

股骨头坏死愈胶囊联合重组人骨形态发生蛋白-2 治疗 激素性股骨头坏死的作用机制

王庆丰^{1△} 杨艳梅¹ 程国平² 王丹丹¹ 唐洪涛¹ 骆焕¹

[摘要] **目的:**探究股骨头坏死愈胶囊联合重组人骨形态发生蛋白-2(hBMP-2)治疗激素性股骨头坏死的机制。**方法:**将 30 只 3 周龄雌性 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组和骨愈组,每组 10 只,模型组和骨愈组采用臀肌注射甲基强的松龙 40 mg/kg,阿莫西林溶液 10 mg/kg,每 48 h 注射 1 次,连续注射 8 周。对照组注射等体积的生理盐水。造模 8 周后,骨愈组给予股骨头坏死愈胶囊水溶液 0.4 g/kg 灌胃,1 次/d,连续 8 周,模型组大鼠给予体积生理盐水灌胃。MRI 观察髋关节影像学改变和组织病理学观察。获取正常大鼠和造模大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs),分组培养:对照组、巨噬细胞系统(MPS)组、骨愈组、hBMP-2 组和骨愈+hBMP-2 组。碱性磷酸酶(ALP)和茜素红染色测定成骨分化情况,油红染色测定成脂分化情况。通过 RT-qPCR 和 Western Blot 法评估成骨相关基因的表达水平。**结果:**体内实验中,MRI 扫描和组织学分析显示,造模成功且股骨头坏死愈胶囊可防止大鼠股骨头坏死模型的骨丢失。体外实验显示,股骨头坏死愈胶囊联合重组人骨形态发生蛋白-2 共处理的骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化能力明显优于 MPS 组,与对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。股骨头坏死愈胶囊联合 hBMP-2 可使骨髓间充质干细胞成骨分化过程中碱性磷酸酶的表达和钙结节的形成提高,其成脂分化被抑制。Western Blot 法结果显示,与 MPS 组相比,骨愈组和骨愈+hBMP-2 组表达更高水平的 BMP-2、Runx2 和 ALP,差异有统计学意义($P<0.05$),表达更低水平的过氧化物酶增殖物激活受体 α (PPAR α),差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**中药股骨头坏死愈胶囊联合重组人骨形态发生蛋白-2,可显著改善骨髓间充质干细胞成脂和成骨之间平衡能力,促进成骨分化,可成为预防或延缓骨转移相关股骨头坏死进展的有效组合。

[关键词] 激素性股骨头坏死;重组人骨形态发生蛋白-2;股骨头坏死愈胶囊;骨髓间充质干细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)11-0001-07

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.231101

Effect and Mechanism of Femoral Head Necrosis Healing Capsule Combined with H-BMP-2 on the Treatment of Steroid-Induced Femoral Head Necrosis

WANG Qingfeng^{1△} YANG Yanmei¹ CHENG Guoping² WANG Dandan¹
TANG Hongtao¹ LUO Huan¹

¹ Henan Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital (Henan Provincial Orthopedic Hospital), Luoyang 471002, Henan China;

² The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471002, Henan China.

Abstract Objective: To investigate the mechanism of femoral head necrosis capsule combined with human bone morphogenetic protein-2 (hBMP-2) in treating steroid-induced femoral head necrosis. **Methods:** 30 3-week-old female SD rats were randomly divided into blank group, model group and femoral head necrosis group, with 10 rats in each group. The model

group and femoral head necrosis group were injected with methylprednisolone (40 mg/kg) and amoxicillin solution (10 mg/kg) by intramuscular injection once every 48 h for 8 weeks. The control group was injected with physiological saline of the same volume. After modeling for 8 weeks, the rats in the femoral head necrosis group were given femoral

基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(2017ZY1005)

¹ 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)(河南 洛阳,471002)

² 河南科技大学第一附属医院

[△]通信作者 E-mail:wangqf600@163.com

head necrosis capsule solution (0.4 g/kg) by gavage once a day for 8 weeks, and the rats in the model group were given physiological saline by gavage. MRI was used to observe joint imaging changes, and histopathological observations were performed. Normal rat and model rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were obtained and divided into control group, MPS group, femoral head necrosis group, hBMP-2 group, and femoral head necrosis + hBMP-2 group for culture. Alkaline phosphatase and eosin red staining were used to determine osteogenic differentiation, and oil red staining was used to determine adipogenic differentiation. The expression levels of osteogenesis-related genes were evaluated by RT-qPCR and Western Blot. **Results:** In the in-vivo experiment, MRI scans and histological analysis showed that the model was successful and that femoral head necrosis capsule prevented bone loss in the rat femoral head necrosis model. In vitro experiment showed that compared with the MPS group, femoral head necrosis capsule combined with hBMP-2 significantly improved the proliferation and osteogenic differentiation ability of BMSCs, and there was no statistical difference compared with the control group. Femoral head necrosis capsule combined with hBMP-2 can enhance the expression of ALP and calcium nodules in BMSCs during osteogenic differentiation, and inhibit adipogenic differentiation. Western Blot results showed that femoral head necrosis group and femoral head necrosis+hBMP-2 group had higher levels of BMP-2, Runx2, and ALP expression ($P<0.05$), and lower PPAR α expression ($P<0.05$) compared with the MPS group. **Conclusion:** The combination of femoral head necrosis capsule and hBMP-2 can significantly improve the balance between adipogenic and osteogenic abilities of BMSCs, promote osteogenic differentiation, and can be an effective combination to prevent or delay the progression of bone metastasis related femoral head necrosis.

