

生骨再造丸对激素性股骨头坏死兔骨髓组织中微小 RNA-708 表达的影响

曹林忠^{1△} 郭明峻¹ 蒋玮¹ 王多贤¹ 张琪¹ 刘孟初¹ 马学强¹

[摘要] 目的:探索生骨再造丸对激素性股骨头坏死(SANFH)兔的干预作用及相关机制。方法:50 只新西兰大白兔按随机数字表法分为空白组 10 只和实验组 40 只,实验组采用大肠杆菌脂多糖(LPS)联合甲泼尼龙琥珀酸钠造模法建立 SANFH 兔模型 32 只,按随机数字表法分为模型组 10 只,仙灵骨葆组 11 只,生骨再造丸组 11 只。仙灵骨葆组和生骨再造丸组分别以 0.4 g/kg 仙灵骨葆和 0.6 g/kg 生骨再造丸灌胃,28 d 后取出两侧股骨,提取骨髓组织中骨髓间充质干细胞(BMSCs)、成骨细胞(OB)及脂肪细胞,qRT-PCR 检测 miRNA-708-3p 和 miRNA-708-5p 表达水平。结果:模型组 BMSCs、OB 和脂肪细胞中的 miRNA-708-3p、miRNA-708-5p 与空白组相比表达水平均有升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);仙灵骨葆组和生骨再造丸组 BMSCs、OB 中 miRNA-708-3p、miRNA-708-5p 与模型组相比表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:SANFH 兔骨髓组织中 miRNA-708-3p 与 miRNA-708-5p 的表达升高是 SANFH 发生的机制之一,生骨再造丸抑制 SANFH 兔 BMSCs、OB 中的 miRNA-708-3p 与 miRNA-708-5p 表达水平是防治早期 SANFH 的分子机制。

[关键词] 生骨再造丸;激素性股骨头坏死;微小核糖核苷酸

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)07-0001-06

Efficacy of Shenggu Zaizao Pills on MicroRNA-708 Expression in Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head Rabbit Bone Marrow Tissue and Its Mechanism

CAO Linzhong^{1△} WU Mingjun¹ JIANG Wei¹ WANG Duoxian¹
ZHANG Qi¹ LIU Mengchu¹ MA Xueqiang¹

¹Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

²Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China.

Abstract Objective: To explore the interventional efficacy of Shenggu Zaizao pills on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SANFH) rabbits and related mechanisms. **Methods:** 50 New Zealand white rabbits were divided into a blank group of 10 and an experimental group of 40 according to the random number table. 32 SANFH rabbit models used Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS) combined with methylprednisolone sodium succinate were built in the experimental group. They were divided into model group of 10, Xianling Gubao group of 11, Shenggu Zaizao pills group of 11 by random number table method. Xianling Gubao group and Shenggu Zaizao pills group were given 0.4 g/kg Xianling Gubao and 0.6 g/kg Shenggu Zaizao pills by gavage respectively. After 28 d, both femurs were taken out, and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), osteoblasts (OB) and fat cells were extracted from the bone marrow tissue. The expression levels of miRNA-708-3p and miRNA-708-5p were detected by qRT-PCR. **Results:** The expression levels of miRNA-708-3p and miRNA-708-5p in BMSCs, OB and adipocytes of the model group were increased compared with the blank group ($P < 0.01$). The expression level of miRNA-708-3p and miRNA-708-5p in OB and BMSCs of Xianling Gubao group and Shenggu Zaizao pills group were lower than that of the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The increased expression of miRNA-708-3p and miRNA-708-5p in SANFH rabbit bone marrow tissue is one of the mechanisms of SANFH. The

expression levels of miRNA-708-3p and miRNA-708-5p in SANFH rabbit BMSCs and OB inhabited by Shenggu Zaizao pills is a molecular mechanism for the prevention and treatment of early SANFH.

