

# 活络骨康丸家兔含药血清抑制酒精诱导骨髓基质细胞成脂分化的实验研究

李志强<sup>1</sup> 王少华<sup>2△</sup> 魏瑄<sup>2</sup> 白玉<sup>2</sup> 李玲<sup>2</sup> 侯颖周<sup>2</sup> 骆晓飞<sup>2</sup> 乔登朝<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨活络骨康丸家兔含药血清抑制酒精诱导骨髓基质细胞(MSCs)成脂分化作用。方法:给予新西兰大白兔 2 mL/kg 活络骨康丸连续灌胃 7 d 后,制备含药血清;随机法将体外分离培养的兔 MSCs 分 3 组,对照组给予含 10% 正常家兔血清的 DMEM 培养液;模型组给予含 10% 正常家兔血清的 DMEM 培养液及 0.09 mol/L 酒精处理细胞;实验组给予含 10% 活络骨康丸血清的 DMEM 培养液及 0.09 mol/L 酒精处理细胞。采用苏丹Ⅲ染色法脂染各组细胞,光镜下计数脂肪细胞个数;对细胞内甘油三酯含量、细胞培养液中骨钙素含量和胞内碱性磷酸酶活性进行测定。结果:实验组脂肪细胞数量及胞内甘油三酯含量均明显低于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),与对照组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。实验组测得碱性磷酸酶活性及骨钙素含量均明显高于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),与对照组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:活络骨康丸家兔含药血清能抑制酒精诱导 MSCs 分化为脂肪细胞,维持其成骨分化,对抗酒精的毒性作用,对酒精性股骨头坏死具有防治作用。

**[关键词]** 活络骨康丸;防治;酒精;股骨头坏死;成脂分化

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)03-0006-04

## Inhibitory Effect of Huoluogukang Pill Drug-containing Serum in Rabbits on Adipogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells Induced by Alcohol

LI Zhiqiang<sup>1</sup> WANG Shaohua<sup>2△</sup> WEI Xuan<sup>2</sup> BAI Yu<sup>2</sup> LI Ling<sup>2</sup>  
HOU Yingzhou<sup>2</sup> LUO Xiaofei<sup>2</sup> QIAO Dengchao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

<sup>2</sup>Zhengzhou Orthopaedic Hospital, Zhengzhou 450052, China.

**Abstract Objective:** To study the effect of Huoluogukang pill drug-containing serum on inhibiting adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells(MSCs)induced by alcohol. **Methods:** The New Zealand white rabbits were intragastrically administered with 2 mL/kg Huoluogukang pill for 7 days to prepare drug-containing serum. The rabbits MSCs isolated and cultured in vitro were randomly divided into 3 groups as follows:the control group was given DMEM medium containing 10% normal rabbit serum,the model group was treated with DMEM medium containing 10% normal rabbit serum and 0.09mol/L alcohol,and the experimental group was treated with DMEM medium containing 10% Huoluogukang pill serum and 0.09 mol/L alcohol. The cells in each group were stained with Sudan Ⅲ, the number of adipocytes was counted under light microscope. The content of intracellular triglyceride,the content of osteocalcin in cell culture medium and the activity of intracellular alkaline phosphatase were measured. **Results:** The number of adipocytes and intracellular triglyceride in the experimental group were significantly lower than those in the model group,there was statistically significant difference( $P < 0.001$ ),while there was no statistically significant difference between the experimental group and the control group( $P > 0.05$ ). The activity of alkaline phosphatase and the content of osteocalcin were significantly higher in the experimental group than the model group( $P < 0.001$ ),while there was no statistically significant difference between the

experimental group and the control group ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** Drug-containing serum with Huoluogukang pill in rabbits can inhibit the adipogenetic differentiation of MSCs induced by alcohol,maintain their osteogenic differentiation, and against the toxic effects of alcohol on alcoholic. And it

基金项目:郑州市科技攻关项目(112PPTSF309-5)

<sup>1</sup> 河南中医药大学研究生院(郑州,450008)

<sup>2</sup> 郑州市骨科医院

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:wangshaohua1719@163.com

has a preventive effect on alcohol-induced osteonecrosis of femoral head.

