

大黄蒽醌对大鼠糖皮质激素性股骨头坏死的保护作用

朱觉新¹, 黄连芳^{2*} (广东医科大学 1. 广东天然药物研究与开发重点实验室; 2. 广东湛江海洋医药研究院, 广东湛江 524023)

摘要: **目的** 观察大黄蒽醌对大鼠糖皮质激素性股骨头坏死的保护作用。**方法** 162只SD雌性大鼠随机分为正常组、模型组、实验组,分别给予生理盐水、醋酸泼尼松(3.5 mg/kg)、大黄蒽醌(70 mg/kg) + 醋酸泼尼松(3.5 mg/kg)灌胃13周。每组在3、5、7、9、11、13周处死9只大鼠,进行股骨头Micro CT扫描及重建、骨形态计量学分析。**结果** Micro-CT重建显示在3周时3组骨小梁结构近乎相似;13周时,模型组骨小梁结构遭到严重破坏,全骨结构特性破坏,实验组接近于正常组。与正常组比较,模型组与实验组在3、5、7、9、11周骨小梁骨密度(Tb.BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)水平下降,结构模型指数(SMI)、骨小梁分离度(Tb.Sp)升高,且模型组更为显著($P < 0.01$ 或 0.05);13周时,实验组Tb.BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N水平高于模型组,SMI、Tb.Sp水平低于模型组($P < 0.01$)。**结论** 大黄蒽醌对大鼠糖皮质激素性股骨头坏死有预防作用。

关键词: 大黄蒽醌; 激素性股骨头坏死; 大鼠

中图分类号: R 816.8; R 212.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3610 (2023) 05-0515-03

Protective effect of rhubarb anthraquinone on steroid induced avascular necrosis of femoral head

ZHU Jue-xin¹, HUANG Lian-fang^{2*} (Guangdong Medical University 1. Guangdong Key Laboratory of Natural Drug Research and Development; 2. Guangdong Zhanjiang Institute of Marine Medicine, Zhanjiang, 524023, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of rhubarb anthraquinone (RA) on steroid induced avascular necrosis of femoral head (SANFH). **Methods** A total of 162 female SD rats were randomly divided into normal, model and experimental groups, each receiving normal saline, prednisone acetate (3.5 mg/kg) or RA (70 mg/kg) + prednisone acetate (3.5 mg/kg) for 13 weeks. At 3, 5, 7, 9, 11 and 13 weeks, 9 rats in each group were sacrificed for Micro CT scanning and reconstruction of the femoral head and morphometry analysis of the femur. **Results** Micro-CT reconstruction showed that the trabecular structure was nearly similar among 3 groups at 3 weeks. At 13 weeks, the trabecular structure was severely damaged with whole bone destruction in model group, and comparable between experimental and normal groups. At 3, 5, 7, 9, and 11 weeks, trabecular bone mineral density (Tb.BMD), bone volume/total volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), and trabecular number (Tb.N) were decreased, while structural model index (SMI) and trabecular separation (Tb.Sp) increased ($P < 0.01$ or 0.05) in model and experimental groups compared with normal group, especially in model group. At 13 weeks, Tb.BMD, BV/TV, Tb.Th and Tb.N were higher, while SMI and Tb.Sp were lower in experimental group compared with model group ($P < 0.01$). **Conclusion** RA can prevent SANFH in rats.

Key words: rhubarb anthraquinone; steroid induced avascular necrosis of femoral head; rat

随着临床上糖皮质激素的广泛应用,激素性股骨头坏死(SANFH)人发病率逐年上升,目前已超过了外伤所致的股骨头坏死的发病率^[1]。股骨头内微结构的改变是SANFH发病的一个必不可少的病理特征,也可作为SANFH早期发展的一个很重要的指标和依据^[2]。

大黄蒽醌来源于掌叶大黄,其生物活性与大黄原药相同^[3-5]。本实验采用大黄蒽醌给药,观察不同给药周期大黄蒽醌对大鼠激素性股骨头坏死大鼠的预防作用,为SANFH动物模型的建立及大黄蒽醌在激素性股骨头防治提供依据。

