

本文引用: 陈 培, 简功辉, 杨 雷, 陈振华, 张天择, 叶政显, 齐新宇, 熊 辉, 陆小龙. 桃红四物汤通过 GLUL/NOTCH 通路促进 BMMSCs 成骨分化及核糖体生成研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(9): 1644–1652.

## 桃红四物汤通过 GLUL/NOTCH 通路促进 BMMSCs 成骨分化及核糖体生成研究

陈 培<sup>1</sup>, 简功辉<sup>2</sup>, 杨 雷<sup>1</sup>, 陈振华<sup>3</sup>, 张天择<sup>3</sup>, 叶政显<sup>3</sup>, 齐新宇<sup>2</sup>, 熊 辉<sup>2</sup>, 陆小龙<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208;

3. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

**〔摘要〕** 目的 探究桃红四物汤(THSWD)促进骨髓间充质干细胞(BMMSCs)成骨分化影响骨折愈合的具体作用机制。方法 体外培养大鼠 BMMSCs, 取生长良好的 BMMSCs 分为对照(CONTROL)组、THSWD 干预(THSWD)组、THSWD 干预+谷酰胺合成酶(GLUL)敲低或过表达空白对照(THSWD+sh-NC 或 THSWD+OE-NC)组、THSWD 干预+GLUL 敲低或过表达(THSWD+sh-GLUL 或 THSWD+OE-GLUL)组。CONTROL 组以 BMMSCs 完全培养基培养 BMMSCs; THSWD 组加入 100 ng/mL THSWD 含药血清干预; THSWD+sh-NC 组及 THSWD+OE-NC 组经 100 ng/mL THSWD 含药血清干预后, 分别转染 sh-NC、OE-NC 慢病毒; THSWD+sh-GLUL 组和 THSWD+OE-GLUL 组经 100 ng/mL THSWD 含药血清干预后, 分别转染 sh-GLUL、OE-GLUL 慢病毒。通过 Western blot 检测碱性磷酸酶(ALP)、骨骼特异性转录因子(Osx)、Runx 相关转录因子 2(Runx2)、GLUL、Notch 胞内结构域(NICD)、神经源性位点 Notch 同源蛋白 1(NOTCH1)及毛状和增强子分裂 1(HES1)蛋白表达水平; 采用茜素红染色检测细胞钙化情况; qRT-PCR 检测 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 表达; 利用网络药理学分析并筛选 THSWD 调控核糖体生成影响 BMMSCs 的关键靶点 GLUL; 采用 CCK-8 法检测细胞活力; 采用 Transwell 检测细胞迁移距离并进行定量分析。结果 与 CONTROL 组相比, THSWD 组 BMMSCs 中 ALP、Osx、Runx2 蛋白表达水平增加( $P<0.01$ ); 茜素红染色 BMMSCs 结果为阳性; THSWD 组核糖体生成关键因子 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 表达增加( $P<0.01$ )。网络药理学分析发现, GLUL 是 THSWD 靶向的关键因子。细胞验证实验发现, 与 THSWD+sh-NC 组相比, THSWD+sh-GLUL 组 BMMSCs 细胞增殖能力, ALP、Osx、Runx2 蛋白表达水平, 细胞迁移能力及愈合率, 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 及 NICD、NOTCH1、HES1 表达水平均下降( $P<0.01$ ); 与 THSWD+OE-NC 组相比, THSWD+OE-GLUL 组 BMMSCs 细胞增殖能力, ALP、Osx、Runx2 蛋白表达水平, 细胞迁移能力及愈合率, 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 及 NICD、NOTCH1、HES1 表达水平均增加( $P<0.01$ )。结论 THSWD 可能通过上调 GLUL 的表达, 激活 NOTCH 信号通路的表达, 促进核糖体生成, 从而促进 BMMSCs 成骨分化。

**〔关键词〕** 骨折愈合; 桃红四物汤; 骨髓间充质干细胞; 核糖体生成; NOTCH 通路

**〔中图分类号〕** R285.5

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.09.008

## Taohong Siwu Decoction promoting osteogenic differentiation and ribosome biogenesis of BMMSCs through the CLUL/NOTCH pathway

CHEN Pei<sup>1</sup>, JIAN Gonghui<sup>2</sup>, YANG Lei<sup>1</sup>, CHEN Zhenhua<sup>3</sup>, ZHANG Tianze<sup>3</sup>, YE Zhengxian<sup>3</sup>,

QI Xinyu<sup>2</sup>, XIONG Hui<sup>2</sup>, LU Xiaolong<sup>1\*</sup>

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Hunan University of

**〔收稿日期〕** 2025-05-09

**〔基金项目〕** 湖南中医药大学“刘良院士工作站”指导项目(22YS004); 湖南创新型省份建设重点领域研发计划项目(2023SK2047); 中医药防治筋骨疾病基础研究创新平台(kh2201056); 国家自然科学基金面上项目(81874478); 湖南省自然科学基金项目(2024JJ9419); 湖南省教育厅科学研究项目(23A0311); 长沙市自然科学基金项目(kq2208197)。

