

# 股骨头坏死愈胶囊含药血清 对大鼠骨髓间充质干细胞凋亡的保护作用

谭旭仪<sup>1</sup>, 李刚<sup>1</sup>, 高书图<sup>2\*</sup>, 程春生<sup>2</sup>, 刘立云<sup>2</sup>, 李书良<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 河南省洛阳正骨医院, 河南 洛阳 471000)

**[摘要]** **目的:**观察股骨头坏死愈胶囊含药血清对体外大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)凋亡的保护作用。**方法:**在体外分离、筛选、培养大鼠 BMSCs 细胞,制备 0.36, 0.72, 1.44 g·kg<sup>-1</sup>灌胃处理得到的股骨头坏死愈胶囊含药血清作用后,选择第3代大鼠 BMSCs,实验分为空白组(加入不含大鼠血清的培养液),正常组(加入体积分数为20%正常大鼠血清培养液),模型组(加入体积分数为20%正常大鼠血清培养液和全反式维甲酸诱导细胞凋亡)和中药血清低、中、高剂量组(培养过程中分别加入对应剂量、体积分数为20%的股骨头坏死愈胶囊含药血清培养液和全反式维甲酸诱导细胞凋亡),共6组,MTT法检测各组细胞相对存活率,流式细胞仪检测各组细胞周期,进行比较。**结果:**与正常组比较,模型组,中药血清低、中、高剂量组相对存活率下降,细胞周期中G<sub>1</sub>期比例上升,G<sub>2</sub>及S期比例下降,差异有显著性意义(P<0.01)。与模型组比较,中药血清低、中、高剂量组相对存活率上升,G<sub>1</sub>期比例减少,G<sub>2</sub>及S期比例增加,且随着中药剂量增加而差值明显,差异有显著性意义(P<0.01)。**结论:**股骨头坏死愈胶囊含药血清可提高大鼠 BMSCs 的存活率,对全反式维甲酸所致的细胞凋亡有保护作用。

**[关键词]** 股骨头坏死愈胶囊; 骨髓间充质干细胞; 凋亡; 股骨头坏死

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0146-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2015030146

**Protective Effect of Gugutou Huaisiyu Capsule Containing Serum on Apoptosis in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells** TAN Xu-yi<sup>1</sup>, LI Gang<sup>1</sup>, GAO Shu-tu<sup>2\*</sup>, CHENG Chun-sheng<sup>2</sup>, LIU Li-yun<sup>2</sup>, LI Shu-liang<sup>1</sup> (1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Luoyang Orthopedics Hospital of Henan Province, Luoyang 471000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe protective effect of Gugutou Huaisiyu capsule containing serum on apoptosis in rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Method:** The BMSCs were separated, filtrated, cultured, and high, medium and low dose Gugutou Huaisiyu capsule containing serum had harvested from mice under 0.36, 0.72, 1.44 g·kg<sup>-1</sup> Gugutou Huaisiyu capsule gavaged, the third generation BMSCs were chose and divided into blank group (no rat serum in culture medium), normal group (with volume fraction of 20% normal rat serum in culture medium), induction apoptosis group (with volume fraction of 20% normal rat serum and all-trans retinoic acid in culture medium) and traditional Chinese medicine serum low, medium and high dose group (with volume fraction of 20% Gugutou Huaisiyu capsule containing serum of low, medium and high dose respectively, and all-trans retinoic acid in culture medium), a total of six groups. Then cell relative survival rate and cell cycle were detected by MTT method and flow cytometry, respectively. **Result:** Compared with normal group, the cell relative survival rate of induction apoptosis group, traditional Chinese medicine containing serum low, medium and high dose groups was increased, and G<sub>1</sub> phase increased, G<sub>2</sub> and S phase proportion, the differences were statistically significant (P<0.01). Compared to the induction apoptosis group, the cell relative survival rate in traditional Chinese medicine containing serum low, medium and high dose groups was declined, while the G<sub>1</sub> phase ratio decreases, G<sub>2</sub> and S phase proportion increase, and the difference increased obviously as the dosage increased, the differences were statistically significant (P<0.01). **Conclusion:** Gugutou Huaisiyu

**[收稿日期]** 20140721(012)

**[基金项目]** 湖南省研究生科研创新基金项目(CX2013B325);河南省公益类科研院所预研计划项目(09yy0067)

**[第一作者]** 谭旭仪,博士,从事中医疗治髋部疾病, Tel:18736316163, E-mail:364539128@qq.com

**[通讯作者]** \*高书图,主任医师,博士研究生导师, Tel:0379-63546505, E-mail:tcn\_gst@163.com

capsule containing serum could improve the survival rate of rat BMSCs, and have protective effect on apoptosis induced by all-trans retinoic acid.

