

龙鳖胶囊含药血清通过调控 Hippo-YAP 信号通路促进骨髓间充质干细胞迁移研究

梁桂洪^{1,2}, 黄和涛¹, 曾令烽^{1,2}, 杨 园^{1,2}, 赵金龙¹, 潘建科¹, 杨伟毅¹, 陈红云¹, 罗明辉¹, 韩燕鸿¹, 刘 军^{1,2*}

1. 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)骨科, 广东 广州 510120

2. 广东省中医药科学院 骨与关节退变及损伤研究团队, 广东 广州 510120

摘 要: 目的 探索龙鳖胶囊含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)迁移和 Hippo-Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)信号通路的影响。方法 通过全骨髓贴壁法提取大鼠原代 BMSCs, 取第 3 代细胞, 采用流式细胞术检测 CD29、CD44、CD45 和 CD90 的表达情况; 利用成脂和成骨分化诱导剂对 BMSCs 进行诱导, 成骨分化后采用茜素红染色观察形成矿化结节的情况, 成脂分化后采用油红 O 染色观察脂滴的形成情况。SD 大鼠 ig 龙鳖胶囊(0.625 g/kg), 2 次/d, 连续 7 d, 腹主动脉取血, 制备含药血清; 使用 YAP 抑制剂 Verteporfin (2、5 $\mu\text{mol/L}$) 或 5.0% 含药血清处理 BMSCs, 采用划痕实验和 Transwell 迁移实验检测 24 h 后细胞的迁移情况。给予 2.5%、5.0% 含药血清处理 BMSCs 24 h, 采用 Western blotting 法检测 Hippo-YAP 信号通路相关蛋白的表达情况。**结果** BMSCs 分离培养后正常贴壁生长, 呈长梭形; 经成骨诱导茜素红染色后, 可见大量被染成红色的矿化结节; 经成脂诱导油红 O 染色后, 可见大量被染成橘红色的脂滴; 流式结果显示, 表达 CD29 的阳性率为 99.68%, 表达 CD44 的阳性率为 99.03%, 表达 CD45 的阳性率为 0.14%, CD90 的阳性率为 95.38%, 符合 BMSCs 的特征。与对照组比较, Verteporfin 显著抑制 BMSCs 迁移 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 5.0% 含药血清显著促进 BMSCs 迁移 ($P<0.05$); 与等剂量的 Verteporfin 组比较, 5.0% 含药血清+Verteporfin 组 BMSCs 迁移率明显上升 ($P<0.01$ 、 0.001)。2.5%、5.0% 含药血清均显著下调大型肿瘤抑制因子 2 (large tumor suppressor homolog 2, LATS2) 蛋白表达水平 ($P<0.05$), 上调 YAP 及其下游蛋白结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF) 蛋白表达水平 ($P<0.01$)。**结论** 龙鳖胶囊含药血清具有促进 BMSCs 迁移的作用, 其作用机制可能与调控 Hippo-YAP 信号通路相关。

关键词: 龙鳖胶囊; 含药血清; 骨髓间充质干细胞; Hippo-YAP 信号通路; 细胞迁移

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)15-4569-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.015

Longbie Capsule containing serum promotes migration of bone marrow mesenchymal stem cells by regulating Hippo-YAP signaling pathway

LIANG Gui-hong^{1,2}, HUANG He-tao¹, ZENG Ling-feng^{1,2}, YANG Yuan^{1,2}, ZHAO Jin-long¹, PAN Jian-ke¹, YANG Wei-yi¹, CHEN Hong-yun¹, LUO Ming-hui¹, HAN Yan-hong¹, LIU Jun^{1,2}

1. Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine & Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

2. Bone and Joint Degeneration and Injury Research Team, Guangdong Provincial Academy of Chinese Medicinal Sciences, Guangzhou 510120, China

收稿日期: 2021-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82004386); 国家自然科学基金资助项目(81873314); 国家自然科学基金资助项目(82004383); 国家自然科学基金资助项目(81974574); 国家自然科学基金资助项目(81473698); 广东省中医药局科研项目(20201129); 广东省普通高校重点科研平台和科研项目(2018KQNCX041); 广东省财政厅项目([2014]157 号, [2018]8 号); 广东省中医院中医药科学技术研究专项(YN2019ML08, YN2015MS15, YK2013B2N19); 广东省医学科学技术研究基金资助项目(A2020105, B2019091); 广州市科技计划项目(202102010273)

