

高良姜素促进骨质疏松模型大鼠骨折愈合的机制研究^Δ

吴永铁*, 申雄成[#][遵义市第一人民医院(遵义医科大学第三附属医院)骨科二病区, 贵州 遵义 563000]

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)19-2365-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.19.11



摘要 **目的** 初步探讨高良姜素(Gal)调节缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)/血管内皮生长因子(VEGF)信号通路对骨质疏松(OP)模型大鼠骨折愈合的影响。**方法** 采用双侧卵巢切除手术构建OP大鼠模型。实验设置假手术(Sham)组(生理盐水)、模型(Model)组(生理盐水)和Gal低、中、高剂量组(2.5、5、10 mg/kg)以及抑制剂组(10 mg/kg Gal+100 mg/kg HIF-1 α /VEGF信号通路抑制剂PX-478),每组12只。腹腔注射相应药物,每天1次,连续90 d。观察大鼠股骨显微结构,评估大鼠股骨生物力学状况,观察大鼠骨组织病理损伤及新生血管情况,检测大鼠股骨中血小板内皮细胞黏附分子1(PECAM-1)表达,检测大鼠血清中骨钙素(OCN)和I型胶原交联C末端肽(CTX-I)、骨形态发生蛋白2(BMP-2)含量以及骨痂组织中碱性磷酸酶(ALP)及HIF-1 α /VEGF信号通路相关蛋白表达。**结果** 与Sham组比较,Model组大鼠骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、最大负载、新生血管数量和血管面积、PECAM-1平均荧光强度、OCN和BMP-2含量及ALP、HIF-1 α 、VEGF蛋白表达水平均显著降低/减少($P<0.05$),CTX-I含量显著升高($P<0.05$)。与Model组比较,Gal低、中、高剂量组大鼠上述指标均显著逆转($P<0.05$),且具有剂量依赖性。与Gal高剂量组比较,抑制剂组大鼠上述指标变化均显著逆转($P<0.05$)。**结论** Gal可调节骨代谢,改善OP模型大鼠骨密度,促进骨折愈合;其作用机制可能与激活HIF-1 α /VEGF信号通路,促进血管生成有关。
关键词 高良姜素;缺氧诱导因子1 α ;血管内皮生长因子;骨质疏松;骨折愈合

Study on the mechanism of galangin promoting fracture in osteoporosis model rats

WU Yongtie, SHEN Xiongcheng[Dept. Two of Orthopedics, Zunyi First People's Hospital (the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University), Guizhou Zunyi 563000, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To preliminarily investigate the impacts of galangin (Gal) on fracture healing in osteoporosis (OP) model rats by regulating hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. **METHODS** The OP rat model was constructed by using bilateral ovariectomy surgery. The model rats were randomly divided into sham operation group (normal saline), model group (normal saline), Gal low-dose, medium-dose and high-dose groups (2.5, 5, 10 mg/kg), inhibitor group (10 mg/kg Gal+100 mg/kg HIF-1 α /VEGF signaling pathway inhibitor PX-478), with 12 rats in each group. They were given relevant medicine intraperitoneally, once a day, for 90 consecutive days. The microstructure of rat bones was observed, the biomechanical status of rat femurs was evaluated, and the pathological damage and neovascularization of rat callus tissue were observed. The expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) in the femur was detected. The contents of osteocalcin (OCN), C-terminal telopeptides of type I collagen (CTX-I) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in serum were detected as well as the expressions of alkaline phosphatase (ALP) and HIF-1 α /VEGF signaling pathway-related proteins in callus tissue. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the BMD, BV/TV, Tb.N, Tb.Th, maximum load, the number and area of blood vessels, the average fluorescence intensity of PECAM-1, the contents of OCN and BMP-2, and the expression levels of ALP, HIF-1 α and VEGF proteins in the model group were reduced significantly ($P<0.05$), while the content of CTX-I increased significantly ($P<0.05$). Compared with the model group, the above indexes of rats were reversed significantly in Gal low-dose, medium-dose and high-dose groups ($P<0.05$), in a dose-dependent manner. Compared with the Gal high-dose group, the above indexes of rats were reversed significantly in the inhibitor group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Gal can regulate bone metabolism, improve bone density of OP model rats and promote fracture healing, the mechanism of which may be

^Δ 基金项目 遵义市科技计划项目(No. 遵市科合HZ字[2022]64号)

* 第一作者 副主任医师。研究方向:骨质疏松。E-mail: 80120997@qq.com

通信作者 副主任医师,硕士。研究方向:骨质疏松。E-mail: 278063358@qq.com

associated with activating the HIF-1 α /VEGF signaling pathway and promoting angiogenesis.

