

# 骨碎补总黄酮 对骨质疏松模型大鼠磷酸钙骨水泥强化椎体骨质量 和生物力学性能的影响及作用机制研究

张鑫, 马朋朋, 刘肃, 李伟, 张麦粒, 赵立春, 张春玲

(河北北方学院附属第一医院, 河北 张家口 075061)

**摘要** 目的: 观察骨碎补总黄酮对骨质疏松模型大鼠磷酸钙骨水泥强化椎体骨质量和生物力学性能的影响, 并探讨其可能的作用机制。方法: 将 60 只 12 周龄雌性 SD 大鼠随机分为 4 组。模型组(10 只)、空白组(20 只)、骨碎补总黄酮组(20 只)大鼠均采用切除双侧卵巢的方法进行骨质疏松造模, 假手术组(10 只)大鼠仅从双侧卵巢附近切除少量脂肪组织。造模手术后 4 周, 处死假手术组和模型组大鼠, 采用双能 X 线吸收法测量第 4 腰椎骨密度, 验证造模是否成功。确认造模成功后, 空白组和骨碎补总黄酮组进行第 4 腰椎磷酸钙骨水泥椎体强化; 术后第 1 天开始骨碎补总黄酮组以 2 mL 骨碎补总黄酮溶液(骨碎补总黄酮用量为  $0.22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )灌胃, 空白组以等量蒸馏水灌胃, 药物干预每天 1 次, 连续干预 8 周。药物干预结束后, 处死空白组和骨碎补总黄酮组大鼠, 取经磷酸钙骨水泥强化的第 4 腰椎, 采用双能 X 线吸收法测定骨密度; 采用显微 CT 检测骨微结构, 测定骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁数量(trabecular number, Tb. N); 采用压缩实验进行生物力学性能检测, 测定椎体最大负荷和刚度; 采用实时荧光定量 PCR 技术检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)等骨形成标志基因的 mRNA 表达水平; 采用 Western Blot 技术检测 ALP、OCN、OPN 等骨形成标志基因, 以及 Wnt1、Wnt3a、 $\beta$  联蛋白等 Wnt 信号通路相关基因的蛋白表达水平。结果: ①造模结果。模型组第 4 腰椎骨密度低于假手术组( $t = 11.311, P = 0.000$ )。②强化椎体的骨密度及骨微结构检测结果。骨碎补总黄酮组强化椎体的骨密度、BV/TV、Tb. Th、Tb. N 均高于空白组( $t = 3.328, P = 0.004; t = 3.795, P = 0.001; t = 2.340, P = 0.031; t = 2.256, P = 0.037$ )。③强化椎体的生物力学性能检测结果。骨碎补总黄酮组强化椎体的最大负荷和刚度均大于空白组( $t = 3.689, P = 0.002; t = 2.335, P = 0.031$ )。④强化椎体组织中骨形成标志基因的 mRNA 和蛋白表达水平检测结果。骨碎补总黄酮组强化椎体组织中 ALP、OCN、OPN 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于空白组(mRNA:  $t = 9.738, P = 0.000; t = 7.576, P = 0.000; t = 9.880, P = 0.000$ ; 蛋白:  $t = 10.923, P = 0.000; t = 17.896, P = 0.000; t = 16.751, P = 0.000$ )。⑤强化椎体组织中 Wnt 信号通路相关基因的蛋白表达水平检测结果。骨碎补总黄酮组强化椎体组织总蛋白中 Wnt1、Wnt3a 蛋白表达水平, 以及核蛋白中  $\beta$  联蛋白的蛋白表达水平均高于空白组( $t = 13.252, P = 0.000; t = 13.379, P = 0.000; t = 9.765, P = 0.000$ ); 2 组强化椎体组织总蛋白中  $\beta$  联蛋白的蛋白表达水平的差异无统计学意义。结论: 骨碎补总黄酮可改善骨质疏松模型大鼠磷酸钙骨水泥强化椎体的骨质量和生物力学性能, 其机制可能是通过激活 Wnt 信号通路, 促进  $\beta$  联蛋白进入细胞核, 增加 ALP、OCN、OPN 表达, 从而促进成骨分化。