Keywords: Shenggu Zaizao pills; hormone-induced femoral head necrosis; microRNA-708

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81860859)

¹ 甘肃中医药大学(兰州,730000)

² 甘肃中医药大学附属医院

[△]通信作者 E-mail:648196207@qq.com

激素性股骨头坏死(SANFH)是由于临床中糖皮质激素(GC)不规范使用或长期大量应用而引起的严重骨科疾病^[1]。SANFH 是治疗比较困难的一种骨关节疾病,没有及时发现和治疗导致股骨头塌陷后会引发髋关节骨关节炎,致使患者生活质量降低,社会及家庭经济负担加重。GC 引起的 BMSCs 成骨-成脂分化失衡是 SANFH 发生的主要机制之一^[2],miRNA-708 在 GC 相关疾病及多种骨科疾病中发挥了关键的调控作用。实验表明 miRNA-708 在 SANFH 患者股骨头组织中呈过表达,GC 可导致 BMSCs 的 miRNA-708 表达水平增高^[3]。但 GC 损伤机体骨组织分子机制不明确,临床尚未发现有效治疗药物。因此,如何有效阻断 SANFH 的进展,促进受损股骨头组织的恢复,是现代医学研究的重点。近年来,中医药防治 SANFH 取得了较好的临床疗效,生骨再造丸治疗早期 SANFH 疗效显著,但其确切的作用机制及更有效的治疗方法仍是当下研究的热点、难点^[4]。本实验研究验证 SANFH 的发生与 miRNA-708 的相关性,明确生骨再造丸是通过抑制 miRNA-708 的表达以阻断 SANFH 的进展,从而为中医药防治 SANFH 提供分子生物学理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2.5 个月龄健康普通级新西兰大白兔,50 只,雄性,1.8~2.2 kg,西南医科大学实验动物中心提供,实验动物质量合格证号为 SCXK(川)2018-17。

1.2 实验药物及试剂

生骨再造丸(170803,甘肃中医药大学附属医院);仙灵骨葆胶囊(190106,国药集团同济堂制药有限公司);注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(X60842,Pfizer Manufacturing Belgium NV);LPS(1001164401,SIGMA);注射用青霉素钠(F8122301,华北制药股份有限公司);L-DMEM 培养基(CGM103.05,Cellmax),H-DMEM 培养基(CGM102.05,Cellmax),碱性磷酸酶显色试剂盒(MA0197,大连美仑生物技术有限公司),OriCell,间充质干细胞成骨诱导分化培养基试剂盒(RBXM-90021,广州赛业生物),油红 O 染色试剂盒(G1261,北京索莱宝),Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit(638313,Clontech),流式抗体 CD29(bs-0486R-PE)、CD34(bs-0646PE-cy7)、CD44(bs-2507R-APC)、CD45(bs-0522R-FITC)均购自北京博奥森;TB Green® Premix Ex Taq™ II (RR920A, Takara),miRNA-708-3p、miRNA-708-5p 引物交由 Takara 公司设计。

1.3 实验仪器

生物超净工作台(江苏苏净安泰公司);摇床(北京

六一仪器厂);离心机(BECKMAN COULTER);梯度 PCR 仪(Biometra);实时荧光定量 PCR 扩增仪(Roch)。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 实验组采用 LPS 联合甲泼尼龙琥珀酸钠法造模^[5],耳缘静脉注射 LPS(10 μ g/kg)、臀肌注射甲泼尼龙琥珀酸钠(20 mg/kg),1 次/d,共 3 次,臀肌处注射青霉素以预防感染。空白组给予耳缘静脉与臀肌注射等量生理盐水和青霉素。28 d 后 MRI 验证造模成功。

1.4.2 分组方法 将 50 只普通级新西兰大白兔按随机数字表法分为空白组 10 只,实验组 40 只,实验组造模成功 32 只,按照随机数字表法分为模型组 10 只,仙灵骨葆组 11 只,生骨再造丸组 11 只(兔的药物灌胃为有创操作,操作不当会引起死亡,导致药物干预失败,根据实际造模情况,药物组模型数量为 11 只)。