Keywords: steroid-induced femoral head necrosis; human bone morphogenetic protein-2 (hBMP-2); femoral head necrosis capsule; bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)

随着糖皮质激素在临床被广泛应用,长期或者大剂量用糖皮质激素引起的股骨头坏死患者也越来越多,严重影响患者的生活质量。有研究表明骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)能够分化为成骨细胞等多种细胞,可修复、重建受损的股骨头,其在骨修复过程中起重要作用^[1-3]。本课题组前期试验发现股骨头坏死愈胶囊水提物可以促进骨髓间充质干细胞成骨分化^[4]。

股骨头坏死愈胶囊是河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)院内制剂,用该药治疗股骨颈骨折和防治创伤性股骨头坏死已有大量的临床经验,并取得了良好临床效果^[5-7]。重组人骨形态发生蛋白-2(Human Bone Morphogenetic Protein 2, hBMP-2)是转化生长因子 β 超家族成员之一,是促进骨修复的生长因子,可诱导未分化的骨髓间充质干细胞分化成为骨细胞和软骨细胞,加速骨愈合。基于此,本研究建立大鼠激素性股骨头坏死模型,通过体内实验探讨股骨头坏死愈胶囊联合重组人骨形态发生蛋白-2治疗激素性股骨头坏死的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

34只3周龄Sprague Dawley(SD)大鼠,SPF级,雌性,体重为40~60 g,实验动物购于北京华阜康,动物合格证号为SCXK(京)2014-0004,饲养于河南省洛阳正骨医院动物饲养中心。

1.2 实验药物

股骨头坏死愈胶囊购于河南省洛阳正骨医院(河

南省骨科医院),属院内制剂,规格为0.35 g \times 60粒,批号为20210607;重组人骨形态发生蛋白-2购于广州赛业生物,以上药物用含10%FBS的 α -MEM培养基完全培养基调至一定浓度,用0.22 μ m细胞过滤器过滤,4 $^{\circ}$ C保存,使用时稀释至所需浓度。

1.3 主要试剂和仪器

0.25%胰蛋白酶(含0.02%EDTA, Gibco, 货号为25200-072),胎牛血清(iCell, 货号为iCell 0500),RNA提取试剂盒(货号为12183025, Invitrogen公司, 美国),dNTPs(货号为18427088, Invitrogen公司, 美国),BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒(货号为C3206, 碧云天),细胞培养箱(HF100, Healforce公司),电热恒温水浴锅(型号为HWS-12, 上海一恒实验设备有限公司),数码凝胶处理系统(Tanon 1600, 天能科学仪器),核酸浓度测定仪(型号为Nano-drop, Thermo公司, 美国),荧光定量PCR仪(型号为7900, Applied Biosystems, 美国)。

1.4 方法

1.4.1 动物模型建立、MRI观察及病理学观察 采用甲基强的松龙建立激素性股骨头坏死模型^[8]。取30只3周龄雌性SD大鼠,采用随机数字表法分为空白组、模型组和骨愈组,每组10只,模型组和骨愈组采用臀肌注射甲基强的松龙40 mg/kg,阿莫西林溶液10 mg/kg,每48 h注射1次,连续注射8周^[9]。对照组注射等体积的生理盐水。造模8周后,骨愈组给予股骨头坏死愈胶囊水溶液0.4 g/kg灌胃,1次/d,连续8周,模型组大鼠给予等体积生理盐水灌胃。干预

结束后随机抽取 20 只大鼠(对照组、巨噬细胞系统(MPS)组、骨愈组、hBMP-2 组和骨愈+hBMP-2 组每组各 4 只),取俯卧位,冠状位磁共振成像(MRI)快速反转序列扫描,观察各组大鼠髋关节的影像学改变。另用 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉各组大鼠,取双侧股骨头,将股骨头标本置于 4%多聚甲醛液固定 24 h,换 75%酒精固定 24 h,10%EDTA-2NA 缓冲液脱钙完成后,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,石蜡包埋,切片,常规苏木精-伊红(HE)染色。光镜下观察股骨头组织病理学改变,如空骨陷窝率、骨小梁结构、骨细胞及骨髓细胞形态变化。

