

南极磷虾油对骨质疏松模型小鼠骨折愈合的促进作用

李媛媛, 毛相朝, 唐彭皓, 李彩龙, 于 朋, 王静凤*
(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘 要: 目的: 探究南极磷虾油 (Antarctic krill oil, AKO) 对骨质疏松模型小鼠骨折愈合的促进作用。方法: 采用 C57BL/6J 雌性小鼠, 通过双侧去卵巢术建立骨质疏松模型; 随后行右胫开放性骨折手术并随机分为一般性骨折对照组、骨质疏松性骨折模型组、阳性对照组、AKO 组。于骨折后 5、11、24、35、56 d 取材, 动态分析 AKO 对小鼠血清相关指标、骨痂组织形态学、显微结构和生物力学以及软骨内成骨关键基因表达的影响。结果: 酶联免疫吸附测定结果表明 AKO 能显著升高血清中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 质量浓度及骨碱性磷酸酶活力; 骨痂苏木精-伊红染色及微型计算机断层扫描结果显示 AKO 能够促进软骨痂向硬骨痂转化, 并改善骨痂微结构, 加速骨痂重塑; 生物力学检测结果显示 AKO 可增强骨性骨痂生物力学性能; 实时荧光定量聚合酶链式反应结果显示, AKO 可显著提高血管入侵相关因子 (VEGF、血小板衍生生长因子和血管紧张素 1) 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 显著降低软骨细胞增殖和肥大相关基因 (聚集蛋白聚糖 Aggrecan 和 Col10a) 的表达 ($P < 0.05$), 显著升高软骨基质降解因子 MMP-13 以及骨生成相关基因 (Col1a、骨钙素和骨形态发生蛋白 2) 的表达 ($P < 0.05$), 提示 AKO 可通过调控软骨内成骨关键基因的表达, 加速软骨内骨化进程。结论: AKO 通过促进软骨内成骨及骨痂重塑, 加速骨质疏松模型小鼠骨折愈合, 提高愈合质量。

关键词: 南极磷虾油; 骨质疏松性骨折; 骨折愈合; 软骨内成骨

Antarctic Krill Oil Enhances Fracture Healing in Osteoporotic Mouse Model

LI Yuanyuan, MAO Xiangzhao, TANG Penghao, LI Cailong, YU Peng, WANG Jingfeng*
(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Antarctic krill oil (AKO) on fracture healing in an osteoporotic mouse model. Methods: Female C57BL/6J mice were ovariectomized to establish the animal model of osteoporosis. Then the mice were subjected to open fracture operation on the right tibial and randomly divided into four groups: control, osteoporotic fracture model, positive control and AKO groups. We dynamically observed the effect of AKO on serum biochemical indicators and callus histomorphology, microstructure and biomechanical properties at 5, 11, 24, 35 and 56 days post-fracture. In addition, we also investigated the effect of AKO on the expression of key genes involved in endochondral ossification. Results: The results of enzyme-linked immunosorbent assay showed that AKO could significantly increase the serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone alkaline phosphatase. The HE staining and micro-computed tomography results showed that AKO could promote the transformation of cartilaginous callus into osseous callus, improved the microstructure of callus and accelerated callus remodeling. AKO could enhance biomechanical properties of bony callus. The quantitative real time polymerase chain reaction results showed that AKO significantly increased the mRNA expression of angiogenesis factors (VEGF, platelet derived growth factor and angiotensin 1) ($P < 0.05$), and decreased the expression of the genes associated with chondrocyte

收稿日期: 2018-02-23

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2016YYSP017); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-48)

第一作者简介: 李媛媛 (1993—) (ORCID: 0000-0002-5829-9004), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋食品营养。

E-mail: 1219664343@qq.com

*通信作者简介: 王静凤 (1964—) (ORCID: 0000-0002-8503-4394), 女, 教授, 博士, 研究方向为海洋食品营养。

E-mail: jfwang@ouc.edu.cn

proliferation and hypertrophy (Aggrecan and Col10a) ($P < 0.05$). Furthermore, AKO significantly increased the mRNA expression of *MMP-13* and osteogenesis-related genes (Col1a, OCN and bone morphogenetic protein (BMP-2)) ($P < 0.05$). These results suggested that AKO could accelerate the process of cartilage ossification and promote fracture healing by regulating the expression of key genes related to endochondral ossification. Conclusion: AKO can accelerate osteoporotic fracture healing and improve healing quality by promoting the process of cartilage ossification and callus remodeling.

