·实验研究·

淫羊藿苷联合 GM6001 治疗酒精性股骨头坏死大鼠的作用机制及对 OPG/RANK/RANKL 通路的影响

贾丙申，于鹏，焦拓，胡帅，黄丽云，曲国欣，纪志华，付昆
海南医学院第一附属医院 关节创伤外科，海南 海口　570102

摘　要：目的　研究淫羊藿苷联合 GM6001 治疗酒精性股骨头坏死大鼠的作用机制，同时探究其对骨保护素（OPG）/核因子-κB 受体活化因子（RANK）/核因子-κB 受体活化因子配体（RANKL）通路的调节作用。**方法**　大鼠随机分为对照组、模型组、淫羊藿苷组、GM6001 组及联合组（淫羊藿苷＋GM6001），每组 12 只。采用 ig 给予大鼠白酒建立酒精性股骨头坏死大鼠模型，淫羊藿苷组按照 60 mg/kg ig 给予大鼠淫羊藿苷，GM6001 组按照 100 mg/kg 尾 iv GM6001，联合组同时给予淫羊藿苷（60 mg/kg）及 GM6001（100 mg/kg），1 次/d，连续 8 周，对照组及模型组给予生理盐水。旷场实验测定大鼠活动次数、活动总距离，抓力测定仪测定大鼠最大抓力；显微 CT 仪测定股骨头骨体积分数、骨小梁间距、骨小梁数目、骨小梁厚度；酶联免疫吸附法（ELISA）测定血清磷、钙水平，血清及股骨头骨形成蛋白-2（BMP-2）、转化生长因子-β（TGF-β）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）水平。苏木精－伊红（HE）染色法测定股骨头组织病理学变化；实时定量聚合酶链式反应（PCR）测定股骨头 OPG、RANK、RANKL mRNA 水平；免疫印迹法测定股骨头 OPG、RANK 及 RANKL 蛋白水平。**结果**　与模型组比较，淫羊藿苷组、GM6001 组、联合组活动次数、活动总距离、最大抓力、骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度，血清磷、钙、BMP-2、TGF-β、bFGF 水平，股骨头 BMP-2、TGF-β、bFGF 水平，股骨头 OPG mRNA 及蛋白水平显著升高（$P<0.05$）；骨小梁间距、股骨头 RANK 和 RANKL 的 mRNA 及蛋白水平显著降低（$P<0.05$），且联合组降低更为显著（$P<0.05$）。**结论**　淫羊藿苷联合 GM6001 能够显著修复大鼠酒精性股骨头坏死，缓解股骨头组织病理学改变，其机制可能与调节 OPG/RANK/RANKL 有关。

关键词：淫羊藿苷；酒精性股骨头坏死；骨保护素；核因子-κB 受体活化因子；核因子-κB 受体活化因子配体
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674 - 5515(2022)08 - 1681 - 08
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.08.001

Mechanism of icariin combined with GM6001 on alcoholic femoral head necrosis in rats and the effect on OPG/RANK/RANKL system

JIA Bing-shen, YU Peng, JIAO Tuo, HU Shuai, HUANG Li-yun, QU Guo-xin, JI Zhi-hua, FU Kun
Department of Joint Trauma Surgery, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China

Abstract: Objective　To investigate the mechanism of icariin combined with GM6001 in treatment of alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head in rats, and to explore its regulatory effect on OPG/RANK/RANKL system. **Methods**　Rats were randomly divided into control group, model group, icariin group, GM6001 group, and combined group (icariin + GM6001), with 12 rats in each group. Rats in icariin group were given icariin 60 mg/kg by gavage, GM6001 group were given GM6001 100 mg/kg by tail vein, rats in combination group were given icariin 60 mg/kg and GM6001 100 mg/kg by gavage, once daily for 8 weeks. The control group and model group were given normal saline. The open field experiment was used to measure the number of activities and the total distance of activities of the rats. The maximum grasping force of the rats was measured by the grip tester. The volume fraction, trabecular spacing, trabecular number, and trabecular thickness of femoral head were measured by microCT. Serum phosphorus and calcium levels, BMP-2, TGF-β, bFGF levels in serum and femoral head were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

收稿日期：2022-06-07
基金项目：海南省卫生健康行业科研项目（20A200025）
作者简介：贾丙申（1980—），男，副主任医师，硕士，研究方向为骨关节疾病、运动损伤及骨组织修复。E-mail: m895a1900@163.com

Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to determine the histopathological changes of femoral head. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to determine the mRNA levels of OPG, RANK, and RANKL in femoral head. The protein levels of OPG, RANK, and RANKL of femoral head were determined by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the number of activities, total distance of activities, maximum grip, bone volume fraction, trabecular bone number, trabecular bone thickness, serum phosphorus, calcium, BMP-2, TGF-β, bFGF levels, and BMP-2, TGF-β, bFGF of serum and femoral head levels in icariin group, GM6001 group, and combined group were significantly increased. The mRNA and protein levels of OPG in femoral head were significantly increased ($P < 0.05$), the mRNA and protein levels of trabecular spacing, femoral head RANK and RANKL were significantly decreased ($P < 0.05$). And the combined group was more significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Icariin combined with GM6001 can significantly repair alcohol-induced femoral head necrosis, and alleviate histopathological changes of femoral head in rats, and the mechanism may be related to the regulation of OPG/RANK/RANKL.

