

## 双氢青蒿素对大鼠激素性股骨头坏死的治疗作用与机制

王岩 马剑雄 董本超 李岩 靳洪震 秦国宁

孙磊 卢斌 田爱现 王颖 柏豪豪 马信龙

天津大学天津医院(天津市天津医院)骨科研究所,天津 300050

通信作者:马剑雄,Email:mjx969@163.com

**【摘要】目的** 探讨双氢青蒿素(DHA)对大鼠激素性股骨头坏死(SONFH)的治疗作用及其机制,为SONFH的预防和早期治疗提供新思路。**方法** 将24只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、低剂量DHA组( $1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )以及高剂量DHA组( $5.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),每组6只。采用肌肉注射甲泼尼龙( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,共6周)制备SONFH动物模型,对照组大鼠给予等量生理盐水(NS)肌肉注射(每周前4d注射,共6周)。之后低剂量DHA组大鼠腹腔注射 $1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  DHA 0.6 mL,高剂量DHA组大鼠腹腔注射 $5.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  DHA 0.6 mL(每周前4d注射,共4周),对照组和模型组大鼠均腹腔注射NS 0.6 mL(每周前4d注射,共4周)。干预4周后,处死全部大鼠取材,随后行Micro-CT扫描,评价大鼠股骨头内部骨小梁形态结构及骨代谢的情况,通过硬组织切片和Von Kossa染色观察骨小梁形态结构的改变以及新生骨小梁的情况,通过石蜡切片苏木素-伊红(HE)染色观察骨小梁形态结构改变,通过蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)和免疫组化染色检测骨保护素(OPG)、核转录因子 $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )受体激活蛋白(RANK)及其配体(RANKL)的表达情况,评价骨小梁的代谢活性。**结果** Micro-CT扫描结果显示,对照组大鼠股骨头内骨小梁结构排布规则,无坏死表现;模型组大鼠股骨头内正常骨小梁较少,骨小梁结构基本消失且出现较大的空洞;低剂量DHA组大鼠股骨头内骨小梁数量和形态较模型组有所恢复;高剂量DHA组大鼠股骨头内骨小梁数量和形态恢复效果更为明显。进一步定量分析结果显示,模型组大鼠骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)均较对照组显著减小,低剂量DHA组仅Tb.Th较模型组明显增加( $\text{mm}:0.49\pm 0.05$ 比 $0.41\pm 0.03$ , $P<0.05$ ),高剂量DHA组BV/TV、Tb.Th、Tb.N均较模型组显著增加[BV/TV(%): $0.48\pm 0.01$ 比 $0.40\pm 0.07$ ,Tb.Th(mm): $0.55\pm 0.07$ 比 $0.41\pm 0.03$ ,Tb.N(个/mm): $1.06\pm 0.07$ 比 $0.96\pm 0.07$ ,均 $P<0.05$ ]。通过硬组织切片Von Kossa染色、石蜡切片HE染色以及抗酒石酸磷酸酶(TRAP)染色结果显示,与对照组相比,模型组大鼠股骨头内骨小梁变得稀疏,被异常组织取代,几乎无新生骨小梁且破骨细胞数增多;与模型组相比,经过DHA干预的大鼠股骨头内骨小梁结构恢复,出现新生骨小梁且破骨细胞数减少,以高剂量DHA组变化最为显著。Western blotting和免疫组化染色结果显示,与对照组相比,经激素处理的大鼠股骨头内OPG蛋白表达量显著降低,RANKL和RANK蛋白表达量显著增高;与模型组相比,低、高剂量DHA组大鼠OPG蛋白表达量均增高,RANKL和RANK蛋白表达量均降低,且高剂量DHA组变化程度更显著。**结论** DHA能上调OPG表达,下调RANKL和RANK表达,从而改变股骨头内的骨代谢异常,抑制SONFH进展。

**【关键词】** 激素性股骨头坏死; 双氢青蒿素; 骨代谢; 机制

**基金项目:** 国家自然科学基金(11772226)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.03.021

### Therapeutic effect and mechanism of Dihydroartemisinin on steroid induced osteonecrosis of femoral head in rats

Wang Yan, Ma Jianxiong, Dong Benchao, Li Yan, Jin Hongzhen, Qin Guoning, Sun Lei, Lu Bin, Tian Aixian, Wang Ying, Bai Haohao, Ma Xinlong