**关键词** 骨质疏松; 骨碎补; 生物黄酮类; 椎体成形术; 骨粘合剂; Wnt 信号通路;  $\beta$  连环蛋白; 大鼠, Sprague-Dawley; 动物实验

## Effects and mechanism of total flavonoids of rhizoma drynariae on bone quality and biomechanical properties of calcium phosphate cement-augmented vertebrae in osteoporotic model rats: an experimental study

ZHANG Xin, MA Pengpeng, LIU Su, LI Wei, ZHANG Maili, ZHAO Lichun, ZHANG Chunling

The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075061, Hebei, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of total flavonoids of rhizoma drynariae (TFRD) on bone quality and biomechanical properties of calcium phosphate cement (CPC)-augmented vertebrae in osteoporotic (OP) model rats, and to explore its underlying

基金项目: 2022 年度河北省医学科学研究课题(20220612)

通讯作者: 张春玲 E-mail: 2548002626@qq.com

mechanism. **Methods:** Sixty 12-week-old female SD rats were randomly assigned into model group (10 ones), blank group (20 ones), TFRD group (20 ones), and sham-operated group (10 ones). All rats but the ones in sham-operated group were treated by bilateral ovariectomy for inducing OP model, while the ones in sham-operated group merely underwent removal of peri-ovarian adipose tissues, with ovaries retained. Four weeks after the modeling surgery, the rats in sham-operated group and model group were sacrificed, and the L<sub>4</sub> lumbar vertebra was dissected for measuring the bone mineral density (BMD) via dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) to evaluate whether the OP models were built successfully. After successful modeling, the rats in blank group and TFRD group were subjected to CPC augmentation at the L<sub>4</sub> lumbar vertebra. From the postoperative day 1, the rats in TFRD group were intervened by intragastric administration with 2 mL TFRD solution (TFRD dosage: 0.22 g/kg), while the ones in blank group with the same dose of distilled water, once a day for consecutive 8 weeks. After the end of drug intervention, the rats in blank group and TFRD group were executed, and the CPC-augmented L<sub>4</sub> lumbar vertebra were harvested to measure the BMD via DEXA, meanwhile, the bone microstructure was assessed, and the bone volume/tissue volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), as well as trabecular number (Tb. N) were detected by micro-CT. Moreover, the biomechanical properties were tested by compression testing to determine the maximum load and stiffness of the CPC-augmented L<sub>4</sub> lumbar vertebra. Furthermore, the mRNA expression levels of bone formation marker genes, including alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN), and osteopontin (OPN) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR technology, and the protein expression levels of bone formation marker genes such as ALP, OCN, and OPN, as well as Wnt signaling pathway-related genes such as Wnt1, Wnt3a, and  $\beta$ -catenin, were detected by Western Blot. **Results:** ① Modeling results. The BMD of the L<sub>4</sub> lumbar vertebra was lower in model group compared to sham-operated group ( $t = 11.311, P = 0.000$ ). ② BMD and bone microstructure of the augmented vertebra. The BMD, BV/TV, Tb. Th, and Tb. N of the augmented L<sub>4</sub> lumbar vertebra were all higher in TFRD group compared to blank group ( $t = 3.328, P = 0.004; t = 3.795, P = 0.001; t = 2.340, P = 0.031; t = 2.256, P = 0.037$ ). ③ Biomechanical properties of the augmented vertebra. The maximum load and stiffness of the augmented L<sub>4</sub> lumbar vertebra were greater in TFRD group compared to blank group ( $t = 3.689, P = 0.002; t = 2.335, P = 0.031$ ). ④ The mRNA and protein expression levels of bone formation marker genes in the augmented vertebra tissues. The mRNA and protein expression levels of ALP, OCN, and OPN in the augmented L<sub>4</sub> vertebra tissues were all higher in TFRD group compared to blank group (mRNA:  $t = 9.738, P = 0.000; t = 7.576, P = 0.000; t = 9.880, P = 0.000$ ; protein:  $t = 10.923, P = 0.000; t = 17.896, P = 0.000; t = 16.751, P = 0.000$ ). ⑤ The protein expression levels of Wnt signaling pathway-related genes in the augmented vertebra tissues. The protein expression levels of Wnt1 and Wnt3a in the total protein extracts, as well as that of  $\beta$ -catenin in the nuclear protein extracts of the augmented L<sub>4</sub> vertebra tissues, were all higher in TFRD group compared to blank group ( $t = 13.252, P = 0.000; t = 13.379, P = 0.000; t = 9.765, P = 0.000$ ); while the comparison of the protein expression level of  $\beta$ -catenin in the total protein extracts between the 2 groups revealed no significant differences. **Conclusion:** TFRD can improve the bone quality and biomechanical properties of CPC-augmented vertebrae in OP model rats. It may work by stimulating osteoblastic differentiation through activating the Wnt signaling pathway, promoting nuclear translocation of  $\beta$ -catenin, and up-regulating the expression of ALP, OCN, and OPN.

