

# 血根碱通过激活分泌型糖蛋白/ $\beta$ -链蛋白信号通路促进脊柱骨折大鼠骨折愈合的实验研究

王慧<sup>1</sup> 潘茂圣<sup>1△</sup>

**[摘要]** 目的:探讨血根碱(SAG)对脊柱骨折大鼠骨折愈合的影响及其作用机制。方法:选用 SD 大鼠 72 只,随机分为 6 组(12 只/组):假手术组、模型组、血根碱低剂量组(10 mg/kg)、血根碱中剂量组(20 mg/kg)、血根碱高剂量组(40 mg/kg)、抑制剂组(Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制剂,Wnt-C59,30 mg/kg)。构建脊柱骨折大鼠模型,造模成功后,灌胃相应药物,1 次/d,连续 4 周。BBB 评分法进行神经功能评定;采用微计算机断层扫描技术(Micro CT)观察大鼠骨骼微结构;苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠脊髓病理损伤;TUNEL 染色观察大鼠骨髓神经细胞凋亡情况;酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠血清骨钙素(OC)和 I 型胶原交联 C-末端肽(CTX-I)、骨形态发生蛋白 2(BMP-2)的含量变化;Western Blot 法检测受损脊髓中 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、碱性磷酸酶(ALP)及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠 BBB 评分,骨密度,BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th、OC、BMP-2 含量,ALP、Wnt-3a、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平降低,脊髓病理损伤严重,神经细胞凋亡指数、CTX-I 含量、Bax、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,血根碱低、中、高剂量组大鼠 BBB 评分,骨密度,BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th、OC、BMP-2 含量,ALP、Wnt-3a、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平升高,脊髓病理损伤减轻,神经细胞凋亡指数,CTX-I 含量,Bax、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与血根碱高剂量组比较,抑制剂组大鼠 BBB 评分,骨密度,BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th、OC、BMP-2 含量,ALP、Wnt-3a、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平降低,脊髓病理损伤严重,神经细胞凋亡指数,CTX-I 含量,Bax、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:血根碱可促进成骨细胞的分化、抑制破骨细胞活性,起到促进脊柱骨折大鼠骨折愈合及改善神经损伤的作用,其作用机制可能与激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关。

**[关键词]** 血根碱;分泌型糖蛋白/ $\beta$ -链蛋白;脊柱骨折愈合;神经损伤

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)08-0013-06

**DOI:**10.20085/j.cnki.issn1005-0205.230803

## Experimental Study of Sanguinarine Promoting Fracture Healing in Spinal Fracture Rats by Activating Secretory Glikoproteinas-3a/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway

WANG Hui<sup>1</sup> PAN Maosheng<sup>1△</sup>

<sup>1</sup> Department of Orthopedics, Suzhou Xiangcheng People's Hospital, Suzhou 215000, Jiangsu China.

**Abstract Objective:** To explore the effect and potential mechanism of sanguinarine (SAG) on fracture healing in rats with spinal fractures. **Methods:** 72 SD rats were randomly divided into 6 groups, with 12 rats in each group: sham group, model group, SAG low-dose group (10 mg/kg), SAG medium-dose group (20 mg/kg), SAG high-dose group (40 mg/kg), and inhibitor group (Wnt/ $\beta$ -catenin pathway inhibitor, Wnt-C59, 30 mg/kg). The spinal fracture rat model was established, and the corresponding drugs were administered once a day for 4 weeks after successful model establishment. The nerve function was evaluated using the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) scoring method. Micro-CT was utilized to observe the bone microstructure, while hematoxylin-eosin (HE) staining was employed to assess the pathological injury of the spinal cord. TUNEL staining was used to observe the apoptosis of nerve cells in the rat bone marrow. The levels of serum osteocalcin (OC), C-terminal telopeptides of type I collagen (CTX-I), and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) were

