说[J]. 中国临床康复，2006，10(7)：189-192.
[3] 张进，徐志伟. 补肾法诱导间充质干细胞向神经方向分化研究[J]. 现代医院，2004，4(9)：15-17.
[4] 陈训华，危剑安，陈燕平，等. 补肾方药对去卵巢雌鼠骨质疏松症防治作用的研究[J]. 中国骨伤，1998，11(2)：12-15
[5] 杨丽，张荣华，谢厚杰，等. 建立大鼠骨髓间充质干细胞稳定分离培养体系与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2009，13(6)：1064-1068.
[6] 丁富平，黄进，张进，等. 左归丸对肾虚大鼠 MSCs 增殖的影响[J]. 时珍国医国药，2010，22(5)：1062-1064.
[7] 吕丽爽. 何首乌中二苯乙烯苷的研究进展[J]. 食品科学，2006，27(10)：608-612.
[8] Majumdar MK，Thiede MA，Mosca JD，et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells and stromal cell[J]. J Cell Physiol，1998，176(1)：57-66.
[9] Pittenger MF，Mackay AM，Beck SC，et al. Muitilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science，1999，284：143-147.
[10] Dormady SP，Bashayan O，Dougherty R，et al. Immortalized multipotential mesenchymal stem cells and the hematopoietic microenvironment[J]. J Hematother Stem Cell Res，2001，10(1)：125-140.
[11] Kocher AA，Schuster MD，Szbolcs ML，et al. Neovascu larization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis，reduces remodeling and improves cardiac function[J]. Nat Med，2001，7(4)：430-436.
[12] Watari K，Asano S，Shirafuji N，et al. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay[J]. Blood，1989，73(1)：117-120.
[13] 李洪，许志恩，李维，等. 粒细胞集落刺激因子对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响[J]. 中国脑血管病杂志，2008，5(10)：461-465.

（编辑：梁进权）

木豆叶对激素干预后的骨髓间充质干细胞的蛋白质组学研究

马春涛[1,2]，曾意荣[3]，曾建春[3]，韩旭东[1]，齐新宇[1]，陈锦伦[1]（1. 广州中医药大学，广东 广州 510405；2. 三亚市中医院，海南 三亚 572000；3. 广州中医药大学第一附属医院，广东 广州 510405）

摘要：目的 观察大剂量激素及木豆叶干预后骨髓间充质干细胞(MSCs)的蛋白质变化，探讨木豆叶治疗股骨头坏死的作用机理。**方法** 培养人 MSCs，设正常对照组、模型(激素)组及木豆叶含药血清组，通过双向电泳比较正常对照组与模型组、模型组与木豆叶含药血清组的蛋白质表达差异，通过质谱分析对差异蛋白质进行初步鉴定。**结果** 与正常对照组比较，模型组 MSCs 有 38 个蛋白点发生显著变化；与模型组比较，木豆叶含药血清组 MSCs 有 28 个蛋白点发生显著变化，MCSc 中热休克蛋白(HSP)、含缬络肽蛋白(VCP)及 COP9 表达水平显著升高。**结论** 大剂量激素干预可造成 MSCs 内脂肪代谢失调、分化异常，木豆叶可抑制 MSCs 凋亡，并可能通过 MAPK 途径，影响其成骨分化及修复骨坏死而发挥治疗股骨头坏死的作用。

关键词：股骨头坏死；骨髓间充质干细胞；激素；蛋白质组学
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1003-9783(2013)04-0351-05
doi：10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.007

Proteomics Study on Effect of Folium Cajani on Hormone-treated Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

MA Chuntao[1,2]，ZENG Yirong[3]，ZENG Jianchun[3]，HAN Xudong[1]，QI Xinyu[1]，CHEN Jinlun[1]（1. Guangzhou University of Chinese Medicine，Guangzhou 510405 Guangdong，China；2. Sanya Traditional Chinese Medical Hospital，Sanya 572000 Hainan，China；3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine，Guangzhou 510405 Guangdong，China）

Abstract：Objective To investigate the changes of protein expression in bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) treated by large doses of hormones and Folium Cajani，and to explore its possible therapeutic mechanism for

