

活骨灌注液对激素体外诱导骨髓间充质干细胞增殖及凋亡的影响

赵军¹ 徐西林² 张晓峰^{1△} 吕航² 李小东² 王政春¹ 张骋¹ 张宁¹

[摘要] **目的:**探讨活骨灌注液对激素刺激骨髓间充质干细胞(BMSCs)后增殖和凋亡的影响。**方法:**全骨髓贴壁细胞培养法分离获得大鼠 BMSCs 并用流式细胞仪鉴定,设置梯度浓度活骨灌注液后通过 CCK8 法筛选作用终浓度。后将 BMSCs 分为三组:正常组(常规培养 BMSCs)、激素组(BMSCs+1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松)和药物组(激素组基础上+活骨灌注液)。采用 MTT 法检测细胞增殖、流式细胞仪检测细胞凋亡及 Western Blot 法检测相关凋亡蛋白的表达。**结果:**流式细胞仪检测 CD29、CD90、CD45 抗体后明确提取细胞为 BMSCs,CCK8 筛选出 2^{-6} 的活骨灌注液为作用终浓度。地塞米松刺激后可抑制 BMSCs 的增殖并促进其凋亡,但活骨灌注液作用后,可缓解地塞米松的作用(相关检测结果显示 $P < 0.05$,差异有统计学意义)。另外 Western Blot 结果显示,激素组中 Bax 和 Cytochrome C 蛋白表达明显升高,Bcl-2 表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而经活骨灌注液处理后,Bax 和 Cytochrome C 蛋白表达明显降低,Bcl-2 表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**活骨灌注液可促进地塞米松作用后 BMSCs 的增殖并抑制其凋亡。

[关键词] 活骨灌注液;骨髓间充质干细胞;细胞增殖;细胞凋亡;激素性股骨头坏死

[中图分类号] R651.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)12-0017-05

Efficacy of Huogu Perfusion on Dexamethasone-Induced Proliferation and Apoptosis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

ZHAO Jun¹ XU Xilin² ZHANG Xiaofeng^{1△} LYU Hang² LI Xiaodong²

WANG Zhengchun¹ ZHANG Cheng¹ ZHANG Ning¹

¹ Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

² The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, China.

Abstract Objective: To investigate the efficacy of Huogu perfusion on the proliferation and apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) stimulated by dexamethasone. **Methods:** The whole bone marrow adherent cell culture method was used to isolate rat BMSCs and were identified by flow cytometry. After setting the gradient concentration of Huogu perfusion, the final concentration was screened by the CCK8 method; then the BMSCs were divided into three groups: normal group (conventional culture BMSCs), dexamethasone group (BMSCs + 1 $\mu\text{mol/L}$ dexamethasone), and drug group (based on dexamethasone group + Huogu perfusion). MTT method was used to detect cell proliferation. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. The Western Blot method was used to detect the expression of related apoptotic proteins. **Results:** After the detection of CD29, CD90, and CD45 antibodies by flow cytometry, it was clear that the

cells were BMSCs, and was screened as the final concentration by CCK8 2^{-6} Huogu perfusion. Dexamethasone can inhibit the proliferation of BMSCs and promote their apoptosis after stimulation, but after the effect of Huogu perfusion, it can effectively alleviate the efficacy of dexamethasone, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Besides, Western Blot results showed that the expression of Bax and Cytochrome C protein in the dexamethasone group was significantly increased; the expression of Bcl-2 was significantly reduced, and the difference was statistically

基金项目:国家自然科学基金项目(81774343)

中央支持地方高校改革发展资金人才培养支持计划(高水平人才培养支持项目)

黑龙江中医药大学附属第二医院科研结余经费专项基金(2019YB-02)

¹ 黑龙江中医药大学(哈尔滨,150040)

² 黑龙江中医药大学附属第二医院

[△]通信作者 E-mail: zhangxiaofeng1962@163.com

significant ($P < 0.05$). After the treatment with Huogu perfusion, Bax and Cytochrome C protein expression were significantly reduced; Bcl-2 expression was significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion: Huogu perfusion can effectively promote the proliferation of BMSCs and inhibit their apoptosis after dexamethasone.

