

积雪草酸对骨质疏松模型大鼠生物力学特性与骨小梁面积及Runx2蛋白的影响

陈晓骝¹, 谭小艳², 刘田丰², 韩登鹏², 魏波², 胡资兵², 吴少科²

https://doi.org/10.12307/2022.895

投稿日期: 2021-01-13

采用日期: 2021-12-17

修回日期: 2022-03-23

在线日期: 2022-04-25

中图分类号:

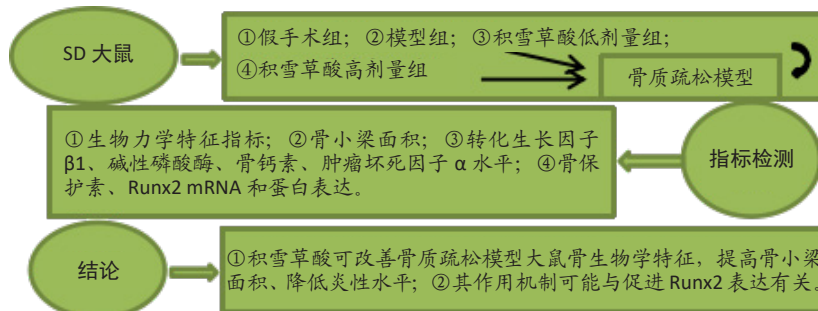
R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2023)02-00246-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 积雪草酸对骨质疏松大鼠生物力学特征、骨小梁面积及Runx2蛋白的影响



文题释义:

积雪草酸: 是一种五环三萜酸, 具有广泛的生物学作用。积雪草酸对多发性骨髓瘤细胞的增殖活性具有调节作用, 可以防治肿瘤恶化, 同时抑制骨基质细胞的脂肪分化。积雪草酸作为一种中药活性成分, 药效温和持久、不良反应少, 应用前景广阔。

RUNX2: 这个基因是转录因子runx家族的一员, 编码一个具有runt-dna结合域的核蛋白。该蛋白对成骨细胞分化和骨骼形态发育至关重要, 并作为核酸和参与骨骼基因表达的调控因子的支架。

摘要

背景: 研究证实, 积雪草酸以浓度依赖的方式促进成骨细胞分化, 抑制成骨细胞凋亡, 但目前关于积雪草酸对骨生物学、Runx2蛋白的具体作用机制尚不明确。

目的: 探究积雪草酸对骨质疏松大鼠生物力学特征、骨小梁面积及Runx2蛋白的影响。

方法: 选用SD大鼠48只, 随机分为假手术组、模型组、积雪草酸低剂量组和高剂量组各12只。除假手术组外其余大鼠双侧去卵巢建立骨质疏松模型, 假手术组和模型组大鼠术后3 mL/(kg·d)生理盐水灌胃; 积雪草酸低剂量组60 mg/(kg·d)积雪草酸灌胃; 积雪草酸高剂量组120 mg/(kg·d)积雪草酸灌胃, 各组大鼠均干预60 d。RT-PCR、Western blot检测检测骨保护素、Runx2的mRNA和蛋白水平, 比较各组大鼠股骨生物力学特征、骨小梁面积及血清炎性因子水平的差异性。

结果与结论: ①大鼠最大载荷、刚度、总能量、弹性模量值假手术组高于模型组($P < 0.05$); 与模型组相比, 积雪草酸低、高剂量组上述指标均有所提高($P < 0.05$), 且积雪草酸高剂量组高于积雪草酸低剂量组($P < 0.05$); ②骨小梁面积假手术组高于模型组($P < 0.05$); 模型组低于积雪草酸低、高剂量组($P < 0.05$); 积雪草酸高剂量组高于低剂量组($P < 0.05$); ③大鼠血清转化生长因子β1的水平模型组显著低于其他3组($P < 0.05$), 积雪草酸高剂量组高于低剂量组($P < 0.05$); 骨钙素、碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子α水平模型组显著高于其他3组($P < 0.05$), 积雪草酸高剂量组高于假手术组($P < 0.05$); ④骨保护素和Runx2的mRNA表达水平假手术组高于模型组和积雪草酸低剂量组($P < 0.05$); 积雪草酸高剂量组高于假手术组($P < 0.05$); ⑤骨保护素、Runx2蛋白表达水平模型组低于其他3组, 积雪草酸高剂量组高于低剂量组; ⑥结果说明, 积雪草酸可改善骨质疏松模型大鼠骨生物学特征, 提高骨小梁面积、降低炎性水平, 其作用机制可能与促进Runx2表达有关。

关键词: 积雪草酸; 骨质疏松大鼠; 生物力学特征; 骨小梁面积; Runx2

Effects of asiatic acid on biomechanical properties, trabecular area and Runx2 protein in osteoporotic rats

Chen Xiaosi¹, Tan Xiaoyan², Liu Tianfeng², Han Dengpeng², Wei Bo², Hu Zibing², Wu Shaoke²

¹International and Special Medical Service Ward, ²Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong Province, China

Chen Xiaosi, Master, International and Special Medical Service Ward, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong Province, China

Corresponding author: Wu Shaoke, Master, Chief physician, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have confirmed that asiatic acid promotes osteoblast differentiation and inhibits osteoblast apoptosis in a concentration-dependent manner. However, the specific mechanism of asiatic acid on bone biomechanics and Runx2 protein is still unclear.