收稿日期：2013-03-13
作者简介：马春涛，男，博士，研究方向：髋膝关节疾病诊疗。Email：mct1983@163.com。通讯作者：曾意荣，博士，教授，硕士生导师，主任医师，研究方向：髋膝关节疾病的基础与临床研究。Email：zeng6612@163.com。
基金项目：国家自然科学基金项目(81273784)。

femoral head necrosis. **Methods** The cultured human MSCs were divided into normal control group，hormone-treat model group and group of serum containing Folium Cajani. Two-dimensional electrophoresis was used to compare the protein expression difference in the three groups，and the protein spots with differential expression were analyzed by mass spectrometry. **Results** A total of 38 protein spots had differential expression in MSCs of the hormone-treat model group as compared with the normal control group. In MSCs of Folium Cajani group，28 protein spots had differential expression as compared with the hormone-treat model group，and heat-shock protein and COP9 expression levels were obviously increased. **Conclusion** Large dose of hormones induce the disorder of lipid metabolism and differentiation of MSCs，and Folium Cajani enhances the stress reaction and self protection，and promote its osteogenic differentiation through MAPK pathway.

Keywords：Necrosis of the femoral head；Bone marrow mesenchymal stem cells；Hormone；Proteomics

激素的使用是导致非创伤性股骨头坏死的常见病因，在我国是仅次于饮酒的第二大发病因素，关于其致病机理的认识目前尚不统一，有脂肪栓塞、骨细胞脂肪变性等多种假说，有研究认为大剂量激素可诱导 MSCs 分化为脂肪细胞，造成骨细胞分化不足，导致骨细胞坏死[1]。木豆叶是豆科植物木豆的干燥叶片，有活血化瘀、消肿止痛、补肾壮骨、去腐生肌之功效，实验证实木豆叶能有效治疗股骨头坏死，有增强骨坏死修复、促进血管生成及延缓细胞凋亡的作用[2-4]。有报道[5]发现木豆叶成分的生脉成骨片对激素诱导下 MSCs 成脂分化有拮抗作用，但其具体机制尚不明确。本研究拟通过蛋白质组学的方法，探寻激素诱导下的 MSCs 以及诱导过程中加入木豆叶含药血清后 MSCs 蛋白质表达的变化，阐释激素性股骨头坏死的致病机理及木豆叶防治股骨头坏死的机理。

1 材料与方法

1.1 动物　SD 大鼠 20 只，SPF 级，雌性，体质量 160～180 g，南方医科大学动物实验中心，许可证号：4402101564。

1.2 试剂　袁氏生脉成骨片，广州市康元药业有限公司，批号：121003，成分为木豆叶；甲强龙，辉瑞公司，批号：Z01579；L-DMEM 培养基、南美胎牛血清、胰酶，GIBCO 公司；碘乙酰胺(IAA)、IPG 胶条、pharmalyte™ 3-10 for IEF，GE 公司；四甲基乙二胺(TEMED)、硝酸银，Sigma 公司；二硫苏糖醇(DTT)，Biosharp 公司；30 %甲叉双丙烯酰铵溶液(Bis)、过硫酸铵(APS)、蛋白定量试剂盒，Bio-rad 公司；五水合硫代硫酸钠、冰醋酸、甲醛、盐酸，广州化学试剂厂；甲醇，广东光华科技股份有限公司；矿物油，MP Biomedicals 公司；甘油、尿素、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、琼脂糖，上海生工生物公司。

1.3 仪器　EttanTM IPGphor II™ 等电聚焦仪、Ettan™ DALTsix 垂直电泳仪、扫描仪及 ImageMaster™ 2D Platinum 6.0 分析软件，GE 公司；UVmini-1240 紫外可见分光光度计，Shimadzu 公司；Centrifuge 5804R 离心机，德国 Eppendorf 公司；Autoflex speed™ MALDI-TOF 质谱仪，Bruker Dalton 公司。

1.4 方法

1.4.1 木豆叶含药血清及正常对照组血清制备　SD 大鼠随机分为中药组和正常对照组，中药组灌胃给予生脉成骨片混悬液(0.6 g·kg^{-1})，每日 1 次，连续灌胃 1 周，最后 1 次给药后 2 h 经腹主动脉采血，室温静置 2 h 后置 2500 r·min^{-1} 离心 10 min，收集上清液，56 ℃水浴灭活 30 min，过滤后置 -20 ℃冰箱保存备用。正常对照组采用等量生理盐水灌胃，采血及保存方法与中药组相同。