**〔通信作者〕** \* 陆小龙, 男, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: 1730657921@qq.com。

*Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China*

**[Abstract]** **Objective** To explore the specific mechanisms of Taohong Siwu Decoction (THSWD) in promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) and affecting fracture healing. **Methods** BMMSCs from rats were cultured in vitro. Well-growing BMMSCs were selected and divided into the following groups: the control (CONTROL) group, the THSWD intervention (THSWD) group, the THSWD intervention+glutamine synthetase (GLUL) knockdown or overexpression blank control (THSWD+sh-NC or THSWD+OE-NC) group, and the THSWD intervention+GLUL knockdown or overexpression (THSWD+sh-GLUL or THSWD+OE-GLUL) group. Cells in the CONTROL group were cultured in complete BMSC medium. The THSWD group was treated with 100 ng/mL THSWD-containing serum. The THSWD+sh-NC and THSWD+OE-NC groups were incubated with 100 ng/mL THSWD-containing serum and then transfected with sh-NC and OE-NC lentiviruses, respectively. The THSWD+sh-GLUL and THSWD+OE-GLUL groups were also treated with 100 ng/mL THSWD-containing serum followed by transduction with sh-GLUL and OE-GLUL lentiviruses, respectively. The protein expression levels of alkaline phosphatase (ALP), Osterix (Osx), runt-related transcription factor 2 (Runx2), GLUL, NOTCH intracellular domain (NICD), neurogenic locus notch homolog protein 1 (NOTCH1), and hairy and enhancer of split-1 (HES1) were detected by Western blot. Mineralization was assessed using Alizarin Red staining. The expression of 5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA, and 28S rRNA was measured via qRT-PCR. Network pharmacology analysis was employed to predict and identify GLUL as a key target through which THSWD regulates ribosome biogenesis to affect BMMSCs. Cell viability was evaluated using the CCK-8 assay, and cell migration distance was quantified using the Transwell assay. **Results** Compared with the CONTROL group, the expression levels of ALP, Osx, and Runx2 significantly increased in the THSWD group ( $P<0.01$ ). Alizarin Red staining results were positive in BMMSCs of the THSWD group. The expression of key ribosome biogenesis factors, including 5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA, and 28S rRNA, was also markedly upregulated in the THSWD group ( $P<0.01$ ). Network pharmacology analysis identified GLUL as a key target of THSWD. Cellular validation experiments showed that, compared with the THSWD+sh-NC group, the THSWD+sh-GLUL group exhibited decreased cell proliferation ability, protein expression levels of ALP, Osx, and Runx2, cell migration capacity and wound healing rate, expression of 5S/5.8S/18S/28S rRNAs, and protein expression levels of NICD, NOTCH1, and HES1 (all  $P<0.01$ ). Conversely, compared with the THSWD+OE-NC group, the THSWD+OE-GLUL group showed increases in all these parameters (all  $P<0.01$ ). **Conclusion** THSWD may promote osteogenic differentiation of BMMSCs by upregulating the expression of GLUL, activating the expression of the NOTCH signaling pathway, and thereby enhancing ribosome biogenesis.

**[Keywords]** fracture healing; Taohong Siwu Decoction; bone marrow mesenchymal stem cells; ribosome biogenesis; NOTCH signaling pathway

骨折作为临床实践中极为常见的一种病症,广泛存在于各类年龄段的人群中,可导致机体出现局部肿胀、疼痛、畸形、活动受限等症状<sup>[1]</sup>。据统计,我国50岁以上人群总骨折患病率为26.6%,并且中老年人骨折患病率随着年龄增长而增加<sup>[2]</sup>。骨折虽可通过手术或者复位后愈合,但仍有5%~10%的临床患者在治疗后出现骨不连、不愈合引起的疼痛、肢体功能障碍和心理障碍,给患者和家庭带来巨大的痛苦,并增加了家庭和社会的经济负担<sup>[3]</sup>。因此,探索促进骨折修复的有效干预手段具有重要的临床意义。骨折修复过程中,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)起着重要作用,BMM

SCs不仅能自我更新,还能在特定的生理或病理条件下分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等多种细胞类型,从而参与骨骼的再生与修复<sup>[4]</sup>,在组织工程和骨损伤治疗中被广泛视为理想的种子细胞。

中医药疗法经历几千年的临床实践被传承至今,其因具有简便、有效、安全等特点被越来越多的现代临床骨科医师和患者所接受<sup>[5]</sup>。桃红四物汤(Taohong Siwu Decoction, THSWD)是骨折早期活血化瘀的代表方剂,临床应用广泛<sup>[6]</sup>。既往研究表明,THSWD可激活血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)相关通路,其活性成分可通过增强碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、

骨骼特异性转录因子(osterix, *Osx*)和 *Runt* 相关转录因子 2(*runt*-related transcription factor 2, *Runx2*)等成骨关键转录因子的表达调控 BMMSCs 成骨分化<sup>[7-8]</sup>。前期研究发现,THSWD 对骨折初期主要临床症状、体征有明显缓解作用,并可有效改善高龄股骨粗隆间骨折术后隐性失血状况,加速断端血肿吸收和骨痂生长塑形,促进骨折愈合<sup>[9]</sup>,但其具体作用机制尚不明确。谷酰胺合成酶(*glutamine synthetase*, *GLUL*)作为参与谷氨酰胺合成的关键酶,不仅在维持细胞代谢稳态中发挥重要作用,还被认为可能通过调控核糖体生物合成影响干细胞分化倾向<sup>[10]</sup>。因此,本研究从代谢调控角度出发,首次提出 *GLUL* 作为中药干预 BMMSCs 成骨分化的关键介导因子,并进一步揭示其通过调控核糖体生成激活 NOTCH 信号通路的作用机制,以期中药复方多靶点调控骨修复提供新的理论支撑与研究思路。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

24 只 5 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量( $120 \pm 10$ ) 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第一附属医院实验动物中心,许可证号:SYXK(湘)2019-0009。饲养条件:温度 20~24 ℃,相对湿度 50%~70%,12 h 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第一附属医院动物实验伦理委员会批准,伦理批号:ZYFY20231110-15。

### 1.2 药物

THSWD 的组成和临床用量参照《医宗金鉴》。桃仁(批号:2019070204)、红花(批号:HY19121803)、生地黄(批号:NY2001902)、全当归(批号:NG19121701)、赤芍(批号:NG19122401)、川芎(批号:SL19112207)饮片购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,按照药量比例为 2:1.2:2:2:1 称取生药材共 300 g,水煎 2 次,浓度定容至 2.4 g 生药/mL,分装,置于 -20 ℃冰箱保存备用。地塞米松(上海源叶生物科技有限公司,货号:B25793,规格:≥98%)。

### 1.3 主要试剂与仪器

DMEM/F12 培养基、胎牛血清、BMMSCs 完全培养基、BMMSCs 成骨诱导分化培养基、青霉素-链霉素溶液(双抗)(武汉普诺赛生命科技有限公司,

货号:PM150312B、164210-500、CM-R131、PD-004、PB180120);GAPDH 抗体、ALP 抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号:AF7021、DF6225);*Osx* 抗体、*Runx2* 抗体、毛状和增强子分裂 1(*hairy and enhancer of split 1*, *HES1*)抗体(英国 Abcam 公司,货号:ab209484、ab236639、ab108937);Notch 胞内结构域(*Notch intracellular domain*, *NICD*)抗体(美国 CST 公司,货号:4147);神经源性位点 Notch 同源蛋白 1(*neurogenic locus Notch homolog protein 1*, *NOTCH1*)抗体、山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:20687-1-AP、SA00001-2);*GLUL*抗体、甘油磷酸钠抗坏血酸、茜素红(美国 Sigma 公司,货号:SAB5700213、49752、A5533);TRIzol 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司,货号:15596018CN);具有降解 cDNA 功能的 Prime-Script rT 试剂盒、SYBR 预混 Taq DNA 聚合酶试剂盒(日本 Takara 公司,货号:RR047A、RR420A)。