广东医科大学附属医院, ¹国际医疗与特需医疗病区, ²骨外科, 广东省湛江市 524023

第一作者: 陈晓骝, 女, 1984年生, 湖北省武汉市人, 汉族, 2010年广东医科大学毕业, 硕士, 主要从事老年人骨质疏松预防与治疗研究。

通讯作者: 吴少科, 硕士, 主任医师, 广东医科大学附属医院骨外科, 广东省湛江市 524023

https://orcid.org/0000-0002-6672-2693 (陈晓骝)

基金资助: 广东省自然科学基金-粤东西北创新人才联合培养项目(2018A030307019), 项目负责人: 吴少科

引用本文: 陈晓骝, 谭小艳, 刘田丰, 韩登鹏, 魏波, 胡资兵, 吴少科. 积雪草酸对骨质疏松模型大鼠生物力学特性与骨小梁面积及Runx2蛋白的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(2):246-251.



OBJECTIVE: To investigate the effects of asiatic acid on biomechanical characteristics, trabecular area and Runx2 protein expression in osteoporotic rats.
METHODS: Forty-eight Sprague-Dawley rats were selected and randomly divided into four groups ($n=12$ per group): sham operation group, model group, low-dose asiatic acid group, and high-dose asiatic acid group. Except for the sham operation group, rats in the other groups were bilaterally ovariectomized to establish osteoporosis models. The rats in the sham operation and model groups were given 3 mL/(kg·d) normal saline after surgery, while those in the low- and high-dose asiatic acid groups were given 60 and 120 mg/(kg·d) asiatic acid by gavage, respectively. Intervention in each group lasted for 60 days. RT-PCR and western blot were used to detect osteoprotegerin and Runx2 at mRNA and protein levels, respectively. Biomechanical characteristics, trabecular bone area and inflammatory factor levels of rats were compared among groups.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The maximum load, stiffness, total energy and elastic modulus of rats in the sham operation group were higher than those in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, both high- and low-dose asiatic acid could increase the above-mentioned indexes ($P < 0.05$). Moreover, the maximum load, stiffness, total energy and elastic modulus were higher in the high-dose asiatic acid group than the low-dose asiatic acid group ($P < 0.05$). (2) The trabecular bone area was higher in the sham operation group than the model group ($P < 0.05$). The trabecular bone area was lower in the model group than the low- and high-dose asiatic acid group ($P < 0.05$). The trabecular bone area was higher in the high-dose asiatic acid group than the low-dose asiatic acid group ($P < 0.05$). (3) The serum level of transforming growth factor- $\beta 1$ was significantly lower in the model group than the other three groups ($P < 0.05$) and significantly higher in the high-dose asiatic acid group than the low-dose asiatic acid group ($P < 0.05$). The levels of osteocalcin, alkaline phosphatase and tumor necrosis factor- α were significantly higher in the model group than the other three groups ($P < 0.05$) and significantly lower in the high-dose asiatic acid group than the low-dose group ($P < 0.05$). (4) The mRNA expression levels of osteoprotegerin and Runx2 were higher in the sham operation group than the model and low-dose asiatic acid groups ($P < 0.05$), and the mRNA expression levels of osteoprotegerin and Runx2 in the high-dose asiatic acid group were higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$). (5) The protein expression levels of osteoprotegerin and Runx2 were lower in the model group than the other three groups and higher in the high-dose asiatic acid group than the low-dose asiatic acid group. To conclude, asiatic acid can improve the biological characteristics of bone tissue, increase the area of trabecular bone, and reduce the level of inflammation in osteoporotic rats. Its mechanism of action may be related to the promotion of Runx2 expression.

Key words: asiatic acid; osteoporotic rat; biomechanical characteristics; trabecular area; Runx2

Funding: Guangdong Provincial Natural Science Foundation-Yuedong Northwest Innovative Talents, No. 2018A030307019 (to WSK)

How to cite this article: CHEN XS, TAN XY, LIU TF, HAN DP, WEI B, HU ZB, WU SK. Effects of asiatic acid on biomechanical properties, trabecular area and Runx2 protein in osteoporotic rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(2):246-251.

0 引言 Introduction

骨质疏松症主要表现为成骨细胞减少、破骨细胞增多、局部丢失大量骨量、骨脆性增加，是一种代谢疾病，且骨质疏松患者极易产生骨折^[1]。骨质疏松症的发病率随着人口老龄化逐年递增，使得该病的致残人数持续增长，引起了医学界学者的关注。骨质疏松症女性发病率高于男性，女性绝经后骨质疏松是由于雌激素下降及卵巢功能衰减使骨的载荷量等减少所致^[2]。健康机体中，骨形成与骨吸收处于平衡状态，当平衡被打破，会导致骨量与骨密度减少，而 Runx2 可促进成骨细胞分化，在骨发育与代谢中占有重要地位^[3]。老年人绝经后因其雌激素分泌减少，导致骨量的大量丢失，同时脊柱、髌骨、手腕等部位较易发生骨折，且难以愈合，给家庭及社会带来沉重的经济负担，因此寻找一种可以有效防治绝经后骨质疏松症的药物已成为当务之急。有研究报道，积雪草酸对多发性骨髓瘤细胞的增殖活性具有调节作用，可以防治肿瘤恶化，同时抑制骨基质细胞的脂肪分化，积雪草酸是一种五环三萜酸，具有广泛的生物学作用。近年来随着对积雪草酸药理活性的研究，发现积雪草酸还具有治疗痴呆症、肿瘤等老年性疾病的作用^[4]。另有研究提出，积雪草苷可通过核因子 κB 、钙/钙调素依赖性激酶和 MAPK 三条信号转导通路抑制破骨细胞发挥作用所需的关键蛋白——NFATc1 的表达，并最终抑制破骨细胞生成^[5]。且目前已有研究证实，积雪草酸以浓度依赖的方式促进成骨细胞分化，抑制成骨细胞凋亡^[6]。但目前关于积雪草酸对骨生物力学、Runx2 蛋白的具体作用机制尚不明确。因此，该课题通过建立去卵巢大鼠骨质疏松动物模型，探讨积雪草酸对骨质疏松大鼠生物力学特征、骨小梁面积及 Runx2 蛋白的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，组间比较进行配对 t 检验和

