

本文引用: 曾 朋, 陆小龙, 徐无忌, 向黎黎, 李汪洋, 熊 辉. 桃红四物汤诱导间充质干细胞动员促进骨折修复的机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2163-2170.

桃红四物汤诱导间充质干细胞动员促进骨折修复的机制

曾 朋¹, 陆小龙¹, 徐无忌¹, 向黎黎¹, 李汪洋^{1*}, 熊 辉^{2*}

1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 探讨桃红四物汤(Taohong Siwu Decoction, THSWD)在骨折早期对骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)动员的影响。**方法** 将24只SPF级雄性SD大鼠随机分为正常组、骨折组及药物组,每组8只。除正常组外,其余两组大鼠予右侧股骨干开放性骨折术造模。造模成功术后第1天,药物组大鼠予20 g/(kg·d)THSWD灌胃,正常组与骨折组的大鼠予等量蒸馏水。早、晚各1次,连续灌胃5 d。采用流式细胞术检测外周血CD45⁺CD90⁺CD29⁺单核细胞数目;通过流式细胞术进行表面标志物鉴定,镜下观察细胞形态,茜素红染色法、油红O染色法分别观察细胞成骨、成脂分化,以此鉴定外周血MSC来源;蛋白芯片检测骨折早期细胞因子的表达。**结果** 与正常组比较,骨折组大鼠外周血MSC绝对细胞数目、相对细胞数目增高($P<0.05$),药物组外周血MSC绝对细胞数目、相对细胞数目显著增高($P<0.01$);与骨折组比较,药物组大鼠外周血MSC绝对细胞数目、相对细胞数目增高($P<0.05$)。通过流式细胞术分析发现:THSWD干预大鼠骨髓来源的细胞中CD45⁺、CD90⁺、CD29⁺比例和CD45⁺中CD90⁺CD29⁺细胞比例分别为90.94%、98.57%、92.27%和94.15%;而THSWD干预的外周血来源的细胞CD45⁺、CD90⁺、CD29⁺比例和CD45⁺中CD90⁺CD29⁺细胞比例分别为90.59%、98.21%、92.03%和93.52%。通过镜下观察细胞形态,外周血MSC较骨髓MSC生长周期明显延长,细胞克隆数明显减少;细胞形态基本无明显区别;经过成骨成脂诱导后,茜素红和油红O染色发现,外周血MSC和骨髓MSC都能向成骨、成脂肪方向分化。与正常组比较,骨折组外周血中性粒细胞趋化因子-1(cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1, CINC-1)和巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)蛋白表达增高($P<0.05$);与骨折组比较,药物组外周血CINC-1、CX3C趋化因子(fractalkine, FKN)、L-选择素(L-selectin)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达增高($P<0.05$),白细胞介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** 活血化瘀法的代表方THSWD干预骨折早期的大鼠能明显促进骨髓内MSC的动员,其分子机制可能与外周血CINC-1、FKN、L-Selectin、VEGF上调、IL-1 α 下调有关。

[关键词] 桃红四物汤;骨折;骨折修复;间充质干细胞;动员

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.12.004

Mechanism of Taohong Siwu Decoction inducing mesenchymal stem cell mobilization to promote fracture repair

ZENG Peng¹, LU Xiaolong¹, XU Wuji¹, XIANG Lili¹, LI Wangyang^{1*}, XIONG Hui^{2*}

1. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of Taohong Siwu Decoction (THSWD) on bone marrow mesenchymal stem cell mobilization in rats with early fracture. **Methods** A total of 24 SPF male SD rats were randomly assigned into normal, fracture, and drug groups respectively, with eight rats in each group. Except for the normal group, the other groups received the surgery of a right femoral shaft fracture. On the first day after the operation, the drug group was given 20 g/kg of THSWD for intragastric administration, while the normal group and the fracture group were given the same amount of distilled water. All rats were

[收稿日期] 2023-05-25

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81874478);湖南省中医药管理局一般项目(2022-04033025);湖南省教育厅青年项目(22B0369)。

[第一作者] 曾 朋,男,主治医师,硕士,研究方向:筋骨疾病的中医药防治及创新药物研究。

[通信作者] *熊 辉,男,博士,主任医师,博士生导师,E-mail: xh_hn@hnuem.edu.cn;李汪洋,男,主治医师,博士,E-mail: woyolee@hnuem.edu.cn。

