

本文引用: 陆 云, 胡 玉, 陈军辉. 乳香-没药含药血清通过 p38 MAPK 信号通路促进 BMMSCs 成软骨分化的机制研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(9): 1653-1662.

乳香-没药含药血清通过 p38 MAPK 信号通路促进 BMMSCs 成软骨分化的机制研究

陆 云¹, 胡 玉², 陈军辉^{2*}

1. 新疆医科大学第六附属医院脊柱三科、骨与软组织肿瘤科, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学第六附属医院
药学部, 新疆 乌鲁木齐 830000

〔摘要〕 目的 探究乳香-没药含药血清对骨髓间充质干细胞(BMMSCs)成软骨分化的影响及其作用机制。方法 采用全骨髓贴壁法从大鼠双侧股骨和胫骨中分离 BMMSCs, 观察其形态并通过流式细胞术进行鉴定; CCK-8 实验筛选乳香-没药含药血清促进 BMMSCs 增殖的最佳含量; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导 BMMSCs 建立体外炎症微环境, 并用 CCK-8 实验筛选其作用浓度; 将 BMMSCs 分为空白组、TNF- α 组、TNF- α +乳香-没药含药血清组和 TNF- α +塞来昔布组, 用 10 ng/mL TNF- α 、10%乳香-没药含药血清或 10 μ mol/L 塞来昔布处理 BMMSCs 后, CCK-8 实验检测各组 BMMSCs 活力, TUNEL 法检测各组 BMMSCs 凋亡, 阿利新蓝染色检测各组 BMMSCs 中基质蛋白糖胺聚糖生成, Western blot 检测软骨分化标志基因 Sox9、II 型胶原(Col II)、聚集蛋白聚糖(Aggregan)及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路相关蛋白表达。结果 分离的 BMMSCs 呈长梭形、多角形, 排列整齐且呈漩涡状生长, CD44、CD90、CD105 为阳性表达, CD34、CD45、HLA-DR 为阴性表达, 符合 BMMSCs 特征。2.5%、5%、10%的乳香-没药含药血清干预的 BMMSCs 活力升高($P<0.05$), 20%、25%的乳香-没药含药血清干预的 BMMSCs 活力降低($P<0.05$); 而 5、10、15、20、25、30 ng/mL 的 TNF- α 处理的 BMMSCs 活力均降低($P<0.05$)。与空白组比较, TNF- α 组 BMMSCs 活力降低($P<0.05$), 凋亡率升高($P<0.05$), 阿利新蓝标记的蓝染细胞减少, 细胞中 Sox9、Col II、Aggrecan 蛋白相对表达量下调($P<0.05$), p-p38/p38、p-JNK/JNK 蛋白相对表达比值升高($P<0.05$); 与 TNF- α 组比较, TNF- α +乳香-没药含药血清组和 TNF- α +塞来昔布组的 BMMSCs 活力升高($P<0.05$), 凋亡率降低($P<0.05$), 阿利新蓝标记的蓝染细胞增多, 细胞中 Sox9、Col II、Aggrecan 蛋白相对表达量上调($P<0.05$), p-p38/p38、p-JNK/JNK 蛋白相对表达比值降低($P<0.05$)。结论 乳香-没药含药血清可以促进炎症环境下 BMMSCs 增殖, 并诱导其成软骨分化, 该机制可能与调控 p38 MAPK 信号通路有关。

〔关键词〕 乳香-没药含药血清; 骨髓间充质干细胞; 成软骨分化; 肿瘤坏死因子- α ; p38 丝裂原活化蛋白激酶

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.09.009

Mechanism of Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum in promoting chondrogenic differentiation of BMMSCs through the p38 MAPK signaling pathway

LU Yun¹, HU Yu², CHEN Junhui^{2*}

1. Department of Spine III and Department of Bone and Soft Tissue Oncology, The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical

〔收稿日期〕 2025-07-01

〔基金项目〕 新疆医科大学第六附属医院(第六临床医学院)科研专项基金项目(LFYKYZXJJ2024016); 新疆医科大学第六附属医院临床药学重点专科基金资助项目(202401)。

〔通信作者〕 * 陈军辉, 男, 主任药师, E-mail: 295753926@qq.com。

University, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 2. Department of Pharmacy, The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China

[Abstract] Objective To investigate the effects of Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum on chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) and its mechanism of action. **Methods** The whole bone marrow adherence method was employed to isolate BMMSCs from the bilateral femur and tibia of rats, and the cell morphology was observed and identified by flow cytometry. The CCK-8 assay was used to determine the optimal concentration of Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum for promoting BMSC viability. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) was used to induce BMMSCs to establish an in vitro inflammatory microenvironment, and its effective concentration was determined by CCK-8 assay. The BMMSCs were divided into blank group, TNF- α group, TNF- α +Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum group, and TNF- α +celecoxib group. Cells in each group were treated with 10 ng/mL TNF- α , 10% Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum, or 10 μ mol/L celecoxib. After the treatment, BMSC viability was measured by CCK-8 assay, apoptosis by TUNEL staining, glycosaminoglycan deposition in the extracellular matrix by Alcian blue staining, and expression of chondrogenic differentiation markers, including Sox9, collagen II (Col II), and aggrecan, as well as key proteins in the p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway by Western blot. **Results** The isolated BMMSCs were spindle- or polygon-shaped, neatly arranged in a whirlpool-like pattern, positive for CD44, CD90, and CD105, and negative for CD34, CD45, and HLA-DR, consistent with the BMSC characteristics. The viability of BMMSCs treated with 2.5%, 5%, and 10% Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum increased ($P<0.05$), while that treated with 20% and 25% Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum decreased ($P<0.05$); the BMSC viability treated with 5, 10, 15, 20, 25, and 30 ng/mL TNF- α was reduced ($P<0.05$). Compared with the blank group, the TNF- α group showed reduced viability ($P<0.05$), increased apoptosis ($P<0.05$), and fewer Alcian blue-stained cells. Additionally, the relative protein expression levels of Sox9, Col II, and aggrecan were downregulated ($P<0.05$), while the ratios of p-p38/p38 and p-JNK/JNK were elevated ($P<0.05$). Compared with the TNF- α group, both the TNF- α +Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum and TNF- α +celecoxib groups showed improved viability ($P<0.05$), reduced apoptosis ($P<0.05$), and increased Alcian blue-stained cells. The relative protein expression levels of Sox9, Col II, and aggrecan were upregulated ($P<0.05$), while the ratios of p-p38/p38 and p-JNK/JNK decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum can promote the proliferation of BMMSCs in inflammatory environments and induce their chondrogenic differentiation. This mechanism may be related to the regulation of the p38 MAPK signaling pathway.

