

蒙药额尔敦-乌日勒干预激素性股骨头坏死模型大鼠的作用机制

金红光^{1,2}, 石桩¹, 王华新¹, 尼玛², 付勇²

https://doi.org/10.12307/2023.854

投稿日期: 2022-10-25

采用日期: 2022-12-13

修回日期: 2023-03-04

在线日期: 2023-03-21

中图分类号:

R446; R318; R496

文章编号:

2095-4344(2023)35-05670-06

文献标识码: B

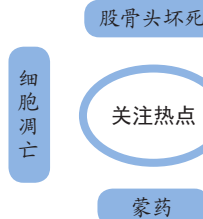
文章快速阅读: 蒙药额尔敦-乌日勒治疗激素性股骨头坏死的相关分析

研究起点

- 激素性股骨头坏死
- 股骨头坏死
- 中西医结合
- 蒙药
- 骨坏死
- 大鼠模型

研究来源

- 股骨头坏死
- 中药治疗
- 蒙药
- 动物模型
- 随机对照实验



研究分支

- 细胞自噬
- 细胞凋亡
- 额尔敦-乌日勒
- 股骨头坏死
- 动物实验

文题释义:

额尔敦-乌日勒:由29味药物配合而成的蒙药,其方中含有藏红花、草果、柯子、牛黄、麝香、草决明、珍珠等,具有扩张毛细血管、改善微循环、抑制血小板聚集和抗血栓等作用,临床上主要用于防治黑、白脉病以及中风、痛风、痹病和全身拘挛等病。

激素性股骨头坏死:是一种类固醇治疗引起的双侧股骨头坏死并发症,致残率高。激素性股骨头坏死的发病机制复杂、多样。长期使用糖皮质激素药物导致股骨头血供受损,骨细胞和骨髓细胞死亡,进而导致结构改变、股骨头塌陷和关节功能障碍。

摘要

背景:激素性股骨头坏死是一种类固醇治疗引起的双侧股骨头坏死并发症,致残率高,然而临床治疗效果并不显著。额尔敦-乌日勒是珍贵蒙药方剂,主要用于防治骨关节疾病,但其改善激素性股骨头坏死的作用机制尚不清楚。

目的:研究蒙药额尔敦-乌日勒(Erden-uril, EU)对激素性股骨头坏死药效作用机制。

方法:将50只大鼠随机分成正常组、股骨头坏死组、低剂量EU组(灌胃0.1 g/kg的蒙药额尔敦-乌日勒)、高剂量EU组(灌胃0.4 g/kg的蒙药额尔敦-乌日勒)和阿仑膦酸钠组(灌胃阳性药阿仑膦酸钠片水溶液)。除正常组外,其余各组大鼠腹腔联合臀肌分别注射脂多糖(10 μg/kg)和甲泼尼松龙(20 mg/kg)建立激素性股骨头坏死模型;灌胃药物1次/d,共6周。6周后,采用苏木精-伊红染色法评估股骨头坏死模型;TUNEL法检测各组股骨头组织中细胞凋亡情况;ELISA和免疫组化法检测各组股骨头组织中促凋亡蛋白Bax和抑凋亡蛋白Bcl-2的表达水平;Western blot法检测各组股骨头组织中ATG5、Beclin-1、LC3II、Caspase-3、Bax和Bcl-2的蛋白表达情况。

结果与结论:①与正常组相比较,股骨头坏死组大鼠股骨头组织空骨陷窝数量增多,且脂肪细胞增大、增多;Bax表达量显著增加,ATG5、Beclin-1、LC3II和Bcl-2表达量显著降低。与股骨头坏死组相比,蒙药额尔敦-乌日勒处理后大鼠空骨陷窝、脂肪细胞均显著减小,脂肪细胞减少,骨髓细胞显著增多;凋亡细胞数显著减少;与股骨头坏死组相比,除Western blot法表明低剂量额尔敦-乌日勒显著上调Bax表达外,其他方法均表明低、高剂量额尔敦-乌日勒显著下调Bax和Caspase-3表达量,显著上调ATG5、Beclin-1、LC3II和Bcl-2表达量;低、高剂量组间蛋白表达差异无显著性意义。②结论:蒙药额尔敦-乌日勒可能通过促进细胞自噬发挥抗凋亡作用保护脂多糖联合甲泼尼松龙引起的大鼠股骨头坏死。

关键词:蒙药;额尔敦-乌日勒;激素性股骨头坏死;凋亡;自噬

缩略语:激素性股骨头坏死:steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, SANFH

Mechanism of Mongolian Medicine Erden-uril on avascular necrosis of the femoral head in rats

Jin Hongguang^{1,2}, Shi Zhuang¹, Wang Huaxin¹, Ni Ma², Fu Yong²

¹Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028005, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Jin Hongguang, Master, Associate chief physician, Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028005, Inner Mongolia Autonomous Region, China; Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Corresponding author: Fu Yong, MD, Professor, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: Steroid-induced avascular necrosis of the femoral head is a complication of bilateral osteonecrosis of the femoral head caused by steroid treatment with a high disability rate, but the therapeutic effect is not significant. Erden-uril is a precious Mongolian medicine prescription, mainly used to prevent and treat bone and joint diseases, but its mechanism of improving steroid-induced avascular necrosis of the femoral head is still unclear.

¹内蒙古民族大学附属医院, 内蒙古自治区通辽市 028005; ²江西中医药大学附属医院, 江西省南昌市 330006

第一作者: 金红光, 男, 1980年生, 内蒙古自治区科左中旗人, 蒙古族, 2014年北华大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事股骨头坏死的发病机制和防治研究。

通讯作者: 付勇, 博士, 教授, 江西中医药大学附属医院, 江西省南昌市 330006

https://orcid.org/0000-0001-9775-9053(金红光)

引用本文: 金红光, 石桩, 王华新, 尼玛, 付勇. 蒙药额尔敦-乌日勒干预激素性股骨头坏死模型大鼠的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(35):5670-5675.