作者简介: 梁桂洪(1990—), 男, 研究实习生/中医师, 研究方向为中医药防治骨与关节退变及损伤疾病的基础与临床研究。

Tel: 15813340072 E-mail: liangguihong@gzucm.edu.cn

***通信作者:** 刘 军, 男, 主任中医师, 博士生导师, 研究方向为骨与关节退变及损伤疾病的基础与临床研究。

Tel: (020)81887233-35633 E-mail: liujun.tcm@163.com

Abstract: Objective To explore the effect of Longbie Capsule (龙鳖胶囊) containing serum on migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and Hippo-Yes-related protein (YAP) signaling pathway. **Methods** Primary rat BMSCs were extracted by whole bone marrow adherence method, and third generation cells were taken, expressions of CD29, CD44, CD45 and CD90 were detected by flow cytometry; BMSCs were induced with adipogenic and osteogenic differentiation inducers, alizarin red staining was used to observe the formation of mineralized nodules after osteogenic differentiation, oil red O staining was used to observe the formation of lipid droplets after adipogenic differentiation. SD rats were ig Longbie Capsule (0.625 g/kg), twice a day for 7 d, blood was taken from abdominal aorta to prepare drug-containing serum; YAP inhibitor Verteporfin (2, 5 $\mu\text{mol/L}$) or 5.0% drug-containing serum were used to treat BMSCs, scratch test and Transwell migration test were used to detect cell migration after 24 h. BMSCs were treated with 2.5% and 5.0% drug-containing serum for 24 h, Western blotting was used to detect the expressions of proteins related to Hippo-YAP signaling pathway. **Results** After isolation and culture, BMSCs grew normally adherently and showed a long spindle shape. After osteogenic induction of Alizarin Red staining, a large number of mineralized nodules were stained in red; After lipogenic induction oil red O staining, a large number of orange-red lipid droplets could be seen; Flow cytometry results showed that positive rate of CD29, CD44, CD45 and CD90 were 99.68%, 99.03%, 0.14% and 95.38%, which were in line with the characteristics of BMSCs. Compared with control group, Verteporfin significantly inhibited the migration of BMSCs ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), 5.0% drug-containing serum significantly promoted the migration of BMSCs ($P < 0.05$); Compared with the corresponding dose of Verteporfin group, migration rate of BMSCs in 5.0% drug-containing serum + Verteporfin group was significantly increased ($P < 0.01$, 0.001). Both 2.5% and 5.0% drug-containing serum significantly down-regulated large tumor suppressor homolog 2 (LATS2) expression ($P < 0.05$), up-regulated expressions of YAP and its downstream protein connective tissue growth factor (connective tissue growth factor, CTGF) ($P < 0.01$). **Conclusion** Longbie capsule containing serum can promote the migration of BMSCs, and its mechanism may be related to the regulation of Hippo-YAP signaling pathway.

Key words: Longbie Capsule; drug-containing serum; bone marrow mesenchymal stem cells; Hippo-YAP signaling pathway; cell migration

关节软骨因缺乏血管、神经和淋巴液的营养供应,导致其自我修复能力受到限制,损伤后难以再生,从而引起骨关节炎(osteoarthritis, OA)等退行性疾病,严重影响中老年人的关节活动^[1]。目前关于关节软骨修复的方法主要有自体软骨移植、骨软骨移植、干细胞治疗和基因治疗等^[2]。然而,提取自体软骨细胞会对供体部位造成一定的损伤,移植的外源性软骨细胞迁移能力弱,不能有效地聚集到损伤部位,且移植后分泌细胞外基质的功能明显减弱,不能与软骨下板很好地融合,从而降低自体软骨细胞移植治疗效果^[3]。骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是最常用的间充质干细胞(marrow stromal cells, MSCs),由于其具有易获得、多向分化和定向迁移的特性,在骨和软骨修复中得到广泛的研究和应用^[4-5]。当机体组织出现损伤后, BMSCs 因具有较强的迁移能力,可以迁移至损伤处并对损伤组织进行修复^[6],因此增强 BMSCs 的迁移能力有助于促进损伤后的软骨修复。

Hippo-Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)信号通路是调控 MSCs 增殖和分化的重要通路^[7]。BMSCs 的增殖、分化、迁移等生物学功能均受 Hippo-YAP 信号通路的影响^[8]。抑制 Hippo 信号

通路能够提高 BMSCs 在体外的增殖和迁移能力^[9]。YAP 作为 Hippo-YAP 信号通路中的效应基因,具有调节 BMSCs 向成骨和成脂方向分化的作用^[10]。本课题组前期研究表明,龙鳖胶囊具有保护和修复 OA 关节软骨组织的作用^[11],且龙鳖胶囊联合 BMSCs 治疗 OA 的效果更为显著^[12];龙鳖胶囊能够促进 BMSCs 增殖^[13]。本研究通过考察龙鳖胶囊对 BMSCs 中 Hippo-YAP 信号通路和迁移功能的影响,为后续探究龙鳖胶囊通过促进 BMSCs 归巢和成软骨分化修复关节软骨的作用机制奠定基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 10 只,雌雄各半,1.5 月龄,体质量(200 ± 10) g,购自南方医科大学实验动物中心,动物许可证号 SYXK(粤)-2018-0094。动物饲养于广东省中医药科学院实验动物中心 SPF 级环境中。动物实验经广东省中医院动物伦理委员会批准(批准号 2020050)。

