

# 原花青素对兔激素性股骨头坏死的改善作用及机制研究<sup>Δ</sup>

吴春立<sup>1\*</sup>, 刘利婷<sup>2</sup>, 赵旭婷<sup>2</sup>, 孙瑞芬<sup>2</sup>, 王文选<sup>3#</sup>(1. 内蒙古医科大学第二附属医院血管外科, 呼和浩特 010010; 2. 内蒙古医科大学第二附属医院骨科, 呼和浩特 010010; 3. 内蒙古医科大学第二附属医院创伤外科中心A区, 呼和浩特 010010)

中图分类号 R966;R681.8 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)20-2519-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.20.06



**摘要** 目的 基于受体相互作用蛋白激酶1(RIPK1)/RIPK3/混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)信号通路,研究原花青素(PACs)对兔激素性股骨头坏死(SONFH)的改善作用及机制。方法 采用注射大肠杆菌内毒素+甲泼尼龙的方法复制SONFH模型兔。将造模成功的兔随机分为模型组(Model组,生理盐水)、PACs低剂量组(PACs-L组,11 mg/kg)、PACs高剂量组(PACs-H组,22 mg/kg)、PACs高剂量+RIPK1激活剂(RIPK1重组蛋白,简称“rRIPK1”)组(PACs-H+rRIPK1组,22 mg/kg PACs+4 μg/kg rRIPK1),另设置对照组(Control组,生理盐水),每组6只。各药物组兔每天灌胃/注射相应药液1次,持续干预4周。末次给药后,检测兔血清中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)含量;检测兔股骨微结构[骨密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数(Tb.N)和骨小梁分离度(Tb.Sp)]变化;观察兔股骨组织的病理学形态;检测兔股骨组织细胞凋亡情况;检测兔股骨组织中血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白2(BMP2)mRNA的表达水平;检测兔股骨组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关蛋白的表达水平。结果 与Control组比较,Model组兔血清中TNF-α、IL-6含量和Tb.Sp、空骨陷窝率、细胞凋亡率以及股骨组织中RIPK1、RIPK3、MLKL蛋白的磷酸化水平均显著升高( $P<0.05$ );BMD、Tb.Th、Tb.N,股骨组织中VEGF、BMP2 mRNA的表达水平以及胱天蛋白酶8(caspase-8)的表达水平均显著降低( $P<0.05$ );股骨组织中骨细胞分布不均,骨小梁排列稀疏。与Model组比较,PACs各剂量组上述定量指标( $P<0.05$ )和病理变化均显著改善。与PACs-H组比较,PACs-H+rRIPK1组上述定量指标( $P<0.05$ )和病理变化均显著逆转。结论 PACs可改善兔SONFH,其作用机制可能与抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路激活、抑制股骨组织细胞凋亡、促进血管新生有关。

**关键词** 原花青素;激素性股骨头坏死;RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路;血管新生

## Study on the improvement effects and mechanism of proanthocyanidins on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rabbits

WU Chunli<sup>1</sup>, LIU Liting<sup>2</sup>, ZHAO Xuting<sup>2</sup>, SUN Ruifen<sup>2</sup>, WANG Wenxuan<sup>3</sup>(1. Dept. of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, China; 2. Dept. of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, China; 3. Area A, Trauma Surgery Center, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the improvement effects and mechanism of proanthocyanidins (PACs) on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH) in rabbits based on the receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1)/RIPK3/mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) signaling pathway. **METHODS** SONFH model in rabbits was induced by injecting *Escherichia coli* endotoxin+methylprednisolone. The successfully modeled rabbits were randomly divided into Model group (normal saline), low-dose PACs group (PACs-L group, 11 mg/kg), high-dose PACs group (PACs-H group, 22 mg/kg), high-dose PACs+RIPK1 activator (rRIPK1) group (PACs-H+rRIPK1 group, 22 mg/kg PACs+4 μg/kg rRIPK1), along with a control group (normal saline), with 6 rabbits in each group. Each administration group was given relevant medicine once a day intragastrically/via injection, for 4 consecutive weeks. After the last administration, the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) in rabbit serum were measured. The changes in the microstructure of rabbit femurs, including bone mineral density (BMD),

<sup>Δ</sup>基金项目 内蒙古自治区自然科学基金项目(No.2021LHMS08-048, No.2022QN08004)

