

• 论 著 •

芹菜素调节 OPG/RANKL/RANK 信号通路对 创伤性骨折大鼠骨折愈合的影响*

陈 月, 苗存良[△], 安志辉, 杜蒙蒙, 刘国峰, 贾天阳, 李 盼
邯郸市中心医院手足显微外科, 河北邯郸 056001

摘 要:目的 探讨芹菜素对骨保护素(OPG)/核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL)/核因子 κB 受体活化因子(RANK)信号通路的调控作用及对创伤性骨折大鼠骨折愈合的影响。方法 采用闭合式股骨干骨折术构建创伤性骨折大鼠模型,将造模成功的大鼠随机分为模型组,芹菜素低、中、高剂量组和阳性对照组,每组 10 只,另取 10 只健康大鼠作为对照组。各组给予相应干预 30 d。采用计算机断层扫描测定大鼠骨小梁密度和厚度,番红 O-固绿染色观察大鼠软骨组织病理学变化,酶联免疫吸附试验检测大鼠血清中骨钙素(BGP)、碱性磷酸酶(ALP)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6 水平,实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法检测大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK mRNA 和蛋白水平。结果 对照组大鼠软骨组织正常,结构完整;与对照组比较,模型组大鼠软骨组织出现严重损伤,骨小梁密度和厚度、血清 BGP、ALP 及股骨组织 OPG mRNA 和蛋白水平降低($P<0.05$),血清 iNOS、TNF-α、IL-6 及股骨组织 RANKL、RANK mRNA 和蛋白水平升高($P<0.05$);与模型组比较,芹菜素低、中、高剂量组大鼠软骨组织病理损伤改善,骨小梁密度和厚度、血清 BGP、ALP 及股骨组织 OPG mRNA 和蛋白水平依次升高($P<0.05$),血清 iNOS、TNF-α、IL-6 及股骨组织 RANKL、RANK mRNA 和蛋白水平依次降低($P<0.05$);芹菜素高剂量组与阳性对照组各项指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 芹菜素可以减轻创伤性骨折大鼠炎症反应,促进骨折愈合,其机制可能与上调 OPG 表达,抑制 RANKL/RANK 信号通路有关。

关键词: 芹菜素; 创伤性骨折大鼠; 骨保护素/核因子 κB 受体活化因子配体/核因子 κB 受体活化因子信号通路; 骨折愈合

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.12.008 中图法分类号:R641
文章编号:1673-4130(2023)12-1446-06 文献标志码:A

Effect of apigenin on fracture healing in rats with traumatic fracture by regulating OPG/RANKL/RANK signaling pathway*

CHEN Yue, MIAO Cunliang[△], AN Zhihui, DU Mengmeng, LIU Guofeng, JIA Tianyang, LI Pan
Department of Hand and Foot Microsurgery, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of apigenin on osteoprotegerin (OPG)/receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)/receptor activator of nuclear factor-κB (RANK) signaling pathway and fracture healing in rats with traumatic fracture. **Methods** The rat model of traumatic fracture was established by closed femoral shaft fracture. The rats were randomly divided into model group, low dose apigenin group, medium dose apigenin group, high dose apigenin group and positive control group, with 10 rats in each group. Another 10 healthy rats were used as control group. Each group was given corresponding intervention for 30 d. The density and thickness of trabecular bone were measured by computed tomography, and the pathological changes of cartilage were observed by safranin O-fast green staining. The serum levels of osteocalcin (BGP), alkaline phosphatase (ALP), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin (IL)-6 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein levels of OPG, RANKL, and RANK in rat femoral tissue were detected by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot. **Results** In the control group, the cartilage tissue was normal and the structure was intact. Compared with the control group, the cartilage tissue of rats in the model group was severely dam-

