

· 基础研究 ·

激素性股骨头坏死囊性变组织骨修复机制分析与活血通络胶囊含药血清对肥大软骨细胞成骨分化影响的实验研究

彭鹏¹, 肖欢², 方伟华¹, 田佳庆¹, 林锟¹, 姚放鸣¹, 肖方骏¹, 何敏聪³, 何伟³, 魏秋实³

(1. 广州中医药大学第三临床医学院, 广东 广州 510006;

2. 毕节市中医医院, 贵州 毕节 551700;

3. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510378)

摘要 目的: 分析激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)囊性变组织的骨修复机制, 并观察活血通络胶囊含药血清对肥大软骨细胞成骨分化的影响。方法: ①SONFH 囊性变组织的骨修复机制分析。纳入 6 例采用全髋关节置换术治疗的 SONFH 患者, 术后收集坏死股骨头 6 个, 其中 3 个股骨头用于囊性变组织的单细胞转录组测序, 采用生物信息学方法分析囊性变组织中的细胞分类、软骨细胞的细胞亚群、肥大软骨细胞参与的生物过程; 另外 3 个股骨头用于囊性变组织的病理学检查, 分别采用苏木素-伊红染色、阿利新蓝染色、番红 O-固绿染色观察囊性变组织中软骨细胞、肥大软骨细胞的分布与特征, 采用免疫组织化学染色观察囊性变组织中肥大软骨细胞标志蛋白 X 型胶原 $\alpha 1$ (collagen type X $\alpha 1$, Col10 $\alpha 1$)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 13 和成骨分化相关蛋白 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 的表达情况。②活血通络胶囊含药血清对肥大软骨细胞成骨分化影响的分析。采用活血通络胶囊(活血通络胶囊粉末溶于蒸馏水)给大鼠灌胃, 制备活血通络胶囊含药血清。取小鼠膝关节软骨, 消化分离后进行培养。将小鼠软骨细胞接种于含有不同浓度的活血通络胶囊含药血清的完全培养基中, 筛选活血通络胶囊含药血清的最佳干预浓度。取处于对数生长期的第 1 代小鼠软骨细胞, 行肥大软骨细胞诱导成功后, 分为成骨诱导组、5% 含药血清干预组 and 对照组, 成骨诱导组更换成骨诱导培养基培养, 5% 含药血清干预组更换含 5% 活血通络胶囊含药血清的成骨诱导培养基培养, 对照组继续采用肥大诱导培养基培养; 培养 7 d 后, 分别采用碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色和茜素红染色, 观察细胞形态特征, 分别采用实时定量 PCR 和蛋白质印迹法检测 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (collagen I $\alpha 1$, Col1 $\alpha 1$)、ALP、RUNX2、OPN 的 mRNA 相对表达量和 ALP、RUNX2、OPN 的蛋白相对表达量。结果: ①SONFH 囊性变组织单细胞转录组测序分析结果。共获得 30 224 个细胞的单细胞转录组测序结果; 细胞分类结果显示, 囊性变组织中有 8 种细胞, 包括 T 细胞、内皮细胞、成纤维细胞、软骨细胞、巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞和肥大细胞; 软骨细胞亚群分析共鉴定出 5 类亚群细胞, 包括稳态软骨细胞、成纤维软骨细胞、炎症软骨细胞、肥大软骨细胞、前体肥大软骨细胞; 差异基因富集分析结果显示, 肥大软骨细胞主要参与细胞迁移正向调节、细胞分化、细胞外基质形成、骨化、细胞迁移和成骨细胞分化等生物过程。②SONFH 囊性变组织的病理学检查结果。囊性变组织的边缘可见软骨细胞、肥大软骨细胞, 且部分软骨组织呈现向骨小梁过渡的形态; Col10 $\alpha 1$ 、MMP13、RUNX2、OPN 在囊性变组织的边缘高表达。③活血通络胶囊含药血清干预肥大软骨细胞成骨分化的分析结果。经筛选, 5% 为活血通络胶囊含药血清的最佳干预浓度。ALP 染色和茜素红染色结果显示, 对照组无明显钙化结节, 成骨诱导组有明显钙化结节, 5% 含药血清干预组钙化结节较成骨诱导组进一步增多; 成骨诱导组细胞 ALP、RUNX2、OPN、Col1 $\alpha 1$ 的 mRNA 相对表达量和 ALP、RUNX2、OPN 的蛋白相对表达量均高于对照组 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.001$), 5% 含药血清干预组细胞 ALP、RUNX2、OPN、Col1 $\alpha 1$ 的 mRNA 相对表达量和 ALP、RUNX2、OPN 的蛋白相对表达量均高于成骨诱导组 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.002$, $P=0.001$; $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.001$)。结论: SONFH 囊性变组织中存在肥大软骨细胞向成骨细胞分化的修复机制, 而活血通络胶囊含药血清能够促进体外培养的肥大软骨细胞向成骨细胞分化。

关键词 股骨头坏死; 糖皮质激素; 囊性变; RNA 测序; 活血通络胶囊; 软骨细胞; 细胞分化; 骨生成

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82274544, 82004392); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2023A1515010551); 毕节市科学技术局 2022 年度“揭榜挂帅”项目 (毕科合重大专项[2022]1 号); 广东省中医骨伤研究院开放课题重点项目 (GYH202101-01, GYH202101-04)

通讯作者: 魏秋实 E-mail: weiqishi@126.com

Mechanism of bone repair in the cystic lesion tissues of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head and the effects of Huoxue Tongluo Jiaonang(活血通络胶囊) medicated serum on the osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes: an experimental study

PENG Peng¹, XIAO Huan², FANG Weihua¹, TIAN Jiaqing¹, LIN Kun¹, YAO Fangming¹, XIAO Fangjun¹, HE Mincong³, HE Wei³, WEI Qiushi³

1. The Third Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2. Bijie Traditional Chinese Medicine Hospital, Bijie 551700, Guizhou, China

3. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510378, Guangdong, China

ABSTRACT **Objective:** To analyze the mechanism of bone repair in cystic lesion tissues of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH), and to observe the effects of Huoxue Tongluo Jiaonang (活血通络胶囊, HXTLJN) medicated serum on the osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes (HCs). **Methods:** ① Analyzing the mechanism of bone repair in SONFH-associated cystic lesion tissues. Six patients who underwent total hip arthroplasty for SONFH were enrolled in the study, and their necrotic femur heads were collected after the surgery. Among the 6 femur heads, 3 ones were used for single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) on cystic lesion tissues to analyze the cell categories, chondrocyte subsets, and biological processes involving in HCs in cystic lesion tissues by bioinformatics methods; while, the other 3 ones were used for pathological examination on the cystic lesion tissues to observe the distributions and characteristics of chondrocytes and HCs in cystic lesion tissues by using hematoxylin-eosin (HE) staining, Alcian blue staining, and safranin O-fast green (SO-FG) staining, respectively, and detect the expression of hypertrophic chondrocyte marker protein including collagen type X $\alpha 1$ (Col10 $\alpha 1$) and matrix metalloproteinase (MMP) 13, as well as the osteogenic differentiation-related protein including Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and osteopontin (OPN) in the cystic lesion tissues by using immunohistochemical staining. ② Analyzing the effects of HXTLJN medicated serum on the osteogenic differentiation of HCs. The rats were intervened by intragastric administration with HXTLJN (HXTLJN powders were dissolved into the distilled water) for making HXTLJN medicated serum. The knee articular cartilages were harvested from the sacrificed mice, and were digested and separated for chondrocytes, which were then cultured in DMEM/F-12. Furthermore, the chondrocytes were inoculated into complete medium containing different concentrations of HXTLJN medicated serum for determining the optimal intervention concentration of HXTLJN medicated serum. The HCs were induced from the first-generation mouse chondrocytes in the logarithmic phase, after successful induction, they were divided into osteogenic induction group, 5% HXTLJN medicated serum intervention group, and control group. The HCs in osteogenic induction group were cultured with osteogenesis inducing medium (OIM), the ones in 5% HXTLJN medicated serum intervention group with OIM containing 5% HXTLJN medicated serum, while the ones in control group with hypertrophy-inducing medium. After 7-day culture, the morphological characteristics of the HCs were observed by using alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red (AR) staining, respectively; and the relative mRNA expression levels of collagen I $\alpha 1$ (Col1 $\alpha 1$), ALP, RUNX2 and OPN, as well as the relative protein expression levels of ALP, RUNX2 and OPN were detected by using real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting, respectively. **Results:** ① The results of analysis on SONFH-associated cystic lesion tissues by scRNA-seq. The scRNA-seq results of 30 224 cells were acquired. The results of cell categories indicated that the cystic lesions harbored eight categories of cells, including T cells, endothelial cells, fibroblasts, chondrocytes, macrophages, monocytes, osteoclasts, and mast cells. The results of chondrocyte subset analysis showed that the chondrocytes included five subsets, namely homeostatic chondrocytes, fibroblast chondrocytes, inflammatory chondrocytes, hypertrophic chondrocytes, and precursor hypertrophic chondrocytes. The results of enrichment analysis on the differentially expressed genes (DEGs) showed that the hypertrophic chondrocytes mainly participated in the biological processes such as positive regulation of cell migration, cell differentiation, extracellular matrix formation, ossification, cell migration, and osteoblast differentiation. ② The results of examination on histopathological changes in SONFH-associated cystic lesion tissues. The cartilage cells and HCs were found at the edge of cystic lesion tissues, with some cartilage tissue presented a transition towards to bone trabeculae in morphology. Moreover, the Col10 $\alpha 1$, MMP13, RUNX2, and OPN were highly expressed at the edge of cystic lesion tissues. ③ The results of analysis on the effects of HXTLJN medicated serum in intervening osteogenic differentiation of HCs. The screening results showed the optimal intervention concentration of HXTLJN medicated serum was 5%. The ALP and ARS staining results showed that the distinct calcified nodules were found in osteogenic induction group, which, however, failed to be found in control group, and they were further increased in 5%

HXTLJN medicated serum intervention group compared to osteogenic induction group. Additionally, the relative mRNA expression levels of ALP, RUNX2, OPN and Col1 α 1, as well as the relative protein expressions levels of ALP, RUNX2 and OPN were higher in osteogenic induction group compared to control group ($P=0.000, P=0.000, P=0.001, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.001$), and were highest in 5% HXTLJN medicated serum intervention group ($P=0.000, P=0.000, P=0.002, P=0.001; P=0.000, P=0.000, P=0.001$).

Conclusion: A repair mechanism of hypertrophic chondrocytes differentiating into osteoblasts is presented in the cystic lesion tissues of SONFH, which can be promoted by the HXTLJN medicated serum in vitro.

Keywords femur head necrosis; glucocorticoids; cystic lesions; RNA-Seq; Huoxue Tongluo capsule; chondrocytes; cell differentiation; osteogenesis

股骨头坏死 (osteonecrosis of the femoral head, ONFH) 是一种难治性骨科疾病^[1-2]。激素性股骨头坏死 (steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH) 是 ONFH 中的常见类型, 与长期使用糖皮质激素有关^[3]。囊性变是 ONFH 的重要病理特征之一, 可引起股骨头力学性能降低, 增加股骨头塌陷的风险, 加速 ONFH 进展^[4]。然而, Lakhotia 等^[5]研究发现, 采用股骨转子间内翻截骨术治疗 ONFH, 术后囊性变区域出现不同程度的新骨生长。这项研究结果提示股骨头囊性变组织具有骨修复的能力, 但其作用机制尚未明确。单细胞转录组测序技术已成为研究肌肉骨骼系统疾病的有效工具, 能够在细胞水平探究组织的生物过程^[6]。为此, 我们采用单细胞转录组测序技术分析 SONFH 囊性变组织的骨修复机制。

SONFH 属中医学“骨蚀”范畴, 活血通络是其基本治则。活血通络胶囊是治疗 ONFH 的经典制剂, 在 ONFH 的治疗中取得显著疗效^[7]。相关体外实验研究^[8-9]结果表明, 活血通络胶囊能够促进骨髓间充质干细胞成骨分化。本研究中的单细胞转录组测序分析结果提示, SONFH 囊性变组织中存在肥大软骨细胞向成骨细胞分化的倾向。因此, 探讨活血通络胶囊含药血清是否能够影响肥大软骨细胞向成骨细胞分化, 对于探究活血通络法治治疗 ONFH 的作用机制具有重要意义。为此, 我们又开展了相关的动物细胞实验, 观察活血通络胶囊含药血清对肥大软骨细胞向成骨细胞分化的影响。

1 材料与仪器

1.1 试验材料

股骨头样本来自于 2022 年 5—10 月在广州中医药大学第三附属医院接受全髋关节置换的 SONFH 患者。试验方案经广州中医药大学第三附属医院伦理委员会审查通过, 伦理批件号: YJ-KY-20220221-003。

1.1.1 纳入标准 ①符合《中国成人股骨头坏死临

床诊疗指南(2020)》^[10]中的 ONFH 诊断标准; ②年龄 18~55 岁; ③ARCO 分期^[11]为 II~IV 期; ④有明确长期或间断大量糖皮质激素药物史; ⑤影像学检查显示股骨头内出现囊性变; ⑥采用全髋关节置换术治疗; ⑦同意参与本研究, 签署知情同意书。