**Keywords:** Huoluogukang pill; prevent; alcohol; osteonecrosis of femoral head; adipogenic differentiation

酒精性股骨头坏死 (Osteonecrosis of Femoral Head, ONFH) 是骨科临床上的常见病, 致残率高, 目前尚缺乏有效的防治方法<sup>[1,2]</sup>。坏死早期病理学特征是出血、造血成分损失、脂肪细胞核缺失、微小脂肪囊泡和骨髓坏死<sup>[3]</sup>。酒精性 ONFH 发病机理研究的最新结果显示<sup>[4,5]</sup>: 酒精能够诱导骨髓基质细胞 (Marrow Stromal Cells, MSCs) 向脂肪细胞分化, 同时导致其成骨能力的下降, 股骨头内脂肪细胞增殖肥大, 骨细胞内脂质沉积, 进而脂肪变性死亡。本院中药制剂活络骨康丸临床应用多年, 对于早期 ONFH 疗效确切, 但活络骨康丸是否阻止酒精诱导的 MSCs 成脂分化, 从发病机理初始环节上防止 ONFH 的发生, 目前尚缺乏相关研究。本研究通过细胞学实验, 观察活络骨康丸家兔含药血清抑制酒精诱导 MSCs 的成脂分化, 并维持其成骨分化的作用, 以证明其对酒精性 ONFH 的防治作用, 现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

新西兰大白兔: SPF 级, 雌雄不限, 4~8 周龄 (河南康达实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号 SKXK(豫)2011-0001); DMEM 培养基 (Gibco 低糖), 优级纯无水乙醇 (河南凯盛化工厂), 活络骨康丸 (郑州市骨科医院, 批号: 郑药制剂 2000BW-20012), 碱性磷酸酶试剂盒、血清甘油三酯试剂盒 (北京中生生物工程高技术公司), 苏丹 III 染色液、苏木精染液 (郑州博兴生物科技有限公司), 骨钙素放射免疫测定盒 (北京北方生物技术研究所)。

### 1.2 方法

**1.2.1 家兔含药血清的制备** 取新西兰大白兔 10 只, 6~8 周龄, 体质量 ( $2.0 \pm 0.5$ ) kg/只, 正常喂养 1 周, 观察饮水摄食及应激活动情况。灌药前 1 d 置代谢笼内饲养。依据体表面积折算动物等效药量<sup>[5]</sup>, 给予家兔 10 倍活络骨康丸剂量, 生理盐水配制后按 2 mL/kg 灌胃; 正常血清兔以单纯生理盐水灌胃, 连续 7 d (1 次/d)。采血前禁食 12 h, 于末次灌胃 3 h 后家兔水合氯醛麻醉, 无菌条件下腹主动脉取血, 放置后离心, 56 °C 水浴灭活 60 min, 抽滤除菌并分装, -70 °C 冰箱冻存备用。

**1.2.2 MSCs 体外培养** 新西兰大白兔 (10 只), 4~6 周龄, 无菌条件下取双侧股骨并剪断两端, DMEM 培养基 (含青霉素 100 U/mL, 链霉素 100  $\mu$ g/mL) 配以 10% 体积分数胎牛血清冲洗出髓腔组织, 使用移液器

吹打细胞成混悬状态。以  $6 \times 10^6$  个/cm<sup>2</sup> 密度种植于 25 cm<sup>2</sup> 一次性细胞培养瓶中, 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱内培养<sup>[3,4]</sup>。细胞种植后第 4 天首次换液, 以后每 2 d 换液 1 次, 用倒置显微镜逐日观察形态及生长情况, 待培养瓶中贴壁细胞密度达 90% 以上进行传代, 取第 2 代 MSCs 以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 6 孔培养板, 定为实验起始时间。

**1.2.3 实验分组** 取 6 孔培养板 10 块, 每块板内随机法分为 3 组: 对照组、模型组和实验组, 2 孔/组。于接种细胞当天, 对照组加入含有 10% 正常家兔血清的 DMEM 培养液; 模型组加入含有 10% 正常家兔血清的 DMEM 培养液及 0.09 mol/L 酒精; 实验组加入含有 10% 活络骨康丸血清的 DMEM 培养液及 0.09 mol/L 酒精。

### 1.2.4 MSCs 成脂分化苏丹 III 染色与脂肪细胞计数

在六孔培养板中放入 18 mm × 18 mm 盖玻片以便细胞粘附并在显微镜下观察。实验第 21 天, 取出盖玻片对其进行苏丹 III 染色。对每个盖玻片上 100 mm<sup>2</sup> 面积中的脂肪细胞进行计数, 然后进行统计学分析。

**1.2.5 细胞内甘油三酯含量测定** 实验第 21 天, 用细胞刮器收集每板各组 2 孔内细胞, 反复冻融法使细胞裂解<sup>[3]</sup>, 离心 (3 000 r/min, 10 min) 后取上清液, 在全自动生化分析仪上用甘油三酯试剂盒测定各组细胞内甘油三酯含量。