1.2 药品与试剂

龙鳖胶囊(批号 200701, 0.5 g/粒)主要由蕲蛇、全蝎、丹参、巴戟天、仙茅、土鳖虫等补肾活血的药物组成,由广东省中医院药剂科生产^[11];SD

大鼠骨髓间充质干细胞完全培养基(批号 RASMX-90011)、SD 大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导分化培养基(批号 RASMX-90021)、SD 大鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基(批号 RASMX-90031)、含 0.04% 乙二胺四乙酸(EDTA)的 0.25% 胰酶(批号 TEDTA-10001)购自赛业(苏州)生物科技有限公司;青-链霉素双抗(批号 15140-122)、不含 EDTA 的 0.25% 胰酶(批号 15050065)、澳洲胎牛血清(批号 10099141)、DMEM 低糖培养基(批号 C11885500BT)、PBS 缓冲液(批号 C10010500BT)购自美国 Gbico 公司;二甲基亚砷(DMSO, 批号 D2650)购自美国 Sigma 公司;YAP 抑制剂维替泊芬(Verteporfin, 批号 S1786)购自美国 Selleck 公司;Transwell 小室(8 μm , 批号 353097)购自美国 BD 公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 K300)购自上海博彩生物科技有限公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(批号 P0012A)、结晶紫染色液(批号 C0121)购自上海碧云天生物技术有限公司;ECL 化学发光液(批号 WBKLS0100)购自美国 Millipore 公司;大型肿瘤抑制因子 2(large tumor suppressor homolog 2, LATS2)抗体(批号 13646)、YAP 抗体(批号 14074)、 β -actin 抗体(批号 3700)、山羊抗兔抗体、山羊抗小鼠抗体购自美国 CST 公司;结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)抗体(批号 ab6992)购自英国 Abcam 公司;干细胞表面标记物 FITC 抗兔 CD45 抗体(批号 202205)和同型阴性对照(批号 400107)、PerCP/Cyanine5.5 抗兔 CD90/抗小鼠 CD90.1 抗体(批号 202515)和同型阴性对照(批号 400149)、Alexa Fluor 647 抗兔 CD44H 抗体(批号 203908)和同型阴性对照(批号 400234)、PE 抗小鼠/兔 CD29 抗体(批号 102207)和同型阴性对照(批号 400907)购自美国 BioLegend 公司。

1.3 仪器

311 型 CO_2 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);HR40-IIA2 型生物安全柜(海尔生物医疗股份有限公司);IC-1000 型 Count Star 自动细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司);5424R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Advantage A10 型超纯水仪(美国 Millipore 公司);TI2-E 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);ChemiDoc Touch 型高灵敏度化学发光成像仪(美国 Bio-Rad 公司);Novo Quanteon 型流式细胞仪(安

捷伦生物);M1000 Pro 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

2 方法

2.1 龙螯胶囊含药血清的制备

将龙螯胶囊内的药粉溶于纯水,配制质量浓度为 0.125 g/mL 的溶液。每日于 9:00、15:00 时,SD 大鼠 ig 龙螯胶囊(0.625 g/kg),连续 7 d。最后 1 次给药 1 h 后,大鼠 ip 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉,腹主动脉采血,3000 r/min 离心 10 min,收集含药血清,于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 30 min,经 0.22 μm 过滤器滤过后分装,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.2 大鼠原代 BMSCs 的提取和培养

采用全骨髓细胞培养法提取和培养大鼠 BMSCs。大鼠 ip 10%水合氯醛(7 mL/kg)处死,于 75%乙醇中浸泡 10 min,无菌条件下取出股骨、胫骨和肱骨,剔除肌肉组织,于含 1%双抗的 PBS 缓冲液中浸泡 10 min;将长骨转移至超净工作台,用含 1%双抗的 PBS 缓冲液冲洗 2 次,置于 10 cm 培养皿中,剪断长骨的干骺端,加入 10 mL 含 1%双抗的 DMEM 低糖培养基,用 10 mL 注射器抽吸培养基冲洗骨髓,收集骨髓悬液,1500 r/min 离心 8 min,弃上清;加入 7 mL SD 大鼠骨髓间充质干细胞完全培养基,混匀后将细胞悬液接种至 25 cm^2 培养瓶中,于培养箱中培养 48 h 后半量换液,再培养 48 h 后全量换液,当细胞融合度达到 90%以上,进行传代培养。

2.3 BMSCs 表面抗原的鉴定

取第 3 代 BMSCs,胰酶消化后制成单细胞悬液,离心后弃上清,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。各取 100 μL 细胞悬液,分别加入 CD29、CD44、CD45、CD90 标记物抗体,同时每份样品设立同型阴性对照,混匀后于冰上避光孵育 30 min,采用流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达。

2.4 BMSCs 成骨诱导分化实验

BMSCs 胰酶消化后计数,将 1×10^5 个细胞接种至包被 0.1%明胶的 6 孔板中,每孔加入 2 mL 完全培养基,于培养箱中培养。当细胞融合度达到 60%~70%,将培养基小心地吸走,按成骨诱导分化培养基试剂盒说明书,每孔中加入 2 mL OriCell 大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基,每 3 天更换 1 次新鲜的成骨诱导液,诱导 4 周后吸去诱导液,PBS 冲洗 2 次;每孔加入 2 mL 4%多聚

甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 2 次; 每孔加入 1 mL 茜素红染液染 3 min, 吸去染液, PBS 冲洗 2~3 次, 将培养板置于倒置显微镜镜下, 观察并拍照染色的效果。

2.5 BMSCs 成脂诱导分化实验

BMSCs 胰酶消化后计数, 将 2×10^5 个细胞接种至 6 孔板中, 按成脂诱导分化培养基试剂盒说明书对 BMSCs 进行诱导处理, 将完全培养基吸走后, 每孔加入 2 mL OriCell 大鼠骨髓间质干细胞成脂诱导分化培养基 A 液 (由基础培养基 175 mL、胎牛血清 20 mL、双抗 2 mL、谷氨酰胺 2 mL、胰岛素 400 μ L、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 200 μ L、罗格列酮 200 μ L、地塞米松 200 μ L 组成), 诱导 3 d 后, 吸走 A 液, 加入 2 mL B 液 (由基础培养基 175 mL、胎牛血清 20 mL、双抗 2 mL、谷氨酰胺 2 mL、胰岛素 400 μ L 组成); 24 h 后, 吸走 B 液, 换回 A 液进行诱导; A 液和 B 液交替作用 6 次后, 继续用 B 液维持培养 5 d 直到脂滴变得大和圆; 多聚甲醛固定, 进行油红 O 染色, 于显微镜下观察成脂染色效果。

2.6 Verteporfin 和龙螯胶囊含药血清对 BMSCs 水平迁移能力的影响

将 BMSCs 以 1×10^5 /孔接种至 6 孔板中, 培养至细胞铺满孔后, 在铺满细胞的六孔板底部中间采用 1 mL 无菌枪头划 1 条直线, 用 PBS 洗去划痕中间漂浮的细胞, 保证划痕区域无细胞存在。设置对照组, Verteporfin (2、5 μ mol/L) 组, 5% 含药血清组, 5% 含药血清 + Verteporfin (2 μ mol/L) 组和 5% 含药血清 + Verteporfin (5 μ mol/L) 组。各给药组分别加入相应药物, 对照组加入 DMSO, 随即在倒置显微镜下观察并拍照划痕的情况, 培养 24 h 后在显微镜下观察并拍照划痕愈合的情况。

2.7 Verteporfin 和龙螯胶囊含药血清对 BMSCs 垂直迁移能力的影响

按“2.6”项下方法进行分组, Transwell 小室中加入 100 μ L 基础培养基湿润小室, 24 孔板的下层分别加入 600 μ L 含有相应药物的培养基。BMSCs 消化离心, 弃上清, 用无血清培养基重悬, 以 2×10^5 /mL 接种于小室上层, 培养 24 h 后, 取出小室, PBS 清洗 2 次; 用甲醇固定 30 min, PBS 清洗 2 次; 结晶紫染色 5 min, PBS 清洗, 用棉签擦去小室上层未能穿过薄膜的细胞, 于显微镜下观察并拍照迁移后的细胞。

2.8 Verteporfin 和龙螯胶囊含药血清对 BMSCs 中 LATS2、YAP 和 CTGF 蛋白表达的影响

BMSCs 胰酶消化后计数, 将 2×10^5 个细胞接种至 6 孔板中, 培养 12 h。设置对照组和含药血清 (2.5%、5.0%) 组, 各给药组加入相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h, 收集细胞, 加入细胞裂解液, 离心取上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 分别加入 LATS2 抗体 (1:1000)、YAP 抗体 (1:1000)、CTGF 抗体 (1:1000) 和 β -actin 抗体 (1:2000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次, 分别加入山羊抗兔抗体 (1:1000)、山羊抗小鼠抗体 (1:2000), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 加入 ECL 化学发光液显影。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验或单因素方差分析。

3 结果

3.1 大鼠原代 BMSCs 的鉴定

如图 1-A 所示, BMSCs 分离后正常贴壁生长, 镜下可见细胞呈长梭形。如图 1-B 所示, 经成骨诱导茜素红染色后, 可见大量被染成红色的矿化结节。如图 1-C 所示, 经成脂诱导油红-O 染色后, 可见大量被染成橘红色的脂滴。如图 1-D~G 所示, 表达 CD29 的阳性率为 99.68%, 表达 CD44 的阳性率为 99.03%, 表达 CD45 的阳性率为 0.14%, CD90 的阳性率为 95.38%, 符合 BMSCs 的特征。以上结果表明提取的细胞为 BMSCs, 可以确保后续研究中细胞来源的准确性。

