

老鹳草素对家兔实验性骨质疏松骨折的治疗作用及机制研究

安宁^{1,2)}, 刘光¹⁾, 王艾云¹⁾, 潘杨进¹⁾, 张明³⁾, 喻卓⁴⁾, 陈鹏¹⁾

(1)昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500;
2)昆明市食品药品检验所, 云南昆明 650034; 3)昆明医科大学海源学院, 云南昆明 650106;
4)昆明医科大学第一附属医院心内科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 研究老鹳草素(Geraniin)对家兔实验性骨质疏松骨折的治疗作用及其机制。**方法** 将家兔随机分为假手术组、模型组、老鹳草素不同剂量组(20、10、5 mg/kg)和辛伐他汀组(5 mg/kg)。利用去势法和桡骨中段骨缺损构建家兔骨质疏松骨折(osteoporotic fracture, OPF)模型。采用骨密度仪检测家兔骨密度变化; 采用X线影像和Micro CT检测家兔骨质疏松骨折愈合情况; 采用骨强度仪检测骨生物力学变化; 采用HE染色检测骨组织病理学变化; 采用全自动生化分析仪和Elisa检测血清骨转换生化标志物和骨灰成分中钙盐和磷盐含量变化。**结果** 老鹳草素显著提高OPF家兔股骨、脊柱及全身的骨密度($P < 0.01$), 改善骨髓腔通畅性与骨皮质连续性, 增加了OPF家兔的骨体积/总体积、减少骨表面积/骨体积, 并改善骨小梁结构的完整性, 增加骨小梁数量及骨小梁厚度、缩小骨小梁间距。另外, 老鹳草素提升了OPF家兔最大载荷、结构刚度和最大位移等生物力学指标, 改善骨微结构。此外, 老鹳草素显著升高OPF家兔血清中的钙(Ca^{2+})、磷(P)水平, 降低碱性磷酸酶(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)、I型胶原交联羧基末端肽(CTX-1)和尿脱氧吡啶啉(DPD)的水平($P < 0.01$), 增加骨灰中的钙盐、磷盐含量($P < 0.01$)。**结论** 老鹳草素能够有效促进骨质疏松骨折的愈合, 改善骨微结构和生物力学性能, 其作用机制可能与增加骨矿盐含量、调节骨代谢相关。

[关键词] 老鹳草素; 骨质疏松骨折; 骨微结构; 生物力学

[中图分类号] R681 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)12-0010-09

Therapeutic Effect and Mechanism of Geraniin on Experimental Osteoporotic Fracture in Rabbits

AN Ning^{1,2)}, Liu Guang¹⁾, WANG AiYun¹⁾, PAN YangJin¹⁾,
ZHANG Ming³⁾, YU Zhuo⁴⁾, Chen Peng¹⁾

(1) School of Pharmaceutical Sciences and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Kunming Food and Drug Inspection Center, Kunming Yunnan 650034; 3) Haiyuan College, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650106; 4) Dept. of Cardiology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To study the therapeutic effect and mechanism of geraniin on experimental osteoporotic fracture (OPF) in rabbits. **Methods** Rabbits were randomly divided into sham operation group, model group, different doses of geraniin groups (20, 10, 5 mg/kg) and simvastatin group (5 mg/kg). OPF model of rabbits was constructed by ovariectomy and bone defect in the middle radius. The changes of bone mineral

[收稿日期] 2024-04-25

[基金项目] 国家自然科学基金(82360088); 云南省科技厅-昆明医科大学联合重点项目(2201AY070001-001); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(202101AY070001-020); 云南省老年疾病临床医学研究中心专项资金(202102AA310069)

[作者简介] 安宁(1987~), 女, 云南昆明市人, 学士, 主管药师, 主要从事老年病药理学的研究工作。安宁, 刘光对本文有同等的贡献。

[通信作者] 陈鹏, E-mail: ynkmc@gmail.com; 喻卓, E-mail: dr_yuzhuo@163.com; 张明, E-mail: 804107862@qq.com

density in rabbits were detected by bone densitometer. X-ray imaging and Micro CT were used to detect the healing of osteoporotic fractures in rabbits. Bone biomechanical changes were detected by bone strength instrument. The pathological changes of bone tissue were detected by HE staining. Automatic biochemical analyzer and Elisa were used to detect the changes of serum bone turnover biochemical markers and calcium salt and phosphorus salt content in ash composition. **Results** Geraniin significantly increased the bone mineral density of femur, spine and the whole body of OPF rabbits ($P < 0.01$), improved the patency of bone marrow cavity and the continuity of bone cortex, increased the bone volume / total volume of OPF rabbits, reduced the bone surface area / bone volume, improved the integrity of trabecular structure, increased the number of trabecular bone and the thickness of trabecular bone, and reduced the spacing of trabecular bone. In addition, geraniin improved biomechanical indexes such as maximum load, structural stiffness and maximum displacement of OPF rabbits, and improved bone microstructure. In addition, geraniin significantly increased the levels of calcium (Ca^{2+}) and phosphorus (P) in serum of OPF rabbits, decreased the levels of alkaline phosphatase (ALP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP), type I collagen cross-linked carboxyl terminal peptide (CTX-1) and urinary deoxypyridinoline (DPD) ($P < 0.01$), and increased the contents of calcium and phosphorus in bone ash ($P < 0.01$). **Conclusion**

Geraniin can effectively promote the healing of osteoporotic fractures and improve bone microstructure and biomechanical properties. The mechanism may be related to the increase of bone mineral content and the regulation of bone metabolism.