**1.2.6 细胞内碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定** 实验第 12 天, 弃去培养液后 PBS 缓冲液清洗细胞 2 遍, 用细胞刮器收集每板各组 2 孔内细胞<sup>[3]</sup>。反复冻融法使细胞裂解, 离心 (3 000 r/min, 10 min) 后取上清液<sup>[4,5]</sup>, 在日立 7150 型全自动生化分析仪上用 ALP 试剂盒测定细胞内 ALP 活性。

**1.2.7 骨钙素放射免疫测定** 实验第 14 天, 取细胞培养液, 采用放射免疫法测定培养基上清液内骨钙素含量<sup>[3]</sup>。

### 1.3 统计学方法

运用 SPSS 22.0 统计分析软件进行实验数据处理, 采用单因素方差分析检验对各组间实验数据进行比较, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 设  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

实验第 12~14 天, 模型组中可见细胞胞浆内开始出现小圆脂滴, 相差显微镜下则能见到圆形颗粒状具有折光性的黑色环, 其数量显著多于实验组, 而对照组

中最少。待进一步培养,脂肪细胞数量逐渐增多,小脂滴逐渐融合变大,变为多边形或圆形。实验第 21 天,取出玻片进行染色实验,光镜下脂肪滴为圆形桔红色

颗粒、胞核被染为浅蓝色,包裹于脂肪细胞胞浆内。模型组中脂肪细胞均比实验组、对照组显著为多(见图 1,表 1)。

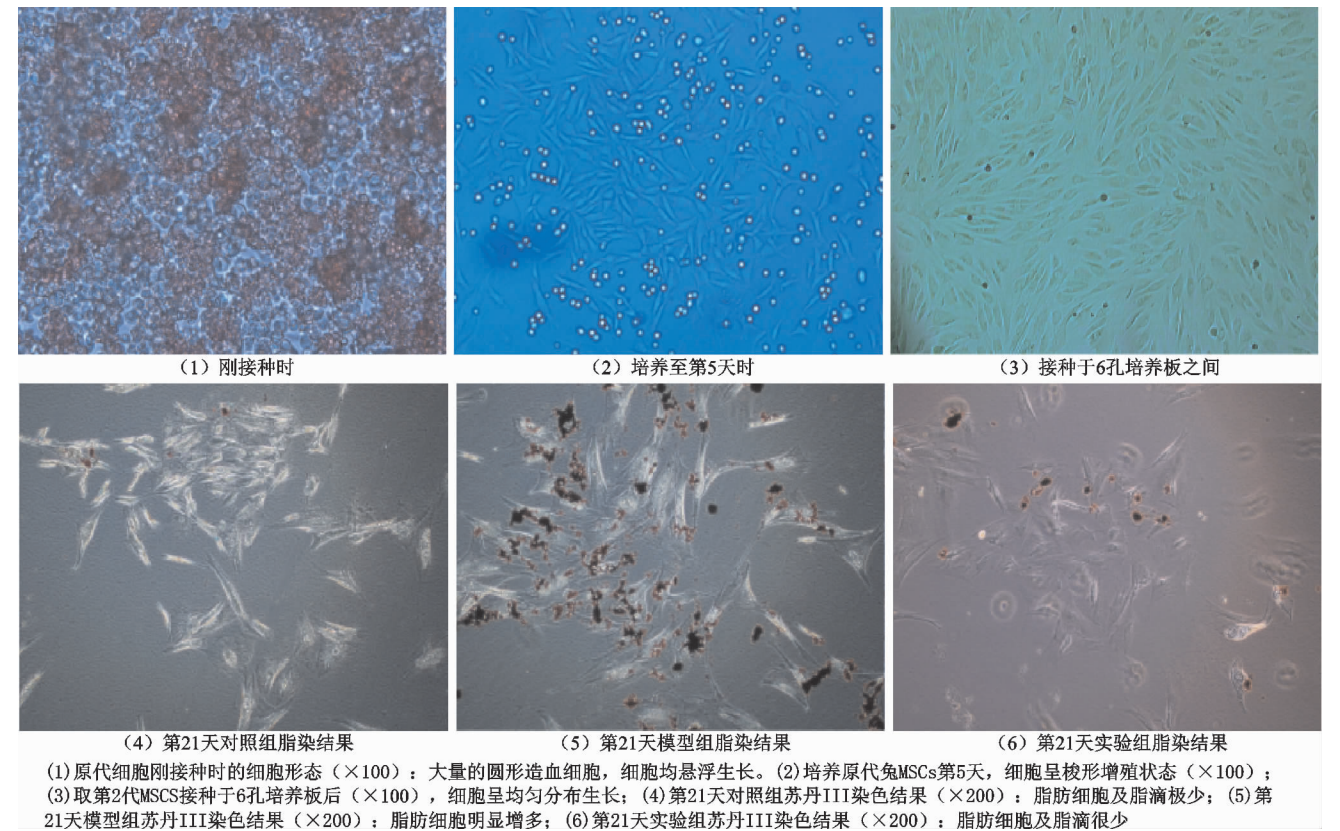


图 1 细胞培养过程中光镜下形态观察

对细胞内甘油三酯含量、细胞培养液中降钙素含量和胞内碱性磷酸酶活性的测定结果分析,实验组与对照组间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而与模型组间的差异均有统计学意义( $P<0.001$ )。

表 1 各组实验指标统计所得数据比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本数	脂肪细胞数 (个/ $\text{cm}^2$ )	甘油三酯含量 ( $\mu\text{g}/\text{孔}$ )	ALP 活性 (U/100 mg)	骨钙素含量 (ng/mg)
对照组	20	$9.32\pm 1.64$	$2.25\pm 0.09$	$44.16\pm 6.33$	$8.94\pm 0.30$
模型组	20	$160.17\pm 6.87$	$7.93\pm 0.19$	$19.72\pm 2.46$	$3.20\pm 0.18$
实验组	20	$17.52\pm 2.63$	$3.17\pm 0.20$	$39.27\pm 3.23$	$7.44\pm 0.16$
