

桃红四物汤早期干预对大鼠骨折愈合中间充质干细胞归巢的影响

李汪洋, 熊辉

(湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410000)

【摘要】 目的: 观察桃红四物汤对骨折大鼠的早期愈合过程中间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 迁移能力、归巢数目及骨痂内细胞因子表达的影响, 探讨桃红四物汤通过调控中间充质干细胞归巢加速骨折愈合的作用机制。方法: 建立右侧股骨干开放性骨折大鼠模型。将 5 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 32 只, 体重 110~130 (120±10) g, 采用随机数字表法分为对照组, 桃红四物汤低、中、高剂量组。对照组予蒸馏水, 其他组予以不同剂量的桃红四物汤。术后第 1 天灌胃, 每天 2 次, 连续 5 d。术后 21 d, 采用微型计算机断层扫描技术(micro-computed tomography, Micro-CT) 观察骨体积分数即骨体积(bone volume)/组织体积(tissue volume) (BV/TV) 和骨密度(bone mineral density, BMD)。术后 5 d, 体外培养对照组和药物组大鼠外周血 MSCs, 采用细胞迁移实验检测其迁移能力。免疫组化(immunohistochemistry, IHC) 检测骨痂处 MSCs 的数目。蛋白芯片技术检测骨痂内细胞因子的表达。结果: Micro-CT 结果显示, 高剂量组 BV/TV 高于中剂量组 ($P=0.032$), 中剂量组高于低剂量组 ($P=0.041$), 对照组和低剂量组无差异性 ($P=0.651$); 此外, 对照组 BMD 和低剂量组无差异 ($P=0.671$), 低剂量组低于中剂量组 ($P=0.018$), 中剂量组低于高剂量组 ($P=0.008$)。细胞迁移实验表明, 桃红四物汤能增强外周血 MSCs 的迁移能力; IHC 检测发现, 骨痂内 CD45⁻、CD90⁺、CD29⁺ 间充质干细胞较对照明显增多; 蛋白芯片显示, 桃红四物汤能促进骨折大鼠骨痂内 CINC-1 (2.91 倍)、CINC-3 (1.59 倍)、LIX (1.5 倍)、Thymus Chemokine (2.55 倍)、VEGF (1.22 倍) 表达, 抑制 TIMP-1 (2.98 倍) 表达。结论: 骨折早期予活血化瘀代表方桃红四物汤能明显加速骨折愈合, 其作用机制可能与增强外周血 MSCs 迁移能力和上调骨痂中 CINC-1、CINC-3、LIX、Thymus Chemokine、VEGF, 下调 TIMP-1 表达, 进而促进外周血 MSCs 归巢有关。

【关键词】 骨折愈合; 活血化瘀; 中草药; 归巢; 间充质干细胞

中图分类号: R681

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2022.04.014

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of Taohong Siwu Decoction (桃红四物汤) early intervention on mesenchymal stem cells homing in fracture healing in rats Li Wang-yang and XIONG Hui. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410000, Hunan, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of Taohong Siwu Decoction (THSWD) on the mesenchymal stem cells (MSCs) migration, homing number and cytokine expression in callus during the early process of fracture healing, and to explore the mechanism of THSWD on accelerating fracture healing by regulating the homing of MSCs in rats. **Methods:** A rat model of right femoral shaft open fracture was established. Thirty-two 5-week-old male Sprague-Dawley rats, weighting 110 to 130 g, were divided into control group, low-dose group, medium-dose group and high-dose group by using random number table. Distilled water was given to the control group, and the other groups were given Taohong Siwu Decoction. The rats were gavaged twice a day for 5 consecutive days after surgery. Bone volume/tissue volume (BV/TV) and bone mineral density (BMD) were observed using micro-computed tomography (micro-CT) at 21 days after surgery. At 5 days post-fracture, peripheral blood MSCs from THSWD treated and untreated rats were cultured in vitro. Subsequently, the migration ability of MSCs was observed by cell migration assay. The number of MSCs homing to the callus at the early stage of fracture (5 d) was detected by Immunohistochemistry (IHC). Protein chip was used to detect the expression of cytokines in callus. **Results:** Micro-CT results showed that BV/TV was higher in the high-dose group than in the medium-dose group ($P=0.032$), and higher in the medium-dose group than in the low-dose group ($P=0.041$), with no difference between the control and low-dose group ($P=0.651$). In addition, there was no difference in BMD between low-dose group and the model group ($P=0.671$), and lower in the

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81874478)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 81874478)

通讯作者: 熊辉 E-mail: xh_hn@hnuocm.edu.cn

Corresponding author: XIONG Hui E-mail: xh_hn@hnuocm.edu.cn

low-dose group than in the medium-dose group ($P=0.018$), and the medium-dose group was lower than the high-dose group ($P=0.008$). Cell migration assay showed that THSWD promotes enhanced the migration ability of peripheral blood MSCs. IHC assay revealed that CD45⁺, CD90⁺, CD29⁺ MSCs significantly increased in bone callus after THSWD intervention compared with the control group. Protein chip showed that THSWD promoted the upregulation of CINC-1 ($\times 2.91$), CINC-3 ($\times 1.59$), LIX ($\times 1.5$), Thymus Chemokine ($\times 2.55$), VEGF ($\times 1.22$) and the down-regulation of TIMP-1 ($\times 2.98$). **Conclusion:** THSWD, a representative formula of "promoting blood circulation and removing blood stasis", can significantly accelerate fracture healing, and its mechanism may be related to enhancing the migration ability of peripheral blood MSCs and up-regulating CINC-1, CINC-3, LIX, Thymus Chemokine, VEGF and down-regulating TIMP-1 in bone callus, which promotes the peripheral blood MSCs homing in the early stage of fracture.