[**Key words**] Geraniin; Osteoporotic fracture; Bone microstructure; Biomechanics

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种全身性代谢性疾病,以骨量减少、微结构破坏、脆性增加、骨强度下降和骨折发生风险增高为主要特征^[1],严重时可能诱发骨质疏松性骨折(osteoporotic fracture, OPF)^[2]。在骨质疏松过程中,由于骨质疏松导致的骨微结构破坏,会产生大量的微小断裂,这些微小的损伤与修复在一定程度上形成了1个负向的平衡,从而导致骨小梁的结构强度下降,从而大大提高了骨折的风险。根据数据统计,患有骨质疏松症的人群中,OPF的发病率约为20%,并且呈现出逐年攀升的趋势^[3]。目前,治疗骨质疏松的药物主要分为以下3类:第1类是降钙素类药物、双膦酸盐类药物、雌激素和雌激素受体调节剂等。第2类是氟化物、甲状旁腺素等促骨形成剂;第3类是骨骼矿化药物,如钙剂、维生素D及其衍生物^[4]。因此,寻找新的OPF治疗药物势在必行。

老鹳草素(Geraniin)是从大戟科植物叶下珠(*Phyllanthus urinaria*)中分离得到的1类天然产物,结构式为:5,7-二羟基-3',4'-二甲氧基黄酮^[5],见图1。研究发现其具有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抗菌等作用^[6-7]。笔者前期实验结果提示老鹳草素可能有降低骨脆性、增加骨强度作用^[8]。因此,本论文拟复制家兔OPF模型,评价3个剂量的老鹳草素治疗OPF的作用,为将老鹳草素研发成具有自主创新和云南特色植物来源的OPF防

治药物提供科学的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物

受试药物老鹳草素来源于中国科学院昆明植物研究所,分子量:952.64,分子式: $\text{C}_{41}\text{H}_{28}\text{O}_{27}$,纯度99%。阳性对照药辛伐他汀来源于上海融禾医药科技发展有限公司,纯度为98%。

1.2 实验动物

本研究选用了36只健康雌性家兔,年龄范围6~8月,体重范围2~2.5 kg。上述实验动物均由昆明医科大学实验动物学部提供(实验动物使用许可证号:SYXK(滇)K2020-0004,动物伦理批准文号:Kmmu20231388)。动物置于通风环境中,由专门人员负责进行单笼饲养,并保证它们

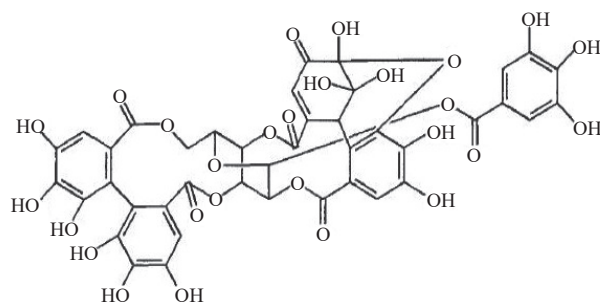


图 1 老鹳草素的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of geraniin

可以自由饮食。温度：18~25℃。湿度：40~70%，经过 2 周的适应性饲养后，正式开始实验。

1.3 试剂与仪器

血清钙、血清磷、碱性磷酸酶检测试剂盒(德国罗氏诊断有限公司);血清 I 型胶原交联羧基末端肽、抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒、尿脱氧吡啶啉试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

光学显微镜(OLYMPUS CK-40)(日本Olympus公司);DW-518型-20℃低温冰箱(中科美菱集团);病理组织烘片机(德国Leica, HI1220型);Micro CT(日本ALOKA公司);双能 X 线骨密度仪(美国GE公司);石蜡包埋切片机(德国Leica, RM2145);Legend RT+低温离心机(德国Thermo公司);紫外分光光度仪(上海美谱达仪器有限公司);AEG-220型电子分析天平(日本岛津公司);全自动生化分析仪(德国罗氏诊断有限公司);骨强度仪 TK-252D(日本muromachi公司);X光机(德国西门子股份公司Luminos Fusion);马弗炉(NEY M-5250);美国 MATRX 动物麻醉机(北京益仁恒业科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 家兔 OPF 模型构建 6~8 月龄雌性家兔 36 只, 体重 2~2.5 kg, 经过 2 周的适应性饲养, 用去势法切除家兔双侧卵巢, 获得一期 OP 模型。3% 戊巴比妥钠(25 mg/kg)耳缘静脉麻醉家兔, 于家兔下腹部约 4 cm 处正中切口, 逐层切开腹腔, 沿着输卵管找到粉红色桑椹状卵巢。先将与卵巢相连的动脉结扎, 然后把两侧的卵巢全部切除, 再将腹腔层层缝合。假手术组打开腹腔, 暴露卵巢, 再将腹腔缝合。术后肌注和腹腔各 1 mL 40 万 U 青霉素。当 OP 模型建立成功后, 进行 OPF 二期造模。3% 戊巴比妥钠(25 mg/kg)耳缘静脉麻醉家兔, 俯卧位, 左前臂纵切, 逐层剥离, 充分暴露桡骨中段, 用带齿钢丝在家兔左侧桡骨中段 3 mm 处造成骨缺损, 逐层缝合骨膜、肌肉、皮肤, 假手术组只暴露桡骨中段, 术后均肌注和腹腔各 1 mL 40 万 U 青霉素, 进而成功建立 OPF 模型

1.4.2 动物给药及取材 (1)老鹳草素药液: 高剂量组(20 mg/kg)老鹳草素药液: 根据灌胃药量标准, 取老鹳草素 4 g, 溶于 100 mL 蒸馏水中得到 40 mg/mL 药液, 灌胃容量按 1 mL/2 kg 体重计灌胃 2 mL。中、低剂量组(10, 5 mg/kg)老鹳草素药液: 将上述高剂量组药液依次等倍稀释。

(2)辛伐他汀(5 mg/kg)药液: 称取辛伐他汀 1 g, 溶于 100 mL 蒸馏水中, 形成浓度为 10 mg/mL 的药液, 每只家兔按 4 kg 计算, 灌胃容量按 1 mL/