observed. Results: Compared with the sham group, the model group rats showed significantly lower BBB scores, bone density (BV/TV, Tb. N, Tb. Th, Ct. Th), OC, BMP-2 levels, ALP, Wnt-3a,  $\beta$ -catenin protein expression, and significantly higher spinal pathology injury, nerve cell apoptosis index, CTX-I levels, Bax, GSK-3 $\beta$  protein expression, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the low, medium, and high dose groups of sanguinarine showed significantly higher BBB scores, bone density (BV/TV, Tb. N, Tb. Th, Ct. Th), OC, BMP-2 levels, ALP, Wnt-3a,  $\beta$ -catenin protein expression, and significantly lower spinal pathology injury, nerve cell apoptosis index, CTX-I levels, Bax, GSK-3 $\beta$  protein expression, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). Compared with the high dose group of sanguinarine, the inhibitor group rats showed significantly lower BBB scores, bone density (BV/TV, Tb. N, Tb. Th, Ct. Th), OC, BMP-2 levels, ALP, Wnt-3a,  $\beta$ -catenin protein expression, and significantly higher spinal pathology injury, nerve cell apoptosis index, CTX-I levels, Bax, GSK-3 $\beta$  protein expression, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). Conclusion: Sanguinarine can promote the differentiation of osteoblasts, inhibit osteoclast activity, and play a role in promoting fracture healing in rats with spinal fractures and improving nerve damage. Its mechanism of action may be related to the activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

<sup>1</sup> 苏州市相城人民医院骨科(江苏 苏州, 215000)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail: 25999765@qq.com

measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western Blot analysis was conducted to detect the expression of Bcl-2-associated X protein (Bax), alkaline phosphatase (ALP), and Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway proteins in the injured spinal cord. **Results:** Compared with the sham group, the model group exhibited decreased BBB scores, bone mineral density (BMD), bone volume fraction (BV/TV), trabecular number (Tb. N), trabecular thickness (Tb. Th), cortical thickness (Ct. Th), OC, BMP-2 contents, ALP, Wnt-3a, and  $\beta$ -catenin protein expression levels. Additionally, the pathological injury of the spinal cord was severe, and the apoptosis index of nerve cells, CTX-I content, Bax, and GSK-3 $\beta$  protein expression levels were increased ( $P < 0.05$ ). In contrast, the SAG low, medium, and high-dose groups showed increased BBB scores, BMD, BV/TV, Tb. N, Tb. Th, Ct. Th, OC, BMP-2 contents, ALP, Wnt-3a, and  $\beta$ -catenin protein expression levels compared to the model group. The pathological injury of the spinal cord was alleviated, and the apoptosis index of nerve cells, CTX-I content, Bax, and GSK-3 $\beta$  protein expression levels were decreased ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the inhibitor group exhibited decreased BBB scores, BMD, BV/TV, Tb. N, Tb. Th, Ct. Th, OC, BMP-2 contents, ALP, Wnt-3a, and  $\beta$ -catenin protein expression levels compared to the SAG high-dose group. The pathological injury of the spinal cord was severe, and the apoptosis index of nerve cells, CTX-I content, Bax, and GSK-3 $\beta$  protein expression levels were increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Sanguinarine (SAG) can promote the differentiation of osteoblasts, inhibit the activity of osteoclasts, facilitate fracture healing, and improve nerve injury in rats with spinal fractures. These effects may be attributed to the activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Keywords:** sanguinarine; Wnt/ $\beta$ -catenin; spinal fracture healing; neurological damage

脊柱骨折是一种常见的骨科疾病,具有骨强度低、愈合慢、抗再骨折能力差等特点<sup>[1-2]</sup>。脊柱骨折会对中枢神经系统造成损伤,其治疗仍是世界医学难题<sup>[3-5]</sup>,深入研究影响脊柱骨折愈合的机制对于探索新的治疗药物具有重要意义。骨折愈合过程中,骨再生与骨重塑是一个动态变化的过程,成骨细胞与破骨细胞的增殖与分化对该过程起到重要的调控作用。血根碱(Sanguinarine, SAG)是一种苯菲啶异喹啉类生物碱,具有多种生理活性<sup>[6]</sup>。血根碱可抑制破骨细胞骨吸收和破骨细胞形成,促进成骨细胞的分化<sup>[7-8]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路是骨稳态的关键调节剂,激活该通路不仅能抑制破骨形成及骨吸收,促进成骨细胞增殖与分化,还能促进骨折愈合<sup>[9-10]</sup>。基于对脊柱骨折的机制研究,本研究从Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路入手,初步探索血根碱治疗脊柱骨折大鼠骨折愈合的机制,为血根碱的临床应用提供依据,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF级SD大鼠购自武汉云克隆动物有限公司,生产许可编号为SCXK(鄂)2018-0021,5~7周龄,体重为180~200 g,适应性喂养1周,设置饲养温度为22℃,湿度为55%~60%,12 h/12 h光暗循环。不禁水食。