KEYWORDS Fracture healing; Promoting blood circulation and removing blood stasis; Drugs, Chinese herbal; Homing; Mesenchymal stem cells

骨折愈合需经历炎症期、修复期和重建期 3 个阶段。中医骨伤科将此总结为瘀去、新生、骨合。局部瘀血是骨折后的病理产物，早期予活血化瘀治疗是基本法则。有研究者从一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)活性，缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF-1 α)和血管内皮生长生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达，骨钙素和 I 型胶原分泌，观察早期“活血化瘀”对骨折愈合的作用^[1-2]。骨折后大量细胞从骨髓或外周组织动员并归巢至损伤处，通过发挥各自的功能使骨组织逐渐无瘢痕化，这是骨组织再生过程^[3]。间充质干细胞归巢是骨折愈合的起始环节，它首先归巢至骨折处，进而分化为成骨细胞参与骨组织的再生^[4-5]。本实验将研究在骨折早期运用活血化瘀代表方桃红四物汤对间充质干细胞归巢的影响，从而揭示桃红四物汤促进骨折愈合的细胞学基础。

1 材料与方

1.1 实验仪器和材料

超净工作台(北京亚泰隆, YT-CJ-2NB);直热式二氧化碳培养箱(上海三藤仪器, DH-160I);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器, DSZ2000X);显微镜(奥林巴斯, CX41-72C02)光学显微镜(Motic, BA410T);切片(浙江金华益迪试验器材, YD-315);全自动凝胶成像分析系统(Syngene, GBOX-H12-E-M);戊巴比妥钠(北京寰宇化工有限公司; 096956-001);SD 大鼠间充质干细胞完全培养基(Cyagen, RASM-90011);一抗 CD90(鼠源, Proteintech, 66766-1-Ig);一抗 CD45(兔源, Proteintech, 20103-1-AP);一抗 CD29(兔源, Proteintech, 12594-1-AP);细胞因子蛋白芯片(R&D Systems, ARY008);Transwell 小室(Corning, 3422);红细胞裂解液(eBioscience, 00-4300-54)。

1.2 实验动物

5 周龄 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠，体重 110~130(120 \pm 10) g, 购自湖南斯莱克景达实验

动物有限公司, 许可证号为 SCXY(湘)2016-002。所有大鼠饲养于湖南中医药大学实验动物中心, 许可证号: SYXK(湘)2013-0005。饲养条件: 室温(22 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度(60 \pm 10)%, 12 h 昼 12 h 夜循环, 灭菌饲料喂养, 自由摄食和饮水。动物实验按照湖南中医药大学动物福利和伦理的原则操作。

1.3 建立右侧股骨干开放性骨折大鼠模型

术前禁食 8 h, 备皮, 根据体重予 1% 戊巴比妥钠(0.1 ml/100 g)腹腔注射麻醉。将大鼠仰卧于无菌操作台, 常规消毒。于右侧大腿外侧纵行切开长约 2 cm 切口, 逐层钝性剥离皮肤及皮下组织。沿着肌肉间隙将前后群肌肉分开, 充分显露右侧股骨干。使用迷你型电磨机沿着股骨干中段横向截断。选用合适大小的克氏针于断端插入并逆行向近端推进, 穿出大转子顶部。断端复位对合, 将克氏针经从近端经过断端向远端推进至股骨髁间位置。持钢丝钳靠股骨大转子顶部剪除多余的克氏针, 折弯尾部并埋入皮下。逐层缝合切口。术后第 1 天, X 线拍照确定造模成功(图 1)。



图 1 大鼠右侧股骨干开放性骨折术后 X 线片显示横向截断股骨干, 从股骨髁间窝逆行插入 1.0 mm 克氏针固定, 尾端折弯埋入皮肤

Fig.1 The postoperative X-ray film of the right femoral shaft open fracture in rats showed that the femoral shaft was transversely truncated, 1.0 mm Kirschner wire was inserted retrogradely from the femoral intercondylar fossa for fixation, and the tail end was bent and embedded into the skin

1.4 桃红四物汤浓缩液制备

1.4.1 药物组成及来源 参照《医宗金鉴》和临床用量,全方生药总量 100 g。组成如下:生地 20 g,当归 20 g,赤芍 20 g,川芎 10 g,桃仁 20 g,红花 10 g。各药材购自湖南中医药大学第一附属医院:生地(河南,NY20011902);当归(甘肃,NG19121701);赤芍(四川,NG19122401);川芎(四川,SL19112207)桃仁(新疆,2019070504);红花(新疆,HY19121803)。

1.4.2 药物煎煮和浓缩 将上 6 味中药饮片按照相应比例配制,共 300 g。将 2 次煎煮后的药液(约 2 000 ml)混匀,双层纱布过滤。置旋转蒸发器中浓缩,最终得到 125 ml 浓缩液(浓度为 2.4 g/ml)。冷却后,移至 4 ℃冰箱,保存备用。

1.5 动物给药剂量

大鼠给药剂量(D,单位 g),由人与动物体表面积(A,单位 m²)换算公式^[6], $D_{\text{大鼠}}=D_{\text{人}}\times A_{\text{大鼠}}/A_{\text{人}}$ 而得。根据 Meeh-Rubner 公式, $A=K\times(W^{2/3})/10\,000$; $W_{\text{大鼠}}=120\text{ g}$, $W_{\text{人}}=70\,000\text{ g}$,K 为系数(大鼠=9.1;人=10.6), $D_{\text{人}}=100\text{ g}$, $A_{\text{大鼠}}/A_{\text{人}}=0.012\,29$, $D_{\text{大鼠}}=100\times 0.012\,29\approx 1.2\text{ g}$ 。成人临床等效剂量为 1.2 g(生药材),以 2 倍梯度设置给药剂量:(1)低剂量=5 g/kg。(2)中剂量=10 g/kg。(3)高剂量=20 g/kg。