**[Key words]** Gugutou Huaisiyu capsule; bone marrow mesenchymal stem cells; apoptosis; osteonecrosis of the femoral head

股骨头坏死愈胶囊系河南省洛阳正骨医院院内制剂,由鹿茸、杜仲、续断等药物组成,功效为补益肝肾、益气活血、温通经络,临床上常用于股骨头缺血性坏死的防治<sup>[1]</sup>。前期实验研究发现该药能增加股骨头局部组织血管内皮生长因子表达,改善股骨头内微循环,促进骨小梁再生与修复从而达到防治股骨头缺血性坏死的发生和发展<sup>[2-3]</sup>。本实验拟观察股骨头坏死愈胶囊含药血清对体外大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)细胞凋亡的保护作用,进一步探讨其对股骨头坏死的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 10周龄清洁级SD大鼠,雌雄各半,体重约200~250g,共20只;4周龄雄性清洁级SD大鼠3只,由河南省洛阳正骨医院组织工程实验室代购,动物合格证号SCXK(鄂)2010-0007。

**1.2 药物与试剂** 股骨头坏死愈胶囊由鹿茸2g,续断10g,杜仲10g,丹参20g,鸡血藤15g,乳香10g,没药10g,水蛭(制)5g,连翘10g,黄芪15g组成(河南洛阳正骨医院,批号20130612),全反式维甲酸(美国Sigma公司,批号20121013),胎牛血清(Gibco公司,批号10099-141),DMEM/F12培养基(Gibco公司,批号12660-018)。

**1.3 仪器** HF160W型CO<sub>2</sub>培养箱(中国力康公司),FACS Calibur型流式细胞仪(美国,BD),IX81型倒置荧光显微镜(日本,奥林巴斯公司),BBS-DSC型超净工作台(巴艾贝斯公司)。

## 2 方法

**2.1 血清及培养液制备** 10周龄清洁级SD大鼠20只,按体重顺序编号,采用随机数字表法分为正常血清组、股骨头坏死愈胶囊低、中、高剂量血清组,每组5只。参考文献[4]中人鼠用药量及体表面积计算得出SD大鼠的等效剂量为0.18 mg·g<sup>-1</sup>,股骨头坏死愈胶囊低、中、高剂量血清组分别以人体2,4,8倍等效剂量(即0.36,0.72,1.44 g·kg<sup>-1</sup>)进行灌胃,正常血清组则给予等体积生理盐水灌胃,2次/d,连续给药7d,第8天清晨1次灌服全天剂量,1h后用体积分数10%水合氯醛麻醉,无菌条件下腹主动脉采集血液后在3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min后,分别制备股

骨头坏死愈胶囊低、中、高剂量含药血清及正常大鼠血清,同一组别大鼠血清合并。制备后在56℃恒温水浴中灭活30 min,-20℃冰箱保存备用。用含双抗(1×10<sup>5</sup> U·L<sup>-1</sup>青霉素,100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素)的DMEM/F12培养基对获得的血清进行稀释,配成血清体积分数为20%的培养液,临用时再次过滤除菌。

**2.2 体外大鼠BMSCs的分离与培养** 参照文献[5]中方法进行。取4周龄清洁级SD大鼠3只,雄性,脱颈处死后,经体积分数75%乙醇浸泡5 min,无菌棉垫拭干后在超净工作台中取出大鼠双侧后肢胫骨和股骨,并剔除附着的肌肉、骨膜等,减去两端骨髓。用5 mL一次性注射器从骨的一端插入,含肝素钠500 U·mL<sup>-1</sup>的DMEM/F12培养液冲出骨髓,直至冲出的液体发白为止,收集并加入磷酸缓冲液(PBS)1 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min后洗涤,加入10%胎牛血清DMEM/F12培养基,移液器吹打成单细胞混悬液,接种于25 cm<sup>2</sup>培养皿中,37℃,5% CO<sub>2</sub>,95%湿度的培养箱中培养,每天观察生长情况,每隔3 d进行全量换液。

**2.3 大鼠BMSCs传代培养** 原代细胞培养12 d,弃培养液,PBS液洗涤2遍后加入0.25%胰蛋白酶联合0.02% EDTA消化液2 mL,放置3~5 min,显微镜下观察,待细胞形态开始皱缩变圆时加入10%胎牛血清DMEM/F12培养基终止消化,吹打成细胞混悬液,1 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min后弃上清液,加入10%胎牛血清DMEM/F12培养基吹打均匀,以5×10<sup>4</sup>个/mL的密度接种到25 cm<sup>2</sup>培养皿中,每瓶接种5 mL,完成1次传代培养。