超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司,型号:SJ-CJ-2FD);倒置显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司,型号:AE2000);CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(苏州纽艾设备有限公司,型号:NU-5810E);酶标仪(美国 Bio-Tek 公司,型号:ELX800);电泳仪、转膜仪(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY-600HE、Y-ZY5)。

## 2 方法

### 2.1 THSWD 含药血清的制备

24 只 5 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,使用随机数字表法分为对照组(CONTROL 组)、THSWD 组,每组 12 只。THSWD 组按 20 g/(kg·d)灌胃给药<sup>[11]</sup>,CONTROL 组灌胃等体积生理盐水,均每日灌胃 1 次,连续 3 d。给药结束后 1 h,异氟烷气体(气体浓度为 3.5%)麻醉大鼠后腹主动脉采血,室温静置 2 h 后,3 000 r/min 离心 15 min(离心半径为 10 cm),分离血清,合并同组血清,56 ℃灭活 30 min,0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装后-80 ℃保存。

### 2.2 细胞分离与培养

将实验大鼠麻醉后断颈处死,用 75%乙醇消毒,分离大腿股骨及胫骨,用基础培养基冲洗股骨和胫骨髓腔,收集冲洗液,补充 10%胎牛血清及 1%青霉素-链霉素双抗。将骨细胞悬液通过 70 μm 细胞过滤器过滤,通过 800 r/min 的离心机分离至出现上层清液及下层沉淀物,取下层。加双倍血清和双

抗,24 h 后观察细胞贴壁情况,弃掉未贴壁的细胞悬液,将培养皿置于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中。每 2 天更换 1 次培养基,直到细胞亚融合,融合程度达到 80%及胰蛋白酶被消耗后,按照 1:2 进行传代培养。将培养的第 3 代 BMMSCs 用于实验。

2.3 细胞转染

将细胞接种至 6 孔板,每孔接种 4×10<sup>5</sup> 个细胞,于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养过夜。待细胞融合度达 70%~80%后进行转染,转染前 2~4 h,将培养基更换为无血清无双抗的培养基,每孔 2 mL。向培养板中加入适量的 GLUL 敲低/对照慢病毒(sh-GLUL/sh-NC)或过表达/对照载体(OE-GLUL/OE-NC),将培养板放回 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 转染 5 h,提取稳转株细胞的 RNA 和蛋白质。通过 qRT-PCR、Western blot 验证 GLUL mRNA 和蛋白的表达水平。所有慢病毒均构建包装于湖南讴睿生物科技有限公司,病毒序列如下。shGLUL-1 正向引物:gatccCAGCAAGTTCCC-ACTTGAACActcgag TGTTC AAGTGGGA ACTTGCTG-tttttg;shGLUL-1 反向引物:aattcaaaaaCAGCAAGTTC-CCACTTGAACActcgagTGTTC AAGTGGGA ACTTGCTG-gg;干扰空载:pLVX-shRNA2-puro;GLUL-OE 正向引物:GGACTCAGATCTCGAGgccaccATGGCCACCT-CAGCAAGTTC;GLUL-OE 反向引物:TAGAGTCG-CGGGATCCTTAGTTCTTGTATTGGAAGGGCTCG;过表达空载:pLVX-puro。

2.4 分组与干预

对照组(CONTROL 组):以 BMMSCs 完全培养基培养 BMMSCs;THSWD 组分为空白对照组(THSWD 组)、GLUL 敲低对照组(THSWD+sh-NC 组)和 GLUL 过表达对照组(THSWD+OE-NC 组);BMMSCs 细胞在 T25 培养瓶中培养至 80%融合,加入 100 ng/mL THSWD 含药血清,THSWD 不做处理,剩余两组分别使用 sh-NC、OE-NC 对照慢病毒转染 BMMSCs,干预培养 24 h 后,再将培养基换成 THSWD 细胞完全培养基继续培养 24 h。敲低 GLUL 和联合 THSWD 干预组(THSWD+sh-GLUL 组)、过表达 GLUL 和联合 THSWD 干预组(THSWD+OE-GLUL 组);BMMSCs 细胞在 T25 培养瓶中培养至 80%融合,加入 100 ng/mL THSWD 含药血清,分别使用 sh-GLUL、OE-GLUL 慢病毒转染 BMMSCs,干预培养 24 h 后,再将培养基换成 BMMSCs 细胞完全培养基继续培养 24 h。将收

集的培养上清液以 300×g 离心 10 min,最后用 0.22 μm 的滤膜过滤除去细胞碎片,获得的培养上清液用于后续检测。

2.5 CCK-8 检测

按 6×10<sup>4</sup> 个/mL 的密度将 BMMSCs 细胞接种于 96 孔板中,将培养板放在培养箱(37 ℃、5% CO<sub>2</sub>)中预培养 24 h。向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在培养箱内孵育 2 h,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

2.6 qRT-PCR 检测

利用 TRIzol 试剂盒从细胞中提取总 RNA。使用反转录试剂盒将 1 μg 总 RNA 用作 cDNA 合成的模板,并使用 SYBR 预混 Taq DNA 聚合酶进行 qRT-PCR 检测,应用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法计算基因和核糖体 RNA (rRNA)的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息  
Table 1 Primer sequence information

| 名称        | 引物序列(5'-3')             | 长度/bp |
|-----------|-------------------------|-------|
| 5s rRNA   | 正向:CTACAGCCATACCACCCGGA | 20    |
|           | 反向:GTATCCCAGGTGGTCTCCCA | 20    |
| 5.8s rRNA | 正向:CTTAGCGGTGGATCACTCGG | 20    |
|           | 反向:GCAAGTGCCTTCCAAGTGC  | 20    |
| 18s rRNA  | 正向:AGCTAATACATGCCGACGGG | 20    |
|           | 反向:TAGGGCAGACGTTCAATGG  | 20    |
| 28s rRNA  | 正向:CGACCTCAGATCAGACGTGG | 20    |
|           | 反向:CCTGTTCACCTGCCGTTACT | 20    |
| GAPDH     | 正向:GCCTTCGCTGTTCTACCC   | 20    |
|           | 反向:CGCCTGCTTCACCACCTTCT | 20    |