Key words: alcoholic femoral head necrosis; icariin; OPG; RANK; RANKL

酒精性股骨头坏死是由于长期大量饮酒导致的酒精及脂类代谢异常引起的股骨头组织损伤、缺血，进而引起的股骨头组织病理性坏死，临床中若不及时治疗，会严重影响患者生存质量，甚至需要通过采用髋关节置换法治疗酒精性股骨头坏死[1]。目前，酒精性股骨头坏死的治疗药物有限且效果并不理想，所以酒精性股骨头坏死治疗药物的研发仍是当前的主要临床工作之一。淫羊藿苷作为一种黄酮苷类化合物，其具有改善造血及血流动力学等多种药理作用[2-3]，近年来研究发现淫羊藿苷对于股骨头坏死具有显著的治疗作用[4]。骨保护素（OPG）/核因子-κB 受体活化因子（RANK）/核因子-κB 受体活化因子配体（RANKL）通路及相关蛋白水平异常与股骨头坏死的发生及进展密切相关，其中 Peng 等[5]研究表明调节 OPG/RANK/RANKL 通路能够显著缓解大鼠股骨头坏死状态，提高 OPG 水平，抑制 RANK 及 RANKL 水平能够显著抑制股骨头坏死的病理进展；Zhao 等[6]研究证实 microRNA-145 能够通过抑制 OPG 水平，同时升高 RANK 及 RANKL 水平进而诱导股骨头坏死的发生及进展。GM6001 是药理作用机制明确的基质金属蛋白酶（MMP）抑制剂，研究发现其能够显著缓解股骨头坏死组织病理学变化[7]。本实验通过研究淫羊藿苷联合 MMP 抑制剂 GM6001 对酒精性股骨头坏死大鼠的治疗作用及机制，以期为淫羊藿苷的药理作用研究提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

淫羊藿苷（质量分数≥98%，北京索莱宝科技有限公司，货号 I8760）；GM6001（美国 Med Chem Express 公司，货号 HY-15768）；体积分数 46%白酒（北京红星股份有限公司，批号 202109141）；聚合酶链式反应（PCR）试剂盒（货号 D7305M）、磷（货号 KMERa011417）、钙（货号 KMERa010692）酶联免疫吸附（ELISA）测定试剂盒购自温州科淼生物科技有限公司；骨形成蛋白-2（BMP-2，武汉菲恩生物科技有限公司，货号 ER0010）、转化生长因子-β（TGF-β，上海名劲生物科技有限公司，货号 B7428）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF，上海恒斐生物科技有限公司，货号 CSB-E08002r-1）；BCA 试剂盒（货号 P0011）、化学发光液（货号 P0018M）、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG（货号 A0423）购自碧云天生物科技有限公司；OPG（货号 K003214P）、RANKL（货号 K003410P）兔多克隆抗体购自北京索莱宝科技有限公司；RANK 兔多克隆抗体（货号 ATA36616）购自武汉益普生物科技有限公司；GAPDH 兔单克隆抗体（货号 ab181602）购自艾博抗贸易有限公司；PCR 引物设计及合成由赛默飞世尔科技有限公司完成。

1.2 实验动物

SD 大鼠 63 只，雄性，健康清洁级，8 周龄，220～240 g，均购自于海南药物研究所有限责任公司，实验动物生产许可证号 SCXK（琼）2020-0007，饲养于动物房，温度 20～25 ℃，相对湿度 44%～71%。本研究实验动物的使用经过海南医学院第一附属医院伦理委员会审批通过（批准号 HNM 20210056）。

1.3 设备及仪器

CKX53 荧光倒置显微镜（日本 Olympus 公司）；RM2135 石蜡切片机（德国 Leica 公司）；DB018 旷场实验箱（北京智鼠多宝生物科技有限责任公司）；himac CR22N 高速离心机（艾本德中国有限公司）；GIS-500 凝胶成像仪（杭州米欧仪器有限公司）；SpectraMax iD5 酶标仪（美谷分子仪器有限公司）；