1.4.3 干预方法 仙灵骨葆组以 0.4 g/kg 仙灵骨葆、生骨再造丸组以 0.6 g/kg 生骨再造丸灌胃 28 d^[6],空白组和模型组给予生理盐水灌胃。

1.4.4 标本制作方法 药物干预 28 d 后,仙灵骨葆组和生骨再造丸组各选取灌胃成功的 10 只,空气栓塞法处死,取出两侧股骨。Percoll 法分离各组 BMSCs,完全冲出骨髓,重悬、离心,弃上清,加入 L-DMEM 完全培养液重悬,铺于等量的 Percoll 分离液上,离心吸取白膜层,洗涤 2 次,弃上清;酶消化法分离各组 OB,将分离处理好的股骨头碾碎,加入适量胰蛋白酶,恒温摇床中预消化后离心,弃上清,加入 3~5 mL 0.1% I 型胶原酶,恒温摇床中消化后离心,弃上清;密度梯度离心法分离各组脂肪细胞,将股骨从中间剪断,完全冲出骨髓,重悬、离心,吸取上层脂肪层;提取的 BMSCs、OB、脂肪细胞加入 5 mL H-DMEM 完全培养基,移至 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养,定时换液。

1.5 实验指标测定

1.5.1 BMSCs、OB 和脂肪细胞的鉴定 各组 P1 代 BMSCs、OB 培养至约 90%融合时流式细胞技术鉴定,培养至约 90%融合时再诱导分化培养 2~3 周,BMSCs 用碱性磷酸酶染色鉴定,OB 用茜素红染色鉴定。初代脂肪细胞用油红 O 染色鉴定。

1.5.2 qRT-PCR 检测 miRNA-708-3p 和 miRNA-708-5p 各组 P1 代 90%融合的 BMSCs、OB 和初代脂肪细胞中加入 MagZol™ Reagent 提取并测定各组细胞总 RNA,miRNA 按照试剂盒说明步骤反转录合成 cDNA,qRT-PCR 检测 miRNA-708-3p 和 miRNA-708-5p 表达水平。

