

# 骨碎补总黄酮通过激活 mTOR 信号通路促进大鼠腱骨愈合的实验研究

张新涛<sup>1</sup>, 江华基<sup>2</sup>, 梁祖儒<sup>1</sup>, 贺飞林<sup>1</sup>, 廖小卿<sup>1</sup>, 任玉香<sup>1</sup>, 张文涛<sup>1</sup>

(1. 北京大学深圳医院运动医学与康复医学科, 广东 深圳 518036; 2. 南方医科大学第三附属医院骨科, 广东 广州 510630)

**【摘要】** 目的: 探讨骨碎补总黄酮对大鼠腱骨愈合的作用及相关分子机制。方法: 选取 10 只 8 周龄雄性 SD 大鼠 (体重 180~220 g), 培养原代跟腱干细胞, 取第 3 代跟腱干细胞用于实验。向大鼠跟腱干细胞中加入不同浓度 (0、0.1、1、10 ng/ml) 骨碎补总黄酮处理, 14 d 后分别检测 ALP、Runx2、OCN、VEGF、P-S6 和 P-4E/BP1 表达的变化。选取 40 只 8 周龄的雄性 SD 大鼠 (体重 180~220 g) 行大鼠关节外骨隧道-游离肌腱移植造模, 术后随机分为实验组和对照组, 实验组灌胃骨碎补总黄酮 (100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 对照组灌胃等量的生理盐水。分别于术后 3、6 周取材进行生物力学检测腱骨愈合强度, 组织学切片观察腱骨愈合情况及新生血管数目。结果: 不同浓度的骨碎补总黄酮处理后, ALP 染色及活性指标检测提示 0 ng/ml 组 (0.55±0.11)、0.1 ng/ml 组 (0.87±0.08)、1 ng/ml 组 (1.18±0.11)、10 ng/ml 组 (1.48±0.10), 各组比较差异有统计学意义 (P<0.05); 体外培养 14 d 后提取细胞蛋白免疫印迹实验提示, 随着骨碎补总黄酮浓度的增加, mTOR 下游标记蛋白 P-S6 蛋白表达量逐渐增加 (P<0.05), P-4E/BP1 蛋白表达量逐渐减少 (P<0.05), 成骨相关蛋白 Runx2、OCN、VEGF 表达量逐渐增加 (P<0.05)。生物力学检测显示术后 3 周时, 对照组 (0.51±0.02) N/mm 和实验组 (0.78±0.05) N/mm 力学强度比较差异无统计学意义 (P>0.05), 而 6 周时实验组 (1.36±0.09) N/mm 的力学强度明显高于对照组 (1.01±0.08) N/mm (P<0.05)。组织学结果显示实验组 3 周和 6 周时腱骨界面细胞成熟程度更高, Sharpey 纤维生长更加密集, 间质钙化程度更高, 新骨和血管发生明显增多。结论: 骨碎补总黄酮可以通过激活 mTOR 信号通路, 促进肌腱干细胞的成骨分化, 在活体可以加快腱骨愈合速度, 提高腱骨愈合质量。

**【关键词】** 骨碎补; 黄酮; 大鼠; 跟腱

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2018.03.011

**Osteopractic total flavone promoting rat extra-articular tendon-bone healing through mTOR pathway** ZHANG Xin-tao\*, JIANG Hua-ji, LIANG Zu-ru, HE Fei-lin, LIAO Xiao-qing, REN Yu-xiang, and ZHANG Wen-tao. \*Department of Sports medicine and rehabilitation, Shenzhen Hospital of Peking University, Shenzhen 518036, Guangdong, China

**ABSTRACT Objective:** To explore function and related molecular mechanism of osteopractic total flavone (OTF) on tendon healing in rats. **Methods:** Ten male rats aged for 8 weeks were collected and weighted from 180 to 220 g. Tendon stem cells were cultivated, the third tendon stem cells were used for experiment. OTP treated with 0, 0.1, 1, 10 ng/ml were added into tendon stem cells, and expression change of ALP, Runx2, OCN, VEGF, P-S6, P-4E/BP1 were detected after 14 days. Forty male rats aged for 8 weeks (weighted 180 to 220 g) were established extra-articular tendon-bone transplanting healing model, and divided into experimental group and control group. Experimental group were treated with OTF (100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), while control group was treated by normal saline with the same volume. Tendon-bone healing degree were detected by biomechanical testing at 3 and 6 weeks after surgery, histological detection were applied to detect tendon-bone healing and number of new vessels. **Results:** After treated by OTP, ALP staining and active index detection showed there were statistical differences among 0, 0.1, 1, 10 ng/ml group. After 14 days' cultivation, western blotting results showed mTOR downstream marker protein P-S6 protein expression were gradually increased with increase of density of OTP, expression of P-4E/BP1 was reduced, while expression of Runx2, OCN, VEGF were increased. Biological detection results showed that there was no significant difference in mechanical strength between experimental group (0.78±0.05) N/mm and control group (0.51±0.02) N/mm at 3 weeks after surgery, while mechanical strength in experimental group (1.36±0.09) N/mm was higher than control group (1.01±0.08) N/mm at 6 weeks after surgery. Histological results showed maturity of tendon-bone surface cell were higher at 3 and 6 weeks

基金项目: 广东省中医药局科研课题 (编号: 20131027)

Fund program: Provided by Administration of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province (No. 20131027)

通讯作者: 张新涛 E-mail: zhangxintao@sina.com

Corresponding author: ZHANG Xin-tao E-mail: zhangxintao@sina.com

in experimental group, sharpey fiber growth more density, calcification extent of mesenchyme was high, and new bone, vessels were increased. **Conclusion:** OTF could promote osteogenic differentiation of tendon stem cells through mTOR signaling in vitro, and stimulate tendon-bone healing in bone tunnel and enhance connection quality between tendon and bone.