Institute of Orthopaedics, Tianjin Hospital, Tianjin University, Tianjin 300050, China

Corresponding author: Ma Jianxiong, Email: mjx969@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the therapeutic effect and mechanism of Dihydroartemisinin (DHA) on hormone induced femoral head necrosis (SONFH) in rats, and to provide a new way of thinking for the prevention and early treatment of SONFH. **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into 4 groups: control group, model group, low dose DHA group ( $1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and high dose DHA group ( $5.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), with 6 rats in each group. The SONFH rat model was established by intramuscular injection of methylprednisolone ( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) for 6 weeks, and the rats in the control group were given intramuscular injection of the same amount of normal saline (NS) for 6 weeks. Then, the rats in the low and high dose DHA groups were injected intraperitoneally with  $1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  and  $5.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  DHA 0.6 mL (injection on former 4 days in each week for 4 weeks) respectively, and NS 0.6 mL was injected in the control group and the model group respectively at the same site and on the same injection days as other groups. After 4 weeks of intervention, all rats were killed and the samples were taken. Micro-CT scanning was performed to evaluate the trabecular morphology and bone metabolism situation in the femoral head of rats. Hard tissue section and Von Kossa staining were used to observe the changes of trabecular morphology and newly growing bone trabecular condition. Paraffin section and hematoxylin-eosin (HE) staining were used to observe the changes of trabecular morphology. Western blotting and immunohistochemistry staining methods were used to detect the expressions of osteoprotegerin (OPG), nuclear factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) receptor activator protein (RANK) and its ligand (RANKL). The

metabolic activity of trabecular meshwork was evaluated. **Results** Micro-CT scanning results showed that the trabecular structure in the femoral head of rats in the control group was arranged regularly without necrosis; the normal trabeculae in the femoral head of rats in the model group were less, the trabecular structure basically disappeared, and instead, relatively large empty cavity occurred; the number and morphological appearance of trabeculae in the femoral head of rats in the low dose DHA group were improved inclining to be restored compared with those in the model group; the number and morphological appearance of trabeculae in the femoral head of rats in the high dose DHA group were much more improved toward normal, indicating that the recovery effect was more significant than that in the lower dose DHA group. Further results of quantitative analysis showed that the bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) and number of bone trabeculae (Tb.N) of the model group were significantly lower than those of the control group, in the low dose DHA group, only Tb.Th was significantly higher than that in model group (mm:  $0.49 \pm 0.05$  vs.  $0.41 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ ), while in the high dose DHA group, BV/TV, Tb.Th and Tb.N were all obviously higher than those in the model group [BV/TV (%):  $0.48 \pm 0.01$  vs.  $0.40 \pm 0.07$ , Tb.Th (mm):  $0.55 \pm 0.07$  vs.  $0.41 \pm 0.03$ , Tb.N (piece/mm):  $1.06 \pm 0.07$  vs.  $0.96 \pm 0.07$ , all  $P < 0.05$ ]. The results of hard tissue section Von Kossa staining, the paraffin section HE staining and tartaric acid phosphatase (TRAP) staining showed that compared with those in the control group, the trabeculae in the femoral bone head of the model group became sparse and replaced by abnormal tissues, almost no newly formed trabeculae was seen and the number of osteoclasts was increased; compared with those in the model group, the trabecular structure in the femoral head of the rats after DHA intervention recovered, newly formed trabeculae appeared and the osteoclasts were decreased, especially more significant in the high dose DHA group. Western blotting and immunohistochemical staining results showed that compared with the control group, the expression of OPG protein in the femoral head of rats treated with hormone was significantly decreased, and the expressions of RANKL and RANK protein were significantly increased; compared with those in the model group, the expressions of OPG protein in the low dose and high dose DHA groups were increased, and the expressions of RANKL and RANK protein were decreased, and the changing degree in the high dose DHA group was more obvious. **Conclusion** DHA can up regulate the expression of OPG and down regulate the expressions of RANKL and RANK, thus the abnormal bone metabolism in the hormone induced femoral head necrosis is changed toward normal or recovery and the disease progression is inhibited.

