

龙牙榧木皂苷IV对大鼠骨重建及破骨细胞形成的影响

贾德政 罗雪峰 杨新文*

(新疆医科大学第一附属医院, 急救创伤中心急诊创伤外科, 乌鲁木齐 830013)

摘要 该研究基于骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)/SMAD4信号通路探讨龙牙榧木皂苷IV(tarasaponin IV, TRS)对踝关节骨折(AF)大鼠骨重建及破骨细胞形成的影响。构建AF模型大鼠, 并将其随机分为AF组、TRS低浓度组(TRS-L组)、TRS中浓度组(TRS-M组)、TRS高浓度组(TRS-H组)、TRS-H+BMP特异抑制剂(Noggin)组, 并设立未进行骨折的正常大鼠为假手术组(Sham组)。酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组大鼠血清中骨重建标志物[Runt相关转录因子-2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)、BMP-2、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL)]的水平; 微计算机断层扫描(Micro-CT)检测各组大鼠骨小梁微结构变化[骨密度(bone mineral density, BMD)、骨体积分数(bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁数(number of trabeculae, Tb.N)、骨小梁厚度(thickness of trabeculae, Tb.Th)]; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)和抗酒石酸磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色法分别检测各组大鼠骨痂组织形态学病理变化及破骨细胞的数量; Western blot检测各组大鼠Runx2、ALP、RANKL、BMP-2和SMAD4蛋白表达水平。与Sham组相比, AF组大鼠Runx2、BMP-2、ALP、SMAD4表达水平及BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th水平显著降低, RANKL表达水平和破骨细胞数量显著升高, 踝骨刚度和最大载荷明显降低($P<0.05$); 与AF组相比, TRS-L、TRS-M、TRS-H组大鼠Runx2、BMP-2、ALP、SMAD4表达水平及BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th水平逐渐升高, RANKL表达水平和破骨细胞数量逐渐降低, 踝骨刚度和最大载荷逐渐升高, 且各指标变化程度与TRS浓度呈正比($P<0.05$); 与TRS-H组相比, TRS-H+Noggin组大鼠Runx2、BMP-2、ALP、SMAD4表达水平及BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th水平显著降低, RANKL表达水平和破骨细胞数量显著升高, 踝骨刚度和最大载荷明显降低($P<0.05$)。TRS可能通过激活BMP-2/SMAD4信号通路, 促进AF大鼠骨重建并抑制破骨细胞的形成。

关键词 龙牙榧木皂苷IV; BMP-2/SMAD4信号通路; 踝关节骨折; 骨重建; 破骨细胞

The Effects of Tarasaponin IV on Bone Regeneration and Osteoclast Formation in Rats

JIA Dezheng, LUO Xuefeng, YANG Xinwen*

(Emergency Trauma Center Emergency Trauma Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830013, China)

Abstract This study investigates the effects of TRS (tarasaponin IV) on bone reconstruction and osteoclast formation in rats with AF (ankle fractures) via the BMP-2 (bone morphogenetic protein-2)/SMAD4 signaling pathway. AF models were established in rats, which were then randomly divided into the AF group, TRS-L (low-concentration TRS) group, TRS-M (medium-concentration TRS) group, TRS-H (high-concentration TRS) group, and TRS-H+Noggin (BMP-specific inhibitor) group. Additionally, a sham operation group (Sham group) consisting of

收稿日期: 2025-07-09

接受日期: 2025-08-07

*通信作者。Tel: 13579885099, E-mail: yxw751121@163.com

Received: July 9, 2025

Accepted: August 7, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-13579885099, E-mail: yxw751121@163.com

normal rats without fractures was included. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) was used to detect bone remodeling markers [Runx2 (Runt-related transcription factor 2), BMP-2, ALP (alkaline phosphatase), RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)] in serum of rats in each group. Micro-CT was used to detect the microstructural changes of bone trabeculae of rats in each group [BMD (bone mineral density), BV/TV (bone volume fraction), Tb.N (number of trabeculae), and Tb.Th (thickness of trabeculae)]. The HE (hematoxylin-eosin) and TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) staining methods were used to detect the morphological and pathological changes of callus tissue and the number of osteoclasts of rats in each group. Western blot was used to detect the Runx2, ALP, RANKL, BMP-2, and SMAD4 proteins in each group. Compared with the Sham group, the AF group showed great decreased in Runx2, BMP-2, ALP, SMAD4, BMD, BV/TV, Tb.N, Tb.Th, great increases in RANKL and osteoclast count, and conspicuous decreased in ankle stiffness and maximum load ($P<0.05$). Compared with the AF group, the TRS-L, TRS-M, and TRS-H groups showed gradual increases in Runx2, BMP-2, ALP, SMAD4, BMD, BV/TV, Tb.N, Tb.Th in rats, gradual decreased in RANKL and osteoclast count, and gradual increases in ankle stiffness and maximum load, and the degree of change in each indicator was directly proportional to TRS concentration ($P<0.05$). Compared with the TRS-H group, the TRS-H+Noggin group showed conspicuous decreased in Runx2, BMP-2, ALP, SMAD4, BMD, BV/TV, Tb.N, Tb.Th, conspicuous increased in RANKL and osteoclast count, and great decreases in ankle stiffness and maximum load ($P<0.05$). TRS may promote bone remodeling and inhibit osteoclast formation in AF rats by activating BMP-2/SMAD4 signaling pathway.