[Keywords] Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum; bone marrow mesenchymal stem cells; chondrogenic differentiation; tumor necrosis factor- α ; p38 mitogen-activated protein kinase

椎间盘退变是一种由椎间盘组织老化及机械性损伤引起的退行性病变,最终可导致显著的病理改变及临床症状。腰痛是椎间盘退变最常见的临床表现之一,易演变为慢性疼痛,严重时可引发功能障碍甚至残疾^[1]。目前,临床上主要采取保守治疗方式,如卧床休息、非甾体抗炎药、物理康复等,对于病情进展至晚期的患者,需实施椎板切除术、椎间盘切除

术、脊柱融合术等手术进行干预^[2]。然而,现有的治疗方法多以缓解症状为主,无法有效逆转椎间盘退变的病理进程。终板软骨细胞位于软骨终板,通过调控细胞外基质的合成,维持终板结构完整性和营养供应。在椎间盘退变过程中,终板软骨细胞出现功能障碍并发生凋亡,导致基质降解加剧及营养运输受阻,进一步促进椎间盘组织的结构破坏和功能恶

化^[3]。因此,如何恢复终板软骨细胞的数量和功能对于延缓或治疗椎间盘退变意义重大。

近年来,干细胞介导的组织再生是一种极具前景的软骨修复手段。间充质干细胞因其高增殖、高可塑性及多向分化潜能的优势,成为组织再生领域中应用价值较高的细胞来源。以间充质干细胞为基础的替代修复策略已广泛应用于骨关节炎、骨质疏松症和多种自身免疫性疾病的研究与治疗^[4-6]。间充质干细胞可从多种组织中分离获得,例如脐带、脐带血、骨髓、脂肪组织等,其中,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)增殖能力强,能够分化为软骨细胞和成骨细胞,被广泛应用于骨科临床治疗中^[7]。然而,BMMSCs向软骨表型分化的过程并非自发进行,而是依赖于特定的诱导微环境及调控因子的作用。乳香-没药是橄榄科植物中常用的一对树脂药材,乳香具有活血止痛、消肿生肌等功效,没药则以活血散瘀、消炎止痛见长。二者常配伍使用,相辅相成,具有良好的协同作用,广泛用于治疗多种慢性炎症性疾病,包括类风湿关节炎、肌肉骨骼疼痛及椎间盘退变等^[8-9]。但其具体作用机制尚不明确,也尚未见乳香-没药对BMMSCs成软骨分化的相关研究。因此,本研究通过观察乳香-没药含药血清对炎症微环境下BMMSCs成软骨分化的影响,初步探究其作用机制,旨在为乳香-没药修复椎间盘退变损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验大鼠

SPF级雄性SD大鼠12只,6周龄,体质量(200±20)g,购自新疆医科大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(新)2023-0005。其中6只用于乳香-没药含药血清制备,另外6只用于BMMSCs分离。大鼠饲养于温度(22±2)℃、相对湿度55%±5%、12 h/12 h光暗交替的动物房中,其间自由摄食、饮水。本研究的动物实验获得本院伦理委员会批准(伦理号:IACUC202501013),实验均按照《实验动物管理条例》进行,严格遵循3R原则。

1.2 主要试剂与仪器

乳香、没药购自苏州市天灵中药饮片有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)购自美国PeproTech公司(批号:300-01A);胰蛋白酶购自北京索莱宝科技公司(批号:T1300); α -MEM完全培养基购自美国Gibco公司(批号:12571-063);胎牛血清购自杭州四季青公司(批号:13011-8611);CCK-8试剂盒购自南京凯基生物公司(批号:KGA317-1);TUNEL凋亡细胞染色试剂盒(批号:C1098)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0012)、RIPA裂解液(批号:P0013B)购自上海碧云天生物科技公司;4',6-二氨基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自深圳欣博盛生物科技有限公司(批号:H-1200-10);阿利新蓝染色试剂盒购自无锡天萃生物科技有限公司(批号:YBEF0011);增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)购自武汉纯度生物科技有限公司(批号:CD-103020GM);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的CD44、CD90、CD105抗体及藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的CD34、CD45、HLA-DR抗体均购自美国BioLegend公司(批号:338806、328106、323206、304005、307605、304005);GAPDH抗体、Sox9抗体、II型胶原(collagen II, Col II)、聚集蛋白聚糖(Aggregan)抗体、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)抗体、磷酸化p38(phospho-p38, p-p38)抗体、c-Jun N-端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)抗体、磷酸化JNK(phospho-JNK, p-JNK)抗体以及抗兔或抗小鼠IgG抗体均购自英国Abcam公司(批号分别为:ab9485、ab185230、ab34712、ab36861、ab31828、ab47363、ab179461、ab131499、ab6721、ab6789)。