\*第一作者 副主任医师,硕士。研究方向:骨与关节疾病的基础与临床研究。E-mail: hplzr@163.com

#通信作者 副主任医师,硕士。研究方向:激素性股骨头坏死的基础及临床研究。E-mail: aiaaym@163.com

trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), and trabecular separation (Tb.Sp) were examined. The histopathological features of rabbit femoral tissues were observed, and the apoptotic status of cells within the rabbit femoral tissues was detected. The mRNA expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone

morphogenetic protein 2 (BMP2) in rabbit femoral tissues were determined. The expressions of RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway-related proteins in femoral tissues were detected. **RESULTS** Compared with the Control group, serum contents of TNF- $\alpha$  and IL-6, Tb.Sp, empty bone cavity rate, cell apoptosis rate, phosphorylation levels of RIPK1, RIPK3 and MLKL in femoral tissue were significantly increased in the Model group ( $P<0.05$ ). BMD, Tb.Th, Tb.N, as well as the mRNA expression of VEGF and BMP2, along with protein expression of caspase-8, in the femoral tissues were all decreased ( $P<0.05$ ). The bone cells in the femoral tissue were unevenly distributed, and the trabeculae were arranged sparsely. Compared with the Model group, the aforementioned quantitative indicators ( $P<0.05$ ) and pathological changes in all dosage groups of PACs showed significant improvements. Compared with the PACs-H group, the aforementioned quantitative indicators ( $P<0.05$ ) and pathological changes in the PACs-H+rRIPK1 group showed significant reversal. **CONCLUSIONS** PACs can ameliorate SONFH in rabbits, and its mechanism of action may be related to the inhibition of the activation of the RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway, suppression of apoptosis in femoral tissue cells, and promotion of angiogenesis.

**KEYWORDS** proanthocyanidins; steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway; angiogenesis

股骨头坏死是一种难治性骨科疾病,其中由激素(如类固醇)诱导的股骨头坏死[即激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)]是非创伤性股骨头坏死最常见的类型,以骨细胞缺血、坏死,骨小梁骨折,股骨头塌陷和关节功能障碍为主要特征<sup>[1-2]</sup>。目前,针对SONFH的治疗药物存在一定副作用,如双膦酸盐可能导致颌骨坏死、抗凝药物可增加出血风险<sup>[3]</sup>。因此,寻找新的SONFH治疗药物具有重要意义。

原花青素(proanthocyanidins, PACs)是一大类多酚类化合物的总称,具有抗炎、抗凋亡等药理活性<sup>[3]</sup>。相关体外研究显示,PACs可抑制地塞米松诱导的成骨细胞凋亡,具有改善股骨头坏死的潜力,但具体作用机制有待进一步完善<sup>[4]</sup>。坏死是一种细胞程序性死亡方式,由受体相互作用蛋白激酶1(receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1)/RIPK3/混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)信号通路介导<sup>[5]</sup>。研究表明,糖皮质激素可通过促进RIPK1、RIPK3表达而激活细胞程序性死亡途径,从而加剧大鼠股骨头坏死<sup>[6]</sup>。然而,PACs是否可通过调控RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路来改善SONFH尚不明确。基于此,本研究拟基于RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路,通过构建SONFH模型兔来探究PACs对SONFH的改善作用及机制,以期为临床治疗SONFH提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Quantum GX型小动物Micro-CT影像系统(德国PerkinElmer公司)、800 TS型酶标仪(广州仪新生物科技有限公司)、Leica型光学显微镜(徕卡显微系统(上海)贸易有限公司)、CX41-32RFL

型荧光显微镜(日本Olympus公司)、AlphaImager HP型凝胶成像系统(美国ProteinSimple公司)、QuantStudio 5型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

