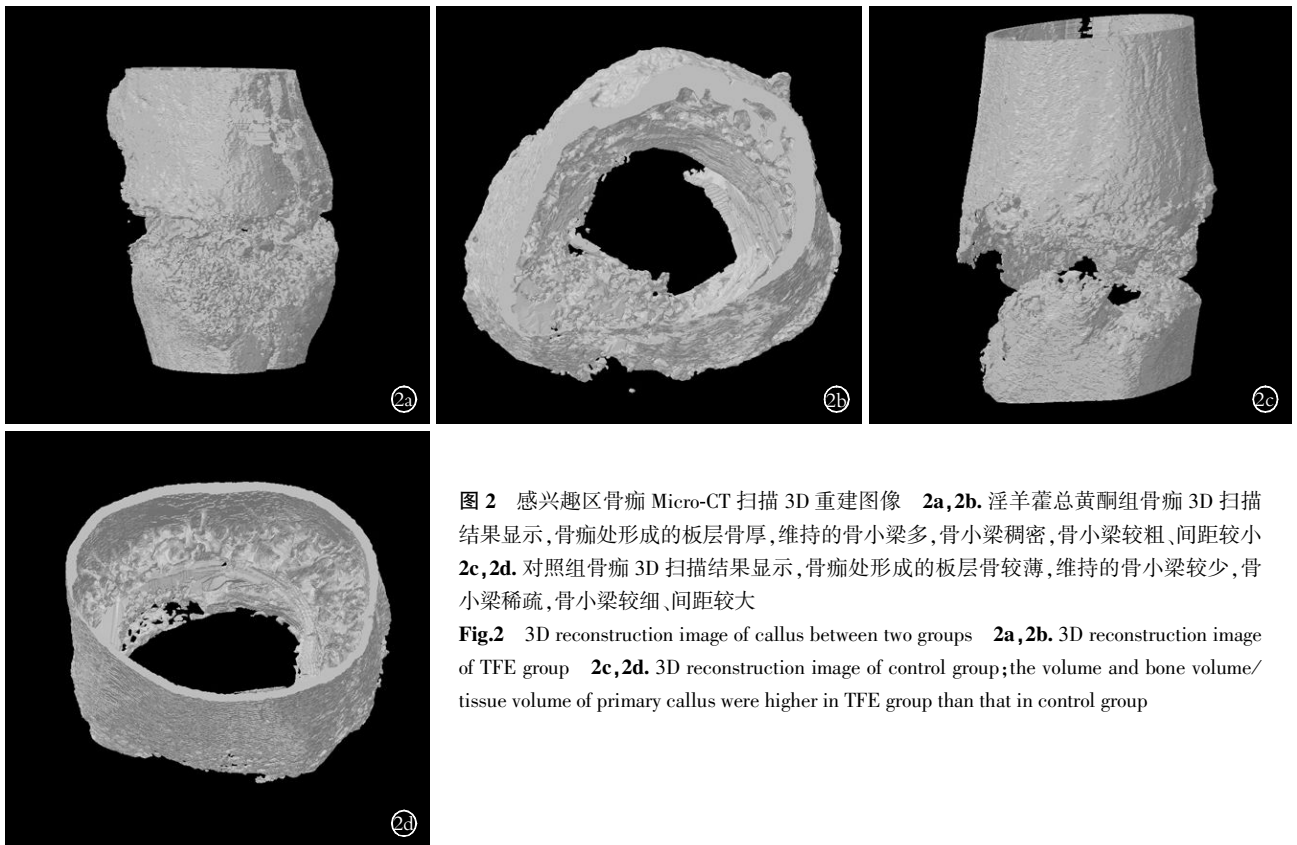


图 2 感兴趣区骨痂 Micro-CT 扫描 3D 重建图像 2a,2b. 淫羊藿总黄酮组骨痂 3D 扫描结果显示,骨痂处形成的板层骨厚,维持的骨小梁多,骨小梁稠密,骨小梁较粗、间距较小 2c,2d. 对照组骨痂 3D 扫描结果显示,骨痂处形成的板层骨较薄,维持的骨小梁较少,骨小梁稀疏,骨小梁较细、间距较大

Fig.2 3D reconstruction image of callus between two groups 2a,2b. 3D reconstruction image of TFE group 2c,2d. 3D reconstruction image of control group;the volume and bone volume/tissue volume of primary callus were higher in TFE group than that in control group

