

DOI:10.16781/j.CN31-2187/R.20211116

· 论 著 ·

## 冬凌草甲素对海水冲溺伤骨折愈合的影响及作用机制

李富东, 孔凡奇, 孙凯强, 孙璟川, 史建刚\*

海军军医大学(第二军医大学)第二附属医院脊柱外科二病区, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 探究冬凌草甲素对海水冲溺伤骨折愈合的影响及作用机制。**方法** 取72只6~8周龄雄性C57BL/6小鼠构建小鼠海水冲溺伤骨折模型,并将其随机分为骨折组、骨折+冬凌草甲素组、冲溺伤骨折组和冲溺伤骨折+冬凌草甲素组,每组18只。术后14d拍摄股骨X线片并在术后21d通过股骨机械强度试验观察冬凌草甲素对骨折愈合影响的表型变化。术后14d取小鼠骨痂组织,采用qPCR和蛋白质印迹法检测M1型巨噬细胞标志分子诱导型一氧化氮合酶(iNOS),M2型巨噬细胞标志分子CD206,炎症因子环氧合酶2(COX2)、IL-1 $\beta$ ,促凋亡因子cleaved caspase 3、Bcl-2相关X蛋白(Bax)及抗凋亡因子Bcl-2的表达水平。术后7d,采用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色观察破骨细胞活化情况。**结果** X线片及股骨机械强度试验结果显示冲溺伤骨折组小鼠骨折愈合减弱,而冬凌草甲素改善了冲溺伤骨折愈合并提高了股骨承受的扭转力( $P < 0.01$ )。qPCR和蛋白质印迹法检测结果显示,与冲溺伤骨折组相比,冲溺伤骨折+冬凌草甲素组小鼠骨痂组织中iNOS、COX2、IL-1 $\beta$ 、cleaved caspase 3、Bax的mRNA和蛋白表达水平均降低,CD206、Bcl-2的mRNA和蛋白表达水平均升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。TRAP染色结果显示,与冲溺伤骨折组相比,冲溺伤骨折+冬凌草甲素组小鼠软骨-骨边界附近破骨细胞数量减少( $P < 0.01$ )。**结论** 冬凌草甲素通过增强抗炎性的M2型巨噬细胞极化和抑制促炎性的M1型巨噬细胞极化减轻骨折后的炎症反应、减少细胞凋亡、抑制破骨细胞过度激活,从而促进海水冲溺伤骨折愈合。

**[关键词]** 海水浸泡;开放性骨折;冬凌草甲素;骨折愈合;极化;炎症;破骨细胞;细胞凋亡

**[中图分类号]** R 826.6; R 683

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 2097-1338(2022)08-0867-07

### Effect and mechanism of oridonin on healing of bone fracture with seawater immersion

LI Fu-dong, KONG Fan-qi, SUN Kai-qiang, SUN Jing-chuan, SHI Jian-gang\*

The Second Ward, Department of Spinal Surgery, The Second Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect and mechanism of oridonin (Ori) on the healing of bone fracture with seawater immersion (BFSI). **Methods** A total of 72 male C57BL/6 mice (6-8 weeks old) were used to construct BFSI model mice, and then they were randomly divided into bone fracture (BF) group, BF+Ori group, BFSI group, and BFSI+Ori group, with 18 mice in each group. X-ray of femur was taken 14 d after operation and femur mechanical strength test was performed to observe the phenotypic changes of Ori on fracture healing 21 d after operation. The callus tissues of mice were harvested 14 d after operation. The expression levels of the M1 macrophage marker (inducible nitric oxide synthase [iNOS]), M2 macrophage marker CD206, inflammatory factors (cyclooxygenase 2 [COX2] and interleukin [IL]-1 $\beta$ ), pro-apoptotic factors (cleaved cysteine aspartic acid specific protease [caspase 3] and Bcl-2-associated X protein [Bax]) and anti-apoptotic factor (B-cell lymphoma 2 [Bcl-2]) were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blotting. The activation of osteoclasts was observed by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining 7 d after operation. **Results** The results of X-ray and femur mechanical strength test showed that the fracture healing was significantly weakened in the BFSI group, while Ori significantly improved the healing of BFSI and increased the torsion force of the femur (all  $P < 0.01$ ). The results of qPCR and Western blotting showed that the mRNA and protein expression of iNOS, COX2, IL-1 $\beta$ , cleaved caspase 3 and Bax in the callus tissues of mice was significantly decreased, while the mRNA and protein expression of CD206 and Bcl-2 was significantly increased in the BFSI+Ori group compared with the BFSI group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The results of TRAP staining showed that the number of osteoclasts in the vicinity of the cartilage bone boundary was significantly decreased in the BFSI+Ori group compared with the BFSI group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Oridonin can alleviate the inflammatory responses after fracture, reduce cell apoptosis, and inhibit the overactivation of osteoclasts, so as to promote the healing of BFSI by enhancing the polarization of anti-inflammatory M2 macrophages and inhibiting the polarization of pro-inflammatory M1 macrophages.

