

· 论 著 ·

冬凌草甲素降低糖皮质激素诱导的大鼠股骨颈骨折风险

王申^{1,2}, 翟娟², 冯莉², 孙华北², 聂新法², 卢庆国², 戴成柏^{2,3}, 李剑^{2,3}, 吴相志^{2,3}, 徐国庆^{2,3}, 毛继玲², 李梅², 胡艳丽², 崔瑶², 耿以茹², 黄国强², 薛魁², 徐帅², 李迎乐², 耿庆贺^{2,3}

1. 广西医科大学研究生院, 广西南宁 530000; 2. 徐州医科大学附属邳州医院中心实验室, 江苏徐州 221300; 3. 徐州医科大学附属邳州医院骨科, 江苏徐州 221300

摘要: **目的** 观察冬凌草甲素(ORI)对糖皮质激素诱导的大鼠股骨颈骨折风险的影响。**方法** 将 30 只 4 月龄 SPF 级 SD 大鼠随机分为对照组($n=10$)、地塞米松皮下注射组(DEX 组, $n=10$)、地塞米松皮下注射 + ORI 补充组(DEX + ORI 组, $n=10$)。对照组给予 0.1 ml 生理盐水肌肉注射;DEX 组按照 1 mg/kg 剂量行肌肉注射,每周 2 次。DEX + ORI 组自 DEX 注射(同 DEX 组)的第 1 天起,即予以腹腔注射 ORI(剂量 2 mg/kg,每周 2 次)。上午 8:00 准时给药,共计 8 周。8 周后,对所有大鼠进行血清学、骨密度、骨微形态学、生物力学检测,并比较各组间差异。**结果** 与对照组比较,DEX 组大鼠血清中 I 型前胶原氨基末端前肽(PINP)水平,腰椎、股骨、胫骨的骨密度,股骨干微形态指标(骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度)和生物力学指标(股骨颈极限载荷、刚度、骨折强度)均明显降低($P<0.05$),血清 I 型胶原羧基端肽(CTX-1)水平、骨小梁分离度、结构模式指数明显升高($P<0.05$)。与 DEX 组比较,DEX + ORI 组血清 PINP,腰椎、股骨、胫骨的骨密度,股骨干微形态指标(骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度)和生物力学指标(股骨颈极限载荷、刚度、骨折强度)明显升高($P<0.05$)、血清 CTX-1 水平、骨小梁分离度、结构模式指数明显降低($P<0.05$)。**结论** ORI 能够有效预防糖皮质激素诱导的大鼠股骨颈骨折,增加骨强度和骨密度,有效降低股骨颈骨折风险。

关键词: 冬凌草甲素; 骨质疏松; 地塞米松; 股骨颈; 骨折风险; I 型前胶原氨基末端前肽; I 型胶原羧基端肽

中图分类号: R 274.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2020)09-1159-04

Oridonin in the reduction of the risk of glucocorticoid induced femoral neck fracture in rats

WANG Shen*, ZHAI Juan, FENG Li, SUN Hua-bei, NIE Xin-fa, LU Qing-guo, DAI Cheng-bai, LI Jian, WU Xiang-zhi, XU Guo-qing, MAO Ji-ling, LI Mei, HU Yan-li, CUI Yao, GENG Yi-ru, HUANG Guo-qiang, XUE Kui, XU Shuai, LI Ying-le, GENG Qing-he

* Graduate School of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530000, China

Corresponding author: GENG Qing-he, E-mail: daishan6091115@163.com

Abstract: Objective To observe the effect of oridonin (ORI) on the risk of femoral neck fracture induced by glucocorticoid in rats. **Methods** Thirty 4-month-old SPF SD rats were randomly divided into control group, dexamethasone (DEX) group, and DEX + ORI group ($n=10$, each). The control group was given intramuscular injection of 0.1 ml normal saline; the DEX group was given intramuscular injection of dexamethasone (1 mg/kg, twice a week). In DEX + ORI group, oridonin (2 mg/kg, twice a week) was injected intraperitoneally from the first day of intramuscular injection of dexamethasone (1 mg/kg, twice a week). The drug was given at 8:00 for 8 weeks. After 8 weeks, the serum indexes, bone mineral density (BMD), bone microstructure and biomechanical indexes of all rats were detected and compared. **Results** Compared with the control group, serum procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) level, BMD of lumbar spine, femur and tibia, microstructure indexes (bone volume fraction, number of trabeculae, thickness of trabecular bone) and biomechanical indexes (ultimate load, stiffness and fracture strength of femoral neck) in DEX group were significantly