OBJECTIVE: To study the action mechanism of Mongolian Medicine Erden-uril on steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rat.

METHODS: Fifty rats were randomly divided into normal group, model group, low-dose Erden-uril group (0.1 g/kg Erden-uril by gavage), high-dose Erden-uril group (0.4 g/kg Erden-uril by gavage) and alendronate sodium group. Except for the normal group, rats in the other groups were intraperitoneally injected with 10 µg/kg lipopolysaccharide and 20 mg/kg methylprednisolone to establish animal models of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. Administration by gavage in each group was performed once a day for 6 weeks. Subsequently, hematoxylin-eosin staining was used to evaluate the femoral head necrosis model; TUNEL method was used to detect apoptosis in femoral head tissue; ELISA and immunohistochemistry were used to detect the expression levels of pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl-2 in femoral head tissue; and western blot method was used to detect the protein expression of ATG5, Beclin-1, LC3II, Caspase-3, Bax and Bcl-2 in femoral head tissue.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the normal group, the number of empty bone lacunae was significantly increased, and adipocytes were enlarged and increased in the model group; the expression of Bax increased significantly and that of ATG5, Beclin-1, LC3II and Bcl-2 decreased significantly in the model group. Compared with the model group, treatment with Mongolian medicine Erdun-uril could significantly reduce the number of empty bone lacunae and the amount of adipocytes, significantly increase the number of bone marrow cells, and significantly decrease the number of apoptotic cells. Compared with the model group, all methods showed significant down-regulation of Bax and Caspase-3 expression and significant up-regulation of ATG5, Beclin-1, LC3II and Bcl-2 expression after treatment with low and high doses of Erdun-uril, except for western blot detection, which showed significant up-regulation of Bax expression after treatment with low-dose Erdun-uril. Moreover, there was no significant difference in protein expression between low- and high-dose Erdun-uril groups. To conclude, Erdun-uril may protect avascular necrosis of the femoral head induced by lipopolysaccharide combined with methylprednisolone in rats by promoting autophagy with anti-apoptotic effects.

Key Words: Mongolian medicine; Erdun-uril; steroid-induced avascular necrosis of the femoral head; apoptosis; autophagy

How to cite this article: JIN HG, SHI Z, WANG HX, NI M, FU Y. Mechanism of Mongolian Medicine Erden-uril on avascular necrosis of the femoral head in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2023;27(35):5670-5675.

0 引言 Introduction

股骨头缺血性坏死是临床上的常见病、难治病,分为创伤性与非创伤性两种类型。据统计,仅在中国就有 812 万例非创伤性股骨头缺血性坏死患者,非创伤性股骨头坏死类型中最常见的是激素性股骨头坏死 (steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, SANFH),在非创伤性股骨头坏死中高达 51%^[1],已经成为全球日益突出的问题。

SANFH 是一种类固醇治疗引起的双侧股骨头坏死并发症,致残率高^[2]。SANFH 的发病机制复杂、多样,长期使用糖皮质激素药物,导致股骨头血供受损,骨细胞和骨髓细胞死亡,进而导致结构改变、股骨头塌陷和关节功能障碍^[3]。近年来研究表明程序性细胞死亡即细胞凋亡与细胞自噬在参与 SANFH 发生发展中发挥关键作用^[4]。在激素和酒精性骨坏死的早期阶段,检测到骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞和骨髓细胞的凋亡^[5-7]。临床研究表明 SANFH 患者的骨细胞凋亡显著增加^[8]。大剂量糖皮质激素可以诱导骨细胞凋亡,并随着激素剂量的增加细胞凋亡率逐渐升高^[9-11]。此外,骨细胞的凋亡、成骨细胞和破骨细胞的分化还受自噬调节^[12-14]。自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤可以显著降低兔 SANFH 的发生发展^[4]。然而,截至目前,尚未见蒙药通过细胞凋亡和自噬防治激素性股骨头缺血坏死的研究报道。

额尔敦-乌日勒是由 29 味药物配合而组成的蒙药,其方中含有藏红花、草果、柯子、牛黄,麝香、草决明、珍珠等^[15],具有扩张毛细血管、改善微循环、抑制血小板聚集和抗血栓等作用,临床上主要用于防治黑、白脉病及中风、痛风、痹病和全身拘挛等病^[16]。当前,额尔敦-乌日勒临床应用研究占多数,而药理研究相对不足,主要集中于防治心脑血管疾病和神经系统疾病等疾病的作用机制^[17]。内蒙古民族大学附属医院科室临床研究发现蒙药额尔敦-乌日勒治疗早期股骨头坏死具有较显著的效果^[18],但其改善 SANFH 的作用机制尚不清楚。因此,该文章拟采用脂多糖联合激素诱导的股骨头坏死模型,从细胞自噬和凋亡角度探讨额尔敦-乌日勒防治 SANFH 的作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。采用独立样本 *t* 检验对两组数值进行比较,采用单因素方差分析 Dunnett 法对多组数值进行比较。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 1 月至 2022 年 8 月在江西中医药大学实验动物中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验试剂 脂多糖 (批号: L8880, 北京索莱宝科技有限公司); 甲泼尼松龙 (MPS, 批号: AP5394, 比利时辉瑞有限公司); 庆大霉素 (批号: 2007007, 金馥康生物药业股份有限公司); 额尔敦-乌日勒 (Erden-uril, EU; 批号: M14060733, 内蒙古蒙药股份有限公司); 阿仑膦酸钠 (批号: S012746, 新加坡 MSD PHARMA 有限公司); 大鼠 Bcl-2 ELISA 检测试剂盒和 大鼠 Bax ELISA 检测试剂盒 (批号: ER0762 和 ER0512, 武汉菲恩生物科技有限公司); TUNEL 凋亡检测试剂盒 (批号: C1088, 上海碧云天生物技术有限公司); LC3 I / II 抗体 (批号: AF5402, Affinity 生物科学有限公司), beclin-1 抗体 (批号: 11306-1-ap, Proteintech 生物科学有限公司), ATG5 抗体、Caspase 3 抗体、Bax 抗体和 Bcl-2 抗体 (批号: ab108327、ab184787, ab32503 和 ab196495, 英国 Abcam 生物科学有限公司); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L) (批号: ZB-2301 北京中杉金桥生物技术有限公司); DAB 显色试剂盒 (批号: CW0125, 北京康为世纪生物技术有限公司)。