收稿日期: 2022-07-28

基金项目: 广东省科技计划项目(2019B090905011), 广东医科大学科研基金项目(GDMUM2020042), 湛江市科技攻关项目(2022B01119)

作者简介: 朱觉新(1982-),女,本科,实验师, E-mail:424323288@qq.com

通信作者: 黄连芳(1963-),女,本科,高级实验师, E-mail:273620993@qq.com

1 对象和方法

1.1 研究对象

选择2019年12月-2022年1月由广东医科大学动物实验室提供的162只SD级雌性大鼠,体质量(280.0±30.0)g,随机分为正常组、模型组与实验组,每组54只。其中实验组给予大黄萘醌(由西安锐禾生物工程技术有限公司提供,纯度为98%)+醋酸泼尼松,模型组给予等容生理盐水+醋酸泼尼松,正常组给予等容生理盐水作为对照。

1.2 给药方式

实验组:上午灌胃大黄萘醌(70 mg/kg),下午灌胃醋酸泼尼松(3.5 mg/kg),液体均按0.1 mL/100 g灌胃给药。模型组:上午灌胃等容生理盐水(0.3 mL),下午灌胃醋酸泼尼松(3.5 mg/kg),液体均按0.1 mL/100 g灌胃给药。正常组:上午灌胃等容生理盐水(0.3 mL),下午无灌胃操作。每周称体质量1次,并按体质量变化调整给药量,连续给药13周。

1.3 饲养条件

饲养室内温度保持24~28℃,湿度在50%~60%。分笼专室饲养,每笼两只,自由摄食饮水,专人负责,每周称体质量1次。

1.4 取材

在相应时间点,实验组大鼠先给予3%戊巴比妥钠进行全身麻醉后心脏抽血至尽处死,采集四肢骨,用生理盐水纱布包裹后再覆锡纸包裹、标记,置-20℃贮藏,备用。

1.5 CT显影及重建

采用Viva Micro CT40(瑞士,SCANCO Medical AG公司)对大鼠骨远端进行扫描,扫描分辨率10 μm,能量值选择70 kV,1200 HA,重建灰度阈值选择447,Gauss Sigma不变。小梁重建时灰度阈值在300以下。

1.6 骨形态计量学分析

CT扫描后取同侧股骨不脱钙骨包埋,并经Leica 2155硬组织切片机分别切成5 μm和10 μm的骨片。薄片Goldner染色后测量和观察骨小梁结构、破骨细胞、成骨细胞和脂肪细胞。厚片直接封片后经荧光显微镜观察荧光形成情况,骨组织形态计量学软件测量骨代谢相关指标:骨小梁骨密度(BMD)、骨体积(BV)、总体积(TV)、相对骨体积或骨体积分数(BV/TV)、结构模型指数(SMI)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.Sp)、骨小梁数量(Tb.N)。

1.7 统计学处理

应用python 3.9.1+pycharm64 2021.2.2,加载scipy

科学计算数据包,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,选用 t 检验、秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Micro-CT三维数字模型重建图