2 kg 体重计灌胃 2 mL。

(3)最后 1 次给药后, 分别对家兔进行骨密度、X 影像学 and 血液生化测定, 然后禁食 12 h 后取材。经耳动脉气体栓塞法处死家兔, 快速分离双侧桡骨及 L3~L5 腰椎, 并去除其周边附着组织, 同时, 将第三腰椎用生理盐水浸湿过的纱布包埋, -20℃低温保存, 以观察其形态学变化; 第四腰椎置于 -20℃保存, 用于后续 Micro CT 扫描。将患侧桡骨于骨折处远近各 5 mm 截断后, 其中 1 段置于制备好的脱钙溶液中, 以观察其骨的形态。另置 1 段于液氮中, 以备进一步的研究。剩余 1 段桡骨用浸有生理盐水的纱布包好, 置 -20℃低温保存, 以作骨生物力学测试。在桡骨进行骨生物力学测定后, 将相同部位的桡骨碎片收集起来称重, 取重量相近的桡骨放于马弗炉灰化后, 进行钙、磷的骨灰分测定。

1.4.3 骨密度测定 用 3% 戊巴比妥钠(25 mg/kg)耳缘静脉麻醉后家兔俯卧位放于骨密度仪上, 由专门的测量师进行骨密度(bone mineral density, BMD)检测, 其中第一阶段造模 16 周后测量 1 次, 第二阶段造模灌胃给药 8 周后测量第 2 次, 分别比较同期的正常组、模型组、各个给药组的 BMD 并对其进行统计分析。

1.4.4 X 线影像检测 在家兔进行骨密度测量以后趁麻醉未醒, 再把它移至于 X 线影像仪器上俯卧位对其左侧桡骨骨折部位进行 X 光拍照, 对比各组的骨折愈合情况。

1.4.5 血液生化指标的测定 将每只家兔用 1 次性采血管进行耳动脉采血, 血液放 4℃静置 2 h 后离心, 取上清液, 用全自动生化分析仪检测血清中的钙(Ca²⁺)、磷(P)水平和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的含量, 用 Elisa 方法检测血清中的抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartaric acid acid phosphatase, TRACP)、I 型胶原交联羧基末端肽(type I collagen cross-linked C-terminal Telo-peptide, CTX-1)和尿脱氧吡啶啉(deoxypyridinoline, DPD)的水平。

1.4.6 Micro CT 检测 用 Micro CT 对家兔第四腰椎进行扫描, 并进行 3D 重建。在此基础上, 进一步检测其骨密度、骨小梁厚度、骨小梁空间间距和单位体积骨表面积。从而借助这些数据分析老鹳草素对家兔骨质疏松骨折愈合的影响程度。

1.4.7 骨生物力学测定 取出放在 -20℃的骨标本, 解冻后放于骨强度仪上进行三点弯曲力学测定, 受力点为桡骨中段, 跨距为 40 mm, 加载速

度为 20.0 mm/min, 通过载荷-位移曲线计算桡骨的最大载荷、结构刚度和最大位移, 曲线最高点的载荷为最大载荷, 曲线在直线部分的斜率为结构刚度, 最大位移可直接读出。

1.4.8 骨组织形态学检测 先用 4% 多聚甲醛溶液将骨组织样品进行固定, 然后用石蜡包埋并切片处理, 切片结束后常规行 HE 染色。

1.4.9 骨灰分测定钙盐、磷盐含量 在股骨进行生物力学测定后, 将相同部位的股骨碎片收集起来称重, 标记好组别, 取重量相近的股骨放于马弗炉内于 110 °C 温度烘烤 48 h 至恒重, 称量并记录骨干重量, 然后再次放于 700 °C 马弗炉灰化后, 冷却取出, 用研磨研成白色粉末, 称量骨灰重。用配好的盐酸加入 1 mL 溶解 2 h 后离心取上清液。取 50 μL 用蒸馏水稀释 600 倍, 取 1000 μL 于全自动生化分析仪上检测, 得到钙、磷的浓度, 通过计算得出骨钙、磷盐的含量。

1.5 统计学处理

本研究以 SPSS19.0 为主要工具, 对实验结果进行统计学分析。各组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA) LSD 方法统计, 结果均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 指标间采用两变量关联性分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 老鹤草素对家兔骨密度的影响

术后 16 周, OP 组家兔股骨、脊柱及全身的骨密度均明显低于假手术组 ($P < 0.05$)。结果表明, 去势可成功建立家兔骨质疏松模型, 见图 2。

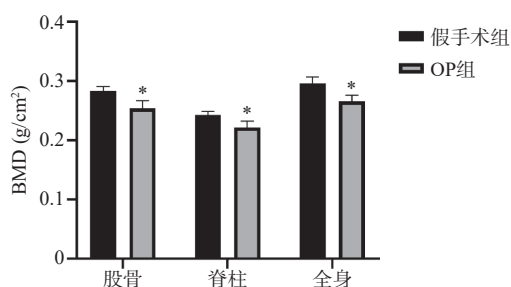


图 2 去势法对家兔 BMD 的影响 [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

Fig. 2 Effect of ovariectomy on BMD in rabbits [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

与假手术组比较, $*P < 0.05$ 。

OP 模型复制成功后, 进行桡骨中段骨折手术。与骨折假手术组比较, OPF 模型组家兔股骨、脊柱及全身的 BMD 均明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 给药 8 周后 (20、10、5) mg/kg 老鹤草素组

和 5 mg/kg 辛伐他汀组均显著提高家兔股骨、脊柱及全身的 BMD ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中 20 mg/kg、10 mg/kg 老鹤草素效果优于 5 mg/kg 老鹤草素组, 见图 3。

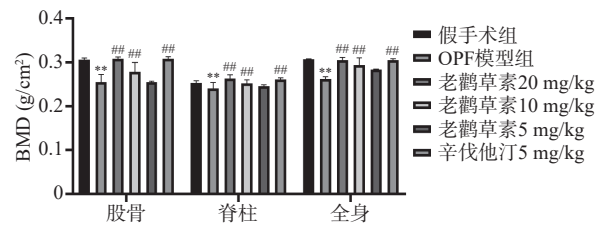


图 3 老鹤草素对 OPF 家兔 BMD 的影响 [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

Fig. 3 Effect of geraniin on BMD in OPF rabbits [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