**【Key words】** Steroid induced osteonecrosis of femoral head; Dihydroartemisinin; Bone metabolism; Mechanism  
**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (11772226)  
DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.03.021

股骨头坏死 (ONFH) 是骨科疾病领域的难题之一, 目前 ONFH 的发病机制尚未完全得到公认, 临床中处理该疾病的不确定因素较多<sup>[1]</sup>。有研究表明, 双氢青蒿素 (DHA) 在抗疟疾、抗肿瘤、免疫调节、抗真菌等领域有非常重要的作用<sup>[2]</sup>, 而 DHA 能干预成骨细胞和破骨细胞的活性从而影响骨代谢, 有治疗骨质疏松等相关疾病的潜力<sup>[3]</sup>。但目前关于 DHA 对激素性股骨头坏死 (SONFH) 的防治作用和治疗机制尚不明确。本研究初步研究 DHA 抑制 SONFH 发展的治疗机制, 现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组:** 选择雄性 SD 大鼠 24 只 (购自中国食品药品检定研究院), 体重约 300 g (约 3 个月龄), 每笼饲养 3 只, 正常环境饲养。随机分为对照组、模型组, 低剂量 DHA 组 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 和高剂量 DHA 组 ( $5.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 每组 6 只。本研究于天津大学天津医院研究所以及天津市骨科生物力学与医学工程重点实验室内进行并顺利完成, 动物处置方法符合动物伦理学标准, 研究方案已通过天津市天津医院伦理委员会审批 (审批号: 2017-3-3)。

**1.2 SONFH 动物模型制备和 DHA 干预:** 对照组大鼠给予生理盐水 (NS) 肌肉注射, 每周前 4 d 注射, 共 6 周; 参照文献 [4] 方法对模型组、低剂量 DHA 组和高剂量 DHA 组大鼠进行 SONFH 模型的建立,

具体操作如下: 肌肉注射甲泼尼龙 (美国辉瑞公司, 500 mg), 剂量为  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 每周前 4 d 注射, 共 6 周。随后对照组和模型组大鼠给予 NS 0.6 mL 腹腔注射, 每周前 4 d 注射, 共 4 周; 低剂量 DHA 组及高剂量 DHA 组大鼠给予 DHA 0.6 mL 腹腔注射, 剂量分别为  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $5.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 每周前 4 d 注射, 共 4 周, 随后取材进行相关检测。

**1.3 Micro-CT 扫描:** 采用西门子临床前小动物三合一 (PET/SPECT/Micro-CT) 扫描成像系统扫描大鼠股骨头, 获得连续的 Micro-CT 扫描图像。然后使用西门子公司配套的三维结构重建软件进行三维重建, 重建后取相关兴趣区域进行骨量的定量计算。

**1.4 硬组织切片和 Von Kossa 染色:** 将取材后的大鼠股骨标本进行固定、分切、梯度脱水、逐级浸透和包埋聚合, 随后制成一个  $100 \mu\text{m}$  的薄片继续磨制抛光, 得到切片后放入 Von Kossa 硝酸银溶液中强光照射 60 min, 再清洗 1 min 后放入海波溶液处理 2 min, 最后用苏木素 - 伊红 (HE) 染色液复染细胞核。

**1.5 石蜡切片和 HE 染色:** 取股骨近端放入脱钙液中脱钙处理后进行脱水浸蜡、包埋, 将包埋块置于石蜡切片机上设置切片厚度为  $4 \mu\text{m}$  进行切片。得到石蜡切片进行脱蜡至水后, 依次进行苏木素染液染 3 ~ 5 min、清洗、分化、清洗、返蓝、清洗等步骤, 最后脱水封片。

**1.6 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测:** 提取大鼠股骨头组织总蛋白并测得浓度后在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上进行电泳, 后置于电转液中完成转膜。封闭 1 h 加入一抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH, 1:2 000)、骨保护素 (OPG, 1:1 000)、核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 受体激活蛋白 (RANK, 1:1 000)、RANK 配体 (RANKL, 1:1 000) 后进行 4 °C 孵育, 次日再应用相对应的 HRP 共轭二抗 (1:10 000) 室温孵育 1 h 后洗膜曝光。