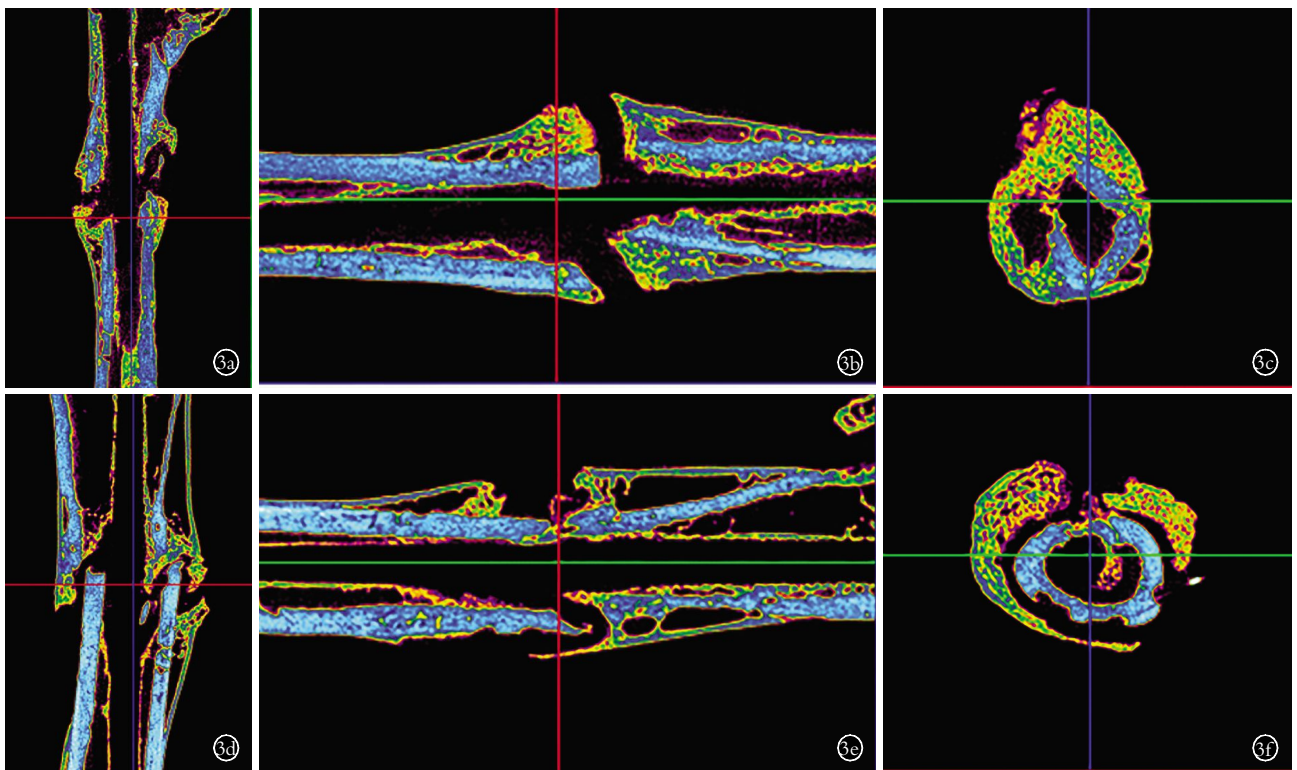


图 3 骨痂感兴趣区切面图 3a,3b,3c. 淫羊藿总黄酮组骨痂感兴趣区冠状位、矢状位、水平位切面图中骨痂中矿化骨含量多,骨小梁结构稠密,梭形骨痂形态丰满 3d,3e,3f. 对照组骨痂感兴趣区冠状位、矢状位、水平位切面图中骨痂中矿化骨含量较少,骨小梁结构稀疏,梭形骨痂较小

Fig.3 The section image of callus between two groups 3a,3b,3c. Section image of TFE group 3d,3e,3f. Section image of control group;trabecular number of primary callus were more in TFE group than that in control group