PACs原料药(批号P413229)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;RIPK1激活剂[RIPK1重组蛋白(简称“rRIPK1”);批号HY-I2479,纯度 $\geq 98\%$ ]购自美国MedChemExpress公司;大肠杆菌内毒素(批号8000P)购自上海雅吉生物科技有限公司;甲泼尼龙(批号A35511)购自上海维亦特生物科技有限公司;青霉素钠(批号A2638)购自北京康瑞纳生物科技有限公司;反转录试剂盒(批号AK3495)购自浙江麦飞生物科技有限公司;肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为10268、20187)均购自上海莱生物科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号20087CR)购自上海碧云天生物技术有限公司;TUNEL试剂盒(批号0003)购自武汉伊莱瑞特科技股份有限公司;兔抗磷酸化RIPK1(phosphorylated RIPK1, p-RIPK1)、RIPK1、磷酸化RIPK3(phosphorylated RIPK3, p-RIPK3)、RIPK3、磷酸化MLKL(phosphorylated-MLKL, p-MLKL)、MLKL、胱天蛋白酶8(caspase-8)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号分别为ab316924、ab300617、ab284393、ab316957、ab196436、ab184718、ab247233、ab181602)均购自英国Abcam公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(货号FNSA-0004)购自武汉菲恩生物科技有限公司;血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)的

mRNA 扩增引物由北京擎科生物科技有限公司设计并合成,具体信息见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

目的基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
VEGF	正向:GCAGACCAAGAAAGACAG	103
	反向:TTGCAGGAACATTTACACG	
BMP2	正向:GAGAAAAGCGTCAAGCGAAAC	121
	反向:AGTAAAAGCGTGATACCCCG	
$\beta$ -actin	正向:TGGCTCTAACAGTC CGCCTAG	119
	反向:AGTGCGACGTGGACATCCG	

### 1.3 实验动物

本研究所用动物为3月龄新西兰兔,共36只,体重约2.3~2.5 kg,由内蒙古大学提供,动物生产许可证号为SCXK(蒙)2020-0006。兔饲养环境温度为20~24℃,相对湿度为40%~60%,自由活动、采食。本实验经内蒙古大学生命科学学院动物伦理委员会批准(批准文号IMU-2024-mouse-080)。

## 2 方法

### 2.1 造模与分组

将兔适应性喂养7 d后,随机选取27只作为造模组,按下述方法造模:于兔耳缘静脉注射大肠杆菌内毒素(10  $\mu$ g/kg),24 h后再次注射1次;随后于臀中肌注射甲泼尼龙(20 mg/kg),每隔24 h注射1次,共注射3次;另外,每周肌内注射青霉素钠(5万单位/kg)2次,预防感染<sup>[7]</sup>。另取9只兔,以生理盐水代替药物,作为对照组(Control组)。5周后,从造模组和Control组中分别选取3只兔,采用Micro-CT影像系统检测其股骨骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁数(trabecular number, Tb.N)和骨小梁分离度(trabecular separation, Tb.Sp),并通过HE染色法观察其股骨组织的病理变化。当造模组兔出现骨小梁排列稀疏、骨细胞数量减少、空骨陷窝数增多,且Tb.Th、Tb.N较Control组兔降低,Tb.Sp较Control组兔升高时,表明SONFH模型兔构建成功<sup>[8]</sup>。将造模成功的24只兔按随机数字表法分为模型组(Model组)、PACs低剂量组(PACs-L组)、PACs高剂量组(PACs-H组)、PACs高剂量+RIPK1激活剂组(PACs-H+rRIPK1组),每组6只。根据动物与人的等效剂量进行换算,PACs-L组、PACs-H组兔分别灌胃11、22 mg/kg PACs<sup>[6]</sup>并尾静脉注射等体积生理盐水,每天1次;PACs-H+rRIPK1组兔在灌胃22 mg/kg PACs的同时尾静脉注射4  $\mu$ g/kg rRIPK1<sup>[9]</sup>,每天1次;Control组和Model组兔灌胃并尾静脉注射等体积生理盐水,每天1次。各组兔均被持续干预4周。

### 2.2 兔血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量检测

末次给药结束后,对各组兔进行耳缘静脉采血,离心后取上清液,采用ELISA法以酶标仪检测其血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量。

### 2.3 兔股骨微结构检测

采完血后处死各组兔,分离出双侧股骨;清洗后,取部分右侧股骨(剩余部分冻存,备用)放入多聚甲醛中固定48 h,然后使用Micro-CT影像系统检测其股骨的骨密度(bone mineral density, BMD)、Tb.Th、Tb.N和Tb.Sp。

### 2.4 兔股骨组织的病理学形态观察

取各组兔左侧股骨,用10%乙二胺四乙酸进行脱钙处理,然后进行常规石蜡包埋、切片;取部分切片进行HE染色,再利用光学显微镜观察股骨组织的病理学形态,并计算空骨陷窝率:空骨陷窝率=空骨陷窝数/骨陷窝数 $\times$ 100%。