KEYWORDS galangin; hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor; osteoporosis; fracture healing

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征的常见老年疾病,因其易导致脆性增加和骨折的发生,所以OP患者的致残率较高^[1]。目前临床上用来治疗OP的药物多以雌激素类药物为主,但其会对人体产生不同程度的副作用^[2]。因此,积极开发新的安全有效、副作用小的抗OP天然活性成分显得尤为重要。高良姜素(galangin, Gal)是一种天然的类黄酮化合物,具有抗肿瘤、抗炎、抗糖尿病和神经保护等多种药理活性^[3]。Gal可以减缓软骨细胞外基质降解,改善骨关节炎进展,可能是治疗骨关节炎的潜在候选药物^[4]。据报道, Gal可诱导人骨肉瘤MG-63和U-2OS细胞的成骨分化^[5]。也有报道称, Gal可以通过抑制丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activation protein kinase, MAPK)和核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路抑制破骨细胞形成,从而有效抑制OP的发展^[6]。缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)/血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)介导的血管生成在骨折愈合中发挥重要作用。研究表明, HIF-1 α /VEGF信号通路被激活后, HIF-1 α 活性增强, VEGF表达升高,可促进血管生成,预防骨质流失,最终增强骨折愈合^[7-8]。但Gal是否能通过调节HIF-1 α /VEGF信号通路促进OP模型大鼠骨折愈合尚不清楚。因此,本研究基于HIF-1 α /VEGF信号通路探讨Gal对OP模型大鼠骨折愈合的影响及可能的作用机制,以期为临床治疗OP提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有HBS-ScanX型多功能全自动酶标仪(南京德铁实验设备有限公司)、 μ CT-100型微计算机断层扫描(micro-computed tomography, micro-CT)设备(丹东奥龙射线仪器集团有限公司)、CX31型光学显微镜(日本Olympus公司)、EPS-300型电泳仪(上海天能科技有限公司)、DW-86L348型超低温冰箱(青岛澳柯玛股份有限公司)、BSA124S/BSA224S型分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 主要药品与试剂

Gal对照品(批号LA1806,纯度 $\geq 98\%$)购自北京康瑞纳生物科技有限公司;PX-478(HIF-1 α /VEGF信号通路抑制剂,批号M00231-CVW)购自北京百奥莱博科技有限公司;骨钙素(osteocalcin, OCN)、I型胶原交联C末端肽(C-terminal telopeptides of type I collagen, CTX-I)、骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为E-EL-R0243c、E-EL-R1456c、E-EL-R0002c)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;蛋白提取试剂盒(批号YT8951)购自北京伊塔生物科技有限公司;兔源碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、HIF-1 α 、VEGF、血小

板内皮细胞黏附分子1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(批号分别为ab83259、ab179483、ab214424、ab222783、ab9485)以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(批号ab6721)均购自美国Abcam公司。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级健康雌性SD大鼠,共72只,8~10周龄,体重180~200 g,购自贵州医科大学实验动物中心,生产许可证号为SCXK(黔)2018-0001。大鼠饲养环境温度为22℃,湿度为55%~60%,12 h光暗循环,饲养期间自由摄食和饮水。适应性喂养1周后进行实验。本研究获得了本院伦理委员会的批准,批准号为伦审(2022)-2-08号。

2 方法

2.1 动物建模、分组与给药

取72只大鼠分为造模组($n=60$)和假手术(Sham)组($n=12$)。造模组大鼠采用双侧卵巢切除手术构建OP大鼠模型,具体操作如下:对造模组大鼠行双侧卵巢切除术,卵巢切除后缝合伤口。12周后利用小动物micro-CT检测造模大鼠的腰椎骨密度(bone mineral density, BMD),当造模组大鼠BMD与Sham组相比显著降低时,即表明OP大鼠造模成功。腹腔注射3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠,钢锯横切切断股骨中段,并用克氏针在髓腔内固定,缝合切口,以构建骨折模型,具体操作参考文献[9]。Sham组大鼠仅在卵巢周围结扎并切除相当大小的脂肪组织。将造模成功的60只大鼠按照随机数字表法分成模型(Model)组和Gal低、中、高剂量组以及抑制剂组(HIF-1 α /VEGF信号通路抑制剂PX-478),每组12只。Gal低、中、高剂量组腹腔注射2.5、5、10 mg/kg的Gal^[6],抑制剂组腹腔注射10 mg/kg的Gal和100 mg/kg的PX-478^[10], Sham组和Model组腹腔注射等量生理盐水;每天1次,连续90 d。