* 基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目(20201574)。
作者简介:陈月,男,主治医师,主要从事四肢骨折相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: hdszxyymcl@163.com。
网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230610.0818.006.html\(2023-06-12\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230610.0818.006.html(2023-06-12))

aged, the density and thickness of bone trabecula, the levels of serum BGP and ALP, OPG mRNA and protein in femoral tissue were decreased ($P < 0.05$), the levels of iNOS, TNF- α , IL-6 in serum, the RANKL, RANK mRNA and protein in femoral tissue were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the pathological changes of cartilage tissue in the low, medium, and high dose apigenin groups were significantly improved, and the density and thickness of trabecular bone, serum BGP and ALP levels, and OPG mRNA and protein levels in femoral tissue were increased in sequence ($P < 0.05$), the levels of iNOS, TNF- α , IL-6 in serum and RANKL, RANK mRNA and protein in femoral tissue were decreased in sequence ($P < 0.05$). There was no significant difference between high dose apigenin group and positive control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Apigenin could reduce inflammatory response and promote fracture healing in rats with traumatic fracture. The mechanism may be related to up-regulation of OPG expression and inhibition of RANKL/RANK signaling pathway.

Key words: apigenin; traumatic fracture rats; osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/receptor activator of nuclear factor- κ B signaling pathway; fracture healing

创伤性骨折是指机体受到暴力或处于疲劳状态下, 导致骨骼或者骨小梁出现部分或者完全中断, 给患者的心理和生活带来了极大的痛苦^[1-2]。因此, 寻求较好的治疗方案成为当今研究的重点。有研究指出, 多模式康复治疗, 内外兼治, 可外治创伤肿胀, 内调气血^[3]。其中骨一方、六藤汤等中草药用于临床治疗, 起到活血化瘀、清热解毒等作用, 可有效防止血栓形成, 但是这些药物无法从根本上治愈创伤性骨折, 只能减轻患者疼痛。芹菜素作为一种天然类黄酮化合物, 具有抗炎、抗病毒、抗氧化、扩张血管等多种药理作用, 且芹菜素具有无诱变性和低毒性的特点, 常被应用于各项研究^[4]。目前已知骨保护素(OPG)/核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)/核因子 κ B 受体活化因子(RANK)是骨调节和破骨细胞分化、成熟过程中的重要信号通路^[5]。但是芹菜素对创伤性骨折大鼠 OPG/RANKL/RANK 信号通路的影响研究较少。因此, 本研究构建创伤性骨折大鼠骨折模型, 使用芹菜素干预该模型, 旨在从 OPG/RANKL/RANK 信号通路揭示芹菜素对创伤性骨折大鼠骨折愈合的影响, 为创伤性骨折患者的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级雄性 SD 大鼠 60 只, 7~8 周龄, 体重 240~270 g, 购自河北赛业生物科技有限公司, 许可证号: SCXK(冀)2020-0031。饲养条件: 温度 24℃, 湿度 50%, 自由进食进水。本研究经本院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 医用克氏针(型号 ZAZJ-I)购自上海紫霄医疗器械有限公司, 计算机断层扫描仪(型号 Eplus-166 PET)购自杭州高能医疗设备有限公司, 显微镜(型号 SMZ745)、实时荧光定量 PCR(qPCR)仪(型号 eQ162CP)均购自上海普赫生物科技有限公司, 酶标仪(型号 HBS-ScanX)购自南京德铁实验设备有

