

骨痹通消颗粒对激素型股骨头坏死 人骨髓间充质干细胞成骨与成脂分化的影响

王壮壮¹ 周正新² 朱磊² 朱彩玉¹ 顾一帆² 李子鹏¹ 陈少奇¹ 李胜¹

1.安徽中医药大学第一临床医学院,安徽合肥 230031;2.安徽中医药大学第一附属医院骨伤二科,安徽合肥 230031

[摘要] 目的 探究骨痹通消颗粒对激素性股骨头坏死人骨髓间充质干细胞(hBMMSC)成骨与成脂分化的影响。方法 取激素性股骨头坏死患者骨髓,体外进行 hBMMSC 的培养,通过细胞形态学观察、成骨及成脂分化潜能来鉴定 hBMMSC。以完培组(基础培养基+10%的胎牛血清)作为对照,采用 CCK-8 法测定 1%、2%、5%、8%、10%体积分数的骨痹通消含药血清 A 组作用 24 h 后对细胞增殖的影响。细胞在 96 孔板的培养过程中,每孔加入地塞米松溶液 0.52 μ l,以完培组(基础培养基+10%的胎牛血清)和损伤组(基础培养基+10%的胎牛血清+0.52 μ l 地塞米松溶液)作为对照,采用 CCK-8 法测定 2%、5%、8%体积分数的骨痹通消含药血清 B 组对激素环境中细胞活力的影响。以无激素诱导细胞作为对照组(基础培养基+10%的胎牛血清),将体外激素诱导的 hBMMSC 细胞分为模型组(基础培养基+10%的胎牛血清+ 10^{-5} mol/L 地塞米松溶液)、实验组(基础培养基+5%的骨痹通消含药血清+ 10^{-5} mol/L 地塞米松溶液)。茜素红染色试剂盒测定各组成骨分化后矿化结节的形成;油红 O 染色试剂盒测定各组成脂分化后脂滴的形成;RT-qPCR 测定成脂相关标志基因 PPAR γ 、C/EBP- α 与 Fabp4 中 mRNA 的表达,Western blot 检测成骨相关蛋白 BMP-2、Runx2 及 β -catenin 的蛋白表达含量。结果 原代细胞培养 7 d 后,可见梭形、纺锤形或多角形的贴壁细胞。第三代细胞生长均匀,平行排列,透光率好。成骨诱导 21 d,细胞发生改变,局部细胞聚集,并有矿化结节产生,茜素红染色呈阳性;成脂诱导 21 d,脂滴与油红 O 染液结合变为红色,油红 O 染色呈阳性。与完培组比较,10%体积分数的含药血清 A 组细胞活力下降($P<0.05$)。与完培组比较,损伤组细胞活力下降($P<0.05$);与损伤组比较,2%、5%、8%体积分数的含药血清 B 组细胞活力升高($P<0.05$)。与对照组比较,模型组染色面积降低($P<0.05$);与模型组比较,实验组中矿化结节与沉积升高,染色范围也更广($P<0.05$)。与对照组比较,模型组细胞内脂质积累增多($P<0.05$);与模型组比较,实验组较细胞内脂质积累降低($P<0.05$)。与对照组比较,模型组 PPAR γ 、C/EBP- α 和 Fabp4 的表达量升高($P<0.01$),与模型组比较,实验组 PPAR γ 、C/EBP- α 和 Fabp4 的表达量降低($P<0.05$)。与对照组比较,模型组 BMP-2、Runx2 及 β -catenin 蛋白表达含量升高($P<0.01$),与模型组比较,实验组 BMP-2、Runx2 及 β -catenin 蛋白表达含量降低($P<0.05$)。结论 骨痹通消颗粒能够促进激素性股骨头坏死 hBMMSC 的增殖及其向成骨分化的能力,抑制成脂分化,为临床上防治激素性股骨头坏死提供了理论基础。

[关键词] 激素性股骨头坏死;人骨髓间充质干细胞;成骨分化;成脂分化

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2024)01(c)-0028-07

DOI:10.20047/j.issn1673-7210.2024.03.05

Effect of Gubi Tongxiao Granules on osteoblastic and lipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head