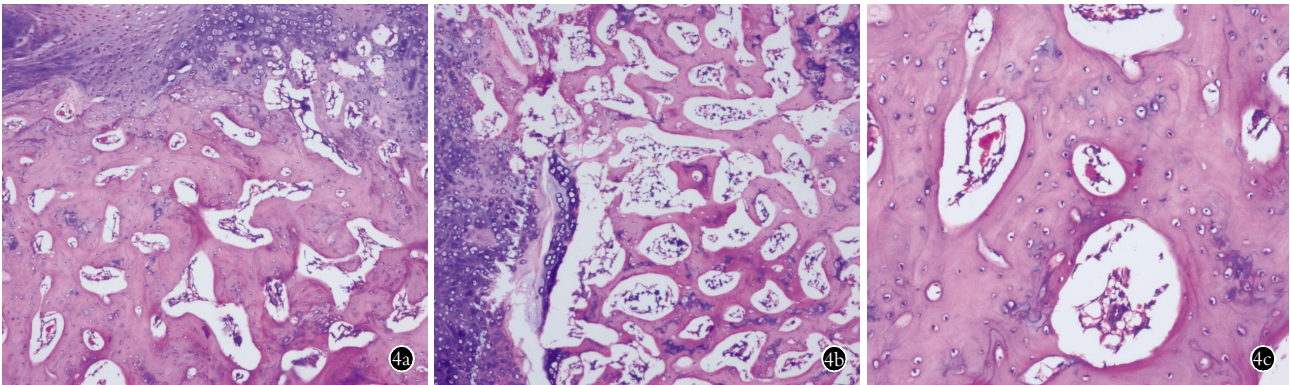


图 4 6 周骨痂 HE 染色结果 4a. 淫羊藿总黄酮组中见少量未钙化软骨细胞及排列紧密的骨小梁结构 (×200) 4b. 对照组中见大量未钙化的软骨细胞和排列稀疏的骨小梁结构 (×200) 4c. 淫羊藿总黄酮组见排列紧密的粗壮骨小梁结构 (×400) 4d. 对照组见排列稀疏的较细骨小梁结构及未钙化的软骨细胞 (×400)

Fig.4 HE staining results of callus in six weeks 4a. A small amount of non-calcified chondrocytes and tightly arranged trabecular structures were found in TFE group (×200) 4b. A large number of uncalcified chondrocytes and sparse trabecular structures were seen in the control group (×200) 4c. The tightly arranged thick bone trabecular structures were visualized (×400) 4d. It show thinner arranged trabecular bone and non-calcified cartilage trabecular cells (×400)

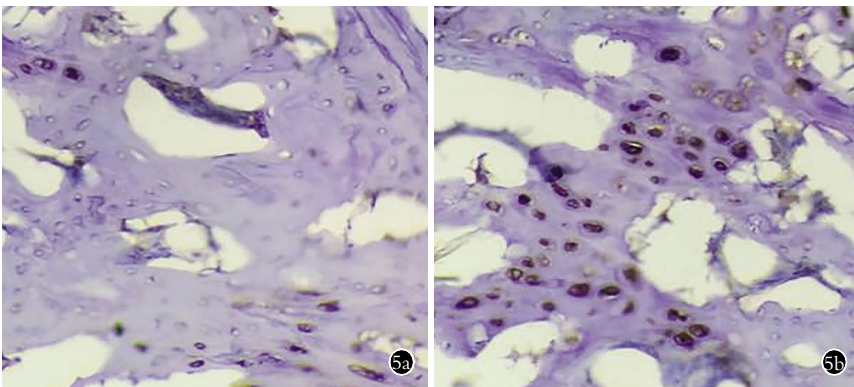
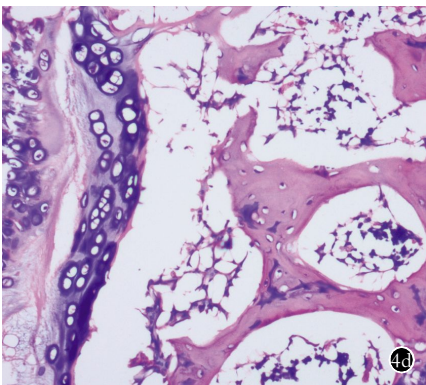


图 5 骨折线处骨痂组织 CKIP-1 免疫组织化学染色结果 (×400) 5a. 淫羊藿总黄酮组染色后仅出现少量 CKIP-1 阳性表达细胞 5b. 对照组染色后出现大量 CKIP-1 阳性表达细胞

Fig.5 The Immunohistochemical results of CKIP-1 in two group callus 6 weeks later after treatment 5a. A few of CKIP-1 positive cells in THE group 5b. A lot of CKIP-1 positive cells in control group