限公司, 凝胶成像系统(型号 BOT-850)购自北京中仪博腾科技有限公司。芹菜素(批号 SA831-60), 原料药, 纯度 $\geq 98.5\%$, 购自陕西新阳禾生物科技有限公司; 伤科接骨片(批号 20210317)购自大连美罗中药厂有限公司; 番红 O-固绿染色试剂盒、骨钙素(BGP)、碱性磷酸酶(ALP)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒, PCR 扩增试剂盒, BCA 蛋白测定试剂盒均购自美国 AbMole 公司; TRIzol 试剂, 兔源 OPG、RANKL、RANK 单克隆抗体均购自美国 SantaCruz 公司; 羊抗鼠二抗(批号 LG3892)购自北京雷根生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 创伤性骨折大鼠模型的构建及分组给药 结合文献[6]中的方法, 采用闭合式股骨干骨折术, 构建创伤性骨折大鼠模型。首先将大鼠以戊巴比妥钠麻醉, 局部去毛、消毒。用 1.0 mm 医用克氏针从左股骨髁间窝处垂直穿入, 直至髓腔; 然后稍增大入针点, 改换另一方向将克氏针插入髓腔; 之后拔出克氏针, 在股骨中段以一拇指为支点, 轻而缓慢的折骨, 当感觉到骨折时即可停止用力, 避免骨折移位; 最后将克氏针从最初穿针点穿入, 直至骨折远端, 剪掉克氏针体外多余部分, 针尾埋于皮下, 用碘附进行局部消毒后, 将大鼠放入笼中饲养。按照随机数字表法将建模成功的大鼠分为模型组, 芹菜素低(10 mg/kg)、中(20 mg/kg)、高(40 mg/kg)剂量组^[7]和阳性对照组(伤科接骨片, 0.33 g/kg)^[8], 每组 10 只。另随机选取 10 只健康大鼠作为对照组(不进行任何处理)。芹菜素低、中、高剂量组分别给予芹菜素 10、20、40 mg/kg 灌胃给药(浓度分别为 1、2、4 mg/mL 的芹菜素溶液, 灌胃体积 10 mL/kg); 阳性对照组给予大鼠 0.33 g/kg 的伤科接骨片灌胃(0.033 g/mL 伤科接骨片混悬液, 灌胃体积 10 mL/kg); 模型组和对照组大鼠给予等体积

生理盐水灌胃;每天给药 1 次,连续给药 30 d。

1.3.2 取材及骨小梁密度、厚度检测 给药结束后,采用戊巴比妥钠对大鼠麻醉,腹主动脉取血 3 mL,分离血清,储存于-70 ℃冰箱中,用于后续 ELISA 检测。大鼠实施安乐死,去毛、消毒,分离骨折周围软骨组织,快速置于 4%的多聚甲醛中固定 24 h,制备石蜡切片,用于后续番红 O-固绿染色观察软骨组织病理学变化。同时取出大鼠骨折的股骨组织,用计算机断层扫描仪计算大鼠骨小梁密度和厚度,之后储存于-70 ℃冰箱中,用于后续检测。

1.3.3 番红 O-固绿染色观察软骨组织病理学变化 取 1.3.2 中石蜡切片,在二甲苯中固定 30 min;随后用浓度为 100%、95%、85%、75%的乙醇溶液中分别脱水 6 min;蒸馏水冲洗后,用铁苏木素液染色 10 min;随后置于 1%的醋酸溶液中快速冲洗,入固绿染液中浸染,蒸馏水冲洗;入番红 O 染液中浸染,蒸馏水冲洗;最后用不同浓度的乙醇脱水,加二甲苯透明处理,用中性树脂封片;显微镜下观察拍照。

表 1 引物序列

基因名称	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
OPG	GTTCTTGACAGCTTCACCA	ATGCAGCCCAGTGACCATTTC
RANKL	ACTAGCATCAAAATCCCAAG	GTAGAAAGCCCCAAAGTACG
RANK	CTTGGAACCAACTGCACCCCTC	AGCTACTGTAGTAAACGCCGA
GAPDH	TACCTGAGACTAAGCTTCG	AGTTCCAATGGCCATGATCC

1.3.6 蛋白质印迹法检测大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白水平 取上述 1.3.2 中适量备用股骨组织,研磨后加入细胞裂解液裂解,用 BCA 法对蛋白进行定量,将蛋白样品置于凝胶电泳上进行分离、转膜,5%脱脂奶粉封闭 1.5 h,加入兔源 OPG(1:550)、RANKL(1:750)、RANK(1:500)、 β -actin(1:700)一抗,4 ℃孵育过夜。加入羊抗兔二抗(1:1150)常温孵育 1.5 h,经 TBST 清洗。ECL 显色试剂显影后置于凝胶成像仪扫描观察,用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,计算得到大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件对数据进行处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 芹菜素对创伤性骨折大鼠骨小梁密度和厚度的影响 与对照组比较,模型组大鼠骨小梁密度和厚度降低($P < 0.05$);与模型组比较,芹菜素低、中、高剂量组大鼠骨小梁密度和厚度依次升高($P < 0.05$);芹