SKYSCAN 1275 快速自动化 microCT 扫描仪（德国 Bruker 公司）；ZL-010 抓力测定仪（安徽耀坤生物科技有限公司）。

1.4　造模、分组和给药

将大鼠随机分为对照组（12 只）及造模组（51 只），造模组参照文献方法[8]，采用白酒 ig 法建立酒精性股骨头坏死大鼠模型，大鼠按照 10 mL/kg ig 46%白酒，1 次/d，连续 24 周，随机取 3 只大鼠进行股骨头组织病理学检查，以大鼠股骨头出现明显坏死性病理改变视为造模成功。将造模成功的大鼠再随机分为模型组、淫羊藿苷组、GM6001 组、联合组，每组 12 只。淫羊藿苷组大鼠 ig 60 mg/kg 淫羊藿苷[9]，GM6001 组按照 100 mg/kg 尾 iv GM6001[10]，联合组同时给予淫羊藿苷 60 mg/kg 和 GM6001 100 mg/kg，1 次/d，连续 8 周[10]，对照组和模型组大鼠给予生理盐水，末次给药 24 h 后进行后续实验。

1.5　大鼠旷场实验活动次数、活动总距离及最大抓力的测定

清洁旷场实验箱内壁后，将大鼠置于矿场实验箱中，记录大鼠 5 min 内活动总距离及活动次数，每只大鼠测定 3 次。将大鼠置于抓力测定仪上，测定大鼠最大抓力，每只大鼠测定 3 次。

1.6　大鼠血清磷、钙、BMP-2、TGF-β、bFGF 的测定

使用 10%水合氯醛对大鼠进行麻醉后，仰卧位腹主动脉采血至干净离心管中，4 ℃静置 1 h，4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min（离心半径 13 cm），取上清液，使用 ELISA 试剂盒测定磷、钙、BMP-2、TGF-β、bFGF 水平。

1.7　大鼠骨体积分数、骨小梁间距、骨小梁数目、骨小梁厚度的测定

大鼠颈椎脱臼法处死，分离股骨头组织，置于 4%多聚甲醛中固定，使用显微 CT 仪进行扫描分析，扫描厚度为 12 μm，电压 50 kV，电流 800 μA，分析大鼠股骨头骨体积分数、骨小梁间距、骨小梁数目、骨小梁厚度。

1.8　大鼠股骨头 BMP-2、TGF-β、bFGF 的测定

颈椎脱臼法处死大鼠后分离股骨头，转移至液氮中，研磨成粉，加入蒸馏水，4 ℃、6 000 r/min 离心 10 min（离心半径 13 cm），取上清液，使用 ELISA 试剂盒测定 BMP-2、TGF-β、bFGF 水平。

1.9　股骨头组织病理学检查

大鼠处死后分离股骨头，置于体积分数为 10%的乙二胺四乙酸溶液浸泡 8 周进行脱钙处理，然后经过梯度乙醇脱水、二甲苯固定后，石蜡包埋，进行 5 μm 切片，常规苏木精－伊红（HE）染色后，置于光学显微镜下进行组织病理学检查。

1.10　大鼠股骨头 OPG、RANK、RANKL mRNA 的测定

大鼠处死后取股骨头，置于液氮中研磨成粉，使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，将 RNA 逆转录为 cDNA 后，按照实时定量 PCR 试剂盒方法测定 OPG、RANK、RANKL、GAPDH mRNA 水平，以 GAPDH 为内参，以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 OPG、RANK、RANKL 相对表达量。PCR 反应体系为 PCR Master Mix 10 μL，正反向引物各 0.8 μL，模板 DNA 2 μL，使用无 RNA 酶水补充至 20 μL。反应程序为 92 ℃预变性 3 min，92 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，68 ℃延伸 60 s，共 30 个循环。基因引物序列见表 1。

表 1　实时定量 PCR 反应引物序列

Table 1　Primer sequence of real-time PCR reaction

基因	正向引物（5’-3’）	反向引物（5’-3’）	长度/bp
OPG	GGTAATGACACGATCACTCC	TGACACGATCACTCC	91
RANK	CAAAGGAACAGGCAGGTGAC	CCTCCTCTTCAGTGTCTGCA	163
RANKL	CACCTACATAACATGCCGCC	TGGTGGTACGGTCTCTAGGA	134
GAPDH	TTGGGAATGGCTACGTCAGT	AAGTGATGACCCGCAGATCA	197

1.11　大鼠股骨头 OPG、RANK、RANKL 蛋白的测定

大鼠处死后分离股骨头，置于液氮中研磨成粉后，使用 RIPA 裂解液在冰盒上充分裂解后，4 ℃，8 000 r/min 离心（离心半径 13 cm）8 min，取上清液，使用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度，取相当于 40 μg 蛋白的裂解液，使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，取目标分子量蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上，使用 5%脱脂牛奶进行封闭后，分别使用 OPG、RANK、RANKL、GAPDH 兔单克隆抗体（1∶500

稀释）4 ℃孵育过夜，TBST 清洗 3 次，5 min/次，辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 室温孵育过夜，再次使用 TBST 清洗 3 次，置于凝胶成像仪中，滴加化学发光液，成像拍照后，使用 Image J 1.12.0 软件进行灰度值分析。

1.12 数据处理

所有数据使用 SPSS 26.0 软件进行分析，计量资料多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验，计数资料采用 χ^2 检验，P＜0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 淫羊藿苷联合 GM6001 对酒精性股骨头坏死大鼠旷场实验活动次数、活动总距离及最大抓力的影响

