

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2024.08.019

论著·基础

秦岭箭叶淫羊藿对骨质疏松大鼠骨代谢及胫骨骨微结构的影响

李永志, 韩礼军, 李智斌, 郭东, 李伟, 张博栋

基金项目: 陕西省中医药管理局课题项目(2021-GJ-JC015)

作者单位: 726000 陕西省商洛市中医医院骨伤二科

通信作者: 韩礼军, E-mail: 18049148580@163.com



【摘要】 目的 探究秦岭箭叶淫羊藿(EPI)对骨质疏松(OP)大鼠骨代谢及胫骨骨微结构的影响。方法 2023年8月—2024年1月于西安迪赛生物医药有限责任公司实验室进行实验,将50只大鼠随机分为Sham组、Model组、EPI低剂量(EPI-L)组、EPI高剂量(EPI-H)组、EPI-H+YC-1[缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)抑制剂]组;除Sham组外,其余组采用双侧卵巢切除术构建OP大鼠模型。ELISA检测大鼠血清白介素10(IL-10)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血钙(Ca)、血磷(P)、骨保护素(OPG)、骨钙素(OCN)、碱性磷酸酶(ALP);双能X射线骨密度仪检测大鼠胫骨密度(BMD);Micro-CT检测胫骨骨微结构;HE染色观察胫骨组织形态;Western blot检测骨形成蛋白(BMP-2)、Runt相关转录因子2(Runx2)、半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved caspase-3)、HIF-1 α 、血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR-2)蛋白水平。结果 与Sham组比较,Model组大鼠胫骨骨微结构和骨组织形态明显受损,血清IL-6、TNF- α 、ALP水平、胫骨骨表面积与体积比、骨小梁分离度和胫骨骨组织cleaved caspase-3蛋白表达水平显著升高(P 均 <0.05),血清IL-10、OPG、OCN、Ca和P水平、胫骨BMD、骨小梁厚度、胫骨骨组织BMP-2、Runx2、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2蛋白表达水平显著降低(P 均 <0.05);与Model组比较,EPI-L组和EPI-H组大鼠胫骨骨微结构和骨组织形态受损明显减轻,血清IL-6、TNF- α 、ALP水平、胫骨骨表面积与体积比、骨小梁分离度、胫骨骨组织cleaved caspase-3蛋白表达水平显著降低(P 均 <0.05),血清IL-10、OPG、OCN、Ca和P水平、胫骨BMD、骨小梁厚度、胫骨骨组织BMP-2、Runx2、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2蛋白表达水平显著升高(P 均 <0.05);与EPI-H组比较,EPI-H+YC-1组上述指标均被部分逆转(P 均 <0.05)。结论 EPI可降低OP大鼠炎症反应,调节骨代谢平衡,改善胫骨骨微结构,可能与激活HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2信号通路有关。

【关键词】 骨质疏松;箭叶淫羊藿;骨代谢;胫骨;骨微结构;大鼠**【中图分类号】** R681 **【文献标识码】** A

Experimental study on the effects of epimedium sagittatum on bone metabolism and tibial bone microstructure in osteoporosis rats Li Yongzhi, Han Lijun, Li Zhibin, Guo Dong, Li Wei, Zhang Bodong. Department of Orthopedics and Traumatology, Shangluo Traditional Chinese Medicine Hospital, Shaanxi Province, Shangluo 726000, China

Funding program: Project of Traditional Chinese Medicine Administration of Shaanxi Province (2021-GJ-JC015)

Corresponding author: Han Lijun, E-mail: 18049148580@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of epimedium sagittatum (EPI) on bone metabolism and tibial bone microstructure in osteoporosis (OP) rats. **Methods** Rats were randomly separated into Sham group, Model group, EPI low-dose (EPI-L) group, EPI high-dose (EPI-H) group, and EPI-H + YC-1 (HIF-1 α inhibitor) group. Bilateral oophorectomy was performed to construct an OP rat model. ELISA was applied to detect serum IL-10, IL-6, TNF- α , serum calcium (Ca), serum phosphorus (P), osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OCN), and alkaline phosphatase (ALP) in rats. Dual energy X-ray bone density instrument was applied to detect tibial bone density (BMD) in rats. Micro CT was applied to detect the microstructure of tibia bone. HE staining was applied to observe the morphology of tibial tissue. Bone morphogenetic protein (BMP-2), RUNT-associated transcription factor 2 (Runx2), and cysteine proteinase-3 (cleaved) were detected by Western blot. Protein levels of caspase-3, hypoxia inducible factor HIF-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF), and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2). **Results** Compared with the Sham group, the microstructure and tissue morphol-

