

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research羟基红花黄色素 A 通过神经营养因子-3
对大鼠胫骨骨骺损伤的作用Effects of hydroxylsafflower yellow A on epiphyseal injury of tibial bone in rats
through neurotrophin-3任晓春, 李文斌, 赵致忠,
吕 嘉, 黄永波(山西医科大学 第二医院 骨科, 山西 太原
030000)REN Xiao-chun, LI Wen-bin,
ZHAO Zhi-zhong, LÜ Jia,
HUANG Yong-bo(Department of Orthopedics, The Second
Hospital of Shanxi Medical University,
Taiyuan 030000, Shanxi Province,
China)

作者简介:任晓春(1985-),男,主治医师,主要从事骨科方面工作和研究
通信作者:黄永波,主任医师,硕士生导师
MP:13753122569
E-mail:13753122569@163.com

摘要:目的 研究羟基红花黄色素 A(HSYA)通过神经营养因子-3(NT-3)对大鼠胫骨骨骺损伤的影响机制。方法 将50只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、HSYA组、NC组和sh-NT-3组,每组10只。除对照组外,其余4组均用高速牙钻建立胫骨骨骺损伤模型。HSYA组灌胃给予 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ HSYA, qd, 连续6周;NC组和sh-NT-3组分别在HSYA组的基础上尾静脉注射 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ sh-NC和sh-NT-3,每2天1次,连续6周。对照组和模型组给予等量的0.9% NaCl灌胃和尾静脉注射。用实时定量反转录聚合酶链反应检测NT-3 mRNA相对表达水平,用蛋白质印迹法检测骨修复标志物和Notch通路关键基因Notch受体1(Notch1)信号通路相关蛋白的相对表达水平。结果 对照组、模型组、HSYA组的NT-3 mRNA相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 3.31 ± 0.59 和 5.16 ± 0.84 ;对照组、模型组、HSYA组、NC组和sh-NT-3组的Runt相关转录因子2蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 3.67 ± 0.63 、 7.36 ± 1.35 、 7.31 ± 1.42 和 5.74 ± 1.32 ,成骨细胞特异性转录因子蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 5.76 ± 1.01 、 8.49 ± 1.42 、 8.56 ± 1.54 和 6.48 ± 1.16 ,Notch1蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 1.44 ± 0.23 、 1.79 ± 0.34 、 1.83 ± 0.35 和 1.52 ± 0.27 。模型组的上述指标与对照组比较,HSYA组的上述指标与模型组比较,sh-NT-3组的上述指标与NC组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 HSYA通过促进NT-3表达,激活Notch1信号通路改善大鼠胫骨骨骺损伤。

关键词:羟基红花黄色素 A;神经营养因子-3;骨骺损伤;Notch1 信号通路;胫骨
DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.05.019

中图分类号:R28 文献标志码:A
文章编号:1001-6821(2025)05-0696-05

Abstract: Objective To study the effect of hydroxylsafflower yellow A (HSYA) on epiphyseal injury of tibial in rats through neurotrophic factor-3 (NT-3). **Methods** Fifty male SD rats were randomly divided into control group, model group, HSYA group, NC group and sh-NT-3 group, with 10 rats in each group. Except the control group, the injury model of tibial epiphyseal was established in the other 4 groups by high speed dental abrasive drill. The HSYA group was given $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ HSYA by intragastric administration once a day for 6 weeks. NC group and sh-NT-3 group were respectively injected with $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ sh-NC and sh-NT-3 through the tail vein, once every two days for 6 weeks. The control group and model group were given the same amount of normal saline intragastric and caudal intravenous injection. Quantitative real -

time polymerase chain reaction was used to detect the expression level of *NT-3* mRNA. The expression levels of bone repair markers and Notch receptor 1 (Notch1) signaling pathway related proteins were detected by Western blot.