<i>F</i>		3 296.889	3 352.534	88.671	1 663.132
<i>P</i>		$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$

注:方差分析各指标中实验组与对照组比较  $P>0.05$ ,其余每两组之间比较  $P<0.001$ 。

3 讨论

活络骨康丸已应用于临床 30 多年,通过研究发现,活络骨康丸可改善激素性 ONFH 患者血液流变学状态,能够改善股骨头内局部微循环,促进缺血坏死区的修复和再生<sup>[6]</sup>。

郑州市骨科医院中药制剂活络骨康丸(批号:郑药制剂 2000BW-20012,成分为当归、黄芪、白芥、元胡、丹参、赤芍、白芍、地龙、没药、川芎、乳香、川断、泡姜、全虫),组方中当归祛瘀活络、健脾濡肌、补血活血,是补血活血之要药<sup>[6]</sup>;川芎行气开郁、活血止痛;地龙通经活络;延胡索活血散瘀;全蝎解毒通络、祛风止痛;黄芪益气固表,并且可以增强人体免疫力<sup>[7]</sup>。丹参具有

活血通瘀等功效。现代医学研究,当归、川芎等具有纠正脂质代谢紊乱、改善毛细血管通透性、改善血流变作用<sup>[6]</sup>、间接促进股骨头内血管内皮生长因子的表达<sup>[8]</sup>,鹿角胶、骨碎补等具有增加成骨细胞数量,抑制骨质丢失诸药合用,具有活血化瘀、滋补肝肾、通络止痛、壮骨填髓、修复骨坏死等功效,有效缓解了髋关节疼痛、促进骨修复及改善关节功能<sup>[9]</sup>,对于早期 ONFH 疗效确切。

正常培养条件下,MSCs 能够分化为多种细胞,其中以成骨细胞与骨细胞为主,极少发生成脂方向分化。酒精能够诱导 MSCs 向脂肪细胞分化,同时减少其向成骨细胞分化<sup>[3]</sup>。所以,培养过程中模型组有大量脂

肪细胞出现。而由于含活络骨康丸家兔血清的加入, 实验组中 MSCs 分化为脂肪细胞的数量显著减少, 甘油三酯含量显著下降, 且与对照组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果表明, 活络骨康丸家兔含药血清在酒精诱导 MSCs 成脂分化过程中有一定程度的抑制作用, 进而能使 MSCs 保持正常的分化过程。

MSCs 成骨分化的早期可采取以 ALP 活性水平来判定。细胞汇合后 ALP 开始升高, 基质钙化时达高峰, 随后迅速下降<sup>[9]</sup>。MSCs 体外培养第 12~14 天时, 其钙化发生, 此时即可测得 ALP 最高活性值。本实验在细胞培养第 12 天时, 实验组细胞内 ALP 活性值达到模型组细胞内 ALP 活性值的 2 倍 ( $P < 0.001$ ), 与对照组接近 ( $P > 0.05$ ), 说明含活络骨康丸家兔血清能够抑制酒精所致的细胞内 ALP 活性降低, 进而使 MSCs 保持正常的成骨分化过程。