方差分析，SNK 法进行事后检验。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 5 月至 2020 年 4 月在广东医科大学附属医院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验用主要试剂 积雪草酸中药材来自南京标科生物公司；二甲基亚砷来自山东佳烨生物公司；戊巴比妥钠来自湖北鸿运隆生物公司；胰蛋白酶来自江苏采薇生物公司；光学显微镜来自济南欧莱博科学仪器公司；骨保护素、Runx2 一抗来自上海恒远生物科技有限公司；辣根过氧化物酶二抗来自上海李记生物科技有限公司；转化生长因子 $\beta 1$ ELISA 试剂盒上海润裕生物科技有限公司；碱性磷酸酶 ELISA 试剂盒来自上海恪敏生物科技有限公司；骨钙素 ELISA 试剂盒来自上海心语生物科技有限公司；肿瘤坏死因子 α 检测试剂盒来自上海拜力生物科技有限公司。

1.3.2 药物制备 根据吴少科等^[7]的研究制备积雪草酸工作液：积雪草酸中药材 500 mg，二甲基亚砷（浓度低于 0.1%）溶解，生理盐水稀释、混匀，定容至 100 mL，配成质量浓度为 5 g/L 的积雪草酸工作液，常温避光保存。

1.3.3 实验动物 健康雌性 SPF 级 SD 大鼠 48 只购自广州吉尼欧生物科技有限公司，许可证号：SYXK(粤)2019-0514，鼠龄 6-8 周，体质量 200-300 g。大鼠常规饲养，自由饮食饮水，饲养温度在 23-24 °C，相对湿度在 40%-50%，适应饲养 1 周后进行实验。实验已通过广东医科大学附属医院伦理审查会批准（批号：Y2019-004-18）。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组 雌性 SD 大鼠 48 只随机分为 4 组，每组 12 只。其中假手术组切除两侧卵巢附近脂肪组织，术后给予 3 mL/(kg·d) 生理盐水灌胃；其余大鼠双侧去卵巢建立骨质疏松模型；术后模型组给予 3 mL/(kg·d) 生理盐水灌胃，积雪草酸低剂量组给予 60 mg/(kg·d) 积雪草酸灌胃，积雪草酸高剂

量组给予 120 mg/(kg·d) 积雪草酸灌胃, 各组大鼠均干预 60 d。
1.4.2 模型建立 将所有大鼠麻醉后, 与两侧肋下剃毛, 消除后, 在肋下 2 cm 脊柱旁 1.5 cm 作纵向开口, 腹腔内找到大鼠卵巢, 假手术组摘取卵巢周围脂肪, 保留卵巢, 然后缝合皮肤, 其他 3 组切除双侧卵巢, 将周围组织塞入腹腔并缝合皮肤, 进行局部消毒, 7 d 后拆线, 后进行常规饲料喂养, 分笼自由活动。饲养 30 d 后使用骨密度检测仪检测各组大鼠胫骨骨密度, 以骨密度低于 2.5 g/cm³ 视为建模成功。

实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	探究积雪草酸对骨质疏松大鼠生物力学特征、骨小梁面积及 Runx2 蛋白的影响
借鉴已有标准	参考文献 [6] 建立去卵巢骨质疏松大鼠模型
施动物造模	
动物来源及品系	SPF 级 SD 大鼠购自广州吉尼欧生物科技有限公司
模型与所研究疾病的关系	去卵巢骨质疏松症大鼠模型是研究绝经后女性骨质疏松的经典模型
造模技术描述	麻醉大鼠后, 在肋下 2 cm 脊柱旁 1.5 cm 作纵向开口, 腹腔内找到大鼠卵巢, 切除双侧卵巢, 将周围组织塞入腹腔并缝合皮肤
动物数量及分组方法	SD 大鼠 48 只随机分为假手术组、模型组、积雪草酸低剂量和高剂量组, 每组 12 只
造模成功评价指标	造模 30 d 后使用骨密度检测仪检测各组大鼠胫骨骨密度, 以骨密度低于 2.5 g/cm ³ 视为建模成功
造模后实验观察指标	①生物力学特征指标变化; ②股骨骨小梁面积; ③血清转化生长因子 β1、碱性磷酸酶、骨钙素、肿瘤坏死因子 α 水平; ④股骨骨保护素、Runx2 mRNA 和蛋白水平
造模后动物处理	实验结束 12 h 禁食, 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 取右侧股骨
伦理委员会批准	实验已通过广东医科大学附属第一医院伦理审查会批准 (批号: Y2019-004-18)

1.4.3 检测各组大鼠生物力学特征指标的表达 实验结束前 12 h 禁食, 戊巴比妥钠麻醉, 取右侧股骨置于生理盐水润湿的纱布中, 并用锡纸包裹防止水分蒸发, 用于指标的检测。使用骨科生物力学测试仪 (上海衡翼精密仪器有限公司, 型号: MTS-858) 进行三点弯曲试验, 取股骨样品, 置于水平支架上, 载荷施加速度为 2 mm/min 直至骨折发生, 测试结束后于断裂处用游标卡尺测量股骨外侧长、短轴以及横截面皮质骨的均值, 求弹性模量 (MOE), Origin9 软件求最大载荷、刚度及吸收的总能量。