Keywords tarasaponin IV; BMP-2/SMAD4 signaling pathway; ankle joint fracture; bone remodeling; osteoclast

踝关节骨折(ankle joint fracture, AF)是一种临床上常见的关节内创伤性骨折,发生率呈逐年上升趋势^[1]。踝关节是人体最重要的活动和负重关节,但因其距离地面近,关节面小,承受压力大,无法得到有效缓冲,导致其极易受伤^[2]。目前AF的治疗方法尚有缺陷,如手术可能造成组织黏连,抗炎药物的使用会产生诸多不良反应等,虽然可以增强关节的稳定性和抗炎,但不适用于所有患者,尤其是老年患者^[3]。而传统中药治疗AF不良反应较小,近年来越来越多研究表明,天然植物提取物在骨折愈合中具有潜在优势。龙牙楸木皂苷IV(tarasaponin IV, TRS)是五加科楸木属植物龙牙楸木的主要成分之一,属于齐墩果烷型三萜皂苷,具有极高的药用价值^[4]。研究发现,三七中的总皂苷及其提取物可以增强骨细胞增殖活力,减轻因过氧化氢引起的氧化损伤,从而促进骨形成,减少对成骨细胞的损伤^[5]。但TRS能否稳定AF的破骨-成骨动态平衡,目前尚未有研究证明。

骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)作为转化生长因子超家族的一员,具有强大的促进成骨分化的能力^[6]。当BMP-2与膜上受体结合后,激活丝氨酸/苏氨酸激酶(serine/threo-

nine kinase, Ser/Thr)等信号分子,促进果蝇与秀丽隐杆线虫蛋白同源物1/5/8(homologues of the drosophila protein, mothers against decapentaplegic and thecaenorhabditis elegans protein 1/5/8, SMAD1/5/8)的磷酸化,随后与SMAD4结合形成复合物,并转移至细胞核内,从而激活经典的BMP-2/SMAD4成骨信号通路^[7]。研究发现,BMP-2/SMAD通路对于维持骨稳态的动态平衡十分关键,并且可以影响成骨的分化能力^[8]。但TRS能否通过调控BMP-2/SMAD4信号通路对AF的骨重建和破骨细胞的形成发挥积极作用,尚不清楚。因此,本研究构建AF大鼠模型,以BMP-2/SMAD4信号通路为切入点,探讨TRS对AF大鼠骨重建和破骨细胞形成的影响,为临床上TRS治疗AF提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 动物

SPF级8周龄雄性SD大鼠,体质量(200±20)g,购于武汉大学动物实验中心,生产许可证号:SCXK(鄂)2022-0004。对大鼠进行一周适应性饲养,环境温度22℃~25℃,湿度为45%~55%,提供常规饲料和清洁用水,并采用12 h光照与12 h黑暗循

环, 确保饲养环境通风良好。本研究方案获得新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会批准(2024-MER-23)。

1.2 主要试剂

主要试剂见表1。

1.3 AF大鼠模型的建立

用戊巴比妥钠对大鼠进行腹腔注射, 麻醉后消毒处理大鼠踝关节, 并将其以仰卧位置固定于手术台, 右侧髌关节充分外展, 右膝关节弯曲90°。在内踝处纵向切1 cm长的切口, 暴露踝关节。小骨凿以37°的角度凿入内踝, 生理盐水冲洗后, 缝合伤口。术后连续3天, 每天注射曲马多镇痛。术后用X线拍摄, 若踝关节出现骨折, 且骨折固定处未发现明显移位, 则视为建模成功^[9]。另选取12只正常大鼠为假手术组(Sham组), 在相同位置纵向切1 cm切口后, 生理盐水冲洗后缝合。所有大鼠均于手术前腹腔注射青霉素以预防感染。

1.4 分组及药物处理

将建模成功的AF大鼠随机分为AF组、TRS低浓度组(TRS-L组)、TRS中浓度组(TRS-M组)、TRS高浓度组(TRS-H组)、TRS-H+Noggin组。TRS-L、TRS-M、TRS-H组大鼠分别腹腔注射25、50、100 mg/kg的TRS; TRS-H+Noggin组注射100 mg/kg

的TRS和2 mL/kg的Noggin(50 ng/mL)^[10]; AF组和Sham组大鼠每天同一时间腹腔注射等量的生理盐水(按照大鼠体质量给予)。每组12只, 每日上午同一时间注射一次, 连续4周。

1.5 各组大鼠骨小梁微结构的变化

末次给药后24 h, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠, 将其以俯卧位固定于手术台, 屈曲双下肢。用微计算机断层扫描(Micro-Computed Tomography, Micro-CT)检测各组大鼠骨痂处以及Sham组相同位置的结构变化, 构建三维感兴趣区, 用CTAn软件分析并计算骨密度(bone mass density, BMD)、骨体积分数(bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁数(trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)。

1.6 ELISA法检测血清中骨重建相关标志物

取各组大鼠腹腔动脉血, 静置后在4 °C条件下以3 000 ×g的离心力离心15 min, 取上清, 根据Runx2、ALP、RANKL的ELISA检测试剂盒说明书步骤严格操作, 用酶标仪测定待测血清于波长为450 nm处的吸光度值, 并计算Runx2、BMP-2、ALP、RANKL水平。

1.7 生物力学测试

对大鼠注射过量麻醉进行安乐死处理后, 取各

表1 试剂与抗体信息

Table 1 Reagent and antibody information

名称 Name	货号/批号 Catalog number/Lot number	厂家 Manufacturers
TRS	wkq-13148	Sichuan Weikeqi
BMP specific inhibitor head protein (Noggin)	HY-P70542	MedChemExpress, United States
TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) staining kit	P0332	Beyotime
HE (hematoxylin-eosin) staining kit	C0105S	Beyotime
ALP (alkaline phosphatase)	ab229126	Abcam
BMP-2 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) kit	ml102832	Shanghai Enzyme-linked Biotechnology
Runx2 (Runt-related transcription factor 2) ELISA kit	ml106179	Shanghai Enzyme-linked Biotechnology
ALP ELISA kit	ml095274	Shanghai Enzyme-linked Biotechnology
RANKL (receptor activator of nuclear factor-κB ligand) ELISA kit	ml003065	Shanghai Enzyme-linked Biotechnology
BMP-2	TPA4352	Abmart
SMAD4	PA1709	Abmart
Runx2	TA5186	Abmart
RANKL	PK85532	Abmart
GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase)	P60037	Abmart
β-actin	P30002	Abmart
Goat anti-rabbit IgG H&L	ab6702	Abcam

组6只大鼠的右下肢踝关节,固定两端,进行三点弯曲力学实验。以踝关节中点为加载点,距顶端8 mm,底端20 mm,记录刚度(骨头在未被破坏时承受力的大小)与最大载荷(骨头承受的最大力学载荷)。

