

补肾活血汤石油醚提取物对 BMSCs 迁移过程中 Wnt5a/PKC 通路的影响

罗 辉¹, 吴志方¹, 沈 玮¹, 胡流超¹, 王 斌¹, 余丽娟², 罗毅文^{1*}
(1. 广州中医药大学附属骨伤科医院, 广东 广州 510240; 2. 广州中医药大学中医诊断学教研室, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 探讨补肾活血汤(熟地黄、菟丝子、补骨脂, 等)石油醚提取物对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)的迁移作用及相关机制。**方法** 全骨髓贴壁法培养 BMSCs, 取第 3 代细胞用于实验, 采用流式细胞仪检测细胞表面抗原, 细胞划痕、Transwell 实验观察补肾活血汤石油醚提取物 0、25、50、100、200 μg/mL 剂量组的细胞迁移能力, Western blot 和 RT-PCR 检测 Wnt5a、蛋白激酶 C (PKC) 表达情况。**结果** 第 3 代 BMSCs 表面抗原 CD29、CD90、CD44 表达阳性, 而 CD45 表达阴性; 细胞划痕 6 h 及 12 h 后, 药物各剂量组细胞迁移速度明显高于空白组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); Transwell 实验中 100 μg/mL 补肾活血汤石油醚提取物为促细胞迁移最佳剂量, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); RT-PCR 结果显示与空白对照组比较, 药物各剂量组的 Wnt5a mRNA 水平均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而与空白对照组的 PKC mRNA 水平比较, 药物只有 100 μg/mL 剂量 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$); Western blot 结果表明药物组各剂量的 Wnt5a、PKC 蛋白表达较空白对照组都明显升高 ($P < 0.01$), 均且以 100 μg/mL 剂量最高 ($P < 0.01$)。**结论** 补肾活血汤石油醚提取物可以促进 BMSCs 体外迁移, 其作用机制可能与 Wnt5a/PKC 信号通路有关。
关键词: 补肾活血汤; 信号通路; 体外迁移; 骨髓间充质干细胞; Wnt5a; PKC
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)12-2462-07
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.12.004

Effect of the petroleum ether extract from Bushen Huoxue Decoction on promoting BMSCs migration via Wnt5a/PKC signaling pathway

LUO Hui¹, WU Zhi-fang¹, SHEN Wei¹, HU Liu-chao¹, WANG Bin¹, YU Li-juan², LUO Yi-wen^{1*}
(1. Orthopedics and Traumatology Hospital Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510240, China; 2. Department of Diagnostics of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effect and mechanism of petroleum ether extract from Bushen Huoxue Decoction (BSH XD, *Rehmanniae Radix Praeparata*, *Cuscutae Semen*, *Psoraleae Fructus*, etc.) on rat BMSCs migration. **METHODS** Bone marrow mesenchymal stem cells isolated from whole bone marrow of rats were amplified by adherent culture *in vitro*. Flow cytometry was employed to detect the cell surface antigens of the third generation cells. Migration examination of cells treated with petroleum ether extract from BSH XD at concentrations of 25, 50, 100 and 200 μg/mL was accomplished by cell scratch test and Transwell assay. Expressions of Wnt5a and PKC protein were traced by Western blot, and so were the mRNA expressions of Wnt5a and PKC by RT-PCR. **RESULTS** Positive expressions of CD29, CD44 and CD90 in the passage 3 of BMSCs but negative expression of CD45 were observed. The cells given different concentrations of petroleum ether extract from BSH XD groups displayed a significantly higher wound healing speed than the control group after 6 h and 12 h cell scratch ($P <$

收稿日期: 2017-05-09
基金项目: 国家自然科学基金 (81473699, 81273783); 广东省自然科学基金 (2016A030310289)
作者简介: 罗 辉 (1991—), 男, 硕士生, 从事中医药治疗骨伤科疾病研究。Tel: 13724054552, E-mail: gzhluohui@163.com
* 通信作者: 罗毅文 (1967—), 男, 博士, 教授, 从事中医药治疗骨伤疾病研究。Tel: (020) 84237212, E-mail: gzhluoyw@126.com
2462

0.05)。100 μg/mL BSHXD was shown to be the most active concentration for promoting cell migration by Transwell migration experiments, with a statistically significant difference ($P < 0.01$)。Compared with the control group, the levels of *Wnt5a* mRNA in the BSHXD groups were significantly higher ($P < 0.05$), and the *PKC* mRNA level in 100 μg/mL petroleum ether extract from BSHXD group was significantly increased as well ($P < 0.01$) by RT-PCR. Although BSHXD groups brought forth significant improvement in both the expressions of *Wnt5a* and *PKC* protein ($P < 0.01$), the 100 μg/mL concentration conferred the highest ($P < 0.01$)。 **CONCLUSION** Petroleum ether extract from BSHXD can promote BMSCs migration *in vitro*, and the mechanism may lie in its association with *Wnt5a* signaling pathway.