decreased ($P < 0.05$), and serum C-telopeptide of type I collagen (CTX-1) level, trabecular separation degree and structural pattern index were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with DEX group, serum PINP level, BMD of lumbar spine, femur and tibia, microstructure indexes (bone volume fraction, trabecular number, trabecular thickness), and biomechanical indexes (ultimate load, stiffness and fracture strength of femoral neck) in DEX + ORI group were significantly increased ($P < 0.05$), serum CTX-1 level, trabecular separation degree and structural pattern index were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Oridonin can effectively prevent the risk of femoral neck fracture induced by glucocorticoid, increase bone strength and BMD, and effectively reduce the risk of femoral neck fracture.

Key words: Oridonin; Osteoporosis; Dexamethasone; Femoral neck; Fracture risk; PINP; CTX-1

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81760885); Research Fund of Xuzhou Medical University (2018KJ23)

糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 是一种临床常用药物, 因其强效抗炎和免疫抑制作用, 被广泛应用于哮喘、慢性阻塞性肺病、类风湿性关节炎等疾病的治疗。但是, 长期、大量的使用 GC 会导致一系列不良后果, 其中最为严重的就是糖皮质激素性骨质疏松症 (GIOP)^[1]。GIOP 是指在使用 GC 治疗疾病时所引起的骨量减少、骨微结构破坏、骨脆性增加、最终导致骨折风险增加的一种全身性疾病^[1-2]。骨质疏松症可以分为原发性和继发性两种, GIOP 现已跃居至继发性骨质疏松的首位。有研究发现, 接受 GC 治疗 1 年以上, 患者骨质疏松发生率高达 30% ~ 50%^[3]。GIOP 导致的疼痛和脆性骨折, 严重影响患者生活质量, 给家庭和社会带来极大负担, 成为世界性难题。但是, 关于 GIOP 的发生机制尚未完全阐明, 同时缺乏有效治疗措施。

近年来, 中医在治疗 GIOP 方面积累了丰富的经验。本研究将传统中药冬凌草引入到 GIOP 治疗中。通过地塞米松 (DEX) 皮下注射构建 GIOP 大鼠模型, 通过观察骨密度、血清骨代谢、骨微结构形态及骨生物力学指标, 探讨冬凌草甲素 (ORI) 补充对 DEX 诱导的大鼠骨量减少及股骨颈骨折风险增加的影响。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 4 月龄 SPF 级 SD 大鼠 30 只, 均为雄性, 体重 (608.4 ± 29.4) g, 由南京医科大学实验动物中心提供。饲养环境: 所有大鼠均在室温 20 ~ 25 °C、相对湿度 45% ~ 60%、正常光照、通风良好的清洁级动物房内分笼饲养, 每笼 2 只。自由进水和饮食, 标准啮齿类动物饲料饲养。每周更换 2 次垫料。每周测 1 次体重。研究获得徐州医科大学附属邳州医院伦理委员会批准 (审批编号: 2018-02-007)。

1.2 实验药物 冬凌草甲素 (Sigma-Aldrich 公司), 纯度为 98% ~ 99%, 使用二甲基亚砜 (DMSO, Sigma-Aldrich 公司) 溶解, 分装于 1.5 ml 的 EP 管中。地塞

米松 (规格 100 mg/支, Sigma-Aldrich 公司)。

1.3 仪器 高速低温离心机 (美国 ThermoFisher 公司), 低温冰箱 (德国 Siemens), 小动物双能 X 线骨密度分析仪 (DXA, 美国 GE 公司, 型号: Rodigy), 多功能酶标仪 (美国 ThermoFisher 公司, 型号: Varioskan LUX), Micro-CT (比利时 Bruker 公司, 型号: SkyScan1176), 生物力学机 (美国 Instron 公司, 型号: 8511)。

1.4 GIOP 大鼠造模及药物干预 根据《实验动物学》方法对所有大鼠进行编号。根据体重分层随机化的原则将 30 只大鼠分为如下 3 组: 对照组 ($n = 10$)、地塞米松皮下注射组 (DEX 组, $n = 10$)、地塞米松皮下注射 + 冬凌草甲素补充组 (DEX + ORI 组, $n = 10$)。对照组给予 0.1 ml 生理盐水肌内注射; DEX 组按照 1 mg/kg 剂量行肌内注射, 每周 2 次。DEX + ORI 组自 DEX 注射 (同 DEX 组) 的第 1 天起, 即予以腹腔注射 ORI (剂量 2 mg/kg, 每周 2 次)^[4]。上午 8:00 准时给药, 共计 8 周。