1.1.2 排除标准 ①有髋部手术史者; ②有长期酗酒史者。

1.2 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 10 只, 体质量 200~220 g; 5 日龄 SPF 级 C57 小鼠 20 只, 体质量 1.52~2.59 g; 均购自广州中医药大学实验动物中心[许可证号: SCXK(粤)2018-0034]。实验方案经广州中医药大学实验动物伦理委员会审查通过, 伦理批件号: 20230214008。

1.3 实验药物

活血通络胶囊(粤药制字 Z20071224), 主要成分包括当归尾、赤芍、川芎、桃仁、木豆叶、红花、熟地黄。

1.4 实验试剂

苏木素-伊红染色试剂盒、阿利新蓝染色试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒、多聚甲醛溶液、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测试剂盒、茜素红试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司), 番红 O-固绿染色试剂盒、台盼蓝染色液、甲苯胺蓝染色液(北京索莱宝科技有限公司), 山羊抗兔 X 型胶原 α 1 (collagen type X α 1, Col10 α 1)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 13、Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、I 型胶原 α 1 (collagen I α 1, Col1 α 1) 抗体(美国 Affinity), 胰蛋白酶、II 型胶原酶、DMEM/F-12 培养基、胎牛血清(美国 Gibco), 胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠 (insulin-transferrin-selenium, ITS)、脯氨酸、地塞米松、三碘甲状腺原氨酸、 β -甘油

磷酸钠、抗坏血酸、骨形态生成蛋白 2(美国 Sigma)。

1.5 实验仪器

HERA 150i 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、TE2000-S 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)、荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)、电泳仪(北京六一仪器厂)、蛋白电泳系统(美国 Bio-Rad 公司)、ImageQuant LAS4000 化学发光成像分析仪(美国 GE 公司)、Pannoramic MIDI 数字切片扫描系统(匈牙利 3D HISTEC 公司)。

2 方法

2.1 SONFH 囊性变组织的骨修复机制分析

2.1.1 SONFH 囊性变组织单细胞样品制备与转录组测序 取股骨头样本,剖开股骨头,切取囊性变组织。磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗后剪碎,采用 II 型胶原酶消化。采用孔径 70 μm 的筛网过滤后,以 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min(离心半径 8 cm),去除上清液。用 PBS 溶液重悬细胞,台盼蓝染色,采用细胞计数板计数估算细胞数量和细胞活性。待细胞数量 > 10 万且细胞活性 $> 80\%$,收集细胞样品。将样品送至杭州联川生物技术股份有限公司进行单细胞转录组测序。

2.1.2 SONFH 囊性变组织单细胞转录组测序数据分析 采用 Seurat 算法工具包,校正样本间批次效应。采用 Seurat 进行主成分分析,并基于前 10 个主成分的 t -分布领域嵌入算法 t -SNE(t -distributed stochastic neighbor embedding, t -SNE)进行降维分析,进行细胞群体的可视化聚类分析并绘制 t -SNE 图,确定囊性变组织中的细胞分类。采用 Seurat 的 Find Markers 功能识别软骨细胞亚群的特定标志基因,并将软骨细胞群中高表达的差异基因与 Cell Marker 数据库中各类软骨细胞的特征基因进行比较,人工确定囊性变中软骨细胞的细胞亚群。结合软骨细胞特异性表达基因,对软骨细胞亚群进行注释,并对肥大软骨细胞差异基因进行 GO 富集分析。

2.1.3 SONFH 囊性变组织病理学检查 取股骨头囊性变组织,制备石蜡切片,分别采用苏木素-伊红染色、阿利新蓝染色、番红 O-固绿染色,观察囊性变组织中软骨细胞和肥大软骨细胞的分布与特征。采用免疫组织化学染色观察囊性变组织中肥大软骨细胞标志蛋白 Col10 α 1、MMP13 和成骨分化相关蛋白

RUNX2、OPN 的蛋白表达情况。

2.2 活血通络胶囊含药血清对肥大软骨细胞成骨分化影响的分析

2.2.1 活血通络胶囊含药血清制备 大鼠适应性喂养 1 周后,开始进行灌胃。将活血通络胶囊粉末溶于蒸馏水,按照 $0.63 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 进行灌胃(按照成人每日剂量 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及换算系数 6.3 计算大鼠每日灌胃剂量)。每日 1 次,连续灌胃 7 d。于第 7 天灌胃 2 h 后,处死大鼠,采集腹主动脉血。室温静置 2 h 后,离心,取上清液,于 $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,采用 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤后分装,于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.2 软骨细胞的培养和鉴定 采用颈椎脱臼法处死小鼠。于无菌条件下,切取小鼠双侧膝关节的透明软骨。依次采用胰蛋白酶、II 型胶原酶消化透明软骨,分离软骨细胞。将软骨细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基中进行培养,于温度 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度 5% 的恒温培养箱中培养。待细胞汇合度达 80% 时,胰蛋白酶消化后进行传代。原代软骨细胞培养 1 d 后,采用甲苯胺蓝染色,于显微镜下观察细胞形态特征。

2.2.3 活血通络胶囊含药血清最佳干预浓度筛选 取处于对数生长期的第 1 代小鼠软骨细胞,接种于 96 孔板,每孔接种 100 μL ;分为对照组及 1.25%、2.5%、5%、7.5%、10% 含药血清组,每组设 6 个复孔。对照组加入 100 μL 完全培养基,1.25%、2.5%、5%、7.5%、10% 含药血清组分别加入 100 μL 含有 2.5%、5%、7.5%、10%、20% 活血通络胶囊含药血清的完全培养基。于温度 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度 5% 的恒温培养箱中培养。于培养第 3 天、第 7 天,每组分别取 3 个复孔加入 CCK-8 工作液,于温度 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度 5% 条件下孵育 2 h 后,采用酶标仪测定 450 nm 处各样品的吸光度值,评估细胞活力。

2.2.4 肥大软骨细胞的诱导和鉴定 取处于对数生长期的第 1 代小鼠软骨细胞,按照每孔约 1×10^4 个细胞接种于 6 孔板,分为肥大软骨细胞诱导组和对照组,每组设 10 个复孔。2 组细胞均添加含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基,于温度 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度 5% 的恒温培养箱中培养 48 h。肥大软骨细胞诱导组更换为肥大诱导培养基(DMEM/F-12 培养基、5% 胎牛血清、1% ITS、 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脯氨酸、10 nmol 地塞米松、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗坏血酸、 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 三碘甲状腺原氨酸)培养,对照组继续采用含 10% 胎牛血清的

DMEM/F-12 培养基培养。于温度 37 ℃、CO₂ 浓度 5% 的恒温培养箱中培养,每隔 1 d 更换 1 次培养基,连续培养 7 d。培养 7 d 后,收集细胞,提取 RNA,逆转录获得 cDNA,采用 RT-qPCR 测定各组细胞 Col10α1、MMP13 的 mRNA 表达量。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 计算 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。收集细胞,提取总蛋白,采用蛋白质印迹法测定各组细胞 Col10α1、MMP13 的蛋白表达量。以 β-肌动蛋白为内参计算蛋白相对表达量。