Keywords: Huogu perfusion; bone marrow mesenchymal stem cells; cell proliferation; apoptosis; steroid-induced osteonecrosis of femoral head

激素性股骨头坏死(SONFH)是长期大剂量应用激素类药物后发生的常见骨科疾病之一,未经及时治疗最终需要全髋关节置换^[1]。因此对 SONFH 发病机理研究及寻找相应的治疗方法至关重要。研究显示 BMSCs 增殖和凋亡的抑制与 SONFH 发病有关^[2]。活骨灌注液具有活血化瘀、补肾壮骨之功效,前期临床^[3]及相关的实验研究发现其对股骨头坏死有较好的疗效。因此,本研究基于上述研究基础继续探讨活骨灌注液对体外激素诱导后 BMSCs 增殖和凋亡的影响,为股骨头坏死的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取黑龙江中医药大学动物实验中心两周龄 SD 大鼠,动物许可证号为 SCXK 黑 2013-004。

1.2 活骨灌注液制备

本研究中活骨灌注液由黑龙江中医药大学药学院制备。过程如下:取中药丹参 12 kg,川芎和骨碎补各 8 kg,蒸馏水浸泡 1 h 后,用蒸馏水煮沸 3 次(分别为 8,6,5 倍蒸馏水煮沸 2.0,1.5,1.0 h)。药渣过滤后,将药液加热浓缩至约相当于生药 1.5~2.0 g/mL。待自然冷却后,边搅拌边加入乙醇至 85% 含醇量放置过夜并过滤(此时药液浓缩至 1:3~5)。继续在药液中加入 13 倍量的注射用水并静置过滤(此时药液浓缩至 1:1)。用 10% NaOH 调节 pH 值至 6.8~7.2,加活性炭煮沸冷却,过滤并灭菌及检测合格后,封装并保存于 4℃ 冰箱备用。

1.3 主要实验试剂和仪器设备

酶标仪(BIOTEK,美国),荧光定量 PCR(BIONEER,美国),凝胶成像仪(Tanon,中国),电泳仪(北京六一,中国),NanoDrop 2000C 分光光度计(Thermo Fisher Scientific,美国),倒置显微镜(Olympus IX53,日本),流式细胞仪(BD,美国),超净工作台(苏州净化设备)。DMEM 培养基(Gibco,美国),胰酶(Sigma,美国),胎牛血清(杭州四季青),BCA 蛋白质测定试剂盒(Wanleibio,中国),地塞米松(索莱宝),全蛋白提取试剂盒(Wanleibio,中国),MTT 检测试剂盒、高纯总 RNA 快速提取试剂盒、CKK8 试剂盒、流式细胞相关试剂盒(碧云天,中国),流式细胞 CD45、CD29、CD90 抗体(Thermo Fisher Scientific,美国),

PARP/cleaved-PARP、caspase-3/cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2、Cytochrome C 抗体(Wanleibio,中国)。

1.4 方法

1.4.1 SD 大鼠 BMSCs 原代分离培养及鉴定 取 2 周龄大鼠脱颈处死,无菌条件下取股骨和胫骨,按文献研究的全骨髓贴壁培养方法^[4]分离培养 BMSCs。采用流式细胞仪利用 BMSCs 表面分子标志物 CD45、CD29、CD90 鉴定 BMSCs。

1.4.2 活骨灌注液作用浓度的筛选 将活骨灌注液原液稀释 10% 后作为母液,过滤除菌后按终浓度为 $2^{-1} \sim 2^{-6}$ 浓度梯度进行稀释成含药培养基后并分组,同时设置母液组及对照组(不加药)。24 h 后,运用 CCK8 试剂盒及在酶标仪 450 nm 处 OD 值以测定各组细胞活力,每组 5 个复孔。