倒置显微镜(型号:IX73)购自上海光学仪器厂;流式细胞仪(型号:FACSCanto II)购自贝克曼库尔特有限公司;多功能酶标仪(型号:MX-7000)购自广州市美瑞实验仪器有限公司;荧光显微镜(型号:BX53)购自北京光明仪器有限公司;蛋白质定量仪(型号:Nanodrop 2000c)购自美国Thermo Fisher

Scientific 公司;电泳仪(型号:Mini-PROTEAN Tetra Cell)购自美国 Bio-Rad 公司;高速冷冻离心机(型号:Eppendorf 5810R)购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 乳香-没药含药血清的制备 6 只 SD 大鼠于每日早晚各灌胃 1 次(按 1:1 比例配制的乳香-没药混合提取液 2 mL),按 6.72 g/kg 剂量连续灌胃 7 d。末次给药前禁食不禁水 12 h,于末次灌胃后 2 h 麻醉大鼠,经腹主动脉采集全血。每只大鼠平均采血量为 8~10 mL,可获得血清 4~5 mL,总产量为 24~30 mL。根据后续细胞实验分组及用量计算,CCK-8、TUNEL、阿利新蓝染色及 Western blot 等实验均采用 10%含药血清工作浓度,单孔用量 0.1~0.5 mL,按每组设置 6 个复孔及多次重复实验计算,本批血清总量可满足全程实验需求。采集的血清置于室温静置 2 h,以 3 000 r/min(离心半径为 10 cm)离心 15 min 分离上清,于 56 ℃水浴灭活 30 min,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装后置于-20 ℃保存备用。

1.3.2 BMMSCs 的分离培养 在无菌条件下麻醉并处死 6 只健康 SD 大鼠,迅速取出双侧股骨和胫骨,彻底去除周围软组织,75%乙醇对骨骼表面进行短时消毒处理,PBS 冲洗干净,剪除骨髓端后,暴露骨髓腔,利用无菌注射器向腔内注入预冷的 α-MEM 完全培养基,充分冲洗骨髓以获取细胞悬液。所得混悬液经 200 目滤网过滤后,以 4 000 r/min(离心半径为 10 cm)离心 5 min,弃去上清后用新鲜培养基重悬细胞,将细胞接种于无菌平底培养皿或培养瓶中,在 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱内进行贴壁培养,每 2~3 d 更换培养液一次,其间采用倒置显微镜进行观察和记录,当贴壁细胞融合度达 80%~90%时,加入胰酶消化进行传代。

1.3.3 流式细胞术鉴定 BMMSCs 取第 3 代生长状态良好的 BMMSCs,制成 1×10⁵ 个/mL 的单细胞悬液,取 100 μL 细胞悬液分别加入标记有不同荧光的抗体:CD34-PE、CD44-FITC、CD45-PE、CD90-FITC、CD105-FITC、HLA-DR-PE,混匀后在避光条件下孵育 30 min。孵育结束后加入 PBS 清洗两次,并将细

胞重悬于 500 μL PBS 中,进行流式细胞仪检测。

1.3.4 CCK-8 实验检测细胞活力 (1)乳香-没药含药血清对 BMMSCs 活力的影响:取第 3 代 BMMSCs,调整密度为 1×10⁵ 个/mL,在 96 孔板孔内加入 100 μL 细胞悬液过夜培养后,使用不同浓度大鼠乳香-没药含药血清(2.5%、5%、10%、15%、20%、25%)处理 BMMSCs,空白组为 10%胎牛血清培养,每组设置 6 个复孔,培养 24 h 后取出,每孔加入 10 μL CCK-8,孵育 2 h,酶标仪 450 nm 波长处测量相应的吸光度(A)值,计算 BMMSCs 活力。细胞活力(%)=[(A_{实验}-A_{空白})/(A_{正常对照}-A_{空白})]×100%。

(2)TNF-α 对 BMMSCs 活力的影响:在 96 孔板孔内加入 100 μL 细胞悬液过夜培养后,使用终浓度为 5、10、15、20、25、30 ng/mL TNF-α 干预 BMMSCs 24 h,空白组 BMMSCs 不进行处理,TNF-α 处理时间 24 h 的设置参考已有文献报道^[10],该条件已在多项研究中用于稳定建立 BMMSCs 炎症损伤模型。每组设置 6 个复孔,24 h 后采用 CCK-8 检测各处理下 BMMSCs 活力。

(3)乳香-没药含药血清对炎性环境下 BMMSCs 活力的影响:在 96 孔板孔内加入细胞悬液 100 μL,分为空白组、TNF-α 组、TNF-α+乳香-没药含药血清组和 TNF-α+塞来昔布组,每组设置 6 个复孔。TNF-α 组用终浓度为 10 ng/mL TNF-α 处理,TNF-α+乳香-没药含药血清组用终浓度为 10 ng/mL TNF-α 和 10%乳香-没药含药血清处理,TNF-α+塞来昔布组用终浓度为 10 ng/mL TNF-α 和 10 μmol/L 塞来昔布^[11]处理,空白组不进行任何处理。各组细胞孵育 24 h 后,CCK-8 检测各处理下 BMMSCs 活力。

1.3.5 TUNEL 法检测 BMMSCs 凋亡情况 取干预处理后的 BMMSCs,于载玻片上制备细胞爬片。采用 4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤 3 次后,用 0.1% Triton X-100 膜通透液室温处理 10 min。PBS 再次洗涤后,用 TUNEL 试剂盒中的 buffer 液覆盖细胞,室温预孵育 10 min。滴加 TUNEL 反应液,置于 37 ℃恒温箱避光孵育 1 h。孵育结束后,PBS 冲洗 3 次,加入 DAPI 染液避光染核 5 min,再次