1.4.2 骨髓间充质干细胞分离和培养 取 4 只正常 3 周龄雌性 SD 大鼠,2 只按照 1.4.1 节方法造模,待造模结束后将 4 只大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后脱颈椎处死,取大鼠双侧股骨和胫骨根据 Kushioka 等^[10]的方法分离和培养骨髓间充质干细胞,分离的细胞一组是正常的骨髓间充质干细胞,另一组是造模后的骨髓间充质干细胞。骨髓间充质干细胞采用 α -MEM 培养基,加 10%胎牛血清和 1%青霉素、链霉素,在 37℃、5%CO₂ 环境中培养。所有实验均采用第 3~6 代骨髓间充质干细胞。

1.4.3 骨髓间充质干细胞实验分组 上述培养的骨髓间充质干细胞分为对照组、MPS 组、骨愈组和 hBMP-2 组及骨愈+hBMP-2 组,其中对照组为正常大鼠分离的骨髓间充质干细胞,其余各组为造模后的骨髓间充质干细胞。每孔约 1×10^4 个细胞,骨愈组用股骨头坏死愈胶囊灭菌提取物浓度 30 mg/mL 处理细胞,hBMP-2 组用 500 ng/mL 重组人骨形态发生蛋白-2 处理细胞,骨愈+hBMP-2 组用股骨头坏死愈胶囊灭菌提取物浓度 30 mg/mL+500 ng/mL 重组人骨形态发生蛋白-2 处理细胞 24 h。所有实验重复 3 次,每组 3 个重复孔,进行成骨和成脂诱导分化。培养基每 3 d 更换 1 次,持续 2 周,以诱导骨髓间充质干细胞分化。

取部分细胞行碱性磷酸酶活性测定和茜素红染色及油红染色观察。于第 7,14,21 天检测碱性磷酸酶活性,第 21 天检测甘油三脂(TG)浓度。碱性磷酸酶活性检测试剂盒与甘油三脂检测试剂盒均购自南京建成,根据说明书操作后于多功能酶标仪中测定吸光度,用于计算与分析。

第二部分细胞于成骨分化 21 d 后,细胞用 PBS 清洗 3 次,然后用 4%多聚甲醛溶液固定 15 min,洗涤 3 次,每次 5 min,0.04 mol/L 茜素红 S 工作液室温染色 30 min,双蒸水洗涤 3 次,每次 5 min,封片后于光学显微镜下拍照。

第三部分细胞于成脂分化 21 d 后,PBS 清洗 3 次,然后用 50%异丙醇固定 15 min,油红工作液

(0.3%)室温避光染色 15 min,60%异丙醇洗去多余油红,双蒸水洗涤 3 次,每次 5 min。苏木精染料(塞维尔 G1004)染色 5 s,双蒸水洗涤 3 次,每次 5 min,封片后于光学显微镜下拍照。

1.4.4 Western Blot 法检测 Runx2、碱性磷酸酶和 hBMP-2 的蛋白表达量 另以同样的分组方法将细胞接种于 6 孔板,成骨成脂分化 21 d 后,一半的细胞用 PBS 清洗 3 次,细胞用 PBS 清洗 3 次,加入 RIPA-PMSF 裂解液,冰上裂解 30 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清,采用 BCA 法测定蛋白含量。加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液 100℃变性 5 min。80 V 恒压电泳约 30 min,待样品进入分离胶层后,换用 120 V 恒压电泳 1.5 h;110 V 恒压转膜 90 min。用 TBST 缓冲液配制 5%脱脂奶粉作为封闭液,将膜放入封闭液中室温封闭 1 h。按抗体说明书上的推荐比例使用封闭液将一抗(Anti-Runx2 antibody, Anti-ALP antibody, Anti-hBMP2 antibody)进行稀释,将膜放入稀释后的一抗中 4℃摇床孵育 12 h。一抗孵育完成后,TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min。将膜放入按 1:1 000 比例稀释的二抗 Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)中室温孵育 1 h,使用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min,使用 ECL 显色剂对膜进行显色,于凝胶成像仪中进行曝光成像。

1.4.5 PCR 检测 Wnt 信号上 Wnt1 的表达量 另一半细胞成骨成脂分化 21 d 后,细胞用 PBS 清洗 3 次,加入 1 mL TRIzol 冰上裂解 5 min,加入氯仿 1/5 体积(0.2 mL),漩涡震荡仪震荡 10 s,4℃,12 000 r/min 离心 20 min;转上层水相(约 400 μ L)于另一 1.5 mL EP 管中,加入等体积异丙醇(约 400 μ L),混匀冰上静止 10 min,4℃,12 000 r/min 离心 20 min;弃上清,加入预冷的 75%乙醇 1 mL,4℃,12 000 r/min 离心 5 min;加入预冷的无水乙醇 1 mL,4℃,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,空气干燥 10 min;溶于焦碳酸二乙酯(DEPC)水中至 40 μ L;取 1 μ L RNA,测定光密度(OD)值,记录 260/280 比值并计算浓度,同时计算用于反转录(RT)的 1 μ g RNA 之体积。引物为 Wnt1,上游为 5'-GCAAGCAGCGACTGATCC-3',长度为 21 bp;下游为 5'-TCTCGGCAGCCTTTGAC-3',长度为 20 bp。 β -catenin 上游为 5'-GTTGCTCCACTC-CAGGAATGAAGG-3',长度为 24 bp;下游为 5'-GCACCAATGTCCAGTCCGAGATC-3',长度为 23 bp。反应条件:95℃ 5 s,60℃ 34 s,循环 40 次,反应结束后用聚合酶链式反应(PCR)仪测定相关数据。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料采用 Kolmogorov-Smirnov 检验是否符合正态分布,