Results The mRNA levels of *NT-3* in control group, model group and HSYA group were 1.00 ± 0.17 , 3.31 ± 0.59 and 5.16 ± 0.84 , respectively. The relative expression of runt related transcription factor 2 protein in control group, model group, HSYA group, NC group and sh-*NT-3* group were 1.00 ± 0.17 , 3.67 ± 0.63 , 7.36 ± 1.35 , 7.31 ± 1.42 , 5.74 ± 1.32 , respectively; the relative expressions of osteoblast-specific transcription factor protein were 1.00 ± 0.18 , 5.76 ± 1.01 , 8.49 ± 1.42 , 8.56 ± 1.54 , 6.48 ± 1.16 , respectively; the relative expressions of Notch1 protein were 1.00 ± 0.18 , 1.44 ± 0.23 , 1.79 ± 0.34 , 1.83 ± 0.35 , 1.52 ± 0.27 , respectively. The above indexes in the model group were compared with the control group, the HSYA group was compared with the model group, and the sh-*NT-3* group was compared with the NC group, and the above indexes were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** HSYA improves tibial epiphyseal injury in rats by promoting *NT-3* expression and activating Notch1 signaling pathway.

Key words: hydroxysafflower yellow A; neurotrophin-3; epiphyseal injury; Notch1 signaling pathway; tibial bone

胫骨远端骨骺骨折是青少年常见的骨骺骨折类型^[1]。羟基红花黄色素 A (hydroxysafflower yellow pigment A, HSYA) 是红花的主要活性成分。HSYA 具有抗炎、抗氧化、促进骨骼矿化、增加成骨细胞存活力等作用^[2]。Notch1 信号通路调控软骨细胞增殖、分化及凋亡的过程^[3]。神经营养因子-3 (neurotrophin-3, *NT-3*) 是一类重要的生长因子,能够刺激和控制神经的发生,也被发现对地塞米松诱导的小鼠成骨细胞凋亡起抑制作用^[4]。本研究通过构建胫骨骨骺损伤模型大鼠,基于 Notch 通路关键基因 Notch 受体 1 (Notch receptor 1, Notch1) 信号通路探究 HSYA 通过 *NT-3* 对大鼠胫骨骨骺损伤的影响机制。

材料与方法

1 材料

动物 清洁级雄性 SD 大鼠,鼠龄 6~8 周,体重 200~250 g,山西省肿瘤医院提供。动物许可证号:SCXK(晋)2022-0002。本实验经山西医科大第二医院动物伦理委员会批准(伦理批号:DW2024067)。

药品与试剂 羟基红花黄色素 A,规格:每瓶 25 mg,纯度:≥98.0%,批号:23675,美国 MCE 公司生产。Trizol 裂解液,美国赛默飞公司生产;反转录试剂盒,瑞士 Roche 公司生产;实时定量反转录聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒,上海翌圣生物科技有限公司生产;大鼠骨成型蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β1) 酶联免疫吸附测定法 (enzyme-

linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒,均为上海白益生物科技有限公司生产;兔抗鼠组织蛋白酶 K、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-9、MMP-13、Runt 相关转录因子 2 (runt related transcription factor 2, Runx2)、成骨细胞特异性转录因子 (osteoblast-specific transcription factor, Osterix)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、I 型胶原蛋白、Notch1、Notch 配体蛋白 1 (Notch ligand protein 1, Jagged1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 G 二抗,均为英国 Abcam 公司生产;苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒,上海贝博生物科技有限公司生产。

仪器 TE-95RM 高速牙钻,东莞市柯维特医疗器械有限公司产品;ELX808 酶标仪,美国 Biotek 公司产品;ChemiDoc 凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司产品;SLAN-96S qRT-PCR 仪,上海宏石医疗公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建^[5]

SD 大鼠用 10% 水合氯醛麻醉大鼠,随后取 5 mm 皮肤竖直切口,暴露胫骨远端前内侧,用高速牙钻(钻头直径为 2 mm),在近生长板 5 mm 处骨干中间处开窗,再将钻头通过此窗插入干骺端生长板中间造成骨骺损伤。

2.2 分组与给药方法

将 50 只 SD 大鼠分为对照组、模型组、HSYA 组、NC 组和 sh-*NT-3* 组,每组 10 只,除对照组外其余 4 组均建立胫骨骨骺损伤模型。HSYA 组用 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 HSYA 灌胃处理, qd, 连续 6 周;NC 组

在 HSYA 组的基础上尾静脉注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 空白对照 sh - NC, 每 2 天 1 次, 连续 6 周; sh - NT - 3 组在 HSYA 组基础上尾静脉注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sh - NT - 3, 每 2 天 1 次, 连续 6 周。对照组和模型组给予等量的 0.9% NaCl 灌胃和尾静脉注射。

2.3 HE 染色观察大鼠胫骨病理学变化^[6]

取大鼠胫骨, 4% 多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋, 切片机切片, 烤片后进行 HE 染色, 用光学显微镜观察大鼠胫骨病理学变化。