2.2 大鼠股骨显微结构分析

各组取6只大鼠麻醉处死,取出两侧股骨,漂洗干净,进行micro-CT。使用VGStudio Max 2.2软件定量分析,获得BMD、骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁数(trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)。

2.3 大鼠股骨生物力学检测

将“2.2”项下大鼠左侧股骨水平放在跨度为20 mm的测试仪器的2个支撑点上,以10 mm/min的速率下压探头,至股骨中段断裂,利用仪器自带软件分析得到骨生物力学指标最大负载。

2.4 大鼠骨组织损伤及新生血管情况检测

采用苏木素-伊红(HE)染色观察骨组织损伤及新生血管情况。取“2.2”项下大鼠的右侧股骨骨折处骨痂组织,经多聚甲醛固定、乙二胺四乙酸脱钙、梯度乙醇脱

水、包埋切片(厚度为5 μm)、脱蜡和水化后进行HE染色,最后在显微镜下观察大鼠骨组织损伤并分析新生血管数量和面积。

2.5 大鼠股骨中PECAM-1表达情况检测

采用免疫荧光染色法检测大鼠股骨中PECAM-1表达。取“2.2”项下大鼠左侧股骨,经固定、脱钙、包埋切片(5 μm)、磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后加入PECAM-1一抗,4℃避光孵育过夜;加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗,室温下避光孵育1 h,经PBS洗涤、DAPI避光复染5 min、封片后,采用荧光显微镜观察并拍摄照片。采用Image J软件计算PECAM-1的平均荧光强度。

2.6 大鼠血清中OCN、CTX-I、BMP-2含量测定

采用ELISA法进行检测。取每组剩余的6只大鼠的腹主动脉血,以3 000 r/min离心15 min,取上层血清,根据试剂盒说明书方法检测大鼠血清中OCN、CTX-I、BMP-2的含量。

2.7 大鼠骨痂组织中ALP、HIF-1α、VEGF蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。麻醉处死“2.6”项下取血后的大鼠,提取其骨痂组织中的总蛋白,通过BCA法测定总蛋白浓度。将蛋白高温变性,取120 μg变性蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压120 V,电泳时间60 min),转膜(电流250 mA,转膜时间60 min),以5%脱脂奶粉室温封闭2 h;分别加入ALP(稀释比例1:1 000)、HIF-1α(稀释比例1:2 000)、VEGF(稀释比例1:1 000)、GAPDH(稀释比例1:1 000)一抗,4℃孵育过夜;洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(稀释比例1:2 000),室温孵育90 min;洗膜后,采用ECL发光显影。以Image J软件分析蛋白条带的灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.8 统计学方法

实验数据用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。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,两组间比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 Gal对大鼠股骨显微结构的影响

与Sham组比较,Model组大鼠股骨BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th均显著降低($P<0.05$);与Model组比较,Gal低、中、高剂量组大鼠股骨BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th均显著升高($P<0.05$),且具有明显的剂量依赖性;与Gal高剂量组比较,抑制剂组大鼠股骨BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th均显著降低($P<0.05$)。结果见图1、表1。