1.6 统计学方法

实验数据均采用 SPSS24.0 软件处理,符合正态

分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MRI 验证结果

造模 28 d, 随机抽取 8 只行 MRI 验证, 股骨头关节面及关节间隙正常, 股骨头前上部 T_1WI 为低信号、 T_2WI 为高信号(见图 1)。

2.2 BMSCs、OB、脂肪细胞鉴定结果

2.2.1 BMSCs 鉴定结果 流式细胞仪检测: CD29 及 CD44 结果表达阳性, 阳性率分别为 100%、99.5%; CD34 及 CD45 结果表达阴性, 阴性率分别为 98.9%、



图 1 造模后影像资料
97.0%(见图 2)。对成骨诱导培养后 BMSCs 行碱性磷酸酶染色, 镜下观察 BMSCs 呈现蓝紫色(见图 3)。

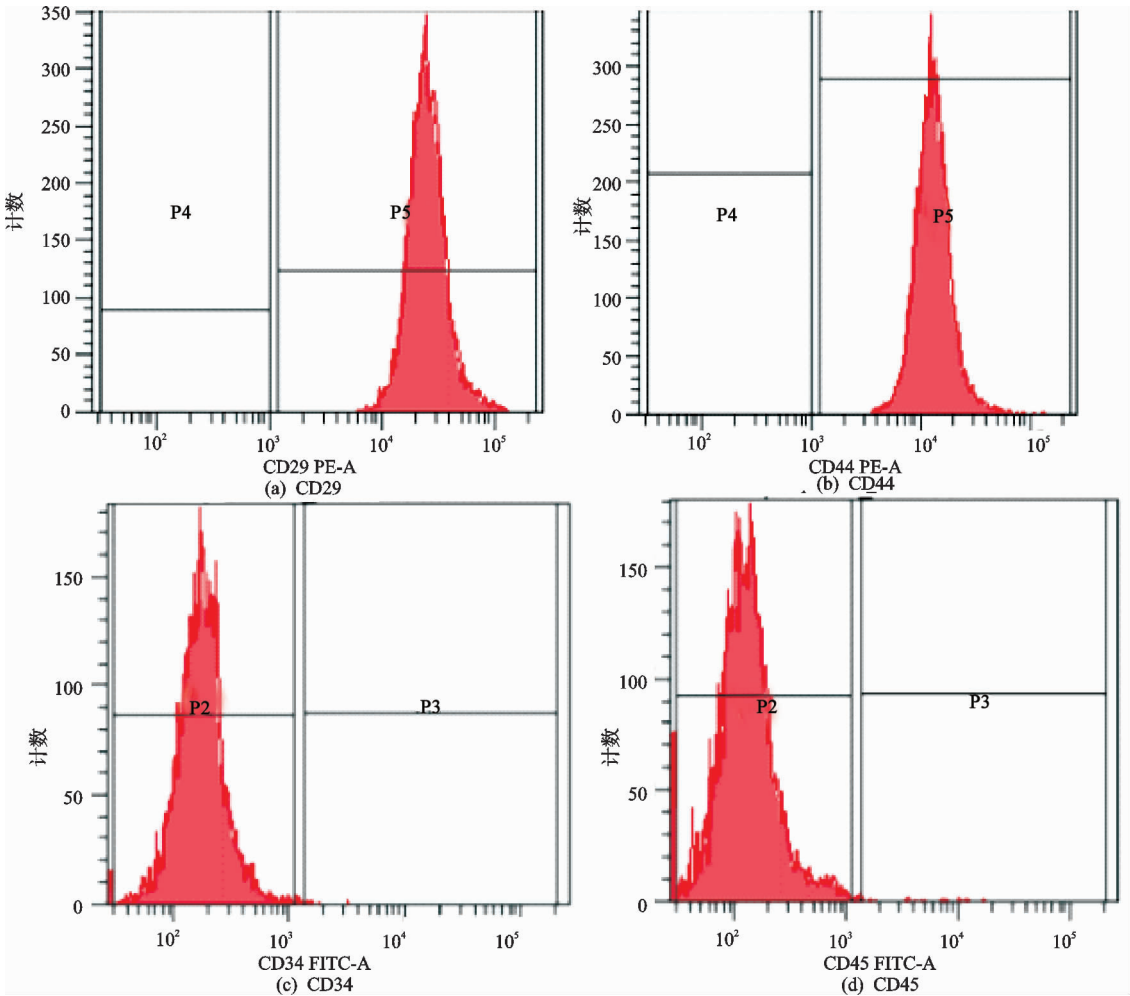


图 2 骨髓间充质干细胞 CD29、CD44 及 CD34、CD45 流式检测结果

2.2.2 OB 鉴定结果 流式细胞仪检测: 钙粘蛋白表达阳性, 阳性率 98.37%; CD45 表达阴性, 阴性率 99.97%(见图 4)。茜素红染色: 镜下可见红色钙化结节(见图 5)。

2.2.3 脂肪细胞鉴定结果 油红 O 染色: 镜下见橘红色脂肪细胞(见图 6)。

2.3 qRT-PCR 检测 miRNA-708 在各组 BMSCs、OB、脂肪细胞中的表达情况

2.3.1 miRNA-708-3p 在各组细胞中的表达

1) BMSCs: 模型组高于空白组, 差异有统计学意

义($P < 0.01$); 仙灵骨葆组、生骨再造丸组低于模型组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 仙灵骨葆组对比生骨再造丸组, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 7。

2) OB: 模型组高于空白组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 仙灵骨葆组、生骨再造丸组低于模型组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 仙灵骨葆组对比生骨再造丸组, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 8。

3) 脂肪细胞: 模型组高于空白组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 仙灵骨葆组、生骨再造丸组对比模型组, 差异有统计学意义($P > 0.05$), 见图 9。