与假手术组比较, $**P < 0.01$; 与 OPF 模型组比较, $#P < 0.05$, $##P < 0.01$ 。

2.2 家兔桡骨 X 线影像检测

治疗 8 周后, 各组家兔的 X 线检查显示, OPF 模型组骨折处骨折线变得模糊, 可见明显高密度白色阴影, 外骨痂增多, 骨髓腔未通, 骨皮质不连续。与 OPF 模型组相比, (20、10、5) mg/kg 老鹤草素组和 5 mg/kg 辛伐他汀组桡骨骨折处骨折线、高密度白色阴影基本消失, 骨髓腔基本实现再通, 骨皮质连续。以上实验结果提示, 不同剂量老鹤草素和辛伐他汀药均能促进骨质疏松骨折的愈合, 见图 4。

2.3 Micro CT 检测

各组家兔在治疗 8 周后, 第四腰椎 Micro CT 扫描发现: 与假手术组比较, OPF 组家兔的骨体积/总体积 (BV/TV) 显著降低、骨表面积/骨体积 (BS/BV) 显著升高 ($P < 0.01$), 表明已经成功构建了家兔骨质疏松动物模型。与 OPF 模型组比较, (20、10、5) mg/kg 老鹤草素组与 5 mg/kg 辛伐他汀组均显著提高了骨体积/总体积 (BV/TV)、减少骨表面积/骨体积 (BS/BV), 并增加骨小梁数量及骨小梁厚度、缩小骨小梁间距 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 5、图 6。

2.4 生物力学测定

去势 16 周后, 与假手术组比较, 桡骨骨折部位的最大载荷、结构刚度和最大位移均明显降低 ($P < 0.01$), 提示家兔去势后 OP 模型复制成功。与模型组比较, 给药 8 周后, (20、10、5) mg/kg 老鹤草素组和 5 mg/kg 辛伐他汀组均显著提高家兔桡骨的最大载荷、结构刚度和最大位移 ($P < 0.05$), 见图 7。

2.5 骨形态学检测

对桡骨骨折部分骨组织进行病理切片、HE

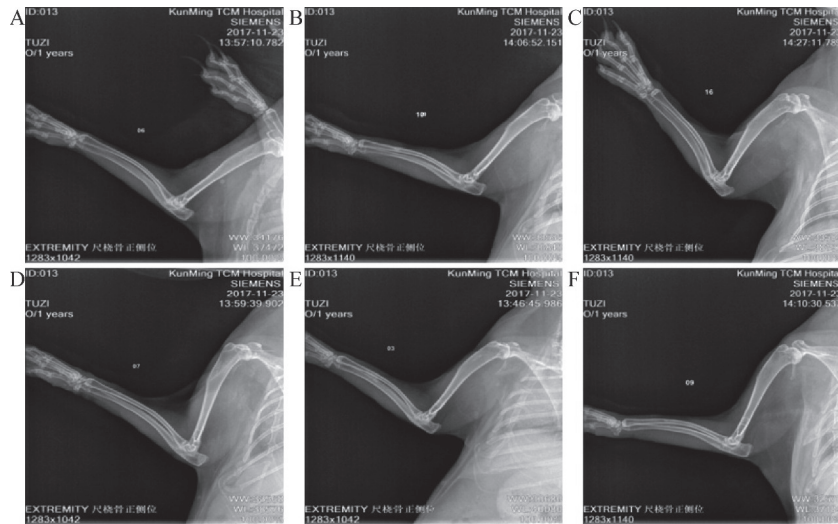


图 4 药物干预 8 周后家兔桡骨 X 线影像图

Fig. 4 X-ray image of rabbit radius after 8 weeks of drug intervention

A: 假手术组; B: OPF 模型组; C: 老鹳草素 20 mg/kg 组; D: 老鹳草素 10 mg/kg 组; E: 老鹳草素 5 mg/kg 组; F: 辛伐他汀 5 mg/kg 组

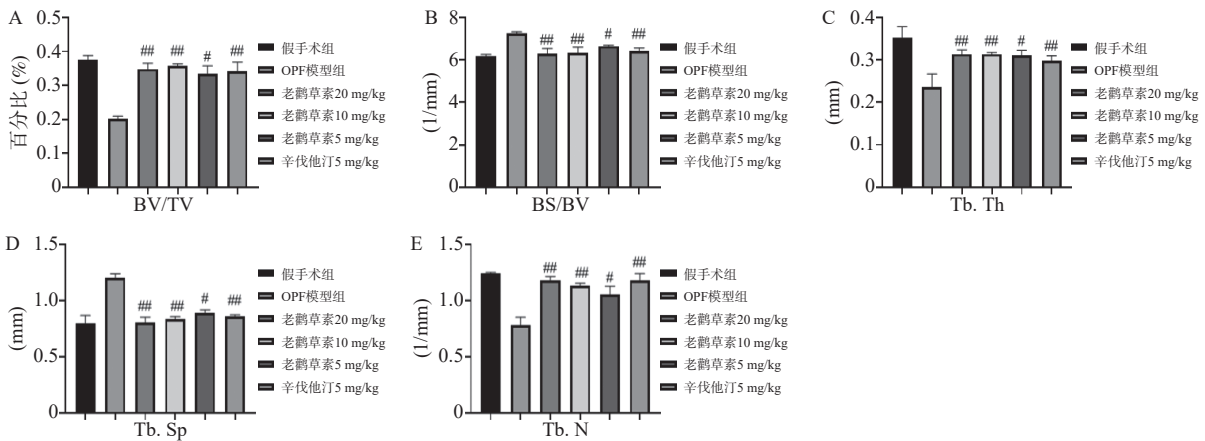


图 5 药物干预 8 周后对 OPF 家兔第四腰椎骨微结构参数的影响 [(x̄ ± s) , n = 6]

Fig. 5 Effect of drug intervention on bone microstructure parameters of the fourth lumbar vertebra in OPF rabbits after 8 weeks [(x̄ ± s) , n = 6]