2.7 细胞划痕实验

将 BMMSCs 以 1×10<sup>6</sup> 个细胞/孔的密度接种在 6 孔板上。细胞生长到 85%~90%融合时,用一次性无菌吸头刮取细胞,制成划痕伤口。用 PBS 冲洗细胞 2 次,并在含有 2% FBS 和 100 ng/mL 虹膜苷的 α-MEM 或相同体积的 PBS 中培养。孵育 24、48 h 后,使用倒置相差显微镜拍摄伤口区域,并使用 Image-Pro Plus 软件计算伤口愈合的相对百分比。

2.8 茜红素染色

在 CONTROL 组和 THSWD 组(100 ng/mL)诱导成骨 21 d 后,用 4%多聚甲醛固定 BMMSCs 15 min,用 0.1%茜素红在室温下染色 30 min。用 PBS 冲洗细胞 2 次以去除多余染料,用倒置相差显微镜观察。

2.9 网络药理学分析

(1)TCMSP 数据库分析 THSWD 复方中桃仁、

红花、生地黄、赤芍、当归、川芎的主要活性成分及其药物靶点基因,基于阈值口服生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ 、药物相似性(drug-likeness, DL)  $> 0.2$  筛选 THSWD 中潜在活性成分。利用 PubChem 数据库获取成分的作用靶点。(2)从 GEO 数据库下载 GSE18043(包含 9 例成骨分化 1、3、7 d 的样本,3 例对照样本)和 GSE178679 芯片(包含 3 例成骨分化的样本、3 例对照样本),利用 limma 包对数据集进行差异表达分析,筛选标准为  $(\log_2FC) > 1, P < 0.05$ 。(3)文献获取核糖体生成相关的基因<sup>[12]</sup>,并基于 GSE18403 和 GSE178679 芯片分析差异基因的表达。(4)采用 Cytoscape 3.11.0 软件构建 THSWD 复方的主要活性成分与药物靶点基因的网络图和活性成分-药物靶点基因及其富集通路网络图,评估活性成分与药物靶点基因及影响成骨分化的相关通路的关系。

## 2.10 Western blot 检测

收集样品用 PBS 洗涤 2 次,再放入 RIPA 裂解缓冲液中裂解,用 8%~10% 凝胶 SDS-PAGE 分离不同细胞提取物中等量的蛋白。将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭膜,然后用一抗

(所有一抗均来源于兔;GAPDH 稀释比例为 1:5 000, ALP、Osx、Runx2、GLUL、NICD、NOTCH1、HES1 稀释比例均为 1:1 000)进行孵育。用与一抗种属对应的二抗孵育(山羊抗兔,稀释比例为 1:5 000),使用增强化学发光试剂观察阳性信号。使用化学发光成像仪对数据进行量化,ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值。

## 2.11 统计学方法

本实验数据采用 GraphPad 6.0 处理,数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,所有体外数据均来自 3 个独立实验,采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析, $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组 BMMSCs 成骨分化比较

与 CONTROL 组比较,THSWD 组 ALP、Osx、Runx2 蛋白表达水平增加( $P < 0.01$ )。BMMSCs 染色结果为阳性,表明细胞中存在钙盐沉积。详见图 1。

### 3.2 各组成骨过程中核糖体生成相关因子表达水平比较

与 CONTROL 组比较,THSWD 组 RNA 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 表达水平均增加( $P < 0.01$ )。详见图 2。

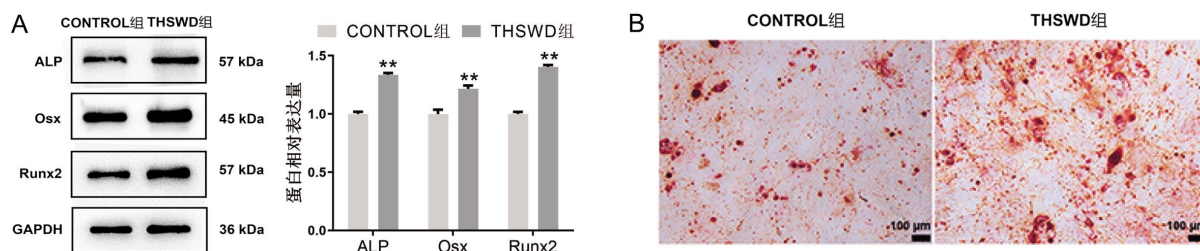


图 1 各组 BMMSCs 成骨分化情况比较

Fig.1 Comparison of osteogenic differentiation of BMMSCs among groups

注:A. 各组 ALP、Osx、Runx2 蛋白表达水平比较;B. 各组茜红素染色结果( $\times 100$ )。与 CONTROL 组比较,\*\* $P < 0.01$ 。

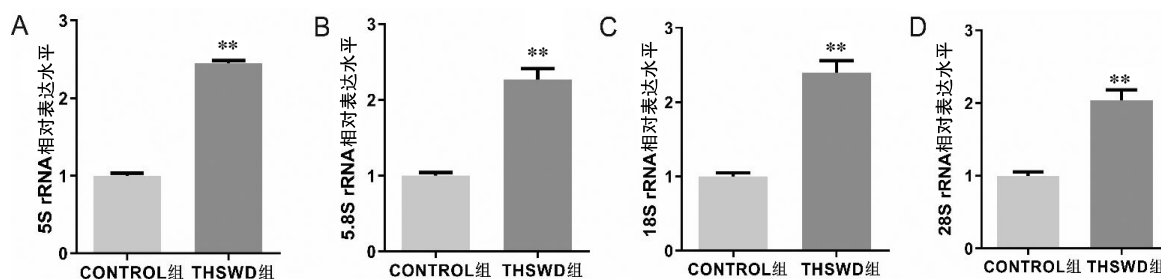


图 2 各组核糖体生成相关因子 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 表达水平比较

Fig.2 Comparison of expression levels of ribosome biogenesis-related factors (5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA, and 28S rRNA) among groups

