

· 创伤性脑损伤专题 ·

阿仑膦酸钠对内毒素诱导的大鼠模型颅骨缺损修复作用的研究

胡湛 王静霞 张晓彬 陈屿恒 倪茂君 田珊珊 彭朝荣

610101 成都, 四川省原子能研究院辐射化学研究所(胡湛、王静霞、张晓彬、陈屿恒、倪茂君); 400014 重庆市急救医疗中心 重庆大学附属中心医院院前急救部(田珊珊); 610101 成都, 辐照保藏四川省重点实验室(彭朝荣)

通信作者: 田珊珊, Email: 710836163@qq.com; 彭朝荣, Email: chinese-peng@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2025.03.002

【摘要】目的 探讨一定剂量内毒素(LPS)对大鼠颅骨缺损修复的影响以及阿仑膦酸钠(ALN)在改善颅骨缺损修复中的作用。**方法** 将20只SD雄性大鼠随机分为空白组、对照组、LPS组与LPS+ALN组,建立LPS诱导及LPS联合ALN给药的颅骨缺损修复动物模型。采用显微CT(Micro-CT)观察大鼠颅骨修复情况,使用酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠血液中白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)3种炎症因子水平,利用苏木精-伊红(HE)染色法切片染色观察骨组织结构,采用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)切片染色考察颅骨缺损处处破骨细胞的状态,采用免疫组化研究骨生长及骨吸收的影响机制。**结果** 检测因子结果表明,与空白组或对照组比较,LPS引起红细胞、血红蛋白及血小板表达水平变化($P < 0.05$),而ALN给药治疗后IL-1 β ($P=0.014$)、IL-6($P=0.049$)及TNF- α ($P=0.006$)炎症因子水平变化,差异均有统计学意义。与空白组相比,Micro-CT显示对照组、LPS组及LPS+ALN组均发生明显骨吸收,但LPS组在第2天时发生明显颅骨间吸收,而ALN治疗后吸收被抑制。病理结果显示,LPS导致破骨细胞的增多,引起骨质丢失和骨结构缺损,颅骨发生明显骨吸收现象;而LPS+ALN组发生骨吸收较少,46 d时成骨细胞分化的标志物骨钙素和转化生长因子- β 表达最少,修复速度高于其他组。**结论** LPS浸泡会导致一定的骨吸收,不利于大鼠颅骨细胞增殖分化,ALN治疗可有效加速骨生成并抑制LPS导致的炎症骨吸收,从而改善颅骨的修复效果。

【关键词】 颅骨修复; 内毒素; 阿仑膦酸钠; 骨吸收; 大鼠

基金项目: 四川省科技计划省院省校合作项目(2022YFSY0003)

Effect of alendronate sodium on lipopolysaccharide-induced repair of skull defects in rats Hu Zhen, Wang Jingxia, Zhang Xiaobin, Chen Yuheng, Ni Maojun, Tian Shanshan, Peng Chaorong
Institute of Radiation Chemistry, Sichuan Institute of Atomic Energy, Chengdu 610101, China (Hu Z, Wang JX, Zhang XB, Chen YH, Ni MJ); Prehospital Emergency Department, Chongqing Emergency Medical Center & Chongqing University Central Hospital, Chongqing 400014, China (Tian SS); Sichuan Provincial Key Laboratory of Irradiation Preservation, Chengdu 610101, China (Peng CR)
Corresponding authors: Tian Shanshan, Email: 710836163@qq.com; Peng Chaorong, Email: chinese-peng@163.com

【Abstract】Objective To explore the effect of a certain dose of endotoxin, lipopolysaccharide (LPS) on skull repair in rats and the role of alendronate sodium (ALN) in improving skull repair. **Methods** Twenty SD male rats were randomly divided into blank, control, LPS and LPS+ALN groups to establish an animal model of LPS-induced and LPS-combined ALN for skull defect repair. Microscopic computed tomography (Micro-CT) was used to observe the skull repair in rats, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of three inflammatory factors, namely interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), in the blood of rats, and hematoxylin-eosin (HE) staining was utilized to observe the bone structure and cells. The status of osteoclasts at the skull defect was examined using tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining of sections, and the mechanism of bone growth and bone resorption was investigated using immunohistochemistry. **Results** The results of the tested factors showed that, compared with blank group or control group, LPS caused abnormal expression of erythrocytes, hemoglobin, and platelets with a statistical difference ($P < 0.05$), and there were statistically significant differences in inflammatory factors

such as IL-1 β ($P=0.014$), IL-6 ($P=0.049$), and TNF- α ($P=0.006$) after ALN administration. Compared with blank group, Micro-CT showed that significant bone resorption occurred in control group, LPS group, and LPS+ALN group, but significant intercranial resorption occurred in LPS group on day 2, while resorption was suppressed after ALN treatment. (3) Analyzing the pathological results, LPS led to an increase in osteoclasts, causing bone loss and bone structure defects, and significant bone resorption occurred in the skull, while less bone resorption occurred in LPS+ALN group, and the markers of osteoclast differentiation, osteocalcin and transforming growth factor- β , were least expressed at 46 days, with a higher rate of repair than in the other groups. **Conclusions** LPS immersion triggers bone resorption, which is detrimental to the proliferation and differentiation of rat skull osteoblasts, and ALN treatment effectively accelerates osteogenesis and inhibits the inflammatory bone resorption caused by LPS, thus improving the skull repair.

【Key words】 Skull repair; Lipopolysaccharide; Alendronate sodium; Bone resorption; Rat

Fund program: Science and Technology Plan and Cooperation Project between Provincial Colleges and Universities of Sichuan Province (2022YFSY0003)

颅骨缺损是常见的神经外科疾病,主要由车祸伤、外伤等引起,我国颅骨损伤的发病率约为24.1%^[1]。临床上,长度超过5 cm的骨缺损通常采用自体骨组织修补,具有改善宿主免疫反应、含存活骨生长细胞及加速新骨生成等优点,被认为是颅骨修复的“金标准”^[2-4],但自体回植存在感染、骨吸收、脑肿胀等并发症^[5-6]。朱锡德^[7]发现回植手术失败最常见的原因因为术后细菌感染,主要以金黄色葡萄球菌为主。当骨组织感染后,革兰阴性杆菌的特有成分——内毒素(lipopolysaccharide, LPS),通过激活巨噬细胞以释放炎症细胞因子,例如TNF- α 、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和IL-6等^[8-10]。孙世荃等^[11]将大鼠股骨中段取出并浸泡在LPS后回植,发现LPS诱导会促进破骨细胞的募集和活化。颅骨的皮质层较薄,骨松质及骨髓腔较骨密质所占比例更多;移植的颅骨形状不规则,新生区域骨密度低且骨质疏松,骨髓腔内破骨细胞活跃,溶解吸收大量骨松质,而成骨细胞状态活性低下,不能有效地新生骨质^[12]。当回植的颅骨受到细菌感染,炎症因子诱导大量破骨细胞增殖,引起骨代谢的变化,从而干扰骨骼修复^[13]。因此,在修复炎症引起的骨吸收时,关键在于如何抑制破骨细胞的生成并促进成骨细胞的活性,使骨再生作用强于骨质吸收^[14]。临床上,常用抑制骨吸收药物(维生素D^[15]、钙盐^[16]等)、促进骨愈合药物(固醇类激素^[17]、甲状旁腺激素^[18]等),以及兼具前2种功效的双膦酸盐(bisphosphonates, BPs)等辅助治疗骨修复。BPs是一种焦磷酸盐的碳取代类似物,通过抑制破骨前体细胞向骨表面的迁移和聚集,使破骨细胞前体细胞与骨组织的黏附过程被阻断,最终抑制多核细胞的分化和破骨细胞形成,使新形成的破骨细胞数量减少,促进干细胞的成骨分化^[19-22]。BPs分为含氮类(nitrogen-containing