表 1 肥大软骨细胞的鉴定实时定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'—3')
X 型胶原蛋白 α1	上游引物 CTGACTGGAAGACGGAGAG
	下游引物 GACGGCTGAGTAGGGAACAC
基质金属蛋白酶 13	上游引物 AACGCCAGACAAATGTGACC
	下游引物 AGGTCATGAGAAGGGTGCTC
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	上游引物 ATGGGTGTGAACCACGAGA
	下游引物 CAGGGATGATGTTCTGGGCA

2.2.5 活血通络胶囊含药血清干预肥大软骨细胞成骨分化的分析 取处于对数生长期的第 1 代软骨细胞,按照每孔约 1 × 10⁴ 个细胞接种于 12 孔板,分为成骨诱导组、5% 含药血清干预组和对照组,每组设 6 个复孔。3 组细胞先采用 2.2.4 中的方法诱导肥大软骨细胞。诱导 7 d 后,成骨诱导组更换为成骨诱导培养基(10% 胎牛血清、5 mmol · L⁻¹ β-甘油磷酸钠、100 nmol · L⁻¹ 地塞米松、50 mg · mL⁻¹ 抗坏血酸和 100 ng · mL⁻¹ 骨形态生成蛋白 2) 培养,5% 含药血清干预组更换为含 5% 活血通络胶囊含药血清的成骨诱导培养基培养,对照组继续采用肥大诱导培养基培养。于温度 37 ℃、CO₂ 浓度 5% 的恒温培养箱中培养,每隔 2 d 更换 1 次培养基。培养 7 d 后,取各组细胞,4% 多聚甲醛固定,分别采用 ALP 染色和茜素红染色,于显微镜下观察细胞形态特征。收集细胞,提取 RNA,逆转录获得 cDNA,采用 RT-qPCR 测定各组细胞 Col1α1、ALP、RUNX2、OPN 的 mRNA 表达量。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 计算 mRNA 相对表达量。引物序列见表 2。收集细胞,提取总蛋白,采用蛋白质印迹法测定各组细胞 ALP、RUNX2、OPN 的蛋白表达量。以 β-肌动蛋白为内参计算蛋白相对表达量。

2.3 数据统计方法

采用 SPSS26.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。肥大软骨细胞诱导组软骨细胞和对照组软骨

细胞中 Col10α1、MMP13 的 mRNA 和蛋白相对表达量的组间比较均采用 *t* 检验,不同浓度活血通络胶囊含药血清组软骨细胞的细胞活力的组间比较,以及对照组、成骨诱导组、5% 活血通络胶囊含药血清干预组肥大软骨细胞中 ALP、RUNX2、OPN、Col1α1 的 mRNA 和 ALP、RUNX2、OPN 的蛋白相对表达量的组间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 α = 0.05。

表 2 肥大软骨细胞成骨分化分析实时定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'—3')
I 型胶原蛋白 α1 链	上游引物 CTGACTGGAAGACGGAGAG
	下游引物 GACGGCTGAGTAGGGAACAC
碱性磷酸酶	上游引物 TGCCCTGAAACTCCAAAAGC
	下游引物 CTTACGCCACACAAGTAGG
Runt 相关转录因子 2	上游引物 AGATGGGACTGTGGTTACCG
	下游引物 TAGCTCTGTGTAAGTGGCC
骨桥蛋白	上游引物 CACTCCAATCGTCCCTAC
	下游引物 CTTTCCGTTGTGTCTCTG
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	上游引物 ATGGGTGTGAACCACGAGA
	下游引物 CAGGGATGATGTTCTGGGCA

3 结 果

3.1 SONFH 囊性变组织骨修复机制的分析结果

共纳入 6 例 SONFH 患者,收集股骨头 6 个,其中 3 个股骨头用于囊性变组织的单细胞转录组测序,3 个股骨头用于囊性变组织的病理学检查。

3.1.1 SONFH 囊性变组织单细胞转录组测序分析结果 共计获得 30 224 个细胞的单细胞转录组测序结果。细胞分类结果显示,囊性变组织中有 8 种细胞,包括 T 细胞、内皮细胞、成纤维细胞、软骨细胞、巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞和肥大细胞[图 1(1)];软骨细胞亚群分析结果显示,共鉴定出 5 类亚群细胞,包括稳态软骨细胞、成纤维软骨细胞、炎症软骨细胞、肥大软骨细胞、前体肥大软骨细胞[图 1(2)]。肥大软骨细胞差异基因富集分析结果显示,肥大软骨细胞主要参与细胞迁移正向调节、细胞分化、细胞外基质形成、骨化、细胞迁移和成骨细胞分化等生物过程(图 2)。

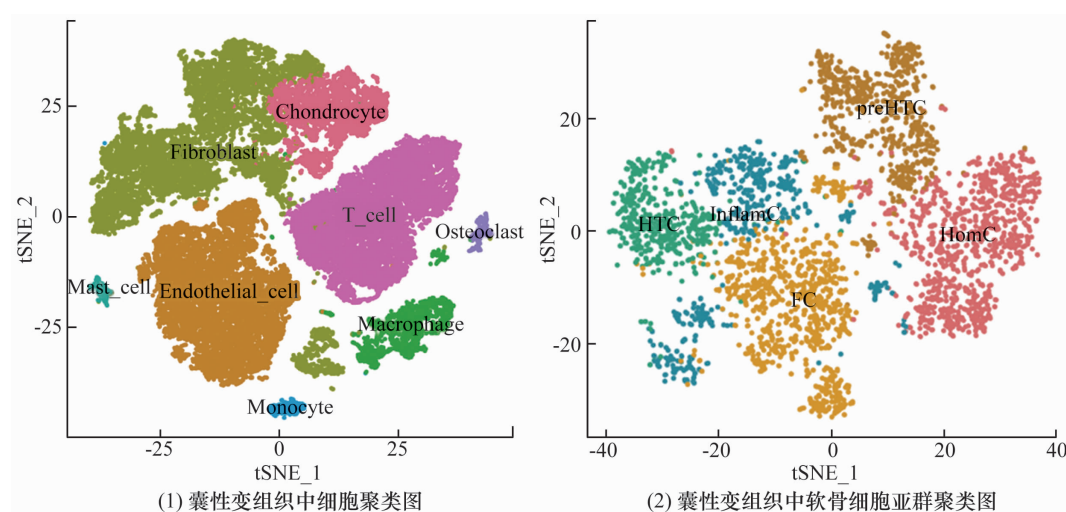
3.1.2 SONFH 囊性变组织病理学检查结果 苏木素-伊红染色、阿利新蓝染色及番红 O-固绿染色均显示,囊性变组织的边缘可见软骨细胞、肥大软骨细胞,且部分软骨组织呈现向骨小梁过渡的形态(图 3)。免疫组化染色结果显示,Col10α1、MMP13、RUNX2、OPN 在囊性变组织的边缘高表达(图 4)。