1.4.2 MSCs 的分离、纯化、扩增　选择髋骨性关节炎行人工关节置换患者，术中使用含肝素的注射器吸取股骨近端骨髓组织约 10 mL，将细胞悬液贴壁缓慢注入到预置有等体积密度为 1.077 kg·L^{-1} 的淋巴细胞分离液的试管内，以 2500 r·min^{-1} 离心 20 min，吸取中间的白色云雾状单核细胞层，PBS 漂洗，1500 r·min^{-1} 离心 10 min，弃上清，加入含 10 %FBS 的 DMEM 培养液 10 mL 并接种于培养瓶内，置入 37 ℃、5 %CO_2 饱和湿度培养箱中培养，3 d 换液 1 次。待细胞融合至 80 %后用胰蛋白酶消化，以 1∶2 传代培养。

1.4.3 MSCs 干预　传至第 3 代的 MSCs 接种于 75 cm^2

培养瓶，增殖至培养瓶 80 %时分为 3 组：正常对照组继续以含 10 %FBS 的 L-DMEM 培养基培养，模型组及木豆叶含药血清组更换含 10^{-5} mol·L^{-1} 甲强龙的 L-DMEM 培养基，干预 3 d。正常对照组更换含 10 %正常对照组血清的 L-DMEM 培养基培养，模型组更换含 10^{-5} mol·L^{-1} 甲强龙和 10 %正常对照组血清的 L-DMEM 培养基培养，木豆叶含药血清组更换含 10^{-5} mol·L^{-1} 甲强龙和 10 %木豆叶含药血清的 L-DMEM 培养基培养，5 d 后提取蛋白。

1.4.4 细胞蛋白提取纯化及定量　吸出细胞加入 PBS 清洗 3 次，去除 PBS 后加入裂解液，将细胞团块吹散后转移到 EP 管中超声处理，12000 r·min^{-1} 离心 20 min，收集上清液分装至 EP 管中，-20 ℃丙酮沉淀过夜。过夜后 12000 r·min^{-1} 离心 20 min，倒去上清液后自然干燥，蛋白质团块 -80 ℃保存备用。

1.4.5 双向电泳　取出蛋白质团块加再水化液 200 μL 溶解，Bradford 法测浓度，蛋白质上样量为 120 μg，尿素水化液加至 450 μL 泡胀过夜后第一向等电聚焦，等电聚焦完成后分别置于 1 %DTT 和 2.5 %碘乙酰胺的平衡缓冲液中平衡 15 min，再将 IPG 胶条置于玻璃板间的凝胶面上，琼脂糖密封液封闭，进行第二向电泳，待溴酚蓝指示剂到达胶底时关闭电泳仪。

1.4.6 硝酸银染色　将凝胶置于固定液（40 %甲醇，10 %醋酸）中摇床固定 30 min。水洗 5 min × 6 次，0.02 %硫代硫酸钠敏化 1 min。水洗 20 s × 3 次。置于染色液（0.2 %硝酸银，0.02 %甲醛）中 20 min，水洗 20 s × 3 次。置于显色液（3 %碳酸钠，0.05 %甲醛，0.0005 %硫代硫酸钠）中显示到理想色度，5 %醋酸终止后置于蒸馏水中。

1.4.7 图像扫描分析及蛋白质鉴定　扫描仪扫描保存图像，见图 1。使用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 图像分析软件，搜索差异点，用针在凝胶相应点的边缘划圈，将胶粒挑到 EP 管中进行酶切、肽段抽提、点靶及质谱分析，利用 flexAnalysis 软件过滤基线峰、识别信号峰。利用 BioTools 软件搜索 NCBI 数据库，寻找匹配的相关蛋白质。

2 结果

2.1 电泳凝胶图像分析　见图 2。与正常对照组比较，模型组 MSCs 有 38 个蛋白点发生显著变化，其中上调 29 个，下调 9 个。与模型组比较，木豆叶含药血清组 MSCs 有 28 个蛋白点发生变化，其中上调 20 个，下调 8 个。按模型组下调、模型组上调，木豆叶含药血清组下调和上调的顺序，将蛋白分为 A 组、B 组、C 组和 D 组并按顺序用阿拉伯数字编号。