3.2 Gal对大鼠股骨生物力学的影响

与Sham组[(49.48±3.76) N]比较,Model组大鼠股骨最大负载[(23.68±2.59) N]显著降低($P<0.05$);与

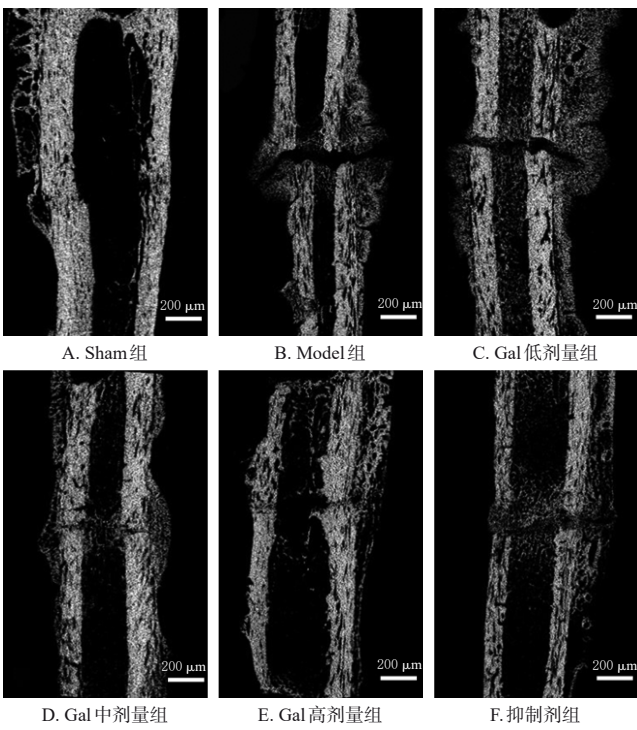


图1 各组大鼠股骨Micro-CT结果

表1 各组大鼠股骨显微结构指标的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	BMD/(mg/cm ³)	BV/TV/%	Tb.N/(1/mm)	Tb.Th/μm
Sham组	252.38±24.65	46.58±3.91	3.98±0.75	57.96±4.98
Model组	156.31±14.87 ^a	31.74±3.17 ^a	2.25±0.53 ^a	43.28±3.51 ^a
Gal低剂量组	174.08±15.49 ^b	34.56±3.58 ^b	2.76±0.49 ^b	46.73±4.68 ^b
Gal中剂量组	204.31±18.36 ^{bc}	38.94±3.84 ^{bc}	3.29±0.57 ^{bc}	51.48±4.73 ^{bc}
Gal高剂量组	235.62±19.72 ^{bcd}	43.16±3.76 ^{cd}	3.76±0.61 ^{cd}	55.93±4.21 ^{cd}
抑制剂组	185.93±16.54 ^c	35.89±3.29 ^c	2.85±0.48 ^c	46.85±3.94 ^c

a: 与Sham组比较, $P<0.05$;b: 与Model组比较, $P<0.05$;c: 与Gal低剂量组比较, $P<0.05$;d: 与Gal中剂量组比较, $P<0.05$;e: 与Gal高剂量组比较, $P<0.05$ 。

Model组比较,Gal低、中、高剂量组大鼠股骨最大负载[分别为(27.36±2.84)、(32.54±3.17)、(37.83±3.69) N]均显著升高($P<0.05$),且具有明显的剂量依赖性;与Gal高剂量组比较,抑制剂组大鼠股骨最大负载[(28.46±2.75) N]显著降低($P<0.05$)。

3.3 Gal对大鼠骨组织病理损伤的影响

Sham组大鼠骨组织中骨小梁数量多、较粗、致密分布;与Sham组比较,Model组大鼠骨组织中骨小梁数量减少、变薄、间隙增大、结构较乱和疏松,新生血管数量和血管面积均显著减少/减小($P<0.05$);与Model组比较,Gal低、中、高剂量组大鼠骨组织中骨小梁数量和厚度明显改善、间距减小、结构更密集、排列整齐,新生血管数量和血管面积均显著增多/增大($P<0.05$),且具有明显的剂量依赖性;与Gal高剂量组比较,抑制剂组大鼠骨组织中骨小梁数量减少、变细、间距增大、结构较为疏松,新生血管数量和血管面积均显著减少/减小($P<0.05$)。结果见图2和表2。