3周时3组大鼠的骨小梁结构相似,见图1。第13周时,模型组的骨小梁结构遭到严重破坏,全骨结构特性破坏,而实验组又接近于正常组,见图2。

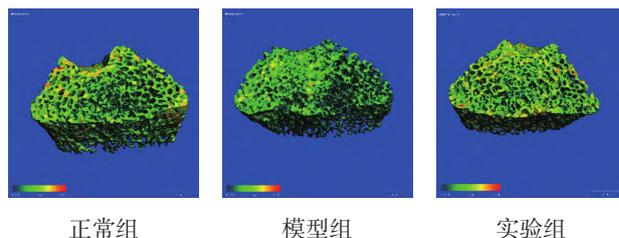


图1 3周时股骨头骨小梁结构Micro-CT三维数字模型重建图

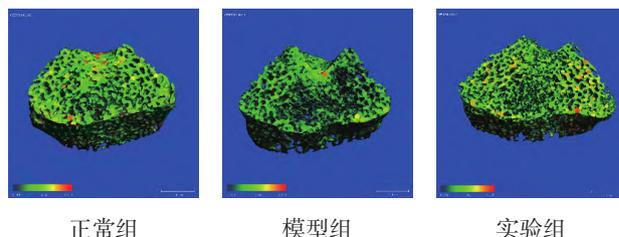


图2 13周时股骨头骨小梁结构Micro-CT三维数字模型重建图

2.2 Tb.BMD、BV/TV、SMI、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp各项指标情况

与正常组比较,模型组与实验组第3、5、7、9、11周的Tb.BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N水平下降,SMI、Tb.Sp升高,模型组更为显著($P<0.05$ 或 0.01)。第13周实验组的Tb.BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N水平高于模型组($P<0.01$),SMI、Tb.Sp水平低于模型组($P<0.01$),见表1。

3 讨论

SANFH预后差、致残率高,迄今发病机制尚未完全明确^[6]。本实验通过建立激素性股骨头坏死大鼠模型,通过大黄萘醌干预SANFH进展,发现第3周时实验组大鼠的SMI与正常组比较均 $P<0.05$ 或 0.01 ;从表1可见,3周时模型组的Tb.BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N较正常组和实验组均明显下降,SMI、Tb.Sp则较正常组和实验组明显升高;第13周时实验组的Tb.BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N水平高于模型组($P<0.01$),SMI、Tb.Sp水平低于模型组($P<0.01$)。本研究结果表明造模成功,而且大黄萘醌在实验初期即

表1 3组各周期Tb.BMD、BV/TV、SMI、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp的比较

($\bar{x} \pm s, n=9$)

时间	组别	Tb.BMD/(g/cm ³)	BV/TV/%	SMI	Tb.Th/ μ m	Tb.N/(no./mm)	Tb.Sp/ μ m
3周	正常组	0.507±0.033	26.671±1.568	1.142±0.060	0.112±0.007	2.476±0.154	0.316±0.019
	模型组	0.408±0.021 ^a	22.200±1.233 ^a	1.440±0.096 ^a	0.092±0.006 ^a	2.029±0.106 ^a	0.384±0.024 ^a
	实验组	0.457±0.020 ^{ab}	24.019±1.601 ^{ab}	1.219±0.064 ^{ab}	0.090±0.004 ^a	2.248±0.132 ^{ab}	0.349±0.018 ^{ac}
5周	正常组	0.506±0.031	27.165±1.697	1.159±0.077	0.114±0.006	2.443±0.143	0.317±0.021
	模型组	0.339±0.021 ^a	18.983±1.116 ^a	1.561±0.104 ^a	0.084±0.005 ^a	1.728±0.115 ^a	0.445±0.024 ^a
	实验组	0.387±0.025 ^{ab}	21.831±1.364 ^{ab}	1.373±0.085 ^{ab}	0.094±0.006 ^{ab}	2.016±0.134 ^{ab}	0.369±0.024 ^{ab}
7周	正常组	0.502±0.031	27.509±1.719	1.189±0.069	0.112±0.007	2.472±0.137	0.319±0.018
	模型组	0.226±0.013 ^a	14.210±0.747 ^a	1.934±0.101 ^a	0.048±0.002 ^a	1.235±0.065 ^a	0.547±0.032 ^a
	实验组	0.287±0.016 ^{ab}	16.001±0.888 ^{ab}	1.514±0.100 ^{ab}	0.066±0.003 ^{ab}	1.564±0.092 ^{ab}	0.425±0.022 ^{ab}
9周	正常组	0.502±0.029	27.141±1.809	1.125±0.075	0.120±0.006	2.496±0.156	0.308±0.018
	模型组	0.241±0.014 ^a	13.727±0.857 ^a	2.018±0.134 ^a	0.053±0.002 ^a	1.278±0.067 ^a	0.537±0.028 ^a
	实验组	0.309±0.019 ^{ab}	17.735±0.933 ^{ab}	1.539±0.096 ^{ab}	0.071±0.003 ^{ab}	1.634±0.102 ^{ab}	0.406±0.022 ^{ab}
11周	正常组	0.493±0.030	27.091±1.425	1.102±0.061	0.116±0.007	2.484±0.130	0.315±0.019
	模型组	0.250±0.013 ^a	14.180±0.886 ^a	2.018±0.112 ^a	0.053±0.002 ^a	1.319±0.069 ^a	0.546±0.030 ^a
	实验组	0.378±0.025 ^{ab}	21.345±1.334 ^{ab}	1.341±0.078 ^{ab}	0.078±0.005 ^{ab}	1.910±0.100 ^{ab}	0.382±0.021 ^{ab}
13周	正常组	0.493±0.025	26.625±1.775	1.126±0.066	0.121±0.008	2.511±0.132	0.310±0.020
	模型组	0.301±0.016 ^a	13.775±0.810 ^a	1.961±0.122 ^a	0.062±0.003 ^a	1.327±0.082 ^a	0.517±0.032 ^a
	实验组	0.500±0.033 ^b	27.347±1.519 ^b	1.182±0.073 ^b	0.119±0.007 ^b	2.455±0.153 ^b	0.306±0.017 ^b

