

· 基础研究 ·

骨健口服液联合间充质干细胞来源外泌体
治疗小鼠膝关节炎的实验研究吴捷¹, 张若谷¹, 邱敏¹, 程良艳¹, 徐建波¹, 金敏伟², 金红婷², 王萍儿²

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

摘要 目的:探讨骨健口服液联合间充质干细胞来源外泌体(mesenchymal stem cell-derived exosome, MSC-EXO)治疗小鼠膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的效果及作用机制。**方法:**将 25 只 12 周龄雄性无特定病原 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组、模型组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组, 每组 5 只。假手术组仅切开发关节囊而不切断内侧半月板, 其余 4 组均采用内侧半月板失稳法构建 KOA 模型。骨健组、骨健 MSC-EXO 组小鼠每日用 0.2 mL 的骨健口服液灌胃, 假手术组、模型组、MSC-EXO 组小鼠每日用等量的生理盐水灌胃, 均连续 8 周。MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠每周膝关节腔注射 1 次 10 μ L 的 MSC-EXO, 其余各组小鼠每周膝关节腔注射 1 次等量的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS), 均连续 8 周。干预 8 周后处死小鼠, 进行小鼠膝关节 Micro-CT 分析、膝关节软骨组织病理学观察、膝关节软骨组织中 II 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(collagen II $\alpha 1$, Col2A1)表达水平检测。**结果:**①小鼠膝关节 Micro-CT 分析结果。假手术组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨体积分数均低于模型组($P=0.004, P=0.007, P=0.040, P=0.001$), 骨健组、MSC-EXO 组小鼠的骨体积分数与骨健 MSC-EXO 组的差异均无统计学意义($P=0.108, P=0.126$)。假手术组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨小梁厚度均大于模型组($P=0.015, P=0.023, P=0.023, P=0.009$), 骨健组、MSC-EXO 组小鼠的骨小梁厚度与骨健 MSC-EXO 组的差异均无统计学意义($P=0.347, P=0.062$)。假手术组和骨健组小鼠的骨小梁数量多于模型组($P=0.016, P=0.021$), MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨小梁数量与模型组的差异均无统计学意义($P=0.196, P=0.206$)。假手术组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨小梁分离度均小于模型组($P=0.016, P=0.012, P=0.007, P=0.001$), 骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨小梁分离度小于骨健组($P=0.016$), MSC-EXO 组小鼠的骨小梁分离度与骨健 MSC-EXO 组的差异无统计学意义($P=0.224$)。②小鼠膝关节软骨组织病理学观察结果。假手术组小鼠的关节软骨表面光滑, 软骨细胞排列有序, 提示无明显关节软骨退变。与假手术组相比, 模型组小鼠的关节软骨组织磨损明显, 软骨细胞数量减少且排列紊乱。与模型组相比, 骨健组和 MSC-EXO 组小鼠仅有部分关节软骨磨损, 软骨细胞数量增多且排列有序。与骨健组、MSC-EXO 组相比, 骨健 MSC-EXO 组小鼠的关节软骨表面光滑, 软骨细胞数量增多且排列更为有序。③小鼠膝关节软骨组织中 Col2A1 表达水平检测结果。假手术组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠膝关节软骨组织中 Col2A1 阳性表达面积比均大于模型组($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$), 骨健 MSC-EXO 组小鼠膝关节软骨组织中 Col2A1 阳性表达面积比大于骨健组和 MSC-EXO 组($P=0.000, P=0.000$)。结论:骨健口服液联合 MSC-EXO 可改善 KOA 小鼠的关节软骨病理状态及软骨下骨的异常微结构, 并显示出协同治疗作用, 其作用机制可能与上调膝关节软骨组织中 Col2A1 的表达有关。

关键词 骨关节炎; 膝; 小鼠; 间质干细胞; 外泌体; 骨健口服液; 软骨; 动物实验

Gujian(骨健)peroral liquids combined with mesenchymal stem cell-derived exosome against knee osteoarthritis in mice: an experimental study

WU Jie¹, ZHANG Ruogu¹, QIU Min¹, CHENG Liangyan¹, XU Jianbo¹, JIN Minwei², JIN Hongting², WANG Pinger²

1. The First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

2. Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of Gujian(骨健, GJ)peroral liquids combined with mesenchymal stem cell-derived exosome(MSC-EXO) on knee osteoarthritis(KOA) in mice, and to explore its mechanism. **Methods:** Twenty-five 12-week-old specific pathogen

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2022ZB116)