注:与 CONTROL 组比较,\*\* $P < 0.01$ 。



### 3.3 THSWD 主要活性成分及核心药物靶点基因筛选

通过 TCMSP 数据库筛选出 THSWD 复方中 13 个主要活性单体,利用 PubChem 数据库共挖掘出 5 423 个药物靶点基因。基于 GSE18043 芯片数据筛选出 2 127 个具有显著性差异的基因( $|\log FC| > 1$ ,  $P < 0.05$ )(图 3A);基于 GSE178679 芯片数据筛选出 2 444 个具有显著性差异的基因( $|\log FC| > 1$ ,  $P < 0.05$ , 图 3B)。在这两套数据集中,共有 123 个差异药物靶点基因,且其中 98 个差异靶点在两套数据中的表达

趋势一致(图 3C)。在已获得的 331 个核糖体生成相关基因中,仅识别出 1 个与核糖体生成相关的差异基因,即 GLUL(图 3D),且其在成骨分化的样本中显著上调(图 3E~F)。进一步分析 THSWD 复方的主要活性成分与药物靶点基因的相关性发现,二者之间存在相互作用关系(图 4A)。富集通路分析主要活性成分的药物靶点基因发现,THSWD 复方主要活性成分可作用于槲皮素、木犀草素、汉黄芩素、豆甾醇等多个靶点,并通过这些靶点共同调控多条信号通路和生物学过程的复杂模式(图 4B)。

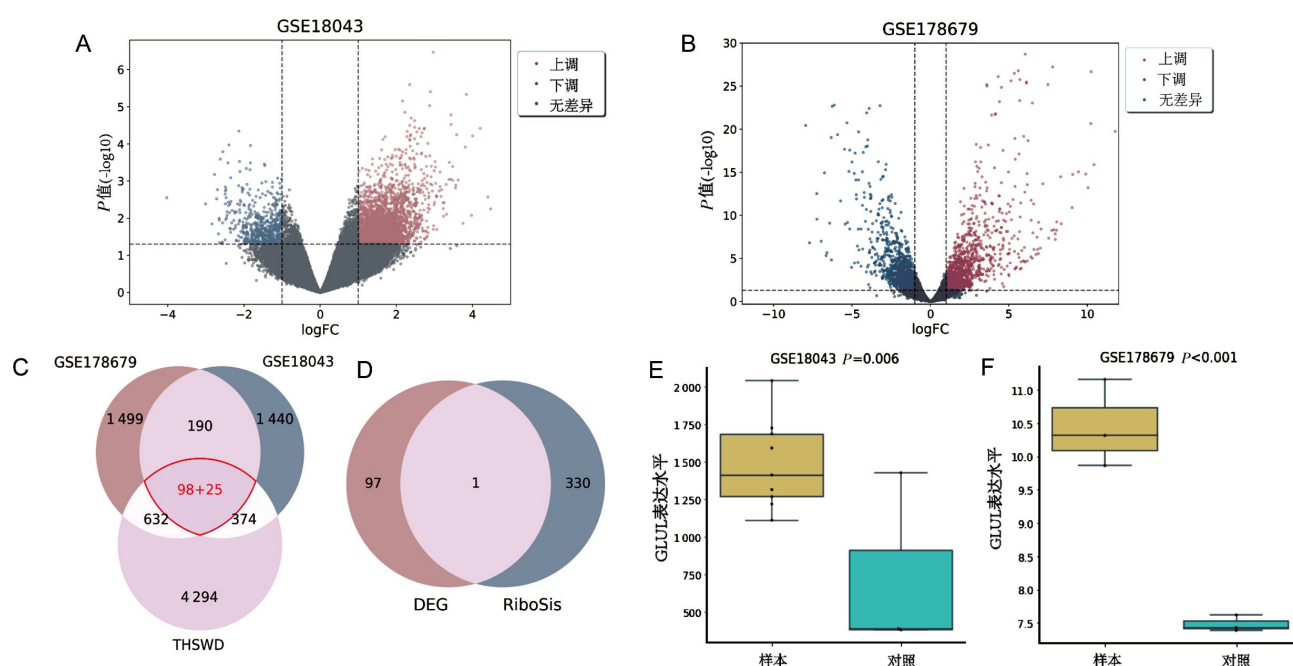


图 3 THSWD 的网络药理学分析

Fig.3 Network pharmacology analysis of THSWD

注:A.芯片 GSE18043 差异分析图;B.芯片 GSE178679 差异分析图;C.芯片 GSE18043 和 GSE178679 中的药物靶点基因;D.核糖体生物发生差异基因;E.GSE18043 芯片中核糖体相关分析及 GLUT 表达变化图;F.GSE178679 芯片中核糖体相关分析及 GLUT 表达变化图。

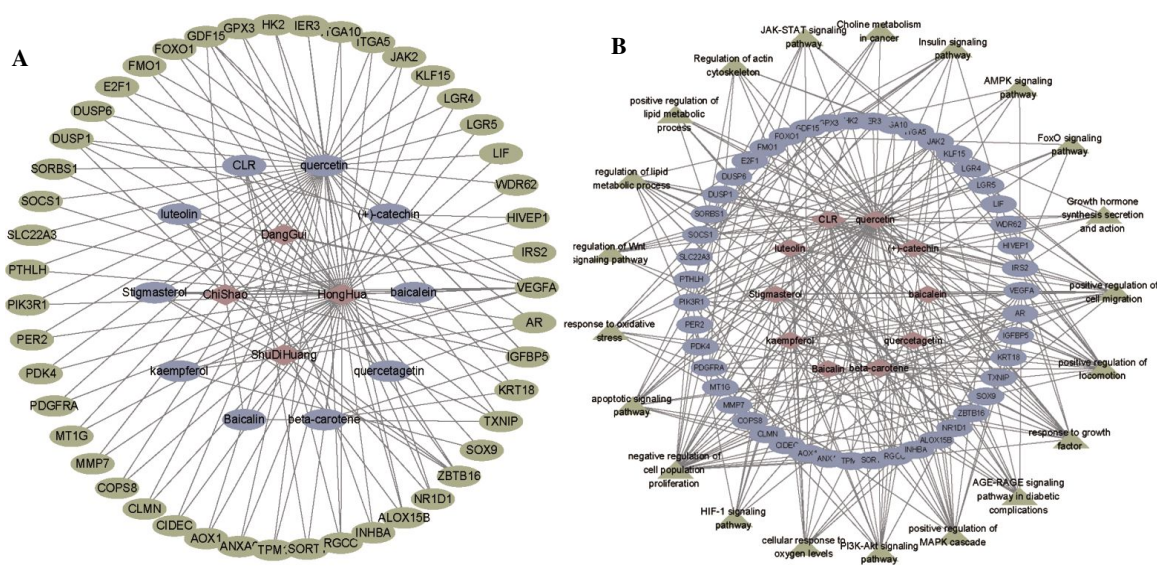


图 4 THSWD 主要活性成分-药物靶点基因及通路富集网络图

Fig.4 Network diagram of THSWD main active ingredients-drug target genes and enriched pathways