**KEYWORDS** Drynaria fortunei; Flavone; Rats; Achilles tendon

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2018, 31(3):248-253 www.zggszz.com

近年来,自体软组织移植物(腓绳肌等)成为临床上前交叉韧带重建的理想替代物。然而,肌腱-骨愈合时间长和愈合结果差等问题仍未得到良好的解决,因此,加快骨道内肌腱的腱骨愈合意义重大。目前,常用的腱骨愈合促进物主要包括人工骨、含钙骨水泥、生长因子、骨形态发生蛋白等,它们均被报道能有效加快腱骨愈合的速度。然而,这些制剂往往价格昂贵且来源有限,难以满足临床需求。骨碎补自古以来就是骨伤科常用药物,对于促进骨折愈合具有重要作用。骨碎补总黄酮是骨碎补中的重要有效成分,大量文献报道骨碎补总黄酮可以促进骨髓间充质干细胞成骨分化<sup>[1]</sup>,对骨折愈合具有重要的促进作用<sup>[2]</sup>。腱骨愈合中的肌腱同样含有大量的肌腱干细胞<sup>[3]</sup>,在骨碎补总黄酮的刺激下可能对腱骨愈合起着至关重要的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与耗材

DMEM 培养基(Sigma 公司), I 型胶原酶(Sigma 公司),胎牛血清(Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO)(Sigma 公司),中性蛋白酶(Sigma 公司),抗坏血酸(Sigma 公司), $\beta$ -磷酸甘油(Sigma 公司),地塞米松(Sigma 公司),青霉素和链霉素双抗混合液(上海碧云天生物技术研究所),0.02%EDTA 与胰蛋白酶 1:1 混合液(广州威佳科技有限公司),骨碎补总黄酮(强骨胶囊)(北京岐黄制药有限公司),CCK-8 试剂(日本同仁化学研究所 Dojindo),碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),TRIzol RNA 提取液(Life Technologies 公司),Runx2 抗体(Santa Cruz 公司),OCN 抗体(Santa Cruz 公司),VEGF 抗体(Santa Cruz 公司),S6 抗体(Santa Cruz 公司),P-S6 抗体(Santa Cruz 公司), $\beta$ -actin 抗体(Santa Cruz 公司)。

### 1.2 大鼠肌腱干细胞的培养与成骨分化

取 8 周龄的雄性 SD 大鼠 10 只(体重 180~220 g)(购于南方医科大学实验动物中心),腹腔麻醉后进行原代肌腱干细胞分离与培养<sup>[4]</sup>。第 3 代肌腱干细胞用于以下实验研究。细胞用骨碎补总黄酮:将骨碎补总黄酮胶囊与基础培养基按 1 mg/ml 的比例进行溶解稀释,作为储存液体,随后根据浓度需要,进一步用基础培养基进行稀释。成骨诱导培养液配备与诱导操作:准备含 10%FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养液,随后在备好的  $\alpha$ -MEM 培养液中添加 50  $\mu$ M 抗坏血酸,

10 mmol  $\beta$ -磷酸甘油和 100 nmol 地塞米松。

### 1.3 动物模型

选取 8 周龄雄性 SD 大鼠 40 只,体重 180~220 g,购于南方医科大学实验动物中心。实验动物均进行右侧大腿腱骨愈合手术,建立大鼠关节外骨隧道-游离肌腱移植模型<sup>[5]</sup>。术后将大鼠随机分为实验组( $n=20$ )和对照组( $n=20$ )。实验组大鼠进行强骨胶囊灌胃(用生理盐水溶解强骨胶囊,100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,灌胃 3 周和 6 周),对照组大鼠进行等量的生理盐水灌胃(灌胃 3 周和 6 周)。分别于术后 3、6 周处死大鼠进行取材。

### 1.4 检测项目与方法

**1.4.1 细胞增殖检测** 将第 3 代肌腱干细胞按  $5 \times 10^4$ /个种植于 96 孔板,每孔 100  $\mu$ l,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h 后,分别加入含 0.1、1、10、100 ng/ml 的骨碎补总黄酮的培养基 100  $\mu$ l,对照组加入等量的 DMSO,每组设 10 个平行孔,共处理 14 d,每隔 2 d 更换 1 次培养基。14 d 后根据 CCK-8 试剂盒说明书检测各组细胞增殖情况,具体方法:用 PBS 清洗细胞 2 次,在所需检测的培养孔每孔加入 100  $\mu$ l 无血清 DMEM 培养液,再加入 10  $\mu$ l 每孔的 CCK8 试剂,37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 浓度及饱和湿度的培养箱内孵育 4 h,随后用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(OD 值)。