Keywords: Antarctic krill oil; osteoporosis fracture; fracture healing; cartilage ossification

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180223-182

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 11-0159-08

引文格式:

李媛媛, 毛相朝, 唐彭皓, 等. 南极磷虾油对骨质疏松模型小鼠骨折愈合的促进作用[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 159-166. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180223-182. <http://www.spkx.net.cn>

LI Yuanyuan, MAO Xiangzhao, TANG Penghao, et al. Antarctic krill oil enhances fracture healing in osteoporotic mouse model[J]. Food Science, 2019, 40(11): 159-166. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180223-182. <http://www.spkx.net.cn>

骨质疏松症是绝经后妇女和老年人最普遍、复杂的骨骼代谢疾病, 会引起骨组织内单位体积骨量减少、骨微结构遭到破坏, 正常荷载性能下降, 骨脆性增加, 以致骨组织受到低能量创伤即会引发骨折^[1-2]。骨质疏松性骨折 (osteoporosis fracture, OPF) 是骨质疏松症最常见、最严重的并发症^[3]。OPF的特点之一是发病率高: 国际骨质疏松基金会调研发现, 全球范围内每3 s就会出现一起OPF病例; 50岁之后, 1/2的女性和1/5的男性会遭遇一次骨折^[4]。OPF特点二为致残率高: 与一般创伤性骨折相比, OPF愈合过程中骨内、外膜表面骨形成不足, 骨矿化沉积速率减慢, 骨痂形成量减少; 此外, 骨重塑出现延迟, 骨折区新生皮质骨厚度变薄, 最终延长了骨折愈合周期^[5-7], 甚至会导致骨不连, 新骨机械性能下降^[8-9], 大大增加了发生二次骨折的风险^[10-11]。因此具有高发病率、高致残率特点的OPF对老年人尤其是绝经后妇女的身心健康构成了巨大的威胁^[12], 其漫长的恢复过程给患者的日常生活带来了极大的不便, 高昂的医疗费用还给家庭乃至社会带来了沉重的经济负担^[13], OPF已然成为新的全球威胁。现在临床上OPF的治疗方式多为物理、基因和药物治疗, 但是这些治疗手段价格昂贵, 且或多或少存在副作用, 所以寻找安全有效的辅助治疗措施成为了研究热点。

以南极磷虾为原料提取的南极磷虾油 (Antarctic krill oil, AKO) 富含磷脂型二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸 (docosapentaenoic acid, DHA) 以及少量的虾青素等多种活性因子^[14-15], 研究发现AKO具有抗氧化^[16]、强健大脑^[17]、降血脂^[18-19]、抗疲劳^[20]等多种生物功能^[21]。此外, 近期研究发现, EPA、DHA可促进骨生成、改善软骨细胞代谢^[22], 而骨折愈合过程经历的软骨内骨化则与此有着密切的关系, 因此本研究以富含磷脂型EPA和DHA的AKO为受试物, 以软骨

内成骨为切入点, 系统地研究AKO对骨质疏松骨折愈合的作用, 以期南极磷虾油功能性食品开发提供理论参考, 为OPF的辅助性治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

8周龄雌性C57BL/6J小鼠, SPF级, 体质量 (18.50 ± 2.56) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证号: SCXK (京) 2012-0001, 饲养温度为22~24℃, 相对湿度为52%~58%。

南极磷虾油由中国海洋大学食品科学与人类健康实验室赠予。AKO组成成分分析结果显示其含有约57.4% (质量分数, 下同) 磷脂、14.2%甘油三酯、15.3%游离脂肪酸、2.1%胆固醇和0.594%虾青素。EPA和DHA分别占总脂肪酸质量的25.13%和19.24%。

阿仑膦酸钠片 澳大利亚默沙东公司; 血清中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、骨碱性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, BALP) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 美国R & D公司; 通用型组织固定液 (中性) 武汉赛维尔生物科技有限公司; UNIQ-10柱式TRIzol总RNA抽提试剂盒及随机引物 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; TRIzol试剂 Ambion生物科技有限公司; RiboLock RNA酶抑制剂 美国Thermo Fisher Scientific公司; M-MLV逆转录酶 美国Promega公司; dNTP Mixture 宝日医生物技术 (北京) 有限公司; Aggrecan、Col10a、MMP-13、PDGF-BB、Ang1、Col1a、OCN、 β -actin引物 苏州金唯智生物科技有限公司; SYBR Green荧光染料 美国Novoprotein公司; 其他试剂均为国产分析纯。

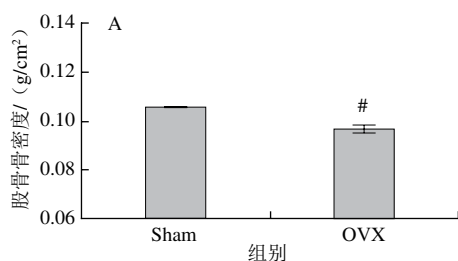
1.2 仪器与设备

Neofuge 13R 型高速冷冻离心机 力康生物医疗科技控股有限公司; Model680型酶标仪 美国Bio-Rad公司; LightCycler480实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 瑞士Roche公司; RM2125RTS石蜡切片机 德国Leica公司; BH14光学显微镜 日本Olympus公司; YLS-16A小动物骨骼强度测定仪 济南益延科技发展有限公司; GK99-UNIGAMMA X-RAY PLUS双能X射线骨密度仪 意大利I'can公司; SCANCO微型计算机断层扫描 (micro computed tomography, μ CT) 仪 瑞士Scanco Medical AG公司; 100型高效液相色谱仪 美国Agilent公司; ICS2000型离子色谱仪 美国Dionex公司; Ultra Trurrax T18 basic型高速匀浆机 德国IKA公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及模型建立