### 1.2 主要试剂

血根碱(货号为YJ-16107R,上海雅吉生物科技有限公司);Wnt-C59(货号为M00416-ARX,北京百奥莱博科技有限公司);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号为G1120-100)、TUNEL染色试剂盒(货号为T2190,北京索莱宝科技有限公司);骨钙素(Osteocalcin, OC, 货号为E-EL-R0243c)、I型胶原交联C-末

端肽(C-terminal Telopeptides of Type I Collagen, CTX-I, 货号为E-EL-R1456c)、骨形态发生蛋白2(Bone Morphogenetic Protein 2, BMP-2, 货号为E-EL-R0002c)、ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);兔抗Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X Protein, Bax, 货号为ab182733)、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP, 货号为ab83259-ALP)、糖原合成酶激酶3 $\beta$ (Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ , 货号为BW4946)、分泌型糖蛋白3a(Serum Glycoprotein 3a, Wnt-3a, 货号为ab172612)、 $\beta$ -链蛋白( $\beta$ -catenin, 货号为ab32572)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, GAPDH, 货号为ab9485)、一抗抗体(美国Abcam公司);辣根酶标记羊抗兔二抗(货号为XY0650,上海信裕生物科技有限公司);蛋白提取试剂盒(货号为YT8951,北京伊塔生物科技有限公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 动物建模、分组和给药** 选用SD大鼠72只,随机分为6组(12只/组):假手术组、模型组、血根碱低剂量组、血根碱中剂量组、血根碱高剂量组、抑制剂组。大鼠脊柱骨折具体操作参考<sup>[11]</sup>。假手术组大鼠只分离肌肉组织后缝合。造模成功后,血根碱低、中、高剂量组分别灌胃10, 20, 40 mg/kg血根碱<sup>[8]</sup>,抑制剂组在血根碱高剂量组的基础上灌胃30 mg/kg Wnt-C59(Wnt/ $\beta$ -catenin通路抑制剂<sup>[12]</sup>),假手术组和模型组灌胃等量的生理盐水,1次/d,连续4周。

**1.3.2 神经功能评定** 参考胸段脊柱骨折后功能评判标准(Basso-Beattie-Bresnahan, BBB)对各组大鼠进行神经功能评定<sup>[13]</sup>。

**1.3.3 显微结构分析** 通过显微 CT 扫描左侧股骨及股骨中骨,使用 Vgstudio Max 2.2 软件对骨小梁和皮质骨进行定量分析。获得骨密度(Bone Mineral Density,BMD)、骨体积分数(Bone Volume Fraction, Bone Volume/Total Volume, BV/TV)、骨小梁数(Trabecular Number, Tb. N)、骨小梁厚度(Trabecular Thickness, Tb. Th)、皮质厚度(Cortical Thickness,Ct. Th)。

**1.3.4 HE 染色** 麻醉 6 只大鼠后,分离受损脊髓,脊髓组织经固定、脱水、包埋切片、脱蜡和水化后进行 HE 染色,最后在显微镜下观察脊髓组织损伤。

**1.3.5 TUNEL 染色** 1.3.4 节中剩余石蜡切片,经 DAB 显色后苏木精复染、封片,高倍镜下随机选取 5 个视野观察,Image Pro-Plus 6.0 软件计数,凋亡指数=(凋亡细胞数/总细胞数)×100%

**1.3.6 ELISA 法检测血清骨钙素、CTX-I、BMP-2 的含量** 各组另选 6 只大鼠,腹腔静脉血,离心后取上层血清。根据骨钙素、CTX-I、BMP-2 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中骨钙素、CTX-I、BMP-2 的含量。

**1.3.7 Western Blot 方法检测 Bax、ALP、Wnt-3a、β-catenin、GSK-3β 蛋白表达** 提取各组大鼠脊髓总蛋白,对蛋白进行定量、电泳分离。转 PVDF 膜后室温条件下封闭 2 h,最后再分别加 Bax、ALP、Wnt-3a、β-catenin、GSK-3β、GAPDH 一抗在 4 ℃ 条件下孵育过夜,加入二抗在 37 ℃ 条件下孵育 90 min。最后 Image J 软件分析各个蛋白条带的灰度值,计算各个蛋白的相对表达水平。

1.4 统计学方法

实验数据用 Graphpad Prism 9.0 软件进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。多组间的比较用单因素