A: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔第四腰椎骨微结构参数 BV/TV 的影响; B: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔第四腰椎骨微结构参数 BS/BV 的影响; C: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔第四腰椎骨微结构参数 Tb.Th 的影响; D: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔第四腰椎骨微结构参数 Tb.Sp 的影响; E: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔第四腰椎骨微结构参数 Tb.N 的影响; 与假手术组比较, **P < 0.01; 与 OPF 模型组比较, #P < 0.05, ##P < 0.01。

染色后, 在光学显微镜下观察老鹳草素对桡骨骨形态的影响。假手术组骨密质排列规整成板层状, 骨密质中间没有间隙, 骨膜完整且表面光滑。模型组骨密质中间有间隙, 骨折线模糊不清, 骨折断端有很多纤维骨痂链接, 且骨痂隆起体积大。与 OPF 模型组比较, (20、10、5)mg/kg 老鹳草素组和 5 mg/kg 辛伐他汀组骨折线基本消失, 外骨痂消失, 骨痂塑性良好, 骨密质排列紧密, 连接性好, 骨髓腔基本实现再通, 见图 8。

对第三腰椎骨组织进行病理切片、HE 染色

后, 可以在光学显微镜下观察老鹳草素对第三腰椎骨形态的影响。假手术组第三腰椎骨小梁形态规整, 骨小梁呈网状, 形成圆形或椭圆形拱桥结构, 间隙均匀, 厚度较大, 表面光滑。OPF 模型组较假手术组第三腰椎骨小梁形态改变明显, 表现为拱桥状结构消失, 小梁间隙变大, 小梁变薄, 变细, 出现大量游离和断裂的骨小梁。与模型组比较, (20、10、5)mg/kg 老鹳草素组和 5 mg/kg 辛伐他汀组第三腰椎可以再次看到排列相对整齐拱桥状的骨小梁结构, 小梁增多, 变厚, 均匀,

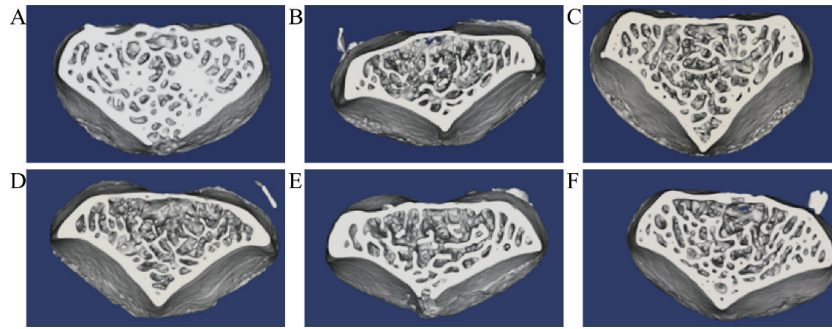


图 6 药物干预 8 周后家兔第四腰椎 Micro CT 三维重建图

Fig. 6 Micro CT three-dimensional reconstruction of the fourth lumbar spine of rabbits after 8 weeks of drug intervention

A: 假手术组; B: OPF 模型组; C: 老鹳草素 20 mg/kg; D: 老鹳草素 10 mg/kg; E: 老鹳草素 5 mg/kg; F: 辛伐他汀 5 mg/kg。

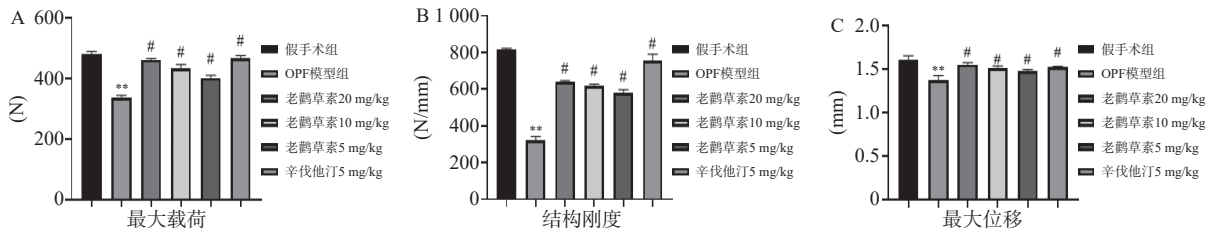


图 7 老鹳草素对 OPF 家兔桡骨生物力学的影响 [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

Fig. 7 Effects of geraniin on biomechanics of radius in OPF rabbits [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

A: 老鹳草素对 OPF 家兔桡骨最大载荷的影响; B: 老鹳草素对 OPF 家兔桡骨结构刚度的影响; C: 老鹳草素对 OPF 家兔桡骨最大位移的影响; 与假手术组比较, $**P < 0.01$; 与 OPF 模型组比较, $\#P < 0.05$ 。

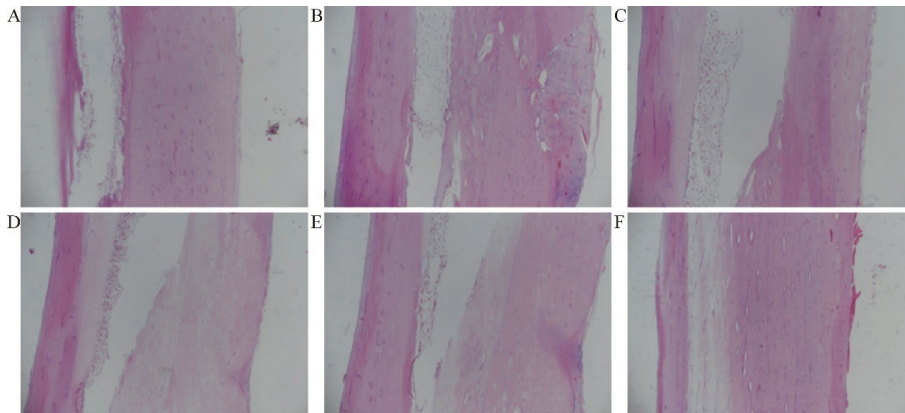


图 8 药物干预 8 周后家兔桡骨骨形态 HE 染色图(40×)