**[收稿日期]** 2021-11-03 **[接受日期]** 2022-07-01

**[作者简介]** 李富东, 硕士生. E-mail: lifudong2020@163.com

\*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885631, E-mail: changzhengspine@smmu.edu.cn

[Key words] seawater immersion; open fractures; oridonin; fracture healing; polarization; inflammation; osteoclasts; apoptosis

[Acad J Naval Med Univ, 2022, 43(8): 867-873]

海军舰载机飞行的技术难度大,飞行事故发生率高。在发生飞行事故时,飞行员会通过海面迫降或跳伞入海的方式将事故危及范围缩减到最小。然而,研究表明跳伞时的冲击力因作用于骨骼而使开放性骨折的发生风险升高<sup>[1]</sup>。飞行员坠入海水导致开放性骨折处浸泡在海水中,从而发生特殊环境下的骨折。海水具有高渗、碱性、含有特殊细菌、低温等特点,并含有大量无机盐,其钠、氯离子浓度为人体血浆的4~5倍,渗透压为血浆的5~6倍<sup>[2]</sup>。海洋细菌具有特殊性,这使得骨折后继发感染的细菌、感染特点和程度均不同于普通开放性骨折后感染<sup>[3]</sup>。因此,海水浸泡后开放性骨折的愈合过程有别于普通骨折。

海水冲溺伤骨折(bone fracture with seawater immersion, BFSI)是指在海战时躯干或肢体受到冲击力作用而发生的开放性骨折,其骨折断端在海水中浸泡导致一系列局部或全身反应。BFSI患者骨折断端在海水中浸泡会导致愈合过程中出现过度炎症反应和氧化应激等,从而使骨折愈合延迟甚至骨折不愈合。在BFSI中,骨折局部炎症反应加重会导致破骨细胞过度激活,影响早期骨折愈合过程,还会导致愈合的骨骼抵抗应力能力降低。有研究报道,常规清创、骨折固定术、抗感染治疗能一定程度减少海水浸泡骨折愈合延迟或不愈合的发生,但愈合延迟或不愈合的发生率仍高达30%<sup>[4]</sup>。因此,在常规骨折治疗基础上,探索一种能促进BFSI愈合的治疗方法对于舰载机飞行员发生BFSI后的康复有重大意义。

传统中药冬凌草的主要有效成分冬凌草甲素(oridonin, Ori)是一种以异戊二烯为基本骨架的四环二萜类化合物<sup>[5]</sup>,具有抗多种肿瘤的生物学活性<sup>[6]</sup>。近年来,人们逐渐认识到Ori强大的抗炎活性、促成骨及抑制破骨的作用,其可通过抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3炎症小体减少炎症因子释放、抑制细胞焦亡等,从而发挥抗炎活性<sup>[7]</sup>;还能通过促进骨形成和抑制骨吸收有效预防骨丢失,从而促进骨折愈合<sup>[8]</sup>。Ori对BFSI愈合的影响尚未见报道。本研究通过检测BFSI模型

小鼠在Ori作用后骨痂组织中巨噬细胞极化状态的改变和炎症因子水平的表达,以及骨痂组织中凋亡相关因子的表达水平,探究Ori对发生BFSI后骨痂形成和生物力学作用的影响。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 6~8周龄雄性C57BL/6小鼠72只购自杭州医学院[实验动物生产许可证号SCXK(浙)2019-0002],饲养于23℃动物饲养专用实验室,12h光/暗循环,自由进食、饮水。将小鼠随机分为骨折(BF)组、骨折+冬凌草甲素(BF+Ori)组、冲溺伤骨折(BFSI)组和冲溺伤骨折+冬凌草甲素(BFSI+Ori)组,每组18只。

1.2 动物模型建立 BF、BF+Ori、BFSI、BFSI+Ori组小鼠均予异氟烷吸入麻醉,手术暴露双侧股骨中段,用骨钳造成右侧股骨中段骨折,克氏针插入骨髓腔内。BF组和BF+Ori组双侧暴露伤口予以旷置3h, BFSI组和BFSI+Ori组双侧暴露伤口均浸泡于20℃海水3h[海水取自中国东海表层海水(0~0.5m,地理坐标在东经122°28'29"、北纬29°33'8"1km范围内),并进行20℃预冷恒温处理]。旷置或浸泡结束后用生理盐水冲洗、碘伏浸泡消毒伤口,逐层缝合肌肉和皮肤。术后当天, BF+Ori组和BFSI+Ori组小鼠予Ori腹腔注射( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),至处死小鼠取标本前1d停止,分别于术后7、14、21d获取各组随机6只小鼠的右侧股骨标本。

1.3 X线片检查 各组分别在术后14d随机取6只小鼠,拍摄1次右侧股骨X线片。采用5分放射学评分系统<sup>[9]</sup>评估骨折愈合情况。

1.4 股骨机械强度试验 术后21d,通过机械强度试验检测每组6只小鼠的股骨骨折后抗机械力性能。在机械测试前,将股骨两端分别嵌入聚甲基丙烯酸甲酯中以确保样本固定在正确的位置和方向,实验仪器采用扭力弹簧测力机(济南凯恩试验机制造有限公司)。