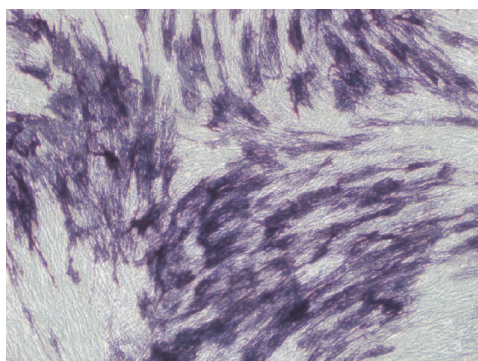


图3 骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶染色(×100)

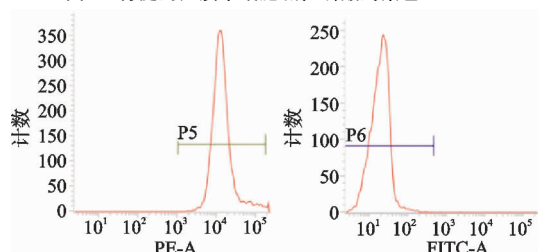


图4 成骨细胞钙粘蛋白、CD34 流式检测结果

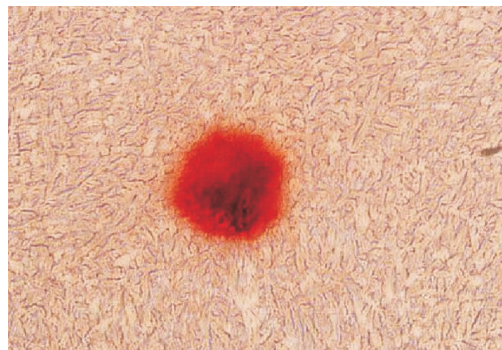


图5 成骨细胞茜素红染色(×100)

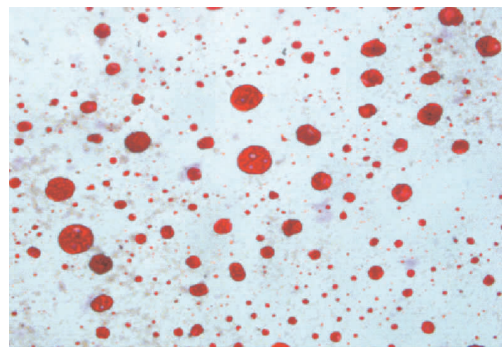


图6 脂肪细胞油红O染色(×100)

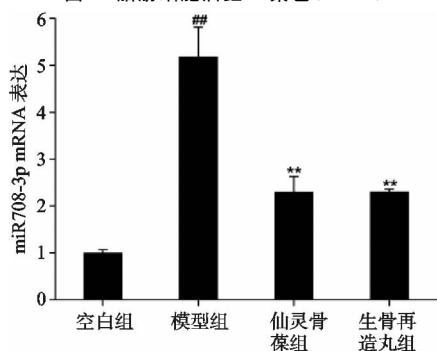


图7 各组骨髓间充质干细胞中 miRNA-708-3p 的表达

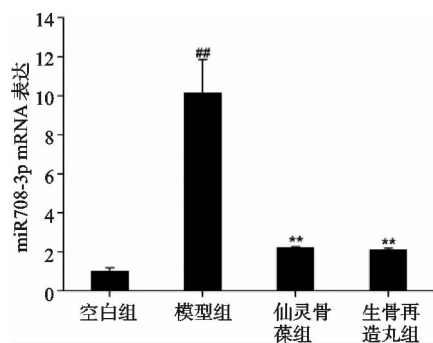


图8 各组成骨细胞中 miRNA-708-3p 的表达

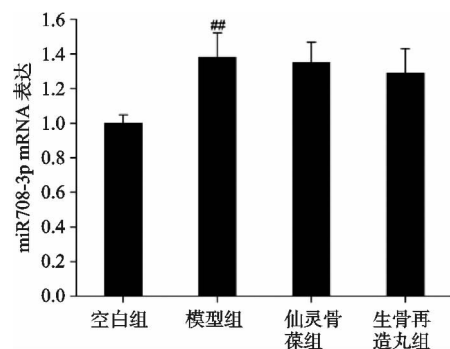


图9 各组脂肪细胞中 miRNA-708-3p 的表达

2.3.2 miRNA-708-5p 在各组细胞中的表达

1) BMSCs: 模型组高于空白组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 仙灵骨葆组、生骨再造丸组低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 生骨再造丸组对比仙灵骨葆组, 差异无统计学意义 ($P > 0.01$), 见图 10。