**1.4.2 ALP 染色及活性检测** ALP 染色:取第 3 代肌腱干细胞按  $2 \times 10^5$ /个种植于 6 孔板,设立 3 个复孔,加入含不同浓度(0、0.1、1、10 ng/ml)骨碎补总黄酮的成骨培养基(DMEM、10%FBS、青霉素、链霉、50  $\mu$ mol/L 抗坏血酸、0.1  $\mu$ mol/L 地塞米松、10 mmol/L  $\mu$  $\beta$ -磷酸甘油)共培养 14 d,每隔 2 d 换液 1 次。14 d 后将 6 孔板中培养基弃去,用 PBS 清洗细胞 2~3 次,然后用 90%乙醇固定 10 min,PBS 清洗 2~3 次,加入 ALP 染色剂 30 min 后进行拍照检测。ALP 活性:将第 3 代肌腱干细胞按  $5 \times 10^4$ /个种植于 96 孔板,每孔 100  $\mu$ l,加入含不同浓度(0、0.1、1、10 ng/ml)骨碎补总黄酮的成骨培养基,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,设立 10 个复孔。14 d 后将 6 孔板中培养基弃去,用 PBS 清洗细胞 2~3 次,以 0.2% Triton X-100 裂解液及反复冻融法充分裂解,裂解液经低温离心机 12 000 r/min 离心 10 min,取上清 50  $\mu$ l,于酶标仪 520 nm 波长处测定 ALP 值。

**1.4.3 成骨相关因子的 mRNA 表达检测** 取第 3 代肌腱干细胞按  $2 \times 10^5$ /个种植于 6 孔板, 并加入不同浓度骨碎补总黄酮处理 14 d。采用 Trizol 试剂提总 RNA, 采用 A260/A280 比值来确定总 RNA 的质量, 并用 2% 琼脂糖电泳检测其完整性。应用随机引物和反转录酶试剂盒反转录合成 cDNA 第 1 链, 使用 SYBR PremixEx Taq™ Real-time PCR 试剂盒配制 20  $\mu$ l PCR 反应体系, 采用实时荧光定量 PCR 法检测成骨性基因 Runx2、OCN 及 VEGF。

**1.4.4 成骨相关蛋白及 mTOR 信号通路相关蛋白表达检测** 取第 3 代肌腱干细胞按  $2 \times 10^5$ /个种植于 6 孔板, 并加入不同浓度骨碎补总黄酮处理 14 d。然后进行细胞裂解, 提取细胞蛋白。取含 20  $\mu$ g 蛋白质样品, 经 12% SDS-PAGE 分离后, 将蛋白质转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 5% 脱脂奶粉室温下摇床振荡封闭 2 h, 然后分别加入一抗, 4  $^{\circ}$ C 过夜。次日加入二抗, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 洗 3 次, 用增强化学发光法检测目的蛋白。

**1.4.5 生物力学指数测定** 分别于术后 3、6 周各处死 5 只大鼠后, 获取胫骨近端移植肌腱复合物, 测量隧道的长度, 两端固定标本, 以 4.0 mm/s 的速度施加应力, 直至肌腱被拔出或断裂。

**1.4.6 组织学检测** 术后 3、6 周各处死 5 只, 取标本进行固定、脱钙、脱水、石蜡包埋, 包埋时注意将骨隧道与石蜡表面垂直, 采用连续切片的方法获取隧道全长不同部位的组织切片, 切片厚度为 5  $\mu$ m; 常规苏木精-伊红染色观察。

**1.5 统计学处理**

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 计量数

据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 先行方差齐性检验, 若满足方差齐性, 则组间多重比较采用 LSD 法; 若结果方差不齐, 组间多重比较采用 Dunnett's T3 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 细胞增殖检测结果**

采用不同浓度的骨碎补总黄酮处理肌腱干细胞 14 d 后, CCK-8 结果显示 0.1、1、10 ng/ml 的骨碎补总黄酮对肌腱干细胞的增殖存活差异无统计学意义 ( $F=0.098, P=0.96$ )。结果见表 1。

**2.2 成骨相关基因的 mRNA 及蛋白表达结果**

在用 0.1、1、10 ng/ml 的骨碎补总黄酮处理肌腱干细胞 14 d 后, 随着骨碎补总黄酮浓度的增加, ALP 表达显著增加 ( $P < 0.05$ ); 随着骨碎补总黄酮浓度的增加, 成骨因子 Runx2、OCN 及 VEGF 的表达量明显增加 ( $P < 0.05$ )。结果见表 2, 图 1。

**2.3 mTOR 信号通路相关蛋白检测结果**

Western-Blot 结果见图 3。随着骨碎补总黄酮浓度的增加, PS6 蛋白表达量逐渐增加, P-4E/BP1 蛋白表达量逐渐减少。

**2.4 生物力学指数结果**

分别于术后 3 周和 6 周, 取材进行生物力学检测髓骨愈合强度, 结果显示术后 3 周骨碎补总黄酮组的髓骨愈合强度与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 2); 术后 6 周骨碎补总黄酮组的髓骨愈合强度显著高于对照组 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