KEY WORDS: Bushen Huoxue Decoction; signaling pathway; migration *in vitro*; bone marrow mesenchymal stem cells; *Wnt5a*; *PKC*

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一类具有多潜能分化和自我更新的非造血干细胞。因其易获得、在体外扩增快、低免疫原性、可在宿主体内长期共活, 且具有向受伤和患病部位处迁移等特性, 使 BMSCs 成为骨科领域中细胞移植、组织修复等治疗方面的理想种子细胞^[1-2]。在骨折修复过程中, 邻近的 BMSCs 会向骨折处迁移而修复损伤组织, 然而, 骨折端及骨膜处的 BMSCs 数量有限, 只有极少数 (<2%) 成功地到达组织损伤处, 因此动员内源性 BMSCs 迁移到骨折处就显得格外重要^[3]。对于 BMSCs 迁移机制的研究, 有助于理解 BMSCs “归巢” 的分子机制, 为骨折自体修复和细胞治疗提供理论依据。BMSCs 的体内归巢和体外迁移由不同因素诱导引发, 涉及不同的信号通路, 虽然多种诱导因子和信号通路被发现参与 BMSCs 的迁移过程, 但是其具体的迁移机制依然不明^[4-5]。大量研究表明 *Wnt* 信号通路调控 BMSCs 的增殖、迁移等^[6], 而研究 *Wnt5a* 与 BMSCs 迁移的关系并不多。本研究拟结合中医药“复方-粗提物-单体”的现代研究模式, 选取前期促 BMSCs 体外迁移的《伤科大成》补肾活血汤为主方, 通过观察其中的石油醚提取物对 BMSCs 迁移能力及 *Wnt5a* 信号通路相关蛋白及基因表达的影响, 从而阐释补肾活血汤防治骨缺损、骨不连及长期制动后出现骨质疏松症的作用机制。现作如下报道。

1 材料

1.1 动物 4 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 8 只, 体重 (70 ± 10) g, 购于广州中医药大学实验动物中心, 许可证号: SCXK (粤) 2013-0020。

1.2 试剂 Fetal Bovine Serum (美国 Hyclone 公司, 批号 1438121); 青霉素-链霉素溶液 (美国 Gibco 公司, 批号 1857816); DMEM 低糖培养基

(美国 Gibco 公司, 批号 8116466); 0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 批号 1785958); 姬姆萨染色液 (北京雷根生物技术有限公司, 批号 1130A16); 磷酸盐缓冲液 (美国 Gibco 公司, 批号 8114262); 二甲基亚砷 (美国 Sigma 公司, 批号 SHBB9317U)。

1.3 仪器 SCW-HS-840 型超净工作台 (苏州市长春电子仪器厂); JS-Power300 型电泳仪 (上海培清公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 全自动细胞荧光分析仪 (上海睿钰公司); B16UU CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 公司); CKX31 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); CFX96 Touch™ 荧光定量 PCR 仪器 (美国 Bio-rad 公司); Transwell 小室 (美国 Corning 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 熟地黄 18 g、菟丝子 18 g、补骨脂 18 g、杜仲 6 g、山萸肉 6 g、肉苁蓉 6 g、枸杞子 6 g、独活 6 g、当归 6 g、没药 6 g、红花 3 g (补肾活血汤全方购于广州中医药大学附属骨伤科医院药房), 干燥打碎, 装入索氏提取器用 500 mL 石油醚提取, 收集提取物并旋蒸至膏状。用 DMSO 溶解质量浓度 400 mg/mL 为贮备液, 以此质量浓度的提取物作为母液进行相应梯度的稀释。