2.4 qRT - PCR 检测各组大鼠胫骨骨髓中 NT - 3、性别决定区 Y 框蛋白 9 (sex determining region Y - box9, Sox9)、II 型胶原蛋白和 X 型胶原蛋白 mRNA 的相对表达水平^[6]

Trizol 裂解液提取各组大鼠胫骨骨髓总 RNA, 反转录试剂盒合成 cDNA, 用 qRT - PCR 试剂盒进行定量 PCR, 扩增条件: 95°C 5 min; 95°C 10 s; 60°C 30 s, 循环 40 次。以 GAPDH 为内参, 按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 mRNA 相对表达水平。

2.5 ELISA 检测各组大鼠血清中 BMP - 2 和 TGF - $\beta 1$ 的水平^[7]

水合氯醛麻醉大鼠后心脏取血, 4°C 静置 4 h, 以 $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书要求检测 BMP - 2 和 TGF - $\beta 1$ 的表达水平。

2.6 蛋白质印迹法检测各组大鼠骨组织中蛋白的相对表达水平^[8]

处死大鼠并取骨髓组织, 研磨、匀浆后提取总蛋白。二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度, 取蛋白 $20 \mu\text{g}$ 上样、电泳、转膜反应后, 加入一抗, 在 4°C 孵育过夜, 加入羊抗兔二抗, 在 37°C 孵育 2 h 后, 用增强化学发光试剂盒进行化学发光并拍摄。以 GAPDH 为内参, 用 Image J 软件分析各组蛋白相对表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 NT - 3 在各组大鼠胫骨骨髓中的表达

HSYA 组用 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 HSYA 灌胃处理; NC 组在 HSYA 组的基础上尾静脉注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 空白对照 sh - NC; sh - NT - 3 组在 HSYA 组的基础上尾静脉注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sh - NT - 3; 对照组和模型组给予

等量的 0.9% NaCl 灌胃和尾静脉注射。

模型组大鼠相较于对照组, 胫骨可见明显创伤, 且伴有大量的炎性细胞浸润, 形成血肿; HSYA 组与模型组相比, 大鼠损伤部位几乎愈合, 血肿与炎症症状均得到一定程度的改善, 见图 1。对照组、模型组和 HSYA 组的 NT - 3 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 3.31 ± 0.59 和 5.16 ± 0.84 。模型组与对照组相比, 大鼠胫骨骨髓中 NT - 3 mRNA 相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$); HSYA 组与模型组相比, 大鼠胫骨骨髓中 NT - 3 mRNA 相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。

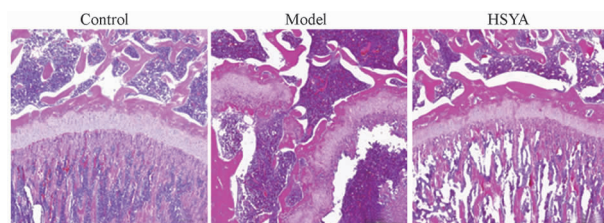


图 1 各组大鼠胫骨骨髓部位的苏木精 - 伊红染色 ($\times 200$)

Figure 1 Hematoxylin - eosin staining of tibial epiphysis of rats in each group ($\times 200$)

Control group: An equal amount of 0.9% NaCl was injected into the stomach and the tail vein; Model group: The model of tibial epiphyseal injury was established and 0.9% NaCl was injected into the stomach and caudal vein; HSYA group: Given $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ hydroxysafflower yellow pigment A by intragastric administration once a day for 4 weeks.

2 羟基红花黄色素 A 通过 NT - 3 对各组大鼠血清中 BMP - 2 和 TGF - $\beta 1$ 水平的影响

表 1 各组大鼠骨损伤标志物水平的 mRNA 相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the relative mRNA expression levels of bone injury markers in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Sox9	collagen II	collagen X
Control	10	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.19
Model	10	5.16 ± 0.87***	4.23 ± 0.79***	4.72 ± 0.81***
HSYA	10	7.18 ± 1.25###	6.33 ± 1.21###	7.94 ± 1.46###
NC	10	7.07 ± 1.31	6.27 ± 1.19	8.02 ± 1.52
sh - NT - 3	10	5.89 ± 1.14 [△]	5.09 ± 0.97 [△]	6.14 ± 1.34 ^{△△}

NC group: On the basis of HSYA group, 1 mg · kg⁻¹ sh - NC was injected into the tail vein once every two days for 6 weeks; sh - NT - 3 group: On the basis of HSYA group, 1 mg · kg⁻¹ sh - NT - 3 was injected intravenously every two days for 6 weeks; Sox9: Sex determining region Y - box 9; Compared with control group, ****P* < 0.001; Compared with the model group, ###*P* < 0.001; Compared with NC group, [△]*P* < 0.05, ^{△△}*P* < 0.01.