ogy of the tibia of rats in the Model group were obviously damaged, the ratio of tibial bone surface area to volume, trabecular separation, serum IL-6, TNF- α , ALP levels, and tibial bone tissue cleaved caspase-3 protein expression level were obviously increased (all $P < 0.05$), the bone trabecular thickness, serum IL-10, OPG, OCN, S-Ca and S-P levels, tibial BMD, tibial bone tissue BMP-2, Runx2, HIF-1 α , VEGF, and VEGFR-2 protein expression levels were obviously reduced (all $P < 0.05$). Compared with the Model group, the damage to the microstructure and tissue morphology of the tibia of rats in the EPI-L and EPI-H groups was obviously reduced, the ratio of tibial bone surface area to volume, trabecular separation, serum IL-6, TNF- α , ALP levels, and tibial bone tissue cleaved caspase-3 protein expression level were obviously reduced (all $P < 0.05$), the bone trabecular thickness, serum IL-10, OPG, OCN, S-Ca and S-P levels, tibial BMD, tibial bone tissue BMP-2, Runx2, HIF-1 α , VEGF, and VEGFR-2 protein expression levels were obviously increased (all $P < 0.05$). Compared with EPI-H group, the above indexes were partially reversed in EPI-H + YC-1 group (all $P < 0.05$). **Conclusion** EPI can reduce inflammatory reaction, regulate bone metabolism balance, and improve tibial bone microstructure in OP rats, possibly by activating the HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 signaling pathway.

【Key words】 Osteoporosis; Epimedium sagittatum; Bone metabolism; Tibia; Bone microstructure; Rat

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是一种骨代谢疾病, 主要特点是骨密度降低、骨组织微结构变形、骨骼变脆^[1]。目前临床针对 OP 的治疗方案效果不佳, 中医药因不良反应小而被广泛研究^[2]。秦岭箭叶淫羊藿 (EPI) 为秦岭地区生长的野生淫羊藿, 具有温肾益阳、强筋骨的药理特性, 研究显示淫羊藿可促进 OP 患者间充质干细胞增殖和成骨分化^[3-4]。淫羊藿总黄酮可改善血清骨代谢指标和骨微结构, 缓解 OP 症状^[5]。研究显示缺氧诱导因子 HIF-1 α (HIF-1 α)/血管内皮生长因子 (VEGF)/血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2) 信号通路参与血管生成和成骨分化过程^[6]。He 等^[7] 研究显示激活 VEGFR-2 可促进血管生成和成骨分化, 进而有效治疗 OP。因此本研究通过建立 OP 大鼠模型来探讨 EPI 是否可通过调控 HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 信号通路来改善 OP 大鼠骨代谢和胫骨骨微结构, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 实验动物: SD 雌性大鼠 60 只, 8 ~ 10 周龄, 体质量 320 ~ 350 g, 购自华中科技大学动物实验室, 生产许可证号 SCXK (鄂) 2021-0009。饲养环境: 光照 12 h/d, 相对湿度 50% ~ 65%, 饲养温度 (22 ± 2) °C。(2) 药物、试剂: EPI (货号: A1197194-31) 购自陕西昊辰生物科技有限公司; HIF-1 α 抑制剂 (YC-1, 货号: HY-146540) 购自美国 MCE 公司; 白介素 10 (IL-10)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血清钙 (Ca)、血清磷 (P)、骨保护素 (OPG)、骨钙素 (OCN)、碱性磷酸酶 (ALP) ELISA 试剂盒 (货号: B3506、B4781、B1432、TS2104、TS2109、H3817-2、TS2104、TS5217) 购自上海初态生物科技有限公司; HE 染色试剂 (HE0072) 购自上海白益生物科技有限公司; 骨形成蛋白 (BMP-2)、Runt 相关转录因子 2 (Runx2)、半胱氨酸蛋白酶-3

(cleaved caspase-3)、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2、 β 肌动蛋白 (β -actin) 一抗及二抗 (货号: ab284387、ab92336、ab2302、ab308443、ab32152、ab245725、ab8226、ab172730) 均购自英国 Abcam 公司; (3) 设备仪器: SkyScan Micro-CT 三位结构扫描购自上海自束蕴仪器有限公司; DXA-800E 双能 X 射线骨密度仪购自江苏品源医疗有限公司。本研究经西安迪赛生物医药有限责任公司实验室医学伦理委员会审核通过 (202307-1056)。

1.2 实验方法 2023 年 8 月—2024 年 1 月于西安迪赛生物医药有限责任公司实验室进行实验。随机选取大鼠 50 只进行 OP 造模: 将大鼠麻醉后俯卧位固定, 背部剃毛并消毒, 背部切开暴露两侧卵巢并切除, 青霉素粉消毒, 缝合皮肤。造模成功标志: 造模组大鼠腰椎骨密度显著低于 Sham 组大鼠。术毕大鼠死亡 3 只, 选取造模成功后的大鼠 40 只随机分为 Model 组、EPI 低剂量 (EPI-L) 组、EPI 高剂量 (EPI-H) 组、EPI-H + YC-1 组, 每组 10 只。原剩余大鼠 10 只作为 Sham 组, 仅切除卵巢周围少许脂肪^[6]。EPI-L 组和 EPI-H 组大鼠予 EPI (水煎煮液) 1.5 g/kg 和 3.0 g/kg 分别灌胃^[8], EPI-H + YC-1 组大鼠予 EPI 液 3 g/kg 灌胃并腹膜给予 YC-1 5 mg/kg^[9], Sham 组和 Model 组同方式给予等体积生理盐水, 1 d/次, 给药 10 周。