符合正态分布的大鼠体重与骨密度数据进行 t 检验,以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。用最小显著性差异 (Least Significant Difference, LSD) 分析两组间的差异,用单因素方差分析多组间的差异。检验水准取双侧 0.05。

2 结果

2.1 一般情况

空白组大鼠体重有所增加,精神状况、毛发颜色等无明显异常变化;模型组大鼠体重显著下降,精神状况较差,毛发略显杂乱、晦暗且光泽度较差,偶有毛发脱落等;骨愈组大鼠体重无明显变化,精神状况尚可,毛发颜色与对照组无明显差异,见图 1。

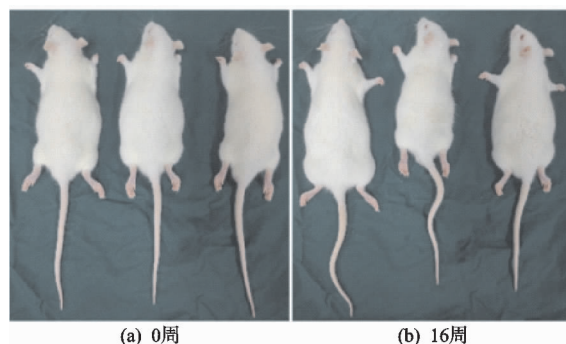


图 1 各组大鼠的一般情况

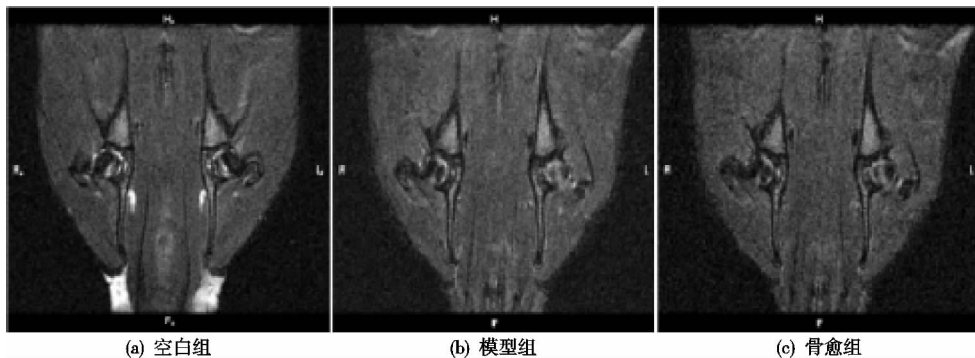


图 2 各组大鼠的 MRI 图像变化

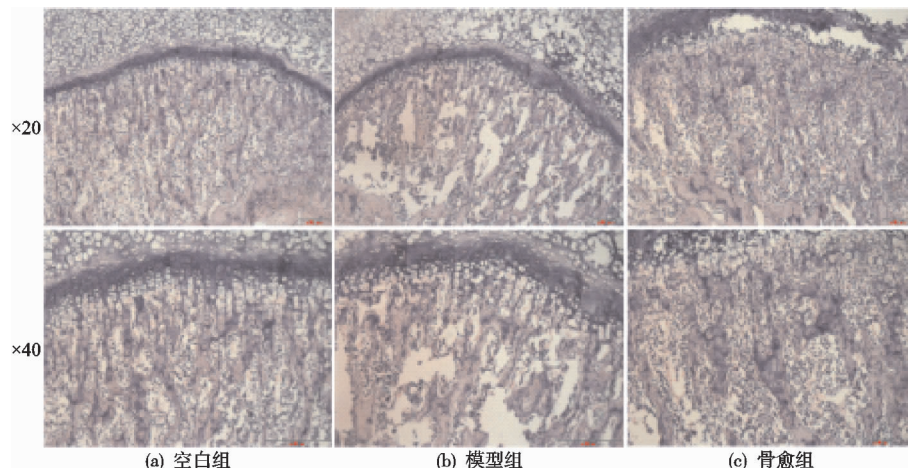


图 3 各组大鼠苏木精-伊红染色结果

2.5 茜素红染色

用成骨诱导培养基培养各组骨髓间充质干细胞,

2.2 各组大鼠双侧双髌关节 MRI 图像变化

空白组中未见明显异常信号;模型组股骨头出现点状或片状中高信号,周围环绕不均匀低信号,呈典型双线征,关节腔内有少量积液;骨愈组髌关节周围偶有 T_2 稍高信号,关节内未见 T_2 高信号,股骨头形态规则,与软骨界限分明,见图 2。