administered intragastrically in the morning and evening for five days. The number of CD45⁻CD90⁺CD29⁺ monocytes in peripheral blood was determined by flow cytometry. The surface markers were identified also by flow cytometry, cell morphology was observed under an inverted microscope, osteogenic and adipogenic differentiation were observed by alizarin red staining and oil red O staining, respectively, to identify the origin of peripheral blood MSCs. The expression of cytokines in the early stage of fracture was detected by protein chips. **Results** The number of CD45⁻CD90⁺CD29⁺ monocytes in peripheral blood in fracture rats was significantly higher than that of normal rats ($P<0.05$). The number of MSCs in peripheral blood was further elevated in the drug group ($P<0.01$). Compared with the fracture group, the number of MSCs in peripheral blood of drug group increased ($P<0.05$). Flow cytometry analysis revealed that the proportions of CD45⁻, CD90⁺, CD29⁺ cells and CD45⁻CD90⁺CD29⁺ cells in bone marrow-derived cells of THSWD-interfered rats were 90.94%, 98.57%, 92.27%, and 94.15%. The proportions of CD45⁻, CD90⁺, CD29⁺ cells, and CD45⁻CD90⁺CD29⁺ cells in peripheral blood-derived cells of THSWD-interfered rats were 90.59%, 98.21%, 92.03%, and 93.52%. By observing the cell morphology under the microscope, it was found that peripheral blood MSCs had a significantly longer growth cycle and a significantly reduced number of cell clones compared with bone marrow MSCs. There is no significant difference in cell morphology; after the induction of osteogenic and adipogenic differentiation, alizarin red and oil red O staining revealed that both peripheral blood MSCs and bone marrow MSCs could turn towards osteogenic and adipogenic differentiation. Compared with the normal group, the expressions of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) were higher in the peripheral blood in the fracture group ($P<0.05$). Compared with the fracture group, the expressions of CINC-1, fractalkine (FKN), L-selectin, vascular endothelial growth factor (VEGF) proteins increased ($P<0.05$), and the expression of interleukin-1 α (IL-1 α) protein decreased ($P<0.05$) in peripheral blood of drug group. **Conclusion** Early intervention of THSWD, the representative formula to promote blood circulation and remove blood stasis, can significantly induce the mobilization of bone marrow MSCs in rats, and its molecular mechanism may be related to the up-regulation of CINC-1, FKN, L-selectin, and VEGF, and the down-regulation of IL-1 in peripheral blood.

[**Keywords**] Taohong Siwu Decoction; fracture; fracture repair; mesenchymal stem cells; mobilization

中医骨伤科治疗骨折以“三期辨证”理论为指导。骨折早期,骨断筋伤,血溢脉外,治疗予以活血化瘀。既往研究从改善局部血液循环、改变血液流变及增加成骨细胞的活性等方面研究活血化瘀法促进骨折愈合的机制^[1]。随着研究的深入,发现活血化瘀法能促进间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)“归巢”^[2]。MSC“归巢”是指MSC离开原有的微环境(主要是骨髓)进入外周血循环,从外周血管迁移至组织损伤处的过程^[3-4]。活血化瘀法促进MSC“归巢”,包括其促进MSC动员和迁移,如加味丹参饮促进心肌损伤再灌注损伤大鼠MSC动员^[5];川芎提取物川芎嗪促进MSC向缺血脑组织迁移^[6]。“三期辨证”理论对应中医骨伤“瘀去、新生、骨合”,其相关因子在促骨折愈合、骨形成过程中均与MSC相关,其中,在促骨愈合早期,MSC“归巢”作为骨形成的先决条件,在此过程中起着关键作用^[7]。目前,药物促进骨折愈合有局部注射重组人骨形态发生蛋白(recombinant human bone morphogenetic protein, rhBMP)、甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)^[8]、动物骨多肽类^[9]、神经生长因子^[10]等方法。这些药物主要通过成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)

信号通路、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)信号通路、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)信号通路、Notch信号通路、Wnt/ β -catenin信号通路等发挥作用。在骨折早期MSC定向移动时,各种生长因子、趋化因子和炎症因子都发挥重要的作用^[11]。采用蛋白芯片检测骨折早期主要细胞因子的表达水平。在外周血中存在多种细胞因子,如:VEGF、CX3C趋化因子(fractalkine, FKN)、CXC趋化因子5(lipopolysaccharide-induced CXC chemokine, LIX)、CC趋化因子5(normal T cell expressed and presumably secreted, RANTES)、中性粒细胞趋化因子-1(cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1, CINC-1)、白细胞介素-1 α (interleukin 1 α , IL-1 α)、细胞间黏附分子-1(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)、L-选择素(L-Selectin)、基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP-1)和巨噬细胞炎性蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α),这些因子及相关信号通路参与骨折修复的炎症期、修复期、重建期^[12]。

桃红四物汤(Taohong Siwu Decoction, THSWD)是骨折早期活血化瘀法的代表方剂,临床应用甚为广泛。已有研究证实,THSWD不仅在增加血流变、相关因子分泌方面可促进骨愈合^[3],还能增强在血肿期骨痂中CNIC-1、CNIC-3、LIX、VEGF等多种因子的表达,促进MSC的“归巢”^[4]。本研究将建立右侧股骨干开放性骨折大鼠模型,观察THSWD在骨折早期对骨髓内MSC动员的影响,探究MSC动员与外周血细胞因子的相关性,试图探明THSWD影响MSC动员的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24只5周龄SPF级雄性SD大鼠,体质量(120±10)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物合格证号:430727221100472812。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)2019-0009。饲养条件:室温20~24℃,相对湿度50%~70%,12h昼夜交替照明,灭菌饲料喂养,自由摄食和饮水。实验方案经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准,伦理批号:LL20191010001。