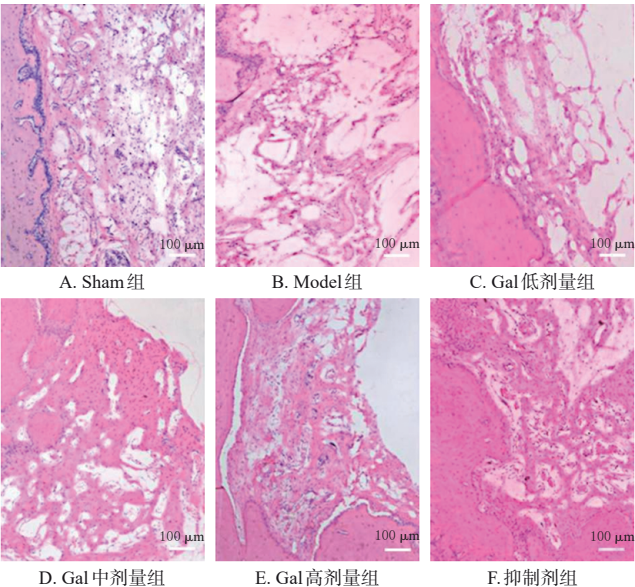


图2 各组大鼠骨组织的HE染色显微图

表2 各组大鼠新生血管数量、血管面积和 PECAM-1 表达的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	新生血管数量/个	血管面积/ μm^2	PECAM-1 平均荧光强度
Sham组	19.04 ± 1.37	$6\,987.42 \pm 418.71$	21.36 ± 1.65
Model组	7.68 ± 0.98^a	$2\,346.58 \pm 276.39^a$	3.21 ± 0.46^a
Gal低剂量组	9.84 ± 1.02^b	$2\,965.90 \pm 293.46^b$	7.58 ± 0.62^b
Gal中剂量组	12.79 ± 1.13^{bc}	$3\,817.94 \pm 323.18^{bc}$	12.96 ± 1.28^{bc}
Gal高剂量组	15.94 ± 1.25^{bcd}	$5\,352.64 \pm 358.76^{bcd}$	19.21 ± 1.57^{bcd}
抑制剂组	10.43 ± 1.10^c	$2\,649.38 \pm 287.41^c$	5.23 ± 0.64^c

a: 与Sham组比较, $P < 0.05$; b: 与Model组比较, $P < 0.05$; c: 与Gal低剂量组比较, $P < 0.05$; d: 与Gal中剂量组比较, $P < 0.05$; e: 与Gal高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3.4 Gal对大鼠股骨中PECAM-1表达的影响

与Sham组比较, Model组大鼠股骨中PECAM-1平均荧光强度显著降低($P < 0.05$); 与Model组比较, Gal低、中、高剂量组大鼠股骨中PECAM-1平均荧光强度均显著升高($P < 0.05$), 且具有明显的剂量依赖性; 与Gal高剂量组比较, 抑制剂组大鼠股骨中PECAM-1平均荧光强度显著降低($P < 0.05$)。结果见图3、表2。

3.5 Gal对大鼠血清中OCN、CTX-I、BMP-2含量的影响

与Sham组比较, Model组大鼠血清中OCN、BMP-2含量均显著降低($P < 0.05$), CTX-I含量显著升高($P < 0.05$); 与Model组比较, Gal低、中、高剂量组大鼠血清中OCN、BMP-2含量均显著升高($P < 0.05$), CTX-I含量均显著降低($P < 0.05$), 且具有明显的剂量依赖性; 与Gal高剂量组比较, 抑制剂组大鼠血清中OCN、BMP-2含量均显著降低($P < 0.05$), CTX-I含量显著升高($P < 0.05$)。结果见表3。

3.6 Gal对大鼠骨痂组织中ALP、HIF-1 α 、VEGF蛋白表达的影响

与Sham组比较, Model组大鼠骨痂组织中ALP、HIF-1 α 、VEGF蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$); 与

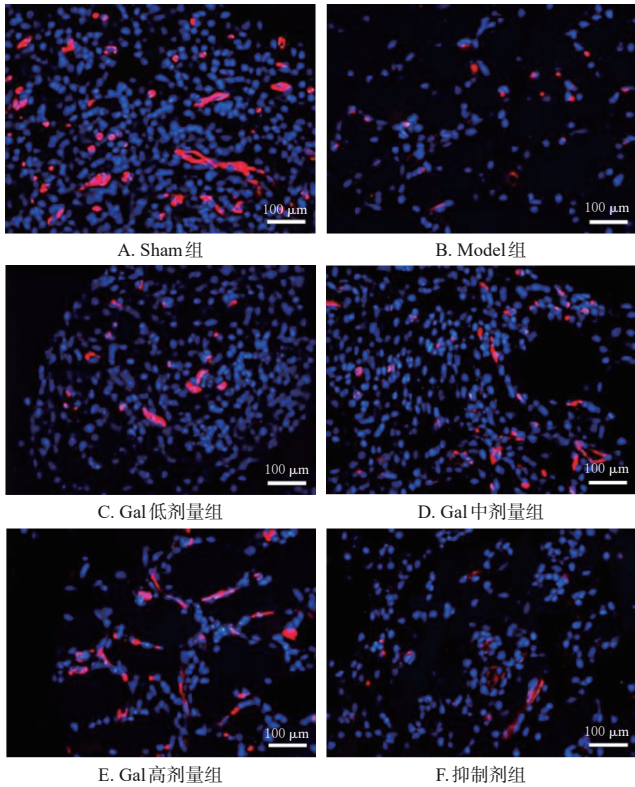


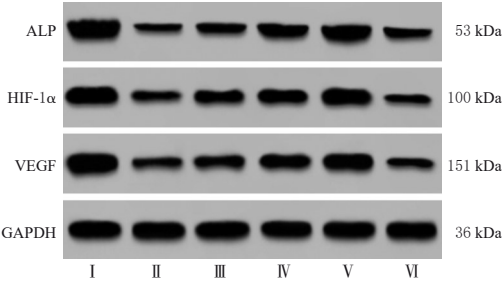
图3 各组大鼠股骨中PECAM-1表达的免疫荧光图

表3 各组大鼠血清中OCN、CTX-I、BMP-2含量的比较($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/mL}$)