1.5 取材 8 周后, 3 组大鼠禁食、水过夜, 异氟醚吸入麻醉后颈椎脱臼处死。用 5 ml 一次性注射器从大鼠心脏抽取血液, 转入 EDTA 抗凝血液采集管。使用高速低温离心机, 8 000 r/min, 4 °C 恒温下离心 5 min, 提取血清, 置于 -40 °C 冰箱进行贮存。取出大鼠腰椎及左侧股骨和胫骨, 剔除骨表面骨膜及附着软组织。以 4 °C 预冷生理盐水清洗干净后, 锡箔纸包裹、标记, 放入 -80 °C 冰箱中冻存待用。

1.6 指标检测

1.6.1 骨代谢指标检测 血清从冰箱取出后, 室温下解冻。采用 ELISA 法检测血清中 I 型前胶原氨基末端前肽 (PINP) 和 I 型胶原羧基端肽 (CTX-1) 浓度, 所有操作流程均严格按照厂家说明书操作^[5]。所用试剂盒均购自南京建成生物科技有限公司。

1.6.2 骨密度测定 自冰箱中取出各组大鼠腰椎、股骨和胫骨后, 常温解冻, 使用 DXA 测量各个标本骨密度。

1.6.3 股骨干微结构测定 将股骨干固定于 micro-CT 样品固定器中,行 Micro-CT 扫描。扫描条件为:电压 50 kV,电流 200 μ A,360° 旋转扫描,图像平面分辨率 1 024 \times 1 024,像素点尺寸 15 μ m \times 15 μ m,层间距 7 μ m。扫描结束,使用 Micro-CT 系统中软件对图像行定量分析,得到以下骨微结构参数:骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数目(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁分离度(Tb. Sp)、结构模式指数(SMI)。

1.6.4 股骨颈垂直压缩实验 将股骨放置于生物力学机中的模具中固定,仔细调整使模具纵轴与股骨干纵轴相平行,同时使股骨头与加压钻头相垂直。使用加压传感器在股骨头部位施加轴向压力,直至股骨颈断裂。测量载荷和位移,记录载荷-变形曲线,并根据曲线计算出极限载荷、刚度、骨折强度。

1.7 统计学方法 所有数据使用 SPSS 17.0 进行分析。计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较选择单因素方差分析及两两比较的 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态比较 本实验过程中,各组大鼠一般状况均良好,皮毛、精神状态、活动、大小便、饮食、饮水无明显异常,无意外死亡。

2.2 各组大鼠血清 P1NP 及 CTX-1 水平比较 与对照组比较,DEX 组大鼠血清中 P1NP 水平明显降低($P < 0.05$)、CTX-1 水平明显升高($P < 0.05$)。与 DEX 组比较,DEX + ORI 组血清 P1NP 明显升高($P < 0.05$)、CTX-1 水平明显降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 3 各组大鼠股骨干形态学比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	BV/TV (%)	Tb. Th (μ m)	Tb. N (1/mm)	Tb. Sp (μ m)	SMI
对照组	35.8 \pm 2.4	92.4 \pm 4.9	3.72 \pm 0.44	198.8 \pm 8.7	1.98 \pm 0.17
DEX 组	22.1 \pm 2.7 ^a	72.5 \pm 5.4 ^a	2.18 \pm 0.35 ^a	268.7 \pm 11.3 ^a	2.41 \pm 0.22 ^a
DEX + ORI 组	33.2 \pm 3.1 ^b	89.4 \pm 6.4 ^b	3.34 \pm 0.68 ^b	208.4 \pm 9.2 ^b	2.11 \pm 0.16 ^b
F 值	70.09	36.68	24.08	149.54	14.18
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:同对照组比较,^a $P < 0.05$;同 DEX 组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 4 各组大鼠股骨颈生物力学比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	极限载荷(N)	刚度(N/mm)	骨折强度(mJ)
对照组	218.8 \pm 12.8	369.7 \pm 21.2	84.1 \pm 6.4
DEX 组	100.4 \pm 10.7 ^a	190.2 \pm 19.1 ^a	48.1 \pm 3.3 ^a
DEX + ORI 组	210.1 \pm 14.7 ^b	358.8 \pm 17.7 ^b	84.2 \pm 4.9 ^b
F 值	264.23	269.46	171.32
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

注:同对照组比较,^a $P < 0.05$;同 DEX 组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