通讯作者:王萍儿 E-mail:pingerwang@zcmu.edu.cn

free(SPF)-grade male C57BL/6J mice were randomized into sham-operated group, model group, GJ group, MSC-EXO group, GJ combined MSC-EXO group, 5 cases in each group. All mice but the ones in sham-operated group were subjected to destabilized medial meniscus (DMM) method on the right knees for inducing KOA, while the ones in sham-operated group underwent surgery for merely incising the joint capsule, but without transecting medial meniscus. After successful modeling, the mice in GJ group and GJ combined MSC-EXO group were intervened by intragastric administration with 0.2 mL GJ peroral liquids, while the ones in sham-operated group, model group and MSC-EXO group with the same dose of normal saline, once a day for consecutive 8 weeks; moreover, the mice in MSC-EXO group and GJ combined MSC-EXO group were further intervened by knee intra-articular injection of 10 μ L MSC-EXO, while the ones in sham-operated group, model group and GJ group by the same dose of phosphate buffer solution (PBS), once a week for consecutive 8 weeks. After the end of intervention, the mice were sacrificed by cervical dislocation method, and their right knees were harvested for scanning and analysing by using Micro-CT, followed by observation on histopathological changes of knee tissues and determination of the expression level of collagen II α 1 (Col2A1) in knee cartilage tissues. **Results:** ①The bone volume fraction was lower in sham-operated group, GJ group, MSC-EXO group and GJ combined MSC-EXO group compared to model group ($P=0.004, P=0.007, P=0.040, P=0.001$), while, there was no statistical difference between GJ group and GJ combined MSC-EXO group as well as between MSC-EXO group and GJ combined MSC-EXO group ($P=0.108, P=0.126$). The trabecular thickness was greater in sham-operated group, GJ group, MSC-EXO group and GJ combined MSC-EXO group compared to model group ($P=0.015, P=0.023, P=0.023, P=0.009$), while, there was no statistical difference between GJ group and GJ combined MSC-EXO group as well as between MSC-EXO group and GJ combined MSC-EXO group ($P=0.347, P=0.062$). The trabecular number was more in sham-operated group and GJ group compared to model group ($P=0.016, P=0.021$), while, there was no statistical difference between MSC-EXO group and model group as well as between GJ combined MSC-EXO group and model group ($P=0.196, P=0.206$). The trabecular separation was lower in sham-operated group, GJ group, MSC-EXO group and GJ combined MSC-EXO group compared to model group ($P=0.016, P=0.012, P=0.007, P=0.001$), and was lower in GJ combined MSC-EXO group compared to GJ group ($P=0.016$), while, there was no statistical difference between MSC-EXO group and GJ combined MSC-EXO group ($P=0.224$). ②The mice in sham-operated group presented with smooth articular cartilage surface and neatly arranged chondrocytes, which suggesting no obvious degeneration in articular cartilage; compared with that of sham-operated group, the changes, manifesting as obviously worn articular cartilage tissues, decreased and disordered arranged chondrocytes, were observed in mice of model group; compared with that of model group, the mice in GJ group and MSC-EXO group presented with partial worn articular cartilage with increased and neatly arranged chondrocytes; the improvement was better in GJ combined MSC-EXO group in contrast to GJ group and MSC-EXO group. ③The positive expression area ratio of Col2A1 in knee cartilage tissues was greater in mice of sham-operated group, GJ group, MSC-EXO group and GJ combined MSC-EXO group compared to model group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$), and was greater in GJ combined MSC-EXO group compared to GJ group and MSC-EXO group ($P=0.000, P=0.000$). **Conclusion:** GJ peroral liquids combined with MSC-EXO can improve the pathological state of articular cartilage and the abnormal microstructure of subchondral bone in KOA mice, and it behaves a synergistic therapeutic action. It may exert the effects by up-regulating the expression of Col2A1 in knee cartilage tissues.

Keywords osteoarthritis; knee; mice; mesenchymal stem cells; exosomes; Gujian (骨健) peroral liquids; cartilage; animal experimentation

随着人类寿命的延长和全球老龄化的加剧,膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的发病率逐年上升。为了更有效地控制 KOA 的进展,应重视其早期诊断和治疗^[1]。研究^[2]发现,软骨损伤与软骨下骨微结构改变在 KOA 的发病过程中几乎同时发生。软骨细胞受损后会发生肥大和增生,失去形成新的软骨基质的能力,进而导致软骨下骨微结构的异常重塑^[3]。目前临床仍然缺乏有效治疗 KOA 的方法,促进关节软骨修复与再生可能是解决该问题的关键^[4-5]。外泌体(exosome, EXO)是一种直径为 30 ~ 200 nm 的细胞外囊泡,内含与母体细胞功能类似的各种生物活性物

质,其主要功能是介导细胞间的物质交换和信号传导。EXO 可以通过吞噬作用释放其内含的生物活性物质来影响目标细胞,从而促进不同组织之间的细胞通讯^[6]。近年来,EXO 被认为在 KOA 的早期诊断和治疗中具有重要作用。研究^[7-9]发现,间充质干细胞来源外泌体(mesenchymal stem cell-derived exosome, MSC-EXO)可以促进软骨再生,从而修复软骨组织,有望成为治疗 KOA 的新方法。中医学认为,肾主骨生髓,肾、髓、骨之间关系密切。肾生骨髓,骨为髓之府,髓的盈盛亏虚可影响骨的生长发育和代谢。因此,中医治疗 KOA 多侧重于补肾调髓、肾髓同

治^[10-11]。骨健口服液是临床常用的治疗 KOA 的补肾调髓方剂之一^[12-13]。为了探讨骨健口服液联合 MSC-EXO 治疗 KOA 的效果及作用机制,我们开展了此项研究,现报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

小鼠间充质干细胞 C3H10T1/2(浙江美森细胞科技有限公司)。无特定病原 C57BL/6J 小鼠 25 只,雄性,12 周龄,体质量(25.35 ± 1.75)g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005],饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心[使用许可证号:SYXK(浙)2018-0012]。实验方案由浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审查通过,伦理批件号:IACUC-202305-18。

1.2 实验药物

骨健口服液由浙江省中医院提供(生产批号:20220512),其药物组成为:黄芪 20 g、丹参 20 g、当归 20 g、杜仲 15 g、延胡索 10 g、菟丝子 10 g。

1.3 实验试剂

DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),RIPA 裂解液、蛋白酶和磷酸酶抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司),二喹啉甲酸试剂盒、苏木素(美国默克公司),4% 多聚甲醛(生工生物工程股份有限公司),阿尔新蓝-苏木素(alcianblue-hematoxylin, ABH)、橙黄 G、伊红(美国 Sigma 公司),CD63 一抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司),TSG101 一抗(杭州华安生物技术有限公司),II 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(collagen II $\alpha 1$, Col2A1)一抗、生物素标记山羊抗兔免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)G 二抗(美国 Abcam 公司),兔二步法检测试剂盒、DAB 显色试剂盒(中杉金桥公司),超敏 ECL 化学发光底物(四正柏生物科技有限公司)。

1.4 实验仪器

组织脱水机(日本樱花公司),石蜡包埋机、冰冻切片机、石蜡切片机(美国赛默飞世尔公司),荧光正置显微镜(德国蔡司公司),Micro-CT(比利时 Bruker 公司),激光粒度分析仪(英国马尔文帕纳科公司),透射电子显微镜(日本日立公司)。