2.2 BMSCs 分离和培养 原代大鼠 BMSCs 分离及培养方法如先前研究所描述^[7], 简言之, 浸泡于 0.1% 苯扎溴铵消毒 20 min, 大鼠颈椎脱臼处死, 无菌下分离出双侧股骨与胫骨, 剔除股骨与胫骨周围的软组织, 剪去两端干骺端, 置于含 100 U/mL 青霉素, 100 μg/L 链霉素双抗的 L-DMEM 培养基; 用 10 mL 注射器抽吸培养基冲洗骨髓腔至发白, 收集冲洗液, 1 200 r/min 离心 8 min, 弃上清液; 接种到含有 10% FBS 与双抗的 L-DMEM 培养基的 25 cm² 培养瓶中 37 ℃、5% CO₂ 培养。24 h 后首

次换液，以后 2 d 换液 1 次，至细胞融合度 80% 以上，用 0.25% 的胰酶消化，按 1：2 进行传代培养，标记为 P1。细胞每 2~3 d 进行换液，待细胞融合度达到传代要求，继续传代，取第 3 代细胞用于实验。

2.3 BMSCs 表面抗原的鉴定 检测第 3 代 BMSCs 表面标志 CD29、CD90、CD44、CD45 的表达。取第 3 代 BMSCs，用胰酶将细胞消化后制成单细胞悬液，离心后弃上清，用 PBS 洗涤 2 遍，调节细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。各取 100 μL 细胞悬液，每管加入相关抗体，同时每管样品设立同型阴性对照，混匀后冰上避光孵育 30 min，用流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达。

2.4 细胞划痕实验 取第 3 代 BMSCs，用 0.25% 胰酶消化，将细胞重悬并调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ，接种于 12 孔板上，每孔 500 μL ，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下，细胞培养箱中培养 24 h 至细胞基本融合。用 100 μL 移液枪头在 12 孔板内垂直划痕，PBS 液冲洗 2 次后加入补肾活血汤石油醚提取物，每孔 500 μL ，使终质量浓度分别为 25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ ，空白对照组加入等体积的培养基。将培养板置入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 0、6、12 h，分别用倒置相差显微镜观察。每个视野内，随机选择 3 个区域，并计算 100 倍视野内迁移划痕宽度。迁移率 = (原始划痕宽度值 - 相应时间划痕宽度值) / 原始划痕宽度值 $\times 100\%$ 。

2.5 Transwell 实验 P3 代 BMSCs 血清饥饿 12 h，

PBS 洗 2 遍，胰酶消化、离心收集细胞，用含 0.1% FBS 的 L-DMEM 培养基重悬细胞至每毫升 5×10^5 个。先加 100 μL 0.1% FBS 的 L-DMEM 培养基润湿 Transwell 小室的上室，再将 100 μL 细胞悬液（约 5×10^4 个细胞）加入上室，实验分 5 组（A~D 组）：A 组为空白对照组，下室内只加入含 10% FBS 的 L-DMEM 培养液 600 μL ，B、C、D、E 组的下室内分别加入含 10% FBS 的 L-DMEM 药物，使其最终稀释质量浓度分别 25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ ，每组设 3 个复孔。置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后，取出 Transwell 小室，弃孔中培养液，用棉签擦去上层细胞，PBS 洗 2 遍，4% 多聚甲醛固定 20 min，静置风干后，姬姆萨染液染色 30 min，PBS 洗 2 遍，在 200 倍倒置显微镜下观察上、下、左、右、中 5 个视野观察细胞并计数。

2.6 实时荧光定量 PCR 检测相关基因表达 取第 3 代 BMSCs 以每孔 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于 6 孔板，待细胞融合至 80% 左右用于实验。空白对照组加普通培养基，对照组分别加入 50、100 $\mu\text{g/mL}$ 补肾活血汤提取物。12 h 后，Trizol 溶液提取总 RNA，逆转录成 cDNA。Real-time PCR 反应体积 20 μL ：上游和下游引物各（10 $\mu\text{mol/L}$ ）0.6 μL ，cDNA 2 μL ，SYBRTM Premix Dimer Eraser（2 $\times$ ）10 μL ，ddH₂O 6.8 μL 。反应条件为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min，然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，40 个循环。融解曲线：95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，每个样品设 3 个复孔，结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 相关基因引物序列
Tab. 1 Primer sequences of the relevant genes