1.3 观测指标与方法 实验结束后大鼠腹主动脉取血 5 ml, 备测; 断头处死大鼠, 取出双侧胫骨, 备测。

1.3.1 ELISA 法检测血清 IL-10、IL-6、TNF- α 、Ca、P、OPG、OCN、ALP 水平: 上述大鼠血液离心留取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书要求依次加入反应试剂、终止试剂和显色试剂, 酶标仪检测各指标吸光值, 根据标准曲线计算相应指标水平。

1.3.2 胫骨密度检测: 取大鼠右侧胫骨用双能 X 射

线骨密度仪直接检测胫骨密度(BMD)。

1.3.3 胫骨微结构检测:取大鼠左侧胫骨,用4%多聚甲醛固定48 h,清洗后用Micro-CT扫描机对左侧胫骨进行扫描,扫描参数(300 uA、50 kV、8 m),扫描完成后用机载软件分析骨表面积与体积比、骨小梁厚度及骨小梁分离度。

1.3.4 观察骨组织形态:取大鼠右侧胫骨,用EDTA溶液脱钙处理30 d,脱钙完全后,脱水、包埋、切片,脱蜡、HE染色,透明后封片,显微镜下观察骨组织形态。

1.3.5 Western blot 检测骨组织相关蛋白水平:称取大鼠右侧胫骨骨组织,研磨提取总蛋白并对其定量,热水浴将蛋白变性后进行电泳,转至PVDF膜,封闭2 h,加入BMP-2、Runx2、cleaved caspase-3、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2、 β -actin一抗孵育过夜(4 $^{\circ}$ C),二抗孵育,ECL显色,用Image J软件定量分析BMP-2、Runx2、cleaved caspase-3、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2蛋白水平。

1.4 统计学方法 采用GraphPad Prism 8.0.1软件分析数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组内两两比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清IL-10、IL-6、TNF- α 水平的比较

Model组大鼠血清IL-6和TNF- α 水平显著高于Sham组,IL-10水平显著低于Sham组($P < 0.05$);EPI-L组、EPI-H组大鼠血清IL-6和TNF- α 水平显著低于Model组,IL-10水平显著高于Model组($P < 0.05$);EPI-H + YC-1组大鼠血清中IL-6和TNF- α 水平显著高于EPI-H组,IL-10水平显著低于EPI-H组($P < 0.05$),见表1。

2.2 各组大鼠血清OPG、OCN、ALP、Ca、P水平的比较 Model组大鼠血清ALP水平显著高于Sham组,OPG、OCN、Ca和P水平显著低于Sham组($P < 0.05$);EPI-L组和EPI-H组大鼠血清ALP水平显著低于Model组,OPG、OCN、Ca和P水平显著高于Model组($P < 0.05$);EPI-H + YC-1组大鼠血清ALP水平显著高于EPI-H组,OPG、OCN、Ca和P水平显著低于EPI-H组($P < 0.05$),见表2。

2.3 各组大鼠胫骨BMD的比较 Model组大鼠胫骨BMD(0.29 ± 0.02) g/cm²水平显著低于Sham组(0.41 ± 0.05) g/cm²($t = 7.047, P < 0.001$);EPI-L组(0.34 ± 0.03) g/cm²和EPI-H组(0.38 ± 0.03) g/cm²大鼠胫骨BMD水平显著高于Model组($t = 4.385, 7.894, P$ 均 < 0.001);EPI-H + YC-1组(0.32 ± 0.03) g/cm²大鼠胫骨BMD水平显著低于EPI-H组($t = 4.472, P < 0.001$)。

表1 各组大鼠血清IL-10、IL-6、TNF- α 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

Tab.1 Effects of EPI on serum IL-10, IL-6, and TNF- α levels in rats

组别	<i>n</i>	IL-10	IL-6	TNF- α
Sham组	10	84.59 \pm 10.63	27.82 \pm 3.41	36.75 \pm 4.32
Model组	10	18.47 \pm 2.42 ^a	118.64 \pm 14.58 ^a	158.62 \pm 19.84 ^a
EPI-L组	10	43.38 \pm 5.27 ^b	85.29 \pm 9.74 ^b	114.37 \pm 15.76 ^b
EPI-H组	10	69.75 \pm 8.51 ^{bc}	53.61 \pm 7.29 ^{bc}	77.49 \pm 9.53 ^{bc}
EPI-H + YC-1组	10	40.26 \pm 5.39 ^d	92.78 \pm 11.67 ^d	121.28 \pm 18.46 ^d
<i>F</i> 值		130.759	57.731	41.170
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与Sham组比较,^a $P < 0.05$;与Model组比较,^b $P < 0.05$;与EPI-L组比较,^c $P < 0.05$;与EPI-H组比较,^d $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠血清OPG、OCN、ALP、Ca、P水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effects of EPI on serum OPG, OCN, ALP, Ca, P levels in rats