**Keywords** osteoporosis; drynariae rhizoma; bioflavonoids; vertebroplasty; bone cements; Wnt signaling pathway; beta catenin; rats, Sprague-Dawley; animal experimentation

椎体强化术是目前治疗骨质疏松性椎体压缩骨折的主要手术方式,术中常用的磷酸钙骨水泥具有生物相容性好、固化过程中不产生高温等优势,但该材料也存在硬度偏低的问题<sup>[1-2]</sup>。骨水泥强化椎体的抗压性能与椎体的骨质量及生物力学性能有关。中药骨碎补具有补肾强骨、续筋接骨的功效,其活性成分骨碎补总黄酮能够在离体细胞中促进成骨分化,并能促进骨缺损大鼠骨矿化和骨重建<sup>[3-4]</sup>。为探讨骨碎补总黄酮对骨质疏松模型大鼠磷酸钙骨水泥强化椎体骨质量和生物力学性能的影响及作用机制,我们进行了此项研究,现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

12 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 60 只,体质量 230 ~ 280 g,购自上海杰思捷实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2023-0004。实验在河北北方学院实验动物中心进行,实验动物使用许可证号:SYXK(冀)2019-004。实验室温度 20 ℃、相对湿度 45% ~ 55%、明暗交替(12 h/12 h),动物自由摄食饮水。实验方案经河北北方学院附属第一医院医学伦理委员会审查通过,伦理批件号:HB-NU202206081037。

## 1.2 实验主要药物与试剂

强骨胶囊(国药准字 Z20030007,北京岐黄医药股份有限公司),成分为骨碎补总黄酮,每粒含骨碎补总黄酮 0.142 g。快速细胞/组织总 RNA 提取试剂盒(货号:19221ES50)、Hifair<sup>®</sup> AdvanceFast 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(货号:11156ES10)、Hieff<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix(No Rox)(货号:11201ES03),购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;抗碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)抗体(货号:ab307726)、抗骨桥蛋白(osteopontin, OPN)抗体(货号:ab218237)、抗 Wnt1 抗体(货号:ab15251)、抗 Wnt3a 抗体(货号:ab219412)、抗  $\beta$  联蛋白抗体(货号:ab184919)、抗  $\beta$  肌动蛋白抗体(货号:ab32575)、抗  $\beta$  微管蛋白抗体(货号:ab78078)、山羊抗兔 IgG(货号:ab6721),均购自 Abcam 公司;抗骨钙素(osteocalcin, OCN)抗体(货号:23418-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司)。

## 1.3 实验主要仪器

MUSE 小动物双能 X 线骨密度检测仪(上海然哲仪器设备有限公司),专业小动物活体显微 CT[平生医疗科技(昆山)有限公司],E10000 型万能材料力学试验机(Instron 公司),MA-3200 实时荧光定量 PCR 仪(苏州雅睿生物技术股份有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组及造模

将 60 只大鼠按体质量排序编号,并从随机数字表中连续抄录 60 个随机数字,对应每 1 只大鼠的编号。再将 60 个随机数字从小到大排序,将随机数字排序 1~10、11~20、21~40、41~60 对应的大鼠依次纳入假手术组、模型组、空白组及骨碎补总黄酮组。模型组、空白组、骨碎补总黄酮组大鼠均采用切除双侧卵巢的方法进行骨质疏松造模,假手术组大鼠仅从双侧卵巢附近切除少量脂肪组织。造模手术后 4 周,用断头法处死假手术组和模型组大鼠,解剖第 4 腰椎,采用双能 X 线吸收法测量骨密度,验证造模是否成功。