bisphosphonates, NBPs)和不含氮(NON-nitrogen-containing bisphosphonates, NON-NBPs)两类,其中NBPs如阿仑膦酸钠(alendronate sodium, ALN)、唑来膦酸以及利塞膦酸钠等可以提高骨密度,降低骨折风险,广泛用于临床治疗^[23]。有研究发现ALN或唑来膦酸相较于利塞膦酸钠可预防骨质流失^[24]。然而,Karpuz^[25]使用5 mg唑来膦酸治疗骨质疏松症,结果显示,42%的患者出现急性期反应,并伴有短期自发恢复性贫血、血小板减少症和严重淋巴细胞减少等症状。

颅骨的自体回植已有广泛研究,但针对BPs用于治疗回植感染后引起的炎症骨吸收及促骨修复尚未发现。为避免唑来膦酸与LPS炎症反应症状重合,选用效果相当的ALN作为骨修复药物。ALN的双膦酸基团与骨内羟基磷灰石有强亲和力,能进入骨基质中抑制破骨细胞的活性^[26-27]。Dirckx等^[28]研究发现,ALN不仅可以抑制破骨细胞活性,还有诱导成骨的作用。基于此,本研究以大鼠颅骨缺损为模型,考虑动物存活率,通过低剂量的LPS诱导促炎症因子的释放,验证ALN是否可以用于治疗炎症导致的骨吸收,进一步研究ALN对炎症骨吸收修复的调控机制,为治疗颅骨自体回植的术后修复提供依据。

一、材料与方法

1. 实验材料与仪器: LPS(湛江博康海洋生物有限公司); ALN(大连美仑生物有限公司); 无水乙醇(AR级, 国药集团化学试剂有限公司); 二甲苯(AR级, 国药集团化学试剂有限公司); 苏木素染液(武汉塞维尔生物科技有限公司); 伊红染液(合肥博美生物科技有限责任公司); 盐酸(AR级, 成都市科隆化学品有限公司); 中性树胶(Biosharp生物公司); 大鼠IL-1 β ELISA试剂盒、大鼠IL-6检测试剂盒、大

鼠TNF- α 检测试剂盒(攸克生命科学技术有限公司); 兽用全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); SpectraMAX Plus384酶标仪(美谷分子仪器有限公司); 组织包埋机(常州郊区中威电子仪器厂); Panoramic 250数字切片扫描仪(3DHISTECH); Micro-CT(Quantum GX II, 美国珀金埃尔默)。

2. 实验大鼠来源及分组: 4周龄的SD雄性大鼠 20只, 体重(150 \pm 5)g, 由成都市达硕实验动物有限公司提供。饲养环境为SPF级动物房, 环境温度23~25 $^{\circ}$ C, 湿度45%~75%。所有大鼠白天和黑夜交替12h, 随意饮水和进食, 统一无菌鼠颗粒饲料喂养。适应性喂养1周后, 采用随机数字表法分为空白组、对照组、LPS组与LPS+ALN组, 每组5只。本研究已经四川里来思诺实验动物伦理委员会审核批准(伦理批号: LLSN-2023011)。

3. 实验方法: (1) 溶液配置。25 $^{\circ}$ C下, 将LPS溶解于无菌0.9%氯化钠溶液中, 配置浓度为5 EU/ml的LPS溶液; 将ALN溶解于无菌0.9%氯化钠溶液中, 配置浓度为10%的溶液, 即用即配。应用剂量参考孙世荃等^[11]、Oliveira等^[27]文献所描述。(2) 实验方法。在实验动物颅骨顶部开创8 mm直径圆孔, 骨瓣取出后, 不同组别按表1分别处理; 处理后, 回植骨瓣并缝合头皮。手术后, 立即皮下注射青霉素(15 mg/kg), 此后每24小时注射1次, 持续3 d, 所有操作在无菌条件下进行。

表1 实验不同分组操作方法

组别	操作方法
空白组	去除骨瓣后, 不回植
对照组	取出骨瓣浸泡在0.9%氯化钠溶液中10 min后直接回植至颅骨原位
LPS组	取出骨瓣浸泡在LPS溶液中10 min后回植至颅骨原位
LPS+ALN组	取出骨瓣浸泡LPS, 30 min后回植至颅骨原位, 每周ALN给药1次(根据大鼠体重注射, 0.7 mg/kg), 共计5次

注: LPS内毒素; ALN 阿仑膦酸钠

4. 血常规及炎症因子检测: 将实验组大鼠眼眶采血, 一部分置于肝素钠采血管, 检测血常规相关指标。另一部分血液静置30 min后, 离心(3 000 rpm, 5 min)获得大鼠血清, 通过ELISA试剂盒检测IL-1 β 、IL-6和TNF- α 炎症因子。

5. 微计算机断层扫描技术(micro computed tomography, Micro-CT): 术后第2、10、19、32天麻醉

取材, 4%多聚甲醛固定48 h, 通过CT以横截面方式扫描颅骨。通过CT内置软件生成样品的三维重建图像, 以评估颅骨修复的影像学表现。

6. 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法: 取颅骨组织固定于4%多聚甲醛24 h以上, 将组织从固定液取出置于乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液内脱钙。将颅骨部位组织修平整经后, 于脱水机内依次梯度酒精进行脱水。固定组织经全自动脱水机脱水, 包埋, 切片后如下操作: (1) 切片脱蜡水化二甲苯/梯度酒精/水分别浸泡; (2) 经苏木精染色10~20 min, 自来水冲洗1~3 min; 盐酸酒精分化5~10 s; 自来水冲洗1~3 min; 放入50 $^{\circ}$ C的温水中或弱碱性水溶液返蓝, 直到出现蓝色为止; 自来水冲洗1~3 min; 放入85%的酒精3~5 min; 伊红染色3~5 min; 水洗3~5 s。(3) 梯度酒精脱水, 放入二甲苯中至透明, 用中性树胶封固。

7. 抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色: 将颅骨组织切片脱蜡水化后, 具体操作如下。(1) 染液配制: A液: 0.1 mol/L醋酸缓冲液pH 5.0; B液: 4%亚硝酸钠; 副品红溶液: 副品红2.5 g+去离子水50 ml+浓盐酸7.5 ml。临用前B液与副品红溶液等比例混合; C液: 萘酚AS-BI磷酸酯20 mg+N,N-二甲基甲酰胺1 ml溶解。(2) 孵育液配制: A液18 ml+B液1 ml+C液1 ml混匀, 用1 mmol/L NaOH或1 mmol/L盐酸调pH至5.0, 再加酒石酸钾钠0.282 g, 充分溶解过滤后备用即为TRAP孵育液。(3) 染色: 切片置于TRAP孵育液内37 $^{\circ}$ C孵育50 min, 镜下观察破骨细胞呈酒红色为止, 蒸馏水漂洗。(4) 苏木素染细胞核: 切片入Harris苏木素染3~8 min, 水/盐酸/酒精清洗分化, 0.6%氨水返蓝, 流水冲洗。(5) 脱水封片: 将切片依次放入二甲苯/梯度酒精/水分别清洗脱水至透明, 晾干后中性树胶封片。