3.2 Verteporfin 和龙螯胶囊含药血清对 BMSCs 水平迁移能力的影响

低表达 LATS1 抑制 Hippo 信号通路可以促进间充质干细胞的迁移^[9], YAP 作为 Hippo-YAP 信号通路中的效应基因, 可能是调控 BMSCs 迁移的重要蛋白。如图 2 所示, 与对照组比较, YAP 抑制剂 Verteporfin 显著抑制 BMSCs 迁移 ($P < 0.01$ 、 0.001), 5% 含药血清显著促进 BMSCs 迁移 ($P < 0.05$); 与等剂量的 Verteporfin 组比较, 5% 含药血清 + Verteporfin 组 BMSCs 迁移率显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.3 Verteporfin 和龙螯胶囊含药血清对 BMSCs 垂直迁移能力的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, Verteporfin 显著

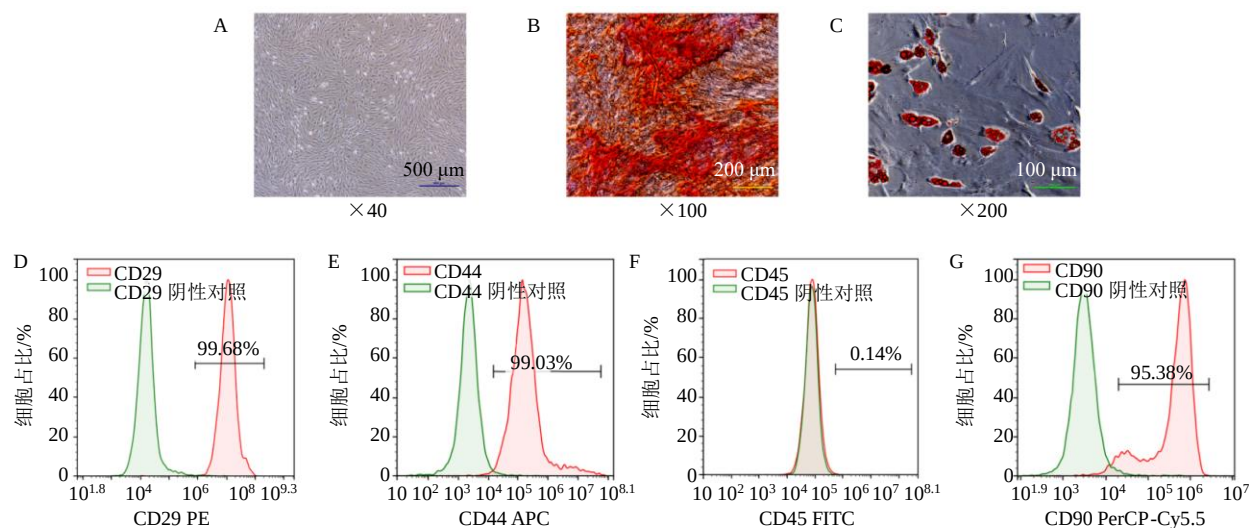
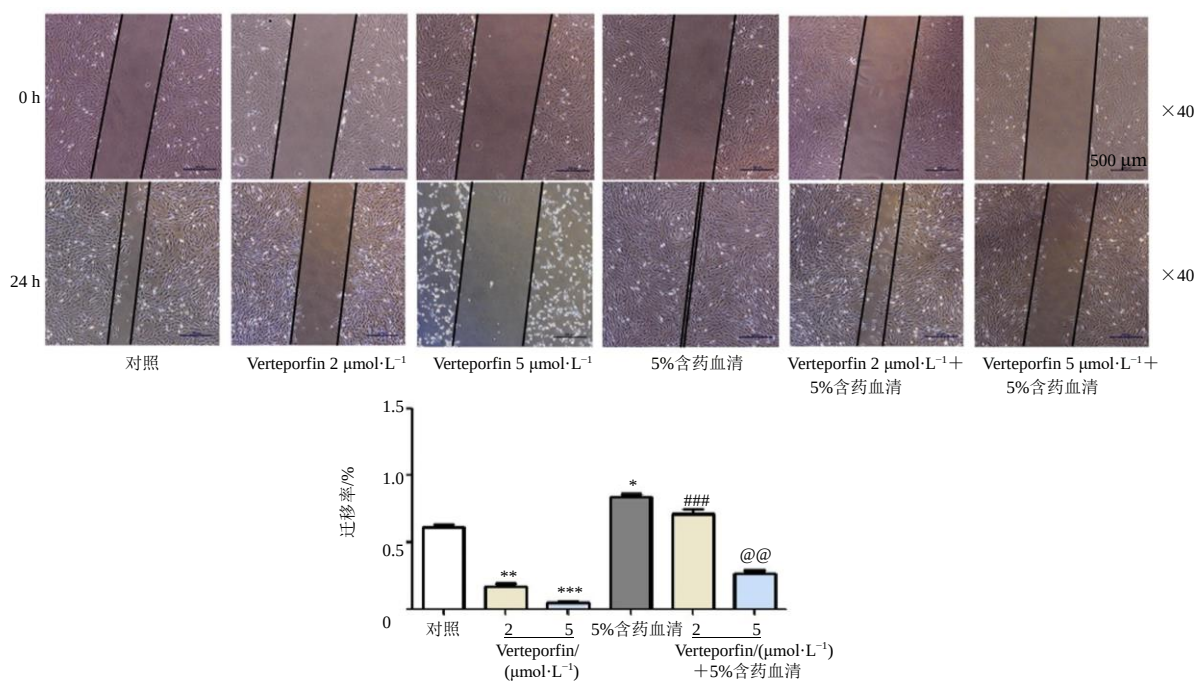