1.2 药物制备

THSWD的组成和临床用量参照《医宗金鉴·卷四十四》,组方如下:生地黄20g,当归20g,赤芍20g,川芎10g,桃仁20g,红花10g(批号分别为:NY2001902、NG19121701、NG19122401、SL19112207、2019070204、HY19121803),购自湖南中医药大学第一附属医院中药房。按照上述药量比例称取生药材共300g,水煎2次浓度定容至2.4g/mL,分装,放置-20℃冰箱保存备用。

1.3 主要药物与实验试剂

SD大鼠骨髓MSC完全培养基、SD大鼠骨髓MSC成骨诱导分化培养基、SD大鼠脂肪MSC成脂诱导分化培养基(广州赛业生物科技有限公司,批号分别为:RASM-90011、RASM-90021、RASMD-90031);CD29抗体(FITC)及其IgG1 kappa同型对照、CD45抗体(PE)及其IgG1 kappa同型对照、红细胞裂解液(美国赛默飞世尔科技公司,批号分别为:12-0291-80、11-0291-80、12-0461-80、12-4714-81、00-4300-54);CD90抗体(Alexa Fluor 647)及其IgG1 kappa同型对照(北京Biolegend生物科技有限公司,

批号分别为:202508、400130);细胞因子蛋白芯片(美国R&D Systems公司,批号:Ab78608);戊巴比妥钠注射液(北京寰宇化工有限公司,批号:096956-001);PBS缓冲液(美国西格玛奥德里奇公司,批号:P4417)。

1.4 主要仪器

细胞流式仪(美国贝克曼库尔特公司,型号:MoFloAstrios EQ);光学显微镜(中国摩迪克显微镜公司,型号:BA410T);超净工作台(北京亚泰隆公司,型号:YT-CJ-2NB);离心机(美国赛默飞世尔科技公司,型号:ST16R/ST16);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器有限公司,型号:H1650R);直热式二氧化碳培养箱(上海三腾仪器有限公司,型号:DH-160I);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司,型号:DSZ2000X);全自动凝胶成像分析系统(英国Syngene公司,型号:GBOX-H12-E-M)。

2 实验方法

2.1 实验动物分组及药物干预

将24只SD大鼠采用随机数字表法分为正常组、骨折组和药物组,每组8只。前期研究中,在采用包含阳性对照组的试验中证明THSWD早期干预下可以促进骨折愈合^[5]。因此,本研究为THSWD的作用机制研究,未设置阳性对照组。除正常组大鼠外,其余两组大鼠采用右侧股骨干开放性骨折方法造模。术前6h禁食,去除腿毛,予以1%戊巴比妥钠腹腔麻醉,进行动物造模^[6]。右侧大腿纵行切开长约2cm外侧切口,沿肌肉间隙将前后肌肉群钝性分离,暴露股骨干后;将肌肉轻轻牵开,使用迷你型电磨机沿骨干中部横断;克氏针从断端逆行插入近端,穿出大转子;断端对位良好后,固定,将克氏针从近端向远端推进至股骨髁,剪掉大转子处多余的克氏针,折弯埋入皮下。消毒缝合皮肤。术后将骨折大鼠放置恒温垫观察30min,待所有大鼠复苏后,予青霉素钠80000U腹腔注射。术后第1天,拍摄X线见骨折内固定在位,断端对位对线良好,判定造模成功^[5]。术后第1天开始灌胃,每天8:00和17:00各灌胃1次。药物组予20g/(kg·d)THSWD,正常组与骨折组予等量蒸馏水,早晚各1次,连续灌胃5d。大鼠的给药剂量按人与动物体表面积公式折算^[7],将成人临床等效剂量1.2g(生药材)定为本次动物实验

的中剂量,前期实验证实高倍率稀释后^[18],采用药物干预剂量为20 g/(kg·d)。

2.2 外周血和骨髓来源 MSC 的分离培养

在药物组中,使用抗凝真空负压采血管进行腹主动脉采血,采血量约2 mL/只,每份血液样本与PBS按照1:1比例稀释后,经过红细胞裂解液2次裂解后,离心获得外周血单核细胞,经PBS洗涤1次后以完全培养基重悬。从骨折组大鼠左侧未予骨折的股骨干和胫骨取材,使用基础培养基冲出骨髓,离心后得到细胞沉淀,完全培养基重悬。将外周血来源的单核细胞与骨髓来源的细胞沉淀置于37℃含5%CO₂的培养箱中孵育,每隔3 d更换液1次,至90%融合时传代消化,收集第5代细胞用于细胞实验。

2.3 外周血中的项目检测

2.3.1 外周血 CD45⁻CD90⁺CD29⁺MSC 数目检测 采用1%戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠后,使用抗凝真空负压采血管进行腹主动脉取血2 mL/只,进行细胞分离、流式前处理、细胞上样:分别吸取大鼠外周血500 μL加入3 mL红细胞裂解液,4℃下裂解10 min;400×g 5 min离心得到沉淀;加入3 mL红细胞裂解液,4℃下裂解10 min;400×g 5 min离心得到沉淀;采用PBS重悬收集细胞沉淀,统计细胞总数,用PBS洗涤细胞1次,并收集细胞;加入500 μL的Binding Buffer缓冲液悬浮细胞;加入CD29、CD45、CD90抗体避光孵育30 min;PBS洗涤2次;进行流式细胞仪检测。