基因	引物序列(5'→3')	产物/bp
Wnt5a	正向引物 5'-CGAAGACGGGCATCAAAGA-3'	97
	反向引物 5'-TGCATCACCTGCCAAAGA-3'	
PKC	正向引物 5'-AAGGTGGTCCACGAGGTGAA-3'	100
	反向引物 5'-TTCCAATGCCCCAGATGAAG-3'	
GAPDH	正向引物 5'-AGGGCTGCCTTCTCTTGTGA-3'	110
	反向引物 5'-AACTTGCCGTGGGTAGAGTCA-3'	

2.7 Western blot 检测蛋白表达水平 第 3 代 BMSCs 胰酶消化后接种于 25 cm^2 培养瓶，经（0、50、100 $\mu\text{g/mL}$ ）作用 12 h，用预冷的 PBS 清洗细胞 2 遍，加入 1 mL 含 1% 有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液与细胞充分接触 30 min，整个过程在冰上进行，4 $^{\circ}\text{C}$ 15 000 $\times g$ 离心 5 min，取上清并行定量分析。提取的总蛋白，加入 5 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液 2464

（按 1：4 的比例），100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min。用微量进样器吸取 30 μg 样品和上样蛋白 Marker 5 μL 缓慢加入样品孔中，进行 SDS-PAGE 电泳，浓缩胶电压 60~100 V，约 30 min，分离胶电压在 100~200 V，约 60 min，电转至 NC 膜上，5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。TBST 洗膜 5 min，6 次。孵育一抗，分别用 Wnt5a 抗体（1：1 000）、PKC 抗体（1：1 000）、

PLC 抗体 (1 : 1 000)、GAPDH 抗体 (1 : 1 000), 4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 5 min, 6 次, 孵育二抗 (1 : 4 000), 室温孵育 2 h 左右。TBST 洗膜 5 min, 6 次, 用 ECL 显色液曝光显影, Image J 图像处理软件分析结果。

2.8 数据分析 采用 SPSS 23.0 统计分析软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析, 若方差齐, 采用 LSD 法, 方差不齐, 则采用 Dunnett T3 法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Photoshop 软件计算划痕实验中细胞划痕宽度, 细胞相对迁移速度进行计算统计。

3 结果

3.1 BMSCs 的形态及鉴定 倒置显微镜下观察分离的原代细胞培养至第 5 天可见大量细胞贴壁, 胞体透亮, 折光性强, 增殖迅速, 见细胞伸展, 伸出伪足呈梭形、多突状的成纤维样细胞构成, 少数细胞

为圆形, 为造血细胞的混杂, 见图 1A。传至第 3 代细胞, 较原代细胞体积变大, 多数梭形细胞聚集呈漩涡状或束状平行排列, 形态均一, 细胞互相融合成片, 见图 1B。

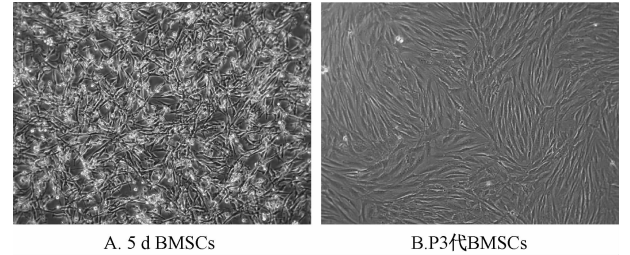


图 1 5 d 和 P3 代的 BMSCs 形态观察 (100 ×)
Fig. 1 Morphology of BMSCs cultured for 5 days and in passage 3 (100 ×)

流式细胞仪检测结果显示, 培养的第 3 代 BMSCs 均表达 CD29、CD44、CD90, 阳性率分别为 99.84%、96.80%、99.99%, CD45 为 4.35%, 见图 2。