1.4.3 实验分组 取第 3 代细胞常规消化,将 1×10^5 个 BMSCs 接种至培养皿,分为正常组(常规培养 BMSCs),激素组(BMSCs + $1 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松)、药物组(激素组基础上 + 2^{-6} 活骨灌注液)。

1.4.4 MTT 法检测细胞增殖 处理 6,12,18,24 h 后进行 MTT 检测。将达到特定时间的各组细胞弃去培养基,然后按照 MTT 试剂盒步骤进行操作,在酶标仪上测定其在 570 nm 处 OD 值,每组 5 个复孔。

1.4.5 流式细胞术检测细胞凋亡 处理 24 h 后将各组细胞离心收集弃上清,用 PBS 洗涤 2 次,按试剂盒相关操作加液后,室温避光孵育 15 min,然后上机进行流式细胞检测。孵育过程中可以重悬细胞 2~3 次以改善染色效果。每组重复 3 次。

1.4.6 Western Blot 检测相关凋亡蛋白的表达 处理 48 h 后收集各组细胞,采用全蛋白提取试剂盒进行全蛋白提取、定量、电泳、转膜、封闭后,在一抗工作液(Bax、Bcl-2、Cytochrome C 及 β -actin 的稀释比例均为 1:1 000)4℃ 过夜;二抗工作液(Bax、Bcl-2、Cytochrome C 及 β -actin 对应的 HRP 标记的山羊抗兔抗体稀释比例均为 1:5 000)37℃ 下孵育 45 min,最后进行化学发光反应,并用 Image J 分析条带灰度值,比较各组细胞表达中的差异。

1.5 统计学方法

本实验计数资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用单因素方差分析比较组间差异,各组间的两两比较采用 LSD 法检验;采

用 SPSS22.0 软件统计, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 培养及鉴定结果

待细胞贴壁生长至培养瓶中 80%~90% 时进行消化传代,此时 BMSCs 贴壁及生长能力加速。传到

第 3 代时可见细胞形态均一呈梭形或纺锤形集落,部分可重叠生长,见图 1a。流式细胞仪检测 BMSCs 表面抗原显示 CD29、CD90、CD45 阳性细胞比率分别为 97.13%、97.32%、3.51%,见图 1(b~d),即证明提取细胞为 BMSCs。