组别	<i>n</i>	OPG (ng/L)	OCN (μ g/L)	ALP (U/L)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)
Sham组	10	11.83 \pm 0.91	16.93 \pm 1.28	42.16 \pm 3.59	2.18 \pm 0.13	2.87 \pm 0.14
Model组	10	4.65 \pm 0.27 ^a	7.51 \pm 0.63 ^a	87.47 \pm 5.23 ^a	1.34 \pm 0.06 ^a	1.52 \pm 0.09 ^a
EPI-L组	10	6.54 \pm 0.58 ^b	10.26 \pm 1.14 ^b	72.83 \pm 4.36 ^b	1.62 \pm 0.07 ^b	1.93 \pm 0.12 ^b
EPI-H组	10	9.17 \pm 0.82 ^{bc}	13.27 \pm 1.46 ^{bc}	56.78 \pm 4.62 ^{bc}	1.87 \pm 0.08 ^{bc}	2.38 \pm 0.15 ^{bc}
EPI-H + YC-1组	10	5.76 \pm 0.43 ^d	9.68 \pm 1.12 ^d	75.36 \pm 5.11 ^d	1.53 \pm 0.06 ^d	1.83 \pm 0.12 ^d
<i>F</i> 值		116.817	44.423	67.935	104.793	85.230
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与Sham组比较,^a $P < 0.05$;与Model组比较,^b $P < 0.05$;与EPI-L组比较,^c $P < 0.05$;与EPI-H组比较,^d $P < 0.05$ 。

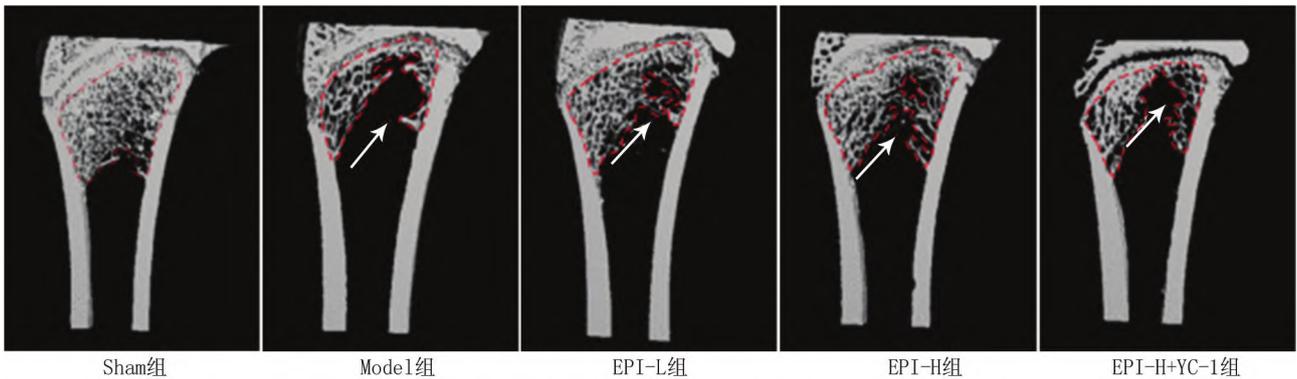
2.4 各组大鼠胫骨骨微结构的比较 Sham 组大鼠胫骨骨微结构完整; Model 组大鼠骨小梁明显减少且排列不规则, 间距增大, 骨陷窝增大; EPI-L 组和 EPI-H 组大鼠胫骨骨微结构形态有明显改善; EPI-H + YC-1 组大鼠胫骨骨微结构损伤程度显著高于 EPI-H 组。Model 组大鼠胫骨骨表面积与体积比和骨小梁分离度显著高于 Sham 组, 骨小梁厚度显著低于 Sham 组 ($P < 0.05$); EPI-L 组和 EPI-H 组大鼠胫骨骨表面积与体积比和骨小梁分离度显著低于 Model 组, 骨小梁厚度显著高于 Model 组 ($P < 0.05$); EPI-H + YC-1 组大鼠胫骨骨表面积与体积比和骨小梁分离度显著高于 EPI-H 组, 骨

小梁厚度显著低于 EPI-H 组 ($P < 0.05$), 见图 1、表 3。

2.5 各组大鼠胫骨骨组织形态的比较 Sham 组大鼠胫骨骨组织形态完好; Model 组大鼠胫骨骨小梁间隙明显变宽, 骨小梁疏松且薄; 与 Model 组比较, EPI-L 组和 EPI-H 组大鼠胫骨骨组织形态有明显好转; EPI-H + YC-1 组大鼠胫骨骨组织形态损伤程度显著高于 EPI-H 组, 见图 2。

2.6 各组大鼠胫骨骨组织 BMP-2、Runx2、cleaved caspase-3、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达的比较

Model 组大鼠胫骨骨组织中 cleaved caspase-3 蛋白表达水平显著高于 Sham 组, BMP-2、Runx2、HIF-1 α 、



注: 箭头指向骨小梁丢失减少。

图 1 各组大鼠胫骨骨微结构的变化 ($\times 10$)