图 1 大鼠原代 BMSCs 的形态 (A)、矿化结节形成 (B)、脂滴形成 (C) 以及 CD29 (D)、CD44 (E)、CD45 (F) 和 CD90 (G) 表面标记物表达情况

Fig. 1 Morphology (A) of primary rat BMSCs, mineralized nodule formation (B), lipid droplet formation (C) and expressions of surface markers of CD29 (D), CD44 (E), CD45 (F) and CD90 (G)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 Verteporfin ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组比较: ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$; 与 Verteporfin ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组比较: @@ $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ vs Verteporfin ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group; @@ $P < 0.01$ vs Verteporfin ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, same as belows

图 2 Verteporfin 和龙螯胶囊含药血清对 BMSCs 水平迁移能力的影响

Fig. 2 Effect of Verteporfin and Longbie Capsules containing serum on horizontal migration of BMSCs

抑制 BMSCs 迁移 ($P < 0.05$), 5%含药血清显著促进 BMSCs 迁移 ($P < 0.05$); 与等剂量的 Verteporfin 组比较, 5%含药血清+Verteporfin 组 BMSCs 迁移数显著升高 ($P < 0.01$)。

3.4 Verteporfin 和龙螯胶囊含药血清对 BMSCs 中 LATS2、YAP 和 CTGF 蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 含药血清 (2.5%、5.0%) 组细胞 LATS2 蛋白表达水平显著降低 ($P <$

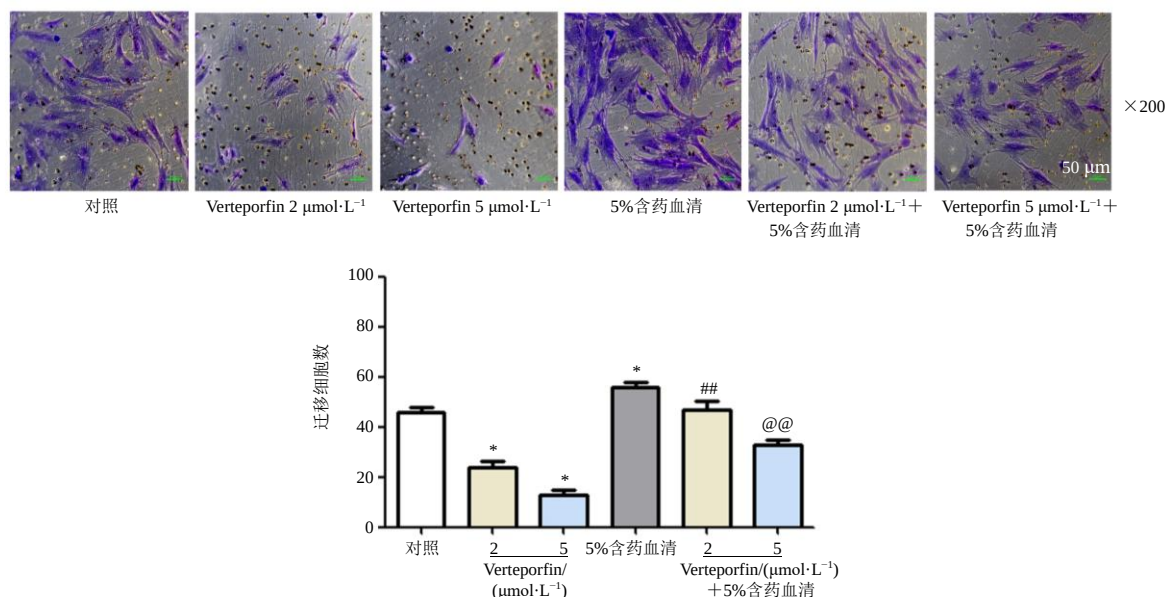


图 3 Verteporfin 和龙鳖胶囊含药血清对 BMSCs 垂直迁移能力的影响

Fig. 3 Effect of Verteporfin and Longbie Capsules containing serum on vertical migration of BMSCs