1.5 qPCR检测 各组分别于术后14d取6只拍摄股骨X线片小鼠的骨痂标本,部分标本使用

HiPure 总 RNA 提取试剂盒 (上海迈跟生物科技有限公司), 根据说明书操作指南提取骨痂组织总 RNA。使用两步法 qPCR 预混液试剂盒 (货号 R323-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 进行反转录, 反应体系为 20  $\mu$ L。在 ABI-7500 实时 PCR 系统 (美国 Applied Biosystems 公司) 上使用通用型高灵敏度染料法定量 PCR 检测试剂盒 (货号 Q711-02, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 进行 qPCR。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的相对表达量。引物序列如下: 诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, *iNOS*) 上游引物序列为 5'-CTGGCAAGCCCAAGGTCTAT-3', 下游引物序列为 5'-GGAGGCTCCGATCAATCCAG-3'; 环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, *COX2*) 上游引物序列为 5'-TGAGCATCTACGGTTTGCTG-3', 下游引物序列为 5'-TGCTTGTCTGGAACAACACTGC-3'; *IL-1 $\beta$*  上游引物序列为 5'-TGACTTCACCATGGAACCCG-3', 下游引物序列为 5'-GACCTGACTTGGCAGAGGAC-3'; cleaved caspase 3 上游引物序列为 5'-TGGGACTGATGAGGAGA-3', 下游引物序列为 5'-ACTGGATGAACCACGAC-3'; Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, *Bax*) 上游引物序列为 5'-GCGAATTGGAGATGAACTGG-3', 下游引物序列为 5'-GTGAGCGAGGCGGTGAGGAC-3'; *Bcl-2* 上游引物序列为 5'-GGTGGGGTCATGTGTGTGG-3', 下游引物序列为 5'-CAGCGGTAGGTGTGCGAAGC-3'; *CD206* 上游引物序列为 5'-CAAGCGATGTGCCTACC-3', 下游引物序列为 5'-AATGCTGTGGATACTTGCC-3'; *GAPDH* 上游引物序列为 5'-CCTTCCGTGTTCCCTAC-3', 下游引物序列为 5'-GACAACCTGGTCCTCA-3'。

1.6 蛋白质印迹法 采用蛋白质印迹法检测各组小鼠术后 14 d 获取的另一部分骨痂标本。用 RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司) 提取骨痂组织总蛋白质, 采用 BCA 蛋白测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 进行定量分析。取等量的蛋白质经 10% SDS-PAGE 分离, 然后转移到 PVDF 膜 (美国 Millipore 公司)。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 在 25  $^{\circ}$ C 封闭 2 h, 然后分别加入 *iNOS* 一抗 (英国 Abcam 公司, 货号 ab178945)、*CD206* 一抗 (美国 CST 公司, 货号 24595)、*COX2* 一抗 (美国 CST 公司, 货号 12282)、*IL-1 $\beta$*  一抗 (英国 Abcam 公司, 货号 ab254360)、*Bcl-2* 一抗 (成

都正能生物技术有限责任公司, 货号 381702)、*Bax* 一抗 (成都正能生物技术有限责任公司, 货号 200958)、cleaved caspase 3 一抗 (美国 CST 公司, 货号 9664)、*GAPDH* 一抗 (美国 CST 公司, 货号 5174) 稀释液 (稀释比例均为 1 : 500) 于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。孵育对应物种二抗。免疫标记检测使用天能成像系统 (上海天能科技有限公司)。采用 ImageJ 软件分析结果。

1.7 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色 各组分别于术后 7 d 取 6 只小鼠股骨, 采用快速钙液进行脱钙, 缺血骨组织切片。切片经二甲苯 I、II 脱蜡各 5 min, 随后经无水乙醇 I、无水乙醇 II、95% 乙醇 I、95% 乙醇 II、80% 乙醇逐步水化 (各 5 min), 然后水洗 3 min。用 TRAP 染色液 (中国塞维尔生物科技有限公司, 货号 G1050-50T) 于 37  $^{\circ}$ C 避光浸染 3 h, 用蒸馏水充分水洗; 苏木精复染 1 min, 蒸馏水充分水洗; 最后切片经梯度乙醇 (80% 乙醇、95% 乙醇 I、95% 乙醇 II、无水乙醇 II、无水乙醇 I) 逐步脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片, 置于 45  $^{\circ}$ C 烤片机中烤片 1 h。光镜下随机选择 3 个视野, 观察破骨细胞数量。采用 ImageJ 软件分析结果。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用方差分析, 然后进行方差齐性检验, 如果方差齐, 多重比较采用最小显著性差异法; 如果方差不齐则采用 Tamhane's  $T^2$  检验。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 Ori 促进 BFSI 愈合 Ori 干预过程中小鼠均未发生不良事件, X 线片显示 BF 组与 BF+Ori 组小鼠骨痂情况相近, BFSI 组小鼠骨痂比 BF 组少, 而 BFSI+Ori 组小鼠骨痂较多 (图 1A)。在 X 线片中, 5 分放射学评分系统分析结果 (图 1B) 显示, BFSI 组评分低于 BF 组 ( $P < 0.01$ ), 表明海水浸泡使小鼠骨折愈合延迟; BFSI+Ori 组小鼠评分较 BFSI 组升高 ( $P < 0.01$ ), 表明 Ori 能够较为明显地促进 BFSI 愈合。力学测试结果 (图 1C) 显示, BFSI+Ori 组小鼠股骨能够比 BFSI 组小鼠股骨承受更大的扭转力 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明, Ori 能够促进 BFSI 小鼠骨折愈合, 有利于小鼠股骨功能的恢复。