2.3 股骨头组织苏木精-伊红染色结果

病理学检查是验证造模成功的金标准,动物处死后取股骨头制作病理切片,显微镜下观察对照组可见组织结构正常,空骨陷窝较少;模型组空骨陷窝数量最多,骨小梁小而薄,骨细胞中伴有大量脂肪组织浸润,脂肪细胞增大、堆积,细胞核被挤向边缘,成骨细胞消失;骨愈组可见骨小梁增大、规则,细胞形态大多正常,空骨陷窝较少,见图 3。

2.4 碱性磷酸酶活性

碱性磷酸酶活性是间充质干细胞成骨分化的标志,巨噬细胞系统处理 10 d 后,取骨髓间充质干细胞进行碱性磷酸酶活性检测。较对照组而言,MPS 组碱性磷酸酶活性显著降低;骨愈组、hBMP-2 组、骨愈+hBMP-2 组活性略有升高,但和对照组比差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 4。

在重组人骨形态发生蛋白-2 处理 24 h 后,4%多聚甲醛固定后茜素红染色发现:与对照组比 MPS 组的成

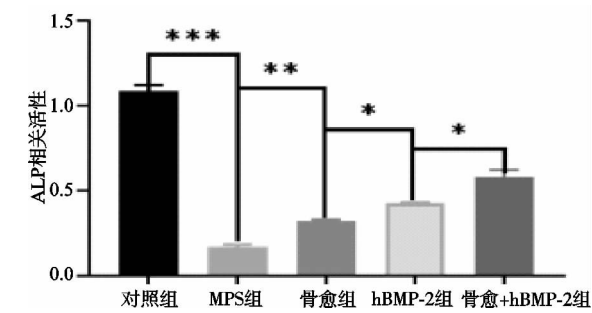


图 4 各组细胞的碱性磷酸酶活性情况

骨分化能力明显降低,形成的钙化结节减少,而骨愈组、hBMP-2 组、骨愈+hBMP-2 组成骨分化形成的钙化结节依次递增,其中骨愈+hBMP-2 组形成的钙化结节较 MPS 组增加了 35%,差异有统计学意义($P<$

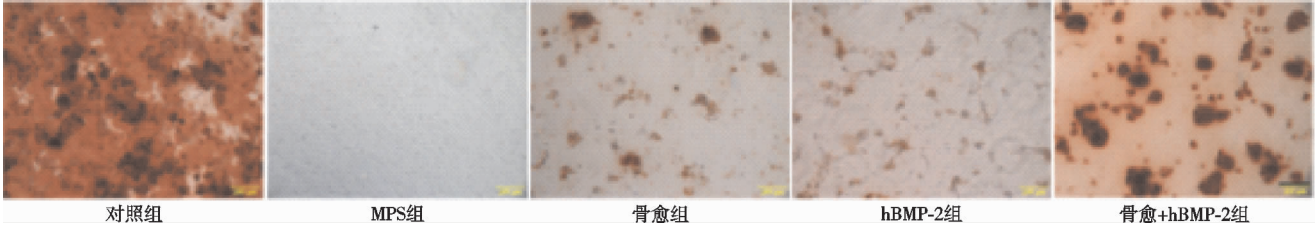


图 5 各组细胞茜素红染色结果($\times 40$)

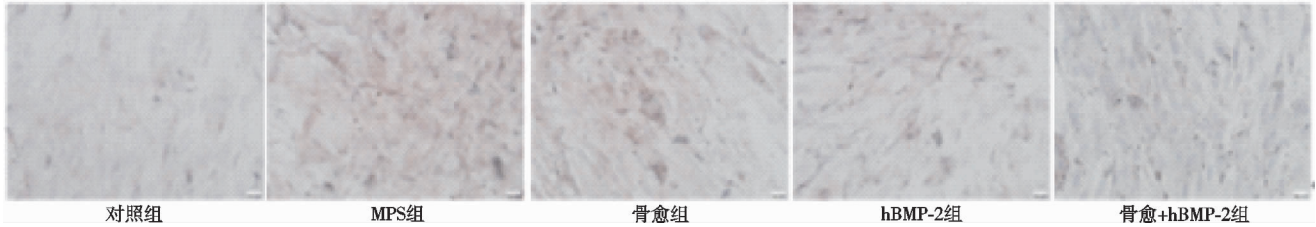


图 6 各组细胞油红染色结果($\times 40$)

2.7 Runx2、碱性磷酸酶和 BMP-2 的蛋白表达量

Western Blot 法结果显示:与 MPS 组相比,骨愈组、hBMP-2 组、骨愈+hBMP-2 组 Runx2、碱性磷酸酶和 BMP-2 蛋白的表达量均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组与骨愈+hBMP-2 组中 BMP-2 蛋白的表达量差异无统计学意义($P>0.05$),见图 7。