与正常组比较: ^a $P<0.01$; 与模型组比较: ^b $P<0.01$, ^c $P<0.05$

起到一定的干预作用。在实验周期的进展中,第7~9周为激素性股骨头坏死模型的平衡区,模型组和实验组的Tb.BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N均处于最低谷,而SMI、Tb.Sp则处于峰值,说明该模型在此周期前处于各项指标快速下降状态,到这个周期后各项指标将会变得平稳。第11~13周则各项指标稍微往好的方向发展,其中实验组恢复最快,13周时实验组各指标均恢复到正常水平,说明大黄蒽醌对激素性股骨头坏死有显著的预防治疗作用。

在Micro-CT三维数字模型重建图可见第3周时实验组和正常组基本一致,而模型组较差,13周时实验组和正常组依旧效果接近,而模型组的骨小梁则破坏严重,表明大黄蒽醌对激素性股骨头坏死有显著的预防治疗作用。

综上,本研究通过大黄蒽醌干预激素性股骨头坏死模型大鼠发现,该模型是可以重现激素性股骨头坏死,在模型开始8周时间内骨小梁结构遭到严重破坏,全骨结构特性破坏,大黄蒽醌对于糖皮质激素性股骨头坏死有显著的预防治疗作用。

参考文献:

- [1] MARUYAMA M, MOEINZADEH S, GUZMAN R A, et al. The efficacy of lapine preconditioned or genetically modified IL4 over-expressing bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in corticosteroid-associated osteonecrosis of the femoral head in rabbits[J]. *Biomaterials*, 2021, 275: 120972.
- [2] PARK I S, MAHAPATRA C, PARK J S, et al. Revascularization and limb salvage following critical limb ischemia by nanoceria-induced Ref-1/APE1-dependent angiogenesis[J]. *Biomaterials*, 2020, 242: 119919.
- [3] 陈祎凡, 皮佩仙, 李继蕾, 等. 大黄蒽醌类有效成分抗肿瘤作用研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(11): 3587-3595.
- [4] 陈其艳, 傅超美, 罗锐锋, 等. 大黄及其蒽醌对自身免疫性疾病治疗的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(1): 9.
- [5] 张宇航, 徐佳元, 曹丹, 等. 肠道微生物菌群对大黄蒽醌类化合物代谢研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(10): 203-211.
- [6] 刘璞, 尹佳萌, 张鑫, 等. 大黄蒽醌类化合物对HepG2细胞内胰岛素信号通路的激活及其机制[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2022, 21(10): 9.