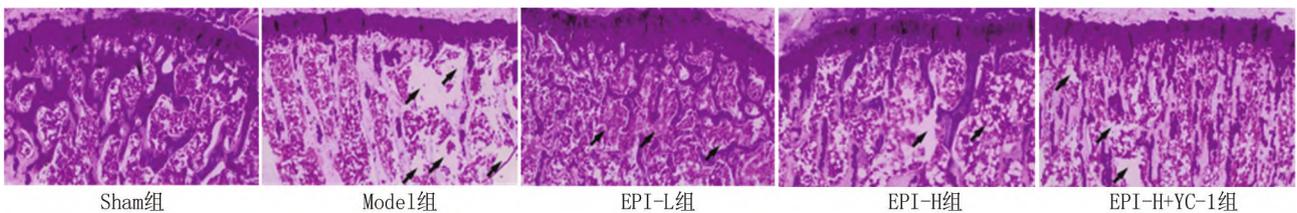
Fig. 1 Changes of tibia bone microstructure in each group of rats ($\times 10$)

表 3 各组大鼠胫骨骨微结构参数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of tibia bone microstructure parameters in each group of rats

组别	n	骨表面积与体积比(1/mm)	骨小梁厚度(μm)	骨小梁分离度(μm)
Sham 组	10	27.38 \pm 1.03	129.36 \pm 4.87	325.62 \pm 16.53
Model 组	10	32.57 \pm 1.12 ^a	104.27 \pm 2.46 ^a	842.56 \pm 32.71 ^a
EPI-L 组	10	30.81 \pm 0.94 ^b	113.62 \pm 3.74 ^b	659.84 \pm 25.27 ^b
EPI-H 组	10	28.46 \pm 0.75 ^{bc}	121.48 \pm 4.32 ^{bc}	438.73 \pm 18.62 ^{bc}
EPI-H + YC-1 组	10	31.24 \pm 0.86 ^d	109.74 \pm 2.68 ^d	713.29 \pm 23.48 ^d
F 值		34.102	45.636	435.196
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 Model 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 EPI-L 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 EPI-H 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

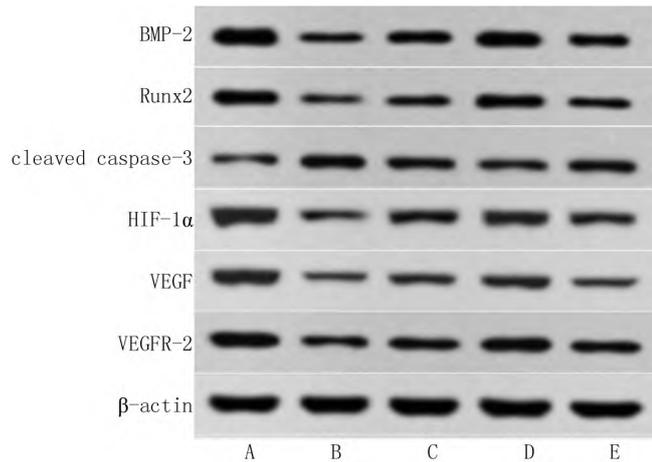


注: 箭头指向骨小梁吸收。

图 2 各组大鼠胫骨骨组织形态 (HE 染色, $\times 400$)

Fig. 2 Morphology of tibia bone tissue in each group of rats (HE staining, $\times 400$)

VEGF、VEGFR-2 蛋白表达水平显著低于 Sham 组 ($P < 0.05$); EPI-L 组和 EPI-H 组大鼠胫骨骨组织中 cleaved caspase-3 蛋白表达水平显著低于 Model 组, BMP-2、Runx2、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达水平显著高于 Model 组 ($P < 0.05$); EPI-H + YC-1 组大鼠胫骨骨组织中 cleaved caspase-3 蛋白表达水平显著高于 EPI-H 组, BMP-2、Runx2、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达水平显著低于 EPI-H 组 ($P < 0.05$), 见图 3、表 4。



注: A. Sham 组; B. Model 组; C. EPI-L 组; D. EPI-H 组; E. EPI-H + YC-1 组。

图 3 Western-blot 检测各组大鼠胫骨骨组织 BMP-2、Runx2、cleaved caspase-3、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达

Fig. 3 Western blot analysis of BMP-2, Runx2, cleared caspase-3, HIF-1 α , VEGF, and VEGFR-2 protein expression in tibial bone tissue of rats in each group

3 讨论

OP 是一种中老年人常见的骨退行性疾病, 据统计我国 50 岁以上的 OP 患者患病率约为 20% , 65 岁以上

绝经女性患病率已超过 50%^[10]。随着我国人口老龄化的加剧, OP 患病人数还在逐年上升, 给家庭带来巨大经济和生活负担, 同时也给社会带来巨大的医疗压力^[11]。目前针对 OP 的治疗尚无较好的治疗方式, 主要采用骨矿化促进剂、骨形成剂、骨吸收剂和激素类药物, 但具有较大的不良反应, 长期服用可引起其他多种类型的疾病, 还有致癌风险^[12]。因此开发新的药物用于 OP 的治疗是医学研究者的工作重点。中药因其特有的优势逐渐被广大医学研究者探究, EPI 是一种天然中草药, 具有强筋骨祛风湿, 补肾、通经络、缓解痹痛的功效^[13]。Gao 等^[13]研究表明, 淫羊藿苷可促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化, 提高 OP 的治疗效果。Huang 等^[14]研究表明, 淫羊藿可抑制破骨细胞分化, 减轻卵巢切除导致的骨质流失, 有效改善 OP 症状。推测 EPI 对 OP 大鼠具有一定改善作用。