1.8 HE染色观察骨痂组织形态学变化

将剩余6只大鼠剥离完整的带骨痂踝关节,切取骨痂组织分为两份,一份置于4%福尔马林溶液中4 °C固定3天后,用10%乙二胺四乙酸二钠溶液室温脱钙4~8周,其间定期更换脱钙液并通过针刺法评估脱钙终点。脱钙完全后,流水冲洗组织过夜,随后经梯度酒精(70%、80%、90%、95%、100%)室温脱水各2 h~4 h,二甲苯透明各30 min~60 min,再于60 °C~62 °C石蜡中浸蜡各1~2 h并进行石蜡包埋。将包埋组织块切片(厚度4 μm~6 μm),60 °C~65 °C烤片2 h~4 h使切片紧密黏附。室温下操作,染色前经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后,进行苏木素染色3 min~8 min,1%盐酸酒精分化数秒,流水返蓝15 min~30 min,伊红复染30 s至2 min,最后经梯度脱水,二甲苯透明,中性树封片,光学显微镜下观察骨痂组织病理学变化。另一份保存于液氮中。

1.9 TRAP染色检测骨痂组织破骨细胞数量

取“1.8”中的石蜡切片,脱蜡后严格按照TRAP染色试剂盒说明进行切片染色,并于光学显微镜下观察、拍照记录。TRAP标记骨痂组织中破骨细胞,阳性染色呈黄褐色,随机选取5个不相邻视野计数,并计算平均值。

1.10 Western blot检测骨痂组织中Runx2、ALP、RANKL、BMP-2和SMAD4蛋白表达情况

取出液氮中保存的骨痂组织,充分研磨裂解,收集上清液。二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid, BCA)测定蛋白浓度后进行热变性,以30 μg上样量进行恒压的聚丙烯酰胺凝胶电泳以分离目的蛋白,湿转法将条带转移至膜。室温封闭1 h,分别添加对

应的一抗Runx2(1:1 000)、ALP(1:2 000)、RANKL(1:1 000)、BMP-2(1:1 000)、SMAD4(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)、β-actin(1:5 000),于4 °C摇床孵育过夜。洗膜,室温孵育二抗(1:5 000) 1 h,再次洗膜后于超敏发光液中显影。凝胶成像分析仪分析蛋白条带灰度值。

1.11 统计学

使用SPSS 25.0统计软件对数据进行分析,计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示。对于多组样本数据的比较,采用单因素方差分析方法,通过LSD-*t*检验进行各组之间的两两比较。当*P*值小于0.05时,认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠骨小梁微结构的变化

与Sham组比,AF组大鼠骨痂组织的BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th水平显著降低($P<0.05$);与AF组比,TRS-L、TRS-M、TRS-H组BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th水平随TRS浓度的升高而逐渐降低($P<0.05$);与TRS-H组比,TRS-H+Noggin组BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th水平显著降低($P<0.05$)。见图1和图2。

2.2 各组大鼠骨重建相关因子的变化

与Sham组比,AF组大鼠血清中Runx2、BMP-2、ALP水平显著降低,RANKL水平显著升高($P<0.05$);与AF组比,TRS-L、TRS-M、TRS-H组Runx2、BMP-2、ALP水平显著升高,RANKL水平显著降低($P<0.05$),且变化幅度呈剂量依赖性($P<0.05$);与TRS-H组比,TRS-H+Noggin组Runx2、BMP-2、ALP水平显著降低,RANKL水平显著升高($P<0.05$)。见图3。

2.3 各组大鼠生物力学指标比较

与Sham组比,AF组大鼠最大载荷、刚度显著

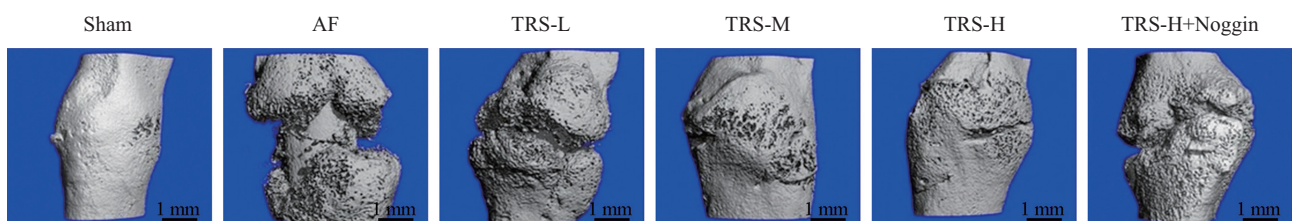
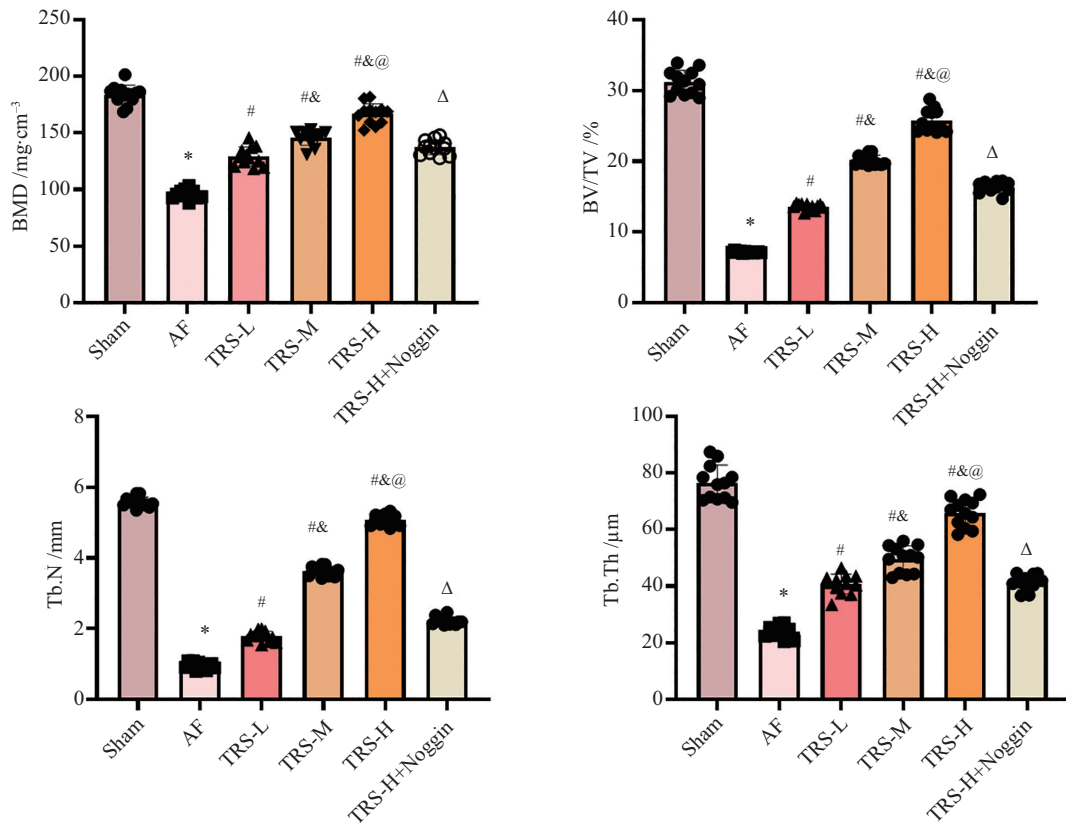