**2.5 组织学检测**

HE 染色结果显示术后 3 周实验组髓骨界面内新生血管数量明显多于对照组 ( $P < 0.05$ , 表 2)。术后

表 1 不同浓度骨碎补总黄酮处理下 CCK-8、ALP 活性及荧光定量 PCR 结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Activity of CCK-8, ALP and quantitative PCR with different concentration of osteopractic total flavone ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	CCK-8	ALP	Runx2	OCN	VEGF
0 ng/ml	6	1.23 $\pm$ 0.17	0.55 $\pm$ 0.11	1.01 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.03
0.1 ng/ml	6	1.21 $\pm$ 0.14	0.87 $\pm$ 0.08*	1.52 $\pm$ 0.11 <sup>+</sup>	1.44 $\pm$ 0.06 <sup>+</sup>	1.44 $\pm$ 0.13 <sup>+</sup>
1 ng/ml	6	1.19 $\pm$ 0.12	1.18 $\pm$ 0.11 <sup>#</sup>	2.19 $\pm$ 0.09 <sup>#</sup>	2.22 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>	1.82 $\pm$ 0.11 <sup>#</sup>
10 ng/ml	6	1.20 $\pm$ 0.09	1.48 $\pm$ 0.10*	2.98 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	3.08 $\pm$ 0.09 <sup>*</sup>	2.21 $\pm$ 0.14 <sup>*</sup>

注: CCK-8: 0.1 ng/ml 与 0 ng/ml 组比较,  $t=0.2873, P > 0.05$ ; 1 ng/ml 组与 0.1 ng/ml 组比较,  $t=0.245, P > 0.05$ ; 10 ng/ml 与 1 ng/ml 组比较,  $t=0.19, P > 0.05$ 。ALP: 与 0 ng/ml 组比较,  $t=7.440, P < 0.05$ ; 与 0.1 ng/ml 组比较,  $t=7.207, P < 0.05$ ; 与 1 ng/ml 组比较,  $t=6.382, P < 0.05$ ; Runx2: 与 0 ng/ml 组比较,  $t=13.35, P < 0.05$ ; 与 0.1 ng/ml 组比较,  $t=14.91, P < 0.05$ ; 与 1 ng/ml 组比较,  $t=23.10, P < 0.05$ ; OCN: 与 0 ng/ml 组比较,  $t=18.42, P < 0.05$ ; 与 0.1 ng/ml 组比较,  $t=24.67, P < 0.05$ ; 与 1 ng/ml 组比较,  $t=22.58, P < 0.05$ ; VEGF: 与 0 ng/ml 组比较,  $t=10.19, P < 0.05$ ; 与 0.1 ng/ml 组比较,  $t=7.056, P < 0.05$ ; 与 1 ng/ml 组比较,  $t=6.927, P < 0.05$

Note: CCK-8: 0.1 ng/ml group versus 0 ng/ml group,  $t=0.2873, P > 0.05$ ; 1 ng/ml group versus 0.1 ng/ml group,  $t=0.245, P > 0.05$ ; 1 ng/ml group versus 10 ng/ml group,  $t=0.19, P > 0.05$ 。ALP: compared with 0 ng/ml group,  $t=7.440, P < 0.05$ ; compared with 0.1 ng/ml,  $t=7.207, P < 0.05$ ; compared with 1 ng/ml,  $t=6.382, P < 0.05$ ; Runx2: compared with 0 ng/ml,  $t=13.35, P < 0.05$ ; compared with 0.1 ng/ml,  $t=14.91, P < 0.05$ ; compared with 1 ng/ml,  $t=23.10, P < 0.05$ ; OCN: compared with 0 ng/ml,  $t=18.42, P < 0.05$ ; compared with 0.1 ng/ml,  $t=24.67, P < 0.05$ ; compared with 1 ng/ml,  $t=22.58, P < 0.05$ ; VEGF: compared with 0 ng/ml,  $t=10.19, P < 0.05$ ; compared with 0.1 ng/ml,  $t=7.056, P < 0.05$ ; compared with 1 ng/ml,  $t=6.927, P < 0.05$

