

中图分类号: R932; R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)05-0038-05

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.05.010



淫羊藿总黄酮联合黄芪多糖对骨质疏松性骨折模型大鼠骨折愈合的影响*

高远航, 柴 仪[△], 刘烁炜, 常伯伦, 暴 凯, 李 倩

(河北省中医院, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 探讨淫羊藿总黄酮联合黄芪多糖对骨质疏松性骨折模型大鼠骨折愈合、骨痂形成及塑形情况的影响。方法 将60只SD大鼠随机分为全处理组(A组)、后处理组(B组)、对照组(C组),各20只。其中,A组和B组分别灌胃淫羊藿总黄酮提取物与黄芪多糖混悬液(1:1, m/m) 690 g/(kg·d)和等量生理盐水,4周后采用双侧卵巢切除术复制大鼠骨质疏松性骨折模型,继续灌胃6周;C组大鼠灌胃等量生理盐水4周后造模,连续灌胃等量生理盐水6周。于造模后第10,17,24,30天拍摄患肢股骨正侧位X线摄片,计算矿化骨组织体积(BV)、骨痂总体积(TV)、骨体积分数(BV/TV)、骨矿密度(BMD)。灌胃6周后,处死所有大鼠,每组随机选取10只进行患肢Micro-CT扫描;于腹主动脉取血,测定I型胶原N端前肽(PINP)、碱性磷酸酶(AKP)、骨钙素(BGP)水平。结果 与本组造模后第10天比较,3组大鼠造模后第17,24,30天的正侧位X线摄片Lane-Sandhu评分均显著升高($P < 0.05$);与C组比较,A组大鼠造模后第10,30天的正侧位X线摄片Lane-Sandhu评分均显著升高($P < 0.05$)。与C组比较,A组大鼠的AKP,BGP,PINP,BV,BV/TV,BMD均显著升高($P < 0.05$),B组大鼠的AKP和BGP均显著升高($P < 0.05$);与B组比较,A组大鼠的BGP,PINP,BV/TV均显著升高($P < 0.05$)。结论 淫羊藿总黄酮联合黄芪多糖可有效改善骨质疏松性骨折模型大鼠的骨折愈合情况,促进骨痂形成。

关键词:淫羊藿总黄酮;黄芪多糖;骨质疏松性骨折;大鼠;骨折愈合

Effect of Epimedium Total Flavonoids Combined with Astragalus Polysaccharides on Fracture Healing in Model Rats of Osteoporotic Fracture

GAO Yuanhang, CHAI Yi, LIU Shuwei, CHANG Bolun, BAO Kai, LI Qian

(Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei, China 050011)

Abstract: Objective To investigate the effect of Epimedium total flavonoids combined with Astragalus Polysaccharides on callus formation and shaping of fracture healing in model rats of osteoporotic fracture. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into the full-treatment group (group A), the post-treatment group (group B), and the control group (group C), with 20 rats in each group. Among them, the rats in group A and group B were respectively gavaged with a suspension of Epimedium total flavonoids and Astragalus polysaccharides (1:1, m/m) at 690 g/(kg·d) and equal volume of normal saline. After four weeks, bilateral oophorectomy was performed to replicate a rat osteoporotic fracture model, and they were continuously gavaged with drugs for six weeks. After modeling by gavage of equal volume of normal saline for four weeks, rats in group C were given an equal volume of normal saline by gavage for six weeks. Frontal and lateral X-ray films of the affected femur were taken on the 10th, 17th, 24th and 30th days after modeling to calculate the mineralized bone volume (BV), tissue volume (TV), BV/TV, and bone density (BMD). After six weeks of gavage, all rats were euthanized, and 10 rats in each group were randomly selected for Micro-CT scanning of affected limbs; blood samples were taken from the abdominal aorta to determine the levels of N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP), alkaline phosphatase (AKP), and osteocalcin (BGP). **Results** Compared with those on the 10th day after modeling, the Lane-Sandhu scores of frontal and lateral X-ray films on the 17th, 24th, and 30th days after modeling in the three groups significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those in group C, the Lane-Sandhu scores of frontal and lateral X-ray films on the 10th and 30th days after modeling significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those in group C, the AKP, BGP, PINP, BV, BV/TV, and BMD in group A significantly increased ($P < 0.05$), while the AKP and BGP in group B significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those in group B, the BGP, PINP, BV/TV in group A significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Epimedium total flavonoids combined with Astragalus polysaccharides can effectively improve the fracture healing in model rats of osteoporotic fracture and promote the formation of callus.