2.3.2 外周血和骨髓来源的 MSC 表型鉴定 通过细胞流式分析第5代外周血和骨髓来源的MSC的免疫表型。选择CD90和CD29作为阳性标记,CD45作为阴性标记。具体如下:收集生长良好的P5代细胞,以1×10⁶个/mL的密度重悬于PBS中洗涤细胞1次;加入500 μL的Binding Buffer悬浮细胞;加入CD29、CD45、CD90抗体于溶液中避光孵育30 min,每组以纯化的同型荧光标记的小鼠IgG抗体作为对照;PBS洗涤2次后于流式固定液中固定30 min;每次采集不低于1×10⁴个细胞进行流式细胞仪检测。

2.3.3 外周血和骨髓来源的 MSC 成骨分化和成脂分化诱导 取生长良好的MSC,以3×10⁴接种于6孔板中,24 h后弃掉培养基,加入2 mL成骨诱导液,每3 d换液1次,诱导21 d。取出标本进行茜素红染色和油红O染色^[19],PBS冲洗3遍,每次5 min;每孔

加入2 mL 4%多聚甲醛,固定30 min,PBS冲洗3次,每次5 min;每孔加入1 mL稀释茜素红染色液或1 mL油红O染色工作液,30 min后,PBS冲洗3次,每次5 min;显微镜下观察矿化结节或脂滴情况。

2.3.4 外周血血清获取及蛋白芯片检测 腹主动脉取血时,更换真空负压采血管,每只大鼠取血4 mL/管。分离血清条件:37℃水浴15 min,常温下3 000 r/min离心15 min(离心半径10 cm),获得的血清进行蛋白芯片检测,具体操作步骤依照说明,检测外周血血清中细胞因子的表达情况。

2.4 统计学方法

所有数据采用Graphpad Prism 7.0统计软件处理,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,使用单因素的方差分析,组间差异采用Tukey's多重比较。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 THSWD 可促进 CD45⁻CD90⁺CD29⁺MSC 的动员

MSC不表达CD45抗原,表达CD90和CD29表面抗原。FCM三色标记法检测3个免疫表型可间接反映MSC数量变化。从外周血单核细胞中分离得到CD45⁻CD90⁺CD29⁺MSC的单核细胞即为MSC。与正常组比较,骨折组大鼠外周血MSC绝对细胞数目、相对细胞数目增高($P<0.05$),药物组外周血MSC绝对细胞数目、相对细胞数目显著增高($P<0.01$);与骨折组比较,药物组大鼠外周血MSC绝对细胞数目、相对细胞数目增高($P<0.05$)。详见图1。

3.2 THSWD 干预外周血来源 CD45⁻CD90⁺CD29⁺MSC 的表型、形态和多向分化潜能的鉴定

通过流式细胞术分析发现:THSWD干预大鼠骨髓来源的细胞中CD45⁻、CD90⁺、CD29⁺比例和CD45⁻中CD90⁺CD29⁺细胞比例分别为90.94%、98.57%、92.27%和94.15%;而THSWD干预的外周血来源的细胞CD45⁻、CD90⁺、CD29⁺比例和CD45⁻中CD90⁺CD29⁺分别为90.59%、98.21%、92.03%和93.52%,详见图2A。通过镜下观察细胞形态,外周血MSC较骨髓MSC生长周期明显延长,细胞克隆数明显减少;细胞形态基本无明显区别;经过成骨成脂诱导后,茜素红和油红O染色发现,外周血MSC和骨髓MSC都能向成骨、成脂肪方向分化,详见图2B。