WANG Zhuangzhuang¹ ZHOU Zhengxin² ZHU Lei² ZHU Caiyu¹ GU Yifan¹ LI Zipeng¹ CHEN Shaoqi¹ LI Sheng¹

[基金项目] 安徽省自然科学基金面上项目(2008085MH281);安徽省教育厅高等学校自然科学研究项目(KJ2020A0403)。

[作者简介] 王壮壮(1996-),男,安徽中医药大学第一临床医学院 2021 级中医骨伤科学专业在读硕士研究生;研究方向:中医药治疗骨伤科疾病。

[通讯作者] 周正新(1968-),男,博士,博士生导师,主任医师;研究方向:中医药治疗骨伤科疾病。

1.The First School of Clinical Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Province, Hefei 230031, China; 2.the Second Department of Orthopedics and Traumatology, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Province, Hefei 230031, China

[Abstract] Objective To investigate the effect of Gubi Tongxiao Granules on osteogenesis and lipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cell (hBMMSC) in

steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. **Methods** The hBMMSC were cultured *in vitro* from the bone marrow of patients with steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. The hBMMSC were identified by morphological observation, osteogenesis and lipogenic differentiation potential. The effect of 1%, 2%, 5%, 8%, 10% volume fraction of Gubi Tongxiao drug-containing serum group A on cell proliferation after 24 h was measured by CCK-8 method with the complete culture group (basic medium +10% fetal bovine serum) as control. In the process of cell culture in 96-well plates, 0.52 μL Dexamethasone solution was added to each well, and the effect of 2%, 5%, 8% volume fraction of Gubi Tongxiao drug-containing serum group B on cell viability in hormonal environment was measured by CCK-8 method with the complete culture group (basic medium +10% fetal bovine serum) and the injured group (basic medium+ 10% fetal bovine serum + 0.52 μL Dexamethasone solution) as control. Non-hormone-induced cells were used as control group (base medium +10% fetal bovine serum). The hBMMSC cells induced by hormones *in vitro* were divided into model group (basic medium +10% fetal bovine serum +10⁻⁵ mol/L Dexamethasone solution) and experimental group (basic medium +5% Gubi Tongxiao drug-containing serum +10⁻⁵ mol/L Dexamethasone solution). The formation of mineralized nodules after osteogenic differentiation was determined by alizarin red staining kit. The formation of lipid droplets after differentiation was determined by oil red O staining kit. The mRNA expressions of PPAR γ , C/EBP- α , and Fabp4 were determined by RT-qPCR, and the protein expressions of BMP-2, Runx2, and β -catenin were detected by Western blot. **Results** After seven days of primary cell culture, fusiform, fusiform or polygonal adherent cells could be seen. The third generation cells grew evenly, arranged in parallel, and had good light transmittance. After 21 days of osteogenic induction, the cells were changed, local cells were aggregated, and there were mineralized nodules, alizarin red staining was positive. After 21 days of lipid induction, lipid droplets combined with oil red O staining solution turned red, and oil red O staining was positive. Compared with the complete culture group, the cell viability of 10% volume fraction of Gubi Tongxiao drug-containing serum group A decreased ($P<0.05$). Compared with the complete culture group, the cell viability of the injured group was decreased ($P<0.05$). Compared with the injured group, the cell viability of 2%, 5%, and 8% volume fraction of Gubi Tongxiao drug-containing serum group B was increased ($P<0.05$). Compared with the control group, the staining area of the model group was decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the mineralized nodules and deposits in the experimental group were increased, and the staining range was also wider ($P<0.05$). Compared with control group, intracellular lipid accumulation increased in model group ($P<0.05$). Compared with model group, intracellular lipid accumulation in experimental group was decreased ($P<0.05$). Compared with control group, the expressions levels of PPAR γ , C/EBP- α , and Fabp4 in model group were increased ($P<0.01$). Compared with model group, the expression of PPAR γ , C/EBP- α , and Fabp4 in experimental group were decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the protein expression contents of BMP-2, Runx2, and β -catenin in the model group were increased ($P<0.01$), while the protein expression contents of BMP-2, Runx2, and β -catenin in the experimental group were decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Gubi Tongxiao Granules can promote the proliferation and osteogenic differentiation of hBMMSC in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head and inhibit lipogenic differentiation, which provides a theoretical basis for clinical prevention and treatment of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head.