1.3.2 实验动物与分组 取 6-8 周龄、体质量 200-220 g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号: SCXK(湘) 2019-0004,在普通环境适应 1 周后将大鼠随机分为正常组 10 只,模型组 40 只。实验方案经内蒙古民族大学附属医院医学伦理委员会审查、批准 (NM-LL-2021-03-09-27)。

1.3.3 仪器 显微镜 (BX43, 奥林巴斯 (中国) 有限公司); 切片机 (2235, 徕卡微系统有限公司); 电热鼓风干燥箱 (HGZF-101-1, 上海跃进医疗器械有限公司); 全自动酶标仪 (WD-2102F, 北京六一生物科技有限公司); 荧光显微镜 (CKX53, 奥林巴斯 (中

国)有限公司]。

1.4 实验方法

1.4.1 动物造模与药物干预 参照文献采用内毒素联合甲泼尼松龙建立大鼠 SANFH 模型^[19]。大鼠适应 1 周后, 随机取 40 只大鼠, 第 1 天给予大鼠臀肌注射 16×10^4 U 庆大霉素, 连续注射 3 d; 第 4 天腹腔注射剂量为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的脂多糖; 第 5-7 天联合注射脂多糖 ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) 和甲泼尼松龙 ($20 \text{mg}/\text{kg}$); 第 8-15 天每天臀肌注射 1 次 16×10^4 U 庆大霉素。如果造模后大鼠股骨头病理观察有空骨陷窝形成、骨细胞核固缩和周围骨髓细胞坏死则认为模型成功^[20]。将 SANFH 模型大鼠随机分成 4 组: 股骨头坏死组大鼠灌胃生理盐水; 阿仑膦酸钠组灌胃阿仑膦酸钠, 剂量为 $7 \text{mg}/\text{kg}$; 低剂量 EU 组, 灌胃额尔敦-乌日勒, 剂量为 $0.1 \text{g}/\text{kg}$; 高剂量 EU 组, 灌胃额尔敦-乌日勒, 剂量为 $0.4 \text{g}/\text{kg}$ 。灌胃 1 次/d, 共 6 周。给药结束后采用戊巴比妥钠 ($15-40 \text{mg}/\text{kg}$) 腹腔注射麻醉大鼠后, 眼眶采血, 收集的血液于室温下静置 30 min 后, $3\ 000 \times g$ 离心 10 min, 所得上清即为大鼠血清; 同时取大鼠股骨头, 将一部分股骨头保存于 4°C 预冷的多聚甲醛固定液中, 另一部分进行液氮保存备用。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	探讨额尔敦-乌日勒防治激素性股骨头坏死的作用机制
选择动物的条件	取 6-8 周龄、体质量 200-220 g 的雄性 SD 大鼠 50 只
模型与所研究疾病的关系	内毒素联合激素构建的大鼠模型为研究激素性股骨头坏死发病机制的经典模型 ^[19]
造模技术描述	随机取 40 只大鼠, 第 1 天给予大鼠臀肌注射 16×10^4 U 庆大霉素, 连续注射 3 d; 第 4 天腹腔注射剂量为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的脂多糖; 第 5-7 天联合注射脂多糖 ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) 和甲泼尼松龙 ($20 \text{mg}/\text{kg}$); 第 8-15 天每天臀肌注射 1 次 16×10^4 U 庆大霉素
造模主要诱导用药	庆大霉素, 脂多糖, 甲泼尼松龙
动物数量及分组方法	将激素性股骨头坏死模型大鼠随机分成 4 组: 股骨头坏死组、阿仑膦酸钠组、低剂量 EU 组、高剂量 EU 组, 每组 10 只; 另取 10 只为正常组
造模成功评价指标	股骨头病理观察有空骨陷窝形成、骨细胞核固缩和周围骨髓细胞坏死则认为模型成功 ^[20]
造模后实验观察指标	①大鼠股骨头坏死病理形态; ②股骨头组织中细胞凋亡情况; ③股骨头组织中促凋亡蛋白 Bax 和抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平; ④股骨头组织中 ATG5、Beclin-1、LC3 II、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达
造模成功后动物处理	股骨头坏死组大鼠灌胃生理盐水; 阿仑膦酸钠组大鼠灌胃 $7 \text{mg}/\text{kg}$ 阿仑膦酸钠; 低、高剂量 EU 组大鼠分别灌胃 $0.1, 0.4 \text{g}/\text{kg}$ 额尔敦-乌日勒, 1 次/d, 共 6 周。结束后麻醉下处死大鼠, 取血液和股骨头组织
伦理委员会批准	实验方案经内蒙古民族大学附属医院医学伦理委员会审查、批准 (NM-LL-2021-03-09-27)

1.4.2 苏木精-伊红染色 骨组织用 10% EDTA 脱钙, 蒸馏水浸洗, 取出组织流水冲洗数小时, 具体方法参照谢磊等^[21]所述, 采用苏木精-伊红染色后, 于光镜下观察股骨头组织病理学改变。