注:A.活性成分-药物靶点基因网络图;B.主要活性成分-药物靶点基因-富集通路网络图。

### 3.4 各组 BMMSCs 功能及 NOTCH 信号通路指标比较

与 THSWD+sh-NC 组比较,THSWD+sh-GLUL 组 GLUL 表达水平降低( $P<0.01$ );与 THSWD+OE-NC 组比较,THSWD+OE-GLUL 组 GLUL 表达水平升高( $P<0.01$ ),表明敲低/过表达 GLUL 模型建立成功(图 5)。

与 THSWD+sh-NC 组比较,THSWD+sh-GLUL 组细胞增殖能力在 72 h 后降低( $P<0.01$ ),ALP、O<sub>sx</sub>、Runx2 蛋白表达水平下调( $P<0.01$ ),细胞迁移距离及愈合率在 24 h 和 48 h 时均下降( $P<0.01$ ),5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 表达及 NICD、NOTCH1、

HES1 蛋白表达均下降( $P<0.01$ )。与 THSWD+OE-NC 组比较,THSWD+OE-GLUL 组细胞增殖能力在 48 h 和 72 h 时增加( $P<0.01$ ),ALP、O<sub>sx</sub>、Runx2 蛋白表达水平上调( $P<0.01$ ),细胞迁移距离及愈合率在 24 h 和 48 h 时均增加( $P<0.01$ ),5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA 表达及 NICD、NOTCH1、HES1 蛋白表达水平均增加( $P<0.01$ )。详见图 6—7。

## 4 讨论

骨折愈合是骨折断端重新建立骨的连续性或完整性的过程,涉及抗炎、成骨以及血管新生等多个阶段<sup>[3]</sup>。其中,BMMSCs 的成骨分化是关键环节<sup>[4]</sup>。THSWD

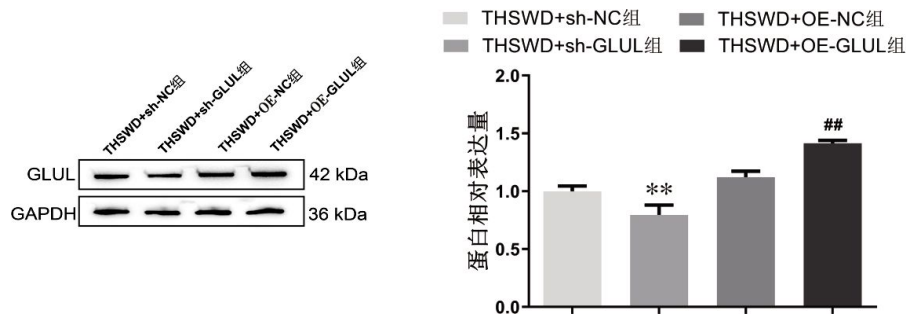


图 5 各组 GLUL 转染效率比较

Fig.5 Comparison of GLUL transfection efficiency among groups

注:与 THSWD+sh-NC 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 THSWD+OE-NC 组比较,## $P<0.01$ 。

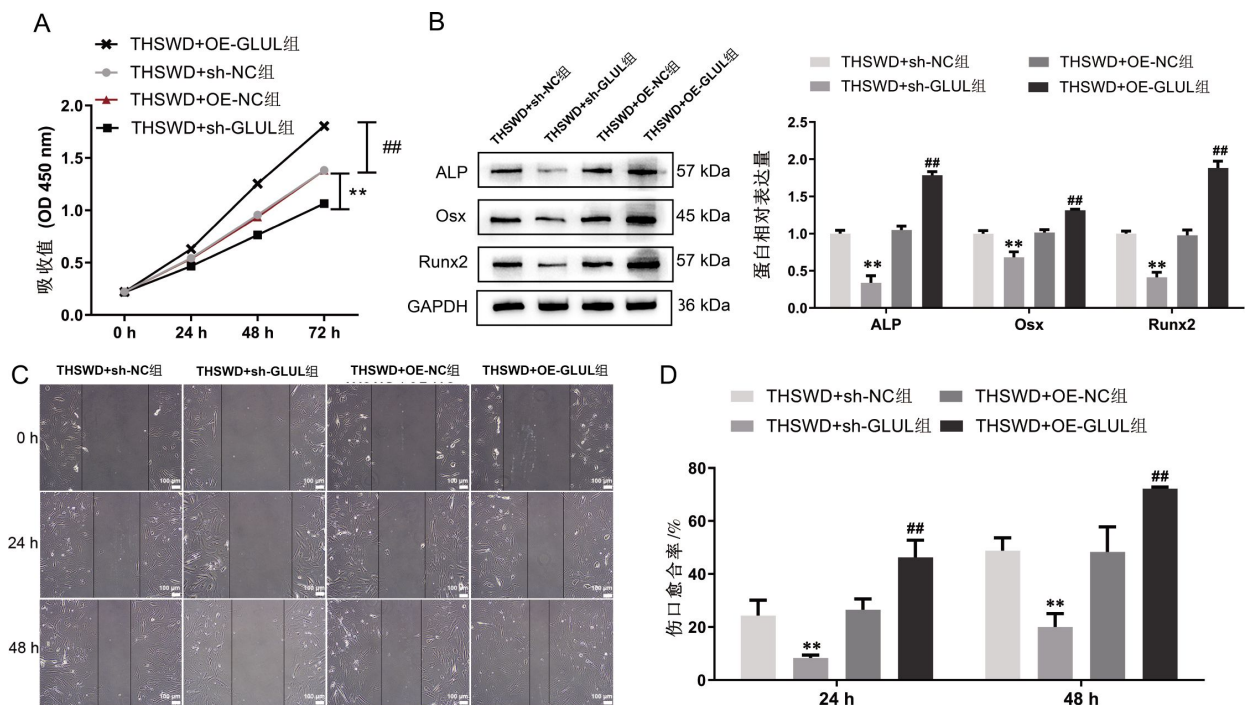


图 6 各组 BMMSCs 成骨分化水平比较

Fig.6 Comparison of BMMSCs osteogenic differentiation levels among groups

注:A.各组细胞活力比较;B.各组 ALP、Osx、Runx2 蛋白表达比较;C.各组细胞的迁移距离比较;D.各组伤口愈合率比较。与 THSWD+sh-NC 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 THSWD+OE-NC 组比较,## $P<0.01$ 。