3.3 蛋白芯片检测外周血细胞因子的表达

与正常组比较,骨折组外周血CINC-1和MIP-1 α

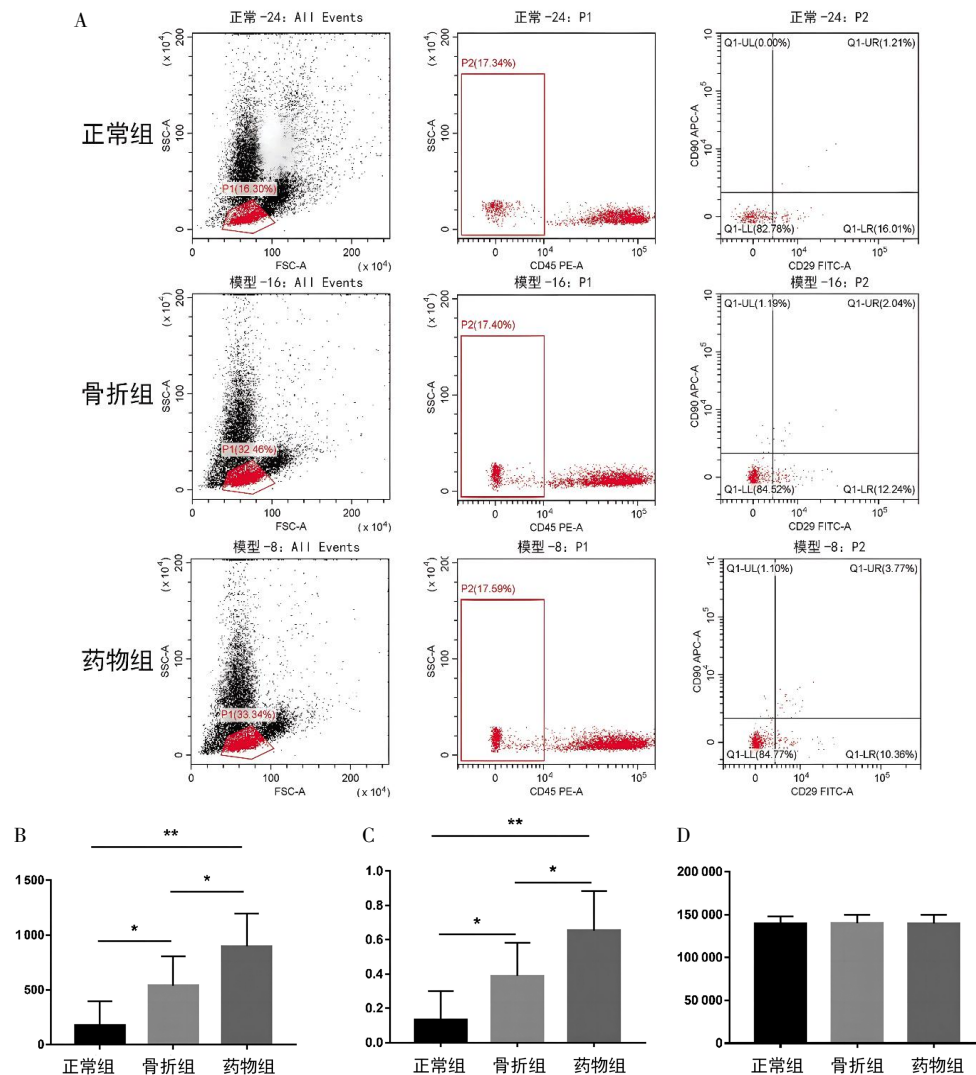


图1 骨折大鼠 CD45⁺CD90⁺CD29⁺MSC 在不同组别的动员

注:A.外周血中 MSC 的数目;B.CD45⁺CD90⁺CD29⁺的绝对细胞数目;C.CD45⁺CD90⁺CD29⁺的相对细胞数目;D.外周血中总细胞数目。 $n=8$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

蛋白表达增高($P<0.05$)。详见图3。与骨折组比较,药物组外周血 CINC-1、FKN、L-Selectin、VEGF 蛋白表达增高($P<0.05$),IL-1 α 蛋白表达降低($P<0.05$)。详见图4。

4 讨论

动员是指 MSC 受到外在刺激后其迁移出原有的微环境(主要是骨髓)进入外周血的过程^[20]。在稳定状态下很难从外周循环血中培养 MSC,之前 MSC 能否动员出现在外周血未经证实^[21]。本研究表明,骨折损伤刺激能促进骨髓内 MSC 的动员。越来越多的研究发现,MSC 能在各种刺激下被激活而动员进入外周血循环^[22-23],但中医药在干预骨折后 MSC 动员及其分子机制尚未明确。

骨折初期,血管破坏,水肿形成,骨折处形成缺

血缺氧的环境,巨噬细胞及淋巴细胞浸润到局部,释放各种炎性因子,诱发炎性反应。骨髓内或外周血 MSC 受炎性信号激活后,启动骨髓动员并向骨折部位迁移^[24]。在骨折修复期,迁移的 MSC 分化大量成纤维细胞出现在有机化血肿、骨折断端及周围组织,继而凋亡、演变成骨祖细胞,骨祖细胞向成骨细胞和软骨细胞方向分化,与侵入的毛细血管相互作用形成骨痂^[25-26]。骨折重建期,骨痂的吸收和重塑在一定程度上依赖于破骨细胞的骨吸收功能,骨基质释放活性转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β),诱导 MSC 迁移和动员到局部修复部位^[27]。同时在低氧诱导因子-1 α /VEGF 通路下,持续重建的新生血管提供血氧、营养,破骨与成骨细胞循环耦合,骨髓腔、骨皮质先后形成,骨折得以修复^[28]。综上所述,MSC“归巢”中的 MSC 动员、迁移与骨折修复具