### 2.2 椎体强化及药物干预

确认造模成功后,空白组和骨碎补总黄酮组进行第 4 腰椎磷酸钙骨水泥椎体强化,方法如下:在两侧髂后上棘连线与后正中线的交点处做长约 2 cm 的纵

切口,分离皮下组织和肌肉,显露第 4 腰椎,用直径 3 mm 的钻头垂直打孔,深度 5 mm,注入磷酸钙骨水泥 0.1 mL,缝合切口。磷酸钙骨水泥椎体强化术后第 1 天开始进行药物干预。根据文献<sup>[4]</sup>研究结果,骨碎补总黄酮组以 2 mL 骨碎补总黄酮溶液(骨碎补总黄酮用量为  $0.22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )灌胃,空白组以等量蒸馏水灌胃,药物干预每天 1 次,连续干预 8 周。

### 2.3 实验指标检测

药物干预结束后,用断头法处死空白组和骨碎补总黄酮组大鼠,解剖得到经磷酸钙骨水泥强化的第 4 腰椎,先从每组各取 10 个椎体立即进行骨密度、骨微结构及生物力学性能检测,另外 10 个椎体在液氮中快速冷冻 1 h 后在  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存,用于相关基因的 mRNA 和蛋白表达水平检测。

**2.3.1 强化椎体骨密度及骨微结构检测** 选用小动物双能 X 线骨密度检测仪进行强化椎体骨密度检测,设置扫描参数为:宽度 20 mm、速度  $7 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。选用小动物显微 CT 进行强化椎体骨微结构检测,设置分辨率为  $15 \text{ }\mu\text{m}$ ;得到扫描图像后,测量骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁量数量(trabecular number, Tb. N)。

**2.3.2 强化椎体生物力学性能检测** 骨密度和骨微结构检测结束后,去除强化椎体的附件和两端的椎间盘,并对椎体两端进行打磨后,采用万能材料力学试验机进行压缩实验,测定椎体的最大负荷和刚度。

**2.3.3 强化椎体组织中骨形成标志基因的 mRNA 表达水平检测** 采用实时荧光定量 PCR 技术检测强化椎体组织中 ALP、OCN、OPN 的 mRNA 表达水平。以  $\beta$  肌动蛋白为内参基因,运用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相关基因 mRNA 相对表达量,引物信息见表 1。

**2.3.4 强化椎体组织中骨形成标志基因及 Wnt 信号通路相关基因的蛋白表达水平检测** 采用 Western Blot 技术,以  $\beta$  肌动蛋白为内参蛋白,通过 ImageJ 软件测定蛋白条带的灰度值,计算强化椎体组织总蛋白中 ALP、OCN、OPN、Wnt1、Wnt3a、 $\beta$  联蛋白的蛋白相对表达量。另取强化椎体组织总蛋白进行核质分离,得到核蛋白后,以  $\beta$  微管蛋白为内参蛋白进行 Western Blot 实验,计算核蛋白中  $\beta$  联蛋白的蛋白相对表达量。

## 2.4 数据统计

采用 SPSS23.0 软件进行数据统计分析。模型组与假手术组第 4 腰椎骨密度比较,以及骨碎补总黄酮组与空白组强化椎体的骨密度、BV/TV、Tb. Th、Tb. N、最大负荷、刚度、骨形成标志基因的 mRNA 和蛋白表达水平、Wnt 信号通路相关基因的蛋白表达水平的组间比较均采用独立样本 *t* 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 造模结果

模型组第 4 腰椎骨密度低于假手术组 [ $(0.147 \pm 0.013) \text{ g} \cdot \text{mm}^{-2}$ ,  $(0.218 \pm 0.015) \text{ g} \cdot \text{mm}^{-2}$ ,  $t = 11.311$ ,  $P = 0.000$ ], 提示造模成功。

### 3.2 强化椎体的骨密度及骨微结构检测结果

骨碎补总黄酮组强化椎体的骨密度、BV/TV、Tb. Th、Tb. N 均高于空白组(图 1、表 2)。

### 3.3 强化椎体的生物力学性能检测结果

骨碎补总黄酮组强化椎体最大负荷和刚度均大于空白组(表 2)。

### 3.4 强化椎体组织中骨形成标志基因的 mRNA 和蛋白表达水平检测结果

骨碎补总黄酮组强化椎体组织中 ALP、OCN、OPN 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于空白组(表 3、图 2)。