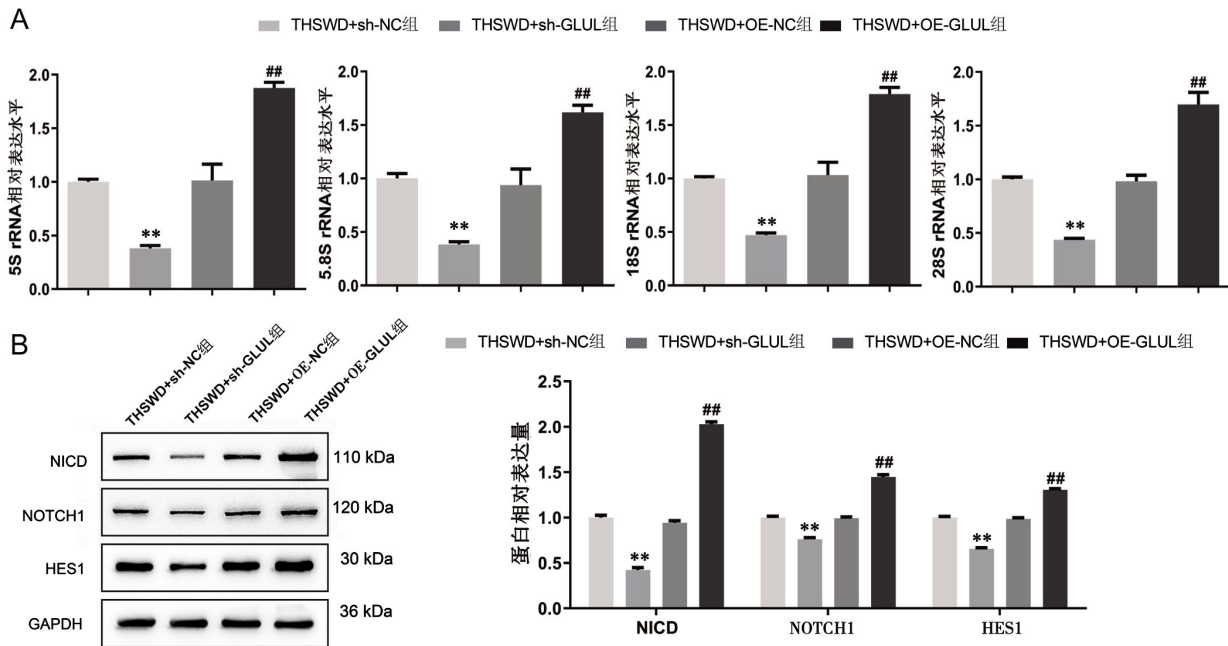


图 7 各组 NOTCH 通路相关指标表达水平比较

Fig.7 Comparison of expression levels of NOTCH pathway-related indicators among groups

注:A.各组 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 表达水平比较;B.各组 NICD、NOTCH1、HES1 蛋白表达水平比较。与THSWD+sh-NC 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 THSWD+OE-NC 组比较,## $P<0.01$ 。

是活血化瘀的代表方剂之一,具有抗炎、镇痛及促血管生成等作用,已广泛应用于临床骨折治疗<sup>[1]</sup>。既往研究表明,THSWD 可上调骨痂中血管内皮生长因子表达,促进 BMMSCs 成骨分化,加速骨折修复<sup>[14-15]</sup>,但其内在机制尚未完全明晰。因此,本研究拟以细胞实验为基础,验证 THSWD 含药血清对 BMMSCs 增殖与成骨分化的影响,并从分子生物学角度深入探讨活血化瘀类中药促进成骨修复的潜在机制。

核糖体生成作为细胞生命活动的核心环节,在细胞增殖、分化和成骨中起至关重要的作用<sup>[16]</sup>。近年研究发现,核糖体生成不仅通过补体途径调控间充质干细胞的成骨分化<sup>[17]</sup>;还通过调控非编码 RNA 翻译及参与炎症信号通路,实现对成骨分化的精准调控<sup>[18]</sup>。特别是在骨质疏松相关骨脂失衡模型中,核糖体生成被证实是成骨分化的重要启动信号<sup>[19]</sup>。鉴于 BMMSCs 在骨折修复中通过介导成骨-成血管耦联机制发挥关键作用,及 THSWD 促进 BMMSCs 成骨分化以加速骨折修复的作用<sup>[20-21]</sup>,本研究探讨 THSWD 对 BMMSCs 中核糖体生成及其成骨分化作用机制的具体影响。采用 Western blot 和茜素红染色方法,观察到 THSWD 能显著升高成骨标志蛋白 ALP、Ossx 和 Runx2 的表达水平,促进钙结节形成,明显上调 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA 的表

达量,提示 THSWD 可能通过激活核糖体生成途径促进 BMMSCs 的成骨分化。该结果为阐明活血化瘀中药促进骨折愈合的分子机制提供了新的实验依据。

本研究通过网络药理学分析推测 THSWD 可能通过调控核糖体生成的关键因子 GLUL 影响 BMMSCs 成骨分化。GLUL 作为催化谷氨酸代谢的关键酶,在 rRNA 代谢、ncRNA 加工及核糖体组装等过程发挥重要作用<sup>[22]</sup>。GLUL 通过催化谷氨酸和氨转化为谷氨酰胺,维持细胞内氨基酸代谢平衡,在成骨细胞信号转导中发挥重要作用<sup>[23]</sup>。多项研究表明,GLUL 表达异常与多种骨骼疾病密切相关:在失重状态下,GLUL 上调与骨骼肌萎缩密切相关<sup>[24]</sup>;靶向抑制 GLUL 可显著影响血管重构过程<sup>[25]</sup>。这些发现提示 GLUL 可能是连接代谢调控与骨修复的关键分子。本研究首次证实 GLUL 在 THSWD 的促成骨效应中发挥重要调控作用:GLUL 敲除可显著减弱 THSWD 对 BMMSCs 增殖、迁移和成骨分化的促进作用,同时抑制核糖体生成关键因子和 NOTCH 信号通路关键分子及其靶基因 HES1 的表达水平;而 GLUL 过表达则呈现相反的效果。这些结果首次揭示 GLUL 是 THSWD 促成骨作用的关键介质,其通过协同调控核糖体生成和 NOTCH 信号通路发挥作用,为骨折治疗提供了新的潜在靶点。