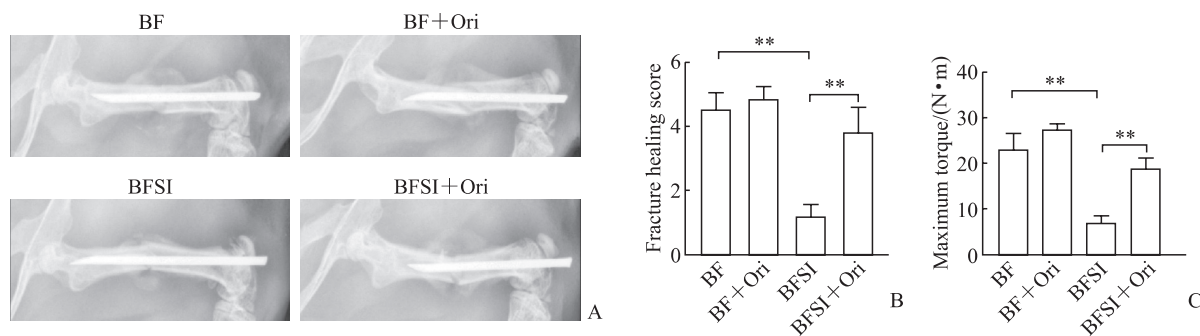


图1 Ori促进BFSI模型小鼠骨折愈合

Fig 1 Ori promotes fracture healing in BFSI mice

A: X-ray films of mice 14 d after fracture. Callus in the BFSI group was less than that in the BF group, and callus in the BFSI+Ori group was more than that in the BFSI group. B: Radiographic fracture healing scores. C: Biomechanical test of the healing fractures. \*\* $P < 0.01$ .  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . Ori: Oridonin; BFSI: Bone fracture with seawater immersion; BF: Bone fracture.

2.2 Ori改变BFSI骨痂组织巨噬细胞极化状态并减轻炎症反应 qPCR和蛋白质印迹法检测结果(图2)显示,BFSI组小鼠骨痂组织中M1型巨噬细胞标志分子iNOS、M2型巨噬细胞标志分子CD206、炎症因子COX2和IL-1 $\beta$ 的mRNA和蛋白表达与BF组相比均升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );而BFSI+Ori组小鼠骨痂组织中iNOS、COX2和IL-1 $\beta$ 的mRNA和蛋白表达相较于BFSI组均降低,CD206的mRNA和蛋白表达则进一步升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。以上结果表明,Ori能够降低BFSI小鼠骨痂组织中促炎性的M1巨噬细胞极化和炎症反应,并增强抗炎性的M2巨噬细胞极化。

2.3 Ori减轻BFSI骨痂组织细胞凋亡 qPCR和蛋白质印迹法检测结果(图3)显示,与BF组相比,BFSI组小鼠骨痂组织中促凋亡因子cleaved caspase 3、Bax的mRNA和蛋白表达水平均升高,抗凋亡因子Bcl-2的mRNA和蛋白表达水平降低( $P$ 均 $< 0.01$ );而BFSI+Ori组小鼠骨痂组织中cleaved caspase 3、Bax的mRNA和蛋白表达水平与BFSI组相比均降低,Bcl-2的mRNA和蛋白表达水平与BFSI组相比均升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。这一结果表明Ori能够减轻BFSI骨痂组织细胞凋亡,从而促进骨折愈合。

2.4 Ori抑制BFSI骨折早期破骨细胞过度激活 TRAP染色结果(图4)显示与BF组相比,BFSI组小鼠软骨-骨边界附近有更多的破骨细胞,而BFSI+Ori组的破骨细胞数量则较BFSI组低( $P$ 均 $< 0.01$ )。这一结果表明Ori能够在BFSI恢复早期抑制过多的破骨细胞产生,有利于骨折愈合。