**1.7 免疫组化染色:** 将石蜡切片进行抗原修复, 阻断内源性过氧化物酶并封闭。加入一抗 OPG (1:200)、RANKL (1:200)、RANK (1:200) 于 4 °C 孵育, 后加入与之对应的二抗 (HRP 标记) 于室温孵育 50 min。最后脱色、显色、复染细胞核以及脱水封片。

**1.8 统计学处理:** 采用 SPSS 19.0 软件分析数据。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间两两两两比较采用独立样本 *t* 检验, 组内比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

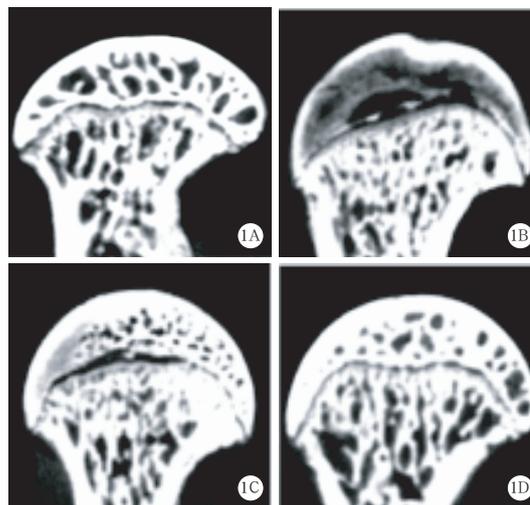
## 2 结果

**2.1 Micro-CT 扫描与定量计算结果:** Micro-CT 扫描结果显示 (图 1), 对照组大鼠股骨头内可观察到骨小梁结构排布规则, 无坏死表现; 模型组股骨头内正常骨小梁较少, 骨小梁结构基本消失且出现较大的空洞, 甚至出现塌陷; 低剂量 DHA 组出现正常的骨小梁结构, 但仍存在部分骨小梁结构缺失, 股骨头内骨小梁排布情况并未完全恢复; 高剂量 DHA 组骨小梁结构恢复程度强于低剂量 DHA 组, 与对照组骨小梁形态和排布情况相近。进一步定量分析结果显示 (表 1), 模型组的骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁数量 (Tb.N) 均较对照组显著减小 (均  $P < 0.05$ ), 而两组间骨小梁分离度 (Tb.Sp) 无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 低剂量 DHA 组仅 Tb.Th 较模型组明显增加 ( $P < 0.05$ ), 两组间 BV/TV、Tb.N、Tb.Sp 均无明显差异 (均  $P > 0.05$ ); 高剂量 DHA 组 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 均较模型组显著增加 (均  $P < 0.05$ ), 而两组间 Tb.Sp 无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组大鼠股骨头 Micro-CT 扫描定量分析结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	BV/TV (%)	Tb.Th (mm)	Tb.N (个/mm)	Tb.Sp (mm)
对照组	6	0.53 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.06	1.28 $\pm$ 0.11	0.57 $\pm$ 0.02
模型组	6	0.40 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.09
低剂量 DHA 组	6	0.44 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.97 $\pm$ 0.06	0.59 $\pm$ 0.09
高剂量 DHA 组	6	0.48 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.55 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	0.54 $\pm$ 0.04

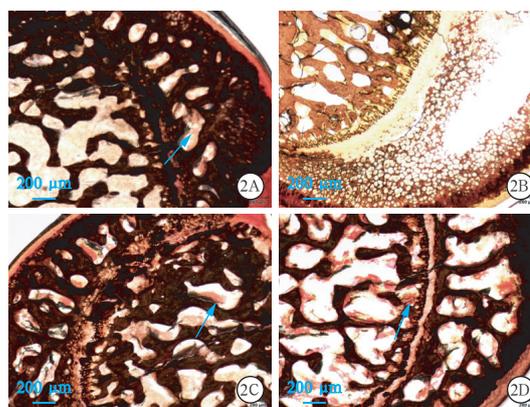
注: BV/TV 为骨体积分数, Tb.Th 为骨小梁厚度, Tb.N 为骨小梁数量, Tb.Sp 为骨小梁分离度; 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$