4 羟基红花黄色素 A 通过 NT - 3 对各组大鼠软骨细胞重塑标志物表达的影响

蛋白质印迹法检测大鼠骨组织中组织蛋白酶 K、MMP - 9 和 MMP - 13 蛋白相对表达水平:模型组与对照组相比,HSYA 组与模型组相比,sh - NT - 3 组与 NC 组相比,在统计学上差异均有统计学意义 (*P* < 0.05, *P* < 0.01, *P* < 0.001),见表 2。

表 2 各组大鼠骨组织中软骨细胞重塑标志物的蛋白相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of relative protein expression levels of chondrocyte remodeling markers in bone tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Cathepsin K	MMP - 9	MMP - 13
Control	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.19
Model	6.87 ± 1.32***	5.60 ± 1.09***	8.83 ± 1.79***
HSYA	9.26 ± 1.84##	8.86 ± 1.75###	13.28 ± 2.44###
NC	9.15 ± 1.77	8.74 ± 1.71	13.37 ± 2.18
sh - NT - 3	7.63 ± 1.36 [△]	6.19 ± 1.26 ^{△△}	10.41 ± 2.02 ^{△△}

Dose and *n* refer to table 1; MMP - 9: Matrix metalloproteinase - 9; MMP - 13: Matrix metalloproteinase - 13; Compared with control group, ****P* < 0.001; Compared with the model group, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001; Compared with NC group, [△]*P* < 0.05, ^{△△}*P* < 0.01.

5 羟基红花黄色素 A 通过 NT - 3 对各组大鼠骨修复标志物表达的影响

蛋白质印迹法检测大鼠骨组织中 Runx2、Osterix、ALP 和 I 型胶原蛋白相对表达水平:模型组与对照组相比,HSYA 组与模型组相比,sh - NT - 3 组与 NC 组相比,在统计学上差异均有统计学意义 (*P* < 0.05, *P* < 0.01, *P* < 0.001),见表 3。

表 3 各组大鼠骨组织中骨修复标志物的蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative protein expression levels of bone repair markers in bone tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Runx2	Osterix	ALP	Collagen I
Control	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.20
Model	3.67 ± 0.63***	5.76 ± 1.01***	2.43 ± 0.42***	4.89 ± 0.84***
HSYA	7.36 ± 1.35###	8.49 ± 1.42###	5.77 ± 1.04###	7.55 ± 1.41###
NC	7.31 ± 1.42	8.56 ± 1.54	5.7	

表达上调, HSYA 能提高 NT-3 水平, 加快胫骨骨骺损伤修复。

组织蛋白酶 K 是硬组织代谢的重要调节因子。有研究发现, MMP-9 由间充质干细胞分泌, 帮助其进入骨损伤部位^[9]。此外, MMP-13 被报道促进间充质干细胞的骨向分化^[10]。本研究发现, 胫骨骨骺损伤模型大鼠组织蛋白酶 K、MMP-9 和 MMP-13 的表达水平均显著升高, HSYA 处理后, 三者表达水平再次升高, 在此基础上敲低 NT-3 则三者表达水平降低, 提示骨骺受损后, 骨重建开始, HSYA 能促进软骨细胞重塑, 可能通过提高 MMP 蛋白水平, 刺激间充质干细胞转移并分化实现。进一步分析成骨情况发现, BMP-2 和 TGF- β 1 指标在 HSYA 处理后上升, NT-3 敲低后下降。BMP-2 和 TGF- β 1 都属于骨源性生长因子, 其中 BMP-2 可促进成骨细胞与软骨细胞分化, 抑制破骨细胞形成。TGF- β 1 能促进 I 型胶原蛋白形成, 加速骨痂成熟, 阻止骨吸收^[11]。研究结果提示, HSYA 可能通过上调 NT-3 水平进而发挥软骨细胞重塑作用。

