

三七总皂苷对腱骨愈合的促进作用

刘晓华, 孙晋, 马佳, 张晟, 姜博, 李妍, 张磊*

中国中医科学院望京医院关节四科, 北京 100102

摘要 前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)重建术后腱骨止点愈合质量直接影响临床效果。前期实验证实三七总皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)可显著改善重建 ACL 腱骨愈合处成骨能力,可能与移植物内源性肌腱干细胞(tendon derived stem cells, TDSCs)的成骨分化密切相关。探讨了PNS对TDSCs成骨分化能力的影响。将培养至第3代的大鼠TDSCs分为PNS组与对照组2组,利用CCK-8实验方法检测PNS对细胞活性的影响;TDSCs经PNS处理72 h后加入成骨培养基进行诱导分化,检测成骨标志物碱性磷酸酶的表达情况;在裸鼠皮下注射PNS处理后的TDSCs,4周后利用Micro-CT检测异位成骨情况。研究证实PNS可显著增强TDSCs细胞成骨分化与裸鼠异位成骨能力。

关键词 三七总皂苷;肌腱干细胞;成骨分化

前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)损伤是多发而又严重的膝关节运动损伤,可引发膝关节发生前向及旋转不稳。如诊治不当,可在膝关节不稳的基础上继发关节软骨、半月板等主要结构的损害,导致膝关节退变和骨关节炎的早期发生,严重影响运动员竞技水平与运动功能,甚至终止运动生涯^[1]。随着全民健身和冰雪运动的普及,ACL损伤的发病率逐年上升。

由于ACL损伤后无法自愈,目前临床常用自体股薄肌腱和半腱肌腱作为移植物重建ACL。术后移植物将与骨道壁愈合(腱骨愈合),形成新的韧带止点,其愈合质量决定了重建效果。腱骨止点愈

合的过程非常复杂,分为4个阶段:(1)炎性反应;(2)细胞增殖;(3)基质合成;(4)基质重塑。基于此,已有多种干预手段用于促进腱骨愈合,包括生长因子、骨形态发生蛋白、干细胞等^[2-6],但均局限于体外实验研究,鲜有临床报道。如何基于腱骨止点愈合的病理生理过程,加快体内腱骨愈合速度,提高愈合质量是运动医学领域的研究热点之一^[7-10]。

肌腱细胞曾被认为是肌腱中唯一的细胞类型,但近年来肌腱干细胞(tendon derived stem cells, TDSCs)相继在人类、小鼠、大鼠以及兔的肌腱组织中被发现,与其他成体干细胞一样,肌腱干细胞也

收稿日期:2020-01-17;修回日期:2020-03-02

作者简介:刘晓华,主治医师,研究方向为运动损伤修复与重建,电子信箱:liuxiaohuabd01@sina.com;张磊(通信作者),主任医师,研究方向为运动损伤修复与重建,电子信箱:arthroartist@163.com

引用格式:刘晓华,孙晋,马佳,等.三七总皂苷对腱骨愈合的促进作用[J].科技导报,2020,38(6):41-45;doi:10.3981/j.issn.1000-7857.2020.06.005

具有多向分化的潜能^[11-13]。然而,激活自体肌腱移植植物源性TDSCs向成骨细胞分化,是加快腱骨愈合的关键。

腱骨愈合的过程和骨折愈合的过程有类似之处。研究发现一些活血化瘀的中药能促进骨折愈合,推测其可能促进腱骨愈合。三七为活血化瘀的代表药物,有效成分为三七总皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)^[14-16]。前期研究发现,在兔体内ACL重建术的腱骨界面给予PNS可显著促进腱骨愈合处成骨效果,然而具体机制国内外尚无报道^[17]。有研究显示淫羊藿总黄酮与大黄素能促进骨髓间充质干细胞增殖及其成骨分化能力^[18-19]。而PNS是否通过促进肌腱移植植物内TDSCs增殖并定向分化为成骨细胞,最终促进腱骨愈合需要进一步验证。因此,本研究所PNS对TDSCs成骨分化能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