骨钙素是一种非胶原蛋白, 几乎全部是由成骨细胞合成, 是成骨细胞分化的特征性表现, 其分泌与成骨过程相伴行, 合成后的骨钙素几乎全部排泌出细胞外环境中<sup>[10]</sup>。因此, 对细胞培养液内骨钙素含量的测定能够反映出成骨细胞的数量及功能活跃程度<sup>[11]</sup>。本实验表明, 在培养过程中, 随着实验组及模型组中酒精的加入, 刺激诱导脂肪细胞生成增多, 测得培养液中骨钙素含量降低; 而同时加入活络骨康丸家兔含药血清的实验组, 与对照组相比较, 其培养液中骨钙素含量降低并不明显 ( $P > 0.05$ ), 表明活络骨康丸在抑制酒精诱导 MSCs 成脂分化的基础上一定程度上保持了细胞的成骨分化。

研究表明, 酒精能够诱导 MSCs 向脂肪细胞分化, 同时减少其向成骨细胞分化<sup>[3]</sup>。长期大量饮酒, 可致股骨头髓内脂肪细胞堆积, 其填塞作用导致骨内压增高, 微小血管因受压而变细, 造成动静脉血流障碍, 局部血供减弱甚至中断<sup>[12]</sup>, 因胞内代谢产物积聚而致毛细血管通透性增加, 血浆外渗, 股骨头内细胞间质水肿, 缺血进行性加重, 骨微循环障碍, 终致大量骨细胞死亡<sup>[13]</sup>。同时, 成骨分化降低, 削弱骨修复作用, 发生 ONFH<sup>[14]</sup>。本研究结果表明, 活络骨康丸家兔含药血清能抑制酒精诱导 MSCs 分化为脂肪细胞, 维持其成骨分化, 对抗酒精的毒性作用, 对酒精性 ONFH 具有防治作用。

## 参考文献

[1] 王上增, 王爱国. 骨小梁金属重建棒植入联合自体松质骨移植治疗早中期股骨头缺血性坏死[J]. 中医正骨, 2014,

26(4):58-60.

- [2] 李志强, 王少华, 王义生, 等. 骨髓干细胞移植和伞状支撑骨移植术治疗股骨头坏死的疗效观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(3):265-267.
- [3] Li J, Wang Y, Li Y, et al. The effect of combined regulation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and calcitonin gene-related peptide on alcohol-induced adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 392(1-2): 39-48.
- [4] Sun J, Wang Y, Li Y, et al. Downregulation of PPAR $\gamma$  by miR-548d-5p suppresses the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and enhances their osteogenic potential[J]. J Transl Med, 2014, 14(12):168.
- [5] Wang Y, Li J, Liu M, et al. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in steroid-induced adipogenic differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells of rabbit using small interference RNA[J]. Chin Med J, 2014, 127(1):130-136.
- [6] 马富强, 白玉, 黄金承, 等. 活络骨康丸对激素性股骨头坏死血液流变学的影响[J]. 中医临床研究, 2013, 5(20):79-80.
- [7] 王春丽, 白明. 活络骨康丸对激素性股骨头坏死内 VEGF 基因表达的影响[J]. 光明中医, 2010, 25(9):1586-1587.
- [8] 张秀珍. 活络骨康丸联合髓芯减压治疗股骨头坏死的临床观察[J]. 海峡药学, 2015, 27(11):162-163.
- [9] 唐艳婷, 孙岩峰, 李小军, 等. 富勒醇对基于悬滴培养的脂肪间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 解放军医学杂志, 2016, 41(8):624-628.
- [10] 秦梦, 陈元川, 郭海玲, 等. 补肾阳中药对成骨细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(5):9-11.
- [11] 谢林, 徐文强, 王庚启, 等. “补肾益肝活血方”对小鼠骨髓基质细胞成骨分化相关基因表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(5):4-8.
- [12] Suh KT, Kim SW, Roh HL, et al. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 431: 220-225.
- [13] 王义生, 熊腾滨, 许建中, 等. 葛根素抑制酒精诱导骨髓基质细胞成脂分化的实验研究[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2004, 3(1):55-58.
- [14] 陈跃平, 高辉, 陈亮, 等. 乙醇对股骨头髓内脂肪细胞的作用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(35):6221-6227.

(收稿日期:2016-10-02)