1.4.3 ELISA 检测 Bax 和 Bcl-2 水平 取各组股骨头组织 1 g 放入研钵, 以液氮研磨成粉末状后取 0.1 g 粉末加入 1 mL 裂解液, 置于冰上裂解 30 min 后, 于 4°C $10\ 000 \times g$ 离心 10 min, 小心吸取上清。采用 ELISA 试剂盒检测股骨头组织中 Bax 和 Bcl-2 水平, 具体方法参照 ELISA 试剂盒说明书。

1.4.4 TUNEL 法检测骨细胞凋亡情况 参照王哲等^[22]所述方法, 取骨组织置于 1% zinc 固定液中固定 48 h, 取出, 于流水冲洗后, 自动脱水机中脱水 (不同体积分数乙醇、二甲苯和石蜡), 再放置于包埋机进行石蜡包埋, 连续切片 (厚度为 $3.0-4.0 \mu\text{m}$), 将切片依次进行烤片 (65°C 2 h), 二甲苯洗 ($10 \text{min} \times 2$ 次), 不同体积分数乙醇洗 (100%, 95%, 80% 各 5 min); 转入湿盒, 滴加 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K (37°C , 30 min), PBS 洗 (3 次 $\times 5 \text{min}$); 参照 TUNEL 试剂盒说明书操作后, 用抗荧光淬灭封固, 荧光显微镜拍照, 采用 Image J 软件定量荧光强度, 计算阳性细胞数, 平均荧光强度 = 总荧光强度值 / 细胞数。

1.4.5 免疫组化法检测骨组织凋亡相关蛋白水平 参照 1.4.2 所述方法获得各组大鼠股骨头切片, 依次进行烤片 (65°C 2 h), 二甲苯洗 ($10 \text{min} \times 2$ 次), 不同体积分数乙醇洗 (100%, 95%, 80% 各 5 min), 水洗, 高压抗原修复 (3 min), PBS 洗 (3 次 $\times 5 \text{min}$), 滴加体积分数 3% H_2O_2 除过氧化物酶活性, PBS 洗 (3 次 $\times 5 \text{min}$), 滴加封闭液 (体积分数 5% 山羊血清 + 0.5% BSA), 室温孵育盒内封闭 2 h, 加一抗工作液 (Bax 和 Bcl-2 浓度均为 1 : 1 000) 4°C 过夜孵育, PBS 洗 (3 次 $\times 5 \text{min}$), 加二抗液室温孵育 2 h, PBST 洗 (3 次 $\times 5 \text{min}$), 加 HRP 工作液孵育 15 min, PBST 洗 (3 次 $\times 5 \text{min}$), 滴加 DAB 显色液 100 s, 显微镜下观察阳性反应, 流水冲洗, 苏木素染色 5 min, 盐酸乙醇分化 10 s, 脱水, 封固, 拍照, 在每张载玻片上随机选择 5 个区域, 使用 Image J 在 200 放大倍数下评估阳性染色区的吸光度值。阳性区平均吸光度值 / 阳性区面积为各组骨组织凋亡相关蛋白水平。

1.4.6 Western blot 检测凋亡及自噬相关蛋白表达 取各组股骨头组织 1 g 放入研钵, 以液氮研磨成粉末状后取 0.1 g 粉末加入 1 mL 裂解液, 置于冰上裂解 30 min 后, 于 4°C $10\ 000 \times g$ 离心 10 min, 小心吸取上清, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。单样取 $40 \mu\text{g}$ 总蛋白与上样缓冲液混匀煮后, 加入 SDS-PAGE 凝胶孔中, 依次进行电泳 (100 V, 1.5 h)、湿法转膜 (200 mA 1.5 h)、一抗溶液过夜孵育 (GAPDH 和 ACTIN 浓度 1 : 2 000, Caspase-3、Bcl-2、LC3 I / II、Beclin-1 和 ATG5 抗体浓度均为 1 : 1 000)、TBST 漂洗 (3 次 $\times 15 \text{min}$)、二抗溶液 (1 : 5 000) 室温孵育 2 h、TBST 漂洗 (3 次 $\times 15 \text{min}$)、滴加 ECL 曝光液、于凝胶成像系统内拍摄图片。目的蛋白和内参蛋白条带灰度值用 Image J 软件进行定量分析, 目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值 / 内参蛋白灰度值。

1.5 主要观察指标 ①大鼠股骨头坏死病理形态; ②股骨头组织中细胞凋亡情况; ③股骨头组织中促凋亡蛋白 Bax 和抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平; ④股骨头组织中 ATG5、Beclin-1、LC3 II、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达情况。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析, 定量结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本 *t* 检验对两组数值进行比较, 采用单因素方差分析 Dunnett 法对多组数值进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章的统计学方法已经内蒙古民族大学附属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 实验选入 50 只大鼠, 共分为 5 组, 全部进入结果分析。

2.2 额尔敦-乌日勒对股骨头坏死病理形态的影响 正常组大鼠的骨小梁排列规则, 骨细胞分布均匀, 空骨陷窝和脂肪细胞数量少; 与正常组比较, 股骨头坏死组大鼠的空骨陷窝数量和脂肪细胞增大、增多; 与股骨头坏死组比较, 高剂量 EU 组和阿仑膦酸钠组大鼠的空骨陷窝、脂肪细胞均显著减少, 骨髓细胞显著增多; 低剂量 EU 组与股骨头坏死组相近, 结果如图 1 所示。

2.3 额尔敦-乌日勒对大鼠股骨头组织中细胞凋亡的影响 与正常组比较, 在脂多糖处理的 SANFH 模型中, 细胞凋亡数显著增加 ($P < 0.001$); 与股骨头坏死组比较, 经额尔敦-乌日勒或阿仑膦酸钠处理后, 细胞凋亡数显著减少 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 结果如图 2 所示。