组别	OCN	CTX-I	BMP-2
Sham组	19.14 ± 3.85	27.58 ± 3.21	15.64 ± 2.68
Model组	8.43 ± 1.63^a	42.83 ± 4.87^a	5.23 ± 1.27^a
Gal低剂量组	10.45 ± 2.07^b	39.14 ± 4.52^b	7.11 ± 1.45^b
Gal中剂量组	13.56 ± 2.31^{bc}	35.21 ± 3.65^{bc}	9.86 ± 1.64^{bc}
Gal高剂量组	15.87 ± 2.68^{bcd}	31.45 ± 3.43^{bcd}	12.34 ± 1.98^{bcd}
抑制剂组	11.54 ± 2.37^c	40.56 ± 4.37^c	8.23 ± 1.47^c

a: 与Sham组比较, $P < 0.05$; b: 与Model组比较, $P < 0.05$; c: 与Gal低剂量组比较, $P < 0.05$; d: 与Gal中剂量组比较, $P < 0.05$; e: 与Gal高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

Model组比较, Gal低、中、高剂量组大鼠骨痂组织中ALP、HIF-1 α 、VEGF蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$), 且具有明显的剂量依赖性; 与Gal高剂量组比较, 抑制剂组大鼠骨痂组织中ALP、HIF-1 α 、VEGF蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结果见图4、表4。



I : Sham组; II : Model组; III : Gal低剂量组; IV : Gal中剂量组; V : Gal高剂量组; VI : 抑制剂组。

图4 各组大鼠骨痂组织中ALP、HIF-1 α 、VEGF蛋白表达的电泳图

表4 各组大鼠骨痂组织中 ALP、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ALP/GAPDH	HIF-1 α /GAPDH	VEGF/GAPDH
Sham组	1.86 $\pm$ 0.21	1.47 $\pm$ 0.12	1.67 $\pm$ 0.18
Model组	0.31 $\pm$ 0.02 ^a	0.36 $\pm$ 0.04 ^a	0.29 $\pm$ 0.03 ^a
Gal低剂量组	0.67 $\pm$ 0.07 ^b	0.69 $\pm$ 0.08 ^b	0.60 $\pm$ 0.07 ^b
Gal中剂量组	1.15 $\pm$ 0.10 ^{bc}	1.08 $\pm$ 0.10 ^{bc}	0.94 $\pm$ 0.08 ^{bc}
Gal高剂量组	1.65 $\pm$ 0.15 ^{cd}	1.35 $\pm$ 0.12 ^{cd}	1.42 $\pm$ 0.13 ^{cd}
抑制剂组	0.72 $\pm$ 0.09 ^a	0.53 $\pm$ 0.05 ^a	0.37 $\pm$ 0.04 ^a

a: 与Sham组比较, $P<0.05$; b: 与Model组比较, $P<0.05$; c: 与Gal低剂量组比较, $P<0.05$; d: 与Gal中剂量组比较, $P<0.05$; e: 与Gal高剂量组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

OP是全身性代谢性骨病,随着年龄的增长,发病率在逐渐升高,尤其在绝经后的女性中表现得更加明显;OP与骨痂形成、骨生长减少、骨密度降低、生物力学强度降低以及骨折愈合过程中细胞分化延迟有关^[1-2]。因此,积极探索安全有效的促进骨折愈合的药物对临床治疗OP具有重要意义。本研究采用双侧卵巢切除手术构建OP大鼠模型,对其进行研究发现,Model组大鼠BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th均降低,股骨显微结构显著受损,最大负载显著下降,生物力学强度降低,与前人研究结果一致^[9],提示OP模型大鼠构建成功。