### 3.5 强化椎体组织中 Wnt 信号通路相关基因的蛋白表达水平检测结果

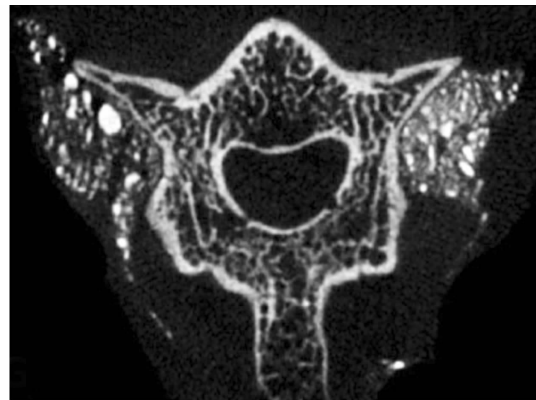
骨碎补总黄酮组强化椎体组织总蛋白中 Wnt1、Wnt3a 的蛋白表达水平,以及核蛋白中  $\beta$  联蛋白的蛋白表达水平均高于空白组;2 组强化椎体组织总蛋白中  $\beta$  联蛋白的蛋白表达水平的差异无统计学意义(表 4、图 2)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物信息

基因名称	引物序列(5'—3')	扩增片段长度/bp
碱性磷酸酶	上游引物 TAGGTATGCGTATTCGTAT	258
	下游引物 GCGTATTATCGATGTCATT	
骨钙素	上游引物 CGGATATCGGCGTATATGC	274
	下游引物 CGTATATCGGCTAGCATT	
骨桥蛋白	上游引物 GCATTATGCATTATGCATG	339
	下游引物 GCATTAGCGATGCGGTAG	
$\beta$ 肌动蛋白	上游引物 GCTATACGATGCATTTAGC	308
	下游引物 CTAGGCGTATATGCGATGC	



(1) 骨碎补总黄酮组



(2) 空白组

图 1 2 组大鼠强化椎体的显微 CT 图像

表 2 2 组大鼠强化椎体的骨密度、骨微结构及生物力学性能检测结果

组别	样本量/ 只	骨密度/ ( $\bar{x} \pm s, \text{g} \cdot \text{mm}^{-2}$ )	骨体积分数/ ( $\bar{x} \pm s, \%$ )	骨小梁厚度/ ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}$ )	骨小梁数量/ ( $\bar{x} \pm s, \text{个} \cdot \text{mm}^{-1}$ )	最大负荷/ ( $\bar{x} \pm s, \text{N}$ )	刚度/ ( $\bar{x} \pm s, \text{N} \cdot \text{mm}^{-1}$ )
骨碎补总黄酮组	10	$0.205 \pm 0.018$	$0.167 \pm 0.012$	$0.139 \pm 0.011$	$1.801 \pm 0.146$	$25.39 \pm 2.19$	$81.09 \pm 7.71$
空白组	10	$0.181 \pm 0.014$	$0.149 \pm 0.009$	$0.128 \pm 0.010$	$1.662 \pm 0.129$	$22.04 \pm 1.87$	$74.13 \pm 5.42$
<i>t</i> 值		3.328	3.795	2.340	2.256	3.689	2.335
<i>P</i> 值		0.004	0.001	0.031	0.037	0.002	0.031

表 3 2 组大鼠强化椎体组织中骨形成标志基因的 mRNA 和蛋白表达水平检测结果

组别	样本量/ 只	碱性磷酸酶( $\bar{x} \pm s$ )		骨钙素( $\bar{x} \pm s$ )		骨桥蛋白( $\bar{x} \pm s$ )	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
骨碎补总黄酮组	10	1.47 ± 0.13	1.18 ± 0.13	1.39 ± 0.12	0.98 ± 0.12	1.52 ± 0.14	0.94 ± 0.11
空白组	10	1.00 ± 0.08	0.67 ± 0.07	1.00 ± 0.11	0.28 ± 0.03	1.00 ± 0.09	0.32 ± 0.04
<i>t</i> 值		9.738	10.923	7.576	17.896	9.880	16.751
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 4 2 组大鼠强化椎体组织中 Wnt 信号通路相关基因的蛋白表达水平检测结果