**2.4 实验分组和干预** 选择第3代大鼠BMSCs,分为空白组,正常组,模型组和中药血清低、中、高剂量组。空白组在培养过程中加入不含大鼠血清的培养液,正常组在培养过程中加入20%的正常大鼠血清培养液,模型组加入体积分数为20%的正常大鼠血清和1×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>全反式维甲酸100 μL诱导细胞凋亡。中药血清低、中、高剂量组培养过程中分别加入对应剂量20%的股骨头坏死愈胶囊含药血清和1×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>全反式维甲酸100 μL。

**2.5 观察指标及方法**

**2.5.1 大鼠BMSCs相对存活率** 分组后的大鼠

BMSCs 按  $3 \times 10^4$  个/mL 接种于 48 孔培养板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 各组设 6 个复孔。在 37  $^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  和 95% 湿度条件下, 各组进行对应血清和实验干预。培养 48 h 后每孔加入 0.5% MTT ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 溶液 20  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h 终止培养, 经 1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 后弃上清液, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的二甲基亚砷 (DMSO), 摇床振荡 10 min, 用酶标仪测定 490 nm 处吸光度 ( $A_{490}$ ), 参照以下公式计算各组细胞相对存活率<sup>[5]</sup>。

细胞相对存活率 = 试验组  $A$  / 空白组  $A \times 100\%$

**2.5.2 大鼠 BMSCs 细胞周期** 分组后的大鼠 BMSCs 按  $3 \times 10^4$  个/mL 接种于 48 孔培养板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 各组设 6 个复孔, 并在 1.4.1 条件下和对应血清和实验干预, 培养 48 h 后收集细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后弃上清液。加入 70% 乙醇固定液, 放置 4  $^\circ\text{C}$  条件过夜, 1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 去除乙醇。PBS 洗涤 1 次后, 加入 100  $\mu\text{L}$  RNAase 酶, 37  $^\circ\text{C}$  反应 30 min, 之后加入 400  $\mu\text{L}$  碘化丙啶染液, 混匀, 在 4  $^\circ\text{C}$  条件下染色 30 min, 采用流式细胞仪, 检测各组细胞周期, 测定各期所占细胞总体的百分数。

**2.6 统计学方法** 研究中采用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析, 检测结果以  $\bar{x} \pm s$  形式描述, 若满足方差齐性和正态齐性时, 组间比较采用单因素方差分析, 不符合时选择非参数检验, 以  $P < 0.01$  为差异有显著性意义。

表 2 股骨头坏死愈胶囊 20% 含药血清对大鼠 BMSCs 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Impact of 20% medicated serum of Gugutou Huaisiyu capsule on cell cycle rat BMSCs ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	G <sub>1</sub> 期/%	G <sub>2</sub> 期/%	S 期/%
空白	-	53.10 $\pm$ 2.04 <sup>1)</sup>	14.33 $\pm$ 1.73 <sup>1)</sup>	32.57 $\pm$ 1.84 <sup>1)</sup>
20% 正常血清	-	44.93 $\pm$ 2.36	17.92 $\pm$ 2.12	37.15 $\pm$ 2.73
模型	-	85.51 $\pm$ 2.41 <sup>1)</sup>	5.51 $\pm$ 1.42 <sup>1)</sup>	8.98 $\pm$ 3.16 <sup>1)</sup>
股骨头坏死愈胶囊 20% 血清	0.36	71.92 $\pm$ 2.58 <sup>1,2)</sup>	8.82 $\pm$ 1.01 <sup>1,2)</sup>	19.26 $\pm$ 2.42 <sup>1,2)</sup>
	0.72	64.27 $\pm$ 2.19 <sup>1,2,3)</sup>	10.83 $\pm$ 1.73 <sup>1,2,3)</sup>	24.90 $\pm$ 1.97 <sup>1,2,3)</sup>
	1.44	54.76 $\pm$ 2.07 <sup>1,2,3)</sup>	14.41 $\pm$ 1.29 <sup>1,2,3)</sup>	30.83 $\pm$ 1.22 <sup>1,2,3)</sup>

注: 与正常血清组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与股骨头坏死愈胶囊血清低剂量组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

BMSCs 系骨髓中的成体干细胞家族中一员, 具有多向分化的潜能, 如可在不同诱导条件下分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等。BMSCs 来源充足, 取材方便, 适合于体外培养, 是目前组织工程研