黄酮类化合物作为一大类天然化合物,普遍存在于食物和植物中,并且可通过调节不同途径来影响OP。例如芦丁通过调节蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路,抑制绝经后的OP^[11];槲皮素通过G蛋白偶联受体C族6成员A/AMP活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路调节葡萄糖和脂质代谢来减轻小鼠睾丸切除术后的OP^[12]。Gal是一种天然黄酮类化合物,也是高良姜的主要活性成分,因其对骨骼相关疾病显示出良好的药理活性而备受关注。Gal通过减弱NF- κ B受体激活蛋白配体活性,诱导Jun激酶和NF- κ B途径的激活,进而防止破骨细胞前体和胶原蛋白诱导的关节炎模型小鼠的骨破坏^[13]。Gal可上调人羊膜间充质干细胞中早期成骨细胞特异性标志物(即ALP、Runt相关转录因子2蛋白、成骨细胞特异性转录因子Osterix)以及晚期成骨细胞特异性标志物(I型胶原 α 1链蛋白、骨桥蛋白和OCN)的mRNA和蛋白表达,促进人羊膜间充质干细胞的成骨分化^[14]。Gal通过激活富含脯氨酸/精氨酸的亮氨酸末端重复蛋白,在体内外显著改善骨关节炎的进展^[4]。Li等^[6]研究还表明, Gal可通过调节胞外信号调节激酶和NF- κ B途径,抑制破骨形成来抑制OP。但目前Gal对OP模型大鼠骨折愈合的影响尚不清楚。本研究发现, Gal可减轻OP模型大鼠股骨显微结构损伤,提高骨密度,增加最大负载,改善骨生物力学性能,升高血清中OCN和BMP-2含量,上调ALP蛋白表达,并降低CTX-I含量。ALP可在一定程度上反映细胞矿化及成骨分化的能力^[14]。OCN是骨中最丰富的非胶原蛋白,也

是成骨分化过程中晚期阶段的标志性物质,在成骨细胞中特异性表达,维持骨重建、吸收和矿化^[15]。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^[15]。CTX-I是骨I型胶原的降解产物,可作为骨吸收的标志物^[15]。这提示, Gal可能是通过调节骨代谢,抑制去卵巢OP模型大鼠骨流失,促进骨折愈合,从而发挥抗大鼠OP的作用。

骨是一种高度血管化的组织,其广泛的血管和毛细血管网络,可为骨的形成和发育提供氧气和营养,血管生成在OP过程中起着至关重要的作用^[16]。骨微环境中的血管生成是骨骼生长发育、骨折后修复和维持骨骼健康所必需的,OP或骨质减少患者的血液供应量相对较低,表明骨血液供应与骨矿物质密度高度相关^[17]。因此,激活骨微环境中的血管生成可能是预防OP的重要策略。HIF1- α 信号通路的激活增加了骨血管的形成,并参与了骨重塑;成骨细胞中HIF1- α 基因的敲除导致骨血管化和成骨减少;成骨细胞中HIF1- α 信号通路的激活不仅可以抑制雌激素缺乏引起的骨质流失,还可以促进骨形成和血管生成^[18-19]。VEGF是HIF1- α 的下游基因,成骨细胞分化过程中VEGF的表达增加,可促进血管生成、骨形成和重塑^[18-19]。PECAM-1广泛分布于血管内皮细胞中,主要参与血管形成等生理活动,可作为评估血管形成的标记分子^[20]。本研究发现,在OP模型大鼠中PECAM-1、HIF-1 α 和VEGF蛋白表达降低,OP模型大鼠的血管数量和血管面积也显著减少/减小; Gal可促进PECAM-1、HIF-1 α 和VEGF蛋白表达,增加血管数量和血管面积。而使用HIF1- α /VEGF信号通路抑制剂后,大鼠血管数量和血管面积减少,减弱了Gal对OP模型大鼠的骨折愈合促进作用。这提示, Gal可通过HIF1- α /VEGF信号通路调节骨代谢,改善OP模型大鼠骨密度,促进骨折愈合。

综上所述, Gal可调节骨代谢,改善OP模型大鼠骨密度,促进骨折愈合;其作用机制可能与激活HIF1- α /VEGF信号通路,促进血管生成有关。然而本研究尚存在不足之处,仅验证了Gal对HIF1- α /VEGF信号通路的作用,未对其他靶点、途径进行验证,后续研究将会进一步明确Gal在OP中的作用机制。

参考文献

[1] ASPRAY T J, HILL T R. Osteoporosis and the ageing skeleton[J]. Subcell Biochem, 2019, 91: 453-476.

[2] JOHNSTON C B, DAGAR M. Osteoporosis in older adults[J]. Med Clin North Am, 2020, 104(5): 873-884.

[3] 王晓晴, 孙允红, 赵方舒, 等. 高良姜素的药理作用及机制研究进展[J]. 中药药理与临床, 2023, 2023(1): 1-18.