3.2 活血通络胶囊对肥大软骨细胞成骨分化影响的分析结果

3.2.1 软骨细胞鉴定结果 显微镜观察显示,细胞贴壁生长,呈椭圆形或多边形,细胞核被甲苯胺蓝染成蓝色(图 5);提示分离提取的细胞为软骨细胞。

3.2.2 肥大软骨细胞的诱导及鉴定结果 肥大软骨细胞诱导组细胞 Col10 α 1 和 MMP13 的 mRNA、蛋白相对表达量均高于对照组(表 3、图 6);提示肥大软骨细胞诱导成功。

3.2.3 活血通络胶囊含药血清最佳干预浓度筛选结果 培养第 3 天、第 7 天,各组细胞活力比较,差异均有统计学意义。培养第 3 天、第 7 天,1.25%、2.5%、5% 含药血清组细胞活力和对照组比较,组间差异均无统计学意义($P = 0.328, P = 0.440, P = 0.301; P = 0.997, P = 0.328, P = 0.652$);7.5%、10% 含药血清组细胞活力均低于对照组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$)。见表 4。因此,选择 5% 为活血通络胶囊含药血清的最佳干预浓度。



HomC 为稳态软骨细胞,FC 为成纤维软骨细胞,HTC 为肥大软骨细胞,InHamC 为炎症软骨细胞,preHTC 为前体肥大软骨细胞。

图 1 激素性股骨头坏死囊性变组织单细胞转录组测序细胞聚类图

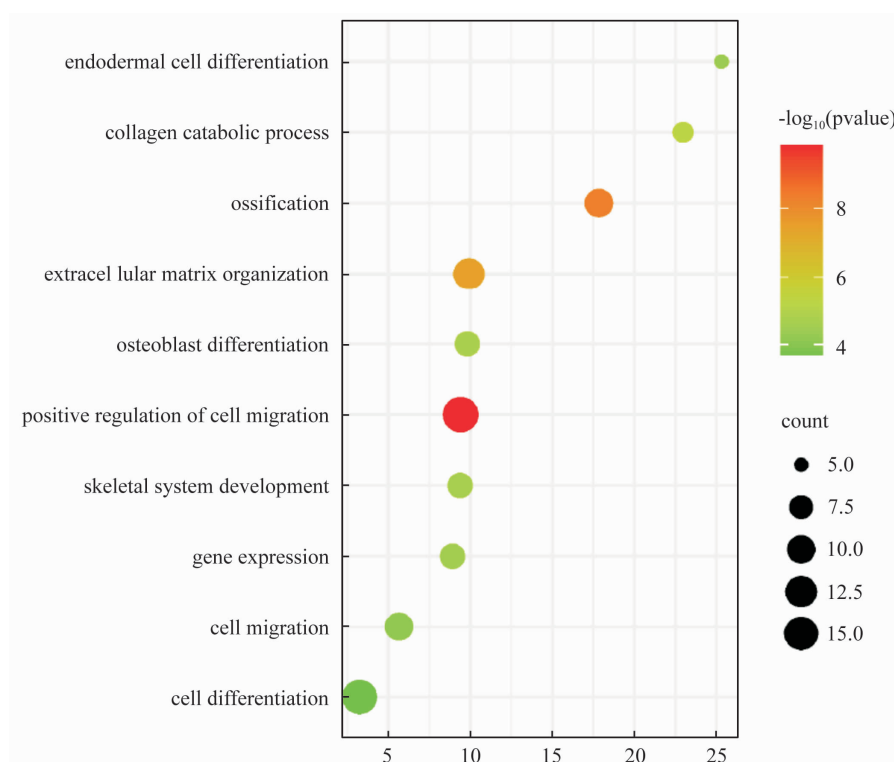


图 2 肥大软骨细胞差异基因富集分析结果

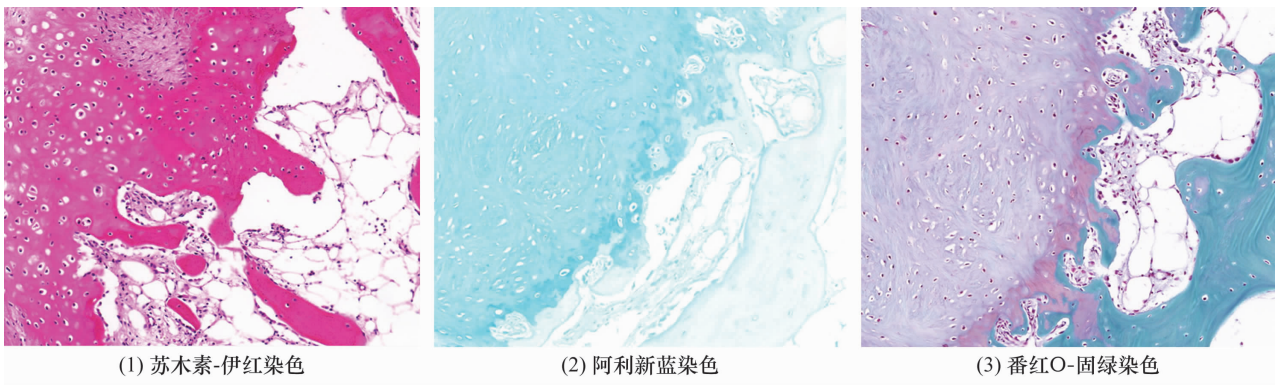


图 3 激素性股骨头坏死囊性变组织染色图片 (×200)

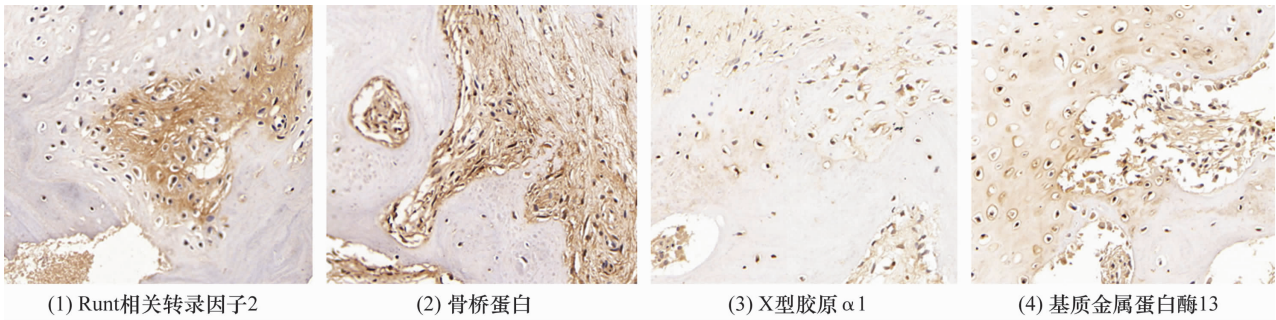


图 4 激素性股骨头坏死囊性变组织免疫组化检测结果 (×400)