和骨痂体积分数均较对照组增高, 骨小梁较对照组更粗, 骨小梁间隙较对照组低, 这说明淫羊藿总黄酮组骨痂骨量和骨小梁密度较对照组增加。HE 染色结果显示淫羊藿总黄酮组骨痂处骨小梁明显粗于对照组, 骨小梁分离度明显小于对照组, 未发育成熟软骨细胞数量明显少于对照组, 软骨细胞骨化占比明显高于对照组, 未骨化软骨细胞占比明显低于对照组。发现软骨细胞骨化异常可能是骨质疏松性骨痂生成障碍的重要因素, 淫羊藿总黄酮可以改善软骨细胞骨化, 促进骨痂处骨小梁生成, 促进骨折愈合。

Runx2 检测结果显示, 淫羊藿总黄酮组可以明显促进 Runx2 在骨痂中的表达, 经 3 点弯曲力学加载后, 淫羊藿总黄酮组最大载荷明显高于对照组, 这与 Micro-CT 扫描结果和 HE 染色结果一致, 均提示淫羊藿总黄酮可以明显提升成骨细胞活性, 促进骨

质疏松大鼠骨折原始骨痂骨小梁结构的生成和发展, 提升骨小梁数量和骨小梁质量, 促进骨折愈合, 增强骨折愈合的强度。

3.2 淫羊藿总黄酮促进骨痂形成、骨折愈合的机制分析

以往骨质疏松及骨质疏松行骨折的研究主要集中在成骨细胞和破骨活性对骨折的影响, 而没有主要关注软骨细胞在骨折愈合中的作用^[19]。近些年来有研究表明软骨细胞骨化能力在骨质疏松和骨折中发挥重要作用^[20]。

李晶等^[21-22]发现淫羊藿总黄酮能增强去卵巢骨质疏松大鼠骨密度、最大载荷和抗弯刚度、抗外力冲击的能力, 可有效抑制卵巢切除大鼠的骨量丢失, 防止骨质疏松的发生。濮祖茂等^[23]发现淫羊藿总黄酮治疗后大鼠骨小梁拱桥形结构有明显改善, 骨小梁

拱形结构恢复其圆形或卵圆形,骨小梁分离度变小,骨小梁变粗,证明了淫羊藿总黄酮抗骨质疏松症的作用。

在骨折愈合的原始骨痂形成期,原始骨痂的形成主要为膜内化骨和软骨化骨。膜内化骨先形成内外骨痂,然后骨折断端及髓腔内的纤维组织亦逐渐转化为软骨组织,并随软骨细胞的增生、钙化而骨化,在骨折处形成环状骨痂和髓腔内骨痂,由此可见,软骨化骨在骨折愈合中的重要性。在淫羊藿总黄酮对于软骨细胞的相关研究中,冯坤等^[24]以鸡胚股骨组织为研究对象,发现淫羊藿提取物能够促进体外软骨器官生长和软骨细胞增殖,猜测其中可能存在具有调节软骨活性的化学因子,通过提高软骨细胞的代谢活性,促进软骨的基质合成、软骨细胞的增殖和软骨体积的增加,进而促进软骨组织的生长。近些年来软骨细胞对于骨折愈合的重要性逐渐受到人们的重视,增加骨折断端的软骨化骨能力可以明显促进骨折愈合^[25]。

CKIP-1 已被证实是骨形成的一个负性调控因子,CKIP-1 敲除小鼠的成骨细胞分化及矿化能力明显增强,证实 CKIP-1 敲除可以导致小鼠骨量升高及骨形成速率增强^[26]。本研究中发现淫羊藿总黄酮可以明显抑制 CKIP-1 在软骨细胞中的表达,淫羊藿总黄酮组表现更好的骨强度和骨质量,提示淫羊藿总黄酮促进骨质疏松骨折愈合的机制不仅是减少骨丢失,而且促进骨质疏松骨折局部软骨细胞的发育和骨化能力。

3.3 本研究的局限性

本实验仅观察并初步探讨了淫羊藿总黄酮对于骨折中期骨痂骨形成以及骨折愈合强度的影响,对于骨折早、晚期末进行进一步的观察;另外对于淫羊藿总黄酮通过促进软骨细胞骨化能力,促进骨质疏松骨折愈合的机制需要进一步阐明。因此,需要进一步深入探讨淫羊藿总黄酮的作用机制及其与骨折愈合过程中软骨细胞的关系。