8. 统计学方法: 所有统计分析均使用GraphPad Prism 8.0.2软件进行。采用Shapiro-Wilk检验进行正态分布检验, 符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 时间变量与多组间比较采用重复测量方差分析(RM-ANOVA)。以颅骨回植时间为自变量, 以检测因子为因变量, 采用单因素回归分析大鼠颅骨回植后病理情况和LPS及LPS+ALN对骨修复的干预影响。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 各组模型大鼠在不同的颅骨回植时间下血常规及炎症因子变化比较: 各组模型大鼠在不同

的颅骨回植时间下白细胞、淋巴细胞、单核细胞计数比较, 差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 检测中, LPS+ALN组在10 d时中性粒细胞水平高于空白组, 差异有统计意义(95%CI: $-6.084 \sim -0.116$, $t=6.21$, $P=0.046$), 见表2。空白组在19 d时红细胞计数与LPS组、LPS+ALN组比较, 差异有统计学意义[LPS组(95%CI: $-5.922 \sim -0.244$, $t=5.60$, $P=0.041$)及LPS+ALN组(95%CI: $-3.727 \sim -0.552$, $t=5.74$, $P=0.019$)]; LPS组在10 d时血红蛋白与空白组(95%CI: $4.914 \sim 21.750$, $P=0.018$)和对照组(95%CI: $5.197 \sim 15.470$, $t=10.96$, $P=0.009$)比较, 差异均有统计学意义; ALN给药治疗后, LPS+ALN组与对照

组比较差异无统计学意义; 19 d时, LPS+ALN组较空白组的血红蛋白值随回植时间变化更大(95%CI: $-35.410 \sim -2.589$, $t=4.80$, $P=0.031$); 10 d时, 空白组与LPS组的血小板值差异有统计学意义(95%CI: $-1\ 527.000 \sim -358.000$, $t=11.03$, $P=0.020$)。见表3。血清中炎症因子浓度变化分析, 见表4, 结果显示, LPS+ALN组在46 d时的IL-1 β 水平高于对照组(95%CI: $-0.041 \sim -0.008$, $t=6.77$, $P=0.014$); LPS+ALN组在10 d时的IL-6水平低于空白组(95%CI: $0.001 \sim 0.229$, $t=3.64$, $P=0.049$); LPS+ALN组在19 d时的TNF- α 水平低于空白组(95%CI: $1.476 \sim 5.191$, $t=7.31$, $P=0.006$)。

表2 各组模型大鼠在不同的颅骨回植时间下白细胞、淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞变化($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	白细胞计数				淋巴细胞计数			
		2 d	10 d	19 d	46 d	2 d	10 d	19 d	46 d
空白组	5	11.867 ± 1.159	13.200 ± 0.173	10.533 ± 1.358	10.267 ± 2.673	8.967 ± 1.935	9.100 ± 1.100	8.067 ± 0.666	6.300 ± 1.637
对照组	5	11.333 ± 1.986	14.233 ± 1.286	11.967 ± 2.501	9.867 ± 1.950	8.233 ± 2.857	7.633 ± 0.404	6.533 ± 1.358	6.100 ± 0.889
LPS组	5	10.967 ± 1.848	14.567 ± 3.247	10.533 ± 0.404	9.200 ± 2.982	8.567 ± 0.981	7.467 ± 1.935	7.667 ± 1.106	6.933 ± 2.223
LPS+ALN组	5	10.880 ± 1.389	14.600 ± 2.787	10.800 ± 1.562	8.400 ± 1.101	7.133 ± 1.629	7.367 ± 1.850	6.400 ± 0.300	5.400 ± 1.035

组别	只数	单核细胞计数				中性粒细胞计数			
		2 d	10 d	19 d	46 d	2 d	10 d	19 d	46 d
空白组	5	0.233 ± 0.058	0.300 ± 0.100	0.267 ± 0.058	0.267 ± 0.058	2.667 ± 0.751	3.667 ± 0.231	2.200 ± 0.794	3.700 ± 1.058
对照组	5	0.300 ± 0.100	0.467 ± 0.058	0.333 ± 0.058	0.267 ± 0.058	2.800 ± 0.819	6.133 ± 0.850	3.533 ± 1.498	3.500 ± 1.114
LPS组	5	0.233 ± 0.058	0.433 ± 0.115	0.267 ± 0.058	0.167 ± 0.115	2.167 ± 0.808	3.867 ± 0.751	2.600 ± 0.751	1.800 ± 0.854
LPS+ALN组	5	0.267 ± 0.058	0.467 ± 0.115	0.300 ± 0.100	0.167 ± 0.058	3.400 ± 0.300	6.767 ± 0.833 ^a	4.100 ± 1.732	2.833 ± 0.058

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; LPS 内毒素; ALN 阿仑膦酸钠

表3 各组模型大鼠在不同的颅骨回植时间下红细胞、血红蛋白、血小板变化($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	红细胞计数($\times 10^{12}/L$)			
		2 d	10 d	19 d	46 d
空白组	5	7.990 ± 0.709	7.003 ± 0.129	6.550 ± 0.382	7.673 ± 0.656
对照组	5	8.210 ± 0.226	7.367 ± 0.220	8.453 ± 1.139	7.853 ± 0.257
LPS组	5	8.013 ± 0.318	7.340 ± 0.139	9.633 ± 0.873 ^a	8.313 ± 0.274
LPS+ALN组	5	8.453 ± 0.539	7.520 ± 0.195	8.690 ± 0.520 ^a	7.350 ± 0.053

组别	只数	血红蛋白(g/L)			
		2 d	10 d	19 d	46 d
空白组	5	165.333 ± 6.351	150.667 ± 2.309	143.000 ± 4.359	155.000 ± 16.462
对照组	5	170.000 ± 1.000	147.667 ± 1.528	161.000 ± 18.735	154.667 ± 6.506
LPS组	5	165.333 ± 11.015	137.333 ± 0.577 ^{ab}	178.667 ± 26.026	153.333 ± 8.083
LPS+ALN组	5	174.667 ± 11.930	146.333 ± 5.508	162.000 ± 5.292 ^a	151.667 ± 0.577

组别	只数	血小板计数($\times 10^9/L$)			
		2 d	10 d	19 d	46 d
空白组	5	1 051.333 ± 177.430	194.000 ± 11.269	1 048.001 ± 63.269	1 145.000 ± 121.897
对照组	5	1 074.333 ± 413.552	774.333 ± 242.042	1 093.000 ± 293.586	1081.667 ± 154.079
LPS组	5	1 202.000 ± 92.407	1 136.333 ± 147.555 ^a	1 467.000 ± 238.761	1 338.333 ± 321.298
LPS+ALN组	5	1 200.667 ± 91.664	903.667 ± 330.697	1 053.667 ± 279.525	1 040.667 ± 11.846

