

• 实验研究 •

三七总皂苷对股骨头坏死大鼠股骨头成骨作用影响的实验研究

方姝晨¹ 邹季² 汪伟² 史政康¹ 陈小微¹ 吴曦^{3△}

[摘要] 目的:观察三七总皂苷(PNS)干预股骨头坏死(ONFH)大鼠模型后,PNS对ONFH大鼠股骨头组织成骨作用的影响。方法:36只SPF级雄性6个月龄SD大鼠按照随机数字表法分为对照组(Ctrl组)、模型组(M组)和干预组(PNS组),每组大鼠12只;M组和PNS组行液氮冷冻法股骨头坏死造模,造模3个月后,M组大鼠每日腹腔注射生理盐水2 mL;PNS组大鼠腹腔注射12.0 mg/mL浓度PNS生理盐水溶液2 mL,1次/日,连续两周;Ctrl组不干预。干预后8周各组大鼠处死,采集血清、股骨头标本,行苏木精-伊红(HE)染色、OPG(Osteoprotegerin)及RANKL(Receptor Activator of NF- κ B Ligand)Western Blot蛋白质电泳,ELISA法测定PINP(Procollagen Type-I N Propeptide)及TRAP-5b(Tartrate Resistant Acid Phosphatase-5b)血清浓度。结果:PNS干预液氮法ONFH大鼠可降低股骨头空骨陷窝率($P<0.01$),可下调骨组织RANKL($P<0.01$)及血清TRAP-5b($P<0.05$)表达,上调骨组织OPG($P<0.01$)表达,可提高血清PINP水平,但差异无统计学意义。结论:PNS可抑制破骨细胞活性,促进成骨,在骨坏死中发挥保护作用。

[关键词] 三七总皂苷;成骨;股骨头坏死;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)06-0006-04

Study of Effect of Panax Notoginseng Saponins on the Osteogenesis of Femoral Head in Rats with ONFH

FANG Shuchen¹ ZOU Ji² WANG Wei² SHI Zhengkang¹ CHEN Xiaowei¹ WU Xi^{3△}

¹Department of Orthopedics and Traumatology, Wujiang District Hospital, Suzhou 215200, Jiangsu China;

² Department of Orthopedics and Traumatology, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430074, China;

³Institute of Traditional Chinese Medicine, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei China.

Abstract Objective: To explore the effect of Panax Notoginseng Saponins (PNS) on the osteogenesis of femoral head in rats with osteonecrosis of the femoral head (ONFH). **Methods:** 36 SPF 6-month-old male SD rats were randomly divided into three groups: control group (group Ctrl), model group (group M) and group PNS. Twelve rats in group M and group PNS were treated with liquid nitrogen freezing for femoral head necrosis. Three months later, rats in group M were injected with 2 mL of saline daily for two weeks, rats in group PNS were injected with 12.0 mg/mL of PNS saline solution 2 mL intraperitoneally, the group Ctrl gave no treatment. Rats in each group were executed 8 weeks later. Serum and femoral head specimens were collected for HE staining, Western Blotting for OPG (Osteoprotegerin), RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) and ELISA was used to determine the serum concentrations of PINP (Procollagen Type-I N Propeptide), TRAP-5b (Tartrate Resistant Acid Phosphatase-5b). **Results:** PNS reduced the empty lacunae rate of femoral

head ($P<0.01$), down-regulated the expression of RANKL ($P<0.01$), up-regulate the expression of OPG ($P<0.01$), reduced the level of TRAP-5b ($P<0.05$) in serum, and increased the level of PINP in serum in the rats with ONFH.

Conclusion: PNS can inhibit the activity of osteoclasts, promote osteogenesis and play a protective role in ONFH.

Keywords: panax notoginseng saponins (PNS); osteonecrosis; osteonecrosis of the femoral head (ONFH); rats

基金项目:2015年苏州市吴江区第二批“科教兴卫”项目 (WWK201523);

2016年十堰市科学技术研究与开发项目(16Y50)

¹ 江苏苏州市吴江区中医院骨伤科(江苏 苏州, 215200)