2 方法

2.1 MSC-EXO 的提取和鉴定方法

2.1.1 MSC-EXO 提取方法

选择生长良好的第 4 ~ 6 代 MSC,待细胞融合至 90% 时,更换为无 EXO 的血清培养基,连续培养 48 h 后收集上清液。4 ℃ 下以 $300 \times g$ 离心 10 min,取上清液。4 ℃ 下以 $2000 \times g$ 离心 10 min,去除死亡细胞。4 ℃ 下以 $10\,000 \times g$ 离心 30 min,取上清液。4 ℃ 下以 $100\,000 \times g$ 离心 4 h,所得沉淀即为 MSC-EXO。向沉淀中加入 200 μ L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)并吹打重悬,之后在 -80 ℃ 下保存备用。

2.1.2 MSC-EXO 鉴定方法 ①透射电子显微镜观察 EXO 的形态:用移液器吸取 20 μ L 重悬于 PBS 中的 MSC-EXO,滴在无菌蜡纸上。将 2 mm 的铜网盖在标本上,静置 2 min。用滤纸吸去多余液体,室温下晾干。用 30 μ L 的 3% 磷钨酸溶液负染 3 min。室温下晾干后,将标本置于透射电子显微镜下进行观察和拍照。②激光粒度分析仪检测 EXO 的粒径:选择合适的粒径样品池,取适量的样品稀释,直接滴入样品池中,使用激光粒度分析仪的动态光散射技术测定样品的粒径。③蛋白质印迹法检测 EXO 表面蛋白的表达量:取 100 μ L EXO 样品,加入等体积含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,4 ℃ 下以 $13\,800 \times g$ 离心 15 min,收集上清液提取总蛋白,采用二喹啉甲酸法测定蛋白浓度。之后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,先在 80 V 条件下电泳 30 min,再在 120 V 条件下电泳 60 min,以分离蛋白质。采用湿转法将蛋白质转移到聚偏氟乙烯膜上,并用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。采用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,加入一抗稀释液(CD63 和 TSG101 的稀释比例均为 1:1000),4 ℃ 孵育过夜。采用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,加入二抗稀释液(稀释比例为 1:5000),室温孵育 1 h。采用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,应用增强化学发光系统显色。

2.2 动物分组、造模和干预方法

2.2.1 分组方法 将 25 只小鼠称重,按体质量由高到低排序后分为 5 个区间,每个区间包含 5 只小鼠。从每个区间中随机选取 1 只小鼠,分别分配入假手术组、模型组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组,每组 5 只。

2.2.2 KOA 造模方法 假手术组小鼠仅切开发关节囊,而不切断内侧半月板,其余 4 组小鼠均采用内侧半月板失稳法构建 KOA 模型。将小鼠仰卧位固定于操作台上,通过腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠进行麻

醉。待小鼠完全麻醉后,无菌条件下,于小鼠右侧膝关节处纵向切开皮肤,暴露膝关节腔。用刀片切断与内侧半月板相连的内侧副韧带,使内侧半月板呈游离状态,从而造成膝关节不稳定,注意避免损伤关节软骨面。逐层缝合关节囊、皮下组织及皮肤。

2.2.3 干预方法 骨健组、骨健 MSC-EXO 组小鼠每日采用 0.2 mL 的骨健口服液灌胃,假手术组、模型组、MSC-EXO 组小鼠每日采用等量的生理盐水灌胃,均连续 8 周。骨健口服液说明书上,人的口服剂量为 $0.85 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,通过体表面积折算得出小鼠的等效剂量比值为 $7.735 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。对于一只 26 g 的小鼠,灌胃剂量为 0.2 mL。MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠每周膝关节腔注射 1 次 $10 \mu\text{L}$ MSC-EXO,其余各组小鼠每周膝关节腔注射 1 次等量的 PBS,均连续 8 周。

2.3 实验指标观察方法

2.3.1 小鼠膝关节软骨下骨微结构分析方法 干预 8 周后,采用颈椎脱位法处死小鼠,收集小鼠的右侧膝关节。将膝关节标本在 4% 多聚甲醛中固定 3 d 后,进行 Micro-CT 扫描。采用 CTvox3.0 软件进行三维重建,并利用 CTAn1.10 软件定量分析胫骨平台软骨下骨的骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量及骨小梁分离度。

2.3.2 小鼠膝关节软骨组织病理学观察方法

Micro-CT 扫描结束后,将小鼠膝关节标本用 14% 乙二胺四乙酸溶液脱钙 14 d,每隔 1 d 换 1 次脱钙液。脱钙结束后,将标本放置在流水下冲洗 24 h,然后进行脱水处理和石蜡包埋。对制作完成的全膝关节石蜡标本进行常规切片,切片厚度为 $3.5 \mu\text{m}$ 。随机选取部分膝关节软骨组织切片放入 60°C 烘箱干燥。对烘干后的切片进行脱蜡和复水处理,然后将其浸入 1% 盐酸酒精中,持续 30 s。取出切片,用干净的卫生纸吸去多余水分,将切片浸入 ABH 染液中,室温下放置 1 h。用纯水浸洗切片 3 次,每次 3 min。将切片再次浸入 1% 盐酸酒精中,3 s 后用纯水浸洗 3 次,每次 3 min。将切片浸入 0.5% 氨水中 15 s,然后用纯水浸洗 2 次,每次 3 min。将切片浸入 95% 乙醇中,1 min 后用伊红-橙黄 G 染色,持续 90 s。染色完成后,将切片分 3 次浸入 95% 乙醇中,每次 1 min。将切片放入 37°C 烘箱中烘干,用中性树脂封片。采用显微镜观察小鼠膝关节软骨组织的病理学改变情况。