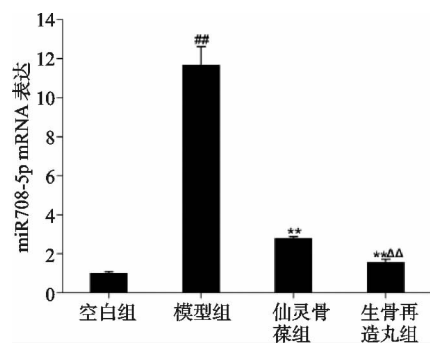


图10 各组骨髓间充质干细胞中 miRNA-708-5p 的表达

2) OB: 模型组高于空白组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 仙灵骨葆组、生骨再造丸组低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 生骨再造丸组对比仙灵骨葆组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 11。

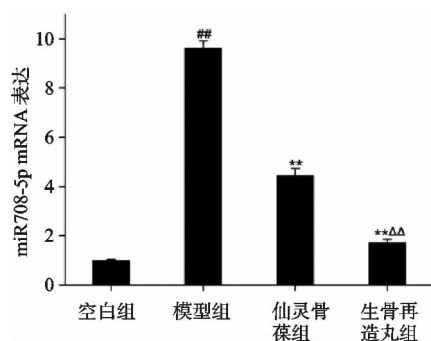


图11 各组成骨细胞中 miRNA-708-5p 的表达

3)脂肪细胞:模型组高于空白组,差异有统计学意义($P<0.01$);仙灵骨葆组、生骨再造丸组对比模型组,差异有统计学意义($P>0.05$),见图 12。

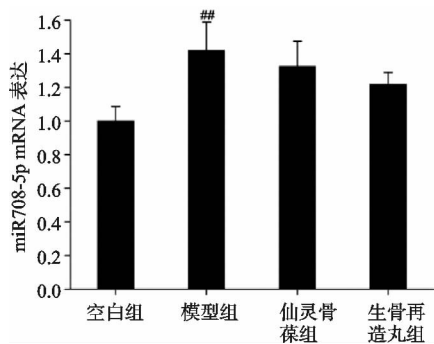


图 12 各组脂肪细胞中 miRNA-708-5p 的表达

3 讨论

GC 导致 SANFH 已成为临床共识,GC 作为抗炎药被长期应用于临床是引起 SANFH 的重要原因。GC 结合糖皮质激素受体(GR)可显著影响细胞代谢、存活、增殖和分化^[7]。GR 介导的信号可由 miRNA-708 启动子区域响应,从而引起细胞的一系列反应^[8]。MicroRNA (miRNA)是一类小内源性非编码单链 RNA,约含有 19~23 个核苷酸,可与目标 mRNA 的非翻译区结合,是转录后调控基因表达的关键调节因子,最新研究表明 miRNA 相关制剂有可能成为新的治疗药物^[9]。miRNA 在细胞分化、凋亡的过程中起着非常关键的作用。近年来,多项研究表明 miRNA 可调控骨代谢过程,是 SANFH 进展的重要因素。miRNA-708 起最初被认为是一种可能的抑癌基因,miRNA-708 的过表达可调节黏附分子和诱导骨髓分化,miRNA-708 通过调控下游效应来影响关键基因,从而影响组织的自我更新及细胞的增殖、分化和死亡^[10]。