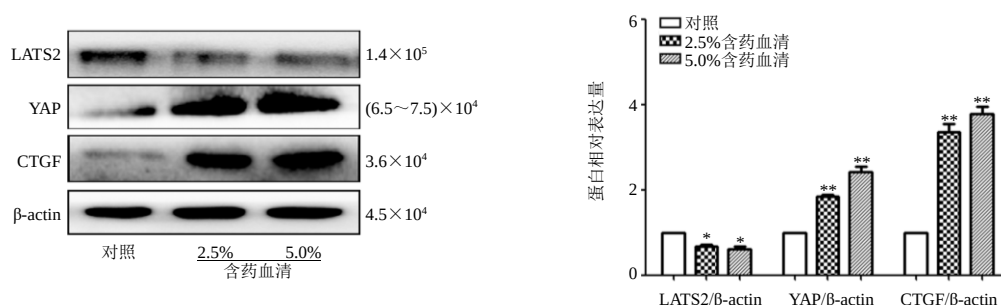


图 4 Verteporfin 和龙鳖胶囊含药血清对 BMSCs 中 LATS2、YAP 和 CTGF 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Verteporfin and Longbie Capsules containing serum on expressions of LATS2, YAP and CTGF in BMSCs

0.05), YAP、CTGF 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), 表明龙鳖胶囊具有调节 Hippo-YAP 信号通路的作用。

4 讨论

关节软骨损伤是发生 OA 等关节退行性慢性疾病的主要病理因素, 因关节软骨自愈能力较差, 受损后无法完成自行修复, 最终引起关节功能性障碍, 严重影响患者的生活质量^[14]。传统的关节软骨修复方法不能形成类似于天然透明软骨组织的结构和生物力学性能, 自体软骨细胞移植技术虽然可以生成生物力学性能良好的透明软骨样组织, 改善患者症状和恢复运动功能^[15], 但存在供体部位损伤、分离的软骨去分化等问题^[16]。BMSCs 移植在关节软骨修复治疗中备受关注, 其在特定条件下可以分化为软骨细胞, 且移植后能够与软骨下骨板融合, 是修

复关节软骨的理想细胞^[17]。BMSCs 同样具有较强的迁移和归巢能力, 当机体组织出现损伤后, MSCs 被损伤部位所召唤后复苏, 定向迁移至损伤处并进行多向分化, 从而对损伤细胞和组织进行修补^[6]。迁移及归巢能力有助于 BMSCs 成功定植于损伤部位, 因此促进 BMSCs 向受损的组织定向迁移是其发挥软骨修复作用的关键环节。本研究通过全骨髓贴壁培养法培养大鼠 BMSCs, 利用成骨、成脂分化和细胞表面标记物等方法鉴定细胞, 结果表明提取的细胞分别被成功诱导出矿化结节和脂肪滴, 且细胞表面标记物 CD29、CD44 和 CD90 为阳性表达, CD45 为阴性表达, 符合 BMSCs 的表型。

Hippo-YAP 信号通路主要由核心分子 LATS1/2 和哺乳动物不育系 20 样激酶 1/2 (mammalian sterile 20-like kinase1/2, MST1/2)、效应分子 YAP 以及转

录共刺激因子 (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ) 组成, 是调控组织、细胞分化和增殖的重要通路, 其多种配体、受体、转录调控因子、激酶以及转录因子在 MSCs 中均有表达^[8]。通过调控 Hippo-YAP 信号通路可能会影响 BMSCs 的增殖、分化、迁移等生物学功能^[9], 从而调控成软骨分化的功能。通过敲低 LATS1 可以抑制 Hippo 信号通路, 降低 YAP 磷酸活性, 增强 YAP 转录活性, 进而提高小鼠 BMSCs 在体外的增殖和迁移能力^[10]。YAP 作为 Hippo-YAP 信号通路中的效应基因, 其活性对 BMSCs 分化作用尤为重要。在 YAP 缺陷的 BMSCs 中, 细胞核 β -连环蛋白 (β -catenin) 表达水平明显降低, Wnt/ β -catenin 信号通路活性减弱, BMSCs 成骨分化功能受限^[18]; YAP 也是人脐带 MSCs 成脂、成骨分化的关键调控因子, 通过上调 YAP, 可以诱导脐带 MSCs 向成骨细胞的分化^[19], 表明 YAP 是 BMSCs 成骨分化重要的调节基因。但 YAP 对 BMSCs 迁移的作用尚不明确, 因此, 本研究考察了 YAP 抑制剂 Verteporfin 对 BMSCs 迁移的影响, 结果表明 Verteporfin 能够抑制 BMSCs 迁移。

补肾活血中药能够有效缓解 OA 患者疼痛和改善关节功能^[20-21]。龙螯胶囊以补肾活血为治疗原则, 对 OA 具有较好的疗效^[22]; 龙螯胶囊能够修复 OA 大鼠的关节软骨^[23], 促进 BMSCs 增殖^[13], 且与 BMSCs 联用对 OA 的治疗效果更为显著^[12]。因此, 龙螯胶囊可能通过调控 BMSCs 迁移从而发挥促进关节软骨修复的作用。本研究结果显示, 龙螯胶囊含药血清具有促进 BMSCs 迁移的作用, 与等剂量的 Verteporfin 比较, 龙螯胶囊含药血清+Verteporfin 显著促进细胞迁移, 表明龙螯胶囊含药血清能够阻断 Verteporfin 抑制的 BMSCs 迁移; 与对照组比较, 龙螯胶囊含药血清显著抑制 LATS2 蛋白表达水平, 上调 YAP 和 CTGF 蛋白表达水平。