PBS 洗涤,滴加封片剂封片。使用荧光显微镜观察并拍摄图,凋亡细胞呈红色荧光,细胞核呈蓝色,每组随机选取 6 个视野,统计红色荧光细胞数与总细胞数,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数目/总细胞数目 $\times 100\%$ 。

1.3.6 阿利新蓝染色检测基质蛋白糖胺聚糖生成 各组 BMMSCs 处理结束后,于 24 孔板中制备细胞爬片, PBS 洗涤 2 次。采用 4%多聚甲醛室温固定 15 min,固定结束后 PBS 洗涤 3 次。以 1%阿利新蓝预染液 (pH 2.5)预染色 3 min,再以新配制的 1%阿利新蓝染液 (pH 2.5)覆盖爬片,室温染色 30 min。染色结束后, PBS 反复冲洗,去除多余染液。在光学显微镜下观察并拍照,糖胺聚糖沉积部位呈现蓝色团块或颗粒状。

1.3.7 Western blot 检测 Sox9、Col II、Aggrecan 蛋白及 p38 MAPK 信号通路相关蛋白表达 各组 BMMSCs 干预后, PBS 洗涤细胞 3 次,采用含蛋白酶及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白质,置于冰上充分裂解 30 min,裂解液收集后于 4 ℃、12 000 r/min(离心半径为 10 cm)离心 15 min,取上清液,用 BCA 测定法定量蛋白质浓度。配制 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,每孔加入等量 30 μg 总蛋白进行电泳分离,并电印迹到 PVDF 膜上。在室温下用 5%脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗涤,

分别加入 Sox9 抗体、Col II 抗体、Aggrecan 抗体、p-p38 抗体、p38 抗体、p-JNK 抗体、JNK 抗体(均按 1:1 000 稀释),4 ℃下孵育过夜, TBST 洗涤,将膜与抗兔或抗小鼠 IgG 抗体(1:5 000 稀释),室温下孵育 1 h,再次洗膜后采用 ECL 显影,凝胶成像系统采集图像,使用 ImageJ 软件分析条带灰度值,各目的蛋白表达水平用内参蛋白 GAPDH 进行归一化处理。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 23.0 对各组数据进行统计分析, GraphPad Prism 8.30 软件绘图,所有实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。单因素方差分析进行多组间数据比较,组间两两数据比较采用 *LSD-t* 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BMMSCs 形态及细胞表型符合干细胞特征

分离获得的 BMMSCs 培养 7 d 后,可见大量长梭形、多角形细胞,细胞排列整齐,呈旋涡状生长。细胞表面标志物 CD44、CD90、CD105 均呈阳性,表达率分别为 99.1%、97.9%、90.9%, CD34、CD45、HLA-DR 为阴性,阳性率为 0.95%、0.48%、0.22%。上述结果提示所分离的细胞具备典型 BMMSCs 的形态学特征和表面免疫表型,说明分离培养 BMMSCs 成功。详见图 1。

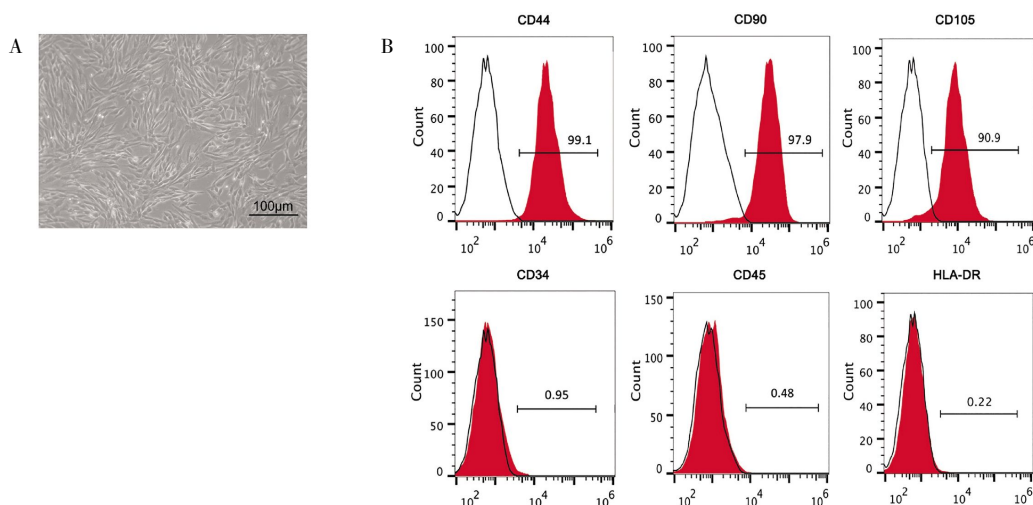


图 1 BMMSCs 鉴定结果

Fig.1 Identification results of BMMSCs

注:A.光学显微镜观察 BMMSCs 形态($\times 100$);B.流式细胞术检测 BMMSCs 表面标志物表达。

2.2 乳香-没药含药血清调节 TNF- α 诱导下 BMMSCs 活力变化

经过不同含量乳香-没药含药血清干预 BMMSCs 后,与空白组比较,2.5%、5%、10%的乳香-没药含药血清干预的 BMMSCs 活力显著升高($P<0.05$),15%的乳香-没药含药血清干预的 BMMSCs 活力未发生显著变化($P>0.05$),而 20%、25%的乳香-没药含药血清干预的 BMMSCs 活力显著降低($P<0.05$),说明低中浓度乳香-没药含药血清可促进 BMMSCs 活力,而高浓度则抑制 BMMSCs 活力。详见图 2。