方差分析,SNK-*q* 检验用于两组间的比较。 $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血根碱对大鼠神经功能的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 BBB 评分减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,血根碱低、中、高剂量组大鼠 BBB 评分增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与血根碱高剂量组比较,抑制剂组大鼠 BBB 评分减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能评分比较( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	BBB 评分/分
假手术组	18.37±2.54
模型组	3.42±0.86 <sup>1)</sup>
血根碱低剂量组	5.67±1.02 <sup>2)</sup>
血根碱中剂量组	8.82±1.15 <sup>2)3)</sup>
血根碱高剂量组	12.45±1.27 <sup>2)3)4)</sup>
抑制剂组	6.13±1.12 <sup>5)</sup>
<i>F</i>	173.975
<i>P</i>	<0.001

注:1)相较于假手术组, $P < 0.05$ ;2)相较于模型组, $P < 0.05$ ;3)相较于血根碱低剂量组, $P < 0.05$ ;4)相较于血根碱中剂量组, $P < 0.05$ ;5)相较于血根碱高剂量组, $P < 0.05$ 。

2.2 血根碱对大鼠骨骼显微结构的影响

与假手术组比较,模型组大鼠骨密度、BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th 减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,血根碱低、中、高剂量组大鼠骨密度、BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th 增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与血根碱高剂量组比较,抑制剂组大鼠骨密度、BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th 减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组大鼠骨骼显微结构的比较( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	BMD/(mg·cm <sup>-3</sup> )	(BV/TV)/%	Tb. N/mm <sup>-1</sup>	Tb. Th/μm	Ct. Th/μm
假手术组	271.54±29.41	24.65±2.31	3.92±0.64	0.13±0.03	507.13±55.62
模型组	161.82±15.92 <sup>1)</sup>	15.24±1.67 <sup>1)</sup>	2.15±0.42 <sup>1)</sup>	0.05±0.01 <sup>1)</sup>	346.82±38.94 <sup>1)</sup>
血根碱低剂量组	185.57±17.65 <sup>2)</sup>	17.52±1.72 <sup>2)</sup>	2.73±0.48 <sup>2)</sup>	0.06±0.01	395.36±32.96 <sup>2)</sup>
血根碱中剂量组	209.31±21.48 <sup>2)3)</sup>	19.94±1.84 <sup>2)3)</sup>	3.29±0.52 <sup>2)</sup>	0.08±0.01 <sup>2)3)</sup>	445.78±42.64 <sup>2)3)</sup>
血根碱高剂量组	236.52±24.37 <sup>2)3)4)</sup>	22.13±2.06 <sup>2)3)4)</sup>	3.76±0.57 <sup>2)3)</sup>	0.09±0.02 <sup>2)3)</sup>	491.07±46.42 <sup>2)3)</sup>
抑制剂组	197.83±18.64 <sup>5)</sup>	17.85±1.78 <sup>5)</sup>	2.85±0.46 <sup>5)</sup>	0.06±0.01 <sup>5)</sup>	398.65±37.83 <sup>5)</sup>
<i>F</i>	38.412	38.437	19.909	36.282	24.681
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)相较于假手术组, $P < 0.05$ ;2)相较于模型组, $P < 0.05$ ;3)相较于血根碱低剂量组, $P < 0.05$ ;4)相较于血根碱中剂量组, $P < 0.05$ ;5)相较于血根碱高剂量组, $P < 0.05$ 。

2.3 血根碱对大鼠脊髓损伤的影响

假手术组大鼠脊髓组织结构正常,细胞排列紧密有序且完整,细胞核清;模型组大鼠脊髓组织结构受损严重,细胞排列疏松无序,核仁固缩,水肿及炎症细胞浸润明显;血根碱低、中、高剂量组大鼠脊髓损伤减轻,