迄今为止,临床上针对 GIOP 仍缺乏安全、有效

2.3 各组大鼠骨密度比较 与对照组比较,DEX 组大鼠腰椎、股骨、胫骨的骨密度均明显降低($P < 0.05$)。与 DEX 组比较,DEX + ORI 组腰椎、股骨、胫骨的骨密度均明显升高($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 各组大鼠股骨干骨微形态比较 与对照组比较,DEX 组 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 值均明显降低($P < 0.05$),Tb. Sp、SMI 值显著升高($P < 0.05$);与 DEX 组比较,DEX + ORI 组 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 值显著升高($P < 0.05$),Tb. Sp、SMI 值明显降低($P < 0.05$)。见表 3。

2.5 各组大鼠股骨颈生物力学强度比较 与对照组比较,DEX 组股骨颈极限载荷、刚度、骨折强度均明显降低($P < 0.05$);与 DEX 组比较,DEX + ORI 组股骨颈极限载荷、刚度、骨折强度值明显升高($P < 0.05$)。见表 4。

表 1 各组大鼠血清骨代谢指标 ($n = 10, \text{ng/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	CTX-1	P1NP
对照组	20.6 \pm 2.5	7.9 \pm 1.8
DEX 组	31.4 \pm 2.7 ^a	3.5 \pm 0.9 ^a
DEX + ORI 组	22.5 \pm 2.1 ^b	7.4 \pm 2.2 ^b
F 值	55.56	19.58
P 值	<0.01	<0.01

注:同对照组比较,^a $P < 0.05$;同 DEX 组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠骨密度值 ($n = 10, \text{mg/cm}^2, \bar{x} \pm s$)

组别	腰椎	股骨	胫骨
对照组	272.8 \pm 11.2	345 \pm 13.8	319 \pm 14.3
DEX 组	214.7 \pm 14.7 ^a	310 \pm 10.9 ^a	264 \pm 14.8 ^a
DEX + ORI 组	264.5 \pm 16.4 ^b	340 \pm 16.2 ^b	308 \pm 10.1 ^b
F 值	48.52	18.80	48.35
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

注:同对照组比较,^a $P < 0.05$;同 DEX 组比较,^b $P < 0.05$ 。

的治疗方法。二磷酸盐类药物是目前 GIOP 防治的首选用药。虽然可以有效治疗临床上各种骨质疏松症,但其有可能导致下颌骨坏死、股骨脆性骨折等一系列严重并发症^[6-7]。寻找治疗 GIOP 的安全、有效药物一直是学术界关注的焦点。

冬凌草是我国特色中草药,主要有效成分为 ORI。ORI 又名延命草宁,是一种以贝壳杉烯为基本骨架的四环二萜类化合物,其化学式为 C₂₀H₂₈O₆^[8]。其形状为无色棱柱状结晶,不溶于水,溶于甲醇、乙醚、乙醇等有机溶剂,味道极苦。既往研究发现,ORI

具有抗肿瘤、抗炎和抗微生物等多种药理活性^[9]。ORI 能够显著抑制多种肿瘤细胞生长,对胰腺癌、肝癌、宫颈癌、结直肠癌、肺癌等细胞具有显著的细胞毒性作用以及抑制作用^[9]。ORI 还能够显著延长患肿瘤动物的生存时间^[10]。ORI 通过核因子红细胞 2 相关因子 2 (Nrf2) 非依赖性抗炎和 Nrf2 依赖性抗氧化功能,对细菌脂多糖诱导的急性肺损伤具有保护作用^[11]。2018 年,我国学者的一项研究发现,ORI 在卵巢切除 (OVX) 的小鼠模型中,能够通过促进骨形成、抑制骨吸收,有效治疗雌激素缺乏诱导的骨质疏松症发生^[4]。ORI 对 GIOP 是否有防治效果尚缺乏实验证明。