Hao 等^[3]发现 SANFH 患者股骨头组织中 miRNA-708 高表达,体外细胞实验进一步证实 GC 可导致 BMSCs 中 miRNA-708 高表达。成骨分化特异性转录因子(RUNX2)和 SMAD3 可协同调节骨代谢。miRNA-708 通过结合 mRNA 3' 非翻译区(3'-UTR)调控 SMADs 激活转化生长因子- β (TGF- β)信号通路, TGF- β 介导 SMAD3 在 RUNX2 基因处聚集,从而抑制或激活下游靶基因可调节蛋白形成。

miRNA-708-5p 和 miRNA-708-3p 同源前体 miRNA-708,对骨质疏松症(OP)的发生具有协同作用。miRNA-708-5p 和 miRNA-708-3p 在卵巢切除(OVX)大鼠和 OP 患者骨组织中均有高表达。miRNA-708-5p 通过靶向介导 SMAD 特异性 E₃ 泛素蛋白连接酶-2 对 BMSCs 的成骨细胞分化产生负调控作用,而 miRNA-708-3p 通过靶向结合小脑变性相关蛋白-1 的翻译 RNA 对骨髓单核细胞中破骨细胞的分化调控^[11]。Wu 等^[12]在胶原诱导的大鼠 RA 模型中

注射 miRNA-708-5p 可以改善 RA 指数,降低 Wnt3a/ β -catenin 在大鼠关节组织中的表达。研究发现 miRNA-708-5p 能诱导滑膜成纤维细胞 MH7A 凋亡,明显抑制细胞集落形成和迁移、Wnt3a/ β -catenin 信号通路的转录和蛋白水平。本实验通过 LPS 联合 GC 成功复制 SANFH 的模型,发现模型组 BMSCs 和 OB 细胞中 miRNA-708-3p 和 miRNA-708-5p 的表达量较空白组明显升高,表明 miRNA-708-3p 和 miRNA-708-5p 的上调参与了 SANFH 的发生。

生骨再造丸基于中医整体观念,以通阳、利湿、活血法立方,组方以淫羊藿、桂枝、黄芪、三七、泽泻等为主。方中君药淫羊藿、鹿角胶、骨碎补滋补肝肾,强筋骨;臣药黄芪、桂枝补益脾肺之气,配合利湿之泽泻,活血化瘀之丹参、三七、龙血竭、山楂等佐使药以通血脉,全方共奏通阳、利湿、活血之功。药理学研究表明,淫羊藿总黄酮可抑制核因子 κ B(Nuclear Factor kappa-B, NF- κ B)信号通路的激活从而减少促炎因子表达和炎性浸润^[13]。鹿角胶、骨碎补可补血活血、抗炎镇痛,预防骨质疏松^[14-15]。黄芪多糖可降低细胞因子 IL-1 β 、IL-6 的分泌,促进 BMSCs 的增殖分化^[16],桂枝可发挥抗炎免疫作用,促进成骨细胞增殖^[17]。其余利湿活血药物可改善股骨头微循环和促进骨愈合的疗效亦被证实。生骨再造丸治疗早、中期激素性股骨头坏死疗效确切^[18],低剂量生骨再造丸可显著改善模型大鼠的血脂水平、骨代谢水平、抑制炎症细胞因子,改善股骨头骨小梁密度水平及骨矿物含量,从而延缓 SANFH 的进展^[6,19-20]。本实验研究发现生骨再造丸干预后 SANFH 中 miRNA-708-3p 和 miRNA-708-5p 的表达量明显降低,表明生骨再造丸通过降低 miRNA-708 的表达以治疗 SANFH。

综上所述,miRNA-708 在 GC 诱导的股骨头坏死中发挥着重要作用,生骨再造丸靶向下调 BMSCs 和 OB 中 miRNA-708 表达水平是治疗 SANFH 的主要机制之一。但生骨再造丸进入体内代谢后通过哪种信号通路下调 miRNA-708 的表达水平以及 miRNA-708 靶向抑制哪种下游关键蛋白或相关信号通路,从而起到抑制 SANFH 的作用,还需进一步的实验研究。