[Key words] Steroid-induced avascular necrosis of the femoral head; Human bone marrow mesenchymal stem cell; Osteogenic differentiation; Lipogenic differentiation

股骨头坏死是由各种原因导致股骨头血运受阻及骨细胞数量减少的一种骨关节疾病^[1]。糖皮质激素(glucocorticoid, GC)在近些年应用广泛,导致激素性股骨头坏死(steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, SANFH)患者日益增多^[2]。医学界各大学者从未停止过对此病的深入研究,但仍有很多病理学及病因在临床尚未得到充分验证^[3]。人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cell, hBMMSC)是一种能够分化为成骨细胞、脂肪细胞等多种细胞的成体干细胞^[4]。研究表明,使用过量激素可能

会造成 hBMMSC 成骨/成脂分化功能紊乱,使骨组织的修复再造受阻^[5]。而 SANFH 的发病与 hBMMSC 分化异常密切相关。因此,调控 hBMMSC 分化对于治疗 SANFH 至关重要。中药骨痹通消颗粒是由安徽中医药大学第一附属医院著名骨科专家丁镔教授的经验方化裁而来,前期基础研究表明,该方能够抑制糖皮质激素对骨细胞与成骨细胞的破坏^[6-7]。为此,本研究通过提取 hBMMSC 进行实验分析,探讨骨痹通消颗粒对 hBMMSC 成骨和成脂分化的影响,进一步为骨痹通消颗粒治疗 SANFH 奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞 30 只清洁级新西兰白兔,体重 3.0~3.5 kg,采购于安徽省动物实验中心[许可证号 SCXK(皖)2020-001,合格证号:NO.202213656],严格遵守动物伦理学进行饲养(AHUCM-rabbits-2022023)。骨髓取自 2021 年 9 月至 2022 年 9 月安徽中医药大学第一附属医院 10 例骨折科 SANFH 并行手术患者,用于体外培养 hBMSC。患者平均年龄(52.83 ± 8.55)岁。本研究方案已获得安徽中医药大学第一附属医院医学伦理委员会批准(2022AH-81)。

1.1.2 实验药物 骨痹通消颗粒(赤芍 12 g、丹参 15 g、续断 10 g、川芎 10 g、淫羊藿 10 g、当归 10 g、甘草 6 g、土鳖虫 6 g、肉桂 4 g)是安徽中医药大学第一附属医院院内制剂,由该院中药房制作、采购,注射用地塞米松磷酸钠(5 mg/支,马鞍山丰原制药有限公司)。

1.1.3 主要试剂和仪器 茜素红染色液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0140);油红 O 染液(北京索莱宝科技有限公司,批号:G1262);成骨与成脂诱导分化试剂盒(加拿大 STEMCELL 公司,批号:2320036、2320056);CCK-8 试剂盒(上海奕杉生物科技有限公司,批号:100-106);RNA 提取试剂盒(广州美基生物,批号:RJH19-01);反转录试剂盒[新贝(上海)生物科技有限公司,批号:R202-02];BMP-2、Runx2、 β -catenin、PPAR γ 、C/EBP- α 及 Fabp4 抗体均购自 Bioss 公司(批号:AB11286487、AB09245415、AB10163878、AB178860、AB40764、AB32552);二抗羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BST16D22C16C54)。

1.2 实验方法

1.2.1 含药血清制备 20 只大白兔适应性饲养 1 周后,按照人与兔的体重计算等效剂量^[8],给予骨痹通消颗粒(4.5 g/kg)灌胃,每天 2 次,灌胃 7 d 后,腹腔注射 3%戊巴比妥钠(45 mg/kg)进行麻醉,进而心脏采血并无菌分离含药血清,分装后贮存在 -20℃冰箱备用。动物尸体由安徽中医药大学实验动物中心统一处理。