神经元排列较紧密有序、核膜较清晰、炎症细胞浸润减轻;抑制剂组大鼠脊髓组织结构受损加重,水肿及炎症细胞浸润严重,见图 1。

2.4 血根碱对大鼠骨髓神经细胞凋亡的影响

与假手术组比较,模型组大鼠骨髓神经细胞凋亡

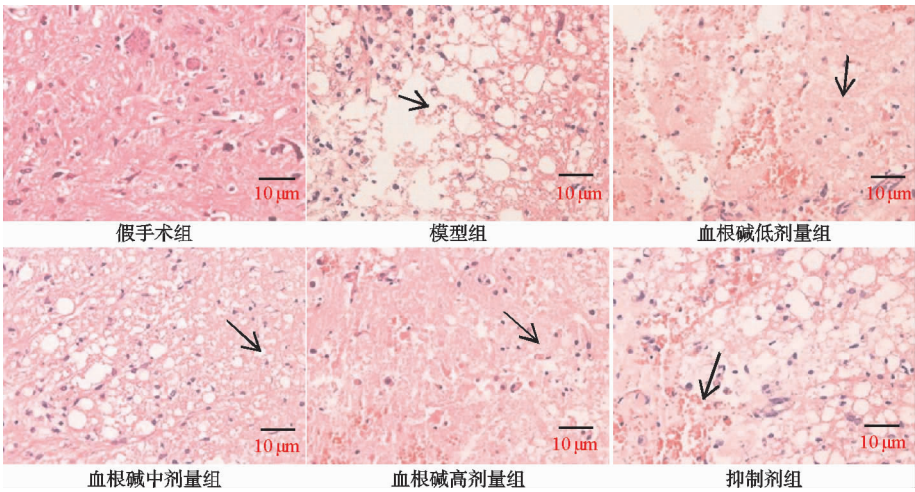


图 1 各组大鼠 HE 染色图(×200)

指数增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,血根碱低、中、高剂量组大鼠骨髓神经细胞凋亡指数减少,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与血根碱高剂量组比较,抑制剂组大鼠骨髓神经细胞凋亡指数增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3 及图 2。

2.5 血根碱对大鼠血清骨钙素、CTX-I、BMP-2 含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清中骨钙素、BMP-2 含量降低,CTX-I 含量升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,血根碱低、中、高剂量组大鼠血清中骨钙素、BMP-2 含量升高,CTX-I 含量降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与血根碱高剂量组比较,抑制剂组大鼠血清中骨钙素、BMP-2 含量降低,CTX-I 含量升高,

差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4。

表 3 各组大鼠骨髓神经细胞凋亡指数的比较( $\bar{x}\pm s, n=12$ )	
组别	细胞凋亡指数/%
假手术组	$3.52\pm0.24$
模型组	$45.73\pm3.86^{1)}$
血根碱低剂量组	$40.06\pm2.57^{2)}$
血根碱中剂量组	$34.63\pm2.14^{2)3)}$
血根碱高剂量组	$23.62\pm1.85^{2)3)4)}$
抑制剂组	$37.68\pm2.55^{5)}$
<i>F</i>	465.687
<i>P</i>	$<0.001$

注:1)相较于假手术组,  $P<0.05$ ;2)相较于模型组,  $P<0.05$ ;3)相较于血根碱低剂量组,  $P<0.05$ ;4)相较于血根碱中剂量组,  $P<0.05$ ;5)相较于血根碱高剂量组,  $P<0.05$ 。

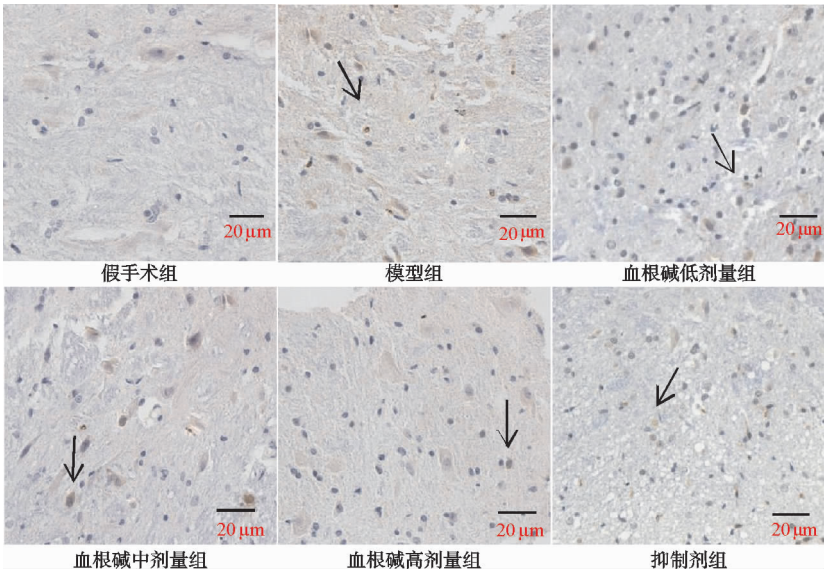


图 2 各组大鼠 TUNEL 染色图(×200)