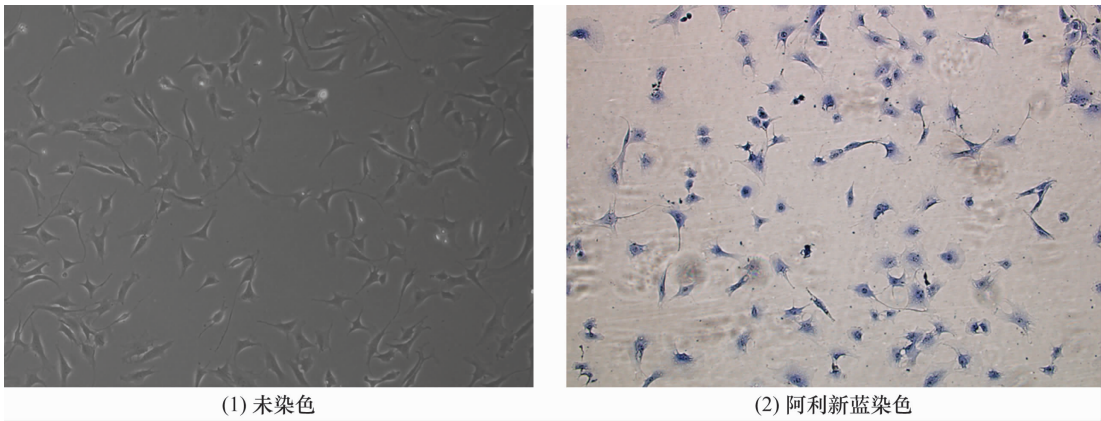


图 5 小鼠原代软骨细胞形态图片 (×100)

表 3 2 组软骨细胞肥大化相关基因的 mRNA 和蛋白相对表达量

组别	样本量/孔	mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)		蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)	
		Col10 α 1 ¹⁾	MMP13 ²⁾	Col10 α 1 ¹⁾	MMP13 ²⁾
肥大软骨细胞诱导组	5	3.17 \pm 0.10	2.80 \pm 0.12	1.64 \pm 0.08	4.12 \pm 0.17
对照组	5	1.21 \pm 0.03	1.03 \pm 0.07	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.06
<i>t</i> 值		18.332	12.954	6.293	17.113
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.003	0.000

注:1)X 型胶原 α 1;2)基质金属蛋白酶 13。

3.2.4 活血通络胶囊含药血清干预肥大软骨细胞成骨分化的分析结果 ALP 染色和茜素红染色结果显示,对照组染色阳性细胞数量较少、颜色较浅,成骨诱导组染色阳性细胞数量较对照组增加、颜色加深,5% 含药血清干预组染色阳性细胞数量较对照组显著增加、颜色显著加深(图 7);提示对照组无明显钙化结

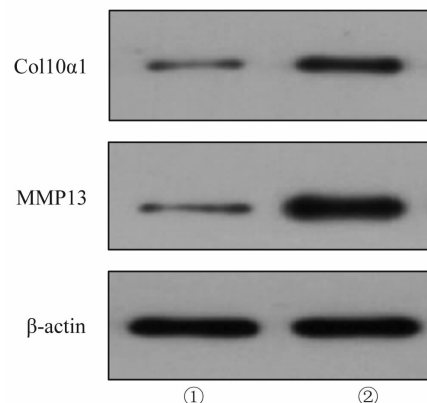
节,成骨诱导组有明显钙化结节,5% 含药血清干预组钙化结节较成骨诱导组进一步增多。3 组细胞 ALP、RUNX2、OPN、Col1 α 1 的 mRNA 相对表达量和 ALP、RUNX2、OPN 的蛋白相对表达量比较,组间差异均有统计学意义。成骨诱导组的肥大细胞 ALP、RUNX2、OPN、Col1 α 1 的 mRNA 相对表达量和 ALP、RUNX2、

OPN 的蛋白相对表达量均高于对照组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.001$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.001$), 5% 含药血清干预组细胞 ALP、RUNX2、OPN、Col1 α 1 的 mRNA 相对表达量和 ALP、RUNX2、OPN 的蛋白相对表达量均高于成骨诱导组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.002$, $P = 0.001$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.001$)。见表 5、图 8。

4 讨论

SONFH 与糖皮质激素的使用关系密切^[12]。然而,临床中多种疾病的治疗不可避免地需要使用糖皮质激素。探索 SONFH 的病理机制及中医药防治 SONFH 的作用机制,对于 SONFH 的防治具有重要意义^[13]。囊性变是 ONFH 发生发展过程中的重要病理特征之一,但其形成机制尚未明确。Gao 等^[14]提出,ONFH 硬化区边缘的机械应力可导致骨吸收增加,进而诱发囊性变的形成。Liu 等^[15]研究发现,股骨头囊性变多见于坏死区与活血区交界处及股骨头前外侧。股骨头囊性变在股骨头塌陷和修复过程中均扮演着

重要的角色,一方面囊性变会导致股骨头力学性能降低,增加股骨头塌陷的风险^[16];另一方面,相关研究^[5]结果表明,股骨头囊性变组织具有骨修复的能力。为了探索 SONFH 囊性变组织的骨修复机制,我



Col10 α 1 为 X 型胶原 α 1, MMP13 为基质金属蛋白酶 13, β -actin 为 β -肌动蛋白, ① 为对照组, ② 为肥大软骨细胞诱导组。

图 6 2 组软骨细胞肥大化相关基因蛋白表达蛋白质印迹法检测结果

表 4 6 组软骨细胞的细胞活力

组别	样本量/孔	光密度值($\bar{x} \pm s$)	
		培养第 3 天	培养第 7 天
1. 25% 含药血清组	3	1.44 \pm 0.04	1.63 \pm 0.03
2. 5% 含药血清组	3	1.45 \pm 0.04	1.66 \pm 0.05
5% 含药血清组	3	1.44 \pm 0.05	1.64 \pm 0.04
7.5% 含药血清组	3	1.30 \pm 0.01	1.45 \pm 0.05
10% 含药血清组	3	1.30 \pm 0.02	1.38 \pm 0.02
对照组	3	1.47 \pm 0.03	1.63 \pm 0.02
F 值		13.972	28.798
P 值		0.000	0.000