2.3.3 小鼠膝关节软骨组织中 Col2A1 表达水平测定方法 随机选取部分小鼠膝关节软骨切片经过烤片、脱蜡及复水处理后,浸入柠檬酸钠缓冲液中,在 60°C 烘箱中放置 4 h 以进行抗原修复。修复完成后,使用 PBS 清洗切片,然后用 0.3% 聚乙二醇辛基苯基醚处理 10 min。PBS 清洗切片,然后在湿盒中用过氧化氢阻断剂室温孵育 15 min。PBS 清洗后,加入 Col2A1 一抗稀释液(稀释比例为 1:200),在 4°C 下孵育过夜。PBS 清洗切片,滴加 IgG 二抗,室温下封闭 20 min。PBS 清洗后,滴加 DAB 显色液,显色 5 min。显色后用苏木素进行复染,然后依次经过 1% 盐酸酒精、0.5% 氨水、二甲苯进行处理,以实现脱水和透明化。采用中性树脂封片后,在显微镜下观察 Col2A1 的表达情况,并采集图像。用 ImageJ 软件对图像进行分析,测定 Col2A1 阳性表达面积。

2.4 数据统计方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计分析。假手术组、模型组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量、骨小梁分离度、膝关节软骨 Col2A1 阳性表达面积比的组间整体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 MSC-EXO 鉴定结果

在透射电子显微镜下, MSC-EXO 呈类圆形且有完整包膜的囊状结构(图 1)。采用激光粒度分析仪测定 MSC-EXO 的粒径,结果显示其平均粒径为 200 nm(图 2)。通过蛋白质印迹法检测发现,在 MSC-EXO 中存在 EXO 特异性蛋白 CD63 和 TSG101(图 3)。这些结果证明 MSC-EXO 的分离和提取成功,可用于后续实验。

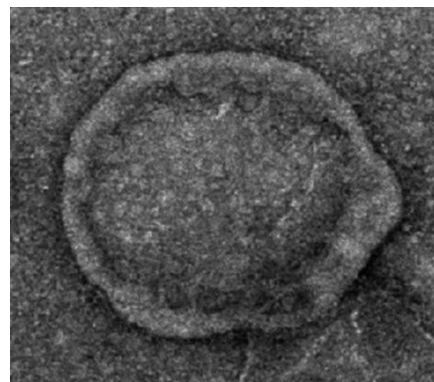


图 1 透射电子显微镜下的间充质干细胞来源外泌体形态图($\times 10\ 000$)

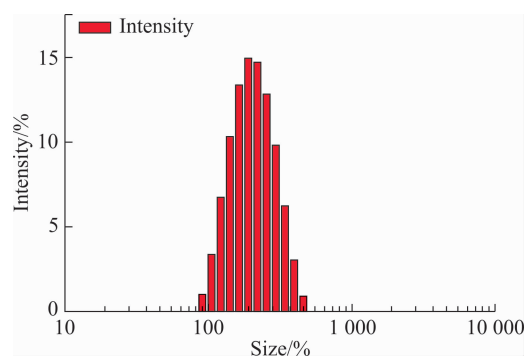
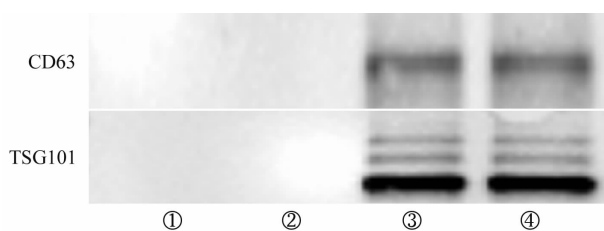


图2 间充质干细胞来源外泌体粒径分布图



①②间充质干细胞裂解液;③④间充质干细胞来源外泌体。

图3 间充质干细胞来源外泌体特异性蛋白的
蛋白质印迹法检测结果

3.2 小鼠膝关节软骨下骨微结构 Micro-CT 分析结果

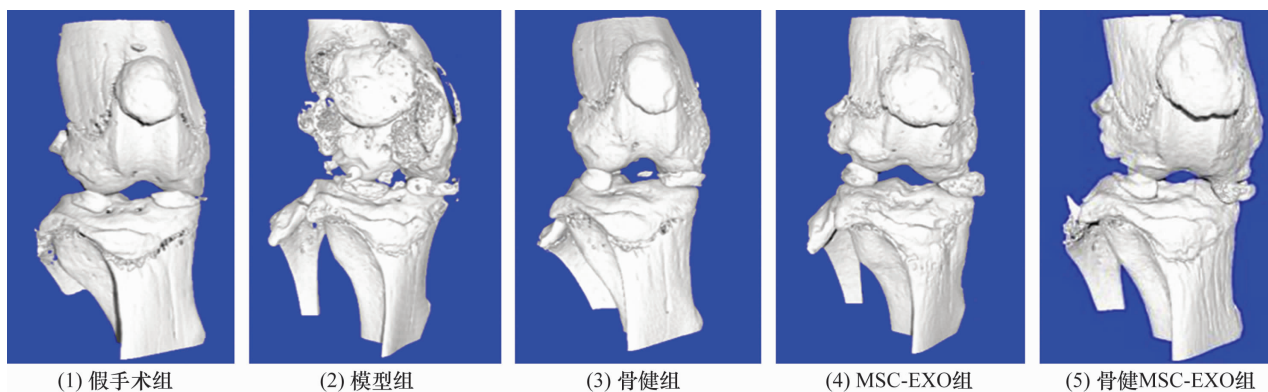
实验期间小鼠活动规律正常,未发生感染或死亡。小鼠膝关节 Micro-CT 分析结果显示,各组小鼠的骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量、骨小梁分离