2.6 血根碱对大鼠脊髓 Bax、ALP、Wnt-3a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脊髓中 Bax、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平升高,ALP、Wnt-3a、 $\beta$ -catenin 蛋白表

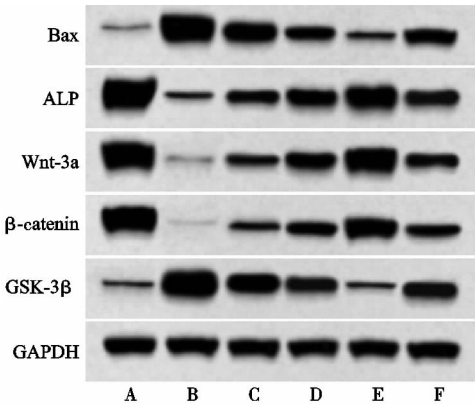
达水平降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,血根碱低、中、高剂量组脊髓中 Bax、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平降低,ALP、Wnt-3a、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与血根碱高剂

表 4 各组大鼠骨钙素、CTX- I、BMP-2 含量的比较( $\bar{x} \pm s, n=12, \text{ng/mL}$ )

组别	OC	CTX- I	BMP-2
假手术组	18.64 $\pm$ 2.85	27.58 $\pm$ 2.21	14.74 $\pm$ 2.26
模型组	7.32 $\pm$ 1.63 <sup>1)</sup>	42.83 $\pm$ 3.87 <sup>1)</sup>	5.12 $\pm$ 1.27 <sup>1)</sup>
血根碱低剂量组	10.25 $\pm$ 2.07 <sup>2)</sup>	39.14 $\pm$ 3.52 <sup>2)</sup>	7.31 $\pm$ 1.35 <sup>2)</sup>
血根碱中剂量组	13.36 $\pm$ 2.12 <sup>2)3)</sup>	35.21 $\pm$ 2.65 <sup>2)3)</sup>	9.86 $\pm$ 1.64 <sup>2)3)</sup>
血根碱高剂量组	15.78 $\pm$ 2.43 <sup>2)3)</sup>	31.45 $\pm$ 2.43 <sup>2)3)4)</sup>	11.24 $\pm$ 1.78 <sup>2)3)</sup>
抑制剂组	11.54 $\pm$ 2.28 <sup>5)</sup>	40.56 $\pm$ 3.37 <sup>5)</sup>	8.23 $\pm$ 1.47 <sup>5)</sup>
<i>F</i>	38.237	43.154	48.835
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)相较于假手术组, $P<0.05$ ;2)相较于模型组, $P<0.05$ ;3)相较于血根碱低剂量组, $P<0.05$ ;4)相较于血根碱中剂量组, $P<0.05$ ;5)相较于血根碱高剂量组, $P<0.05$ 。

量组比较,抑制剂组脊髓中 Bax、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平升高,ALP、Wnt-3a、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3 及表 5。



注: A 为假手术组; B 为模型组; C 为血根碱低剂量组; D 为血根碱中剂量组; E 为血根碱高剂量组; F 为抑制剂组

图 3 Western Blot 检测各组大鼠中 Bax、ALP、Wnt-3a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  蛋白表达

表 5 各组大鼠脊髓中 Bax、cleaved caspase-3、Wnt-3a、 $\beta$ -catenin 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	Bax/GAPDH	ALP/GAPDH	Wnt-3a/GAPDH	$\beta$ -catenin/GAPDH	GSK-3 $\beta$ /GAPDH
假手术组	0.14 $\pm$ 0.03	2.14 $\pm$ 0.19	1.88 $\pm$ 0.13	1.65 $\pm$ 0.13	0.17 $\pm$ 0.03
模型组	1.92 $\pm$ 0.17 <sup>1)</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	1.88 $\pm$ 0.14 <sup>1)</sup>
血根碱低剂量组	1.38 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	0.67 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	0.57 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	0.45 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	1.41 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>
血根碱中剂量组	0.87 $\pm$ 0.08 <sup>2)3)</sup>	1.13 $\pm$ 0.09 <sup>2)3)</sup>	1.12 $\pm$ 0.09 <sup>2)3)</sup>	0.97 $\pm$ 0.08 <sup>2)3)</sup>	0.92 $\pm$ 0.08 <sup>2)3)</sup>
血根碱高剂量组	0.33 $\pm$ 0.02 <sup>2)3)4)</sup>	1.65 $\pm$ 0.15 <sup>2)3)4)</sup>	1.76 $\pm$ 0.15 <sup>2)3)4)</sup>	1.38 $\pm$ 0.12 <sup>2)3)4)</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>2)3)4)</sup>
抑制剂组	0.96 $\pm$ 0.08 <sup>5)</sup>	0.83 $\pm$ 0.09 <sup>5)</sup>	0.78 $\pm$ 0.07 <sup>5)</sup>	0.67 $\pm$ 0.06 <sup>5)</sup>	0.91 $\pm$ 0.07 <sup>5)</sup>
<i>F</i>	272.337	218.854	308.322	287.821	351.251
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)相较于假手术组, $P<0.05$ ;2)相较于模型组, $P<0.05$ ;3)相较于血根碱低剂量组, $P<0.05$ ;4)相较于血根碱中剂量组, $P<0.05$ ;5)相较于血根碱高剂量组, $P<0.05$ 。