与对照组比较，模型组大鼠活动次数、活动总距离、最大抓力显著降低（P＜0.05）；与模型组比较，淫羊藿苷组、GM6001 组、联合组活动次数、活动总距离、最大抓力显著升高（P＜0.05）；与淫羊藿苷组和 GM6001 组比较，联合组活动次数、活动总距离、最大抓力显著升高（P＜0.05），见表 2。

表 2 各组大鼠活动次数、活动总距离及最大抓力比较结果（$\bar{x} \pm s$，n = 12）

Table 2 Comparison on activity times, total distance, and maximum grasping power of rats ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	活动次数/次	活动总距离/cm	最大抓力/N
对照	—	67.81±1.33	2 344.68±15.09	798.22±22.18
模型	—	42.36±0.98*	1 349.02±16.77*	601.34±18.19*
淫羊藿苷	60	54.78±0.95$^{\#}$	1 916.40±16.30$^{\#}$	706.81±19.54$^{\#}$
GM6001	100	50.17±1.02$^{\#}$	1 769.86±13.77$^{\#}$	682.38±19.59$^{\#}$
联合	淫羊藿苷 60＋GM6001 100	60.52±1.66$^{\#ab}$	2 238.81±14.79$^{\#ab}$	771.50±12.97$^{\#ab}$

与对照组比较：$^{*}P$＜0.05；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05；与淫羊藿苷组比较：^{a}P＜0.05；与 GM6001 组比较：^{b}P＜0.05

$^{*}P$ < 0.05 *vs* control group; $^{\#}P$ < 0.05 *vs* model group after treatment; ^{a}P < 0.05 *vs* icariin group; ^{b}P < 0.05 *vs* GM6001 group

2.2 淫羊藿苷联合 GM6001 对酒精性股骨头坏死大鼠骨体积分数、骨小梁间距、骨小梁数目、骨小梁厚度的影响

结果表明，与对照组比较，模型组大鼠骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度显著降低，骨小梁间距显著增大（P＜0.05）；与模型组比较，淫羊藿苷组、GM6001 组、联合组骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度显著增加（P＜0.05），骨小梁间距显著降低（P＜0.05）；与淫羊藿苷组和 GM6001 组比较，联合组骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度显著增加，骨小梁间距显著降低（P＜0.05），见表 3。

表 3 各组大鼠骨体积分数、骨小梁间距、骨小梁数目、骨小梁厚度比较结果（$\bar{x} \pm s$，n = 12）

Table 3 Comparison on bone volume fraction, trabecular spacing, trabecular number, and trabecular thickness in rats ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	骨体积分数/%	骨小梁间距/mm	骨小梁数目/(mm^{-1})	骨小梁厚度/mm
对照	—	0.63±0.03	0.13±0.02	7.93±0.13	0.26±0.07
模型	—	0.31±0.02*	0.47±0.04*	4.29±0.09*	0.06±0.02*
淫羊藿苷	60	0.49±0.06$^{\#}$	0.28±0.08$^{\#}$	6.22±0.17$^{\#}$	0.17±0.03$^{\#}$
GM6001	100	0.42±0.07$^{\#}$	0.39±0.03$^{\#}$	5.58±0.46$^{\#}$	0.15±0.04$^{\#}$
联合	淫羊藿苷 60＋GM6001 100	0.58±0.07$^{\#ab}$	0.15±0.03$^{\#ab}$	7.12±0.32$^{\#ab}$	0.22±0.09$^{\#ab}$

与对照组比较：$^{*}P$＜0.05；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05；与淫羊藿苷组比较：^{a}P＜0.05；与 GM6001 组比较：^{b}P＜0.05

$^{*}P$ < 0.05 *vs* control group; $^{\#}P$ < 0.05 *vs* model group after treatment; ^{a}P < 0.05 *vs* icariin group; ^{b}P < 0.05 *vs* GM6001 group

2.3 淫羊藿苷联合 GM6001 对酒精性股骨头坏死大鼠血清磷、钙、BMP-2、TGF-β 及 bFGF 水平的影响

结果表明，与对照组比较，模型组大鼠血清磷、钙、BMP-2、TGF-β、bFGF 水平显著降低（P＜0.05）；与模型组比较，淫羊藿苷组、GM6001 组、联合组血清磷、钙、BMP-2、TGF-β、bFGF 水平显著升高（P＜0.05）；与淫羊藿苷组、GM6001 组比较，联合组血清磷、钙、BMP-2、TGF-β、bFGF 水平显著升高（P＜0.05），见表 4。

2.4 淫羊藿苷联合 GM6001 对酒精性股骨头坏死大鼠股骨头 BMP-2、TGF-β、bFGF 水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠股骨头 BMP-2、TGF-β、bFGF 水平显著降低（P＜0.05）；与模型组比较，淫羊藿苷组、GM6001 组、联合组股骨头 BMP-2、TGF-β、bFGF 水平显著升高（P＜0.05）；与淫