2.4 额尔敦-乌日勒对大鼠股骨头组织中凋亡相关蛋白表达的影响 与正常组比较, 促凋亡蛋白 Bax 在 SANFH 模型大鼠的股骨头组织中表达显著升高 ($P < 0.001$); 与股骨头坏死组相比, 经低、高剂量额尔敦-乌日勒或阿仑膦酸钠处理后, Bax 在股骨头组织中表达显著降低 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$)。而抑凋亡蛋白 Bcl-2 在 SANFH 的股骨头组织中表达量显著低于正常组 ($P < 0.001$); 与股骨头坏死组相比, 经低、高剂量额尔敦-乌日勒处理后, Bcl-2 在股骨头组织中表达显著增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 而阿仑膦酸钠处理无显著差异, 但具有增加趋势。结果如图 3 所示。

2.5 额尔敦-乌日勒对大鼠股骨头组织中凋亡相关蛋白含量的影响 与正常组相比, 股骨头坏死组大鼠的促凋亡蛋白 Bax 表达水平显著增加 ($P < 0.05$); 与股骨头坏死组相比, 经额尔敦-乌日勒处理后, 低、高剂量的额尔敦-乌日勒均显著降低 Bax 水平 (分别为 $P < 0.001$ 和 $P < 0.05$, 图 4A); 与之相反, 低、高剂量的额尔敦-乌日勒均显著增加抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平 ($P < 0.05$, 图 4B); 阳性药阿仑膦酸钠则显著增加 Bcl-2 水平 ($P < 0.05$), 而不影响 Bax 水平, 结果如图 4 所示。

2.6 额尔敦-乌日勒对大鼠股骨头组织中细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响 与正常组比较, 股骨头坏死组大鼠 Bax 和凋亡关键蛋白酶 Caspase-3 表达量显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Bcl-2 表达量显著下降 ($P < 0.001$); 与股骨头坏死组相比, 经高剂量额尔敦-乌日勒处理后, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$); 然而, 经低剂量额尔敦-乌日勒处理后 Bax 表达显著上调 ($P < 0.001$), 结果如图 5 所示。

2.7 额尔敦-乌日勒对大鼠股骨头组织中细胞自噬相关蛋白的影响 与正常组比较, 股骨头坏死组大鼠自噬相关蛋白 ATG5、Beclin-1 和 LC3 II 表达量显著降低 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$); 与股骨头坏死组相比, 经低剂量额尔敦-乌日勒处理后, ATG5、Beclin-1 和 LC3 II 表达量显著增加 ($P < 0.001$); 高剂量额尔敦-乌日勒显著增加 ATG5 和 LC3 II 的表达量 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 结果如图 6 所示。

3 讨论 Discussion

SANFH 是最常见的股骨头坏死类型。随着激素的大量使用, 罹患此病者数以千万计, 并仍在迅猛地增长, 如果治疗不当也会导致股骨头塌陷和骨关节炎^[23]。此次研究采用蒙药额尔敦-乌日勒防治脂多糖联合激素构建的大鼠 SANFH 模型, 结果表明蒙药额尔敦-乌日勒可通过促进自噬抑制骨细胞凋亡显著缓解 SANFH。

研究表明, 地塞米松和糖皮质激素可诱导成骨细胞凋亡导致 SANFH^[24]。激素、酒精和 (或) 其代谢产物可直接导致骨细胞发生凋亡^[25], 且骨细胞凋亡参与糖皮质激素诱导的股骨头早期缺血性坏死的病理改变^[26]。也有研究报道甲泼尼松龙以剂量依赖的方式增加 SANFH 模型中骨细胞的自噬, 影响成骨细胞和破骨细胞之间的相互作用^[27], 甲泼尼松龙构建的 SANFH 模型坏死区域会从骨骺延伸到股骨干。以高剂量脂多糖联合 3 次注射大剂量甲泼尼松龙诱导股骨头坏死发病率高 (85%), 但伴有高实验动物死亡率 (50%)^[28]。此次研究以低剂量脂多糖联合 3 次注射大剂量甲泼尼松龙可诱导股骨头坏死达到高发病率和低动物死亡率^[19]。

Bax、Caspase-3 和 Bcl-2 分别作为促凋亡和抗凋亡的调节因子, 且 Bcl-2 与 Bax 之间的失衡是地塞米松诱导成骨细胞凋亡的重要原因^[23]。研究发现 SANFH 患者体内 Caspase-3 表达水平升高, 激活的 Caspase-3 导致成骨细胞凋亡^[29]。此外, 地塞米松处理骨细胞后, 骨细胞中 caspase-3 和 Bax 的表达增加, Bcl-2 的蛋白表达降低, 显著促进骨细胞凋亡^[30]。采用红花多糖和蒜素处理成骨细胞后, Caspase-3 活性和 PI3K/AKT 通路被抑制, 成骨细胞凋亡数量显著降低^[10, 31]。红花多糖和仙鹤草多糖还可以通过上调 Bcl-2 表达保护激素诱导的细胞凋亡^[32-33]。此次研究中, 与股骨头坏死组相比, 仅高剂量的蒙药额尔敦-乌日勒可显著下调 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达, 且高剂量 EU 组的 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达小于低剂量 EU 组, 显著上调 Bcl-2 蛋白表达, 推测其具有抗细胞凋亡作用; 但 TUNEL 实验显示低剂量 EU 组的凋亡细胞数比高剂量 EU 组的高, 且免疫组化和 ELISA 实验显示低剂量 EU 组的 Bax 表达却又低于高剂量 EU 组, 相比具有降低趋势, 推测原因可能是取股骨头的位置不同引起, 不同部位所存在的凋亡细胞种类及数量可能不同。因此, 额尔敦-乌日勒具体影响激素诱导坏死股骨头中何种细胞凋亡有待进一步确定。