度比较,总体差异均有统计学意义(表1)。假手术组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨体积分数均低于模型组($P = 0.004, P = 0.007, P = 0.040, P = 0.001$),骨健组、MSC-EXO 组小鼠的骨体积分数与骨健 MSC-EXO 组的差异均无统计学意义($P = 0.108, P = 0.126$)。假手术组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨小梁厚度均大于模型组($P = 0.015, P = 0.023, P = 0.023, P = 0.009$),骨健组、MSC-EXO 组小鼠的骨小梁厚度与骨健 MSC-EXO 组的差异均无统计学意义($P = 0.347, P = 0.062$)。假手术组和骨健组小鼠的骨小梁数量多于模型组($P = 0.016, P = 0.021$),MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨小梁数量与模型组的差异均无统计学意义($P = 0.196, P = 0.206$)。假手术组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨小梁分离度均小于模型组($P = 0.016, P = 0.012, P = 0.007, P = 0.001$),骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨小梁分离度小于骨健组($P = 0.016$),MSC-EXO 组小鼠的骨小梁分离度与骨健 MSC-EXO 组的差异无统计学意义($P = 0.224$)。小鼠膝关节 Micro-CT 三维重建图片见图4。

表1 5组小鼠膝关节软骨下骨微结构 Micro-CT 分析结果

组别	样本量/ 只	骨体积分数/ ($\bar{x} \pm s, \%$)	骨小梁厚度/ ($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)	骨小梁数量/ ($\bar{x} \pm s, \text{个} \cdot \text{mm}^{-1}$)	骨小梁分离度/ ($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)
假手术组	5	71.508 ± 5.163	0.193 ± 0.213	5.704 ± 0.569	0.064 ± 0.005
模型组	5	93.516 ± 3.790	0.141 ± 0.006	4.343 ± 0.173	0.123 ± 0.007
骨健组	5	78.209 ± 3.390	0.180 ± 0.018	5.309 ± 0.284	0.095 ± 0.009
MSC-EXO ¹⁾ 组	5	80.817 ± 6.292	0.170 ± 0.014	4.982 ± 0.374	0.080 ± 0.013
骨健 MSC-EXO ¹⁾ 组	5	73.385 ± 2.213	0.196 ± 0.019	5.044 ± 0.441	0.067 ± 0.008
<i>F</i> 值		11.641	5.403	4.857	23.272
<i>P</i> 值		0.001	0.014	0.020	0.000

注:1)为间充质干细胞来源外泌体。



MSC-EXO:间充质干细胞来源外泌体。

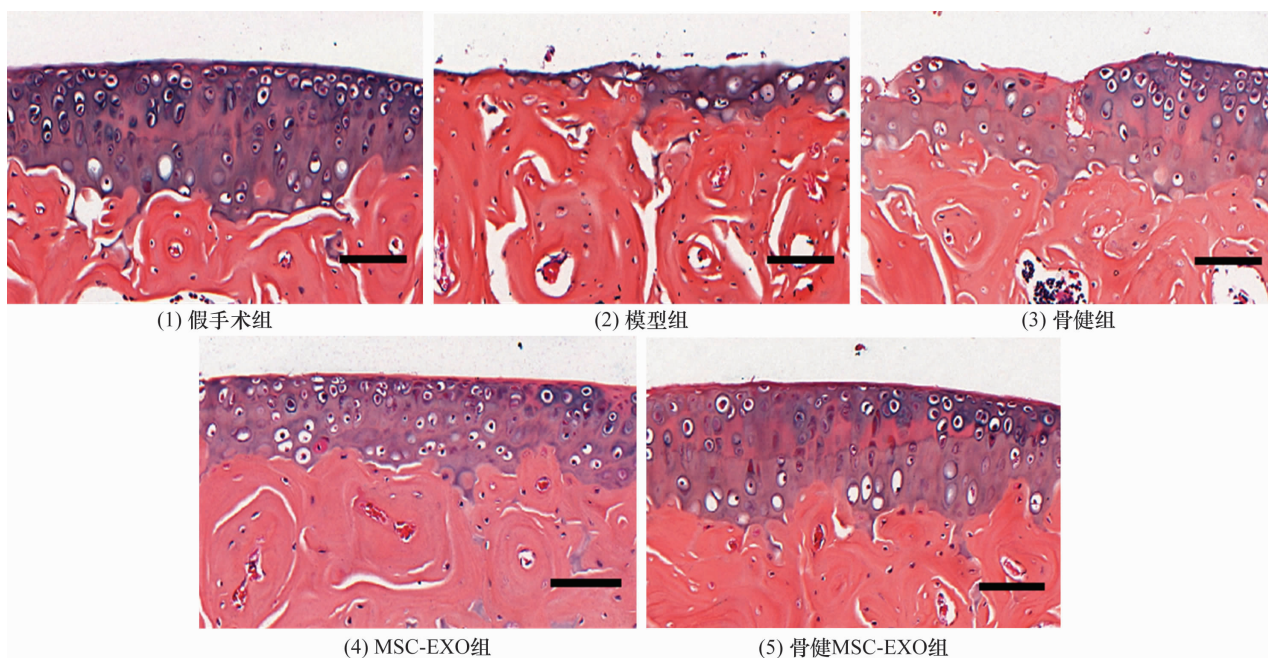
图4 小鼠膝关节 Micro-CT 三维重建图片

3.3 小鼠膝关节软骨组织病理学观察结果

ABH 染色结果(图 5)显示,假手术组小鼠的关节软骨表面光滑,软骨细胞排列有序,提示无明显关节软骨退变。与假手术组相比,模型组小鼠的关节软骨组织磨损明显,软骨细胞数量减少且排列紊乱。与模型组相比,骨健组和 MSC-EXO 组小鼠仅有部分关节软骨磨损,软骨细胞数量增多且排列有序。与骨健组、MSC-EXO 组相比,骨健 MSC-EXO 组小鼠的关节软骨表面光滑,软骨细胞数量增多且排列更为有序。