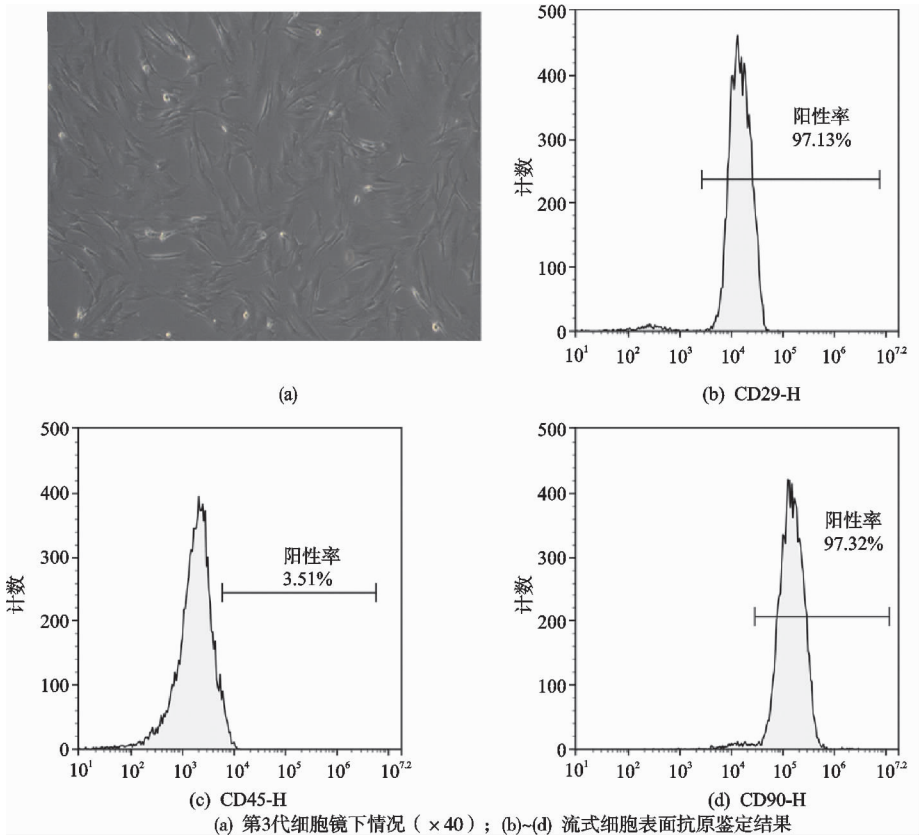


图 1 BMSCs 培养及鉴定结果

2.2 活骨灌注液浓度筛选结果

梯度浓度的活骨灌注液作用 BMSCs 24 h 后,相关检测结果(酶标仪 450 nm 和 570 nm 处 OD 值)显示高浓度的药物可抑制细胞的增殖;随着药物浓度的逐渐降低,对 BMSCs 增殖的影响逐渐减小,见表 1 和图 2。因此后续实验中选择 2^{-6} 的活骨灌注液作为药物终浓度。

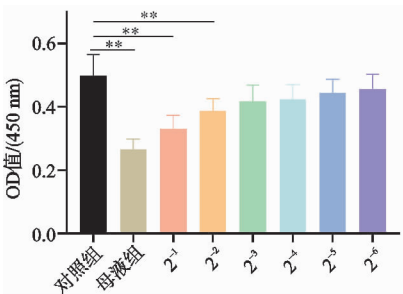


表 1 CCK8 检测不同浓度活骨灌注液对 BMSCs 增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	OD 值(450 nm)
对照组	0.499±0.066
母液组	0.266±0.033
2 ⁻¹ 组	0.331±0.042
2 ⁻² 组	0.386±0.039
2 ⁻³ 组	0.419±0.050
2 ⁻⁴ 组	0.423±0.047
2 ⁻⁵ 组	0.444±0.044
2 ⁻⁶ 组	0.456±0.047

2.3 MTT 法检测药物对细胞增殖影响结果

检测结果显示随着作用时间的延长,与正常组细胞相比,地塞米松可明显抑制 BMSCs 的增殖(24 h 时

间点, $P<0.05$ 差异有统计学意义)。在同时给活骨灌注液处理后,地塞米松抑制细胞增殖作用减弱(与激素组细胞相比,24 h 时间点, $P<0.05$ 差异有统计学意义),酶标仪 570 nm 处的 OD 值见图 3。

2.4 流式细胞仪检测药物对细胞凋亡影响结果

细胞凋亡的检测结果显示,相比正常培养的空白组细胞,地塞米松诱导后可明显增加凋亡细胞比率,差异有统计学意义($P<0.05$);而经活骨灌注液处理后,凋亡细胞比率明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

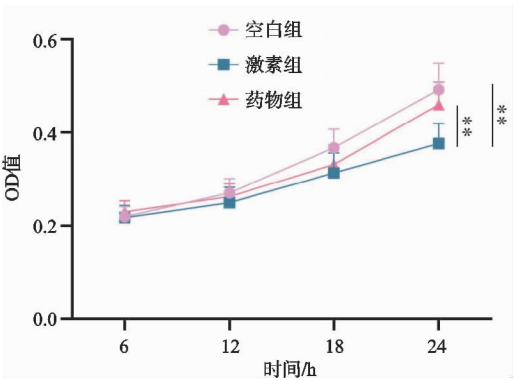


图 3 不同时间点各组细胞增殖情况 (** $P<0.05$)