表 4　各组大鼠血清磷、钙、BMP-2、TGF-β 及 bFGF 比较结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

Table 4　Comparison on serum phosphorus, calcium, BMP-2, TGF-β, and bFGF of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	磷/(mmol·L^{-1})	钙/(mmol·L^{-1})	BMP-2/(ng·mL^{-1})	TGF-β/(ng·mL^{-1})	bFGF/(ng·mL^{-1})
对照	—	3.91±0.08	2.87±0.11	14.63±0.61	61.22±1.78	35.17±1.45
模型	—	2.16±0.07*	1.62±0.06*	7.71±0.32*	39.11±2.02*	20.09±1.27*
淫羊藿苷	60	3.34±0.09$^{\#}$	2.39±0.10$^{\#}$	11.11±0.42$^{\#}$	52.66±1.83$^{\#}$	28.64±0.84$^{\#}$
GM6001	100	2.81±0.08$^{\#}$	2.48±0.05$^{\#}$	9.92±0.36$^{\#}$	47.64±1.05$^{\#}$	24.15±0.68$^{\#}$
联合	淫羊藿苷 60＋GM6001 100	3.83±0.06$^{\#ab}$	2.63±0.09$^{\#ab}$	13.25±0.29$^{\#ab}$	58.33±1.85$^{\#ab}$	34.31±0.97$^{\#ab}$

与对照组比较：$^{*}P$＜0.05；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05；与淫羊藿苷组比较：^{a}P＜0.05；与 GM6001 组比较：^{b}P＜0.05

$^{*}P < 0.05$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group after treatment; $^{a}P < 0.05$ *vs* icariin group; $^{b}P < 0.05$ *vs* GM6001 group

羊藿苷组和 GM6001 组比较，联合组 BMP-2、TGF-β、bFGF 水平显著升高（P＜0.05），见表 5。

2.5　淫羊藿苷联合 GM6001 对酒精性股骨头坏死大鼠股骨头组织病理学的影响

淫羊藿苷联合 GM6001 对酒精性股骨头坏死大鼠股骨头组织病理学的影响如图 1 所示，结果表明，对照组大鼠股骨头组织无明显病理学改变，与对照组比较，模型组大鼠股骨头组织空骨陷窝增加，骨小梁结构紊乱；与模型组比较，淫羊藿苷组、GM6001 组、联合组股骨头组织病理学明显恢复。

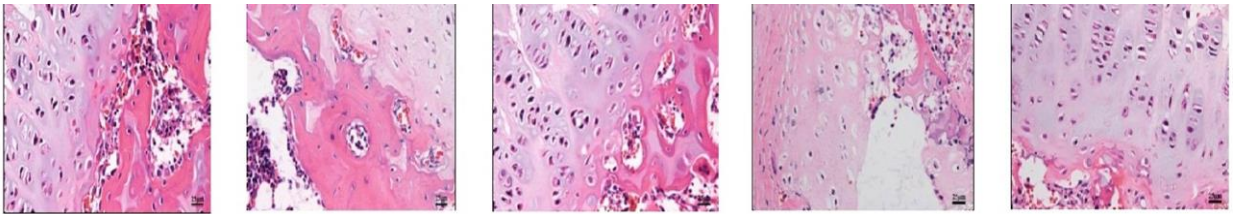
表 5　各组大鼠股骨头 BMP-2、TGF-β、bFGF 比较结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

Table 5　Comparison of BMP-2, TGF-β, and bFGF in femoral head of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	BMP-2/(ng·mL^{-1})	TGF-β/(ng·mL^{-1})	bFGF/(ng·mL^{-1})
对照	—	13.81±1.03	51.92±1.79	38.66±0.78
模型	—	8.17±0.88*	39.88±2.07*	17.14±1.05*
淫羊藿苷	60	10.61±0.80$^{\#}$	46.03±0.78$^{\#}$	29.58±1.04$^{\#}$
GM6001	100	9.67±0.24$^{\#}$	44.76±0.90$^{\#}$	24.71±0.87$^{\#}$
联合	淫羊藿苷 60＋GM6001 100	12.05±0.94$^{\#ab}$	48.85±1.07$^{\#ab}$	34.49±0.74$^{\#ab}$

与对照组比较：$^{*}P$＜0.05；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05；与淫羊藿苷组比较：^{a}P＜0.05；与 GM6001 组比较：^{b}P＜0.05

$^{*}P < 0.05$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group after treatment; $^{a}P < 0.05$ *vs* icariin group; $^{b}P < 0.05$ *vs* GM6001 group



对照　模型　淫羊藿苷 60 mg·kg^{-1}　GM6001 100 mg·kg^{-1}　联合

图 1　大鼠股骨头组织病理学结果（×200）

Fig. 1　Histopathological of femoral head in rats (×200)