1.3.4 ELISA 检测大鼠血清中 BGP、ALP、iNOS、TNF- α 和 IL-6 水平 取出 1.3.2 中储存的血清,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,首先将所有试剂充分混匀,按照比例稀释标准品,离心后取上清液,之后置入酶标孔中,用封板胶纸封住反应孔,室温孵育,依次加入工作液、显色底物,每个样品做 3 个复孔,同时设立平行对照孔,利用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度,绘制相应标准曲线,依次测定各组大鼠血清中 BGP、ALP、iNOS、TNF- α 、IL-6 水平。

1.3.5 qPCR 检测大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK mRNA 水平 取上述 1.3.2 中适量备用股骨组织,研磨匀浆后用 TRIzol 试剂分离总 RNA,反转录成 cDNA 后进行 qPCR 反应。引物由天津海普斯基因科技有限公司合成,序列见表 1。设置温度程序如下:93 ℃ 1 min,95 ℃ 19 s,60 ℃ 21 s,72 ℃ 13 s 进行 41 个循环。以 GAPDH 为内部参照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法检测股骨组织 OPG、RANKL、RANK mRNA 水平。

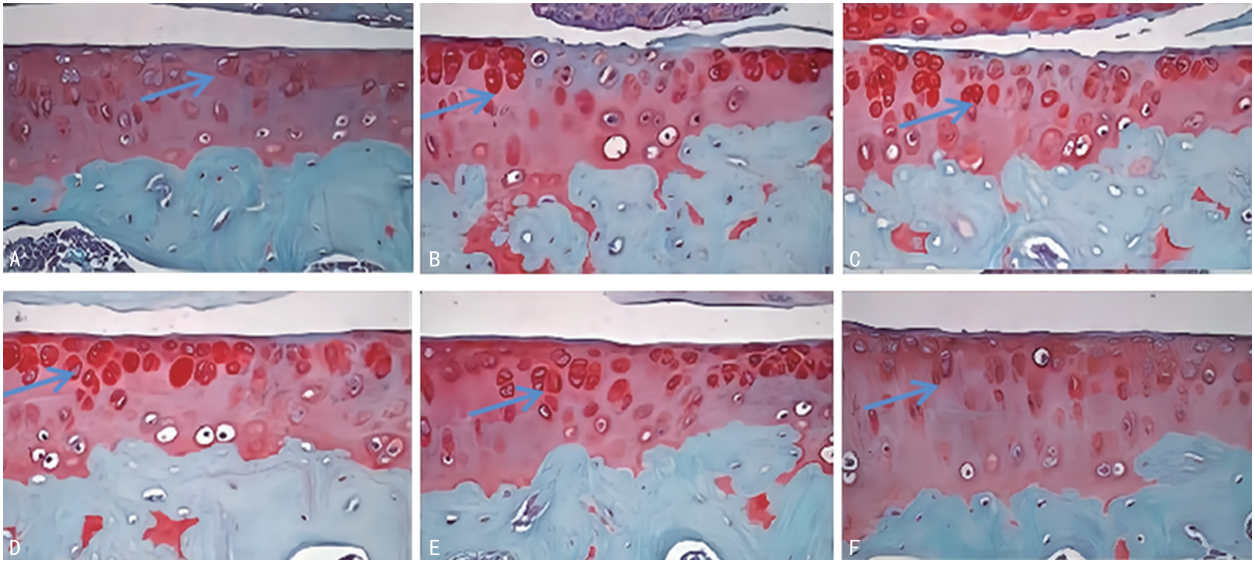
素高剂量组和阳性对照组大鼠骨小梁密度和厚度差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 芹菜素对创伤性骨折大鼠骨小梁密度和厚度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	骨小梁密度(mg/mm ³)	骨小梁厚度(mm)
对照组	800.65±38.64	0.13±0.02
模型组	523.64±25.44 ^a	0.03±0.01 ^a
芹菜素低剂量组	600.23±36.77 ^{ab}	0.06±0.01 ^{ab}
芹菜素中剂量组	681.64±42.14 ^{abc}	0.09±0.01 ^{abc}
芹菜素高剂量组	764.84±45.31 ^{abcd}	0.12±0.01 ^{abcd}
阳性对照组	770.21±53.19 ^{abcd}	0.12±0.02 ^{abcd}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与芹菜素低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与芹菜素中剂量组比较,^d $P < 0.05$ 。