参考文献

- [1] 张智海,刘忠厚,石少辉,等. 中国大陆地区以-2.5 SD 为诊断的骨质疏松症发病率文献回顾性研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(1): 1-7.
ZHANG ZH, LIU ZH, SHI SH, et al. A retrospective literature study of osteoporosis incidence based on -2.5 SD criteria in mainland China[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2015, 21(1): 1-7. Chinese.
- [2] Abimanyi-Ochom J, Watts J, Borgström F, et al. Changes in quality of life associated with fragility fractures: Australian arm of the International Cost and Utility Related to Osteoporotic Fractures Study (AusICUROS)[J]. Osteoporos Int, 2015, 26(6): 1781-1790.
- [3] Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden[J]. Arch Osteoporos, 2013, 8: 136.
- [4] 陈琛,李大伟,王琦,等. 微创保守在老年骨质疏松性脊柱骨折的成本效果评估[J]. 中国骨伤, 2016, 29(7): 614-618.
CHEN C, LI DW, WANG Q, et al. The cost-effectiveness analysis of minimally invasive surgery and conservative treatment in elderly osteoporotic spinal fracture[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2016, 29(7): 614-618. Chinese with abstract in English.
- [5] 刘康,孙龙泰,邓先辉,等. 改良股骨近端锁定钢板治疗骨质疏松性股骨转子间骨折的临床观察[J]. 中国骨伤, 2016, 28(8): 689-692.
LIU K, SUN LT, DENG XH, et al. Clinical observation of improved proximal femoral locking plate in treating osteoporotic intertrochanteric fractures[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2016, 29(8): 689-692. Chinese with abstract in English.
- [6] McClung M, Harris ST, Miller PD, et al. Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday[J]. Am J Med, 2013, 126(1): 13-20.
- [7] 陆乐,徐洋,蔡辉. 淫羊藿总黄酮研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 2: 167-170.
LU L, XU Y, CAI H. Recent advances in total flavonoids of epimedium[J]. Shan Dong Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao, 2013, 2: 167-170. Chinese.
- [8] 胡彦武,刘凯,闫梦彤,等. 淫羊藿总黄酮及淫羊藿苷的心血管保护作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(13): 227-230.
HU YW, LIU K, YAN MT, et al. Research advances of cardiovascular protection and their mechanisms of total flavonoids and icariin from epimedium folium[J]. Zhongguo Shi Yan Fang Ji Xue Za Zhi, 2015, 21(13): 227-230. Chinese.
- [9] Yuan D, Wang H, He H, et al. Protective effects of total flavonoids from epimedium on the male mouse reproductive system against cyclophosphamide-induced oxidative injury by up-regulating the expressions of SOD3 and GPX1[J]. Phytother Res, 2014, 28(1): 88-97.
- [10] 卢敏,王林华,罗毅文,等. 淫羊藿总黄酮胶囊治疗原发性骨质疏松症 360 例的多中心临床观察[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(3): 279-282.
LU M, WANG LH, LUO YW, et al. Treatment of primary osteoporosis with epimedium total flavone capsule: a multicenter clinical observation on 360 cases[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2013, 19(3): 279-282. Chinese.
- [11] 陈柏龄,谢登辉,王宗伟,等. 淫羊藿总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 OPG、OPGLmRNA 表达的影响[J]. 中国骨伤, 2009, 22(4): 271-273.
CHEN BL, XIE DH, WANG ZW, et al. Effect of total flavone of epimedium on expression of bone OPG, OPGL mRNA in ovariectomized rats[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2009, 22(4): 271-273. Chinese with abstract in English.
- [12] 余昶,董启榕,周晓中. 两种大鼠股骨骨折模型愈合的比较[J]. 苏州大学学报:医学版, 2008, 28(1): 4-6.
SHE C, DONG QR, ZHOU XZ. Comparative research on the fracture healing process in two kinds of fracture model of rat femur[J]. Su Zhou Da Xue Xue Bao; Yi Xue Ban, 2008, 28(1): 4-6. Chinese.
- [13] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体

间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.

HUANG JH, HUANG XH, CHEN ZY, et al. Equivalent dose conversion between animals and humans in pharmacological tests[J]. Zhongguo Lin Chuang Yao Li Xue Yu Zhi Liao Xue, 2004, 9(9): 1069-1072. Chinese.

[14] Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis[J]. Osteoporos Int, 2015, 26(7): 2045-2047.