### 2.5 兔股骨组织细胞凋亡情况检测

取“2.4”项下各组兔剩余切片,经脱蜡、抗原修复后,加入0.1% Triton X-100试剂进行通透处理,再以5%牛血清白蛋白封闭后,滴加TUNEL反应液孵育,再加入4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液复染细胞核;封片后,采用荧光显微镜观察细胞凋亡情况(凋亡细胞呈绿色荧光),并计算细胞凋亡率:细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。

### 2.6 兔股骨组织中VEGF、BMP2 mRNA表达检测

取“2.3”项下各组兔冻存的右侧股骨组织,研磨成粉,取适量,加入Trizol试剂提取总RNA;将上述总RNA反转录成cDNA后,以此cDNA为模板进行PCR扩增。PCR扩增体系(20  $\mu$ L)为2 $\times$ SYBR Green Mix 10  $\mu$ L、正/反向引物各0.8  $\mu$ L、cDNA模板2  $\mu$ L、无核酸酶水6.4  $\mu$ L。PCR扩增程序为95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火和延伸30 s,共40个循环。以 $\beta$ -actin为内参,采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算兔股骨组织中VEGF、BMP2 mRNA的表达水平(结果以Control组为参照进行归一化处理)。

### 2.7 兔股骨组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关蛋白表达检测

取“2.6”项下各组兔右侧股骨组织粉末,加入RIPA裂解液充分裂解,离心后取上清蛋白;将蛋白变性处理后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜,加入封闭液封闭;分别加入p-RIPK1、RIPK1、p-RIPK3、RIPK3、p-MLKL、MLKL、caspase-8、GAPDH一抗(稀释比例均为1:1 000),于4℃下孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例为1:1 000),于室温下孵育1 h;洗膜后,以ECL试剂显影,并使用凝胶成像系统成像。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的条带灰度值比值表示目的蛋白的表达水平,以p-RIPK1与RIPK1、p-RIPK3与RIPK3、p-MLKL与MLKL的表达水平比值表示RIPK1、RIPK3、MLKL蛋白的磷酸化水平。

## 2.8 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计分析。经 Shapiro-Wilk 检验和 Levene 检验分析后,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验(方差齐时)。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 PACs对兔血清中炎症因子含量的影响

与 Control 组比较,Model 组兔血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量均显著升高( $P<0.05$ );与 Model 组比较,PACs-L 组和 PACs-H 组兔血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量均显著降低( $P<0.05$ ),且 PACs-H 组降低效果更明显( $P<0.05$ );与 PACs-H 组比较,PACs-H+rRIPK1 组兔血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表 2。

表 2 各组兔血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ , mmol/L)

组别	TNF- $\alpha$	IL-6
Control 组	670.95 $\pm$ 38.04	127.89 $\pm$ 18.19
Model 组	931.28 $\pm$ 42.10 <sup>a</sup>	211.16 $\pm$ 14.36 <sup>a</sup>
PACs-L 组	846.06 $\pm$ 56.77 <sup>b</sup>	180.97 $\pm$ 13.25 <sup>b</sup>
PACs-H 组	737.14 $\pm$ 49.58 <sup>bc</sup>	152.99 $\pm$ 11.08 <sup>bc</sup>
PACs-H+rRIPK1 组	881.37 $\pm$ 50.26 <sup>d</sup>	196.08 $\pm$ 17.13 <sup>d</sup>

a: 与 Control 组比较,  $P<0.05$ ; b: 与 Model 组比较,  $P<0.05$ ; c: 与 PACs-L 组比较,  $P<0.05$ ; d: 与 PACs-H 组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.2 PACs对兔股骨微结构的影响

与 Control 组比较,Model 组兔 BMD、Tb.Th、Tb.N 均显著降低,Tb.Sp 显著升高( $P<0.05$ );与 Model 组比较,PACs-L 组和 PACs-H 组兔 BMD、Tb.Th、Tb.N 均显著升高,Tb.Sp 均显著降低( $P<0.05$ ),且 PACs-H 组上述改善效果更明显( $P<0.05$ );与 PACs-H 组比较,PACs-H+rRIPK1 组兔 BMD、Tb.Th、Tb.N 均显著降低,Tb.Sp 显著升高( $P<0.05$ )。结果见表 3、图 1。