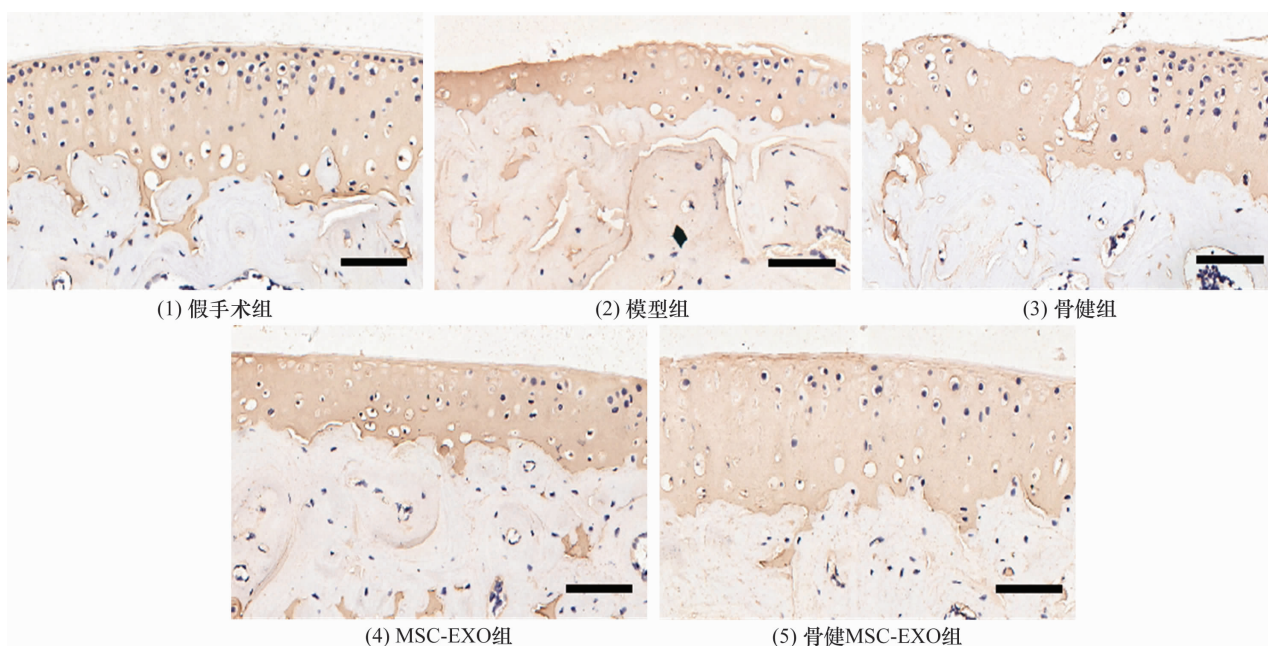
3.4 小鼠膝关节软骨组织中 Col2A1 表达水平检测结果

各组小鼠膝关节软骨组织中 Col2A1 阳性表达面积比的总体比较,差异有统计学意义(图 6、表 2)。假手术组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠膝关节软骨组织中 Col2A1 阳性表达面积比均大于模型组($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$),骨健 MSC-EXO 组小鼠膝关节软骨组织中 Col2A1 阳性表达面积比大于骨健组和 MSC-EXO 组($P=0.000, P=0.000$)。



MSC-EXO:间充质干细胞来源外泌体。

图 5 小鼠膝关节软骨组织阿尔新蓝-苏木素染色图片(×300)



MSC-EXO:间充质干细胞来源外泌体。

图 6 小鼠膝关节软骨组织中Ⅱ型胶原蛋白α1链表达水平的免疫组织化学检测结果(×300)

表 2 5 组小鼠膝关节软骨组织中Ⅱ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链阳性表达面积比

组别	样本量/只	Col2A1 ²⁾ 阳性表达面积比/ $(\bar{x} \pm s, \%)$
假手术组	5	38.564 \pm 2.844
模型组	5	18.887 \pm 0.651
骨健组	5	27.567 \pm 0.834
MSC-EXO ¹⁾ 组	5	26.851 \pm 0.715
骨健 MSC-EXO ¹⁾ 组	5	36.219 \pm 0.714
<i>F</i> 值		91.888
<i>P</i> 值		0.000

注:1)为间充质干细胞来源外泌体;2)为Ⅱ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链。

4 讨 论

KOA 是中老年人常见的骨骼肌肉系统疾病,随着病情的加重,可导致患者逐渐丧失活动能力^[14]。膝关节软骨的病变或破坏、膝关节的退行性改变或损伤、膝关节内应力失衡,以及膝关节其他结构的破坏与修复之间的平衡失调,是导致 KOA 发生和发展的主要原因。目前,治疗 KOA 的方法主要包括应用镇痛药、非甾体抗炎药、透明质酸衍生物、皮质醇类药,以及关节镜手术、关节置换术等;然而,仍缺乏最佳的治疗方案^[15-19]。

骨健口服液具有补肾调髓的功效,是治疗 KOA 的中药制剂之一,其药物组成包括黄芪、丹参、当归、杜仲、延胡索和菟丝子。现代药理学研究^[20-23]显示:黄芪及其活性成分可以有效促进干细胞体外增殖,并能诱导干细胞向成骨细胞、成脂细胞、神经样细胞和心肌样细胞分化;杜仲可诱导干细胞向成骨细胞分化,有助于预防骨质疏松;菟丝子可促进干细胞增殖。此外,杜仲、菟丝子还可通过多环节、多途径调节骨生成与骨吸收过程^[24]。由这些研究结果可知,骨健口服液的药物组成与 KOA 的病理机制相匹配,体现了其补肾调髓、强筋壮骨的治疗理念。

EXO 是近年来干细胞领域的研究热点。据报道^[25],MSC-EXO 在心肌缺血再灌注损伤、伤口愈合、肝再生以及骨或软骨再生方面具有潜在的应用价值。与干细胞相比,EXO 具有更为强大的信号分子转运和调控能力,为在无细胞移植治疗情况下实现软骨组织的再生与修复提供了新的策略。C3H10T1/2 细胞是由 Reznikoff 等^[26]于 1972 年从 C3H 系小鼠胚胎中分离并建立的一种具有多向分化潜能的间充质干细胞株,已被用于研究间充质干细胞向脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞分化的机制^[27-29],被认为是一种可靠的 MSC 细胞模型^[30]。此外,有学者^[31]从 C3H10T1/2 细胞中提取 EXO,并探讨了这些 EXO 对人滋养细胞