注: 对照组 (1A) 大鼠股骨头内骨小梁结构排布规则, 无坏死表现; 模型组 (1B) 大鼠股骨头内正常骨小梁较少, 骨小梁结构基本消失且出现较大空洞; 低剂量双氢青蒿素 (DHA) 组 (1C) 大鼠股骨头内骨小梁数量和形态较模型组有所恢复; 高剂量 DHA 组 (1D) 大鼠股骨头内骨小梁数量和形态恢复效果更明显

图 1 各组大鼠股骨头 Micro-CT 扫描图像

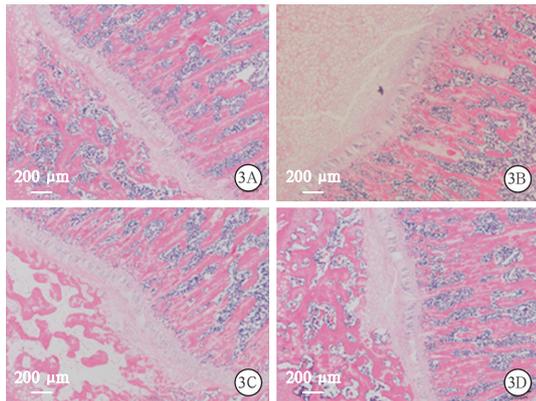
**2.2 硬组织切片和 Von Kossa 染色结果 (图 2):** 对照组大鼠股骨头内骨小梁排布整齐、规则, 未观察到骨坏死表现, 在骨小梁周围可见少量新生骨组织; 与对照组相比, 模型组大鼠股骨头内正常骨小梁数量减少、被异常组织替代, 几乎无新生骨组织; 与模型组相比, 低剂量 DHA 组大鼠股骨头内正常骨小梁数量有所增加, 但仍存在骨小梁的断裂, 骨小梁周围出现部分新生骨组织; 而采用高剂量 DHA 干预的大鼠股骨头内骨小梁形态结构较好且排布较规则, 骨小梁周围出现大量的新生骨组织。



注: 对照组 (2A) 大鼠股骨头内骨小梁排布整齐、规则, 在骨小梁周围可见少量新生骨组织; 模型组 (2B) 大鼠股骨头内正常骨小梁数量较对照组减少, 被异常组织替代, 几乎无新生骨组织; 低剂量双氢青蒿素 (DHA) 组 (2C) 大鼠股骨头内正常骨小梁数量较模型组有所增加, 但仍有骨小梁断裂, 骨小梁周围出现新生骨组织; 高剂量 DHA 组 (2D) 大鼠股骨头内骨小梁形态结构较好且排布较规则, 骨小梁周围出现大量新生骨组织; 蓝色箭头  $\uparrow$  所示粉色区域为成骨细胞分泌的胶原 (新生骨组织)

图 2 光镜下观察各组大鼠股骨头硬组织切片病理学改变 (Von Kossa 染色 低倍放大)

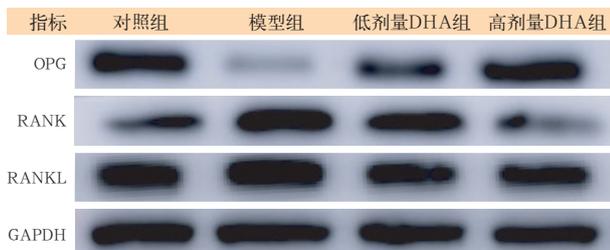
**2.3 石蜡切片和 HE 染色结果(图 3):**石蜡切片 HE 染色结果显示对照组骨小梁形态正常、排布规则,未观察到骨坏死表现;而在经甲泼尼龙处理的大鼠股骨头内骨小梁变得稀疏、断裂甚至消失,被异常组织取代;使用低剂量 DHA 干预的大鼠骨小梁仍存在一定程度的稀疏情况;相反,使用高剂量 DHA 干预的大鼠骨小梁组织形态结构良好,几乎无骨小梁结构和骨髓被坏死组织替代的情况,与对照组股骨头内形态结构相似。