研究发现, Sox9 通过促进 II 型胶原蛋白表达, 参与胫骨生长板软骨细胞的增殖和分化, 软骨的发育^[12]。II 型胶原蛋白占胫骨生长板软骨组织中的绝大部分, 帮助关节软骨对抗压力, 维持形态, 也参与软骨组织的形成和代谢。X 型胶原蛋白通过与 II 型胶原蛋白发生联系, 形成网格状结构建软骨基质^[13]。本研究结果表明, HSYA 能促进骨骺损伤大鼠 Sox9、II 型胶原蛋白和 X 型胶原蛋白的表达, 下调 NT-3 则出现相反结果。进一步研究大鼠骨修复情况发现, HSYA 与 NT-3 对 Runx2、Osterix、ALP 和 I 型胶原蛋白有相似调控作用。研究结果提示, HSYA 促进骨修复过程的进行和软骨的形成, 主要是通过上调 NT-3 实现的。

Notch1 信号通路参与调节成骨细胞和破骨细胞的分化; Jagged1 为 Notch1 信号通路在骨骼系统中表达最多的配体, 在骨痂组织的血管内皮细胞中表达上调, 参与调节骨修复过程中血管生成, 进而调控骨折愈合^[14]。本研究发现, 骨骺损伤大鼠骨组织中 Notch1 和 Jagged1 蛋白的表达水平均升高, HSYA 处理再次上调其水平, 敲低 NT-3 则抑制 Notch1 信号通路相关蛋白表达, 提示 HSYA 可能通过上调 NT-3

水平, 激活 Notch1 信号通路, 促进软骨形成以及骨形成过程, 帮助骨骺损伤修复。

参考文献:

- [1] 文小林, 岳莹, 顾靖钊, 等. 3D 打印技术辅助治疗青少年胫骨远端骨骺骨折的临床进展[J]. 局解手术学杂志, 2023, 32(12): 1082—1086.
- [2] 陈莹, 刘健, 梁亚杰, 等. 羟基红花黄色素 A 减轻双环己酮草酰二胺小鼠髓鞘脱失的机制[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(25): 5311—5319.
- [3] 王树东, 黄医明, 郭海清, 等. 针刺经筋点对膝关节骨性关节炎 Notch 信号通路调控机制及 Notch1、Notch2、Jagged1、Jagged2 蛋白表达的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11): 33—36, 266.
- [4] 樊萍, 冯秀媛, 胡楠, 等. 神经营养因子 3 抑制地塞米松诱导小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡的作用及机制[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(22): 1698—1702.
- [5] 郑志刚, 张伦广, 潘三元, 等. 活血止痛汤联合脂肪填充对大鼠胫骨骨骺损伤的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2024, 32(3): 12—16.
- [6] 张莎莎, 王娜, 李勇军. 葡萄籽提取物抑制大鼠生长板软骨细胞凋亡促进胫骨生长[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(16): 2494—2499.
- [7] 向乐, 余伟. 丹参注射液对大鼠下颌骨骨折愈合过程中 BMP-2 和 TGF- β 1 的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(22): 4—8.
- [8] 沈灵杰, 秦超, 刘合飞. 自体富血小板血浆通过 Notch1 调节骨质疏松大鼠骨折愈合[J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(2): 181—186, 209.
- [9] 李汪洋. 桃红四物汤调控间充质干细胞归巢在骨折愈合中的分子机制研究[D]. 湖南长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [10] 邓懿轩. MMP13 通过 HIF1 α -Wnt/ β -catenin 轴促进 BMP9 诱导小鼠胚胎成纤维细胞骨向分化研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2022.
- [11] 温成, 王希杰, 韩俊成, 等. 髓内钉固定与微创经皮钢板内固定对胫腓骨骨折患者血小板活化及血清转化生长因子- β 1 和骨形态发生蛋白-2 影响的比较[J]. 中国骨伤, 2023, 36(11): 1100—1106.
- [12] 毛瑞, 何影, 代自超, 等. SOX9 在 SD 大鼠胚胎发育髌突软骨与胫骨生长板软骨中的时间表达研究[J]. 昆明医科大学学报, 2022, 43(2): 1—6.
- [13] 李建, 李大鹏, 赵国阳. 骨关节炎患者关节软骨中胶原蛋白表达变化的研究进展[J]. 中国骨与关节杂志, 2020, 9(2): 148—152.
- [14] 过丽强, 赵世天,