#### 3 结果

**3.1 各组大鼠 BMSCs 相对存活率比较** 与空白组、正常血清组比较, 模型组细胞相对存活率下降, 差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 中药血清低、中、高剂量组相对存活率随着剂量增加而上升, 差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 股骨头坏死愈胶囊 20% 含药血清对大鼠 BMSCs 相对存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Impact of 20% medicated serum of Gugutou Huaisiyu capsule on relative survival rate rat BMSCs ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	相对存活率/%
空白	-	100 $\pm$ 0.0
20% 正常血清	-	110.33 $\pm$ 1.86 <sup>1)</sup>
模型	-	63.74 $\pm$ 1.35 <sup>1,2)</sup>
20% 股骨头坏死愈胶囊血清	0.36	71.52 $\pm$ 1.72 <sup>1,2,3)</sup>
	0.72	80.63 $\pm$ 1.99 <sup>1,2,3,4)</sup>
	1.44	96.30 $\pm$ 1.97 <sup>1,2,3,4)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与正常血清组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; 与股骨头坏死愈胶囊血清低剂量组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 各组大鼠 BMSCs 细胞周期比较** 与正常血清组比较, 模型组大鼠 BMSCs 细胞周期中 G<sub>1</sub> 期比例上升, G<sub>2</sub> 及 S 期比例下降, 差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 中药血清低、中、高剂量组中大鼠 BMSCs 细胞周期中 G<sub>1</sub> 期比例减少, G<sub>2</sub> 及 S 期比例增加, 且随着中药剂量增加而差值明显, 差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

究最多的种子细胞<sup>[6]</sup>。诸多研究表明, 在股骨头缺血性坏死患者中 BMSCs 数目下降, 活力降低, 并认为股骨头缺血性坏死、塌陷与 BMSCs 有着密切关系, 近年来有学者采用 BMSCs 移植治疗股骨头缺血性坏死, 取得较好的疗效<sup>[7-8]</sup>。

近年来,随着组织工程技术的兴起和日趋成熟,相关实验报道亦日益增多。研究中多结合中药血清药理学方法,制备药物血清,代表该药物在体内产生作用的真正有效成分,可控性强,特别适合中药复方成分复杂的特点<sup>[9]</sup>。笔者临床发现本院制剂对股骨头坏死有较好的疗效,本研究拟股骨头坏死愈胶囊含药血清对体外大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)凋亡的保护作用,拟从组织工程角度进一步探讨其相关作用机制。

细胞周期中G<sub>1</sub>期为DNA和蛋白质合成的准备阶段,G<sub>2</sub>期为DNA合成后期,是有丝分裂的准备期,在这一时期,DNA合成终止,大量合成RNA及蛋白质,包括微管蛋白和促成熟因子等。DNA复制和组蛋白的合成在S期完成。已有研究证实,经全反式维甲酸处理后,可导致大量凋亡细胞出现,细胞周期检测发现,大量细胞停留在G<sub>1</sub>期,阻滞细胞进入S期,S期比例明显减少<sup>[10]</sup>,这与本研究中模型组经全反式维甲酸处理后的检测结果一致。

本研究结果表明,经股骨头坏死愈胶囊低、中、高剂量血清干预后,大鼠BMSCs相对存活率较模型组明显上升,细胞周期检测发现,中药血清低、中、高剂量组G<sub>1</sub>期比例减少,G<sub>2</sub>及S期比例增加,且随着中药剂量增加而差值明显,差异有显著性意义( $P < 0.01$ ),表明股骨头坏死愈胶囊血清可有效提高大鼠BMSCs的存活率,促使大鼠BMSCs细胞进入S期,促进细胞有丝分裂,抑制细胞凋亡,对全反式维甲酸所致的细胞凋亡有保护作用,这可能为其治疗股骨头坏死的作用机制之一。但股骨头坏死愈胶囊通过何种信号传导通路促进BMSCs增殖和分化,有待下一步继续研究。

#### [参考文献]

- [1] 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.
- [2] 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):99-104.
- [3] 段卫峰,高书图,刘又文. 股骨头坏死愈胶囊对兔激素性股骨头坏死血管内皮生长因子表达影响的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志,2012,7(11):944-947.
- [4] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:1698.
- [5] 章静波. 组织和细胞培养技术[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2011:106,184.
- [6] 丁幸坡,金先庆,王智勇,等. 纳米载体介导人胰岛素样生长因子1基因转染兔骨髓间充质干细胞及其表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(6):1035-1038.
- [7] 宋奕,丁道芳,李玲慧,等. 细胞凋亡在激素性股骨头坏死机制中的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志,2013,21(21):2163-2165.
- [8] Kong X Y, Wang R T, Tian N, et al. Effect of Huogu II formula (II) with medicinal guide Radix Achyranthis Bidentatae on bone marrow stem cells directional homing to necrosis area after osteonecrosis of the femoral head in rabbit [J]. Chin J Integr Med,2012,18(10):761-768.
- [9] 李玲慧,詹红生,丁道芳,等. 左归丸、右归丸含药血清对大鼠脂肪干细胞成骨分化的影响[J]. 中医杂志,2013,54(22):1941-1944.
- [10] 李楠,王和鸣,林旭,等. 补骨合剂对全反式维甲酸诱导的骨髓基质细胞凋亡的保护作用[J]. 中西医结合学报,2004,2(5):367-371.

[责任编辑 聂淑琴]