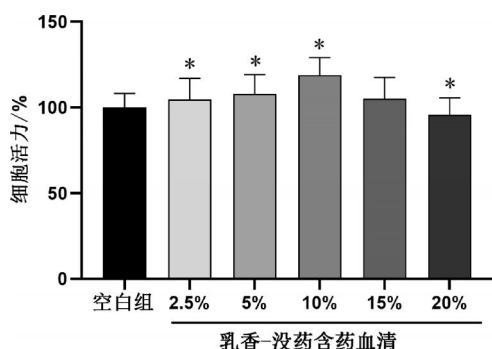


图 2 不同含量乳香-没药含药血清处理对 BMMSCs 活力的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum on the viability of BMMSCs

注:与空白组比较,* $P<0.05$ 。

采用不同浓度 TNF- α 处理后,与空白组比较,5、10、15、20、25、30 ng/mL 的 TNF- α 均会显著降低 BMMSCs 活力($P<0.05$)。详见图 3。

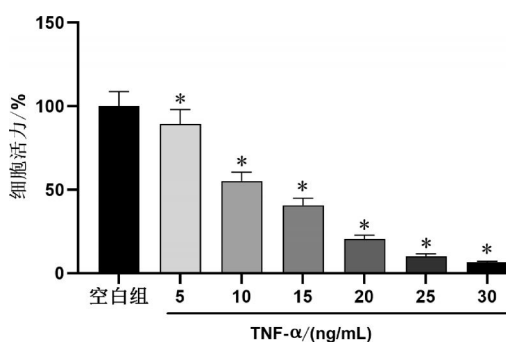


图 3 不同浓度 TNF- α 处理对 BMMSCs 活力的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of TNF- α on the viability of BMMSCs

注:与空白组比较,* $P<0.05$ 。

通过乳香-没药含药血清和 TNF- α 处理后,与空白组比较,TNF- α 组的 BMMSCs 活力显著降低($P<0.05$);与 TNF- α 组比较,TNF- α +乳香-没药含

药血清组和 TNF- α +塞来昔布组的 BMMSCs 活力显著升高($P<0.05$),说明适当浓度的乳香-没药含药血清能拮抗 TNF- α 处理对 BMMSCs 活力的抑制作用。详见图 4。

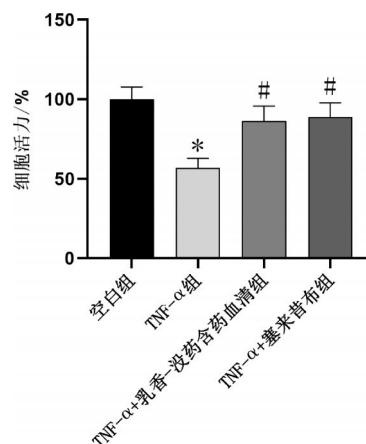


图 4 乳香-没药含药血清和塞来昔布对 TNF- α 诱导的 BMMSCs 活力的影响

Fig.4 Effects of Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum and celecoxib on the viability of BMMSCs induced by TNF- α

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与 TNF- α 组比较,* $P<0.05$ 。

2.3 乳香-没药含药血清抑制 TNF- α 诱导的 BMMSCs 凋亡

与空白组比较,TNF- α 组的 BMMSCs 凋亡率显著升高($P<0.05$);与 TNF- α 组比较,TNF- α +乳香-没药含药血清组和 TNF- α +塞来昔布组的 BMMSCs 凋亡率显著降低($P<0.05$),说明 TNF- α 诱导的 BMMSCs 凋亡受到抑制。详见图 5。

2.4 乳香-没药含药血清促进 TNF- α 诱导下 BMMSCs 成软骨分化

空白组 BMMSCs 中有大量蓝色着色细胞,而 TNF- α 组蓝色着色细胞明显减少,说明其成软骨分化能力降低;相较于 TNF- α 组,TNF- α +乳香-没药含药血清组和 TNF- α +塞来昔布组的 BMMSCs 中蓝染细胞增加,说明成软骨分化能力增强。详见图 6。

与空白组比较,TNF- α 组中 Sox9、Col II、Aggrecan 蛋白相对表达量显著下调($P<0.05$);与 TNF- α 组比较,TNF- α +乳香-没药含药血清组和 TNF- α +塞来昔布组中 Sox9、Col II、Aggrecan 蛋白相对表达量均显著上调($P<0.05$),说明软骨基质合成能力增强。详见图 7。