本研究通过双能 X 线检测、Micro-CT 扫描和 HE 染色发现造模大鼠胫骨 BMD 显著降低, 骨小梁明显减少且排列不规则, 骨小梁间隙明显变宽, 骨小梁疏松且薄, 骨陷窝增大, 提示 OP 造模成功。EPI 干预后可显著改善胫骨骨微结构和骨组织形态。OP 发生时体内雌激素合成降低, 机体衰老, 炎性因子过量合成释放, 促进破骨细胞分化, 造成骨质丢失, 炎性因子还会诱发血管免疫性反应, 造成血管损伤, 引起成骨组织细胞缺血死亡, 加速 OP 发展^[15]。本研究结果显示, OP 大鼠血清炎性因子 IL-6 和 TNF- α 水平显著升高, 抗炎因子 IL-10 水平显著降低, 表明 OP 可引起炎症反应发生。EPI 干预后可显著降低炎性因子水平, 提高抗炎因子水平, 减轻炎症反应。骨代谢是成骨细胞造骨和破骨细胞吸收骨的动态过程, 该平衡被打破后可引起骨代谢疾病, OP 发生造成骨代谢异常, 引起骨质流失。Ca、P、OCN、OPG 和 ALP 为骨代谢检测指标, Ca 和 P

表 4 各组大鼠胫骨骨组织 BMP-2、Runx2、cleaved caspase-3、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of rats in each group of BMP-2, Runx2, cleared caspase-3, HIF-1 α , VEGF, and VEGFR-2 protein expression in tibial bone tissue in each group of rats

组别	n	BMP-2	Runx2	cleaved caspase-3	HIF-1 α	VEGF	VEGFR-2
Sham 组	10	1.18 \pm 0.15	0.92 \pm 0.10	0.21 \pm 0.03	1.07 \pm 0.14	0.97 \pm 0.13	0.89 \pm 0.10
Model 组	10	0.43 \pm 0.06 ^a	0.35 \pm 0.05 ^a	0.78 \pm 0.10 ^a	0.39 \pm 0.05 ^a	0.36 \pm 0.06 ^a	0.29 \pm 0.04 ^a
EPI-L 组	10	0.68 \pm 0.09 ^b	0.54 \pm 0.08 ^b	0.62 \pm 0.09 ^b	0.63 \pm 0.08 ^b	0.58 \pm 0.07 ^b	0.46 \pm 0.07 ^b
EPI-H 组	10	0.91 \pm 0.11 ^{bc}	0.76 \pm 0.09 ^{bc}	0.43 \pm 0.06 ^{bc}	0.84 \pm 0.11 ^{bc}	0.76 \pm 0.09 ^{bc}	0.69 \pm 0.08 ^{bc}
EPI-H + YC-1 组	10	0.62 \pm 0.08 ^d	0.49 \pm 0.06 ^d	0.67 \pm 0.09 ^d	0.56 \pm 0.07 ^d	0.52 \pm 0.07 ^d	0.40 \pm 0.06 ^d
F 值		51.832	56.246	28.680	53.591	50.791	69.010
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 Model 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 EPI-L 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 EPI-H 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

为骨骼的基本组成成分,含量减少时会引起骨密度降低,影响骨骼形成,促进 OP 发展;ALP 由成骨细胞合成并分泌,发生肝脏或骨骼疾病后会其异常升高;OCN 是由成骨细胞产生的非胶原蛋白,具有维持骨矿化的作用;OPG 又称破骨细胞抑制因子,可减少破骨细胞形成^[16]。本研究结果显示,EPI 干预后可显著降低 ALP 水平,提高 OPG、OCN、Ca 和 P 水平,改善 OP 大鼠骨代谢异常。BMP2 和 Runx2 为骨诱导细胞因子,在骨形成和成骨细胞生成过程中发挥重要作用,BMP2 可诱导成骨细胞分化和促进骨形成,促进骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞;Runx2 是成骨细胞的转录激活因子,可促进成骨细胞增殖和分化;OP 发生时成骨细胞大量凋亡,cleaved caspase-3 为凋亡调控蛋白,可激活细胞凋亡级联反应,促进细胞凋亡^[17-19]。本研究结果显示,EPI 干预后可显著提高 BMP-2 和 Runx2 蛋白表达,降低 cleaved caspase-3 蛋白表达,促进骨髓间充质干细胞成骨分化和骨形成,降低细胞凋亡。提示 EPI 可降低 OP 大鼠炎症反应,调节骨代谢平衡,改善胫骨骨微结构^[20]。

研究显示,HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 信号通路是一条参与血管生成的信号通路,活化的 HIF-1 α 可调控 VEGF 表达,VEGF 与 VEGFR-2 特异性结合后可促进血管生成,加速组织愈合和细胞增殖^[21]。Ren 等^[22]研究表明,提高 VEGF 表达可改善 OP 大鼠骨组织微形态,调节骨形成和骨吸收,缓解 OP。Zheng 等^[23]研究表明,提高 VEGF 表达可促进 OP 大鼠血管和成骨生成,加速骨修复。本研究结果显示,OP 大鼠 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达水平显著降低,HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 信号通路被抑制,EPI 干预后可激活 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达。为进一步验证 EPI 的作用靶点,本研究在 EPI 干预基础上用 HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 信号通路抑制剂 YC-1 进行干预,结果显示,YC-1 可减弱 EPI 对 OP 大鼠骨代谢及胫骨骨微结构的改善作用。提示 EPI 对 OP 大鼠的改善作用可能是通过激活 HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 信号通路实现的。