表 3 各组兔股骨微结构相关指标比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	BMD/(g/cm <sup>3</sup> )	Tb.Th/mm	Tb.Sp/mm	Tb.N/(个/mm)
Control 组	0.61 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.04
Model 组	0.43 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.68 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
PACs-L 组	0.49 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.57 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.35 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
PACs-H 组	0.56 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	0.25 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	0.44 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup>
PACs-H+rRIPK1 组	0.47 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.61 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>	0.31 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>

a: 与 Control 组比较,  $P<0.05$ ; b: 与 Model 组比较,  $P<0.05$ ; c: 与 PACs-L 组比较,  $P<0.05$ ; d: 与 PACs-H 组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.3 PACs对兔股骨组织的病理学形态影响

Control 组兔股骨组织结构正常、骨细胞分布均匀,空骨陷窝率为 (11.83  $\pm$  1.45)%。与 Control 组比较,Model 组兔股骨组织中骨小梁排列稀疏,骨细胞分布不均,空骨陷窝率 [(28.67  $\pm$  2.21)%] 显著升高 ( $P<0.05$ )。与 Model 组比较,PACs-L 组和 PACs-H 组兔股骨组织中骨小梁排列密集,骨细胞数量增多,空骨陷窝率 [分别为 (21.33  $\pm$  1.67)%、(15.50  $\pm$  1.63)%] 均显著降低 ( $P<0.05$ ),且 PACs-H 组降低效果更明显 ( $P<0.05$ )。与 PACs-H 组比较,PACs-H+rRIPK1 组兔股骨组织中骨小梁排列稀疏,骨细胞数量减少,空骨陷窝率 [(24.17  $\pm$  2.15)%] 显著升高 ( $P<0.05$ )。结果见图 2。

### 3.4 PACs对兔股骨组织细胞凋亡的影响

与 Control 组 [细胞凋亡率为 (2.52  $\pm$  0.88)%] 比较,Model 组兔股骨组织细胞凋亡率 [(31.60  $\pm$  5.05)%] 显著升高 ( $P<0.05$ );与 Model 组比较,PACs-L 组和 PACs-H 组兔股骨组织细胞凋亡率 [分别为 (24.73  $\pm$  4.36)%、(13.24  $\pm$  2.17)%] 均显著降低 ( $P<0.05$ ),且 PACs-H 组降低效果更明显 ( $P<0.05$ );与 PACs-H 组比较,PACs-H+rRIPK1 组兔股骨组织细胞凋亡率 [(28.12  $\pm$  5.35)%] 显著升高 ( $P<0.05$ )。结果见图 3。

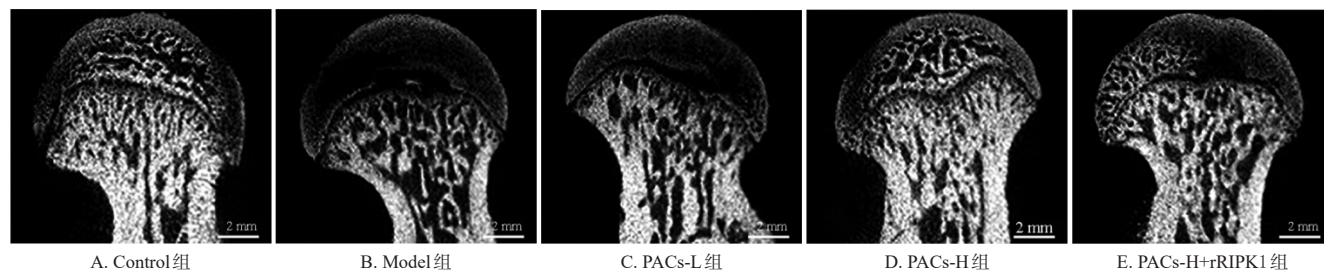


图 1 各组兔股骨微结构的显微图

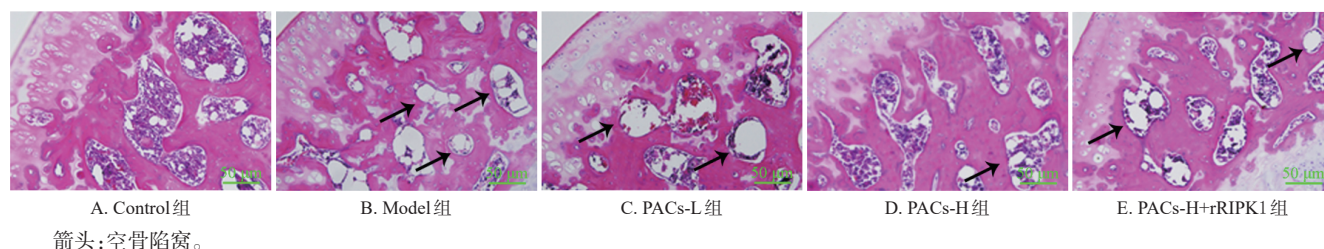


图 2 各组兔股骨组织的病理学形态显微图(HE 染色)