综上所述,本研究从代谢调控角度出发,首次提出 GLUL-核糖体生成-NOTCH 信号轴在 THSWD 促成骨作用中的关键作用,为进一步揭示中药复方调控干细胞命运提供了新的研究视角。但本研究仍存在一定局限性:如相关结论主要来源于体外细胞实验,缺乏体内模型验证;目前尚不能明确 GLUL 是否为 THSWD 的直接作用靶点,缺乏明确的活性成分与靶标之间的结合证据。因此,后续研究需进一步结合多模型验证、多组学分析及活性成分-靶点筛选等手段,系统完善作用机制解析,并在此基础上推动其向临床前研究与转化应用的深入发展。

## 参考文献

- [1] 曾 朋, 陆小龙, 徐无忌, 等. 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.
- [2] 申泽薇, 魏玉虾, 余灿清, 等. 中国 10 个地区成年人骨折住院率的描述性分析[J]. 中华流行病学杂志, 2021, 42(5): 771-779.
- [3] MICK P, FISCHER C. Delayed fracture healing[J]. Seminar in Musculoskeletal Radiology, 2022, 26(3): 329-337.
- [4] 刘 琪, 李玉生, 杨 程, 等. 骨髓间充质干细胞的成软骨分化及其在骨关节炎软骨损伤修复中的研究进展[J]. 医学综述, 2023, 29(6): 1041-1048.
- [5] 吴 昊, 龚志贤, 卢 敏, 等. 黄栀理伤贴膏对兔膝关节炎滑膜组织 TLR4/MyD88 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(7): 1195-1202.
- [6] 马 川, 吴彦欣, 李敏敏, 等. 经典名方桃红四物汤抗血栓药作用及其机制研究[J]. 中草药, 2024, 55(23): 8035-8045.
- [7] 冯海波. 从外泌体 MiR-126-VEGF/Notch 信号轴探究桃红四物汤对创伤性 ANFH 大鼠血管新生的分子机制[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [8] 周文佳, 尚云峰, 朱文新, 等. 基于 Hippo-YAP 信号通路探讨桃红四物汤对 BMSCs 增殖与成骨分化的影响 [J]. 中国中医急症, 2022, 31(4): 576-579.
- [9] LU X, LI J, ZHOU B, et al. Taohong Siwu Decoction enhances human bone marrow mesenchymal stem cells proliferation, migration and osteogenic differentiation via VEGF-FAK signaling in vitro[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 307: 116203.
- [10] PAN X, YE L, GUO X, et al. Glutamine production by Glul promotes thermogenic adipocyte differentiation through Prdm9-mediated H3K4me3 and transcriptional reprogramming[J]. Diabetes, 2023, 72(11): 1574-1596.
- [11] 冯海波, 王怡璇, 姚金龙, 等. 桃红四物汤对创伤性股骨头坏死大鼠组织形态学及 VEGFR2、Dll4 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(7): 1188-1193.
- [12] ZANG Y, RAN X, YUAN J, et al. Genomic hallmarks and therapeutic targets of ribosome biogenesis in cancer[J]. Briefings in Bioinformatics, 2024, 25(2): 1-13.
- [13] 李承满, 王 飞. 柚皮苷促进骨折愈合的作用机制研究进展[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(5): 1272-1277.
- [14] WANG W J, DUAN X Y, WANG W. Mechanism of Taohong Siwu Decoction in treating soft tissue injury based on UPLC-Q-TOF-MS, network pharmacology and experimental verification[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(12): 3043-3051.
- [15] LI W, LI T, TANG Z, et al. Taohong Siwu decoction promotes the process of fracture healing by activating the VEGF-FAK signal pathway and systemically regulating the gut microbiota[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 133(3): 1363-1377.
- [16] 李玲慧, 王尚全, 孙 凯, 等. 杜仲苷调控核糖体生成抑制髓核细胞损伤和细胞外基质降解的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(21): 5713-5720.
- [17] JARIYASAKULROJ S, ZHANG W, BAI J, et al. Ribosome biogenesis controls cranial suture MSC fate via the complement pathway in mouse and human iPSC models[J]. Stem Cell Reports, 2023, 18(12): 2370-2385.
- [18] LIU H, FAN Z P, YANG Q B, et al. Analysis of differential translation profiles of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation[J]. The Chinese Journal of Dental Research, 2025, 28(1): 31-43.
- [19] ZHANG Z, TAO Z, ZHANG Y, et al. Integrative analyses of genetic mechanisms responsible for bone-fat imbalance in osteoporosis [J]. The Journal of Gene Medicine, 2024, 26 (11): e3739.
- [20] 敖江鹏. 改良桃红四物汤联合切开复位内固定术治疗血瘀证创伤性四肢骨折患者的效果[J]. 中国医学创新, 2025, 22(21): 54-58.
- [21] 魏 进. 桃红四物汤治疗气滞血瘀型老年髋部骨折围手术期临床观察[J]. 内蒙古中医药, 2025, 44(5): 8-10.
- [22] CHEN J, ZHANG D, ZHU C, et al. Explainable machine learning reveals ribosome biogenesis biomarkers in preeclampsia risk prediction[J]. Frontiers in Immunology, 2025, 16: 1595222.
- [23] OLKKU A, BODINE P V, LINNALA-KANKKUNEN A, et al. Glucocorticoids induce glutamine synthetase expression in human osteoblastic cells: A novel observation in bone[J]. Bone, 2004, 34(2): 320-329.
- [24] 薛慧敏, 宁婧鑫, 李 霞, 等. 谷氨酰胺合成酶上调促发模拟失重小鼠骨骼肌萎缩的分子机制[J]. 延安大学学报 (医学科学版), 2025, 23(2): 18-23.
- [25] ZHANG M, LU X, LUO L, et al. Targeting glutamine synthetase with AS1411-modified exosome-liposome hybrid nanoparticles for inhibition of choroidal neovascularization[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 1-16.

(本文编辑 周 旦)