丁苯酞对大鼠骨髓间充质干细胞炎性损伤的改善作用及机制Δ

赵二义[1]*，赵仲艳[1]，王带媚[2]，黄培坚[1]，黄仕雄[1]，胡诗俊[1]，谢　凌[1]，陈正萍[3]#（1.海南省人民医院/海南医学院附属海南医院神经内科，海口　570311；2.海南省人民医院/海南医学院附属海南医院药学部，海口　570311；3.重庆市黔江中心医院药学部，重庆　409099）

中图分类号　R965；R743　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）08-0946-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.08.10

摘　要　目的　研究丁苯酞对大鼠骨髓间充质干细胞（BMSCs）炎性损伤的改善作用及其可能机制。**方法**　将大鼠BMSCs分为对照组、模型组和丁苯酞低、中、高浓度组（10、20、50 μmol/L）。体外培养BMSCs并采用脂多糖（终浓度为10 mg/L）建立炎性损伤模型，经丁苯酞干预后检测细胞存活率、凋亡率和细胞培养液中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素1β（IL-1β）、白细胞介素6（IL-6）含量以及细胞中核因子κB（NF-κB）p65 mRNA和胱天蛋白酶3（caspase-3）、B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）和NF-κB p65蛋白表达。**结果**　与对照组比较，模型组细胞存活率和Bcl-2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；细胞凋亡率，TNF-α、IL-1β、IL-6含量，NF-κB p65 mRNA以及caspase-3、Bax、NF-κB p65蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，丁苯酞各浓度组上述指标均显著逆转（$P<0.05$），且呈浓度依赖性。**结论**　丁苯酞对脂多糖诱导的BMSCs炎性损伤具有改善作用，其机制可能与抑制NF-κB信号通路有关。

关键词　丁苯酞；骨髓间充质干细胞；脂多糖；炎性损伤；大鼠

Improvement effect and mechanism of *N*-butylphthalide on inflammatory injury of bone marrow mesenchymal stem cells in rats

ZHAO Eryi[1], ZHAO Zhongyan[1], WANG Daimei[2], HUANG Peijian[1], HUANG Shixiong[1], HU Shijun[1], XIE Ling[1], CHEN Zhengping[3] (1. Dept. of Neurology, Hainan General Hospital/Hainan Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311, China; 2. Dept. of Pharmacy, Hainan General Hospital/Hainan Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311, China; 3. Dept. of Pharmacy, Qianjiang Central Hospital of Chongqing, Chongqing 409099, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the improvement effect and possible mechanism of *N*-butylphthalide on inflammatory injury of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in rats. **METHODS** BMSCs of rats were divided into control group, model group, *N*-butylphthalide low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups (10, 20, 50 μmol/L). BMSCs were cultured *in vitro* and lipopolysaccharide (the final concentration of 10 mg/L) was used to establish the inflammatory injury model. After the intervention of *N*-butylphthalide, the survival rate, apoptotic rate, the contents of tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin 1β (IL-1β) and IL-6 in cell culture medium, the mRNA expression of nuclear factor-κB (NF-κB) p65, and the protein expressions of caspase-3, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax) and NF-κB p65 in cells were detected. **RESULTS** Compared with control group, the survival rate and protein expression of Bcl-2 were decreased significantly in model group ($P<0.05$); the apoptotic rate, contents of TNF-α, IL-1β and IL-6, the mRNA expression of NF-κB p65, and the protein expressions of caspase-3, Bax and NF-κB p65 were increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, above indexes were significantly reversed in all concentration groups of *N*-butylphthalide ($P<0.05$), in concentration-dependent manner. **CONCLUSIONS** *N*-butylphthalide can ameliorate the inflammatory injury of BMSCs induced by lipopolysaccharide, and its mechanism may be related to the inhibition of NF-κB signaling pathway.