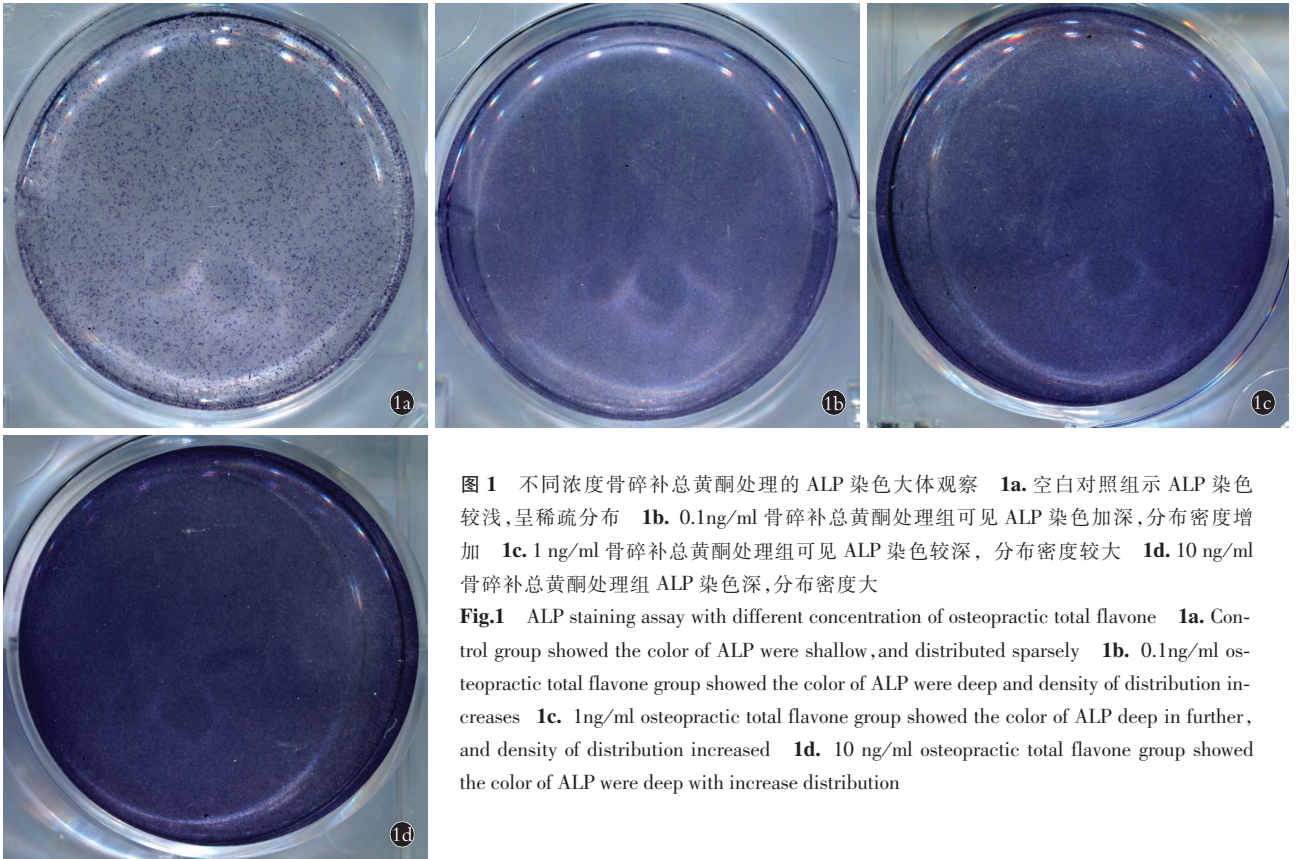


图 1 不同浓度骨碎补总黄酮处理的 ALP 染色大体观察 1a. 空白对照组示 ALP 染色较浅,呈稀疏分布 1b. 0.1ng/ml 骨碎补总黄酮处理组可见 ALP 染色加深,分布密度增加 1c. 1 ng/ml 骨碎补总黄酮处理组可见 ALP 染色加深,分布密度较大 1d. 10 ng/ml 骨碎补总黄酮处理组 ALP 染色深,分布密度大

Fig.1 ALP staining assay with different concentration of osteopractic total flavone 1a. Control group showed the color of ALP were shallow, and distributed sparsely 1b. 0.1ng/ml osteopractic total flavone group showed the color of ALP were deep and density of distribution increases 1c. 1ng/ml osteopractic total flavone group showed the color of ALP deep in further, and density of distribution increased 1d. 10 ng/ml osteopractic total flavone group showed the color of ALP were deep with increase distribution

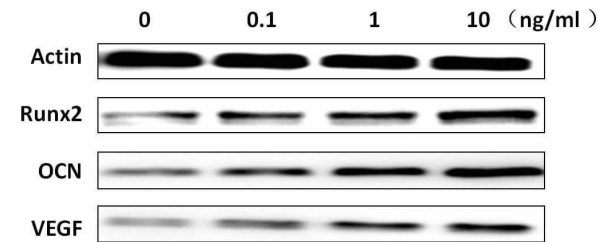


图 2 不同浓度骨碎补总黄酮处理下 Runx2、OCN 及 VEGF 蛋白免疫印迹结果

Fig.2 Western Blotting results of Runx2, OCN, and VEGF with different dose of osteopractic total flavone

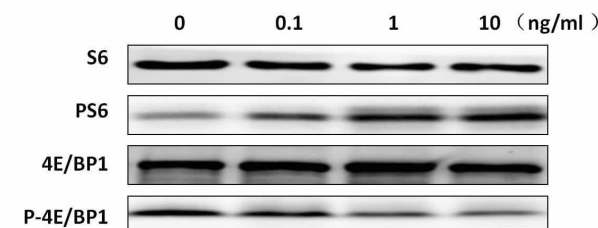


图 3 不同浓度骨碎补总黄酮处理下 PS6 和 P-4E/BP1 蛋白免疫印迹结果

Fig.3 Western-Blotting results of PS6 and P-4E/BP1 with different dose of osteopractic total flavone