成骨诱导培养基(赛业(广州)生物科技公司)。

1.2 TDSCs的分离、培养与三系分化鉴定

购置清洁级4~6周龄健康雄性Sprague Dawley大鼠(100~150 g),麻醉后处死,无菌条件下分离出双侧髌腱,仔细清除周围组织,使用眼科剪剪成约1 mm³组织碎块,使用3 mg/mL胶原酶及4 mg/mL中性蛋白酶于37℃消化1 h,离心后去除消化液,将细胞重悬于LG-DMEM培养液,铺于100 mm²培养皿,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,6~7天后换液,随后每3天换液,待细胞长至90%汇合后传代。后续实验均使用P2~P5代细胞。

将P3代细胞按3×10⁴/mL的浓度接种于25 cm²细胞培养瓶或者事先放置有消毒盖玻片的六孔板内制备细胞爬片,细胞融合率为80%~90%时,分别换成骨、成脂、成软骨诱导培养基,放置于37℃、5%CO₂饱和湿度的CO₂恒温培养箱内培养。相差显微镜下观察,每3天更换诱导培养基。收集不同时间点样品进行染色鉴定,分别用碱性磷酸酶染色鉴定干细胞成骨分化能力(14天),油红O染色鉴定

干细胞成脂分化能力(14天),阿尔新蓝染色鉴定干细胞成软骨分化能力(21天)。

1.3 细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞增殖与毒性

96孔板中配制细胞数为1×10³/mL的100 μL细胞悬液,将培养板在培养箱中预培养24 h(37℃, 5%CO₂);向培养板加入10 μL不同浓度的PNS,培养箱孵育72 h,每孔加入10 μL CCK-8溶液,在培养箱内孵育1~4 h后,酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

1.4 TDSCs成骨诱导分化

将体外扩增的P3代细胞按3×10⁴/mL的浓度接种于25 cm²细胞培养瓶或者事先放置有消毒盖玻片的六孔板内制备细胞爬片。细胞融合率为80%~90%时,加入PNS共培养72 h,然后换成骨诱导培养基,放置于37℃、5%CO₂饱和湿度的CO₂恒温培养箱内培养。相差显微镜下观察,每3~4天更换成骨培养基。收集不同时间点样品进行检测。

1.5 酶联免疫吸附实验

将体外扩增的P3代细胞以3×10⁴/mL的浓度接种于六孔板内,细胞融合率为80%~90%时,加入100 μg/mL PNS共培养3、7、14天时取细胞裂解液,按照碱性磷酸酶的酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒的操作方法进行检测,得到的蛋白量与细胞总蛋白量相除,消除因细胞数量不一致造成的差异。

1.6 裸鼠体内异位成骨

20只4周龄BALB-c雌性裸鼠随机分为2组。在裸鼠下肢皮下做小切口,将单纯TDSCs或与PNS共培养3天后细胞沉淀植入皮下筋膜间隙内。动物单笼饲养,自由活动进食,术后4周处死后用Micro-CT检测皮下局部成骨情况。

2 结果

2.1 原代培养的TDSCs生长特性

接种后4~6 h即可见部分细胞贴壁,呈短棒、小圆形。48 h后可见细胞呈梭形生长。7天后细胞迅速生长并达90%以上汇合,开始呈现漩涡状生长。随着细胞传代培养,细胞迅速增殖,3~4天可

90%单层汇合,细胞呈长梭形。到P3代时,细胞形态均一,为密集生长的呈旋涡状或平行排列的梭形贴壁细胞(图1(a))。三系分化结果显示,P3代TDSCs具有成骨、成脂及成软骨的多向分化潜能(图1(b)~(d))。