### 3 讨论

在现代战争中,BFSI是重要伤情,如何救治此类病例、降低伤残率是一项重要且有挑战的任务。尽早手术清创及大剂量使用广谱抗生素能在很大程度上降低BFSI患者感染率,能治愈大多数患者,但仍有部分患者骨折愈合延迟甚至骨折不愈合,本研究在动物实验中也证明了这一点。因此,需要探索一种具有良好促进BFSI愈合作用的药物。Ori是从植物中分离出来的一种有生物活性的天然物质,具有抑制骨肿瘤进展<sup>[10]</sup>及抗炎、促进成骨、抑制骨质吸收等作用<sup>[8,11-12]</sup>,其对BFSI愈合的影响尚未见报道。本实验检测了Ori对BFSI愈合的影响,结果显示BFSI组骨痂少于BF组,而Ori能改善BFSI愈合情况。

普遍认为,炎症反应在骨折最初的血肿炎症期募集多种免疫细胞(如巨噬细胞、中性粒细胞等)以抵抗病菌的入侵,有利于骨折愈合,随着骨痂开始形成炎症反应逐步减弱。但是,BFSI会产生不可控制的炎症反应,激活大量破骨细胞,并导致成骨细胞和软骨细胞凋亡<sup>[13-14]</sup>。

巨噬细胞是参与骨折愈合炎症反应的关键细胞,促炎性的M1型巨噬细胞和抗炎性的M2型巨噬细胞相互平衡,促进骨折愈合<sup>[15]</sup>。如M1型巨噬细胞过度激活将导致过度的炎症反应,不利于骨折愈合<sup>[16]</sup>。本实验检测了骨痂组织中M1和M2型巨噬细胞标志分子及炎症因子的表达水平,结果表明Ori能够促进小鼠发生BFSI后M2型巨噬细胞极化,抑制M1型巨噬细胞极化和炎症因子表达。Ori通过适当降低骨折断端炎症水平,发挥了促进骨折愈合的作用。

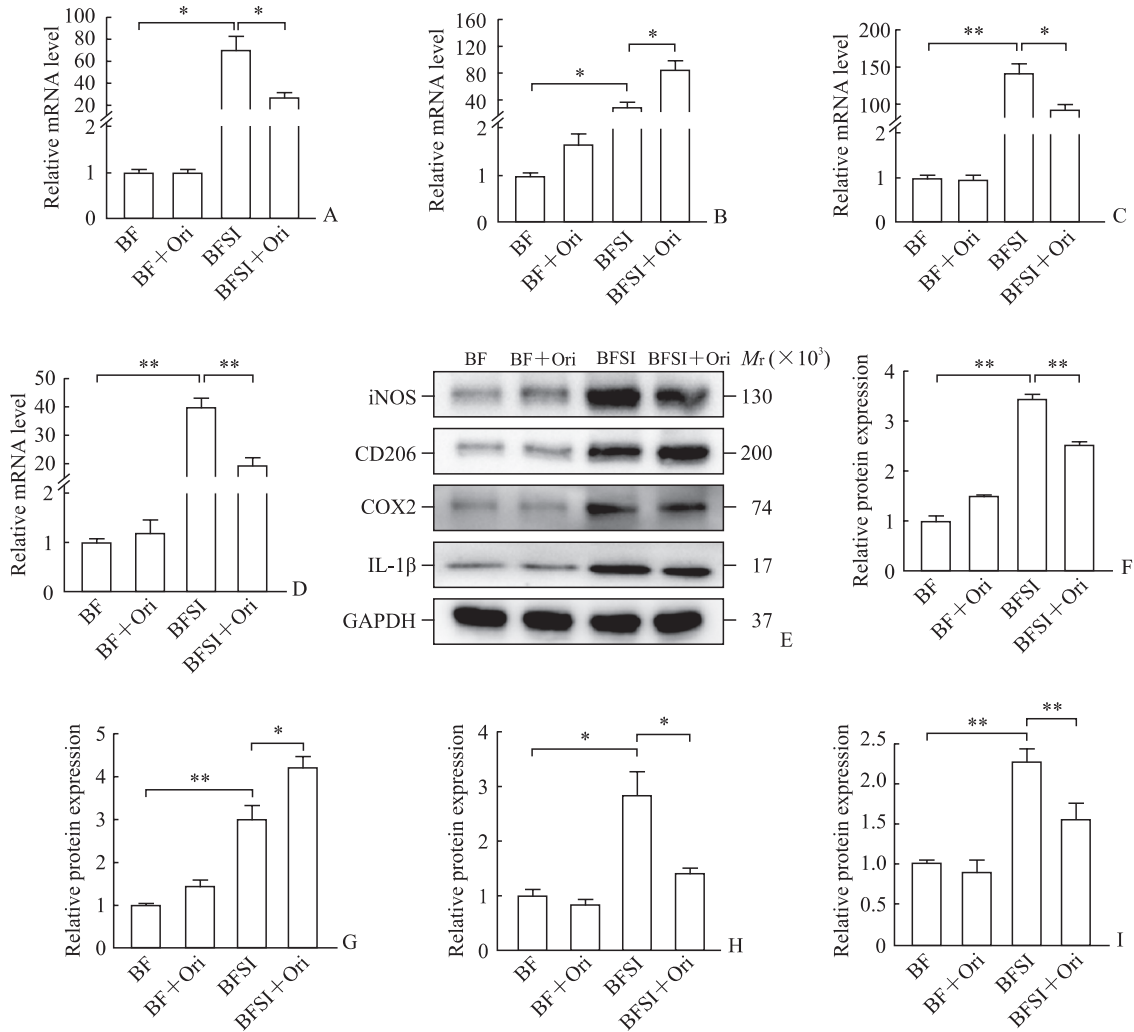


图 2 Ori 改变 BFSI 模型小鼠骨痂组织中巨噬细胞极化状态并减轻炎症反应

Fig 2 Ori alters polarization of macrophages and alleviates inflammation in callus tissues of BFSI mice