表 2 对照组与实验组术后 3、6 周腱骨愈合强度、新生血管数量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Comparison of tendon-bone healing strength and number of new vessels between control group and experimental group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	腱骨愈合强度(N/mm)		新生血管数量(个/mm)	
		3 周	6 周	3 周	6 周
实验组	5	0.78±0.05	1.36±0.09	38±2	7±4
对照组	5	0.51±0.02	1.01±0.08	21±2	15±3
t 值	-	15.85	9.91	19.01	5.06
P 值	-	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05

## 2.6 组织学检测

如图 4 所示,术后 3 周,实验组腱骨界面内有大量成纤维细胞聚集,细胞排列有序,骨隧道附近有软骨样细胞出现,并且细胞间质有钙化趋势,隧道壁表面新骨较多;对照组腱骨界面内大量成纤维细胞聚集,细胞混乱无固定排列,骨隧道附近未见软骨样细胞,间质钙化不明显,隧道壁表面新骨量少。术后 6 周,实验组的所有腱骨界面均有明显的 Sharpey 纤维连接,骨隧道附近软骨样细胞较多,基质钙化明显,腱骨界面内还有片状新骨形成,隧道壁表面新骨形成多;对照组腱骨界面有 6 个标本出现 Sharpey

6 周两组腱骨界面内血管数量比术后 3 周有所减少,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ,表 2)。

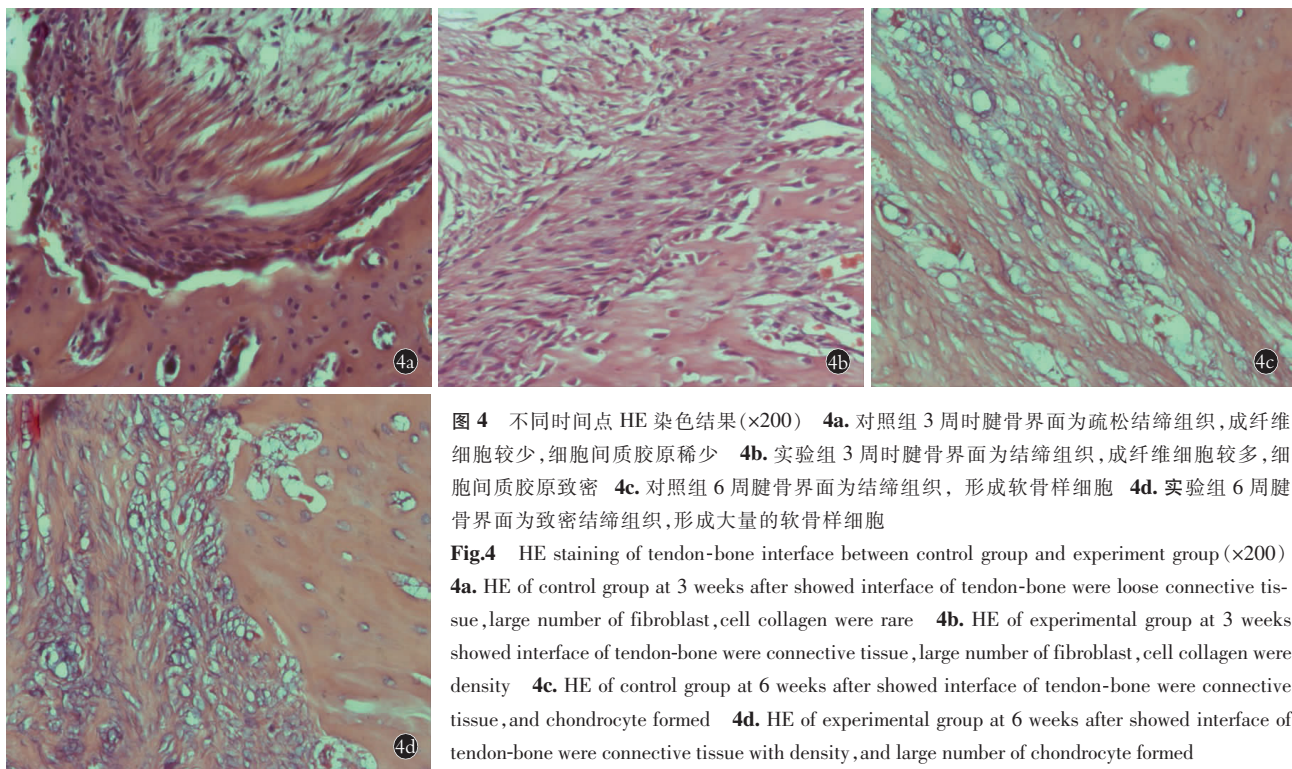


图 4 不同时间点 HE 染色结果(×200) 4a. 对照组 3 周时腱骨界面为疏松结缔组织,成纤维细胞较少,细胞间质胶原稀少 4b. 实验组 3 周时腱骨界面为结缔组织,成纤维细胞较多,细胞间质胶原致密 4c. 对照组 6 周时腱骨界面为结缔组织,形成软骨样细胞 4d. 实验组 6 周时腱骨界面为致密结缔组织,形成大量的软骨样细胞