1.6 实验动物分组和干预

造模成功后,将开放性股骨干骨折大鼠 32 只,随机分为 4 组:对照组(蒸馏水);低剂量桃红四物汤组(5 g/kg);中剂量桃红四物汤组(10 g/kg);高剂量桃红四物汤组(20 g/kg)。用于 micro-CT 检测。造模成功后,将开放性骨干骨折大鼠 24 只,随机分成 2 组:对照组(蒸馏水),治疗组(20 g/kg)。用于外周血细胞原代培养、免疫组化和蛋白芯片检测。术后第 1 天开始,每天(上午 8:00,下午 5:00)灌胃 2 次,每次灌胃 1 ml,连续灌胃 5 d。

1.7 检测项目与方法

1.7.1 micro-CT 扫描 颈椎脱臼法处死大鼠,取出右侧股骨干并剔除多余肌肉,4%多聚甲醛固定,将骨折标本纵向放置 micro-CT 测试管中,以骨折断端中心上下 5 mm 范围内为感兴趣区域(region of interest,ROI),共得到 161 层轴位片,经高斯滤波后,定义最大灰度阈值 30%区分矿化组织和非矿化组织。根据系统软件分析大鼠股骨骨折处组织体积(tissue volume,TV),骨体积(bone volume,BV),骨体积分数(BV/TV)和骨密度(bone mineral density,BMD)。

1.7.2 外周血间充质干细胞原代培养 真空负压采血管(肝素抗凝管)腹主动脉取血每只约 2 ml,每份血液样本与磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer

saline,PBS)按照 1:1 比例稀释后,经过红细胞裂解液 2 次裂解,离心获得单核细胞^[7]。经 PBS 洗涤 1 次后以完全培养基重悬,置于 37 ℃含 5% CO₂ 的培养箱中孵育,每隔 3 d 更换新的完全培养基,待细胞密度融合 90%后,传代消化,收集 5 代细胞用于实验。

1.7.3 Transwell 实验 取 P5 代细胞用于实验,步骤具体如下:消化细胞后,用无血清培养基调整细胞浓度至 $1\times 10^6/\text{ml}$;小室下层加入 500 μl 含 10% FBS 的完全培养,小室中每孔加入 100 μl;37 ℃、5% CO₂ 培养箱放置 8、16 h;取出小室,用干净湿棉球轻擦上室表面;将甲醇和丙酮等体积混合配成固定液,固定 20 min,将膜取下;0.1%结晶紫染色 5 min,PBS 洗 3~5 次;将膜置于载玻片,膜底面朝上,镜下拍照,各取 6 个视野;将膜置于 10%醋酸 500 μl 浸泡,使脱色;酶标仪 550 nm 处测定吸光度(optical density,OD)。

1.7.4 骨痂处 CD45、CD90、CD29 的免疫组化检测 具体操作方法如下:60 ℃烤片 1~2 h;将切片置于二甲苯中 3 次,每次孵育 20 min,依次放入梯度乙醇(100%、95%、85%、75%)中,每级 5 min,再置入蒸馏水中浸泡 5 min;将切片浸入盛有 0.01 M PBS(pH=6.0)的微波炉,加热并持续 95 ℃作用,15 min 后再置 0.01 M PBS(pH=7.2)中洗涤 3 次,每次 3 min;3% H₂O₂ 阻断 10 min,1% 高碘酸阻断 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;滴加适当稀释的一抗(CD90、CD45、CD29),4 ℃过夜;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴加 100 μl 抗-小鼠、兔、兔-IgG 抗体-HRP 多聚体;37 ℃下孵育 30 min;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,再滴加显色剂 DAB 工作液 80 μl,室温孵育 5 min;蒸馏水洗涤,苏木素复染 5~10 min,蒸馏水冲洗,PBS 返蓝 5 min;依次梯度酒精浸泡(60%~100%)脱水,每次 5 min,再置于二甲苯 2 次,每次 10 min;中性树脂封片,显微镜观察,拍照。

1.7.5 蛋白芯片检测骨痂细胞因子表达 从 -80 ℃冰箱中取出余下骨折标本,以骨折端为中心,长约 5 mm 的标本,将对照组和桃红四物汤高剂量组中 8 只骨标本放置液氮中研磨成粉末状,称重,移入 1.5 ml EP 管。加入蛋白裂解液 PIPA(7 μl/mg)和蛋白酶抑制剂 PMSF(10 μl/1ml),冰浴 30 min,震荡均匀后。4 ℃离心,15 000 r/min,5 min。吸取上清液,移入 0.5 ml EP 管。根据 BCA 法计算蛋白浓度。上清液放置 -80 ℃冰箱中保存备用。具体步骤按照说明书操作。

1.8 统计学处理

采用 Graphpad Prism 7.0 统计软件,定量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t*

检验(双侧检验)或两因素析因设计一元定量资料方差分析, 各组间采用单因素多水平设计一元定量资料方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 影像学 micro-CT 扫描观察桃红四物汤对骨体积和新骨矿化的影响

2.1.1 骨折端 Micro-CT 三维重建图 采用 Micro-CT 对大鼠骨折端进行扫描并建立三维图(见图 2a), 大鼠股骨干骨折后 21 d, 各组骨折断端已部分连接, 断端处稍膨隆。与对照组比较, 桃红四物汤各组大鼠骨折线变窄, 骨痂增加, 其中以桃红四物汤高剂量组最为明显, 大鼠骨折断端骨痂完整连续, 骨折线模糊。