KEYWORDS　*N*-butylphthalide; bone marrow mesenchymal stem cell; lipopolysaccharide; inflammatory injury; rat

缺血性脑卒中是最常见的神经系统疾病，具有高致残率、高致死率和高复发率等特征。仅有少数患者采用静脉/动脉注射重组组织纤溶酶原激活剂或血管内治疗来改善缺血性脑卒中的预后，绝大多数患者会错失最佳治疗时间窗。近年来，利用骨髓间充质干细胞（bone

Δ**基金项目**　海南省重点研发计划科研项目（No.ZDYF2021SHFZ112）；海南省卫生健康行业科研项目（No.20A200223）

***第一作者**　副主任医师，硕士。研究方向：脑血管病基础与临床、干细胞神经元分化。电话：0898-68622179。E-mail：zhaoguanduo@126.com

\# **通信作者**　副主任药师。研究方向：临床药学。电话：023-79245775。E-mail：chenzhengping1974@163.com

marrow mesenchymal stem cells，BMSCs）作为治疗手段已经成为脑卒中研究的热点。BMSCs具有多向分化的能力，在特定条件下，可分化为神经细胞、胶质细胞、成骨细胞等细胞类型[1]。然而，BMSCs移植治疗脑卒中2期临床试验指出，虽然BMSCs移植可以显著改善脑卒中患者神经功能缺损症状，但是移植的细胞在体内存活时间不超过1个月[2]。因此，通过抗氧化剂和凋亡抑制剂保护移植的BMSCs免受凋亡，提高其在炎性环境下的生存能力和存活率，可能是移植BMSCs治疗脑卒中成功的关键。

丁苯酞具有减少炎症因子的释放、促进神经营养因子的分泌和血管新生以及抗氧化应激损伤等作用，广泛参与调控细胞的增殖、分化和凋亡等一系列病理生理过程[3－4]。丁苯酞可通过抑制Toll样受体4（Toll-like receptor 4，TLR4）/核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）信号传导，下调肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、白细胞介素18（interleukin 18，IL-18）和IL-1β等细胞因子的表达，抑制皮层和海马组织的星形胶质细胞活化，减轻脑缺血再灌注炎性损伤[5]。但是丁苯酞对炎性损伤的BMSCs是否存在类似保护作用，尚未见报道。基于此，本实验研究丁苯酞对脂多糖诱导的BMSCs炎性损伤的作用及其可能的机制，为丁苯酞联合BMSCs移植治疗缺血性脑卒中、脊髓损伤或其他神经系统疾病提供新的思路。

1　材料

1.1　主要仪器

本研究所用主要仪器包括ELx800型酶标仪（美国BioTek公司），BX41型荧光显微镜（日本Olympus公司），TC-EA型普通聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）扩增仪（杭州博日科技有限公司），EPS-600型数显式稳流电泳仪、VE-186型转移电泳槽、Tanon 2500型凝胶成像系统（上海天能科技有限公司）。

1.2　主要药品与试剂

丁苯酞氯化钠注射液（批号6182206125，规格100 mL∶丁苯酞25 mg与氯化钠0.9 g）购自石药集团恩必普药业有限公司；胎牛血清、DMEM液体培养基、噻唑蓝（MTT，批号M2128-1G）均购自美国Sigma公司；TNF-α、IL-1β、IL-6酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（货号分别为20181118、20181005、20181018）均购自上海酶联生物科技有限公司；兔抗大鼠胱天蛋白酶3（caspase-3）、B细胞淋巴瘤2（B cell lymphoma 2，Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 related X protein，Bax）、NF-κB p65抗体及山羊抗兔IgG二抗（H&L）（货号分别为184787、194583、182734、194726、6721）均购自英国Abcam公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH，货号GB11002）购自武汉赛维尔生物科技有限公司；RNeasy Mini试剂盒、一步法RT-PCR试剂盒（货号分别为217004、210210）均购自德国Qiagen公司；一步法Tunel细胞凋亡检测试剂盒（货号C1088）购自上海碧云天生物技术有限公司；其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3　实验动物

2月龄SPF级健康Wistar雄性大鼠，体质量100～150 g，由海南省实验动物中心提供，生产许可证号为SCXK（琼）2019-0007。大鼠用颗粒饲料饲养，饲养环境的温度为21～27 ℃，相对湿度为40%～70%，明暗时长各为12 h。