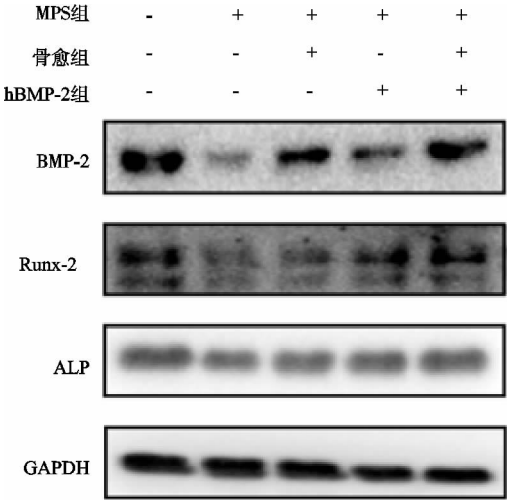


图 7 各组蛋白表达结果

0.05),见图 5(茜素红染色表达的是钙结节形成情况,表明干细胞的成骨分化能力)。

2.6 油红染色

用成脂诱导培养基培养各组骨髓间充质干细胞,在重组人骨形态发生蛋白-2 处理 24 h 后,4%多聚甲醛固定后油红染色发现:与对照组相比 MPS 组的成脂分化能力显著升高,脂滴变大成聚集状,而骨愈组、hBMP-2 组、骨愈+hBMP-2 组成脂分化形成的脂滴逐渐减少,其中骨愈+hBMP-2 组形成的脂滴较 MPS 组减少了 45%,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 6(油红染色表达成脂分化能力,表明骨髓间充质干细胞的多向分化潜能)。

2.8 Wnt 信号传导通路 wnt1 的表达量

检测各组 β -catenin 及 wnt1 的 mRNA 表达可反映 Wnt 信号通路开放与传导,结果显示 hBMP-2 组比对照组 β -catenin 及 wnt1 的 mRNA 表达升高了 27%,差异有统计学意义($P<0.05$);而 siRNA 较对照组则降低了 24%,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 8。

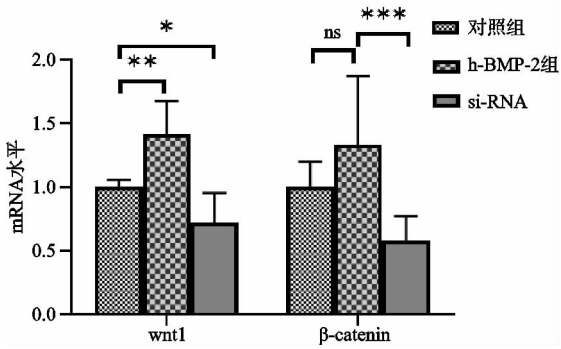


图 8 各组细胞 Wnt 信号传导通路 wnt1 和 β -catenin 实时荧光定量检测结果

3 讨论

研究表明^[11]长期大量使用糖皮质激素诱导成骨细

胞凋亡增加和延长破骨细胞的生存时间,导致骨量丢失,骨小梁纤细、变薄,负重下易发生破碎,再修复发生异常。长期受力积累,股骨头塌陷,同时骨组织血运受到破坏,最终导致激素性股骨头坏死(Steroid Induced Avascular Necrosis of Femoral Head, SANFH)。该病起病隐匿,病情发展迅速,发现时已经致残,成为目前临床上重大公共难题之一^[12-13]。如何有效防治激素性股骨头坏死是目前临床研究的热点,根据中医药“未病先防、既病防变”和辨证施治的思想,中医药治疗可以通过多药物联合、多靶点协同作用,用于治疗激素性股骨头坏死有一定优势。

股骨头坏死愈胶囊组方源自名老中医平乐正骨郭氏的经验方,为国家非物质文化遗产“平乐郭氏正骨”的经典药物,经过 200 多年的临床实践,现为河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)的院内制剂,批准文号为豫药制字 Z20120237(洛)。股骨头坏死愈胶囊是由杜仲、续断、补骨脂、黄芪、丹参、桂枝、当归等 10 余味中药组成的复方制剂^[14],该药经大量临床实践验证^[15-18],治疗肝肾两虚、气虚血瘀型股骨头缺血性坏死具有良好疗效。通过股骨头坏死愈胶囊治疗后,对患者股骨头坏死有一定的改善作用。在临床观察中笔者意外发现,患者在用药后血清中甘油三酯含量显著降低。通过体外实验进一步研究,证明股骨头坏死愈胶囊可以促进骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化,并且在促进骨髓间充质干细胞成骨分化过程中骨形态发生蛋白-2 表达明显降低^[19]。