2.1.2 Micro-CT 扫描 BV/TV 和 BMD 结果 BV/TV 和 BMD 参数评估骨折断端骨痂体积和新骨矿化程度。骨体积分数 BV/TV 表示骨组织体积与组织体积比值, 直接反应骨量情况, 测量结果见表 1 和图 2b, 高剂量组骨体积分数明显高于中剂量组 ($P = 0.032$), 且中剂量组明显高于低剂量组 ($P = 0.041$), 低剂量组与对照组之间骨体积分数无明显差异 ($P = 0.651$)。各组 BMD 测量结果见表 1 和图 2c, 从各组间比较来看, 对照组与药物组存在明显差异, 高剂量组显著高于中剂量组 ($P = 0.008$), 中剂量组明显高于低剂量组 ($P = 0.018$), 而低剂量组与对照组无差异 ($P = 0.671$)。桃红四物汤不同浓度对骨痂处骨矿化的

影响与骨体积分数相同, 以高剂量组 BMD 增加显著, 骨矿化程度最高。

表 1 桃红四物汤对骨折大鼠骨痂内 BV/TV 和 BMD 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of Taohong Siwu Decoction (桃红四物汤, THSWD) on BV/TV and BMD in callus of fracture rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BV/TV	BMD(mg/cm ³)
对照组	8	0.51±0.06	500.70±28.21
低剂量组	8	0.54±0.07	526.60±26.75
中剂量组	8	0.62±0.03	598.70±53.43
高剂量组	8	0.70±0.05	678.20±62.72
F 值		19.12	24.52
P 值		0.00	0.00

2.2 骨痂处 CD45⁺, CD90⁺, CD29⁺的免疫组化检测

通过检测骨痂内 MSCs 免疫标记物 CD45、CD90、CD29 的表达, 间接反映骨折断端骨痂部位 MSCs 归巢的数目^[8-10]。桃红四物汤组(3 个干预组)大鼠骨痂内 CD45 表达量低于对照组; 而 CD90 和 CD29 的表达量则相反, 桃红四物汤组大鼠骨痂内明显高于对照组大鼠(见图 3)。由此推测, 桃红四物汤组大鼠骨痂内 CD45⁺、CD90⁺、CD29⁺细胞多于对照组大鼠, 间接表明桃红四物汤可能促进外周血 MSCs

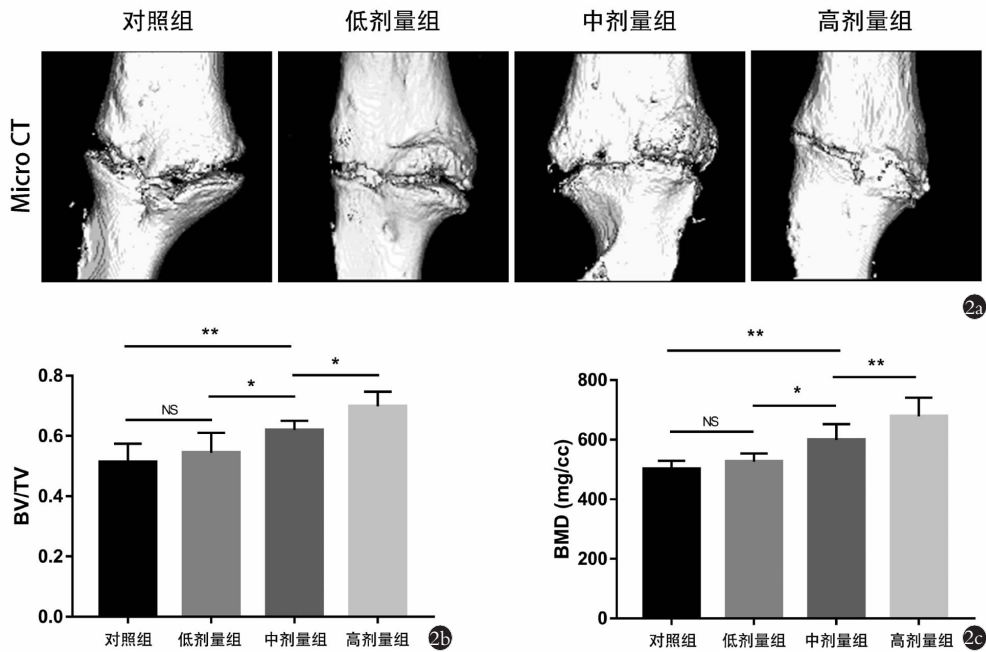


图 2 Micro-CT 检测桃红四物汤对股骨干骨折大鼠骨痂内骨体积分数和骨矿化密度的影响 ($n=8$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, NS 差异无统计学差异) 2a. 三维重建图显示桃红四物汤促进骨折断端骨痂的形成, 且呈剂量依赖性 2b. 骨体积分数 2c. 骨矿化密度

Fig.2 The effects of Taohong Siwu Decoction (桃红四物汤, THSWD) on bone volume fraction and bone mineral density in callus of rats with femoral shaft fracture were detected by micro CT ($n=8$ for all groups; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, NS indicates not significant) 2a. Representative 3D reconstructed micro-CT images showed that THSWD promotes the callus formation in a dose-dependent manner 2b. Bone volume over total tissue volume 1c. Bone mineral density

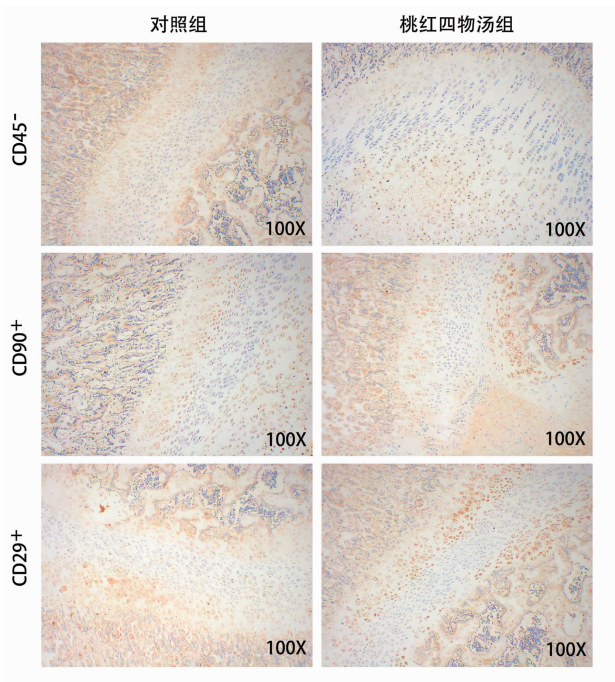


图 3 免疫组化(亲和组织化学法)检测骨折断端 CD45⁻、CD90⁺、CD29⁺的表达(100 倍),阳性为黄色或棕黄色

Fig.3 CD45⁻, CD90⁺, CD29⁺ expression in the marginal zone within callus areas by immunohistochemistry (affinity histochemistry) at ×100 magnification. Yellow or brown represents positive stain