C57BL/6J小鼠随机分为假手术组 (Sham组, 36 只) 和去卵巢组 (OVX组, 90 只), 腹腔注射水合氯醛 (400 mg/kg m_b) 进行麻醉, Sham组切除卵巢周围少量脂肪组织, OVX组行双侧去卵巢手术。术后3个月, 每组取4只小鼠进行安乐死, 取股骨进行骨密度分析, 结果显示, 与Sham组相比, OVX组小鼠股骨骨密度显著降低 ($P<0.05$), 证明骨质疏松模型建立成功 (图1A)。



A. 股骨骨密度; B. 骨折后立即对骨折部位进行X射线扫描。#. 与Sham组相比差异显著 ($P<0.05$)。

图1 小鼠骨质疏松性骨折模型的建立

Fig. 1 Establishment of the osteoporotic fracture model

随后小鼠于右胫骨中上1/3处行开放性骨折手术 (图1B)。将手术成功的小鼠进行分组: Sham组小鼠骨折后作为一般骨折对照组 (Control组), 去卵巢小鼠骨折后随机分为骨质疏松性骨折模型组 (Model组)、阳性

对照组 (ALN组)、AKO组, 每组27只。骨折后立即灌胃受试物, 其中Control组、Model组小鼠灌胃生理盐水, ALN组小鼠灌胃阿伦磷酸钠 (质量浓度为0.1 mg/mL), AKO组小鼠灌胃南极磷虾油 (质量浓度为30 mg/mL), 灌胃剂量均为10 mL/kg m_b 。骨折术后第5天, 每组取5只小鼠禁食不禁水8 h, 行尾静脉取血, 常规分离血清用于生化指标检测。术后11、24 d每组取8只小鼠禁食不禁水8 h, 摘眼球取血, 收集血清用于生化指标检测; 小鼠脱颈椎处死后, 迅速分离右胫骨痂组织, 用于组织形态学观察 (11、24、35 d, 每组4只)、2D μ CT分析 (24 d, 每组3只)、生物力学分析 (56 d, 每组4只) 及骨折愈合相关基因检测 (11、24 d, 每组4只)。

1.3.2 血清生化指标测定

参照ELISA试剂盒方法测定血清VEGF质量浓度和BALP活力。

1.3.3 股骨组织骨密度测定

小鼠去卵巢术后3个月, 取股骨组织, 采用双能X射线骨密度测试仪检测骨密度。

1.3.4 骨痂组织形态学观察

小鼠右胫骨痂于组织固定液固定24 h, 质量分数8%乙二胺四乙酸二钠 (pH 7.3) 脱钙2~3周石蜡包埋切片 (5 μ m厚), 进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 光学显微镜下观察骨痂组织学特点并成像。

1.3.5 骨痂2D μ CT分析

小鼠骨折术后第24天取材骨痂组织, 采用2D μ CT扫描仪进行扫描, 并使用配套软件分析骨折区形态学参数。用ImageJ软件分析2D μ CT图像获得的愈合组织横切面, 计算横切面的最大长度和最小长度以评估愈合组织的大小。

1.3.6 骨痂生物力学测定

在骨折后第56天取材骨痂组织, 通过小鼠骨骼强度测试仪的3点弯曲测试来确定胫骨骨折区的最大弯曲刚度。

1.3.7 qPCR分析

取小鼠骨折后第11、24天骨痂组织, 检测骨折愈合相关基因mRNA相对表达量。采用总RNA抽提试剂盒法提取骨痂组织总RNA, 取1 μ g骨痂总RNA在反转录酶M-MLV的催化下逆转录成cDNA。随后进行荧光实时定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 扩增, 各反应物用量参照Maxima SYBR Green qPCR Mastermix说明书要求。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火20 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共45个循环。相关基因的引物序列如表1所示, 以 β -actin作为内参校正目的基因mRNA表达量。

表1 小鼠骨折愈合相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences used for qPCR amplification of fracture healing related genes

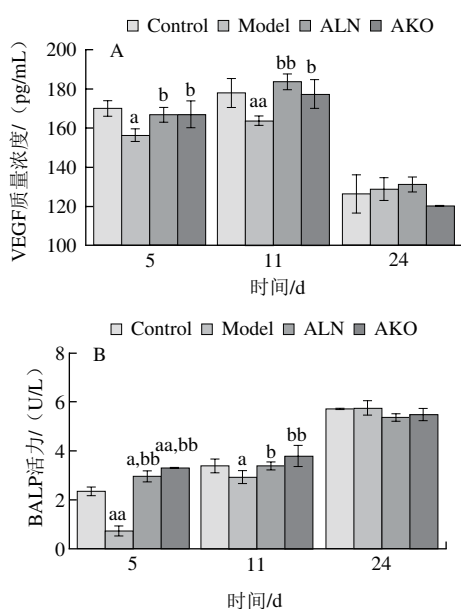
基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
<i>Aggrecan</i>	TTGCAGACCAGGAGCAATGT	CGGTCATGAAAGTGGCGGTA
<i>Col10a</i>	AGGTATGGCTCCAATTGCC	AGGACGAGTGGACGTACTCA
<i>MMP-13</i>	GACCCCAACCTTAAGCATCC	CCTCGGAGACTGGTAATGGC
<i>PDGF-BB</i>	TCCACCAGCAGCGATTCTCAG	GTGCCATCAGAGTTCCTCCAGTCT
<i>Ang1</i>	ATTCGCCATCCCAACAGGAA	ATCAAGAACAACGGGCTGG
<i>Col1a</i>	AGCACGCTCTGGTTGGAGAG	GACATTAGGCGCAGGAAGGT
<i>OCN</i>	GCCCTGAGTCTGACAAAGCCTTC	CGGTCTTCAAGCCATACTGGTCTG
<i>β-actin</i>	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA

1.4 数据统计分析

采用SPSS 17.0软件对实验数据进行单因素方差分析, 并进行最小显著性差异法和SNK (Student-Newman-Keuls) 法组间比较分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 AKO对小鼠血清生化指标的影响



A. VEGF质量浓度; B. BALP活力。同一时间, 与Control组相比, a. 差异显著 ($P < 0.05$), aa. 差异极显著 ($P < 0.01$); 同一时间, 与Model组相比, b. 差异显著 ($P < 0.05$), bb. 差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

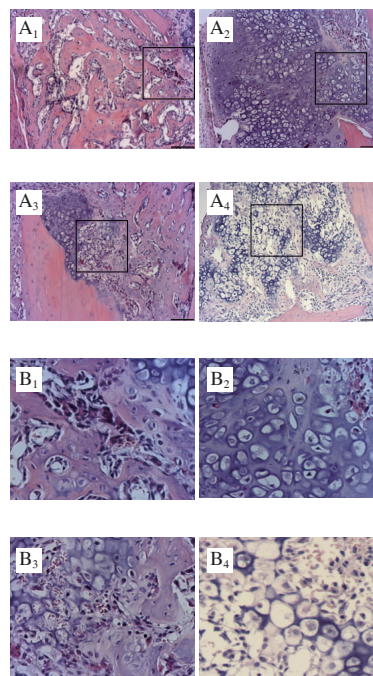
图2 AKO对小鼠血清生化指标的影响

Fig. 2 Effect of AKO on serum biochemical indicators

由图2A可知, 各组VEGF表达高峰期集中在骨折后第5、11天, 说明新血管的生成及入侵主要发生在骨折愈合的早中期。骨折后第5、11天, Model组血清VEGF质量浓度较Control组均显著降低, 经AKO干预后VEGF质量浓度分别上升了6.39%和8.05% ($P < 0.05$), 提示AKO在骨折愈合早中期促进血管新生与入侵。图2B显示, 各组BALP在骨折术后第24天呈现高表达, 表明这个时期是活

跃的新骨形成阶段。此外, 骨折后第11天, 与Control组相比, Model组血清BALP活力显著降低, 而AKO组极显著升高 ($P < 0.01$)。提示在骨折愈合期间, AKO可增强成骨细胞活性、促进新骨形成。

2.2 AKO对OPF愈合过程中软骨痂至硬骨痂演变的影响

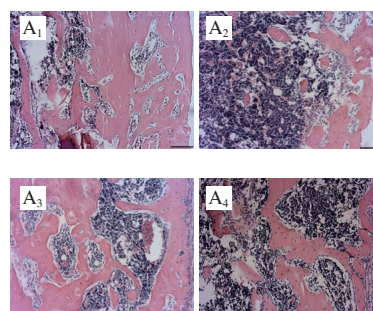


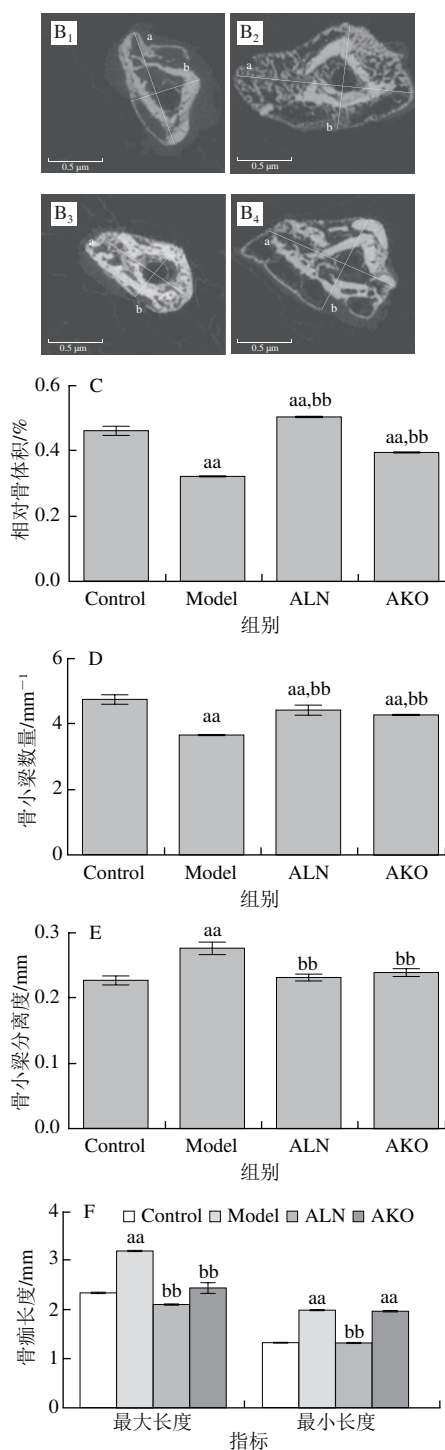
A、B. 分别为放大10、20倍。下标1~4. 分别为Control组、Model组、ALN组、AKO组, 图4~5同。