自噬与凋亡均属细胞程序性死亡的类型, 两者相互制约、相互调控。自噬可以通过抑制 caspase 表达或活性阻断细

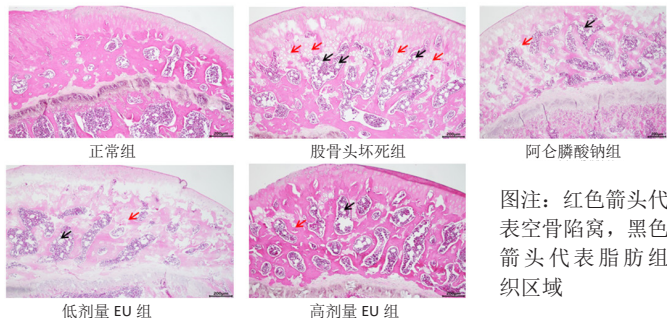
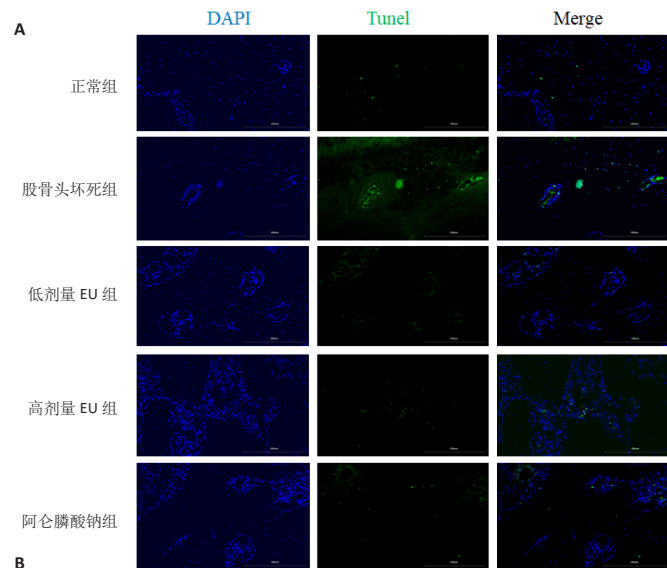
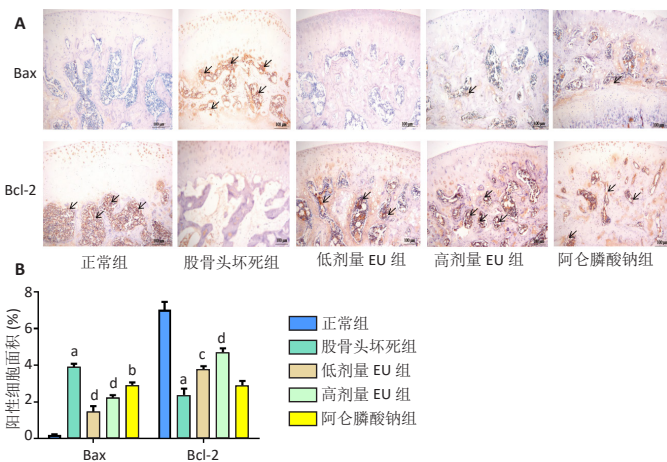


图1 | 额尔敦-乌日勒(EU)对大鼠股骨头形态的作用(标尺=200 μm)
Figure 1 | Effect of Erden-uril on the morphology of the rat femoral head (scale bar=200 μm)



图注: 图A为荧光显微镜观察(标尺=100 μm); B为各组细胞凋亡统计学分析,与正常组比较,^a $P < 0.001$;与股骨头坏死组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$

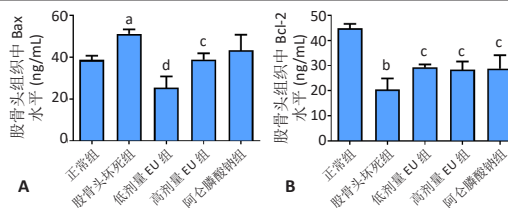
图2 | 额尔敦-乌日勒(EU)对大鼠股骨头组织中细胞凋亡的作用
Figure 2 | Effect of Erden-uril on cell apoptosis in rat femoral head tissue



图注: 图A为免疫组化染色(箭头指阳性细胞,标尺=100 μm); B为各组阳性细胞面积比较,与正常组比较,^a $P < 0.001$;与股骨头坏死组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$,^d $P < 0.001$

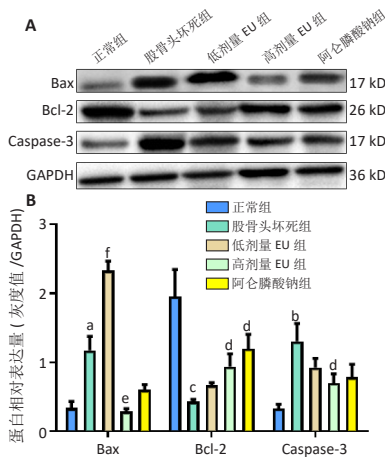
图3 | 免疫组化法检测额尔敦-乌日勒(EU)对大鼠股骨头组织中Bcl-2和Bax的作用

Figure 3 | Effect of Erden-uril on Bcl-2 and Bax expression in rat femoral head tissue detected by immunohistochemical method



图注: 图A为促凋亡蛋白Bax水平; B为抑凋亡蛋白Bcl-2水平。与正常组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与股骨头坏死组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.001$

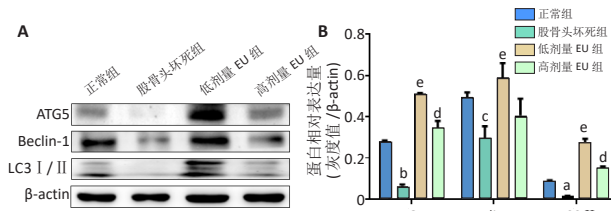
图4 | ELISA法检测额尔敦-乌日勒(EU)对股骨头组织中Bcl-2和Bax水平的影响
Figure 4 | Effect of Erden-uril on Bcl-2 and Bax levels in rat femoral head tissue detected by ELISA