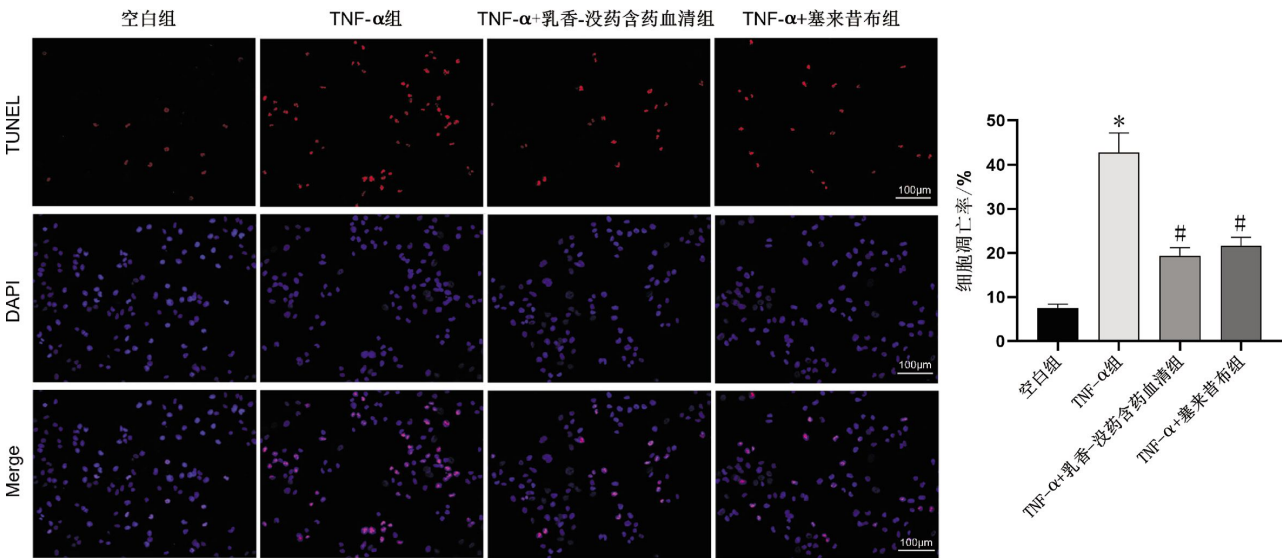


图 5 乳香-没药含药血清和塞来昔布对 TNF-α 诱导的 BMMSCs 凋亡的影响(TUNEL 染色,×100)

Fig.5 Effects of Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum and celecoxib on apoptosis of BMMSCs induced by TNF-α (TUNEL staining, ×100)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与 TNF-α 组比较,# $P<0.05$ 。

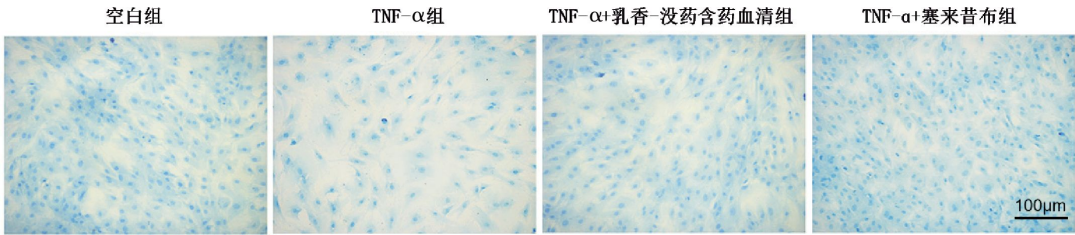


图 6 乳香-没药含药血清和塞来昔布对 TNF-α 诱导的 BMMSCs 成软骨分化的影响(阿利新蓝染色,×100)

Fig.6 Effects of Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum and celecoxib on chondrogenic differentiation of BMMSCs induced by TNF-α (Alcian blue staining, ×100)

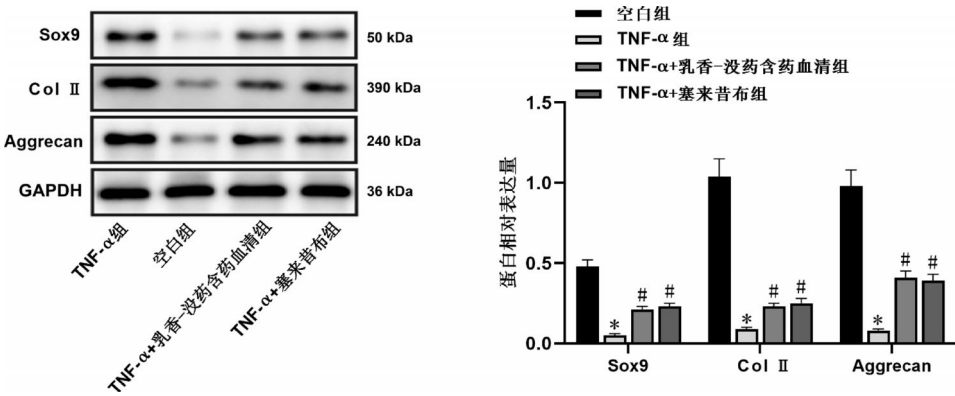


图 7 乳香-没药含药血清和塞来昔布对 TNF-α 诱导的 BMMSCs 中 Sox9、Col II、Aggrecan 蛋白表达的影响

Fig.7 Effects of Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum and celecoxib on the protein expression of Sox9, Col II, and aggrecan in BMMSCs induced by TNF-α

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与 TNF-α 组比较,# $P<0.05$ 。

2.5 乳香-没药含药血清通过抑制 p38 MAPK 信号通路调控 BMMSCs 功能

与空白组比较,TNF-α 组中 p-p38/p38、p-JNK/

JNK 蛋白相对表达量比值显著升高($P<0.05$);与TNF-α 组比较,TNF-α+乳香-没药含药血清组和 TNF-α+塞来昔布组中 p-p38/p38、p-JNK/JNK 蛋白相对

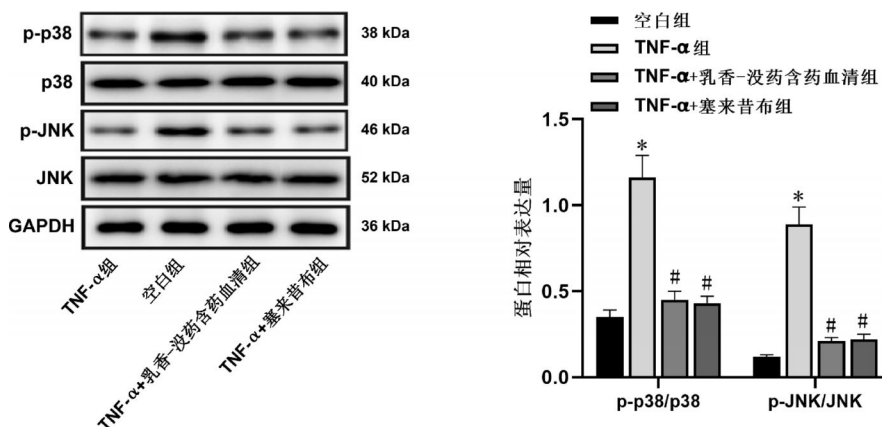


图 8 乳香-没药含药血清和塞来昔布对 TNF- α 诱导的 BMMSCs 中 p38 MAPK 信号通路蛋白表达的影响

Fig.8 Effects of Ruxiang (Olibanum) and Moyao (Myrrha)-containing serum and celecoxib on p38 MAPK signaling pathway-related protein expression in BMMSCs induced by TNF- α