A-D: mRNA expression of *iNOS* (a marker of M1 macrophages, A), *CD206* (a marker of M2 macrophages, B), and inflammatory factors *COX2* (C) and *IL-1β* (D) detected by quantitative polymerase chain reaction; E: Representative Western blotting images; F-I: Relative protein expression of *iNOS* (F), *CD206* (G), *COX2* (H), and *IL-1β* (I) detected by Western blotting. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . Ori: Oridonin; BFSI: Bone fracture with seawater immersion; BF: Bone fracture; *iNOS*: Inducible nitric oxide synthase; *COX2*: Cyclooxygenase 2; *IL-1β*: Interleukin 1β; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

严重炎症反应会增加骨折断端细胞的凋亡，较高的凋亡水平会导致骨折愈合延迟<sup>[17]</sup>，因此，本实验检测了 BFSI 骨痂组织中凋亡相关因子的表达。结果显示，BFSI 小鼠骨痂组织中凋亡相关基因表达增多、抗凋亡基因表达减少，而 Ori 逆转了这种表达模式，提示 Ori 可能通过缓解 BFSI 愈合过程中的细胞凋亡促进骨折愈合。本实验中 Ori 在 BFSI 中抑制细胞凋亡的作用与其在急性肝损伤、心肌缺血损伤等疾病中的作用<sup>[18]</sup>相似。但在恶性肿瘤中，Ori 能够通过诱导或促进肿瘤细胞凋亡达到治疗目的<sup>[19]</sup>。因此，可以推断 Ori 在肿瘤组织中

促进恶性细胞凋亡而在 BFSI 等疾病中抑制细胞凋亡，从而发挥其保护效应。

骨折愈合过程包括成骨细胞为主的骨形成和破骨细胞为主的骨吸收。破骨细胞是使人体骨质溶解的唯一细胞，但成骨细胞也可促进破骨细胞的激活和骨吸收作用的发挥<sup>[20]</sup>。破骨细胞的过度激活会加速骨质吸收，阻碍骨痂形成，不利于早期的骨折愈合<sup>[21]</sup>。本实验也分析了破骨细胞的激活状态，结果表明 Ori 降低了骨折愈合过程中破骨细胞的过度激活，有利于改善骨折愈合延迟或不愈合状态，与既往报道结果<sup>[8]</sup>类似。