综上, YAP 抑制剂 Verteporfin 具有抑制 BMSCs 迁移的功能, 龙螯胶囊含药血清能够阻断这一过程, 从而起到增强 BMSCs 迁移能力的作用, 其作用机制可能与调控 Hippo-YAP 信号通路相关。细胞迁移功能与 BMSCs 归巢、分化及其组织修复能力密切相关, 本课题组后续将研究龙螯胶囊调控 BMSCs 成软骨分化的作用及机制, 为探索补肾活血中药修复关节软骨提供新的研究方向和思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yanke A B, Lee A S, Karas V, *et al.* Surgeon ability to appropriately address the calcified cartilage layer: An *in vitro* study of arthroscopic and open techniques [J]. *Am J Sports Med*, 2019, 47(11): 2584-2588.
- [2] Fuggle N R, Cooper C, Oreffo R O C, *et al.* Alternative and complementary therapies in osteoarthritis and cartilage repair [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2020, 32(4): 547-560.
- [3] Andriolo L, Reale D, di Martino A, *et al.* High rate of failure after matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation in osteoarthritic knees at 15 years of follow-up [J]. *Am J Sports Med*, 2019, 47(9): 2116-2122.
- [4] Zhang Y, Liu Y, Wu M, *et al.* MicroRNA-664a-5p promotes osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by directly downregulating HMGA2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(1): 9-14.
- [5] Yamasaki S, Mera H, Itokazu M, *et al.* Cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation: Review of preclinical and clinical studies [J]. *Cartilage*, 2014, 5(4): 196-202.
- [6] De Becker A, Riet I V. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? [J]. *World J Stem Cells*, 2016, 8(3): 73-87.
- [7] Tang Y, Weiss S J. Snail/Slug-YAP/TAZ complexes cooperatively regulate mesenchymal stem cell function and bone formation [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(5): 399-405.
- [8] 李朗, 董亮, 惠姣洁, 等. 低表达 LATS1 通过抑制 Hippo 信号通路促进间充质干细胞的分化增殖和迁移 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(8): 731-737.
- [9] 董亮, 李朗. LATS2 介导 Hippo 信号途径调控间充质干细胞生物学行为的实验研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31(9): 1143-1148.
- [10] Pan H H, Xie Y T, Zhang Z Q, *et al.* YAP-mediated mechanotransduction regulates osteogenic and adipogenic differentiation of BMSCs on hierarchical structure [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 152: 344-353.
- [11] 潘建科, 杨伟毅, 刘军, 等. 龙螯胶囊对膝关节炎大鼠软骨和滑膜病理的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(7): 807-812.
- [12] 陈鹏, 石小田, 郭宇, 等. 骨髓间充质干细胞移植联合龙螯胶囊修复膝关节炎 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(5): 797-802.
- [13] 潘建科, 郭柏铭, 刘军, 等. 龙螯胶囊对骨髓间充质干细胞增殖活性的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(28): 4439-4444.

- [14] Kwon H, Brown W E, Lee C A, *et al.* Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(9): 550-570.
- [15] Andriolo L, Reale D, Di Martino A, *et al.* Long-term results of arthroscopic matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation: A prospective follow-up at 15 years [J]. *Am J Sports Med*, 2020, 48(12): 2994-3001.
- [16] Andriolo L, Merli G, Filardo G, *et al.* Failure of autologous chondrocyte implantation [J]. *Sports Med Arthrosc Rev*, 2017, 25(1): 10-18.
- [17] Zhang S, Hu B W, Liu W J, *et al.* Articular cartilage regeneration: The role of endogenous mesenchymal stem/progenitor cell recruitment and migration [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2020, 50(2): 198-208.
- [18] Pan J X, Xiong L, Zhao K, *et al.* YAP promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation by regulating β -catenin signaling [J]. *Bone Res*, 2018, 6: 18.
- [19] Lorthongpanich C, Thumanu K, Tangkiettrakul K, *et al.* YAP as a key regulator of adipo-osteogenic differentiation in human MSCs [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 402.
- [20] 潘建科, 洪坤豪, 刘军, 等. 补肾活血中药治疗膝骨关节炎有效性和安全性的系统评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(12): 5248-5256.
- [21] Huang H T, Pan J K, Yang W Y, *et al.* Are kidney-tonifying and blood-activating medicinal herbs better than NSAIDs for knee osteoarthritis? A systematic review and meta-analysis [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2019, 2019: 9094515.
- [22] 潘建科, 杨伟毅, 刘军, 等. 龙螯胶囊治疗膝骨关节炎临床疗效及其对生活质量的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(3): 558-561.
- [23] 李永津, 林涌鹏, 侯宇, 等. 龙螯胶囊与骨髓间充质干细胞移植对膝骨关节炎大鼠软骨修复作用的比较研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2018, 35(1): 123-128.

[责任编辑 李亚楠]