图注: 图A为凋亡相关蛋白免疫印迹条带; B为蛋白表达的量化分析,与正常组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$;与股骨头坏死组比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$,^f $P < 0.001$

图5 | Western-blot检测额尔敦-乌日勒(EU)对大鼠股骨头组织中凋亡相关蛋白的作用

Figure 5 | Effect of Erden-uril on apoptosis-related proteins in rat femoral head tissue detected by western blot assay



图注: 图A为自噬相关蛋白免疫印迹条带; B为蛋白表达的量化分析,与正常组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$;与股骨头坏死组比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.001$

图6 | Western-blot检测额尔敦-乌日勒(EU)对大鼠股骨头组织中细胞自噬相关蛋白的作用

Figure 6 | Effect of Erden-uril on autophagy-related proteins in rat femoral head tissue detected by western blot assay

胞凋亡,降低细胞损伤,促进细胞存活^[34]。ATG5介导的自噬通过P53/Rb通路调控细胞凋亡^[35]。地塞米松诱导Bax、caspase-3和LC3表达水平显著增加,以及P62和Bcl-2表达水平显著降低,导致成骨细胞凋亡^[36],而甲状腺激素可以通过增强细胞自噬来减轻地塞米松诱导的MLO-Y4骨细胞的凋亡过程^[37]。研究表明骨细胞中beclin-1的减少伴随着骨细胞Caspase-3的增加,表现出自噬的抗凋亡活性减弱^[38]。采用匹诺西布林抑制骨细胞中的PI3K/Akt/mTOR通路,可以激活细胞自噬,减轻糖皮质激素诱导的细胞凋亡^[39],而采用高活性血小板裂解物可抑制自噬保护激素诱导的大鼠股骨头缺血性坏死^[40]。此外,切除卵巢也会诱导骨细胞凋亡,推测是因骨细胞Beclin-1和LC3 I的减少和骨细胞p62增加所致^[41]。也有研究表明中药健骨散和淫羊藿可通过调节自噬改善股骨头缺血性坏死^[42-43]。此次研究中,股骨头坏死组自噬

标记物 ATG5、Beclin-1 和 LC3 II 等表达量显著降低, 经低剂量蒙药额尔敦-乌日勒处理后, ATG5、Beclin-1 和 LC3 II 表达量显著增加, 表明低剂量额尔敦-乌日勒可促进细胞自噬作用, 但蒙药额尔敦-乌日勒作用于股骨头组织中的何种细胞有待进一步验证。

由于股骨头坏死的修复机制非常复杂, 临床上其治疗方法主要以髋关节置换术为主, 但手术风险高、创伤程度大、假体耐久性较差、需再次手术、费用昂贵, 给患者家庭和社会带来沉重的经济和心理负担。内蒙古民族大学附属医院科室临床研究显示蒙药额尔敦-乌日勒临床疗效显著, 但作用机制不明。此次研究表明蒙药额尔敦-乌日勒能够显著抑制大鼠 SANFH, 其作用机制可能是通过促进股骨头组织中的细胞自噬发挥抑制细胞凋亡作用。该研究为蒙药额尔敦-乌日勒在 SANFH 临床治疗上的科学应用提供了理论依据。

作者贡献: 实验设计和论文写作为第一作者, 实验实施为第一、二作者, 资料收集和数据统计为第三、四作者, 实验评估为通讯作者。

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。

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。

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。

出版规范: 文章撰写遵守了《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

- CHAO PC, CHIEN WC, CHUNG CH, et al. Correlation between miR-1207-5p expression with steroid-induced necrosis of femoral head and VEGF expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(7):2710-2718.
- LI X, LI Y, LI L, et al. Overactivated autophagy contributes to steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. *Exp Ther Med.* 2017;14(1):367-372.
- WANG A, REN M, WANG J. The pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: A systematic review of the literature. *Gene.* 2018;671:103-109.
- 孙亮, 刘万林, 娜日松, 等. 3-甲基腺嘌呤调控自噬基因 Beclin1 可降低模型兔激素性股骨头缺血坏死的发生与发展 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(15): 2391-2396.
- MANOLAGAS SC, WEINSTEIN RS, NICHOLAS RW. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(8):2907-2912.
- MORIISHI T, MARUYAMA Z, FUKUYAMA R, et al. Overexpression of Bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. *PLoS one.* 2011;6(11):e27487.
- WEINSTEIN RS, O'BRIEN CA, ALMEIDA M, et al. Osteoprotegerin prevents glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis in mice. *Endocrinology.* 2011;152(9): 3323-3331.
- WEINSTEIN R, NICHOLAS R, MANOLAGAS S. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(8):2907-2912.
- ZALAVRAS C, SHAH S, BIRNBAUM M, et al. Role of apoptosis in glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2003; 13(2-4):221-235.
- ZHAN J, YAN Z, ZHAO M, et al. Allicin inhibits osteoblast apoptosis and steroid-induced necrosis of femoral head progression by activating the PI3K/AKT pathway. *Food Funct.* 2020;11(9):7830-7841.
- BAI R, FENG W, LIU W, et al. Roles of osteocyte apoptosis in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. *Genet Mol Res.* 2016;15(1). doi: 10.4238/gmr.15017529.
- LAI E, HONG C, KOK S, et al. Simvastatin alleviates the progression of periapical lesions by modulating autophagy and apoptosis in osteoblasts. *J Endoc.* 2012; 38(6):757-763.
- WHITEHOUSE C, WATERS S, MARCHBANK K, et al. Neighbor of Brca1 gene (Nbr1) functions as a negative regulator of postnatal osteoblastic bone formation and p38 MAPK activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(29):12913-12918.