² 湖北省中医院骨伤科

³ 十堰市人民医院(湖北医药学院附属人民医院)中医中药研究所

[△]通信作者 E-mail: 1015411076@qq.com

股骨头坏死(Osteonecrosis of the Femoral Head, ONFH)为常见骨坏死,疾病进展快,致残率高,目前发病机制尚不明确。三七提取物三七总皂苷(Panax Notoginseng Saponins, PNS)是临床常用的改善循环药物,大量基础及临床实验已证实其可发挥改善心脏、脑血供、促进血管新生作用,骨科领域已有临床医师将其试用于 ONFH 治疗。本课题组液氮冷冻制备 ONFH 大鼠模型,通过 PNS 对其进行干预,观察 PNS 对股骨头坏死大鼠股骨头组织成骨作用的影响,探讨其部分作用机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 6 个月龄 SD 大鼠 36 只,雄性,SPF 级实验室适应性饲养 1 周,自由进食、进水,光照周期随 SPF 实验室光源设定,体质量(403.8 ± 225.1)g,实验动物生产许可证号为 SCXK(鄂)2016-0008;实验动物使用许可证号为 SYXK(鄂)2016-0031。

1.2 实验药物及试剂

三七总皂苷(注射用血栓通冻干粉)(广西梧州)、OPG 一抗(圣克鲁斯,美国)、RANKL 一抗(圣克鲁斯,美国)、GAPDH 一抗(Abcam,美国)、PINP ELISA 试剂盒(上海科兴分装,R&D 原产,美国)、TRAP-5b ELISA 试剂盒(江苏晶美)。

1.3 实验仪器

光学显微镜(奥林巴斯 CX23,日本)、电泳仪(北京六一 DYY-12)、酶标仪(北京普天 PT-3502A)、高速冷冻离心机(常州亿能 TG16-WS)。

1.4 方法

1.4.1 分组方法 将实验大鼠按照随机数字表法分为对照组(Ctrl 组)、模型组(M 组)和干预组(PNS 组),每组大鼠 12 只,对 M 组和 PNS 组行造模。

1.4.2 造模方法 M 组及 PNS 组每只大鼠按体质量予 20%水合氯醛 500 mg/kg 麻醉,定位右侧髂棘中下 1/3 交点与大转子连线中点,消毒后以定位点为准沿躯干纵轴切开,纵行分层切开至关节囊,后前屈、内收大鼠术侧下肢,暴露关节并剪断股骨头韧带,随即使股骨头脱位并暴露,使用自制冷冻杆置于液氮中 5 s,取出后冷冻杆头迅速放置于股骨头承重区 3 s,重复 15 次,庆大霉素液 0.25 mL 冲洗创口,将关节复位,止血后依次分层缝合,术后常规庆大霉素 0.2 mL 腹腔注射 3 d,创口消毒,并分笼饲养。

1.4.3 干预方法 造模 3 个月后,M 组大鼠每日腹腔注射生理盐水 2 mL,PNS 组大鼠腹腔注射 12.0 mg/mL PNS 生理盐水溶液 2 mL(按常规大鼠与人体面积及体质量体表面积转换公式综合换算 1:6 计算),1 次/d,连续 2 周,Ctrl 组不干预。

1.4.4 标本制作方法 干预后 8 周,所有大鼠过度麻醉后处死(所有实验动物处死均在麻醉状态下,符合动物伦理学规定),下腔静脉取血 3 mL,6 000 r/min 离心 5 min,上清置于 -80°C 冰箱保存。各组动物提前按动物编号随机抽取 6 个,冰上截取造模股骨头,冷 PBS 冲洗后,立即置于 -80°C 冰箱保存,剩余 6 个股骨头 4%中性甲醛固定 72 h 后 EDTA 脱钙 45 d,然后石蜡包埋,行苏木精-伊红染色。

1.5 实验指标测定

1.5.1 苏木精-伊红染色 二甲苯 15 min 两次,逆梯度乙醇,各 5 min,蒸馏水冲洗 5 min,苏木精-伊红染色 5 min,冲洗,1%盐酸乙醇 3 s,水洗,0.5%伊红液染色 3 min,冲洗,顺梯度乙醇,各 5 min,苯酚二甲苯 5 min,二甲苯 2 min,3 次。光镜下观察苏木精-伊红染色片,100 倍下股骨头视野内随机 5 个视野,记录并计算空骨陷窝率。