本研究体内实验影像学观察发现,骨愈组大鼠髋关节周围偶有 T₂ 稍高信号,关节内未见 T₂ 高信号,股骨头形态规则,与软骨界限分明,空白组中未见明显异常信号,而模型组股骨头出现点状或片状样中高信号,周围环绕不均匀低信号,呈典型双线征,关节腔内有少量积液;股骨头病理切片模型组空骨陷窝数量最多,骨小梁小而薄,骨细胞中伴有大量脂肪组织浸润,脂肪细胞增大、堆积,细胞核被挤向边缘,成骨细胞消失;骨愈组可见骨小梁增大、规则,细胞形态大多正常,空骨陷窝较少,进一步验证了股骨头坏死愈胶囊在治疗股骨头缺血性坏死方面具有良好疗效。

骨髓间充质干细胞是多能细胞,可以分化成多个细胞系,其成骨、成脂分化在生理过程中保持动态平衡,但这种平衡可能会被类固醇破坏。长期使用大剂量类固醇可通过下调成骨相关基因和基因表达直接破坏平衡,上调脂肪生成相关基因的表达^[20-22]。当该平衡向成脂分化倾斜,脂肪细胞增多、变大时,骨内压升高,血流量降低,导致骨重塑减少,引起股骨头坏死。因此,如何抑制脂肪生成骨髓间充质干细胞的分化和促进其成骨分化是关键。碱性磷酸酶是成骨细胞早期

分化的标志,碱性磷酸酶活性的提高是骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的重要标志^[23],成骨细胞可通过基质小泡释放钙离子和碱性磷酸酶等物质,钙离子在碱性磷酸酶作用下沉积在胶原上,完成基质钙化过程^[24]。骨愈组、hBMP-2 组、骨愈+hBMP-2 组碱性磷酸酶活性均有升高,和 MPS 组比差异有统计学意义,且骨愈+hBMP-2 组效果优于其他两组。茜素红染色显示骨愈组、hBMP-2 组、骨愈+hBMP-2 组成骨分化形成的钙化结节依次递增,其中骨愈+hBMP-2 组形成的钙化结节较 MPS 组增加了 35%,差异有统计学意义,说明股骨头坏死愈胶囊可以促进骨髓间充质干细胞成骨分化过程中碱性磷酸酶的表达和钙结节的形成,并且股骨头坏死愈胶囊联合 hBMP-2 的作用最佳,初步推断股骨头坏死愈胶囊联合 hBMP-2 可能通过这一途径来促进骨形成及骨代谢。

目前研究发现多种信号通路参与骨髓间充质干细胞成骨或成脂分化,Runx2 是成骨过程中的关键转录因子并且受骨形态发生蛋白-2 调节^[25-26]。骨形态发生蛋白-2 在成骨分化中的积极作用是公认的^[27],有不少研究者尝试用缓释材料将骨形态发生蛋白-2 包裹并植入体内来治疗各种骨缺损^[28-29]。同样,Wnt 通路在骨形成中也是必须的^[30]。研究表明骨形态发生蛋白-2 的激活能产生更高的碱性磷酸酶活性和 Runx2 在体外的表达。基于此,本研究采用股骨头坏死愈胶囊联合重组人骨形态发生蛋白-2 作用于骨髓间充质干细胞,进一步探讨股骨头坏死愈胶囊和重组人骨形态发生蛋白-2 在促进骨髓间充质干细胞成骨分化过程中的作用机制。Western Blot 法实验结果显示,与 MPS 组相比,骨愈组、hBMP-2 组、骨愈+hBMP-2 组 Runx2、碱性磷酸酶和骨形态发生蛋白-2 蛋白的表达量均明显降低,差异有统计学意义,Wnt 信号传导通路主要组成部分 β -catenin 和 wnt1 的 mRNA 表达可反映 Wnt 信号通路开放与传导,结果显示 hBMP-2 组较对照组 β -catenin 及 wnt1 的 mRNA 表达升高了 27%,而 siRNA 较对照组则降低了 24%。

综上所述,本研究结果证明股骨头坏死愈胶囊联合重组人骨形态发生蛋白-2 能增加骨髓间充质干细胞成骨分化活性和分化能力,这可能是通过上调骨形态发生蛋白-2 和 wnt1 基因表达来实现的,该研究为激素性股骨头坏死的机制阐明及靶点预测提供了新的思路。

参考文献

- [1] KOLB A R, PATSCH J M, VOGL W D, et al. The role of the subchondral layer in osteonecrosis of the femoral head: analysis based on HR-QCT in comparison to MRI findings[J]. Acta Radiol, 2019, 60(4): 501-508.