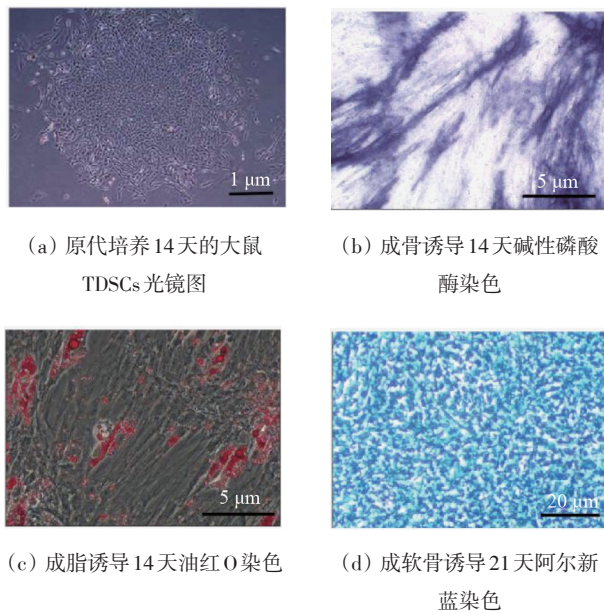


图1 TDSCs原代细胞干细胞特性鉴定

2.2 PNS对TDSCs细胞增殖活力的影响

利用CCK-8实验方法检测PNS对TDSCs细胞活性的影响,将P3代TDSCs以 1×10^3 /mL的浓度接种于96孔板内,细胞融合率约为80%~90%时,加入不同浓度梯度PNS共培养72 h,利用CCK-8试剂盒检测分析细胞活力(图2)。随着PNS浓度的增加,TDSCs的存活率以剂量依赖的方式逐渐降

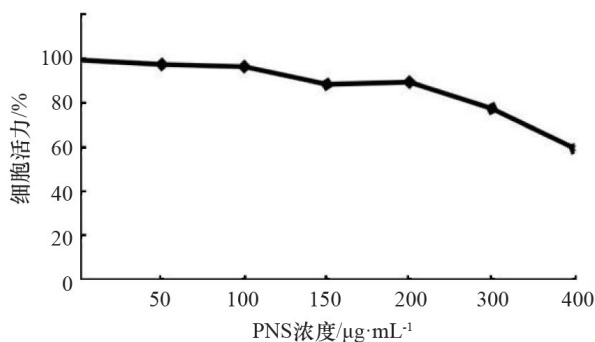
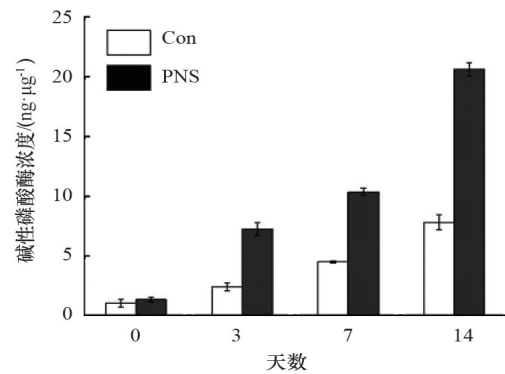
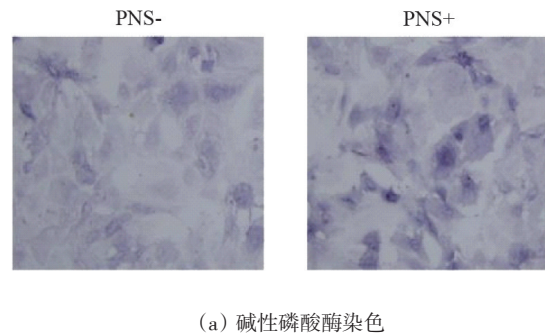


图2 PNS对TDSCs细胞增殖活力的影响

低,而其中浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PNS对TDSCs的细胞毒性较小。

2.3 PNS对TDSCs细胞成骨分化能力的影响

为了检测PNS对TDSCs成骨效应的影响,将P3代TDSCs以 3×10^4 /mL的浓度接种于六孔板内,细胞融合率为80%~90%时,先用100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PNS处理TDSCs 3天,再进行成骨诱导分化,检测碱性磷酸酶的表达情况。如图3(a)所示,PNS能够显著提高TDSCs成骨诱导7天时的碱性磷酸酶染色,同时酶联免疫吸附实验结果发现PNS能够显著提高TDSCs成骨诱导3、7、14天时碱性磷酸酶的含量(图3(b))。