1.4.4 RT-PCR 检测骨保护素、Runx2 水平 取各组大鼠股骨组织, 胰酶消化后提取细胞悬液, 冲洗, 采用 TRIzol 试剂提取 RNA, 反转录 cDNA 后进行 PCR 扩增, 以 GAPDH 为内参, 扩增条件为 95 °C 2 min、95 °C 30 s、60 °C 30 s, 共 40 个循环, 计算方法用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析, 引物序列见表 1。

1.4.5 检测各组大鼠骨小梁面积 实验结束后, 无菌条件下取出左侧股骨, 多聚甲醛固定、脱钙、脱水、透明、浸渍、包埋、贴片后行常规苏木精-伊红染色。用 SONY 摄像头采集苏木精-伊红染色, 切片图像并输入图像分析系统。在光学显微镜下, 每张切片随机选取 5 个视野, 每个视野选定 5 个部位用鼠标分割法测量骨小梁面积。

表 1 | 引物序列

Table 1 | Primer sequences

基因	方向	引物序列	产物长度 (bp)
骨保护素	F	5'-GCA TGA GTC AGG TAG TGC TTC TGT G-3'	219
	R	5'-GCA GCA TCG CTC TGT TCC TGT A-3	
Runx2	F	5'-GCC GGG AAT GAT GAG AAC TA-3	112
	R	5'-GTC GTG GAA GGC TGT GAT G-3	
GAPDH	F	5'-GAT GTC ATC ATA CTT GGC AGG TTT-3'	620
	R	5'-GGA CCG TCC ACT GTC ACT TT-3'	

1.4.6 检测各组大鼠转化生长因子 β1、碱性磷酸酶、骨钙素、肿瘤坏死因子 α 水平 实验结束后, 麻醉处死各组大鼠后, 经股动脉取血, 离心 10 min, 1 325 r/min, 分离血清, 取上清液, ELISA 法检测转化生长因子 β1、碱性磷酸酶、骨钙素水平, 放射免疫法检测肿瘤坏死因子 α 水平, 均按照说明书进行操作。

1.4.7 Western blot 检测骨保护素、Runx2 水平 取各组大鼠股骨组织, 裂解液裂解并提取蛋白, 并对蛋白的浓度进行测量, 分装后保存在 -20 °C 的环境中。将提取出的蛋白溶液和缓冲溶液进行混均, 然后将其煮沸、变性。把电泳后的 50 μm 蛋白样品转移到 PVDF 膜上, 加脱脂奶粉封闭 1 h。加入骨保护素、Runx2 一抗后 (1 : 500)PBS 漂洗 3 次, 每次间隔 10 min, 最后加入辣根过氧化物酶二抗 (1 : 2 000) 对溶液稀释, 常温封闭 1 h。取出 PVDF 膜, 上述方法漂洗, DAB 显色后照相。

1.5 主要观察指标 ①大鼠生物力学特征指标; ②股骨骨小梁面积; ③血清转化生长因子 β1、碱性磷酸酶、骨钙素、肿瘤坏死因子 α 水平; ④股骨骨保护素、Runx2 mRNA 和蛋白水平。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 组间比较进行配对 t 检验和方差分析, 描述采用 $\bar{x} \pm s$; 事后检验采用 SNK 法进行组间两两比较 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。文章统计学方法已通过广东医科大学附属第一医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用 SD 大鼠 48 只, 分为 4 组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

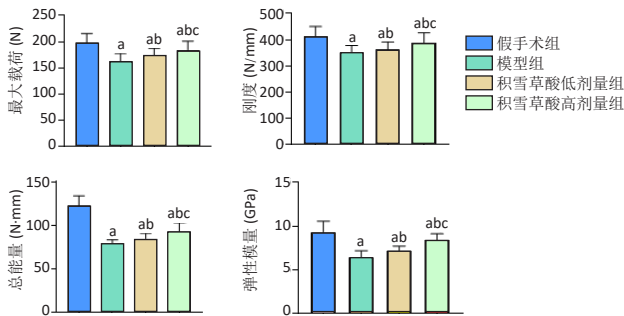
2.2 各组大鼠生物力学特征指标的比较 假手术组大鼠股骨组织中最大载荷、刚度、总能量、弹性模量值高于模型组 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 积雪草酸低剂量组、高剂量组大鼠股骨组织中最大载荷、刚度、总能量、弹性模量值均有所提高 ($P < 0.05$), 且积雪草酸高剂量组大鼠股骨组织中生物力学指标高于积雪草酸低剂量组 ($P < 0.05$), 见表 2, 图 1。

2.3 各组大鼠股骨骨小梁面积比较 假手术组大鼠股骨组织中骨小梁面积 (2.41±0.22) mm² 较模型组 (0.43±0.03) mm² 高 ($t=30.890, P < 0.001$); 模型组大鼠股骨组织中骨小梁面积较积雪草酸低剂量组 (1.07±0.08) mm²、积雪草酸高剂量组 (1.92±0.18) mm² 低 ($t=25.950, 28.280, 均 P < 0.001$); 积雪草酸高剂量组大鼠股骨组织中骨小梁面积较积雪草酸低剂量组高 ($t=14.950, P < 0.001$), 见图 2, 3。