- [2] ZHANG C, SU Y, DING H, et al. Mesenchymal stem cells-derived and siRNAs-encapsulated exosomes inhibit osteonecrosis of the femoral head[J]. J Cell Mol Med, 2020,24(17):9605-9612.
- [3] LU X, GUO H, LI J, et al. Recombinant human bone morphogenic protein-2 immobilized fabrication of magnesium functionalized injectable hydrogels for controlled-delivery and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in femoral head necrosis repair[J]. Front Cell Dev Biol, 2021,9:723789.
- [4] MILLER K D, MASUR H, JONES E C, et al. High prevalence of osteonecrosis of the femoral head in HIV-infected adults[J]. Ann Intern Med, 2002,137(1):17-25.
- [5] 吴晓龙. 股骨头坏死愈胶囊治疗肝肾两虚型股骨头缺血性坏死 120 例疗效观察[J]. 中医药临床杂志, 2013, 25(10):876.
- [6] 谭旭仪, 刘又文, 高书图, 等. 股骨头坏死愈胶囊治疗股骨颈骨折术后患者 55 例临床观察[J]. 中医杂志, 2014, 55(4):308-310.
- [7] 王丹丹, 杨艳梅, 王庆丰. 股骨头坏死愈胶囊修复股骨头坏死的作用机制探讨[J]. 中医导报, 2019, 25(8):122-125.
- [8] 章建华, 张成龙, 尹华. 激素类型对大鼠股骨头坏死模型的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(12):3969-3973.
- [9] 谭旭仪, 丁幸坡, 高书图, 等. 股骨头坏死愈胶囊含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(10):3267-3270.
- [10] KUSHIOKA J, KAITO T, OKADA R, et al. A novel negative regulatory mechanism of Smurf2 in BMP/Smad signaling in bone[J]. Bone Res, 2020, 8(1):41.
- [11] 刘金富, 曾平, 农焦, 等. 通络生骨胶囊对激素性股骨头坏死模型大鼠 Toll 样受体 4 信号通路的影响[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(26):4150-4155.
- [12] WANG T, TENG S, ZHANG Y, et al. Role of mesenchymal stem cells on differentiation in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2017, 13(2):669-675.
- [13] 谭旭仪, 高菲菲, 高书图, 等. 多孔钽棒配合股骨头坏死愈胶囊治疗激素性股骨头坏死临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(1):40-43.
- [14] 马依林, 张虹, 吴晓龙. 股骨头坏死愈胶囊基于“破”“和”“补”理论治疗股骨头坏死的组方分析[J]. 中医研究, 2022, 35(6):17-20.
- [15] 孙墨渊, 杨光耀, 张蕾蕾, 等. 股骨头坏死愈胶囊联合头颈部开窗打压植骨治疗非创伤性股骨头坏死的临床疗效观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(6):42-47.
- [16] 段卫峰, 高书图, 刘又文, 等. 股骨头坏死愈胶囊对兔激素性股骨头坏死血流变学影响的实验研究[J]. 陕西中医, 2013, 34(1):99-103.
- [17] 谭旭仪, 刘又文, 高书图, 等. 股骨头坏死愈胶囊对股骨头坏死患者血液流变学的影响[J]. 中成药, 2014, 36(10):2227-2228.
- [18] 王波, 李龙龙, 张斌青, 等. 股骨头坏死愈胶囊治疗早期股骨头坏死临床疗效的 Meta 分析[J]. 中医临床研究, 2021, 13(25):145-148.
- [19] 张颖, 张蕾蕾, 孙瑞波, 等. 补肾活血法对人骨髓间充质干细胞成骨能力的影响及 miR-93-5p 对其的抑制作用[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2):667-671.
- [20] FANG S, LI Y, CHEN P. Osteogenic effect of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Drug Design, Development and Therapy, 2018, 13:45-55.
- [21] WANG S H, GOU G H, WU C C, et al. Increased COUP-TFII expression mediates the differentiation imbalance of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in femoral head osteonecrosis [J]. BioMed Research International, 2019:9262430.
- [22] 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.
- [23] LI Z, WEI W, XU H, et al. Effects of altered CXCL12/CXCR4 axis on BMP2/Smad/Runx2/Osterix axis and osteogenic gene expressions during osteogenic differentiation of MSCs[J]. American Journal of Translational Research, 2017, 9(4):1680-1693.
- [24] WHITE A, LAMB P W, BARRETT J C, et al. Frequent downregulation of the KAI1 (CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines[J]. Oncogene, 1998, 16(24):3143-3149.
- [25] KOMORI T. Runx2: an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation[J]. Histochemie Cell Biol, 2018, 149(4):313-323.
- [26] 乔仁秋, 李树山, 殷力. 基于经典 Wnt/ β -连环蛋白信号通路探讨激素性股骨头坏死骨髓间充质干细胞成骨成脂分化机制[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(7):1206-1209.
- [27] PRALL W C, HAASTERS F, HEGGEBØ J, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 440(4):617-622.
- [28] PAJARINEN J, LIN T, GIBON E, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing[J]. Biomaterials, 2019, 196:80-89.
- [29] RAZZOUK S, SARKIS R. BMP-2: biological challenges to its clinical use[J]. N Y State Dent J, 2012, 78(5):37-39.
- [30] 杨洲, 高静媛, 田发明. Wnt 信号通路在骨稳态中的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(1):109-113.