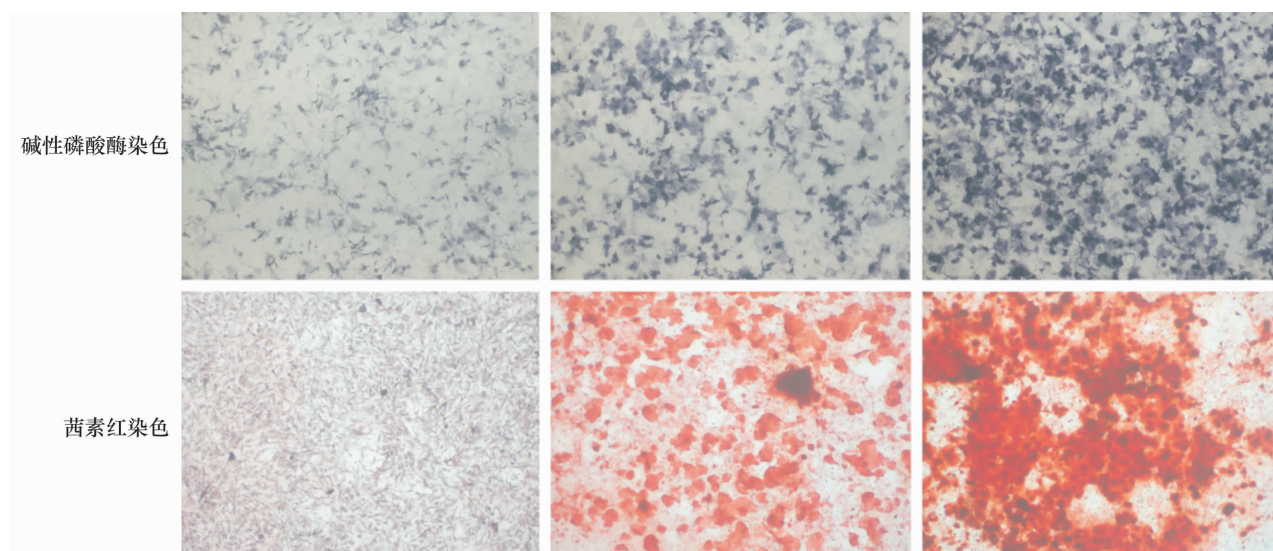
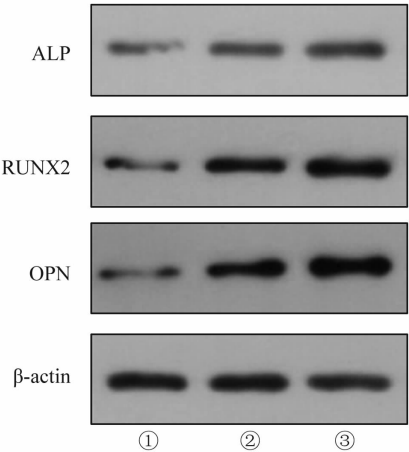


图 7 肥大软骨细胞成骨分化染色图片 ($\times 100$)

表 5 3 组肥大软骨细胞成骨分化标志基因的 mRNA 和蛋白相对表达量

组别	样本量/ 孔	mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)				蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)		
		ALP ¹⁾	RUNX2 ²⁾	OPN ³⁾	Col1 α 1 ⁴⁾	ALP ¹⁾	RUNX2 ²⁾	OPN ³⁾
对照组	3	0.59 \pm 0.49	0.59 \pm 0.04	0.48 \pm 0.05	0.79 \pm 0.02	0.33 \pm 0.03	0.37 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02
成骨诱导组	3	1.14 \pm 0.10	0.94 \pm 0.07	0.91 \pm 0.14	1.05 \pm 0.06	0.68 \pm 0.05	0.75 \pm 0.05	0.73 \pm 0.09
5% 含药血清 干预组	3	1.95 \pm 0.09	1.33 \pm 0.02	1.37 \pm 0.08	1.20 \pm 0.03	1.09 \pm 0.07	0.99 \pm 0.07	1.11 \pm 0.04
F 值		260.933	263.503	87.621	94.488	154.680	113.241	129.616
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)碱性磷酸酶;2)Runt 相关转录因子 2;3)骨桥蛋白;4) I 型胶原 α 1。



ALP 为碱性磷酸酶,RUNX2 为 Runt 相关转录因子 2,OPN 为骨桥蛋白, β -actin 为 β -肌动蛋白,①为对照组,②为成骨诱导组,③为 5% 含药血清干预组。

图 8 3 组肥大软骨细胞成骨分化标志基因蛋白表达蛋白质印迹法检测结果

们对股骨头囊性变组织进行了单细胞转录组测序,测序数据分析结果显示股骨头囊性变组织中有 8 类细胞,其中软骨细胞可能与骨修复关系密切。我们根据软骨细胞的标记基因^[17-18],对软骨细胞进行了亚群分析,并确定了稳态软骨细胞、成纤维软骨细胞、炎症软骨细胞、前体肥大软骨细胞和肥大软骨细胞 5 类亚群细胞。肥大软骨细胞差异基因富集分析结果显示,肥大软骨细胞主要参与了骨化、成骨细胞分化等生物过程。病理学检查进一步验证了囊性变组织边缘有软骨细胞和肥大软骨细胞,且部分软骨组织呈向骨小梁过渡的形态,提示囊性变组织内存在软骨组织向骨组织过渡的区域。此外,免疫组化染色结果表明,囊性变组织中肥大软骨细胞标志蛋白和成骨分化相关蛋白的表达显著增加。因此,我们认为,股骨头囊性变组织中存在软骨细胞肥大化及肥大软骨细胞向成骨细胞分化的过程,且 SONFH 囊性变组织的骨修复机制与肥大软骨细胞向成骨细胞分化有关。

血瘀证是 ONFH 的主要证候,活血通络是其基本

治则^[19]。Wei 等^[20]研究发现,活血通络胶囊能够有效缓解 SONFH 患者的髋部疼痛,降低股骨头塌陷率;此外,他们还观察到坏死股骨头囊性变组织中出现成骨现象。何宪顺等^[21]研究发现,活血通络胶囊能够促进 SONFH 患者股骨头囊性变组织的骨修复,改善患者临床症状,且其可能通过“骨吸收/成血管/成骨”三元调控发挥修复作用。上述研究表明,活血通络胶囊治疗 SONFH 可能与促进股骨头囊性变组织的骨修复有关,但其具体作用机制尚未明确。基于单细胞转录组测序数据分析结果,我们认为,活血通络胶囊可能通过影响肥大软骨细胞向成骨细胞分化发挥促进股骨头囊性变组织骨修复的作用。为此,我们收集了小鼠膝关节软骨细胞,建立了肥大软骨细胞模型及肥大软骨细胞成骨分化模型,进而验证活血通络胶囊含药血清对肥大软骨细胞成骨分化的作用;结果显示,活血通络胶囊含药血清能够显著促进肥大软骨细胞向成骨细胞分化。