Key words: Epimedium total flavonoids; Astragalus polysaccharides; osteoporotic fracture; rat; fracture healing

*基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目[2019001]。

第一作者:高远航,男,硕士研究生,医师,研究方向为中医骨伤科学,(电子信箱)gaoyuanhang2012@163.com。

[△]通信作者:柴仪,男,博士研究生,主任医师,研究方向为中西医结合诊治骨伤,(电子信箱)290507602@qq.com。

骨质疏松症(OP)为一种全身代谢性疾病,主要与骨形成和骨破坏相关^[1]。绝经后骨质疏松症(PMOP)是临床绝经女性较常见的代谢性疾病,由体内激素变化导致。据不完全统计,全球800万50岁以上女性患有OP,且诊断明确^[2]。研究发现,植物雌激素是目前治疗该类疾病的一类雌激素样生物活性物质,临床疗效良好,副作用小。中药淫羊藿中含有雌激素样活性物质总黄酮,对促进骨吸收和抑制骨破坏具有良好作用^[3]。中药黄芪的主要成分黄芪多糖可促进细胞增殖分化而调控骨细胞代谢,可抑制破骨细胞活性而影响骨代谢^[4-5]。前期研究发现,与单用淫羊藿总黄酮、黄芪多糖比较,两药联用不仅能更好地改善骨质疏松模型大鼠的血钙、血磷和骨钙素水平,且对骨干质量、骨灰质量、骨钙和骨磷的含量增加更明显^[6]。为此,本研究中探讨了淫羊藿总黄酮联合黄芪多糖对骨质疏松性骨折模型大鼠骨折愈合、骨痂形成及塑形情况的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:XBT-1型医用X射线胶片(美国Kodak公司);JIDI-5G型离心机(广州吉迪仪器有限公司); μ CT-100型Mirco-计算机断层成像(CT)仪,Evaluation6.5-3型CT成像处理系统,均购于SCANCO Medical AG。

试剂:淫羊藿总黄酮提取物(上海梵态生物科技有限公司,货号为CAS489-32-7);黄芪多糖(中国Desite公司,批号为DH0109);I型胶原N端前肽(PINP)、碱性磷酸酶(AKP)、骨钙素(BGP)检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为27UTGCPLY6,2QFC5TC3NJ,R5B8RYU7I1)。

动物:60只健康6月龄雌性SD大鼠,体质量为200~220 g,动物生产许可证号为SCXK(冀)2018-1-004,动物使用许可证号为SCXK(冀)2018-1-004,购于河北医科大学实验动物中心。饲养条件为12 h/12 h明暗交替,温度为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $(50 \pm 15)\%$,自主饮食。

1.2 方法

试验药物制备:将淫羊藿总黄酮提取物与黄芪多糖按1:1(m/m)比例混合,搅拌,即得。

分组、造模与给药:将60只雌性SD大鼠按随机数字表法分为全处理组(A组)、后处理组(B组)、对照组(C组),各20只。饲以常规饲料,自由饮水。A组、B组、C组大鼠分别灌胃淫羊藿总黄酮提取物与黄芪多糖混悬液 $690\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、生理盐水、生理盐水4周后,复制骨质疏松性骨折模型大鼠。将雌性SD大鼠用2%苯巴比妥钠 $60\text{ mg}/\text{kg}$ 进行腹腔麻醉,麻醉成功后,常规消毒,摘除双侧卵巢,术后4周,行经典开放截骨模型术,大鼠麻醉消毒后,右股骨外侧切口,暴露股骨干,用钢锯于股骨结节处开髓,将

1 mm克氏针顺行插入远端,复位骨折后,顺行打入股骨近端,确定克氏针牢固后,对多余部分进行剪除修整,逐层缝合切口,遂复制骨质疏松性骨折模型大鼠^[6]。造模3 d后,肌肉注射头孢硫脒 $4\,000\text{ U}/\text{d}$ 抗感染。3组均造模成功,饲以常规饲料,自由饮水。A组、B组大鼠灌胃淫羊藿总黄酮提取物与黄芪多糖混悬液 $690\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,C组大鼠灌胃等量生理盐水,6周后处死。

正侧位X线摄片检查:为进一步观察术后各组骨痂形成及骨折愈合的情况,分别于造模后第10、17、24、30天用2%苯巴比妥钠 $60\text{ mg}/\text{kg}$ 腹腔麻醉大鼠,麻醉成功后,对大鼠患肢左胫骨行正侧位X线摄片,且利用Lane-Sandhu评分标准对各时间点的X线摄片进行疗效评分。