组别	样本量/ 只	Wnt1 <sup>1)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	Wnt3a <sup>1)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	β 联蛋白 <sup>1)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	β 联蛋白 <sup>2)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )
骨碎补总黄酮组	10	1.19 ± 0.13	1.10 ± 0.12	0.81 ± 0.09	1.13 ± 0.11
空白组	10	0.62 ± 0.04	0.55 ± 0.05	0.85 ± 0.10	0.71 ± 0.08
<i>t</i> 值		13.252	13.379	0.940	9.765
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.360	0.000

注:1)总蛋白中的表达水平;2)核蛋白中的表达水平。



ALP 为碱性磷酸酶, OCN 为骨钙素, OPN 为骨桥蛋白, ① 为空白组, ② 为骨碎补总黄酮组。

图 2 2 组大鼠强化椎体组织中骨形成标志基因及 Wnt 信号通路相关基因的蛋白表达水平 Western Blot 法检测结果

#### 4 讨论

采用椎体强化术治疗骨质疏松性椎体压缩骨折, 能够增强骨折椎体的强度、防止椎体进一步压缩和塌陷。磷酸钙骨水泥是椎体强化术中常用的椎体填充物, 由磷酸钙粉末作为固相, 水和 PBS 等作为液相组成, 生物力学强度良好, 而且固化过程中产热缓慢、温升较小, 能够避免热损伤<sup>[5-6]</sup>; 但也存在机械强度及抗压缩性能不足的缺点, 这也限制了其在临床中的应用<sup>[7-8]</sup>。有研究表明, 促进成骨分化能够增加骨密度、改善骨微结构<sup>[9-10]</sup>。在采用磷酸钙骨水泥进行椎体强化治疗的同时, 促进成骨分化以增加骨密度、改善骨微结构, 可能是增强强化椎体机械强度的有效方法<sup>[11-12]</sup>。

骨质疏松症属中医“骨痿”“骨痹”等范畴, 其病机为骨枯髓减、肾精亏虚。多种治疗骨质疏松症的中药复方中均有骨碎补, 其活性成分骨碎补总黄酮具有改善骨代谢的作用。赵盾等<sup>[4]</sup>以骨碎补总黄酮对骨缺损模型大鼠灌胃, 用量为 0.22 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, 结果

表明骨碎补总黄酮具有促进骨重建、诱导骨生成的作用。张莉丽等<sup>[13]</sup>的研究也表明, 骨碎补总黄酮具有增加骨密度的作用。本研究使用磷酸钙骨水泥对骨质疏松模型大鼠的第 4 腰椎进行强化, 经骨碎补总黄酮灌胃干预 8 周后, 强化椎体各项骨质量指标和骨生物力学性能指标均得到改善。

分子生物学研究发现, 骨碎补总黄酮调节骨代谢的作用与激活经典 Wnt 信号通路有关<sup>[13-15]</sup>。Wnt 信号通路激活时, Wnt1 和 Wnt3a 表达上调, 并使细胞内糖原合酶激酶 3β 的磷酸化水平提高, 削弱降解复合体对 β 联蛋白的降解效应, 进而导致 β 联蛋白在细胞内聚集并进入细胞核, 调控下游 ALP、OCN、OPN 的表达, 促进成骨分化<sup>[16-17]</sup>。本研究中, 骨碎补总黄酮灌胃干预使骨质疏松模型大鼠骨水泥强化椎体组织中 ALP、OCN、OPN 的表达增加, 表明骨碎补总黄酮能促进磷酸钙骨水泥强化椎体的成骨分化。进一步检测经典 Wnt 信号通路中 Wnt1、Wnt3a 及 β 联蛋白的表达, 结果显示骨碎补总黄酮干预使骨质疏松模型大鼠

磷酸钙骨水泥强化椎体组织总蛋白中 Wnt1、Wnt3a, 以及核蛋白中  $\beta$  联蛋白的表达均增加, 表明骨碎补总黄酮能激活磷酸钙骨水泥强化椎体经典 Wnt 信号通路, 促进成骨分化, 改善磷酸钙骨水泥强化椎体的骨质量和生物力学性能。

本研究的样本量较小, 而且未针对 Wnt 信号通路设置回复实验。今后可利用本研究的动物模型和给药方法, 在增加样本量的基础上设计骨碎补总黄酮与 Wnt 抑制剂联合治疗的回复实验, 进而进一步明确骨碎补总黄酮通过 Wnt 信号通路发挥治疗作用的机制。