图3 AKO对小鼠骨折后11 d骨痂组织形态学的影响

Fig. 3 Effect of AKO on callus histomorphology at 11 days post-fracture

对不同时间点的骨痂组织切片进行HE染色, 动态观察骨痂形态学变化, 从而反映软骨内骨化进程。如图3所示, 骨折手术后11 d, Control组骨折区愈合组织由大量编织骨组织和少量软骨组织组成。然而, Model组主要充斥大量软骨愈合组织, 且多数处于增殖期。模型小鼠经AKO干预后, 骨痂中大量软骨细胞变得肥厚, 并伴有软骨基质降解和矿化新骨替代软骨现象, 表明AKO促进软骨细胞肥大、凋亡及新骨矿化, 使小鼠提前完成软骨痂期过渡至硬骨痂期。





A.骨折后24 d骨痂组织HE图; B.骨折后24 d骨痂组织2D μ CT分析;
C~F.分别为相对骨体积、骨小梁数量、骨小梁分离度、骨痂长度。

图4 AKO对小鼠骨折后24 d骨痂组织形态学及微结构的影响

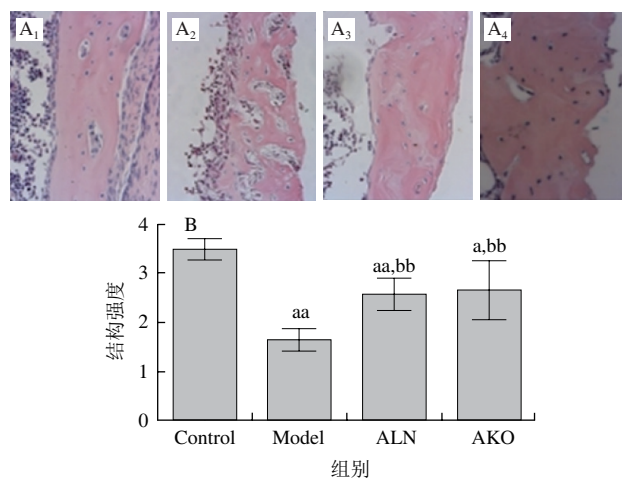
Fig. 4 Effect of AKO on histomorphology and microstructure of callus at 24 days post-fracture

图4A表明,骨折后24 d软骨性骨痂已经转化为硬骨痂,且逐渐丰富聚集演变成致密的板层骨桥接骨折断端。结果显示,Control组骨痂由致密的编织骨填充,且向成熟的板层骨转变;而Model组编织骨含量较少,且

疏松散乱。补给AKO后,小鼠骨痂内编织骨的数量增加,且聚合呈片状骨。结果提示AKO可以促进骨性骨痂的形成与成熟。此外,第24天愈合组织的2D μ CT分析(图4C~E)表明,AKO通过增加相对骨体积(增加16.97%)、骨小梁数量(增加14.77%),降低骨小梁分离度(降低18.53%),使模型小鼠骨性骨痂微结构得到显著改善。2D μ CT结果显示,AKO组较Model组骨痂横截面最大长度减少了23.51% ($P < 0.01$) (图4B、F),在一定程度上反映了AKO在骨折手术后第24天显著降低了愈合组织的大小,加速后期骨重塑。

综上所述,AKO通过加速软骨细胞肥大和矿化、促进硬骨痂的形成与完善,增加愈合组织的成熟,从而促进骨折愈合。

2.3 AKO对OPF愈合过程中硬骨痂塑形的影响



A.骨折后35 d骨痂组织HE图; B.骨折后56 d骨痂组织骨结构强度。

图5 AKO对小鼠骨折后35 d骨痂组织形态学及56 d骨痂生物力学性能的影响

Fig. 5 Effect of AKO on callus histomorphology at 35 days post-fracture and biomechanical properties of callus on at 56 days post-fracture

图5A显示,骨折后35 d,Control组骨痂在将形成皮质骨的区域观察到致密的板层骨,而Model组骨折处的板层骨塑型不完全,间隙较大;灌胃AKO后,板层骨痂致密成熟,骨重塑能力显著增强。骨折后56 d骨痂的弯曲刚度测试结果(图5B)显示,Model组骨痂结构强度较Control组显著降低,说明骨质疏松症损害了OPF愈合质量;经AKO治疗后,骨痂结构强度极显著升高59.28% ($P < 0.01$)。以上结果提示,AKO可促进骨重塑的完成,使新骨快速恢复正常的机械强度,提高新骨的内在质量和抗外力性能。

2.4 AKO对软骨内成骨相关基因表达的影响

骨折愈合过程中软骨内成骨相关关键因子的mRNA相对表达量检测结果显示(图6),骨折术后第11天,与Control组相比,Model组Aggrecan、Coll10a表达量显著升高;而MMP-13、PDGF-BB、Ang1、Colla及OCN相