血生化指标检测:造模6周后,于大鼠腹主动脉采血,离心(转速为 $1\,800\text{ r}/\text{min}$)10 min,取上清液, -80°C 冰箱冷冻保存,按酶联免疫吸附试验试剂盒说明书操作。设置标准样品孔和样品孔,将 $50\text{ }\mu\text{L}$ 待测样品添加到样品孔中,但不添加任何样品到空白孔中。除空白孔外,将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体添加到标准样品孔和样品孔的每个孔中,并用密封膜封闭反应孔。将反应孔在 37°C 水浴或恒温箱中孵育60 min。弃液体,在吸水纸上干燥。用洗涤剂 $350\text{ }\mu\text{L}$ 填充每个孔并静置1 min;弃洗涤剂,在吸水纸上干燥,重复洗板5次。向每个孔中加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 底物A和 $50\text{ }\mu\text{L}$ 底物B,在 37°C 的黑暗中孵育15 min,加终止液终止反应,利用酶标仪测量各孔的吸光度(OD),绘制标准曲线,计算PINP, AKP, BGP的浓度。

塑形情况:造模6周后处死大鼠,每组随机选取10只,利用Micro-CT仪扫描患肢,使大鼠股骨纵轴与Micro-CT仪检查床滑轨的移动轴保持平行,设置扫描分辨率为 $40\text{ }\mu\text{m}$,每次扫描时间为14 min。将获得的扫描结果进行标准化处理,再沿股骨纵轴以骨折线为中心围绕骨痂进行上下扫描,共100个扫描层面,建立三维兴趣区(ROI)。在进行区分高矿化组织与低或未矿化组织时,采用标准皮质骨密度的45%作为固定阈值,参考文献^[7]及扫描结果,分别计算骨小梁数量(Tb.N)、矿化骨组织体积(BV)、骨痂总体积(TV)、骨体积分数(BV/TV)、骨矿密度(BMD),观察骨折塑形情况。

1.3 统计学处理

采用SPSS 26.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较使用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正侧位X线摄片

不同时间点模型大鼠正侧位X线摄片见图1。与本组造模后第10天比较,3组大鼠造模后第17、24、30天



A. 造模后第 10 天 B. 造模后第 17 天 C. 造模后第 24 天 D. 造模后第 30 天

图 1 不同时间点 A 组模型大鼠正侧位 X 线摄片

A. The 10th day after molding B. The 17th day after molding C. The 24th day after molding D. The 30th day after molding

Fig. 1 Frontal and lateral X - ray films of model rats in group A at different time points

的正侧位 X 线摄片 Lane - Sandhu 评分均显著升高 ($P < 0.05$); 与 C 组比较, A 组大鼠造模后第 10, 30 天的正侧位 X 线摄片 Lane - Sandhu 评分均显著升高 ($P < 0.05$)。详见图 2 和表 1。



B 组 C 组

图 2 造模后第 30 天 B 组和 C 组大鼠正侧位 X 线摄片

Fig. 2 Frontal and lateral X - ray films of SD rats on the 30th day after molding in groups B and C

表 1 不同时间点 3 组大鼠正侧位 X 线摄片 Lane - Sandhu 评分比较 ($\bar{X} \pm s$, 分, $n = 20$)

Tab. 1 Comparison of Lane - Sandhu scores of frontal and lateral X - ray films among the three groups at different time points ($\bar{X} \pm s$, point, $n = 20$)

时间	A 组	B 组	C 组	F 值	P 值
造模后第 10 天	0.890 ± 0.658 ^Δ	0.630 ± 0.597	0.470 ± 0.513	2.450	0.096
造模后第 17 天	1.580 ± 0.607*	1.260 ± 0.653*	1.260 ± 0.653*	1.550	0.221
造模后第 24 天	2.260 ± 0.733*	2.110 ± 0.658*	1.890 ± 0.809*	1.198	0.310
造模后第 30 天	3.160 ± 0.834 ^{Δ*}	2.740 ± 0.933*	2.420 ± 0.961*	3.127	0.520
F 值	34.931	31.193	23.075		
P 值	0.000	0.000	0.000		

注:与 C 组比较, ^Δ $P < 0.05$;与 B 组比较, * $P < 0.05$ 。表 2 和表 3 同。与本组造模后第 10 天比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with those in group C, ^Δ $P < 0.05$; Compared with those in group B, * $P < 0.05$ (for Tab. 1 - 3); Compared with those on the 10th day after modeling, * $P < 0.05$.