1.2.2 hBMSC 分离、培养及鉴定 在患者行全髋关节置换术时,用 5 ml 注射器从股骨中抽取 1~2 ml 骨髓液,加入完培培养基培养,每隔 2 d 换液 1 次,当细胞密度达到 80%~90%时,消化并传代细胞继续培养。取第三代细胞在显微镜下观察细胞形态学,并分别进行成骨和成脂诱导培养。每隔 3 d 换液 1 次,21 d 后进行茜素红染色、油红 O 染色,显微镜下观察骨髓系分化潜能。

1.2.3 CCK-8 检测细胞增殖 将第三代细胞以 1×10^4 /孔

均匀铺在 96 孔板上,并分为完培组(基础培养基+10%的胎牛血清)及 1%、2%、5%、8%、10%体积分数的含药血清 A 组,每组 10 个复孔,培养 24 h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ l,孵育 1 h,在酶标仪上以 450 nm 的波长检测各组的光密度(optical density, OD)值。为了进一步探究骨痹通消颗粒对 GCs 环境下 hBMSC 细胞活力的影响,继续种细胞于 96 孔板,细胞贴壁后,每孔加入 0.52 μ l 地塞米松溶液,分为损伤组(基础培养基+10%的胎牛血清+0.52 μ l 地塞米松溶液)与含药血清 B 组(分别为基础培养基+2%、5%、8%含药血清+0.52 μ l 地塞米松溶液),同时制备完培组(基础培养基+10%的胎牛血清)。每组 10 个复孔。培养 24 h 后,按照 CCK-8 试剂盒测定各孔波长 450 nm 处的 OD 值。

1.2.4 实验分组 基于“1.2.3”的实验结果重新分组为对照组、模型组、实验组。无激素诱导细胞作为对照组(基础培养基+10%的胎牛血清)。参考文献[9]中方法,使用地塞米松(10^{-5} mol/L)溶液诱导细胞损伤,随后将体外激素诱导的 hBMSC 细胞分为模型组(基础培养基+10%的胎牛血清+ 10^{-5} mol/L 地塞米松溶液)、实验组(基础培养基+5%的骨痹通消含药血清+ 10^{-5} mol/L 地塞米松溶液)。

1.2.5 hBMSC 成骨分化 调整细胞密度为 5×10^4 /ml,铺在 6 孔板上,按“1.2.4”项下分组,每组 3 个复孔。分别给予各组含相应血清的 hBMSC 成骨诱导分化培养基培养,每隔 3 d 更换 1 次培养基。21 d 后按照成骨染色试剂盒染色后在显微镜下观察。

1.2.6 hBMSC 成脂分化 调整细胞密度为 5×10^4 /ml,铺于 6 孔板,按“1.2.4”项下分组,每组 3 个复孔。分别给予各组含相应血清的 hBMSC 成脂诱导分化培养基培养,每隔 3 d 更换 1 次培养基。21 d 后按照成脂染色试剂盒染色后在显微镜下观察。

1.2.7 RT-qPCR 检测 hBMSC 中成脂相关基因的表达 选取 PPAR γ 、C/EBP- α 及 Fabp4 作为目标检测基因, β -actin 为内参。按照试剂盒说明书提取细胞中 RNA,并检测其纯度。取 2 μ g 的 RNA,按照 37℃、15 min,85℃、5 s 反应程序将 RNA 反转录为 cDNA,于 -20℃冰箱保存,加入相应引物和荧光染料扩增,反应体系为 50 μ l,其中 10 $\times$ PCR Buffer 5 μ l,d NTPs 1 μ l,正反向引物各 1 μ l,DNA 模板 2 μ l,Taq 酶 0.5 μ l,加双蒸水至 50 μ l。反应条件:95℃预变性 30 s,95℃变性 10 s,60℃退火及延伸 30 s,循环 45 次,72℃延伸 5 min。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。引物序列见表 1。实验重复 3 次。

表 1 各基因引物序列(5'-3')

基因	引物序列
PPAR γ	正向引物:ATGCAGCTCCACTTTGATTGTCTT 反向引物:GACTTCTCCAGCATTCTACTCCAC
C/EBP- α	正向引物:GGCAGCTGGCGGAAGATGAACTGCA 反向引物:TGGAGCTGACCACTGACAATGACCT
Fabp4	正向引物:CTTGGCAACAATGCTAGAAATGGC 反向引物:ACGCACTAAGACAGACGCGGTATCG
β -actin	正向引物:CATTGCTGACAGGATGCAGAAGGCC 反向引物:TGGAGCTGACCACTGACAATGACCT