(b) 酶联免疫吸附实验检测碱性磷酸酶的表达

图3 PNS对TDSCs细胞碱性磷酸酶合成的影响

2.4 PNS促进TDSCs在裸鼠体内异位成骨

通过Micro-CT扫描观察皮下注射TDSCs 4周后的裸鼠,发现PNS处理组皮下可见明显点状成骨信号,箭头所示细胞植入区(图4)。

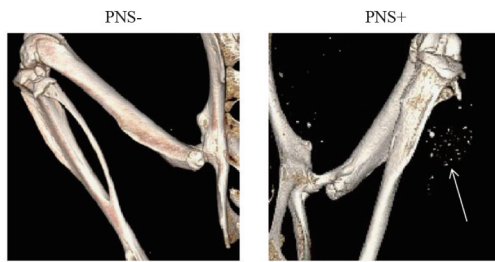


图4 术后4周时 Micro-CT扫描照片显示裸鼠皮下的异位成骨

3 讨论

随着全民健身和冰雪运动的普及, ACL 损伤的发病率逐年上升。目前临床常采用关节镜下自体肌腱移植重建 ACL, 腱骨愈合不良会影响重建效果^[7-10]。因此如何提高体内腱骨愈合质量受到关注。成体干细胞存在于骨髓、脂肪、滑膜、肌腱等组织中, 具有较强的增殖能力和多向分化潜能。TDSCs 是一种具有集落形成和三系分化能力的干细胞^[12-13]。前期发现, 在兔体内利用自体肌腱重建 ACL 的腱骨界面给予 PNS 可显著促进腱骨愈合处成骨效果, 然而具体机制国内外尚无报道^[7]。文献报道活血化瘀药物淫羊藿总黄酮与大黄素能促进骨髓间充质干细胞增殖及其成骨分化能力^[18-19]。因此, 推测 PNS 通过激活自体肌腱内源性 TDSCs 向成骨细胞分化, 发挥其促进腱骨愈合的作用。研究拟验证, PNS 是否通过促进 TDSCs 增殖并定向分化为成骨细胞, 最终促进腱骨愈合。

首先, 三系分化实验证实 TDSCs 原代细胞具有干细胞特性, CCK-8 实验结果发现随着 PNS 浓度的增加, TDSCs 的存活率以剂量依赖的方式逐渐降低, 且浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PNS 对 TDSCs 的细胞毒性较小。因此, 随后体内外实验均采用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PNS。其次, 利用碱性磷酸酶作为成骨分化指标, 检测体外 PNS 对 TDSCs 成骨分化能力的影响, 发现 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PNS 处理 TDSCs 后碱性磷酸酶表达明显增加。进一步, 利用异位成骨实验检测裸鼠皮下 PNS 对 TDSCs 成骨分化能力的影响, 皮下注射 TDSCs 4 周后, Micro-CT 扫描观察发现 PNS 处

理组皮下可见明显点状成骨信号。实验结果证实 PNS 可促进 TDSCs 的成骨分化与异位成骨能力。

本研究可为活血化瘀药物三七的有效成分 PNS 促进腱骨愈合和止点形成提供新的实验依据。

4 结论

探讨了 PNS 对 TDSCs 增殖与成骨分化能力的影响, 发现随着 PNS 浓度的增加, TDSCs 的存活率以剂量依赖的方式逐渐降低; PNS 可促进 TDSCs 成骨标志物碱性磷酸酶的表达增加以及裸鼠皮下异位成骨能力。因此, 实验结果证实 PNS 可促进 TDSCs 成骨分化与异位成骨能力。

参考文献 (References)

- [1] 杨晓, 李箭. 肌腱移植与不同大小骨隧道匹配对前交叉韧带重建腱骨愈合质量影响的实验研究[D]. 四川: 四川大学, 2005.
- [2] Qin L, Wang L, Wong M W, et al. Osteogenesis induced by extracorporeal shockwave in treatment of delayed osteotendinous junction healing[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2010, 28(1): 70-76.
- [3] Zou G, Song E, Wei B. Effects of tendon-bone healing of anterior cruciate ligament reconstruction by osteoprotegerin combined with deproteinized bovine bone[J]. *Muscles Ligaments Tendons Journal*, 2017, 7(2): 256-262.
- [4] Karaoglu S, Celik C, Korkusuz P. The effects of bone marrow or periosteum on tendon-to-bone tunnel healing in a rabbit model[J]. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*, 2009, 17(2): 170-178.
- [5] Tian X, Jiang H, Chen Y, et al. Baicalein accelerates tendon-bone healing via activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway in rats[J]. *Biomed Research International*, 2018(2018): 3849760.
- [6] 倪锋, 皇甫小桥, 赵金忠, 等. 人工骨材料磷酸钙及硫酸钙在腱-骨愈合中的作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(21): 3815-3821.
- [7] 李棋, 李箭. 骨隧道与肌腱移植不同长度匹配对前交叉韧带重建腱骨愈合质量影响的实验研究[D]. 四川: 四川大学骨科, 2005.
- [8] 薛海滨, 敖英芳, 于长隆. 应用半腱肌腱重建前交叉韧带末端形成的特点[J]. *中国运动医学杂志*, 2002, 21(2):