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与 TNF- α 组比较,# $P<0.05$ 。

表达量比值显著降低($P<0.05$),说明 p38 MAPK、JNK 活化受到抑制。详见图 8。

3 讨论

椎间盘退变过程中,软骨终板经历钙化、结构破坏、炎症激活和通透性降低等一系列病理改变,且多种因素之间相互影响,共同参与椎间盘组织的退行性演变。维持或重建软骨终板的结构与功能已成为近年来椎间盘退变研究领域的重要方向。BMMSCs 因其较强的适应性和在特定诱导条件下的分化潜能,近年来被广泛应用于组织工程和软骨再生领域^[12]。通过移植 BMMSCs 并诱导其成软骨分化以修复软骨缺损,被认为是一种具有前景的治疗策略^[13]。然而,BMMSCs 的行为及其分化潜能受到周围微环境的影响,包括各种炎症因子、信号分子及细胞外基质成分等。在椎间盘病理状态下,促炎因子水平升高可能会扰乱正常分化平衡,削弱细胞的合成代谢能力并促进其凋亡,严重干扰终板软骨组织的再生修复能力^[14]。研究表明,TNF- α 会降低软骨形成标志蛋白 Aggrecan 和 Col II 表达,抑制 BMMSCs 向软骨分化^[15]。此外,TNF- α 能够激活核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路,进而阻碍 BMMSCs 的软骨形成;而干扰其表达可以抑制炎症,改善类风湿关节炎症状,并促进软骨形成标志物表达^[16]。本研究通过 TNF- α 干预模拟炎症环境,实验结果证实 TNF- α 会降

低 BMMSCs 活力,促进其凋亡,并减少基质蛋白糖胺聚糖生成,抑制软骨形成标志蛋白 Sox9、Col II、Aggrecan 的表达,表明其对 BMMSCs 成软骨分化具有负向调控作用。

乳香和没药作为来源于天然树脂的中药材,常联合用于多种慢性炎症性及组织损伤性疾病的治疗。现代药理研究显示,乳香-没药主要活性成分具备调控炎症信号通路、抗氧化以及镇痛等多种生物学作用,当前已在多种软骨损伤疾病的治疗中展现出良好的应用前景^[17-18]。已有临床研究表明,乳香提取物 Aflapin 能够减轻骨关节炎患者疼痛、僵硬和肿胀等症状,调节血清炎症因子水平,并有助于软骨再生^[19]。此外,没药在碘乙酸钠诱发的骨关节炎模型大鼠中具有强效的镇痛和抗炎活性,能够逆转软骨侵蚀并改善软骨损伤^[20]。软骨形成伴随着一系列特异性标志物的表达。糖胺聚糖是构成软骨细胞外基质的重要成分,主要包括透明质酸、软骨素硫酸和皮肤素硫酸等,通过与蛋白聚糖结合,维持软骨的弹性和抗压性能^[21]。Sox9 是软骨形成过程中最关键的转录因子之一,能够激活编码 Col II 的软骨特异性基因表达,维持软骨细胞的分化状态和功能^[22]。Col II 和 Aggrecan 是软骨特异性胶原蛋白和蛋白聚糖,两者协同维持基质稳定性与弹性^[23]。塞来昔布是一种选择性环氧合酶-2 抑制剂,能够通过减少软骨细胞外基质降解、抑制促炎因子和促分解代谢酶表达,减少

软骨基质破坏^[11]。本研究结果显示,乳香-没药含药血清可显著提升炎症环境中BMMSCs的活力,减少细胞凋亡,增加基质蛋白糖胺聚糖生成,并上调成软骨关键蛋白Sox9、Col II和Aggrecan的表达,以上实验结果与塞来昔布处理下的实验结果相似。这一现象提示,乳香-没药不仅发挥抗炎作用,同时还可能直接促进BMMSCs向软骨方向的分化过程。

p38 MAPK信号通路作为炎症调控的核心通路之一,已被证实在多种疾病中发挥重要作用,例如心血管疾病、神经退行性疾病、骨科疾病以及癌症^[24-26]。在BMMSCs分化过程中,该通路活性的变化可显著影响成软骨表型的建立。过度激活的p38 MAPK通过介导JNK抑制Sox9、Col II、Aggrecan等软骨形成特异性基因的表达,进而干扰细胞软骨分化的进程^[27]。本研究观察到,TNF- α 干预显著上调了BMMSCs中p38和JNK的磷酸化水平,说明p38 MAPK信号通路被激活;而乳香-没药含药血清则可有效逆转这一激活趋势,提示其调节作用可能与抑制p38 MAPK信号通路的过度活化有关,从而改善BMMSCs在炎症环境中成软骨分化障碍。

综上所述,本研究表明乳香-没药含药血清在炎症环境中能够提高BMMSCs活性,减少细胞凋亡,促进其成软骨分化,其潜在机制可能与调控p38 MAPK信号通路相关。这一发现为天然药物在组织工程和再生医学领域的应用提供了新思路,也为探索椎间盘退变的新型治疗策略提供了理论依据。然而,研究仍存在局限性,本实验未进一步分析乳香-没药中活性成分及其具体作用机制,且缺乏动物水平的体内验证,后续研究可采用p38 MAPK通路激动剂和抑制剂进行干预,结合动物模型探讨其临床可行性与安全性,为椎间盘退变治疗提供更为坚实的实验基础。