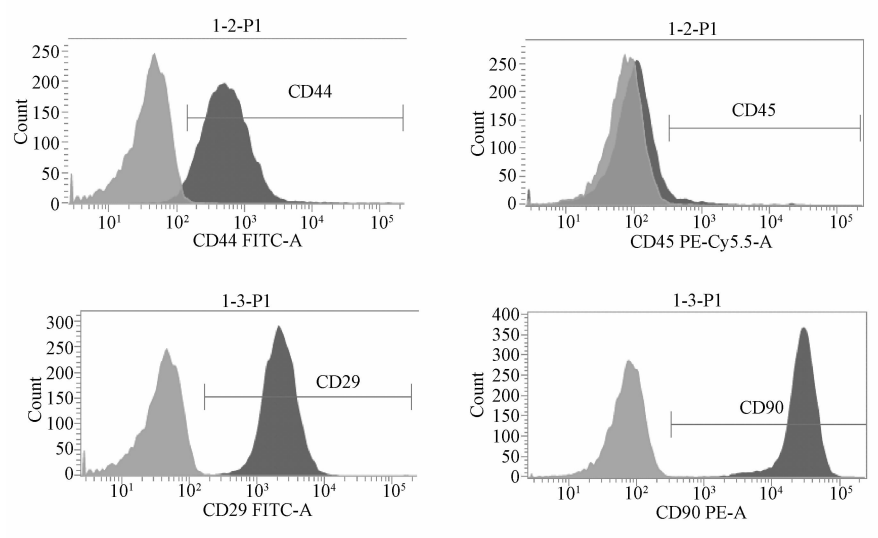


图 2 流式细胞仪检测 P3 BMSCs 的 CD44、CD45、CD29、CD90 表达
Fig. 2 Expression of CD44, CD45, CD29 and CD90 in P3 BMSCs by flow cytometry

3.2 补肾活血汤石油醚提取物对 BMSCs 的迁移作用 细胞划痕实验结果显示: 细胞划痕 6 h 及 12 h 后, 各剂量药物组划痕损伤细胞迁移速度明显高于空白对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且随补肾活血汤石油醚提取物质量浓度递增, 而质量浓度达 200 $\mu\text{g/mL}$ 其促迁移作用明显减弱 ($P < 0.05$), 当补肾活血汤石油醚提取物质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时促迁移作用最强 ($P < 0.01$), 见图 3、表 2。

Transwell 实验表明: 分别检测经 0、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 补肾活血汤石油醚提取物的处理

的 BMSCs 12 h 后的穿膜下室细胞数, 随药物质量浓度增加, 下室细胞数逐渐增加, 与空白对照组下室的细胞数比较, 100 $\mu\text{g/mL}$ 补肾活血汤石油醚提取物可显著提高细胞迁移, 为促细胞迁移最佳质量浓度, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 实验结果与细胞划痕实验相一致。见图 4 ~ 5。

3.3 补肾活血汤石油醚提取物对 BMSCs 的 *Wnt5a*、*PKC* mRNA 表达影响 实时荧光定量 PCR 检测结果显示: 与空白对照组比较, 补肾活血汤石油醚提取物 50、100 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组 *Wnt5a* mRNA 水平都明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。100 $\mu\text{g/mL}$

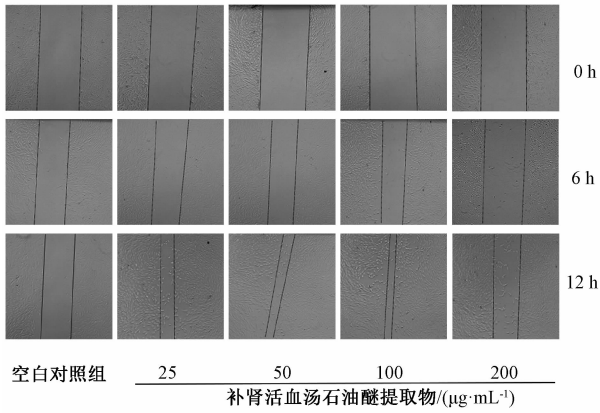


图 3 补肾活血汤石油醚提取物不同质量浓度对 BM-SCs 划痕后迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effects of different concentrated BSHXD petroleum ether extract on BMSCs migration by scratch test ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

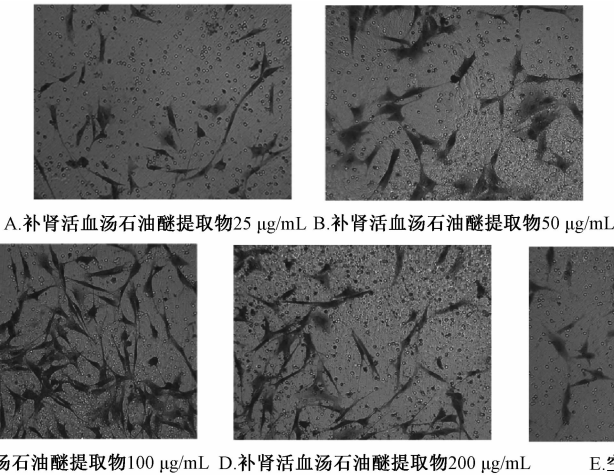
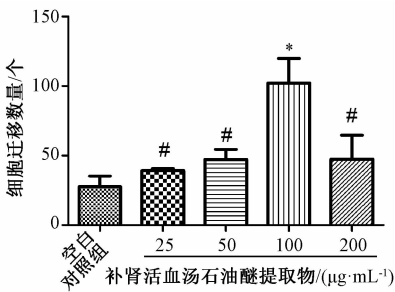