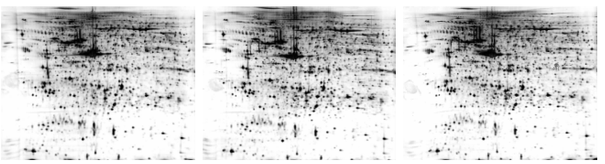
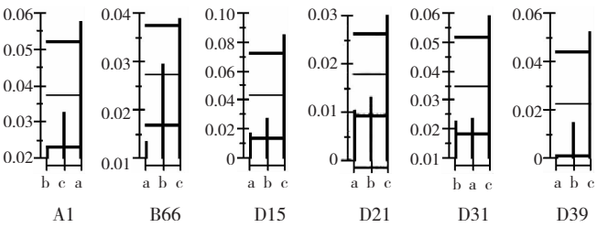


图 1　各组 MSCs 双向电泳图

Figure1　2-D electrophoresis images of there groups



a. 正常对照组；b. 模型组；c. 木豆叶含药血清组

图 2　6 个差异点在 3 组中蛋白表达量

Figure 2　Expression of six distinct points in three groups (a: control group, b: hormone model group, c: folium cajani group)

2.2 肽指纹图谱分析　见图 3。将有显著性差异的蛋白点经质谱分析，鉴定成功 46 个，Bio Tools 软件搜索 NCBI 数据库，得到 5 个重要差异的蛋白点，编号分别为 A1，B66，D15，D31，D39。蛋白相关信息见表 1。

表 1　蛋白点相关信息

Table 1　Informations of protein spots

序号	名称	检索号	分子量	等电点	覆盖率/%	得分
A1	NMHC	gi|189036	145623	5.23	13	126
B66	FASN	gi|89257335	30368	5.81	46	209
D15	HSP70 8 isoform1 variant	gi|62897129	71083	5.28	36	162
D31	COP9 s5 variant	gi|62087848	31467	6.20	27	181
D39	HSP27	gi|662841	22427	7.83	37	135

3 讨论

通过对差异蛋白的分析，我们发现其按功能分别涉及细胞骨架，细胞迁移、黏附，能量代谢，信号转导，分化增殖等方面，其中脂肪酸合成酶（fatty acid synthase，FASN），非肌肉肌球蛋白重链（non-muscle myosin heavy chain，NMHC），热休克蛋白