1.2.8 Western blot 检测 hBMMSC 中成骨相关蛋白的表达 选取 BMP-2、Runx2 及 β -catenin 为目标蛋白, β -actin 为内参。使用 RIPA 和 PMSF 混合而成的裂解液提取各组蛋白,BCA 法测定浓度。依次进行上样、凝胶电泳、转膜及封闭,在 4℃ 环境下配摇床孵育一抗(1:1 000)过夜。TBST 洗膜 3 次,室温孵育对应的二抗(1:5 000),采用 Image J 软件分析条带。并计算目标蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

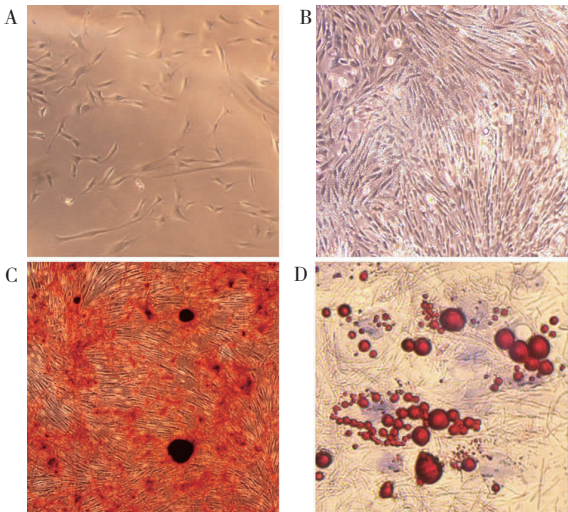
1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用 t 检验;计数资料采用例数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hBMMSC 的形态学及髓系分化潜能鉴定

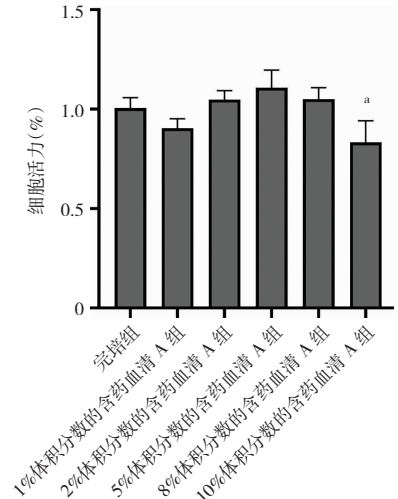
将抽提的骨髓接种后,显微镜下观察显示,原代细胞呈圆形或其他不规则形状,7 d 后,可见梭形、纺锤形或多角形的贴壁细胞(图 1A)。第三代细胞生长均匀,平行排列,透光率好(图 1B)。成骨诱导 21 d,细胞发生改变,局部细胞聚集,并有矿化结节产生,茜素红染色呈阳性(图 1C);成脂诱导 21 d,脂滴与油红 O 染液结合变为红色,油红 O 染色呈阳性(图 1D)。



A:原代细胞;B:第 3 代细胞;C:茜素红染色;D:油红 O 染色。
图 1 细胞形态学观察及髓系分化(40 $\times$)

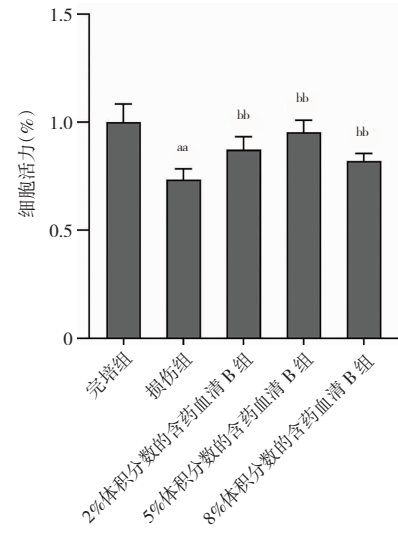
2.2 骨痹通消颗粒降低 GCs 对 hBMMSC 细胞活力的影响

与完培组比较,10%体积分数的含药血清 A 组细胞活力下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与完培组比较,损伤组细胞活力下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与损伤组比较,2%、5%、8%体积分数的含药血清 B 组可细胞活力升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。5%体积分数的含药血清 B 组细胞活力高于 2%、8%体积分数的含药血清 B 组。见图 2~3。