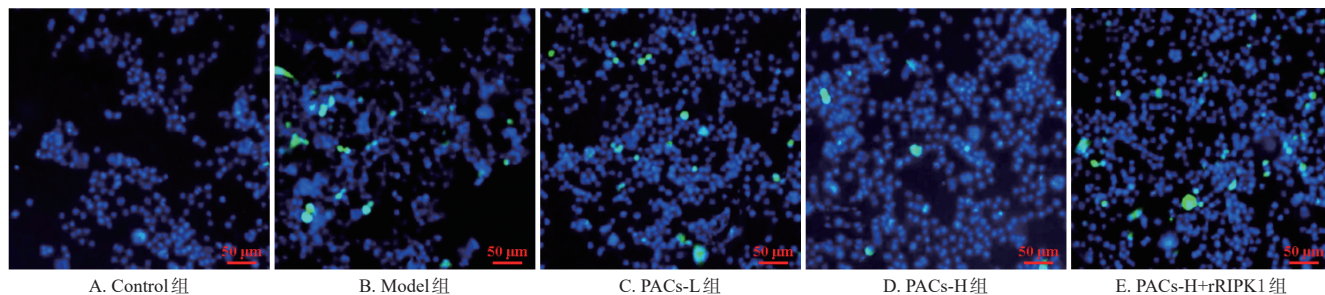


图3 各组兔股骨组织细胞凋亡情况的显微图(TUNEL染色)

### 3.5 PACs对兔股骨组织中VEGF、BMP2 mRNA表达的影响

与Control组比较,Model组兔股骨组织中VEGF、BMP2 mRNA表达水平均显著降低( $P<0.05$ );与Model组比较,PACs-L组和PACs-H组兔股骨组织中VEGF、BMP2 mRNA表达水平均显著升高( $P<0.05$ ),且PACs-H组升高效果更明显( $P<0.05$ );与PACs-H组比较,PACs-H+rRIPK1组兔股骨组织中VEGF、BMP2 mRNA表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表4。

表4 各组兔股骨组织中VEGF、BMP2 mRNA和通路相关蛋白表达情况比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	VEGF mRNA	BMP2 mRNA	p-RIPK1/ RIPK1	p-RIPK3/ RIPK3	p-MLKL/ MLKL	caspase-8/ GAPDH
Control组	1.01±0.02	0.99±0.02	0.40±0.02	0.32±0.05	0.17±0.03	0.96±0.06
Model组	0.58±0.07 <sup>a</sup>	0.62±0.05 <sup>a</sup>	0.92±0.05 <sup>a</sup>	0.97±0.07 <sup>a</sup>	0.89±0.07 <sup>a</sup>	0.47±0.05 <sup>a</sup>
PACs-L组	0.71±0.05 <sup>b</sup>	0.77±0.08 <sup>b</sup>	0.78±0.06 <sup>b</sup>	0.71±0.08 <sup>b</sup>	0.67±0.08 <sup>b</sup>	0.65±0.08 <sup>b</sup>
PACs-H组	0.94±0.07 <sup>bc</sup>	0.92±0.06 <sup>bc</sup>	0.54±0.06 <sup>bc</sup>	0.48±0.05 <sup>bc</sup>	0.31±0.06 <sup>bc</sup>	0.88±0.07 <sup>bc</sup>
PACs-H+rRIPK1组	0.67±0.06 <sup>d</sup>	0.71±0.06 <sup>d</sup>	0.83±0.07 <sup>d</sup>	0.78±0.06 <sup>d</sup>	0.74±0.08 <sup>d</sup>	0.56±0.07 <sup>d</sup>