2　实验方法

2.1　大鼠BMSCs的分离培养、鉴定及实验分组

参考本课题组以往的方法[6]，在无菌条件下从大鼠股骨干和胫骨干提取BMSCs，在恒温培养箱中培养，间隔2 d更换培养基（DMEM液体培养基+15%胎牛血清+0.5 mol/L谷氨酰胺，下同），置于显微镜下动态监测其生长状态，连续传代培养4～6代冻存备用。特异性蛋白CD29和CD44表达阳性表明成功提取到BMSCs。

2.2　分组与给药

参照文献方法[4,7]，将实验分为对照组、模型组和丁苯酞低、中、高浓度组（10、20、50 μmol/L），除对照组外，其余各组加入10 mg/L的脂多糖和相应浓度的丁苯酞。

2.3　细胞存活率检测

采用MTT比色法进行检测。取第4代BMSCs转至96孔板，每孔100 μL含细胞1×10^{5}个，细胞贴壁后24 h，更换培养基，按“2.2”项下方法分组、给药，每组6个复孔。培养24 h后，吸弃培养基，以磷酸盐缓冲液（PBS）清洗3次，每孔加新鲜培养基100 μL、MTT（5.0 mg/mL）50 μL，孵育4 h；离心弃上清液，再加入二甲基亚砜200 μL，继续孵育到结晶全部溶解。以空白孔调零，采用酶标仪测定570 nm波长处的吸光度（A），计算存活率，存活率（%）=（实验组A值/对照组A值）×100%。

2.4　细胞凋亡率检测

采用Tunel法进行检测。按照“2.3”项下方法取BMSCs，培养、分组、给药，每组6个复孔。培养24 h后，吸弃培养基，以PBS清洗3次，用4%多聚甲醛固定30 min，1%过氧化氢作用20 min，Tunel反应液在37 ℃下培育60 min，封片，置于荧光显微镜下观察记录，红色为凋亡细胞。各组均随机采集5个视野的细胞，尽可能保证视野下每张图含有相同的细胞数，计算细胞的凋亡率。

2.5　细胞炎症因子含量检测

采用ELISA法进行检测。取第4代的BMSCs转至12孔板，每孔2 mL含细胞2×10^{6}个，培养至细胞融合度为60%～70%时备用。按“2.2”项下方法分组、给药，每组6个复孔，培养24 h后，收集培养液，按试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测各组BMSCs培养液中TNF-α、IL-1β、IL-6的含量。

2.6　NF-κB p65 mRNA表达检测

采用RT-PCR法进行检测。按照“2.5”项下方法取BMSCs，培养、分组、给药，每组6个复孔，培养24 h后，吸弃培养基，以PBS清洗3次，利用RNeasy Mini试剂盒提取各组BMSCs的RNA，按照一步法RT-PCR试剂盒说

明书操作，以GAPDH为内参，检测NF-κB p65 mRNA表达。总反应体系为50 μL，包含5×缓冲液10 μL、dNTP混合物2 μL、酶混合物2 μL、5×Q-溶解液10 μL、RNA酶抑制剂1 μL、RNA 2 μL、上下游引物各0.5 μL、无RNA酶水22 μL。扩增条件如下：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性1 min，58 ℃退火1 min，72 ℃延伸1 min，共行35个循环；然后72 ℃延伸10 min。采用凝胶图像分析系统（3.0版）分析NF-κB p65 mRNA表达水平。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司设计合成，序列与产物大小见表1。

表1　引物序列与产物大小

基因	引物序列（5′-3′）	产物长度/bp
NF-κB p65	上游引物：ATGTGGAGATCATTGAGCAGC	151
	下游引物：CCTGGTCCTGTGTAGCCATT	
GAPDH	上游引物：TGTTCGTCATGGGTGTGAAC	154
	下游引物：ATGGCATGGACTGTGGTCAT	