Fig. 8 HE staining of rabbit radius bone morphology after 8 weeks of drug intervention (40×)

A: 假手术组; B: OPF 模型组; C: 老鹳草素 20 mg/kg; D: 老鹳草素 10 mg/kg; E: 老鹳草素 5 mg/kg; F: 辛伐他汀 5 mg/kg

能够看到其相互链接成不完整的网状结构, 并且还存有较少的游离端, 见图 9。

2.6 血液生化指标的测定

术后 16 周, 模型组家兔血清中的 Ca^{2+} 和 P 水平明显低于假手术组, 而 ALP 和 TRACP 的水平则明显升高 ($P < 0.01$), 提示骨质疏松造模成功。给药 8 周后, 与模型组比较, (20、10、5)mg/kg 老鹳草素组和 5 mg/kg 辛伐他汀组的 Ca^{2+} 、P 水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ALP、TRACP 水平明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。用 Elisa 方法检

测各给药组家兔血清中的 CTX-1 和 DPD 的水平, 与假手术组比较, 模型组血清中的 CTX-1 和 DPD 的含量均升高 ($P < 0.01$), 提示骨质疏松造模成功。给药 8 周后, 与模型组比较, (20、10、5) mg/kg 老鹳草素组和 5 mg/kg 辛伐他汀组的 CTX-1、DPD 水平明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示老鹳草素药以及辛伐他汀能抑制骨的吸收, 见图 10。

2.7 骨灰分测定股骨的钙盐和磷盐含量

去势 16 周后, 与假手术组比较, OPF 模型组的骨钙、磷含量明显降低 ($P < 0.01$), 提示家兔去

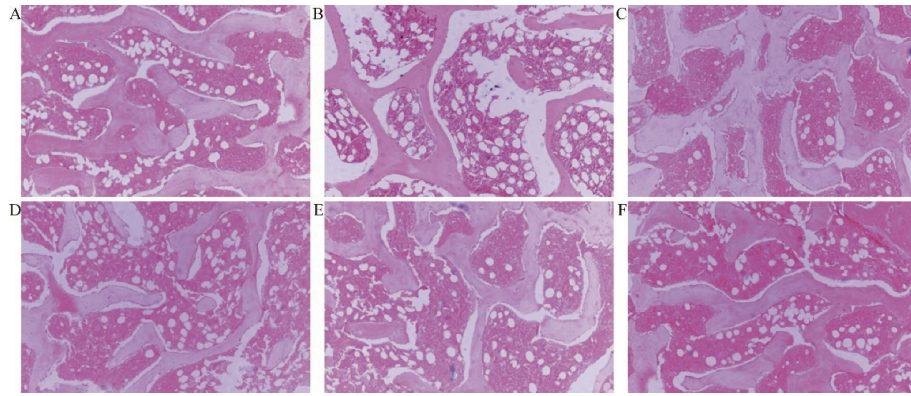


图 9 药物干预 8 周后家兔第三腰椎骨形态 HE 染色图(100×)

Fig. 9 HE staining of the third lumbar vertebrae of rabbits after 8 weeks of drug intervention (100×)

A: 假手术组; B: OPF 模型组; C: 老鹳草素 20 mg/kg; D: 老鹳草素 10 mg/kg; E: 老鹳草素 5 mg/kg; F: 辛伐他汀 5 mg/kg

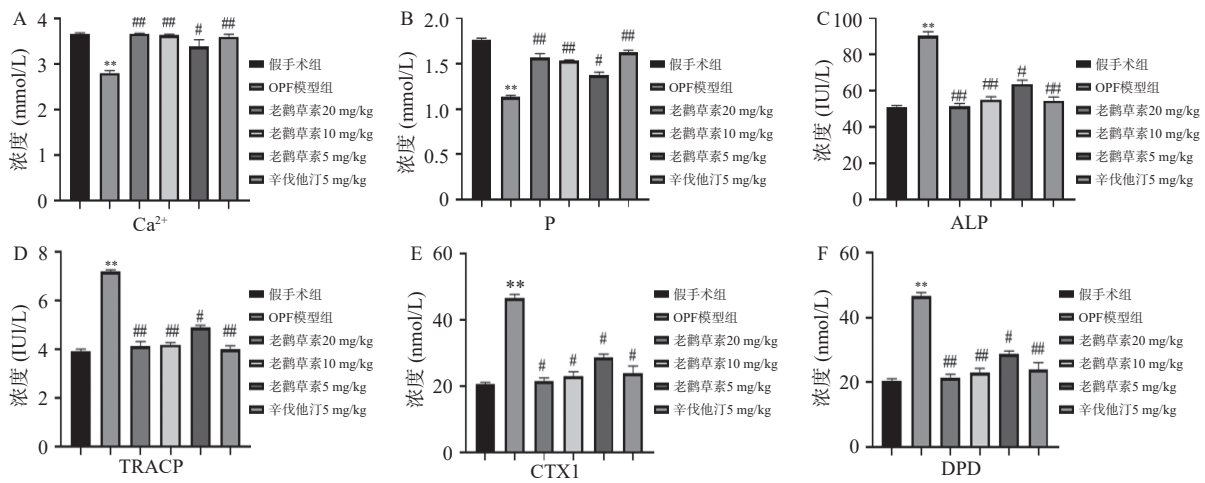


图 10 药物干预 8 周后对 OPF 家兔血液生化指标的影响 [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

Fig. 10 Effects of geraniin on blood biochemical indexes of OPF rabbits after 8 weeks of drug intervention [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

A: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔血液中 Ca^{2+} 的影响; B: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔血液中 P 的影响; C: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔血液中 ALP 的影响; D: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔血液中 TRACP 的影响; E: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔血液中 CTX-1 的影响; F: 药物干预 8 周后对 OPF 家兔血液中 DPD 的影响; 与假手术组比较, $**P < 0.01$; 与模型组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$ 。