注:对照组(3A)大鼠股骨头内骨小梁排列规则,正常骨小梁数量多,未观察到骨坏死表现;模型组(3B)大鼠股骨头内骨小梁稀疏,正常骨小梁被空泡状组织代替;低剂量双氢青蒿素(DHA)组(3C)大鼠股骨头内与模型组相比,骨小梁数量和形态有所恢复;高剂量 DHA 组(3D)大鼠股骨头内骨小梁数量和形态恢复效果更为明显

**图 3 光镜下观察各组大鼠股骨头石蜡切片病理学改变[苏木素-伊红(HE)染色 低倍放大]**

**2.4 Western blotting 检测结果(图 4):**与对照组相比,经过激素处理的大鼠股骨头内 OPG 蛋白表达量显著降低, RANKL 和 RANK 蛋白表达量显著增高;与模型组相比,低、高剂量 DHA 组大鼠 OPG 蛋白表达量均增高, RANKL 和 RANK 蛋白表达量均降低,且高剂量 DHA 组变化程度更显著。

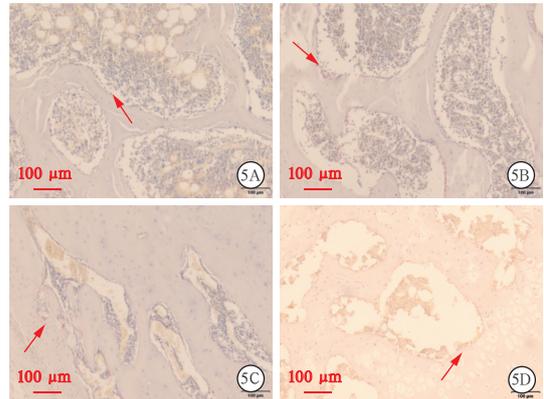


DHA 为双氢青蒿素, OPG 为骨保护素, RANK 为核转录因子- $\kappa$ B 受体激活蛋白, RANKL 为 RANK 配体, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验

**图 4 Western blotting 检测各组大鼠股骨头 OPG、RANK、RANKL 蛋白表达**

**2.5 抗酒石酸磷酸酶(TRAP)染色结果(图 5):**对照组大鼠股骨头内阳性结果较少,提示破骨细胞数量少;与对照组相比,模型组大鼠股骨头内染色阳

性强度明显上升,提示破骨细胞数显著增多;与模型组相比,低剂量 DHA 组染色阳性强度明显下降,提示破骨细胞数明显减少,高剂量 DHA 组染色阳性强度下降更为显著。

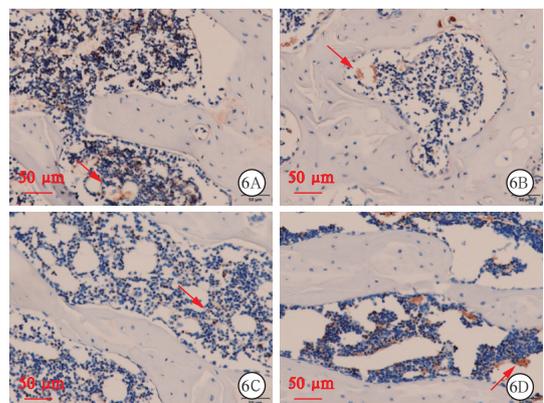


注:对照组(5A)大鼠股骨头内有少量破骨细胞存在;模型组(5B)大鼠股骨头内阳性染色强度与对照组相比明显上升,提示破骨细胞增多;低剂量双氢青蒿素(DHA)组(5C)大鼠股骨头内阳性染色强度较模型组有所下降,提示破骨细胞减少;高剂量 DHA 组(5D)大鼠股骨头内阳性染色强度较模型组下降明显,提示破骨细胞显著减少;红色箭头↑所示棕色区域为破骨细胞