1.5.2 Western Blot 法测定 组织剪剪碎股骨头,研钵内液氮冷冻并进一步研碎股骨头,加 RIPA 及 PMSF 混合裂解液,冰上裂解 30 min,置于沸水 5 min,冷冻高速离心机 12 000 r/min 离心 5 min,收集上清。制作蛋白标准品,随后 BCA 法测定,据标准品浓度曲线斜率计算各样本内蛋白浓度。制作 8% SDS-PAGE 胶,配置上样溶液,随后上样,80 V 电压(单板电泳)至溴酚蓝运动至胶底部,电泳时间约为 100 min,湿式转膜,电流为 250 mA,转膜时间为 70 min,脱色摇床室温封闭 1 h,OPG,RANKL,GAPDH 一抗孵育 4°C 冰箱过夜,二抗孵育 1 h,洗膜 3 次,曝光、显影、定影。将胶片扫描后 Image J 测量条带灰度值,并计算目的蛋白与内参比值。

1.5.3 ELISA 法测定 将样本血清取出,冰上融化 1 h,6 000 r/min 离心 5 min,取样本 0.2 mL 备用。按预实验结果稀释血清,标准品按浓度梯度各 50 μL 加入 96 孔板,上样 50 μL ,每样 3 个复孔,加入包被液, 4°C 冰箱过夜,次日洗板 3 次,每次 5 min,封闭液室温摇床 BSA 封闭液封闭 2 h,洗板 3 次,每次 5 min,加入酶标抗体,室温摇床孵育 2 h,加入底物显色液,摇床孵育 5 min,加入终止液,酶标仪测定 450 nm OD 值。根据标准品浓度曲线斜率计算各样本内目的蛋白浓度。

1.6 统计学方法

所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学结果及图表由 Graph Pad Prism 5.0 软件计算并输出。三组计量资料采用单因素方差分析(含组内两两比较), $P < 0.05$ 差异有统计学意义,本文所有图表中 * 表示与 M 组比较差异有统计学意义(* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$)。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色及空骨陷窝率结果

M组大鼠股骨头 HE 染色与 Ctrl 组比较显示股骨头部分塌陷,股骨头内骨小梁稀疏,骨小梁走行不规则,骨小梁间隙增大,部分区域可见骨组织缺如,可见纤维组织增生,骨小梁间骨髓组织脂肪细胞增生,PNS

组大鼠股骨头苏木精-伊红染色与 Ctrl 组比较显示骨小梁数量减少,骨小梁间隙增大,骨小梁间骨髓组织脂肪细胞增生(见图 1)。PNS 组与 M 组比较,股骨头无明显塌陷,骨组织缺如不明显,无严重骨髓组织脂肪增生及纤维增生。PNS 组及 Ctrl 组与 M 组空骨陷窝率差异有统计学意义($P<0.01$),见图 2 及表 1。

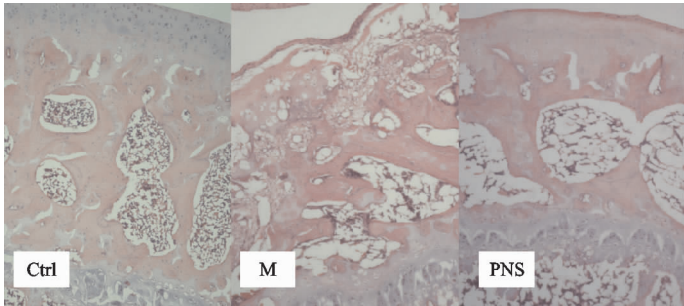
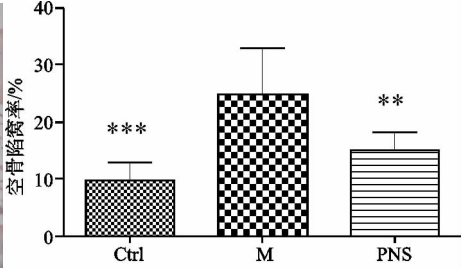


图 1 各组大鼠股骨头 HE 染色(1:100)

表 1 各组大鼠股骨头组织空骨陷窝率($\bar{x}\pm s, \%$)

Ctrl	M	PNS
9.67±3.23	24.97±8.01	14.99±3.11



注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 2 各组大鼠空骨陷窝率

2.2 Western Blot 蛋白电泳结果

Western Blot 蛋白电泳结果见图 3, OPG 及 RANKL 相对表达量见图 4 及表 2。

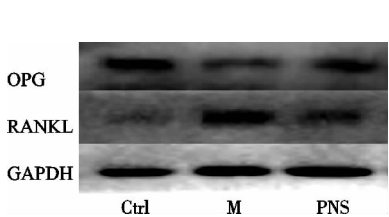


图 3 各组股骨头 Western Blot 条带

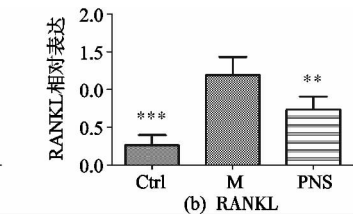
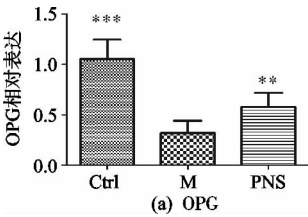