综上所述,EPI 可能通过激活 HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 信号通路来降低 OP 大鼠炎症反应,调节骨代谢平衡,改善胫骨骨微结构。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

李永志、韩礼军:科研设计、数据分析整理以及文章撰写、

修改;李智斌、郭东:实验手术指导及文章审阅;李伟、张博栋:实验实施、数据收集及协助文章审阅

参考文献

- [1] Humphrey MB, Russell L, Danila MI, et al. 2022 American college of rheumatology guideline for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2023, 75 (12): 2088-2102. DOI:10.1002/art.42646.
- [2] He J, Xu S, Zhang B, et al. Gut microbiota and metabolite alterations associated with reduced bone mineral density or bone metabolic indexes in postmenopausal osteoporosis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(9):8583-8604. DOI:10.18632/aging.103168.
- [3] Tong X, Wang Y, Dong B, et al. Effects of genus *Epimedium* in the treatment of osteoarthritis and relevant signaling pathways[J]. *Chin Med*, 2023, 18(1):92-101. DOI:10.1186/s13020-023-00788-8.
- [4] Xia SL, Ma ZY, Wang B, et al. Icarin promotes the proliferation and osteogenic differentiation of bone-derived mesenchymal stem cells in patients with osteoporosis and T2DM by upregulating GLI-1[J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1):500-512. DOI:10.1186/s13018-023-03998-w.
- [5] 张冬雪,曲帅,王明月,等.淫羊藿总黄酮联合骨营养剂抗骨质疏松作用探讨[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(12):1797-1804. DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.12.015.
- [6] 吴永铁,申雄成.高良姜素促进骨质疏松模型大鼠骨折愈合的机制研究[J]. *中国药房*, 2023, 34(19):2365-2370. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2023.19.11.
- [7] He Y, Kam H, Wu X, et al. Dual effect of aucubin on promoting VEGFR2 mediated angiogenesis and reducing RANKL-induced bone resorption[J]. *Chin Med*, 2023, 18(1):108-117. DOI:10.1186/s13020-023-00786-w.
- [8] Dai Z. Study on the protective effect and mechanism of the rhizoma *drynariae-epimedium* formula on osteoarthritis in rats[J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2022, 2022:2869707-2869718. DOI:10.1155/2022/2869707.
- [9] 郭彦芳,董秀芳,王瑜龙,等.木犀草素抑制 HIF-1 α /NLRP3 信号通路对脑卒中大鼠认知障碍和神经细胞凋亡的影响[J]. *热带医学杂志*, 2022, 22(9):1196-1202, 1325. DOI:10.19526/j.cnki.1005-8915.20240120.
- [10] Li J, Chen X, Lu L, et al. The relationship between bone marrow adipose tissue and bone metabolism in postmenopausal osteoporosis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2020, 52(3):88-98. DOI:10.1016/j.cytogfr.2020.02.003.
- [11] Chakrabarti K, McCune WJ. Glucocorticoid-induced osteoporosis in premenopausal women: Management for the rheumatologist[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2023, 35(3):161-169. DOI:10.1097/BOR.0000000000000934.
- [12] Zhang AS, Khatri S, Balmaceno-Criss M, et al. Medical optimization of osteoporosis for adult spinal deformity surgery: A state-of-the-art evidence-based review of current pharmacotherapy[J]. *Spine Deform*, 2023, 11(3):579-596. DOI:10.1007/s43390-022-00621-6.

(下转 1001 页)