表 2 | 各组生物力学指标对比 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Comparison of biomechanical indexes among groups	组别	最大载荷 (N)	刚度 (N/mm)	总能量 (N·mm)	弹性模量 (GPa)
	假手术组	198.26±17.33	412.36±38.17	122.46±11.38	9.35±1.22
	模型组	163.41±14.26 ^a	349.77±28.36 ^a	79.26±3.81 ^a	6.44±0.75 ^a
	积雪草酸低剂量组	172.33±15.37 ^{ab}	361.82±30.24 ^{ab}	84.55±6.14 ^{ab}	7.21±0.52 ^{ab}
	积雪草酸高剂量组	184.71±16.52 ^{abc}	389.74±36.52 ^{abc}	92.56±10.42 ^{abc}	8.44±0.71 ^{abc}
	F 值	10.89	8.43	61.54	28.29
	P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

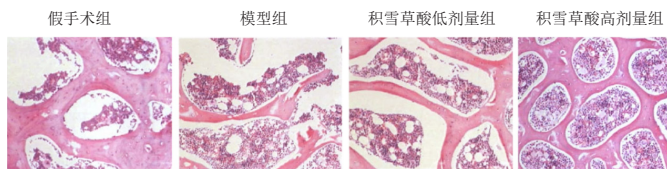
表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与积雪草酸低剂量组比较, ^c $P < 0.05$



图注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与积雪草酸低剂量组比较, ^c $P < 0.05$

图 1 | 各组大鼠生物力学指标的比较

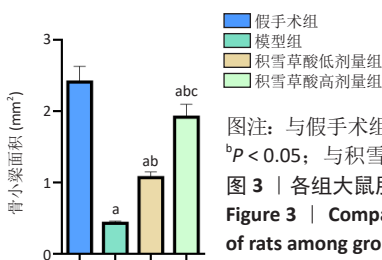
Figure 1 | Comparison of biomechanical indexes among groups



图注: 模型组大鼠骨小梁面积较其他 3 组低; 积雪草酸高剂量组大鼠骨小梁面积高于低剂量组

图 2 | 各组大鼠股骨组织骨小梁面积观察 (苏木精 - 伊红染色, $\times 100$)

Figure 2 | Histological observation of trabecular bone tissue of the rat femur (hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)



图注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与积雪草酸低剂量组比较, ^c $P < 0.05$

图 3 | 各组大鼠股骨骨小梁面积对比

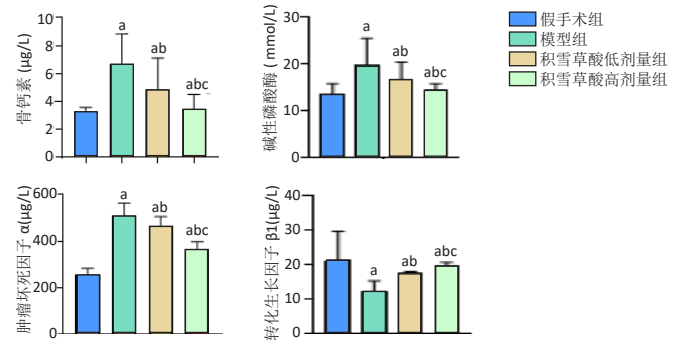
Figure 3 | Comparison of femoral trabecular area of rats among groups

2.4 各组大鼠转化生长因子 $\beta 1$ 、碱性磷酸酶、骨钙素及肿瘤坏死因子 α 水平 假手术组大鼠血清中转化生长因子 $\beta 1$ 的水平较模型组高, 骨钙素、碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子 α 水平较模型组低 ($P < 0.05$); 模型组大鼠血清中转化生长因子 $\beta 1$ 的水平较积雪草酸各组低, 骨钙素、碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子 α 水平较积雪草酸低剂量各组高 ($P < 0.05$); 积雪草酸高剂量组大鼠血清中转化生长因子 $\beta 1$ 的水平较积雪草酸低剂量组高, 骨钙素、碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子 α 水平较积雪草酸低剂量组低 ($P < 0.05$), 见表 3, 图 4。

表 3 | 各组大鼠骨钙素、碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子 α 及转化生长因子 $\beta 1$ 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Comparison of the levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- $\beta 1$ among groups	组别	骨钙素 ($\mu\text{g/L}$)	碱性磷酸酶 (mmol/L)	肿瘤坏死因子 α ($\mu\text{g/L}$)	转化生长因子 $\beta 1$ ($\mu\text{g/L}$)
	假手术组	3.27±0.31	13.47±2.22	256.37±27.32	21.07±8.46
	模型组	6.71±2.14 ^a	19.65±5.71 ^a	508.94±55.72 ^a	12.06±3.12 ^a
	积雪草酸低剂量组	4.90±2.22 ^{ab}	16.58±3.72 ^{ab}	468.33±37.28 ^{ab}	17.33±0.52 ^{ab}
	积雪草酸高剂量组	3.42±1.08 ^{abc}	14.32±1.38 ^{abc}	365.47±33.26 ^{abc}	19.56±1.02 ^{abc}
	F 值	11.44	6.87	96.7	9.03
	P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与积雪草酸低剂量组比较, ^c $P < 0.05$



图注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与积雪草酸低剂量组比较, ^c $P < 0.05$

图 4 | 各组大鼠骨钙素、碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子 α 及转化生长因子 $\beta 1$ 水平对比

Figure 4 | Levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- $\beta 1$ in rats

2.5 各组大鼠股骨骨保护素和 Runx2 蛋白水平 假手术组大鼠股骨组织中骨保护素、Runx2 蛋白水平高于模型组 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 积雪草酸各组大鼠股骨组织中骨保护素、Runx2 蛋白水平均有所提高 ($P < 0.05$), 积雪草酸高剂量组大鼠股骨组织中骨保护素、Runx2 蛋白水平高于积雪草酸低剂量组 ($P < 0.05$), 见表 4, 图 5。