系 HTR8/Svneo 迁移的影响。因此,本研究选择 C3H10T1/2 细胞进行 MSC-EXO 的提取。

本研究发现,假手术组小鼠的膝关节软骨未见明显的骨质破坏与增生。模型组小鼠的膝关节软骨表面变得粗糙,有磨损现象;软骨细胞的排列结构紊乱,数量减少;骨小梁的厚度降低、数量减少,骨体积分数和骨小梁分离度值升高。这些观察结果表明,KOA 模型构建成功。小鼠膝关节 Micro-CT 分析结果显示,与模型组相比,骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠的骨体积分数和骨小梁分离度降低,而骨小梁厚度增大。小鼠膝关节软骨组织病理学观察结果显示,骨健组和 MSC-EXO 组小鼠的软骨细胞数量较模型组多,提示骨健口服液和 MSC-EXO 在提高软骨细胞数量方面有一定的疗效,但并不全面。相比之下,骨健 MSC-EXO 组小鼠的软骨细胞数量增加、排列有序,提示骨健口服液联合 MSC-EXO 的治疗效果更好。小鼠膝关节软骨组织中 Col2A1 阳性表达水平检测结果显示,假手术组、骨健组、MSC-EXO 组、骨健 MSC-EXO 组小鼠膝关节软骨中 Col2A1 的阳性表达面积比均大于模型组,提示可通过促进Ⅱ型胶原表达,增加关节软骨基质的合成,从而起到治疗 KOA 的作用。与骨健组、MSC-EXO 组相比,骨健 MSC-EXO 组小鼠膝关节软骨中 Col2A1 的阳性表达面积比显著升高,表明骨健口服液联合 MSC-EXO 的治疗效果更佳。

本研究结果表明,骨健口服液联合 MSC-EXO 可改善 KOA 小鼠的关节软骨病理状态及软骨下骨的异常微结构,并显示出协同治疗作用,其作用机制可能与上调膝关节软骨组织中 Col2A1 的表达有关。以骨健口服液为代表的补肾调髓中药与 EXO 的联合调控机制有待深入研究,这可能为中医防治 KOA 提供新的研究思路和理论基础。

参考文献

- [1] VAN DEN BOSCH M H J. Osteoarthritis year in review

- 2020;biology[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2021, 29(2): 143–150.
- [2] MURATOVIC D, FINDLAY D M, CICUTTINI F M, et al. Bone marrow lesions in knee osteoarthritis: regional differences in tibial subchondral bone microstructure and their association with cartilage degeneration[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27(11): 1653–1662.
- [3] KUYINU E L, NARAYANAN G, NAIR L S, et al. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes[J]. J Orthop Surg Res, 2016, 11: 19.
- [4] STODDART J C, DANDRIDGE O, GARNER A, et al. The compartmental distribution of knee osteoarthritis – a systematic review and meta-analysis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2021, 29(4): 445–455.
- [5] REICHENBACH S, FELSON D T, HINCAPIÉ C A, et al. Effect of biomechanical footwear on knee pain in people with knee osteoarthritis: the BIOTOK randomized clinical trial[J]. JAMA, 2020, 323(18): 1802–1812.
- [6] SHAO H, IM H, CASTRO C M, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles[J]. Chem Rev, 2018, 118(4): 1917–1950.
- [7] 伏玉龙, 郭珈宜, 李峰, 等. 间充质干细胞来源外泌体修复膝关节关节炎软骨损伤作用机制的研究进展[J]. 中医正骨, 2023, 35(11): 76–79.
- [8] VONK L A, VAN DOOREMALEN S F J, LIV N, et al. Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles promote human cartilage regeneration in vitro[J]. Theranostics, 2018, 8(4): 906–920.
- [9] YAN L, LIU G, WU X. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells in mechanical environment show improved osteochondral activity via upregulation of LncRNA H19[J]. J Orthop Translat, 2020, 26: 111–120.
- [10] 胡雪琴, 金红婷, 施振宇, 等. 髓病理论及其在骨病学中的应用[J]. 中医正骨, 2018, 30(11): 39–42.
- [11] 胡雪琴, 金红婷, 肖鲁伟, 等. “浙派中医”骨伤学家肖鲁伟辨治“髓系骨病”的学术经验[J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(10): 1071–1073.
- [12] 汪小健, 王瑞, 顾勇, 等. 骨健口服液治疗原发性骨质疏松症的临床疗效分析[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(10): 2424–2427.
- [13] WU C, GE Q, SHI Z, et al. Elucidation of the underlying mechanism of Gujian oral liquid acting on osteoarthritis through network pharmacology, molecular docking, and experiment[J/OL]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 9230784 [2023–11–02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35937393/>.
- [14] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745–1759.
- [15] SPROUSE R A, HARRIS G D, SPROUSE G D E. A practical approach to knee OA[J]. J Fam Pract, 2020, 69(7): 327–334.
- [16] SCHNITZER T J, EASTON R, PANG S, et al. Effect of tanezumab on joint pain, physical function, and patient global assessment of osteoarthritis among patients with osteoarthritis of the hip or knee: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2019, 322(1): 37–48.
- [17] UTAMAWATIN K, PHRUETTHIPHAT O A, APINYANKUL R, et al. The efficacy of intra-articular triamcinolone acetate 10 mg vs. 40 mg in patients with knee osteoarthritis: a non-inferiority, randomized, controlled, double-blind, multicenter study[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2023, 24(1): 92.
- [18] 陈军, 凌仕勇, 吴卓一, 等. 膝关节镜手术后静脉血栓形成危险因素分析[J]. 血栓与止血学, 2021, 27(1): 130–132.
- [19] 胡琪, 袁建涛, 宋薇, 等. 行全膝关节置换术患者术后发生下肢深静脉血栓危险因素的研究进展[J]. 中外医学研究, 2021, 19(31): 193–196.
- [20] 王刘玉, 万全会, 陈军. 黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖的影响及作用机制研究[J]. 中医正骨, 2023, 35(8): 1–7.
- [21] 张睿, 倪敏, 周春根, 等. 从中医“精气转化”探讨黄芪对间充质干细胞增殖及分化的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(10): 146–149.
- [22] SONG J, ZHANG Y, ZHU Y, et al. Structural characterization and anti-osteoporosis effects of polysaccharide purified from *Eucommia ulmoides* Oliver cortex based on its modulation on bone metabolism[J/OL]. Carbohydr Polym, 2023, 306: 120601 [2023–11–02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36746570/>.
- [23] 黄进, 张进, 徐志伟. 菟丝子含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖的效应及机制[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(4): 818–822.
- [24] QI S, ZHENG H, CHEN C, et al. *Du-zhong* (*eucommia ulmoides* oliv.) cortex extract alleviates lead acetate-induced bone loss in rats[J]. Biol Trace Elem Res, 2019, 187(1): 172–180.
- [25] ALTANEROVA U, JAKUBECHOVA J, REPISKA V, et al. Exosomes of human mesenchymal stem/stromal/medicinal signaling cells[J]. Neoplasma, 2017, 64(6): 809–815.