- YOUSEFI S, PEROZZO R, SCHMID I, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2006;8(10):1124-1132.
- 白珍, 莲花. 额尔敦-乌日勒药理作用及机制研究 [J]. *中国蒙医药 (蒙)*, 2016, 11(6):4.
- 蒙医学编辑委员会. 中国医学百科全书·蒙医学 [M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 1987. (蒙文版):862.
- 宝莉莉, 宋福顺, 都格尔, 等. 蒙药额尔敦-乌日勒的研究进展 [J]. *中国民族民间医药*, 2019, 28(3):53-56.
- 玉春, 阿拉坦格日乐, 特木日巴根, 等. 蒙药苏木-6 治疗股骨头坏死 97 例临床疗效观察 [J]. *中国民族医药杂志*, 2016, 22(1):14-15.
- WU X, YANG S, DUAN D, et al. Experimental osteonecrosis induced by a combination of low-dose lipopolysaccharide and high-dose methylprednisolone in rabbits. *Joint Bone Spine.* 2008;75(5):573-578.
- 蒋玮, 曹林忠, 郭明峻, 等. 激素性股骨头坏死动物模型的建立及评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6):799-804.
- 谢磊, 张严, 姜自伟, 等. 引导骨再生技术结合补肾法修复大鼠股骨骨缺损 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(26):4106-4111.
- 王哲, 李炎, 姜理想, 等. 富血小板血浆联合髓腔减压调控激素性股骨头坏死模型兔氧化应激反应 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(11):1677-1682.
- XUE X, FENG Z, LI Z, et al. Salidroside inhibits steroid-induced avascular necrosis of the femoral head via the PI3K/Akt signaling pathway: In vitro and in vivo studies. *Mol Med Rep.* 2018;17(3):3751-3757.
- FENG Z, ZHENG W, TANG Q, et al. Fludarabine inhibits STAT1-mediated up-regulation of caspase-3 expression in dexamethasone-induced osteoblasts apoptosis and slows the progression of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rats. *Apoptosis.* 2017;22(8):1001-1012.
- GLIMCHER MJ, KENZORA JE. The Biology of Osteonecrosis of the Human Femoral Head and its Clinical Implications: III. Discussion of the Etiology and Genesis of the Pathological Sequelae; Comments on Treatment. *Clin Orthop Relat Res.* 1979;(140):273-312.
- 宋奕, 丁道芳, 李玲慧, 等. 细胞凋亡在激素性股骨头坏死机制中的研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2013, 21(21):2163-2165.
- LUO P, GAO F, HAN J, et al. The role of autophagy in steroid necrosis of the femoral head: a comprehensive research review. *Int Orthop.* 2018;42(7):1747-1753.
- YAMAMOTO T, HIRANO K, TSUTSUI H, et al. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;(316):235-243.
- XU X, WEN H, HU Y, et al. STAT1-caspase 3 pathway in the apoptotic process associated with steroid-induced necrosis of the femoral head. *J Mol Histol.* 2014; 45(4):473-485.
- LV W, YU M, KONG P, et al. Total flavonoids of *Rhizoma drynariae* ameliorate steroid-induced avascular necrosis of the femoral head via the PI3K/AKT pathway. *Mol Med Rep.* 2021;23(5):345.
- CUI D, ZHAO D, WANG B, et al. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) polysaccharide attenuates cellular apoptosis in steroid-induced avascular necrosis of femoral head by targeting caspase-3-dependent signaling pathway. *Int J Biol Macromol.* 2018;116:106-112.
- CUI D, ZHAO D, HUANG S. Structural characterization of a safflower polysaccharide and its promotion effect on steroid-induced osteonecrosis in vivo. *Carbohydr Polym.* 2020;233:115856.
- HUANG W, JIN S, YANG W, et al. Protective effect of *Agrimonia pilosa* polysaccharides on dexamethasone-treated MC3T3-E1 cells via Wnt/ β -Catenin pathway. *J Cell Mol Med.* 2020;24(3):2169-2177.
- HAN X, ZHANG P, JIANG R, et al. Explore on the effect of ATF6 on cell growth and apoptosis in cartilage development. *Histochem Cell Biol.* 2014;142(5):497-509.
- KIM J, CHEE W, YABUTA N, et al. Atg5-mediated autophagy controls apoptosis/anoikis via p53/Rb pathway in naked mole-rat fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;528(1):146-153.
- PENG P, NIE Z, SUN F, et al. Glucocorticoids induce femoral head necrosis in rats through the ROS/JNK/c-Jun pathway. *FEBS Open Bio.* 2021;11(1):312-321.
- ZHU L, CHEN J, ZHANG J, et al. Parathyroid Hormone (PTH) Induces Autophagy to Protect Osteocyte Cell Survival from Dexamethasone Damage. *Med Sci Monit.* 2017;23:4034-4040.
- ZHU Y, ZHAO L, LIU L, et al. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein Cell.* 2010;1(5):468-477.
- WANG X, GONG L, HUANG J, et al. Pinocembrin alleviates glucocorticoid-induced apoptosis by activating autophagy via suppressing the PI3K/Akt/mTOR pathway in osteocytes. *Eur J Pharmacol.* 2020;880:173212.
- HUANG Z, WANG Q, ZHANG T, et al. Hyper-activated platelet lysates prevent glucocorticoid-associated femoral head necrosis by regulating autophagy. *Biomed Pharmacother.* 2021;139:111711.
- FLORENCIO-SILVA R, SASSO GRS, SASSO-CERRI E, et al. Effects of estrogen status in osteocyte autophagy and its relation to osteocyte viability in alveolar process of ovariectomized rats. *Biomed Pharmacother.* 2018;98:406-415.
- HAN J, CHAI Y, ZHANG X, et al. gGujiansan Ameliorates Avascular Necrosis of the Femoral Head by Regulating Autophagy via the HIF-1/BNIP3 Pathway. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM. 2021;2021:6683007.
- LIU S, HUANG Y, WANG C, et al. Epimedium protects steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rats by inhibiting autophagy. *Exp Ther Med.* 2018; 16(6):5047-5052.

(责任编辑: WZH, ZN, ZJP)