2.7　NF-κB p65、caspase-3、Bax和Bcl-2蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。按照“2.5”项下方法取BMSCs，培养、分组、给药，每组6个复孔，培养24 h后，吸弃培养基，以PBS清洗3次，用细胞裂解液（200 μL）裂解，离心收集上清蛋白质标本，采用BCA方法检测蛋白质含量。蛋白变性后用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离细胞总蛋白，取样20 μg进行电泳，电泳结束后将蛋白质移至硝酸纤维素膜。取出膜置于室温条件下，用山羊血清封闭3 h，加入兔抗大鼠NF-κB p65、caspase-3、Bax、Bcl-2、GAPDH抗体（稀释比均为1∶200），4 ℃培育24 h；加入碱性磷酸酶标记的山羊抗兔IgG二抗（稀释比为1∶100），37 ℃培育60～120 min，用DAB显色检测棕黄色条带。拍照记录结果，运用Quantity One软件系统分析图片的灰度值，以GAPDH为内参，以目标蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示目标蛋白相对表达量。

2.8　统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t法。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　各组BMSCs的存活率比较

如表2显示，与对照组比较，模型组和丁苯酞低、中、高浓度组BMSCs的存活率均显著降低（$P<0.05$），其中模型组存活率最低；与模型组比较，丁苯酞低、中、高浓度组BMSCs的存活率均显著升高（$P<0.05$），且呈浓度依赖性，以丁苯酞高浓度组BMSCs的存活率最高。

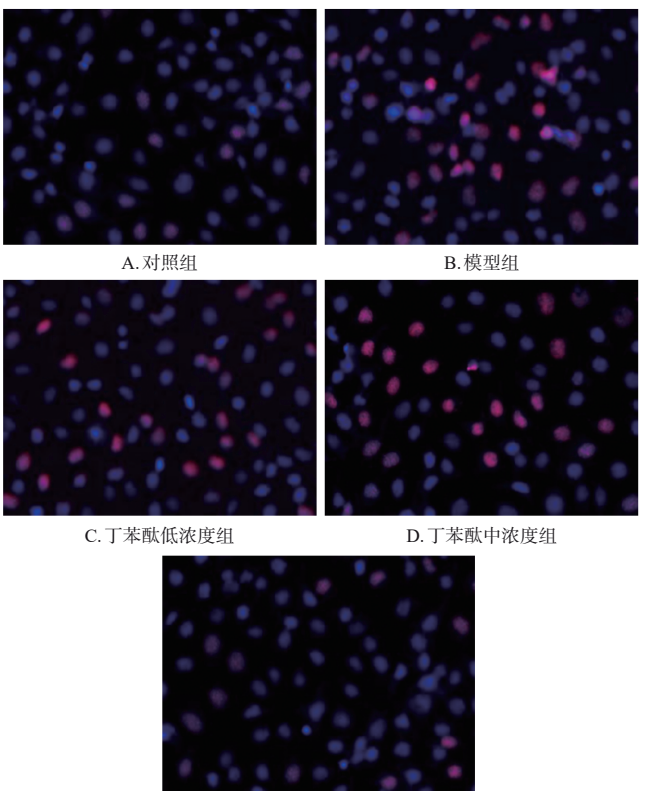
3.2　各组BMSCs的凋亡率比较

如表2、图1显示，与对照组比较，模型组和丁苯酞低、中、高浓度组BMSCs的凋亡率均显著升高（$P<0.05$），其中模型组凋亡率最高；与模型组比较，丁苯酞低、中、高浓度组BMSCs的凋亡率均显著降低（$P<0.05$），且呈浓度依赖性，以丁苯酞高浓度组BMSCs的凋亡率最低。

表2　各组BMSCs的存活率及凋亡率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，%）

组别	存活率	凋亡率
对照组	78.2±1.9	16.5±2.7
模型组	45.2±3.2[a]	51.3±3.0[a]
丁苯酞低浓度组	55.6±1.6[ab]	39.6±1.5[ab]
丁苯酞中浓度组	63.6±3.1[abc]	31.2±2.1[abc]
丁苯酞高浓度组	70.7±1.5[abcd]	21.2±2.3[abcd]
F	39.755	243.423
P	<0.001	<0.001