2.5 Western Blot 检测 Bax、Bcl-2 及 Cytochrome C 蛋白的表达结果

相比正常培养的空白组细胞,地塞米松诱导后 Bax 和 Cytochrome C 蛋白表达明显升高,Bcl-2 表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);而经活骨灌注液处理后,Bax 和 Cytochrome C 蛋白表达明显降低,Bcl-2 表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

3 讨论

激素类药物大量使用是目前形成 OFNH 的最常见原因之一,涉及多种机制(如脂质代谢紊乱、凝血功

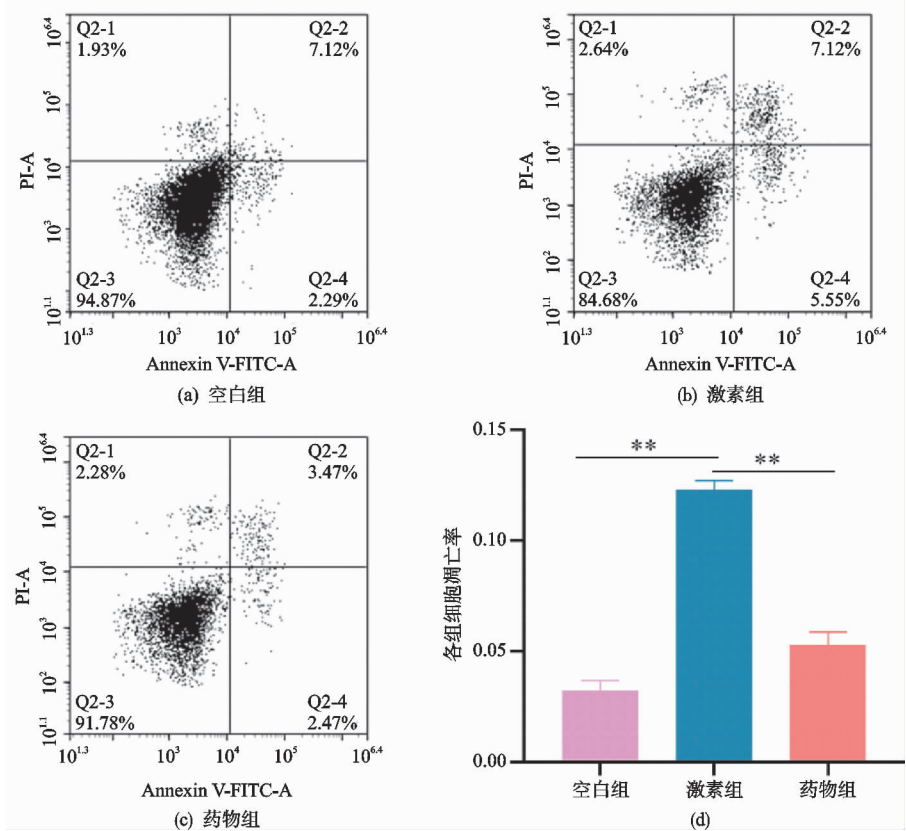


图 4 各组细胞凋亡情况 (** $P<0.05$)

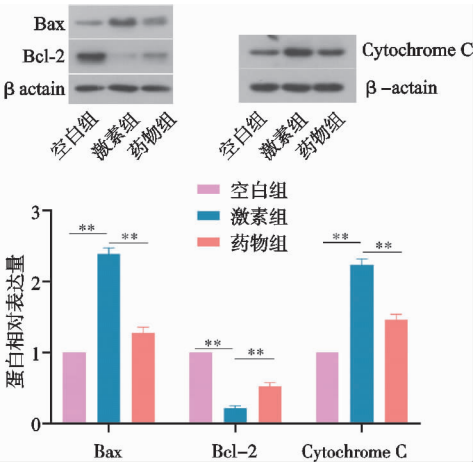


图 5 Western blot 检测 Bax、Bcl-2 及 Cytochrome C 蛋白的表达结果 (** $P<0.05$)