Fig.4 HE staining of tendon-bone interface between control group and experiment group (×200) 4a. HE of control group at 3 weeks after showed interface of tendon-bone were loose connective tissue,large number of fibroblast,cell collagen were rare 4b. HE of experimental group at 3 weeks showed interface of tendon-bone were connective tissue,large number of fibroblast,cell collagen were density 4c. HE of control group at 6 weeks after showed interface of tendon-bone were connective tissue,and chondrocyte formed 4d. HE of experimental group at 6 weeks after showed interface of tendon-bone were connective tissue with density,and large number of chondrocyte formed

纤维,隧道壁附近发现有软骨样细胞,且细胞基质有钙化趋势,隧道壁表面有少量新骨,但腱骨界面内无新骨形成。

### 3 讨论

#### 3.1 骨碎补总黄酮对肌腱干细胞成骨的影响

目前,腱骨愈合过程的具体机制虽尚未得到良好的阐述,但大量的研究表明,自体肌腱移植与创伤周围软组织中存在大量肌腱干细胞,肌腱干细胞与间充质干细胞功能十分相似,肌腱干细胞在创伤后被炎症反应激活,并向成骨细胞分化<sup>[6]</sup>,最终在原位促进腱骨愈合<sup>[7]</sup>。在本研究中,结果显示骨碎补总黄酮可以明显促进大鼠自体肌腱移植后的腱骨愈合。同时,骨碎补总黄酮作为传统骨伤中药,已被报道可促进多种干细胞的成骨分化<sup>[1-2]</sup>。综上所述,肌腱干细胞成骨分化对促进腱骨愈合具有重要的作用。因此,本文在体外评估了骨碎补总黄酮对肌腱干细胞成骨分化的影响。而研究结果显示:骨碎补总黄酮可在体外有效的刺激肌腱干细胞的成骨分化标记物(ALP,RUNX2,OCN)的表达并提高其成骨分化,说明骨碎补总黄酮促进大鼠腱骨愈合可能源自其对肌腱干细胞成骨分化的促进作用。本研究结果明确了肌腱干细胞的成骨分化在腱骨愈合过程中的重要作用,提示了促进腱骨愈合的关键点是有效促进肌腱干细胞的成骨分化。

#### 3.2 骨碎补总黄酮增加腱骨愈合部位血管的形成

血管发生一直以来都被认为是腱骨愈合的重要

基础<sup>[8]</sup>,因此,有效促进血管形成是腱骨愈合的重要条件。过往的研究显示,骨碎补总黄酮可提高成骨细胞 VEGF 和 FGF-2 的表达,促进其成骨区域血管形成,促进骨折后的骨发生<sup>[10]</sup>。而骨发生也被认为是腱骨愈合的重要生物基础,因此课题组在体外评估了骨碎补总黄酮对进肌腱干细胞 VEGF 的表达的影响,结果显示骨碎补总黄酮可以促进肌腱干细胞 VEGF 的表达,提示骨碎补总黄酮在促进肌腱干细胞成骨分化的同时,还可以促进肌腱干细胞的 VEGF 分泌以提高原位的血管发生从而达到促进腱骨愈合的效应。

然而,尽管在骨碎补总黄酮干预后,实验组大鼠早期腱骨界面内的血管形成较对照组出现增多,但在腱骨愈合后期,伴随着腱骨界面组织逐渐成熟,实验组腱骨界面内的血管数量出现明显降低,而实验组大鼠的下降趋势显著快于对照组,此现象与本研究的体外结果并不完全一致,笔者认为,这可能是由于实验组大鼠腱骨愈合过程在骨碎补总黄酮促进下提前进入了成骨终末钙化期,而对照组尚处于腱骨界面的软组织修复期,仍需要大量血管发生方能完成成骨发生。

#### 3.3 激活 mTOR 信号通路促进腱骨愈合

近年来,虽然针对腱骨愈合过程的研究已大量发表,然而其中关键的分子靶点与分子机制并未得到良好阐述。哺乳动物雷帕霉素特异性靶点(Mammalian Target of Rapamycin,mTOR)是在哺乳动物中

调控能量代谢与蛋白质合成的重要分子复合物,其对哺乳动物骨发育、骨形成、骨重构以及血管形成的调控作用已被明确肯定<sup>[9]</sup>。局部的骨发生与血管发生一直以来都被认为是腱骨愈合过程的重要基础,过往研究证实骨碎补总黄酮可以促进多种干细胞的成骨分化与各类血管发生因子的表达<sup>[9]</sup>。本文体外实验结果显示:骨碎补总黄酮处理后,肌腱干细胞中的 mTOR 信号通路标记物 P-S6 蛋白出现显著提高,并呈现了浓度依赖性。这表明骨碎补总黄酮激活了肌腱干细胞中的 mTOR 信号通路,从而促进肌腱干细胞的成骨与成血管,并最终促进腱骨愈合,证实了 mTOR 信号通路对肌腱干细胞的骨与血管发生有关键的调控作用。因此,课题组拟在下一步研究中深入探讨 mTOR 信号通路调节在肌腱干细胞成骨分化的分子机制,立足于肌腱干细胞,探索腱骨愈合过程的潜在分子靶点。