迁移至骨折断端。

2.3 桃红四物汤促进外周血间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)体外迁移

Transwell 小室实验检测外周血 MSCs 趋化能力,桃红四物汤组外周血 MSCs 较对照组的趋化作用明显增强(图 4a)。通过吸光值(optical density, OD)间接计算 MSCs 迁移的数目。桃红四物汤组 OD 值(8 h)为 0.79±0.02,对照组为 0.93±0.02,二者差异显著($t=12.17, P<0.001$);桃红四物汤组 OD 值(16 h)为 0.98±0.01,对照组为 1.30±0.01,二者有显著差异($t=50.74, P<0.001$)(见图 4b 和表 2)。此结果表明,桃红四物汤能显著增强外周血 MSCs 的迁移能力。

2.4 蛋白芯片检测骨痂内细胞因子的差异

蛋白芯片检测骨痂中检测到 13 种细胞因子(见图 5a):中性粒细胞趋化因子-1(cytokine-induced neutrophil chemoattractant -1, CINC-1),中性粒细胞趋化因子-2 α/β (Cytokine-induced neutrophil chemoattractant -2 alpha/beta, CINC-2 α/β),中性粒细胞趋化因子-3(cytokine-induced neutrophil chemoattractants-3, CINC-3),细胞间黏附分子-1(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1),白细胞介素-1(interleukin-1 alpha, IL-1 α),白细胞介素 1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β),CXC 趋化因子 5(lipopo-

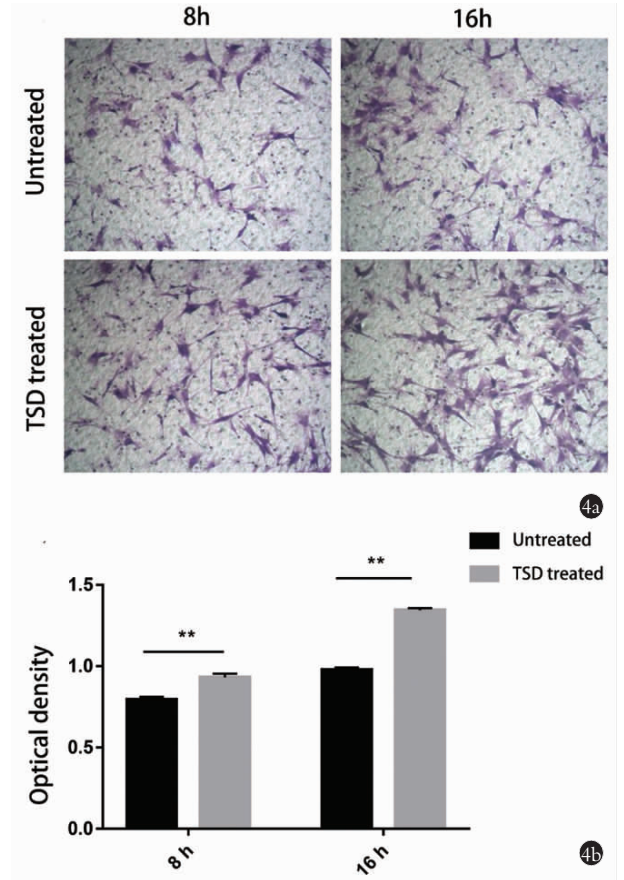


图 4 Transwell 小室检测桃红四物汤对外周血 MSCs 体外趋化作用 4a. 结晶紫染色后的迁移至小室外侧的外周血间充质干细胞(100 倍) 4b. 光密度值表示迁移的细胞数目($n=8, **P<0.01$)

Fig.4 Cell migration assay used to study the migration of peripheral blood MSCs under TSHWD treatment in vitro 4a. Representative images of crystal violet staining of the migrated peripheral blood MSCs on the exterior of the insert at ×100 magnification 4b. The number of migrated cells calculated by optical density($n=6, **P<0.01$)

表 2 黏附于迁移小室底部的外周血 MSCs 经脱色后在 550 nm 波长处的光密度 OD 值($\bar{x}\pm s, \%$)

Tab.2 Optical density at 550 nm after decolorization of peripheral blood MSCs adhering to the bottom of chambers ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	视野	8 h	16 h
对照组	6	0.79±0.02	0.98±0.01
桃红四物汤组	6	0.93±0.02	1.30±0.01
<i>t</i> 值		12.17	50.74
<i>P</i> 值		0.00	0.00

lysaccharide-induced CXC chemokine, LIX), L-选择素(L-selectin), CXC 趋化因子 9(monokine induced by gamma interferon, MIG), CC 趋化因子 5(normal T cell expressed and presumably secreted, RANTES), CXC 趋化因子 7(thymus chemokine), 基质金属蛋白

酶组织抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP-1), 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)。与骨折大鼠相比, 桃红四物汤能促进骨痂内 CINC-1 (2.91 倍)、CINC-3 (1.59 倍)、LIX (1.5 倍)、Thymus Chemokine (2.55 倍) 和 VEGF (1.22 倍) 的表达, 抑制 TIMP-1 (2.98 倍) 的表达 (见图 5b 和表 3)。