图1 各组大鼠Micro-CT三维重建图

Fig.1 Micro-CT three-dimensional reconstruction images of the rat groups



* $P < 0.05$, 与Sham组比; # $P < 0.05$, 与AF组比; & $P < 0.05$, 与TRS-L组比; @ $P < 0.05$, 与TRS-M组比; Δ $P < 0.05$, 与TRS-H组比。 $n = 12$ 。

* $P < 0.05$ compared with Sham group; # $P < 0.05$ compared with AF group; & $P < 0.05$ compared with TRS-L group; @ $P < 0.05$ compared with TRS-M group; Δ $P < 0.05$ compared with TRS-H group. $n = 12$.

图2 各组大鼠踝关节骨痂组织BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th比较

Fig.2 Comparison of bone mineral density, bone volume/total volume, trabecular number, and trabecular thickness in the ankle joint tissues of rats

降低($P < 0.05$); 与AF组比, TRS-L、TRS-M、TRS-H组最大载荷、刚度随TRS浓度的升高而逐渐升高($P < 0.05$); 与TRS-H组比, TRS-H+Noggin组最大载荷、刚度显著降低($P < 0.05$)。见图4。

2.4 各组大鼠骨痂组织病理变化

Sham组大鼠骨小梁较粗, 排列整齐, 间距较小, 连接无断裂; 与Sham组比, AF组骨小梁数量较少且较细, 排列紊乱, 间距大并有大部分断裂, 骨髓腔内有大量空洞; 与AF组比, TRS-L、TRS-M、TRS-H组骨小梁数目增多, 相对较粗, 结构恢复, 排列紧密; TRS-H+Noggin组相较于TRS-H组, 骨小梁变细, 数目较少, 连接断裂情况加重。见图5。

2.5 各组大鼠骨痂组织破骨细胞数量

与Sham组比, AF组大鼠骨痂组织中破骨细胞数量显著增加($P < 0.05$); 与AF组比, TRS-L、TRS-M、TRS-H组破骨细胞数量随TRS浓度的升高而逐渐减少($P < 0.05$); 与TRS-H组比, TRS-H+Noggin组破骨细

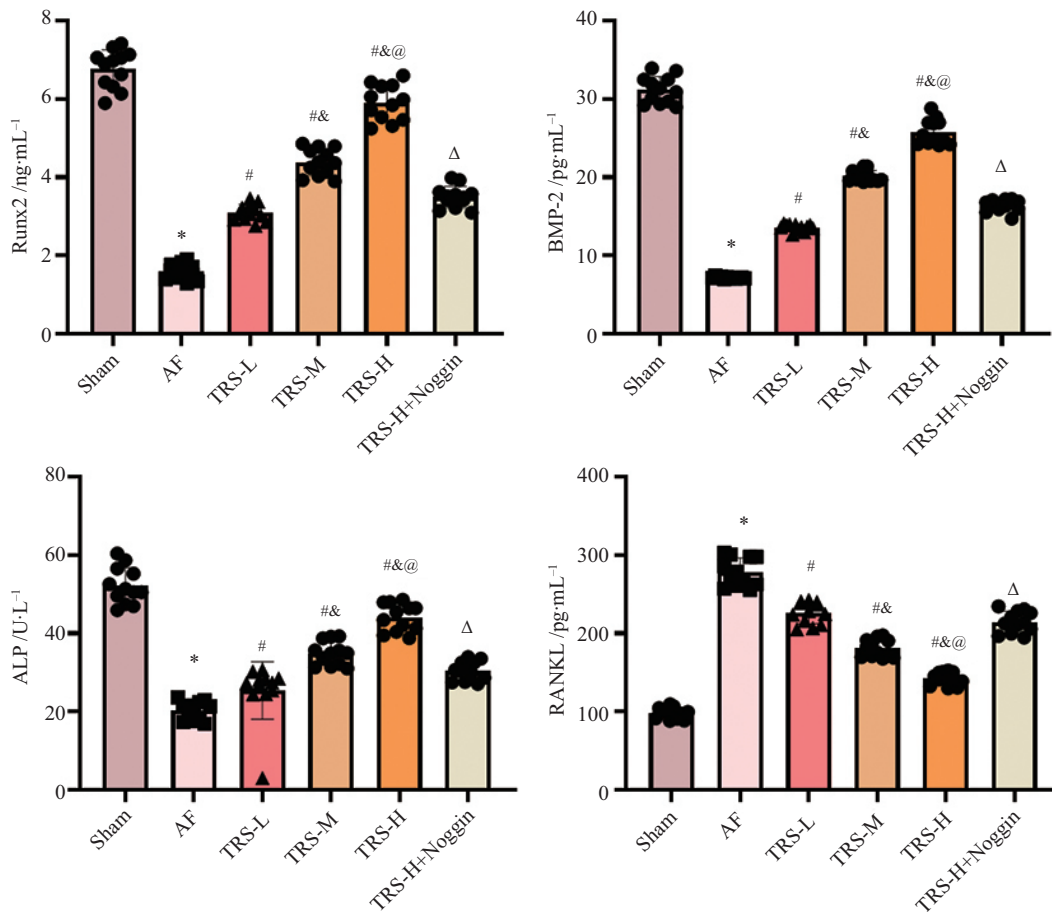
胞数量显著增加($P < 0.05$)。见图6和图7。

2.6 各组大鼠骨痂组织中BMP-2、SMAD4、Runx2、ALP、RANKL表达情况

与Sham组比, AF组大鼠骨痂组织中BMP-2、SMAD4、Runx2、ALP蛋白表达水平显著降低, RANKL表达水平显著升高($P < 0.05$); 与AF组比, TRS-L、TRS-M、TRS-H组BMP-2、SMAD4、Runx2、ALP蛋白表达水平升高, RANKL表达水平降低, 且呈浓度依赖性($P < 0.05$); 与TRS-H组比, TRS-H+Noggin组BMP-2、SMAD4、Runx2、ALP蛋白表达水平显著降低, RANKL表达水平显著升高($P < 0.05$)。见图8和图9。