对表达量显著降低,直到术后第24天表达量才上升。提示Model组小鼠骨折后第11天愈合过程仍处于软骨痂优势阶段,直至第24天才集中发生软骨矿化及骨性骨痂的重塑。说明由于骨质疏松症的影响,软骨痂的成熟及矿化被严重推迟。模型小鼠灌胃AKO后,骨痂Aggrecan、Col10a表达量在术后第11天显著下调,分别下降53.43%、20.47%;而MMP-13、PDGF-BB、Ang1、Colla及OCN相对表达量在骨折后第11天显著上调,分别升高85.53%、187.83%、115.5%、35.15%、134.74%。另外,图6B、C显示,骨折后第24天,AKO组小鼠MMP-13、PDGF-BB、Ang1表达量降低,而Colla及OCN表达量显著升高($P<0.05$)。以上结果提示,AKO可通过调控软骨内骨化相关基因的表达,促进血管入侵,加速OPF小鼠软骨痂向钙化软骨痂转变,从而加速骨折愈合。

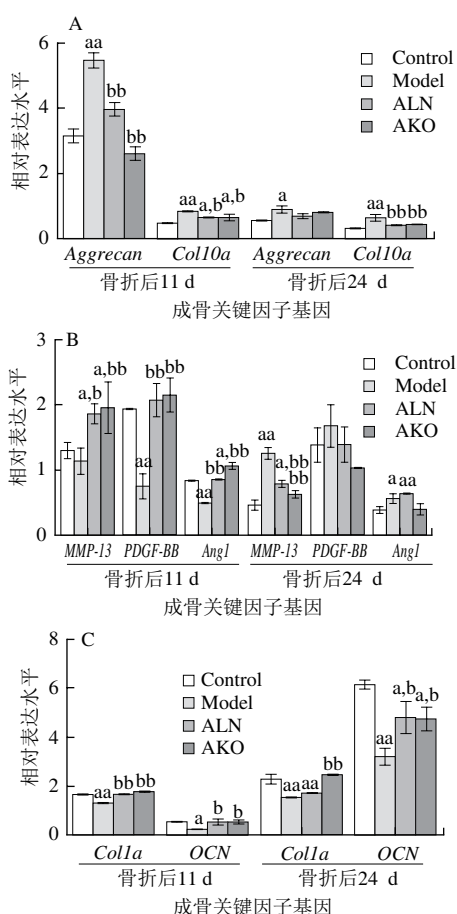


图6 AKO对小鼠软骨内成骨相关基因mRNA表达的影响

Fig. 6 Effect of AKO on mRNA expression of key genes related to endochondral ossification

3 讨论

本实验采用OVX手术及单侧胫骨开放性骨折手术建立OPF模型,通过检测OPF愈合过程中软骨内成骨时期和骨痂重塑期相关的各项指标,探究AKO对骨质疏松模型

小鼠骨折愈合的作用。结果表明,AKO可促进OPF愈合过程中的成软骨分化、软骨成熟肥大、软骨基质降解、新血管生成和新骨形成,加速软骨内骨化进程;促进硬骨痂塑型,增强新骨机械强度,提高愈合质量。

骨折愈合是一个响应骨损伤而发生的复杂多阶段的骨修复过程,其最终目标是使受损的骨返回到功能和生物力学健全的状态。骨质疏松性骨折愈合主要经历以下3个紧密连接的阶段:1)骨折断端形成血肿、募集间充质干细胞的炎症期;2)骨膜反应为特征的膜内成骨,以及经历软骨骨痂-矿化软骨痂-编织骨样骨性骨痂的逐步过渡的软骨内骨化阶段;3)包括骨再吸收和骨形成的骨痂重塑阶段,使骨恢复原始形态和质量^[23-24]。

软骨内成骨阶段是发生在骨质疏松性骨折愈合早中期的重要阶段:在此过程中,大量具有多向分化潜能的MSCs被募集到骨折断端,在转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等生长因子作用下分化为软骨细胞;软骨细胞大量增殖,分泌软骨蛋白聚糖;软骨细胞成熟肥大,分泌X型胶原,形成软骨骨痂^[25]。随后,由于软骨痂机械强度无法满足机体需求,它将被编织骨由外向内逐渐替代;软骨愈合组织分泌MMP-13等因子进行软骨基质降解,最终软骨细胞凋亡^[26];成骨细胞入侵增殖分化、分泌骨基质并矿化成小梁骨,并逐渐汇聚成致密的板层骨,形成骨性骨痂连接骨折断端^[27]。骨折后第11、24天的骨痂HE、2D μ CT结果显示,相比于Model组小鼠,AKO组小鼠骨折区提前出现大量肥大软骨细胞并伴有软骨基质降解,部分软骨被矿化新骨代替,形成松散的小梁骨;随后更快地转变成了致密、骨微结构优良的成熟板层骨。提示AKO通过促进软骨内骨化进程,改善骨质疏松引起的骨折愈合延迟现象。