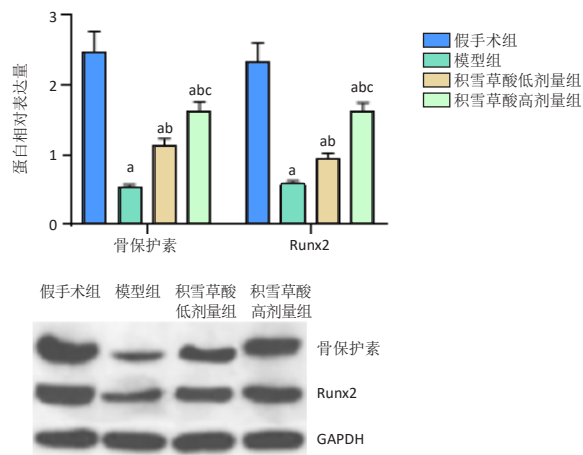
表 4 | 各组大鼠股骨骨保护素和 Runx2 蛋白水平的比较

Table 4 | Comparison of osteoprotegerin and Runx2 protein levels of rats among groups

组别	骨保护素	Runx2
假手术组	2.45±0.31	2.32±0.28
模型组	0.54±0.03 ^a	0.58±0.04 ^a
积雪草酸低剂量组	1.12±0.11 ^{ab}	0.94±0.08 ^{ab}
积雪草酸高剂量组	1.62±0.13 ^{abc}	1.62±0.12 ^{abc}
F 值	249.500	281.600
P 值	< 0.001	< 0.001

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与积雪草酸低剂量组比较, ^c $P < 0.05$

2.6 各组大鼠股骨骨保护素和 Runx2 mRNA 水平 假手术组大鼠股骨组织中骨保护素和 Runx2 mRNA 水平较模型组、积雪草酸低剂量组高 ($P < 0.05$); 模型组大鼠股骨组织中骨保护素 mRNA、Runx2 mRNA 水平低于其余各组 ($P < 0.05$); 积雪草酸高剂量组大鼠股骨组织中骨保护素 mRNA、Runx2 mRNA 水平高于假手术组 ($P < 0.05$), 由此可看出骨保护素 mRNA 和



图注：与假手术组比较，^a*P* < 0.05；与模型组比较，^b*P* < 0.05；与积雪草酸低剂量组比较，^c*P* < 0.05

图 5 | 各组大鼠股骨骨保护素与 Runx2 蛋白水平的比较

Figure 5 | Osteoprotegerin and Runx2 protein levels in the femur of rats

Runx2 mRNA 水平在骨质疏松大鼠模型中为低表达，经过治疗后水平升高，见表 5，图 6。

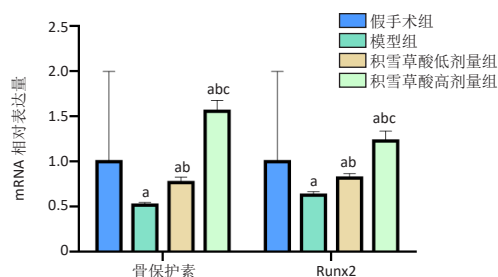
表 5 | 各组大鼠股骨骨保护素和 Runx2 mRNA 水平的比较

($\bar{x} \pm s$, *n* = 12, 相对表达量)

Table 5 | Comparison of osteoprotegerin and Runx2 mRNA levels among groups

组别	骨保护素	Runx2
假手术组	1	1
模型组	0.52±0.03 ^a	0.63±0.04 ^a
积雪草酸低剂量组	0.77±0.06 ^{ab}	0.82±0.05 ^{ab}
积雪草酸高剂量组	1.56±0.12 ^{abc}	1.23±0.11 ^{abc}
<i>F</i> 值	9.29	3.09
<i>P</i> 值	< 0.001	0.03

表注：与假手术组比较，^a*P* < 0.05；与模型组比较，^b*P* < 0.05；与积雪草酸低剂量组比较，^c*P* < 0.05



图注：与假手术组比较，^a*P* < 0.05；与模型组比较，^b*P* < 0.05；与积雪草酸低剂量组比较，^c*P* < 0.05

图 6 | 各组大鼠股骨骨保护素和 Runx2 mRNA 表达量的对比

Figure 6 | Osteoprotegerin and Runx2 mRNA levels in the femur of rats

3 讨论 Discussion

在中国骨质疏松症多发于老年人群，且女性发病人数较多，主要是由于绝经后雌激素减少使骨量减少所致^[8]；在国外骨质疏松已达到了流行的比例^[9]。此次研究运用积雪草酸针对骨质疏松症进行治疗，对骨质疏松症模型大鼠骨生物学特征、Runx2 蛋白以及骨小梁面积进行了分析。

此次研究发现，模型组大鼠骨生物学特征各指标下降，在经过积雪草酸治疗后积雪草酸低剂量组与积雪草酸高剂量组骨生物学特征各指标水平上升，以积雪草酸高剂量

组上升更为显著，由此可看出，积雪草酸提高了大鼠最大载荷和刚度。最大载荷和刚度的水平是决定骨质疏松发生与否的重要条件，骨质疏松是骨吸收与骨形成失衡、骨量下降所致^[10]。骨微观结构的改变可影响骨生物力学的特性^[11-12]。积雪草酸是积雪草的提取物，属于五环三萜酸类，具有较强的抗肿瘤作用，且还具有抗炎、抗菌、清热利湿、解毒消肿等作用，可通过减少炎症等发挥骨保护作用^[13-14]。研究提示积雪草通过提高抗氧化的能力以及抑制骨吸收、促进骨形成、影响骨微观结构，达到骨保护的作用^[15-16]。提示，积雪草酸可能是通过降低炎症反应，从而增加大鼠骨的最大载荷以及刚度，影响骨微结构，进而起到治疗骨质疏松作用。