2.2 芹菜素对创伤性骨折大鼠骨折周围软骨组织病理学变化的影响 番红 O-固绿染色后,深红色部位为软骨组织,对照组大鼠软骨组织无变化,结构完整;与对照组比较,模型组大鼠软骨组织出现严重损伤;经芹菜素低、中、高剂量干预后,大鼠软骨组织损伤出现不同程度地好转;其中芹菜素高剂量组效果最佳,且与阳性对照组比较,效果差异不明显。见图 1。



注：A、B、C、D、E、F 分别为对照组，模型组，芹菜素低、中、高剂量组，阳性对照组大鼠软骨组织病理图。

图 1 各组大鼠软骨组织病理图(×200,箭头指示为软骨组织)

2.3 芹菜素对创伤性骨折大鼠血清 BGP、ALP 水平的影响 与对照组比较,模型组大鼠血清 BGP、ALP 水平降低($P<0.05$);与模型组比较,芹菜素低、中、高剂量组大鼠血清 BGP、ALP 水平依次升高($P<0.05$);芹菜素高剂量组和阳性对照组大鼠血清 BGP、ALP 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 芹菜素对创伤性骨折大鼠血清 BGP、ALP 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	BGP(μg/L)	ALP(U/L)
对照组	2.20±0.24	230.59±24.35
模型组	0.39±0.05 ^a	86.23±9.52 ^a
芹菜素低剂量组	0.67±0.07 ^{ab}	125.49±13.46 ^{ab}
芹菜素中剂量组	0.92±0.09 ^{abc}	168.26±16.37 ^{abc}
芹菜素高剂量组	1.21±0.12 ^{abcd}	197.43±20.01 ^{abcd}
阳性对照组	1.23±0.21 ^{abcd}	198.37±20.13 ^{abcd}

注：与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与芹菜素低剂量组比较,^c $P<0.05$;与芹菜素中剂量组比较,^d $P<0.05$ 。

2.4 芹菜素对创伤性骨折大鼠血清炎症因子水平的

表 4 芹菜素对创伤性骨折大鼠血清炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}, n=10$)

组别	iNOS	TNF-α	IL-6
对照组	50.64±5.12	42.26±4.36	39.52±4.36
模型组	175.25±17.16 ^a	95.61±9.84 ^a	145.67±15.62 ^a
芹菜素低剂量组	130.46±12.45 ^{ab}	82.81±8.95 ^{ab}	111.59±12.43 ^{ab}
芹菜素中剂量组	90.15±9.84 ^{abc}	66.53±6.89 ^{abc}	86.25±8.94 ^{abc}
芹菜素高剂量组	62.48±6.45 ^{abcd}	51.12±5.46 ^{abcd}	51.02±5.64 ^{abcd}
阳性对照组	59.96±6.43 ^{abcd}	49.63±5.62 ^{abcd}	48.36±5.26 ^{abcd}

注：与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与芹菜素低剂量组比较,^c $P<0.05$;与芹菜素中剂量组比较,^d $P<0.05$ 。

2.6 芹菜素对创伤性骨折大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白水平的影响 与对照组比较,