**图 5 光镜下观察各组大鼠股骨头石蜡切片病理学改变[抗酒石酸磷酸酶(TRAP)染色 低倍放大]**

**2.6 免疫组织化学染色结果**

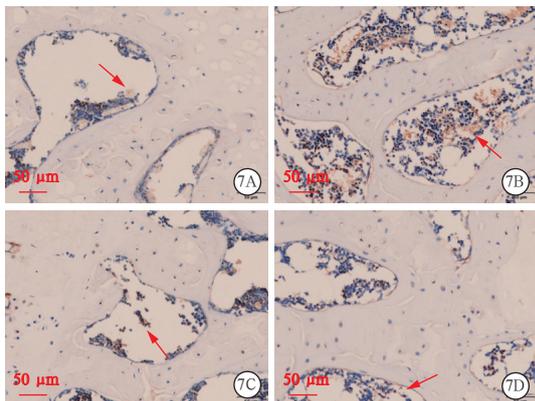
**2.6.1 OPG(图 6):**与对照组相比,经过激素处理的大鼠股骨头内 OPG 免疫组织化学染色阳性强度明显下降,提示 OPG 表达量下调;而经过 DHA 干预的大鼠股骨头染色阳性强度明显上升,提示 OPG 表达量上调,且随 DHA 干预剂量增加棕染程度越深,阳性强度上升越明显,提示 OPG 表达量显著上调。



注:对照组(6A)大鼠股骨头内骨保护素(OPG)呈棕色染色;模型组(6B)大鼠股骨头内 OPG 棕染程度弱于对照组,提示 OPG 表达量下调;低剂量双氢青蒿素(DHA)组(6C)大鼠股骨头内 OPG 棕染程度较模型组有所增强,提示 OPG 表达量上调;高剂量 DHA 组(6D)大鼠股骨头内 OPG 棕染程度较模型组增强且呈深棕色,提示 OPG 表达量显著上调;红色箭头↑所示棕色区域为阳性结果

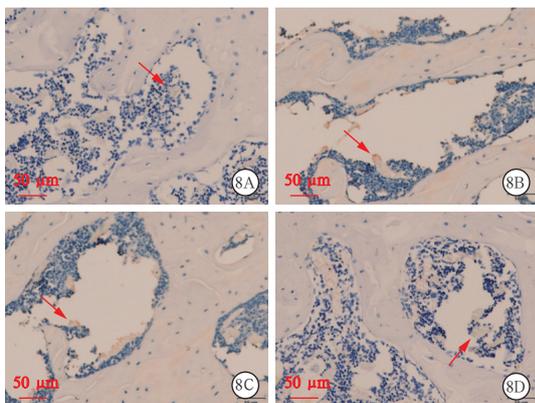
**图 6 光镜下观察各组大鼠股骨头 OPG 的阳性细胞表达(免疫组化染色 中倍放大)**

**2.6.2 RANKL 和 RANK(图 7~8):** 与对照组相比,模型组 RANKL 和 RANK 免疫组化染色阳性强度明显增强,而低、高剂量 DHA 组免疫组化染色阳性强度均显著下降,以高剂量 DHA 组最明显,棕染较浅。



注:对照组(7A)大鼠股骨头内核转录因子- $\kappa$ B受体激活蛋白配体(RANKL)呈棕色染色;模型组(7B)大鼠股骨头内 RANKL 棕染程度强于对照组,提示 RANKL 表达量上调;低剂量双氢青蒿素(DHA)组(7C)大鼠股骨头内 RANKL 棕染程度较模型组有所减弱,提示 RANKL 表达量下调;高剂量 DHA 组(7D)大鼠股骨头内 RANKL 棕染程度较模型组减弱且棕色较浅,提示 RANKL 表达量显著下调;红色箭头↑所示棕色区域为阳性结果

**图 7 光镜下观察各组大鼠股骨头 RANKL 的阳性细胞表达(免疫组化染色 中倍放大)**



注:对照组(8A)大鼠股骨头内核转录因子- $\kappa$ B受体激活蛋白(RANK)呈棕色染色;模型组(8B)大鼠股骨头内 RANK 棕染程度强于对照组,提示 RANK 表达量上调;低剂量双氢青蒿素(DHA)组(8C)大鼠股骨头内 RANK 棕染程度较模型组有所减弱,提示 RANK 表达量下调;高剂量 DHA 组(8D)大鼠股骨头内 RANK 棕染程度较模型组减弱且棕色较浅,提示 RANK 表达量显著下调;红色箭头↑所示棕色区域为阳性结果