势后 OP 模型复制成功。与 OPF 模型组比较, 给药 8 周后, (20、10、5) mg/kg 老鹳草素组和 5 mg/kg 辛伐他汀组均显著提高家兔的骨钙、磷盐含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中 5 mg/kg 老鹳草素组对骨磷盐的含量影响不显著, 与 OPF 模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 11。

3 讨论

OPF 被定义为在骨质疏松背景下, 个体于日常轻微外力作用下即易引发的骨折现象, 此类型骨折往往伴随着骨骼质量下降、恢复周期增长及再次骨折风险增高等一系列并发症^[9]。尽管对 OPF 的愈合机制尚未充分理解, 但其治疗和药物

研发展现出良好的前景。OP 是 OPF 发生发展的主要病理基础, 寻找 OP 新的治疗靶点也是治疗 OPF 的关键^[10]。成骨作用减弱与破骨作用增强是 OP 的主要发病机制^[11]。OP 的治疗药物主要可归为 3 大类: (1) 基础治疗药物, 典型代表为钙与维生素 D 的组合应用; (2) 骨吸收抑制剂, 涵盖双磷酸盐、雌激素、降钙素等药物; (3) 促进骨骼生成的药物, 例如甲状旁腺激素等。本老鹳草素是从云南特色药用植物叶下珠中提取的活性成分, 属于多酚类化合物, 在先前的研究工作中, 笔者观察到老鹳草素对实验性 OP 展现出了明显的抑制效果^[12-13]。然而, 老鹳草素在促进骨折愈合方面的研究仍然不足。因此, 本研究拟在前期基础上, 建立家兔 OPF 模型, 探索老鹳草素对骨折愈

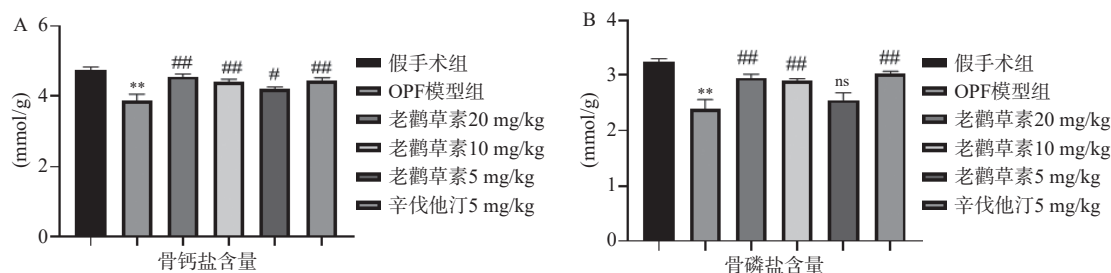


图 11 老鹳草素对 OPF 家兔骨钙、磷盐含量的影响 [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

Fig. 11 Effects of geraniin on bone calcium and phosphate contents in OPF rabbits [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

A: 老鹳草素对 OPF 家兔骨钙盐含量的影响; B: 老鹳草素对 OPF 家兔骨磷盐含量的影响与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ 。

合的修复作用及其量效关系。

利用雌性家兔实施卵巢摘除手术, 有效地构建了 OP 疾病模型, 并在此基础之上, 进一步发展出了骨质疏松性骨折(OPF)的模型。与假手术组相比, 去卵巢家兔的 BMD 显著下降, 表明 OP 模型复制成功, 与相关文献一致^[14]。在 OP 模型基础上, 实施左侧桡骨中段 3 mm 骨缺损手术, 经 X 光确认骨折成功。选择桡骨作为模型的优点在于其由尺骨支撑, 骨膜牵拉, 有助于减少骨折断端位移, 从而降低实验干扰因素。

为深入探究骨微结构及骨量的改变, 本研究运用了 Micro-CT 技术进行三维成像解析。作为一种高分辨率且非破坏性的成像手段, Micro-CT 能够详尽地呈现骨小梁架构及骨微结构的细节信息^[15]。研究结果显示, 家兔去势 16 周后, 模型组的骨小梁明显稀疏、变细, 且存在大量不连续的断端。用药 8 周后, 老鹳草素治疗组和阳性药物对照组的骨小梁显著增多, 变粗且排列更紧密, 形成拱桥结构, 提示老鹳草素能够改善 OPF 家兔的骨微结构。骨的生物力学性能是评价骨质量的一项重要指标, 它不仅能够反映骨的生长代谢情况, 还能提示骨量和骨结构的特性^[16]。本研究结果显示, 家兔去势 16 周后模型组的最大载荷、最大位移和结构刚度均显著降低, 而用药 8 周后, 老鹳草素治疗组及阳性药物对照组的最大载荷、结构刚度均有所上升, 最大位移也有所增加, 表明老鹳草素能够增强 OPF 家兔的骨强度, 降低其脆性。血清生化指标的检测进一步支持了老鹳草素对 OPF 的治疗作用。去势后家兔血清中 Ca^{2+} 和 P 水平明显下降, 而 ALP 和 TRACP 的活力明显增高。给药 8 周后, 与 OPF 模型组相比, 老鹳草素高、中、低剂量组以及辛伐他汀组的 Ca^{2+} 、P 水平明显升高, ALP、TRACP 水平显著降低, 表明老鹳草素对 OPF 具有积极的治疗作用, 其作

用机制可能通过改善血液生化指标实现。骨组织的主要成分是骨基质和骨矿物, 它们的主要成分是钙羟磷灰石晶体和不定形的钙磷^[17]。在甲状旁腺素与降钙素的调节下, 骨钙与血钙保持动态平衡^[18-19], 骨钙含量的降低是骨质疏松的重要病理特征^[20-21]。因此, 在建立 OP 模型及药物治疗 OPF 愈合时, 骨钙盐和骨磷盐含量的测定是评估模型成功与药物效果的重要指标^[22-23]。实验中, 家兔去势 16 周后模型组的骨钙降低, 而经过 8 周的老鹳草素治疗后, 其骨钙和磷含量均不同程度上升, 提示老鹳草素可能通过提高骨钙和骨磷含量来促进 OPF 的愈合。