影响 与对照组比较,模型组大鼠血清 iNOS、TNF-α 和 IL-6 水平升高($P<0.05$);与模型组比较,芹菜素低、中、高剂量组大鼠血清 iNOS、TNF-α 和 IL-6 水平依次降低($P<0.05$);芹菜素高剂量组和阳性对照组大鼠血清 iNOS、TNF-α 和 IL-6 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

2.5 芹菜素对创伤性骨折大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK mRNA 水平的影响 与对照组比较,模型组大鼠股骨组织 OPG mRNA 水平降低($P<0.05$),RANKL、RANK mRNA 水平升高($P<0.05$);与模型组比较,芹菜素低、中、高剂量组大鼠股骨组织 OPG mRNA 水平依次升高($P<0.05$),RANKL、RANK mRNA 水平依次降低($P<0.05$);芹菜素高剂量组和阳性对照组大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK mRNA 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

模型组大鼠股骨组织 OPG 蛋白水平降低($P<0.05$),RANKL、RANK 蛋白水平升高($P<0.05$);与

模型组比较, 芹菜素低、中、高剂量组大鼠股骨组织 OPG 蛋白水平依次升高($P<0.05$), RANKL、RANK 蛋白水平依次降低($P<0.05$); 芹菜素高剂量组和阳

性对照组大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 6、图 2。

表 5 芹菜素对创伤性骨折大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK mRNA 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

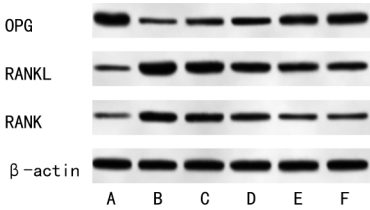
组别	OPG mRNA	RANKL mRNA	RANK mRNA
对照组	1.00±0.07	1.01±0.11	1.03±0.11
模型组	0.16±0.02 ^a	3.68±0.37 ^a	3.24±0.33 ^a
芹菜素低剂量组	0.36±0.04 ^{ab}	2.76±0.28 ^{ab}	2.40±0.25 ^{ab}
芹菜素中剂量组	0.58±0.07 ^{abc}	2.01±0.21 ^{abc}	1.76±0.19 ^{abc}
芹菜素高剂量组	0.82±0.09 ^{abcd}	1.22±0.13 ^{abcd}	1.14±0.12 ^{abcd}
阳性对照组	0.83±0.09 ^{abcd}	1.19±0.12 ^{abcd}	1.12±0.12 ^{abcd}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与芹菜素低剂量组比较,^c $P<0.05$;与芹菜素中剂量组比较,^d $P<0.05$ 。

表 6 芹菜素对创伤性骨折大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	OPG	RANKL	RANK
对照组	1.32±0.18	0.35±0.05	0.25±0.04
模型组	0.30±0.06 ^a	1.43±0.18 ^a	0.99±0.12 ^a
芹菜素低剂量组	0.53±0.10 ^{ab}	1.15±0.16 ^{ab}	0.75±0.10 ^{ab}
芹菜素中剂量组	0.79±0.13 ^{abc}	0.98±0.13 ^{abc}	0.54±0.07 ^{abc}
芹菜素高剂量组	1.05±0.15 ^{abcd}	0.68±0.09 ^{abcd}	0.38±0.06 ^{abcd}
阳性对照组	1.06±0.16 ^{abcd}	0.62±0.09 ^{abcd}	0.36±0.05 ^{abcd}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与芹菜素低剂量组比较,^c $P<0.05$;与芹菜素中剂量组比较,^d $P<0.05$ 。