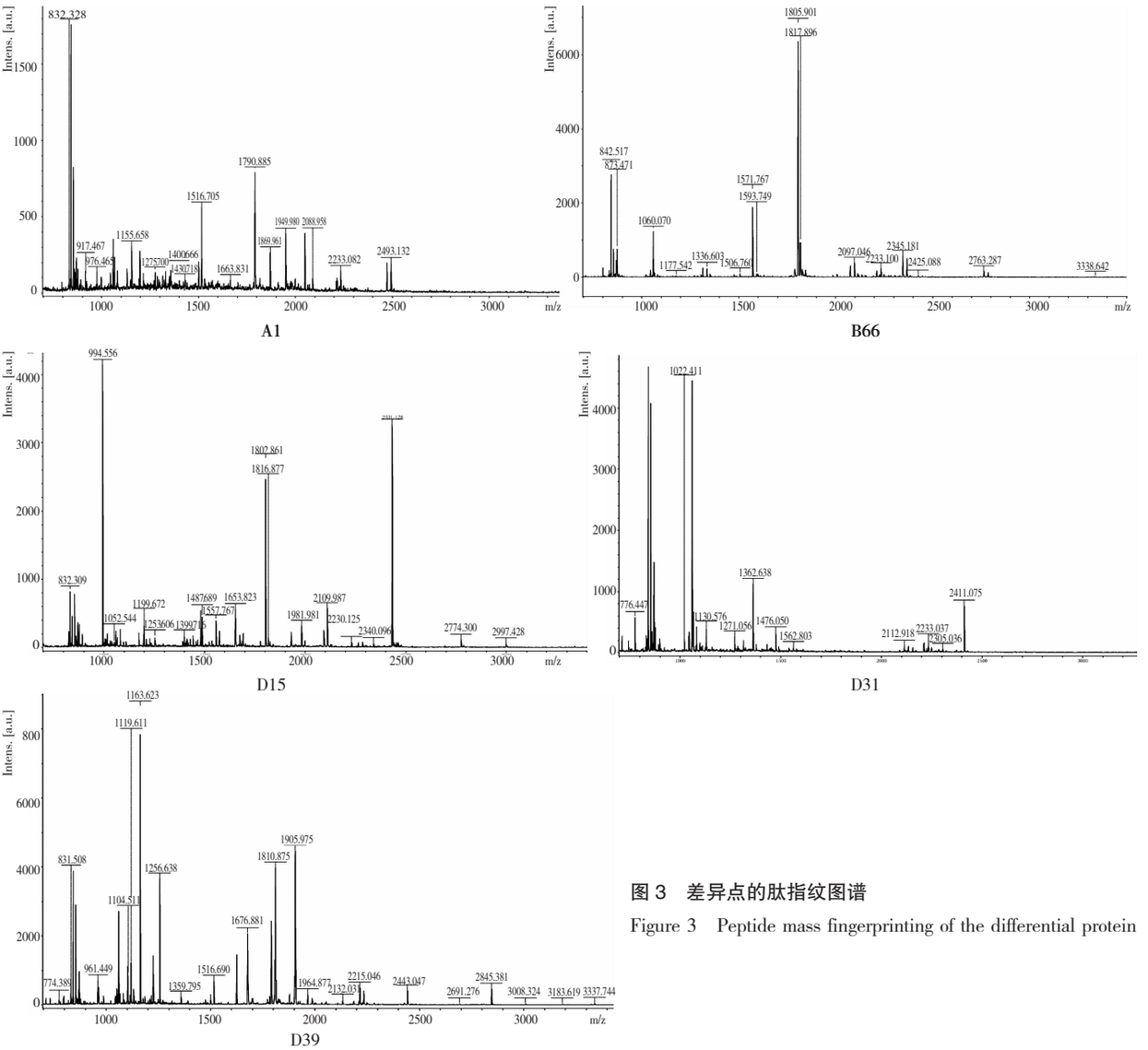


图 3　差异点的肽指纹图谱

Figure 3　Peptide mass fingerprinting of the differential protein

(heat shock protein，HSP)和 COP9 对我们的研究有重要意义。

FASN 是体内合成内源性饱和脂肪酸的关键酶，主要参与细胞的增殖、分化和机体能量及脂类代谢。FASN 通过影响细胞增殖与脂肪酸代谢，与癌症、肥胖、2 型糖尿病和冠心病的危险因素密切相关。在动脉粥样硬化的研究中，FASN 的主要产物棕榈酸等饱和脂肪酸为动脉粥样硬化斑块的主要成分[6-7]。FASN 还可利用 NADPH 还原酶通过缩合反应合成新生内源性脂肪酸[8-9]，研究发现，巨噬细胞的 FSAN 被抑制后胆固醇及甘油三酯含量均有所减少[10]。本实验中激素干预后 MSCs 的 FASN 水平升高，表明激素可能引起其脂肪代谢紊乱及内源性脂肪酸增多。

NMHC 是非肌肉肌球蛋白 II(NMII)的组成部分，NMII 可为细胞内分子运动提供动力，同时参与细胞迁移、黏附、胞质分裂等各种生理活动，NMII 被抑制后会造成细胞黏附能力的下降，有研究发现小鼠胚胎干细胞敲除，可发现细胞间黏附缺失，小鼠不能发育成正常的内脏内胚层[11]。激素干预后的 MSCs 的 NMHC 水平降低，表明其生长、黏附等多项生命活动受到影响。

HSP 是人体内的一种应激蛋白，在高温、感染、创伤等应激状态下被诱导表达，HSP 可分为 5 类：小分子 HSP(sHSP)，HSP60，HSP70，HSP90 和 HSP 110。HSP27 属 sHSP 家族，可阻断应激状态下肌动蛋白和肌动蛋白丝的分裂，从而维持细胞的结构[12]，还可抑制 Cytc 释放和 Bax 介导的线粒体伤害[13]。HSP70 可通过阻止细胞色素 C 释放起到抗凋亡作用，