图 4 Transwell 小室各组迁移到下室的细胞数量的观察 (200 × , $\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Observation of migrated cells numbers in Transwell chamber of each group (200 × , $\bar{x} \pm s, n = 5$)



注：与空白对照组比较，* $P < 0.01$ ；与 BSHXD 石油醚提取物 100 μg/mL 组比较，# $P < 0.01$

图 5 补肾活血汤石油醚提取物干预 12 h 对 BMSCs 迁移数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effect of petroleum ether extract from BSHXD on BMSCs migrated number after 12 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 2 补肾活血汤石油醚提取物对 BMSCs 迁移率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab. 2 Effect of petroleum ether extract from BSHXD on BMSCs migration rate ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞迁移速率/%	
		6 h	12 h
空白对照组	0	6.89 ± 2.99 [▲]	15.87 ± 1.57 [▲]
BSHXD 石油	25	25.63 ± 1.11 ^{*▲}	54.88 ± 1.89 ^{*▲}
醚提取物	50	26.38 ± 1.67 ^{*▲}	71.01 ± 2.64 ^{*▲}
	100	49.98 ± 2.00 [*]	84.87 ± 1.34 [*]
	200	8.84 ± 1.79 ^{#▲}	42.39 ± 1.95 ^{*▲}

注：与空白对照组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{*} $P < 0.01$ ；与 BSHXD 石油醚提取物 100 μg/mL 组比较，[▲] $P < 0.01$

质量浓度组 PKC mRNA 水平明显升高。且均以 100 μg/mL 质量浓度组 Wnt5a、PKC mRNA 水平最高 ($P < 0.01$)。结果详见表 3。

表 3 补肾活血汤石油醚提取物对 BMSCs 的 Wnt5a、PKC mRNA 相对表达影响

Tab. 3 Effect of petroleum ether extract from BSHXD on the mRNA relative expression of Wnt5a and PKC in BMSCs

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	mRNA	
		Wnt5a	PKC
空白对照组	0	1.223 ± 0.252	1.012 ± 0.192
BSHXD 石油醚提取物	50	2.239 ± 0.333 ^{#▲}	1.492 ± 0.134
	100	4.952 ± 1.445 [*]	1.719 ± 0.428 [*]

注：与空白对照组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{*} $P < 0.01$ ；与 BSHXD 石油醚提取物 100 μg/mL 组比较，[▲] $P < 0.05$

3.4 补肾活血汤石油醚提取物对 BMSCs 的 Wnt5a、PKC 蛋白表达影响 与空白对照组比较，补肾活血汤石油醚提取物 50、100 μg/mL 剂量组

Wnt5a、PKC 蛋白表达都明显升高 ($P < 0.01$)。且亦以 100 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组 Wnt5a、PKC 蛋白表达最高 ($P < 0.01$)。见表 4、图 6。

表 4 补肾活血汤石油醚提取物对 BMSCs 的 Wnt5a、PKC 蛋白表达影响

Tab. 4 Effects of petroleum ether extract from BSHXD on protein expression of Wnt5a and PKC in BMSCs

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	蛋白表达	
		Wnt5a/GAPDH	PKC/GAPDH
空白对照组	0	36.036 $\pm$ 3.347 [#]	44.440 $\pm$ 14.331 [#]
BSHXD 石油 醚提取物	50	91.005 $\pm$ 15.216 ^{*#}	150.793 $\pm$ 29.086 ^{*#}
	100	140.658 $\pm$ 9.945 [*]	218.428 $\pm$ 7.994 [*]

注:与空白对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与 BSHXD 石油醚提取物 100 $\mu\text{g/mL}$ 组比较,[#] $P < 0.01$