此次研究发现，大鼠 Runx2、骨保护素表达及骨小梁面积在模型组的表达下降，在经过积雪草酸治疗后 Runx2、骨保护素表达及骨小梁面积表达上升，且积雪草酸高剂量组上升效果更为明显，说明积雪草酸可提高骨保护素水平及 Runx2 转录能力。骨保护素可通过与骨保护素诱导受体结合，抑制破骨细胞的形成^[17]。Runx2 可促进成骨细胞分化，Runx2 表达的减少会致骨发育异常，其过表达可促进成骨细胞的产生^[18-19]。骨质疏松症在发病时破骨细胞与成骨细胞增长失衡，有研究表明积雪草酸在抗人成骨细胞凋亡方面具有重要作用，可减缓骨质疏松症^[20]。王剑等^[21]研究提示，Runx2 水平下降可能是骨质疏松发病的原因之一，在经过治疗后 Runx2 水平上升，促进成骨细胞增殖，提高骨小梁面积，改善骨质疏松症状。上述结果提示，积雪草酸具有提高 Runx2 水平的作用，从而提高骨小梁面积，对骨质疏松症起到治疗作用。

此次研究显示，大鼠骨钙素、碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子 α 的水平在模型组中升高，转化生长因子 β1 的水平在模型组中下降，经过积雪草酸治疗后骨钙素、碱性磷酸酶、肿瘤坏死因子 α 的水平下降，转化生长因子 β1 的水平上升，说明积雪草酸可降低骨质疏松大鼠中的骨钙素从而减少钙化，降低肿瘤坏死因子及碱性磷酸酶的表达，提高转化生长因子 β1 的转录功能，对骨质疏松起到治疗的效果。骨钙素来自于成骨细胞，主要是维持骨代谢，女性绝经后骨钙素水平上调可引起骨质疏松症^[22-23]。碱性磷酸酶的水平与骨钙化联系密切，是骨形成的重要酶，成骨细胞分泌碱性磷酸酶并释放入血，当肝和胎盘等功能正常时，血清碱性磷酸酶可作为骨形成的有效特异性指标^[24-25]。一般认为碱性磷酸酶的升高是伴随着骨吸收亢进而出现的代偿性骨形成增加引起的^[26-27]。肿瘤坏死因子 α 可促进破骨细胞繁殖，抑制碱性磷酸酶产生，减少骨钙化的形成^[28]。转化生长因子 β1 主要存在于骨内，可促细胞繁殖，参与骨与软骨的形成^[29]。叶文静等^[30]研究结果提示，积雪草治疗肺纤维化效果较好，其作用机制是通过下调肿瘤坏死因子 α、转化生长因子 β1 水平，减少炎症产生而完成的。相关研究显示，积雪草酸可以通过调节碱性磷酸酶、骨钙素，降低成骨细胞的凋亡来防治去卵巢大鼠骨质疏松症的发生^[7]。上述结论提示，积雪草酸可调

控炎症水平以及碱性磷酸酶、骨钙素的表达来改善骨质疏松症。

综上所述,积雪草酸可改善大鼠骨生物学特征,提高骨小梁面积、降低炎症水平,其作用机制可能与促进 Runx2 表达有关。该研究存在单中心研究、样本量少等不足之处,研究内容需进一步完善,在今后的研究中应通过多元化实验方案为临床骨质疏松治疗提供有力的依据。

作者贡献: 第一作者陈晓驹设计方案、文章内容,查阅文献,撰写文章;第二至四作者谭小艳、刘田丰、韩登鹏协助数据整理分析,修改、补充文章设计缺陷;第五作者魏波对文章数据进行统计学分析及统计学图片制作;第六作者胡资兵补充方案设计,查阅相关文献,对前言及讨论进行补充说明;通讯作者吴少科审阅文章,补充遗漏,核对统计值。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

出版规范: 文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] SCHBER C, PAPAGEORGIOU E, HARSTRICK A, et al. Are glucocorticoid-induced osteoporosis recommendations sufficient to determine antiosteoporotic treatment for patients with rheumatoid arthritis?. *Cancer*. 2015;72(7):2242-2247.
- [2] WRIGHT NC, LOOKER AC, SAAG KG, et al. The Recent Prevalence of Osteoporosis and Low Bone Mass in the United States Based on Bone Mineral Density at the Femoral Neck or Lumbar Spine. *J Bone Miner Res*. 2014;29(11):2520-2526.
- [3] 梁广胜,陈伟才,殷姗姗,等.淫羊藿总黄酮对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程 BMP-2/RunX2/OSX 通路的影响[J]. *中国中西医结合杂志*,2016,36(5):614-618.
- [4] 张雅雯,尹丽娜,梁泽华,等.积雪草酸大鼠体内药理学考察[J]. *中国现代应用药学*,2015,32(3):314-317.
- [5] 许可,郑绿珍,王清清,等.信号通路抑制剂或蛋白合成抑制剂或羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用[P]. CN110215517A. 2019.
- [6] 许燕,肖明,李涛,等.积雪草酸促进成骨细胞分化的机制[J]. *华西药理学杂志*,2019,34(4):5.
- [7] 吴少科,陈晓驹,陈海聪,等.积雪草酸抑制去卵巢大鼠骨质疏松的作用[J]. *实用医学杂志*,2019,35(13):2051-2055.
- [8] 孟炜晴,张福杰.人类免疫缺陷病毒相关骨质疏松的诊断与治疗的研究进展[J]. *中华传染病杂志*,2021,39(3):182-184.
- [9] SANDOMIERSKI M, ZIELIŃSKA M, BUCHWALD T, et al. Controlled release of the drug for osteoporosis from the surface of titanium implants coated with calcium titanate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022;110(2):431-437.
- [10] 张家国,徐晓峰,李明,等.银杏叶提取物对糖皮质激素诱导的骨质疏松症大鼠骨密度和骨生物力学的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*,2019,25(4):461-464+471.
- [11] 李兴勇,魏晓辉,李喜香,等.亚麻木酚素对实验性骨质疏松大鼠骨生物力学和 AKP 活性的影响[J]. *西部中医药*,2015,28(10):43-45.