与完培组比较,* $P < 0.05$ 。

图 2 不同体积分数的骨痹通消含药血清作用 24 h 后对细胞增殖的影响($n=10$)



与完培组比较,* $P < 0.01$;与损伤组相比,^{bb} $P < 0.01$ 。

图 3 不同体积分数的骨痹通消含药血清对激素环境中细胞活力的影响($n=10$)

2.3 各组成骨分化情况

与对照组比较,模型组染色面积降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,实验组中矿化结节与沉积升高,染色范围也更广,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4、表 2。

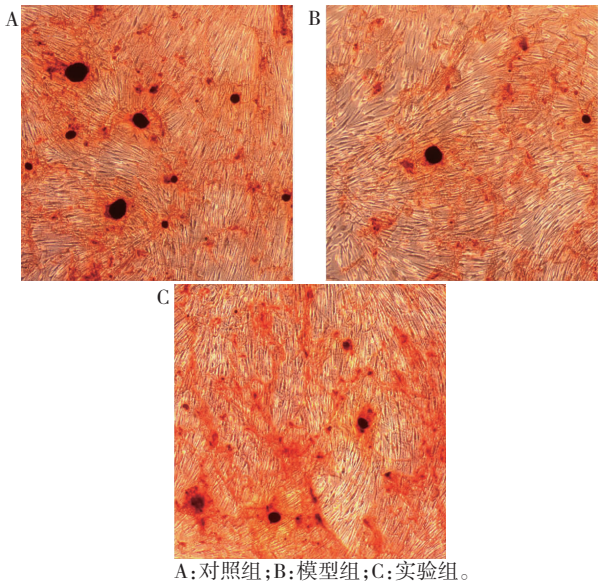


图 4 各组茜素红染色情况(40×)

表 2 各组细胞钙化结节数($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	钙化结节数(个)
对照组	3	12.518 ± 2.078
模型组	3	6.397 ± 0.743 ^{aa}
实验组	3	8.339 ± 0.778 ^b

注 与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 各组成脂分化情况

与对照组比较,模型组细胞内脂质积累增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,实验组较细胞内脂质积累降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5、表 3。

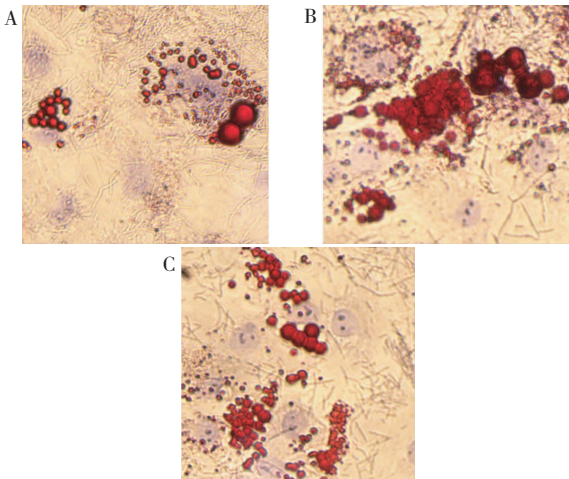


图 5 各组油红 O 染色情况(40×)

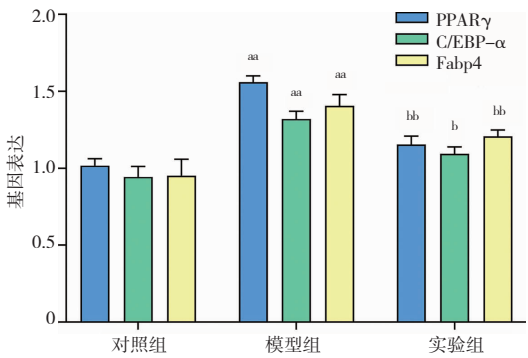
表 3 各组细胞脂滴数($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	脂滴数(个)
对照组	3	34.247 ± 4.640
模型组	3	56.531 ± 9.033 ^a
实验组	3	40.111 ± 3.513 ^b