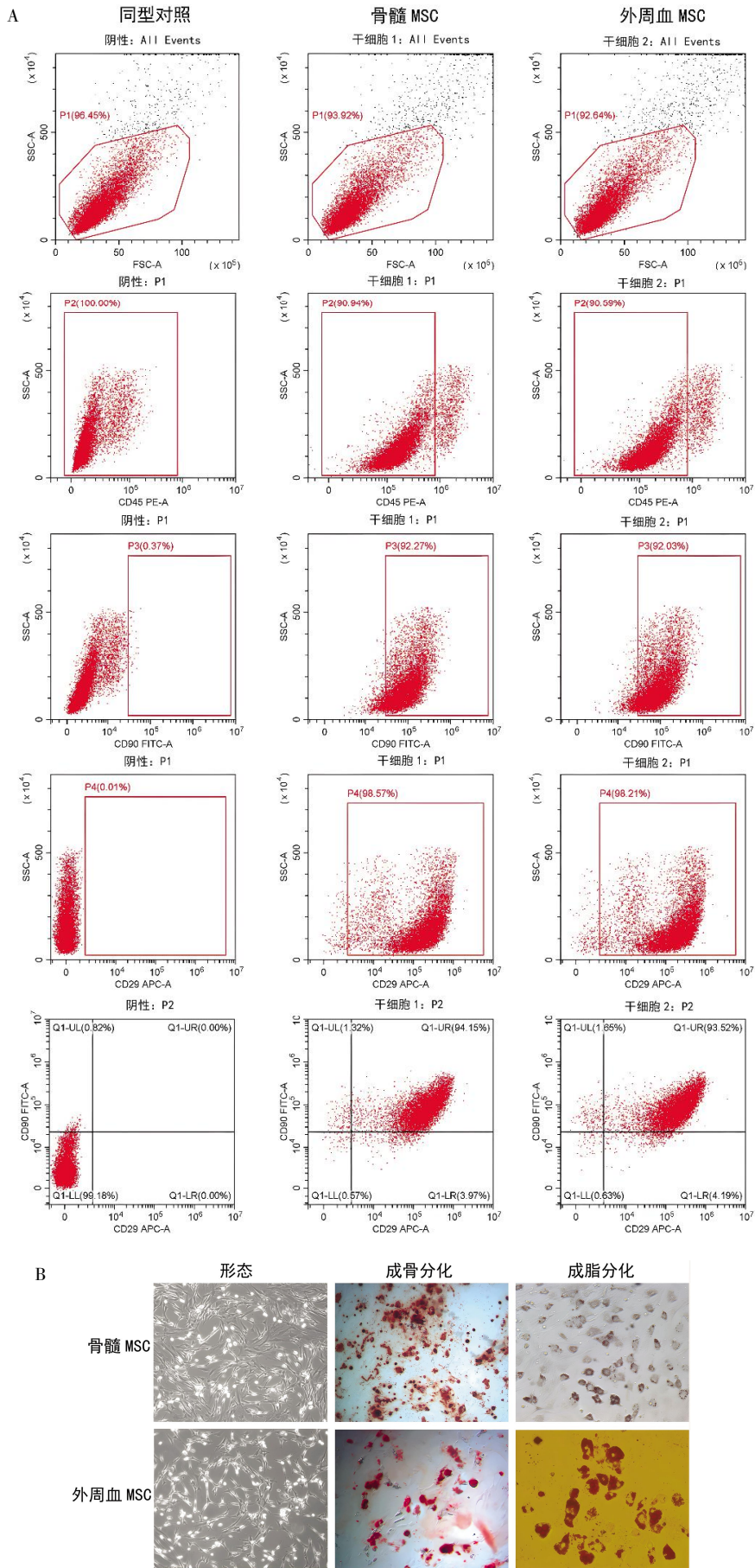


图 2 MSC 不同来源的细胞表型、细胞形态、多向分化潜能的鉴定

注:A.外周血与骨髓来源的 MSC 形态、成骨分化和成脂分化;B.外周血和骨髓来源的 MSC 表型鉴定(成骨分化鉴定茜素红染色,成脂分化鉴定油红 O 染色,×400)