软骨内骨化进程受多种生长因子调控:其中Aggrecan、Col10a、MMP-13是软骨细胞增殖、肥大、基质降解的标志物^[28-30];VEGF、PDGF-BB、Ang是血管生成及入侵相关的关键调控因子^[31],促进氧分压的改善及营养、成骨细胞和破骨细胞的运输;BALP、Colla、OCN表达量反映成骨细胞活性^[32],是重要的骨生成标志物,可以反应硬骨痂形成及重塑情况。血清及基因检测结果显示,模型小鼠灌胃AKO后,骨折后第11天的骨痂Aggrecan、Col10a表达量显著降低,而MMP-13、VEGF、PDGF-BB、Ang1、ALP、Colla及OCN的mRNA相对表达量显著上调,表明AKO促进软骨细胞增殖、肥大、凋亡及矿化。同时骨折后第24天,骨痂MMP-13、PDGF-BB、Ang1 mRNA相对表达量降低,而Colla及OCN mRNA相对表达量显著升高,说明AKO组已提前完成血管入侵,且加速了新骨的形成,进一步证明了AKO加速软骨内骨化,促进骨折愈合。

骨折愈合后期以骨重塑为主：为了恢复骨的原有模式，骨性骨痂进行骨塑形与改建，髓腔中多余的愈合组织被吸收、清除，髓腔重新沟通，皮质骨区演变出生物力学性能优良的板层骨，恢复正常骨结构。此阶段主要经历破骨细胞对松散的编织骨进行重吸收，并伴随成骨细胞形成新的成熟板层骨的爬行替代过程，使原始骨痂的形状和大小被重塑^[33]，生物力学性能得到改善^[34-35]。骨折后第35天，组织学观察结果显示AKO组较Model组具有更强的骨重塑能力，形成致密的新骨桥接骨折断端。骨折后第56天，AKO组骨痂最大弯曲刚度较Model组显著增加，说明骨折愈合质量更优。综上结果表明，AKO能够在骨折愈合末期促进骨性骨痂重塑，优化骨痂力学结构。

综上所述，AKO通过调控血管生成因子、软骨内成骨相关因子的表达以及成骨细胞活性来增强血管入侵、软骨内成骨以及骨重塑，改善因骨质疏松导致的骨折愈合延迟与损伤，提高愈合质量。

参考文献：

- [1] KANIS J A, MCCLOSKEY E V, JOHANSSON H, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women[J]. *Osteoporosis International*, 2013, 24(1): 23-57. DOI:10.1007/s00198-012-2074-y.
- [2] 于利, 李长洲, 王腾飞, 等. 唑来膦酸在骨质疏松骨折术后应用的临床疗效分析[J]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2015, 9(5): 676-679. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-134X.2015.05.026.
- [3] STROM O, BORGSTROM F, KANIS J A, et al. Osteoporosis: burden, health care provision and opportunities in the EU: a report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)[J]. *Archives of Osteoporosis*, 2011, 6(1/2): 59-155. DOI:10.1007/s11657-011-0060-1.
- [4] VAN STARR T P, DENNISON E M, LEUFKENS H G, et al. Epidemiology of fractures in England and Wales[J]. *Bone*, 2001, 29(6): 517-522.
- [5] MCCANN R M, COLLEARY G, GEDDIS C, et al. Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2008, 26(3): 384-393. DOI:10.1002/jor.20505.
- [6] VON RÜDEN C, AUGAT P. Failure of fracture fixation in osteoporotic bone[J]. *Injury*, 2016, 47(Suppl 2): 3-10. DOI:10.1016/S0020-1383(16)47002-6.
- [7] 杨丹, 栗平, 赵平. 探讨骨质疏松性骨折的相关影响因素及预防[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(2): 152-155.
- [8] BAHNEY C S, HU D P, MICLAU T, et al. The multifaceted role of the vasculature in endochondral fracture repair[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2015, 6: 4. DOI:10.3389/fendo.2015.00004.
- [9] PISANI P, RENNA M D, CONVERSANO F, et al. Major osteoporotic fragility fractures: risk factor updates and societal impact[J]. *World Journal of Orthopedics*, 2016, 7(3): 171-181. DOI:10.5312/wjo.v7.i3.171.
- [10] KIM S M, KANG K C, KIM J W, et al. Current role and application of teriparatide in fracture healing of osteoporotic patients: a systematic review[J]. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2017, 24(1): 65-73. DOI:10.11005/jbm.2017.24.1.65.
- [11] MACKERT G A, SCHULTE M, HIRCHE C, et al. Low-energy extracorporeal shockwave therapy (ESWT) improves metaphyseal fracture healing in an osteoporotic rat model[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(12): e0189356. DOI:10.1371/journal.pone.0189356.
- [12] LI W, WANG K, LIU Z, et al. HIF-1 α change in serum and callus during fracture healing in ovariectomized mice[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(1): 117-126.
- [13] 张钢. 阿伦膦酸钠对大鼠股骨骨质疏松性骨折愈合过程的影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014: 13-16.
- [14] 施佳慧, 吕桂善, 徐同成, 等. 磷虾油的脂肪酸成分及其降血脂功能研究[J]. *营养学报*, 2008, 30(1): 115-116. DOI:10.3321/j.issn:0512-7955.2008.01.029.
- [15] PHLEGER C F, NELSON M M, MOONEY B D, et al. Interannual and between species comparison of the lipids, fatty acids and sterols of Antarctic krill from the US AMLR Elephant Island survey area[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 2002, 131(4): 733-747. DOI:10.1016/S1096-4959(02)00021-0.
- [16] 王亚恩, 姜国良, 徐恺, 等. 南极磷虾油对高脂血症大鼠血脂和抗氧化力的影响[J]. *中国海洋药物*, 2011, 30(3): 56-59. DOI:10.13400/j.cjmd.2011.03.011.
- [17] WIBRAND K, BERGE K, MESSAOUDI M, et al. Enhanced cognitive function and antidepressant-like effects after krill oil supplementation in rats[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2013, 12(1): 6-19. DOI:10.1186/1476-511X-12-6.
- [18] 刘忠华, 刘文杰. 葡萄皮提取物与磷虾油对肥胖高脂血症大鼠血脂的影响[J]. *山东化工*, 2016, 45(21): 42-43; 46. DOI:10.3969/j.issn.1008-021X.2016.21.017.2.
- [19] 黄婧. 磷虾油防治脂肪肝的实验研究进展[J]. *精细与专用化学品*, 2014, 22(9): 20-22. DOI:10.3969/j.issn.1008-1100.2014.09.005.
- [20] 郑琳, 刘满阳, 周新, 等. 南极磷虾油对负重游泳小鼠的抗疲劳作用[J]. *大连工业大学学报*, 2015, 34(2): 108-110. DOI:10.19670/j.dlgydxb.2015.02.007.
- [21] 冯迪娜, 袁玥, 朱晓丽. 南极磷虾油生理功能的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(7): 115-117. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2015.07.031.
- [22] 喜文天. 多不饱和脂肪酸对软骨基质金属蛋白酶-13分泌的影响及其机制的探究[D]. 北京: 首都医科大学, 2014: 1-17.
- [23] KATES S L, ACKERT-BICKNELL C L. How do bisphosphonates affect fracture healing?[J]. *Injury*, 2017, 47(1): S65-S68. DOI:10.1016/S0020-1383(16)30015-8.
- [24] BAO Q, CHEN S, QIN H, et al. An appropriate Wnt/ β -catenin expression level during the remodeling phase is required for improved bone fracture healing in mice[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 2695-2706. DOI:10.1038/s41598-017-02705-0.
- [25] MEYER E G, BUCKLEY C T, THORPE S D, et al. Low oxygen tension is a more potent promoter of chondrogenic differentiation than dynamic compression[J]. *Journal of Biomechanics*, 2010, 43(13): 2516-2523. DOI:10.1016/j.jbiomech.2010.05.020.