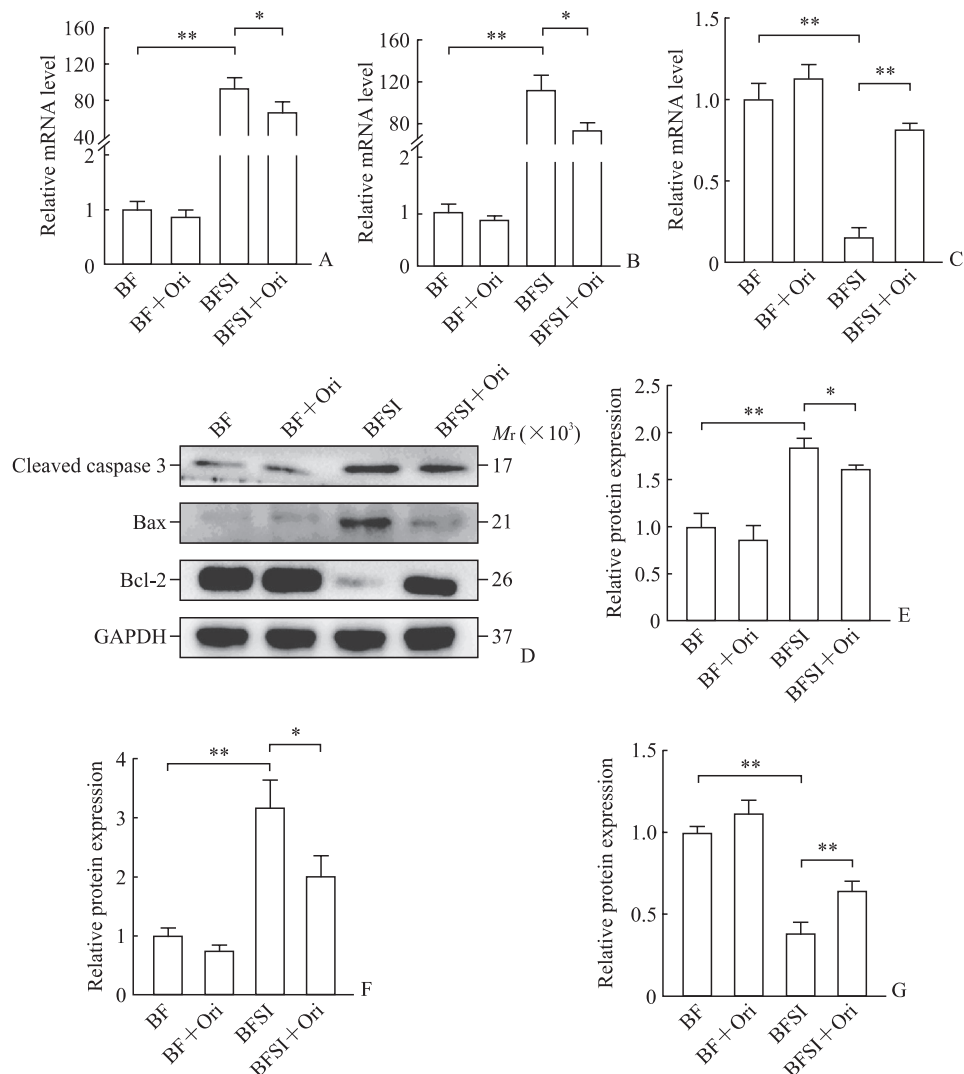


图3 Ori减轻 BFSI 模型小鼠骨痂组织细胞凋亡

Fig 3 Ori alleviates cell apoptosis in callus tissues of BFSI mice

A-C: mRNA expression of pro-apoptotic factors cleaved caspase 3 (A) and *Bax* (B) and anti-apoptotic factor *Bcl-2* (C) detected by quantitative polymerase chain reaction; D: Representative Western blotting images; E-G: Relative protein expression of cleaved caspase 3 (E), *Bax* (F), and *Bcl-2* (G) detected by Western blotting. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . Ori: Oridonin; BFSI: Bone fracture with seawater immersion; BF: Bone fracture; *Bax*: Bcl-2-associated X protein; *Bcl-2*: B-cell lymphoma 2; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

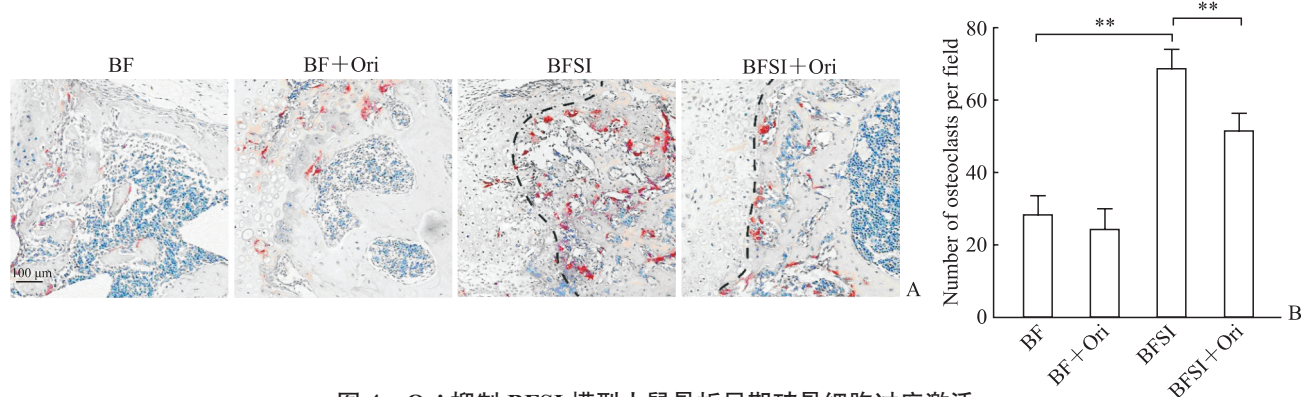


图4 Ori抑制 BFSI 模型小鼠骨折早期破骨细胞过度激活

Fig 4 Ori curbs overactivation of osteoclasts in early stage of fracture in BFSI mice

A: Representative TRAP staining images; B: Quantitative analysis of the osteoclasts. \*\* $P < 0.01$ .  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . Ori: Oridonin; BFSI: Bone fracture with seawater immersion; BF: Bone fracture; TRAP: Tartrate-resistant acid phosphatase.