图 4 各组股骨头组织 OPG 及 RANKL 相对表达量

表 2 各组大鼠股骨头组织 OPG 及 RANKL 相对表达量($\bar{x}\pm s$)

项目	Ctrl	M	PNS
OPG	1.05±0.20 ¹⁾	0.32±0.12	0.57±0.14 ²⁾
RANKL	0.26±0.13 ¹⁾	1.19±0.24	0.73±0.17 ²⁾

注:1)与 M 组比较差异有统计学意义(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$);2)PNS 组与 M 组股骨头组织 OPG 及 RANKL 表达差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 ELISA 法测定结果

PNS 组与 M 组 PINP 表达差异无统计学意义($P>$

0.05)。PNS 组与 M 组 TRAP-5b 相对表达差异有统计学意义($P<0.01$),ELISA 法测定结果见图 5 及表 3。

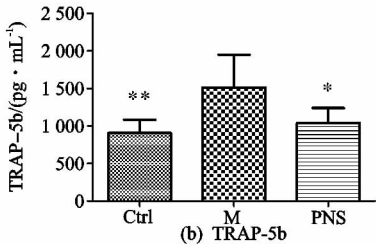
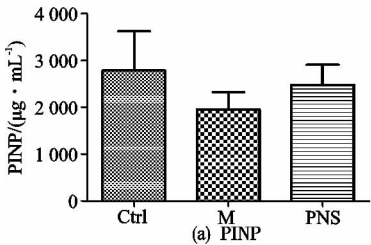


图 5 各组 PINP 及 TRAP-5b 血清浓度

表 3 各组大鼠血清 PINP 及 TRAP-5b 表达量($\bar{x}\pm s$)

项目	Ctrl	M	PNS
PINP/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2 785.01±834.32	1 948.07±373.19	2 477.08±434.11
TRAP-5b/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	906.61±177.03 ¹⁾	1 511.00±438.48	1 041.30±197.94 ¹⁾

注:1)与 M 组比较差异有统计学意义(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

2.4 结论

PNS 干预液氮法 ONFH 大鼠后可改善股骨头组

织形态,降低股骨头骨组织空骨陷窝率($P<0.01$),可下调骨组织 RANKL($P<0.01$)、血清 TRAP-5b 表达

($P < 0.05$),上调骨组织 OPG 表达($P < 0.01$),但对血清 PINP 水平表达无明显影响($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 PNS 与 ONFH

PNS 是三七提取物的主要成分,其药理研究较为深入,目前认为 PNS 具有延长凝血时间、抑制血小板凝集、降血脂血压、抗炎、抗氧化等作用^[1],许多基础研究及临床研究显示其具有较为确切的神经保护及心血管保护作用^[2-5],并已广泛应用于临床。

ONFH 的发病机制目前仍不明确,但其发病与血供不足密切相关,PNS 作为经典的具有抗血小板、抗血栓中药提取物,中医理论中也有对三七活血定痛作用的描述,因此许多研究者将 PNS 作为治疗股骨头坏死可能有效的药物进行研究。王大伟等^[6]通过 PNS 干预酒精性兔股骨头坏死模型,结果显示 PNS 能够促进兔成骨细胞的增殖和分化,并能提高成骨细胞的 OPG mRNA 的相对表达量而对其 RANKL mRNA 有抑制作用。黄进等^[7]通过 PNS 干预激素性兔股骨头坏死模型,结果显示 PNS 能提高激素性 ONFH 模型兔的 VEGF 及 BMP-2 mRNA 表达,改善缺血性股骨头坏死的病理表现。此外有研究显示 PNS 对骨髓间充质干细胞凋亡有抑制作用^[8],同时具有血管新生作用^[9-10],这些作用机制是 PNS 干预 ONFH 可能的作用机制。