白表达水平降低,脊髓病理损伤严重、神经细胞凋亡指数、CTX- I 含量、Bax 蛋白表达水平升高,提示脊柱骨折大鼠模型构建成功。

血根碱是从白屈菜、博落回罂粟科植物中分离出来的,因其具有多种药理活性而备受关注。Li 等<sup>[7]</sup>发现血根碱可以抑制体外破骨细胞骨吸收和破骨细胞形成。Zhang 等<sup>[8]</sup>研究发现,血根碱可显著增加碱性磷酸酶活性,促进成骨细胞分化调节因子(BMP2、成骨

3 讨论

脊柱是人体背部主要的支柱,连接器官神经、血管和脊椎,因此,脊柱骨折通常会伴有严重的中枢神经系统损伤,主要病理变化包括大量的神经细胞死亡等,此外,致残率与死亡率较高,严重威胁着患者健康和生命安全<sup>[14]</sup>。因此,寻求安全有效的治疗方法是目前临床工作的重点。CTX-I是骨I型胶原的降解产物,可作为骨吸收的标志物<sup>[15]</sup>。骨钙素是骨中最丰富的非胶原蛋白,在成骨细胞中特异性表达<sup>[16]</sup>。碱性磷酸酶属于一类糖蛋白,大多由成骨细胞分泌形成,在指示骨细胞活性方面,碱性磷酸酶起关键作用。BMP-2 参与调节成骨细胞分化,是软骨和骨形成的主要诱导因子<sup>[17]</sup>。研究发现,脊柱骨折大鼠模型的骨密度、BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th 显著降低<sup>[18]</sup>。本研究构建脊柱骨折大鼠模型后发现,模型组大鼠 BBB 评分、骨密度、BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th、OC、BMP-2 含量、碱性磷酸酶蛋

细胞特异性转录因子和骨保护蛋白)的表达。在一项生物信息学研究中,血根碱被确定为骨质疏松症治疗的潜在候选药物<sup>[19]</sup>。本研究用不同浓度的血根碱灌胃大鼠发现,大鼠 BBB 评分、骨密度、BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th、OC、BMP-2 含量、碱性磷酸酶蛋白表达水平升高,神经细胞凋亡指数、CTX- I 含量、Bax 蛋白表达水平降低,结果表明血根碱的治疗可以促进成骨细胞的分化、抑制破骨细胞活性,以促进脊柱骨折大

鼠骨折愈合,血根碱同时具有改善脊柱骨折大鼠神经损伤的作用。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是骨稳态的关键调节剂。程经纬等<sup>[9]</sup>研究发现,上调 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路后可影响骨代谢,并减轻 2 型糖尿病小鼠骨质疏松。罗诒财等<sup>[10]</sup>研究表明,激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可促进成骨细胞增殖与分化。Zhao 等<sup>[20]</sup>发现 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活可促进骨折愈合。脂联素通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径调节骨间充质干细胞成骨分化<sup>[21]</sup>。本研究发现血根碱能升高 Wnt-3a、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平,降低 GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平,提示血根碱可能通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,促进成骨细胞的分化,抑制破骨细胞活性,从而起到促进骨折愈合、改善脊柱骨折大鼠神经损伤的作用。使用 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制剂后,降低了血根碱对脊柱骨折大鼠骨折愈合的促进作用及对神经损伤的改善作用。

综上所述,血根碱可能通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,促进成骨细胞的分化,抑制破骨细胞活性,从而起到促进脊柱骨折大鼠骨折愈合及改善神经损伤的作用,本研究为脊柱骨折的治疗提供了新思路。然而本研究尚存在不足之处,仅验证了血根碱对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的作用,未对其他靶点、途径进行验证,后续研究将进一步明确血根碱在脊柱骨折中的作用机理。