3 讨论

AF通常由外界暴力因素导致胫腓骨下部和距骨相互撞击, 造成下肢骨损伤, 主要临床表现为踝骨处红肿, 疼痛, 踝关节活动受限等^[1]。骨折愈合是

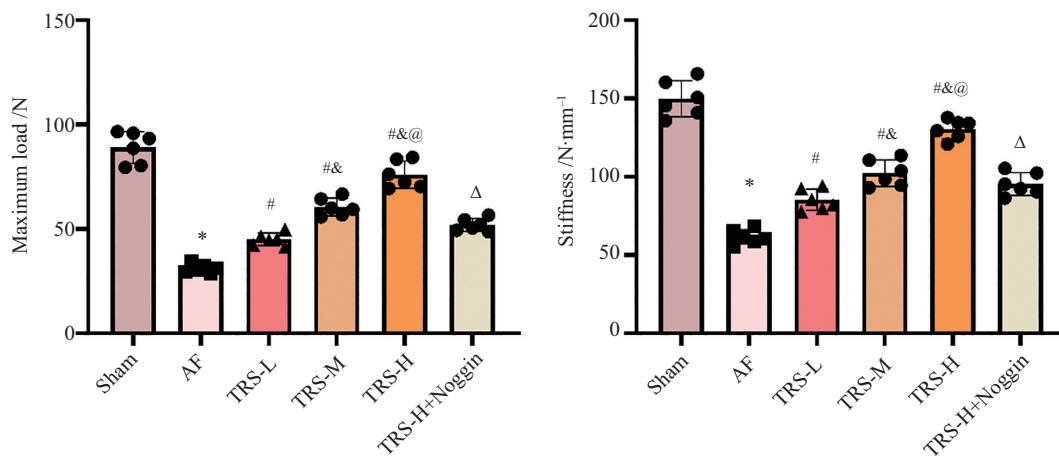


* $P < 0.05$, 与Sham组比; # $P < 0.05$, 与AF组比; & $P < 0.05$, 与TRS-L组比; @ $P < 0.05$, 与TRS-M组比; $\Delta P < 0.05$, 与TRS-H组比。 $n = 12$ 。

* $P < 0.05$ compared with Sham group; # $P < 0.05$ compared with AF group; & $P < 0.05$ compared with TRS-L group; @ $P < 0.05$ compared with TRS-M group; $\Delta P < 0.05$ compared with TRS-H group. $n = 12$.

图3 各组大鼠血清Runx2、BMP-2、ALP、RANKL水平比较

Fig.3 Comparison of serum levels of Runx2, BMP-2, ALP, and RANKL in rats



* $P < 0.05$, 与Sham组比; # $P < 0.05$, 与AF组比; & $P < 0.05$, 与TRS-L组比; @ $P < 0.05$, 与TRS-M组比; $\Delta P < 0.05$, 与TRS-H组比。 $n = 6$ 。

* $P < 0.05$ compared with Sham group; # $P < 0.05$ compared with AF group; & $P < 0.05$ compared with TRS-L group; @ $P < 0.05$ compared with TRS-M group; $\Delta P < 0.05$ compared with TRS-H group. $n = 12$.