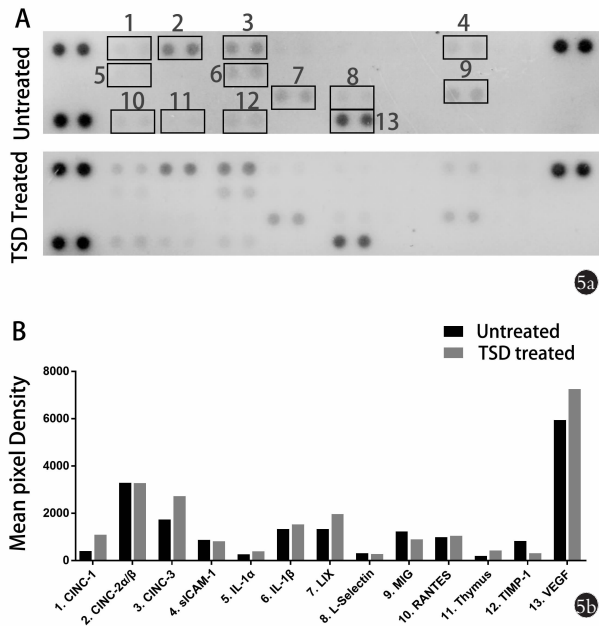


图 5 蛋白芯片检测骨痂内细胞因子的表达 5a. 蛋白芯片结果 5b. 平均灰度值

Fig.5 Protein chip showing the effects of THSWD promotes on cytokines expression in callus areas 5a. Images of protein chip 5b. Mean pixel density

3 讨论

桃红四物汤出自于清代·吴谦所著的《医宗金鉴》, 由桃仁、红花、当归、赤芍、生地黄、川芎 6 味药组成, 主治血瘀之证。骨折早期, 骨断筋伤, 血溢脉外, 离经之血瘀滞于肌肤腠理而致气滞血瘀, 桃红四物汤活血化瘀最为相宜。课题组在临床实践中发现, 骨折早期运用活血化瘀代表方桃红四物汤能明显缩短胫腓骨骨折愈合时间, 提高骨折修复效率^[11]。动物实验也证明, 桃红四物汤早期干预骨折大鼠, 能明显增加骨痂体积, 提高骨矿化密度。对于桃红四物汤促进骨折愈合的作用, 已有研究者从改善血流变、增加相关因子分泌等方面解释^[12]; 但是, 其影响骨折愈合的关键因素并没有发现^[13]。干细胞具有自我更新和分化潜能的细胞, 不仅能向多种组织细胞分化, 而且具有明显的迁移能力, 通过静脉移植或局部注射骨髓间充质干细胞治疗骨科疾病获益良多, 已引起广泛关注^[14]。本研究发现, 桃红四物汤能增强外周血

表 3 蛋白芯片检测骨折早期骨痂内细胞因子的表达 ($\bar{x} \pm s$, pixel)

Tab.3 Level of cytokines expression in callus areas in early stage by using protein chip ($\bar{x} \pm s$, pixel)

细胞因子	孔数	灰度值	
		对照组	桃红四物汤组
CINC-1	2	355.0±26.9	1 034.0±46.7
CINC-2α/β	2	3 240.0±268.7	3 218.0±414.4
sICAM-1	2	823.0±46.7	771.0±86.3
IL-1α	2	216.0±35.4	337.0±39.6
IL-1β	2	1 288.0±152.7	1 478.0±121.6
LIX	2	1 283.0±188.1	1 916.0±148.5
L-Selectin	2	261.0±48.1	230.0±39.6
MIG	2	1 183.0±157.0	844.0±171.1
RANTES	2	942.0±75.0	989.0±137.2
Thymus	2	145.0±46.7	370.0±33.9
TIMP-1	2	779.0±125.9	261.0±72.1
VEGF	2	5 889.0±889.5	7 204.0±350.7

注: 各组骨标本 (n=8) 提取总蛋白, 设置一复孔计算均数和标准差
Note: total protein was extracted from bone samples of each group (n=8), and a multiple well was set to calculate the mean and standard deviation

MSCs 迁移能力, 增加早期骨痂内 MSCs 归巢数目。有研究证明^[15-16], 骨折部位 MSCs 归巢的数量与成骨能力、骨痂新生成正比。MSCs 归巢数目的增加将为骨折断端提供充足的干细胞, 促进骨组织再生。

MSCs 的归巢受到外身生物学行为改变和骨折断端局部微环境变化的共同影响^[17-18]。骨折早期断端血肿中基质成分、细胞因子浓度、pH 值、氧分压等局部环境均能影响 MSCs 的迁移^[19-20], 骨痂内细胞因子产生的趋化性在 MSCs 迁移过程中发挥着重要作用^[21]。采用蛋白芯片检测骨痂中细胞因子表达 (29 种), 发现骨痂内 (骨折后 5 d) 表达 CINC-1、CINC-2α/β、CINC-3、sICAM-1、IL-1α、IL-1β、LIX、L-selectin、MIG、RANTES、Thymus Chemokine、TIMP-1、VEGF 等 13 种细胞因子。与骨折大鼠骨痂相比, 桃红四物汤能促进骨痂内 CINC-1 (2.91 倍)、CINC-3 (1.59 倍)、LIX (1.5 倍)、Thymus Chemokine (2.55 倍) 和 VEGF (1.22 倍) 表达, 抑制 TIMP-1 (2.98 倍) 表达。

CINC-1 (CXCL1) 和 CINC-3 (CXCL3) 为 CXC 家族的趋化因子, 对中性粒细胞具有强大趋化作用。研究证明 CINC-1 能与 MSCs 膜 CXCR1 受体结合促进 MSCs 迁移^[22]。LIX (CXCL5) 已被证实能促进 MSCs 的成骨分化和迁移^[23]。有研究者通过 Thymus Chemokine (CXCL7) 干预 MSCs 后, 发现 CXCL7 能与 MSCs 膜上趋化因子受体 CXCR2 结合而促进其趋化