3.2 动物模型选择

本课题组采用液氮法制备大鼠 ONFH 模型,该模型可模拟 ONFH 病程发展^[11-12],且经济性良好,操作简便,试验伦理学风险小,经本课题组实验验证,该模型空骨陷窝率与 Ctrl 组差异有统计学意义,HE 染色表现也与中早期 ONFH 临床表现相似,可模拟中早期 ONFH 表现。

3.3 OPG,RANKL,PINP 及 TRAP-5b

OPG 属于肿瘤坏死因子受体超家族,可由成骨细胞分泌,以 RANKL 诱骗受体形式与 RANK 结合,通过调节破骨细胞活性进而调节成骨/破骨,因此 OPG/RANKL 在骨重建中发挥重要作用^[13]。N 端前肽型 I 型前胶原(PINP)是重要的骨形成标志物,PINP 与 I 型胶原按 1:1 合成,而 I 型胶原是骨基质中唯一的胶原,血清 PINP 与骨形成的组织形态变化显著相关,且其血清浓度基本不受食物影响^[14-15]。TRAP-5b 是骨具有高特异性的酶,其只来源于破骨细胞,其反映了破骨细胞活力^[16]。此外血清 PINP 和 TRAP-5b 基本不会被肾脏清除,血清浓度相对较为稳定^[17]。

基于国内外已有研究结果,本实验应用 PNS 提取物对大鼠 ONFH 模型进行干预,结果显示 PNS 干预 ONFH 大鼠后可抑制破骨细胞活性,促进成骨,在骨

坏死中发挥保护作用。但目前单纯以骨形成与骨吸收对 ONFH 进行研究的模式存在片面性和局限性,尚不能解释骨坏死发病机制及骨坏死后的修复机制,随着骨坏死中调控作用研究的深入,可望在将来进一步揭示相关机制。

参考文献

- [1] 杨琳,林万程,施家乐.三七总皂苷药理作用的研究进展[J].安徽医药,2014,18(5):963-965.
- [2] SHI X,YU W,YANG T,et al. Panax notoginseng saponins provide neuroprotection by regulating NgR1/RhoA/ROCK2 pathway expression,in vitro and in vivo[J]. Journal of Ethnopharmacology,2016,190:301-312.
- [3] 张建平,储利胜,陶水良,等.黄芪甲苷和三七总皂苷配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠海马 NSCs 的保护作用[J].中成药,2017,39(11):2372-2376.
- [4] TIAN Z,PANG H,DU S,et al. Effect of panax notoginseng saponins on the pharmacokinetics of aspirin in rats[J]. Journal of Chromatography:B,2017,1040:136-143.
- [5] DUAN L,XIONG X,HU J,et al. Efficacy and safety of oral panax notoginseng saponins for unstable angina patients;a meta-analysis and systematic review[J]. Phytomedicine,2018,47(1):23-33.
- [6] 王大伟,史宝明,李小峰,等.三七总皂苷干预股骨头缺血性坏死兔成骨细胞护骨素基因的表达[J].中国组织工程研究,2011,15(20):3728-3732.
- [7] 黄进,张翼飞,颜慧玫,等.三七总皂苷对股骨头坏死血清 VEGF 及 BMP-2 的 mRNA 表达水平的影响[J].吉林医学,2017,38(7):1208-1210.
- [8] 区泳芳,伏学坤,梅兴莎,等.三七总皂苷对大鼠骨髓间充质干细胞凋亡的抑制作用[J].生理学报,2016,68(3):285-292.
- [9] 傅晨,刘雪梅,王凤丽,等.血塞通软胶囊对单侧颈动脉狭窄大鼠脑组织血管新生的作用及其机制[J].北京中医药,2018,37(9):821-824.
- [10] 章友财,刘金浪,蔡声麟.三七总皂苷对兔酒精性股骨头坏死微血管血供及超微结构的影响[J].江西医药,2016,51(1):23-25.
- [11] 刘筱萍,张转建,刘红,等.液氮冷冻大鼠股骨头坏死的实验研究[J].医学研究杂志,2009,38(11):38-40.
- [12] SHI D,SUN Y,YIN J,et al. Cajan leaf combined with bone marrow derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteonecrosis of the femoral head[J]. Experimental and Therapeutic Medicine,2014,7(6):1471-1475.
- [13] MARTIN T J. Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG [J]. World Journal of Orthopedics,2013,4(4):186-197.
- [14] CHAVASSIEUX P,PORTERO-MUZY N,ROUX J P,et al. Are biochemical markers of bone turnover representative of