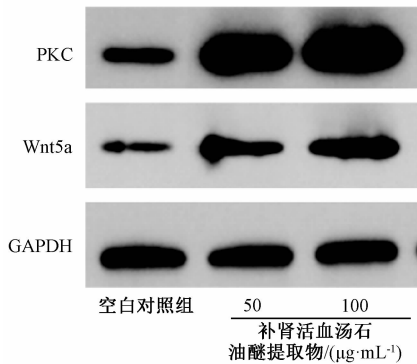


图 6 各组 Wnt5a、PKC 蛋白表达凝胶电泳图
Fig. 6 Gel electrophoresis results of Wnt5a, PKC protein expression in various groups

4 讨论

补肾活血汤出自清代赵竹泉的《伤科大成》，以熟地黄、山茱萸补肝肾，益精髓为君；辅以肉苁蓉、补骨脂、杜仲、枸杞子、菟丝子壮肾阳、强筋骨为臣，以使阴阳互补；佐以当归、没药和红花活血祛瘀、活血养血，与补肾之品相配，以养血补精，补而不膩。诸药配伍，共奏补肾填精、活血止痛之功，是治疗骨折、骨不连等疾病的经典方剂。传统中医认为，肾主骨生髓藏精，肾精、肾阳充足，则骨生髓有源，骨得滋养而坚强有力。BMSCs 源于骨髓血，故可认为 BMSCs 的增长与化生与肾精功能密切相关。通过前期的研究，本课题对补肾活血汤各提取物（石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇、水溶性提取物）的进行筛选，发现与空白组比较，乙酸乙酯部位对 BMSCs 增殖具有明显促进作用 ($P < 0.05$)，补肾活血汤石油醚部位具有明显促进 BMSCs 迁移的作用，其最佳质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$)，其机制可能是通过上调 CXCR4 蛋白表达 ($P < 0.05$)，激活 SDF-1/CXCR4（趋化因子

受体/基质细胞衍生因子-1）信号轴相关，临床研究也证实补肾活血汤在治疗老年桡骨远端骨折确有疗效，与对照组比较，治疗组 RUSS 评分，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)^[7-9]。现代药理研究证实，熟地有增强人体造血功能及抗衰老的作用，补骨脂、红花、肉苁蓉、菟丝子等具有类雌激素样作用和促进骨形成的作用^[10-11]。值得注意的是，在中医上具有“补肾壮阳”作用的中药或提取物多有促进 BMSCs 增殖、抑制其凋亡或诱导成骨分化等作用^[12]。具有“活血化瘀”功效的中药及提取物多具有促进细胞迁移的作用，如欧阳长生等^[13]证实丹参和血府逐瘀汤含药血清通过升高血清间质细胞衍生因子 1 均能促进兔 BMSCs 的体外迁移，Transwell 实验显示干预 4 h 后丹参组、血府组 BMSCs 迁移数均明显增加 ($P < 0.05$)，李静等^[14]研究发现红花苷可修复模拟微重力作用导致的细胞骨架 F-actin 的重构，提高细胞动力，与模拟微重力组比较，红花苷微重力组细胞迁移数明显增加 ($P < 0.05$)。

Wnt 信号通路中各成员在 BMSCs 中均有表达，且随着 BMSCs 不同生物学行为的变化而发生改变，表明 Wnt 信号通路对 BMSCs 多种生物功能活动起着重要调控作用^[15]。细胞自分泌或旁分泌的 Wnt 蛋白存在于细胞外基质或附着在细胞表面参与信号传导，调节细胞的增殖、分化、迁移、极性^[16]。Wnt5a 属于非经典 Wnt 信号通路的代表蛋白，主要介导非经典通路 Wnt/ Ca^{2+} 和 Wnt/PCP 信号转导调控等。据研究^[17]显示 Wnt5a 通过结合 Ror2 受体从而诱导 Wnt/ Ca^{2+} 和 Wnt/PCP 通路，同时对经典 β -catenin 通路抑制或激活。其中 Wnt/ Ca^{2+} 信号通路可活化其下游 CaMK II 和 PKC 来调节细胞的增殖、迁移和粘附，影响细胞的形态、分化、运动和凋亡；而 PCP 通路通过小 G 蛋白或通过 JNK 发挥作用，调控细胞骨架重排，调节细胞极性和迁移^[18]。有学者报道了采用腺病毒转染的 BMSCs 过表达 Wnt5a，可上调 Ror2 and CaMK II 表达，下调 β -catenin 和 cyclin D1 的表达，结果证实了 Wnt5a 蛋白可以激活 Wnt/ Ca^{2+} 信号通路，抑制经典 Wnt/ β -catenin 信号通路^[19]。大量研究亦显示 Wnt5a 信号通路调控多种细胞的迁移，如 Binda 等^[20]发现 Wnt5a 可促进胶质母细胞瘤获得侵袭表型，侵袭性最强的神经胶质瘤存在 Wnt5a 过表达的现象。然而其中以 BMSCs 为研究对象，探究 Wnt/ Ca^{2+} 信号通路调控迁移机制的研究报道较少。本实验采用细