2.6　淫羊藿苷联合 GM6001 对酒精性股骨头坏死大鼠股骨头 OPG、RANK、RANKL mRNA 水平的影响

结果表明，与对照组比较，模型组大鼠股骨头 OPG mRNA 水平显著降低，RANK、RANKL mRNA 水平显著升高（P＜0.05）；与模型组比较，淫羊藿苷组、GM6001 组、联合组大鼠的股骨头 OPG mRNA 水平显著升高，RANK、RANKL mRNA 水平显著降低（P＜0.05）；与淫羊藿苷组、GM6001 组比较，联合组股骨头 OPG mRNA 水平显著升高，RANK、RANKL mRNA 水平显著降低（P＜0.05），见表 6。

2.7　淫羊藿苷联合 GM6001 对酒精性股骨头坏死大鼠股骨头 OPG、RANK、RANKL 蛋白的影响

结果表明，与对照组比较，模型组大鼠股骨头 OPG 蛋白水平显著降低，RANK、RANKL 蛋白水平显著升高（P＜0.05）；与模型组比较，淫羊藿苷组、GM6001 组、联合组股骨头 OPG 蛋白水平显著升高，RANK、RANKL 蛋白水平显著降低（P＜0.05）；与淫羊藿苷组、GM6001 组比较，联合组股骨头 OPG 蛋白水平显著升高，RANK、RANKL 蛋白水平显著降低（P＜0.05），见图 2。

表 6 各组大鼠股骨头 OPG、RANK、RANKL mRNA 比较结果（$\bar{x} \pm s$，n = 12）

Table 6 Comparison of OPG, RANK, and RANKL mRNA in femoral head of rats ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	OPG mRNA	RANK mRNA	RANKL mRNA
对照	—	6.51±0.19	1.47±0.16	1.02±0.08
模型	—	0.89±0.11*	5.56±0.34*	4.79±0.13*
淫羊藿苷	60	2.36±0.27$^{\#}$	4.08±0..41$^{\#}$	3.34±0.23$^{\#}$
GM6001	100	3.71±0.42$^{\#}$	3.46±0.27$^{\#}$	2.62±0.17$^{\#}$
联合	淫羊藿苷 60＋GM6001 100	5.18±0.52$^{\#ab}$	2.21±0.16$^{\#ab}$	1.87±0.19$^{\#ab}$

与对照组比较：$^{*}P$＜0.05；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05；与淫羊藿苷组比较：^{a}P＜0.05；与 GM6001 组比较：^{b}P＜0.05

$^{*}P$ < 0.05 *vs* control group; $^{\#}P$ < 0.05 *vs* model group after treatment; ^{a}P < 0.05 *vs* icariin group; ^{b}P < 0.05 *vs* GM6001 group

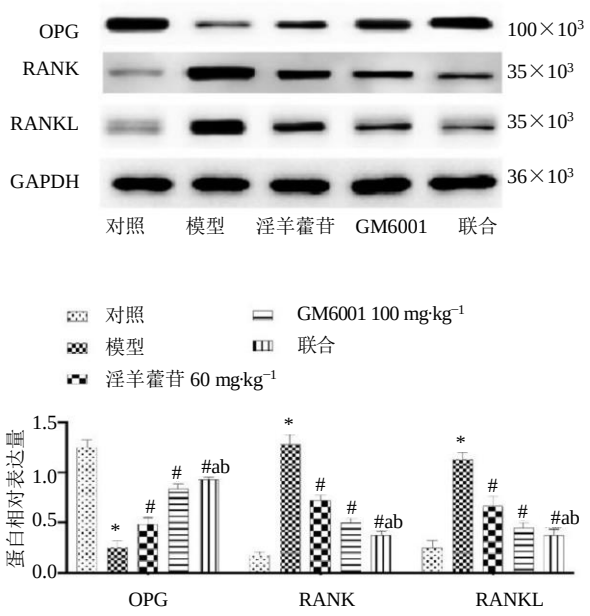


图 2 各组大鼠股骨头 OPG、RANK、RANKL 蛋白比较结果（n = 12）

Fig. 2 Comparison of OPG, RANK and RANKL protein in femoral head of rats （ n = 12）

3 讨论

股骨头坏死是临床中常见的骨科疾病，临床表现为疼痛、关节活动及行走功能障碍等。酒精性股骨头坏死又称为股骨头无菌性坏死，其发病机制为长期大量饮酒引起脂质代谢紊乱，导致股骨头微血管病变及炎症损伤，进而引起股骨头缺血性损伤及变性坏死。酒精性股骨头坏死若不及时治疗，会导致患者患者髋关节疼痛，功能及活动受限，严重影响患者生活质量。然而，目前临床中用于治疗酒精性股骨头坏死的药物和手段均不能显著逆转股骨头病理性改变，只能缓解其疾病进展，且预后效果并不明显，所以对于股骨头坏死治疗药物的研发仍是目前的主要工作重点[11]。