注 与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.5 各组成脂相关基因表达

与对照组比较,模型组 PPAR γ 、C/EBP- α 和 Fabp4 的表达量升高,差异有高度统计学意义($P < 0.01$),与模型组比较,实验组 PPAR γ 、C/EBP- α 和 Fabp4 的表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6。

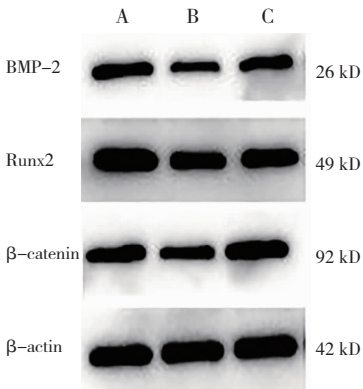


与对照组比较,^{aa} $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^{bb} $P < 0.01$ 。

图 6 各组细胞基因表达情况($n=3$)

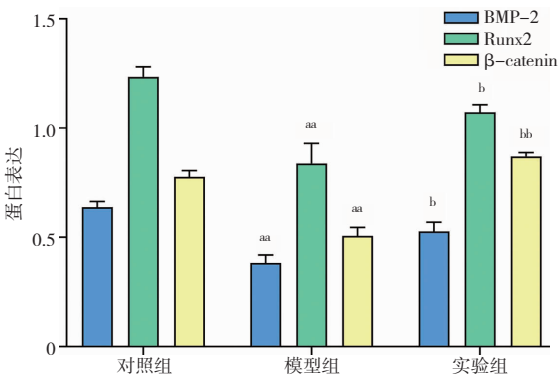
2.6 各组成骨相关蛋白表达。

与对照组比较,模型组 BMP-2、Runx2 及 β -catenin 蛋白表达含量升高,差异有高度统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,实验组 BMP-2、Runx2 及 β -catenin 蛋白表达含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 7~8。



A:对照组;B:模型组;C:实验组。

图 7 各组成骨蛋白条带图



与对照组比较,^{aa} $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^{bb} $P < 0.01$ 。

图 8 各组蛋白的相对表达量($n=3$)

3 讨论

SANFH 的发病机制有很多,如成骨成脂分化失衡、脂肪栓塞、骨质疏松、细胞凋亡与功能失衡,以及凝血异常等^[10-12]。hBMMSC 成骨成脂分化的失衡是最主要的发病机制之一。当脂肪细胞增多,容易引起凝血障碍,导致细胞凋亡与功能失衡,继而导致股骨头骨髓坏死的恶性循环^[13]。该病在中医上为“骨蚀”范畴。《素问·痹论》篇曰:“风、寒、湿三气杂至合,病在骨,骨髓酸痛,而为骨蚀。”发病根本在于肾虚,与脾肾密切相关,脾肾两虚导致痰结血瘀,不通则痛,不荣则痛,而疼痛是 SANFH 最明显的临床特征^[14-15]。大量研究数据表明,补肾壮阳、活血化瘀类方药对激素性股骨头坏死具有一定的治疗效果^[16-18]。骨痹通消颗粒选用有强筋健骨之功的淫羊藿、续断、土鳖虫与活血化瘀止痛作用的丹参、赤芍、川芎、当归及引火归元的肉桂,加以甘草调和诸药,共奏补肾活血化瘀之功^[19]。hBMMSC 在疾病的发展过程中至关重要,成骨-成脂分化在生理状态下处于动态平衡状态,若长期使用大量糖皮质激素会打破这种平衡,导致二者分化出现异常,进而引起 SANFH 等相关疾病^[20-21]。因此,对于改善成骨-成脂的分化比例,延缓 SANFH 的进程有重大意义。本研究于体外分离 hBMMSC,加以骨痹通消颗粒含药血清培养,观察其对 hBMMSC 增殖及成骨、成脂分化的影响,明确骨痹通消颗粒发挥作用的机制。