- 1002/ajmg. a. 32708.
- [3] Shaheen R, Faqieh E, Sunker A, et al. Recessive mutations in DOCK6, encoding the guanidine nucleotide exchange factor DOCK6, lead to abnormal actin cytoskeleton organization and Adams-Oliver syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 89(2):328-333. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.07.009.
- [4] Hassed S, Li S, Mulvihill J, et al. Adams-Oliver syndrome review of the literature: Refining the diagnostic phenotype [J]. *Am J Med Genet A*, 2017, 173(3):790-800. DOI:10.1002/ajmg.a.37889.
- [5] Meester JAN, Verstraeten A, Alaerts M, et al. Overlapping but distinct roles for NOTCH receptors in human cardiovascular disease[J]. *Clin Genet*, 2019, 95(1):85-94. DOI:10.1111/cge.13382.
- [6] Dehdashtian A, Dehdashtian M. Adams-Oliver syndrome: A case with full expression [J]. *Pediatr Rep*, 2016, 8(2):6517. DOI: 10.4081/pr.2016.6517.
- [7] Southgate L, Sukalo M, Karountzos ASV, et al. Haploinsufficiency of the NOTCH1 receptor as a cause of Adams-Oliver syndrome with variable cardiac anomalies[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2015, 8(4):572-581. DOI:10.1161/CIRCGENETICS.115.001086.
- [8] Huang S, Yang L, Zhao L, et al. Novel in-frame deletion mutation in NOTCH1 in a Chinese sporadic case of Adams-Oliver syndrome [J]. *DNA Cell Biol*, 2020, 39(5):783-789. DOI:10.1089/dna.2019.5200.
- [9] Chapman G, Moreau JLM, I P E, et al. Functional genomics and gene-environment interaction highlight the complexity of congenital heart disease caused by Notch pathway variants[J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(4):566-579. DOI:10.1093/hmg/ddz270.
- [10] DuDOIgnon B, Huber C, Michot C, et al. Expanding the phenotype in Adams-Oliver syndrome correlating with the genotype [J]. *Am J Med Genet A*, 2020, 182(1):29-37. DOI:10.1002/ajmg.a.61364.
- [11] Meester JAN, Sukalo M, Schroder KC, et al. Elucidating the genetic architecture of Adams-Oliver syndrome in a large European cohort [J]. *Hum Mutat*, 2018, 39(9):1246-1261. DOI: 10.1002/humu.23567.
- [12] Talora C, Campese AF, Bellavia D, et al. Notch signaling and diseases: An evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1782(9):489-497. DOI:10.1016/j.bbadis.2008.06.008.
- [13] Algaze C, Esplin ED, Lowenthal A, et al. Expanding the phenotype of cardiovascular malformations in Adams-Oliver syndrome [J]. *Am J Med Genet A*, 2013, 161A(6):1386-1389. DOI: 10.1002/ajmg.a.35864.
- [14] Siebel C, Lendahl U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease [J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(4):1235-1294. DOI:10.1152/physrev.00005.2017.
- [15] Zhou XL, Liu JC. Role of Notch signaling in the mammalian heart [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2014, 47(1):1-10. DOI:10.1590/1414-431X20133177.
- [16] Gratton R, Tricarico PM, Moltrasio C, et al. Pleiotropic role of Notch signaling in human skin diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12):4214. DOI:10.3390/ijms21124214.
- [17] 王军, 李良志, 谭琴兰, 等. Notch 信号通路在 IgA 肾病肾间质纤维化中的表达和意义 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2019, 20(2):5. DOI:10.3969/j.issn.1009-587X.2019.02.007.

(收稿日期:2024-02-23)

(上接 998 页)

- [13] Gao J, Xiang S, Wei X, et al. Icaritin promotes the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells through regulating sclerostin and activating the Wnt/ β -Catenin signaling pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6666836-6666847. DOI: 10.1155/2021/6666836.
- [14] Huang JM, Wang Z, Qi GB, et al. Icaritin ameliorates RANKL-mediated osteoclastogenesis and ovariectomy-induced osteoporosis [J]. *Ageing (Albany NY)*, 2023, 15(19):10213-10236. DOI:10.18632/aging.205068.
- [15] Lv W, Yu M, Yang Q, et al. Total flavonoids of *Rhizoma drynariae* ameliorate steroid induced avascular necrosis of the femoral head via the PI3K/AKT pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5):345-356. DOI:10.3892/mmr.2021.11984.
- [16] 义明东, 唐新桥, 张强. 橙皮苷通过抗炎和抗氧化对骨质疏松大鼠模型的影响 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2024, 29(3):190-201. DOI:10.16680/j.1671-3826.2024.03.15.
- [17] 甘坤宁, 张波, 贺辉, 等. 绝经后骨折患者血清骨碱性磷酸酶、I 型前胶原和骨形态发生蛋白 2 水平与骨质疏松程度的相关性 [J]. *疑难病杂志*, 2022, 21(8):845-849, 855. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.08.013.
- [18] 王金玲, 黄夏荣, 屈萌艮, 等. 运动训练老年骨质疏松大鼠骨量及骨微结构的变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(5):676-682. DOI:10.12307/2022.1020.
- [19] 杨鑫, 李源力, 蒋萍, 等. 漆黄素对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响 [J]. *临床误诊误治*, 2023, 36(7):38-43. DOI:10.3969/j.issn.1002-3429.2023.07.010.
- [20] 赵海燕, 张慧莉, 汪晓妹, 等. 阿托伐他汀对老年 2 型糖尿病合并骨质疏松患者血清 Hb、NLR、PLR 及骨代谢指标的影响 [J]. *疑难病杂志*, 2022, 21(12):1242-1247. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.12.004.
- [21] Zhang W, Sun L, Gao H, et al. Mechanism of the HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 pathway in the proliferation and apoptosis of human haemangioma endothelial cells [J]. *Int J Exp Pathol*, 2023, 104(5):258-268. DOI:10.1111/iep.12485.
- [22] Ren LJ, Zhu XH, Tan JT, et al. MiR-210 improves postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rats through activating VEGF/Notch signaling pathway [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2023, 24(1):393-405. DOI:10.1186/s12891-023-06473-z.
- [23] Zheng S, Zhou C, Yang H, et al. Melatonin accelerates osteoporotic bone defect repair by promoting osteogenesis-angiogenesis coupling [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13(2):826660-826672. DOI:10.3389/fendo.2022.826660.

(收稿日期:2024-04-10)