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与对照组比较, ^b $P < 0.01$; LPS 内毒素; ALN 阿仑膦酸钠

表4 各组模型大鼠在不同的颅骨回植时间下 IL-1 β、IL-6、TNF-α 变化比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-1 β				IL-6			
		2 d	10 d	19 d	46 d	2 d	10 d	19 d	46 d
空白组	5	0.039 ± 0.038	-0.006 ± 0.006	-0.009 ± 0.001	0.085 ± 0.114	0.356 ± 0.152	0.300 ± 0.045	0.341 ± 0.050	0.286 ± 0.041
对照组	5	0.003 ± 0.002	0.006 ± 0.001	0.004 ± 0.018	-0.007 ± 0.003	0.271 ± 0.039	0.202 ± 0.028	0.331 ± 0.072	0.262 ± 0.028
LPS组	5	0.012 ± 0.017	0.002 ± 0.003	-0.001 ± 0.003	-0.000 ± 0.014	0.257 ± 0.031	0.227 ± 0.058	0.355 ± 0.023	0.325 ± 0.055
LPS+ALN组	5	0.005 ± 0.030	0.003 ± 0.005	0.001 ± 0.015	0.018 ± 0.005 ^a	0.249 ± 0.039	0.185 ± 0.030 ^b	0.328 ± 0.085	0.294 ± 0.011

组别	只数	TNF-α			
		2 d	10 d	19 d	46 d
空白组	5	9.545 ± 1.403	10.076 ± 4.368	10.707 ± 0.569	13.232 ± 3.433
对照组	5	10.202 ± 2.780	11.465 ± 4.597	7.222 ± 0.885	9.167 ± 3.433
LPS组	5	10.934 ± 1.819	9.672 ± 1.776	13.737 ± 3.652	9.343 ± 3.878
LPS+ALN组	5	10.530 ± 1.219	11.540 ± 3.868	7.374 ± 0.548 ^c	11.818 ± 1.050

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与空白组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; LPS 内毒素; ALN 阿仑膦酸钠

2. Micro-CT分析: 俯视的大鼠颅骨实况, 见图1。空白组仅有少量针状骨结构沿缺损边缘生长, 而其他实验组均发生明显的骨吸收。图1C显示, LPS组浸泡后颅骨中间位置初期2 d时即发生较明显的骨吸收, 而对照组在32 d出现, 说明LPS加速骨吸收的发生。图1D显示LPS+ALN组在仅缺损颅骨边缘处发生骨吸收情况, 未发生骨间吸收且整体吸收情况较弱, 进一步证实ALN可以抑制LPS导致的骨吸收。进一步分析不同组骨密度, 表5结果显示, 颅骨回植2、4 d时, 空白组因颅骨缺失, 与另外3组模型组骨密度值比较差异有统计意义(均 $P < 0.01$)。空白组为新生骨组织较原颅骨骨密度偏低, LPS+ALN组与其他组比较, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 说明该剂量下ALN对骨密度影响有限。但是LPS组出现明显的先下降后上升, LPS表现出对骨密度的短期降低作用, ALN给药作用减弱。表6结果显示, 空白组因取出自体颅骨组织, 故再生骨面积及骨体积较低, 2、4 d时骨面积和骨体积与LPS+ALN组比较, 差异均有统计学意义[骨面积(2 d: 95%CI: -209.700 ~ -31.650, $t=29.47$, $P=0.031$; 4 d: 95%CI: -217.000 ~ -19.580, $t=26.06$, $P=0.038$); 骨体积(2 d: 95%CI: -30.210 ~ -4.551, $t=29.46$, $P=0.031$; 4 d: 95%CI: -31.280 ~ -2.793, $t=26.01$, $P=0.038$)]。LPS+ALN组在32 d时骨面积最大, 且前期在骨面积和骨体积的修复中更具有优势, 但后期略有下降。对照组和LPS组骨面积和体积先减小后增大, LPS干扰下骨修复前期速度较对照组更慢。

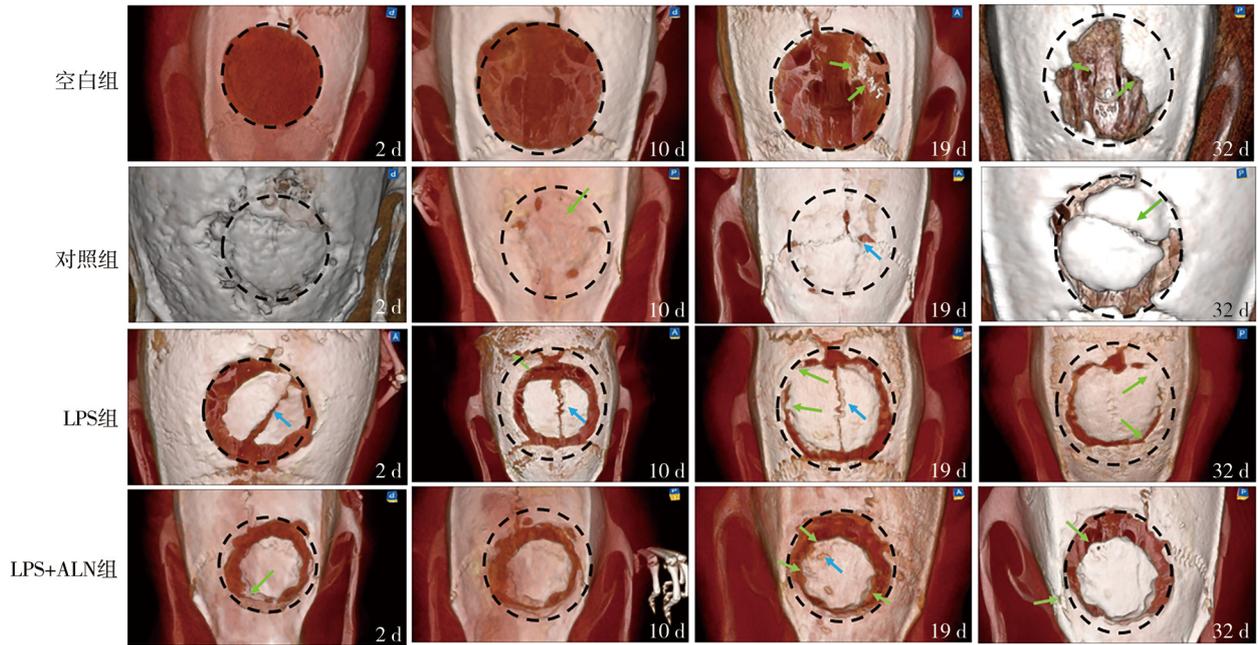
3. 颅骨组织分析结果: 见图2。将各实验组大鼠安乐死后分别取出脑和颅骨组织, 从显微镜下较难看出不同治疗组之间的显著区别, 这同时也说明

较难从外部观察进行比较是否发生骨吸收。

4. HE染色分析: 见图3。将各实验组大鼠颅骨切片进行HE染色, 空白组由于没有进行回植, 可以看到大量结缔组织, 但没有看到骨矿化和骨增长, 而对照组骨质大量丢失, 没有形成完整骨结构, 出现明显骨吸收现象, 仅回植但不作任何干预的情况下, 颅骨的自我修复还是会受到影响。LPS+ALN组颅骨恢复效果最好, 骨面积大于前面三组, 骨组织量和完整程度更高。图3结果显示, LPS组颅骨出现明显的骨吸收现象, 颅骨外层出现明显骨结构破坏, 骨质丢失和骨结构缺损, 颅骨内侧也存在轻微骨吸收, 说明LPS对大鼠颅骨增殖分化具有不利影响。