然而,本研究依旧存在一定的不足:(1)本研究结果虽然提示骨碎补总黄酮可能是通过激活肌腱干细胞中的 mTOR 信号通路以促进腱骨愈合,但由于肌腱干细胞缺乏明确的分子标记,无法构建特异的基因敲除小鼠模型,因此无法完全明确 mTOR 信号通路在腱骨愈合过程中的调控作用。(2)由于腱骨愈合过程目前机制尚不清楚,本研究中缺乏其他相关分子靶点在腱骨愈合过程中的作用。(3)强骨胶囊是中药制剂,成分复杂,除了含有主要成分骨碎补外,还含有其它多种活性药物,其含有的某些活性成分可能会对研究结果产生偏倚。因此,课题组在未来的研究中将针对以上不足进行更深入的研究。

综上所述,本研究提示骨碎补总黄酮可能通过激活 mTOR 信号通路促进肌腱干细胞的成骨分化及 VEGF 的表达,并最终促进大鼠的腱骨愈合过程。鉴于骨碎补总黄酮有着安全、价格低廉的特点,本研究可为骨碎补总黄酮的临床推广和应用提供初步的理论依据。

#### 参考文献

[1] 舒晓春,刘君静,朱丹华,等.不同浓度的骨碎补总黄酮对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响[J].中国病理生理杂志,2010,26(7):1261-1264.  
SHU XC,LIU JJ,ZHU DH,et al. Effect of rhizoma drynariae total flavonoids on osteogenesis in cultured bone mesenchymal stem cells

[J]. Zhongguo Bing Li Sheng Li Za Zhi,2010,26(7):1261-1264. Chinese.  
[2] 高华利,肖涟波,张子峰,等.骨碎补总黄酮对胶原诱导性关节炎大鼠关节骨破坏影响的实验研究[J].中国骨伤,2013,26(9):764-767.  
GAO HL,XIAO LB,ZHANG ZF,et al. Experimental study on effect of Rhizoma Drynariae Flavone on bone destruction of collagen induced arthritis rat[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2013,26(9):764-767. Chinese with abstract in English.  
[3] Zhang J,Wang H C. Zhang J,et al. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes[J]. BMC Musculoskeletal Disorders,2010,11(1):1-11.  
[4] 胡超,唐康来,陈万,等.大鼠跟腱来源肌腱干细胞的分离培养及鉴定[J].第三军医大学学报,2013,35(11):1097-1101.  
HU C,TANG KL,CHEN W,et al. Isolation and identification of tendon stem cells from rat Achilles's tendon[J]. Di San Jun Yi Da Xue Xue Bao,2013,35(11):1097-1101. Chinese.  
[5] 陆军,Ray Vanderby Jr. 大鼠关节外骨隧道-游离肌腱移植模型的建立[J].中华骨科杂志,2014(8):864-871.  
LU J,Ray Vanderby Jr. Establishment of a novel rat extra-articular tendon-to-bone transplanting healing model[J]. Zhonghua Gu Ke Za Zhi,2014(8):864-871. Chinese.  
[6] Lui PP Y,Yin MW. Higher BMP/Smad sensitivity of tendon-derived stem cells (TDSCs) isolated from the collagenase-induced tendon injury model:possible mechanism for their altered fate in vitro[J]. BMC Musculoskeletal Disorders,2013,14:248.  
[7] Lui P PY,Lai SC,Cheuk YC,et al. Expression of bone morphogenetic protein-2 in the chondrogenic and ossifying sites of calcific tendinopathy and traumatic tendon injury rat models[J]. J Orthop Surg Res,2009,4(1):27.  
[8] 上官文姬,李鹤,汤璐敏.骨碎补总黄酮对大鼠成骨细胞 VEGF 和 FGF-2 表达的影响[J].辽宁中医药大学学报,2014,(8):38-41.  
SHANFGUAN WJ,LI H,TANG LM. Effect of drynaria flavonoids on expressions of VEGF and FGF-2 on rat osteoblast[J]. Liao Ning Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao,2014,(8):38-41. Chinese.  
[9] Hongli S,Koo KJ,Richard M,et al. Osteoblast-targeted suppression of PPAR $\gamma$  increases osteogenesis through activation of mTOR signaling[J]. Stem Cells,2013,31(10):2183-2192.  
[10] 丁小刚,覃勇,鄂建设,等.骨碎补总黄酮对老年性骨质疏松症患者血清骨钙素水平及骨密度影响[J].中国骨质疏松杂志,2013,19(5):519-521.  
DING XG,TAN Y,E JS,et al. Research and evaluation of the effect of flavonoids drynaria fortunei on serum osteocalcin and bone mineral density in senile osteoporotic patients[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi,2013,19(5):519-521. Chinese.  
(收稿日期:2017-04-17 本文编辑:李宜)