- [26] GERSTENFELD L C, CHO T J, KON T, et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF- α signaling: the role of TNF- α in endochondral cartilage resorption[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2003, 18(9): 1584-1592. DOI:10.1359/jbmr.2003.18.9.1584.
- [27] BURKE D P, KELLY D J. Substrate stiffness and oxygen as regulators of stem cell differentiation during skeletal tissue regeneration: a mechanobiological model[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e40737. DOI:10.1371/journal.pone.0040737.
- [28] WANG P, ZHANG F, HE Q, et al. Flavonoid compound icariin activates hypoxia inducible factor-1 α in chondrocytes and promotes articular cartilage repair[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(2): e0148372. DOI:10.1371/journal.pone.0148372.
- [29] ZHANG X, PRASADAM I, FANG W, et al. Chondromodulin-1 ameliorates osteoarthritis progression by inhibiting HIF-2 α activity[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(11): 1970-1980. DOI:10.1016/j.joca.2016.06.005.
- [30] RAY S, THORMANN U, SOMMER U, et al. Effects of macroporous, strontium loaded xerogel-scaffolds on new bone formation in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats[J]. *Injury*, 2016, 4: 52-61. DOI:10.1016/S0020-1383(16)30013-4.
- [31] BENEST A V, SALMON A H, WANG W Y, et al. VEGF and angiopoietin-1 stimulate different angiogenic phenotypes that combine to enhance functional neovascularization in adult tissue[J]. *Microcirculation*, 2006, 13(6): 423-437. DOI:10.1080/10739680600775940.
- [32] LIU Q, WAN Q L, YANG R T, et al. Effects of intermittent versus continuous parathyroid hormone administration on condylar chondrocyte proliferation and differentiation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 424(1): 182-188. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.06.106.
- [33] MARSELL R, EINHORN T A. The biology of fracture healing[J]. *Injury*, 2011, 42(6): 551-555. DOI:10.1016/j.injury.2011.03.031.
- [34] ZHAN Q, GUI X, WANG F, et al. Sialoglycoprotein isolated from the eggs of gadus morhua enhances fracture healing in osteoporotic mice[J]. *Food & Function*, 2017, 8(3): 1094-1104. DOI:10.1039/c6fo01346e.
- [35] BUTEZLOFF M M, ZAMARIOLI A, LEONI G B, et al. Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis[J]. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2015, 30(11): 727-735. DOI:10.1590/S0102-865020150110000002.