WANG X Q, SUN Y H, ZHAO F S, et al. Research progress on mechanism and pharmacological activities of galangin[J]. Pharmacol Clin Chin Mate Med, 2023, 2023(1): 1-18.

- [4] LIN Q, ZHANG Y X, HONG W S, et al. Galangin ameliorates osteoarthritis progression by attenuating extracellular matrix degradation in chondrocytes via the activation of PRELP expression[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 936: 175347.
- [5] LIU C H, MA M M, ZHANG J D, et al. Galangin inhibits human osteosarcoma cells growth by inducing transforming growth factor- β 1-dependent osteogenic differentiation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1415-1421.
- [6] LI X C, JIANG J W, YANG Z F, et al. Galangin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis via inhibiting MAPK and NF- κ B signalling pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(11): 4988-5000.
- [7] ZHANG Y T, HAO Z C, WANG P F, et al. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1 α -mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(2): e12570.
- [8] YUAN H, XIAO L Y, MIN W, et al. Bu-Shen-Tong-Luo decoction prevents bone loss via inhibition of bone resorption and enhancement of angiogenesis in ovariectomy-induced osteoporosis of rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 220: 228-238.
- [9] 陈振东, 于建农, 陈杰. 唑来膦酸促进大鼠骨质疏松性骨折愈合的实验研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(4): 538-542.
- CHEN Z D, YU J N, CHEN J. Experimental study on zoledronic acid promoting the healing of osteoporotic fractures in rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2023, 39(4): 538-542.
- [10] 吴熙, 陈高. 芍药苷对难愈性溃疡大鼠创面愈合及 HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 信号通路的影响[J]. *河北医学*, 2023, 29(3): 369-374.
- WU X, CHEN G. Effects of paeoniflorin on wound healing and HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 signaling pathway in rats with refractory ulcers[J]. *Hebei Med*, 2023, 29(3): 369-374.
- [11] XIAO Y H, WEI R, YUAN Z, et al. Rutin suppresses FNDC1 expression in bone marrow mesenchymal stem cells to inhibit postmenopausal osteoporosis[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(10): 6680-6690.
- [12] SUN J, PAN Y L, LI X F, et al. Quercetin attenuates osteoporosis in orchietomy mice by regulating glucose and lipid metabolism via the GPRC6A/AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 849544.
- [13] HUH J E, JUNG I T, CHOI J, et al. The natural flavonoid galangin inhibits osteoclastic bone destruction and osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B in collagen-induced arthritis and bone marrow-derived macrophages[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1/2/3): 57-66.
- [14] XING Y, ZHANG M S, XIAO J H, et al. Galangin induces the osteogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells via the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 935: 175326.
- [15] MORSCZECK C. Mechanisms during osteogenic differentiation in human dental follicle cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 5945.
- [16] TONG X Y, CHEN X, ZHANG S H, et al. The effect of exercise on the prevention of osteoporosis and bone angiogenesis[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 8171897.
- [17] ABDURAHMAN A, LI X L, LI J, et al. Loading-driven PI3K/Akt signaling and erythropoiesis enhanced angiogenesis and osteogenesis in a postmenopausal osteoporosis mouse model[J]. *Bone*, 2022, 157: 116346.
- [18] 史桂荣, 任博文, 张仲博, 等. 红茴香提取物干预骨质疏松性大鼠骨折后的血管生成[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(31): 5028-5034.
- SHI G R, REN B W, ZHANG Z F, et al. Effect of *Illicium henryi* extract on angiogenesis in rats with osteoporotic fractures[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27(31): 5028-5034.
- [19] 上官文姬, 张跃辉, 岳江, 等. 柚皮苷通过 HIF-1 α /VEGF 信号促进 H 型血管抗骨质疏松的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(12): 1755-1759.
- SHANGGUAN W J, ZHANG Y H, YUE J, et al. Naringin exerts anti-osteoporosis effect by promoting H-type angiogenesis through HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. *Chin J Osteoporos*, 2022, 28(12): 1755-1759.
- [20] 王君, 吴滨滨, 王晓东, 等. 补肾益气化瘀冲剂对去卵巢骨质疏松模型大鼠血管形成的影响及机制研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(3): 54-61.
- WANG J, WU B B, WANG X D, et al. Effect of Bushen Yiqi Huayu granules on blood vessel formation in ovariectomized rats with osteoporosis and the mechanism[J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(3): 54-61.

(收稿日期: 2023-05-31 修回日期: 2023-08-18)

(编辑: 林 静)