近年来, 辛伐他汀口服给药逐渐被应用于家兔的骨质疏松及骨缺损模型。有研究显示, 辛伐他汀被应用于骨折局部的皮下注射及复合材料中, 疗效良好^[24]。有研究表明其具备良好的成骨作用, 能有效促进骨折愈合^[25]。因此, 本研究选择了对 OP 和 OPF 疗效较为确切的辛伐他汀作为实验阳性对照药。

综上所述, 老鹳草素在促进 OPF 家兔骨折愈合方面表现显著, 其效果与辛伐他汀相当, 其对 OPF 的治疗可能通过增加骨密度、改善骨微结构以及骨生物力学性能、增加骨矿盐含量、调节骨代谢等多途径实现。本研究为老鹳草素用于防治 OPF 提供了进一步的科学依据。然而, 本研究在分子水平的探索相对不足, 未来应关注骨组织 Western Blot 和 RT-PCR 实验检测, 以丰富实验内容, 使得结论更具说服力。

[参考文献]

- [1] Zhong H, Zhou Y, Wang P, et al. Influencing factors of bone mass abnormalities among postmenopausal women in Tibet, China[J]. *BMC Public Health*, 2023, 23(1): 2100-

- 2109.
- [2] Jin Z, Da W, Zhao Y, et al. Role of skeletal muscle satellite cells in the repair of osteoporotic fractures mediated by β -catenin[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, 13(2): 1403–1417.
- [3] Guo L, Gao Z, Ge H. Effects of serum 25-hydroxyvitamin D level on decreased bone mineral density at femoral neck and total hip in Chinese type 2 diabetes[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): 1894–1905.
- [4] Celik B, Leal AF, Tomatsu S. Potential targeting mechanisms for bone-directed therapies[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(15): 8339–8348.
- [5] 芮琛, 赵怡凡, 刘天鹏, 等. 老鹳草素抗骨质疏松症机制的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2023, 20(22): 43–46.
- [6] Lee R H, Jeong J Y, Park A S, et al. Geraniin Alleviates Inflammation in Caco-2 Cells and Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mice by Targeting IL-1 β [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(14): 7882–7893.
- [7] 彭彩亮, 崔璇, 蒋宁, 等. 老鹳草素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制 [J]. 吉林中医药, 2023, 43(9): 1063–1067.
- [8] 张小超, 郭蕴萍, 何波, 等. 老鹳草素对破骨细胞 II 型碳酸酐酶 mRNA 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 32–34.
- [9] Wang Y, Hu Y, Lan S, et al. A recombinant parathyroid hormone-related peptide locally applied in osteoporotic bone defect[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(22): 2300516–2300528.
- [10] Lu J, Ren Z, Liu X, et al. Osteoporotic fracture guidelines and medical education related to the clinical practices: A nationwide survey in China[J]. *Orthop Surg*, 2019, 11(4): 569–577.
- [11] Zhang P, Li B, Chen H, et al. RNA sequencing-based approaches to identifying disulfidptosis-related diagnostic clusters and immune landscapes in osteoporosis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2024, 16(9): 8198–8216.
- [12] Fatoye F, Smith P, Gebrye T, et al. Real-world persistence and adherence with oral bisphosphonates for osteoporosis: a systematic review[J]. *BMJ Open*, 2019, 9(4): 27049–27058.
- [13] Shen B, Yu J, Wang S, et al. *Phyllanthus urinaria* ameliorates the severity of nutritional steatohepatitis both in vitro and in vivo[J]. *Hepatology*, 2008, 47(2): 473–483.
- [14] Zhao F, Xu Y, Ouyang Y, et al. Silencing of miR-483-5p alleviates postmenopausal osteoporosis by targeting SATB2 and PI3K/AKT pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(5): 6945–6956.
- [15] Wang F, Zheng L, Theopold J, et al. Methods for bone quality assessment in human bone tissue: a systematic review[J]. *J Orthop Surg Res*, 2022, 17(1): 174–182.
- [16] Gao H, Zhao Y, Zhao L, et al. The role of oxidative stress in multiple exercise-regulated bone homeostasis[J]. *Aging Dis*, 2023, 14(5): 1555–1582.
- [17] Izzo C, Secondulfo C, Bilancio G, et al. Chronic kidney disease with mineral bone disorder and vascular calcification: an overview[J]. *Life (Basel)*, 2024, 14(3): 418–430.
- [18] Wang T, Huang S, He C. Senescent cells: A therapeutic target for osteoporosis[J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(12): 13323–13336.
- [19] Massara B, Mariem R, Emna B, et al. Kaposiform hemangioendothelioma with fatal income: Kasabach-Merritt phenomenon and hypercalcemia[J]. *Clin Case Rep*, 2022, 10(2): 5458–5473.
- [20] Hubert PA, Lee SG, Lee SK, et al. Dietary polyphenols, berries, and age-related bone loss: A review based on human, animal, and cell studies[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2014, 3(1): 144–158.
- [21] Cosme F, Pinto T, Aires A, et al. Red fruits composition and their health benefits: A review[J]. *Foods*, 2022, 11(5): 644–654.
- [22] Hou C, Wang X, Jiang W, et al. Peptide 11R VIVIT promotes fracture healing in osteoporotic rats[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(2): 162–175.
- [23] Oršolić N, Nemrava J, Jeleč Ž, et al. Antioxidative and anti-inflammatory activities of chrysin and naringenin in a drug-induced bone loss model in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2872–2881.
- [24] 邹伟龙, 于龙, 王亮, 等. 不同剂量辛伐他汀载药体系对兔骨质疏松模型骨修复的实验研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(4): 437–442.
- [25] Rothe R, Hauser S, Neuber C, et al. Adjuvant drug-assisted bone healing: Advances and challenges in drug delivery approaches[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(5): 428–439.