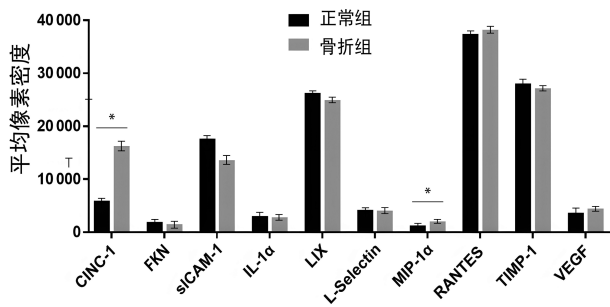


图3 蛋白芯片技术检测骨折后外周血细胞因子的表达

注: $n=8$; $*P<0.05$ 。

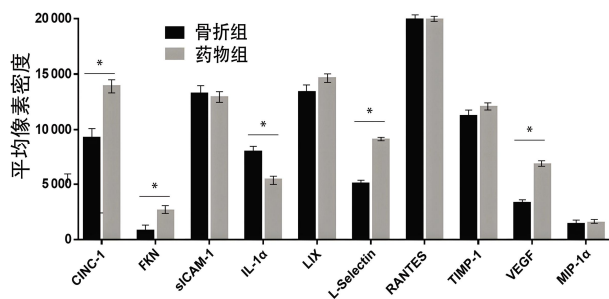


图4 蛋白芯片技术检测 THSWD 干预后外周

血细胞因子的表达

注: $n=8$; $*P<0.05$ 。

有紧密的内在联系。

MSC 表面不表达 CD45 抗原,但表达 CD90、CD29 抗原。本次研究,通过流式细胞术检测上述抗原的表达以确定外周血 MSC 的数目。结果提示,骨折组中大鼠的外周血 CD45⁻CD90⁺CD29⁺单核细胞明显多于正常组;在 THSWD 早期干预后,骨折组大鼠外周血 CD45⁻CD90⁺CD29⁺单核细胞进一步增加。这表明 THSWD 可明显促进 MSC 动员。同时本研究为确定外周血中的 MSC 是否来自于骨髓,对 THSWD 干预的外周血来源的 MSC 与骨折大鼠骨髓来源的 MSC 进行鉴定。结果显示,二者表面标记均符合 MSC“表达 CD90、CD29 抗原,不表达 CD45 抗原”的差异性;均为长梭形,贴壁生长;且都能向成骨细胞和成脂肪细胞分化。因此,本课题组推断,THSWD 早期干预骨折大鼠后,能促进骨髓内 MSC 动员进入外周血。

骨折愈合过程中大量的炎性细胞浸润和细胞因子释放入血,募集细胞和促进其他细胞因子的分泌而启动骨折的修复过程^[29]。本研究通过蛋白芯片检测,骨折后 5 d 外周血中表达 CINC-1、FKN、sICAM-1、IL-1α、LIX、L-Selectin、RANTES、TIMP-1、VEGF 和 MIP-1α 等细胞因子。

CINC-1 和 MIP-1α 浓度在骨折后变化显著,与正常大鼠比较,骨折大鼠中外周血 CINC-1 和 MIP-1α

增高。CINC-1 能与 CXCR2 趋化因子受体 2 结合并促进中性粒细胞动员^[30];而 MIP-1α 能与 CC 趋化因子受体 1 结合促进巨噬细胞定向移动^[31]。随着中性粒细胞和巨噬细胞等炎性细胞进入外周血,当骨髓内静息状态的 MSC 感知上述免疫信号后即被激活进入外周血,参与骨折的修复^[32]。

前期研究表明,THSWD 能促进骨折大鼠股骨干骨折骨体积和骨矿化密度的增加^[33]。本研究发现,THSWD 可能通过促进骨髓内 MSC 动员加快骨折愈合。蛋白芯片结果提示,THSWD 能增加骨折大鼠外周血中 L-Selectin、FKN、CINC-1 和 VEGF 表达,并能抑制 IL-1α 表达。FKN 是内皮细胞表达的具有黏附和趋化双重活性的细胞因子。有研究报道,FKN 能促进骨髓 MSC 向缺血损伤的脑组织归巢^[34]。L-Selectin 作为细胞黏附分子,主要参与白细胞与血管内皮细胞表面的黏附。研究表明,MSC 不表达 L-Selectin 的配体^[35],所以其能否促进 MSC 动员需继续研究。VEGF 能促进 MSC 的生长和铺展、细胞膜褶皱的形成及黏着斑和应力纤维的组装^[36]。研究表明,MSC 能抑制外周血中巨噬细胞等分泌炎性因子,具有自身免疫调节和抑制炎症的作用^[37]。另外,外周血 IL-1α 表达的降低,可能是由于 MSC 动员后的结果,但 IL-1α 的降低是否能促进 MSC 的动员还尚待证实。

综上所述,THSWD 作为活血化瘀的代表方在干预骨折早期的大鼠能明显促进骨髓内 MSC 的动员,外周血 FKN、CINC-1、VEGF、L-Selectin 的上调、IL-1α 下调可能与其动员分子机制相关,尚待研究。

参考文献

- [1] 刘征宇. 具有促进骨折愈合的中药及作用机制[J]. 世界中医药, 2019, 14(10): 2809-2813.
- [2] 李 鹏, 余新安, 赵东军, 等. 骨髓间充质干细胞对大鼠骨质疏松股骨干骨折早期愈合影响的实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2021, 50(7): 793-796.
- [3] SELMA J M, DAS A, AWOJODOU A O, et al. Novel lipid signaling mediators for mesenchymal stem cell mobilization during bone repair[J]. Cellular and Molecular Bioengineering, 2018, 11(4): 241-253.
- [4] 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.
- [5] 赵慧杰. 加味丹参饮含药血清对骨髓间充质干细胞增殖及分泌 bFGF、VEGF 的影响[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(8): 41-43.
- [6] 毛诗慧, 李 琳, 孙逸梅, 等. 川芎嗪预处理增强骨髓间充质干