2.2 血生化指标

与 C 组比较, A 组大鼠 AKP, BGP, P I NP 水平均显著升高 ($P < 0.05$), B 组大鼠 AKP 和 BGP 水平均显著升

高 ($P < 0.05$); 与 B 组比较, A 组大鼠 P I NP 和 BGP 水平均显著升高 ($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 3 组大鼠血生化指标比较 ($\bar{X} \pm s$, $n = 20$)

Tab. 2 Comparison of blood biochemical indexes among the three groups ($\bar{X} \pm s$, $n = 20$)

血生化指标	A 组	B 组	C 组	F 值	P 值
P I NP (μg/L)	5.722 ± 0.150 ^{Δ*}	5.450 ± 0.122	5.360 ± 0.114	42.174	0.000
AKP (U/L)	131.265 ± 14.569 ^Δ	134.494 ± 13.923 ^Δ	79.894 ± 6.774	124.571	0.000
BGP (U/L)	1.545 ± 0.124 ^{Δ*}	1.461 ± 0.114 ^Δ	1.071 ± 0.130	84.915	0.000

2.3 塑形情况

与 C 组比较, A 组大鼠 BV, BV / TV, BMD 均显著升高 ($P < 0.05$); 与 B 组比较, A 组大鼠 BV / TV 显著升高 ($P < 0.05$)。详见表 3。

表 3 3 组大鼠骨分化指标比较 ($\bar{X} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 3 Comparison of bone differentiation indexes among the three groups ($\bar{X} \pm s$, $n = 10$)

骨分化指标	A 组	B 组	C 组	F 值	P 值
Tb. N (mm ⁻¹)	2.808 ± 0.474	2.539 ± 0.380	2.582 ± 0.440	1.106	0.345
BV (mm ³)	31.235 ± 7.374 ^Δ	24.059 ± 9.653	21.089 ± 3.643	5.075	0.013
TV (mm ³)	47.310 ± 10.389	41.359 ± 9.879	42.585 ± 9.635	0.993	0.384
BV / TV (%)	66.210 ± 7.448 ^{Δ*}	57.033 ± 9.634	50.408 ± 5.737	10.426	0.000
BMD (g / cm ³)	0.652 ± 0.088 ^Δ	0.600 ± 0.997	0.541 ± 0.086	3.690	0.038

3 讨论

PMOP 是指女性绝经后体内激素水平失衡, 造成体内骨吸收大于骨形成状态, 从而导致骨质疏松发生的一类代谢性疾病^[8-9], 临床表现主要为骨密度降低, 形成低骨量或骨质疏松, 以及骨组织内微结构改变^[10]。OP 最严重的结局就是发生骨折, 骨质疏松性骨折的预防和治疗是研究 OP 的最终目的^[11]。目前, 主要通过补充雌激素来纠正破坏的骨平衡^[12]。植物雌激素因良好的疗效和较低的副作用成为临床替代传统雌激素的治疗方法。

中医学认为, PMOP 归属“骨痹”“骨痿”等范畴, 其发生、发展与“肾气”密切联系。《素问·痿论篇》中认为,

“肾者水脏也，今水不胜火，则骨枯而髓虚，故足不任身”，阐述了肾气亏虚导致OP发生的疾病机理。除肾气外，肝气虚也是OP发病的重要原因。《素问·上古天真论篇》中指出“肝气衰，筋不能动”，其病因病机主要为肝肾亏虚、肾精不足。张冰彬等^[13]通过对2年内入院患者的研究发现，肾虚患者占OP总数的4/5，提示肾虚为主要证型。肝与肾的关联十分密切，肝肾同源，精血同源，肝之血无法到达肾，肾精则亏损，同时肝阴虚也会导致肾阴虚^[14]。淫羊藿归肝、肾二经，具有温补肾阳、强筋骨作用。相关研究发现，淫羊藿与内分泌系统具有密切联系，其相关物质可激发内分泌系统，从而增强机体的分泌功能，不仅有效促进骨形成，且能通过促进骨代谢来治疗OP^[15-16]。淫羊藿总黄酮是淫羊藿的主要有效成分，可通过调控Wnt/ β -联蛋白(Wnt/ β -catenin)途径，进一步作用于OPG/核因子- κ B受体活化因子(RANK)/核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)系统，促进成骨细胞分化，发挥骨保护作用^[17]。黄芪多糖是黄芪的主要有效成分，不仅可促进成骨分化，且能对骨密度和骨量发挥保护作用^[18-19]，可通过激活核因子E2相关转录因子2(Nrf2)信号通路，而促进绝经后骨质疏松模型大鼠的抗氧化酶合成分泌，减轻氧化应激反应，增强成骨细胞功能的活性，从而缓解骨质疏松^[20]。