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与丁苯酞低浓度组比较，$P<0.05$；d：与丁苯酞中浓度组比较，$P<0.05$



A.对照组　B.模型组　C.丁苯酞低浓度组　D.丁苯酞中浓度组　E.丁苯酞高浓度组

图1　各组BMSCs的凋亡染色图（Tunel法，×200）

3.3　各组BMSCs培养液中TNF-α、IL-1β、IL-6含量比较

如表3显示，与对照组比较，模型组和丁苯酞低、中、高浓度组BMSCs培养液中TNF-α、IL-1β、IL-6含量均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，丁苯酞低、中、高浓度组BMSCs培养液中TNF-α、IL-1β、IL-6含量均显著降低（$P<0.05$），且呈浓度依赖性，以丁苯酞高浓度组BMSCs培养液中的含量最低。

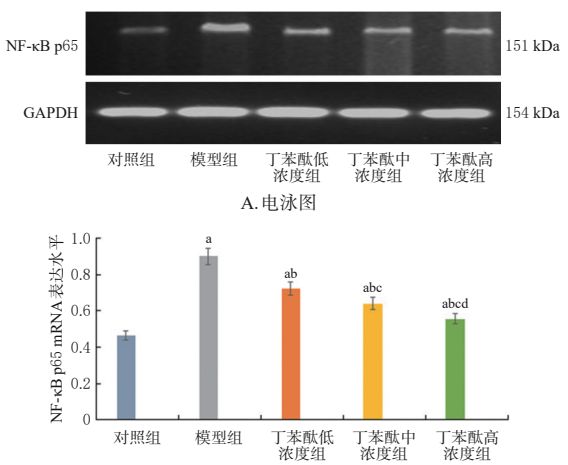
3.4　各组BMSCs中NF-κB p65 mRNA表达比较

如图2显示，与对照组比较，模型组和丁苯酞低、中、高浓度组BMSCs中NF-κB p65 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$），其中模型组最高；与模型组比较，丁苯酞低、中、高浓度组BMSCs中NF-κB p65 mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$），且呈浓度依赖性，以丁苯酞高浓度组NF-κB p65 mRNA表达水平最低。

表3　各组BMSCs培养液中TNF-α、IL-1β、IL-6含量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，pg/mL）

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
对照组	71.3±6.6	52.6±1.9	109.5±3.7
模型组	215.3±8.6[a]	148.3±2.5[a]	274.2±1.5[a]
丁苯酞低浓度组	175.2±3.1[ab]	105.1±3.1[ab]	213.9±4.2[ab]
丁苯酞中浓度组	131.0±4.5[abc]	85.4±3.7[abc]	177.8±1.2[abc]
丁苯酞高浓度组	79.9±4.1[abcd]	62.3±3.5[abcd]	144.6±2.2[abcd]
F	341.606	474.071	81.434
P	<0.001	<0.001	<0.001

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与丁苯酞低浓度组比较，$P<0.05$；d：与丁苯酞中浓度组比较，$P<0.05$



a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与丁苯酞低浓度组比较，$P<0.05$；d：与丁苯酞中浓度组比较，$P<0.05$