参考文献

- [1] ZHAO S R, WEN J J, MU H B. Role of Hsa-miR-122-3p in steroid-induced necrosis of femoral head[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 54-59.
- [2] 李时斌, 赖渝, 周毅, 等. 激素性股骨头坏死发病机制及相关信号通路的靶点效应[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(6): 935-941.
- [3] HAO C, YANG S, XU W, et al. MiR-708 promotes steroid-induced osteonecrosis of femoral head, suppresses osteogenic differentiation by targeting SMAD3[J]. Sci Rep,

- 2016,6:22599.
- [4] HUANG W, DENG H, JIN S Y, et al. A polysaccharide from dried aerial parts of *Agrimonia pilosa*: structural characterization and its potential therapeutic activity for steroid-induced necrosis of the femoral head (SANFH) [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 214: 71-79.
 - [5] MONTELEONE N J, LUTZ C S. miR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 71292-71316.
 - [6] 曹林忠, 汪小敏, 张虎林, 等. 生骨再造丸对兔激素性股骨头坏死 VEGF 及 FLT-1 表达的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2018, 23(8): 874-880.
 - [7] SENTHIL KUMAR K J, GOKILA VANI M, HSIEH H W, et al. MicroRNA-708 activation by glucocorticoid receptor agonists regulate breast cancer tumorigenesis and metastasis via downregulation of NF- κ B signaling [J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(2): 335-348.
 - [8] LIN K T, YEY Y M, CHUANG C M, et al. Glucocorticoids mediate induction of microRNA-708 to suppress ovarian cancer metastasis through targeting Rap1B [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 5917.
 - [9] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA [J]. *Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202-1207.
 - [10] SCHNEIDER E, POCHERT N, RUESS C, et al. MicroRNA-708 is a novel regulator of the Hoxa9 program in myeloid cells [J]. *Leukemia*, 2020, 34(5): 1253-1265.
 - [11] WANG R, FENG Y, XU H, et al. Synergistic effects of miR-708-5p and miR-708-3p accelerate the progression of osteoporosis [J]. *Int Med Res*, 2020, 48(12): 300060-520978015.
 - [12] WU J, FAN W Q, MA L, et al. miR-708-5p promotes fibroblast-like synoviocytes' cell apoptosis and ameliorates rheumatoid arthritis by the inhibition of Wnt3a/ β -catenin pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 3439-3447.
 - [13] 金剑飞, 何维英, 周钰龙. 淫羊藿总黄酮对膝关节骨性关节炎大鼠核因子- κ B 通路的影响 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2020, 28(3): 5-9.
 - [14] 鲍悦, 高久堂, 孙佳明, 等. 中药鹿角胶的研究进展 [J]. *吉林中医药*, 2016, 36(2): 173-175.
 - [15] 王永胜, 胡菁菁, 卢育南, 等. 骨碎补总黄酮对去势大鼠骨质疏松的防治作用 [J]. *中国卫生标准管理*, 2020, 11(9): 94-95.
 - [16] 刘琳, 白海, 王存邦, 等. 黄芪多糖对多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞增殖与细胞因子表达的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(10): 1873-1877.
 - [17] 夏天卫, 周国威, 姚晨, 等. 桂枝及肉桂治痹的中医认识与现代药学研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6): 218-226.
 - [18] 郭成龙, 何玲, 张晓刚, 等. 生骨再造丸治疗激素性股骨头坏死 33 例 [J]. *西部中医药*, 2016, 29(12): 68-69.
 - [19] 郭成龙, 何玲, 郭小荣, 等. 生骨再造丸联合髓芯减压术对激素性股骨头缺血性坏死模型兔血脂水平及骨小梁结构的影响 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2018, 35(1): 18-22.
 - [20] 郭成龙, 魏玉娇, 何玲, 等. 生骨再造丸对激素性股骨头坏死大鼠骨代谢及炎症细胞因子表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(4): 170-174.

(收稿日期: 2020-10-07)