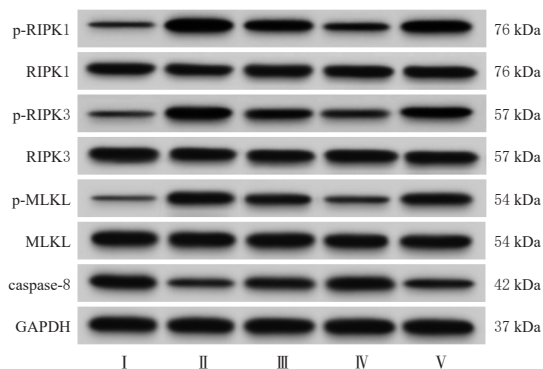
a: 与Control组比较, $P<0.05$ ; b: 与Model组比较, $P<0.05$ ; c: 与PACs-L组比较, $P<0.05$ ; d: 与PACs-H组比较, $P<0.05$ 。

### 3.6 PACs对兔股骨组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关蛋白表达的影响

与Control组比较,Model组兔股骨组织中RIPK1、RIPK3、MLKL蛋白的磷酸化水平均显著升高,caspase-8蛋白的表达水平显著降低( $P<0.05$ );与Model组比较,PACs-L组和PACs-H组兔股骨组织中RIPK1、RIPK3、MLKL蛋白的磷酸化水平均显著降低,caspase-8蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.05$ ),且PACs-H组上述改善效果更明显( $P<0.05$ );与PACs-H组比较,PACs-H+rRIPK1组兔股骨组织中RIPK1、RIPK3、MLKL蛋白的磷酸化水平均显著升高,caspase-8蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ )。结果见图4、表4。

## 4 讨论

股骨头坏死,又称股骨头缺血性坏死,主要由创伤、酒精和激素等因素诱导;SONFH是非创伤性股骨头坏死最常见的类型,其早期表现为髋关节钝痛、隐痛,伴运动后髋关节疼痛加重,严重者可出现活动受限、跛行;如



I: Control组; II: Model组; III: PACs-L组; IV: PACs-H组; V: PACs-H+rRIPK1组。

图4 各组兔股骨组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关蛋白表达的电泳图

果不及时治疗,可能发生髋关节股骨头缺血性坏死,严重影响患者的行动<sup>[1]</sup>。

研究表明,炎症在SONFH进展中具有重要影响:炎症因子的大量释放不仅可通过刺激破骨细胞活化来导致骨形成减少,还可通过抑制股骨血流供应而最终诱发股骨坏死<sup>[10]</sup>。既往研究表明,PACs可促进牙周韧带干细胞向成骨细胞转化,增强内源性牙槽骨再生<sup>[11]</sup>;可通过抑制成骨细胞凋亡,改善类固醇诱导的大鼠股骨病理损伤<sup>[6]</sup>。这表明PACs对骨相关疾病具有一定的改善效果。本研究结果显示,经PACs干预后,SONFH模型兔血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量均显著降低;股骨BMD、Tb.Th、Tb.N均显著升高,Tb.Sp显著降低;骨小梁排列密集,骨细胞数量增多,空骨陷窝率显著降低。这提示,PACs对兔SONFH具有明显的改善作用。

SONFH可导致股骨头的血流供应中断,从而促进骨细胞凋亡和坏死,进而导致关节塌陷<sup>[1]</sup>。VEGF是一种由血小板、巨噬细胞、成骨细胞分泌的血管生长因子,在血管生成中起关键作用<sup>[2]</sup>。Pan等<sup>[12]</sup>研究发现,上调VEGF表达可促进血管生成,从而改善SONFH。此外,BMP2对骨损伤的修复具有重要作用<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,经PACs干预后,模型兔股骨组织中VEGF、BMP2 mRNA表达水平均显著升高。这提示,PACs可促进模型兔的血管生成及骨形成,从而恢复坏死股骨头的血流