注:A为对照组;B为模型组;C为芹菜素低剂量组;D为芹菜素中剂量组;E为芹菜素高剂量组;F为阳性对照组。

图 2 各组大鼠股骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白质印迹图

3 讨 论

创伤性骨折是指骨的连续性和完整性发生中断,造成创伤性骨折的原因往往是一些无法预估的突发事件。一旦人体发生骨折后,不及时治疗或者治疗方法不当,会引发骨折移位、肢体畸形、关节炎或者骨头坏死等严重后果,给患者造成更大的心理和经济负担,所以骨折后的骨愈合成为人们关注的焦点。骨愈合过程主要包括炎症、间充质细胞凝结、软骨形成、血管生成和成骨,是一种独特的再生过程^[9-10]。本研究采用闭合式股骨干骨折术构建创伤性骨折大鼠模型,发现模型组大鼠骨小梁密度和厚度均降低,软骨组织损伤严重,血清 TNF-α、iNOS、IL-6 水平升高,表示创伤性骨折大鼠模型构建成功,并已产生炎症反应,可进行下一步研究。

骨形成可以促进骨折损伤处的修补,加快骨愈合。骨形成的标志是 ALP 活性和 BGP 水平。血清中 ALP 和 BGP 水平越高,机体内成骨活动越强,骨折愈合速度越快^[11]。本研究中模型组大鼠血清 ALP、BGP 水平低于对照组,提示创伤性骨折大鼠的骨愈合缓慢。张震等^[6]研究表明,在骨折愈合过程中,细胞因子参与调节炎症、软骨形成和骨重塑过程,其中 iNOS、TNF-α 和 IL-6 是造成骨关节炎的主要促炎细胞因子^[12-14]。芹菜素具有抗炎、抗病毒、抗氧化、扩张血管等多种药理作用和生物学特性,随着对其药理作用的深入研究,芹菜素在很多疾病治疗中发挥良好的作用。黄斌等^[15]研究发现,芹菜素可以减小肥胖大鼠氧化应激损伤,减轻炎症反应。高卫良等^[16]研究证明,芹菜素可能通过抑制炎症反应、细胞凋亡而起到保护髓核细胞的作用。本研究发现,经伤科接骨片和不同浓度的芹菜素处理后,创伤性骨折大鼠软骨组织损伤得到有效缓解,血清 iNOS、TNF-α、IL-6 水平降低,骨小梁密度、厚度、ALP、BGP 水平升高。这表明芹菜素在一定程度上可以促进创伤性大鼠骨折愈合,减轻炎症反应。

OPG 和 RANKL 作为肿瘤坏死因子受体超家族成员,OPG 可以抑制破骨细胞的分化、成熟,升高骨密度;而 RANKL 可以活化破骨细胞,促进破骨细胞

的分化、成熟。RANK 是 RANKL 的唯一受体,一旦与 RANKL 结合便可以增强破骨细胞功能^[17]。OPG/RANKL/RANK 信号通路在骨生物学中被广泛提及。张峻玮等^[18]研究发现,骨碎补可以通过激活 OPG/RANKL/RANK 信号通路,抑制破骨细胞分化、成熟,从而预防骨质疏松。ZHAO 等^[19]研究发现低剂量的阿司匹林可以升高 ALP 水平,促进钙吸收,可能与上调 OPG 及抑制 RANKL/RANK 轴有关,为新的抗骨质疏松药物的开发提供了线索。研究发现通过激活 OPG/RANKL/RANK 信号通路,改善局部缺血缺氧环境,可预防股骨头坏死^[20]。本研究结果表明,与对照组比较,模型组大鼠股骨组织 OPG mRNA 和蛋白水平降低,RANKL、RANK mRNA 和蛋白水平升高;经伤科接骨片及不同浓度的芹菜素处理后,大鼠股骨组织 OPG mRNA 和蛋白水平升高,RANKL、RANK mRNA 和蛋白水平降低。表明芹菜素可能通过上调 OPG 表达,抑制 RANKL、RANK 表达,减轻炎症反应,促进骨愈合。

综上所述,芹菜素可以减轻创伤性骨折大鼠炎症反应,促进骨折愈合,其机制可能与上调 OPG 表达,抑制 RANKL/RANK 信号通路有关,本研究为芹菜素治疗创伤性骨折提供了有力证据。但芹菜素是否通过其他通路间接参与创伤性骨折的愈合,有待进一步实验验证。