**图 8 光镜下观察各组大鼠股骨头 RANK 的阳性细胞表达(免疫组化染色 中倍放大)**

### 3 讨论

本研究显示,经激素处理的大鼠股骨头内骨小梁形态和结构遭破坏,正常骨小梁数目减少且排布不规则,部分正常骨组织被空泡状异常组织替代,新生骨小梁少见,骨坏死表现明显,BV/TV、Tb.Th、Tb.N

显著降低,证明 SONFH 大鼠模型复制成功,与文献[5]报道一致。而 DHA 能改善大鼠股骨头内骨小梁形态和结构异常,对 SONFH 有一定治疗作用。

相关研究显示,股骨头内骨小梁代谢与 SONFH 的发生密不可分<sup>[6]</sup>。已有研究表明,DHA 能干预成骨细胞和破骨细胞活性从而影响骨代谢<sup>[3]</sup>。Sordi 等<sup>[7]</sup>发现,DHA 能通过影响细胞外信号调节激酶(ERK)及 NF- $\kappa$ B 信号通路从而抑制破骨细胞分化及增殖。与对照组相比,经过激素处理的大鼠 OPG 表达显著降低,RANK 和 RANKL 表达显著升高,此时破骨细胞增殖分化能力增强,骨代谢平衡状态被打破,导致骨小梁形态结构改变,最终在生物力学环境作用下进一步形成 SONFH,与 Song 等<sup>[8]</sup>报道一致。通过低剂量 DHA 干预后 OPG 表达升高,RANK 和 RANKL 表达降低,而高剂量干预后变化程度更为显著,说明此时破骨细胞的形成被抑制,骨代谢异常得到改善,致使异常骨小梁形态结构得到恢复,拮抗 SONFH 的发展。

综上所述,DHA 能通过上调 OPG 表达以及下调 RANKL 和 RANK 表达,改变股骨头内的骨代谢异常,抑制 SONFH 进展。今后拟在其他信号通路上进一步深入研究,明确 DHA 治疗 SONFH 的具体机制,为 SONFH 的预防和早期治疗提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 马剑雄,何伟伟,赵杰,等. 股骨头坏死发病机制研究的最新进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21 (27): 4397-4402. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2017.27.023.
- [2] 罗悦晨,梁林,臧照辉,等. 青蒿素对脑缺血/再灌注损伤大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (1): 27-28. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.01.009.
- [3] Zeng XZ, Zhang YY, Wang S, et al. Artesunate suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis through inhibition of PLC  $\gamma$  1-Ca<sup>2+</sup>-NFATc1 signaling pathway and prevents ovariectomy-induced bone loss [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 124: 57-68. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.10.007.
- [4] Kuang MJ, Huang Y, Zhao XG, et al. Exosomes derived from Wharton's jelly of human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce osteocyte apoptosis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats via the miR-21-PTEN-AKT signalling pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15 (9): 1861-1871. DOI: 10.7150/ijbs.32262.
- [5] Ismail T, Osinga R, Todorov A Jr, et al. Engineered, axially-vascularized osteogenic grafts from human adipose-derived cells to treat avascular necrosis of bone in a rat model [J]. *Acta Biomater*, 2017, 63: 236-245. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.09.003.
- [6] Luo ZH, Liu Y, Liu YT, et al. Cellular and molecular mechanisms of alcohol-induced osteopenia [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74 (24): 4443-4453. DOI: 10.1007/s00018-017-2585-y.
- [7] Sordi R, Nandra KK, Chiazza F, et al. Artesunate protects against the organ injury and dysfunction induced by severe hemorrhage and resuscitation [J]. *Ann Surg*, 2017, 265 (2): 408-417. DOI: 10.1097/SLA.0000000000001664.
- [8] Song HM, Wei YC, Li N, et al. Effects of Wenyangbushen formula on the expression of VEGF, OPG, RANK and RANKL in rabbits with steroid-induced femoral head avascular necrosis [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (6): 8155-8161. DOI: 10.3892/mmr.2015.4478.

(收稿日期: 2021-02-19)