骨质疏松患者的骨代谢标记物会出现异常变化，骨代谢生化指标的变化对骨转化、骨折风险等的评价具有重要参考意义^[21]。其中，P I NP, AKP, BGP均为《骨代谢生化指标临床应用专家共识(2020)》^[22]中推荐监测骨质疏松常见的骨代谢生化指标。本研究结果显示，与C组比较，A组和B组大鼠的AKP和BGP水平均显著升高($P < 0.05$)；与B组比较，A组大鼠的P I NP和BGP水平均显著升高($P < 0.05$)。表明淫羊藿总黄酮与黄芪多糖在预防骨质疏松骨折方面具有一定优势，特别在骨质疏松骨折发生后，淫羊藿总黄酮与黄芪多糖可能通过提高大鼠体内P I NP和BGP水平及抑制AKP水平促进骨形成。与本组造模后第10天比较，3组大鼠造模后第17, 24, 30天的正侧位X线摄片Lane-Sandhu评分均显著升高($P < 0.05$)；与C组比较，A组大鼠造模后第10, 30天的正侧位X线摄片Lane-Sandhu评分均显著升高($P < 0.05$)。表明造模后第10, 30天的效果更明显。对骨骼结构进行金标准评估，Micro-CT仪可对骨小梁结构进行更精准的评估，起到定量、定性分析的作用^[23]。本研究结果显示，与C组比较，A组大鼠的BV, BV/TV, BMD均显著升高($P < 0.05$)；与B组比较，A组大鼠的BV/TV显著升高($P < 0.05$)。表明淫羊藿总黄酮联合黄芪多糖能有效改善骨质疏松性骨折，A组改善

效果最好，进一步验证了淫羊藿总黄酮联合黄芪多糖对骨质疏松性骨折的防治作用。A组与C组间无显著差异可能与以下2个因素有关：1)淫羊藿总黄酮联合黄芪多糖改善骨质疏松性骨折的治疗周期长于6周；2)造模前，服用淫羊藿总黄酮和黄芪多糖能进一步改善骨质疏松，促进骨质疏松性骨折愈合。

综上所述，淫羊藿总黄酮联合黄芪多糖能提高骨质疏松性骨折模型大鼠的BV, BV/TV, BMD,可进一步促进其骨折愈合。本研究中未进一步验证灌胃周期，缺乏病理组织学的观察和验证，有待后续进一步研究。

参考文献

- [1] 金颖慧, 闫国强, 张俊艳, 等. 基于Wnt/ β -catenin信号通路的中医药防治骨质疏松症研究进展[J]. 中国药业, 2023, 32(2): 122-127.
- [2] LUPSA BC, INSOGNA K. Bone health and osteoporosis. Endocrin Metab Clin North Am, 2015, 44(3): 517-530.
- [3] 李建国, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 淫羊藿提取物淫羊藿苷在细胞水平防治骨质疏松症的研究概况[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(1): 132-135.
- [4] 孔祥鹤, 牛银波, 王婷梅, 等. 黄芪多糖对大鼠原代成骨细胞的影响及其机制研究[J]. 中草药, 2011, 42(10): 2065-2069.
- [5] 杨潞侠, 周福贻, 王胜军, 等. 黄芪注射液静滴联合推拿治疗腰椎骨质疏松症20例临床研究[J]. 江苏中医药, 2011, 43(10): 63-64.
- [6] 孔令岩, 柴 仪, 李 倩, 等. 淫羊藿总黄酮和黄芪多糖配伍对骨质疏松大鼠的保护作用[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2021, 29(4): 24-26.
- [7] 魏占英, 章振林. Micro-CT在骨代谢研究中骨微结构指标的解读及应用价值[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2018, 11(2): 200-205.
- [8] 邢秋娟. 益气化瘀补肾方治疗绝经后妇女原发性骨质疏松症及对骨代谢标志物的影响[J]. 中国药业, 2018, 27(1): 41-43.
- [9] FENG J, LIU S, MA S, et al. Protective effects of resveratrol on postmenopausal osteoporosis: regulation of SIRT1 - NF - κ B signaling pathway [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014, 46(12): 1024-1033.
- [10] SILVA I, BRANCO JC. Denosumab: recent update in postmenopausal osteoporosis[J]. Acta Reumatol Port, 2012, 37(4): 302-313.
- [11] NAKATOH S, TAKEMARU Y. Application of the fracture risk assessment tool (FRAX®) and determination of suitable cut-off values during primary screening in specific health check-ups in Japan[J]. J Bone Miner Metab, 2013, 31(6): 674-680.
- [12] KHOSLA S, WESTENDORF JJ, OURSLER MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures[J]. J Clin Invest, 2008, 118(2): 421-428.
- [13] 张冰彬, 李志湘. 绝经后骨质疏松症的中西医研究概况[J].