供应,修复骨组织。

细胞凋亡贯穿于股骨头坏死的整个病理过程:在股骨头坏死的早期阶段,RIPK1与RIPK3结合形成坏死复合体,该复合体可招募磷酸化的效应蛋白MLKL,磷酸化的MLKL会形成寡聚物,并作为非特异性孔嵌入细胞膜和阳离子通道中,干扰细胞正常的动力学行为,最终导致细胞破裂<sup>[5]</sup>。caspase-8是凋亡通路的关键分子,可通过切割RIPK1或RIPK3而阻断细胞坏死性凋亡<sup>[14]</sup>。目前已有研究显示,抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路活化可减轻糖皮质激素诱导股骨头坏死过程中的细胞凋亡<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,与Control组比较,Model组兔股骨组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路蛋白的磷酸化水平和股骨组织细胞凋亡率均显著升高,caspase-8蛋白的表达显著下调,表明RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路激活可能与股骨细胞坏死性凋亡存在关联。经PACs干预后,模型兔股骨组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路蛋白的磷酸化水平和股骨组织细胞凋亡率均显著降低,caspase-8蛋白的表达显著上调,提示PACs可能通过抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路来抑制股骨细胞的坏死性凋亡。为进一步探究PACs与RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路的关系,本研究在高剂量PACs的基础上给予rRIPK1(RIPK1激活剂)进行联合干预,结果显示,高剂量PACs对模型兔的改善作用被rRIPK1逆转,提示PACs对SONFH的改善作用可能是通过抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路激活来实现的。

综上所述,PACs可能通过抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路激活,抑制股骨组织细胞凋亡,促进血管新生,从而改善兔SONFH。

## 参考文献

- [1] ZHANG J, CAO J Z, LIU Y F, et al. Advances in the pathogenesis of steroid-associated osteonecrosis of the femoral head[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(6): 667.
- [2] PENG P, HE W, ZHANG Y X, et al. CircHIPK3 promotes bone microvascular endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis by targeting miR-7 and KLF4/VEGF signaling in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2023, 32(1): 43-55.
- [3] ZHAO Y, JIANG C Q, LU J Y, et al. Research progress of proanthocyanidins and anthocyanidins[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(6): 2552-2577.
- [4] LI H, ZHANG Y F, HAO Y Q, et al. Proanthocyanidins inhibit osteoblast apoptosis via the PI3K/AKT/Bcl-xL path-

way in the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats[J]. *Nutrients*, 2023, 15(8): 1936.

- [5] FAN X Y, XU X, WU X J, et al. The protective effect of DNA aptamer on osteonecrosis of the femoral head by alleviating TNF- $\alpha$ -mediated necroptosis via RIP1/RIP3/MLKL pathway[J]. *J Orthop Transl*, 2022, 36: 44-51.
- [6] FENG M, ZHANG R R, ZHANG M M, et al. Administration of necrostatin-1 ameliorates glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats[J]. *J Mol Histol*, 2023, 54(3): 207-216.
- [7] 徐玉娟,刘园园,陶莹,等. 艾灸对兔激素性股骨头坏死组织中IKK $\beta$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 表达的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2024, 46(5): 440-445, 452.
- [8] 杨丰合,冯桂宇,李晋玉,等. 兔激素性股骨头坏死的造模改进及结果评价[J]. *北京航空航天大学学报*, 2023, 49(7): 1755-1760.
- [9] 邹曲,符丹丹,范腾阳,等. 汉黄芩素对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠气道炎症的影响及机制[J]. *中国药房*, 2023, 34(9): 1060-1065.
- [10] YUAN N, ZHANG W Y, YANG W Z, et al. Exosomes derived from M2 macrophages prevent steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by modulating inflammation, promoting bone formation and inhibiting bone resorption[J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1): 243.
- [11] LIU Z, LI Q L, WANG X Y, et al. Proanthocyanidin enhances the endogenous regeneration of alveolar bone by elevating the autophagy of PDLSCs[J]. *J Periodontal Res*, 2023, 58(6): 1300-1314.
- [12] PAN F Y, LI Z M, LIU X W, et al. Effect of strontium ranelate on rabbits with steroid-induced osteonecrosis of femoral head through TGF- $\beta$ <sub>1</sub>/BMP2 pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(3): 1000-1006.
- [13] NOVAK S, MADUNIC J, SHUM L, et al. PDGF inhibits BMP2-induced bone healing[J]. *NPJ Regen Med*, 2023, 8(1): 3.
- [14] YUAN J Y, OFENGEIM D. A guide to cell death pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(5): 379-395.
- [15] XU X, FAN X Y, WU X J, et al. Luteolin ameliorates necroptosis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head via RIPK1/RIPK3/MLKL pathway based on network pharmacology analysis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 661: 108-118.

(收稿日期:2025-05-26 修回日期:2025-09-19)

(编辑:唐晓莲)