并抑制凋亡诱导因子从而保护细胞[14]。本实验中木豆叶含药血清组 MSCs 中 HSP 的升高说明其自我保护能力增强。

COP9 是一种核蛋白复合体，由 S1-S8 共 8 个亚单位组成，介导细胞内广泛的信号传导。本实验发现的 S5 参与了应激活化蛋白激酶(JNK)介导的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途经，MAPK 途径是调节 MSCs 分化的细胞转导途径之一。JNK 通路在转导胞外信号至核转录因子时起重要作用。有学者研究发现发现 JNK 能改变骨钙素的 mRNA 水平，骨形态发生蛋白 2(BMP2)从转录水平活化 JNK，从而诱导成骨细胞分化[15-16]。本实验中木豆叶含药血清组 COP9 的升高说明木豆叶可能对 JNK 通路产生影响。

综上所述，干细胞在受到大剂量激素的干预后，NMII 被抑制影响了干细胞的正常生命活动，FASN 水平的提高，增加了 MSCs 内源性脂肪酸的产生，造成脂肪代谢紊乱。骨坏死是骨组织破坏大于修复的结果，激素的使用使血液黏稠度增高，血脂异常，股骨头内由于栓塞等原因造成供血不足、骨细胞坏死，上述两种蛋白的变化干扰了 MSCs 正常的分化、修复作用，造成破坏大于修复，形成股骨头坏死。木豆叶干预后 MSCs 的 FASN 没有显著变化，故不能说明木豆叶有通过此途径减少细胞内源性脂肪酸生成的作用，而 HSP 和 COP9 表达水平的显著升高，提示其作用机理可能在于提高 MSCs 的应激性和自我保护作用，同时通过 MAPK 途径促进了 MSCs 的成骨分化从而加速修复骨坏死，这种促进成骨分化的机制有待进一步的实验研究证实。

参考文献：

[1] Kawai K，Tamaki A. Hirohata K. Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. A histochemical and electron microscopic study[J]. J Bone Joint Surg Am，1985，67（5）：755-763.

[2] 罗文正，刘红，郑稼，等. 木豆叶总黄酮对股骨头坏死大鼠的作用及机制研究[J]. 中国药师，2009，12(7)：857-859.

[3] 史达. 木豆叶联合骨髓间充质干细胞治疗股骨头坏死的实验与相关临床研究[D]. 广州：广州中医药大学，2007.

[4] 颜东亮. 木豆叶提取物对急性放射性皮炎的作用及其机理研究[D]. 广州：广州中医药大学，2012.

[5] 史风雷，李刚，王海彬，等. 袁氏生脉成骨胶囊对激素诱导骨髓基质细胞成脂分化的拮抗作用[J]. 广州中医药大学学报，2003，12(20)：302-304.

[6] Insull WJ，Bartsch GE. Cholesterol，triglyceride，and phospholipid content of intima，media，and atherosclerotic fatty streak in human thoracic aorta[J]. J Clin Invest，1966，45(4)：513-523.

[7] Lang PD，Insull WJ. Lipid droplets in atherosclerotic fatty streaks of human aorta[J]. J Clin Invest，1970，49(8)：1479-1488.

[8] Hillgartner FB，Salati LM，Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis[J]. Physiol Rev，1995，75(1)：47-76.

[9] Semenkovich CF. Regulation of fatty acid synthase(FAS)[J]. Prog Lipid Res，1997，36(1)：43-53.

[10] Rae C，Graham A. Fatty acid synthase inhibitor，C75，blocks resistin-induced increases in lipid accumulation by human macrophages [J]. Diabetes Obes Metab，2008，10(12)：1271-1274.

[11] Conti MA，Even-Ram S，Liu C，et al. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice[J]. J Biol Chem，2004，279(40)：41263-41266.

[12] Dillmann WH. Small heat shock proteins and protection against injury [J]. Ann N Y Acad Sci，1999，874：66-68.

[13] Havasi A，Li Z，Wang Z，et al. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism[J]. J Biol Chem，2008，283(18)：12305-12313.

[14] Ravagnan L，Gurbuxani S，Susin SA，et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor[J]. Nat Cell Biol，2001，3(9)：839-843.

[15] Guicheux J，Lemonnier J，Ghayor C，et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation[J]. J Bone Miner Res，2003，18(11)：2060-2068.

[16] Suzuki A，Ghayor C，Guicheux J，et al. Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells[J]. J Bone Miner Res，2006，21（5）：674-683.

（编辑：邓响潮）

欢迎订阅《中药新药与临床药理》，邮发代号：46-210