## 参考文献

- [1] MYERS M A, HALL S, WRIGHT A, et al. Spinal fractures incurred by sports-related injuries[J]. *World Neurosurg*, 2021, 151(1): e747-e752.
- [2] PONKILAINEN V T, TOIVONEN L, NIEMI S, et al. Incidence of spine fracture hospitalization and surgery in finland in 1998—2017[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2020, 45(7): 459-464.
- [3] 陈俊华, 孙治平, 李放, 等. 经椎弓根伤椎椎体内植骨联合短节段内固定治疗单节段骨质疏松性脊柱骨折[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2022, 37(9): 931-933.
- [4] QU Q, PANG Y, ZHANG C, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit vein graft intimal hyperplasia and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 133-146.
- [5] 卫永鲲, 雷涛, 赵利明, 等. 人脐带间充质干细胞对脊柱骨折大鼠愈合及神经功能的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(12): 2212-2215.
- [6] 汤丽丽, 郭洁, 李晶, 等. 血根碱通过 TGF- $\beta$ 1/Smad 通路抑制化疗耐药性宫颈癌细胞的增殖[J]. *广州中医药大学学报*, 2022, 39(11): 2627-2631.
- [7] LI H, ZHAI Z, LIU G, et al. Sanguinarine inhibits osteoclast formation and bone resorption via suppressing

RANKL-induced activation of NF- $\kappa$ B and ERK signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(3): 951-956.

- [8] ZHANG F, XIE J, WANG G, et al. Anti-osteoporosis activity of Sanguinarine in preosteoblast MC3T3-E1 cells and an ovariectomized rat model[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4626-4633.
- [9] 程经纬, 柳杨青, 汪艳芳, 等. Mstn 基因敲除通过上调 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路影响骨代谢并减轻 2 型糖尿病小鼠骨质疏松[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(7): 1246-1252.
- [10] 罗诒财, 钟晓霞, 李昊. 罗汉果苷 V 通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对糖尿病状态成骨细胞增殖与分化的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(8): 781-785.
- [11] 王晓晨, 陈星宇, 胡海燕, 等. 异氟烷麻醉对脊柱骨折大鼠神经功能、镇痛及脊髓 c-FOS 蛋白的影响[J]. *实用药物与临床*, 2022, 25(8): 684-689.
- [12] 陈烨, 严瑞, 贾崇高, 等. 基于 YKL-40 和 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路探讨山茱萸颗粒对糖尿病肾病的保护作用[J]. *中药材*, 2020, 43(4): 961-967.
- [13] 赵曼云, 郭蔚虹, 张霞. 益母草碱通过调节 cAMP/PKA 信号通路抑制脊髓损伤大鼠神经细胞凋亡[J]. *中成药*, 2022, 44(7): 2315-2319.
- [14] 王芸. 风险护理在脊柱骨折患者围术期护理中的应用及对患者疼痛症状的影响观察[J]. *中国药物与临床*, 2021, 21(5): 888-890.
- [15] CHAI X, YINWANG E, WANG Z, et al. Predictive and prognostic biomarkers for lung cancer bone metastasis and their therapeutic value[J]. *Front Oncol*, 2021, 11(1): 1-22.
- [16] KOMORI T. What is the function of osteocalcin? [J]. *J Oral Biosci*, 2020, 62(3): 223-227.
- [17] YU S, GUO J, SUN Z, et al. BMP2-dependent gene regulatory network analysis reveals Klf4 as a novel transcription factor of osteoblast differentiation [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(2): 197-203.
- [18] 李鹏, 李晓博, 王林钦. 神经干细胞促进大鼠局部神经元降钙素基因相关肽生成及脊柱骨折愈合机制研究[J]. *陕西医学杂志*, 2022, 51(9): 1066-1070.
- [19] YU G, WANG L, LI Y, et al. Identification of drug candidate for osteoporosis by computational bioinformatics analysis of gene expression profile[J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18(1): 1-7.
- [20] ZHAO C, YU T, DOU Q, et al. Knockout of TLR4 promotes fracture healing by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(2): 152766.
- [21] WANG Y, ZHANG X, SHAO J, et al. Adiponectin regulates BMSC osteogenic differentiation and osteogenesis through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1-13.