三碘甲状腺原氨酸、视黄酸和地塞米松等物质可诱导软骨细胞向肥大软骨细胞分化^[22-23]。我们采用含有三碘甲状腺原氨酸、地塞米松的肥大诱导培养基诱导软骨细胞的肥大化,结果显示,诱导 7 d 后,Col10 α 1、MMP13 等肥大软骨细胞标志蛋白的表达量显著升高,提示肥大软骨细胞诱导成功。相关研究^[24-25]报道,禽类和鼠类软骨细胞在体外能够被诱导为肥大软骨细胞及成骨细胞,并合成骨样基质。我们采用了已报道的软骨细胞成骨诱导培养基^[26],结果显示,成骨诱导组细胞成骨标记基因的表达量较对照组显著上调,提示成骨细胞诱导成功。此外,我们还分析了不同浓度活血通络胶囊含药血清对软骨细胞活性的影响,结果显示 7.5%、10% 活血通络胶囊含药血清会导致软骨细胞活性下降。因此,我们选择 5% 活血通络胶囊含药血清作为最佳干预浓度。

本研究结果表明,SONFH 囊性变组织中存在肥

大软骨细胞向成骨细胞分化的修复机制,而活血通络胶囊含药血清能够促进体外培养的肥大软骨细胞向成骨细胞分化。

参考文献

- [1] GEORGE G,LANE J M. Osteonecrosis of the femoral head[J]. J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev, 2022, 6(5): e21. 00176.
- [2] LIU F, WANG W, YANG L, et al. An epidemiological study of etiology and clinical characteristics in patients with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. J Res Med Sci, 2017, 22: 15.
- [3] LESPASIO M J, SODHI N, MONT M A. Osteonecrosis of the hip: a primer[J]. Perm J, 2019, 23.
- [4] ZHANG Z, LIN T, ZHONG Y, et al. Effect of femoral head necrosis cystic area on femoral head collapse and stress distribution in femoral head: a clinical and finite element study[J]. Open Med (Wars), 2022, 17(1): 1282 – 1291.
- [5] LAKHOTIA D, SWAMINATHAN S, SHON W Y, et al. Healing process of osteonecrotic lesions of the femoral head following transtrochanteric rotational osteotomy: a computed tomography-based study[J]. Clin Orthop Surg, 2017, 9(1): 29 – 36.
- [6] ZHANG F, WEI K, SLOWIKOWSKI K, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry[J]. Nat Immunol, 2019, 20(7): 928 – 942.
- [7] HE X M, HE M C, YANG P, et al. The therapeutic effect of Huo Xue Tong Luo capsules in Association Research Circulation Osseous (ARCO) stage II osteonecrosis of the femoral head: a clinical study with an average follow-up period of 7.95 years[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 773758.
- [8] FANG B, LI Y, CHEN C, et al. Huo Xue Tong Luo capsule ameliorates osteonecrosis of femoral head through inhibiting lncRNA-Miat[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 238: 111862.
- [9] 吴忠书, 韦雨柔, 陈晓俊, 等. 活血通络胶囊促进骨髓间充质干细胞成骨中的 ER α -Wnt/ β -catenin 信号通路[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(25): 3937 – 3943.
- [10] 中国医师协会骨科医师分会骨循环与骨坏死专业委员会, 中华医学会骨科分会骨显微修复学组, 国际骨循环学会中国区. 中国成人股骨头坏死临床诊疗指南(2020)[J]. 中华骨科杂志, 2020, 40(20): 1365 – 1376.
- [11] YOON B H, MONT M A, KOO K H, et al. The 2019 revised version of Association Research Circulation Osseous Staging system of osteonecrosis of the femoral head[J]. J Arthroplasty, 2020, 35(4): 933 – 940.
- [12] LIU W, YUE J, GUO X, et al. Epidemiological investigation and diagnostic analysis of osteonecrosis of the femoral head in three northeastern provinces of China[J]. J Orthop Surg Res, 2024, 19(1): 292.
- [13] 魏秋实, 何伟, 张庆文, 等. 基于中医治未病理论探讨新型冠状病毒肺炎后股骨头坏死的防治思路[J]. 中医正骨, 2020, 32(3): 48 – 51.
- [14] GAO F, HAN J, HE Z, et al. Radiological analysis of cystic lesion in osteonecrosis of the femoral head[J]. Int Orthop, 2018, 42(7): 1615 – 1621.
- [15] LIU G B, LI R, LU Q, et al. Three-dimensional distribution of cystic lesions in osteonecrosis of the femoral head[J]. J Orthop Translat, 2019, 22: 109 – 115.
- [16] 魏秋实, 何伟, 张庆文, 等. 围塌陷期股骨头坏死不同影像学表现研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2021, 35(9): 1105 – 1110.
- [17] JI Q, ZHENG Y, ZHANG G, et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(1): 100 – 110.
- [18] LI H, JIANG X, XIAO Y, et al. Combining single-cell RNA sequencing and population-based studies reveals hand osteoarthritis-associated chondrocyte subpopulations and pathways[J]. Bone Res, 2023, 11(1): 58.
- [19] 魏秋实, 沈莹珊, 庄至坤, 等. 股骨头坏死络病理论的建立及科学价值[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(7): 1 – 4.
- [20] WEI Q S, HONG G J, YUAN Y J, et al. Huo Xue Tong Luo capsule, a vasoactive herbal formula prevents progression of asymptomatic osteonecrosis of femoral head: a prospective study[J]. J Orthop Translat, 2018, 18: 65 – 73.
- [21] 何宪顺, 韦雨柔, 何敏聪, 等. 活血通络法对激素性股骨头坏死囊性变患者血清骨吸收/成血管/成骨蛋白调节作用的研究[J]. 中国全科医学, 2024, 27(12): 1504 – 1510.
- [22] QUARTO R, CAMPANILE G, CANCEDDA R, et al. Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis[J]. J Cell Biol, 1992, 119(4): 989 – 995.
- [23] RANDAU T M, SCHILDBERG F A, ALINI M, et al. The effect of dexamethasone and triiodothyronine on terminal differentiation of primary bovine chondrocytes and chondrogenically differentiated mesenchymal stem cells[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72973.
- [24] DESCALZI C, CANCEDDA F, GENTILI C, MANDUCA P, et al. Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture[J]. J Cell Biol, 1992, 117(2): 427 – 435.
- [25] HEGERT C, KRAMER J, HARGUS G, et al. Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 23): 4617 – 4628.
- [26] TSCHAFFON M E A, REBER S O, SCHOPPA A, et al. A novel in vitro assay to study chondrocyte-to-osteoblast trans-differentiation[J]. Endocrine, 2022, 75(1): 266 – 275.

(收稿日期: 2024-05-14 本文编辑: 吕宁)