胞划痕与 Transwell 细胞迁移实验的结果筛选出补肾活血汤石油醚提取物 100 μg/mL 可增强 BMSCs 迁移能力, 进一步验证了其可上调 BMSCs 的 Wnt/Ca²⁺ 信号通路的 Wnt5a、PKC 基因及蛋白的表达, 提示补肾活血汤石油醚提取物促进 BMSCs 迁移可能与 Wnt/Ca²⁺ 信号通路相关。

综上所述, 补肾活血汤石油醚部位促 BMSCs 体外迁移以 100 μg/mL 质量浓度最佳, 其能提高 Wnt5a、PKC 基因和蛋白的表达, 表明其促进 BMSCs 迁移作用机制可能与非经典通路 Wnt5a/PKC 信号通路相关。然而调控 BMSCs 迁移的信号网络是复杂多样的, Wnt5a 信号通路在补肾活血汤石油醚部位调控 BMSCs 迁移的具体分子机制仍未明确, 其下游蛋白的参与与否还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells; characteristics and clinical applications[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006, 44(4): 215-230.

[2] Dhinsa B S, Adesida A B. Current clinical therapies for cartilage repair, their limitation and the role of stem cells[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2012, 7(2): 143-148.

[3] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11): 2739-2749.

[4] Rattigan Y, Hsu J M, Mishra P J, *et al.* Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(20): 3417-3424.

[5] Zou C, Luo Q, Qin J, *et al.* Osteopontin promotes mesenchymal stem cell migration and lessens cell stiffness via integrin β1, FAK, and ERK pathways [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 65(3): 455-462.

[6] Ling L, Nurcombe V, Cool S M. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells[J]. *Gene*, 2009, 433(1-2): 1-7.

[7] 黄永铨, 罗毅文, 王 斌, 等. 补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖的研究[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(1): 86-91.

[8] 罗毅文, 王 斌, 吴志方, 等. 补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞体外迁移及 CXCR4 表达的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(3): 356-361.

[9] 黄永铨, 罗毅文, 王 斌, 等. 补肾活血汤治疗老年桡骨远端骨折的临床疗效观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(3): 5-8.

[10] 林桂涛, 李荣伟, 耿子凯, 等. 补骨脂水及乙醇提取物雌激素样作用的比较[J]. 中成药, 2016, 38(12): 2688-2691.

[11] 韩 艳, 温利平, 刘 娜, 等. 补肾活血方对去卵巢大鼠骨代谢及骨密度的影响[J]. 中医正骨, 2015, 27(12): 7-11, 15.

[12] 方健康, 周轶平, 李玛琳. 中药对骨髓间充质干细胞增殖、凋亡及分化的影响研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2834-2837.

[13] 欧阳长生, 王云开, 苏 海, 等. 丹参及血府逐瘀汤含药血清与兔骨髓间充质干细胞的体外迁移: 促进还是抑制?[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(40): 7847-7851.

[14] 李 静, 陈 军, 钱彦方, 等. 红花苷对模拟微重力下细胞迁移的作用[J]. 中医杂志, 2013, 54(1): 55-58.

[15] 施剑明, 邹亚华, 耿书国, 等. 间充质干细胞增殖、衰老及分化: Wnt 信号通路经典与非经典的调控作用[J]. 中国组织工程研究 2014, 18(41): 6719-6724.

[16] Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, *et al.* Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 204(1): 17-33.

[17] Cheng C W, Yeh J C, Fan T P, *et al.* Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(2): 285-290.

[18] Oishi I, Suzuki H, Onishi N, *et al.* The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway[J]. *Genes Cells*, 2003, 8(7): 645-654.

[19] Shen Y L, Luo Q, Guo Y X, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived Wnt5a inhibits leukemia cell progression *in vitro* via activation of the non-canonical Wnt signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(1): 85-90.

[20] Binda E, Visioli A, Giani F, *et al.* Wnt5a drives an invasive phenotype in human glioblastoma stem-like cells [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(4): 996-1007.