图4 各组大鼠踝骨最大载荷、刚度比较

Fig.4 Comparison of maximum load and stiffness of the ankle bones in rats

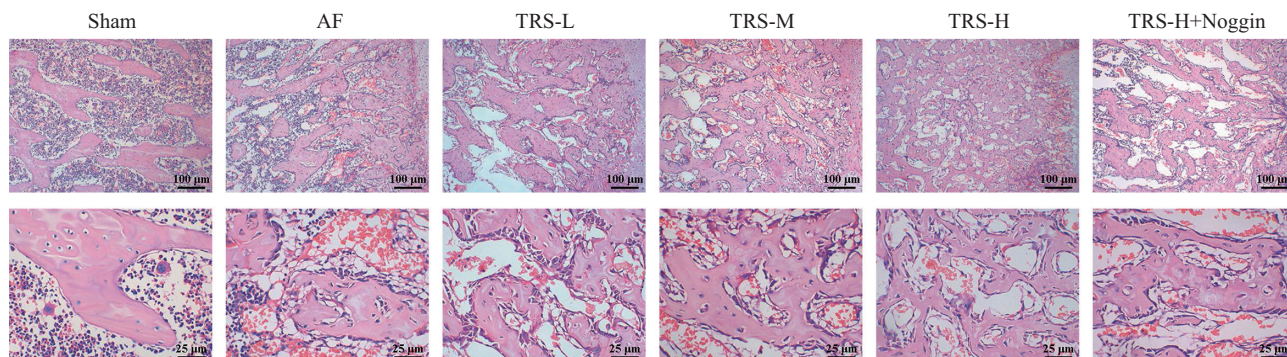


图5 各组大鼠骨痂组织HE染色
Fig.5 HE staining of bone graft tissues in rats

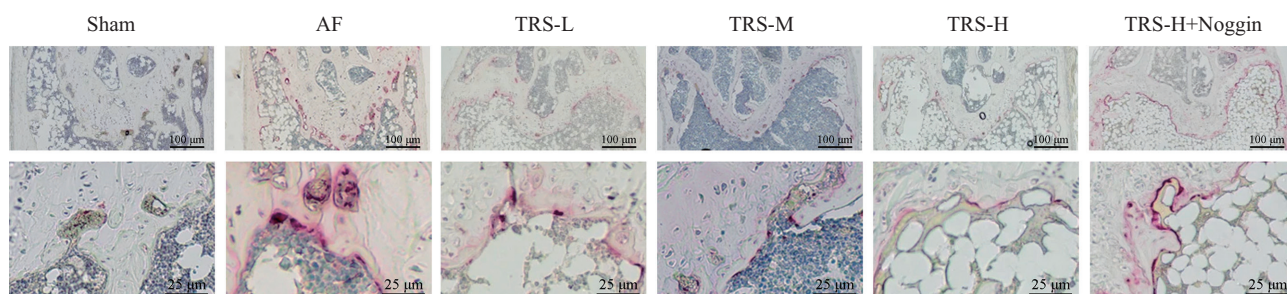
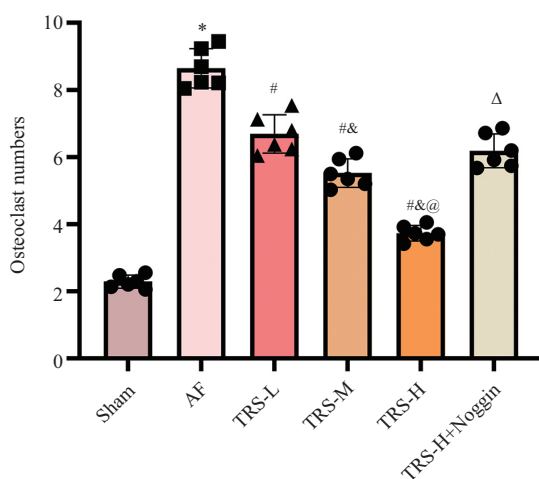


图6 各组大鼠骨痂组织TRAP染色
Fig.6 TRAP staining of bone graft tissues in rats



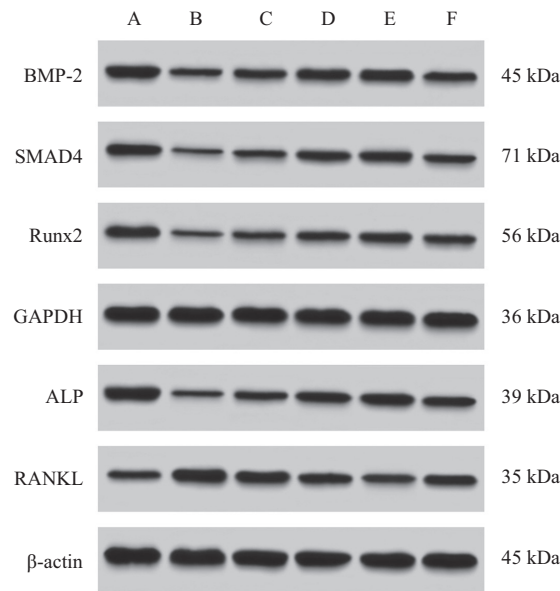
* $P < 0.05$, 与Sham组比; # $P < 0.05$, 与AF组比; & $P < 0.05$, 与TRS-L组比; @ $P < 0.05$, 与TRS-M组比; Δ $P < 0.05$, 与TRS-H组比。 $n = 6$ 。

* $P < 0.05$ compared with Sham group; # $P < 0.05$ compared with AF group; & $P < 0.05$ compared with TRS-L group; @ $P < 0.05$ compared with TRS-M group; Δ $P < 0.05$ compared with TRS-H group. $n = 6$.

图7 各组大鼠骨痂组织破骨细胞数量的比较
Fig.7 Comparison of osteoclast numbers in bone graft tissues of rats

一个破骨-成骨动态平衡的状态, 破骨细胞主导骨吸收, 成骨细胞促进骨形成。由于炎症反应平衡被打破, 破骨细胞活力增强, 骨愈合减慢^[12]。因此, 寻找抑制破骨细胞活性, 增强成骨细胞功能的新型药

物或方法, 对于AF的治疗至关重要。本研究构建AF大鼠模型发现, 与Sham组比, AF组大鼠骨组织损伤较为严重, 骨小梁结构杂乱无序, BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th水平均下降, 且破骨细胞数增多, 这一