综上所述,本研究结果表明中药提取物 Ori 能够增强抗炎性的 M2 型巨噬细胞极化、抑制促炎性的 M1 型巨噬细胞极化,减轻骨折后的炎症反应,减少细胞凋亡,抑制破骨细胞过度激活,促进 BFSI 的愈合,有利于骨痂的形成,增强 BFSI 发生后的骨组织对机械力的抵抗能力,这为 Ori 应用于海战 BFSI 治疗提供了实验依据。但本实验主要针对 BFSI 愈合过程中炎症、细胞凋亡等的变化,引起相关表型改变的可能信号通路尚待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 谢雄,梁波,臧蕴. 跳伞致脊柱压缩性骨折 568 例[J]. 中华创伤杂志,1999,15:307-308.
- [2] 林建宁,阮狄克. 海水浸泡对开放性骨折组织修复的影响研究[J]. 人民军医,2009,52:15-16.
- [3] 韩善桥,虞积耀,姜涛,王大鹏. 创伤合并海水浸泡动物感染实验研究[J]. 实用预防医学,2011,18:1533-1535.
- [4] 胡旭,吴灼金,杨永林. 四肢开放性骨折海水浸泡后的治疗[J]. 海军医学杂志,2010,31:234-236.
- [5] 王申,耿庆贺,还涵,廖瑞霁,吴新贵. 冬凌草甲素对雌激素缺乏诱导的大鼠骨质疏松症的影响[J]. 江苏医药,2020,46:217-220.
- [6] XU L H, BI Y L, XU Y Z, ZHANG Z C, XU W J, ZHANG S S, et al. Oridonin inhibits the migration and epithelial-to-mesenchymal transition of small cell lung cancer cells by suppressing FAK-ERK1/2 signalling pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24: 4480-4493.
- [7] XU L, LI L, ZHANG C Y, SCHLUESENER H, ZHANG Z Y. Natural diterpenoid oridonin ameliorates experimental autoimmune neuritis by promoting anti-inflammatory macrophages through blocking Notch pathway[J/OL]. Front Neurosci, 2019, 13: 272. DOI: 10.3389/fnins.2019.00272.
- [8] ZOU B H, TAN Y H, DENG W D, ZHENG J H, YANG Q, KE M H, et al. Oridonin ameliorates inflammation-induced bone loss in mice via suppressing DC-STAMP expression[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42: 744-754.
- [9] SHUID A N, MOHAMAD S, MUHAMMAD N, FADZILAH F M, MOKHTAR S A, MOHAMED N, et al. Effects of  $\alpha$ -tocopherol on the early phase of osteoporotic fracture healing[J]. J Orthop Res, 2011, 29: 1732-1738.
- [10] 陈功森,倪健,罗菊元,曲昌海,尹兴斌. 基于CNKI的冬凌草甲素研究文献计量学分析[J]. 中国中医药信息杂志,2019,26:104-109.
- [11] ZHOU L, HUANG Y K, ZHAO J L, YANG H L, KUAI F. Oridonin promotes osteogenesis through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis *in vitro*[J/OL]. Life Sci, 2020, 262: 118563. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118563.
- [12] JIA T, CAI M M, MA X, LI M, QIAO J T, CHEN T X. Oridonin inhibits IL-1 $\beta$ -induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes by activating PPAR- $\gamma$ [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 69: 382-388.
- [13] TONG X S, GANTAR R R, LIU Z P. AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates autophagy, inflammation and immunity and contributes to osteoclast differentiation and function[J]. Biol Cell, 2020, 112: 251-264.
- [14] ZHANG T, ZHAO K X, HAN W Q, YANG W L, LU X Y, LIU Q, et al. Deguelin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis *in vitro* and prevents inflammation-mediated bone loss *in vivo*[J]. J Cell Physiol, 2019, 234: 2719-2729.
- [15] SCHLUNDT C, EL KHASSAWNA T, SERRA A, DIENELT A, WENDLER S, SCHELL H, et al. Macrophages in bone fracture healing: their essential role in endochondral ossification[J]. Bone, 2018, 106: 78-89.
- [16] HUANG R, VI L, ZONG X H, BAHT G S. Maresin 1 resolves aged-associated macrophage inflammation to improve bone regeneration[J]. FASEB J, 2020, 34: 13521-13532.
- [17] SUN Y, XIONG Y, YAN C C, CHEN L, CHEN D, MI B B, et al. Downregulation of microRNA-16-5p accelerates fracture healing by promoting proliferation and inhibiting apoptosis of osteoblasts in patients with traumatic brain injury[J]. Am J Transl Res, 2019, 11: 4746-4760.
- [18] DENG Y L, CHEN C, YU H G, DIAO H, SHI C C, WANG Y G, et al. Oridonin ameliorates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice via inhibition of apoptosis[J]. Am J Transl Res, 2017, 9: 4271-4279.
- [19] GAO S Y, TAN H X, ZHU N, GAO H Y, LV C Y, GANG J, et al. Oridonin induces apoptosis through the mitochondrial pathway in human gastric cancer SGC-7901 cells[J]. Int J Oncol, 2016, 48: 2453-2460.
- [20] QUINN J M, GILLESPIE M T. Modulation of osteoclast formation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328: 739-745.
- [21] LOI F, CORDOVA L A, PAJARINEN J, LIN T H, YAO Z Y, GOODMAN S B. Inflammation, fracture and bone repair[J]. Bone, 2016, 86: 119-130.

[本文编辑] 杨亚红