能障碍及细胞的增殖与凋亡等^[5]。而体外研究发现,超过生理剂量的地塞米松(如 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 和 $1 \mu\text{mol/L}$)呈剂量和时间依赖性的抑制 BMSCs 的增殖并促进其凋亡增加,这可能与激活多种与糖皮质激素受体相关的信号通路如 Wnt 信号通路、调节多种转录或转录后调节因子等方式有关系^[6]。因此,促进 BMSCs 增殖并抑制其凋亡或许能起到治疗 SONFH 的作用。

细胞内在凋亡途径是由 Bcl-2 蛋白家族控制和调节的,Bcl-2 蛋白家族包括抗凋亡(如 Bcl-2)和促凋亡(如 Bax)蛋白^[7]。在接受刺激后激活仅具有 Bcl-2 同源结构域 3(BH3)的蛋白质来启动哺乳动物细胞凋亡程序,进而触发 Bax 等蛋白的构象变化,在线粒体上形成寡聚物,导致膜内空间的 Cytochrome C 等凋亡蛋白的释放,这也标志着哺乳动物细胞凋亡的开始^[8]。最终释放的 Cytochrome C 激活相应的效应蛋白酶以

执行细胞凋亡的程序^[8-9]。而在 SONFH 中抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低,促凋亡蛋白 Caspase-3、Bax 表达增加,且通过 Bcl2 / Bad / Caspase-3 途径可治疗糖皮质激素相关的股骨头坏死^[10-11],证明细胞凋亡在其发病机制中起到重要作用。

现代中医学对 SONFH 的整体辨证以“血瘀”“肾虚”“痰瘀”为主,临床上也多运用“活血化瘀”“补肾壮骨法”来治疗^[12]。多数研究者认为“血瘀”的病理改变贯穿本病的始终,“肾虚、血瘀”为基本病机,“补肾活血法”应为其基本治则。活骨灌注液由丹参、川芎、骨碎补组成的复合水针制剂,是张晓峰教授多年的临床经验总结,是在 SONFH 肾虚、血瘀的相关病机基础上拟定的经验方,具有活血化瘀、补肾壮骨的功效。现代中药药理学研究发现,补肾可增加机体内激素水平,从而增加骨形成,抑制骨吸收;活血化瘀能降低血黏度、抑制血小板凝集、纠正脂质代谢紊乱及抗血栓生成,对改善股骨头部位缺血状态、促进坏死骨部位修复有很好的效果^[13]。另有研究显示丹参具有良好的活血化瘀、改善微循环、促血管形成及抑制细胞凋亡作用^[14]。川芎嗪可以通过减轻细胞自噬发生的程度,预防细胞程序性死亡的发生^[15],骨碎补含药血清可促进 BMSCs 的增殖^[16]。结合上述文献的研究结果,本课题组前期研究发现活骨灌注液可通过上调兔坏死股骨头的 Bcl-2 表达,下调 Bax 及 Caspase-3 表达,从而调控股骨头坏死局部细胞的凋亡,促进骨的修复和再生,但并未进一步研究其凋亡的具体机制。因此在本实验中,笔者用 1 μmol/L 的地塞米松刺激 BMSCs 模拟 SONFH 干细胞模型后,发现细胞增殖受抑制,凋亡比率明显增加;且促凋亡蛋白 Bax 及 Cytochrome C 表达明显升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显降低,证明超生理剂量的地塞米松可抑制 BMSCs 的增殖并促进其凋亡,与相关文献研究结果一致^[2,17]。但在筛选出合适浓度活骨灌注液作用于 1 μmol/L 地塞米松刺激的 BMSCs 后,地塞米松对细胞增殖的抑制作用减弱,凋亡比率降低;另外促凋亡蛋白 Bax 及 Cytochrome C 表达明显降低,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显升高,证明活骨灌注液可改善地塞米松对细胞增殖和凋亡的影响。