- 127-130.
- [9] 黄红拾, 敖英方, 王永健, 等. 膝关节持续被动活动对兔重建前交叉韧带腱骨愈合的影响[J]. 中华外科杂志, 2008, 46(14): 1088-1091.
- [10] Lim C R, Henson T, Ebert J, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction using a double bundle hamstring autograft configuration in patients under 30 years[J]. World Journal Orthopaedic, 2019, 10(12): 446-453.
- [11] Ljungqvist A, Schwelnus M P, Bachl N, et al. International Olympic Committee consensus statement: Molecular basis of connective tissue and muscle injuries in sport[J]. Clinics in Sports Medicine, 2008, 27(1): 231-239.
- [12] Lui P P, Rui Y F, Ni M, et al. Tenogenic differentiation of stem cells for tendon repair—what is the current evidence[J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2011, 5(8): e144-163.
- [13] Paredes J J, Andarawis-Puri N. Therapeutics for tendon regeneration: A multidisciplinary review of tendon research for improved healing[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2016, 1383(1): 125-138.
- [14] 龚圆渊, 张力华. 中药对骨髓间充质干细胞多向分化影响的研究进展[J]. 河南中医, 2012, 32(2): 252-254.
- [15] 马慧萍, 贾正平, 张汝学, 等. 淫羊藿总黄酮含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化[J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(4): 420-428.
- [16] 吉光荣, 董清平, 姚猛, 等. 三七总甙对骨髓间质干细胞体外成骨潜能的影响[J]. 中医药学报, 2003, 35(5): 14-16.
- [17] 张磊, 李智尧, 孙晋, 等. 三七总皂苷促进腱骨愈合的实验研究[J]. 中国骨伤, 2011, 24(2): 132-135.
- [18] 马慧萍, 贾正平, 张汝学, 等. 淫羊藿总黄酮含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化[J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(4): 420-428.
- [19] 赛音其木格, 娜仁图娅, 杨健, 等. 大黄素诱导人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2006, 12(5): 448-452.

The promoting effect of total saponins of panax notoginseng for tendon and bone healing

LIU Xiaohua, SUN Jin, MA Jia, ZHANG Sheng, JIANG Bo, LI Yan, ZHANG Lei*

Department of Joint Surgery and Sports Medicine, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

Abstract The anterior cruciate ligament (ACL) is an important structure of the knee, easily getting hurt. Currently, it is a common practice using the autologous tendon graft to reconstruct the ACL and to treat the ACL injury. However, the tendon-bone interface heals slowly after the ACL reconstruction, which affects the early rehabilitation of the patients. The Panax Notoginseng Saponins (PNS), a blood-activating and blood-stasis drug, is often used for the treatment of fractures. Our previous experiments show that the PNS can significantly enhance the osteogenesis effect of the tendon autograft in the reconstruction of the ACL. Thus, this paper focuses on the effect of the PNS on the osteogenic differentiation of the tendon derived stem cells (TDSCs). The TDSCs of passage 3 are divided into two groups, the PNS group and the negative control group. The effect of the PNS on the cell activity is detected by the flow cytometry and the CCK8. After 72 hours of the PNS treatment, the TDSCs are cultured with the osteogenic medium, and the expression of the osteogenic marker ALP is detected by the ALP staining and the Elisa. The TDSCs are subcutaneously injected into nude mice after the PNS treatment, and then the micro-CT is used to detect the ectopic osteogenesis 4 weeks later. Compared with the negative control group, it is shown that the PNS could promote the osteogenic differentiation of the TDSCs and the ectopic osteogenesis in nude mice.

Keywords panax notoginseng saponins; tendon derived stem cells; osteogenic differentiation ●



(责任编辑 傅雪)