5. TRAP染色分析: 见图4。将大鼠颅骨组织进行TRAP染色, 结果显示, 空白对照组由于颅骨缺失, 可以观察到一定数量的破骨细胞。LPS组颅骨修复的未成骨缝隙中含有大量破骨细胞, 而LPS+ALN组相对较少。

6. 免疫组化分析: 见图5。骨钙素(osteocalcin, OCN)^[19]为成骨细胞的分化标记, 转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)^[20]兼具有促进成骨细胞分化增殖、刺激骨形成, 支持破骨细胞形成、刺激骨吸收的双重作用, 是骨形成和与骨吸收之间重要的偶联调节因子, 实验中选取这2个标志物进行免疫组化分析。从图5中OCN和TGF-β的染色结果中可以发现, 颅骨回植过程中成骨细胞一直在促进骨的形成, 但是空白组难以在一定时间内形成致密的骨组织, 长期处于分化增殖状态; 对照组由于未经药物干预, 在回植颅骨和头部骨组织的连接处会发现OCN和TGF-β大量表达; LPS组颅骨缺损处OCN和TGF-β大量阳性表达, 反映了骨



注：黑色曲线表示颅骨截面区域，绿色箭头表示骨修复情况，蓝色箭头表示骨吸收情况；LPS 内毒素；ALN 阿仑膦酸钠；Micro-CT 微计算机断层扫描技术

图1 各实验组2、10、19、32 d时大鼠颅骨Micro-CT图

表5 各组模型大鼠在不同的颅骨回植时间下骨密度变化(g/cm³, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	2 d	4 d	10 d	24 d	32 d
空白组	5	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.519 ± 0.100	0.541 ± 0.105	0.693 ± 0.094
对照组	5	0.586 ± 0.110 ^a	0.653 ± 0.072 ^a	0.639 ± 0.084	0.723 ± 0.094	0.600 ± 0.014
LPS组	5	0.642 ± 0.010 ^a	0.647 ± 0.008 ^a	0.523 ± 0.125	0.737 ± 0.028	0.749 ± 0.027
LPS+ALN组	5	0.659 ± 0.039 ^a	0.639 ± 0.047 ^a	0.624 ± 0.159	0.717 ± 0.165	0.714 ± 0.035

注：与空白组比较，^aP < 0.001；LPS 内毒素；ALN 阿仑膦酸钠

表6 各组模型大鼠在不同颅骨回植时间下骨面积、骨体积变化($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	骨面积(mm ²)				
		2 d	4 d	10 d	24 d	32 d
空白组	5	-	-	0.175 ± 0.007	4.545 ± 3.642	23.370 ± 13.958
对照组	5	98.545 ± 7.729	94.770 ± 35.497	81.575 ± 24.077	202.315 ± 3.415	132.910 ± 70.527
LPS组	5	107.715 ± 68.285	116.050 ± 76.523	87.075 ± 21.899	136.360 ± 47.800	213.290 ± 31.707
LPS+ALN组	5	120.695 ± 5.791 ^a	118.300 ± 6.421 ^a	175.395 ± 105.621	192.025 ± 142.447	213.980 ± 45.163

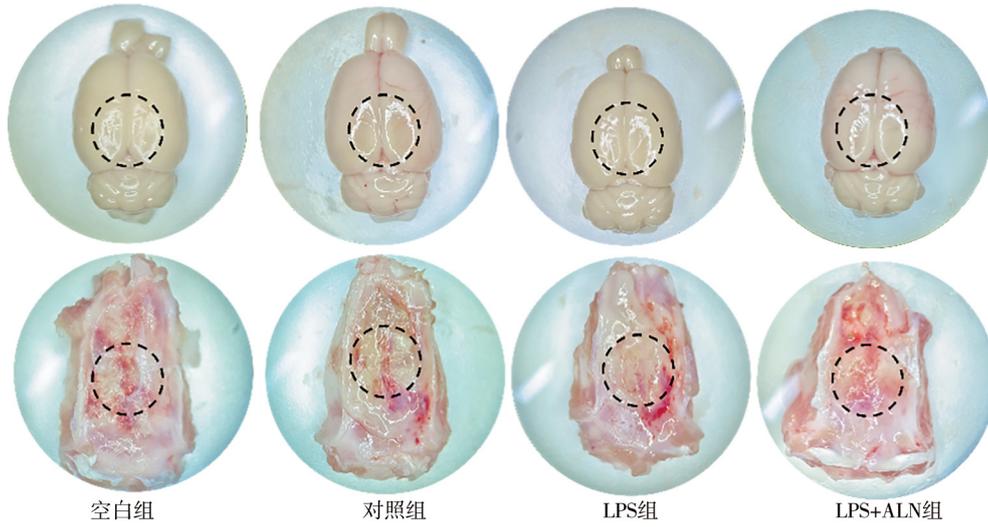
组别	只数	骨体积(mm ³)				
		2 d	4 d	10 d	24 d	32 d
空白组	5	-	-	0.021 ± 0.001	0.410 ± 0.325	3.365 ± 2.015
对照组	5	14.190 ± 1.117	13.645 ± 5.112	11.750 ± 3.465	18.210 ± 0.311	11.960 ± 6.350
LPS组	5	15.510 ± 9.829	16.710 ± 11.017	7.835 ± 1.973	16.865 ± 10.798	19.155 ± 0.587
LPS+ALN组	5	17.380 ± 0.843 ^a	17.035 ± 0.926 ^a	12.790 ± 2.418	17.285 ± 12.820	19.215 ± 4.593

注：与空白组比较，^aP < 0.05；LPS 内毒素；ALN 阿仑膦酸钠；- 无数据

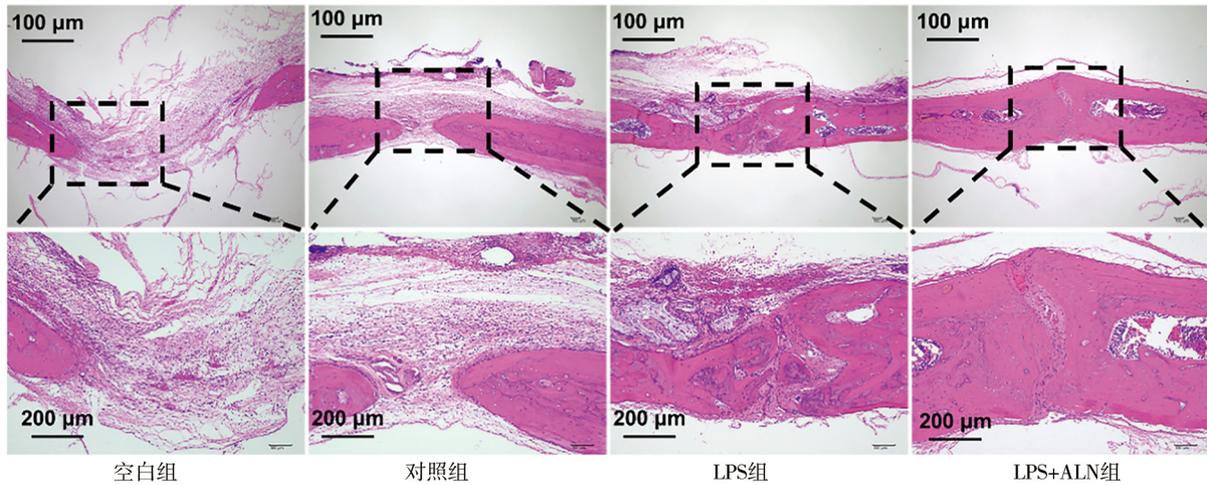
形成对骨吸收之间动态过程；LPS+ALN组由于恢复的较快，OCN和TGF-β均表达较少。