然而本实验也有一定局限性,要进一步通过动物实验证实活骨灌注液可通过促进 BMSCs 增殖和抑制其凋亡来治疗 SONFH。另外,鉴于中药复方的复杂成分及多靶点多途径的作用特点,对 BMSCs 凋亡和增殖影响的有效作用成分及进一步调控机制需要更深层次的研究。

参考文献

[1] ZHENG L Z, WANG J L, XU J K, et al. Magnesium and vitamin C supplementation attenuates steroid-associated osteonecrosis in a rat model[J]. *Biomaterials*, 2020, 238: 119828.

[2] XU Y, JIANG Y, WANG Y, et al. LINC00473 rescues human bone marrow mesenchymal stem cells from apoptosis induced by dexamethasone through the PEBP1-medi-

ated Akt/Bad/Bcl-2 signaling pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2021, 47(1): 171-182.

[3] 杨珺, 张晓峰, 徐西林. 活骨注射液治疗 I 期股骨头缺血性坏死 58 例临床观察[J]. *中医药信息*, 2009, 26(1): 40-41.

[4] OTSURU S, HOFMANN T J, OLSON T S, et al. Improved isolation and expansion of bone marrow mesenchymal stromal cells using a novel marrow filter device[J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(2): 146-153.

[5] XIE X H, WANG X L, YANG H L, et al. Steroid-associated osteonecrosis: epidemiology, pathophysiology, animal model, prevention, and potential treatments (an overview)[J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2015, 3(2): 58-70.

[6] HAN L, WANG B, WANG R, et al. The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10(1): 377.

[7] GLAB J A, CAO Z, PUTHALAKATH H. Bcl-2 family proteins, beyond the veil[J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2020, 351: 1-22.

[8] JIANG X, JIANG H, SHEN Z, et al. Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(41): 14782-14787.

[9] SHALABY R, FLORES-ROMERO H, GARCÍA-SÁEZ A J. The mysteries around the BCL-2 family member BOK[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(12): 1638.

[10] TAO S C, YUAN T, RUI B Y, et al. Exosomes derived from human platelet-rich plasma prevent apoptosis induced by glucocorticoid-associated endoplasmic reticulum stress in rat osteonecrosis of the femoral head via the Akt/Bad/Bcl-2 signal pathway[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 733-750.

[11] DUAN L, ZUO J, ZHANG F, et al. Magnetic targeting of HU-MSCs in the treatment of glucocorticoid-associated osteonecrosis of the femoral head through Akt/Bcl2/Bad/Caspase-3 pathway[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 3605-3620.

[12] 王荣田, 林娜, 陈卫衡, 等. 股骨头坏死的证素辨证初步研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2011, 34(7): 495-499.

[13] 李新建, 齐振熙, 李志敏, 等. 补肾活血汤含药血清骨髓间充质干细胞成骨-成脂分化的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(8): 3274-3277.

[14] 王政春, 张晓峰, 赵军, 等. 丹参治疗股骨头坏死的作用机制概述[J]. *中医药导报*, 2021, 27(4): 119-121.

[15] 赵秋振, 张辉, 薄爱华. 川芎嗪对 SH-SY5Y 细胞自噬作用的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(2): 498-500.

[16] 黄胜杰, 李媚, 王和鸣. 温阳补肾药对骨髓间充质干细胞增殖的实验研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2012, 20(10): 1-4.

[17] XU Y, JIANG Y, WANG Y, et al. LINC00473 regulated apoptosis, proliferation and migration but could not reverse cell cycle arrest of human bone marrow mesenchymal stem cells induced by a high-dosage of dexamethasone [J]. *Stem Cell Research*, 2020, 48: 101954.