- [12] 郎小琴,高越,周叶,等.牛膝多糖对老年骨质疏松大鼠模型骨代谢及生物力学特征的影响[J]. *中华全科医学*,2019,17(4):547-550,589.
- [13] 喻伟光,田振峰,李彦敏,等.羟基积雪草酸通过调控 MMPs 的表达抑制大鼠炎症骨破坏的作用研究[J]. *医学动物防制*,2021,37(1):57-60+103.
- [14] 郝春波,邓伟,巩蕾,等.积雪草酸对大鼠牙周膜细胞增殖、迁移和成骨分化的影响[J]. *实用口腔医学杂志*,2020,36(4):666-670.
- [15] 吴少科,陈晓驹,孙欣,等.积雪草酸对高血脂小鼠骨量丢失的保护作用[J]. *中国骨质疏松杂志*,2018,24(3):281-289.
- [16] CHIARETTI M, FEGATELLI DA, PAPPALARDO G, et al. Comparison of Centella with Flavonoids for Treatment of Symptoms in Hemorrhoidal Disease and After Surgical Intervention: A Randomized Clinical Trial. *Randomized Controlled Trial Sci Rep*. 2020;10(1):8009.
- [17] 张峻玮,李琰,薛海鹏,等.骨碎补经骨髓间充质干细胞调节 OPG/RANKL/RANK 通路抑制破骨细胞的实验研究[J]. *中国骨质疏松杂志*,2019,25(5):617-624.
- [18] 胡流超,罗毅文,程英雄,等.补肾活血汤通过 Runx2/Osterix 促进骨质疏松模型大鼠的骨折愈合[J]. *中国组织工程研究*,2019,23(11):1717-1722.
- [19] 沈耿杨,江晓兵,任辉,等.龟板联合阿仑磷酸钠对激素性骨质疏松大鼠腰椎 Runx2、CTSK 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*,2017,32(5):2181-2185.
- [20] 耿骥,郭文洁,刘佳,等.积雪草酸对结肠癌 HCT116 细胞增殖及自噬水平的影响[J]. *江苏大学学报(医学版)*,2015,25(2):133-136.
- [21] 王剑,郑洪新,刘研,等.补肾益髓中药复方对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织 Runx2 mRNA 及蛋白表达的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*,2014,20(8):890-895.
- [22] DIEGO EMD, NACHER M, RAPADO A, et al. Immunoreactive osteocalcin forms in conditioned media from human osteoblast culture and in sera from healthy adult control subjects and patients with bone pathologies. *Eur J Clin Invest*. 1998;28(1):48-58.
- [23] RITA PM, MARCO R, NICOLA A, et al. Inhibition of miR-21 restores RANKL/OPG ratio in multiple myeloma-derived bone marrow stromal cells and impairs the resorbing activity of mature osteoclasts. *Oncotarget*. 2015;6(29):27343-27358.
- [24] 张倩,杨旭,王媛,等.二仙汤对去势大鼠骨微结构及 ALP、OPG、IL-6 的影响[J]. *世界中西医结合杂志*,2020,15(11):2053-2057+2061.
- [25] 廖腾,孙猛,王众,等.PFNA 配合骨化三醇对股骨骨折患者功能康复及血清 ALP、OPG 水平的影响[J]. *广东医学*,2020,41(7):713-717.
- [26] ALP HH, HUYUT Z, YILDIRIM S, et al. The effect of PDE5 inhibitors on bone and oxidative damage in ovariectomy-induced osteoporosis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(10):1051-1061.
- [27] KANATLI U,ATAOLU B,OZER M, et al. Kyphoplasty for Intractable Pain Due to Glucocorticosteroid-induced Osteoporotic Vertebra Fracture of a 9-Year-Old Patient With Systemic Lupus Erythematosus: 8-Year Follow-up. *J Pediatr Orthop*. 2015;35(6):e55-59.
- [28] 付远锋,李家伟,陈阳斌,等.阿仑磷酸钠片联合骨碎补煎剂对老年骨质疏松患者血清 MMP-9 和 TNF- α 水平的影响[J]. *现代生物医学进展*,2016,16(29):5756-5759.
- [29] 李晓曦,陈宇恒,唐秀凤,等.淫羊藿和女贞子配伍对绝经后骨质疏松大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路的实验研究[J]. *中国骨质疏松杂志*,2019,25(12):1685-1690.
- [30] 叶文静,朱小春,王晓冰,等.积雪草苷通过抑制炎症和纤维化减弱阳霉素诱导的肺间充质纤维化[J]. *中国药理学与毒理学杂志*,2016,30(1):29-37.

(责任编辑: WZH, ZN, ZJP)