参考文献

- [1] GHARGOZLOO D, TOMARCHIO A, BALLERINI M, et al. Traumatic bilateral scaphoid fractures[J]. Med Glas (Zenica), 2021, 18(1): 222-225.
- [2] WANG X, LI X H, QI M, et al. Incidence of post-traumatic stress disorder in survivors of traumatic fracture: a systematic review and meta-analysis[J]. Psychol Health Med, 2022, 27(4): 902-916.
- [3] 区志坚, 邱华耀, 黄思聪, 等. 李逸群教授创伤性骨折中医康复辨治经验[J]. 中国当代医药, 2021, 27(35): 183-186.
- [4] 付海洋, 姜良勇, 齐亚军, 等. 芹菜素药理作用的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(10): 787-792.
- [5] 李坤, 喻锋, 余国庆, 等. Lnc-AK077216 基于 OPG/RANKL/RANK 通路对破骨细胞分化成熟的调控作用[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(11): 51-56.
- [6] 张震, 张庆峰, 李伟, 等. 连翘苷对创伤性骨折大鼠模型骨愈合作用的研究[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(1): 71-76.
- [7] 赵岗, 杨丽, 樊秀梅. 芹菜素通过 PI3K/Akt 通路对妊娠期糖尿病大鼠胰岛素抵抗的作用[J]. 药物评价研究, 2020, 43(3): 417-422.
- [8] 沈明勤, 王颖钰, 荆梅, 等. 伤科接骨片治疗大鼠骨折模型

的影像学评价[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 91-96.

- [9] HIXON K R, MILLER A N. Animal models of impaired long bone healing and tissue engineering-and cell-based in vivo interventions[J]. J Orthop Res, 2022, 40(4): 767-778.
- [10] RAVI P, NAGESWARAN J, RAMANUJAM M, et al. Correlation between traumatic brain injuries and callus formation in long bone fractures[J]. Indian J Orthop, 2022, 56(5): 837-846.
- [11] WANG X H, WANG M H, CUI X, et al. Antiosteoporosis effect of geraniin on ovariectomy-induced osteoporosis in experimental rats[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(6): 1-8.
- [12] MATTA C, FELLOWS C R, QUASNICHKA H, et al. Clusterin secretion is attenuated by the proinflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in models of cartilage degradation[J]. J Orthop Res, 2021, 39(5): 1017-1029.
- [13] SUI C, WU Y C, ZHANG R, et al. Rutin inhibits the progression of osteoarthritis through CBS-mediated RhoA/ROCK signaling[J]. DNA Cell Biol, 2022, 41(6): 617-630.
- [14] BI R, CHEN K, WANG Y, et al. Regulating fibrocartilage stem cells via TNF- α /Nf- κ B in TMJ osteoarthritis[J]. J Dent Res, 2022, 101(3): 312-322.
- [15] 黄斌, 陶小根, 陈剑, 等. 芹菜素改善肥胖大鼠肾脏氧化应激损伤[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(6): 856-860.
- [16] 高卫良, 付晓丽, 安兆威. 芹菜素通过抗炎性反应和细胞凋亡保护大鼠髓核细胞[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(1): 28-31.
- [17] UDAGAWA N, KOIDE M, NAKAMURA M, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways[J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 19-26.
- [18] 张峻玮, 李琰, 薛海鹏, 等. 骨碎补经骨髓间充质干细胞调节 OPG/RANKL/RANK 通路抑制破骨细胞的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(5): 617-624.
- [19] ZHAO H J, ZHAO L. Low-dose aspirin promotes osteogenic differentiation and osteogenic activity in osteoporotic rats by regulating Opg/Rankl/Rank Axis[J]. Trop J Pharm Res, 2020, 19(10): 2103-2107.
- [20] DONG B, YAO J, LI X, et al. Experimental study on the intervention of renal tonifying and activating OPG/RANKL/RANK signaling pathway on steroid-induced femoral head necrosis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27(1): 235-236.