- [26] REZNIKOFF C A, BRANKOW D W, HEIDELBERGER C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division[J]. *Cancer Res*, 1973, 33(12): 3231–3238.
- [27] MUKAI T, KUSUDO T. Bidirectional effect of vitamin D on brown adipogenesis of C3H10T1/2 fibroblast-like cells[J/OL]. *Peer J*, 2023, 11: e14785[2023-11-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36815991/>.
- [28] MENG X, CUI J, WANG Y, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 interacts with microRNA-34a to promote chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4): 1774–1782.
- [29] ALONSO-PÉREZ A, GUILLÁN-FRESCO M, FRANCO-TREPAT E, et al. Improved protocol to study osteoblast and adipocyte differentiation balance[J]. *Biomedicines*, 2022, 11(1): 31.
- [30] TANG Q Q, OTTO T C, LANE M D. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(26): 9607–9611.
- [31] 梁彦. 间充质干细胞来源的外泌体对人滋养细胞系 HTR8/Svneo 迁移的影响的相关研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- (收稿日期: 2023-11-03 本文编辑: 郭毅曼)

(上接第 27 页)

- [9] FAIRBANK J C, PYNSENT P B. The Oswestry disability index[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2000, 25(22): 2940–2952.
- [10] BURHOLT V, NASH P. Short form 36(SF-36) health survey questionnaire: normative data for Wales[J]. *J Public Health (Oxf)*, 2011, 33(4): 587–603.
- [11] KIM K T, JO D J, LEE S H, et al. Oblique retroperitoneal approach for lumbar interbody fusion from L1 to S1 in adult spinal deformity[J]. *Neurosurg Rev*, 2018, 41(1): 355–363.
- [12] FUJIBAYASHI S, HYNES R A, OTSUKI B, et al. Effect of indirect neural decompression through oblique lateral interbody fusion for degenerative lumbar disease[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2015, 40(3): E175–E182.
- [13] 董国顺, 王保锁. 推拿手法与中药汤剂治疗腰椎间盘突出症疗效[J]. *中国继续医学教育*, 2019, 11(15): 150–152.
- [14] 黎鹏, 程永婷, 马峰, 等. 乳香没药精油自微乳的制备与抗炎镇痛作用评价[J]. *药物评价研究*, 2023, 46(4): 795–802.
- [15] 曾鹏辉, 窦晨, 高家菊, 等. 丁香-肉桂药对挥发油的抗氧化作用研究[J]. *中国民族民间医药*, 2023, 32(4): 41–47.
- [16] 李雨繁, 李双, 赵文吉, 等. 不同来源甘松化学成分含量分析与抗氧化活性研究[J]. *成都医学院学报*, 2023, 18(5): 545–548.
- [17] 杨启培, 陈锋, 崔伟, 等. 山柰酚活性单体治疗骨质疏松症的相关信号通路[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(26): 4242–4249.
- [18] 先梦麟, 耿娜娜, 邓琳, 等. 山柰酚调控细胞衰老治疗类风湿性关节炎的体外研究[J]. *陆军军医大学学报*, 2023, 45(12): 1281–1291.
- [19] 苏玉, 勘静. 中药川乌与草乌的鉴别比较及药理活性分析[J]. *当代医药论丛*, 2020, 18(7): 57–58.
- [20] 王明华, 赵二劳, 杨洁, 等. 白芷香豆素提取及其药理作用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(10): 234–237.
- [21] 刘美婷, 王连媚, 孟晶, 等. 细辛的化学成分、药理及毒理研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(10): 224–234.
- [22] 吴谕锋, 朱泽宇, 陈靖南, 等. 冰片药理作用及冰片酯的研究进展[J]. *药学研究*, 2020, 39(4): 217–224.
- [23] 王晶, 张金伟, 张艺蓉, 等. 丁香酚酯及肉桂醇酯对氟比洛芬透皮吸收的影响[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2023, 25(5): 1796–1802.
- [24] 邢鲁豫. 中医定向透药疗法配合针灸治疗腰椎间盘突出症的临床疗效探讨[J]. *中国实用医药*, 2023, 18(13): 146–149.
- [25] 季宏昌, 黄湘龙, 刘耀远, 等. 张伯礼运用乳香-没药对药治疗顽痹经验[J]. *中医杂志*, 2023, 64(19): 1961–1963.
- [26] 左世国, 李姣姣, 向昱阳. 《医宗金鉴·正骨心法要旨》中骨伤外治处方的用药规律分析[J]. *中医正骨*, 2022, 34(2): 40–43.
- [27] 李辉诚, 钟燕珠, 区炳雄, 等. 医疗用毒性中药饮片生川乌、生草乌使用情况分析与外治方药挖掘[J]. *中医药管理杂志*, 2023, 31(1): 111–115.
- (收稿日期: 2023-11-18 本文编辑: 时红磊)