性迁移^[24]。桃红四物汤能通过促进骨痂内 CXC 家族趋化因子(CXCL1、CXCL3 和 CXCL7)因子的表达,增加外周血与骨痂内的化学梯度,趋化外周血 MSCs 归巢至骨折断端。VEGF 是一种是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,常在损伤修复过程中显著增高^[25]。有研究证明^[26-27],VEGF 能活化 MSCs 胞内 FAK 和桩蛋白(Paxillin)酪氨酸位点磷酸化水平,促进黏着斑和应力纤维的形成,增强 MSCs 迁移能力,研究发现,桃红四物汤干预的骨折大鼠骨痂内 VEGF 表达增加,桃红四物汤可能促进 VEGF 的表达促进 MSCs 的归巢。金属蛋白酶组织抑制(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs),是一类能抑制 MMPs 活性的天然蛋白酶抑制剂,它能与 MMPs 结合抑制 MMP 的活性,从而阻碍 MMPs 介导的细胞迁移和细胞外基质的降解。TIMP-1 为 TIMPs 中第一个被发现的蛋白酶抑制剂,它能抑制 MMP-2、MMP-9 等蛋白酶降解^[24]。研究发现,桃红四物汤干预大鼠骨痂内 TIMP-1 的表达较未干预组明显降低,从而抑制 TIMP-1 对 MMP9 和 MMP2 蛋白的降解,增强其对血管内皮细胞基膜和骨基质的降解,促进 MSCs 的归巢^[28]。

总之,活血化瘀基本方桃红四物汤能促进外周血 MSCs 归巢至骨折断端,为加速骨折愈合提供充足的干细胞。桃红四物汤促进外周血 MSCs 归巢的机制可能与增强外周血 MSCs 迁移能力和上调骨痂中 CINC -1、CINC -3、LIX、Thymus Chemokine、VEGF,下调 TIMP-1 表达有关。

参考文献

- [1] 张俐,周海兵,刘烈刚. 活血化瘀汤影响骨折愈合早期一氧化氮合酶活性的作用机制探讨[J]. 中国骨伤,2005,18(2):33-36. ZHANG L,ZHOU HB,LIU LG. Enzymatic activities of nitric oxide synthase during fracture healing with *Huoxue Huayu* Decoction(活血化瘀汤)[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2005,18(2):33-36. Chinese with abstract in English.
- [2] 张俐,杨宗宇. 活血化瘀汤对大鼠骨折愈合过程中血清骨钙素和 I 型胶原表达的影响[J]. 中国骨伤,2007,20(8):527-528. ZHANG L,YANG ZY. Effect of *Huoxue Huayu* Decoction (活血化瘀汤) on expression of bone gamma carboxyglutamate protein and Collagen I in rat fracture healing[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2007,20(8):527-528. Chinese with abstract in English.
- [3] Su P,Tian Y,Yang C, et al. Mesenchymal stem cell migration during bone formation and bone diseases therapy[J]. Int J Mol Sci,2018,19(8):2343.
- [4] Bahney CS,Zondervan RL,Allison P, et al. Cellular biology of fracture healing[J]. J Orthop Res,2019,37(1):35-50.
- [5] Lin W,Xu L,Zwigenberger S, et al. Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing[J]. J Orthop Translat,2017,9:19-27.
- [6] 章元冲. 药理学实验[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996:236-238.
- [7] 张继英,刘刚,马栋,等. Sprague-Dawley 大鼠外周血来源间充质干细胞的动员、分离培养及鉴定[J]. 中国运动医学杂志,2012,31(9):811-816. ZHANG JY,LIU G,MA D, et al. Mobilization, culture, isolation and identification of mesenchymal stem cells form peripheral blood of Sprague-Dawley rats[J]. Zhongguo Yun Dong Yi Xue Za Zhi,2012,31(9):811-816. Chinese.
- [8] Maerz T,Fleischer M,Newton MD, et al. Acute mobilization and migration of bone marrow-derived stem cells following anterior cruciate ligament rupture[J]. Osteoarthritis Cartilage,2017,25(8):1335-1344.
- [9] Zhang Y,An S,Hao J, et al. Systemic injection of substance P promotes murine calvarial repair through mobilizing endogenous mesenchymal stem cells[J]. Sci Rep,2018,8(1):12996.
- [10] 何秀华,李东良,江军,等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养及示踪优化[J]. 解放军医学杂志,2011,36(2):137-140. HE XH,LI DL,JIANG J, et al. Culture and optimized tracing of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Jie Fang Jun Yi Xue Za Zhi,2011,36(2):137-140. Chinese.
- [11] 熊辉. 桃红四物汤治疗胫腓骨干骨折的疗效观察[J]. 湖南中医药导报,2001,(5):239-240. XIONG H. Curative effect observation of tibia-fibula shaft fracture with *Taohong Siwu* decoction[J]. Hu Nan Zhong Yi Yao Dao Bao,2001,(5):239-240. Chinese.
- [12] 许世超,陈荣良. 桃红四物汤在骨伤科中的研究及临床应用[J]. 中国中医骨伤科杂志,2011,19(11):77-78. XU SC,CHEN RL. Research and clinical application of *Taohong Siwu* Decoction in orthopedics and traumatology[J]. Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi,2011,19(11):77-78. Chinese.
- [13] 李秀秀,金中义,金福厚. 桃红四物汤促进骨折愈合的实验研究进展[J]. 云南中医中药杂志,2015,36(10):79-81. LI XX,JIN ZY,JIN FH. Progress of experimental study on the promotion of fracture healing by *Taohong Siwu* Decoction[J]. Yun Nan Zhong Yi Zhong Yao Za Zhi,2015,36(10):79-81. Chinese.
- [14] Organ A,Kamali A,Meshiri A, et al. Role of mesenchymal stem Cells in bone regenerative medicine:What is the evidence [J]. Cells Tissues Organs,2017,204(2):59-83.
- [15] Safarova Y,Umbayev B,Hortelano G, et al. Mesenchymal stem cells modifications for enhanced bone targeting and bone regeneration[J]. Regen Med,2020,15(4):1579-1594.
- [16] Xu J,Chen Y,Liu Y, et al. Effect of SDF-1/Cxcr4 signaling antagonist AMD3100 on bone mineralization in distraction osteogenesis[J]. Calcif Tissue Int,2017,100(6):641-652.
- [17] 李汪洋,熊辉. 间充质干细胞归巢及其在骨科疾病中的研究[J]. 中国骨伤,2020,33(7):689-692. LI WY,XIONG H. Study on MSCs homing and its research on osteodiseases[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2020,33(7):689-692. Chinese with abstract in English.
- [18] Kallmeyer K,Pepper MS. Homing properties of mesenchymal stromal cells[J]. Expert Opin Biol Ther,2015,15(4):477-479.
- [19] Hoff P,Gaber T,Strehl C, et al. Immunological characterization of the early human fracture hematoma[J]. Immunol Res,2016,64(5-6):1195-1206.
- [20] Pennings S,Liu KJ,Qian H. The stem cell niche:Interactions be-