研究表明，MMP 在股骨头坏死的发生及发展中占据重要地位。王斯晟等[12]临床研究证实，MMP 表达与早期股骨头坏死的发生及进展有关，同时 MMP 水平能够反映股骨头坏死的严重程度；赵红星等[13]研究证实 MMP 水平升高是导致股骨头坏死的关键因素；王建忠等[14]研究则表明，抑制 MMP 表达则能够显著促进股骨头组织病理学恢复。GM6001 是药理作用机制明确的 MMP 抑制剂，芦敏慧等[10]研究证实 GM6001 能显著抑制 MMP 水平，进而促进股骨头坏死的恢复。

淫羊藿苷是从小檗科植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、巫山淫羊藿或朝鲜淫羊藿的干燥茎叶中提取得到的黄酮苷类化合物，其具有改善造血功能，增强免疫及代谢等多种药理作用[15]。现代医学研究发现，淫羊藿苷对于股骨头坏死具有显著的改善作用，其中赵丁岩等[16]研究表明，淫羊藿苷对于股骨头坏死具有显著的防治作用，并能够显著抑制炎症反应，提高促血管生成因子的表达；岳聚安等[9]研究发现，淫羊藿苷能够显著提高股骨头坏死大鼠骨小梁宽度，增大骨小梁面积。由此可见淫羊藿苷在股骨头坏死的治疗中具有较大潜力，然而，淫羊藿苷对于股骨头坏死的药理作用机制尚不明确，本实验通过研究淫羊藿苷联合 MMP 抑制剂 GM6001 对于酒精性股骨头坏死的药理作用及机制，为淫羊藿苷的药理作用研究提供新的参考。

旷场实验活动次数、活动总距离及最大抓力是反映大鼠自主活动行为及活动能力的指标[17]，本实验结果表明，与对照组比较，模型组大鼠活动次数、活动总距离及最大抓力均显著降低，而给予大鼠淫羊藿苷及 GM6001 抑制剂后，大鼠活动次数、活动总距离及最大抓力均显著升高，且淫羊藿苷联合 GM6001 组大鼠活动次数、活动总距离及最大抓力升高水平高于单独使用淫羊藿苷或 GM6001 组，提示淫羊藿苷联合 GM6001 能够显著改善大鼠运动功能；骨体积分数、骨小梁间距、骨小梁数目、骨小

梁厚度是反映股骨头组织病理学改变的重要指标，骨体积分数、骨小梁数目及骨小梁厚度降低，骨小梁间距增加，是股骨头组织坏死的重要表现[18]，本实验结果表明，淫羊藿苷联合 GM6001 能够显著升高酒精性股骨头坏死大鼠骨体积分数、骨小梁数目及骨小梁厚度，缩小骨小梁间距，且效果显著优于单独使用淫羊藿苷组及 GM6001 组，提示淫羊藿苷联合 GM6001 能够显著抑制酒精性股骨头坏死大鼠股骨头组织病理学病变。血清磷、钙水平是反映骨组织结构及状态的指标，BMP-2、TGF-β、bFGF 水平与股骨头组织病理学进展及转归有关[19]，血清及股骨头组织 BMP-2、TGF-β、bFGF 水平降低均提示股骨头病理性坏死，本实验结果表明淫羊藿苷联合 GM6001 能够明显升高酒精性股骨头坏死大鼠血清磷、钙水平，升高血清及股骨头组织 BMP-2、TGF-β 及 bFGF 水平，进而改善股骨头组织代谢水平，修复股骨头组织病理学损伤，发挥其对酒精性股骨头坏死大鼠股骨头病理性坏死的治疗作用，且效果优于单独使用淫羊藿苷组及 GM6001 组。

OPG/RANK/RANKL 通路是近年来研究发现的与股骨头坏死相关的重要信号通路[20-21]。陈晓波等[22]研究表明，股骨头 OPG 水平降低，RANK 及 RANKL 水平升高是导致股骨头坏死的重要因素，而升高 OPG 水平，降低 RANK 及 RANKL 水平则是治疗股骨头坏死的有效途径和方法；宋红梅等[23]研究表明，提高股骨头组织 OPG 水平，同时抑制 RANK 及 RANKL 的表达能够有效调节成骨细胞及破骨细胞的活性，进而促进股骨头组织的恢复，因此，调节 OPG/RANK/RANKL 通路及相关蛋白水平是股骨头治疗的有效途径。本实验结果表明，与对照组比较，模型大鼠股骨头组织 OPG 水平显著降低，而 RANK 及 RANKL 水平升高，然而与模型组比较，淫羊藿苷组、GM6001 组、联合组股骨头组织 OPG mRNA 及蛋白水平显著升高，RANK 及 RANKL mRNA 及蛋白水平显著降低。由此可见，淫羊藿苷联合 GM6001 能够显著促进 OPG 表达，抑制股骨头组织 RANK 及 RANKL 表达，进而促进酒精下股骨头坏死大鼠股骨头组织病理学及功能的恢复。

综上所述，淫羊藿苷联合 GM6001 能够显著修复大鼠酒精性股骨头坏死，缓解股骨头组织病理学改变，其机制可能与调节 OPG/RANK/RANKL 通路有关。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Al-Omari A A, Aleshawi A J, Marei O A, *et al*. Avascular necrosis of the femoral head after single steroid intra-articular injection [J]. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2020, 30(2): 193-197.