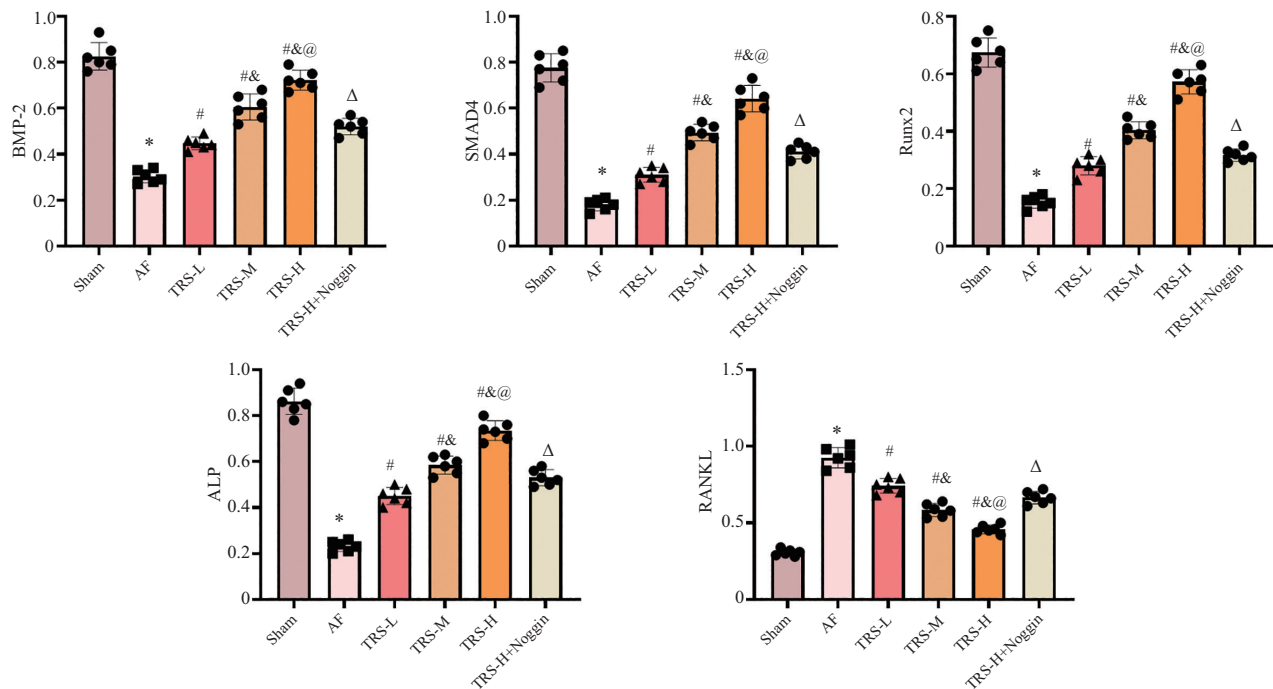


A: Sham组; B: AF组; C: TRS-L组; D: TRS-M组; E: TRS-H组; F: TRS-H+Noggin组。

A: Sham group; B: AF group; C: TRS-L group; D: TRS-M group; E: TRS-H group; F: TRS-H+Noggin group.

图8 Western blot法检测骨痂组织中BMP-2、SMAD4、Runx2、ALP、RANKL蛋白表达情况

Fig.8 Western blot analysis of BMP-2, SMAD4, Runx2, ALP, and RANKL protein expression in bone graft tissues



* $P < 0.05$, 与Sham组比; # $P < 0.05$, 与AF组比; & $P < 0.05$, 与TRS-L组比; @ $P < 0.05$, 与TRS-M组比; Δ $P < 0.05$, 与TRS-H组比。n=6。

* $P < 0.05$ compared with Sham group; # $P < 0.05$ compared with AF group; & $P < 0.05$ compared with TRS-L group; @ $P < 0.05$ compared with TRS-M group; Δ $P < 0.05$ compared with TRS-H group. n=6.

图9 各组大鼠骨痂组织中BMP-2、SMAD4、Runx2、ALP、RANKL蛋白表达水平

Fig.9 Protein expression levels of BMP-2, SMAD4, Runx2, ALP, and RANKL in bone graft tissues of rats

结果与先前研究报道结果一致^[9], 表明AF模型建立成功。

龙牙榧木是常见的中国民间药材, 属五加科榧

木属植物, 龙牙榧木总皂苷是从其中提取的一种皂苷类混合物, 具有丰富的化学活性, 具有活血止痛、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理活性^[13]。有研究表

明, TRS可以通过降低SOCS3、RANKL的水平, 上调Runx2、BMP-2、AKP、STAT3的水平, 抑制破骨细胞骨吸收, 促进成骨细胞骨形成, 改善骨小梁的连接、断裂情况, 从而改善骨质疏松大鼠的骨重建情况, 促进骨愈合^[14]。Runx2是转录因子Runx家族一员, 可以促进成骨细胞增殖和分化^[15]。ALP可以反映成骨细胞分化程度, 其含量越高, 成骨细胞活性越高, 骨形成能力越强。RANKL被证实可以促进核转录因子的释放, 并促进破骨细胞的分化和成熟^[16]。因此, 本研究探讨了不同浓度的TRS对踝骨骨折大鼠骨重建以及破骨细胞形成的影响。与AF组相比, 不同剂量TRS处理组大鼠表现出不同程度的骨折愈合, 且大鼠骨折处BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th水平升高, 这可能与骨伤处组织骨小梁数增多、骨量增加有关; 此外, TRS可以增强骨形成能力和成骨细胞的分化能力, 表现为成骨细胞增殖和分化标志物Runx2和ALP活性的增强; 而RANKL水平的降低可能是骨折组织中破骨细胞活性显著降低的原因。本研究结果与文献中报道的TRS治疗效果一致, 且与TRS剂量有关。基于以上结果, 可以表明TRS可以有效治疗AF大鼠, 促进骨折愈合。

BMP是骨组织中重要的生长因子, BMP蛋白家族包括BMP-2、BMP-4、BMP-7等, 其中BMP-2具有强大的骨再生活性, 能够促进成骨、血管生成、细胞外基质的合成, 共同推动骨再生和骨重建的过程^[17]。SMAD蛋白家族属于细胞内信号转导蛋白, 能够介导骨形态发生蛋白等多种蛋白的信号转导过程, 调节成骨细胞和破骨细胞的功能, 在骨重建过程中扮演关键的角色^[18]。有研究发现, 骨髓间充质干细胞可以增加骨密度, 促进新生血管的生成, 促进小鼠骨形成并调节骨量, 该作用机制可能与激活BMP/SMAD通路有关^[19]。在本研究中, Sham组大鼠骨组织中BMP-2和SMAD4蛋白表达水平显著高于AF组。这一结果提示, 在AF骨折大鼠骨愈合过程中BMP-2和SMAD4活性的升高会促进骨形成过程的进行, 与此前研究相符。使用TRS治疗后, 大鼠骨组织中BMP-2和SMAD4蛋白表达均出现上调, 提示BMP-2/SMAD4通路可能参与TRS治疗AF的过程。有学者通过使用BMP-2特异性抑制剂Noggin联合骨康胶囊干预骨折模型, 研究表明, 骨康胶囊+Noggin组能在一定程度降低ALP水平, 下调Runx2、BMP-2蛋白表达, 降低ALP染色效果, 并抑制成骨细

胞基质矿化的形成^[20]。在本研究中, 对AF大鼠联合使用TRS和Noggin干预后, 结果显示, 大鼠骨组织中BMP-2蛋白水平明显降低, 同时大鼠血清和骨组织中Runx2、ALP水平显著降低, RANKL水平显著升高, 股骨的BMD水平显著降低, 骨痂组织病变加重, 骨最大载荷和刚度显著降低, 骨痂组织中破骨细胞数量显著增多。以上结果提示TRS能够激活BMP-2通路, 进而调控体内骨重建相关因子的表达, 改善AF的病理情况, 加速骨折愈合的进程, 因而使用BMP-2抑制剂后, TRS对AF的治疗效果降低。

综上所述, TRS能够通过激活BMP-2/SMAD4信号通路, 促进骨重建并抑制破骨细胞的形成。然而, 本次验证具有局限性, 如TRS如何激活BMP-2/SMAD4信号通路、BMP-2下游靶基因是否参与TRS的作用等尚不明确, 因此后续将优化实验方案进一步探讨。