本研究的结果提示, 骨碎补总黄酮可改善骨质疏松模型大鼠磷酸钙骨水泥强化椎体的骨质量和生物力学性能, 其机制可能是通过激活 Wnt 信号通路, 促进  $\beta$  联蛋白进入细胞核, 增加 ALP、OCN、OPN 表达, 从而促进成骨分化。

### 参考文献

- [1] TIAN Y, LIU H, HE L, et al. Calcium phosphate-based composite cement; impact of starch type and starch pregelatinization on its physicochemical properties and performance in the vertebral fracture surgical models in vitro[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2021, 109(12): 2068–2078.
- [2] INDURKAR A, RUBENIS K, BOCCACCINI A R, et al. Development of nanocomposite hydrogel using citrate-containing amorphous calcium phosphate and gelatin methacrylate[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, 12: 1421415.
- [3] HAN L, WANG C, WANG T, et al. Total flavonoids of rhizoma drynariae improves tendon-bone healing for anterior cruciate ligament reconstruction in mice and promotes the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells by the ERK1/2-G $\alpha$ 1-TGF- $\beta$ /MAPK pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2024, 39(1): 106–119.
- [4] 赵盾, 方斌, 易春智, 等. 骨碎补总黄酮对骨组织重建及骨形态发生蛋白 2、血管内皮生长因子、CD31 的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(29): 4638–4642.
- [5] DIMA O, DIDILESCU A C, MANOLE C C, et al. Synthetic composites versus calcium phosphate cements in bone regeneration; a narrative review [J]. *Ann Anat*, 2024, 255: 152273.
- [6] KINNE R W, GUNNELLA F, KUNISCH E, et al. Performance of calcium phosphate cements in the augmentation of sheep vertebrae—an ex vivo study [J]. *Materials (Basel)*, 2021, 14(14): 3873.
- [7] JEONG J, KIM J H, SHIM J H, et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration [J]. *Biomater Res*, 2019, 23: 4.
- [8] ALIBEIGIAN Y, KALANTARI N, EBRAHIMI SADRA BADI A, et al. Incorporation of calcium phosphate cement into decellularized extracellular matrix enhances its bone regenerative properties [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2024, 244: 114175.
- [9] DA SILVA D, CROUS A, ABRAHAMSE H. Enhancing osteoblast differentiation from adipose-derived stem cells using hydrogels and photobiomodulation; overcoming in vitro limitations for osteoporosis treatment [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2024, 46(7): 6346–6365.
- [10] LIU W, XIANG S, WU Y, et al. Icariin promotes bone marrow mesenchymal stem cells osteogenic differentiation via the mTOR/autophagy pathway to improve ketogenic diet-associated osteoporosis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1): 127.
- [11] STEINACKER V C, WEICHHOLD J, RENNER T, et al. Biological and mechanical performance of calcium phosphate cements modified with phytic acid [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2024, 35(1): 36.
- [12] 张鑫, 马朋朋, 刘肃, 等. 脂联素对骨质疏松大鼠椎体磷酸钙骨水泥强化后骨质量及生物力学的影响及机制 [J]. *实用骨科杂志*, 2022, 28(12): 1084–1088.
- [13] 张莉丽, 张布衣, 余阳. 骨碎补总黄酮上调骨质疏松模型大鼠 Wnt/LRP-5/ $\beta$ -catenin 通路表达的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(6): 807–811.
- [14] LI S, ZHOU H, HU C, et al. Total flavonoids of rhizoma drynariae promotes differentiation of osteoblasts and growth of bone graft in induced membrane partly by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 675470.
- [15] HU Y, MU P, MA X, et al. Rhizoma drynariae total flavonoids combined with calcium carbonate ameliorates bone loss in experimentally induced osteoporosis in rats via the regulation of Wnt3a/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 702.
- [16] AHMAD M, HAFFNER-LUNTZER M, SCHOPPA A, et al. Mechanical induction of osteoanabolic Wnt1 promotes osteoblast differentiation via  $\beta$ -catenin [J]. *FASEB J*, 2024, 38(4): e23489.
- [17] HUANG X, LI S, LU W, et al. Metformin activates Wnt/ $\beta$ -catenin for the treatment of diabetic osteoporosis [J]. *BMC Endocr Disord*, 2022, 22(1): 189.

(收稿日期: 2024-11-23 本文编辑: 李晓乐)