- 细胞外泌体对脑缺血大鼠的神经保护和抗神经元凋亡作用[J]. 浙江中医药大学学报, 2023, 47(5): 455-462.
- [7] 李汪洋, 熊 辉. 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[J]. 中国骨伤, 2022, 35(4): 367-374.
- [8] 王小璐, 崔 宇, 张令强. 促进骨折愈合的治疗策略及机制研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(1): 121-130.
- [9] 赵晓明, 苏晨晨, 娄啸霄, 等. PFNA 术后应用动物骨多肽类药物促进骨折愈合的临床疗效研究[J]. 中华全科医学, 2021, 19(3): 347-350.
- [10] 毛俊杰, 徐涛涛, 董培建. 神经生长因子/原肌球蛋白受体激酶 A 信号通路与骨折疼痛和骨折愈合的关系研究进展[J]. 中医正骨, 2023, 35(3): 50-54, 64.
- [11] 颜杉钰, 梅宏翔, 李 娟. 间充质干细胞迁移在骨组织损伤修复中的作用[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(12): 854-858.
- [12] 王怡璇, 熊 辉, 冯海波, 等. 间充质干细胞动员及活血化痰中药对其影响的研究进展[J]. 中国医药, 2023, 18(3): 477-480.
- [13] 覃祚海, 马成豪, 王 浩, 等. 桃红四物汤对全膝关节置换术后患者转化生长因子信号通路及骨愈合的影响[J]. 陕西中医, 2021, 42(9): 1243-1246.
- [14] 朱 杰, 易发现. 间充质干细胞归巢机制及影响因素研究进展[J]. 中国医药科学, 2023, 13(6): 25-29.
- [15] 熊 辉, 李 前, 谈立明. 桃红四物汤有效成分的交互作用及其对血清 VEGF 浓度的影响[J]. 中医正骨, 2011, 23(2): 3-6.
- [16] 张玲莉, 赵一龙, 吴 伟. 实验鼠骨折模型研究进展[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(1): 76-81.
- [17] 贺石林, 王 健, 王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2007: 48-49.
- [18] 熊 辉, 左亚杰, 丁志高, 等. 桃红四物汤干预骨微血管新生及 VEGF 表达的实验研究[J]. 中国医师杂志, 2004(2): 195-197.
- [19] WEI F Y, LEUNG K S, LI G, et al. Low intensity pulsed ultrasound enhanced mesenchymal stem cell recruitment through stromal derived factor-1 signaling in fracture healing[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106722.
- [20] FU X R, LIU G, HALIM A, et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair[J]. Cells, 2019, 8(8): 784.
- [21] NING K T, YANG B Q, CHEN M, et al. Functional heterogeneity of bone marrow mesenchymal stem cell subpopulations in physiology and pathology[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 11928.
- [22] VIEIRA C P, MCCARREL T M, GRANT M B. Novel methods to mobilize, isolate, and expand mesenchymal stem cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 5728.
- [23] ZHU J L, LIU Y M, CHEN C, et al. Cyasterone accelerates fracture healing by promoting MSCs migration and osteogenesis[J]. Journal of Orthopaedic Translation, 2021, 28: 28-38.
- [24] LIN W P, XU L L, ZWINGENBERGER S, et al. Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing[J]. Journal of Orthopaedic Translation, 2017, 9: 19-27.
- [25] YU H B, YU W Y, LIU Y, et al. Expression of HIF-1 α in cycling stretch induced osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells[J]. Molecular Medicine Reports, 2019, 20(5): 4489-4498.
- [26] 田原野, 康非吾. 缺氧诱导因子-1 α 在骨折愈合中的作用[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2021, 19(3): 182-186.
- [27] UDALAMATHITHA V L, JAYASINGHE C D, UDAGAMA P V. Potential role of herbal remedies in stem cell therapy: Proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2016, 7(1): 110.
- [28] 金昱彤, 祁 琳, 牛蕊蕊, 等. 红景天苷激活 HIF-1 α 信号通路促进成骨细胞增殖的机制[J]. 中国药理学通报, 2022, 38 (2): 190-195.
- [29] 杨 卓, 邱振南, 余晓愉, 等. 桃红四物汤组方药物主要有效单体成分伍对早期骨折愈合的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(12): 1462-1467.
- [30] YAMASHIRO L H, DE SOUZA G E P, DE MELO SOARES D. Role of CINC-1 and CXCR2 receptors on LPS-induced fever in rats[J]. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2019, 471(2): 301-311.
- [31] 马泽冰, 冯海波, 熊 辉, 等. 基于 VEGF/DLL4 信号研究桃红四物汤对创伤性股骨头坏死大鼠的作用及机制[J]. 吉林中医药, 2023, 43(5): 572-577.
- [32] PAJARINEN J, LIN T, GIBON E, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing[J]. Biomaterials, 2019, 196: 80-89.
- [33] 杨 卓. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨桃红四物汤对骨折早期的干预机制[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.
- [34] SUBBARAYAN M S, JOLY-AMADO A, BICKFORD P C, et al. CX3CL1/CX3CR1 signaling targets for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2022, 231: 107989.
- [35] SACKSTEIN R, MERZABAN J S, CAIN D W, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone[J]. Nature Medicine, 2008, 14(2): 181-187.
- [36] 钟嘉伟, 潘 剑, 郭雨晨. 免疫细胞调控颌骨稳态及损伤修复的研究进展[J]. 口腔医学, 2023, 43(5): 465-470.
- [37] ARABPOUR M, SAGHAZADEH A, REZAEI N. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes[J]. International Immunopharmacology, 2021, 97: 107823.