讨论 颅骨修复与成骨细胞和破骨细胞的平衡有关^[14]，但是由于骨回植并感染时会产生炎症反应，而LPS会诱导炎症反应加剧，进而加剧骨吸收

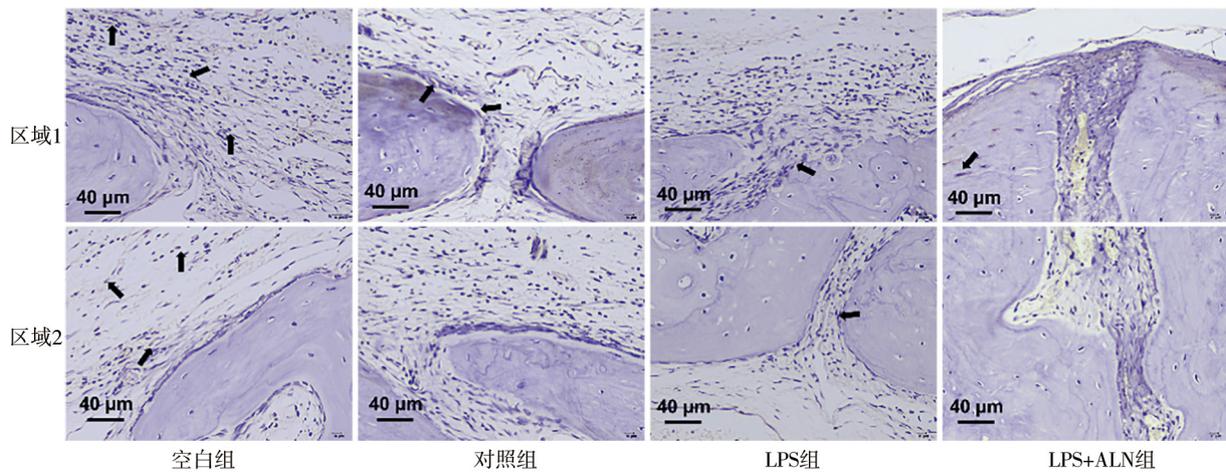
的发生，破碎的骨片被炎症细胞包围，因此加入药物改善骨吸收位置的微环境，促使骨再生解决骨缺损问题。通过小剂量的LPS诱导颅骨组织引起促炎症因子的释放，增加破骨细胞的生成，首次证明了ALN可以抑制LPS诱导的破骨细胞的生成以及骨吸



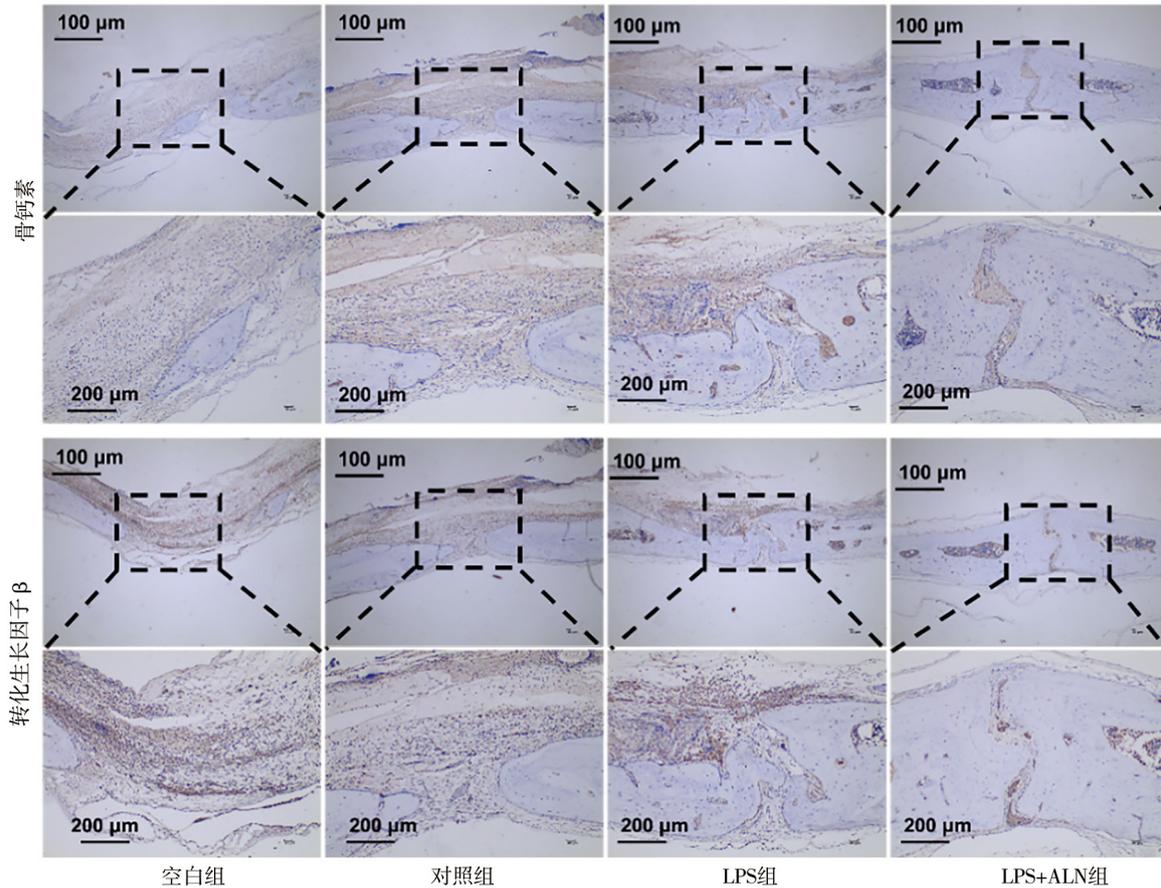
注：虚线表示回植颅骨区域；LPS 内毒素；ALN 阿仑膦酸钠
图2 实验46 d时各组大鼠脑及颅骨拍照图