参考文献

- [1] CHIU A P, CHIA C, ARENDT-NIELSEN L, et al. Lumbar intervertebral disc degeneration in low back pain[J]. *Minerva Anestesiologica*, 2024, 90(4): 330-338.
- [2] SAMANTA A, LUFKIN T, KRAUS P. Intervertebral disc degeneration-Current therapeutic options and challenges[J]. *Frontiers in Public Health*, 2023, 11: 1156749.
- [3] YANG H, CHEN X, CHEN J, et al. The pathogenesis and targeted therapies of intervertebral disc degeneration induced by cartilage endplate inflammation[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2024, 12: 1492870.
- [4] CHEN X, ZHENG J, YIN L, et al. Transplantation of three mesenchymal stem cells for knee osteoarthritis, which cell and type are more beneficial? A systematic review and network meta-analysis[J]. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2024, 19(1): 366.
- [5] TIAN R C, ZHANG R Y, MA C F. Rejuvenation of bone marrow mesenchymal stem cells: Mechanisms and their application in senile osteoporosis treatment[J]. *Biomolecules*, 2025, 15(2): 276.
- [6] SWAIN H N, BOYCE P D, BROMET B A, et al. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease: A systematic review and meta-analysis of pre-clinical studies[J]. *Biochimie*, 2024, 223: 54-73.
- [7] PRASAD P, CANCELAS J A. From marrow to bone and fat: exploring the multifaceted roles of leptin receptor positive bone marrow mesenchymal stromal cells[J]. *Cells*, 2024, 13(11): 910.
- [8] 赵丽辉, 赵子樟, 李佳响, 等. 乳香、没药活性成分KTDA、FSA及其配伍的抗炎镇痛作用及机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(11): 1460-1465.
- [9] LU Y, LUAN H, PENG C, et al. Application of network pharmacology and dock of molecules on the exploration of the mechanism of frankincense-myrrh for lumbar intervertebral disc degeneration: A review[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103(29): e38953.
- [10] 周 兴, 陆艳青, 彭建平, 等. TNF- α 对人骨髓间充质干细胞sncRNAs表达的调控研究[J]. *中国临床新医学*, 2022, 15(5): 388-394.
- [11] 朱志恒, 丁佳滢, 葛杨硕, 等. 塞来昔布抑制凝血酶诱导的大鼠软骨细胞退变[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(34): 5446-5451.
- [12] ROSSI N, HADAD H, BEJAR-CHAPA M, et al. Bone marrow stem cells with tissue-engineered scaffolds for large bone segmental defects: A systematic review[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2023, 29(5): 457-472.
- [13] DING N, LI E, OUYANG X, et al. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells for articular cartilage regeneration in osteoarthritis[J]. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2021, 16(7): 840-847.

- [14] MENG X, MENG X, HE Z, et al. Selenium deficiency can promote the expression of VEGF and inflammatory factors in cartilage differentiation and mediates cartilage injury[J]. Biological Trace Element Research, 2024, 202(9): 4170–4179.
- [15] PAN S, WANG L, WU B, et al. Effect and mechanism of sirnas targeting IL-1 β /TNF- α combined with BMMSCs transplantation in ameliorating rheumatoid arthritis in rats[J]. Veterinary Sciences, 2022, 9(10): 531.
- [16] DING N, ZENG M Y, SONG W J, et al. SP600125 restored TNF- α -induced impaired chondrogenesis in bone mesenchymal stem cells and its antiosteoarthritis effect in mice[J]. Stem Cells and Development, 2021, 30(20): 1028–1036.
- [17] 宿树兰, 缪晓冬, 李佳响, 等. 乳香与没药相须配伍特征分析及其现代研究进展与展望[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(21): 5789–5796.
- [18] 唐开强, 穆晓红, 叶超, 等. 乳香-没药治疗类风湿性关节炎的网络药理学和生物信息学分析[J]. 世界中医药, 2021, 16(12): 1797–1803.
- [19] VAIDYA N, AGARWAL R, DIPANKAR D G, et al. Efficacy and safety of boswellia serrata and apium graveolens l. extract against knee osteoarthritis and cartilage degeneration: A randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled clinical trial[J]. Pharmaceutical Research, 2025, 42(2): 249–269.
- [20] LEE D, JU M K, KIM H. Commiphora extract mixture ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis[J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1477.
- [21] CHEN Y, MEHMOOD K, CHANG Y F, et al. The molecular mechanisms of glycosaminoglycan biosynthesis regulating chondrogenesis and endochondral ossification[J]. Life Sciences, 2023, 335:122243.
- [22] HASEEB A, KC R, ANGELOZZI M, et al. SOX9 keeps growth plates and articular cartilage healthy by inhibiting chondrocyte dedifferentiation/osteoblastic redifferentiation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(8): e2019152118.
- [23] MAZOR M, LESPESSAILLES E, BEST T M, et al. Gene expression and chondrogenic potential of cartilage cells: osteoarthritis grade differences[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18):10610.
- [24] ROMERO-BECERRA R, SANTAMANS A M, FOLGUEIRA C, et al. p38 MAPK pathway in the heart: new insights in health and disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(19): 7412.
- [25] YIN M, ZHENG X, SHI L. Targeting p38 MAPK: A potential bridge between ER stress and age-related bone loss[J]. Cell Signalling, 2025, 127: 111549.
- [26] SARG N H, ZAHER D M, ABU JAYAB N N, et al. The interplay of p38 MAPK signaling and mitochondrial metabolism, a dynamic target in cancer and pathological contexts[J]. Biochemical Pharmacology, 2024, 225: 116307.
- [27] MA N, TENG X, ZHENG Q, et al. The regulatory mechanism of p38/MAPK in the chondrogenic differentiation from bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2019, 14(1): 434.

(本文编辑 苏维)