[15] 曲新华, 郝永强. 双膦酸盐在骨科相关疾病治疗中的地位及再认识[J]. 中华骨科杂志, 2014, 34(1): 78-80.

QU XH, HAO YQ. The role of bisphosphonates in the treatment of orthopedic diseases[J]. Zhonghua Gu Ke Za Zhi, 2014, 34(1): 78-80. Chinese.

[16] 杨丽娟, 沈飞霞, 郑景晨, 等. 阿仑膦酸钠在甲状腺功能亢进症继发骨质疏松症中的临床应用[J]. 中国骨伤, 2012, 25(2): 133-137.

YANG LJ, SHEN FX, ZHENG JC, et al. Clinical application of alendronate for osteoporosis/osteopenia secondary to hyperthyroidism[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(2): 133-137. Chinese with abstract in English.

[17] Canalis E. Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches[J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 9(10): 575-583.

[18] Haxaire C, Hay E, Geoffroy V. Runx2 controls bone resorption through the down-regulation of the Wnt pathway in osteoblasts[J]. Am J Pathol, 2016, 186(6): 1598-1609.

[19] 黄明炜, 廖勇敢. 淫羊藿总黄酮调节骨代谢作用及药理机制的研究新进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(4): 452-456.

HUANG MW, LIAO YG. Research progress in the regulating effect of epimedium flavonoids on bone metabolism and its pharmacological mechanism[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2014, 20(4): 452-456. Chinese.

[20] 张蕾, 程瑜, 金王东, 等. 药用植物淫羊藿与富血小板血浆协同对软骨细胞的增殖作用[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(3): 680-684.

ZHANG L, CHENG Y, JIN WD, et al. Study of medicinal plant Epimedium brevicornum Maxim and platelet effects on chondrocyte proliferation[J]. Zhe Jiang Nong Ye Xue Bao, 2014, 26(3): 680-684. Chinese.

[21] 李晶, 宋敏, 罗晓, 等. 淫羊藿总黄酮对去势大鼠骨密度的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(6): 1661-1664.

LI J, SONG M, LUO X, et al. Effects of the total flavone of epimedium on bone mineral density in ovariectomized rats[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi, 2012, 27(6): 1661-1664. Chinese.

[22] 李晶, 宋敏, 罗晓, 等. 淫羊藿总黄酮对去势大鼠骨组织 BMP-2 和 OPG mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(7): 2529-2531.

LI J, SONG M, LUO X, et al. Effects of total flavonoids of Epimedium on the expression of BMP-2 and OPG mRNA in bone tissues of ovariectomized rats[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi, 2015, 30(7): 2529-2531. Chinese.

[23] 濮祖茂, 李勇, 李晶晶, 等. 淫羊藿总黄酮对去除卵巢大鼠股骨头作用的扫描电镜观察与图像分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(2): 246-250.

PU ZM, LI Y, LI JJ, et al. Study of effects of Epimedium Pubescens Flavonoid on femur of rat after ovariectomy[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2005, 11(2): 246-250. Chinese.

[24] 冯坤, 谢文, 陈宝龙, 等. 5 种淫羊藿对软骨组织生长和软骨细胞增殖影响的对比研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(24): 2065-2067.

FENG K, XIE W, CHEN BL, et al. Effect of five species of Epimedium on growth of cartilage and proliferation of cartilage cell in vitro [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2006, 31(24): 2065-2067. Chinese.

[25] 毕锴, 温建民, 孙永生, 等. 中医药对骨折愈合作用及其机制的实验研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(1): 137-140.

BI K, WEN JM, SUN YS, et al. Experimental research progress of fracture healing and its mechanism by traditional chinese medicine [J]. Zhongguo Zhong Yi Ji Chu Yi Xue Za Zhi, 2014, 20(1): 137-140. Chinese.

[26] Li W, Zhao B, Peng J, et al. CKIP-1 Reduces Bone Mass by Accelerating Osteoclastogenesis in Elderly Mice[J]. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience, 2015, 12(11): 4147-4157.

(收稿日期: 2017-01-18 本文编辑: 李宜)

·读者·作者·编者·

本刊关于通讯作者有关事宜的声明

本刊要求集体署名的文章必须明确通讯作者。凡文章内注明通讯作者的稿件, 与该稿件相关的一切事宜均与通讯作者联系。如文内未注明通讯作者的文章, 按国际惯例, 有关稿件的一切事宜均与第一作者联系, 特此声明!

《中国骨伤》杂志社