4 小结与展望

本研究分别通过ELISA、Micro-CT、HE染色、TRAP染色及Western blot等方法, 发现TRS可升高大鼠Runx2、BMP-2、ALP、SMAD4表达水平及BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th水平, 降低RANKL表达水平、减少破骨细胞数量, 并减轻骨痂组织病理损伤, 证实TRS可通过激活BMP-2/SMAD4信号通路促进AF大鼠骨重建, 抑制破骨细胞形成, 为AF临床治疗提供潜在策略。

虽本研究已证实TRS可激活BMP-2/SMAD4信号通路, 但关于该通路上下游调控因子变化如何, TRS是否联合影响旁信号通路共同发挥骨重建作用, TRS侧重影响破骨细胞还是成骨细胞, 以上问题均有待后续设计相关实验进一步探讨, 以推动临床转化。

参考文献 (References)

- [1] 马智佳, 韩松, 王青华, 等. 正骨手法保守治疗旋后外旋型III度和IV度踝关节骨折的临床研究[J]. 中国骨伤(MA Z J, HAN S, WANG Q H, et al. Clinical study on the conservative treatment of pronation and supination type III and IV ankle fractures with osteopathic manual therapy [J]. Chin J Orthop, 2023, 36(8): 737-43.
- [2] POGLIACOMI F, DE FILIPPO M, CASALINI D, et al. Acute syndesmotic injuries in ankle fractures: from diagnosis to treatment and current concepts [J]. World J Orthop, 2021, 12(5): 270-91.
- [3] MAIA S, FALCÃO D, SILVA J, et al. The clinical impact of

- rockall and glasgow-blatchford scores in nonvariceal upper gastrointestinal bleeding [J]. *GE Port J Gastroenterol*, 2021, 28(4): 243-52.
- [4] 周云洁, 常红波, 王新洲. 龙牙榧木总皂苷通过调控AMPK/Nrf2信号抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞铁死亡[J]. *中药材*(ZHOU Y J, CHANG H B, WANG X Z. Total saponins of longya, *Torreya grandis* inhibit hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte ferroptosis via regulation of the AMPK/Nrf2 pathway [J]. *J Tradit Chinese Med*), 2023, 46(12): 3091-6.
- [5] 沈磊, 董林, 贺福义, 等. 三七总皂苷调节RAGE/MAPK/NF- κ B信号通路对糖尿病骨质疏松大鼠骨密度及骨代谢的影响[J]. *中国老年学杂志*(SHEN L, DONG L, HE F Y, et al. Total saponins of *Panax notoginseng* modulate RAGE/MAPK/NF- κ B pathway to influence bone density and metabolism in diabetic osteoporotic rats [J]. *Age Ageing*), 2024, 44(23): 5768-72.
- [6] NOVAK S, MADUNIC J, SHUM L, et al. PDGF inhibits BMP-2-induced bone healing [J]. *NPJ Regen Med*, 2023, 8(1): 3.
- [7] WANG Z, SUN J, LI Y, et al. Experimental study of the synergistic effect and network regulation mechanisms of an applied combination of BMP-2, VEGF, and TGF- β 1 on osteogenic differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(3): 2394-405.
- [8] KIM JH, KIM M, HONG S, et al. Albiflorin promotes osteoblast differentiation and healing of rat femoral fractures through enhancing BMP-2/Smad and Wnt/ β -Catenin signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 690113.
- [9] 李松, 杨滕尧, 彭茜. 踝关节骨折术后创伤性关节炎发生的影响因素及风险预测模型的构建[J]. *中国骨伤*(LI S, YANG Q Y, PENG Q. Factors influencing post-operative traumatic arthritis after ankle fracture and construction of a risk prediction model [J]. *Chin J Orthop*), 2024, 37(3): 264-70.
- [10] CHIEN S Y, TSAI C H, LIU S C, et al. Noggin inhibits IL-1 β and BMP-2 expression, and attenuates cartilage degeneration and subchondral bone destruction in experimental osteoarthritis [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 927.
- [11] BOURASSA V, DEAMOND H, YOUSEFPOUR N, et al. Pain-related behavior is associated with increased joint innervation, ipsilateral dorsal horn gliosis, and dorsal root ganglia activating transcription factor 3 expression in a rat ankle joint model of osteoarthritis [J]. *Pain Rep*, 2020, 5(5): e846.
- [12] XIAO D, ZHOU Q, BAI Y, et al. Deficiency of PDK1 in osteoclasts delays fracture healing and repair [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2): 1536-46.
- [13] WANG R, WANG M, ZHOU J, et al. Saponins in chinese herbal medicine exerts protection in myocardial ischemia-reperfusion injury: possible mechanism and target analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 570867.
- [14] 余昌明, 刘奎. 龙牙榧木皂苷IV调控SOCS3/STAT3通路对骨质疏松大鼠骨重建的影响[J]. *中国药师*(YU C M, LIU K. Effects of total saponin IV from *Torreya grandis* on bone reconstruction in osteoporotic rats via regulation of SOCS3/STAT3 pathway [J]. *Chin J Pharm*), 2021, 24(11): 1993-7.
- [15] CHOU L Y, CHEN C H, CHUANG S C, et al. Discoidin domain receptor 1 regulates runx2 during osteogenesis of osteoblasts and promotes bone ossification via phosphorylation of p38 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7210.
- [16] HONMA M, IKEBUCHI Y, SUZUKI H. Mechanisms of RANKL delivery to the osteoclast precursor cell surface [J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1): 27-33.
- [17] HAN L, LIU H, FU H, et al. Exosome-delivered BMP-2 and polyaspartic acid promotes tendon bone healing in rotator cuff tear via Smad/RUNX2 signaling pathway [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 1459-75.
- [18] OMI M, KONERU T, LYU Y, et al. Increased BMP-Smad signaling does not affect net bone mass in long bones [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1145763.
- [19] XUE Y, HU S, CHEN C, et al. Myokine Irisin promotes osteogenesis by activating BMP/SMAD signaling via α V integrin and regulates bone mass in mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(2): 572-84.
- [20] MA X, YANG J, LIU T, et al. Gukang capsule promotes fracture healing by activating BMP/SMAD and Wnt/ β -catenin signaling pathways [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 7184502.