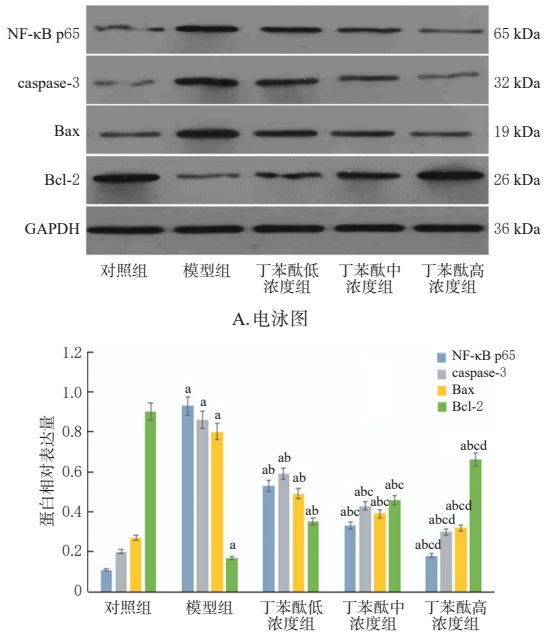
图2　各组BMSCs中NF-κB p65 mRNA表达比较

3.5　各组BMSCs中NF-κB p65、caspase-3、Bax和Bcl-2蛋白表达比较

如图3显示，与对照组比较，模型组和丁苯酞低、中、高浓度组BMSCs中NF-κB p65、caspase-3、Bax蛋白相对表达量均显著升高（$P<0.05$），Bcl-2蛋白相对表达量均显著降低（$P<0.05$），其中模型组变化最显著；与模型组比较，丁苯酞低、中、高浓度组BMSCs中NF-κB p65、caspase-3、Bax蛋白相对表达量均显著降低（$P<0.05$），Bcl-2蛋白相对表达量均显著升高（$P<0.05$），且呈浓度依赖性，以丁苯酞高浓度组变化最显著。

4　讨论

脑卒中是危害人类健康的重大疾病之一，无菌性炎症贯穿缺血性脑卒中的整个病理生理过程。在脑动脉闭塞发生后，炎症反应、氧化应激及细胞凋亡等一系列事件可进一步加重缺血脑组织损伤[8]。脑组织缺血后的炎性微环境是影响移植后细胞存活率的重要因素。为了解决缺血性脑卒中患者BMSCs移植后细胞存活率较低的困境，需要改善核心梗死区及缺血半暗带周围恶劣的微环境。近年有研究证实，通过药物预处理BMSCs，可减弱炎症因子释放，改善微环境条件，从而提高移植后细胞的存活率[9-10]。脂多糖是革兰氏阴性细菌



a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与丁苯酞低浓度组比较，$P<0.05$；d：与丁苯酞中浓度组比较，$P<0.05$

图3　各组BMSCs中NF-κB p65、caspase-3、Bax和Bcl-2蛋白表达比较

内毒素，可以激动TLR-4，活化NF-κB信号传导通路，刺激促炎信号级联反应，是一种重要的致炎诱导剂[11]，广泛应用于模拟炎性损伤研究。本实验采用脂多糖诱导BMSCs炎性损伤，结果显示，与对照组比较，模型组细胞存活率显著降低，凋亡率和促凋亡蛋白caspase-3、Bax表达均显著升高，抑凋亡蛋白Bcl-2表达显著降低，提示炎性微环境对BMSCs的生存有不利影响；与模型组比较，丁苯酞各浓度组细胞存活率均显著升高，凋亡率和caspase-3、Bax蛋白表达均显著降低，Bcl-2蛋白表达均显著升高，且呈浓度依赖性，表明丁苯酞对脂多糖诱导的BMSCs炎性损伤具有明显的改善作用。

NF-κB是一种重要转录调控因子，广泛表达于哺乳动物细胞中，可特异性结合众多细胞基因的启动子及增强子序列位点，然后调控各种重要的细胞因子、生长因子、趋化因子、黏附分子和免疫受体的表达，参与调节机体的免疫应答、炎症反应及细胞的增殖、分化和凋亡等生命活动[12]。本研究结果显示，与对照组比较，脂多糖可诱导BMSCs培养液中的炎症细胞因子IL-1β、IL-6、TNF-α的含量升高，促进NF-κB p65 mRNA及蛋白表达；而丁苯酞可降低上述炎症细胞因子含量，抑制NF-κB p65 mRNA及蛋白表达，表明丁苯酞可拮抗脂多糖致炎作用，减弱细胞炎性损伤和NF-κB信号通路的活性。

综上所述，丁苯酞对脂多糖诱导的BMSCs炎性损伤具有改善作用，其机制可能与抑制NF-κB信号通路有关。

（下转第960页）