DEX 注射诱导的 GIOP 模型与 OVX 诱导的绝经后骨质疏松模型一样,广泛应用于骨质疏松症的各项研究中^[1-2,6,12]。同以往研究结果类似^[1],笔者对 4 月龄 SD 大鼠行 DEX 皮下注射后 8 周,各项检测结果提示大鼠出现明显骨质疏松症表现。DEX 组大鼠血清中骨形成标志物 P1NP 显著降低,而骨吸收标志物 CTX-1 水平显著升高,提示 GC 导致骨形成降低、骨吸收增高,骨代谢出现负平衡。DXA 检测结果提示,DEX 组大鼠腰椎、股骨和胫骨的骨密度均明显下降。此外,DEX 组大鼠 BV/TV、Tb. Th、Tb. N 等测值明显降低,而 Tb. Sp、SMI 显著升高,说明骨小梁断裂、变细,骨小梁从棒状结构向板状结构转化,骨微观结构恶化。这些结果均表明 GIOP 大鼠模型造模成功。该动物模型较好地模拟了 GIOP 患者骨形成减少、骨吸收增加的异常骨代谢状态。值得注意的是,经过 8 周 ORI 补充,DEX + ORI 组大鼠血清 P1NP 水平明显升高,而 CTX-1 水平明显下降。腰椎、股骨和胫骨的骨密度均显著增加。Micro-CT 检查结果提示,DEX + ORI 组大鼠股骨 BV/TV、Tb. Th、Tb. N 等测值明显提高,而 Tb. Sp、SMI 显著下降,各指标与对照组无明显差别。从以上干预结果可以发现,ORI 对 GIOP 大鼠骨重建失衡有显著纠正作用,能显著降低骨吸收,增加骨形成,有效修复骨微结构,逆转骨量丢失,改善 DEX 引起的骨密度下降。

单纯的骨组织形态学观察、骨密度测定并不能全面反映骨质量。骨生物力学测试是骨强度、骨结构、骨量的综合体现,是评价骨质疏松性骨折风险最为直接、有效的方法^[1-2]。以生物力学性能指标变化评价骨质疏松治疗、干预的疗效,具有极高的价值,为其他测定方法所无法取代。本实验股骨颈生物力学测试发现,DEX 治疗后股骨颈极限载荷、刚度、骨折强度明显降低,骨折风险显著增加。经过 8 周 ORI 补充,股骨颈极限载荷、刚度、骨折强度明显增加,骨折风险

降低。

综上所述,本研究发现 ORI 能够促进骨形成,抑制骨吸收,有效预防 GC 诱发的大鼠骨密度下降、骨质量降低,有效降低股骨颈骨折风险增加,为 ORI 应用于临床 GIOP 的预防和治疗提供了充分的实验参考依据。

参考文献

- [1] Geng QH, Heng K, Li J, et al. A soluble bone morphogenetic protein type 1A receptor fusion protein treatment prevents glucocorticoid-induced bone loss in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11 (7) : 4232 - 4247.
- [2] Geng QH, Gao HY, Yang RL, et al. Pyrroloquinoline quinone prevents estrogen deficiency-induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15 (1) : 58 - 68.
- [3] Boling EP. Secondary osteoporosis; underlying disease and the risk for glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Clin Ther*, 2004, 26 (1) : 1 - 14.
- [4] Xie ZA, Yu HJ, Sun XW, et al. A novel diterpenoid suppresses osteoclastogenesis and promotes osteogenesis by inhibiting Irf1-mediated and IκBα-mediated p65 nuclear translocation [J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33 (4) : 667 - 678.
- [5] Williams-Dautovich J, Yogendirarajah K, Dela Cruz A, et al. The CRH-transgenic cushingoid mouse is a model of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *JBM R Plus*, 2017, 1 (1) : 46 - 57.
- [6] Wu X, Li J, Zhang H, et al. Pyrroloquinoline quinone prevents testosterone deficiency-induced osteoporosis by stimulating osteoblastic bone formation and inhibiting osteoclastic bone resorption [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9 (3) : 1230 - 1242.
- [7] 耿庆贺, 翟怀远, 李迎乐, 等. 非创伤性股骨头坏死患者血清白细胞介素-33 水平变化及意义 [J]. *中国临床研究*, 2019, 32 (4) : 509 - 511, 515.
- [8] Li DH, Han T, Liao J, et al. Oridonin, a promising ent-kaurane diterpenoid lead compound [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (9) : 1395.
- [9] Li JJ, Wu YH, Wang D, et al. Oridonin synergistically enhances the anti-tumor efficacy of doxorubicin against aggressive breast cancer via pro-apoptotic and anti-angiogenic effects [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 146 : 104313.
- [10] Vasaturo M, Cotugno R, Fiengo L, et al. The anti-tumor diterpene oridonin is a direct inhibitor of Nucleolin in cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1) : 16735.
- [11] Yang HH, Lv H, Li HJ, et al. Oridonin protects LPS-induced acute lung injury by modulating Nrf2-mediated oxidative stress and Nrf2-independent NLRP3 and NF-κB pathways [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17 (1) : 62.
- [12] Li XD, Ominsky MS, Villaseñor KS, et al. Sclerostin antibody reverses bone loss by increasing bone formation and decreasing bone resorption in a rat model of male osteoporosis [J]. *Endocrinology*, 2018, 159 (1) : 260 - 271.