注：虚线表示回植颅骨放大区域；LPS 内毒素；ALN 阿仑膦酸钠；HE 苏木精-伊红
图3 实验46 d时各组模型大鼠颅骨HE染色图



注：黑色箭头表示破骨细胞；LPS 内毒素；ALN 阿仑膦酸钠；TRAP 抗酒石酸性磷酸酶染色
图4 实验46 d时各组模型大鼠颅骨TRAP染色图



注: 棕色区域为阳性表达; 虚线表示放大区域; LPS 内毒素; ALN 阿仑膦酸钠

图5 实验46 d时各组模型大鼠颅骨免疫组化图

收, 提高骨生成速度。

Shi等^[29]研究发现ALN可以通过干扰Wnt信号通路, 有效抑制炎症因子的分泌。白细胞数量计数由淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞等组成, 白细胞整体数量比例可以反映骨细胞炎症程度^[30]。中性粒细胞通过产生单核细胞趋化蛋白1富集单核细胞, 单核细胞进一步分化巨噬细胞, 随后巨噬细胞释放促炎症因子^[31]。本研究结果显示, 在10 d时中性粒细胞数量及单核细胞异常增多, 骨修复处于纤维骨痂形成及骨性骨痂形成阶段, 对应HE切片有真状骨结构形成; LPS参与下干扰了细胞及分泌细胞因子的骨愈合调节, 而ALN有效地弥补了LPS对白细胞生成的抑制作用。红细胞与血红蛋白与很多临床疾病密切相关, 如静脉血栓、镰状细胞贫血症的骨坏死等^[32], 血小板具有促凝血和促进骨组织生长的作用。进一步发现, LPS会导致大鼠体内血细胞数量和血红蛋白含量偏高, 可能是炎症反应与促炎细胞因子的表达, 抑制蛋白水平的表达和活性氧的生成^[33]。本研究结果显示, 空白组的血小板值在10 d

时异常低, 但后期恢复正常, 可能是血小板假性减低导致; LPS组整体较其他组偏高, 可能是LPS诱导单核细胞的促凝血蛋白分泌, 促凝血活性提高^[34]。

IL-1β、IL-6、TNF-α是3种促炎性细胞因子, 由辅助性T细胞、T淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞分泌而成, 在调节免疫系统中发挥着重要作用^[35]。本实验中, 因考虑颅骨回植后大鼠存活率问题, 采用小剂量LPS浸泡, 对炎症因子的调控较微弱, 结果显示, 颅骨缺损面积过大其炎症反应指标IL-1β、IL-6、TNF-α水平更高, 而LPS诱导后即使长期修复后, 炎症反应仍旧偏高, ALN灌胃口服后集中存在与生物体内活性骨重塑的部位, 通过影响破骨细胞皱缩边界的形成和调节细胞骨架的分子途径来抑制骨吸收^[26]。

ALN主要起诱导成骨作用, 参与骨组织的修复。本研究中Micro-CT中发现回植颅骨均发生明显骨吸收, 但LPS浸泡后骨吸收更严重, Micro-CT与骨面积和骨体积结果一致, LPS引起的骨吸收导致前期修复缓慢甚至抑制。有研究推测可能是植入骨

的吸收来源于破骨细胞, LPS引起破骨细胞的增殖, 导致骨面积及骨体积前期略下降, 而ALN给药修复后回植的颅骨本身未发生骨吸收, 同时修复速度加快^[28]。受限于打孔的不规则程度, 从长期骨损失修复上ALN有一定促骨生成作用。在组织学染色中, HE染色中观察到LPS会导致明显的骨吸收并破坏内部骨结构组织, ALN可以抑制LPS诱导的骨吸收, 提高颅骨修复的完整程度。进一步从破骨细胞生成发现, ALN通过抑制破骨细胞的关键酶- 法呢醇焦磷酸合成酶从而影响破骨细胞功能, 进而影响骨吸收^[35]。结合OCN和TGF- β 的表达说明LPS会由于影响骨形成和骨吸收过程, 干扰颅骨修复过程, 但ALN可以抑制LPS的干扰进而加速骨缺损的修复。

颅骨自体回植后出现的细菌感染、骨吸收、脑肿胀等问题促进了抗骨质疏松类治疗药物的临床使用, 但细菌感染导致的LPS增多引起炎症骨吸收是否可以通过AIN等药物抑制尚未有动物实验验证。本实验通过大鼠颅骨回植建模, 利用小剂量的LPS诱导一定炎症骨吸收, 首次证实ALN对其具有一定的抑制作用以及提高骨修复速度。然而, 本研究存在一定的局限性: LPS的剂量尚未达到最佳的感染模型以及细菌感染是否与LPS感染症状一致; 同时, 在临床使用时由于人体骨组织密度更高, 对药物促修复要求也更高。因此, 通过该动物模型验证结果, 后期研究可以增加临界LPS感染组以及细菌感染组, 结合ALN与生长因子如碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子等联合治疗修复。此外, ALN的修复机制及对动物修复时间的研究基础也为感染型骨损伤的临床治疗提供依据。

综上所述, 本实验结果表明, LPS浸泡会导致一定的骨吸收, 不利于大鼠颅骨增殖分化, 而ALN给药后颅骨恢复较好, 可以促进骨生成以及抑制骨吸收。本次实验发现骨回植样品浸泡5 EU/ml LPS溶液时, 观察到中性粒细胞及单核细胞明显低于LPS+ALN组, LPS+ALN比空白组的炎症反应调控更显著; 从病理结果中发现, LPS会引起骨质丢失和骨结构缺损, 颅骨发生骨吸收现象, 同时干扰颅骨回植修复过程; 而给ALN药物剂量为0.7 mg/kg时, 骨吸收减少, 从骨修复角度能够显著降低LPS影响, 促进骨结构修复的完整性。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

志谢 感谢启载生物科技(成都)有限公司对本研究的资助, 以及实验方案建议

作者贡献声明 研究设计为王静霞, 数据收集、整理为胡榭、王静霞、张晓彬、陈屿恒, 统计分析、论文撰写为胡榭、王静霞、张晓彬, 论文修订为王静霞、张晓彬、倪茂君, 彭朝荣、田珊珊审校