- tween stem cells and their environment [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018:4879379.
- [21] Hocking AM. The role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to wounds [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2015, 4 (11):623-630.
- [22] Pu Y, Wang M, Hong Y, et al. Adiponectin promotes human jaw bone marrow mesenchymal stem cell chemotaxis via CXCL1 and CXCL8 [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21 (7):1411-1419.
- [23] Nedeau AE, Bauer RJ, Gallagher K, et al. A CXCL5-and bFGF-dependent effect of PDGF-B-activated fibroblasts in promoting trafficking and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314 (11-12):2176-2186.
- [24] Kalwitz G, Endres M, Neumann K, et al. Gene expression profile of adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells stimulated by the chemokine CXCL7 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41 (3):649-658.
- [25] Wang X, Fu X, Zhao S, et al. Antiangiogenic properties of caudatin in vitro and in vivo by suppression of VEGF/VEGFR2/AKT/FAK signal axis [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (6):8937-8943.
- [26] Wang H, Wang X, Qu J, et al. VEGF enhances the migration of MSCs in neural differentiation by regulating focal adhesion turnover [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230 (11):2728-2742.
- [27] Zhang W, Zhu C, Wu Y, et al. VEGF and BMP-2 promote bone regeneration by facilitating bone marrow stem cell homing and differentiation [J]. *Eur Cell Mater*, 2014, 27:1-11.
- [28] Grunwald B, Schoeps B, Kruger A. Recognizing the molecular multifunctionality and interactome of TIMP-1 [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29 (1):6-19.

(收稿日期:2021-06-19 本文编辑:王玉蔓)

· 综述 ·

自噬在骨骼肌质量维持中的作用

刘阿英, 张全兵, 周云, 王锋

(安徽医科大学第二附属医院康复医学科, 安徽 合肥 230601)

【摘要】 作为人体重要的运动和能量代谢器官, 骨骼肌质量的正常维持对于机体发挥正常的生理功能至关重要。自噬-溶酶体 (autophagy-lysosome, AL) 途径是一种在正常和病态细胞中普遍存在的生理或病理机制, 对于维持细胞内蛋白质平衡, 清除细胞内受损的细胞器, 及维持内环境稳定起到关键作用。自噬过程的顺利进行需要经历多个步骤, 在多重因子的协调作用下完成。自噬通过清除受损的肌原纤维和隔离的胞浆蛋白等细胞成分来维持健康机体的肌肉内稳态。自噬还可以提供细胞增殖所需的初始能量, 促进损伤后肌肉的再生和重塑。同时, 自噬失调也是导致年龄相关性骨骼肌萎缩的一个重要诱因。自噬可以影响骨骼肌对运动的反应, 增加基础自噬水平有利于提高骨骼肌对运动的适应性。本文将自噬在骨骼肌质量维持中的作用与通路进行总结, 以便为临床预防和治疗肌萎缩提供有效的康复策略。

【关键词】 骨骼肌; 肌萎缩; 自噬; 溶酶体

中图分类号: R337.1

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2022.04.015

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Role of autophagy in the maintenance of skeletal muscle mass LIU A -ying, ZHANG Quan -bing, ZHOU Yun *, and WANG Feng. Department of Rehabilitation Medicine, the Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, Anhui, China

ABSTRACT As an important exercise and energy metabolism organ of the human body, the normal maintenance of skeletal muscle mass is essential for the body to perform normal physiological functions. The autophagy-lysosome (AL) pathway is a physiological or pathological mechanism that is ubiquitous in normal and diseased cells. It plays a key role in the maintaining of protein balance, removing damaged organelles, and the stability of internal environment. The smooth progress of the autophagy process needs to go through multiple steps, which are completed under the coordinated action of multiple factors. Autophagy maintains the muscle homeostasis of a healthy body by removing cell components such as damaged myofibrils and isolated cytoplasmic proteins. Autophagy could also provide the initial energy required for cell proliferation, promote muscle regeneration

基金项目: 安徽医科大学转化医学研究生培养改革试点项目 (编号: 9101118101); 安徽省重点研发计划项目 (编号: 201904a07020067)

Fund program: Anhui Medical University Translational Medicine Postgraduate Training Reform Pilot Project (No.9101118101)

通讯作者: 周云 E-mail: zhoukeg@163.com

Corresponding author: ZHOU Yun E-mail: zhoukeg@163.com