[2] Wang Z, Wang D, Yang D, *et al*. The effect of icariin on bone metabolism and its potential clinical application [J]. *Osteoporos Int*, 2018, 29(3): 535-544.

[3] 房正华, 马宝林, 宋湖平, 等. 基于 miR-223-3p 研究淫羊藿苷治疗大鼠颅脑外伤后神经损伤的作用机制 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5948-5955.

[4] 时利军, 毛天立, 罗攀, 等. 淫羊藿苷干预兔早期激素性股骨头坏死的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2020, 34(2): 206-212.

[5] Peng W X, Ye C, Dong W T, *et al*. MicroRNA-34a alleviates steroid-induced avascular necrosis of femoral head by targeting Tgif2 through OPG/RANK/RANKL signaling pathway [J]. *Exp Biol Med*, 2017, 242(12): 1234-1243.

[6] Zhao J J, Wu Z F, Wang L, *et al*. MicroRNA-145 mediates steroid-induced necrosis of the femoral head by targeting the OPG/RANK/RANKL signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159805.

[7] 仝昭方, 王庆志, 唐洪涛, 等. GM6001 对激素性股骨头坏死大鼠组织形态学与基因表达的影响 [J]. 海南医学, 2017, 28(15): 2409-2413.

[8] 马秉楠, 关玉波, 陈长锋, 等. 补肾生髓强骨方对酒精性股骨头坏死模型大鼠炎症因子、氧化应激及 TLR4、NF-κB 和 VEGF 蛋白表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(12): 2125-2128.

[9] 岳聚安, 高贺, 张启栋, 等. 淫羊藿苷对大鼠股骨头坏死微血管内皮细胞的影响 [J/OL]. 中国矫形外科杂志, 2022(3): 1-6. [2022-08-04]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1247.R.20220221.1017.008.html.

[10] 芦敏慧, 李鹏, 徐治平. GM6001 对糖皮质激素性股骨头坏死大鼠骨组织功能及骨代谢指标的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(19): 4699-4701.

[11] Roth A, Tingart M. Atraumatic femoral head necrosis in adults [J]. *Oper Orthop Traumatol*, 2020, 32(2): 87-88.

[12] 王斯晟, 桂斌捷, 周健, 等. MMP-13 在早期股骨头坏死滑膜中的表达 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(4): 502-505.

[13] 赵红星, 黄媛霞, 徐海斌, 等. 股骨头坏死早期大鼠股骨头骨组织中基质金属蛋白酶及其相关抑制剂的表达 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2017, 38(2): 231-234.

[14] 王建忠, 武永刚, 董慧珍. 阿托伐他汀对糖皮质激素性股骨头坏死骨组织 MMP/TIMP 系统的影响 [J]. 中国

骨与关节杂志, 2014, 3(11): 865-870.

[15] 张成龙, 刘爱峰, 张超, 等. 基于文献计量学的淫羊藿研究现状及热点分析 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(10): 2242-2251.

[16] 赵丁岩, 俞庆声, 郭万首, 等. 淫羊藿苷对激素诱导损伤人股骨头微血管内皮细胞蛋白质表达谱的影响 [J]. 中华医学杂志, 2016, 96(13): 1026-1030.

[17] 董玉雷, 周磊, 李玉龙, 等. 大鼠激素性股骨头坏死模型的建立和评价 [J]. 中国医学科学院学报, 2015, 37(2): 152-156.

[18] 李云矗, 孙平, 徐刚, 等. 氯化锂对激素性股骨头坏死大鼠股骨头微观结构的影响 [J]. 山东医药, 2017, 57(16): 16-19.

[19] 于潼, 谢利民, 张振南, 等. 健脾补肾方调控激素性股骨头坏死大鼠促成骨分化因子的研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(2): 183-187.

[20] Fu D, Qin K, Yang S, *et al*. Proper mechanical stress promotes femoral head recovery from steroid-induced osteonecrosis in rats through the OPG/RANK/RANKL system [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020, 21(1): 281.

[21] Sun M, Cao Y, Yang X, *et al*. DNA methylation in the OPG/RANK/RANKL pathway is associated with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2021, 22(1): 599.

[22] 陈晓波, 陈雷雷, 洪郭驹, 等. 桃红四物汤对激素性股骨头坏死兔股骨头微结构的影响及其机制 [J]. 山东医药, 2017, 57(32): 5-9.

[23] 宋红梅, 魏迎辰, 吴斌, 等. 温阳补肾方对兔激素性股骨头坏死组织 RANKL/RANK/OPG 通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(1): 302-305.

[责任编辑 高源]