参 考 文 献

- [1] 夏建江, 张岩, 孟宏武. 异体颅骨外板和自体骨修复猪颅骨缺损的研究[J]. 医学理论与实践, 2023, 36(23): 3961-3964. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2023.23.001. Xia JJ, Zhang Y, Meng HW. Study on repairing pig skull defect with allogenic skull outer plate and autogenous bone[J]. J Med Theor & Prac, 2023, 36(23): 3961-3964.
- [2] Rogers GF, Greene AK. Autogenous bone graft: basic science and clinical implications[J]. J Craniofac Surg, 2012, 23(1): 323-327. DOI: 10.1097/SCS.0b013e318241dcb.
- [3] Mirabet V, García D, Yagüe N, et al. The storage of skull bone flaps for autologous cranioplasty: literature review[J]. Cell Tissue Bank, 2021, 22(3): 355-367. DOI: 10.1007/s10561-020-09897-2.
- [4] 周佳林, 侯晓峰, 张春阳. 小儿颅骨缺损修补材料的研究进展[J]. 中国医学工程, 2020, 28(4): 32-36. DOI: 10.19338/j.issn.1672-2019.2020.04.008. Zhou JL, Hou XF, Zhang CY. Research progress of repair materials for skull defects in children[J]. China Medical Engineering, 2020, 28(4): 32-36.
- [5] Lilja-Cyron A, Andresen M, Kelsen J, et al. Intracranial pressure before and after cranioplasty: insights into intracranial physiology[J]. J Neurosurg, 2019, 133(5): 1548-1558. DOI: 10.3171/2019.7.JNS191077.
- [6] Andreas B, Sandrine H, Stefan R, et al. Early cranioplasty may improve outcome in neurological patients with decompressive craniectomy[J]. Brain injury, 2013, 27(9): 1073-1079. DOI: 10.3109/02699052.2013.794972.
- [7] 朱锡德. 颅骨修补材料比较的系列研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2020.
- [8] Luebke JL, Shen J, Bruce KE, et al. The CsoR-like sulfurtransferase repressor (CstR) is a persulfide sensor in *Staphylococcus aureus*[J]. Mol Microbiol, 2014, 94(6): 1343-1360. DOI: 10.1111/mmi.12835.
- [9] Alper K, Taner A, Mevlüt A, et al. Therapeutic effects of caffeic acid phenethyl ester on alveolar bone loss in rats with endotoxin-induced periodontitis[J]. J Dent Sci, 2019, 14(4): 339-345. DOI: 10.1016/j.jds.2019.03.011.
- [10] Huang Y, Du Z, Zheng T, et al. Antibacterial, conductive, and osteocompatible polyorganophosphazene microscaffolds for the repair of infectious calvarial defect[J]. J Biomed Mater Res A, 2021, 109(12): 2580-2596. DOI: 10.1002/jbm.a.37252.
- [11] 孙世荃, 张康蓉, 康悦, 等. 骨移植并发感染时骨吸收的细胞学成分和植入骨辐照灭菌的作用[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2006, 5(6): 341-345. DOI: 10.3969/j.issn.2095-252X.2006.06.006. Sun SQ, Zhang KR, Kang Y, et al. Cytological components of bone absorption during bone transplantation complicated with infection and the effect of irradiation sterilization of implanted bone[J]. Chinese Journal of Bone Tumor and Bone Disease, 2006, 5(6): 341-345.
- [12] Moejko-Ciesielska J, Kiewisz R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: still fabulous[J]. Microbiol Res, 2016, 192: 271-282. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010.

- [13] Choi HJ, Im JA, Kim SH. Changes in bone markers after once-weekly low-dose alendronate in postmenopausal women with moderate bone loss [J]. *Maturitas*, 2008, 60(2): 170-176. DOI: 10.1016/j.maturitas.2008.05.003.
- [14] Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025 [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 22(3): 465-475. DOI: 10.1359/jbmr.061113.
- [15] Chun RF, Shieh A, Gottlieb C, et al. Vitamin D binding protein and the biological activity of vitamin D [J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10: 718. DOI: 10.3389/fendo.2019.00718.
- [16] Dashnyam K, Bayaraa O, Mandakhbayar N, et al. Nanoscale calcium salt-based formulations as potential therapeutics for osteoporosis [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(8): 4604-4613. DOI: 10.1021/acsbomaterials.0c00219.
- [17] Thapa S, Nandy A, Rendina-Ruedy E. Endocrinal metabolic regulation on the skeletal system in post-menopausal women [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1052429. DOI: 10.3389/fphys.2022.1052429.
- [18] Shen M, Zhang R, Jia W, et al. Nuclear scaffold protein p54 (nrb)/NONO facilitates the hypoxia-enhanced progression of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2021, 40(24): 4167-4183. DOI: 10.1038/S41388-021-01848-9.
- [19] Estelle P, Sylvie M, Guillaume L, et al. Synthesis of hybrid polyphenol/hydroxyapatite nanomaterials with anti-radical properties [J]. *Nanomaterials*, 2022, 12(20): 3588. DOI: 10.3390/nano12203588.
- [20] Kanan B, Takefumi O, Tetsu T, et al. Release of nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs) from hydroxyapatite by non-NBPs and by pyrophosphate [J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44(11): 1670-1680. DOI: 10.1248/BPB.B21-00320.
- [21] Russell G, Graham G. Determinants of structure-function relationships among bisphosphonates [J]. *Bone*, 2007, 40(5): S21-S25. DOI: 10.1016/j.bone.2007.03.002.
- [22] Wang B, Liu J, Niu D, et al. Mussel-inspired bisphosphonated injectable nanocomposite hydrogels with adhesive, self-healing, and osteogenic properties for bone regeneration [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021(28): 13. DOI: 10.1021/ACSAMI.1C06058.
- [23] Wilkinson JM. The use of bisphosphonates to meet orthopaedic challenges [J]. *Bone*, 2020, 137: 115443. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115443.
- [24] Tutaworn T, Nieves JW, Wang Z, et al. Bone loss after denosumab discontinuation is prevented by alendronate and zoledronic acid but not risenedronate: a retrospective study [J]. *Osteoporos Int*, 2023, 34(3): 573-584. DOI: 10.1007/s00198-022-06648-9.
- [25] Karpuz S. Zoledronic acid-induced severe lymphopenia [J]. *Osteoporos Int*, 2023(9): 34. DOI: 10.1007/s00198-023-06831-6.
- [26] Kolios L, Hoerster AK, Sehmisch S, et al. Do estrogen and alendronate improve metaphyseal fracture healing when applied as osteoporosis prophylaxis [J]. *Calcif Tissue Int*, 2010, 86(1): 23-32. DOI: 10.1007/s00223-009-9318-7.
- [27] Oliveira ND, Oliveira J, Leticia SM, et al. Bone repair in craniofacial defects treated with different doses of alendronate: a histological, histomorphometric, and immunohistochemical study [J]. *Clin Oral Investig*, 2019, 23(5): 2355-2364. DOI: 10.1007/s00784-018-2670-0.
- [28] Dirckx N, Moorer MC, Clemens TL, et al. The role of osteoblasts in energy homeostasis [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(11): 651-665. DOI: 10.1038/s41574-019-0246-y.
- [29] Shi L, Li X, Tang J. Effect of alendronate sodium on chondrocytes in joint inflammation through down-regulation of microRNA-184 (miR-184) [J]. *Mater Express*, 2021, 11(7): 1132-1138. DOI: 10.1166/MEX.2021.2024.
- [30] 谷鑫博, 刘泽民, 孙海钰. 中性粒细胞在骨折愈合中的作用方式及干预后的促愈合效应 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(15): 3235-3243. DOI: 10.12307/org.3235-3243.2024.01.15.
Gu XB, Liu ZM, Sun HY. The role of neutrophils in fracture healing and the effect of promoting healing after intervention [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2025, 29(15): 3235-3243.
- [31] Okamura H, Yoshida K, Yang D, et al. Protein phosphatase 2A C α regulates osteoblast differentiation and the expressions of bone sialoprotein and osteocalcin via osterix transcription factor [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(5): 1031-1037. DOI: 10.1002/jcp.24250.
- [32] Kim Y, Choi S, Youn J, et al. Effects of remote ischemic preconditioning on the deformability and aggregation of red blood cells in a rat endotoxemia model [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2021. DOI: 10.3233/CH-201084.
- [33] 唐若晖. 白介素 37 抑制破骨细胞分化和缓解炎性骨质破坏的研究 [D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2019.
- [34] Turner DM, Nedjai B, Hurst T, et al. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease [J]. *BBA-Molecular Cell Research*, 2014, 1843(11): 2563-2582. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
- [35] Abadie CE, Devogelaar J, Ringe DJ, et al. Recommendations for the registration of agents to be used in the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: updated recommendations from the group for the respect of ethics and excellence in science [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2005, 35(1): 1-4. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2005.03.006.

(收稿日期: 2024-10-21)

(本文编辑: 王影)