茜素红染色能够反映成骨分化晚期钙化结节的数量。本研究表明,骨痹通消颗粒含药血清能够促进 hBMMSC 钙化并减少细胞中脂质生成,抑制其成脂分化的能力。hBMMSC 的分化由许多转录因子调控。Runx2 是一种 hBMMSC 向成骨细胞分化的不可或缺的转录因子,且可抑制 hBMMSC 成脂分化^[22]。BMP-2 能够促进 hBMMSC 分化为成骨细胞^[23]。 β -catenin 作为 Wnt/ β -catenin 的通路蛋白,能够激活该通路来促进 hBMMSC 向成骨分化。PPAR γ 对 Runx2 有负向调节作用。在 hBMMSC 成骨与成脂分化时,Runx2 和 PPAR γ 共同调控各种细胞因子以维持平衡,GCs 能够通过下调 Runx2 的表达抑制 hBMMSC 的成骨分化作用,通过上调 PPAR γ 的表达促进其向成脂分化^[24]。C/EBP- α 与 Fabp4 同样为 hBMMSC 在脂肪分化过程中的关键基因,能够与 PPAR γ 共同调控成脂相关蛋白^[25]。本研究发现,骨痹通消颗粒能够促进 hBMMSC 中成骨相关蛋白 BMP-2、Runx2 及 β -catenin 的表达,且可下调成脂相关基因 PPAR γ 、C/EBP- α 和 Fabp4 中 mRNA 的表达,进一步证明骨痹通消颗粒含药血清促进成骨分化、抑制成脂分化的药效作用。

综上所述,骨痹通消颗粒能够促进 hBMMSC 成骨分化的能力,并抑制其向成脂分化,进一步调控 hBMMSC 成骨-成脂分化的平衡与稳态,起到防治激素性股骨头坏死的作用。为了更好地发挥骨痹通消颗粒的功效,还需更多临床及动物实验进一步探究其对 SANFH 的防治优势。

利益冲突声明: 本文所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 孙昭杰,张宁,李明阳,等.激素性股骨头坏死的中西医结合治疗进展[J].中医药学报,2023,51(6):105-109.
- [2] 朱诗白,张啸天,陈曦,等.股骨头坏死的保髓治疗[J].中华关节外科杂志(电子版),2020,14(6):741-746.
- [3] 曾平,韦标方,何伟,等.激素性股骨头坏死遗传易感性的研究进展[J].中国骨伤,2010,23(2):156-159.
- [4] 尹素娟,张荣华,朱晓峰,等.rhTGF- β 1 对 SD 大鼠 MSCs 骨向分化的影响及机制研究[J].中国病理生理杂志,2014,30(3):460-466.
- [5] 陈高扬.环状 RNA CDR1as 在激素性股骨头坏死 BMSCs 成骨/成脂异常转分化中的分子机理及信号通路的研究[D].长春:吉林大学,2019.
- [6] 朱彩玉,周正新,顾一帆,等.骨痹通消颗粒调控成血管化与细胞凋亡干预兔激素性股骨头坏死[J].海南医学院学报,2022,28(19):1451-1457.
- [7] 周正新,李文华,朱磊,等.中药骨痹通消颗粒干预激素性股骨头坏死模型兔的细胞凋亡[J].中国组织工程研究,2018,22(20):3190-3194.
- [8] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2010:69-72.
- [9] Zhu L,Chen J,Zhang J,et al. Parathyroid Hormone (PTH) Induces Autophagy to Protect Osteocyte Cell Survival from Dexamethasone Damage [J]. Med Sci Monit,2017:p4034-4040.
- [10] 成衍男,潘振宇.激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J].临床外科杂志,2023,31(4):301-304.
- [11] 孙懿,赵海燕,成杰,等.激素性股骨头坏死发生机制的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2023,31(1):58-62.
- [12] 李向洲,邢涛,张应拴,等.中药治疗激素性股骨头坏死作用机制的研究进展[J].中医正骨,2023,35(2):33-40,45.
- [13] 黄增发.Icariin 调节骨髓间充质干细胞成骨成脂分化治疗激素性股骨头坏死的实验研究[D].武汉:华中科技大学,2018.

(下转第 39 页)